

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Identifikace peptidů navázaných na MHC I
molekulách pomocí hmotnostní spektrometrie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Lubomír Machalla
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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

.....
Podpis studenta

Chtěl bych zde poděkovat mé vedoucí diplomové práce Mgr. Kateřině Zachové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady a odborné vedení při vypracování předkládané diplomové práce. Poděkování rovněž náleží pracovišti Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého, kde mi bylo umožněno tuto práci zrealizovat a také velké poděkování patří panu prof. Mgr. Markovi Šebelovi, Dr. za jeho pomoc a odborné rady při vypracování diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lubomír Machalla
Název práce	Identifikace peptidů navázaných na MHCI molekulách pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav imunologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Dendritické buňky jsou buňky imunitního systému, které propojují jeho vrozenou a získanou část. Patří mezi tzv. profesionální antigen prezentující buňky, které dokáží pohltnout antigen pomocí fagocytózy a následně takový antigen rozložit na peptidové fragmenty. Tyto fragmenty poté dendritická buňka vystavuje na svém povrchu pomocí MHC molekul. V rámci diplomové práce byla věnována pozornost MHC I molekule a peptidům nacházejícím se na této molekule. K dendritickým buňkám byl přidán rekombinantní RBD protein pocházející z viru SARS-CoV-2. Pomocí imunoafinitní chromatografie byl komplex MHC I – peptid izolován z buněčného lyzátu. Následovalo štěpení komplexu MHC I – peptid trypsinem a kapalinová chromatografie, kde byly odseparovány jednotlivé peptidy. Identifikace peptidů byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie. Celkově analýza byla provedena 3x z důvodu optimalizace metody. Získané aminokyselinové sekvence peptidů byly následně porovnány pomocí databáze UniProt. Ve vzorku bylo nalezeno více jak 100 peptidů a identifikováno bylo celkem 14 proteinů, kde u 10 proteinů byla velice nízká shoda. U zbývajících 4 proteinů byla shoda vyšší. Hlavním identifikovaným proteinem byl myší IgG. Bohužel nebyl nalezen peptid, u kterého bychom mohli konstatovat, že pocházel z naší přidané RBD domény. Tento postup je proto důležité dále optimalizovat, aby mohl být využíván ke zhodnocení efektivity navržených antigenních konstruktů potenciálně sloužících jako vakcíny.

Klíčová slova	Dendritické buňky, Spike protein, receptor vázající doména, hlavní histokompatibilní komplex, peptid
---------------	--

hmotnostní spektrometrie

Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Lubomír Machalla
Title	Identification of MHCI bound peptides using a mass spectrometry
Type of thesis	Diploma
Department	Palacky University, Faculty of Medicine and Dentistry, Department of Immunology, Olomouc
Supervisor	Mgr. Kateřina Zachová, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

Dendritic cells are cells of the immune system that connect its innate and adaptive parts. Dendritic cells belong to the group called professional antigen-presenting cells, which can absorb the antigen by phagocytosis and subsequently break down the antigen into peptide fragments. These fragments are then displayed on the cell surface using MHC molecules. Within the diploma thesis, attention was paid to the MHC I molecule and peptides bound on this molecule. To the dendritic cells was added recombinant RBD protein derived from SARS-CoV-2. The MHC I – peptide complex was isolated from the cell lysate by immunoaffinity chromatography. After that complex MHC I - peptide was digested by trypsin and peptides from the complex were separated by liquid chromatography. To the identification of peptides was used mass spectrometry. The analysis was performed 3 times to optimize the method. The obtained amino acid peptide sequences were compared using the UniProt database. More than 100 peptides were found in the sample and a total of 14 proteins were identified. Ten proteins were very low matched. The remaining 4 proteins were more matched. The main identified protein was mouse IgG. Unfortunately, no peptide from the RBD domain was found. It is therefore important further optimize this method so that it can be used to evaluate the effectiveness of proposed antigenic constructs potentially used as vaccines.

Keywords	Dendritic cells, Spike protein, receptor binding domain, major histocompatibility complex, mass
----------	---

spectrometry, peptide

Number of pages 64

Number of appendices 0

Language Czech

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	3
2.1	Antigen prezentující buňky	3
2.1.1	Dendritické buňky	3
2.2	MHC molekuly	4
2.2.1	Struktura a funkce MHC I molekul.....	4
2.2.2	„Neklasické“ MHC molekuly I. třídy	6
2.2.3	Vazba peptidů na MHC I a jejich prezentace.....	6
2.2.4	Vazba peptidů na MHC II a jejich prezentace	8
2.2.5	Zkřížená antigenní prezentace (antigen cross presentation)	10
2.2.6	Cesta zkřížené antigenní prezentace (Cytosolová cesta)	11
2.2.6.1	Cesta z endosomu do cytosolu.....	11
2.2.6.2	Cesta z endosomu do cytosolu a zpět do endosomu	12
2.2.6.3	Zkřížená antigenní prezentace-Vakuolární cesta.....	13
2.2.6.4	Zkřížená antigenní prezentace pomocí mezibuněčné komunikace 14	
2.3	Koronaviry.....	15
2.3.1	Virus SARS-CoV-2 a jeho struktura.....	16
2.3.2	Spike protein	17
2.3.3	Odolnost proti SARS-CoV-2 podle krevní skupiny	21
2.3.4	Jednotlivé vakcíny proti SARS-CoV-2.....	21
2.4	Hmotnostní spektrometrie	25
2.4.1	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)	26
2.4.2	Průletový analyzátor „Time of Flight“ (TOF)	27
2.5	Afinitní chromatografie	27
3	Experimentální část.....	29
3.1	Materiál	29
3.1.1	Použité chemikálie	29
3.1.2	Použité roztoky.....	30
3.1.3	Přístroje a pomůcky.....	31
3.2	Použité metody	32
3.2.1	Produkce RBD Spike SARS-CoV-2 v 293F buněčné linii	32

3.2.2	Purifikace a zakoncentrování RBD proteinu.....	33
3.2.3	SDS PAGE elektroforéza.....	33
3.2.4	Kvantifikace proteinu pomocí BCA metody	34
3.2.5	Kvantifikace proteinu pomocí SDS PAGE.....	35
3.2.6	Příprava kompletního kultivačního média IMDM.....	35
3.2.7	Kultivace adherentních buněk.....	35
3.2.8	Příprava CNBr aktivované Sepharosy na afinitní chromatografii	36
3.2.9	Pulzace dendritických buněk RBD doménou Spike proteinu.....	37
3.2.10	Izolace komplexu MHC I – peptid z dendritických buněk	37
3.2.11	Měření pomocí hmotnostní spektrometrie	38
4	Výsledky	39
4.1	SDS PAGE elektroforéza	39
4.2	Stanovení koncentrace pomocí BCA metody	40
4.3	Stanovení koncentrace pomocí SDS PAGE.....	42
4.4	Identifikace peptidů navázaných na MHC I.....	45
5	Diskuze	50
6	Závěr	53
7	Seznam použité literatury	55
8	Seznam použitých zkratk	63

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma na popis MHC I prezentace antigenu, struktura MHC I molekuly, její *de novo* syntéza i možnosti recyklace, způsoby predikce peptidů vázaných na MHC I molekulách
2. Vypracování literární rešerše o struktuře viru SARS-CoV-2, charakteristika Spike proteinu
3. Exprese a purifikace savčích proteinů
4. Konjugace specifických protilátek (anti MHC I)
5. Imunoafinitní purifikace komplexu MHCI-peptid
6. Identifikace peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie

1 ÚVOD

Obranyschopnost, nebo jinými slovy imunitní systém, patří ke základním vlastnostem organismu. Obranyschopnost má v každém organismu různé podoby a různé vlastnosti. Bude mít jiné vlastnosti u evolučně starších organismů, kde ještě není vyvinutá adaptivní část imunitního systému a jiné vlastnosti bude mít např. u obratlovců, kde je již adaptivní část imunitního systému známa. U obou případů má však imunitní systém za úkol chránit organismus před škodlivými vlivy vnějšího i vnitřního prostředí a zachovat tak integritu organismu. Imunitní systém můžeme také rozdělit na humorální a buněčnou část. Humorální část tvoří sekrece různých molekul a sérových proteinů, mezi něž řadíme i komplement. Buněčná část se skládá z různých typů buněk. Obě části tvoří nedílnou součást imunitního systému a navzájem kooperují.

U obratlovců, kde se nachází vrozená a získaná část imunitního systému, musí být imunitní systém vybaven buňkami, které tvoří tzv. přechod, nebo také spojnicí, jenž tyto dvě části spojuje. Tento úkol zastávají antigen prezentující buňky (APC). Do APC patří makrofágy, ale především dendritické buňky (DC), které jsou považovány za nejúčinnější APC. Tyto buňky disponují především funkcí fagocytózy, která jim dovoluje pohlcovat, rozkládat a následně spojovat části rozloženého antigenu s molekulou hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Tyto rozložené antigeny spojené s MHC molekulou poté DC vystavuje na svém povrchu.

DC využívají 2 typy MHC molekul (MHC I a MHC II). Rozdíl, zda bude antigen vystaven na MHC I, nebo MHC II molekule spočívá v původu antigenu. Pokud daný antigen je exogenního původu např. z bakterie, bude vystavován na MHC II molekule, zatímco pokud je antigen intracelulární (např. somatický nebo virového původu) bude vystaven na MHC I molekule. Bylo však zjištěno, že ačkoli je antigen exogenního původu, může být vystavován na MHC I molekule. Tomuto jevu se říká zkřížená antigenní prezentace a je dnes velice diskutovaným tématem, protože umožňuje aktivovat CD 8+ T lymfocyty. Ty se aktivují pouze, když je antigenový fragment vystavován na MHC I molekule. Když je antigenový fragment vystavován na MHC II molekule, aktivuje pomocné CD 4+ T lymfocyty, které nemají cytotoxickou schopnost jako CD 8+ T lymfocyty, a proto mají velice omezené účinky proti virem napadeným buňkám nebo rakovinotvorným buňkám. Z tohoto důvodu se dnes upínají pohledy

výzkumu na vývoj vakcín, které by úspěšně aktivovaly oba typy T lymfocytů (Zachova et al., 2016; Hořejší et al., 2017).

S příchodem pandemie viru SARS-CoV-2 se však vývoj vakcín stal veřejností velice diskutovaným tématem. Nesmí se však zapomínat, že v minulosti vakcíny zachránily milióny životů. Jako každý nový objev byla hlavně v minulosti však vakcinace vnímaná spíše negativně než pozitivně. Bohužel biologie a s ní spojená imunologie není matematika, kde je vždy jednoznačný výsledek, a proto vakcinace může sebou také přinášet bohužel určitá rizika. Dokonalá vakcína, která by byla bezpečná a bez vedlejších účinků, efektivní a snadno aplikovatelná, neexistuje. Naštěstí dnešní věda je již na vyšší úrovni, než byla věda v přechozích stoletích a dnešní vakcíny jsou již daleko bezpečnější a očkování je dnes normální rutinní záležitost (Hořejší et al., 2017).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Antigen prezentující buňky

Antigen prezentující buňky (APC) jsou buňky, které se vyznačují hlavně schopností fagocytózy. Do skupiny APC patří dendritické buňky, monocyty, makrofágy, ale také B lymfocyty. Tyto buňky rozeznávají antigen, pohlcují a následně informují adaptivní část imunitního systému o možné infekci. Mezi hlavní APC buňky se řadí dendritické buňky (Hořejší et al., 2017).

2.1.1 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) patří mezi nejučinnější buňky patřící do skupiny APC, a proto představují hlavní spojující článek mezi rychle reagující vrozenou a antigenně specifickou částí imunitního systému. Dendritické buňky můžeme v organismu najít ve dvou formách, a to ve nezralé a zralé formě. Jestliže v organismu není žádná infekce, nezralé dendritické buňky průběžně fagocytují molekuly rozpuštěné v tekutině či odumřelé buňky zdravých tkání. Následně takové pohlcené molekuly zpracují a fragmenty těchto molekul vystavují na svém povrchu v komplexu s MHC molekulami. Specifické T lymfocyty nejsou nezralou dendritickou buňkou aktivovány. Buď jsou utlumeny, nebo jsou z nich vytvořeny tzv. regulační T lymfocyty, které imunitní reakce vůči takovému antigenu potlačují, a proto jsou nezralé dendritické buňky důležité pro zachování tolerance vůči vlastní tkáni. Jestliže dendritická buňka rozezná podnět, který reprezentuje nebezpečí pro organismus (buňky, které zahynou nekrotizací či patogenní mikroorganismus), aktivuje se a stává se z ní zralá dendritická buňka. Mnohé struktury jsou pro patogenní mikroorganismy typické, a proto je dendritická buňka dokáže správně rozpoznat. Tyto struktury jsou sdílené různými mikroorganismy a jsou nezbytné pro jejich život. Někdy tyto struktury bývají označeny jako PAMP (pathogen associated molecular pattern). Příkladem PAMP mohou být např. lipopolysacharidy nebo peptidoglykany. Zároveň i dendritické buňky umí rozeznat i některé molekuly, které pocházejí z poškozených buněk a tkání. Tyto molekuly bývají souhrně označovány jako DAMP (damage associated molecular pattern) a patří mezi ně např. kyselina močová, nukleové kyseliny nebo některé intracelulární proteiny. Pro tyto charakteristické mikrobiální nebo endogenní komponenty mají dendritické buňky a také jiné druhy leukocytů různé druhy receptorů označovány jako PPR (pattern recognition

receptors). Mimořádně důležité jsou TLR (toll-like receptor) receptory, které rozeznávají celou řadu molekul typické pro různé patogeny (lipopolysacharidy, lipoproteiny, virové nukleové kyseliny). Další významnou skupinou jsou CLR (C-type lectin receptors) receptory, které rozeznávají sacharidy, jež jsou součástí mikrobiálních glykoproteinů a polysacharidů. Dále mají dendritické buňky např. scavengerové („uklízecí“) receptory, NLR (NOD-like receptors) receptory nebo RLR (RIG-I-like receptors) receptory. Při aktivaci dendritické buňky se změní její vlastnosti. Aktivované dendritické buňky již nedisponují schopností pohlcovat částice z okolí. Zároveň po aktivaci se výrazně zvýší exprese MHC molekul a také kostimulačních molekul jako např. CD80, CD86. Zralá DC již dokáže aktivovat naivní T lymfocyty (takové, jenž se dosud neseťkaly s antigenem). DC ve zralém stádiu mají životnost 2-3 dny a následně hynou apoptózou. Proto je důležité, aby byly zásoby DC neustále doplňovány z kostní dřeně (Hořejší et al., 2017).

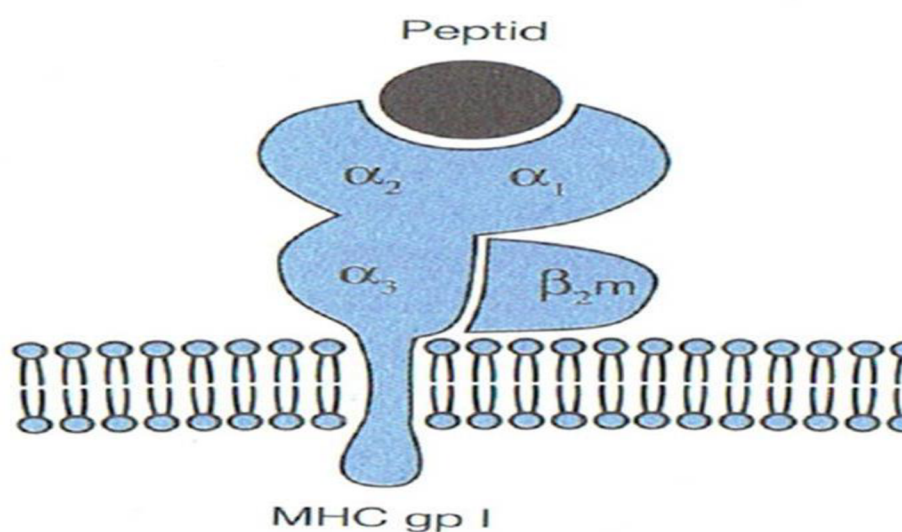
2.2 MHC molekuly

MHC (major histocompatibility complex) glykoproteiny I. třídy (MHC gp I, nebo jen MHC I) se nacházejí na všech jaderných buňkách v organismu, zatímco MHC glykoproteiny II. třídy (MHC II) za fyziologických podmínek pouze na buňkách, které dokáží prezentovat antigen. Jako příklad můžeme uvést DC, makrofágy, monocyty či B lymfocyty. Lidé mají tři klasické izotypy MHC I molekul (HLA-A, -B, -C). Jako HLA se označují lidské MHC I molekuly (human leukocyte antigens). Mezi neklasické MHC I molekuly náleží HLA -E, -F a -G a rovněž také molekuly ze skupiny CD1, které striktně nejsou produkty MHC I, nicméně strukturně a funkčně mají k MHC I glykoproteinům velmi blízko (Hořejší et al., 2017).

2.2.1 Struktura a funkce MHC I molekul

MHC I molekula (Obr. 1) se skládá z transmembránového řetězce α o molekulové hmotnosti 45 kDa a s ním nekovalentně asociovaného β 2-mikroglobulinu o molekulové hmotnosti 12 kDa. V α řetězci lze rozlišit tři domény. Dvě N-terminální α 1 a α 2. Tyto domény vytvářejí místo, na které se mohou vázat peptidy. Třetí doména (α 3) a β 2m jsou podle struktury podobné imunoglobulinovým doménám, což znamená, že jsou tvořeny sekvencí okolo 110-120 aminokyselin a jejich struktura připomíná stejně jako u imunoglobulinových domén jakýsi soudek tvořený smyčkami polypeptidového řetězce

stabilizovaný cystinovým můstkem. Základní funkcí MHC I je vázat peptidové fragmenty proteinů, které buňka produkuje. Následně tyto peptidové fragmenty v komplexu s MHC I molekulou vystavuje na buněčném povrchu tak, aby byly rozeznány T lymfocyty (díky jejich antigenně specifickým receptorům). Aby měla MHC I molekula stabilní konformaci a mohla tak být dlouhodobě exprimována na buněčném povrchu, musí na ní být navázaná peptidová molekula, která pochází z proteinů produkovaných v buňce, a které byly určeny k degradaci proteasomem pomocí tzv. polyubikvitinylace. Na MHC I molekuly se nemusí vázat jen čistě peptidy, nýbrž také chemicky modifikované peptidy (např. glykoproteiny). Některé „neklasické“ MHC I molekuly, tj. např. CD1 mohou vázat místo peptidů lipidové molekuly, které následně předkládají T lymfocytům. Většina somatických buněk na svém povrchu obsahuje až několik desítek tisíc MHC I molekul. Tento počet je ovšem nízký oproti některým leukocytům (hlavně APC), které mají tento počet ještě řádově vyšší (Hořejší et al., 2017).



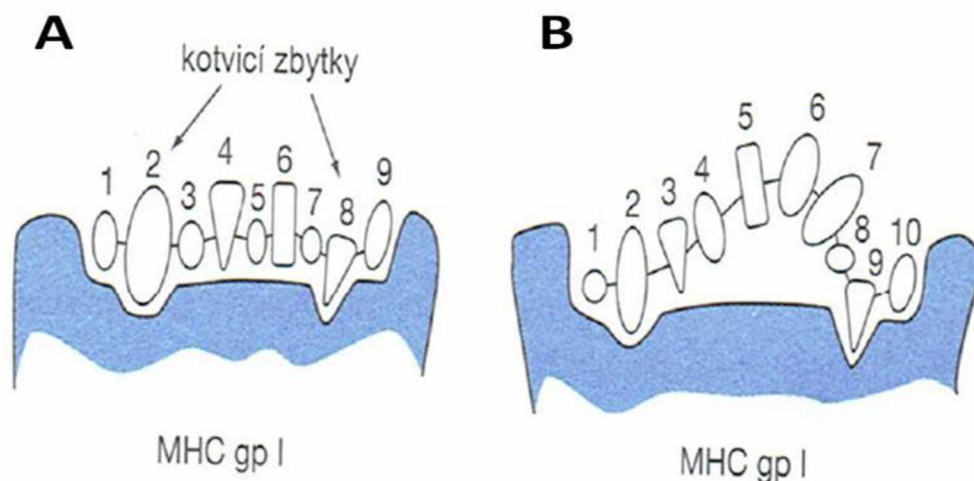
Obrázek č.1: Znárodnění struktury MHC I glykoproteinu (podjednotková struktura)
Převzato a upraveno dle Hořejší et al., 2017

2.2.2 „Neklasické“ MHC molekuly I. třídy

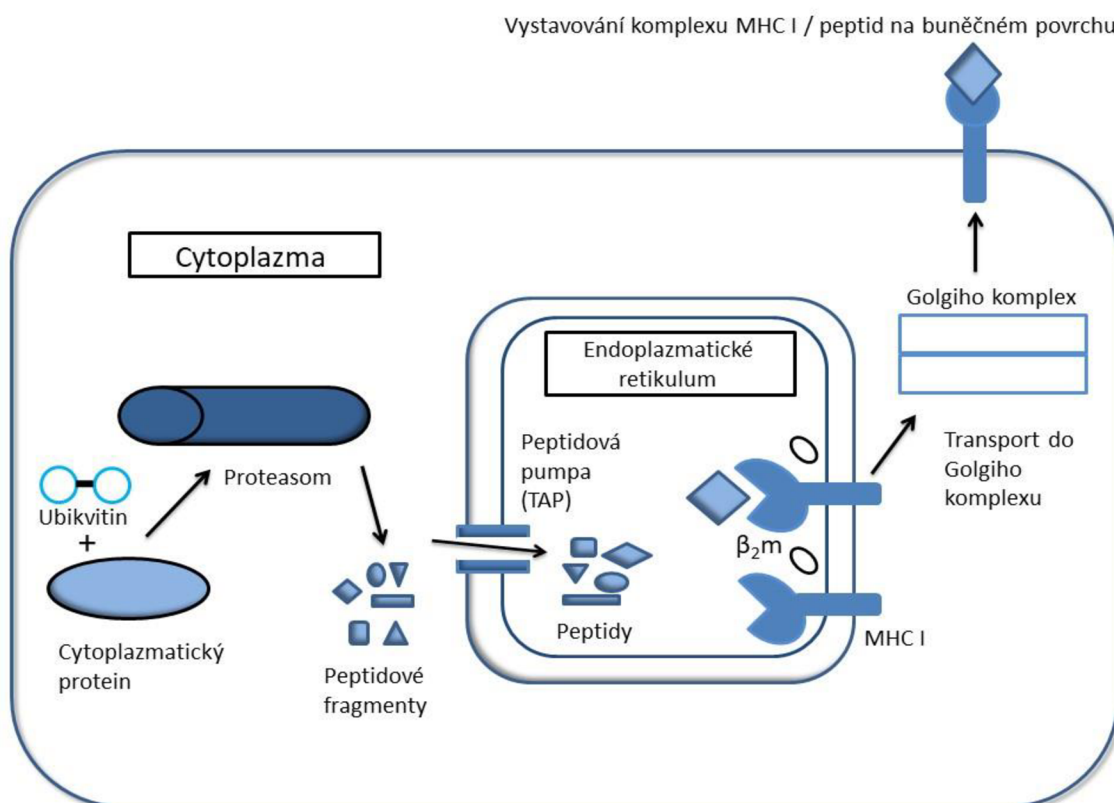
Mezi „klasické“ molekuly MHC I patří u člověka HLA –A, -B, -C (někdy také nazývané jako MHC gp Ia). Jako „neklasické“ MHC I (někdy nazývané MHC gp Ib) patří u člověka molekuly s označením HLA –E, -F, -G a někdy také CD1 (diferenciační antigen). Každý z těchto membránových glykoproteinů je strukturně blízký klasickým MHC I. Jsou poskládány z podobného transmembránového α řetězce a β 2m. Tyto molekuly se vyskytují pouze jen na některých buňkách a většinou se zaměřují na vazbu zvláštních ligandů. Také nejsou tak polymorfni jako klasické MHC I. HLA –G se vyskytuje pouze na povrchu trofoblastů (části placenty pocházející z plodu) a váže široké spektrum peptidů. HLA –E se nachází u mnoha typu buněk a váže tzv. signální peptidy, které pocházejí z biosyntetických prekurzorů HLA –A, -B, -C a –G. Komplexy HLA –E a –G s peptidy jsou rozpoznávány NK buňkami (natural killer cells – přirození zabijáci), které mají speciální inhibiční receptory. Pomocí NK buněk tak přispívají k toleranci plodu v děloze, ačkoliv zásadní role NK buněk je spíše v protinádorové a protivirové imunitě, protože NK buňky nemají jen inhibiční receptory, nicméně také aktivační receptory. Molekuly CD1 nevážou peptidy, nýbrž mikrobiální glykolipidy, případně glykolipidy, které jsou organismu vlastní (Hořejší 2017).

2.2.3 Vazba peptidů na MHC I a jejich prezentace

Vazebné místo pro peptidy u MHC I molekul (Obr. 2) je určeno pro peptidy o délce 8-11 aminokyselin, protože tyto peptidy se do vazebného místa vejdou. Vazebné místo je na obou koncích uzavřeno, nicméně je možné, aby se do tohoto místa navázaly také i jinak velké peptidy např. tzv. „vybouleným způsobem“. Důležitou roli má povaha „kotvicích“ aminokyselinových zbytků. Specifická molekula MHC I váže peptidy, které mají základní společné strukturní rysy, to znamená, že vykazují určitý vazebný motiv. Zpravidla je velmi důležitá povaha jedné nebo dvou aminokyselin, jež se nacházejí na konci peptidů. Povaha ostatních aminokyselin není moc důležitá nebo na tom nezáleží vůbec (Hořejší et al., 2017).



Obrázek č. 2: A: Vazba peptidů do vazebných míst na MHC I. B : Vazba peptidů na MHC I „vybouleným způsobem“. Převzato a upraveno dle Hořejší et al., 2017



Obrázek č.3: Schéma prezentace antigenu pomocí MHC I molekuly

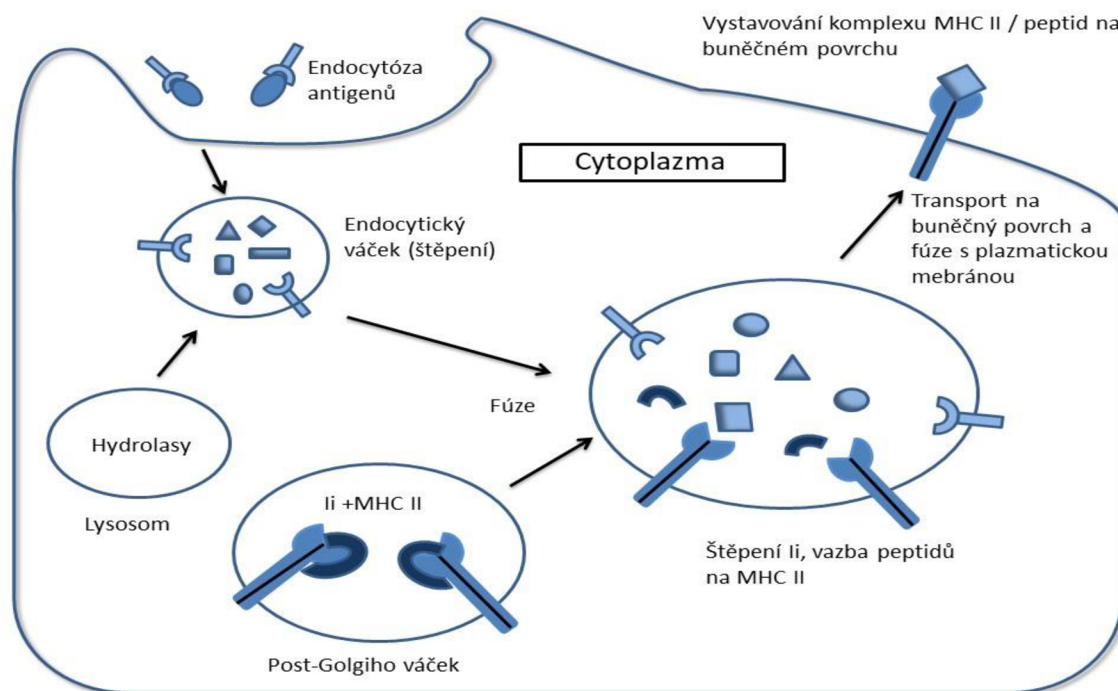
Během biosyntézy MHC I molekul v endoplazmatickém retikulu (ER) dochází k vazbě peptidů, jež pocházejí z proteinů, které jsou produkované v buňce. Hned po vytvoření polypeptidového řetězce α a β_2m (tj. po translaci mRNA) dochází v lumen ER k

poskládání do korektní prostorové konformace a vzájemné asociaci. Ve stejném čase dochází také k asociaci s některým peptidem, jehož struktura vyhovuje vazebným nárokům vazebného místa daného MHC I. Všechny komplexy MHC I, jež jsou uvolněny k dalšímu zpracování v Golgiho aparátu, a které se následně objeví na povrchu buňky, musí mít tři složky: α řetězec, β_2m a peptid. Hlavním zdrojem peptidů jsou intracelulární většinou somatické proteiny, které jsou degradovány v buněčné cytoplazmě proteolytickým komplexem zvaným proteasom. Cytoplazmatické proteiny, které byly označeny ubikvitinem, malým globulárním polypeptidem (proces zv. polyubikvitinylace), jsou směřovány do proteasomu. Tato multikatalytická jednotka štěpí proteiny na malé peptidy. Toto štěpení je součástí přirozeného metabolismu buněčných proteinů a podléhá mu, jak všechny normální somatické proteiny, tak i proteiny pocházející z intracelulárních virů nebo tumorů. Peptidové fragmenty, jež byly vytvořené pomocí proteasomu, jsou transportovány z cytoplazmy do endoplazmatického retikula (ER) pomocí specifických membránových pump, které se skládají z podjednotek nazývaných TAP (Transportér spojený se zpracováním antigenu). Vzniklý komplex MHC I / peptid míří pomocí vezikulárního transportu z endoplazmatického retikula přes Golgiho komplex na buněčný povrch, kde je následně vystavován a rozpoznáván receptory cytotoxických CD8 + T lymfocytů. Tyto T lymfocyty následně likvidují virem infikované, nebo nádorové buňky. Celý děj graficky znázorněn výše (Obr. 3) (Cresswell et al., 1999; Zachova et al., 2016; Hořejší et al., 2017).

2.2.4 Vazba peptidů na MHC II a jejich prezentace

U molekul MHC II je vznik komplexu MHC II / peptid odlišný než u MHC I molekuly. Zároveň má MHC II molekula jiné vazebné vlastnosti, než MHC I. U MHC II je vazebné místo na obou koncích otevřené, a proto se do něj mohou vázat peptidy delší, než u MHC I. Obvyklá délka peptidů, které se váží na MHC II, je 15 – 35 aminokyselin. Tato délka však není limitující a mohou se zde vázat i peptidy delší, které na obou koncích poté přečnívají. Peptidy se obvykle váží způsobem, že leží ve vazebném místě v natažené konformaci, nicméně v některých případech jsou peptidy vázány také tzv. „vybouleným“ způsobem, kdy jsou ve vazebném místě uchyceny na koncích a jejich střední část je „vyboulena“ ven. U MHC II molekuly v endoplazmatickém retikulu dochází ke spojení α a β řetězců s dalším transmembránovým proteinem, který se nazývá invariantní řetězec (Ii). Tento řetězec má za úkol blokovat vazebné místo

peptidům, takže se do vazebného místa nemohou vázat peptidy podobné těm, které se váží na MHC I molekulu. Komplexy $\alpha\beta Ii$ jsou vedeny do Golgiho aparátu, kde se oddělují a ve formě sekrečních váčků fúzí s endosomy, které vznikly jako produkt endocytózy proteinů zachycených na povrchu APC. Většinou se jedná o nějaký antigen např. mikrobiální glykoprotein či komplex antigen-protilátka. Předtím však ještě probíhá fúze endosomů s lysosomy. Lysosomy obsahují hydrolasy, které následně štěpí pohlcené antigeny a jiné biopolymery (proteiny) na peptidové fragmenty. Následuje fúze endosomu s transportním váčkem obsahujícím prekurzorové molekuly MHC II ($\alpha\beta Ii$), který přichází z Golgiho aparátu. Po fúzi se Ii řetězec rozpadne a do uvolněného místa se navážou peptidové fragmenty vzniklé z endocytovaných antigenů (většinou proteinů). Takto vzniklý komplex MHC II/ peptid je transportován na buněčný povrch (Obr.4). Vystavené peptidové fragmenty poté interagují s receptory CD 4 + T lymfocytů (Desjardins et al., 1994; Trombetta, 2003, Zachova et al., 2016; Hořejší et al., 2017).



Obrázek č.4: Schéma vzniku komplexu MHC II s peptidy z pohlcených proteinů a jejich prezentace na buněčném povrchu

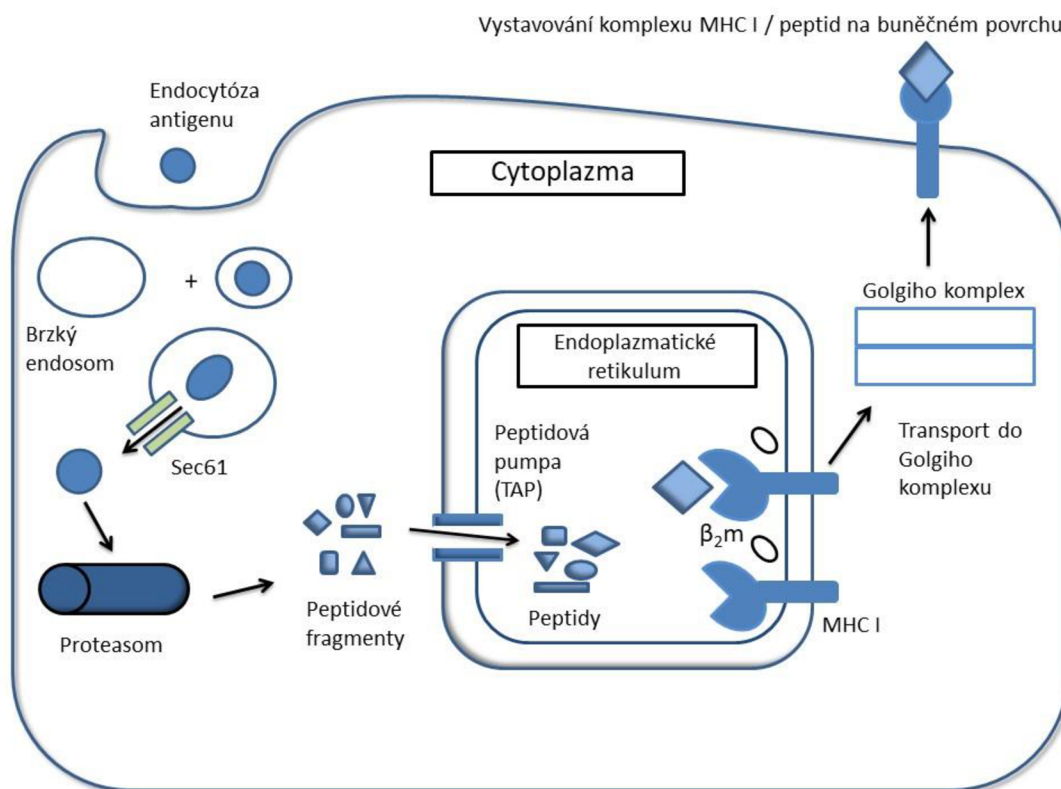
2.2.5 Zkřížená antigenní prezentace (antigen cross presentation)

Experimentálně bylo zjištěno, že v určitých případech dochází k vazbě exogenních proteinů na MHC I molekuly buněk prezentujících antigen. Takovému ději se říká „zkřížená antigenní prezentace“ (antigen cross presentation). Některé fagocytované proteiny jsou transportovány z fagosomu do cytoplazmy a zde jsou pomocí proteasomu rozloženy na příslušné peptidy. Ty jsou standardním způsobem dopraveny do ER, kde se vážou na MHC I. Alternativě může také docházet k tomu, že v pozdních fagosomech, které obsahují již peptidové fragmenty rozštěpených pohlčených proteinů, dochází rovnou k navazování těchto peptidů na MHC I. Díky zkřížené antigenní prezentaci je možné, aby exogenní antigen byl rozpoznáván nikoli jen CD4 + T lymfocyty, ale také CD8+ T lymfocyty. Důležité je podotknout, že touto schopností disponují pouze některé subpopulace dendritických buněk a s nejvyšší pravděpodobností také některé subpopulace makrofágů (Hořejší et al., 2017; Bevan, 1976; Zachova et al., 2016). V podstatě má zkřížená antigenní prezentace 3 základní kroky. Prvním krokem je fragmentace antigenu na peptidy o určité velikosti, která je nutná k tomu, aby se určitý antigen vlezl do drážky nacházející se na MHC I molekule. Druhým podstatným krokem je navázání peptidu na MHC I molekulu. Poslední krok je transport tohoto komplexu MHC I/peptid na buněčný povrch. Jsou možné dvě cesty, ve kterých může být antigen fragmentován a poté spojen s MHC I molekulou. V první cestě je antigen přenesen z endosomu do cytosolu pomocí transportního komplexu Sec61 a následně cílen do proteasomu. Poté následuje podobný mechanismus jako v případě MHC I prezentace (cytosolová cesta). Druhou cestou, jakou může být antigen fragmentován a následně spojen s MHC I molekulou, je tzv. vakuolární cesta. V této cestě je antigen fragmentován uvnitř fagocytujících váček a zde také spojen s recyklující se MHC I molekulou. Následuje transport na buněčný povrch. Komplex MHC I/ peptid v této cestě není vystaven prostředí cytosolu. Bylo však zjištěno, že u zkřížené antigenní prezentace se cytosolový antigen může vrátit zpět do endosomu k MHC I prezentaci (Gromme et al., 1999). V následujících kapitolách jsou popsány jednotlivé cesty zkřížené antigenní prezentace s použitím cytosolové a vakuolární cesty.

2.2.6 Cesta zkřížené antigenní prezentace (Cytosolová cesta)

2.2.6.1 Cesta z endosomu do cytosolu

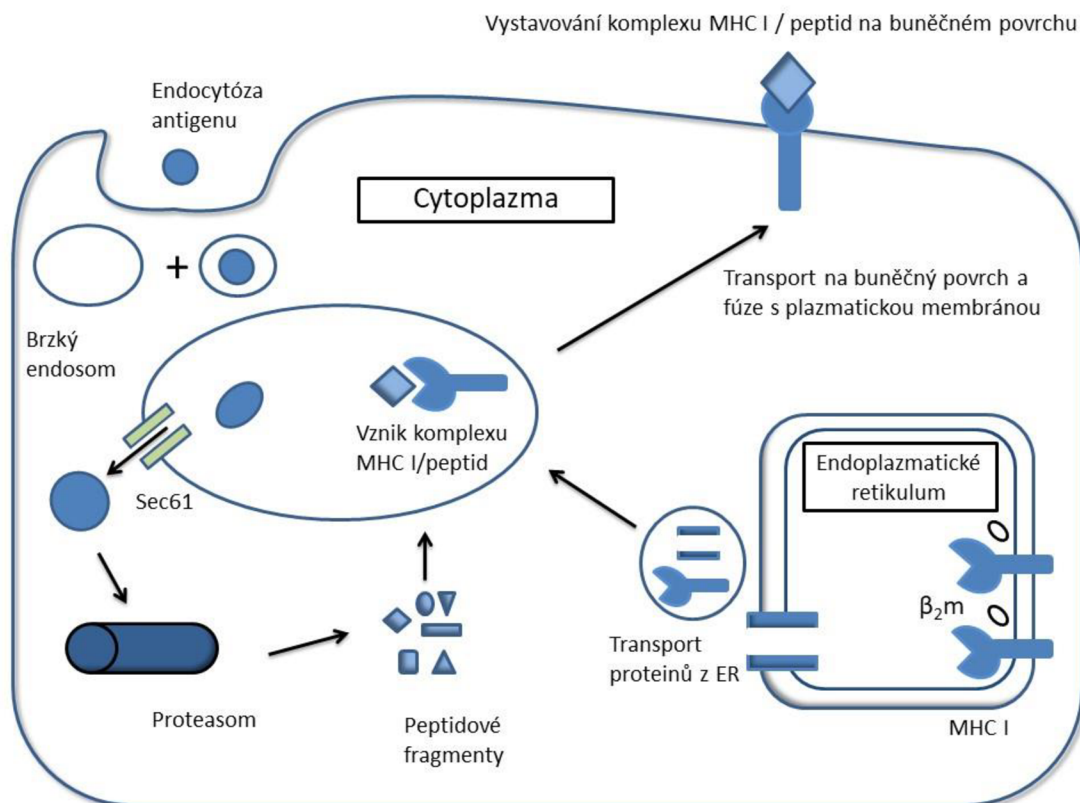
Endosom-cytosolová cesta (Obr. 5) byla popsána již před více jak 20 lety jako cesta navozující imunitní odpověď CD8+ T lymfocytů. Tato cesta je nezávislá na lysosomu, nicméně je k ní potřeba proteasom. Na začátku je exogenní antigen pohlcen dendritickou buňkou. Vytvoří se tzv. endocytické váčky, které fúzí s brzkým endosomem. Poté antigen opouští brzký endosom pomocí transportního komplexu Sec61. Následuje fragmentace antigenu proteasomem na krátké peptidy, které posléze putují do lumen ER pomocí TAP transportérů jako v případě klasické MHC I prezentace. Uvnitř endoplazmatického retikula se vytváří komplex MHC I/ peptid, který opouští ER a putuje skrz Golgiho komplex na buněčný povrch. (Kovacsovic-Bankowski & Rock, 1995; Guermonprez et al., 2003; Ichiyanagi et al., 2010; Singh & Cresswell, 2010; Imai et al., 2011; Mukai et al., 2011; Zachova et al., 2016).



Obrázek č.5: Schéma zkřížené antigenní prezentace: Cesta z endosomu do cytosolu

2.2.6.2 Cesta z endosomu do cytosolu a zpět do endosomu

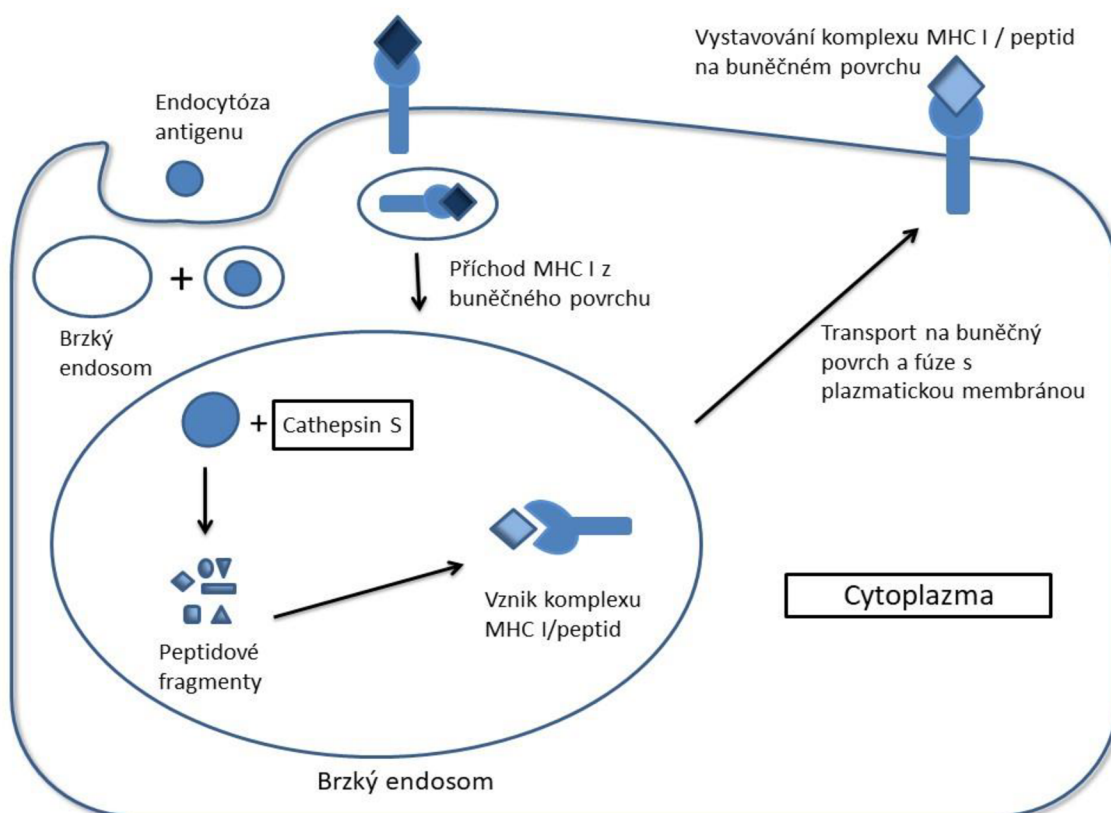
Jak už z názvu vyplývá, tato cesta má společný začátek, jako cesta z endosomu do cytosolu, nicméně při této cestě dochází k tzv. retrográdnímu kroku, kdy se naštěpené fragmenty antigenů zpětně vrací do endosomu (Obr. 6). Na začátku je exogenní antigen pohlcen dendritickou buňkou jako v předchozím případě. Následuje vytvoření endocytických váčků, které fúzí s brzkým endosomem. Poté antigen opouští brzký endosom pomocí transportního komplexu Sec61 a vstupuje do proteasomu. Fragmentovaný antigen v tomto případě směřuje zpátky k brzkému endosomu, který obsahuje veškeré proteiny nutné k úspěšnému navázání peptidu na MHC I (např. TAP, tapasin, chaperony ER calnexin a calreticulin, ERP57, MHC I). Tyto proteiny přicestovaly do brzkého endosomu z endoplazmatického retikula v podobě váčků. Uvnitř brzkého endosomu se spojí peptidy z antigenu s MHC I molekulou a po následném transportu jsou vystavovány na buněčném povrchu. (Ackerman et al., 2003; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Zachova et al., 2016).



Obrázek č.6: Schéma zkřížené antigenní prezentace: Cesta z endosomu do cytosolu a zpět do endosomu

2.2.6.3 Zkřížená antigenní prezentace-Vakuolární cesta

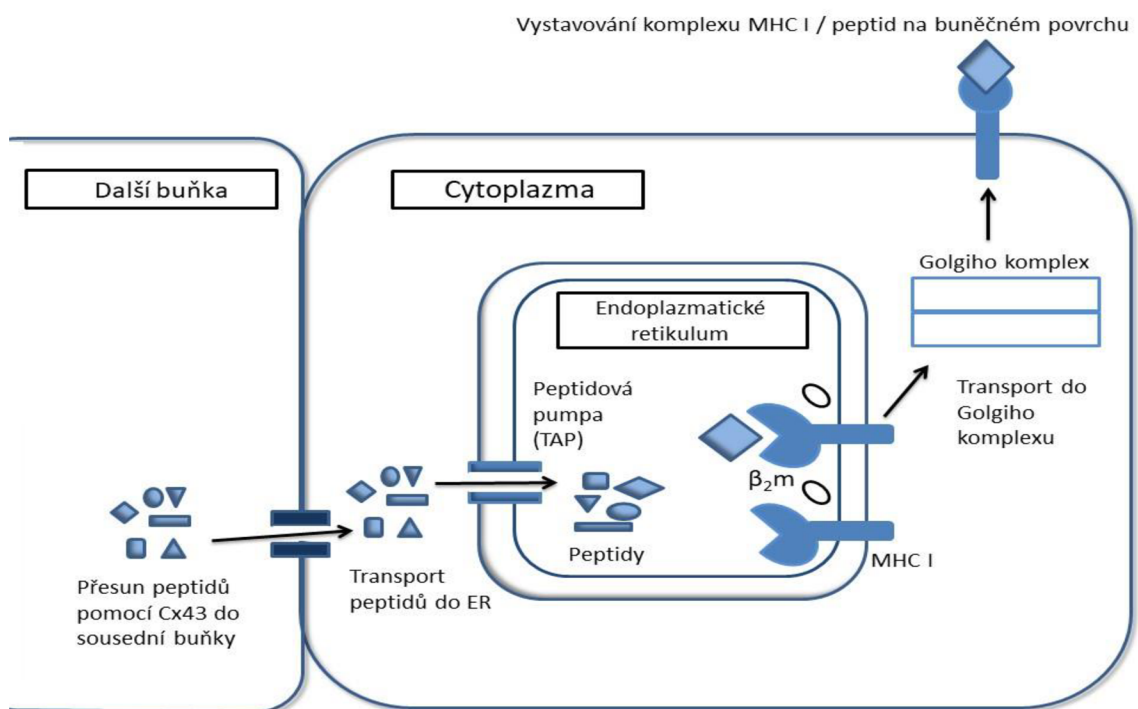
Vakuolární cesta zkřížené antigenní prezentace (Obr. 7) využívá jiných možností než předchozí cesty zkřížené antigenní prezentace. Vakuolární cesta není citlivá na inhibitory proteasomu a TAP přenašečů, protože tato cesta proteasom ani TAP přenašeče nevyužívá. Nicméně je velmi citlivá na inhibitory cysteinových proteas (Leupeptin, E64, ZFA-FMK). Zároveň se nevyskytuje u dendritických buněk, které jsou deficientní na Cathepsin S. Na začátku je antigen pohlcen dendritickou buňkou. Po pohlčení jsou vytvořené váčky s antigenem spojeny s brzkým endosomem. Proteasa Cathepsin S, která je přítomna v brzkém endosomu, štěpí antigen na peptidy. V případě vakuolární cesty se využívá recyklace MHC I molekuly a ta přichází z buněčného povrchu a fúzuje s brzkým endosomem. Poté vzniká komplex MHC I/ peptid. Nakonec komplex MHC I/peptid opouští brzký endosom a putuje k buněčnému povrchu. (Campbell et al., 2000; Gromme et al., 1999; Shen et al., 2004; Pillay et al., 2002; Schirmbeck et al., 1995; Zachova et al., 2016).



Obrázek č.7: Schéma zkřížené antigenní prezentace: Vakuolární cesta

2.2.6.4 Zkřížená antigenní prezentace pomocí mezibuněčné komunikace

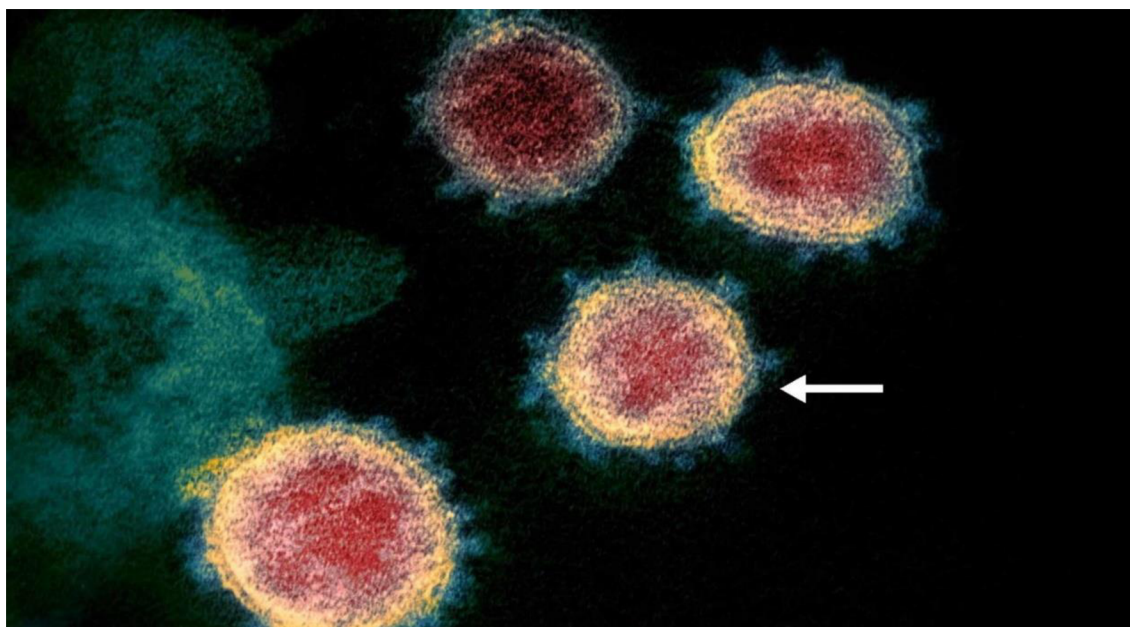
Bylo objeveno, že pomocí mezibuněčné komunikace může také docházet ke zkřížené antigenní prezentaci (Obr. 8), protože mezibuněčná komunikace umožňuje výměnu molekul mezi buňkami. Tunely, které zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci, jsou vysoce uspořádané struktury, které jsou složeny z konnexinu (např. Cx43). Hexamery tvořené konnexinem se nazývají konnexony. Pomocí tunelů tvořených Cx43 je možné přesouvat pouze molekuly o velikosti do 1800 Da, což odpovídá peptidům ne větším jak 10 aminokyselin. Peptidy získané ze sousední buňky, tak mohou být prezentovány na MHC I u APC a zároveň mohou podléhat zkřížené antigenní prezentaci u DC. Malá molekula např. peptid se přesune do cytosolu sousední buňky díky tunelu skládajícího se z Cx43. Poté je peptid přemístěn do ER díky TAP přenašeči. Uvnitř ER se vytvoří komplex MHC I/peptid, který následně opouští ER a cílí na buněčný povrch. (Handel et al., 2007; Mendoza-Naranjo et al., 2007; Neijssen et al., 2005; Pang et al., 2009; Zachova et al., 2016).



Obrázek č.8: Schéma zkřížené antigenní prezentace pomocí mezibuněčné komunikace

2.3 Koronaviry

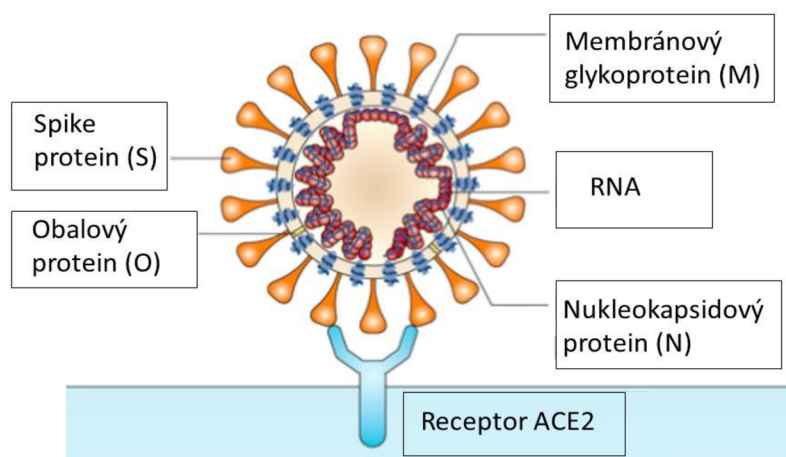
Koronaviry jsou obalené RNA viry, které způsobují akutní i přetrvávající infekce u lidí, ostatních savců a ptáků. Jejich nejvíce významným společným rysem, jenž byl odhalen elektronovou mikroskopií, jsou široce rozmístěné hroty ve tvaru palice, které vyčnívají z povrchu virionu. Tyto hroty jsou morfologicky odlišné, než jaké mají např. *ortoviry* nebo *paramyxoviry*. Název této skupiny vznikl díky těmto hrotům, protože mají jakousi „svatozář“, která dává virové částici vzhled sluneční koróny. Koronaviry jsou studovány již více jak 40 let, protože způsobují nejen respirační infekce u lidí, ale také významné ekonomické škody v podobě způsobení nemocí u domácích zvířat. Virové částice koronavirů jsou víceméně sférického charakteru a vykazují mírný stupeň pleomorfismu. Nukleokapsidy koronavirů mají spirálovitě symetrický tvar. Koronaviry patří do podčeledi *Orthocoronavirinae* (čeleď *Coronaviridae*), která patří do řádu *Nidovirales*. Tato podčeleď se dále dělí na alfa, beta, gama a delta koronaviry. Alfa a beta koronaviry infikují pouze savce, zatímco gama a delta koronaviry infikují převážně ptáky. Nově objevený virus s názvem SARS-CoV-2 (Obr. 9) (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2) patří do rodu betakoronavirů (Woo et al., 2012; Knipe et al., 2013; Cui et al., 2019; Zhu et al., 2020 a).



Obrázek č. 9: Snímek virionů SARS-CoV-2 pořízen pomocí elektronového mikroskopu. Šipka ukazuje na jeden virion. Převzato a upraveno dle Valencia, 2020. Snímek byl pořízen Národním institutem pro alergie a infekční nemoci (NIAID) Rocky Mountains Laboratories (RML), Národní institut zdraví Spojených států (NIH)

2.3.1 Virus SARS-CoV-2 a jeho struktura

Virus s názvem SARS-CoV-2, někdy také nazýván jako Wuchanský virus nebo COVID-19, je nedávno objevený nový kmen lidského koronaviru, jenž je původcem respiračního onemocnění. Tento virus patří do rodu betakoronavirů. SARS-CoV-2 má genomovou strukturu typickou pro většinu koronavirů. Jako u většiny koronavirů 2/3 jeho genomické hmoty kóduje 16 nestrukturních proteinů (nsps) spojených s transkripcí a replikací genomu. Zbývající 1/3 genomu kóduje 4 základní strukturní proteiny: Hrotový tzv. Spike (S), Obalový (O), Nukleokapsidový (N), Membránový (M) a také další strukturní a doplňkové proteiny (Obr. 10). Spike protein je důležitý při navázání viru na buněčné receptory hostitelské buňky. Spike protein je také cíl od protilátek vytvořených imunitním systémem. Membránový protein je důležitý pro udržení tvaru a struktury virionů. Obalový protein je spojen s uvolňováním replikovaného viru a jeho sestavením v hostitelských buňkách. První nakažení pacienti s tímto virem byli hospitalizováni na konci prosince roku 2019 v čínském Wuchanu. Po analýzách vzorku získaných od infikovaných jedinců bylo následně zjištěno, že se jedná o nový kmen koronaviru, který byl následně pojmenován jako SARS-CoV-2. Kompletní virový genom byl získán v lednu 2020 pomocí moderních metod meta-transkriptomického sekvencování (Zhang & Holmes, 2020).

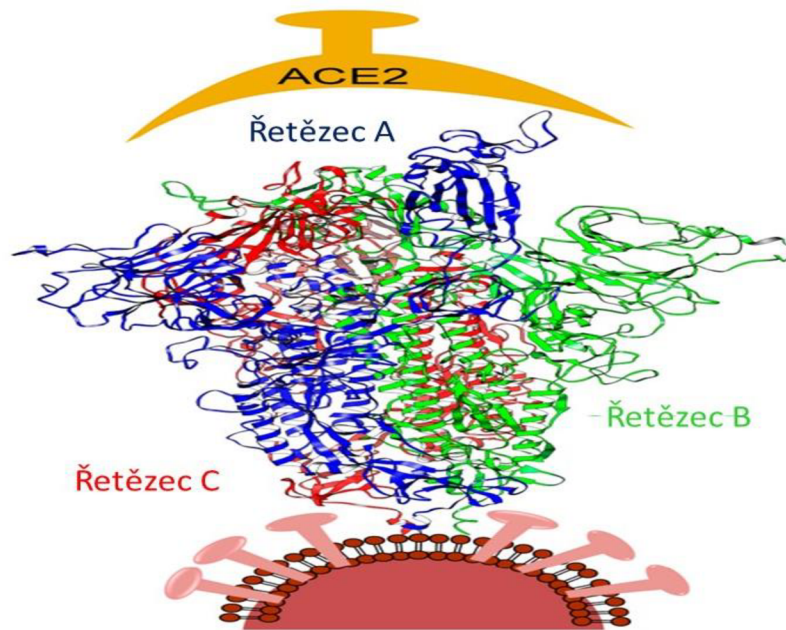


Obrázek č. 10: Kreslená ilustrace struktury koronaviru a virového receptoru ACE2 na povrchu hostitelské buňky. Převzato a upraveno dle Du et al., 2009; Liu et al., 2020

Bylo dokázáno, že virus SARS-CoV-2 je nakažlivější než jeho blízcí předchůdci SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) a MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), kteří také způsobují respirační onemocnění. Ačkoliv se může zdát, že menší smrtnost viru SARS-CoV-2, která se pohybuje okolo 3 %, přinese i menší počet obětí, tak je to jen zdánlivá představa. Ačkoliv má SARS-CoV smrtnost okolo 10 % a MERS dokonce okolo 30 % - 40 %, tak ani jedna z těchto dvou variant nezpůsobila takový počet obětí jako SARS-CoV-2, který se právě díky své lepší nakažlivosti dokázal rozšířit velice rychle a nakazit obrovské množství lidí (Gralinski et al., 2018; Tahir ul Qamar et al., 2019; Wang & Alexander, 2021 a). Studie ukazují, že COVID-19 se primárně šíří dýchacími cestami, respiračními sekrety, kapičkami a přímým kontaktem s nakaženým. Virus využívá jako vstup ústa a nos. Následně infikuje hostitelské buňky v dýchacím systému (Kutter et al., 2018; Cui et al., 2019; Paules et al., 2020; Lu et al., 2020). Je také možnost, že člověk se může nakazit pouze dotykem předmětu či nějakého povrchu, kde se virus nachází a následným dotykem úst, očí či nosu. Proto se jako prevence doporučuje časté mytí rukou mýdlem nebo dezinfekcí na bázi alkoholu. K infekci hostitelské buňky potřebuje virus vstoupit do buňky a následně využívá proteosyntetický aparát hostitelské buňky ke svému množení. (Wrapp et al., 2020).

2.3.2 Spike protein

Spike protein (Obr. 11) (někdy také označovaný jako S protein) je transmembránový glykoprotein, který má molekulovou hmotnost okolo 150 kDa. Tento protein se nachází na vnější části viru. S protein je homotrimer skládající se ze tří monomerů (řetězec A, B a C), které vyčnívají na povrchu viru a umožňují tak vazbu na hostitelské buňky přes angiotenzin-konvertující enzym II (ACE2), jež je exprimovaný hlavně v buňkách dolních dýchacích cest. Tento enzym můžeme také najít u buněk dalších tělesných orgánů jako např. srdce, ledviny nebo střeva, z čehož lze předpokládat, že virus může infikovat více tělesných orgánů (Donoghue et al., 2000; Zhang et al., 2020; Zhao et al., 2020 a; Mallapaty, 2020; Wrapp et al., 2020; Kalathiya et al., 2020).



Obrázek č. 11: Základní schéma homotrimeru Spike proteinu viru SARS-CoV-2. Převzato a upraveno dle Kalathiya et al., 2020

Každý monomer Spike proteinu má dvě hlavní štěpná místa (Obr. 12), a to místo s označením S1/S2, které odděluje podjednotku S1 od podjednotky S2 a druhé hlavní štěpné místo S2', které se nachází v rámci podjednotky S2 (Belouzard et al., 2009; Madu et al., 2009; Takeda, 2021). Každý monomer tak zahrnuje dvě funkční podjednotky.

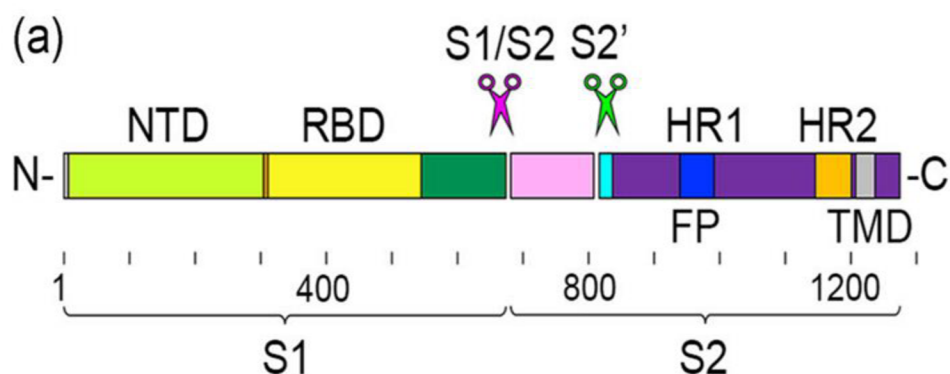
První podjednotka s označením S1 je odpovědná za vazbu k receptoru hostitelské buňky. Podjednotka S1 obsahuje N-terminální doménu (NTD) a receptor vázající doménu (RBD) (Li, 2016). Jak již název napovídá, za vazbu na ACE2 je zodpovědná právě RBD doména. Důležité je zmínit, že NTD se také může vázat u určitých druhů koronavirů na proteinové receptory, takže u některých koronavirů se mohou obě domény podílet na vazbě Spike proteinu na buňku (Wang et al., 2021 b). Distální S1 podjednotka také přispívá ke stabilizaci prefúzního stavu membránově ukotvené podjednotky S2, která obsahuje fúzní aparát (Walls et al., 2016 a, b; Kirchdoerfer et al., 2016; Gui et al., 2017; Pallesen et al., 2017; Yuan et al., 2017; Song et al., 2018)

Druhá podjednotka s označením S2 je odpovědná za fúzi virové a buněčné membrány (Bosch et al., 2003; Burkard et al., 2014; Kirchdoerfer et al., 2016; Walls et al., 2016 a; Tortorici & Veessler, 2019). U všech koronavirů je dále Spike protein štěpen hostitelskými proteasami (Madu et al., 2009; Millet & Whittaker, 2015). Toto štěpení umožňuje aktivaci proteinu pro membránovou fúzi prostřednictvím rozsáhlých

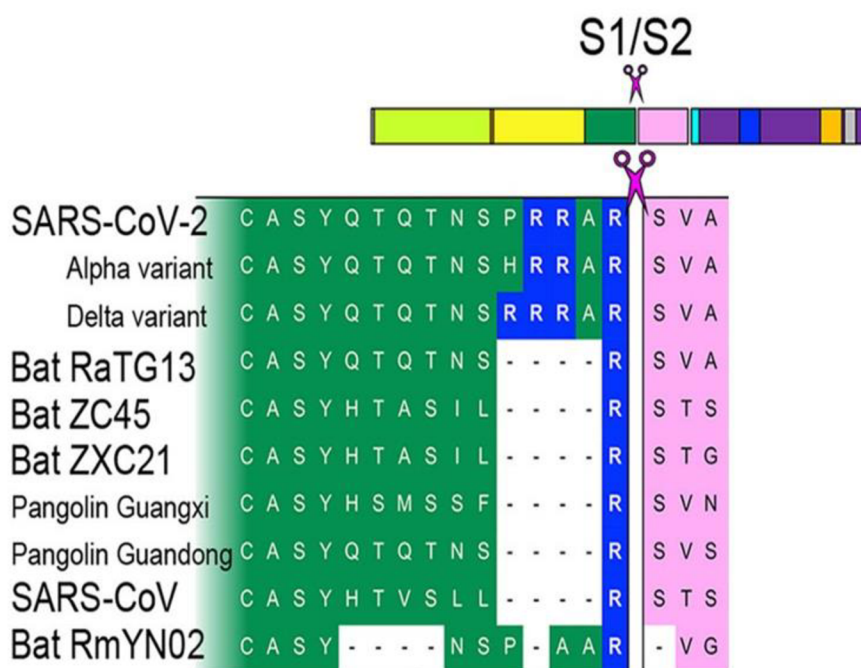
konformačních změn (Belouzard et al., 2009; Heald-Sargent & Gallagher, 2012; Millet & Whittaker, 2014; Millet & Whittaker, 2015; Park et al., 2016; Walls et al., 2017). Vstup koronaviru do buněk je složitý proces, který vyžaduje společný postup navázání receptoru a proteolytického zpracování Spike proteinu k podpoře fúze virus-buňka (Walls et al., 2020). V závislosti na druhu viru používají jednotlivé koronaviry různé domény v rámci podjednotky S1 k rozpoznání připojovacích a vstupních receptorů (Vlasak et al., 1988; Hulswit et al., 2019).

Vzhledem ke skutečnosti, že koronavirový Spike protein je exponovaný na povrchu virionu a zprostředkovává vstup do hostitelských buněk, je hlavním cílem neutralizačních protilátek při nastalé infekci. Zároveň je to hlavní zaměření designu vakcín, které vyvíjí farmaceutické společnosti (Walls et al., 2020). Spike protein viru SARS-CoV-2 má ze 76 % stejnou aminokyselinovou sekvenci jako SARS-CoV. Největší podobnost Spike protein SARS-CoV-2 má však s netopýřím koronavirem s označením SARSr-CoV RaTG13. Shoda v aminokyselinové sekvenci Spike proteinu je u těchto dvou virů 97 % (Ge et al., 2013; Yang et al., 2015; Walls et al., 2020). Afinita viru SARS-CoV-2 k lidskému ACE2 (hACE2) je srovnatelná s virem SARS-CoV, který způsobil epidemii v roce 2003 (Walls et al., 2020).

Jedním z hlavních rysů proteinu viru SARS-CoV-2 je přítomnost tzv. suboptimálního furinového štěpného motivu (FCM) (682-RRAR↓S-686; šipka dolů znamená štěpné místo - znázorněno na obrázku č. 13) u místa S1/S2 vložením unikátní sekvence 4 aminokyselin (681-PRRA-684). Tato sekvence není přítomna u viru SARS-CoV, který se poprvé objevil mezi lety 2002-2003 ani u netopýřního viru s označením RaTG13, který je relativně „nejblíže“ viru SARS-CoV-2 ani u jiných dnes známých netopýřích koronavirů (Andersen et al., 2020). Tento charakteristický rys je jedním ze základů pro nevědecký argument, že vir SARS-CoV-2 může být uměle vytvořen v laboratoři. K tomuto typu inserce však může také dojít během přirozené evoluce koronavirů (Zhou et al., 2020; Wu & Zhao, 2021; Takeda, 2021).



Obrázek č.12: Spike protein viru SARS-CoV-2 je typ transmembránového proteinu, skládajícího se z S1 and S2 podjednotky s celkovou délkou 1273 aminokyselin. NTD (N-termální doména) (14-303), RBD (Receptor vázající doména) (319-541), FP (Fúzní peptid) (816-854), HR1 (Sedmičlenné opakující se oblasti 1) (942-990), HR2 (Sedmičlenné opakující se oblasti 2) (1163-1202), TMD (Transmembránová doména) (1214-1234), Štěpící místo S1/S2 (685/686) je vyznačeno magentovými nůžkami a štěpící místo S2' (815/816) je vyznačeno zelenými nůžkami. Převzato a upraveno dle Takeda 2021



Obrázek č.13: Aminokyselinová sekvence štěpícího místa S1/S2 u SARS-CoV-2 a relativně příbuzných koronavirů. Magentové nůžky značí S1/S2 štěpící místo. V modrých rámečcích jsou znázorněny základní argininové zbytky. Aminokyseliny jsou vyobrazeny jako jednotlivé znaky a pomlčky znázorňují mezery v sekvenci. Převzato a upraveno dle Takeda 2021

2.3.3 Odolnost proti SARS-CoV-2 podle krevní skupiny

Onemocnění Covid-19 vykazuje velice rozsáhlou škálu závažnosti. Silně to naznačuje, že průběh nemoci a zároveň velikost závažnosti onemocnění souvisí s hostitelskými faktory. Je velmi pravděpodobné, že získané komordity jako je např. věk, obezita, kouření, apod. souvisí s klinickou závažností Covid-19. Důležité je podotknout, že je vysoce pravděpodobné, že s tím mohou také souviset genetické faktory hostitele. Nedávno bylo zjištěno, že typ krevní skupiny je silně statisticky spojen nejen s možností se nakazit, nýbrž také s průběhem a přežitím infekce SARS-CoV-2 (Zhao et al., 2020 b). Studie naznačují, že krevní skupina A je spojena s vyšším rizikem infekce, zatímco krevní skupina 0 měla toto riziko nižší (Li et al., 2020). Tato proměnlivá náchylnost může být podle hypotézy spojená s cirkulujícími anti-A protilátkami, které by mohly interferovat nebo dokonce inhibovat proces adheze mezi buňkou a virem. Při studii se porovnával podíl jedinců, kteří měli protilátky anti-A v jejich séru (tj. krevní skupina 0 a B) a jedinců, kteří tyto protilátky neměli (tj. krevní skupina A a AB). Zjistilo se, že jedinci, kteří měli protilátky anti-A byli významně méně zastoupeni ve skupině pozitivních na Covid-19, než jedinci, kteří neměli protilátky anti-A. Při studiu protilátek anti-B nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl. Během experimentu byl také pozorován rozdíl mezi protilátkami anti-A u krevní skupiny 0 a krevní skupiny B. Zdá se, že protilátky anti-A u krevní skupiny 0 mají větší protektivní účinek než u skupiny B (Gérard et al., 2020). Je to pravděpodobně způsobené faktem, že převládající isotyp imunoglobulinu anti-A v séru krevní skupiny B je především IgM, zatímco u krevní skupiny 0 je převládající isotyp IgG (Fung et al., 2014).

Na závěr lze říci, že přítomnost protilátek anti-A v séru konkrétně IgG je faktor, který může při boji s infekcí Covid-19 zastávat významnou roli. Důležité je však zmínit, že toto pozorování je ještě daleko od potvrzení jednotlivých závěrů. Každopádně by toto sledování mohlo pomoci najít nové přístupy, které by mohly být užitečné při sledování případně léčení nemoci SARS-Covid-2 (Gérard et al., 2020).

2.3.4 Jednotlivé vakcíny proti SARS-CoV-2

Je tomu už více než 200 let, kdy Edward Jenner provedl symbolické očkování osmiletého chlapce hnisem získaným od dojičky, která byla infikovaná kravskými neštovicemi. Výsledek tohoto experimentu se zapsal opravdu úspěšně do historie medicíny. Tradiční vakcíny založené na inaktivovaném nebo oslabeném patogenu, které

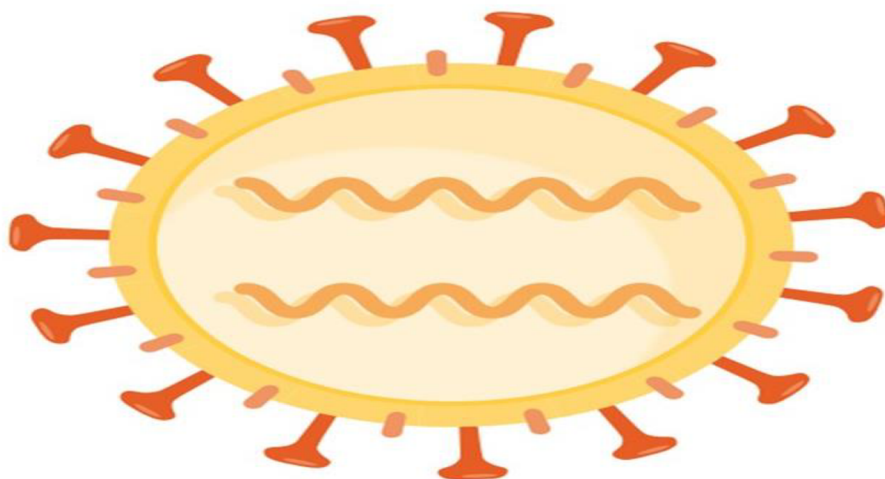
jsou účinné proti mnoha onemocněním, pomalu začínají vyklízet prostor pro mnohem více sofistikované technologie vývoje jednotlivých vakcín. Tyto technologie umožňují nové strategie designu vakcín (Plotkin, 2014; Kyriakidis et al., 2021).

Vždy je však mít na paměti, že jsou tady dva hlavní cíle, jenž by měla jakákoliv vakcína splňovat. V první řadě je to bezpečnost vakcíny, která musí být splněna a druhým podstatným cílem je účinnost vakcíny, tzn. aby se po jejím podání vytvořila dostatečně silná a dlouhodobá imunitní ochrana vůči sledovanému patogenu. Většina schválených vakcín je zaměřena na indukci neutralizačních protilátek vůči cílovému patogenu. Podání vakcíny je tedy snaha o vytvoření takového stavu, kdy by infekce jedince byla zcela potlačena a vzniku onemocnění či jejímu přenosu na další jedince by bylo zcela zabráněno (Dutta et al., 2016; Kyriakidis et al., 2021). V případě onemocnění SARS-CoV-2 vzniklo mnoho druhů vakcín, které jsou založené na různých strategiích. Inaktivované vakcíny (Obr. 14) proti SARS-CoV-2 jsou vyráběny pěstováním SARS-CoV-2 na buněčné kultuře. Následuje chemická inaktivace viru (Gao et al., 2020; Wang et al., 2020). Tyto vakcíny lze vyrábět poměrně snadno. Jejich výnos je však omezen produktivitou viru v buněčné kultuře a požadavkům na zařízení, kde se vakcína vyrábí. Prostory musí být na úrovni biologické ochrany 3 (Gao et al., 2020). Tyto vakcíny se většinou podávají intramuskulárně a mohou obsahovat hydroxid hlinitý nebo další jiná adjuvantia (Krammer, 2020). Strategii inaktivovaných vakcín využily čínské společnosti Sinovac se svou vakcínou s názvem CoronaVac a společnost Sinopharm.

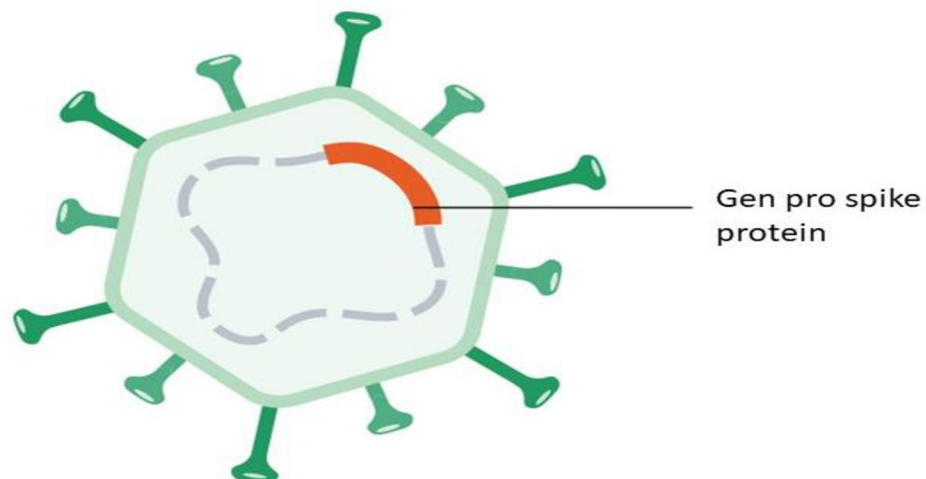
Další strategii, která byla využita, je založena na virových vektorových vakcínách. Takové vakcíny jsou obvykle založeny na jiném viru, který se používá jako vektor (Obr. 15). Takový vektor je vyvinut tak, aby při vniknutí do buněk, přinutil hostitelské buňky exprimovat Spike protein, na který poté reaguje imunitní systém. Vektorový virus však není schopen se dále množit. Většinou jako vektor se u těchto vakcín používají adenoviry. Výhodou těchto vakcín je, že se nemusí pracovat s živým virem a zároveň je možno využít již vyzkoušený vektorový virus, který se používá i u jiných vakcín. Nevýhodou těchto vakcín je, že vektory mohou být potlačeny již existující imunitou proti těmto vektorům. Mezi nejznámější vakcíny založené na tomto principu patří ruská vakcína Sputnik V nebo vakcína vytvořená společností AstraZeneca (Mercado et al., 2020; Krammer, 2020; Zhu et al., 2020 b).

Posledním zde uvedeným typem vakcín a zároveň velmi veřejností diskutovaným typem jsou RNA vakcíny (Obr.16). RNA vakcíny jsou relativně nedávno objevená

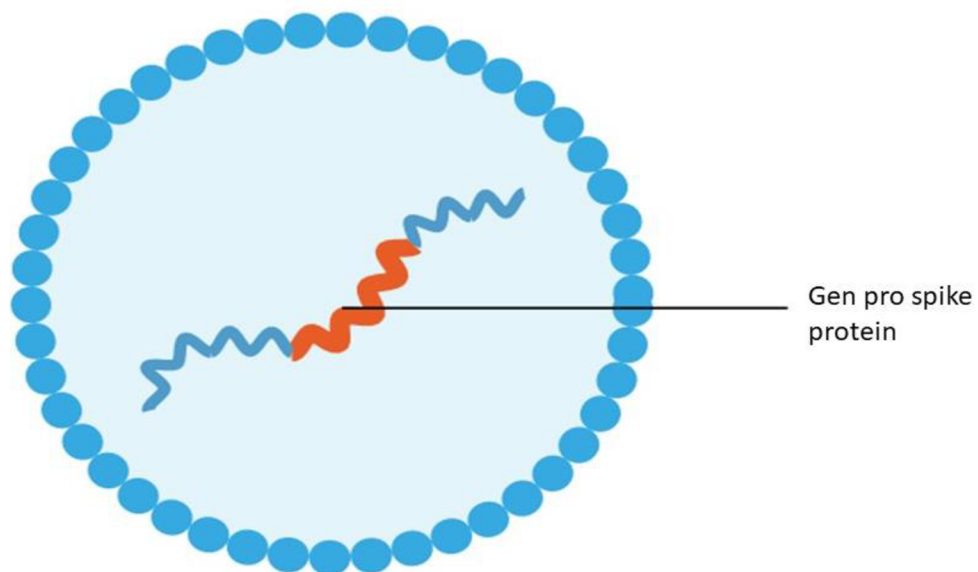
strategie, jak imunizovat organismus. V této strategii se místo samotného antigenu používá jeho genetická informace a v buňkách očkovaného jedince se následně tento antigen vytvoří. Může být použita mRNA nebo samoreplikující se RNA. V případě mRNA je však zapotřebí vyšší dávky než u samoreplikující RNA (Vogel et al., 2018). RNA se většinou do buněk dostane prostřednictvím lipidových nanočástic (Corbett et al., 2020). Výhodou tohoto druhu vakcíny je, že se může kompletně vyrobit in vitro a její příprava je oproti jiným druhům vakcín velice rychlá. Zároveň takové nepotřebuje žádné adjuvans. Nevýhodou je, že je tato technologie poměrně nová a není ještě zcela jasné, jaké se mohou ještě vyskytnout komplikace, tak jako při užití každé nové technologie nebo nového technologického postupu. Dosud asi největší nevýhodou bylo skladování tohoto druhu vakcíny, které musí být za velice nízkých teplot, kterých dříve běžné chladicí systémy nebyly schopny docílit. Mezi nejznámější společnosti, které vyvinuly tento druh vakcíny proti SARS-CoV-2, patří Moderna nebo Pfizer. Na závěr této kapitoly je potřeba zmínit, že tohle nejsou všechny očkovací strategie, které existují, protože existují ještě další druhy vakcín jako např. vakcíny založené na rekombinantních proteinech třeba od společnosti Novavax (Krammer, 2020).



Obrázek č.14: Inaktivované vakcíny obsahují celý virus SARS-CoV-2, který se pěstuje v buněčných kulturách a následně chemicky inaktivuje. Převzato a upraveno dle Krammer, 2020.



Obrázek č. 15: Vektorová vakcína, která využívá jiného viru jako vektoru. Převzato a upraveno dle Krammer, 2020.



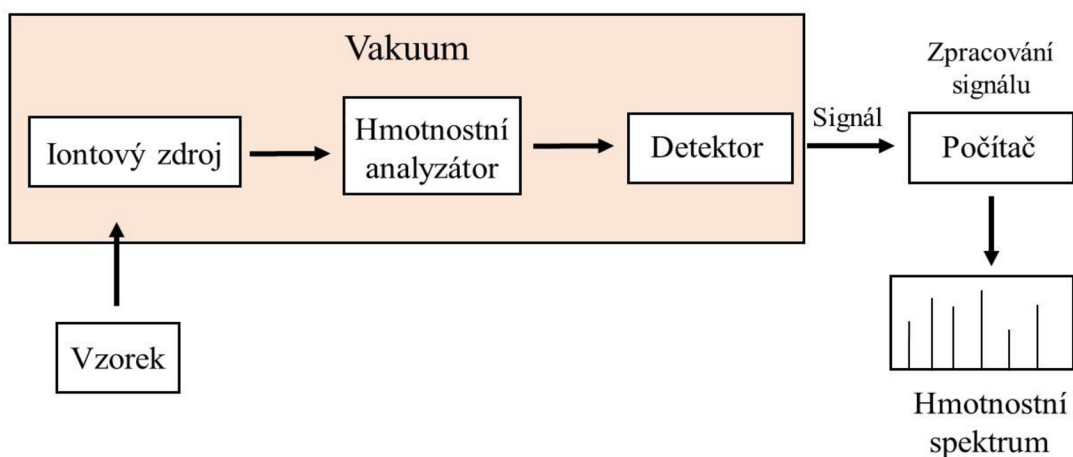
Obrázek č. 16: RNA vakcíny se skládají z RNA, která kóduje spike protein a tato RNA je zabalena v lipidových nanočásticích. Převzato a upraveno dle Krammer, 2020.

2.4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie patří díky svým vynikajícím vlastnostem mezi jednu z nejlepších analytických metod. Nepřekonatelná citlivost, rychlost, detekční limity a rozmanitost aplikací řadí hmotností spektrometrii na vynikající pozici mezi analytické metody. V analytické chemii jsou většinou nejnovější aplikace zaměřené na biochemii. Hmotnostní spektrometrie se může v biochemii využívat na studium např. metabolomu, proteomu nebo metabolismu (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

Hmotnostní spektrometrie dosáhla v poslední době velkého zlepšení. Tento pokrok přinesl do hmotnostní spektrometrie nové nástroje. Principem hmotností spektrometrie je ionizace neboli tvorba iontů. Prvním krokem analýzy sloučenin pomocí hmotností spektrometrie je tvorba iontů v plynné fázi např. pomocí elektronové ionizace (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

Vytvořené ionty jsou separovány v hmotnostním spektrometru podle jejich poměru hmotnosti k náboji. Následně jsou ionty detekovány. Podle toho se vytvoří hmotnostní spektrum dané molekuly. Hmotnostní spektrum může být prezentováno jako tabulka nebo jako sloupcový graf. X osa v grafu hmotnostního spektra znázorňuje poměr hmotnosti k náboji určitého iontu a značí se m/z . Y osa v grafu znázorňuje počet iontů nebo jejich relativní intenzitu. Nejintenzivnější vrchol v grafu se nazývá základní vrchol a je mu přiřazena relativní intenzita 100 %. Intenzity všech ostatních vrcholů jsou uvedeny jako úměrné hodnoty, to znamená jako procenta základního píku. Ionty poskytují informace o povaze a struktuře jejich prekurzorové molekuly. Hmotnostní spektrometr (Obr. 17) vždy obsahuje: vstup pro zavedení sloučeniny, která se analyzuje, ionizační zdroj k produkci iontů ze vzorku, jeden nebo více hmotnostních analyzátorů k oddělení různých iontů, detektor, který „počítá“ ionty a nakonec systém zpracování dat, jež produkuje hmotnostní spektrum (De Hoffmann & Stroobant, 2007).



Obrázek č. 17: Základní schéma hmotnostního spektrometru

2.4.1 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

Analyzovaný vzorek musí být před analýzou v hmotnostním spektrometru ionizován. K tomuto slouží iontové zdroje. V hmotnostní spektrometrii se používají různé iontové zdroje. Jedním z iontových zdrojů je tzv. MALDI. Tato metoda se vyznačuje snadnou přípravou vzorku a má dobrou toleranci ke kontaminaci solemi, pufrů a detergenty (Chen et al., 1998; Stump et al., 2002). Ionizace vzorku pomocí MALDI je dosaženo ve dvou krocích. První krok zahrnuje rozpuštění sloučeniny, která má být analyzována, v rozpouštědle obsahující malé organické molekuly. Takové rozpouštědlo nazýváme maticí. Malé molekuly, které matrice obsahuje, musí mít silnou absorpci ve vlnové délce laseru, jež se používá. Takto vytvořená směs je před analýzou vysušena a veškeré kapalné rozpouštědlo je odstraněno. Výsledkem je „pevný roztok“ maticových krystalů s analytem. Druhý krok probíhá za vakuových podmínek uvnitř zdroje hmotnostního spektrometru. Dochází zde k ozáření krystalů matrice pomocí laseru (jejich zahřátí a sublimaci). Matrice, tak expanduje do plynné fáze a strhává intaktní analyt (Dreisewerd, 2003). Ionizační reakce mohou probíhat kdykoli během tohoto procesu (Zenobi & Knochenmuss, 1998; Knochenmuss & Zenobi, 2003). MALDI je více citlivé než jiné laserové techniky. Počet molekul matrice je vyšší než počet molekul analytu, čímž se molekuly analytu oddělují. Netvoří se shluky vzorku, které brání výskytu molekulárních iontů. Matrice také minimalizuje poškození vzorku, které může vzniknout vlivem laseru, protože absorbuje většinu dopadající energie a zvyšuje účinnost přenosu energie

z laseru na analyt. Citlivost je tedy také značně zvýšena (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

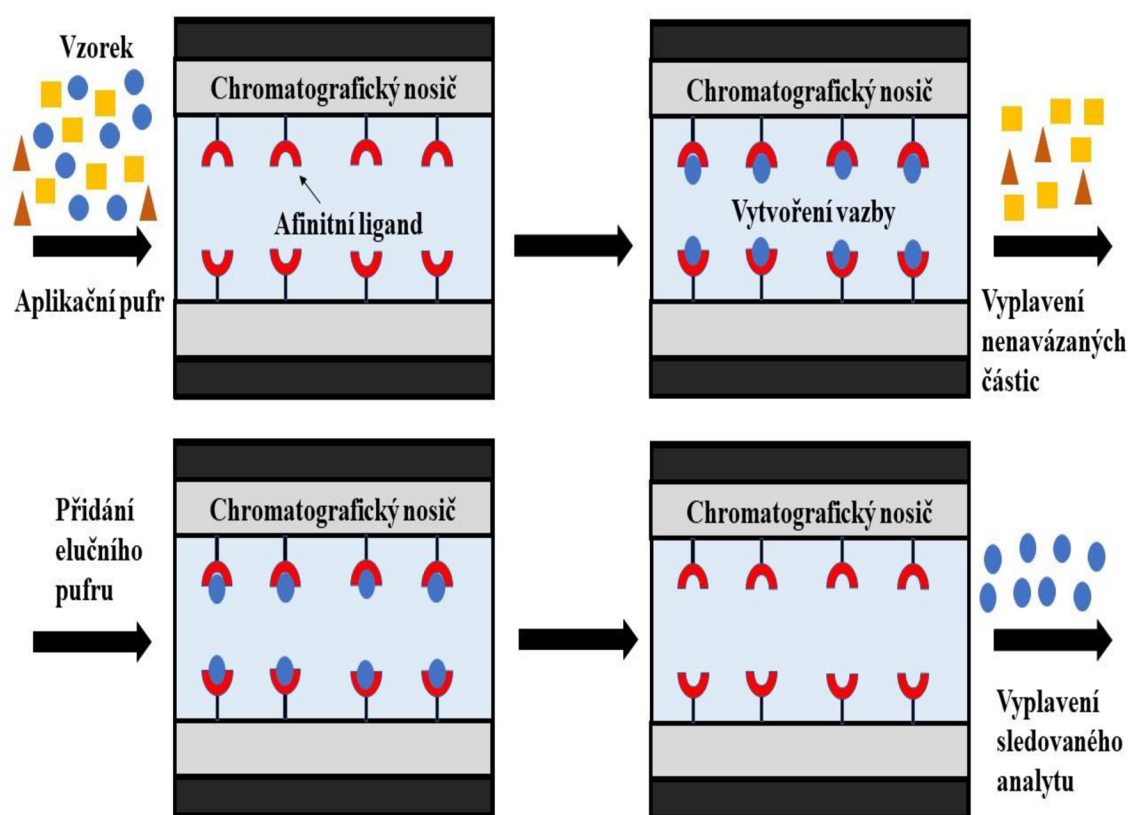
2.4.2 Průletový analyzátor „Time of Flight“ (TOF)

Analyzátor TOF je druh analyzátoru, který odděluje ionty na základě jejich rychlosti. Iontům je na začátku udělena rychlost pomocí elektrického pole. Poté se ionty pohybují v oblasti bez elektrického pole. Tato oblast se nazývá letová trubice. Ionty, které jsou vypuzovány ze zdroje, jsou vypuzovány ve svazcích. Tyto svazky jsou vytvářeny přerušovaným procesem jako je např. laserová desorpce. Následně jsou ionty urychlovány k letové trubici rozdílem potenciálu aplikovaného mezi elektrodou a extrakční mřížkou. Protože veškeré ionty získávají stejnou kinetickou energii, lze říci, že ionty charakterizované rozložením své hmotnosti prezentují rozložení své rychlosti. Když ionty opouštějí oblast zrychlení, vstupují do oblasti, kde nepůsobí žádné elektrického pole. V této části se ionty rozdělují podle svých rychlostí, než dosáhnou detektoru umístěného na druhém konci letové trubice. Poměr hmoty k náboji se poté následně určuje z měřeného času, který iontům trvá, než proletí oblastí bez elektrického pole mezi zdrojem a detektorem. Rychlost analýzy detektoru TOF je velká a hmotností spektrum v širokém rozsahu lze získat během pár mikrosekund. Zároveň horní hmotnostní rozsah analyzátoru TOF nemá limit, což jej činí vhodným kandidátem pro měkké ionizační techniky. Vzorky s hmotností vyšší jak 300 kDa byly pozorovány právě díky MALDI-TOF (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

2.5 AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Afinitní chromatografie je forma kapalinové chromatografie (Obr. 18), kde se jako stacionární fáze využívá biologicky příbuzné vazebné činidlo. Tato chromatografie využívá především biologické interakce, u nichž je výhodou jejich selektivita a zároveň reverzibilita. Typickým příkladem těchto interakcí je např. interakce protilátky s antigenem nebo enzymu se substrátem. U afinitní chromatografie se používá tato selektivní interakce způsobem, tak že jedno činidlo z interagujícího páru (např. protilátka) je imobilizováno na chromatografický nosič. Činidlu, které je imobilizované na nosiči, se říká „afinitní ligand“, jež má schopnost selektivně zadržovat komplementární vazebnou částici přítomnou v komplexní směsi. U afinitní chromatografie se používají různé druhy pufrů. Tyto pufrы se používají pro aplikaci, promývání nebo eluci analyzovaného vzorku. U těchto pufrů je důležité sledovat jejich

hodnotu pH a iontovou sílu z důvodu stability afinitního ligandu a jeho vazebného partnera, nebo také pro plnou aktivaci obou činidel. K nanesení na kolonu se používá aplikační pufr, který do kolony přinese komplexní směs, jež obsahuje také námi sledovanou látku. Na afinitní ligand se naváže pouze námi sledovaná látka a zbytek se promývacím pufrům promyje. Následně se použije eluční pufr, který obvykle mívá rozdílné pH než aplikační nebo promývací pufr a námi sledovanou látku vyplaví (Walters, 1985; Handbook of Affinity Chromatography, 2006; Reichelt, 2015; Rodriguez et al., 2020).



Obrázek č.18: Základní princip afinitní chromatografie-schéma

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

Fosfátový pufr (PBS) 10x (Biosera, USA)

β -merkптоethanol (Sigma- Aldrich, USA)

IMDM GlutaMax (Gibco, UK)

Trypsin-EDTA (Gibco, UK)

Fetal bovine serum (FBS) (PAN-Biotech, Německo)

Penstrep (ThermoFisher Scientific, USA)

Kyselina chlorovodíková (Merck, Německo)

Glycin (VWR, USA)

SDS (VWR, USA)

Tris (Amresco, USA)

Standard PageRuler (ThermoFisher Scientific, USA)

Opti-MEM médium (Gibco, UK)

Kyselina octová (VWR, USA)

Protilátka – anti MHC I (ThermoFisher Scientific, USA)

Transfekční činidlo 293 Fectin (ThermoFisher Scientific, USA)

Barvivo Coomassie Brilliant blue (ThermoFisher Scientific, USA)

Leupeptin (Sigma-Aldrich, USA)

Aprotinin (Sigma-Aldrich, USA)

PMSF (Sigma-Aldrich, USA)

Pepstantin (Sigma-Aldrich, USA)

NaHCO₃ (Lach-Ner, ČR)

Glycin (Lachema, ČR)

NaCl (Lach-Ner, ČR)

CH₃COONa x 3H₂O (Lachema, ČR)

Metanol (Penta Chemicals, ČR)

Etanol (Mach Chemikálie, ČR)

Isopropanol (Penta Chemicals, ČR)

NaOH (Lachner Neratovice, ČR)

Médium free style 293 (Gibco, UK)

Standard PageRuler™ Plus Prestained Protein, katalogové číslo 26619 (ThermoFisher Scientific, USA)

Plasmid expresní vector pcDNA 3.1., Gene name:

RBD_SpikeSARSnCoV2_IgGkappaHistag (ThermoFisher Scientific, USA)

Freestyle™ 293-F buňky (ThermoFisher Scientific, USA)

cDC1- Buněčná linie (Lausanne, Švýcarsko)

Sepharosa, katalogové číslo C9210 (Sigma-Aldrich, USA)

Ni-NTA agarosa (ThermoFisher Scientific, USA)

Imidazol (PanReac AppliChem, Španělsko)

3.1.2 Použité roztoky

Roztok kompletního IMDM média - 8% FBS, 1% Penstrep v IMDM Gluta Max médiu, přídavek malého množství β-merkapt ethanolu (na 100 ml přidáno 0,34 μl)

Coupling pufr – 0,1 mmol·l⁻¹ NaHCO₃, 0,5 mmol·l⁻¹ NaCl, pH 8,3-8,5

Roztok kyseliny chlorovodíkové - 1 mmol·l⁻¹

Roztok glycinu – 0,2 mol·l⁻¹, pH 8,0

Acetátový pufr – 0,1 mol·l⁻¹ CH₃COOH·3H₂O, 0,5 mol·l⁻¹ NaCl, pH 4

Eluční roztok kyseliny octové – 10% CH₃COOH v PBS

Lyzační pufr – 1% SDS v PBS, (do 10 ml roztoku bylo přidáno 4 μl Leupeptinu, 20 μl PMSF, 5,25 μl Aprotininu a 4 μl Pepstatinu, veškeré inhibitory měly koncentraci 1 mg/ml až na PMSF, který měl koncentraci 250 mmol·l⁻¹)

5 x SDS elektrodový pufr – 45,3 g Tris, 216 g glycinu, 15 g SDS, 1950 ml destilované vody

Fixační roztok – 750 ml isopropanolu, 300 ml kyseliny octové, 3 litry destilované vody

Odbarvovací roztok – 150 ml metanolu, 210 ml kyseliny octové, 2340 ml destilované vody

Eluční pufr – 50 mmol·l⁻¹, NaH₂PO₄, 300 mmol·l⁻¹ NaCl, 200 mmol·l⁻¹ imidazol, 0,05% Tween 20, pH 7,4

Promývací pufr – 50 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·l⁻¹ NaCl, 2 mmol·l⁻¹ imidazol, 0,05% Tween 20, pH 6,8

Adaptační pufr – 500 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄, 1500 mmol·l⁻¹ NaCl, 100 mmol·l⁻¹ imidazol, 0,5% Tween 20 byl přidá k danému objemu před pipetováním do média, pH 8

3.1.3 Přístroje a pomůcky

Injekční stříkačky (BD, USA)

Membránové filtry 45 µm (Sarstedt, Německo)

Flowbox – Safe fast top (Schoeller Instruments, ČR)

Zkumavky-plastové (Eppendorf, Německo, SPL, UK)

Ph metr (Hanna Instruments, USA)

Multifunkční reader (Agilent, USA)

Falcon zkumavky (SPL, UK)

Mikrozkumavky-plastové (Eppendorf, Německo)

Pipety (Eppendorf, Německo, Sarstedt Německo, ThermoFisher Scientific, USA)

Pipetor (Hirschmann, Německo)

Centrifuga (MPW, USA)

Kultivační nádoby (TPP, UK)

Špičky k pipetám (Neptune Scientific, USA)

Vortex IKA (Sigma-Aldrich, USA)

Zakoncetrovací centrifugační kolonka cutoff 10 kDa (Sartorius, USA)

Zdroj pro elektroforézu (Bio-Rad Laboratories, USA)

Elektroforéza vertikální (Bio-Rad Laboratories, USA)

Lopatky pro snadné přenášení elektroforetických gelů (Bio-Rad Laboratories, USA)

96- jamkové destičky (ThermoFisher Scientific, USA)

Orbitální třepačka (Ika, Německo)

Sada pro přípravu gelů na SDS PAGE– krycí sklo, spodní sklo se spacerem, hřebínek, stojánek na skla (Bio-Rad Laboratories, USA)

CO₂ inkubátor (Panasonic, Japonsko)

Laminární box – Aura VF48 (BioAir, USA)

Mikroskop (Leica, Německo)

Centrifugy (Hettich, Německo)

Ultrazvuk (Hielscher, USA)

Analytické váhy (Ohaus, USA)

3.2 Použité metody

3.2.1 Produkce RBD Spike SARS-CoV-2 v 293F buněčné linii

Mikrozkumavka s počtem 5×10^6 Free style 293F buněk byla rozmrazena a buňky byly přeneseny do 20 ml expresního média a kultivované při 37 °C a 8 % CO₂ na orbitální třepacče při 125 rpm. Druhý den byly buňky spočítány a následně kultivovány při koncentraci 3×10^5 až 3×10^6 buněk/ml. Den před transfekcí byly buňky naředěny na hustotu 1×10^6 na 1 ml média a kultivovány přes noc. V den transfekce byly buňky opět ředěny, a to na hustotu 1×10^6 na 1 ml média. Buňky byly transfekovány transfekčním činidlem 293fectin a plasmidem, který kóduje RBD doménu. Před transfekcí byl plasmid a transfekční činidlo (293fectin) naředěny v Opti-MEM médiu. Na každých 80 ml buněčné kultury bylo naředěno 40 µg plasmidu v 1 ml Opti-MEM médiu a inkubováno 5 minut při pokojové teplotě. Transfekční činidlo 293fectin v objemu 80 µl na 80 ml buněčné kultury byl naředěn také v 1 ml Opti-MEM médiu a inkubace také byla 5 minut při pokojové teplotě. Následně celý objem naředěného plasmidu s Opti-

MEM médiem byl přenesen do roztoku naředěného transfekčního činidla 293fectin a směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Směs naředěného transfekčního činidla 293fectin a plasmidu byla následně přenesena do buněčné kultury a buňky byly takto inkubovány 4 dny při 37 °C a 8 % CO₂ na orbitální třepačce při 125 rpm.

3.2.2 Purifikace a zakoncentrování RBD proteinu

Po kultivaci byla provedena centrifugace média při 170 g 10 minut. Médium bylo odpipetováno a zamraženo. Buňky byly rozsuspendovány v původním objemu média a kultivovány další 3 dny. Médium bylo poté opět centrifugováno. K médiu bylo přidáno zamražené médium, 10x adaptivní pufr upravující pH (na 100 ml média bylo přidáno 10 ml pufru) a Ni-NTA agarosa (na 500 ml média 2,5 ml agarosy). Směs byla při velmi malé rychlosti točena na rotátoru při 4 °C přes noc. Agarosa byla promyta 3x15 ml promývacího pufru a protein byl eluován pomocí elučního pufru (6x 0,6 ml). Protein byl dialyzován a zakoncentrován do PBS pomocí zakoncentrovacích centrifugačních kolonek (cutoff 10 kDa). Čistota proteinu byla následně ověřena pomocí SDS-PAGE a koncentrace byla změřena metodou BCA (Pierce) a denzitometricky z SDS-PAGE gelu.

3.2.3 SDS PAGE elektroforéza

Nejprve byla sestavena aparatura k přípravě elektroforetických gelů (dělicího a zaostřovacího). Byla používána 1 mm skla. Námi sledovaný protein měl okolo 30 kDa. Proto bylo použito 15 ml 10% polyakrylamid roztoku na vytvoření dělicího gelu (5 ml 30% akrylamidbisakrylamid, 3,75 ml 4xTris pufr pH 8,8, 6,25 ml H₂O, 75 µl 10% H₂O roztoku persíranu amonného, 15 µl TEMED). Bublinám a vysychání gelu bylo zabráněno přelitím n-butanolem. Gel byl ponechán 20 minut, aby ztuhnul. Mezitím bylo připraveno 10 ml 4% polyakrylamid roztoku jako zaostřovací gelu (1,3 ml 30% akrylamidbisakrylamid, 2,5 ml 4xTris pufr pH 6,8, 6,2 ml H₂O, 50 µl 10% H₂O roztoku persíranu amonného, 10 µl TEMED). Následně byl odmyt n-butanol pomocí ddH₂O a byl nalit zaostřovací gel mezi skla a do něj byl zasunut hřebínek na vytvoření jamek. Gel se nechal ztuhnout (20 minut). Do jednotlivých jamek bylo vždy napipetováno 10 µl eluce (roztok, co se uvolnil při Ni-NTA po přidání elučního pufru). Předtím, než se jednotlivé eluce pipetovaly do jamek, byly považeny s SDS na 5 minut při 90 °C. Elektroforéza byla nastavena na 60 minut při 120 V. Jako standard byl použit PageRuler s katalogovým číslem 26619.

3.2.4 Kvantifikace proteinu pomocí BCA metody

Na kvantifikaci byl použit 96 jamkový panel. Do jamek s označením B2-B9 a C2-C9 bylo napipetováno vždy 10 μ l naředěného roztoku BSA, který byl použit jako standard. Ředění BSA bylo řízeno podle protokolu viz. (Tab.1). BSA byl ředěn pomocí PBS. Původní roztok BSA na ředění měl koncentraci 2 mg/ml. Jamky v řadě D2-D4 byly ponechány pro námi sledovaný vzorek. Vzorek byl podroben 3 ředěním, a proto bylo potřeba použít 3 jamky. Do první jamky bylo napipetováno 5 μ l vzorku do 10 μ l PBS, do druhé jamky 1 μ l vzorku do 10 μ l PBS a do třetí jamky 0,5 μ l vzorku do 10 μ l PBS. Do zbývajících jamek bylo napipetováno PBS.

Následně byl připraven roztok reagující s BCA (WR). Objem WR byl spočítán pomocí následujícího vzorce:

$(\text{standarty} + \text{vzorky}) * (\text{replikáty}) * (\text{pipetovaný objem WR roztoku ke vzorku}) = \text{celkový potřebný objem WR}$. V našem případě byl objem vypočítán následovně:

$(8+3) * (2) * (200 \mu\text{l}) = 4400 \mu\text{l}$ WR činidla. Pro lepší výpočet a následující míchání reagentů bylo číslo zaokrouhleno na 5000 μ l = 5 ml. WR činidlo bylo připraveno smícháním BCA reagentie A s BCA reagentií B (50:1, Reagentie A: Reagentie B). V našem případě 5000 μ l reagentie A a 100 μ l reagentie B. Po přípravě WR roztoku bylo ke standardům a našim vzorkům přidáno 200 μ l WR činidla a následně byla destička s jamkami ponechána na 30 sekund na třepačce. Poté byla destička se vzorky a

Tabulka č.1: Příprava ředění standardů albuminu (BSA)

Schéma ředění BSA jako standardu			
Vzorek (jamka)	Objem roztoku (PBS) (μ l)	Objem BSA (2mg/ml)	Finální koncentrace BSA
1 (B2,C2)	0	300	2000
2 (B3,C3)	125	375	1500
3 (B4,C4)	325	325	1000
4 (B5,C5)	175	175 vzorku 2	750
5 (B6,C6)	325	325 vzorku 3	500
6 (B7,C7)	325	325 vzorku 4	250
7 (B8,C8)	400	325 vzorku 5	125
8 (B9,C9)	400	100 vzorku 6	25

standards ponechána inkubaci na 30 minut při 37 °C. Nakonec byla změřena absorbance jednotlivých jamek se standardy a vzorky při 562 nm.

3.2.5 Kvantifikace proteinu pomocí SDS PAGE

Nejprve byla vytvořena kalibrační řada roztoků BSA. Do každé 1,5 ml zkumavky bylo napipetováno 4 μ l BSA standardu o různém obsahu BSA ve vzorku a 4 μ l 2 x SDS redukčního pufru. Kalibrační řada měla celkem 5 koncentrací BSA. V jednotlivých jamkách bylo 2 μ g, 1 μ g, 0,5 μ g, 0,25 μ g, 0,125 μ g BSA množství. Na kvantifikace proteinu pomocí SDS PAGE byly používány gely, které měly stejné složení jako na předchozí elektroforézu viz. kapitola 3.2.3. Vzorek s našim proteinem (RBD) byl naředěný na koncentraci 1 mg/ml. Do 1,5 ml zkumavky jsme potřebovali 2 μ g RBD, takže do zkumavky bylo napipetováno 2 μ l vzorku s proteinem, 2 μ l 1 x PBS + 4 μ l 2 x SDS redukčního pufru. Následně byly standardy spolu se vzorkem promíchány pomocí pikofugy a poté povařeny na 5 minut při 90 °C. Na elektroforézu byl použit marker s názvem a označením Page Ruler Plus Prest, Product *26619. Do každé jamky bylo napipetováno celkově vždy 8 μ l vzorku. Markeru bylo napipetováno jen 5 μ l. Elektroforéza byla nastavena na 100 V prvních 10 minut. Poté 60 minut při 150 V a následně byla elektroforéza ukončena. Gel byl přenesen do fixačního pufru na 5 minut a poté byl gel přenesen do barviva Coomassie. Gel byl ponechán v barvivu přes noc. Další den byl gel přenesen do odbarvovacího roztoku. Odbarvovací roztok byl vyměňován dle potřeby. Nakonec byla pořízena fotka gelu.

3.2.6 Příprava kompletního kultivačního média IMDM

Do 500 ml nádoby bylo napipetováno 40 ml FBS, 5 ml roztoku penicilínu a 44,5 ml IMDM GlutaMax média. Následně bylo médium pomocí injekční stříkačky přefiltrováno přes filtr. Po přefiltrování bylo do média přidáno 1,7 μ l 50 mmol·l⁻¹ β -merkapt ethanolu.

3.2.7 Kultivace adherentních buněk

Nejprve byly buňky rozmrazeny a přeneseny do zkumavky typu falkon. K buňkám bylo následně přidáno 14 ml PBS. Následovala centrifugace na 5 minut při 250 g a 24 °C. Poté byl supernatant opatrně odsáván a nechal se ve zkumavce pouze spodní pelet buněk. K tomuto peletu bylo přidáno 5 ml IMDM média a buňky byly následně v tomto médiu rozsuspendovány. Ruzsuspendované buňky byly přeneseny do kultivační nádoby

a inkubovány při 37 °C, 5 % CO₂ v inkubátoru do následujícího dne. Následující dny byly buňky vždy zkontrolovány pod mikroskopem. Podle potřeby byly buňky přeneseny do větší kultivační nádoby. Vždy, když bylo buňky potřeba přenést do větší kultivační nádoby, bylo odsáno médium a k buňkám v kultivační nádobě bylo přidáno PBS dle velikosti kultivační nádoby např. na kultivační nádobu o ploše dna 25 cm² bylo použito 5 ml PBS (kvůli zbavení se FBS). Poté byl PBS odsán a byl přidán k buňkám trypsin (množství zase záleželo na ploše dna nádoby 350 µl trypsinu na nádobu o ploše dna 25 cm²) asi na 1-2 minuty. Tímto byly buňky odlepeny. Následně bylo k buňkám přidáno 10 ml kompletního IMDM média a 5 ml média s buňkami bylo odebráno a přepipetováno do další kultivační nádoby. Když bylo v nádobě dostatečné množství buněk, tak byly buňky přeneseny do větší kultivační nádoby. Na provedení experimentu bylo potřeba mít napěstované čtyři kultivační nádoby o povrchu dna 150 cm².

3.2.8 Příprava CNBr aktivované Sepharosy na afinní chromatografii

Do 200 ml 1 mmol·l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové byl přidán 1 gram kyanogen-bromid aktivované Sepharosy minimálně 30 minut. Poté 100 ml roztoku bylo přeneseno do dvou 50 ml zkumavek a roztok byl centrifugován při 400 g, laboratorní teplotě, 5 minut. Supernatant byl po centrifugaci odebrán a k peletu agarosy (2,5 ml – v jedné zkumavce) bylo přidáno 17,5 ml destilované vody. Takto byla agarosa centrifugována při 400 g 3 minuty. Supernatant byl následně odsán a byl proveden opět stejný krok s tím rozdílem, že místo destilované vody byl použit coupling pufr (NaHCO₃/NaCl) s objemem 5 ml. Po odsání supernatantu bylo odebráno 100 µl agarosy a k této agarose byla přidána protilátka anti MHC I (100 µl) spolu se 100 µl coupling pufru. Roztok byl kultivován 2 hodiny při pokojové teplotě na třepačce. K roztoku po kultivaci bylo následně přidáno 2 x 150 µl coupling pufru. Roztok byl poté centrifugován při 400 g 3 minuty. Supernatant byl po centrifugaci odebrán a k agarose bylo přidáno 200 µl 0,2 mol·l⁻¹ roztoku glycinu. Po přidání byl roztok kultivován do dalšího dne (24 hodin) při 4 °C. Před použitím byla Sepharosa následující den ještě 5x promyta (centrifugace při 400 g, 90 sekund, laboratorní teplota) acetátovým pufrem a 5x zásaditým pufrem (coupling pufr).

Z důvodu optimalizace došlo v této části ke změně. Místo 100 µl Sepharosy bylo ve třetím pokusu používáno pouze 65 µl.

3.2.9 Pulzace dendritických buněk RBD doménou Spike proteinu

Do každé kultivační nádoby o ploše dna 150 cm², která obsahovala asi 120 miliónů buněk bylo přidáno 130 µg proteinu. Takto byly buňky kultivovány 24 hodin při 37 °C, 5 % CO₂.

3.2.10 Izolace komplexu MHC I – peptid z dendritických buněk

Na izolaci byly použity 4 plně porostlé kultivační nádoby o ploše dna 150 cm². Po pulzaci bylo buňkám odsáno médium a buňky byly promyty pomocí PBS (10 ml PBS na každou nádobu). Poté bylo PBS odsáno a do každé kultivační nádoby bylo přidáno 1,1 ml trypsinu. Trypsin byl přidáván rovnoměrně, aby se dostal na veškerá místa na dně kultivační nádoby a tím se zajistil maximální zisk buněk. Po asi 2 minutách bylo do nádoby přidáno 3 ml kompletního média, aby byl účinek trypsinu zastaven. Poté bylo médium s buňkami odsáno do 15 ml zkumavky. Stejný postup byl proveden u všech kultivačních nádob. Zkumavka s buňkami byla dále centrifugována při 250 g, 5 minut při laboratorní teplotě. Supernatant byl odsán a k peletě buněk bylo přidáno 4 ml 1% roztoku Triton X 100 v PBS obsahující inhibitory proteas (v 10 ml 1% roztoku Tritonu X-100 - 4 µg Leupeptin, Aprotinin 5,25 µg, Pepstatin 4 µg, 20 µl 250 mmol·l⁻¹ PMSF). Směs byla takto inkubována 2 hodiny na třepačce při 4 °C. Po 2 hodinách byla směs centrifugována při 4000 g, 4 °C, 20 minut a supernatant byl po centrifugaci odebrán do nové 15 ml zkumavky. Ke směsi bylo přidáno 100 µl již předem připravené Sepharosy konjugované s protilátkou anti MHC I a směs byla inkubovaná přes noc na třepačce při 4 °C. Další den byla sepharosa s komplexem MHC I – peptid promyta v 5 ml PBS (centrifugace 90 sekund při 400 g, laboratorní teplota). Komplex MHC I – peptid byl poté eluován do 100 µl 10% kyseliny octové v PBS. Vzorek byl poté poslán k analýze pomocí hmotnostní spektrometrie.

Z důvodu optimalizace došlo v této části k úpravě některých kroků pro dosažení lepších výsledků. V druhém pokusu byl místo 1% roztoku Tritonu X 100 použit 1% roztok SDS, kde směs buněk v 1% roztoku SDS byla inkubována na 2 hodiny na ledu. Zároveň během této inkubace byla podpořena lýze buněk pomocí ultrazvuku, kdy byl na vzorek aplikován 6x ultrazvuk v intervalech 10 sekund a 5 minut probíhalo chlazení roztoku na ledu. Zároveň byla Sepharosa s komplexem MHC I – peptid po noční inkubaci promyta 2x v 5 ml PBS. Ve třetím pokusu došlo ještě k dalším změnám. Místo 1,1 ml trypsinu bylo použito 1,3 ml a místo 3 ml média bylo z každé kultivační nádoby

vzato 4 ml média s buňkami a buňky byly následně 3x promyty pomocí PBS (centrifugace 250 g, 5 minut). Ve třetím pokusu byl opět znovu použit 1% roztok Tritonu X 100 místo 1% roztoku SDS a směs byla opět inkubována na třepačce jako v prvním pokusu. Poslední změnou, která ve třetím pokusu byla provedena bylo závěrečné promytí. Sepharosa s komplexem MHC I – peptid byla 3x promyta ve 2,5 ml PBS.

3.2.11 Měření pomocí hmotnostní spektrometrie

Veškerá měření spojená s hmotnostní spektrometrií a identifikace jednotlivých proteinů byla prováděna pane profesorem M. Šebelou. Při prvním pokusu byl vzorek přečištěn na pipetové špičce ZipTip C18 a následně bylo změřeno hmotnostní spektrum. Vzorek však neobsahoval peptidy.

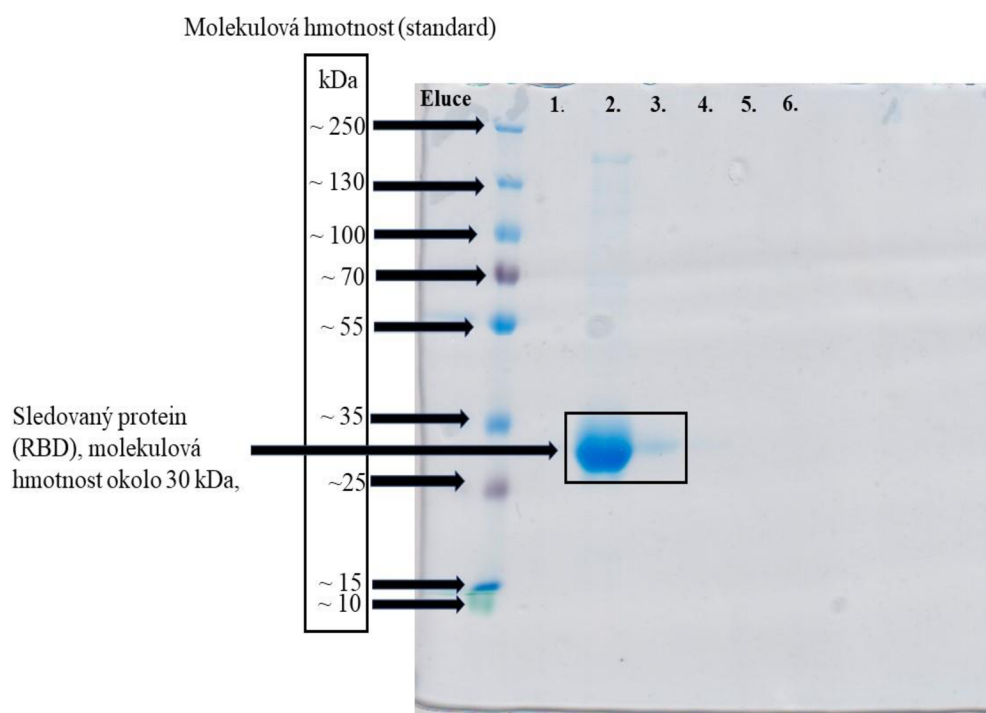
Při druhém pokusu byl vzorek rozdělen na dvě části z důvodu podezření, že peptidy se v kyselém prostředí neodpojují od MHC I molekuly a tím zůstává stále stabilní komplex MHC I – peptid. První část vzorku byla zpracována jako v prvním pokusu, tj. přečištěna na pipetové špičce ZipTip C18 a následně změřeno hmotnostní spektrum. Druhá část byla nejprve naštěpena trypsinem a poté byl pokus trypsinové štěpy identifikovat. Z důvodu vysokého obsahu peptidů pocházejících z hovězího albuminu však tuto identifikaci nebylo možné provést.

Při třetím pokusu byl vzorek štěpen trypsinem v prostředí s $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ močovinou, $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ thiomočovinou a $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NH_4CO_3 o pH 8,0. Směs peptidů byla přečištěna na ZipTip C18 špičkách. Z důvodu vysokého množství peptidů ve vzorku byly následně peptidy od sebe odděleny pomocí nano LC chromatografie. Následovala tandemová hmotnostní spektrometrie a naměřené výsledky byly poté porovnávány proti databázi UniProt.

4 VÝSLEDKY

4.1 SDS PAGE elektroforéza

Pomocí SDS PAGE elektroforézy bylo provedeno ověření exprese a puřifikace RBD proteinu. V našem případě to byla RBD doména viru SARS-CoV-2. Ověření proběhlo pomocí standardu, u kterého byly známy molekulové hmotnosti jednotlivých bandů. Následně byl náš vzorek porovnán se standardem. Pomocí SDS PAGE elektroforézy bylo také stanoveno, ve které eluci bylo vyloučeno největší množství proteinu. V našem případě to bylo ve druhé eluci (Obr. 19). V první eluci nebyl detekován protein a ve třetí eluci bylo množství proteinu značně menší oproti druhé eluci. V dalších elucích již také nebyl protein pozorován.



Obrázek č. 19: Důkaz velikosti proteinu (RBD) v našem vzorku pomocí SDS PAGE elektroforézy

4.2 STANOVENÍ KONCENTRACE POMOCÍ BCA METODY

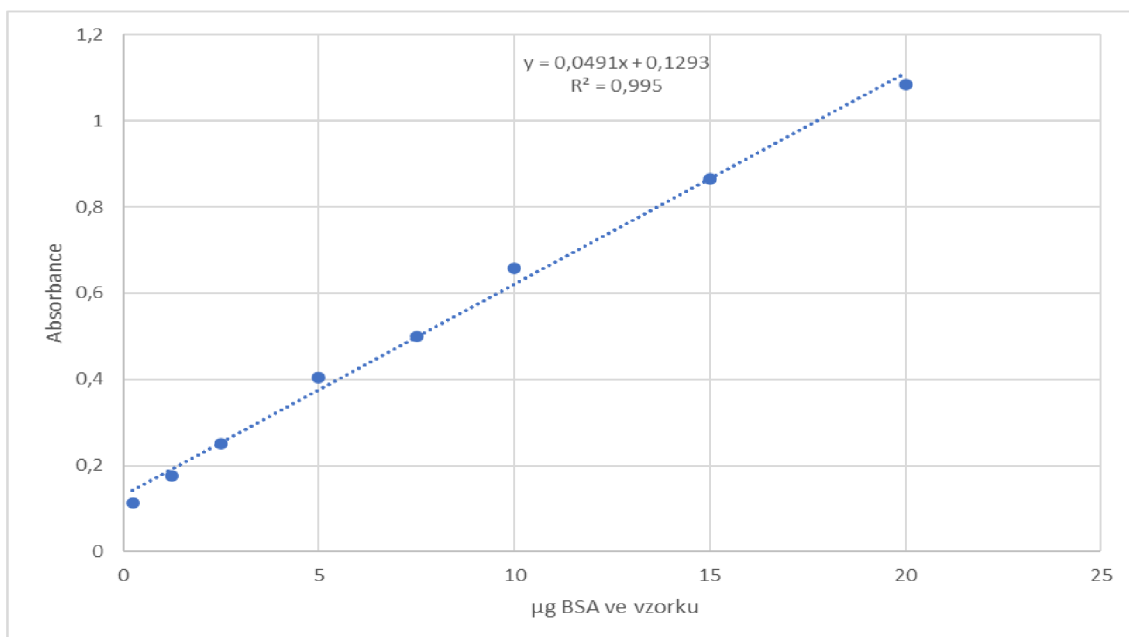
Z naměřených hodnot absorbancí u jednotlivých naředěných vzorků BSA (viz. tabulka č. 2), byly spočítány průměry těchto absorbancí. Z průměrů hodnot absorbancí BSA vzorků byl vytvořen graf ukazující lineární závislost absorbance na množství proteinu ve vzorku (Obr. 20). Pomocí této zjištěné lineární závislosti byly následně vypočítány koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích obsahujících protein (RBD) (viz. tabulka č.4). Hodnota absorbance u vzorku proteinu (RBD), který měl objem 5 μ l, přesahovala maximální hodnotu absorbance u kalibrační řady vytvořené ze vzorků BSA (viz. tabulka č.3), a proto nemohla tato hodnota být zahrnuta pro výpočet koncentrace námi sledovaného proteinu.

Tabulka číslo 2: Jednotlivé hodnoty absorbancí ředěných vzorků BSA

Absorbance jednotlivých vzorků			
Množství BSA ve vzorku	Absorbance 1	Absorbance 2	Průměr absorbancí
20 μ g	1,099	1,071	1,085
15 μ g	0,879	0,851	0,865
10 μ g	0,665	0,653	0,659
7,5 μ g	0,529	0,47	0,4995
5 μ g	0,41	0,4	0,405
2,5 μ g	0,245	0,257	0,251
1,25 μ g	0,177	0,174	0,1755
0,25 μ g	0,111	0,115	0,113

Tabulka číslo 3: Jednotlivé hodnoty absorbancí u vzorků obsahujících protein (RBD)

Absorbance vzorků s proteinem (RBD)	
Objem použitého roztoku s proteinem (RBD) na měření	Absorbance
5 μ l	2,062
1 μ l	0,604
0,5 μ l	0,406



Obrázek č.20: Graf zobrazující lineární závislost absorbance na množství (μg) BSA ve vzorku. Graf obsahuje R^2 (hodnotu spolehlivosti) a také rovnici spojnice trendu.

Tabulka číslo 4: Stanovené koncentrace v jednotlivých objemech vzorku

Objem vzorku	Množství (μg) RBD	Koncentrace $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Průměrná koncentrace ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1 μl	9,668024	9,668024	10,46945
0,5 μl	5,635438	11,27088	10,46945
160 μl	1675,112	10,46945	10,46945

Výpočet pro zjištění koncentrace RBD ve vzorku, kde y je hodnota absorbance a x koncentrace.

$$y = 0,0491x + 0,1293 \Rightarrow x = \frac{y - 0,1293}{0,0491}$$

Po dosažení do rovnice byly následně spočítány koncentrace v jednotlivých vzorcích proteinu a udělán průměr těchto hodnot. Z tohoto průměru bylo poté spočítáno podle vzorce $m = C \cdot V$ množství proteinu v celém objemu získaného vzorku. Celkový objem získaného vzorku s proteinem byl 160 μl . Celkově tedy bylo získáno 1,675 mg RBD proteinu.

4.3 STANOVENÍ KONCENTRACE POMOCÍ SDS PAGE

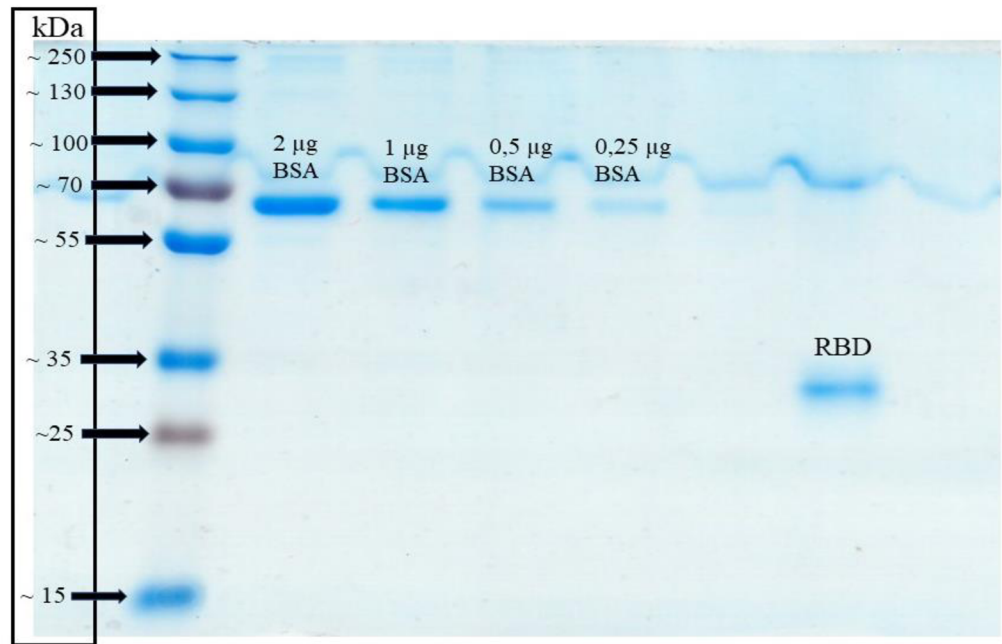
Prostřednictvím SDS PAGE byla provedena kontrola koncentrace již naředěného RBD proteinu na koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Fotografie gelu byla vyhodnocena pomocí programu ImageJ denzitometricky (Obr. 21). V tomto programu byly stanoveny jednotlivé intenzity bandů BSA (viz. tabulka č.5), které sloužily jako standard pro vytvoření lineární závislosti intenzity bandu na množství proteinu ve vzorku (Obr. 22). Pomocí lineární závislosti bylo poté vypočteno množství proteinu ve vzorku, které bylo napipetováno do jamky a množství bylo porovnáno s množstvím proteinu, které podle BCA metody mělo být obsaženo v jamce. Při vytvoření lineární závislosti nebyla zahrnuta koncentrace BSA v jamce 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ z důvodu nízké intenzity. Koncentrace BSA byla příliš malá na to, aby byla zachycena. Na fotografii gelu band nelze vidět, a proto pro vytvoření kalibrační řady byly použity pouze 4 standardy BSA.

Tabulka číslo 5: Standardy BSA vzorků a intenzita bandů

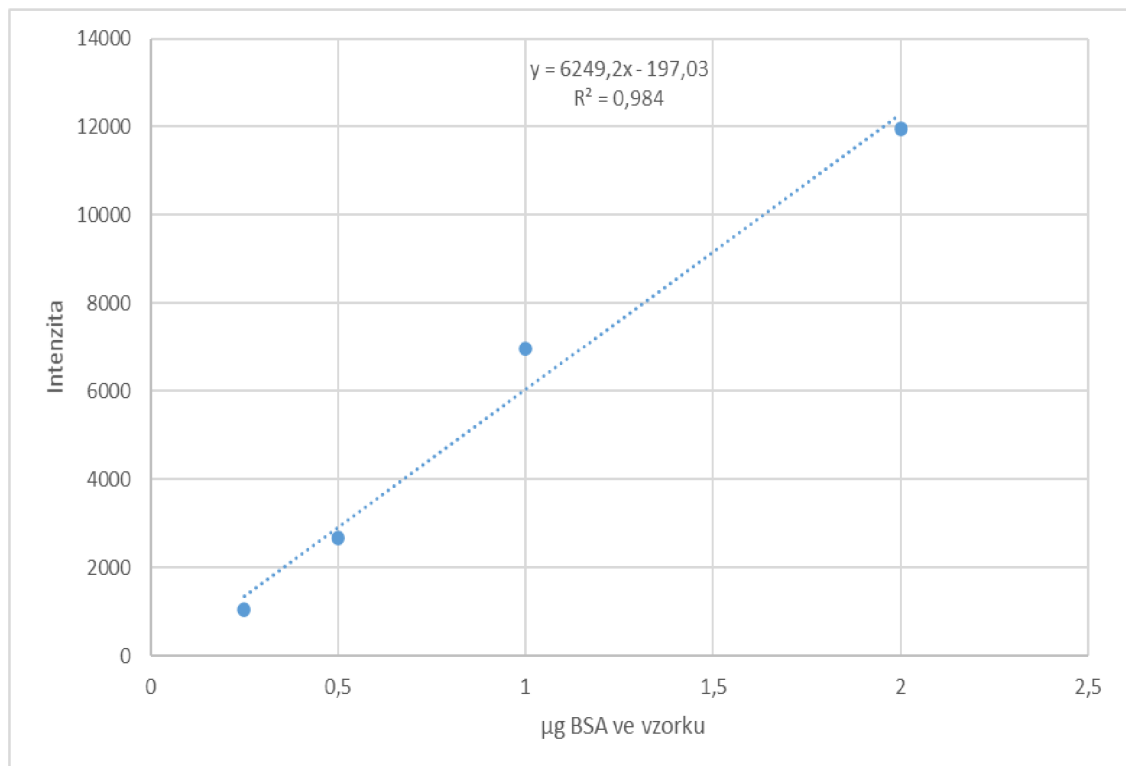
Standard	μg	Intenzita bandů
BSA	2	11941,983
BSA	1	6973,326
BSA	0,5	2679,841
BSA	0,25	1051,234

Intenzita bandu pro RBD protein po vyhodnocení v ImageJ byla 11029,622.

Molekulová hmotnost (standard)



Obrázek číslo 21: Gel po SDS PAGE elektroforéze, který byl použit na vyhodnocení pomocí ImageJ



Obrázek číslo 22: Graf ukazující lineární závislost intenzity na množství (µg) BSA ve vzorku. Graf obsahuje R^2 (hodnotu spolehlivosti) a také rovnici spojnice trendu.

Výpočet pro zjištění koncentrace RBD ve vzorku, kde y je hodnota intenzity a x množství (μg) ve vzorku.

$$y = 6249,2x - 197,03 \Rightarrow x = \frac{y + 197,03}{6249,2}$$

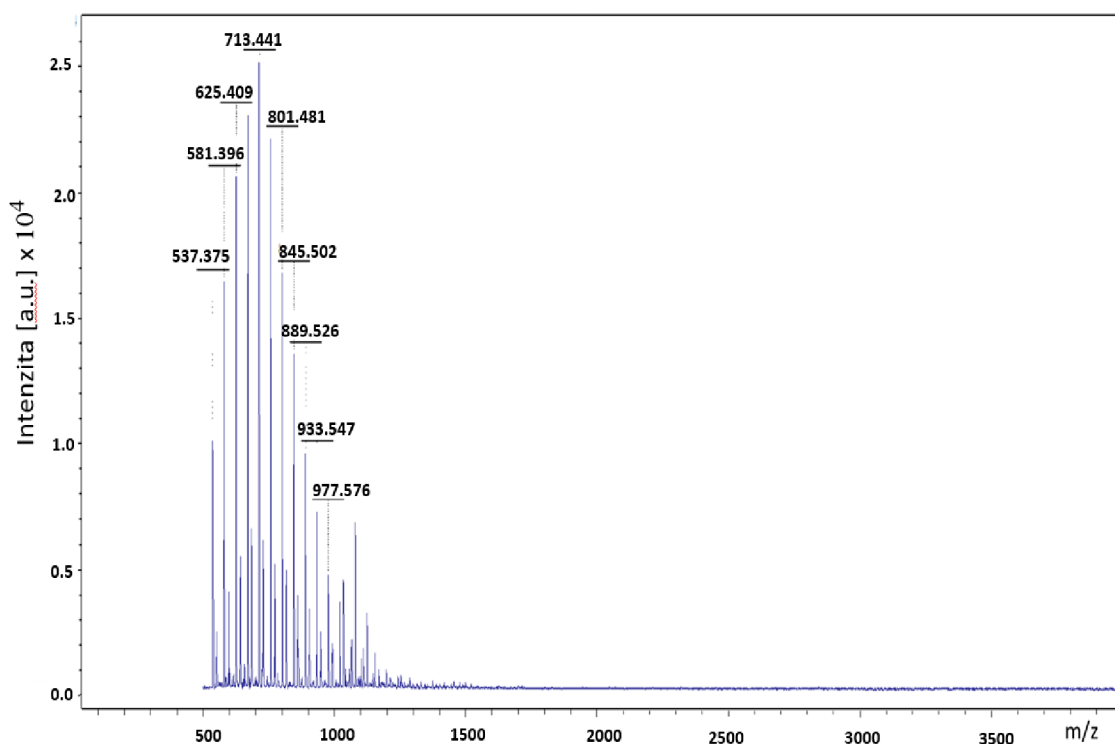
Po dosažení do rovnice bylo následně vypočítané množství ve vzorku s proteinem a porovnán s množstvím, které ve vzorku mělo být podle stanovení pomocí BCA metody (viz. tabulka číslo 6). Odchylka činila pouze $0,1018 \mu\text{g}$, což z důvodu nepřesnosti metod je velice malá a přijatelná odchylka.

Tabulka číslo 6: Porovnání stanovené koncentrace pomocí SDS PAGE proti BCA metodě

Metoda stanovení	Protein RBD (množství v jamce)	Koncentrace v RBD roztoku
BCA metoda	$2 \mu\text{g}$	$1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
SDS PAGE	$1,7964 \mu\text{g}$	$0,8982 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

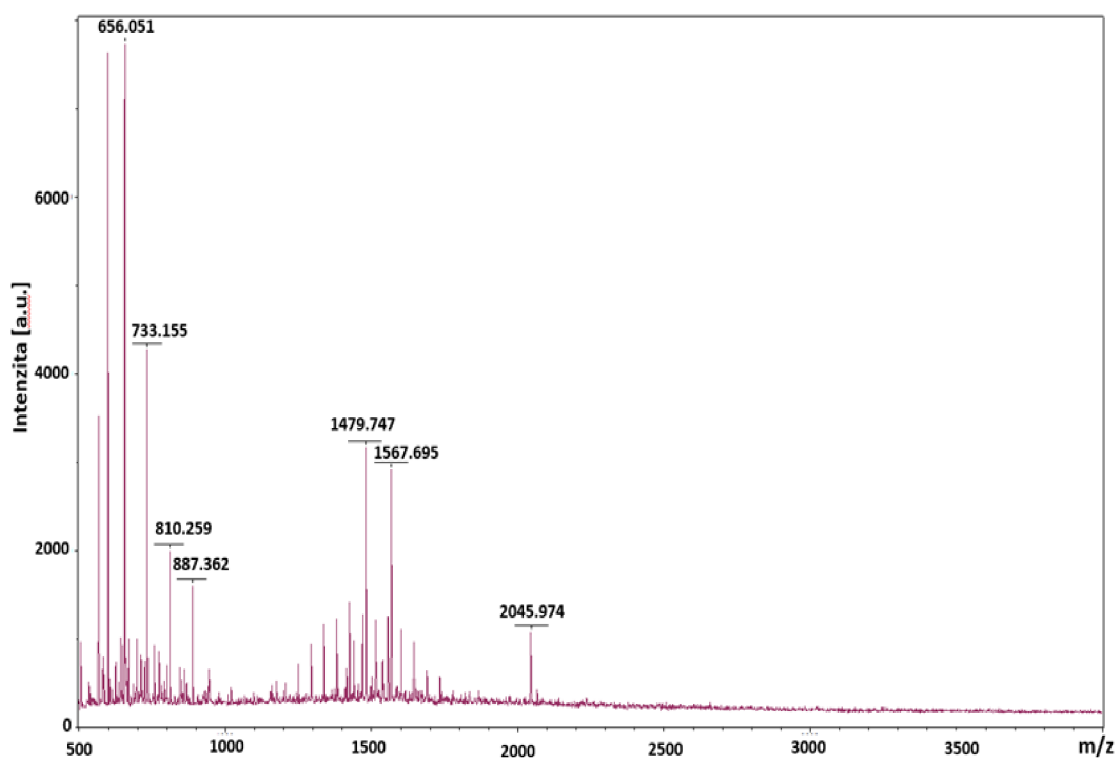
4.4 IDENTIFIKACE PEPTIDŮ NAVÁZANÝCH NA MHC I

Veškerá data a měření na hmotnostním spektrometru byla prováděna panem profesorem M. Šebelou. Všechny grafy a obrázky pocházejí z jeho měření. Pomocí CNBr sepharosy byly z buněčného lyzátu vyselektovány proteiny (komplex MHC I – peptid). Pokus byl 3x zopakován. Během pokusů docházelo k optimalizaci metody. V prvním pokusu na hmotnostním spektrometru nebyly nalezeny žádné peptidy. Bylo to z důvodu špatného předpokladu, že po vložení vzorku do 10% kyseliny octové v PBS budou sledované peptidy uvolněny z molekuly MHC I. Při prvním měření byla v hmotnostním spektru nalezena pouze série píků s hmotnostním rozdílem 44 kDa, což odpovídá polyethylenglykolu (Obr. 23). Jeden z iontů byl fragmentován, ale vůbec neobsahoval aminokyseliny. Polyethylenglykol pocházel z detergentu Tritonu X-100, který byl používán při experimentu.



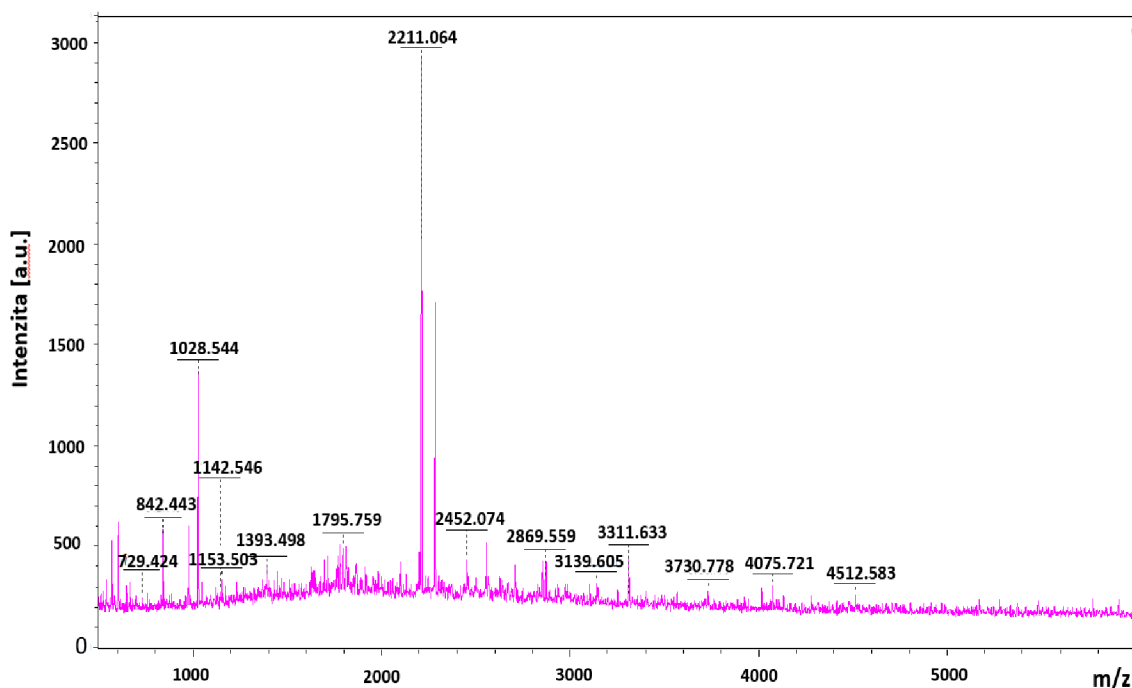
Obrázek č.23: Graf hmotnostního spektra vzorku připraveného při prvním pokusu.

Při druhém pokusu, kdy se jako detergent používal 1% SDS byly již ve spektru objeveny peptidy, nicméně pouze velice malý počet. Celkově byly nalezeny pouze 3 peptidy s hodnotami m/z 1479.747, 1567.695 a 2045.974 (Obr. 24). První dva píky tj. 1479.747 a 1567.695 byly od hovězího albuminu, kterého bylo ve vzorku velké množství. Třetí peptid s hodnotou 2045.974 nebylo možné jednoznačně určit z jakého proteinu pochází. Z důvodů vysoké koncentrace nalezených dvou peptidů pocházejících z BSA ve vzorku byla znemožněna další analýza vzorku. Bylo přistoupeno k další optimalizaci, kdy pro zvýšení výtěžku extrakce byl opět použit Triton X-100 a byly přidány promývací kroky pro zbavení se velkého množství BSA ve vzorku a minimalizaci jeho výskytu. Důkaz, že peptidy obsažené ve vzorku pocházely z BSA, bylo zjištěno jejich sekvencováním.



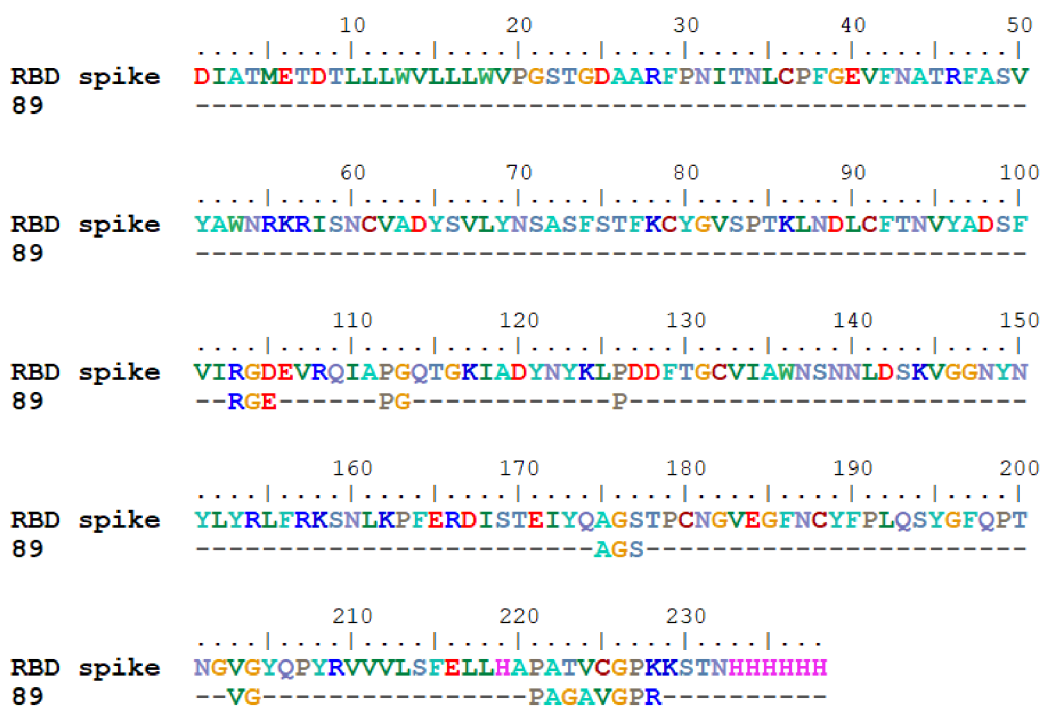
Obrázek č. 24: Graf hmotnostního spektra vzorku připraveného při druhém pokusu.

Třetí pokus byl již úspěšný z hlediska nalezení peptidů pocházejících z MHC I molekul myších dendritických buněk. Vzorek již neobsahoval Triton X-100 ani peptidy pocházející z hovězího albuminu, který by znesnadňoval analýzu. Ve vzorku bylo nalezeno poměrně velké množství peptidového materiálu. Nejvýraznější pík s hodnotou m/z 2211.064 je autolytický peptid trypsinu (Obr. 25), kterého bylo přidáno poměrně velké množství. Po separaci peptidů pomocí nLC probíhalo sekvencování peptidů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF-TOF. Výsledky byly porovnány proti celé databázi UniProt.



Obrázek číslo 25: Graf hmotnostního spektra vzorku připraveného při třetím pokusu.

Celkem bylo nalezeno více než 100 peptidů. Každý peptid byl zvlášť porovnáván proti sekvenci RBD domény Spike proteinu v programu BioEdit a nebyla nalezena žádná významná shoda. Z toho lze usoudit, že nebyl nalezen peptid, který by pocházel z RBD domény Spike proteinu.



Obrázek číslo 27: Porovnání sekvence RBD domény Spike proteinu oproti získané sekvenci peptidu číslo 89 pocházejícího ze vzorku.

5 DISKUZE

Je nezpochybnitelné, že příchod pandemie viru SARS-CoV-2 změnil fungování drtivé většiny dnešních zemí. Tato pandemie způsobila nejen velkou ztrátu na životech, nýbrž také způsobila globální ochromení ekonomického sektoru. Proto byl pohled vědců upínán především na nalezení vhodného řešení, jak tuto pandemii zastavit. Pandemie způsobena virem SARS-CoV-2 si již vyžádala celkově více jak 6 miliónů obětí a více jak půl miliardy lidí bylo tímto virem nakaženo (COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE), 2022).

K řešení, jak tuto pandemii zastavit, ke kterému se přiklonilo nejvíce zemí, je očkování. Jak již bylo zmíněno, tak nalezení bezpečné a účinné vakcíny není jednoduchý úkol. Zároveň virus SARS-CoV-2 podléhá mutacím, které mu mohou poskytovat určitou ochranu vůči imunitní ochraně vyvolané očkováním, a proto jsou dnes zkoušeny různé přístupy na vytvoření účinné univerzální vakcíny.

Jedna z hlavních imunitních obran proti intracelulárním patogenům jsou CD8 + T lymfocyty, které reagují na peptidové fragmenty, jež jsou vystavovány na buněčném povrchu dendritických buněk pomocí MHC I molekul (Hořejší et al., 2017). Analýza peptidů spojených s MHC molekulami je známa jako „imunopeptidomika“. Tato analýza, která je založena na hmotnostní spektrometrii, může nabídnout nové perspektivy a přístupy k infekčním nemocem a také k vývoji vakcín proti těmto nemocem. Zároveň může být nápomocna při imunoterapiích (Vizcaíno et al., 2020). V současné době je izolace komplexu MHC – peptid a následná identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie nejběžnější metodou (Purcell et al., 2019). Díky skutečnosti, že peptidy pocházející z epitopů patogenu, jsou proto považovány za buněčné a humorální aktivátory imunitní odpovědi. Mohou působit proti více sérotypům patogenu. Vakcíny založené na peptidech jsou zároveň bezpečnější a levnější na výrobu, vzhledem k jejich malé velikosti ve srovnání s proteiny (Li et al., 2014). Také peptidové vakcíny jsou zároveň přístupné k výrobě a formulaci tkzv. „peptidových koktejlů“ k vyvolání široké imunitní reakce proti patogenu (Gaur et al., 2021). Zjištění, na jaké peptidy dendritická buňka rozkládá určitý patogen a následně tyto peptidy vystavuje na svém povrchu pomocí MHC I molekul může přinést zásadní pomoc při tvorbě vakcíny. Proto byla také tato práce zaměřena na identifikaci těchto peptidů, které by pocházely z námi přidaného antigenního konstruktů - RBD domény Spike proteinu viru SARS-CoV-2.

Při porovnání s podobnou studií, ve které bylo využíváno podobného protokolu, je těžké určit, čím mohlo být způsobeno, že nebyl nalezen žádný peptid pocházející z RBD domény Spike proteinu. V podobné studii, kde byly používány lidské dendritické buňky nikoli myši jako v našem případě a k buňkám byl přidáván jiný patogen, konkrétně bakterie *Francisella tularensis* způsobující Tularémii, byly peptidy pocházející z přidávaného patogena nalezeny. Multiplicita infekce byla ~100. Následně byly buňky také kultivovány 24 hodin při 37 °C, 5% CO₂. Experiment byl dále řízen podobným protokolem jako v našem případě. Na izolaci komplexu MHC I – peptid byla využita imunoafinitní chromatografie s použitím CNBr aktivované sepharosy, akorát lyzační pufr obsahoval jiné extrakční činidlo. Místo Tritonu X-100 byl používán zwittergent CHAPS. V této studii bylo identifikováno celkem 10 peptidů pocházejících z přidávaného patogenu (Gaur et al., 2021). Experiment tudíž mohlo ovlivnit nesprávně zvolené extrakční činidlo, nebo že bylo přidáno malé množství RBD proteinu k buňkám.

Podstatné jsou také studie zabývající se cytotoxickými T lymfocyty, které sehrávají důležitou roli při nemoci Covid-19. Dnešní vakcíny jsou zaměřovány především na tvorbu protilátek. Neutralizační aktivita však proti novým variantám SARS-CoV-2 má tendenci klesat ve srovnání s aktivitou proti původnímu referenčnímu kmeni. (Garcia-Beltran et al., 2021; Liu et al., 2021; Abu-Raddad et al., 2021; Trombetta et al., 2021; Zhou et al., 2021). Proto je pro boj proti SARS-CoV-2 vyžadována vakcína, která by nebyla ovlivněna mutacemi v genomu viru. CD8⁺ T lymfocyty u jedinců po vyléčení z nemoci Covid-19 dokázaly rozpoznat nejen peptidy odvozené od Spike proteinu, ale také od dalších virových proteinů včetně membránového nebo nukleokapsidového proteinu (Grifoni et al., 2020; Le Bert et al., 2020; Peng et al., 2020). Je zajímavé, že podle studie z roku 2020, byla také zachována reakce T lymfocytů proti nukleokapsidovému proteinu SARS-CoV u jedinců s infekcí prodělanou před 17 lety a tyto buňky ukázaly zkříženou reaktivitu vůči SARS-CoV-2. Výsledky takové studie mohou poskytnout velice důležité informace pro tvorbu univerzální vakcíny, která by mohla být účinná proti mnoha mutacím SARS-CoV-2 a také jiným koronavirům (Le Bert et al., 2020).

Důležité je zmínit, že ne vždy vystavovaný peptidový fragment vázaný na MHC I molekulách dendritických buněk dokáže zaktivovat CD8⁺ T lymfocyty a navodit imunitní odpověď. V jedné studii byla pozorována reaktivita CD8⁺ T lymfocytů na

peptidy, které byly navázané na MHC I molekule a pocházely ze SARS-CoV-2. Peptidy pocházely např. ze Spike proteinu nebo membránového proteinu. Celkem v této studii bylo pozorováno 29 peptidů. Bylo zjištěno, že z 29 peptidů pouze 16 peptidů bylo schopných zaktivovat CD8 + T lymfocyty (Hikichi et al., 2022).

Data z této práce obsahují informace o optimalizaci přípravy vzorku na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Dle výsledků této práce nelze jednoznačně říct, čím bylo způsobeno, že nebyl nalezen žádný peptid pocházející z RBD domény. Vzhledem ke skutečnosti, že nakonec bylo ve vzorku objeveno poměrně dost peptidového materiálu, lze z toho usoudit, že pravděpodobně peptidy pocházející z RBD domény nebyly dostatečně vystavovány na buněčném povrchu dendritických buněk. Pro budoucí experiment by bylo možná vhodné k buňkám přidat více antigenu a případně zkusit použít nějaké adjuvans na stimulaci buněk.

6 ZÁVĚR

Teoretická část byla především zaměřená na antigenní prezentaci a témata s tím spojená jako jsou antigen prezentující buňky, zkřížená antigenní prezentace, struktura a funkce MHC molekul. V této diplomové práci byl pohled zaměřen hlavně na MHC I molekulu. Další část teoretické části byla věnována zvláště viru SARS-CoV-2, kde byla hlavně popsána jeho struktura, která nás zajímala z důvodu RBD domény, jež je součástí Spike proteinu. RBD doména byla předmětem našeho zájmu z důvodu použití této domény jako antigenního konstruktů v experimentální části. Na konci teoretické části můžeme ještě najít, jaké vakcíny byly vyvinuté vůči Covidu-19 a základní informace o hlavních použitých metodách v této diplomové práci.

Experimentální část byla tvořena třemi hlavními částmi. V první části byly transfekovány Free style 293F buňky plasmidem kódující RBD doménu. Takto byl RBD protein vyprodukován. Následně byl protein purifikován pomocí Ni-NTA agarosy a zakoncetrován pomocí zakoncetrovacích centrifugačních kolonek (cutoff 10 kDa). Poté byla provedena SDS PAGE k důkazu, že náš vzorek obsahuje námi sledovaný protein a zároveň bylo zjištěno, ve které eluci je uvolněno nejvíce proteinu. Zároveň byla stanovena koncentrace proteinu pomocí BCA metody. Stanovená koncentrace byla ověřena pomocí SDS PAGE.

V druhé části byly myší dendritické buňky pulzovány antigenním konstruktem. V našem případě to byla RBD doména. Po 24 hodinách pulzace byly buňky lyzovány a pomocí imunoafinitní chromatografie, kde se využívala CNBr aktivovaná sepharosa byl izolován komplex MHC I – peptid. V této části bylo potřeba velké optimalizace.

V poslední třetí části byly vyizolované proteiny obsažené ve vzorku nejprve naštěpeny trypsinem. Poté byly jednotlivé peptidy rozděleny pomocí kapalinové chromatografie a byla zjištěna jejich sekvence pomocí hmotnostní spektrometrie. Nakonec byla provedena identifikace pomocí databáze UniProt.

Po identifikaci byla nalezena shoda celkem ve 14 proteinech s tím, že u 10 proteinů byla shoda nízká. U čtyř proteinů byla shoda poměrně větší. Největší shoda byla nalezena u myšího IgG.

Když se podíváme do historie, tak je dost pravděpodobné, že v budoucnu přijde určitě další pandemie nějakého infekčního onemocnění, jak tomu z historického hlediska vždy bylo např. dýmějový mor nebo španělská chřipka. Je proto důležité, aby

byly rozvíjeny nové přístupy, jak těmto případným novým hrozbám čelit a případně se na ně již připravit, aby případné škody byly, co nejvíce eliminovány, a proto je rozvoj a optimalizace případných nových metod a postupů zcela nepostradatelný a nesmí být zanedbán.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- A.B. B. (A. A. OF B. B.), FUNG, M. K., GROSSMAN, BJ., B., HILLER, C. D., WESTHOFF, C. M., & , M. T. (A. S. C. P.)S. B. B. (Eds.). (2014). *Technical Manual: Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks* (18th edition). American Association of Blood Banks (AABB).
- ABU-RADDAD, L. J., CHEMAITELLY, H., & BUTT, A. A. (2021). Effectiveness of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants. *New England Journal of Medicine*, 385(2), 187-189. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2104974>
- 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>
- ANDERSEN, K. G., RAMBAUT, A., LIPKIN, W. I., HOLMES, E. C., & GARRY, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450-452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- BELOUZARD, S., CHU, V. C., & WHITTAKER, G. R. (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5871-5876. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809524106>
- BEVAN, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *Journal of Experimental Medicine*, 143(5), 1283-1288. <https://doi.org/10.1084/jem.143.5.1283>
- BOSCH, B. J., VAN DER ZEE, R., DE HAAN, C. A. M., & ROTTIER, P. J. M. (2003). The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801-8811. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>
- BURKARD, C., VERHEIJE, M. H., WICHT, O., VAN KASTEREN, S. I., VAN KUPPEVELD, F. J., HAAGMANS, B. L., PELKMANS, L., ROTTIER, P. J. M., BOSCH, B. J., DE HAAN, C. A. M., & PERLMAN, S. (2014). Coronavirus Cell Entry Occurs through the Endo-/Lysosomal Pathway in a Proteolysis-Dependent Manner. *PLoS Pathogens*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502>
- CAMPBELL, D. J., SERWOLD, T., & SHASTRI, N. (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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.1.168>
- CORBETT, K. S., EDWARDS, D. K., LEIST, S. R., ABIONA, O. M., BOYOGLU-BARNUM, S., GILLESPIE, R. A., HIMANSU, S., SCHÄFER, A., ZIWAWO, C. T., DIPIAZZA, A. T., DINNON, K. H., ELBASHIR, S. M., SHAW, C. A., WOODS, A., FRITCH, E. J., MARTINEZ, D. R., BOCK, K. W., MINAI, M., NAGATA, B. M., et al. (2020). SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, 586(7830), 567-571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
- COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE). (2022). Retrieved April 17, 2022, from <https://www.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>
- CRESSWELL, P., BANGIA, N., DICK, T., & DIEDRICH, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunological Reviews*, 172(1), 21-28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01353.x>
- CUI, J., LI, F., & SHI, Z. -L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

- DE HOFFMANN, E., & STROOBANT, V. ([2007]). *Mass spectrometry: principles and applications* (Third edition). John Wiley.
- DESJARDINS, M., HUBER, L. A., PARTON, R. G., & GRIFFITHS, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of Cell Biology*, 124(5), 677-688. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.5.677>
- DONOGHUE, M., HSIEH, F., BARONAS, E., GODBOUT, K., GOSSELIN, M., STAGLIANO, N., DONOVAN, M., WOOLF, B., ROBISON, K., JEYASEELAN, R., BREITBART, R. E., & ACTON, S. (2000). A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation Research*, 87(5). <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.5.e1>
- DREISEWERD, K. (2003). The Desorption Process in MALDI. *Chemical Reviews*, 103(2), 395-426. <https://doi.org/10.1021/cr010375i>
- DU, L., HE, Y., ZHOU, Y., LIU, S., ZHENG, B. -J., & JIANG, S. (2009). The spike protein of SARS-CoV — a target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 226-236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>
- DUTTA, A., HUANG, C. -T., LIN, C. -Y., CHEN, T. -C., LIN, Y. -C., CHANG, C. -S., & HE, Y. -C. (2016). Sterilizing immunity to influenza virus infection requires local antigen-specific T cell response in the lungs. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep32973>
- GAO, Q., BAO, L., MAO, H., WANG, L., XU, K., YANG, M., LI, Y., ZHU, L., WANG, N., LV, Z., GAO, H., GE, X., KAN, B., HU, Y., LIU, J., & CAI. (2020). Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, 369(6499), 77-81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
- GARCIA-BELTRAN, W. F., LAM, E. C., ST. DENIS, K., NITIDO, A. D., GARCIA, Z. H., HAUSER, B. M., FELDMAN, J., PAVLOVIC, M. N., GREGORY, D. J., POZNANSKY, M. C., SIGAL, A., SCHMIDT, A. G., & IAFRATE, A. J. (2021). Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*, 184(9). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.013>
- GAUR, R., VERMA, D. K., ALAM, S. I., & KAMBOJ, D. V. (2021). Identification of MHC Class I bound peptides of Francisella tularensis Live Vaccine Strain using mass spectrometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105651>
- GE, X. -Y., LI, J. -L., YANG, X. -L., CHMURA, A. A., ZHU, G., EPSTEIN, J. H., MAZET, J. K., HU, B., ZHANG, W., PENG, C., ZHANG, Y. -J., LUO, C. -M., TAN, B., WANG, N., ZHU, Y., CRAMERI, G., ZHANG, S. -Y., WANG, L. -F., DASZAK, P., et al. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 503(7477), 535-538. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
- GÉRARD, C., MAGGIPINTO, G., & MINON, J. -M. (2020). COVID-19 and ABO blood group: another viewpoint. *British Journal of Haematology*, 190(2). <https://doi.org/10.1111/bjh.16884>
- GRALINSKI, L. E., SHEAHAN, T. P., MORRISON, T. E., MENACHERY, V. D., JENSEN, K., LEIST, S. R., WHITMORE, A., HEISE, M. T., BARIC, R. S., SUBBARAO, K., ENJUANES, L., & SCHULTZ-CHERRY, S. (2018). Complement Activation Contributes to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Pathogenesis. *MBio*, 9(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01753-18>
- GRIFONI, A., WEISKOPF, D., RAMIREZ, S. I., MATEUS, J., DAN, J. M., MODERBACHER, C. R., RAWLINGS, S. A., SUTHERLAND, A., PREMKUMAR, L., JADI, R. S., MARRAMA, D., DE SILVA, A. M., & FRAZIER. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, 181(7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
- GROMME, M., UYTDEHAAG, F. G. C. M., JANSSEN, H., CALAFAT, J., VAN BINNENDIJK, R. S., KENTER, M. J. H., TULP, A., VERWOERD, D., & NEEFJES, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences, 96(18), 10326-10331. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10326>
- GUERMONPREZ, P., SAVEANU, L., KLEIJMEER, M., DAVOUST, J., VAN ENDERT, P., & AMIGORENA, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, 425(6956), 397-402. <https://doi.org/10.1038/nature01911>
- GUI, M., SONG, W., ZHOU, H., XU, J., CHEN, S., XIANG, Y., & WANG, X. (2017). Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Research*, 27(1), 119-129. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.152>
- HANDBOOK OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY, 2ND EDITION EDITED BY DAVID S. HAGE (University of Nebraska). CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL. 2006. xx 944 pp. \$176.36. ISBN 0-8247-4057-2. (2006). *Journal of the American Chemical Society*, 128(19), 6521-6521. <https://doi.org/10.1021>
- HANDEL, A., YATES, A., PILYUGIN, S. S., & ANTIA, R. (2007). Gap junction-mediated antigen transport in immune responses. *Trends in Immunology*, 28(11), 463-466. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.08.006>
- HEALD-SARGENT, T., & GALLAGHER, T. (2012). Ready, Set, Fuse! The Coronavirus Spike Protein and Acquisition of Fusion Competence. *Viruses*, 4(4), 557-580. <https://doi.org/10.3390/v4040557>
- HIKICHI, T., SAKAMOTO, M., HARADA, M., SAITO, M., YAMANE, Y., TOKUMURA, K., & NAKAMURA, Y. (2022). Identification of cytotoxic T cells and their T cell receptor sequences targeting COVID-19 using MHC class I-binding peptides. *Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01013-4>
- HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., & ŠPÍŠEK, R. (2017). *Základy imunologie* (6., aktualizované vydání). Stanislav Juhaňák - Triton.
- HOUDE, M., BERTHOLET, S., GAGNON, E., BRUNET, S., GOYETTE, G., LAPLANTE, A., PRINCIOTTA, M. F., THIBAUT, P., SACKS, D., & DESJARDINS, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, 425(6956), 402-406. <https://doi.org/10.1038/nature01912>
- HULSWIT, R. J. G., LANG, Y., BAKKERS, M. J. G., LI, W., LI, Z., SCHOUTEN, A., OPHORST, B., VAN KUPPEVELD, F. J. M., BOONS, G. -J., BOSCH, B. -J., HUIZINGA, E. G., & DE GROOT, R. J. (2019). Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9- O - acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7), 2681-2690. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809667116>
- CHEN, X., CARROLL, J. A., & BEAVIS, R. C. (1998). Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9(9), 885-891. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(98\)00059-2](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00059-2)
- ICHIYANAGI, T., IMAI, T., KAJIWARA, C., MIZUKAMI, S., NAKAI, A., NAKAYAMA, T., & UDONO, H. (2010). Essential Role of Endogenous Heat Shock Protein 90 of Dendritic Cells in Antigen Cross-Presentation. *The Journal of Immunology*, 185(5), 2693-2700. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000821>
- IMAI, T., KATO, Y., KAJIWARA, C., MIZUKAMI, S., ISHIGE, I., ICHIYANAGI, T., HIKIDA, M., WANG, J. -Y., & UDONO, H. (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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108372108>
- KALATHIYA, U., PADARIYA, M., MAYORDOMO, M., LISOWSKA, M., NICHOLSON, J., SINGH, A., BAGINSKI, M., FAHRAEUS, R., CARRAGHER, N., BALL, K., HAAS, J., DANIELS, A., HUPP, T. R., & ALFARO, J. A. (2020). Highly Conserved Homotrimer Cavity Formed by the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein: A Novel Binding Site. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/jcm9051473>

- KIRCHDOERFER, R. N., COTTRELL, C. A., WANG, N., PALLESEN, J., YASSINE, H. M., TURNER, H. L., CORBETT, K. S., GRAHAM, B. S., MCLELLAN, J. S., & WARD, A. B. (2016). Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*, *531*(7592), 118-121. <https://doi.org/10.1038/nature17200>
- KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M., GRIFFIN, D. E., LAMB, R. A., ROIZMAN, B., RACANIELLO, V. R., & MARTIN, M. A. (2013). *Fields Virology* (6th Edition). Lippincott Williams & Wilkins.
- KNOCHENMUSS, R., & ZENOBI, R. (2003). MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes. *Chemical Reviews*, *103*(2), 441-452. <https://doi.org/10.1021/cr0103773>
- KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M., & ROCK, K. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*, *267*(5195), 243-246. <https://doi.org/10.1126/science.7809629>
- KRAMMER, F. (2020). SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, *586*(7830), 516-527. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
- KUTTER, J. S., SPRONKEN, M. I., FRAAIJ, P. L., FOUCHIER, R. A. M., & HERFST, S. (2018). Transmission routes of respiratory viruses among humans. *Current Opinion in Virology*, *28*, 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.01.001>
- KYRIAKIDIS, N. C., LÓPEZ-CORTÉS, A., GONZÁLEZ, E. V., GRIMALDOS, A. B., & PRADO, E. O. (2021). SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *Npj Vaccines*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00292-w>
- LE BERT, N., TAN, A. T., KUNASEGARAN, K., THAM, C. Y. L., HAFEZI, M., CHIA, A., CHNG, M. H. Y., LIN, M., TAN, N., LINSTER, M., CHIA, W. N., CHEN, M. I. -C., WANG, L. -F., OOI, E. E., & KALIMUDDIN, S. (2020). SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*, *584*(7821). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
- LI, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, *3*(1), 237-261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- LI, J., WANG, X., CHEN, J., CAI, Y., DENG, A., & YANG, M. (2020). Association between ABO blood groups and risk of SARS-CoV-2 pneumonia. *British Journal of Haematology*, *190*(1), 24-27. <https://doi.org/10.1111/bjh.16797>
- LI, W., JOSHI, M., SINGHANIA, S., RAMSEY, K., & MURTHY, A. (2014). Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*, *2*(3), 515-536. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030515>
- LIU, C., ZHOU, Q., LI, Y., GARNER, L. V., WATKINS, S. P., CARTER, L. J., SMOOT, J., GREGG, A. C., DANIELS, A. D., JERVEY, S., & ALBAIU, D. (2020). Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Central Science*, *6*(3), 315-331. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00272>
- LU, R., ZHAO, X., LI, J., NIU, P., YANG, B., WU, H., WANG, W., SONG, H., HUANG, B., ZHU, N., BI, Y., MA, X., ZHAN, F., WANG, L., HU, T., & ZHOU. (2020). *The Lancet*, *395*(10224). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- MADU, I. G., ROTH, S. L., BELOUZARD, S., & WHITTAKER, G. R. (2009). Characterization of a Highly Conserved Domain within the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein S2 Domain with Characteristics of a Viral Fusion Peptide. *Journal of Virology*, *83*(15), 7411-7421. <https://doi.org/10.1128/JVI.00079-09>
- MALLAPATY, S. (2020). Why does the coronavirus spread so easily between people? *Nature*, *579*(7798), 183-183. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00660-x>
- MENDOZA-NARANJO, A., SAEZ, P. J., JOHANSSON, C. C., RAMÍREZ, M., MANDAKOVIĆ, D., PEREDA, C., LÓPEZ, M. N., KIESSLING, R., SÁEZ, J. C., & SALAZAR-ONFRAY, F. (2007). Functional Gap Junctions Facilitate Melanoma Antigen Transfer and Cross-Presentation between Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, *178*(11), 6949-6957. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6949>
- MERCADO, N. B., ZAHN, R., WEGMANN, F., LOOS, C., CHANDRASHEKAR, A., YU, J., LIU, J., PETER, L., MCMAHAN, K., TOSTANOSKI, L. H., HE, X., MARTINEZ, D. R., RUTTEN, L., BOS, R., VAN MANEN, D., VELLINGA, J., CUSTERS, J., LANGEDIJK, J.

- P., KWAKS, T., et al. (2020). Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 586(7830). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2607-z>
- MILLET, J. K., & WHITTAKER, G. R. (2014). Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), 15214-15219. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407087111>
- MILLET, J. K., & WHITTAKER, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, 202, 120-134. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>
- MUKAI, Y., YOSHINAGA, T., YOSHIKAWA, M., MATSUO, K., YOSHIKAWA, T., MATSUO, K., NIKI, K., YOSHIOKA, Y., OKADA, N., & NAKAGAWA, S. (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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001093>
- NEIJSEN, J., HERBERTS, C., DRIJFHOUT, J. W., REITS, E., JANSSEN, L., & NEEFJES, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*, 434(7029), 83-88. <https://doi.org/10.1038/nature03290>
- NEUMAN, B. W., KISS, G., KUNDING, A. H., BHELLA, D., BAKSH, M. F., CONNELLY, S., DROESE, B., KLAUS, J. P., MAKINO, S., SAWICKI, S. G., SIDDELL, S. G., STAMOU, D. G., WILSON, I. A., KUHN, P., & BUCHMEIER, M. J. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*, 174(1), 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>
- PALLESEN, J., WANG, N., CORBETT, K. S., WRAPP, D., KIRCHDOERFER, R. N., TURNER, H. L., COTTRELL, C. A., BECKER, M. M., WANG, L., SHI, W., KONG, W. - P., & ANDRES, E. L. (2017). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1707304114>
- PANG, B., NEIJSEN, J., QIAO, X., JANSSEN, L., JANSSEN, H., LIPPUNER, C., & NEEFJES, J. (2009). Direct Antigen Presentation and Gap Junction Mediated Cross-Presentation during Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 183(2), 1083-1090. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900861>
- PARK, J. -E., LI, K., BARLAN, A., FEHR, A. R., PERLMAN, S., MCCRAY, P. B., & GALLAGHER, T. (2016). Proteolytic processing of Middle East respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), 12262-12267. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608147113>
- PAULES, C. I., MARSTON, H. D., & FAUCI, A. S. (2020). Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. *JAMA*, 323(8). <https://doi.org/10.1001/jama.2020.0757>
- PENG, Y., MENTZER, A. J., LIU, G., YAO, X., YIN, Z., DONG, D., DEJNIRATTISAI, W., ROSTRON, T., SUPASA, P., LIU, C., LÓPEZ-CAMACHO, C., SLON-CAMPOS, J., ZHAO, Y., STUART, D. I., PAESEN, G. C., GRIMES, J. M., ANTONSON, A. A., BAYFIELD, O. W., HAWKINS, D. E. D. P., et al. (2020). *Nature Immunology*, 21(11). <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
- PILLAY, C. S., ELLIOTT, E., & DENNISON, C. (2002). Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochemical Journal*, 363(3). <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630417>
- PLOTKIN, S. (2014). History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), 12283-12287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400472111>
- PURCELL, A. W., RAMARATHINAM, S. H., & TERNETTE, N. (2019). Mass spectrometry–based identification of MHC-bound peptides for immunopeptidomics. *Nature Protocols*, 14(6), 1687-1707. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0133-y>
- REICHEL, S. (2015). *Affinity Chromatography Methods and Protocols* (3rd ed.). Humana.
- RODRIGUEZ, E. L., PODDAR, S., IFTEKHAR, S., SUH, K., WOOLFORK, A. G., OVBUDE, S., PEKAREK, A., WALTERS, M., LOTT, S., & HAGE, D. S. (2020). Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *Journal of Chromatography B*, 1157. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>

- SHEN, L., SIGAL, L. J., BOES, M., & ROCK, K. L. (2004). Important Role of Cathepsin S in Generating Peptides for TAP-Independent MHC Class I Crosspresentation In Vivo. *Immunity*, 21(2), 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.004>
- SCHIRMBECK, R., MELBER, K., & REIMANN, J. (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. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250431>
- SINGH, R., & CRESSWELL, P. (2010). Defective Cross-Presentation of Viral Antigens in GILT-Free Mice. *Science*, 328(5984), 1394-1398. <https://doi.org/10.1126/science.1189176>
- SONG, W., GUI, M., WANG, X., XIANG, Y., & HEISE, M. T. (2018). Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLOS Pathogens*, 14(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007236>
- STUMP, M. J., FLEMING, R. C., GONG, W. -H., JABER, A. J., JONES, J. J., SURBER, C. W., & WILKINS, C. L. (2002). MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION MASS SPECTROMETRY. *Applied Spectroscopy Reviews*, 37(3), 275-303. <https://doi.org/10.1081/ASR-120014277>
- TAHIR UL QAMAR, M., SALEEM, S., ASHFAQ, U. A., BARI, A., ANWAR, F., & ALQAHTANI, S. (2019). Epitope-based peptide vaccine design and target site depiction against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: an immune-informatics study. *Journal of Translational Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2116-8>
- TAKEDA, M. (2021). Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. *Microbiology and Immunology*, 1348-0421.12945. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12945>
- TORTORICI, M. A., & VEESLER, D. (2019). Structural insights into coronavirus entry. *Complementary Strategies to Understand Virus Structure and Function*, 93-116. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.08.002>
- TROMBETTA, E. S. (2003). Activation of Lysosomal Function During Dendritic Cell Maturation. *Science*, 299(5611), 1400-1403. <https://doi.org/10.1126/science.1080106>
- TROMBETTA, C. M., MARCHI, S., VIVIANI, S., MANENTI, A., BENINCASA, L., RUELLO, A., BOMBARDIERI, E., VICENTI, I., ZAZZI, M., & MONTOMOLI, E. (2021). Serum Neutralizing Activity against B.1.1.7, B.1.351, and P.1 SARS-CoV-2 Variants of Concern in Hospitalized COVID-19 Patients. *Viruses*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/v13071347>
- VALENCIA D N (March 24, 2020) Brief Review on COVID-19: The 2020 Pandemic Caused by SARS-CoV-2. *Cureus* 12(3): e7386. doi:10.7759/cureus.7386
- VIZCAÍNO, J. A., KUBINIOK, P., KOVALCHIK, K. A., MA, Q., DUQUETTE, J. D., MONGRAIN, I., DEUTSCH, E. W., PETERS, B., SETTE, A., SIROIS, I., & CARON, E. (2020). The Human Immunopeptidome Project: A Roadmap to Predict and Treat Immune Diseases, 19(1), 31-49. <https://doi.org/10.1074/mcp.R119.001743>
- VLASAK, R., LUYTJES, W., SPAAN, W., & PALESE, P. (1988). Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12), 4526-4529. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4526>
- VOGEL, A. B., LAMBERT, L., KINNEAR, E., BUSSE, D., ERBAR, S., REUTER, K. C., WICKE, L., PERKOVIC, M., BEISSERT, T., HAAS, H., REECE, S. T., SAHIN, U., & TREGONING, J. S. (2018). Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Molecular Therapy*, 26(2), 446-455. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.017>
- WALLS, A. C., PARK, Y. -J., TORTORICI, M. A., WALL, A., MCGUIRE, A. T., & VEESLER, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- WALLS, A. C., TORTORICI, M. A., BOSCH, B. -J., FRENZ, B., ROTTIER, P. J. M., DIMAIO, F., REY, F. A., & VEESLER, D. (2016 a). Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature*, 531(7592), 114-117. <https://doi.org/10.1038/nature16988>

- WALLS, A. C., TORTORICI, M. A., FRENZ, B., SNIJDER, J., LI, W., REY, F. A., DIMAIO, F., BOSCH, B. -J., & VEESLER, D. (2016 b). Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy, *23*(10), 899-905. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3293>
- WALLS, A. C., TORTORICI, M. A., SNIJDER, J., XIONG, X., BOSCH, B. -J., REY, F. A., & VEESLER, D. (2017). Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(42), 11157-11162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708727114>
- WALTERS, R. R. (1985). Affinity chromatography. *Analytical Chemistry*, *57*(11), 1099A-1114A. <https://doi.org/10.1021/ac00288a001>
- WANG, L., & ALEXANDER, C. A. (2021 a). COVID-19 Compared with Other Viral Diseases: Novelties, Progress, and Challenges. *Electronic Journal of General Medicine*, *18*(1). <https://doi.org/10.29333/ejgm/8575>
- WANG, H., ZHANG, Y., HUANG, B., DENG, W., QUAN, Y., WANG, W., XU, W., ZHAO, Y., LI, N., ZHANG, J., LIANG, H., BAO, L., XU, Y., & DING, L. (2020). Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. *Cell*, *182*(3), 713-721. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.008>
- WANG, S., QIU, Z., HOU, Y., DENG, X., XU, W., ZHENG, T., WU, P., XIE, S., BIAN, W., ZHANG, C., SUN, Z., LIU, K., SHAN, C., LIN, A., JIANG, S., XIE, Y., ZHOU, Q., LU, L., HUANG, J., et al. (2021 b). AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Research*, *31*(2), 126-140. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00460-y>
- WOO, P. C. Y., LAU, S. K. P., LAM, C. S. F., LAU, C. C. Y., TSANG, A. K. L., LAU, J. H. N., BAI, R., TENG, J. L. L., TSANG, C. C. C., WANG, M., ZHENG, B. -J., CHAN, K. -H., & YUEN, K. -Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology*, *86*(7), 3995-4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- WRAPP, D., WANG, N., CORBETT, K. S., GOLDSMITH, J. A., HSIEH, C. -L., ABIONA, O., GRAHAM, B. S., & MCLELLAN, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, *367*(6483), 1260-1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- WU, Y., & ZHAO, S. (2021). Furin cleavage sites naturally occur in coronaviruses. *Stem Cell Research*, *50*. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102115>
- YANG, X. -L., HU, B., WANG, B., WANG, M. -N., ZHANG, Q., ZHANG, W., WU, L. -J., & GE, X. -Y. (2015). *Journal of Virology*, *90*(6). <https://doi.org/10.1128/JVI.02582-15>
- YUAN, Y., CAO, D., ZHANG, Y., MA, J., QI, J., WANG, Q., LU, G., WU, Y., YAN, J., SHI, Y., ZHANG, X., & GAO, G. F. (2017). Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms15092>
- ZACHOVA, K., KRUPKA, M., & RASKA, M. (2016). Antigen Cross-Presentation and Heat Shock Protein-Based Vaccines. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *64*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0370-x>
- ZENOBI, R., & KNOCHENMUSS, R. (1998). Ion formation in MALDI mass spectrometry. *MASS SPECTROMETRY REVIEWS*, *17*(5), 337-366. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1998\)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S)
- ZHAO, Y., ZHAO, Z., WANG, Y., ZHOU, Y., MA, Y., & ZUO, W. (2020 a). Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *202*(5), 756-759. <https://doi.org/10.1164/rccm.202001-0179LE>
- ZHAO, J., YANG, Y., HUANG, H. -P., LI, D., GU, D. -F., LU, X. -F., ZHANG, Z., LIU, L., LIU, T., LIU, Y. -K., HE, Y. -J., SUM, B., WEI, M. -L., LI, Y. -R., YANG, G. -Y., WANG, X. -H., ZHANG, L., ZHOU, X. -Y., XING, M., et al. (2020 b). Relationship between the

- ABO Blood Group and the COVID-19 Susceptibility. *MedRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.03.11.20031096>
- ZHANG, H., KANG, Z., GONG, H., XU, D., WANG, J., LI, Z., CUI, X., MENG, T., ZHOU, W., LIU, J., & XU, H. (2020). Digestive system is a potential route of COVID-19: an analysis of single- cell coexpression pattern of key proteins in viral entry process. *BioRxiv*, 1-9. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-32095>
- ZHOU, H., CHEN, X., HU, T., LI, J., SONG, H., LIU, Y., WANG, P., LIU, D., YANG, J., HOLMES, E. C., HUGHES, A. C., BI, Y., & SHI, W. (2020). A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current Biology*, 30(11), 2196-2203.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.023>
- ZHOU, D., DEJNIRATTISAI, W., SUPASA, P., LIU, C., MENTZER, A. J., GINN, H. M., ZHAO, Y., DUYVESTYEN, H. M. E., TUEKPRAXHON, A., NUTALAI, R., WANG, B., PAESEN, G. C., LOPEZ-CAMACHO, C., SLON-CAMPOS, J., HALLIS, B., & COOMBES, N. (2021). Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell*, 184(9). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.037>
- ZHU, N., ZHANG, D., WANG, W., LI, X., YANG, B., SONG, J., ZHAO, X., HUANG, B., SHI, W., LU, R., NIU, P., ZHAN, F., MA, X., WANG, D., XU, W., WU, G., GAO, G. F., & TAN, W. (2020 a). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- ZHU, F. -C., LI, Y. -H., GUAN, X. -H., HOU, L. -H., WANG, W. -J., LI, J. -X., WU, S. -P., WANG, B. -S., WANG, Z., WANG, L., JIA, S. -Y., JIANG, H. -D., WANG, L., JIANG, T., HU, Y., GOU, J. -B., XU, S. -B., XU, J. -J., WANG, X. -W., et al. (2020 b). Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *The Lancet*, 395(10240), 1845-1854. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31208-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31208-3)

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE2 Angiotenzin-konvertující enzym II

APC Antigen prezentující buňky

BE Brzký endosom

CLR Lektinové receptory

DAMP Molekuly uvolněné z poškozených buněk

DC Dendritické buňky

ER Endoplazmatické retikulum

ERAP Aminopeptidasa endoplazmatického retikula

FBS Fetalní bovinní sérum

FCM Suboptimální furinový štěpný motiv

HLA Lidské MHC molekuly

IMDM Iscoveovo upravené Dulbeccovo médium

Ii Invariantní řetězec

MDP Muramyl dipeptid

MHC Hlavní histokompatibilní komplex

NK Přirození zabijáci

NLR Receptory skupiny NOD

NTD N-terminální doména

NSPS Nestrurní proteiny

PAMP Molekulární struktury typické pro patogenní mikroorganismy

PBS Fosfátový pufr

PFA Paraformaldehyd

PPR Receptor rozpoznávající určitý molekulový vzor

PS Proteasom

RBD Receptor vázající doména

RLR Receptory skupiny RIG

TAP Transportér spojený se zpracováním antigenu

TLR Receptory skupiny Toll

TOF Typ analyzátoru u hmotnostní spektrometrie