

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Eglė Mažeikė

**MODELINĖS PRIEŠVĖŽINĖS VAKCINOS KONSTRAVIMAS
PANAUDOJANT Į VIRUSUS PANAŠIAS DALELES**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2005 – 2011 metais Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute ir Friedrich-Löffler institute Vokietijoje.

Mokslinis vadovas:

Dr. Alma Gedvilaitė (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

TURINYS

TURINYS.....	3
SANTRUMPOS.....	5
IVADAS	7
MOKSLINIS NAUJUMAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Priešvėžinio imuninio atsako ypatybės.....	11
1.2. Priešvėžinės vakcinės.....	26
1.3. Į virusus panašios dalelės.....	32
1.4. LCMV GP33 peptidas – modelinis CTL antigenas	52
2. METODAI IR MEDŽIAGOS	55
2.1. Metodai	55
2.1.1. Plazmidžių konstravimas.....	55
2.1.2. Imlijų <i>S.cerevisiae</i> ląstelių paruošimas ir transformacija	55
2.1.3. Mielių auginimas ir svetimų baltymų sintezės indukcija	56
2.1.4. Svetimų baltymų gryninimas iš mielių ląstelių	56
2.1.5. Baltymų dializė, baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis su NDS.....	58
2.1.6. Western blotas.....	58
2.1.7. Į virusus panašių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu	59
2.1.8. Pelių imunizavimas	59
2.1.9. Imunofermentinė analizė	59
2.1.10. Ląstelių kultūrų auginimas.....	60
2.1.11. Ląstelių užšaldymas ilgalaikiam saugojimui	60
2.1.12. Ląstelių atgaivinimas po ilgalaikio užšaldymo	61
2.1.13. Ląstelių skaičiavimas su tripano mėliu.....	61
2.1.14. Ląstelių žymėjimas antikūnais tėkmės citometrijai	61
2.1.15. LCMV titro nustatymas blužnyje	62
2.1.16. T ląstelių stimuliavimas <i>in vitro</i>	64
2.1.17. Viduląstelinio IFN γ nustatymas	66
2.1.18. Dendritinių ląstelių iš pelių kaulų čiulpų auginimas ir brandinimas	66
2.1.19. Statistinė analizė.....	67
2.2. Medžiagos	68
2.2.1. Darbui naudoti reagentai ir jų gamintojai	68
2.2.2. Plazmidės, oligonukleotidai, peptidai	68
2.2.3. Fermentai, DNR ir baltymų molekulinės masės žymekliai	71
2.2.4. Antikūnai, citokinai	71
2.2.5. Ląstelės.....	72
2.2.6. Gyvūnai	72
2.2.7. Tirpalai, mitybinės terpės	72
2.2.8. Prietaisai	77

2.2.9. Programinė įranga	78
3. DARBO EIGA IR REZULTATAI	79
3.1. HaPyV viruso pagrindinio kapsidės baltymo VP1 – CTL epitopų nešiklio savybių tyrimas	79
3.1.1. Chimerinių VPD su vienu, dviem, trim ir keturiais vienodais CTL epitopų intarpais kūrimas	79
3.1.2. Chimerinių VPD, turinčių trijų skirtingų CTL epitopų intarpus, kūrimas	89
3.1.3. Chimerinių HaPyV VP1 baltymų su sutrumpintu C-galu kūrimas ...	91
3.1.4. Mozaikinių VPD kūrimas	93
3.1.5. Chimerinių VPD su modeliniu GP33 CTL epitopu kūrimas	99
3.2. Chimerinių HaPyV VP1 pagrindu sukurtų VPD gebėjimo sukelti humoralinį imuninį atsaką <i>in vivo</i> tyrimas	103
3.2.1. VP1-CEA VPD gebėjimo indukuoti antikūnų prieš chimerines VPD sintezę pelėse tyrimas	103
3.2.2. Modelinių VP1-GP33 VPD gebėjimo sukelti antikūnų sintezę pelėse tyrimas	106
3.3. Modelinių chimerinių VP1-GP33 VPD gebėjimo sukelti intarpui specifinį CTL imuninį atsaką tyrimas	108
3.3.1. Antigenai specifinių CTL ląstelių stimuliavimas VP1-GP33 VPD <i>in vitro</i>	108
3.3.2. Dendritinių ląstelių brandinimas VP1-GP33 VPD <i>in vitro</i>	110
3.3.3. GP33 antigenai specifinių CD8 ⁺ T ląstelių stimuliavimas dendritinėmis ląstelėmis, subrandintomis su VP1-GP33 VPD, <i>in vitro</i>	111
3.3.4. Antigenai specifinio ilgalaikio CTL imuninio atsako stimuliavimas VP1-GP33 VPD <i>in vivo</i>	113
3.3.5. Profilaktinės imunizacijos VP1–GP33 VPD poveikio, apsaugant peles nuo LCMV infekcijos, tyrimas <i>in vivo</i>	116
3.3.6. Profilaktinės imunizacijos VP1–GP33 VPD poveikio MCA102–GP33 vėžinių ląstelių augimui tyrimas <i>in vivo</i>	117
3.3.7. Terapinio priešvėžinio VP1-GP33 VPD poveikio tyrimas <i>in vivo</i> ...	120
3.3.8. Teorinių CTL epitopų HaPyV VP1 baltymo sekoje nustatymas	122
4. REZULTATŲ APTARIMAS	124
5. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS	134
IŠVADOS	137
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	138
KONFERENCIJOS	139
FINANSINĖ PARAMA	139
CURRICULUM VITAE	140
NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS	141
PADĖKA	154

SANTRUMPOS

Santrumpa ¹	Paaiškinimas
Ag	<u>A</u> ntigenas, -ai
Ak	<u>A</u> ntikūnas, -ai
APL	<u>A</u> ntigenus pateikiančiosios ląstelės (<i>angl.</i> Antigen Presenting Cells)
ar.	<u>A</u> minorūgštis, -ys
BCR	B ląstelių receptorius, nuo <i>angl.</i> <u>B</u> cell receptor
CD	Ląstelių paviršiaus žymenys, nuo <i>angl.</i> <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation
CFSE	Karboksifluoresceinsukcimidilesteris, nuo <i>angl.</i> <u>c</u> arboxy <u>f</u> luorescein <u>s</u> uccinimidyl <u>e</u> ster
CIAP	Šarminė fosfatazė iš veršiuko žarnų, nuo <i>angl.</i> <u>c</u> alf <u>i</u> ntestinal <u>a</u> lkaline <u>p</u> hosphatase
CTL	<u>C</u> itotoksiniai <u>T</u> limfocitai
DL	<u>D</u> endritinės ląstelės
DMSO	<u>D</u> imetilsulfoksidai
EDTA	<u>E</u> tilendiaminotetraacto rūgštis
EGIS	<u>E</u> kariotų genų inžinerijos skyrius
FCS	Embrioninis veršiuko serumas, nuo <i>angl.</i> <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
FITC	<u>F</u> luoresceino izotiocianatas
HaPyV	Žiurkėno poliomos virusas, nuo <i>angl.</i> <u>H</u> amster <u>P</u> olyomavirus
HBV	<u>H</u> epatito <u>B</u> virusas
HPyV	Žmogaus poliomos virusas, nuo <i>angl.</i> <u>H</u> uman <u>P</u> olyomavirus
GM CSF	Granulocitų makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius, nuo <i>angl.</i> <u>g</u> ranulocyte- <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony- <u>s</u> timulating <u>f</u> actor
IFA	<u>I</u> munofermentinė analizė, <i>angl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
IL-4	<u>I</u> nterleukinas ketvirtas
LCMV	Pelių limfocitų choriomeningito virusas, <i>angl.</i> Lymphocytic Choriomeningitis Virus
mAk	<u>M</u> onokloniniai antikūnai
pAk	<u>P</u> olikloniniai antikūnai
PGR	<u>P</u> olimerazės grandininė reakcija
MHC	Pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas, nuo <i>angl.</i> <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex
NK	Ląstelės natūralios žudikės, nuo <i>angl.</i> <u>n</u> atural <u>k</u> iller
PE	Fikoeritrinas, nuo <i>angl.</i> <u>p</u> hycoeritrin

¹ šiame sąraše nėra santrumpų, kurios yra taip plačiai paplitę, kad nereikalauja paaiškinamo, pvz., DNR, RNR ir pan.

PMSF	Proteazių slopiklis fenilmetansulfonilfluoridas, nuo <i>angl.</i> <u>phenylmethanesulfonylfluoride</u>
PFU	Kolonijas formuojantis vienetas, nuo <i>angl.</i> <u>plaque forming unit</u>
PEG	<u>P</u> olietilenglikolis
KT	<u>K</u> ambario <u>t</u> emperatūra
SAP	Šarminė fosfatazė iš krevečių, nuo <i>angl.</i> <u>shrimp alkaline phosphatase</u>
SN	Standartinis nuokrypis
NDS	<u>N</u> atrio <u>d</u> odecilsulfatas
NDS-PAGE	<u>P</u> oliakrilamidinis <u>g</u> elis su <u>NDS</u>
TAA	Vežiniai peptidiniai antigenai, nuo <i>angl.</i> <u>Tumor Associated Antigens</u>
TCR	T ląstelių receptorius, nuo <i>angl.</i> <u>T cell receptor</u>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiaminas
T _H	T ląstelės pagalbinkės, nuo <i>angl.</i> <u>T helper</u>
TRAIL	Su TNF susijęs apoptozę indukuojantis ligandas, nuo <i>angl.</i> <u>(TNF)-related apoptosis-inducing ligand</u>
VPD	Į <u>v</u> irusus panašios <u>d</u> alelės, <i>angl.</i> <u>Virus-like Particles - VLPs</u>)
VP1	Virusinis baltymas 1, nuo <i>angl.</i> <u>virus protein 1</u>

ĮVADAS

Vėžiu yra vadinamos ligos, kurioms būdingas nekontroliuojamas nenormalių ląstelių dalijimasis bei plitimas į gretimus audinius [Vėžio terminų žodynas, www.cancer.gov]. Vėžys kiekvienais metais pasaulyje diagnozuojamas keliems milijonams žmonių. Susirgimų skaičius nuolat auga. Šiuo metu onkologiniams pacientams gydyti yra taikoma kombinuota visų žinomų kovos su vėžiu būdų terapija: chirurginė intervencija, chemoterapija, švitinimas ir vakcinės. Priešvėžinių vakcinų tikslas – suaktyvinti imunitetą prieš tam tikrą antigeną ir sukelti vėžinių ląstelių žūtį.

Identifikavus vėžinius antigeninius peptidus, MHC molekulių pateikiamus vėžinių ląstelių paviršiuje, atsirado peptidinių priešvėžinių vakcinų rūšis. Šių vakcinų tikslas yra sukelti CTL imuninį atsaką prieš vėžinius antigeninius peptidus [Marchand et al., 1995; Rosengerg et al., 1998]. Deja, vėžiniai antigeniniai peptidai yra trumpi (9 ar.), neimunogeniški, kartais sukelia net CTL toleranciją [Toes et al., 1996; Zaks ir Rosenberg, 1998]. Norint patobulinti peptidines vakcinas, yra kuriami ilgesni peptidai arba naudojami papildomi baltymai, kurie pagerintų trumpų peptidų imunogeniškumą ir turėtų papildomų CTL ar T_H epitopų [Perz et al., 2010]. Į virusus panašios dalelės (VPD) gali būti perspektyvi peptidinių vakcinų, skirtų sukelti imuninį atsaką prieš CTL epitopus, alternatyva, kadangi VPD pasižymi virusams būdingomis savybėmis: pasikartojančiu paviršiumi, virusine kilme, dydžiu, gebėjimu sukelti humoralinį ir ląstelinį imuninį atsaką [Pumpens ir Grens, 2002].

Rekombinantinės VPD – tai daugiakomponentės struktūros, sudarytos iš daugybės vieno ar kelių virusinių struktūrinių baltymų kopijų, dažniausiai ikosaedrinės arba siūlinės formos. VPD yra panašios į virusus, iš kurių jos yra kilusios, bet, skirtingai nuo virusų, jos neturi viruso genetinės medžiagos, todėl yra neinfektyvios ir saugios [Pumpens

ir Grens, 2002]. Dendritinės ląstelės (DL) užląstelinius antigenus paprastai pateikia kompleksuose su MHC II klasės molekulėmis, bet VPD fragmentai gali būti kryžmiškai pateikiami su MHC I klasės molekulėmis (ši VPD savybė yra būtina, norint aktyvinti antigenui specifines CTL ląsteles).

Daugelio virusų VPD formuojančius baltymus yra bandoma panaudoti tikslinių trumpų peptidų nešikliais. Įvairių virusinių baltymų pagrindu sukurtos VPD *in vivo* dažniausiai sukelia humoralinį [Bounaguro et al., 2002; Zvirbliene et al., 2006; Kang et al., 2009; Herbst-Kralovetz et al., 2010], o išskirtiniais atvejais ir ląstelinį imuninį atsaką [Lacasse et al., 2008; Ding et al., 2009]. Norint *in vivo* sukelti antigeniniam peptidui specifinį ląstelinį imuninį atsaką, dažnai reikia naudoti adjuvantus, pvz., CpG oligonukleotidus ar α -CD40 antikūnus [Storni et al., 2002; Schwarz et al., 2005].

Žiurkėno poliomos viruso (HaPyV) pagrindinio struktūrinio baltymo VP1 formuojamos VPD gali būti svetimų sekų nešikliai, nes VP1 monomerinis baltymas toleruoja įvairios kilmės ir ilgumo (pvz., 9, 120, 238 ar.) peptidų intarpus bei formuoja VPD [Gedvilaite et al., 2000, 2004, 2006]. Iki šiol duomenų apie HaPyV VP1 pagrindu sukurtų chimerinių VPD gebėjimą sukelti įterptam antigenui specifinį ląstelinį imuninį atsaką *in vivo* nebuvo. Yra žinoma tik tiek, kad pelių imunizavimas pelių poliomos viruso chimerinėmis VPD, turinčiomis įterptą CTL epitopą, sukėlė CTL imuninį atsaką ir slopino vėžinių ląstelių augimą [Brinkman et al., 2005; Andreasson et al., 2009]. Nors pelių ir žiurkėno poliomos virusų VP1 baltymų aminorūgščių sekos yra labai panašios, bet jų formuojamos VPD pasižymi skirtingomis savybėmis: nevienodu gebėjimu subrandinti žmogaus dendritines ląsteles *in vitro* bei hemagliutinacija [Gedvilaite et al., 2006], todėl reikėjo įvertinti HaPyV VP1 VPD gebėjimą sukelti ląstelinį imuninį atsaką *in vivo*.

Pagrindinis šios disertacijos darbo **tikslas** buvo modelinėse sistemose parodyti rekombinantinių HaPyV VP1 baltymų formuojamų VPD panaudojimo priešvėžinių vakcinų kūrimui galimybes, įvertinant svetimų CTL epitopų įterpimo į VP1 baltymą toleravimą, VPD formavimosi efektyvumą bei sukeltą įterptam antigenui specifinį imuninį atsaką.

Darbe buvo iškelti šie **uždaviniai**:

- Sukurti mielių *Saccharomyces cerevisiae* producentus, gaminančius HaPyV VP1 pagrindu sukonstruotus chimerinius (su įvairiais CTL epitopų intarpais) baltymus, šiuos baltymus išgryninti, patikrinti ar jie formuoja VPD.
- Nustatyti VP1 baltymo panaudojimo CTL epitopų nešikliu galimybes, sukurti efektyvesnes chimerinių VPD gryninimo schemas.
- Pelėse ištirti chimerinių VPD su įterptais CTL epitopais gebėjimą sukelti antikūnų prieš įterptus peptidus sintezę.
- Ištirti chimerinių VPD su įterptu modeliniu GP33 epitopu imunogeniškumą *in vitro*: nustatyti VPD gebėjimą subrandinti dendritines ląsteles bei stimuliuoti antigenui specifines CTL ląsteles.
- Ištirti chimerinių VPD su įterptu modeliniu GP33 epitopu imunogeniškumą *in vivo*: nustatyti, ar VPD sušvirkštimas gali sukelti ilgalaikio imuninio atsako prieš GP33 antigeną susidarymą ir apsaugoti peles nuo GP33 specifinio viruso infekcijos ir (ar) stabdyti vėžinių ląstelių augimą.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šiame darbe buvo tiriamos HaPyV viruso pagrindinio struktūrinio baltymo VP1 formuojamų į virusus panašių dalelių (VPD) panaudojimo priešvėžinių vakcinų kūrimui perspektyvos. Vėžinėms ląstelėms būdingų peptidinių antigenų (CTL epitopų) turinčios VPD galėtų padėti imuninio atsako, nukreipto prieš vėžines ląsteles, *in vivo* susidarymui.

Pirmą kartą buvo nuodugniai ištirtos HaPyV viruso VP1 baltymo formuojamų VPD savybės, jų tinkamumas būti CTL epitopų nešikliais. HaPyV VP1 baltymo pagrindu buvo sukurtos chimerinės VPD su įterptais įvairiais CTL epitopais, ištirtos įterpimui palankiausios VP1 baltymo vietos, išbandyti nauji VPD gavimo ir gryninimo būdai, pagerinantys chimerinių VPD formavimąsi bei išėigas.

Pirmą kartą, panaudojant modelines chimerines VPD (turinčias GP33 CTL epitopo intarpus), *in vivo* buvo ištirtas chimerinių HaPyV VP1 pagrindu sukonstruotų VPD sukeliamas ir humoralinis, ir ląstelinis imuninis atsakas. Daugumos virusų pagrindu sukurtos VPD efektyviai sukelia humoralinį atsaką, tačiau tik nedaugelis sužadina ir CTL imuninį atsaką. Šiame darbe buvo parodyta, kad chimerinės VPD su CTL epitopų tarpais *in vitro* ir *in vivo* efektyviai brandino dendritines ląsteles, specifiškai aktyvavo CTL ląsteles, pelėse sukėlė įterptam epitopui specifinį, ilgalaikį, humoralinį ir ląstelinį imuninį atsaką. HaPyV pagrindu sukurtos modelinės chimerinės VPD, efektyviai *in vivo* sužadino įterptam antigenui specifinių CTL ląstelių atsiradimą, o susidaręs CTL imuninis atsakas buvo efektyvus ir naikino antigenui specifines virusais infekuotas bei vėžines taikinio ląsteles.

Gauti rezultatai parodė, kad HaPyV VP1 baltymas yra vienas iš nedaugelio virusų struktūrinių baltymų, kurie ne tik formuoja VPD, bet pasižymi ir universaliomis baltymo – nešiklio savybėmis, o *in vivo* sukelia efektyvų, ilgalaikį, įterptam epitopui specifinį imuninį atsaką.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Priešvėžinio imuninio atsako ypatybės

Vėžiu yra vadinama ligų grupė, kurioms būdingas nekontroliuojamas ląstelių augimas, dalijimasis ir plitimas. Vėžinių ląstelių atsiradimą gali sukelti genetiniai pakitimai, pvz., genų mutacijos, įsiterpę virusiniai genai, sutrikusi normalių genų raiška ir kt. [Weinberg, 2007]. Vėžys yra antra pagal dažnumą mirties priežastis pasaulyje (pirmoji – širdies/kraujagyslių ligos); kiekvienais metais ši liga diagnozuojama keliems milijonams žmonių ir susirgimų skaičius nuolat auga. Pvz., JAV kasdien nuo vėžio miršta apie 1500 žmonių, t. y., daugiau nei pusė milijono per metus; baiminamasi, kad 2010-aisiais mirčių nuo vėžio skaičius užims jau pirmąją vietą pasaulyje [American cancer society duomenys].

Lietuvoje vėžiu serga ~ 70 000 žmonių ir šis skaičius nuolat auga. Kasmet yra diagnozuojama ~ 17 000 naujų vėžinių susirgimų atvejų ir ~8000 pacientų miršta (~ 22 žmonės kasdien) [Lietuvos vėžio registro duomenys].

Vėžinių ląstelių savybės

Vėžinės ląstelės nuo sveikųjų skiriasi savo fiziologija ir morfologija. Minėtus pokyčius lemia genų pažaidos: mutacijos arba genų raiškos pokyčiai, nesusiję su DNR pažaidomis (epigenetinės pažaidos). Dėl genų pažaidų vėžinėje ląstelėje sutrinka ląstelės dauginimosi, diferenciacijos, apoptozės ir kitų procesų valdymas, todėl tokia ląstelė gali nekontroliuojamai ir neribotai daugintis. Iš pradinės pakitusios ląstelės formuojasi ląstelių klonas, vadinamas augliu, kuris vėliau išveši, ardydamas ir naikindamas aplink esančias normalias ląsteles ir audinius. Kraujotakos arba limfine sistema auglio ląstelės gali išplisti po organizmą, formuodamos naujas kolonijas, vadinamas metastazėmis. Auglys,

atsiradęs iš vienos pakitusios ląstelės, gali sutrikdyti viso organizmo funkcionavimą ir sukelti jo mirtį.

Žmogaus organizme supiktybėti gali bet kurio audinio ląstelės, todėl vėžinių susirgimų įvairovė labai plati. Augliai (standžios vėžinių ląstelių sankaupos) yra skirstomi į piktybinius ir gerybinius. Piktybinių auglių formavimasis yra diagnozuojamas kaip vėžinis susirgimas. Vėžiniai susirgimai klasifikuojami ir pagal ląstelių, iš kurių jie išsivystė, tipą, pvz., karcinoma yra epitelio ląstelių, sarkoma – jungiamojo audinio, leukemija – kraujodaros sistemos, limfoma – limfocitų vėžys. Toliau vėžiniai susirgimai yra klasifikuojami pagal organą, kuriame vėžys išsivystė, pvz., plaučių karcinoma ar B ląstelių leukemija.

Sveikų ląstelių dauginimąsi riboja augimo veiksnių, kuriuos sekretuoja daugelis organizmo ląstelių bei specializuoti audiniai (endokrininės liaukos), kiekis ląstelės aplinkoje. Vėžinės ląstelės, skirtingai nuo normalių, gali daugintis ir tada, kai augimo veiksnių iš aplinkui esančių sveikų audinių jos negauna, nes vėžinės ląstelės šių veiksnių prisisintetina pačios. Be to, vėžinėse ląstelėse dažnai aptinkamas padidėjęs augimo veiksnių receptorių kiekis arba receptoriai yra struktūriškai pakitę ir jų aktyvavimui nereikia ligando. Minėtus pokyčius lemia mutacijos receptorių genuose, pvz., amplifikacijos. Turėdamos daugiau receptorių, vėžinės ląstelės stipriau reaguoja į augimą skatinančius signalus ir sėkmingai plinta po organizmą. Vėžinėse ląstelėse gali padidėti ir viduląstelinių baltymų, dalyvaujančių signalų perdavime ar genų transkripcijoje, aktyvumas. Pvz., dėl mutacijos Ras baltymas, perduodantis įvairių augimo veiksnių signalus, tampa pastoviai aktyvus ir ląstelės dauginimąsi aktyvina be išorinių signalų pagalbos.

Ląstelės ciklą valdo sudėtingi molekuliniai mechanizmai, kuriuos pažeidus, ląstelės žūsta arba jų ciklas laikinai sustabdomas kontrolės taškuose. Vėžinėse ląstelėse dauguma ląstelės ciklo kontrolės taškų

mechanizmų neveikia, todėl jos gali nekontroliuojamai daugintis. Daugelyje vėžinių ląstelių „ribos taško“ kontrolės mechanizmai pažeidžiami genų pažaidoms suardžius baltymo Rb valdomą atsaką, ir ląstelės pradeda dalintis be augimo veiksmų signalų. Dažnai vėžinėse ląstelėse nefunkcionuoja ir „DNR pažaidų“ kontrolės taškas: normalios ląstelės, turinčios DNR pažaidų, pasitraukia iš ląstelės ciklo ir pradeda DNR reparaciją, tačiau vėžinės ląstelės, net ir susikaupus dideliu genetinių pažaidų kiekiui jų genomuose, toliau tęsia dalijimosi ciklą, formuodamos genetiškai nestabilių ląstelių klonus. DNR pažaidų kontrolė vėžinėse ląstelėse dažnai nevyksta todėl, kad jose būna mutavę baltymo p53 arba kitų šio atsako baltymų genai. Be to, vėžinėse ląstelėse mutacijos išveiklina DNR reparacijos fermentus, todėl DNR pažaidos lieka nepataisytos ir jų kiekis kaupiasi. Vėžio raida yra nepertraukiamas pažaidų kaupimosi procesas, kuris lemia nekontroliuojamą vėžinių ląstelių dauginimąsi bei invazyvumą.

Apoptozės vengimas – dar viena unikali vėžinių ląstelių savybė. Normalių ląstelių apoptozę sukelia DNR pažaidos, onkogenai, streso signalai. Vėžinėms ląstelėms išvengti apoptozės leidžia įvairūs pokyčiai, pvz., susilpnėję proapoptoziniai (apoptozę skatinantys) ir sustiprėję antiapoptoziniai signalai. Sutrikę apoptozės mechanizmai lemia vėžinių ląstelių atsparumą priešvėžiniam gydymui. Pagrindinis chemoterapijos ir radioterapijos tikslas – sukelti vėžinių ląstelių DNR pažaidas, dėl kurių ląstelės turėtų žūti apoptozės ar nekrozės keliais. Deja, dalis vėžinių ląstelių dėl apoptozės mechanizmų defektų yra atsparios chemoterapijai.

Vėžinėse ląstelėse dažnai būna pažeisti ląstelės senėjimo mechanizmai, sutrikusi fermento telomerazės raiška, gausu mutacijų genuose, valdančiuose replikacinį senėjimą. Nustatyta, kad išveiklinus p53 ir Rb baltymų genus, ląstelė gali peržengti replikacinio senėjimo ribą ir toliau dalintis, kaupdama genetines pažaidas.

Vėžinės ląstelės stimuliuoja angiogenezę – naujų kraujagyslių formavimąsi. Auglys pasiekęs 2–3 mm² dydį nebegali augti be papildomo kapiliarų ir kraujagyslių tinklo. Kraujotakos sistema augliui pristato mitybines medžiagas ir pašalina ląstelių metabolizmo produktus. Per kraujagyslių sistemą vėžinės ląstelės išplinta į kitus organus. Vėžinės ląstelės sintetina kraujagyslių augimą skatinančius baltymus, pvz., VEGF (kraujagyslių endotelio augimo veiksnį), taip aprūpindamos auglį pakankamu kapiliarų ir kraujagyslių tinklu.

Metastazavimas (naujų vėžinių ląstelių klonų formavimasis) – dar viena unikali vėžinių ląstelių savybė. Augančiam augliui reikia vis daugiau erdvės, todėl vėžinės ląstelės ima sintetinti mažiau paviršiaus adhezijos molekulių, padidina matrikso metaloproteazių, urokinazių, katepsinų ir kitų matriksą ardančių proteazių sintezę. Minėti pokyčiai užtikrina vėžinių ląstelių judėjimą į naujas organizmo vietas, kur auglio ląstelės formuoja naujus vėžinių ląstelių klonus. Proteazių dėka vėžinės ląstelės sugeba tirpinti pamatinę laminą bei kitus tarpląstelinio matrikso komponentus. Plisdamos į kitus organus vėžinės ląstelės ne kartą turi atlipti ir vėl prisitvirtinti prie matrikso bei aplinkui esančių ląstelių, todėl jos vėl padidina adhezijos molekulių, kurios yra svarbios, keliaujant kraujotakos sistema bei formuojant naujas kolonijas, sintezę. Vėžinių ląstelių morfologiją įtakoja sumažėję kontaktai su jas supančiais paviršiais. Dauguma vėžinių ląstelių yra apvalesnės ir judresnės nei normalios, jų citoskeleto struktūra yra blogiau išvystyta. Vėžinėms ląstelėms būdingi dideli branduoliai, pakitusi genų raiška ir intensyvūs metabolizmo tempai.

Morfologinius ir fiziologinius pokyčius vėžinėse ląstelėse lemia genų, kontroliuojančių ląstelės proliferaciją, diferenciaciją, senėjimą, apoptozę, ląstelių tarpusavio kontaktus, pažaidos. Mutacijos ir epigenetiniai pokyčiai sutrikdo svarbiausių procesų kontrolę ir suteikia vėžinei ląstelei pranašumą kovoje dėl erdvės ir mitybinių medžiagų. Pirminiuose auglio

ląstelių klonuose aptinkamos tik kelios mutacijos, o progresuojančiuose augliuose – daugybinės mutacijos, epigenetinės pažaidos, sudėtingi chromosomų struktūros arba ploidiškumo pakitimai. Vėžinės ląstelės pasižymi genetiniu nestabilumu – sugebėjimu greitai sukaupti mutacijas. Mutacijų kaupimosi tempai dešimtis kartų viršija spontaninių DNR pažaidų atsiradimą; šiuos pokyčius lemia mutacijos, esančios genomo stabilumo reguliatorių (reparacijos fermentų, ląstelės ciklo kontrolės taškų baltymų ir kt.), genuose. Genetinis nestabilumas suteikia vėžinėms ląstelėms plastiškumo, įtakoja greitus dauginimosi tempus, invazyvumą bei sugebėjimą prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų [Alberts et al., 2002; Mildažienė et al., 2003].

Vėžio imunologija

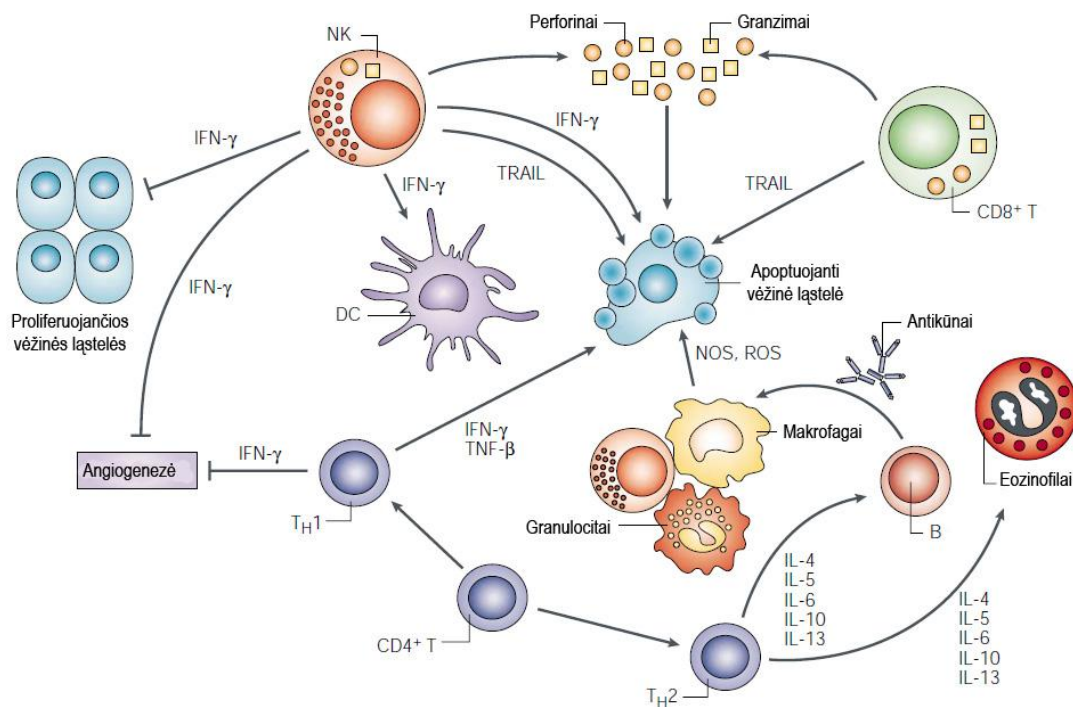
Organizmo imuninė sistema – tai grupė ląstelių (limfocitai, makrofagai, dendritinės ir kt.) ir organų (kaulų čiulpai, blužnis, čiobrialiaukė, limfmazgiai ir kt.), kurių tikslas yra apsaugoti organizmą nuo svetimų genetinės informacijos ir nuo savų pakitusių ląstelių. Vienus gynybos mechanizmus žmogus turi dar prieš kontaktuodamas su patogenais – tai fizikiniai ir cheminiai barjerai, audinių ir kraujo fagocituojančios ląstelės, įvairios kraujyje cirkuliuojančios molekulės, pvz., citokinai, komplemento komponentai. Minėti apsaugos mechanizmai vadinami įgimtu, arba nespecifiniu, imunitetu. Kiti apsaugos mechanizmai pradeda veikti tik po organizmo kontaktų su svetimomis medžiagomis ir yra toms medžiagoms specifiniai – tai įgytas, arba specifinis, imunitetas. Specifinį imuninį atsaką sukeliančios medžiagos vadinamos antigenais. Pagal tai, kokie imuninės sistemos efektoriniai mechanizmai pašalina antigenus, įgytas imunitetas yra skirstomas į humoralinį ir ląstelinį imuninį atsaką. Humoralinio atsako reakcijose dalyvauja antigenui specifiniai antikūnai, o ląstelinio – antigenui specifiniai limfocitai [Mayer, 2009; Todar, 2009].

Kovojant su vėžiu labai svarbus yra tiek įgimtas nespecifinis, tiek įgytas specifinis imuninis atsakas [Mayer, 2009] (1 pav.). Pirmieji į kovą su vėžinėmis ląstelėmis stoja įgimto imuninio atsako komponentai – tai tirpios molekulės (komplemento baltymai) ir įvairios ląstelės (makrofagai, dendritinės, NK ląstelės bei granulocitai – bazofilai, eozinofilai, neutrofilai). Įgytas imunitetas į vėžines ląsteles reaguoja vėliau, lėčiau, tačiau jis yra antigenams specifinis ir turi imuninę atmintį. Imuninės atminties dėka kitą kartą į antigeną imuninė sistema reaguoja greičiau ir stipriau. Pagrindiniai specifinio imuniteto komponentai yra B ląstelės ir jų gaminami antikūnai bei CTL (CD8⁺) ir T_H (CD4⁺) limfocitai. NK T ir γδ T ląstelės priklauso abiemis minėtoms imuninio atsako šakoms [Dranoff, 2004].

Įgimto imuniteto komponentai vėžines ląsteles gali atpažinti per PRR receptorius (nuo *angl.* pattern-recognition receptors). PRR sąveikauja su DAMP molekulėmis (*angl.* damage associated molecular pattern molecules), esančiomis vėžinių ląstelių paviršiuje. Vėžinėse ląstelėse taip pat vyksta, pvz., stresu indukuojamų genų (MICA, MICB) raiška, o jų produktus atpažįsta NKG2D receptoriai esantys NK, makrofagų ir CTL ląstelių paviršiuje.

NK ląstelės (*angl.* natural killer) – tai antigenui nespecifiniai limfocitai. Jie atpažįsta įvairias organizmui svetimas ląsteles ir yra pirmosios ląstelės, galinčios apginti organizmą nuo tik ką atsiradusių vėžinių ląstelių. NK ląstelės turi įvairių receptorių (tiek aktyvinančių tiek slopinančių), pvz., KIR (nuo *angl.* killer-cell immunoglobulin-like receptors) ar KLR (nuo *angl.* killer lectin-like receptors). Receptorių dėka NK ląstelės aptinka MHC I klasės molekulių neturinčias vėžines ląsteles ir gali jas lizuoti perforinų/granzimų keliu, per apoptozę indukuojantį ligandą TRAIL (nuo *angl.* (TNF)-related apoptosis-inducing ligand) bei per NO (azoto oksidą). NK ląstelės taip pat sekretuoja IFNγ, kuris slopina

vėžinių ląstelių proliferaciją, skatina jų apoptozę, pagerina vėžinių antigenų pateikimą ir slopina angiogenezę. NK ląstelės taip pat žudo antikūnais pažymėtas ląsteles (mechanizmas vadinamas ADCC, nuo *angl.* antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). NK ląstelės aktyvina sąveika ne tik su vėžinėmis, bet ir su dendritinėmis ląstelėmis [Murphy et al., 2008].



1 pav. Įgimto ir įgyto imuninio atsako priešvėžinio veikimo schema. Stimuliuotos NK ląstelės vėžines ląsteles gali lizuoti perforinų/granzimų keliu arba per apoptozę indukuojančius ligandus, tokius kaip TRAIL (su TNF susijęs apoptozę indukuojantis ligandas). NK ląstelės sekretuoja IFN γ , kuris slopina vėžinių ląstelių proliferaciją, sustiprina apoptozę, pagerina vėžinių antigenų pateikimą ir slopina angiogenezę. NK T ląstelės taip pat yra citotoksiškos ir gamina citokinus. CTL (CD8⁺) T ląstelės vėžines ląsteles lizuoja mirties receptorių ligandų (pvz., TRAIL) bei granzimų/perforinų keliais. T_H (CD4⁺) ląstelės gali diferencijuotis į T_H1, sekretuojančias IFN γ arba į T_H2 ląsteles, sekretuojančias interleukinus IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ir IL-13. Šie citokinai sustiprina eozinofilų funkciją ir padidina antikūnų sekreciją (B ląstelės). Antikūnai ant vėžinės ląstelės paviršiaus gali užblokuoti onkogeninius signalus ar stimuliuoti vėžinių ląstelių sunaikinimą per Fc receptorius, esančius makrofagų, granulocitų ar NK ląstelių paviršiuje. Antikūnai taip pat gali palengvinti vėžinių antigenų pateikimą dendritinių ląstelių paviršiuje formuodami imuninius kompleksus. Makrofagai gali naikinti vėžines ląsteles išskirdami azoto oksidą ir reaktyvias deguonies formas. Auglio kraujagysles gali atakuoti limfocitai ir granulocitai [Dranoff, 2004].

NK T ir $\gamma\delta$ T ląstelės yra vadinamos ILL ląstelėmis (nuo *angl.* innate-like lymphocytes); jos turi antigenams specifinių receptorių, todėl ir vadinamos T ląstelėmis. Minėtieji receptoriai yra silpnai išreikšti, jų įvairovė skurdi (patiria tik kelis genų persitvarkymus). ILL ląstelės randamos tik tam tikruose audiniuose. $\gamma\delta$ T ląstelės aptinkamos epitelyje, šių ląstelių svetimkūnių atpažinimo ligandai gali būti HSP baltymai (*angl.* heat shock protein), nukleotidai, fosfolipidai. NK T ląstelės randamos čiobrialiaukėje ir periferiniuose limfiniuose organuose, atpažįsta glikolipidus ir labai greitai ima sekretuoti citokinus – IL-4, IL-10, IFN γ [Murphy et al., 2008].

Dendritinės ląstelės (DL) ir makrofagai yra antigenus pateikiančiosios ląstelės (APL). APL ląstelės vėžines ląsteles, jų liekanas, jau apoptuojančias ląsteles, bei baltymus, išėjusius iš nekrozės apimtų vėžinių ląstelių, sugauna, fagocituoja ir sunaikina, o gautus antigeninius peptidus, kompleksuose su MHC molekulėmis, pateikia savo paviršiuje specifinio imuninio atsako ląstelėms. Dendritinės ląstelės vėžinės kilmės peptidus pateikia NK T ląstelėms su CD1D molekulėmis, o CD8⁺ ir CD4⁺ T limfocitams – su MHC I ir MHC II klasių molekulėmis. Subrendusios dendritinės ląstelės savo paviršiuje taip pat turi kostimuliuojančių molekulių (B7-1, B7-2), būtinų T ląstelių aktyvavimui [Steinman, 1991; Mellman ir Steinman, 2001; Guermonprez et al., 2002]. Be to, dendritinės ląstelės sekretuoja interleukinus IL-12 ir IL-18, kurie papildomai stimuliuoja T_H1 (CD4⁺) bei CTL (CD8⁺) ląsteles. APL taip pat naikina antikūnais pažymėtas ląsteles. Makrofagai vėžines ląsteles papildomai gali lizuoti gamindami azoto oksidą ir reaktyvias deguonies formas [Brown ir Kirkwood, 2001; Dranoff, 2004; Todar, 2009].

B ląstelės (antigenui specifinio imuninio atsako ląstelės efektorės) padeda kovoti su vėžinėmis ląstelėmis sekretuodamos antikūnus prieš tam tikrą vėžinį antigeną. Vėžinių ląstelių paviršiaus antigenams

specifiniai antikūnai gali slopinti onkogeninius signalus ir (arba) stimuliuoti vėžinių ląstelių sunaikinimą, per Fc receptorius, pritraukdami makrofagus, granulocitus ar NK ląsteles. Antikūnai, formuodami imuninius kompleksus, gali prisidėti ir prie vėžinių antigenų pateikimo dendritinių ląstelių paviršiuje.

T limfocitai – vienos pagrindinių specifinio priešvėžinio imuninio atsako ląstelių. Yra du pagrindiniai šių ląstelių tipai: T_H ($CD4^+$) ir CTL ($CD8^+$) ląstelės.

CTL ląstelės yra pagrindinės vėžines ląsteles žudančiosios ląstelės. CTL naikina antigenui specifines vėžines ląsteles perforinų, granzimų arba mirties receptorių (pvz., FAS, TRAIL) keliais [Nabholz ir McDonald, 1983; Melief ir Kast, 1991; Greenberg, 1991; Berke, 1994]. CTL ląstelės savo TCR receptoriais atpažįsta trumpus peptidus (9–10 ar.), esančius kompleksuose su MHC I klasės molekulėmis, įvairių branduolį turinčių ląstelių paviršiuje [Zinkernagel ir Doherty, 1979]. Vieną kartą aktyvintos CTL ląstelės įgyja imuninę atmintį. CTL ląstelės specifiškai atpažįsta vėžines ląsteles tik tada, kai jas stimuliuoja dendritinės ląstelės (profesionaliausios APL ląstelės) [Schuler ir Steinman, 1997; Nestle et al., 1998]. Pačios vėžinės ląstelės tiesiogiai negali stimuliuoti T ląstelių, nes neturi kostimuliuojančių molekulių, būtinų T ląstelių aktyvavimui bei efektyvaus ląstelinio imuninio atsako susidarymui.

T_H ($CD4^+$) ląstelės atpažįsta ilgesnius (12-20 ar.) peptidus esančius kompleksuose su MHC II molekulėmis APL (dendritinės, B ląstelės, makrofagai) ląstelių paviršiuje [Germain ir Margulies, 1993; Grabbe et al., 1996]. T_H ląstelės gali diferencijuotis į T_H1 ląsteles, kurios sekretuoja IFN γ ir TNF β arba į T_H2 ląsteles, sekretuojančias IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, ir taip skatina eozinofilų funkciją bei padidina B ląstelių gamintamų antikūnų produkciją. IFN γ vėžinių ląstelių paviršiuje padidina MHC molekulių raišką [Schoenberger et al., 1998; Ridge et al., 1998; Bennett et al., 1998].

Be to, suaktyvintos CD4⁺ T ląstelės (ir NK T) sintetina CD40L ligandą, kuris per CD40 stimuliuoja DL brendimą [Brown ir Kirkwood 2001; Todar, 2009], o tai sustiprina CTL ląstelių atsaką [Ridge et al., 1998; Bennett et al., 1998; Toes et al., 1998] bei atminties ląstelių susidarymą [Giuntoli et al., 2002].

Vėžinių ląstelių „pabėgimo“ nuo imuninės sistemos mechanizmai

Vėžinės ląstelės turi visą eilę „pabėgimo“ nuo imuninės sistemos mechanizmų, kurie užtikrina, kad vėžinės ląstelės liktų imuninės sistemos nepastebėtos ir nesunaikintos. Tai antigenų pateikimo slopinimas ir sutrikdymas, imuninę sistemą slopinančių citokinų sintezė, reguliacinių imuninių ląstelių prisitraukimas [Khong ir Restifo, 2002; Drake et al., 2006; Whitside, 2006].

Antigenų pateikimo sutrikimai vėžinėse ląstelėse

Su vėžiu susiję antigenai (TAA) vėžinių ląstelių paviršiuje yra pateikiami kompleksuose su MHC molekulėmis, kur jie galėtų būti CTL ląstelių atpažinti, o atpažintos vėžinės ląstelės sunaikintos. Tačiau vėžinės ląstelės pasižymi sumažinta MHC I ar β 2-mikroglobulino (būtina MHC I klasės molekulės dalis atsakinga už komplekso stabilizavimą) molekulių raiška. Pvz., vėžinėse ląstelėse, MHC molekulių genuose, atsiranda mutacijų, dėl to CTL ląstelių TCR receptoriai vėžinių ląstelių nebegali atpažinti. Kartais vėžinės ląstelės MHC molekules sekretuoja už ląstelės ribų, o ne ląstelės paviršiuje ir taip išvengia CTL ląstelių atpažinimo. Šis reiškinys yra vadinamas ląstelės šėrimusi (*angl.* shedding). Epitopo pakitimas – dar vienas galimas vėžinių ląstelių pabėgimo nuo imuninės sistemos būdas. Išlieka tos vėžinės ląstelės, kurių antigenuose yra įvykę pakitimų – taškinių mutacijų, iškritų ar kt. Pakitusios ląstelės yra selektyviai atrenkamos, nes turi pranašumą prieš ląsteles su nepakitusiais epitopais, kuriuos gali atpažinti CTL ląstelės.

Vėžinėse ląstelėse gali sumažėti MHC molekulių (užmetilinamas geno promotorius) [Nie et al., 2001] ar kitų komponentų, dalyvaujančių antigeno pateikimo ląstelės paviršiuje procese, raiška, pvz., proteosomos LMP subvienetų, TAP transporterio, šaperono tapasino [Restifo et al., 1993]. Sumažėjusi, bet neišnykusi MHC I molekulių sintezė nustatoma daugeliu vėžinių susirgimų atvejų. Jeigu vėžinės ląstelės visai neturi MHC I molekulių, tai CTL ląstelės negali jų atpažinti ir, žinoma, sunaikinti. Tačiau visiškas MHC I nebuvimas ant vėžinių ląstelių yra laikomos geresniu prognostiniu žymeniu, nes išlieka tikimybė, kad tokias vėžines ląsteles sunaikins NK ląstelės. Deja, dažnai vėžinės ląstelės savo paviršiuje neturi NK ląstelėms būtinų aktyvacijos molekulių [Ljunggren ir Karre, 1990; Smyth et al., 2002]. 10–84 proc. gimdos kaklelio karcinomų, melanomų ir kt. atvejais būna sumažėjęs arba visai išnykęs TAP transporterių kiekis. TAP transportuoja proteolizės būdu atsiradusias antigeninių peptidų molekules iš citozolio į endoplazminį tinklą, kur jos jungiasi su MHC molekulėmis ir keliauja į ląstelės paviršių, todėl daugelio etapų antigenų pateikimo procese yra didelis TAP baltymo poreikis [Hicklin et al., 1999].

Imuninę sistemą slopinančiųveiksnių sekretavimas vėžinėse ląstelėse

Vėžinės ląstelės sekretuoja įvairias tirpias medžiagas, pvz., citokinus, augimo veiksnius, kurie slopina imuninę sistemą. Vienas iš tokių citokinų yra TGF- β (*angl.* transforming growth factor), kuris slopina T ląstelių aktyvavimą, proliferaciją ir diferenciaciją bei skatina angiogenezę [Li et al., 2006]. Vėžinės ląstelės neturi TGF- β receptorių, taip jos išvengia šio veiksnio poveikio. Priešingai negu normalios ląstelės, kurios gamina citokinus tik tam tikrą laiką, vėžinės juos gali produkuoti nuolatos. TGF- β slopina perforinų ir granzimų, Fas ligando, IFN γ , IL-2 raišką, o jie yra būtini CTL ir T_H aktyvavimui, bei CTL ląstelių citotoksiškumui [Thomas ir Massague, 2005].

IL-10 yra vėžinių ląstelių sekretuojamas citokinas, slopinantis dendritinių ląstelių veiklą: sumažėja TAP transporterių, būtinų kokybiškam peptidų pateikimui, bei MHC, kostimuliuojančių molekulių (CD80, CD86) ir adhezijos molekulių (ICAM-I) sintezė ir taip sutrikdomas CTL ir T_H ląstelių aktyvavimas [Malefyt et al., 1991; Moore et al., 2001; Kurte et al., 2004]. IL-10 „nukenksmindamas“ dendritines ląsteles sutrikdo įgimto nespecifinio imuniteto ryšį su įgytu specifiniu. Be to, abu citokinai, tiek IL-10, tiek ir TGF-β, skatina vienas kito sintezę [Mocellin et al., 2005].

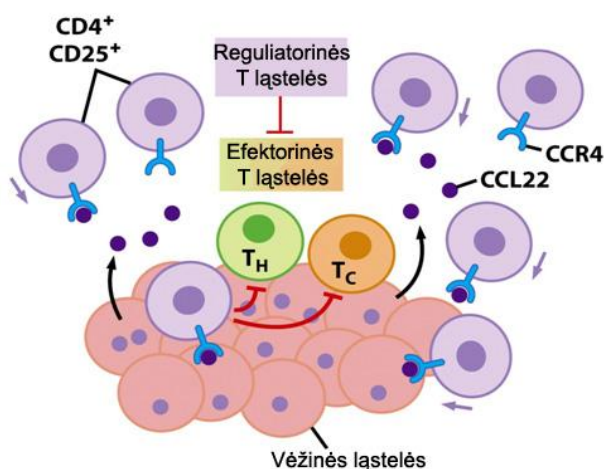
Prie vėžinių ląstelių sekretuojamų imuninę sistemą slopinančių faktorių priskiriamos ir mikropūslelės – vėžinės ląstelės išorinės membranos dariniai su Fas ligandu ir TRAIL, kurie skatina apoptozę. T ląstelė prisijungusi prie minėtos pūslelės gauna signalą susinaikinti. Vėžinių susirgimų atvejais spontaniškas T ląstelių susinaikinimas pastebimas gan dažnai [Whitside, 2005]. Mikropūslelių pagalba vėžinės ląstelės atsikrato ir MHC bei kostimuliuojančių molekulių. Šis reiškinys leidžia vėžinėms ląstelėms išvengti T ląstelių prisijungimo. Mikropūslelės yra aptinkamos tik vėžiu sergančių pacientų kūno skysčiuose.

Reguliacinių T ląstelių (T_{reg}) funkcijos

Vėžinių ląstelių aplinkoje dažnai yra randama reguliacinių T ląstelių (T_{reg}). Tai CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T ląstelės. Pagrindinė jų funkcija yra slopinti CTL ir T_H ląsteles [Sakaguchi, 2004]. T_{reg} ląsteles aktyvina TGF-β ir IL-10, o prie vėžinių ląstelių pritraukia chemokinai.

T_{reg} ląstelės į vėžinių ląstelių aplinką gali patekti iš čiobrialiaukės, limfmazgių, kaulų čiulpų ar periferinio kraujo. Vėžinės ląstelės skatina T_{reg} infiltraciją į vėžinį audinį gamindamos daug chemokino ligando CCL22, kurio receptorių yra CCR4 (esantis T_{reg} ląstelių paviršiuje). Vėžinės ląstelės gamina APL ląsteles slopinančias molekules, o nesubrendusios ir nefunkcionalios APL ląstelės skatina T_{reg} diferenciaciją ir, manoma, jog

sukelia jų plitimą. Vėžinių ląstelių aplinkoje yra daug TGF- β , kuris normalias CD4⁺ T ląsteles gali paversti į T_{reg} ląsteles.



2 pav. Vėžinių ir CD4⁺CD25⁺ reguliacinių T ląstelių (T_{reg}) sąveikos schema. Vėžinės ląstelės pritraukia T_{reg} ląsteles (violetinės) sekretuodamos chemokiną CCL22, kurio receptorių CCR4 yra T_{reg} ląstelių paviršiuje. Pagrindinė T_{reg} ląstelių funkcija – CTL (T_c paveiksle) ir T_H ląstelių slopinimas [Weinberg, 2007].

Yra keletas mechanizmų, kuriais T_{reg} ląstelės blokuoja priešvėžinį imunitetą. Jos indukuoja B7-H4 molekulių raišką APL ląstelių paviršiuje ir taip sustabdo T ląstelių ciklą. Suaktyvintos T_{reg} ląstelės pačios tiesiogiai perforinų ir granzimų keliu gali žudyti taikinio ląsteles – APL ir T ląsteles. Be to, T_{reg} ląstelės turi CTLA4 molekules (su citotoksinais T limfocitais susijęs ketvirtas antigenas), kurios priverčia APL ląsteles sintetintiIDO (indolamino 2,3-dioksigenazė), todėl sumažėja triptofano kiekis ir sustabdomas T ląstelių aktyvavimas. T_{reg} ląstelės taip pat sekretuoja IL-10 ir TGF- β bei tiesiogiai slopina T ląstelių aktyvaciją ir, sutrikdo APL ląstelių funkciją (APL negamina MHC, CD80, CD86, IL-12) [Zou, 2006].

Siekiant sukelti efektyvų priešvėžinį imuninį atsaką, esminį vaidmenį atlieka dendritinės ląstelės. Deja, vėžinių ląstelių aplinkoje DL dažniausiai yra randamos nesubrendusios (labai žemas kostimuliuojančių molekulių, IL-12 raiškos lygmuo) arba tolerantiškos ir neatliekančios savo funkcijų [Robinovich et al., 2007].

Vėžinių ląstelių ir imuninės sistemos santykiai be galo sudėtingi. Atskleidus ir išaiškinus visus vėžinių ląstelių pabėgimo nuo imuninės sistemos mechanizmus, būtų galima ieškoti naujų būdų, kaip pašalinti T ląstelių imunosupresiją ir padėti onkologinėmis ligomis sergantiems ligoniams.

Su vėžiu susiję peptidiniai antigenai (TAA)

TAA antigenai (*angl.* tumor associated antigens) – vėžinių ląstelių žymenys – trumpi peptidai pateikiami vėžinių ląstelių paviršiuje kompleksuose su MHC molekulėmis. Pirmasis TAA buvo nustatytas devinto dešimtmečio viduryje (melanominis antigenas MAGE-1) – nuo tada prasidėjo šių peptidų tyrimų ir bandymų pritaikyti vėžinių susirgimų gydymui era [Brugen et al., 1991; Traversari et al., 1992]. Peptidinių vakcinų idėją lydėjo labai didelė entuziazmo banga, nes atsirado viltis paprastučius peptidus panaudoti vėžinėms ląstelėms specifinių CTL ląstelių aktyvavimui bei sukurti sąlyginai paprastas ir pigias priešvėžines vakcinas. Eksperimentų, atliktų su laboratoriniais gyvūnais, rezultatai yra džiuginantys, tačiau klinikiniai tyrimai su žmonėmis nėra tokie sėkmingi, kokių yra tikėtasi. Peptidinių vakcinų sukūrimui reikia papildomų mokslinių tyrimų [Perez et al., 2010].

Visi T limfocitų (CD8⁺ ir CD4⁺) atpažįstami vėžiniai antigenai, pagal tai kokiuose audiniuose ir su kuriomis MHC molekulėmis randami, yra suskirstyti į grupes: vėžio – sėklidžių, diferenciacijos, vėžiui specifinių, padidėjusios antigenų raiškos [Novellino et al., 2005].

Vėžio – sėklidžių TAA grupei priskiriami su MHC I ir II klasių molekulėmis pateikiami vėžio – sėklidžių (*angl.* cancer – testis) antigenai, pvz., pirmasis identifikuotas žmogaus vėžinis antigenas MAGE-1 (melanominis antigenas). Šios grupės antigenai gaminami histologiškai skirtinguose žmogaus augliuose ir kai kuriuose normaliuose audiniuose: sėklidžių spermatocituose-spermatogonijose, placentoje, kiaušidėse.

Sveikame suaugusiame organizme šios grupės antigenų genai yra nutildyti – neveiklūs, bet įvairių auglių atvejais jie būna transkribuojami [Scalan ir Skimpson, 2004; Lim et al., 2005]. Imuninė sistema į minėtus antigenus nereaguoja, nes sėklidžių ląstelės neturi MHC molekulių. Vėžio – sėklidžių antigenams taip pat priklauso BAGE (B antigenas), RAGE (inkstų antigenas), NY-ESO-1 (Niujorko esofago antigenas), HAGE (helikazės antigenas), SAGE (sarkomos antigenas) ir kiti TAA. Nors šios klasės antigenai yra geriausiai charakterizuoti, bet daugumos jų fiziologinės funkcijos vis dar yra neaiškios.

Diferenciacijos antigenų grupei priklauso su MHC I ir II klasių molekulėmis pateikiami vadinamieji diferenciacijos antigenai. Jie aptinkami tiek normaliuose, tiek vėžiniuose audiniuose. Pirmieji iš jų buvo rasti melanomose ir melanocituose [Thomson et al., 1988]. Pvz., CEA (karcinoembrioninis), PSA (prostatos specifinis), TRP (su tirozinaze susijusio baltymo) antigenai, MART-1, gp75, gp100 ir kt. Nustatyta, kad diferenciacijos antigenai gali sukelti tiek humoralinį, tiek ląstelinį imuninį atsaką [Houghton, 1994].

Vėžiui specifinių TAA antigenų grupei priklauso tik vėžinėms ląstelėms specifiniai, unikalūs antigenai. Normaliose sveikose ląstelėse šios grupės TAA nebūna, todėl jie yra dažniausi imunoterapinių vaistų taikiniai. Unikalūs vėžiniai antigenai atsiranda dėl normalių genų taškinių mutacijų, todėl šie antigenai gaminami tik vieno konkretaus vėžinio susirgimo atveju, dažnai yra pacientui specifiniai. Kartais tos pačios mutacijos gali pasitaikyti ir keliems pacientams. Vėžiui specifinių antigenų randama įvairiausiuose augliuose: melanomose, glioblastomose, plaučių karcinomose, kepenų ir tiesiosios žarnos adenokarcinomose ir kt. Dažniausiai mutacijos būna svarbias reguliacines funkcijas atliekančių baltymų genuose, pvz., p21/ras, p53, Bc-Alb, cdk, RB-1, erb-2 [Schreiber et al., 1988; Urban ir Schreiber, 1992; Chen et al., 1992; Jung ir Schluesener, 1991].

Genai, koduojantys TAA antigenus, kurių raiška yra padidėjusi, randami daugumoje normalių audinių ir histologiškai įvairiuose auglių tipuose, nesuteikiant pirmenybės nei vienai iš vėžio rūšių. Šią grupę sudaro su MHC I ir II klasių molekulėmis pateikiami plačiai paplitę antigenai, kurie normaliuose audiniuose yra sintetinami nedideliais kiekiais, t. y., žemiau slenkstinio lygio, kurį atpažįsta CTL, o ląstelei pakitus (supiktybėjus), prasideda stipri antigenų raiška ir sukiamas imuninis atsakas, nutraukiantis anksčiau buvusią toleranciją [Zinkernagel ir Hengartner, 2001]. Tarp šios grupės antigenų yra anti-apoptoziniai baltymai, hTERT (žmogaus telomerazės atvirkštinė transkriptazė), livinas, survivinas [Scheibenbogen et al., 2002; Kawakami et al., 2004].

Iš viso jau yra nustatyta apie 2000 skirtingų TAA vėžinių peptidinių antigenų. Informacijos apie konkretų TAA galima rasti „Journal of the Academy of cancer Immunology“ sukurtoje internetinėje duomenų bazėje: <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/tumorspecific.htm>.

1.2. Priešvėžinės vakcinos

Pacientų sergančių vėžiu gydymui yra naudojama kombinuota terapija – keletu gydymo būdų derinys, pvz., chirurgija ir chemoterapija, chemoterapija ir imunoterapija bei kt.

Pats seniausias ir labai efektyvus vėžio gydymo būdas yra chirurgija, naudojama tiek gydymui (esamo vėžinio arba sveiko, bet galinčio supiktybėti audinio pašalinimui), tiek tikslios diagnozės ar ligos stadijos nustatymui. Pats dažniausias onkologinių ligų gydymo būdas – chemoterapija. Chemoterapiniai preparatai žudo greitai besidalinančias ląsteles: jie kovalentiškai jungiasi prie DNR, RNR ar prie ląstelės skeleto baltymų, sutrikdo DNR sintezę, mitozę, sukelia apoptozę ir kt. Deja, žmogaus organizme greitai dalijasi ne tik vėžinės ląstelės, bet ir dalis

sveikų ląstelių, pvz., kaulų čiulpų, žarnyno epitelio, plaukų svogūnėlių ląstelės, todėl šis gydymas turi daug šalutinių poveikių. Vėžinių ląstelių naikinimas Rentgeno spinduliais (radiacija) – taip pat dažnas onkologinėmis ligomis sergančių pacientų gydymo būdas. Kiti kovos su vėžinėmis ląstelėmis keliai: lazerinė terapija, hormonų terapija, kaulų čiulpų transplantacija, anti-angiogeninė terapija, hipertermija.

Naujausias vėžinių ligų gydymo būdas – imuninė terapija, kuri paties žmogaus imuninę sistemą priverčia kovoti su vėžinėmis ląstelėmis. Šiai terapijai priskiriami imuninės sistemos ląsteles stimuliuojantys interferonai, interleukinai ir kiti citokinai, taip pat medžiagos, skatinančios kraujo ląstelių gamybą kaulų čiulpuose, monokloniniai antikūnai, specifiskai pažymintys vėžines ląsteles, bei priešvėžinės vakcinos [US National Cancer Institute internetinė svetainė, www.cancer.gov].

Galimas imuninės sistemos poveikis vėžinių susirgimų gydymui buvo nustatytas daugiau nei prieš šimtmetį. Dr. William Coley, analizuodamas ligoninės archyvuose esančius duomenis, pastebėjo tendenciją, jog dažnai augliai regresuoja tada, kai paciento imuninė sistema yra suaktyvinta dėl infekcijos. Vėžinių susirgimų gydymui dr. Coley pradėjo naudoti bakterijų ekstraktus (Coley toksinus) ir pasiekė, kad kai kurie augliai regresuodavo, o ligoniai pasveikdavo [Coley, 1893; Coley, 1928; McCarthy, 2006]. Deja, šio gydytojo sukurtas gydymas padėdavo ne visiems pacientams, nepageidaujamas šalutinis poveikis kartais būdavo labai stiprus. Tai buvo pirmoji imunoterapija taikyta vėžio gydymui, atvėrusi vartus naujoms idėjoms, moksliniams tyrimams, naujų vėžio gydymo metodų kūrimui.

Priešvėžinės vakcinos yra skirstomos į profilaktines ir terapines. Profilaktinės vakcinos yra skirtos sveikų žmonių skiepijimui, siekiant dirbtinai sukelti imuninį atsaką prieš tam tikrą antigeną [Tabi ir Man, 2008]. Susidariusi imuninė atmintis saugo organizmą nuo galimo pavojaus, pvz., priešvėžinė profilaktinė vakcina prieš papilomos viruso

infekcijas, kurios gali sukelti gimdos kaklelio vėžį [Kirnbauer et al., 1992; Schiller ir Lowy, 2001; Garland et al., 2007; Paavonen et al., 2007]. Terapinės vakcinės yra skirtos jau susirgusių žmonių gydymui [Finke et al., 2007; Acres et al., 2007; Goldman ir DeFrancesco 2009]. Terapinių priešvėžinių vakcinų kūrimas yra sunkus uždavinys, nes vakcinės turi sukelti imuninį atsaką ne prieš svetimus organizmus (bakterijas, virusus), o prieš savas pakitusias ląsteles, kurios organizmui nėra svetimės, ir tam reikia įveikti tolerancijos barjerą [Kiessling ir Choudhury, 2007; Ghaffar ir Nagarkatti, 2009].

Nors visame pasaulyje jau seniai atliekama labai daug mokslinių tyrimų, tobulinama ligų diagnostika, kuriami nauji vaistai ir tam išleidžiama labai daug lėšų, bet pacientų su įvairiais vėžiniais susirgimais (su keliomis išimtimis) išgyvenimo lygis yra žemas ir vėžys išlieka viena iš pagrindinių mirties priežasčių pasaulyje [Berzofsky et al., 2004]. Šalia jau egzistuojančių vėžinių susirgimų gydymo būdų nuolatos yra ieškoma naujų, turinčių kuo geresnį terapinį veikimą ir kuo mažiau nepageidaujamų šalutinių poveikių [Yee et al., 2002; Dudley et al., 2005; Rescingo et al., 2007; Wrzesinski et al., 2007; Bok, 2008; Baxevanis et al., 2009].

Žmogaus imuninė sistema gali kovoti su vėžinėmis ląstelėmis, bet šių ląstelių gebėjimas keisti savo antigeninį veidą padeda joms išgyventi [Loose ir Van der Wiele, 2009]. Pagrindinė užduotis, kuriant naujas priešvėžines vakcinas, yra nuslopinti vėžinių ląstelių gebėjimą išvengti imuninės sistemos atpažinimo [Copier et al., 2009] ir sukelti efektyvų CTL atsaką, kad vėžinės ląstelės būtų atpažįstamos ir naikinamos [Webster et al., 2005]. Sunkių ligų atvejais, kai vėžinis susirgimas jau yra pasiekęs aukštesnes stadijas, imunoterapijos tikslas yra ne pagydyti, bet atstatyti dinaminį balansą tarp vėžinių ląstelių ir imuninės sistemos bei pagerinti ligonio gyvenimo kokybę [Rozkova et al., 2009].

Priešvėžinė imunoterapija yra skirstoma į pasyviają ir aktyviają [McNeel, 2007; Todar, 2009]. Pasyviajai terapijai priklauso imunomoduliuojančios medžiagos (citokinai, vėžiui specifiniai antikūnai) ir imuninės ląstelės. Minėtos medžiagos ar ląstelės pacientui sukelia vienokią ar kitokią imuninę reakciją, tačiau jos nesusijusios su imuninės atminties atsiradimu, dėl to reikia daryti nuolatinius pakartotinius preparato sušvirkštimus [Rescingo et al., 2007; McNeel, 2007; Todar, 2009]. Keletas pasyviosios imunoterapijos produktų jau yra naudojami vėžiu sergančių pacientų gydymui – tai vaistai kovai su krūties navikais, melanoma, inkstų karcinoma, leukemija ir kt. [Dudley et al., 2005; Rescingo et al., 2007].

Aktyviosios imunoterapinės vakcinos – tai preparatai, kurie kovai su vėžinėmis ląstelėmis stimuliuoja ir aktyvina paties žmogaus imuninę sistemą [Rescingo et al., 2007; McNeel 2007]. Ši terapija yra ilgalaikė [Gulley et al., 2007; Kipp ir McNeel, 2007; Marrari et al., 2007].

Imunoterapines vakcinas galima skirstyti į antigenai nespecifines ir specifines. Nespecifinėms vakcinoms yra priskiriamos medžiagos, kurios nėra specifinės konkreitiems antigenams, pvz., limfokinais suaktyvintos ląstelės žudikės (LAK). Tai yra leukocitai, kurie *ex vivo* yra paveikiami IL-2, aktyvinami ir suleidžiami atgal pacientui. Tokie leukocitai gali nespecifiškai lizuoti vėžines ląsteles, kurios buvo atsparios NK ląstelėms. Šią terapiją bandoma pritaikyti melanomoms, inkstų ląstelių karcinomoms, ne Hodžkino limfomoms gydyti [Grimm et al., 1982; Clarc et al., 1990]. Yra keli nespecifinės imunoterapijos preparatai, kurie jau yra naudojami inkstų, šlapimo pūslės vėžio gydymui [Intron A, 2007; Proleukin, 2008].

Specifinės imunoterapinės vakcinos yra skirtos vėžiniams antigenams specifinių T ląstelių atsakui sukelti [Kipp ir McNeel, 2007; Marrari et al., 2007]. Šiai terapijai dažniausiai yra naudojamos autologinės

paciento imuninės sistemos ląstelės (dendritinės ląstelės, limfocitai), pvz., *ex vivo* yra atrenkami konkretiems vėžiniams antigenams specifiniai T limfocitai, jie kultivuojami, padauginami ir sušvirkščiami atgal pacientui [Balsari, 1986; Wrzesinski et al., 2007]. Daug autologinių terapinių vakcinų yra kuriama dendritinių ląstelių pagrindu: iš paciento kraujo surenkami leukocitai, jie specialiai kultivuojami, užauginamos dendritinės ląstelės, po to jos paveikiamos tam tikru vėžiniu antigenu (taip ląstelės yra subrandinamos) ir sušvirkščiamos atgal pacientui, kad sukeltų T ląstelių atsaką. Dendritinių ląstelių stimuliavimui naudojami antigenai gali būti autologiniai, t. y., paties paciento vėžinės ląstelės, vėžinių ląstelių lizatai, iRNR iš tų pačių ląstelių arba universalūs, vadinami antigenais „nuo lentynos“. Universaliais antigenais gali būti tam tikrą antigeną koduojančios DNR ar iRNR, konkrečioms vėžinėms ląstelėms specifiniai baltymai, TAA peptidai ar TAA peptidai su nešikliais [Chaudhuri et al., 2009]. Šiuo metu jau yra atliekama keletas klinikių tyrimų su šios rūšies vaistais, pvz., GRNVAC1 aktyviai mieloleukemijai gydyti [National Institute of Health Clinical Trial.gov Web site, Nr.1, 2009], IDM-2 šlapimo pūslės vėžiui [Baron-Bodo et al., 2005], IDD-3 melanomos [National Institute of Health Clinical Trial.gov Web site, Nr.2, 2009], INGN 225 smulkialąstelinio plaučių vėžio [National Institute of Health Clinical Trial.gov Web site, Nr.3, 2009], Prostavac-VF prostatos [Higano et al., 2009; Park et al., 2007; Kantoff et al., 2010], lapuleucel-T krūties, kiaušidžių ir žarnų [Park et al., 2007] vėžiniams susirgimams gydyti. 2010-aisiais buvo aprobuota pirmoji autologinė dendritinių ląstelių vakcina Provenge (Dendreon, JAV), skirta gydyti prostatos vėžiu sergančius pacientus.

Autologinės priešvėžinės ląstelių vakcinos yra labai gerai pacientų toleruojamos, tačiau itin brangios, nes pagaminta vakcina tinka tik vienam konkrečiam pacientui, o vakcinai paruošti reikia specialių patalpų ir reagentų (GMP – *angl.* good manufacturing practice), turi būti vykdoma kokybės ir saugumo kontrolė. Jeigu vakcinos paruošimui naudojami

autologiniai antigenai, o ne „nuo lentynos“, tada vakcinų gamybos procedūra pasidaro dar ilgesnė, sudėtingesnė ir brangesnė, bet gaunama efektyvesnė vakcina. Autologinės priešvėžinės ląstelių vakcinų klinikinių tyrimų rezultatai teikia vilčių: pagerėja pacientų gyvenimo kokybė, pailginama gyvenimo trukmė, o atskirais atvejais ir pasveikstama. Deja, dėl paruošimo sudėtingumo, autologinių ląstelių vakcinų dar sunkiai įsivaizduojamos kasdieninėje praktikoje, todėl yra ieškoma paprastesnių, pigesnių ir universalesnių terapinių priešvėžinių vakcinų variantų. Perspektyviau atrodo sintetinių peptidų ar rekombinantinių baltymų pagrindu kuriamos vakcinų, nes jas galima tiesiog paimti „nuo lentynos“ ir sušvirkšti pacientams.

Atradus TAA antigenus, jų pagrindu iš karto buvo pradėtas sintetinių peptidinių priešvėžinių vakcinų kūrimas, tačiau efektyvaus CTL atsako su tokiais vakcinomis gauti iki šiol nepavykdavo [Marchand et al., 1995; Jager et al., 1996; Rosenberg et al., 1998; Weber et al., 1999]. Taip yra greičiausiai todėl, kad, norint gauti efektyvų ir ilgalaikį CTL atsaką, reikia stimuliuoti ne tik CTL, bet ir T_H ląsteles. Be to, jei vakciną sudaro tik vienos rūšies antigenai, labai tikėtina, kad vėžinės ląstelės greitai mutuos, antigeno nebegamins ir taip nuo imuninės sistemos pasislėps. Efektyvesnės turėtų būti vakcinų, turinčių daugiau antigenų, ir ne tik CTL, bet ir T_H antigenų.

Vėliau buvo kuriamos peptidinės priešvėžinės vakcinų sudarytos iš keleto peptidų mišinio, bet šis metodas taip pat nebuvo toks efektyvus, kaip tikėtasi [Widmann et al., 1992]. Problemų kėlė ir tai, kad pavieniai trumpi peptidai yra nestabilūs, greitai degraduoja ir gali sukelti imuninę toleranciją, anergiją [Kyburz et al., 1993; Toes et al., 1996].

Dar vienas galimas peptidinių priešvėžinių vakcinų kūrimo variantas – chimerų gamyba (peptidų sujungimas į ilgesnius polipeptidus). Galima ieškoti natūraliai egzistuojančių baltymų, turinčių reikiamus antigenus,

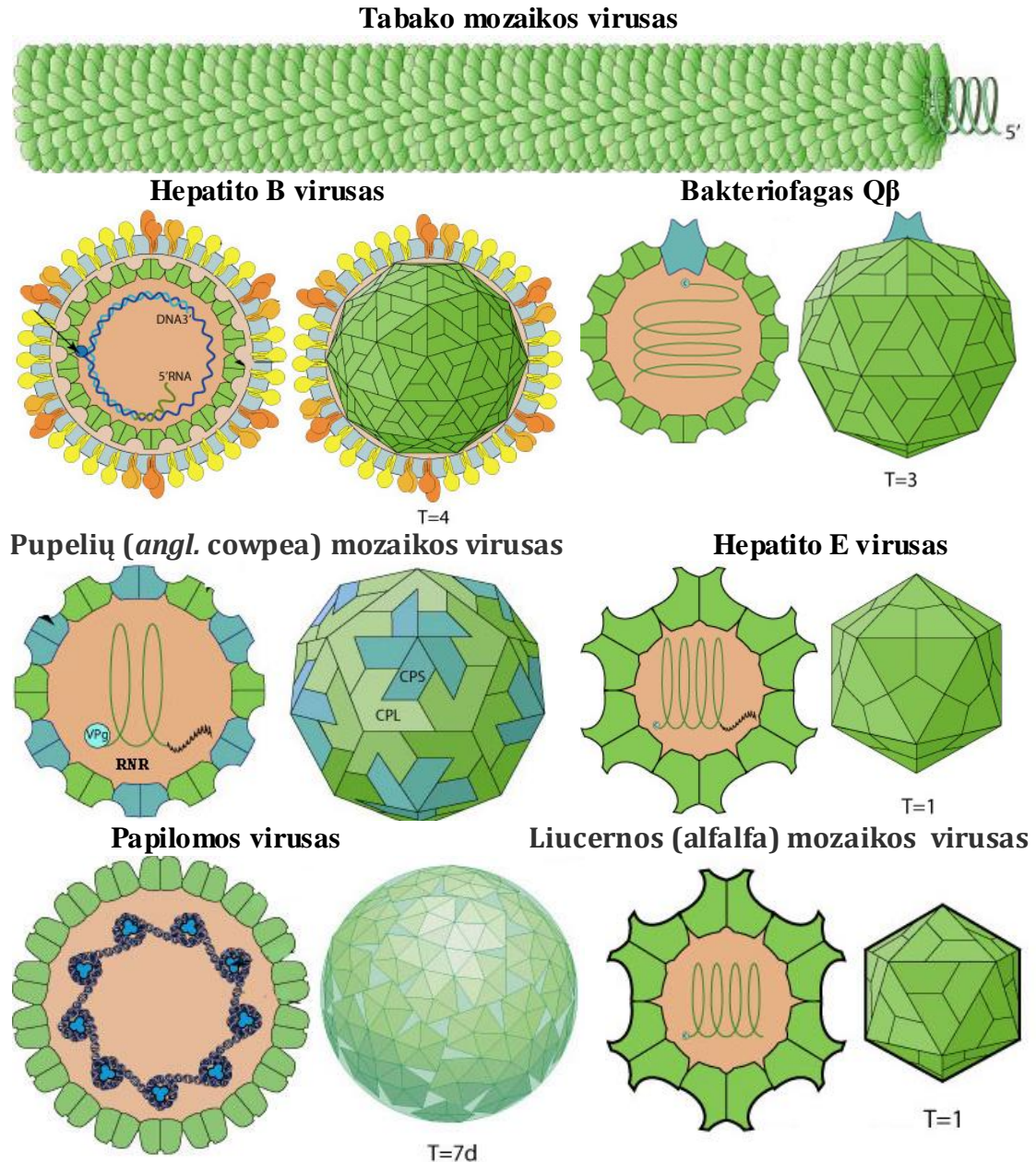
arba tokius baltymus pasigaminti laboratorijoje. Rekombinantinių chimerinių baltymų su įterptais norimais antigeniniais peptidais panaudojimas išspręstų ir trumpų peptidų nestabilumo problemą. Sukurti chimeriniai rekombinantiniai baltymai turi būti imunogeniški, teisingai pateikiami, sugebėti tinkamai aktyvinti dendritines ląsteles, kad šios gamintų T ląstelių aktyvinimui būtinas kostimuliuojančias molekules. Yra žinoma, kad dendritinės ląstelės gali gaminti teisingus peptidus ir juos pateikti ląstelės paviršiuje, bet neturėti kostimuliuojančių molekulių (nesubrendusios DL) – tada išsivysto CTL ląstelių tolerancija, anergija. Norint padidinti peptidų ar baltymų imunogeniškumą, galima naudoti adjuvantus. Adjuvantai – tai medžiagos, kurios pamėgdžioja pavojaus signalus, pažadina ir sustimuliuoja imuninę sistemą, palengvina antigenų patekimą į dendritines ląsteles ir jų patekimą, pvz., bakterijos, virusai, TNF- α , IFN, DNR, HSP baltymai ir kt. [Medzhitov, 2001; Janeway ir Medzhitov, 2002].

Imuninę sistemą stimuliuojančiais adjuvantais galėtų būti ir chimerinės į virusus panašios dalelės (VPD). Iš išorės VPD primena tikrus virusus, todėl dendritinių ląstelių yra lengvai sugaunamos. Prie VPD prijungti ar įterpti TAA antigenai, jei būtų teisingai APL ląstelių pateikiami, galėtų stimuliuoti T ląsteles. VPD pagrindu, jau yra sukurtos ir plačiai naudojamos dvi vakcinos (prieš hepatito B bei papilomos virusus). Minėtų vakcinų gamybai svetimų baltymų raiškos sistema buvo pasirinktos mielės.

1.3. Į virusus panašios dalelės

Į virusus panašios dalelės (VPD, *angl.* virus-like particles) yra ikosaedrinės ar siūlinės struktūros, sudarytos iš daugybės vieno ar kelių viruso struktūrinių baltymų kopijų [Johnson ir Chui, 2000]. VPD yra panašios į autentiškus virusus, iš kurių yra kilusios, bet neturi viruso genetinės medžiagos, yra neinfektyvios ir visiškai saugios, todėl VPD yra

patrauklios kandidatės vakcinų kūrimui [Chackerian, 2007]. VPD formuoja įvairių virusų (gyvūnų, augalų, bakteriofagų) struktūriniai baltymai (3 pav.).



3 pav. Virusų, kurių struktūriniai baltymai formuoja į virusus panašias daleles, kapsidžių pavyzdžiai [http://expasy.org/viralzone/]. VPD formuoja įvairių virusų (gyvūnų, augalų, fagų) struktūriniai baltymai. VPD būna siūlinės (pvz., tabako mozaikos virusas) arba ikosaedrinės formos (pvz., papilomos, hepatito B, E, bakteriofagas Qβ ir kt.).

Rekombinantines VPD galima gauti daugelyje svetimų baltymų raiškos sistemų: bakterijose, mielėse, augaluose, vabzdžių, žinduolių ląstelėse. Vienose raiškos sistemose virusiniai struktūriniai baltymai į VPD

susirenka patys, kitose yra gaunami VPD subvienetai, kuriuos po to *in vitro* reikia surinkti į VPD. Priklausomai nuo pasirinktos svetimų baltymų raiškos sistemos, VPD gavimas gali būti pigus ir greitas. VPD į virusus yra panašios ne tik struktūriškai, bet ir imunogeniškai, dažnai VPD antigeniškumas yra toks pats kaip ir virusų, iš kurių jos yra kilusios [Jennings ir Bachmann, 2007, 2008].

Geriausi imunogenai yra patys virusai. Vakcinoms galima naudoti susilpnintus ar visai išveiklintus virusus, dažnai užtenka vienos tokios vakcinės dozės efektyviam bei ilgalaikiam imuniniam atsakui sukelti. Virusų pagrindu sukurtos vakcinės jau padėjo suvaldyti daugybę ligų – raupus, tymus, kiaulytę, raudonukę, kokliušą ir kt. [Plotkin, 2005]. Skiepams naudojant tikrų virusų pagrindu sukurtas vakcinas visada išlieka tikimybė tuo virusu užsikrėsti ir jį išplatinti, todėl šios vakcinės nors ir yra pačios efektyviausios, bet nėra saugios. Rekombinantinių baltymų pagrindu sukurtos vakcinės yra saugios, bet dažnai ne tokios efektyvios ir mažiau imunogeniškos, todėl jų efektyvumui pagerinti naudojami adjuvantai [Goldman ir Lambert, 2004]. Rekombinantinės VPD yra patraukli platforma vakcinų gamybai todėl, kad į vieną sistemą sujungia pačias patraukliausias ir esmines vakcinų savybes. VPD yra geri imunogenai, nes aktyvina tiek įgimtą (per PAMP atpažįstančius receptorių), tiek ir įgytą imunitetą, jų paviršius yra atsikartojantis, antigeninės determinantės išsidėsčiusios tvarkingai, nutolusios viena nuo kitos 50–100 Å atstumu [Bachman et al., 1995]. Be to, VPD yra 25–100 nm diametro, todėl jas lengvai suryja dendritinės ląstelės, kurios po to efektyviai stimuliuoja B ir CTL ląsteles [Bachmann et al., 1993].

Dėl VPD saugumo ir imunogeniškumo pastaruosius 10–20 metų su jomis buvo atliekama daug mokslinių eksperimentų, iki klinikinių ir klinikinių tyrimų. Atskiros mokslininkų grupės parodė, kad hepatito B ir C, ŽIV, papilomos, Norwalk, Rota, Parvo virusų struktūrinių baltymų

formuojamos VPD sukelia neutralizuojančių antikūnų susidarymą ir yra gerai toleruojamos [Grgacis ir Anderson, 2006]. Blue Tongue, Rota ir Parvo virusų VPD yra tyrinėjamos veterinariniais tikslais. Hepatito B bei papilomos virusų struktūrinių baltymų formuojamų VPD pagrindu sukurtos vakcinos (Gardasil, Cervavax) jau yra pripažintos ir naudojamos žmonių skiepijimui [Jennings ir Bachmann, 2008].

Į virusus panašios dalelės – epitopų nešikliai

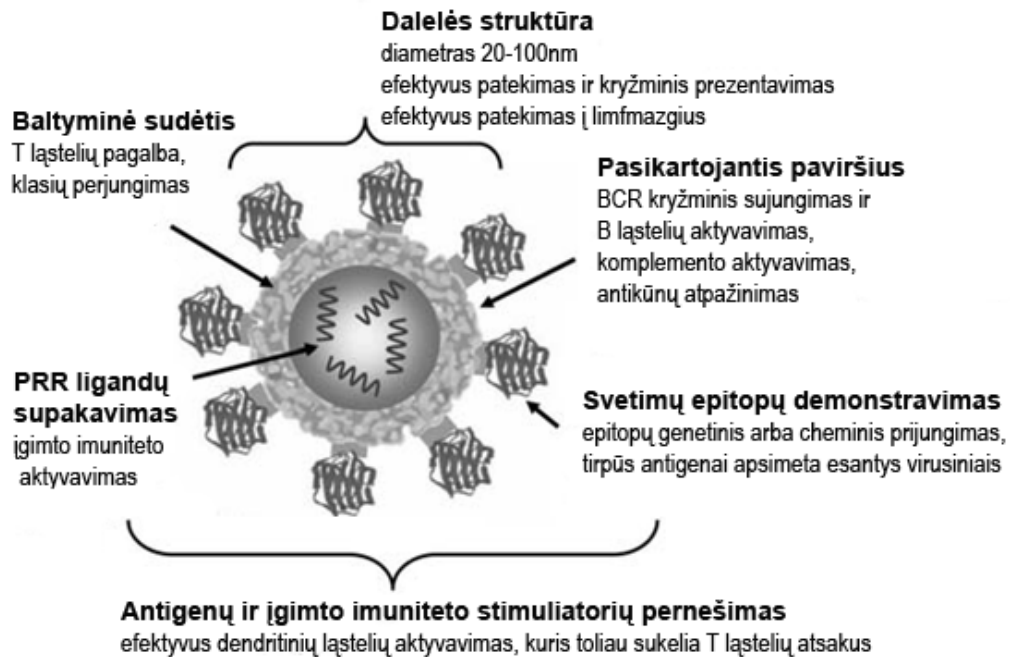
Apie chimerinių VPD vakcinas galvoti buvo pradėta prieš 10–15 metų [Ulrich et al., 1998; Pumpens ir Grens, 2001]. Chimerinės VPD – tokios VPD, kurios sudarytos iš virusinių struktūrinių baltymų sulietų su papildomomis sekomis (chimera – graikų mitologijos fantastinė būtybė, kurios kūnas sudarytas iš skirtingų gyvūnų kūnų dalių). Išstobulėjus genų inžinerijos metodams bei pasinaudojus struktūriniais Rentgeno kristalografijos, krioelektronmikroskopijos bei imunologijos duomenimis, kurti norimas chimerines VPD pasidarė nesudėtinga. VPD bei chimerinės VPD jau yra pagamintos iš viengrandžių, dvigrandžių, DNR ar RNR genomus turinčių virusų struktūrinių baltymų. Norint sukurti naujas chimerines VPD, reikia žinoti virusinių baltymų struktūrą, parinkti baltymo vietas, galinčias toleruoti papildomų sekų įterpimą, ir genų inžinerijos ar kitais metodais, įterpti ar prijungti norimą svetimą seką. VPD iš baltymų monomerų pasirinktose svetimų baltymų raiškos sistemose dažniausiai susirenka spontaniškai. Viena viruso struktūrinio baltymo kopija turi 1 įterptos sekos kopiją, o gauta VPD suformuoja paviršių, kur įterptas antigenas atsiduria tvarkingame, organizuotame, atsikartojančiame paviršiuje – gaunamas didelis antigeno tankis vienoje vietoje – VPD. Įterpiami antigenai gali būti linijiniai arba konformaciniai. Vienos iš plačiausiai žinomų chimerinių VPD yra hepatito B šerdies antigeno VPD su įterptomis papildomomis sekomis [Pumpens ir Grens, 2001].

Mozaikinės VPD – iš skirtingų baltymų suformuotos VPD. Mozaikinės VPD gaunamos pasirinktoje svetimų baltymų raiškos sistemoje kartu sintetinant kelis skirtingus viruso struktūrinius baltymus, pvz., nemodifikuotas viruso struktūrinis baltymas su chimeriniu (modifikuotu) arba du skirtingi viruso struktūriniai baltymai sintetinami kartu ir pan. Mozaikinės VPD yra labai įdomios ir patrauklios, nes leidžia sukurti norimos kompozicijos VPD su skirtingais intarpais, be to, skirtingi baltymai gali būti sintetinami skirtingais kiekiais.

Į virusus panašios dalelės ir B ląstelių atsakas

VPD sukelia greitą ir stiprų B ląstelių atsaką, ši VPD savybė yra susijusi su virusams būdinga dalelių struktūra [Bachmann ir Zinkernagel, 1997] (4 pav.). Daugumos virusų genomai yra mažučiai ir koduoja tik kelis viruso struktūrinius baltymus. Virusų baltyminės šerdys ar apvalkalėliai yra sudaryti iš daugybės vienodų baltymų kopijų, todėl jų paviršius yra tvarkingas, atsikartojantis, tankiai supakuotas, kvazikristalinis. Toks paviršius yra būdingas ir virusams, ir VPD. Evoliucijos eigoje stuburiniams išsivystė imuninės sistemos savybė greitai atpažinti ir reaguoti į virusams būdingas reguliarias struktūras [Bachmann ir Zinkernagel, 1996]. Daug kartų pasikartojantys epitopai virusų ar VPD paviršiuje kryžmiškai sujungia B ląstelių receptorių (BCR, *angl.* B cell receptor), taip šią sąveiką stabilizuoja ir greitai aktyvina B ląsteles [Bachmann et al., 1995; Thyagarajan et al., 2003]. Pavieniai tirpūs virusiniai baltymai nėra tokie imunogeniški, kaip esantys tvarkingoje struktūroje, kuri padeda peržengti B ląstelių tolerancijos lygį [Bachman et al., 1993; Schodel et al., 1993; Justewicz et al., 1995]. Norint, kad antigenai sukeltų B ląstelių atsaką, reikia mažiausiai 20–25 epitopų, esančių vienas nuo kito 5–10 nm atstumu [Dintzis et al., 1982]. Virusų ir VPD paviršiuose epitopai yra išdėstyti minėtu dažnumu [Jegerlehner et al., 2002a]. Prie pasikartojančių paviršių lengviau jungiasi komplemento baltymai bei antikūnai – tai palengvina antigeno fagocitozę [Fanger et al., 1996; Matsushita ir Fujita, 2001].

Eksperimentiškai *in vivo* buvo parodyta, jog VPD gali stimuliuoti B ląsteles. Be to, VPD be adjuvantų B ląsteles stimuliuoja geriau nei jas sudarantys rekombinantiniai virusų struktūriniai baltymai, nesusijungę į VPD, su adjuvantais, skirtais B ląstelių atsakui sustiprinti, pvz., nepilnu Freund adjuvantu ar CpG turtinga bakterine DNR [Gatto et al., 2004].



4 pav. Į virusus panašių dalelių (VPD) savybės apibendrinanti schema. VPD sujungia esmines imunogenines virusų savybes į vieną sistemą, gali efektyviai stimuliuoti T ir B ląstelių atsakus, todėl tinka vakcinų kūrimui. VPD atsikartojantis ir tvarkingas paviršius tiesiogiai sąveikauja su B ląstelėmis ir komplemento kaskados komponentais, gali prisijungti natūralius antikūnus, o tai pagerina VPD patekimą į dendritines ląsteles. VPD yra sudarytos iš baltymų – tai padeda aktyvinti B ir T ląsteles, taip pat leidžia genetiniais ar cheminiais metodais prijungti norimas medžiagas. Dalelių ypatinga struktūra ir pobūdis sustiprina jų patekimą į dendritines ląsteles ir antigenų patekimą su MHC I ir II klasės molekulėmis DL paviršiuje. Be to, VPD iš atskirų baltymų susirenka spontaniškai, todėl į jas galima pripakuoti papildomų mažų molekulių, pvz., PRR receptorių ligandų, kurie gali padėti sukelti įgimtą imuninį atsaką [Jennings ir Bachmann, 2008].

Labai svarbi VPD savybė – dydis, jis padeda VPD judrumui. VPD sušvirkštos į organizmą nukeliauja iki limfmazgių, patenka į antrinius imuninės sistemos organus, ten sąveikauja su B ląstelėmis ir jas suaktyvina. VPD tiesiogiai sąveikaudamos su B ląstelėmis gali stimuliuoti

ir konformaciniams epitopams specifines B ląsteles. Kartais į VPD galima pripakuoti papildomų medžiagų, adjuvantų, pvz., TLR9 ligandų (CpG oligonukleotidai, kurie aktyvina B ląsteles, slopina jų apoptozę, sustiprina imunoglobulinų klasių persijungimą [Krieg, 2006]) ar TLR7 ligandų (viengrandžių RNR [Jegerlehner et al., 2007]).

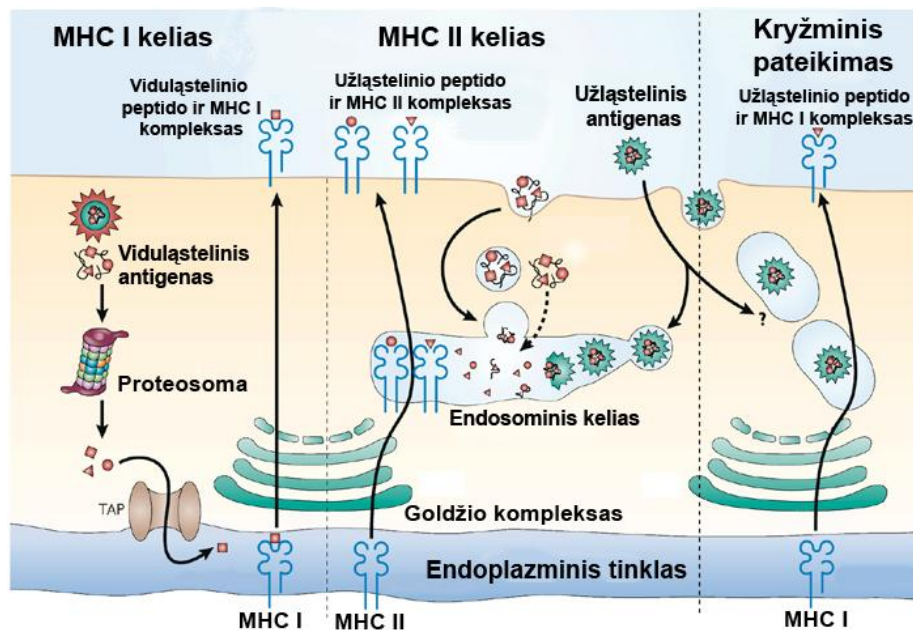
VPD yra naudojamos norint sukelti B ląstelių atsaką prieš virusą, iš kurio jos yra kilusios, arba prieš svetimus antigenus, kuriuos galima prijungti prie VPD. Antigenus su VPD galima sujungti chemiškai arba pasitelkus genų inžinerijos metodus. Antigenais gali būti ne tik peptidai, bet ir polisacharidai, mažos organinės molekulės (haptentai). VPD dėka imuninį atsaką pavyksta gauti net prieš savo antigenus – VPD padeda apeiti toleranciją.

Į virusus panašios dalelės ir T ląstelių atsakas

Norint, kad VPD sukeltų efektyvų antigenams specifinį T ląstelių atsaką, dendritinės ląstelės (DL) VPD turi sugauti ir antigeninius peptidus pateikti savo paviršiuje kompleksuose su MHC molekulėmis. Subrendusios DL gali aktyvinti antigenui specifinius T limfocitus.

Molekuliniai agregatai, tokie kaip VPD, kurie turi didelį paviršių, pasižymintį tam tikru krūviu, hidrofobiškumu ir gebėjimu sąveikauti su receptoriais, dendritinių ląstelių yra daug geriau pagaunami ir suryjami, lyginant su tirpiaisiais pavieniais baltymais [Ahsan et al., 2002]. APL efektyviausiai gaudo patogenams būdingo dydžio antigenus: nuo 10 nm iki 3 μm skersmens. VPD dydis pakliūna į šį intervalą, jos yra lengvai dendritinių ląstelių sugaunamos endocitozės ar fagocitozės keliais. Optimalus antigenų, kuriuos ryja DL, diametras yra ~ 40 nm [Fifis et al., 2004]. Sugavusios antigenus DL endosominiuose kompartmentuose proteazių dėka juos sukarpo į peptidus ir ląstelės paviršiuje pateikia kompleksuose su MHC II klasės molekulėmis. DL pasižymi dar viena savybe – gebėjimu kryžmiškai pateikti endocitozės būdu sugautus

antigenus, todėl egzogeninės kilmės antigenai, kurie turėtų būti pateikti su MHC II, yra pateikiami su MHC I klasės molekulėmis (5 pav). Ypatingų struktūrų, tokių, kaip VPD, antigenų kryžminis pateikimas yra daug efektyvesnis negu pavienių baltymų ir pagal gausą prilygsta pateikimui su MHC II [Kovacsovic-Bankowski et al., 1993; Harding ir Song, 1994; Storni ir Bachmann, 2004]. VPD antigenus pateikia tik profesionalios APL, bet ne kitų tipų, pvz., fibroblastų ar T ląstelės [Ruedl et al., 2002]. Antigenai, pateikiami ne profesionalių ląstelių, ne įjungia, o išjungia T ląstelių atsaką, todėl ši VPD savybė palengvina efektyvaus T ląstelių imuninio atsako susidarymą ir palaikymą.

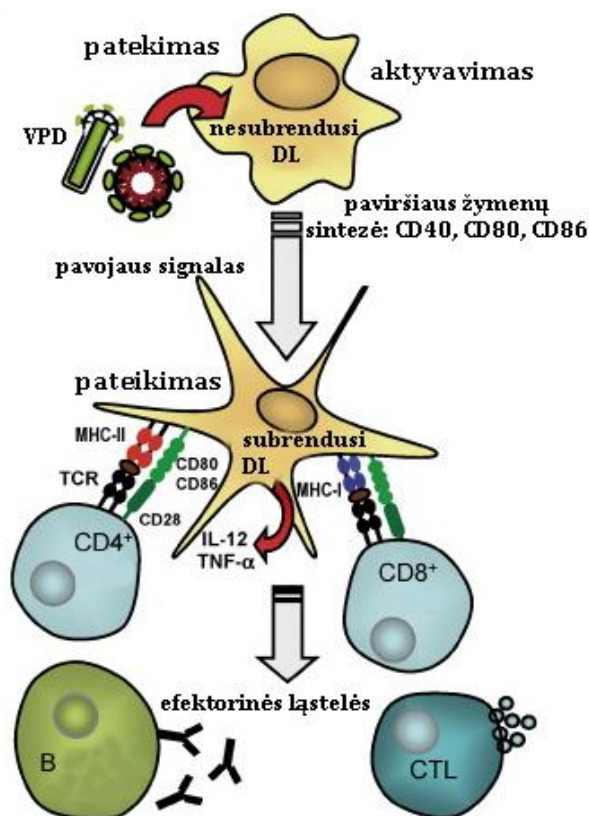


Nature Reviews | Immunology

5 pav. Antigenų pateikimo dendritinių ląstelių paviršiuje mechanizmų schemas.

DL antigenus gali pateikti MHC I keliu, MHC II keliu arba kryžmiškai. MHC I keliu yra pateikiami viduląstelinių baltymų antigenai kompleksuose su MHC I klasės molekulėmis; peptidai gaunami citoplazmoje, proteosomų dėka. MHC II keliu yra pateikiami užląstelinių antigenų peptidai kompleksuose su MHC II klasės molekulėmis; peptidai gaunami proteolitinės degradacijos endosominiuose kompartmentuose dėka. Į endosomas patekti gali ir viduląstelinių baltymų, pvz., plazminės membranos baltymai, endocitozės kelio komponentai, citoplazmos baltymai, patekę į endosomas autofagijos keliu. Kryžminio pateikimo metu užląstelinių antigenų peptidai yra pateikiami kompleksuose su MHC I klasės molekulėmis [Villadango ir Schnorrer, 2007].

Dauguma rekombinantinių antigenų, kartais ir VPD, nepriklausomai nuo to, kad yra pateikiami su MHC I molekulėmis, sukelia silpną T ląstelių atsaką ir reikalauja papildomų stimulų. Kadangi virusų replikacija ląstelėje šeimininkėje sužadina ir įgimtą imunitetą, tai padeda gauti efektyvų CTL ląstelių atsaką, tačiau dauguma rekombinantinių baltymų taip stimuliuoti imuninės sistemos negali. Virusai indukuoja ląstelių lizę, gamina viengrandes ir dvigrandes RNR molekules, RNR su 5' trifosfatais be kepurės. Virusų nukleorūgštys sąveikauja su TLR receptoriais, RAG helikazėmis, PKR (PKR – interferonu indukuojamos nuo dvigrandės RNR priklausomos baltymų kinazės), ir visa tai sukelia gausią I tipo interferonų, priešūždegiminių citokinų gamybą [Takeuchi ir Akira, 2007]. VPD sušvirkštimas indukuoja stiprų CTL atsaką, jei kartu stipriai stimuliuojamos ir dendritinės ląstelės, makrofagai [Storni et al., 2002]. Švirkščiant VPD su medžiagomis, sužadinančiomis įgimtą imunitetą, galima gauti imuninį atsaką, būdingą tikrai virusinei infekcijai.



6 pav. Į virusus panašių dalelių sukulto dendritinių ląstelių brandinimo schema.

Nesubrendusios dendritinės ląstelės (DL) sugavusios VPD susiaktyvina: ląstelės paviršiuje padaugėja CD40, CD80, CD86 molekulių, pradedami sekretuoti citokinai, pakinta ląstelės morfologija, t. y. nesubrendusios DL virsta subrendusiomis. Iš VPD kilę peptidai subrendusių DL yra pateikiami kompleksuose su MHC I ar MHC II CD4+ arba CD8+ T ląstelėms, todėl gaunamos veiklios efektorinės antikūnus gaminančios B ląstelės ir citotoksinės CTL ląstelės [Ludwig ir Wagner, 2007].

Su skirtingų virusų VPD buvo įrodyta, kad VPD sugeba indukuoti fenotipinį ir funkcinį dendritinių ląstelių brendimą (6 pav.). Žmogaus papilomos viruso VPD be adjuvantų aktyvina dendritinės ląstelės, šios gamina kostimuliuojančias molekules, CTL aktyvavimui būtinus citokinus [Lenz et al., 2001], tačiau papilomos virusų struktūrinių baltymų formuojamos VPD pasižymi išskirtinai geromis imuninį atsaką sužadinančiomis savybėmis. Bakteriofago Q β pagrindu sukurtos VPD gautos *E. coli* ląstelėse nesukelia efektyvaus CTL ląstelių atsako, tačiau, pridėjus adjuvantinių medžiagų – TLR ligandų, viengrandžių RNR ar CpG, gaunamas efektyvus CTL atsakas [Schwarz et al., 2003, 2005]. Chimerinės bakteriofago Q β VPD, gautos prijungus GP33 antigeninį peptidą (iš LCMV) ir pripakuotos CpG, sukelia antigenui specifinį imuninį atsaką *in vivo*, apsaugo nuo viruso infekcijos, kovoja su vėžinėmis ląstelėmis, turinčiomis tą patį antigeną [Storni et al., 2004]. VPD gali sukelti ne tik pirminį CTL imuninį atsaką, bet restimuluoti ir jau esančias antigenui specifines atminties CTL ląsteles. Dauguma molekulių – antigenų nešiklių gali sukelti tik pirminį imuninį atsaką, o norint pakartotinai jas panaudoti imuninio atsako pastiprinimui, dažniausiai šias molekules reikia truputį pakeisti, pvz., antigenus įterpti į kitą baltymo nešiklio vietą. VPD šiuo atveju yra daug pranašesnės už kitus baltymus-nešiklius, nes tiek norint sukelti pirminį ląstelinį imuninį atsaką, tiek jį vėliau restimuluoti ar sustiprinti, galima naudoti tas pačias VPD, nedarant jose jokių pakeitimų [Schwarz et al., 2005]. Į VPD supakuotos medžiagos, pvz., RNR – TLR ligandai, yra apsaugotos nuo išorinių poveikių, degradavimo, jos patenka tiesiai į APL ląsteles, nesijungia prie serumo baltymų – tai stipriai pagerina jų farmakokinetines savybes, sumažina šalutinius poveikius (pvz., blužnies padidėjimą) [Storni et al., 2004].

Klinikiniai tyrimai su VPD

VPD – antigenų nešiklių pagrindu yra kuriamos vakcinos kovai su įvairiomis ligomis: reumatoidiniu artritu, hipertenzija, osteoporoze,

ateroskleroze, Alzheimerio, viršsvoriu, gripu, vėžiu, priklausomybe nuo nikotino ir kt. Su daugeliu iš minėtų VPD jau yra atliekami klinikiniai tyrimai.

Pirmoji VPD pagrindu sukurta vakcina, kuri naudojama skiepyti žmonėms, yra prieš hepatitą B. Tai vienas dažniausių ir sunkiausių infekcinių susirgimų. Iš viso pasaulyje yra apie 350 milijonų HBV viruso nešiotų. Maždaug milijonas žmonių kasmet nuo hepatito B miršta. Minėtos vakcinės gamybai naudojamos rekombinantinės VPD yra gaunamos iš mielių ląstelių [Wampler et al., 1985]. Vakciną prieš hepatitą B gamina kompanijos GlaxoSmithKline, Merk&Co (vakcinų pavadinimai atitinkamai Engerix ir Recombivax). Vakcina yra saugi, efektyvi (88-96 proc. pacientų kraujyje randama reikiamų antikūnų), gaunamas imuninis atsakas yra ilgalaikis (daugiau nei 10 metų po vakcinavimo) [Coates et al., 2001].

Antroji VPD pagrindu sukurta žmonių skiepijimui naudojama vakcina yra skirta apsaugoti nuo žmogaus papiloma virusų (HPV) infekcijos, kuri moterims gali sukelti gimdos kaklelio vėžį. Yra daug HPV viruso tipų, patys pavojingiausi – 16 ir 18. Vakcinės prieš papilomos virusus taip pat gaminamos mielių ląstelėse. Papilomos VPD formuojasi iš pagrindinio kapsidės baltymo L1. Sušvirkštus žmonėms šios vakcinės, organizme susidaro neutralizuojantys antikūnai, kurie apsaugo nuo viruso infekcijos [Kirnbauer et al., 1992; Schiller ir Lowy, 2001; Garland et al., 2007; Paavonen et al., 2007]. Kompanija Merk&Co gamina keturvalentę vakciną (Gerdasil), kuri apsaugo nuo 6, 11, 16, 18 HPV tipų. GlaxoSmithKline vakcina yra divalentė (Cervarix) – prieš 16 ir 18 HPV tipus. Džiugu, kad šios vakcinės ne tik sukelia neutralizuojančių antikūnų susidarymą sveikoms pacientėms (90-100 proc.) ir apsaugo nuo viruso infekcijos, bet taip pat tinka ir sergančių pacienčių gydymui, nes efektyviai veikia ne tik profilaktiškai, bet ir terapiškai.

Jau yra sukurtos ir klinikiniuose tyrimuose tikrinamos kelios vakcinos, kuriose VPD atlieka CTL epitopų nešiklių vaidmenį, yra tiriamas tokių vakcinų profilaktinis ar terapinis efektyvumas bei gebėjimas sukelti CTL atsaką. Pavyzdžiui, *CVLP* (chimerinės VPD; Medigene AG, Martinried, Vokietija), *Malarivax* (Apovia, San Diego, JAV), *p24-VLP* (British Biotech plc, Oxford, Didžioji Britanija) vakcinos yra skirtos kovai su papiloma virusu, *Plasmodium falciparum*, ŽIV. Klinikinių tyrimų rezultatai parodė, kad išvardintos vakcinos sukėlė sąlyginai silpną CTL imuninį atsaką, ne tokį, kokio buvo tikėtasi [Lindenburg et al., 2002; Walther et al., 2005, Kaufmann et al., 2007]. Minėtų rezultatų priežastys gali būti šios: tyrimuose nebuvo naudojami jokie nespecifinio imuninio atsako stiprikliai (pvz., CpG), buvo naudojamos neoptimalios vakcinos dozės ar intervalai tarp skiepimų.

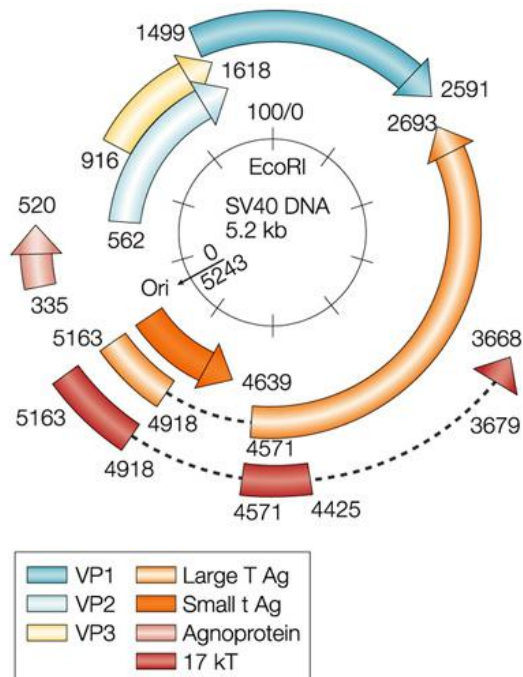
Bakteriofago Q β VPD pagrindu buvo sukurtos chimerinės VPD skirtos kovai su melanoma. Šios VPD yra sujungtos su melanomos MART-1 baltymo dalimi, pripakuotos CpG ir pavadintos MelQbG10. Su MelQbG10 VPD yra pradėti klinikiniai tyrimai: vakcina skiriama II-IV stadijos melanoma sergantiems pacientams, tiriamas vakcinos saugumas, toleravimas, imunogeniškumas, efektyvumas, stebima ligos progresija, CTL funkcionalumas, bandoma parinkti tinkamas dozes, tinkamiausias injekcijų vietas.

VPD panaudojimas rekombinantinių vakcinų kūrimui yra perspektyvus, jos jau yra naudojamos žmonių skiepimui ir norimam B ląstelių atsakui sukelti. Norisi tikėtis, kad VPD taip pat bus pritaikytos ir efektyviam CTL imuniniam atsakui gauti.

Poliomos virusai ir jų struktūrinių baltymų formuojamos į virusus panašios dalelės

Poliomos virusai priklauso *Polyomaviridae* virusų šeimai. Tai – apvalkalėlio neturintys DNR virusai. Jų genomai dvigrandis, žiedinis,

kovalentiškai uždaras, apie 5 kb dydžio (7 pav.). Ikosaedrinė viruso kapsidė yra 45–50 nm skersmens, sudaryta iš trijų rūšių baltymų: VP1, VP2 ir VP3. Kiekvienas virusas turi siaurą šeiminių ratą. Pirmasis atrastas šios virusų šeimos atstovas – pelių poliomos virusas, buvo pavadintas *polioma* dėl sugebėjimo sukelti auglius daugelyje vietų [Gross, 1953; Stewart, 1953].



7 pav. Poliomos viruso (SV40) geno schema [Gazdar et al., 2002]. Poliomos virusų genomai dvigrandis, žiedinis, kovalentiškai uždaras, apie 5 kb dydžio. Struktūriškai genomai skirstomi į ankstyvą, vėlyvą ir reguliacinį (nekoduojantį) rajonus. Reguliaciniame rajone yra ankstyvo ir vėlyvo rajonų promotoriai bei replikacijos pradžios seka ori. Ankstyvo ir vėlyvo rajonų koduojančios sekos nepersikloja, pirminiai transkriptai yra nuskaitomi nuo priešingų DNR grandžių. Ankstyvoji mRNR koduoja T antigenus (ir 17kT baltymą SV40 atveju), o vėlyvoji – struktūrinius VP1, VP2, VP3 baltymus ir Agno baltymą (funkcija nežinoma).

Nature Reviews | Cancer

Poliomos virusai gali sukelti vėžinę ląstelių transformaciją ir auglius eksperimentiniams gyvūnams. Iki 2011-ųjų metų pavasario identifikuoti ir mokslinėje literatūroje paskelbti poliomos virusai yra išvardinti 1 lentelėje.

2011-ųjų pradžioje buvo žinomi 9 žmogaus poliomos virusai. Dauguma žmonių yra poliomos virusų nešiotojai nuo ankstyvos vaikystės, bet be jokių simptomų. Įdomu, kad imunosupresijos atvejais poliomos virusai reaktyvinasi ir yra siejami su tam tikromis patologijomis. Plačiai paplitęs JCV (JCPyV) poliomos virusas siejamas su progresuojančia daugiažidinine leukoencefalopatija (AIDS pacientams), o BKV (BKPyV) poliomos virusas su šlapimtakių stenoze (po inkstų transplantacijos),

hemoraginiu cistitu (po kaulų čiulpų transplantacijos) [Krumholz et al., 2009]. KI ir WU virusai buvo rasti vaikų kvėpavimo takų mėginiuose, tačiau su konkrečia kvėpavimo takų liga jie dar nėra susieti [Allander et al., 2007; Gaynor et al., 2007]. Merkelio ląstelių poliomos virusas (MCV arba MCPyV) buvo surastas reto, bet labai agresyvaus odos vėžio – Merkelio ląstelių karcinomos – ląstelėse. Tai pirmasis žmogaus poliomos virusas, kuris yra susietas su konkrečiu vėžiniu susirgimu. MCV yra randamas beveik visose (~ 90 proc.) Merkelio ląstelių karcinomose [Feng et al., 2008]. MCV virusas yra plačiai paplitęs ir tarp sveikų žmonių, šio viruso DNR yra randama sveikų žmonių odos tepinėliuose, seilėse, žarnose, kvėpavimo takų mėginiuose [Feng et al., 2008; Loyo et al., 2009; Wieland et al., 2009]. 2010-aisiais sveikų žmonių odos tepinėliuose buvo rasti dar du žmogaus poliomos virusai – šeštasis ir septintasis – HPyV6, HPyV7 [Schowalter et al., 2010]. Nustatyta, kad MCV, HPyV6, HPyV7 virusų DNR pasišalina su senomis odos ląstelėmis virionų pavidalu. Aštuntasis žmogaus poliomos virusas buvo rastas imunosupresuoto žmogaus (po širdies transplantacijos), sirgusio *Trichodysplasia Spinulosa* (TS), veido odos mėginiuose. Virusas buvo pavadintas su *Trichodysplasia Spinulosa* (TS) susijusiu poliomos virusu (TSV) [Meijden et al., 2010]. TS yra labai retas odos susirgimas, dažniausiai pasitaikantis itin silpną imunitetą turintiems žmonėms, pvz., po organų transplantacijų. Ligai būdingi dideli ir bjaurūs inkštirai, primenantys mazgelius-spygliukus žmogaus veide, kurie drastiškai pakeičia žmogaus išvaizdą. 2011-aisiais buvo paskelbta ir apie dar vieno žmogaus poliomos viruso, kuris iš eilės preliminariai buvo pavadintas 9-uuju (HPyV9), nustatymą [Scuda et al., 2011]. HPyV9 buvo surastas imunosupresuoto paciento (po inkstų transplantacijos) kraujo serume. HPyV9 viruso buvimas buvo nustatytas kraujo serume, plazmoje, pilname kraujyje ir šlapime, jo nerasta cerebrospinaliniame skystyje, kvėpavimo takų mėginiuose. HPyV9 iš visų iki šiol žinomų poliomos virusų yra panašiausias į beždžionių limfotropinį

poliomas virusą (LPV). HPyV9 buvo nustatytas tik 4 iš 597 ištirtų imunosupresuotų pacientų atvejais, tai leidžia manyti, kad šis virusas nėra plačiai paplitęs. Kadangi paskutiniaisiais metais atrandama vis naujų žmonių poliomas virusų, panašu, kad žmonių populiacijoje jų cirkuliuoja ir dar daugiau.

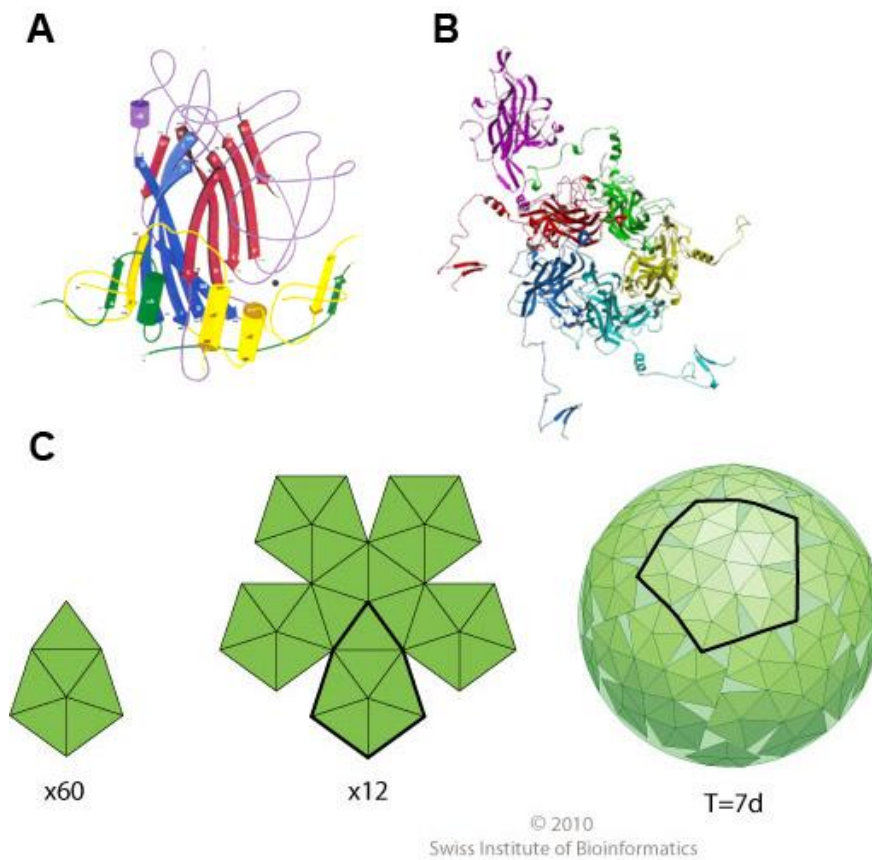
1 lentelė. Poliomas virusų sąrašas [Dalianis ir Garcea, 2009; Schowalter et al., 2010; Meijden et al., 2010]

Virusas	Atradimo metai	Šeimininkas
1. Pelių poliomas virusas	1953	Pelė
2. Pelių pneumotropinis virusas	1953	Pelė
3. SV40	1960	Beždžionė
4. SA12	1963	Beždžionė
5. Triušių poliomas virusas	1964	Triušis
6. Žiurkėno poliomas virusas	1968	Žiurkėnas
7. BK poliomas virusas (BKPyV)	1971	Žmogus
8. JC poliomas virusas (JCPyV)	1971	Žmogus
9. Jaučio poliomas virusas	1974	Galvijai
10. Limfotropinis papova virusas	1979	Beždžionė
11. Paukščių poliomas virusas	1981	Paukščiai
12. Žiurkių poliomas virusas	1984	Žiurkė
13. Pavianų poliomas virusas 2	1989	Pavianas
14. Cynomolgus poliomas virusas	1999	Beždžionė
15. Žąsų hemoraginis poliomas virusas (GPyV)	2000	Žąsis
16. Šimpanzės poliomas virusas	2005	Šimpanzė
17. Varnų poliomas virusas	2006	Varna
18. Kikilių poliomas virusas	2006	Kikilis
19. KI ² poliomas virusas (KIPyV)	2007	Žmogus
20. WU poliomas virusas (WUPyV)	2007	Žmogus
21. Voverinės beždžionės poliomas virusas	2008	Beždžionė
22. Merkelio ląstelių poliomas virusas	2008	Žmogus
23. HPyV6	2010	Žmogus
24. HPyV7	2010	Žmogus
25. TSV	2010	Žmogus
26. HPyV9	2011	Žmogus

Poliomas virusų kapsidę sudaro trys paviršiniai baltymai: pagrindinis kapsidės baltymas VP1 ir minoriniai – VP2 ir VP3. Šie baltymai suformuoja ikosaedrinę kapsidę, kurią sudaro 72 VP1 baltymo formuojami pentamerai (8 pav.). Vienam pentamerui tenka maždaug po vieną minorinį baltymą, VP2 arba VP3. Kiekvienas virionas turi po 360 VP1 baltymo

² KIPyV pavadinimas kilo nuo Karolinska Institute virus, o WUPyV – nuo Washington University virus.

vienetų (72x5) ir 30-60 VP2 bei VP3 baltymo molekulių. Virusinę dalelę sudaro apie 88 proc. baltymų ir apie 12 proc. DNR. Viriono sedimentacijos koeficientas sacharozės tankio gradientu yra 240 S. Poliomos virusai yra atsparūs lipidų tirpikliams, kadangi jie neturi papildomo apvalkalo, taip pat yra iš dalies atsparūs karščiui. Cezio chlorido tankio gradientu virionai randami 1.34 g/mL tankio frakcijoje.



8 pav. Poliomos virusų kapsidės susidarymo schema. (A) Pagrindinio kapsidės baltymo VP1 erdvinė struktūra. (B) Struktūrinių VP1 baltymų formuojamas pentameras [Liddington et al., 1991]. (C) 72 pentamerai jungiasi tarpusavyje ir sudaro T=7d simetrijos ikosaedrinę kapsidę [http://www.expasy.org/viralzone]. Žaliasis trikampis žymi vieną VP1 baltymą. Vieną viruso kapsidę sudaro 360 VP1 baltymo vienetų, t. y. 72 pentamerai (72x5=360).

VP1 baltymas išskirtas iš virionų ar susintetintas įvairiose rekombinantinėse svetimų baltymų raiškos sistemose *in vivo* ir *in vitro* formuoja į virusus panašias daleles (VPD). VPD susidarymui VP2 ir VP3 struktūriniai baltymai nėra būtini. VPD grįžtamai suyra į VP1 pentamerus,

pašalinus kalcio jonus, redukavus disulfidinius ryšius ir esant šarminei terpei bei mažai joninei jėgai [Salunke, 1986].

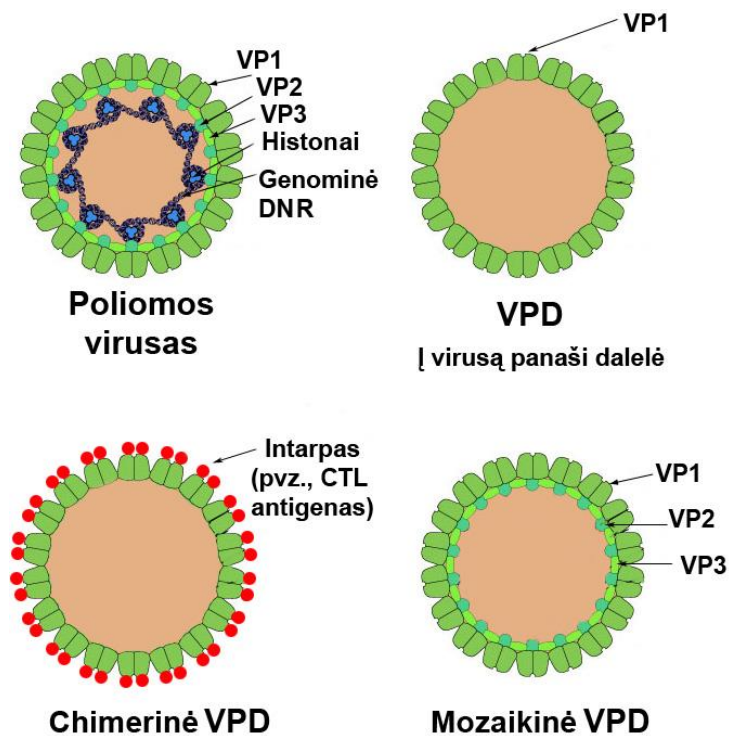
Kiekvienas iš 12 VP1 pentamerų, esančių ikosaedro viršūnėse, sąveikauja su 5 gretimais pentamerais, o kiekvienas iš kitų 60 pentamerų turi po 6 kaimynus. SV40 ir pelės poliomos viruso VP1 baltymų struktūros yra nustatytos. Penkiavalenčių ir šešiavalenčių VP1 pentamerų struktūra identiška, išskyrus lanksčius VP1 baltymo C galus. Po penkis tokius galus įsiskverbia į kiekvieną pentamerą ir po penkis išėina iš jo į gretimus pentamerus.

Minorinių baltymų VP2 ir VP3 sekos yra persidengiančios, VP2 sudaro visa VP3 seka C-gale ir papildomos 115 amino rūgščių N-gale. *Polyomaviridae* šeimos virusų baltymų VP2, VP3 C-gale yra konservatyvi seka, per kurią šie baltymai jungiasi prie VP1 baltymo N-galo [Barouch ir Harrison, 1994]. VP2 ir VP3 yra išsidėstę pentamerų kūgiškose ertmėse. Kiekviename kapsomere VP2, VP3 jungiasi su VP1 skirtingai, be to, jie gali jungtis su bet kuriuo iš 5 VP1 baltymų [Chen et al, 1998]. Kapsomerai yra išsidėstę taip, kad viriono išorėje yra tik VP1 baltymai. Poliomos virusų VP1 baltymas gali jungtis prie infekuojamos ląstelės oligosacharidinės grandinės, pasibaigiančios sialo rūgštimi, o kai kurių virusų virusinės dalelės pasižymi hemagliutinuojančiomis savybėmis.

VP1 turi tris tretinės struktūros modulius: N galo, du antiparalelius β -lakštus, turinčius vyniotinio topologiją, ir ilgą C galo. Pirmos 15 N galo ar. yra nukreiptos į kapsidės vidų ir sąveikauja su minichromosoma³. β -lakštus sudarančias juostas jungia kilpos. Manoma, kad per C galines baltymų dalis yra užtikrinamas ryšys tarp pentamerų. Pentameras yra cilindro formos. Jo centre esanti kūgiška ertmė plačiuoju galu atsiveria į viriono vidų. Pentamerą sudarantys monomerai labai glaudžiai susiję. SV40, MPyV, HaPyV, žmogaus poliomos virusų VP1 sekų palyginimas rodo, kad β lakštų susiformavimą

³ Kadangi viruse randami ląstelės šeiminkės histonai H2A, H2B, H3 ir H4, tai DNR-histonų kompleksas vadinamas virusine minichromosoma.

sąlygojančios sekos labai konservatyvios. Labiausiai varijuoja viriono išorėje esančios kilpos, jos greičiausiai sąlygoja virusų sąveiką su ląstelių receptoriais ir antigenines savybes [Liddington et al., 1991]. Kadangi šios kilpos yra gana variabilios ir nedalyvauja sąveikoje tarp VP1 pentamerų, jos gali būti modifikuojamos, įterpiant į jas svetimus epitopus. Tokios VPD galėtų būti panaudotos vakcinoms prieš įvairius virusus gauti ir imuniniam atsakui skatinti. Į tinkamas VP1 sritis įterpus atitinkamus polipeptidus, galima būtų kurti VPD, sąveikaujančias su tam tikrų tipų ląstelių receptoriais ir galinčias pernešti į tas ląsteles genetinę informaciją. Įrodyta, kad į VP1 VPD paviršiuje esančias sritis galima įterpti gana didelius polipeptidus, pvz., į MuPyV VP1 HI kilpą įjungus visą 18 kDa dihidrofolatreduktazės polipeptidinę grandinę. VP1 baltymas išlaikė sugebėjimą formuoti VPD, o dihidrofolatreduktazė – fermentinį aktyvumą [Gleiter et al., 1999].



9 pav. Poliomos viruso ir į virusus panašių dalelių schemas. Poliomos virusų kapsidė yra sudaryta iš struktūrinių VP1, VP2 ir VP3 baltymų bei genominės medžiagos – dvigrandės žiedinės DNR. VPD sudarymui užtenka tik pagrindinio kapsidės baltymo VP1. Chimerines VPD sudaro modifikuotas VP1 baltymas su prijungtomis svetimomis sekomis. Mozaikines VPD sudaro keli skirtingi baltymai, pvz., VP1 ir VP2 arba VP1 ir modifikuotas VP1 [http://www.expasy.org/viralzone].

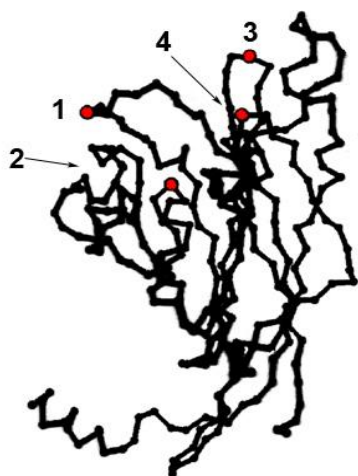
Poliomos virusų VPD (9 pav.), kaip atitinkamų virusų analogai, jau naudojamos diagnostikoje, tačiau galėtų būti panaudotos ir profilaktinėms priemonėms kurti. Be to, šios VPD tyrinėjamos kaip svetimų epitopų pateikimo imuninei sistemai priemonė ir vektoriai genų terapijai. Daugiausia eksperimentų yra padaryta su pelių poliomos virusų VPD, jas bandoma panaudoti svetimų sekų nešikliais bei imuniniam atsakui prieš VPD sukelti. Pelėms kartu su adjuvantais sušvirškus VPD, sukeliamas efektyvus, antigenui specifinis imuninis atsakas, kuris apsaugo nuo virusų infekcijos, bei vėžinių ląstelių augimo [Andreasson et al., 2009].

Norint panaudoti poliomos VPD žmogaus priešvėžinių vakcinų kūrimui, visada iškyla klausimas dėl anti-VP1 antikūnų kryžminio reagavimo su vakcina. Taip gali atsitikti, nes didžioji dalis žmonių populiacijos yra užsikrėtusi žmogaus poliomos virusais, šie virusai paplitę po visą pasaulį, o tai galėtų sumažinti gydymo efektyvumą. Tyrimai rodo, kad didžioji žmonių populiacijos dalis turi antikūnų prieš BK ir JC žmogaus poliomos virusus [Doerries, 1996]. Naujai atrasti poliomos virusai KIPyV, WUPyV, taip pat yra plačiai paplitę žmonių populiacijoje. Literatūroje yra preliminarių duomenų apie tokius kryžminio reagavimo eksperimentus: žmonių kraujo serumai kryžmiškai nereaguoja su VPD, naudojamomis kaip vakcina [Brinkman et al., 2005]. Naudojant pelių (MuPyV) arba žiurkėno poliomos virusų (HaPyV) VP1 VPD, ši kryžmiško reagavimo galimybė dar mažesnė.

Šiam darbui pasirinktas žiurkėno poliomos viruso VP1 baltymas yra labai efektyviai sintetinamas mielių *S.cerevisiae* ląstelėse [Sasnauskas et al., 1999]. Mielių ląstelės neturi žmogaus organizmui toksinių medžiagų ir negali sukelti pašalinių nepageidaujamų reakcijų, todėl jos itin tinka VPD vakcinų kūrimui ir gamybai. HaPyV-VP1 formuojamos VPD, jas liofilizavus ir vėl ištirpinus nesuyra, o tai vakcinų kūrimui ir ilgam VPD laikymui yra svarbus privalumas. Mielėse susintetintas HaPyV VP1 gerai toleruoja

įvairaus ilgio ir kilmės baltymų intarpus, esančius VP1 baltymo kilpose, VPD paviršiuje. Nustatytos keturios epitopų įterpimo pozicijos į HaPyV–VP1 baltymą: „1“ pozicija tarp 80-89 ar., „2“ tarp 221-224 ar., „3“ tarp 244-246 ar. ir „4“ pozicija tarp 280-289 ar. [Gedvilaitė et al., 2000, 2004]. VP1 baltymo svetimų intarpų toleravimas buvo parodytas į VP1 baltymo minėtas pozicijas įvedus HBV – hepatito B viruso pre-S1 rajono epitopą (5 ar. ilgio – DPAFR), visais keturiais atvejais susidarė VPD, kuriomis paskiepijus peles buvo sukeltas stiprus, pre-S1 sekai specifinis imuninis atsakas [Gedvilaitė et al., 2000]. Lyginant HaPyV VP1 baltymo homologiją su kitų poliomos virusų VP1 baltymais, nustatyta, kad labiausiai variabili yra 4 pozicija, po to mažėjimo tvarka: 3, 1, 2. Visos keturios pozicijos, baltymų monomerams susirinkus į VPD, užtikrina intarpų padėtį dalelės išorėje (10 pav.).

A



B



10 pav. Sumodeliuotas žiurkėno poliomos viruso (HaPyV) pagrindinio struktūrinio baltymo VP1, tretinės struktūros modelis. (A) Modelyje raudonais taškais pažymėtos galimos svetimų intarpų vietos: „1“ pozicija tarp 80-89 ar., „2“ tarp 221-224 ar., „3“ tarp 244-246 ar., „4“ tarp 280-289 ar. [Gedvilaitė et al., 2000]. (B) HaPyV VP1 modelis su antrinės struktūros elementais (modelis gautas su swiss-model įrankiu [<http://swissmodel.expasy.org>]).

HaPyV VP1 baltymo – vidutinių ir ilgų svetimų intarpų (45, 80 ir 120 ar.) nešiklio tinkamumas buvo parodytas į minėtas keturias baltymo pozicijas, įterpiant hanta virusų kapsidę formuojančio baltymo

fragmentus. Buvo parodyta, kad vidutinius ir ilgus intarpus puikiai toleruoja 4 ir 1 pozicijos, gauti chimeriniai VP1 baltymai įgauna tinkamą konformaciją ir susirenka į VPD [Gedvilaitė et al., 2004], o į 4 VP1 baltymo poziciją galima įterpti net visą GFP baltymą [Gedvilaitė et al., 2006]. VPD su hanta virusų kapsidę formuojančio baltymo tarpais pelėms sukėlė intarpams specifinį humoralinį imuninį atsaką net ir be adjuvantų. Be to, pastebėta, kad kuo intarpas ilgesnis, ar jų daugiau, tuo silpnesnis humoralinis imuninis atsakas gaunamas prieš patį nešiklį – mažėja nešiklio imunogeniškumas ir antigeniškumas. Minėta savybė dar labiau padidina HaPyV VP1 formuojamų VPD panaudojimo svetimiams peptidams pernešti vertę, ypač kuriant vakcinas, sukeliančias imunitetą prieš konkretų peptidą.

1.4. LCMV GP33 peptidas – modelinis CTL antigenas

LCMV (pelių limfocitų choriomeningito virusas) yra natūralus pelių patogenas, pelėms sukeliantis stiprų CTL atsaką. LCMV yra nuodugniai ištirtas ir charakterizuotas modelinis virusas, naudojamas CTL imuninio atsako pelėse analizei.

LCMV yra Arena virusų šeimai priklausantis RNR virusas (11 pav.). Tai dažnas pelių patogenas, galintis pakenkti ir žmogui [Karupiah, 2006]. Dirbant su šiuo virusu yra būtina II-III klasės saugumo lygmens laboratorija. LCMV yra ląstelių nelizuojantis virusas, todėl viruso plitimą sunku pastebėti ir reikia ypač saugoti nuo užkrėtimo laboratorijoje esančias ląstelių linijas.

LCMV pelėse indukuoja stiprų CTL atsaką, kurį galima nustatyti *in vitro* atliekant ⁵¹Cr atpalaidavimo analizę (*angl.* Cr release assay) [Zinkernagel ir Doherty, 1974]. LCMV specifinių CTL ląstelių susidarymui T_H pagalbos nereikia [Ahmed et al., 1988; Leist et al., 1987],

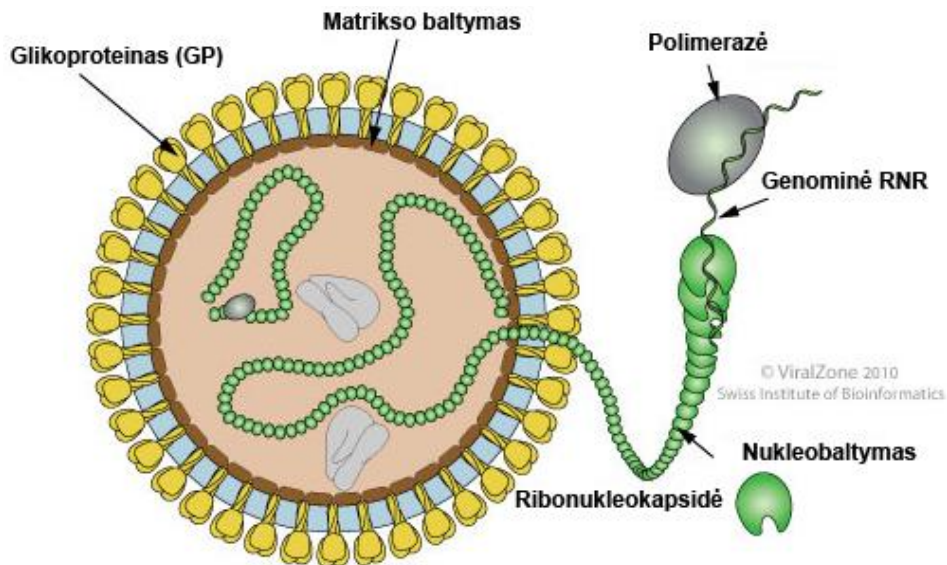
nors jis indukuoja ir T_H , ir B ląsteles. Viruso replikaciją išimtinai reguliuoja CTL (CD8⁺) ląstelės per perforino sukeltą ląstelių lizę pirminės infekcijos metu [Kagi et al., 1944]. Viruso eliminavimas yra LCMV specifinių CTL ląstelių buvimo rodiklis. Nesant LCMV specifinių CTL ląstelių, LCMV nėra pašalinamas. LCMV nėra citopatinis virusas, todėl infekcijos metu ląstelių nelizuoja. Žalą šeimininko ląstelėms padaro paties šeimininko CTL ląstelės, kurios lizuoja virusu infekuotas ląsteles ir sukelia imunopatologiją. LCMV sušvirkštus sveikoms pelėms į smegenis yra sukiamas mirtinas choriomeningitas – CTL suardo nervų ląsteles. Jeigu sušvirškus LCMV į letenėles per 8 dienas jos ištinsta, tai rodo, jog pelė turi virusui specifinių CTL ląstelių. Jeigu viruso infekcijos metu pelė turi LCMV specifinių atminties CTL ląstelių, tai viruso replikacija greitai yra sustabdoma ir imunopatologija nepasireiškia. Imunopatologijos nebuvimas rodo pirminio CTL imuninio atsako nebuvimą arba atminties CTL ląstelių buvimą [Rowe, 1954; Lehmann-Grube, 1971; Hany et al., 1989].

Yra žinomi keli LCMV kamienai, kurie skiriasi viruso replikacijos stiprumu ir audinių tropizmu. LCMV WE kamienas yra naudojamas, kai norima sukelti stiprų CTL imuninį atsaką, o Arm (Armstrong) kamienas – norint silpnesnio atsako. Docile arba clone-13 kamienų virusai replikuojasi labai greitai ir visiškai išsekina specifines CTL ląsteles [Moskophidis et al., 1993].

LCMV sukelia CTL atsaką daugeliui MHC I klasės haplotipų, pvz., H-2^b, H-2^d, H-2^k. Stipriausi ir geriausiai moksliniams eksperimentams tinkantys LCMV epitopai yra šie: NP₃₉₄₋₄₀₈, GP₃₃₋₄₁ [Pircher et al., 1989].

GP33 – LCMV glikoproteino (GP) CTL antigenas, jo aminorūgščių seka KAVYNTATC (33–41 ar.). Eksperimentams yra naudojamas modifikuotas GP33 peptidas, kurio paskutinė aminorūgštis yra pakeista iš cisteino į

metioniną (kad nesusidarytų disulfidiniai tilteliai) – KAVYNFATM [Aichele et al., 1994].



11 pav. Pelių limfocitų choriomeningito viruso (LCMV) schema. LCMV priklauso Arena virusų šeimai. LCMV genomą sudaro dvi linijinės viengrandės RNR. Virioną sudaro apvalkalėlis ir dvi ribonukleokapsidės. Virione randama šeimininko ląstelės ribosomų bei nestruktūrinių baltymų [International Committee on Taxonomy of Virus, www.ictvonline.org; Šveicarijos bioinformatikos instituto internetinė duomenų bazė <http://www.expasy.org/viralzone>].

2. METODAI IR MEDŽIAGOS

2.1. Metodai

2.1.1. Plazmidžių konstravimas

Darbai su DNR buvo naudojami klasikiniai genų inžinerijos, molekulinės biologijos metodai [Sambrook et al., 1989]. Plazmidinė DNR iš *E.coli* ląstelių buvo gryninama šarminės lizės metodu. DNR nukleotidų seka buvo nustatoma Biotechnologijos institute, Sekvenavimo centre automatinio sekvenatoriumi ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). DNR elektroforezė buvo vykdoma 0.8 – 2 % agarozės geliuose, turinčiuose 0.1 – 0.2 µg/mL etidžio bromido. DNR koncentracija tirpaluose buvo nustatoma spektrofotometru NanoDrop2000. DNR fragmentai iš agarozės gelių buvo gryninami pagal gamintojo rekomendacijas, naudojant DNR gryninimo iš agarozės gelio rinkinį „Cyclo-pure gel extraction kit“ (Amresco, JAV). Plazmidinės DNR hidrolizės restrikcijos endonukleazėmis, polimerazės grandininės reakcijoms, 5'-galinių fosfatų pašalinimui, DNR viengrandžių („lipnių“) galų bukinimui, 5'-galinių fosfatų pašalinimui, DNR siuvimui, buvo naudojami UAB „Fermentas“ (Lietuva) reagentai, procedūros atliekamos pagal gamintojo rekomendacijas. Imliųjų *E. coli* ląstelių paruošimui ir transformacijai buvo naudojama klasikinė Bolivar ir Backman metodika [Bolivar ir Becman, 1979].

2.1.2. Imliųjų *S.cerevisiae* ląstelių paruošimas ir transformacija

Transformuojant mieles, buvo naudojama modifikuota Geitz pasiūlyta metodika [Geitz et al., 1995]. Iš vakaro mielių kamieno (kuris bus naudojamas transformacijai) ląstelių kolonija užsėjama į 5 mL YEPD terpės ir auginama per naktį 220 rpm/+30°C/16 val. kratytuve. Ryte naktinė kultūra buvo skiedžiama terpe iki optinio tankio 1 ($\lambda = 600$ nm) ir inkubuojama 220 rpm/+30°C/3 val. kratytuve, kad ląstelės vieną ar du kartus pasidalintų. Po to ląstelės buvo surenkamos nucentrifuguojant 2000 rpm/KT/5 min., plaunamos su 5 mL TE buferio. Suspendavus

ląsteles į 3 mL 0.1 M TE-LiCl tirpalo, jos buvo inkubuojamos 1 val. +30°C termostate. Po inkubacijos, paruoštos imliosios mielių ląstelės buvo surenkamos, centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis, ir suspenduojamos į 100 µL 0.1 M TE-LiCl tirpalo.

Transformacijai buvo imama 15 µL paruoštos imliųjų ląstelių kultūros, pridedama 5 µL DNR tirpalo (2–4 µg) ir 30 min. inkubuojama +30°C termostate. Pridėjus du tūrius 50 % TE-PEGx4000 (40 µL) ir 1 val. palaikius +30°C termostate, mišiniai 20-čiai min. buvo perkelti į +42°C temperatūros vandens vonią. Po temperatūrinio šoko transformantai buvo gaivinami užpilant 1mL YEPD terpės ir inkubuojant per naktį (apie 16 val.) +30°C temperatūros termostate. Mėgintuvėlio kepurėlėje buvo steriliai praduriama skylutė, kad nesikauptų mielių išskiriamas CO₂, mėgintuvėliai uždengiami folija. Po inkubacijos ląstelės buvo surenkamos 6 sek. centrifuguojant stalinėje Eppendorf minicentrifugoje 5417C, ir išsėjamos (iššpateliuojamos) ant agarizuotos YEPD terpės su 0,0125 % formalino (0.3 µL/mL). Transformantai buvo tikrinami ir atrenkami persėjant juos ant YEPD terpės su dvigubai didesniu formalino kiekiu (0.6 µL/mL).

2.1.3. Mielių auginimas ir svetimų baltymų sintezės indukcija

Mielės *S. cerevisiae*, transformuotos plazmide su reikiamu genu, 20–24 val. buvo auginamos skystoje YEPD terpėje (turinčioje 2 % gliukozės). Po to buvo įpilama pusė tūrio 3xYEPG terpės skirtos svetimų baltymų sintezės indukcijai (turinčios 9 % galaktozės). Į auginimo ir indukcinę terpes buvo dedama 0,3 µL/mL formalino. Indukcija trukdavo 20–24 val. [Sasnauskas et al., 1999].

2.1.4. Svetimų baltymų gryninimas iš mielių ląstelių

Po baltymų sintezės indukcijos, mielių ląstelės buvo atskiriamos nuo terpės centrifuguojant 2000 rpm/KT/5 min. (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius) ir užšaldomos – 20°C temperatūroje.

Baltymų gryninimas buvo atliekamas ledo vonioje. Priklausomai nuo ląstelių kiekio, jos buvo užpilamos 2 kartus didesniu ardymo buferio DB450+Arg tūriu ir pridedamas lygus kiekis (pagal mielių masę) stiklinių rutuliukų. Į ląstelių ardymo buferį prieš pat darbą buvo pridedama 1–2 mM proteazių slopiklio PMSF, taip pat Roche proteazių slopiklių kokteilio (pagal gamintojo rekomendacijas). Mielų ląstelės buvo ardomos intensyviai purtant purtykle (30 sek. ardoma ir 2–5 min. dedama į ledą atšaldyti) arba su homogenizatoriumi (French presu). Bendras ardymo laikas 5 – 10 min. Mielų ląstelių lizatą nucentrifugavus 2000 rpm/+4°C/10 min. greičiu (Beckman J-6B centrifuga, JS-5.2 rotorius), buvo surenkamas supernatantas. Suardytų mielių ląstelių lizatų (grubūs lizatai) ir supernatantų mėginiai buvo analizuojami geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAGE).

Toliau baltymai buvo gryninami centrifuguojant per 20 – 60 % sacharozės tirpalų gradientą (-us). Ląstelių lizato supernatantas buvo užpilamas ant sacharozės gradiento paviršiaus ir centrifuguojamas 37000 rpm/+4°C/~16 val. (Beckman K80 arba K90 centrifugoje, 70.1 Ti arba 60 Ti rotoriuje). Sacharozės tirpalų gradientas buvo sudarytas tankio mažėjimo tvarka į ultracentrifuginį mėgintuvėlį atsargiai pilant sacharozės tirpalus. Po ultracentrifugavimo buvo renkamos atskiros baltymų frakcijos, kurios vykdant NDS-PAGE, buvo tikrinamos ieškant tikslių baltymų. Norint gauti kuo grynesnius baltymus bei juos sukonzentruoti, atrinktos frakcijos su gryninamais baltymais buvo pakartotinai užnešamos ant suformuoto sacharozės tirpalų gradiento ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis.

Toliau baltymai buvo gryninami CsCl gradiente: baltymų suspensija buvo užpilama ant cezio chlorido gradiento paviršiaus ir centrifuguojama 37000 rpm/+4°C/~40 val. CsCl tirpalų gradientas buvo sudarytas tankio mažėjimo tvarka į ultracentrifuginį mėgintuvėlį atsargiai pilant cezio

chlorido tirpalus. Nucentrifugavus buvo renkamos atskiros frakcijos (po 0.5–2 mL, pradėdant nuo viršaus) ir tikrinamos vykdant NDS-PAGE, gelį nudažant ir analizuojant. Metodika sudaryta remiantis [Gedvilaite et al., 2000] bei modifikuojant.

2.1.5. Baltymų dializė, baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis su NDS

Darbui su baltymais buvo naudojami klasikiniai metodai [Sambrook et al., 1989]. Baltymų tirpalai buvo dializuojami prieš PBS buferį. Baltymų elektroforezė buvo vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis, Tris-glicino-NDS buferyje, vertikalios elektroforezės aparate. Po elektroforezės geliai buvo dažomi Coomassie brilantinio mėlio tirpalu.

2.1.6. Western blotas

Po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis išfrakcionuoti baltymai ir dažytas baltymų molekulinės masės standartas buvo pernešami ant nitroceliuliozinės membranos (pusiau sausas pernešimas). Tam tikslui poliakrilamidinis gelis po elektroforezės, nitroceliuliozinė membrana (prieš tai 15–30 sek. palaikius metanolyje) ir pernešimo popierius (vatmanas), buvo pamerkiami į pernešimo buferį. Ant pusiau šlapio pernešimo aparato buvo dedamas lapelis vatmano, ant viršaus membrana, ant jos gelis ir vėl vatmanas. Pernešimas buvo vykdomas 20 min. esant 12 V įtampai. Po to membrana buvo laikoma 1 val. blokavimo tirpale. Po blokavimo membraną patalpinus į „Biometra“ cilindrą, ji buvo vartyklėje inkubuojama 3-uose mL TTBS buferio su atitinkamais pirminiais antikūnais, 1 val. (arba per naktį). Po inkubacijos, membrana 3 kartus po 15 min. buvo plaunama TTBS buferiu. Nuplauta membrana 1–2 val. buvo inkubuojama 3-uose mL TTBS su antriniais antikūnais ir vėl plaunama 3 kartus po 15 min. su TTBS buferiu ir dar 2 kartus po 5 min. su TBS buferiu. Pabaigoje membrana buvo pamerkiama į

ryškumą ir, išryškėjus baltymų juostelėms, nuplaunama vandeniu. Metodika sudaryta remiantis [Sambrook et al., 1989].

2.1.7. Į virusus panašių dalelių stebėjimas elektroniniu mikroskopu

Cezio chlorido gradientu grynintų VPD tirpalas buvo užlašinamas ant specialaus tinklelio skirtu mėginių stebėjimui elektroniniu mikroskopu (S162-3 Formvar/Carbon 300 Mesh Cu, Agar scientific, UK). Mėginiai ant tinklelių buvo dažomi 2 % vandeniniu uranilacetato tirpalu, po to stebimi elektroniniu mikroskopu bei fotografuojami.

2.1.8. Pelių imunizavimas

Visos pelės švirkščiamos medžiagos (VPD, LCMV, vėžinės ląstelės) buvo ruošiamos PBS buferyje. Tais atvejais, kai antigenas buvo švirkščiamas į veną, prieš sušvirkštimą pelės buvo palaikomos po infraraudonųjų spindulių lempa. Prieš sušvirkštimus po oda, į raumenis, po pilvaplėve, pelės buvo užmigdomos eteriu.

2.1.9. Imunofermentinė analizė

Į 96-šulinėlių skaidrios plokščiadugnės plokštelės („NUNC™“) šulinėlius buvo pilama po 50 µL 4 µg/mL koncentracijos VPD tirpalo padengimo buferyje. Inkubuojama per naktį 37°C temperatūroje. Tirpalą išpylus, šulinėliai 2 kartus po 150 µL buvo plaunami plovimo buferiu ir užpylus 100 µL blokavimo buferio (3 % JSA plovimo buferyje), plokštelės buvo inkubuojamos 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos šulinėliai buvo 3 kartus po 150 µL plaunami plovimo buferiu. Įpylus po 50 µL įvairaus praskiedimo pelių kraujo serumo (plovimo buferyje), plokštelės buvo inkubuojamos 1–2 val. 37°C temperatūros termostate. Po inkubacijos šulinėliai buvo 3 kartus po 150 µL praplaunami. Po to buvo įpilama po 50 µL/šulinėliui atitinkamai praskiestų (skiedimą nurodo gamintojas), su peroksidaze konjuguotų (anti-pelės) antrinių antikūnų tirpalo plovimo buferyje, plokštelės buvo inkubuojamos 1 val. 37°C. Po

inkubacijos šulinėliai buvo plaunami 3 kartus po 150 µL plovimo buferio. Ryškinama įpylus po 50 µL ryškalo TMB Plus (Clinical Science Products, JAV). Reakcija buvo sustabdoma pridėjus po 50 µL 10 % H₂SO₄ tirpalo. Rezultatai buvo kiekybiškai įvertinami spektrofotometru „Infinite M200“ (bangos ilgis 450 nm). Antikūnų titru buvo laikomas toks didžiausias antikūnų skiedimas, kai antikūnai vis dar gerai reaguoja su antigenu.

2.1.10. Ląstelių kultūrų auginimas

Ląstelės buvo auginamos T25, T75 buteliuose arba 6 šulinėlių lėkštelėse, joms tinkančiose terpėse (pvz., DMEM, RPMI-1640, MEM ar kt.) su antibiotikais (pvz., geneticinu, penicilinu/streptamicinu) +37°C CO₂ inkubatoriuje jas nuolat (kas 2–3 paras) persėjant. Persėjant ląsteles, kurios auga prilipusios prie indo dugno, terpė nuo ląstelių buvo nusiurbiamama, iš karto buvo užpilama tripsino tirpalo ir porą minučių palaikoma, kol ląstelės pradeda atlipti nuo paviršiaus, tada indas buvo smarkiai pakratomas, kad ląstelės greitai ir galutinai atkibtų nuo dugno. Po to buvo užpilama tripsino tirpalui lygiu ar didesniu tūriu mitybinės terpės su 10% FCS ir dalis gautos ląstelių suspensijos (pvz., 1/5) buvo perpilama į naują indą su šviežia mitybine terpe. Metodika sudaryta remiantis [Freshney, 2005].

2.1.11. Ląstelių užšaldymas ilgalaikiam saugojimui

Norint ląsteles užšaldyti, pirmiausia buvo priauginamas norimas ląstelių kiekis, po to jos buvo surenkamos ir nuplaunamos terpe. Suskaičiavus ląsteles, jos buvo skiedžiamos iki 2x10⁶ ląstelių/mL į specialią ląstelių užšaldymo terpę (turinčią 10% FCS ir 10% DMSO), labai švelniai ir atsargiai suspenduojamos ir skubiai išpilstomos po 1 mL į kriomėgintuvėlius. Kriomėgintuvėliai buvo kaip galima greičiau sudedami į izopropanoliu pripildytus šaldymo indus, kurie parai patalpinami į – 80°C šaldytuvą. Po to mėgintuvėlius galima perkelti į skystą azotą. Metodika sudaryta remiantis [Freshney, 2005].

2.1.12. Ląstelių atgaivinimas po ilgalaikio užšaldymo

Ląstelės esančios kriomėgintuvėliuose buvo kaip galima greičiau delnuose atitirpinamos ir labai švelniai perkeliamos į 15 mL Falcone tipo mėgintuvėlį. Po to ant ląstelių iki mėgintuvėlio viršaus itin lėtai buvo pripilama mitybinės terpės. Ląsteles surinkus centrifuguojant (1100 rpm/KT/10 min.) jos buvo suspenduojamos į konkrečiai toms ląstelėms tinkamą terpę ir auginamos +37°C CO₂ inkubatoriuje. Metodika sudaryta remiantis [Freshney, 2005].

2.1.13. Ląstelių skaičiavimas su tripano mėliu

10 μL norimos suskaičiuoti ląstelių suspensijos buvo skiedžiama ir dažoma, pridedant 90 μL Tripano mėlio dažo, bei gerai sumaišoma pipetuoiant. Gauta suspensija buvo užnešama ant Neubauer kameros ir gyvos ląstelės (gyvos ląstelės baltos, o negyvos – mėlynos) buvo skaičiuojamos šviesinio mikroskopo pagalba. Ląstelių dažymas yra paremtas neigiamai įkrauto chromoforo savybe nesąveikauti su ląstelėmis tol, kol jų membrana yra nepažeista. Suskaičiavus ląsteles, jų kiekis buvo perskaičiuojamas į ląstelių skaičių/mL suspensijos. Metodika sudaryta remiantis Freshney, 2005.

2.1.14. Ląstelių žymėjimas antikūnais tėkmės citometrijai

Vienam ląstelių mėginiui, skirtam analizei tėkmės citometru, buvo žymima ~1x10⁶ ląstelių. Ląstelės buvo sumaišomos su norimais antikūnais (koncentracija buvo parenkama pagal gamintojo rekomendacijas arba titruojant) ir ~ 30 min. inkubuojama +4°C šaldytuve. Po to ląstelės buvo nuplaunamos pripilant pilną mėgintuvėlį FACS buferio ir nucentrifuguojant (1100 rpm/KT/10 min.). Supernatantas buvo nupilamas, o ląstelės suspenduojamos į likusį tirpalo lašą. Taip pažymėtos ląstelės buvo analizuojamos tėkmės citometru.

Jei buvo atliekamas kelių pakopų ląstelių žymėjimas (pirminiai, antriniai antikūnai), ląstelės buvo žymimos tokia tvarka: pažymima pirminiais

antikūnais, nuplaunama, pažymima antrinais antikūnais ir vėl nuplaunama.

Tais atvejais, kai buvo žymimos ne ląstelių kultūros, o kraujo ląstelės, pirmiausiai reikėjo 3 lašus pelių kraujo įsilašinti į ~ 3 mL FACS buferio su EDTA ir ląsteles persinešti į laboratoriją bei surinkti centrifuguojant (1100 rpm/KT/10 min.). Po centrifugavimo supernatantas buvo nupilamas, ląstelės suspenduojamos į likusį tirpalo lašą ir žymimos antikūnais anksčiau aprašytu būdu. Po visų žymėjimo žingsnių ląstelės buvo nuplaunamos FACS buferiu ir surenkamos centrifuguojant. Po to ląsteles nuolatos purtant („vorteksuojant“) ant jų buvo lėtai pilamas 1 mL eritrocitų lizės buferio. Gauta suspensija buvo laikoma kambario temperatūroje atidžiai stebint, kada ląstelių suspensija nuskaidrės – eritrocitai susilizuos (~ 1 min.). Po eritrocitų lizės ląstelės buvo greitai nuplaunamos FACS buferiu. Taip pažymėtos baltosios kraujo ląstelės tinka analizei tėkmės citometru.

Jeigu ląstelės tėkmės citometru buvo analizuojamos ne iš karto po jų pažymėjimo antikūnais, o vėliau, pvz., kitą dieną, tai ląstelės buvo užfiksuojamos, pripilant lygų tūrį fiksavimo tirpalo (4% formalino PBS buferyje), ir paliekamos +4°C šaldytuve iki analizės. Metodikos sudarytos remiantis Ormerod, 2000.

2.1.15. LCMV titro nustatymas blužnyje

III saugumo lygmens laboratorijoje pelei (C57 BL/6) į veną buvo sušvirkščiamas 200 pfu LCMV. Po 4–5 dienų, kai viruso titras būna maksimalus, blužnis steriliai buvo išimamas į šaltą PBS buferį ir perkeliama į II saugumo lygmens laboratoriją (ledo vonioje).

Blužnies ląstelių suspensijos paruošimas

Visos procedūros buvo atliekamos steriliai. Blužnis buvo pasveriamas, po to perkeliama į 2 mL Eppendorf tipo mėgintuvėlį, užpilama 1 mL terpės

(DMEM), įmetamas vienas metalinis 0.5 cm diametro rutuliukas ir audinių homogenizatoriumi iš blužnies paruošiama ląstelių suspensija (2 min. smarkiai purtoma). Gauta ląstelių suspensija buvo nuskaidrinama centrifuguojant 1000g/+4°C/10 min., o supernatantas, pamatavus tūrį, perkeliamas į naują Eppendorf tipo mėgintuvėlį. Dalis supernatanto buvo užšaldoma – 80°C temperatūroje, likusi dalis naudojama titravimui.

LCMV titravimas

LCMV titravimas buvo vykdomas su MC57 ląstelėmis 24-šulinėlių plokščiadugnėse plokštelėse. Pirmiausia, supernatantas buvo skiedžiamas į 200 µL terpės (DMEM) žingsniu 1:10 (serijinis skiedimas). Po to į kiekvieną šulinėlį kuo greičiau buvo užpilama po 200 µL 7×10^5 ląstelių/mL MC57 ląstelių suspensijos toje pačioje terpėje ir inkubuojamos +37°C 5 % CO₂ termostate 4–6 val. kol ląstelės prilips prie šulinėlio dugno. Ląstelėms prilipus, ant viršaus labai atsargiai buvo užpilama ~ 300 µL DMEM terpės su metilceliulioze (DMEM, 1 % metilceciuliozės, 5 % FCS, antibiotikai, L-glutaminas), kad ląstelės negalėtų judėti. Po 40–48 val. terpė iš šulinėlių buvo švelniai išsiurbiamą, o užaugęs vientisas ląstelių sluoksnis atsargiai dukart praplaunamas su PBS. Ląstelių sluoksnio užfiksavimui buvo pripilama po 250 µL 4 % formalino tirpalo PBS buferyje ir inkubuojama 30 min. +4°C temperatūroje. Po to ląstelės buvo permeabilizuojamos (lipidinės membranos tirpinimas) užpylus 250 µL 0.5 % Triton X-100 tirpalo PBS buferyje ir inkubuojant 20 min. (+4°C). Po to ląstelės buvo 1 kartą praplaunamos su PBS ir užblokuojamos pripilant 200 µL PBS su 10% FCS (ar bet kokios terpės su 10% FCS), inkubuojama 60–90 min.

LCMV formuojamų negatyvių kolonijų (angl. plaque) žymėjimas antikūnais

Ant užfiksotų, permeabilizuotų ir užblokuotų ląstelių buvo užpilama 200 µL terpės su žiurkės α-LCMV monokloniniais antikūnais VL-4

(dr. HP. Pircher dovana, Freiburgas, Vokietija), inkubuojama 60–90 min. Po to šulinėliai 5 kartus buvo praplaunami su PBS, vėliau užpilama α -žiurkės IgG antikūnų žymėtų PE, inkubuojama 1–2 val., šulinėliai paskutinius 5 kartus buvo praplaunami su PBS. Plokštelės buvo analizuojamos fluorescenciniu mikroskopu, skaičiuojamos negatyvios kolonijos, viruso titras perskaičiuojamas į pfu/blužniai (didžiausias titras gali būti $\sim 10^7$ pfu/blužniai). Metodika sudaryta remiantis [Battegay et al., 1991] bei [Bachmann, 1997].

2.1.16. T ląstelių stimuliavimas *in vitro*

Blužnies ląstelių suspensijos paruošimas

Visos procedūros buvo atliekamos steriliai. Pelė buvo apipurškiama 70 % etanolio tirpalu, blužnis buvo išimama steriliomis žirklutėmis bei pincetu ir perkeliama į vienkartinę Petri lėkštelę su 3–5 mL PBS buferio bei metaliniu tinkliuku. Blužnis švirkšto stūmoklio gumine dalimi buvo pertrinama per tinklėlį – gaunama ląstelių suspensija. Gauta suspensija buvo surenkama ir perkeliama į 15 mL Falcone tipo mėgintuvėlį, praplaunama lediniu PBS buferiu, ląstelės suskaičiuojamos ir paruošiama 5×10^6 ląstelių/mL suspensija PBS buferyje.

Blužnies ląstelių žymėjimas CFSE dažu

Į gautą blužnies ląstelių suspensiją buvo pridedama 0.1 mM CFSE (12 pav.). Ląstelės 10 min. buvo inkubuojamos $+37^\circ\text{C}$ 5 % CO_2 termostate 2–3 kartus per tą laiką švelniai pavartant. Ląsteles nudažius, jos greitai buvo nuplaunamos PBS buferiu su 1 % FCS (KT) arba bet kokia mitybine terpe turinčia FCS.

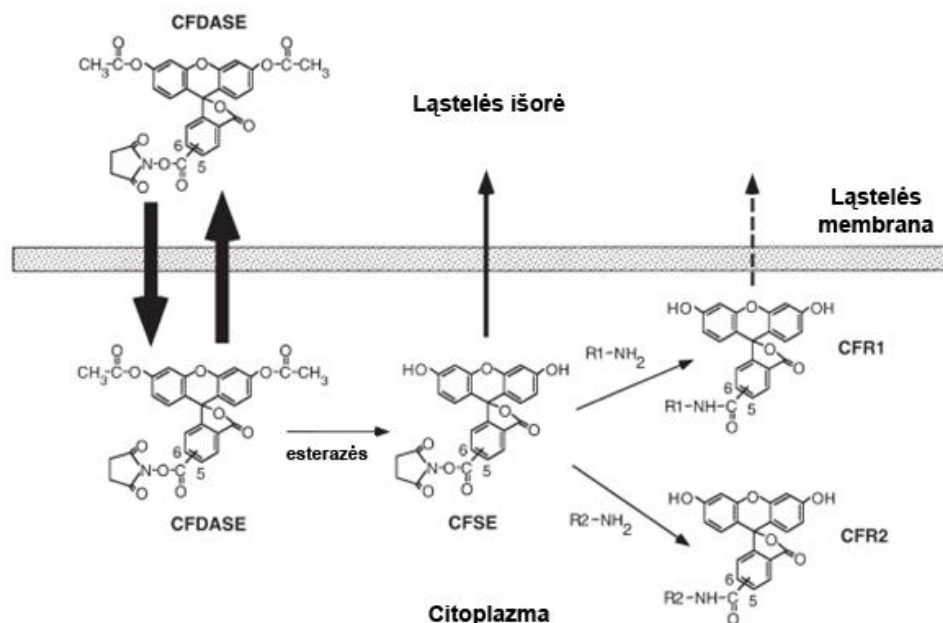
*T ląstelių stimuliavimas *in vitro**

CFSE dažytos ląstelės buvo suskaičiuojamos, paruošiama 2×10^6 ląstelių/mL suspensija IMDM terpėje su 10 % FCS ir 5×10^{-5} M β -merkaptoetanolio. Paruošta ląstelių suspensija buvo išpilstoma į 24-šulinėlių plokštes po 1 mL į šulinėlį, pridedama antigenų (pvz., 10 μg

VPD, 10^{-7} M GP33 peptido, PBS buferio (neigiamai kontrolei) arba 10^5 dendritinių ląstelių ir inkubuojama $+37^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 termostate $\sim 4\text{-}5$ paras. Kasdien ląstelės buvo stebimos šviesiniu mikroskopu.

Ląstelių analizė tėkmės citometru

Po 4-5 parų (laikas priklauso nuo naudotų antigenų) ląstelės buvo surenkamos gerai pamaišant pipetmanu ir perkeliamos į mėgintuvėlius skirtus tėkmės citometrui. Dalis ląstelių buvo pasiliekiama kontroliniams matavimams, o likusios buvo pažymimos fluorescencinę žymę turinčiais antikūnais, pvz., pelės $\alpha\text{-CD8/PE}$ ir analizuojamos tėkmės citometru: nustatoma, kuri dalis CFSE („žaliai“) nudažytų CD8^+ T ląstelių proliferuoja. Proliferuojančiomis ląstelėmis laikomos tos ląstelės, kuriose yra sumažėjęs CFSE kiekis (proliferuojančiai ląstelei kiekvieną kartą pasidalinus pusiau jis tampa vis mažiau „žalia“). Metodika sudaryta remiantis [Bachmann, 1997] ir [Freshney, 2005].



12 pav. CFSE dažo veikimo mechanizmo schema. CFSE dažas yra naudojamas gyvų ląstelių citoplazmos žymėjimui. CFDASE laisvai juda per ląstelės membraną į ląstelę ir iš jos. Ląstelės citoplazmoje esančioms esterazėms nukirpus acetato grupes CFDASE virsta į CFSE, kurio judrumas per ląstelės membraną yra daug mažesnis, o CFSE prisijungus prie citoplazmoje esančių baltymų NH_2 grupių, CFSE pasilieka citoplazmoje. CFSE dažas fluorescuoja „žaliai“. CFDASE: 5(6)-karboksi fluorescein diacetat N-sukcinimidilo esteris, CFSE: karboksi fluorescein sukcinimidilo esteris, R_1 , R_2 : bet kokie ląstelės citoplazmoje esantys baltymai. Rodyklių storumas atspindi dažo judėjimo per membraną intensyvumą [Parish, 1999].

2.1.17. Viduląstelinio IFN γ nustatymas

Pirmiausia buvo paruošiama 2×10^6 ląstelių/mL blužnies ląstelių suspensija IMDM terpėje su 10 % FCS ir 5×10^{-5} M β -merkaptoetanolio. Gauta suspensija buvo išpilstoma į 24 šulinėlių plokšteles po 1 mL į šulinėlį, pridedama 10^{-7} M GP33 peptido, pagal gamintojo rekomendacijas GolgiStop⁴ reagento (BD Pharmingen, USA) ir inkubuojama +37°C 5 % CO₂ termostate 4–6 val. arba per naktį. Po to ląstelės buvo surenkamos, pažymimos α -CD8/FITC antikūnais, nuplaunamos FACS ir PBS buferiais. Vėliau ląstelės buvo užfiksuojamos ir permeabilizuojamos pridedant 100 μ L „Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization“ (BD Pharmingen) tirpalo ir 20 min. palaikant ant ledo. Vėliau ląstelės du kartus buvo nuplaunamos plovimo buferiu „Perm/Wash“ (BD Pharmingen), pažymimos α -IFN γ /PE antikūnais, vėl nuplaunamos ir analizuojamos tėkmės citometru. Metodika sudaryta remiantis [Jung, 1993; Sander, 1993; Assenmacher, 1994; Prussin, 1995; Elson, 1995].

2.1.18. Dendritinių ląstelių iš pelių kaulų čiulpų auginimas ir brandinimas

Ląstelių iš kaulų čiulpų paruošimas

Procedūra buvo atliekama steriliai. Nuo B6 pelės galinių kojų šlaunikaulių ir blauzdikaulių labai atsargiai, nepažeidžiant kaulų, buvo nuvalomi raumenys. Po to kaulai porą minučių buvo palaikomi 96 % etanolyje ir, išgriebus į sterilią Petri lėkštelę, nudžiovinami. Kaulą laikant pincetu, steriliomis žirkklėmis buvo nukerpami abu kaulo galai, o kaulų čiulpai buvo išplaunami į 50 mL Falcone tipo mėgintuvėlį (tam buvo naudojamas švirkštas su kuo plonesne adata prisiurbtas ledinio PBS buferio). Kaulas buvo praplaunamas iš abiejų galų, o procedūra pakartojama su visais 4

⁴ GolgiStop reagentas – baltymų transporto slopiklis, į kurio sudėtį įeina monesinas. Pridėjus šio reagento į limfocitų suspensiją yra sustabdomas viduląstelinis baltymų transportas, dėl to Goldžio komplekse ima kauptis citokinai (ar kiti baltymai), o tai leidžia nustatyti citokinus sintetinančias ląsteles (tėkmės citometru) [www.biosciences.com/pharmingen/protocols].

kaulais. Surinkus ląsteles, mėgintuvėlis iki viršaus buvo pripilamas ledinio PBS ir gerai sumaišomas švelniai pipetuoiant. Gauta ląstelių suspensija buvo perkošiama per specialų filtrą (BD Biosciences, BD Falcon, Cell Strainer, 100 μm Nylon REF352360) į naują mėgintuvėlį. Ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 1100 rpm/10 min. ir suskaičiuojamos.

Dendritinių ląstelių auginimas

Dendritinių ląstelių terpėje (RPMI-1640, su merkaptoetanoliu, IL-4, GM-CSF) buvo paruošiama 5×10^5 ląstelių/mL suspensija, išpilstoma po 10 mL/ Petri lėkštei ir inkubuojama +37°C 5 % CO₂ termostate. Trečią dieną į kiekvieną lėkštelę buvo pripilama po 10 mL šviežios dendritinių ląstelių terpės. Šeštą dieną iš kiekvienos lėkštelės buvo nusiurbiamas po 10 mL terpės, ląstelės surenkamos nucentrifuguojant 1100 rpm/10 min., po to suspenduojamos į tokį pat tūrį šviežios terpės ir gauta suspensija išpilstoma po 10 mL atgal į Petri lėkšteles. Aštuntą dieną ląstelės buvo analizuojamos tėkmės citometru, ląsteles pažymėjus α-CD11c ir α I-A^b antikūnais. Taip paruoštos nesubrendusios dendritinės ląstelės buvo užšaldomos ilgalaikiam saugojimui dendritinių ląstelių terpėje su 10 % FCS ir 10 % DMSO.

Dendritinių ląstelių brandinimas

Nesubrendusios dendritinės ląstelės buvo išpilstomos į 6 šulinėlių plokšteles po 10^6 ląstelių/šulinėliui. Į dendritinių ląstelių terpę buvo pridedama antigenų (10 μg/mL VPD arba 1 μg/mL LPS teigiamai kontrolei, o PBS – neigiamai) ir ląstelės inkubuojamos 2–3 paras. Kasdien tėkmės citometru buvo analizuojama ląstelių paviršiaus žymenų raiška (CD80, CD86, CD40, CD11c). Metodika sudaryta remiantis Lutz et al., 1999.

2.1.19. Statistinė analizė

T ląstelių proliferacijos eksperimentų rezultatai buvo lyginami naudojant Student t-testą, $p < 0,05$ reikšmės buvo laikomos statistškai patikimomis. Užkrėtimo virusais eksperimentų rezultatų statistinis patikimumas buvo

skaičiuojamas Wilcoxon Mann-Whitney testo pagalba, o auglių augimo eksperimentų duomenys buvo analizuojami naudojantis LogRank testu [Machin et al., 2006].

2.2. Medžiagos

2.2.1. Darbui naudoti reagentai ir jų gamintojai

2 lentelė. Darbui naudoti reagentai ir jų gamintojai

GAMINTOJAS	REAGENTAI
Fermentas (Lietuva)	Restrikcijos endonuklezės ir 5 standartinių buferių rinkinys, Pfu ir Taq DNR polimerazės, SAP ir CIAP fosfatazės, T4 DNR ligazė ir jai skirtas buferis, dNTP mišinys, įvairūs buferiai PGR reakcijoms, DNR ir baltymų molekulinės masės standartai, X-gal, IPTG, pUC, pTZ plazmidės, 50xTAE buferis, plazmidinės DNR gryninimo rinkinys GeneJET Plasmid Miniprep Kit, DNR fragmentų gryninimo iš agarozės gelio rinkinys
Sigma Aldrich (Vokietija)	Cezio chloridas, EDTA, PEG, Tris, Tween-20, magnio sulfatas, kalcio chloridas, ličio chloridas, gliukozė, agaras, formalinas, merkaptioetanolis, stiklo rutuliukai, TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidinas), IL-4, GM CSF
Amresco (JAV)	Natrio chloridas, glicinas, natriohidrofosfatas, agarozė, LB, mielių ekstraktas, Cyclo-pure gel extraction kit rinkinys DNR grynimui iš agarozės gelio
Fluka (Šveicarija)	Vandenilio peroksidas, PMSF, glicerolis, gliukozė
Bio Rad (JAV)	Agarozė, antikūnai, NDS
Roth (Vokietija)	Amonio acetatas, mielių ekstraktas, peptonas, pieno milteliai, ampicilinas, proteazių slopiklių kokteilis, Tris
Serva (Vokietija)	Natrio azidas, NDS, PEG, akrilamidas, bisakrilamidas, amonio persulfatas
Applichem (Vokietija)	Tris, L-argininas, kalcio chloridas, magnio chloridas, NDS, galaktozė
Merk (Vokietija)	agaras, bromfenolio mėlis, izopropanolis, kalcio chloridas, metanolis, Triton X-100
Reachim (Rusija)	Kalio chloridas, gliukozė, galaktozė, kalio hidrofosfatas, natrio acetatas
Standard (Lenkija)	Natrio šarmas, acto rūgštis, sieros rūgštis
Vilniaus degtinė (Lietuva)	Etanolis
Biological industries (Izraelis)	tripsinas, geneticinas, merkaptioetanolis, penicilinas-streptomocinas, mitybinės terpės ląstelių kultūroms
BD Biosciences (JAV)	Tėkmės citometro buferiai ir mėgintuvėliai, antikūnai tėkmės citometrijai
Invitrogen, Gibco (JAV)	penicilinas-streptomocinas, L-glutaminas, mitybinės terpės ląstelių kultūroms

2.2.2. Plazmidės, oligonukleotidai, peptidai

3 lentelė. Šiame darbe naudotos plazmidės, oligonukleotidai, peptidai

PLAZMIDĖS, PEPTIDAI	PAPILDOMA INFORMACIJA	GAMINTOJAS
pUC19 klonavimo vektorius	Ap ^R ; ColE1 replikonas	Fermentas, Lietuva

pTZ57R klonavimo vektorius	Ap ^R ; Cole1 replikonas	Fermentas, Lietuva
pFX7 vektorius	Jo pagrindą sudaro pIC19H plazmidė, todėl jis gali replikuotis bakterijose ir suteikti joms atsparumą ampicilinui. Replikacijai mielėse reikalingas 2μ plazmidės fragmentas, turintis jos ARS. Mielių transformantams atsparumą formaldehidui suteikia FDH1 – <i>Candida maltosa</i> formaldehiddehidrogenazės genas. Heterologinių genų transkripciją sąlygoja hibridinis GAL10-PYK1 promotorius (sudarytas iš UDP-galaktozės epimerazės geno UAS sekos ir piruvatkinazės geno promotoriaus). GAL10 UAS atsakinga už transkripcijos indukciją, mitybinę terpę su gliukoze pakeičiant terpę su galaktoze. PGK1 yra fosfogliceratkinazės geno transkripcijos terminatorius.	Iš EGIS kolekcijos
pFGG3, pFDP1 vektoriai	Mielių vektoriai, sukonstruoti pFX7 plazmidės pagrindu, turi papildomą galaktoze indukuojamą GAL7 promotorių ir GAL7 terminatorių, tarp kurių galima įterpti antrą norimą geną.	Iš EGIS kolekcijos
GP ₃₃₋₄₁ peptidas (a.r.: KAVYNFATM)	Antigenas T ląstelių proliferacijos <i>in vitro</i> eksperimentams; H-2 ^b	Metabion (Vokietija), dr.R.Ulrich dovana

```

      Gly Ser Ser Gly      Gly Ser Ser Gly
GAT CAA GGT TCT TCA GGA GAT CTT GGT TCT TCA GGT
      TT CCA AGA AGT CCT CTA GAA CCG AGA AGT CCA CTA G

```

13 pav. GSSG-X-GSSG intarpo sekos, skirtos DNR fragmentų, koduojančių svetimus peptidus (šiuo atveju – CTL epitopus), įterpimui į HaPyV VP1 baltymą koduojantį geną. GSSG jungtukai pažymėti žydra spalva.

Muc																	
Asp	Gln	Ala	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Val	His	Asn	Val	Asn	Asp				
GAT	CAA	GCA	TCT	ACT	GCT	CCA	CCA	GTT	CAT	AAT	GTT	AAC					
	TT	CGT	AGA	TGA	CGA	GGT	GGT	CAA	GTA	TTA	CAA	TTG	CTA G				
CEA																	
Asp	Gln	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Asn	Leu	Ser	Asp			
GAT	CAA	TCT	GGT	TAT	TTA	TCT	GGT	GCT	GAT	TTA	AAT	TTA	TCA				
	TT	AGA	CCA	ATA	AAT	AGA	CCA	CGA	CTA	AAT	TTA	AAT	AGT	CTA G			
WT1																	
Asp	Gln	Ala	Arg	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	Ser	Asp				
GAT	CAA	GCT	AGA	ATG	TTT	CCT	AAT	GCT	CCA	TAC	TTA	AGT					
	TT	CGA	TCT	TAC	AAA	GGA	TTA	CGA	GGT	ATG	AAT	TCA	CTA G				
htert																	
Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Asp
GAT	CAA	GAA	GAA	ATT	TTG	GCC	AAA	TTT	TTA	CAT	TGG	TTA	ATG	TCT	GTT	TAT	
	TT	CTT	CTT	TAA	AAC	CGG	TTT	AAA	AAT	GTA	ACC	AAT	TAC	AGA	CAA	ATA	CTA G
Httert																	
Asp	Gln	Gly	Tyr	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	Leu	His	Trp	Leu	Asp				
GAT	CAA	GGT	TAC	ATT	TTG	GCC	AAG	TTT	TTG	CAT	TGG	TTG					
	TT	CCA	ATG	TAA	AAC	CGG	TTC	AAA	AAC	GTA	ACC	AAC	CTA G				
TRP2																	
Asp	Gln	Gly	Val	Phe	Val	Trp	Leu	His	Tyr	Tyr	Ser	Val	Asn	Asp			
GAT	CAA	GGT	GTT	TTT	GTT	TGG	TTG	CAT	TAT	TAT	TCT	GTT	AAC				
	TT	CCA	CAA	AAA	CAA	ACC	AAC	GTA	ATA	ATA	AGA	CAA	TTG	CTA G			
CMV																	
Asp	Gln	Gly	Val	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Val	Ala	Thr	Val	Tyr	Asp			
GAT	CAA	GGT	GTT	AAC	TTG	GTT	CCA	ATG	GTT	GCT	ACA	GTA	TAC				
	TT	CCA	CAA	TTG	AAC	CAA	GGT	TAC	CAA	CGA	TGT	CAT	ATG	CTA G			
MAGE																	
Asp	Gln	Thr	Leu	Val	His	Phe	Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Val	Gly	Asp			
GAT	CAA	ACC	TTG	GTT	CAT	TTT	TTG	TTA	TTG	AAA	TAC	GTA	GGT				
	TT	TGG	AAC	CAA	GTA	AAA	AAC	AAT	AAC	TTT	ATG	CAT	CCA	CTA G			
TMH																	
Asp	Gln	Gly	Val	Phe	Val	Trp	Leu	His	Tyr	Tyr	Ser	Val	Leu	Val	His	Phe	
GAT	CAA	GGT	GTT	TTT	GTT	TGG	TTG	CAT	TAT	TAT	TCT	GTT	TTG	GTG	CAC	TTT	
	TT	CCA	CAA	AAA	CAA	ACC	AAC	GTA	ATA	ATA	AGA	CAA	AAC	CAC	GTG	AAA	
Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	Leu	His	Trp	Leu	Asp			
TTG	TTA	TTG	AAA	TAT	ATT	TTG	GCC	AAG	TTT	TTG	CAT	TGG	TTA				
AAC	AAT	AAC	TTT	ATA	TAA	AAC	CGG	TTC	AAA	AAC	GTA	ACC	AAT	CTA G			
GP33																	
		Lys	Ala	Val	Tyr	Asp	Phe	Ala	Tyr	Met							
GAT	CAA	AAA	GCT	GTT	TAT	AAT	TTT	GCT	ACC	ATG							
	TT	TTT	CGA	CAA	ATA	TTA	AAA	CGA	TGG	TAC						CTA	

14 pav. CTL epitopų, skirtų chimerinių virusus primenančių dalelių gavimui, aminorūgščių ir nukleotidinės sekos. Epitopų sekos pažymėtos rausvame fone (viršutinė eilutė – aminorūgščių seka, apatinės – oligonukleotidinis dupleksas). Rausvų stačiakampių viršuje surašyti epitopų pavadinimai: Muc, CEA, WT1, httert, HTERT, TRP2, CMV, MAGE, TMH, GP33.

2.2.3. Fermentai, DNR ir baltymų molekulinės masės žymekliai⁵

4 lentelė. Šiame darbe naudoti fermentai, DNR ir baltymų molekulinės masės žymekliai

REAGENTAS	REAGENTO PASKIRTIS
Restrikcijos endonukleazės	DNR hidrolizė
T4 DNR ligazė	DNR susiuvimas
SAP ir CIAP fosfatazės	Fosfatų pašalinimas
Klionovo fragmentas	DNR lipnių galų pašalinimas
Taq ir Pfu polimerazės	DNR sintezė
Nukleotidų mišinys PGR reakcijoms	DNR sintezė
Fermentams specifiniai buferiai	Įvairi
DNR molekulinės masės standartai, įvairūs (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Mass Ruler™ DNA Ladder Mix)	DNR elektroforezė agarozės geliuose
Baltymų molekulinės masės žymekliai (dažyti ir nedažyti), įvairūs (Protein Ladder #SM0661, Protein Molecular Weight Marker #SM0431, Prestained Protein Molecular Weight Marker #SM0441).	Baltymų elektroforezei poliakrilamido geliuose
RNRazė	RNR pašalinimas

2.2.4. Antikūnai, citokinai

5 lentelė. Šiame darbe naudoti antikūnai, citokinai

ANTIČŪNAI	TIKSLAS, KURIAM ANTIČŪNAI BUVO NAUDOTI	GAMINTOJAS
Mouse α-HaPyV VP1 6D11, mAk	Western imunoblotas	Dr. A. Žvirblienės dovana (Biotechnologijos institutas, Lietuva)
α-mouse IgG (H+L) HRP	Western imunoblotas, IFA	BioRad arba Sigma
α-LCMV, pAk	LCMV titro skaičiavimas	Dr. H.Pircher dovana (Freiburgas, Vokietija)
biotinas α-mouse CD11c (Integrin αX) (clone M1/70)	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
FITC α-mouse I-Ab (clone AF6-120.1)	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
FITC α-mouse CD80 (B7-1) (clone 16-10A1)	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
FITC α-mouse CD86 (B7-2) (clone GL-1)	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
rat α-mouse CD40	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
PE F(ab') ₂ fragment donkey α-rat IgG (H+L)	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
FITC α-mouse CD8a (Ly-2) (clone 53-6.7),	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
PE F(ab') ₂ fragment donkey α-rat IgG (H+L)	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
FITC streptavidinas	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
PE streptavidinas	Tėkmės citometrija	BD Pharmingen
rm IL-4	Dendritinių ląstelių auginimas	Sigma-Aldrich
rm GM-CSF	Dendritinių ląstelių auginimas	Sigma-Aldrich

⁵ Visų reagentų gamintojas – Fermentas, Lietuva.

2.2.5. Ląstelės

6 lentelė. Šiame darbe naudotos ląstelės

LAŠTELĖS	TIKSLAS, KURIAM LAŠTELĖS BUVO NAUDOTOS	PASTABOS, ŠALTINIS
<i>Escherichia coli</i> DH5α F-gyrA96(Nal ^r) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17(r _k m _k ⁺) glnV44 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 [φ80dlacZ ΔM15]	Plazmidžių dauginimas, genų klonavimas	EGIS biblioteka (VU Biotechnologijos institutas, Vilnius, Lietuva). Auginti +37°C temperatūros purtyklėje arba termostate.
<i>Escherichia coli</i> GM119 F-dam-3 dcm-6 lacY1 galK2 galT22 tsx-78 glnV44 metB1 thi? fhuA? mtl?	Plazmidžių dauginimas (dam ⁻ , dcm ⁻)	EGIS biblioteka. Auginti +37°C temperatūros purtyklėje arba termostate.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH22-214 MATa/MATα his3/his3 leu2/leu2 cir ⁺	Svetimų baltymų sintezė	EGIS biblioteka. Auginti +30°C temperatūros purtyklėje arba termostate.
MCA102	Vėžio eksperimentai <i>in vivo</i>	Dr. H. Pircher dovana (Freiburgas, Vokietija). Auginti +37°C temperatūros +5% CO ₂ termostate.
MCA102-GP33 [Blohm et al., 2002]	Vėžio eksperimentai <i>in vivo</i>	Dr. H. Pircher dovana. Auginti +37°C temperatūros +5% CO ₂ termostate.
MC57 fibroblastai, H-2D ^b	LCMV titro nustatymas	Dr. H. Pircher dovana. Auginti +37°C temperatūros +5% CO ₂ termostate. Auginimo terpė: MEM +5% FCS.

2.2.6. Gyvūnai

7 lentelė. Šiame darbe naudoti gyvūnai

PELĖS	SAVYBĖS	ŠALTINIS
C57 BL/6 (B6)	H-2 D ^b	Friedrich-Löffler institutas (Vokietija)
Transgeninės P14 tg TCR (line 327) (P14) [Aichele et al., 1994]	>90% šių pelių CD8 ⁺ T ląstelių yra specifinės LCMV GP33 antigenui. Naudotos T ląstelių proliferacijos eksperimentams <i>in vitro</i>	Dr. H. Pircher dovana, padauginta Friedrich-Löffler institute (Vokietija)

2.2.7. Tirpalai, mitybinės terpės

8 lentelė. Tirpalai plazmidinės DNR gryninimui

TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS	PASTABOS
NaOH-NDS	1% NDS, 0,2 M NaOH	
NaAc (pH = 4.8)	3 M NaAc, pH = 4.8	
NaAc (pH = 5.2)	3 M NaAc, pH = 5.2	
NH ₄ Ac	7.5 M NH ₄ Ac	
RNRazės A tirpalas	10 mg/mL jaučio kasos RNRazės A	RNRazė A ištirpinama vandenyje, 10 min. paverdama vandens vonioje. Laikoma -20°C temperatūroje.

Fenolis-chloroformas	Fenolio chloroformo mišinys santykiu 1:1, prisotintas 50 mM Tris-HCl vandeniniu tirpalu, pH = 7.5–8
----------------------	---

9 lentelė. Tirpalai DNR elektroforezei

TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS	PASTABOS
AE 1X	0.04 M TrisAc, 0.2 mM EDTA, pH=8.3	Ruošiamas 50X tirpalas.
Agarozė	0.8 – 2 % agarozės TAE buferyje	
Etidžio bromidas	10 mg/mL	Dirbti su nitrilinėmis pirštinėmis.
DNR mėginių dažas	0.04 % bromfenolio mėlio, 0.04 % ksilolcianolio, 30 % glicerolio	

Tirpalai fermentinėms reakcijoms

Visoms fermentinėms reakcijoms, pvz., DNR hidrolizei, siuvimui, PGR ir kt., buvo naudojami gamintojų rekomenduojami ir kartu su fermentais pateikiami buferiniai tirpalai

10 lentelė. Tirpalai, skirti bakterijų ir mielių transformacijoms

TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS	PASTABOS
Na	5 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, pH = 7.4-8.0	Tirpalas autoklavuojamas ir laikomas +4°C temperatūroje. Prieš naudojimą atšaldomas ledo vonioje.
Ca	5 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM CaCl ₂ , pH = 7.4-8.0	Tirpalas autoklavuojamas ir laikomas +4°C temperatūroje. Prieš naudojimą atšaldomas ledo vonioje.
TE buferis	10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH = 7.6	Tirpalas autoklavuojamas
TE-LiCl	0.1 M LiCl TE buferyje	Tirpalas autoklavuojamas
TE-PEG	50% (w/v) PEGx4000 TE buferyje	Tirpalas autoklavuojamas

11 lentelė. Tirpalai, skirti VPD gryninimui iš mielių *S. cerevisiae* ląstelių

TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS	PASTABOS
DB450	10 mM Tris-HCl 450 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ 0.01 % Triton X-100, pH = 7.2	Buferis filtruojamas per 0.2µm filtrą į sterilų butelį
DB450+Arg	10 mM Tris-HCl	Buferis filtruojamas per 0.2µm filtrą

	450 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ 0.01 % Triton X-100, 0.25 M Arg, pH = 7.2	į sterilų butelį
DB150	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ 0.01 % Triton X-100, pH = 7.2	Buferis filtruojamas per 0.2µm filtrą į sterilų butelį
DB150+Arg	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ 0.01 % Triton X-100, 0.25M Arg, pH = 7.2	Buferis filtruojamas per 0.2µm filtrą į sterilų butelį
PMSF 10X	20 mM PMSF izopropanolyje	Tirpalas laikomas -20°C temperatūroje. Naudojamas 1X tirpalas. Skiedžiama į DB450+Arg buferį.
Sacharozės tirpalai	60, 55, 50, 45, 40, 30, 20 % (w/v) sacharozės DB150+Arg buferyje	Tirpalai filtruojami per 0.2µm filtrą į sterilius butelius
CsCl tirpalai	1.38, 1.35, 1.32, 1.29, 1.26 g/mL CsCl DB150 buferyje	Tirpalai filtruojami per 0.2µm filtrą į sterilius butelius

12 lentelė. Tirpalai baltymų elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis

TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS
Akrilamido/bisakrilamido tirpalas	40 % (w/v) akrilamido, 0.8 % N,N'-metilenbisakrilamido tirpalas vandenyje
4x koncentruojančio gelio buferis	0.5 M Tris-HCl tirpalas vandenyje pH = 6.8
4x frakcionuojančio gelio buferis	1.5 M Tris-HCl tirpalas vandenyje (pH = 8.8)
Amonio persulfato tirpalas	10 % (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ tirpalas vandenyje
NDS tirpalas	10 % NDS tirpalas vandenyje
Koncentruojantis gelis	3.2 % akrilamido/bisakrilamido tirpalo, 1.25 M Tris-HCl (pH = 6.8), 0.1 % amonio persulfato tirpalo, 0.1 % NDS, 0.001 % TEMED
Frakcionuojantis gelis	12 % akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido 40:0.8, 0.375 M Tris-HCl (pH = 8.8), 0.1 % NDS, 0.1 % amonio persulfato, 0.001 % TEMED.
2x baltymų dažo buferis	0.5 M Tris-HCl (pH = 6.8), 20 % (w/v) glicerolio, 4 % (w/v) NDS, 0.001 % (w/v) bromfenolio mēlio, 10 % (v/v) β-merkaptio etanolio

Tris-gly-NDS elektroforezės buferis	25 mM Tris, 0.2 M glicino, 0.1 % NDS tirpalas vandenyje pH = 8.3
Coomassie brilantinio mėlio dažymo tirpalas	50 % (v/v) etanolio, 0.25 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) acto rūgštis tirpalas vandenyje
Gelių plovimo tirpalas	5 % (v/v) acto rūgštis, 5 % etanolio tirpalas vandenyje

13 lentelė. Tirpalai Western blotui

TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS
Pernešimo buferis	25 mM Tris, 150 mM glicino, 10 % (v/v) etanolio tirpalas vandenyje
TBS buferis	20 mM Tris, 0.5 M NaCl tirpalas vandenyje (pH = 7.5)
TTBS	0.1 % Tween-20 (v/v) tirpalas TBS buferyje.
Blokavimo tirpalas	5 % lieso pieno miltelių 5 mM natrio azido tirpalas TTBS buferyje
Ryškalas	prieš pat vartojimą sumaišyti tirpalus A ir B: A: imami 2 mL paruošto tirpalo: 30 mg 4-chlor-1-naftolio tabletė (Sigma) ištirpinta į 10 mL metanolio arba etanolio (laikomas tamsiame inde). B: 5 µL 30 % H ₂ O ₂ šviežiai ištirpinta į 10 mL TBS buferio.

14 lentelė. Tirpalai imunofermenetinei analizei

TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS
Padengimo (karbonatinis) buferis	66, 67 mM NaHCO ₃ , 30 mM Na ₂ CO ₃ tirpalas vandenyje (pH = 9,4-9,5).
Plovimo buferis	10 mM Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 0,1 % Tween-20 tirpalas vandenyje (pH = 7,2).
Blokavimo buferis	3 % JSA plovimo buferyje

15 lentelė. Mitybinės terpės ir joms skirti tirpalai

TERPĖS, TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS	PASTABOS
LB	1 % peptono, 0.5 % mielių ekstrakto, 0.5 % NaCl tirpalas vandenyje	Autoklavuojama (1 atm, 40 min.)
LB agarizuota	1 % peptono, 0.5 % mielių ekstrakto, 0.5 % NaCl, 2 % agaro	Autoklavuojama (1 atm, 40 min.)

YEED	tirpalas vandenyje 1 % mielių ekstrakto, 2 % pepto no, 2 % gliukozės	Autoklavuojama (0.5 atm, 30 min.)
YEED agarizuota	tirpalas vandenyje 1 % mielių ekstrakto, 2 % pepto no, 2 % gliukozės, 2 % agaro	Autoklavuojama (0.5 atm, 30 min.)
YEPG	tirpalas vandenyje 1 % mielių ekstrakto, 2 % pepto no, 3 % galaktozės	Autoklavuojama (0.5 atm, 30 min.)
Ampicilino tirpalas	50 mg/mL ampicilino tirpalas vandenyje	Laikomas - 20°C temperatūroje. Transformuotos, atsparios ampicilinui <i>E. coli</i> ląstelės augintos LB terpėse, turinčiose 50 µg/mL ampicilino.
Formalinas	37 % formaldehido tirpalas	Mielių transformantus išsėti ant agarizuotos YEED terpės pridėjus į ją 0.3 µL/mL 37 % formaldehido tirpalo (formalino), o transformantų atrinkimui – 0.6 µL/mL formalino. Skystoje YEED terpėje atrinkti transformantai buvo auginami ir indukuojami pridėjus 0.3 µL/mL formalino.
MEM, IMDM, DMEM		Iš Gibco. Prieš naudojimą įdedama FCS ir 100U/mL penicilino/streptomicino.
RPMI-1640		Iš Gibco. Prieš naudojimą įdedama FCS ir penicilino/streptomicino.
Dendritinių ląstelių auginimo terpė	RPMI-1640 su 2 mM L-glutamino, 10 % FCS, 100U/mL penicilino/streptomicino 0.025 % (v/v) β- merkaptioetanolio, 10 ng/mL IL-4, 20 ng/mL GM-CSF.	

16 lentelė. Tirpalai darbui su ląstelių kultūromis

TIRPALO PAVADINIMAS	TIRPALO SUDĖTIS	PASTABOS
Tripsino tirpalas	0.25 % tripsino, 0.02 % EDTA	Gibco arba Biological industries
Penicilino ir streptomicino mišinys	Penicilino: 10000 u/mL, Streptomicino: 10 mg/mL	Gibco arba Biological industries
Geneticinas	100 mg/mL	Gibco
FCS		Biological industries
FACS buferis	PBS su 2 % FCS, 0.1 % NaN ₃	Laikomas +4°C
FACS EDTA	FACS buferis su	

	0.5 M EDTA	
Eritrocitų lizės tirpalas, 10X	0.155 M NH ₄ Cl 0.01 M KHCO ₃ 0.1 mM EDTA	Naudojamas 1X tirpalas.
Ląstelių fiksavimo tirpalas	4 % formalino tirpalas FACS buferyje	
L-glutaminas	200 mM	Gibco
Tripano mėlis	5 mg/mL PBS buferyje	Biological industries
PBS		Gibco

Pastaba: jeigu nenurodyta kitaip, tai buvo ruošiami vandeniniai tirpalai ir laikomi kambario temperatūroje.

2.2.8. Prietaisai

17 lentelė. Šiame darbe naudoti prietaisai

PRIETAISAS	TIKSLAS, KURIAM PRIETAISAS BUVO NAUDOTAS	GAMINTOJAS
Gilson automatiniai dozatoriai	<1 mL tūrių dozavimas	Gilson (USA)
Eppendorf stalinė mini centrifuga 5415D	Eppendorf tipo mėgintuvėlių centrifugavimas	Eppendorf (Vokietija)
Eppendorf centrifuga 5810R	15 mL, 50 mL Falcone tipo mėgintuvėlių centrifugavimas	Eppendorf
Beckman J-6B centrifuga	100-400 mL tūrių centrifugavimas, t. y. mielių biomasės surinkimas	Beckman (USA)
Beckman K80, K90 ultracentrifugos	VPD gryninimas	Beckman
Eppendorf PGR cikleris Mastercycler	PGR	Eppendorf
PGR cikleris Multigenie	PGR	Labnet (USA)
Nanodrop2000 spektrofotometras	DNR tirpalų koncentracijos nustatymas	Thermo Scientific (USA)
Gelių dokumentavimo sistema Herolab	Agarozinių elektroforegramų fotografavimas	Herolab (Vokietija)
Termostatas (iki 100°C)	Baltyminių mėginių virimas, fermentų išveiklinimas	Biosan (Latvija)
Vandenis termostatas Haake DC10	Bakterijų, mielių transformacija, temperatūrinis šokas	Thermo Scientific (USA)
Purtyklė Vortex Genie-2	Reikiamų mėginių mechaninis purtymas, maišymas	Scientific Industries (USA)
Maišyklė-vartyklė Labquake Shaker Rotisserie	Membranų inkubavimas Western blotui	Barnstead Thermolyne (USA)
Maišyklė-siūbuoklė MiniRocker MR-1	Poliakrilamidinių gelių plovimas	Biosan (Latvija)
Purtyklė-termostatas innova 44	Bakterijų, mielių auginimas skystoje terpėje, aeruojant	New Brunswick scientific (USA)
Termostatai-inkubatoriai (+30°C, +37°C)	Bakterijų, mielių auginimas Petri lėkštelėse	
Pusiau sauso blotų pernešimo aparatas	Pusiau sausas baltymų pernešimas ant membranų, Western blotas	Biometra (Vokietija)
Šaldytuvas +4°C	Tirpalų, ląstelių ir kt. laikymas	Snaigė (Lietuva)
Šaldytuvas - 20°C	Fermentų ir kt. medžiagų laikymas	Liebherr (Vokietija)
Šaldytuvas - 80°C	Ląstelių ilgalaikis saugojimas	New Brunswick scientific (USA)
Spektrofotometras TEKAN infinite M200	IFA rezultatų matavimas	TECAN (Šveicarija)
Srovės šaltinis	Elektroforezė	Biometra

Elektroforezės aparatas agarozės geliams	Elektroforezė	Biometra
Vertikalios elektroforezės aparatas paliakrilami diniams geliams	Elektroforezė	Biometra
Laminarinė spinta BABCOCK-BSH Laminar flow	Darbas su bakterijomis, mielėmis	Vokietija
Laminarinė spinta HeraSafe	Darbas su ląstelių kultūromis	Thermo Scientific (USA)
Liofilizatorius Labconco	Baltymų džiovinimas	Labconco (USA)
+37°C CO ₂ termostatas	Ląstelių kultūrų auginimas	
Fluorescencinis mikroskopas IX51, Olympus	LCMV titro nustatymas, virusus pažymint fluorescuojančiais antikūnais	Olympus
Elektroninis mikroskopas Morgagni 268 (D)	Baltymų gebėjimo formuoti VPD nustatymas	FEI (USA)
Tėkmės citometras BD FACSCalibur	Ląstelių paviršiaus žymenų nustatymas, ląstelių skaičiavimas	BD Biosciences (USA)
Kompiuteris	Duomenų rinkimas, apdorojimas	Dell (USA)

2.2.9. Programinė įranga

18 lentelė. Šiame darbe naudota programinė įranga

PROGRAMA	TIKSLAS KURIAM PROGRAMA BUVO NAUDOTA
Microsoft Office Word 2007	Duomenų rinkimas, aprašymas
Microsoft Office Excel 2007	Lentelių ir grafikų braižymas, duomenų matematinis apdorojimas, statistinė analizė
SigmaPlot 8.0	Grafikų braižymas
Origin 8.1	Statistinis duomenų apdorojimas
Cell QuestPro	Duomenų analizė dirbant tėkmės citometru BD FACS Calibur
VectorNTI Suite 9	Darbas su nukleotidinėmis sekomis
Tecan i-control 1.5	IFA duomenų rinkimas su spektrofotometru TEKAN infinite M200
Nanodrop 2000/2000c	Duomenų rinkimas spektrofotometru NanoDrop2000
Adobe PhotoShop CS3	Paveiksliukų karpymas, teksto uždėjimas
CorelDRAW X5	Darbas su grafikais, paveiksliukais

3. DARBO EIGA IR REZULTATAI

3.1. HaPyV viruso pagrindinio kapsidės baltymo VP1 – CTL epitopų nešiklio savybių tyrimas

Norint nustatyti žiurkėno poliomos viruso (HaPyV) pagrindinio kapsidės baltymo VP1 formuojamų VPD tinkamumą vakcinų gamybai, pirmiausia reikėjo išsiaiškinti ar HaPyV VP1 baltymas gali būti CTL epitopų nešikliu. Siekiant atsakyti į išsikeltą klausimą buvo konstruojami įvairius chimerinius VP1 baltymus koduojantys genai ir buvo tiriama, ar VP1 toleruoja CTL epitopų intarpus (14 pav.), ar modifikuoti VP1 baltymai gali formuoti VPD. CTL epitopai buvo įterpiami į keturias bioinformatiniais metodais parinktas VP1 baltymo vietas (19 lentelė), kurios turėjo užtikrinti CTL epitopų pateikimą VPD paviršiuje (10 pav.).

19 lentelė. HaPyV VP1 baltymo pozicijos skirtos svetimų sekų įterpimui

Intarpo pozicijos Nr.	Intarpo vieta VP1 baltyme
1	tarp 80-89 ar.
2	tarp 221-224 ar.
3	tarp 244-246 ar.
4	tarp 280-289 ar.

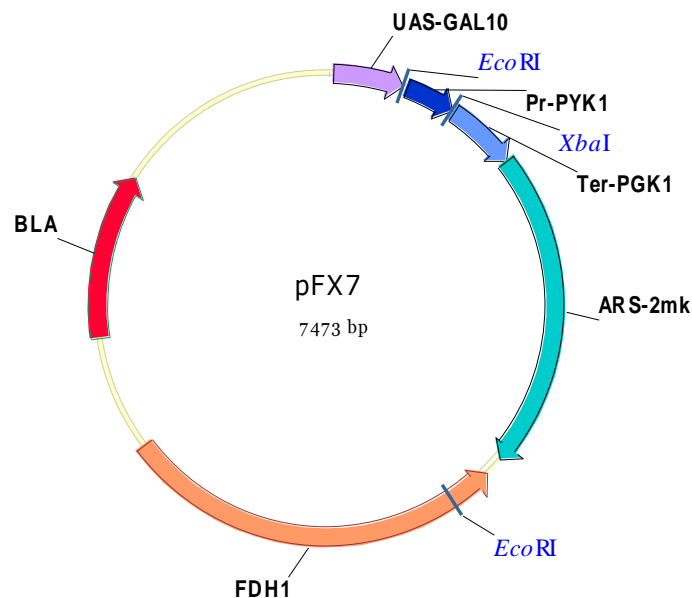
3.1.1. Chimerinių VPD su vienu, dviem, trim ir keturiais vienodais CTL epitopų intarpais kūrimas

VPD, turinčios daugiau nei vieną įterptą epitopų kopiją, turėtų stipriau stimuliuoti imuninę sistemą prieš įterptus antigenus, o tam pačiam imuniniam efektui gauti galėtų užtekti mažesnių chimerinių VPD dozių. Dėl minėtos priežasties, pirmiausia reikėjo išsiaiškinti, kurios VP1 baltymo vietos toleruoja CTL epitopų intarpus, ir kiek intarpų kopijų gali būti įterpta į vieną VP1 baltymą, nesuardant VPD formavimosi.

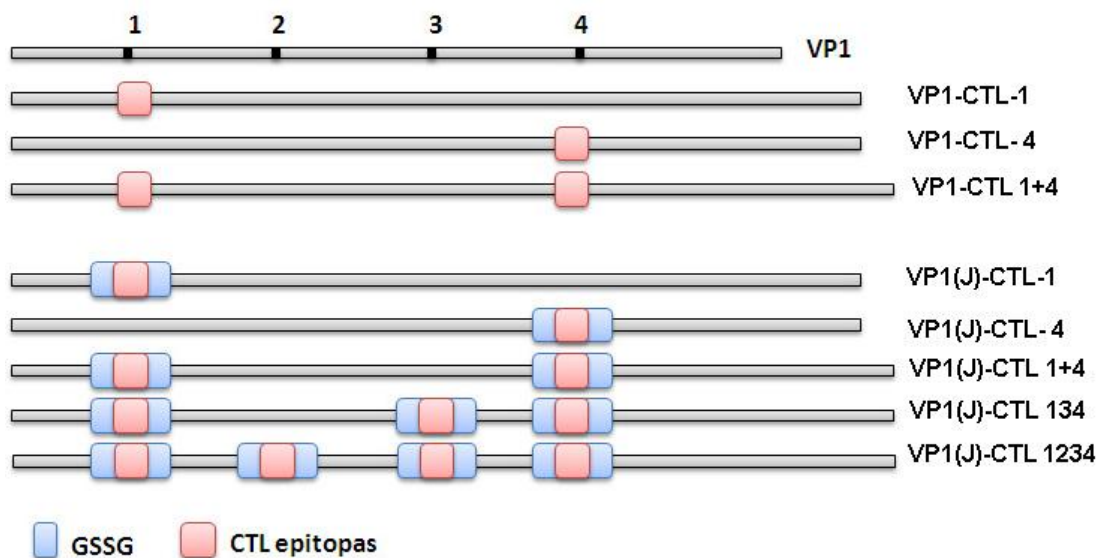
Chimerinius baltymus koduojančių genų konstravimui buvo panaudotos plazmidės, kurių pagrindą sudaro pFX7 vektorius, skirtas vieno svetimo baltymo sintezei mielėse (15 pav.). Į pFX7 vektorių tarp

promotorinės ir terminatorinės sekų buvo įterpti HaPyV natyvų ir modifikuotus VP1 baltymus koduojantys genai, kuriuose PGR metodu buvo įterpti restrikcijos endonukleazės BglII atpažinimo taikiniai, skirti svetimų sekų, koduojančių, pvz., CLT epitopus, įterpimui [Sasnauskas et al., 1999; Gedvilaite et al., 2000]. Tikslinius intarpus koduojantys oligonukleotidiniai dupleksai (14 pav.) buvo susintetinti chemiškai (Metabion) ir įterpti į pasirinktas VP1 baltymą koduojančio geno vietas.

Šiame darbo etape buvo sukonstruoti genai, skirti chimerinių VP1 baltymų su vieno, dviejų, trijų ar net keturių CTL epitopų intarpais, sintezei mielėse (16 pav.).



15 pav. pFX7 plazmidės, skirtos svetimų baltymų sintezei mielėse *S.cerevisiae*, schema. pFX7 plazmidė turi mielių 2 μ plazmidės ARS ir bakterijų ORI DNR fragmentus, kuriuose yra DNR replikacijos pradžios sekos, todėl ši plazmidė gali nepriklausomai replikuotis bakterijų ir mielių ląstelėse. Vektoriaus atrankos žymeklis mielėse yra FDH1 – formaldehid dehidrogenazės genas (rusva spalva), gautas iš mielių *Candida maltosa*, lemiantis mielių ląstelių sugebėjimą augti terpėje su formalinu. FDH1 genas koduoja nuo glutationo priklausomą formaldehido dehidrogenazę, priskiriamą ADH III fermentų klasei [Sasnauskas et al., 1999]. pFX7 plazmidės atrankos žymeklis bakterijose yra *bla* genas (raudona spalva), suteikiantis atsparumą ampicilinui. Svetimų baltymų sintezei pFX7 turi GAL10-PYK1 sudėtinį promotorių (tamsiai mėlyna spalva) ir PGK1 terminatorinę seką (šviesiai mėlyna spalva). Sudėtinį promotorių sudaro GAL10 geno reguliacinis promotoriaus UAS fragmentas (angl. *upstream activation sequence*) (violetinė spalva), indukuojamas galaktoze ir PYK1 geno, koduojančio piruvatkinazę promotoriaus fragmentas. Transkripcijos terminatoriumi panaudotas fosfliceratkinazės PGK1 geno terminatorius



16 pav. Chimerinių HaPyV VP1 baltymų su vienodais vieno, dviejų, trijų, keturių CTL epitopų tarpais (su GSSG jungtukais ir be jų), schemas. Norint nustatyti, kiek CTL epitopų tarpų toleruoja VP1 baltymas, buvo konstruojami chimerinius VP1 baltymus, kurių schemas parodytos šiame paveiksle, koduojantys genai. Pilka linija simbolizuoja VP1 baltymą, juodi taškai su skaičiais 1, 2, 3, 4 – svetimų sekų įterpimo į VP1 baltymą vietas, rausvi kvadratai – CTL epitopų tarpus, melsvi stačiakampiai – GSSG jungtukus, kurie toliau bus žymimi (J). Po vieną CTL epitopų kopiją buvo įterpiama į 1 arba 4 VP1 baltymo pozicijas. Kuriant baltymus su dviem CTL epitopų kopijomis, epitopai buvo įterpiami į 1 ir 4 (toliau bus žymima 1+4) VP1 baltymo pozicijas, su trimis – į 1, 3, 4 (toliau bus žymima 134), o su keturiomis – į 1, 2, 3, 4 (toliau bus žymima 1234) VP1 baltymo pozicijas.

Įterpimui į VP1 baltymą, buvo pasirinkti šie CTL epitopai:

- Muc – mucino 1 antigenas, ar. seka STAPPVHNV;
- CEA – karcinoembrioninis antigenas, ar. seka YLSGADLNL;
- WT1 – Vilmsio vėžio antigenas, ar. seka RMFPNAPYL;
- htert – žmogaus telomerazės atvirkštinės transkriptazės antigenas, ar. seka ILAKFLHWT.

Siekiant sumažinti įterpiamų CTL epitopų poveikį VP1 baltymo struktūrai, konformacijai bei VPD formavimuisi, iš abiejų CTL epitopo pusių buvo pridėti Gly-Ser-Ser-Gly (sutrumpintai GSSG) peptidiniai jungtukai (13 pav.). GSSG jungtukai⁶ yra sudaryti iš mažų ir judrių aminorūgščių, todėl buvo tikimasi, kad jie padės VP1 baltymo su įterptu

⁶ Plazmidžių pavadinimuose GSSG jungtuko sekų buvimas VP1 baltyme toliau bus žymimas (J) raide.

CTL epitopu struktūros ir teisingos konformacijos susidarymui, bei geriau išskels epitopus į VPD paviršių.

Į VP1 baltymo vietas koduojančias 1, 4, 1+4 ir 1+2+3+4 pozicijas (su ir be GSSG jungtukais) buvo įterptos Muc ir CEA epitopus koduojančios nukleotidinės sekos, o į 1, 4, 1+4, 1+2+3, 1+2+3+4 VP1 baltymo vietas – WT1 ir htert epitopus koduojančios nukleotidinės sekos.

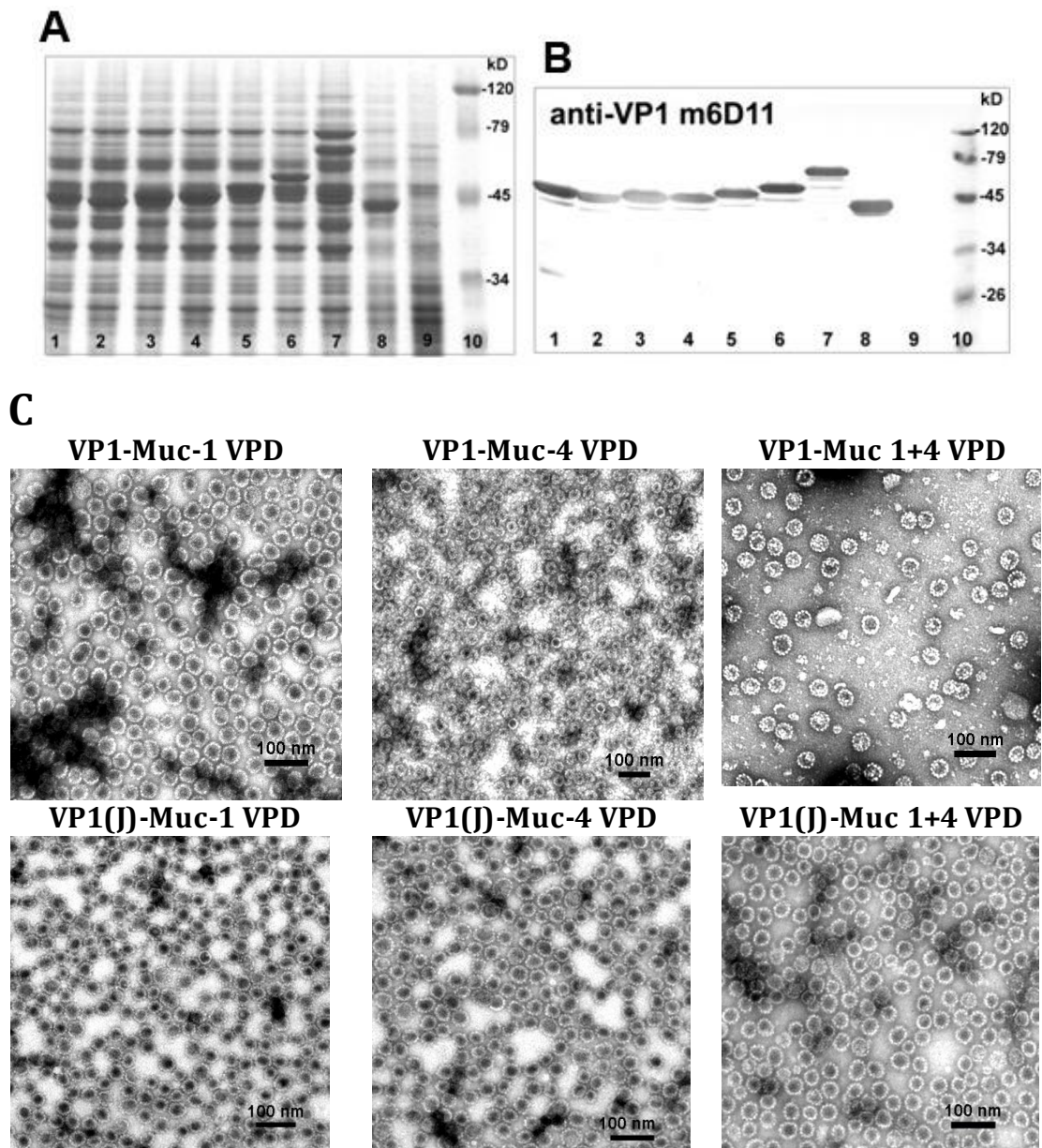
Sukonstruotų genų sekos buvo patikrintos ir patvirtintos DNR sekoskaitos metodu (Sekvenavimo centras, Biotechnologijos institutas, Lietuva). Visi plazmidžių konstravimo darbai buvo atliekami naudojant klasikinius genų inžinerijos metodus, vadovaujantis fermentų gamintojų rekomendacijomis. Gautomis plazmidėmis, koduojančiomis chimerinius baltymus, bei pFX-VP1 plazmide (koduojančia nemodifikuotą VP1 baltymą⁷) kontrolei buvo transformuotos mielių *S.cerevisiae* 214 AH22-14 kamieno ląstelės ir atrinkti reikiami transformantai.

Norint patikrinti ar sukonstruoti chimeriniai baltymai mielėse buvo sintetinami, mielių ląstelės buvo suardytos, o gauti ląstelių lizatai panaudoti Western blote naudojant α -VP1 monokloninius antikūnus (mAk) (17 pav. – pavyzdys su vienu iš epitopų).

NDS-PAGE ir Western bloto rezultatai parodė, kad mielėse buvo sintetinami visi sukonstruoti chimeriniai baltymai, tačiau jų sintezė buvo nevienodai efektyvi.

VP1-Muc (bendras VP1 chimerinių baltymų su Muc intarpais pavadinimas) chimeriniai baltymai mielių ląstelėse buvo sintetinami taip pat efektyviai, kaip ir nemodifikuotas VP1 baltymas, išskyrus baltymą su įterptomis keturiomis Muc epitopo kopijomis (19 lentelė, 17 pav.). VP1-Muc baltymų, su GSSG jungtukais ir be jų, raiškos efektyvumas buvo panašus. [Dorn et al., 2008].

⁷ Laukinio tipo VP1 baltymą koduojantis genas yra 1119 bp ilgio (GeneID 148926). VP1 baltymą sudaro 384 ar. (~42 kDa).



17 pav. Chimerinių VP1 baltymų su Muc epitopų tarpais sintezę mielių *S.cerevisiae* AH22-214 kamiene patvirtinančios nuotraukos. (A) NDS-PAGE gelio, (B) Western bloto su α -VP1 monokloniniais antikūnais 6D11 ir (C) elektroninės mikroskopijos nuotraukos. (A) ir (B) į takelius užnešti grubūs mielių ląstelių, sintetinančių chimerinius baltymus, lizatai: 1: VP1-Muc-1, 2: VP1-Muc-4, 3: VP1(J)-Muc-1, 4: VP1(J)-Muc-4, 5: VP1-Muc 1+4, 6: VP1(J)-Muc 1+4, 7: VP1(J)-Muc-1234, 8: VP1 (teigiama kontrolė) ir 9: mielių, nesintetinančių jokio svetimio baltymo lizatas (neigiama kontrolė), 10: baltymų molekulinės masės žymeklis „Protein Ladder #SM0661“ (Fermentas, Lietuva) [Dorn et al., 2008]. Juodas brūkšnylis elektroninės mikroskopijos nuotraukose atitinka 100 nm.

VP1-CEA chimerinių baltymų mielėse sintezės rezultatai buvo analogiški rezultatams, gautiems su VP1-Muc baltymais [Lawatschek et al., 2007].

Iš chimerinių VP1-WT1 baltymų itin efektyviai buvo sintetinami baltymai su vienu įterptu WT1 epitopu. Be to, skirtingai nuo VP1-Muc ir nuo VP1-CEA, VP1-WT1 baltymai su GSSG jungtukais buvo sintetinami efektyviau, negu be GSSG peptidų. Didinant įterptų epitopų skaičių, baltymų sintezės efektyvumas silpnėjo (20 lentelė).

VP1-htert baltymų raiška buvo silpniausia, lyginant su VP1-Muc, VP1-CEA, VP1-WT1 chimerinių baltymų raiška. Nepriklausomai nuo to, kiek htert epitopų buvo įterpta į VP1 baltymą, visų VP1-htert baltymų sintezės lygis buvo vienodai mažas. htert CTL epitopas geriausiai buvo toleruojamas tada, kai į VP1 baltymą buvo įterpta tik viena jo kopija. GSSG jungtuko pridėjimas jokios įtakos VP1-htert baltymų sintezės lygiui neturėjo (20 lentelė).

Patvirtinus modifikuotų VP1 baltymų sintezę mielėse, buvo tikrinama, ar jie formuoja VPD. Suardžius mielių ląsteles, gautas lizatas buvo nuskaidrintas ir grynintas centrifuguojant per sacharozės „pagalvę“. Minėto centrifugavimo metu į mėgintuvėlio dugną nusėda baltymų agregatai, baltymai, formuojantys VPD, bei pentametrus, o ląstelių pavieniai tirpūs baltymai, dalis lipidų, bei polisacharidų lieka sacharozės tirpalo viršuje. Po gryninimo per sacharozės pagalvę, chimeriniai baltymai buvo gryninami 2–3 kartus centrifuguojant per CsCl tirpalų gradientą. Išgryninti baltymai buvo sukoncentruoti. Su baltymų mėginiais buvo vykdoma baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAGE).

Išgrynintų chimerinių baltymų mėginius analizuojant elektroniniu mikroskopu buvo nustatyta, kad baltymai su vienu ir dviem CTL epitopų tarpais VPD formuoja efektyviai. Baltymų su trimis ir keturiais epitopų tarpais mėginiuose buvo aptinkamos tik pavienės VPD, didžioji dalis baltymų formavo pentametrus, kurie lipo į agregatus (baltymų neformuojančių VPD nuotraukos nepateiktos).

Chimerinių VP1 baltymų su CTL epitopų intarpais išeigos buvo mažesnės, lyginant su nemodifikuoto VP1 baltymo išeigomis, o jų gryninimas buvo sudėtingesnis – baltymai lipo prie ląstelių nuolaužų ir kiekvienoje gryninimo stadijoje buvo prarandami. GSSG jungtukų panaudojimas pastebimos įtakos VPD formavimuisi neturėjo.

VP1 baltymas Muc, CEA, WT1 CTL epitopų intarpus toleravo gerai, o htert – prasčiau. Įsitikinimui, jog svetimų CTL epitopų toleravimas priklauso nuo atitinkamo epitopo sekos, įterpimui į VP1 baltymo seką buvo pasirinkti dar penki CTL epitopai (14 pav.):

- hTERT – žmogaus telomerazės atvirkštinės transkriptazės antigenas, ar. seka ILAKFLHWT (hTERT nuo htert skiriasi epitopą supančiomis aminorūgštimis, žr. 14 pav.);
- TRP – su tirozinaze susijusio baltymo antigenas, ar. seka FVWLHYYSV;
- MAGE – melanomos antigeno antigenas, ar. seka LVHPLLLKY;
- FLU – gripo A viruso antigeninio matrikso baltymo antigenas, ar. seka GILGFVFTL;
- CMV – žmogaus citomegalo viruso matrikso fosfoproteino antigenas, ar. seka NLVPMVATV.

Išvardinti CTL epitopai į VP1 baltymą buvo įterpiami po dvi kopijas su GSSG jungtukais, nes ankstesni eksperimentai parodė, kad VP1 baltymas geriausiai toleravo vieną ar du CTL epitopų intarpus. GSSG jungtukų pridėjimas nei vienu iš anksčiau aprašytų atvejų baltymų sintezės ar gryninimo nepablogino, o WT1 epitopo atveju – pagerino.

Visų naujai sukurtų VP1-hTERT, VP1-TRP, VP1-MAGE, VP1-FLU, VP1-CMV chimerinių baltymų raiškos lygis buvo žemesnis, lyginant su VP1-Muc, VP1-CEA, VP1-WT1 bei su nemodifikuoto VP1 baltymo raiškos lygiu. Silpnesnės baltymų sintezės paaiškinimas galėtų būti šių baltymų netoleravimas mielių ląstelėse: jei tam tikros baltymų dalys įgavo

neteisingą konformaciją, baltymai galėjo pradėti agreguotis ir mielių ląstelėse buvo degraduojami.

Visi šiame darbo etape išgryninti chimeriniai VP1 baltymai su įterptais CTL peptidais buvo aptinkami 1.26 – 1.30 g/mL CsCl gradiento frakcijose (nemodifikuoto VP1 baltymo plūduriavimo tankis 1.30 – 1.32 g/mL). Mažesnio tankio CsCl frakcijose esantys baltymai tolesniam gryninimui nebuvo atrenkami. Baltymų, esančių tik tam tikro tankio CsCl tirpaluose, atrinkimas tolimesniems gryninimo etapams, drastiškai sumažino galutines išgrynintų baltymų išeigas, tačiau leido tikėtis, kad išgryninti chimeriniai baltymai formuoja VPD.

Išgrynintų baltymų mėginių analizė elektroniniu mikroskopu parodė, kad jie formavo VPD, tačiau ne taip efektyviai kaip nemodifikuoti VP1 baltymai. Nors visi baltymai buvo gryninami iš tokio pat mielių biomasės kiekio (~ 20 g), išgrynintų baltymų išeigos buvo tik 5–7 mg, o kai kurių, pvz., VP1-FLU, tik 3 mg (20 lentelė). Išgryninto nemodifikuoto VP1 baltymo išeiga buvo 20 mg. Visi baltymai buvo gryninami iš tokio pat mielių biomasės kiekio (~ 20 g). VP1- hTERT, VP1-TRP, VP1-MAGE, VP1-FLU, VP1-CMV chimerinių baltymų gryninimo metu buvo susidurta su sunkumais: chimeriniai baltymai, lyginant su nemodifikuotu VP1 baltymu, daug prasčiau tirpo, buvo linkę agreguotis, labai lipo prie ląstelių nuolaužų. Akivaizdu, kad agregaciją sukėlė į VP1 baltymą įterptos papildomos sekos. CTL epitopai baltymuose, iš kurių šie epitopai yra kilę, dažnai randami ne atitinkamų baltymų paviršiuje, o viduje. Susilpnėjusiam chimerinių baltymų sintezės lygiui mielių ląstelėse, o kartu ir sumažėjusioms išgrynintų baltymų išeigoms įtakos turėjo konkretaus įterpto epitopo aminorūgščių seka – chimeriniai baltymai su vienais įterptais epitopais (Muc, CEA, WT1) buvo sintetinami ir gryninomi taip pat puikiai, kaip ir su nemodifikuotas VP1 baltymas, o su kitais epitopais (htert, TRP, FLU) – išgrynintų baltymų išeigos buvo ženkliai mažesnės.

20 lentelė. Sukonstruotų chimerinių VP1 baltymų su CTL epitopų intarpais savybių apibendrinimas

CTL epitopo pavadinimas	Chimerinio baltymo pavadinimas	VP1 baltymo pozicijos į kurias buvo įterpiami CTL epitopai				GSSG jungtuko panaudojimas	Chimerinio baltymo sintezės efektyvumas	VPD formavimas	Išgrynintų chimerinių baltymų išėigos, mg
		1	2	3	4				
Muc	VP1-Muc-1	+				-	puikus	puikus	17
	VP1(J)-Muc-1	+				+	puikus	puikus	20
	VP1-Muc-4				+	-	puikus	puikus	15
	VP1(J)-Muc-4				+	+	puikus	puikus	16
	VP1-Muc 1+4	+			+	-	puikus	puikus	15
	VP1(J)-Muc 1+4	+			+	+	puikus	puikus	15
	VP1(J)-Muc 1234	+	+	+	+	+	geras	prastas	~1
CEA	VP1-CEA-1	+				-	puikus	puikus	16
	VP1(J)-CEA-1	+				+	puikus	puikus	18
	VP1-CEA-4				+	-	puikus	puikus	15
	VP1(J)-CEA-4				+	+	puikus	puikus	17
	VP1-CEA 1+4	+			+	-	puikus	puikus	14
	VP1(J)-CEA 1+4	+			+	+	puikus	puikus	12
	VP1(J)-CEA 1234	+	+	+	+	+	geras	prastas	~1
WT1	VP1-WT1-1	+				-	geras	puikus	18
	VP1(J)-WT1-1	+				+	puikus	puikus	20
	VP1-WT1-4				+	-	geras	puikus	17
	VP1(J)-WT1-4				+	+	puikus	puikus	19
	VP1-WT1 1+4	+			+	-	geras	geras	13
	VP1(J)-WT 1+4	+			+	+	geras	geras	14
	VP1(J)-WT1 123	+		+	+	+	prastas	geras	5
	VP1(J)-WT1 1234	+	+	+	+	+	prastas	prastas	~1
Htert	VP1-htert-1	+				-	prastas	geras	5
	VP1(J)-htert-1	+				+	prastas	geras	6
	VP1-htert-4				+	-	prastas	geras	5
	VP1(J)-htert-4				+	+	prastas	geras	6
	VP1-htert 1+4	+			+	-	prastas	geras	4
	VP1(J)-htert 1+4	+			+	+	prastas	geras	4
	VP1(J)-htert 123	+		+	+	+	prastas	prastas	3
	VP1(J)-htert 1234	+	+	+	+	+	prastas	prastas	<1
TRP2	VP1(J)-TRP2 1+4	+			+	+	prastas	geras	3
MAGE	VP1(J)-MAGE 1+4	+			+	+	prastas	geras	6
hTERT	VP1(J)-Htert 1+4	+			+	+	prastas	geras	5
FLU	VP1(J)-FLU 1+4	+			+	+	prastas	geras	3
CMV	VP1(J)-CMV 1+4	+			+	+	prastas	geras	7

Grafoje „VP1 baltymo pozicijos į kurias buvo įterpiami CTL epitopai“ pliuso ženklu yra pažymėtos VP1 baltymo pozicijos, į kurias buvo įterpti CTL epitopai. Grafoje „GSSG jungtukų panaudojimas“ pliuso ženklas reiškia, kad įterpiamas CTL epitopas iš abiejų epitopo pusių buvo apsuptas Gly-Ser-Ser-Gly jungtuko sekomis. „Chimerinio baltymo sintezės efektyvumas“: puikus – chimerinio baltymo sintezė tokia pat efektyvi kaip ir nemodifikuoto VP1 baltymo, gera – chimerinio baltymo sintezė iki 20 % prastesnė už nemodifikuoto VP1 baltymo, prasta – chimerinio baltymo sintezė >50 % prastesnė už nemodifikuoto VP1 baltymo. „VPD formavimas“: „puikus“ – chimerinis baltymas formuoja nemodifikuotam VP1 baltymui būdingas 45 nm skersmens VPD, mėginyje nėra mažesnių VPD ar pentamerų, VPD labai daug, „geras“ – chimerinis baltymas formuoja nemodifikuotam VP1 baltymui būdingas 45 nm VPD, mėginyje nėra mažesnių VPD ar pentamerų, „prastas“ – chimerinis baltymas formuoja nemodifikuotam VP1 baltymui būdingas 45 nm VPD, bet jų labai mažai, mėginyje taip pat yra ir mažesnių VPD ar pentamerų. „Išgrynintų baltymų išėigos“ – nusako kiek mg chimerinių baltymų buvo išgryninta iš 20 g šlapios mielių biomasės, palyginimui – VP1 baltymo buvo išgryninama 20 mg.

Paskaičiavus ir palyginus šiame darbo etape naudotų CTL epitopų hidropatiškumo indeksus paaiškėjo, kad VP1 baltymas geriau toleruoja hidrofiliškoms savybėmis pasižyminčių peptidų intarpus (21 lentelė). Kuo hidrofobiškesnis peptidas buvo įterpiamas į VP1 baltymą-nešiklį, tuo mažesnės buvo išgrynintų baltymų išeigos.

21 lentelė. CTL epitopų – peptidų hidropatiškumo indeksų palyginimas

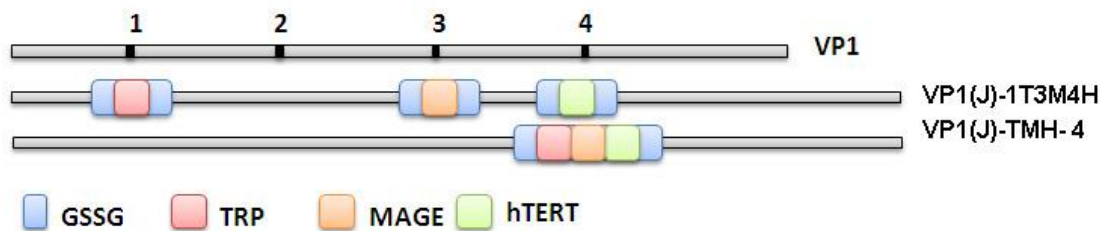
	CTL epitopo pavadinimas	CTL epitopo aminorūgščių seka	CTL epitopo hidropatiškumo indeksas*
1	Muc	STAPPVHNV	-0.133
2	CEA	YLSGADLNL	0.411
3	WT1	RMFPNAPYL	-0.244
4	htert	ILAKFLHWT	0.889
5	MAGE	LVHPLLLKY	1.044
6	CMV	NLVPMVATV	1.589
7	TRP	FVWLHYYSV	0.833
8	FLU	GILGFVFTL	2.267

* - hidropatiškumo indeksas parodo peptido hidrofiliškas/hidrofobias savybes. Kuo šis indeksas didesnis, tuo peptidas yra labiau hidrofobinis (lentelėje raudona spalva), o kuo mažesnis – tuo labiau hidrofilinis (žalia spalva). Hidropatiškumo indeksas svarbus formuojantis baltymui, nes hidrofiliškos aminorūgštys stengiasi atsiderinti jo paviršiuje, o hidrofobinės – pasislėpti viduje. Hidropatiškumo indeksas buvo paskaičiuotas naudojantis Šveicarijos bioinformatikos instituto ExPaSy ProtParam įrankiu [<http://expasy.org/tools/protparam.html>].

Šio skyriaus eksperimentais buvo parodyta ir patvirtinta chimerinių VP1 baltymų su vienu, dviem, trimis ar keturiomis CTL epitopų kopijomis sintezė mielėse *S. cerevisiae*. Nustatyta, kad chimerinių VP1 baltymų su vienu, o kai kuriais atvejais su dviem įterptais CTL epitopais sintezės lygis buvo toks pat aukštas, kaip ir nemodifikuoto VP1 baltymo. Trijų ir keturių epitopų įterpimas jau stipriau įtakojo VPD formavimąsi ir ypač išgrynintų baltymų išeigas – kuo daugiau CTL epitopų buvo įterpta į VP1 baltymą, tuo mažesnės buvo išgrynintų baltymų išeigos. VP1 baltymą efektyviai galima naudoti vieno, dviejų, retais atvejais trijų, bet ne daugiau CTL epitopų kopijų nešikliu.

3.1.2. Chimerinių VPD, turinčių trijų skirtingų CTL epitopų intarpus, kūrimas

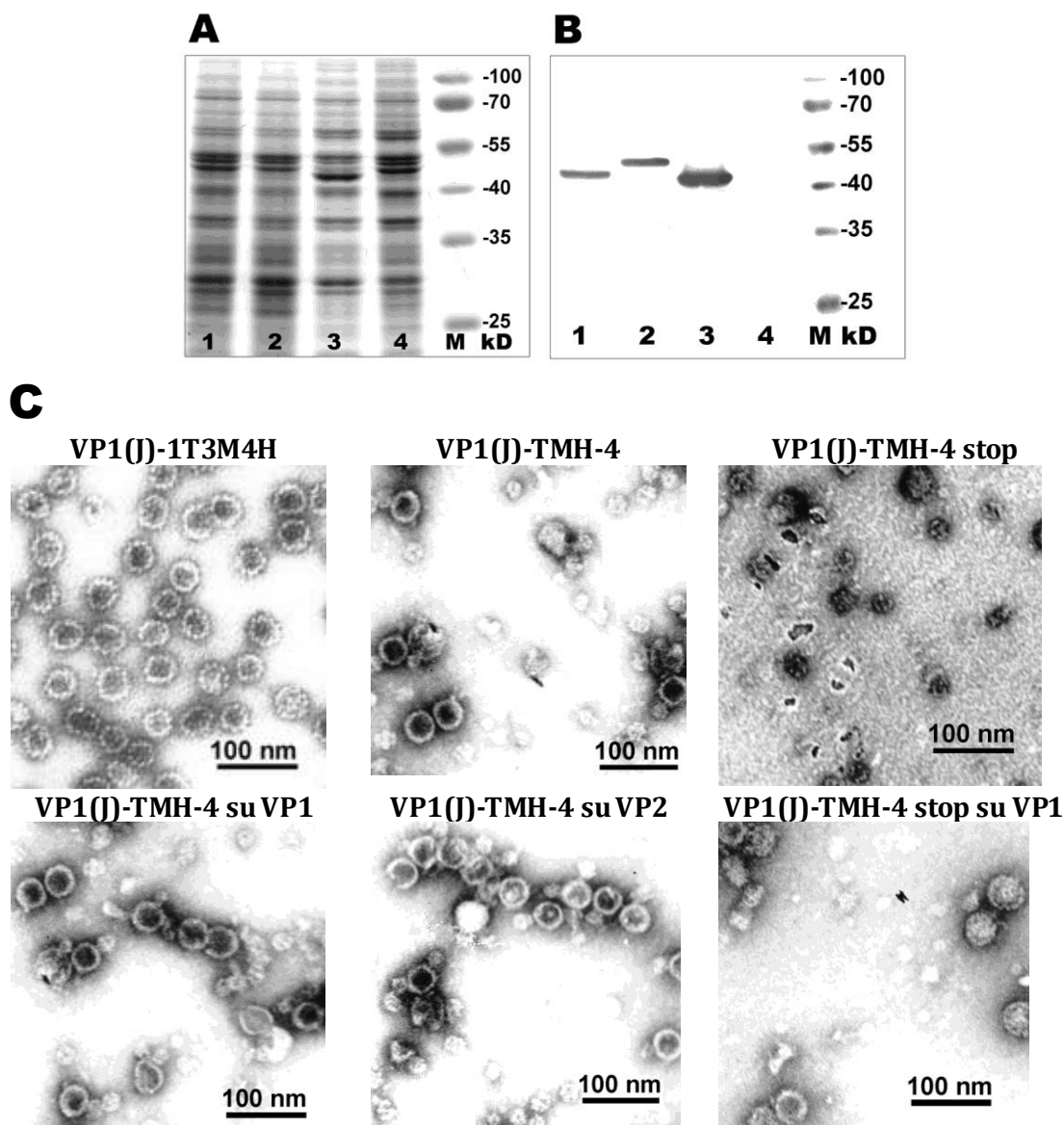
Vėžinės ląstelės savo paviršiuje turi daug skirtingų CTL epitopų (TAA antigenų), kurie nuolat mutuoja, kinta, nes slepiasi nuo imuninės sistemos atpažinimo. Norint, kad vėžinėms ląstelėms būtų sunkiau išvengti imuninės sistemos atpažinimo, vienu metu reikėtų aktyvinti kuo daugiau skirtingo specifškumo CTL ląstelių.



18 pav. Chimerinių HaPyV VP1 baltymų su trimis skirtingais CTL epitopų intarpais schemas. Pilkos spalvos juostos – VP1 baltymas; juodi kvadratai – galimos CTL epitopų įterpimo vietos į HaPyV VP1 baltymą (1 – tarp 80-89ar., 3 – 244-246ar., 4 – tarp 288-295ar.); žydras stačiakampis – GSSG jungtukas; spalvoti kvadratai – CTL epitopų intarpai. Dešinėje pusėje pateikti baltymų pavadinimai.

Baltymai, sudaryti iš kelių ar keliolikos vėžinių antigenų, sujungtų į vieną polipeptidą, turėtų efektyviau stimuliuoti citotoksinių T limfocitų atsaką ir padidindami tikimybę aptikti vėžines ląsteles, turinčias tikslinius antigenus, bei jas sunaikinti. Deja, dauguma CTL epitopų yra sudaryti iš hidrofobinių aminorūgščių, o tokius dirbtinius baltymus sunku susintetinti bei išgryninti. Šiame darbo etape mes pabandėme į tiriamą HaPyV VP1 baltymą įterpti tris skirtingus CTL antigenus: TRP, MAGE ir hTERT. Minėti peptidai po vieną buvo įterpti į tris VP1 baltymo pozicijas (chimerinis baltymas pagal pirmąsias intarpų raides ir įterpimo pozicijų numerius pavadintas VP1(J)-1T3M4H⁸. Kitu atveju, trys peptidai buvo sulieti į vieną trigubą peptidą, kuris buvo įterptas į 4 VP1 baltymo poziciją (chimerinis baltymas pavadintas VP1(J)-TMH-4) (18 pav.) [Aleksaite ir Gedvilaite, 2006]. Abiem atvejais peptidai buvo įterpiami su GSSG jungtukais.

⁸ Baltymo pavadinime skaičiai reiškia VP1 baltymo pozicijų numerius, o raidės – pirmosios įterpto epitopo pavadinimo raidės.



19 pav. Chimerinių VP1 baltymų su trimis skirtingais CTL epitopais (TRP, MAGE, hTERT) sintezę mielėse patvirtinančios nuotraukos. (A) – NDS-PAGE gelis, (B) – Western blotas su α -VP1 antikūnais, (C) – VPD elektroninės mikroskopijos nuotraukos. Takeliuose – 1: mielių ląstelių, sintetinančių VP1(J)-1T3M4H baltymą lizatas, 2: mielių ląstelių, sintetinančių VP1(J)-TMH-4 baltymą lizatas, 3: mielių ląstelių, sintetinančių VP1 baltymą lizatas, 4: mielių ląstelių, nesintetinančių svetimų baltymų lizatas, M: dažytas baltymų molekulinės masės žymeklis (#SM0671, Fermentas, Lietuva).

Sukonstruotų chimerinių baltymų VP1(J)-1T3M4H ir VP1(J)-TMH-4 raiška mielių ląstelėse buvo silpnesnė nei nemodifikuoto VP1 baltymo. Abu baltymai iš mielių ląstelių buvo išgryninti, tačiau išgrynintų baltymų išeigos buvo itin mažos (2-4 mg iš 20g mielių biomasės), o baltymai mažiau tirpūs nei VP1. Baltymų mėginių elektroninis mikroskopavimas parodė, kad abu VP1(J)-1T3M4H bei VP1(J)-TMH-4 chimeriniai baltymai

formavo VPD (19 pav.). VP1(J)-1T3M4H baltymo formuojamos VPD buvo panašios į VP1 formuojamas VPD, o VP1(J)-TMH-4 VPD buvo nevienodo dydžio (didelė dalis VPD buvo mažesnės nei 45 nm skersmens, kuris būdingas poliomos virusų VPD).

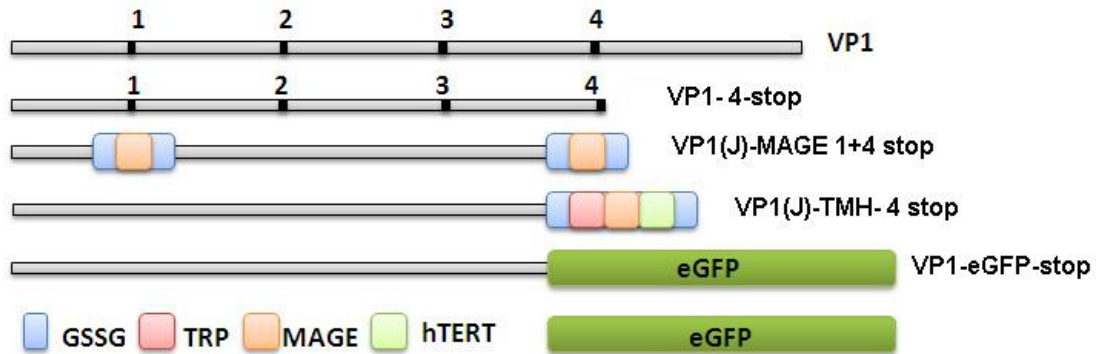
Palyginus minėtus du baltymus pagal sintezės lygį, gryninimo lengvumą, išgrynintų baltymų kiekius bei VPD kokybę, paaiškėjo, kad norint sukurti VPD su keliais skirtingais intarpais, palankiau buvo tris skirtingus CTL epitopus įterpti po vieną į skirtingas VP1 baltymo vietas, negu sulietą iš kelių CTL epitopų ilgą peptidą į vieną iš VP1 baltymo pozicijų.

3.1.3. Chimerinių HaPyV VP1 baltymų su sutrumpintu C-galu kūrimas

Vienas iš kriterijų, parenkant keturias anksčiau minėtas svetimų peptidų įterpimo į HaPyV VP1 baltymą pozicijas buvo šių vietų imonogeniškumas. Be jau minėtų keturių pozicijų (18 lentelė, 10 pav.) yra nustatyta dar viena imunogeniška VP1 vieta – tai C-galinė baltymo dalis, kuri dažnai yra atsakinga už kryžmines imunines reakcijas tarp įvairių poliomos virusų. VP1 baltymo C-galinės dalies pašalinimas galėtų sumažinti nepageidaujamas poliomos virusų kapsidžių kryžmines imunines reakcijas, o svetimų peptidų įterpimas į šią imunogenišką C-galinę baltymo dalį galėtų užtikrinti stiprų imuninį atsaką prieš įterptą peptidą.

Tyrinėjant VP1 baltymo sugebėjimą formuoti VPD ir kas 10–12 ar. trumpinant jo C-galą iki 4 pozicijos (288-295 ar.), buvo nustatyta, kad C-galo iškritos įtakoja VPD susidarymą [Gedvilaite et al., 2006]. Įdomu, kad VPD efektyviai formavo tokie VP1 baltymai, kurių C-galinė dalis buvo pašalinta net nuo 384 iki 307 aminorūgšties. Nustačius, kad VP1 baltymas formuoja VPD net ir be C-galinės dalies, buvo nutarta CTL peptidus prijungti prie VP1 baltymų sutrumpintų iki 4 pozicijos (tokį baltymą

pavadinome VP1-4-stop). Buvo tikimasi, kad prijungti CTL epitopai laisvai kabės VP1-4-stop baltymo C-gale ir netrukdytų chimerinio baltymo teisingos konformacijos susidarymui.



20 pav. Chimerinių VP1 pagrindu sukurtų baltymų su modifikuotu baltymo C-galu schemos. VP1 baltymo C-galas buvo modifikuotas jį sutrumpinus iki 4 VP1 baltymo pozicijos. Pilkos spalvos juostos – VP1 baltymas; juodi kvadratai – galimos CTL epitopų įterpimo vietos į HaPyV VP1 baltymą (1 – tarp 80-89ar., 3 – 244-246ar., 4 – tarp 288-295ar.); žydras stačiakampis – GSSG jungtukas; spalvoti kvadratai – CTL epitopų intarpai; tamsiai žalias stačiakampis – eGFP baltymas.

Šiame darbo etape buvo sukonstruoti chimeriniai VP1 baltymai (20 pav.), už 4-osios VP1 baltymo pozicijos neturintys C-galinės baltymo dalies ir su prijungtomis bei baltymo C-gale „kabančiomis“ skirtingo ilgio svetimomis sekomis: VP1(J)-MAGE 1+4-stop⁹ – su vienu CTL epitopu (9 ar.), VP1(J)-TMH-4-stop – su trimis sulietais CTL epitopais (27 ar.), VP1-eGFP-stop – su visu eGFP baltymu (238 ar.).

Tik ~10 % išgryninto VP1(J)-MAGE 1+4-stop baltymo formavo VPD, likęs baltymas, analizuojant elektroniniu mikroskopu buvo aptinkamas pentametrų (VPD subvienetų) pavidalu (22 pav.).

Chimerinio VP1(J)-TMH-4-stop baltymo, turinčio prijungtą trijų sulietų CTL epitopų (27 ar.) peptidą, raiška mielių ląstelėse buvo labai silpna, gryninimas sudėtingas – baltymas buvo netirpus, linkęs agreguotis bei lipti prie mielių ląstelių nuolaužų. VP1(J)-TMH-4-stop baltymo mėginių

⁹ “Stop“ baltymų pavadinimuose reiškia, kad VP1 baltymas neturi C-galo srities žemiau 4 pozicijos (į baltymą koduojantį geną įvestas stop kodonas).

stebėjimas elektroniniu mikroskopu parodė, kad mėginyje dominavo pentametrų agregatai, retai buvo aptinkamos ir įvairaus skersmens VPD.

Prie VP1-4-stop baltymo prijungus visą eGFP baltymą, buvo nustatyta, kad toks chimerinis VP1-eGFP-4-stop baltymas mielėse buvo sintetinamas (NDS-PAGE, Western blotas). VP1-eGFP-4-stop baltymo gryninimo metu buvo labai lengva sekti šio chimerinio baltymo buvimo vietą – mėgintuvėliuose jis švytėjo intensyvia žalia spalva. Gryninimo per CsCl gradientą metu, VP1-eGFP-4-stop baltymas buvo rastas 1,26 g/mL tankio CsCl frakcijose (palyginimui natyvaus VP1 formuojamos VPD randamos ~1,30 g/mL tankio CsCl frakcijose). VP1-eGFP-4-stop baltymas buvo mažiau tirpus nei nemodifikuotas VP1 baltymas ir buvo linkęs formuoti smėlį primenančius agregatus. Išgryninto baltymo mėginių analizė elektroniniu mikroskopu parodė, kad didžioji VP1-eGFP-4-stop baltymo dalis (95%) neformavo VPD, o buvo aptinkama pentametrų ir pentamerų agregatų pavidalu.

VP1 baltymas sutrumpintas iki 4 pozicijos (VP1-4-stop) gali būti naudojamas kai kurių ilgesnių peptidų prijungimui (kaip, pvz., viso eGFP baltymo, kuris buvo labai imunogeniškas gaminant monokloninius antikūnus prieš eGFP). CTL epitopų prijungimui VP1-4-stop nešiklio naudojimas nepasiteisino.

3.1.4. Mozaikinių VPD kūrimas

Mozaikinėmis VPD yra vadinamos į virusus panašios dalelės sudarytos iš daugiau nei vienos rūšies kapsidės baltymų. Mūsų laboratorijoje buvo parodyta, kad prie chimerinių VP1 baltymų su įterptu į 4 VP1 poziciją eGFP baltymu, pridėjus nemodifikuotų VP1, VP2 ar VP3 baltymų „pagalbininkų“ pagerėja chimerinių baltymų sintezė ir išgrynintų VPD išeigos. Vienoje ląstelėje sintetinant VP1-eGFP su VP1 baltymu, mozaikinių VPD išeiga pagerėjo apie ~5 kartus, o pridėjus VP2 ar VP3

baltymų – apie du kartus [neskelbti EGIS duomenys]. Nemodifikuotų viruso kapsidės struktūrinių baltymų „pagalbininkų“ pridėjimas galėtų būti svarbus ne tik VPD formavimosi palengvinimui ar chimerinių baltymų sintezės pagerinimui, bet ir VPD prisitvirtinimui prie ląstelių receptorių ar patekimui į dendritines ląsteles. Be to, į VPD įjungtas VP2 baltymas galėtų tarnauti papildomų epitopų nešikliu.

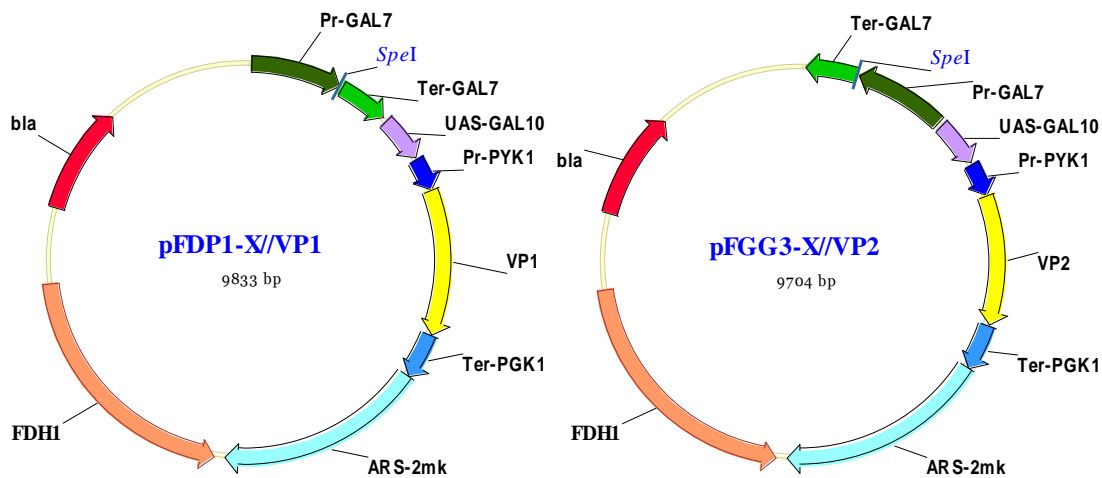
Šiame darbo etape, tikintis palengvinti chimerinių VP1 baltymų su įterptais CTL epitopais gryninimą ir pagerinti jų formuojamų VPD išėigas, buvo panaudotos plazmidės, leidžiančios vienoje ląstelėje kartu su chimeriniu VP1 baltymu sintetinti ir nemodifikuotus VP1 arba VP2 baltymus, tikintis chimerinių-mozaikinių VPD susidarymo. Buvo pasirinkti šie chimeriniai baltymai: VP1(J)-MAGE 1+4¹⁰ bei VP1(J)-CMV 1+4 (įterpti du trumpi CTL epitopai, silpna chimerinių baltymų raiška, nedidelės išgrynintų baltymų išėigos), VP1(J)-1T3M4H (įterpti trys CTL epitopai, silpna chimerinių baltymų sintezė) ir VP1(J)-TMH-4 (įterptas ilgas peptidas iš sujungtų trijų CTL epitopų, silpna chimerinių baltymų sintezė). VP1(J)-MAGE 1+4, VP1(J)-CMV 1+4 ir VP1(J)-1T3M4H baltymai buvo sintetunami kartu su VP1 baltymu, o VP1(J)-TMH-4 – su VP1 arba su VP2 baltymais (atskirai).

Paraleliai buvo sukonstruotos plazmidės, leidžiančios vienoje ląstelėje sintetinti chimerinius VP1 baltymus su sutrumpintu C-galu (VP1(J)-MAGE 1+4-stop¹¹ – su vienu CTL epitopu (9 ar.), VP1(J)-TMH-4-stop – su trimis sulietais CTL epitopais (27 ar.), VP1-eGFP-stop – su visu eGFP baltymu (238 ar.)) kartu su nemodifikuotais „pagalbiniais“ VP1 baltymais, tikintis, kad mozaikinėse VPD „pagalbinis“ VP1 baltymas pagerins šių baltymų VPD formavimosi efektyvumą ir išėigas.

¹⁰ VP1(J)-MAGE 1+4 baltymo pavadinimo paaiškinimas: (J) reiškia GSSG jungtuko buvimą, po to seka intarpo pavadinimas (čia MAGE), o gale – pozicijų, į kurias intarpas buvo įdėtas (čia 1 ir 4 abi kartu) numeris.

¹¹ „Stop“ baltymų pavadinimuose reiškia, kad VP1 baltymas neturi C-galo srities žemiau 4 pozicijos (į baltymą koduojantį geną įvestas stop kodonas).

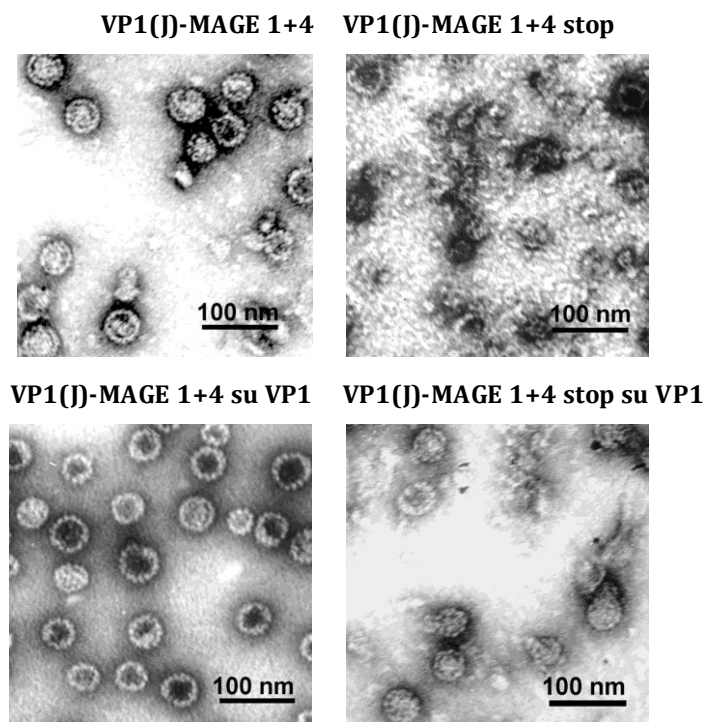
Mozaikinių VPD gavimui mielėse *S. cerevisiae* buvo naudojamos pFDP1-X//VP1, pFGG3-X//VP2 plazmidės (20 pav.). Minėtos plazmidės yra sukonstruotos pFX7 pagrindu (15 pav.) ir turi papildomą galaktoze indukuojamą GAL7 promotorių bei GAL7 terminatorių, tarp kurių galima įterpti antrą svetimą geną, kurio raišką norime gauti mielėse (šiuo atveju genas koduojančius chimerinius VP1 baltymus). Tarp GAL10 PYK1 promotoriaus ir PGK1 terminatoriaus pFDP1-X//VP1 plazmidėje buvo įterptas VP1 baltymo genas, o pFGG3-X//VP2 plazmidėje – VP2 baltymo genas. Išskirtinė šių plazmidžių savybė yra ta, kad promotorių stiprumas pFGG3 plazmidėje skiriasi: nuo GAL7 geno promotoriaus indukuojamų genų raiška yra stipresnė nei nuo GAL10 PYK1 promotoriaus. Promotorių stiprumas yra panašus jiems esant atskirose plazmidėse.



21 pav. pFDP1-X//VP1, pFGG3-X//VP2 plazmidžių schemos. pFDP1 ir pFGG3 plazmidės yra sukurtos pFX7 plazmidės pagrindu. Abi plazmidės yra skirtos dviejų baltymų sintezei mielių ląstelėse vienu metu. X – bet koks genas, kurio koduojamą baltymą norime kartu sintetinti su VP1 (kairėje) ar VP2 (dešinėje) baltymais.

Gryninant CTL epitopų intarpų turinčius chimerinius VP1 baltymus, susintetintus mielių ląstelėse drauge su nemodifikuotu VP1 „pagalbininku“, buvo pastebėta, kad chimerinių baltymų gryninimas labai palengvėjo. Mozaikinės VPD, lyginant su chimerinėmis VPD sintetinėmis be baltymo-pagalbininko, geriau tirpo, buvo linkę mažiau

agreguoti ir lipti prie mielių ląstelių nuolaužų. Jau po pirmo centrifugavimo per CsCl gradientą buvo gauti gana grynai tikslinių baltymų mėginiai. Gryninant chimerines VPD be VP1 baltymo „pagalbininko“, tokiame grynumui pasiekti reikėdavo dviejų, atskirais atvejais net ir trijų centrifugavimo per CsCl gradientus etapų. Išgrynintų chimerinių baltymų išėigos padidėjo 2–3 kartus. Teigiamas VP1 baltymo „pagalbininko“ poveikis chimerinių baltymų sintezei buvo gautas su šiais tirtais chimeriniais baltymais – VP1(J)-MAGE 1+4, VP1(J)-CMV 1+4 ir VP1(J)-1T3M4H. „Pagalbinio“ VP1 baltymo pridėjimas ne tik padidino VPD išėigas, bet, kaip parodė išgrynintų baltymų mėginių analizė elektroniniu mikroskopu, pagerino ir VPD formavimosi efektyvumą (22 pav.).



22 pav. VP1-MAGE chimerinių baltymų mėginių elektroninės mikroskopijos nuotraukos. VP1(J)-MAGE 1+4: chimerinis VP1 baltymas, turintis MAGE CTL epitopo intarpus 1 ir 4 VP1 baltymo pozicijose. VP1(J)-MAGE 1+4 stop: chimerinis VP1 baltymas, turintis MAGE CTL epitopo intarpus 1 ir 4 VP1 baltymo pozicijose ir su nutrumpintu baltymo C galu (už 4 pozicijoje esančio epitopo). VP1(J)-MAGE 1+4 su VP1: chimerinis VP1(J)-MAGE 1+4 ir nemodifikuotas VP1 baltymai, sintetinami kartu. VP1(J)-MAGE 1+4 stop su VP1: chimerinis VP1(J)-MAGE 1+4 stop ir nemodifikuotas VP1 baltymai, sintetinami kartu.

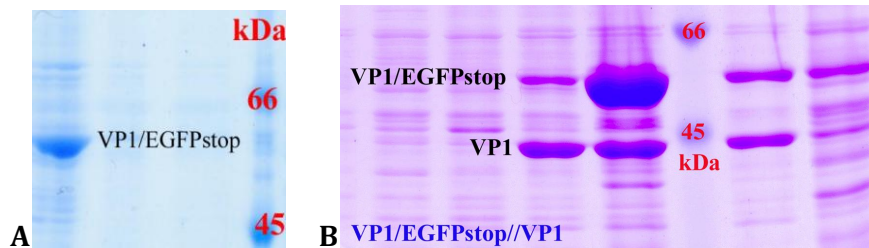
VP1(J)-MAGE 1+4-stop baltymo raiška kartu su nemodifikuotu VP1 baltymu, pagerino chimerinio baltymo išeigas, tačiau mozaikines VPD formuojantys baltymai buvo randami plačiai pasklidę po CsCl gradientą: vienos frakcijose dominavo chimerinis baltymas kitose – nemodifikuotas VP1. C-galo neturintis chimerinis VP1 baltymas neefektyviai formavo mozaikines VPD su nemodifikuotu VP1 baltymu. Mozaikinių VP1(J)-MAGE 1+4-stop//VP1 VPD¹² baltymų mėginių analizė elektroniniu mikroskopu parodė, kad minėtų baltymų mėginiai buvo labai heterogeniški: juose buvo aptinkami tiek pentametrai, tiek standartinio 45 nm dydžio VPD, tiek mažesnės – 20 nm VPD (22 pav.).

Chimerinio VP1(J)-TMH-4 ir VP1(J)-TMH-4-stop baltymų su įterptu polipeptidu iš trijų sulietų CTL epitopų sintezė mielių ląstelėse drauge su pagalbinais VP1 ar VP2 baltymais teigiamos įtakos nepadarė. Mozaikinių VPD sudėtyje buvo randama tik nedidelė VP1(J)-TMH-4 chimerinio baltymo dalis, o chimeriniai VP1(J)-TMH-4-stop baltymai su VP1 baltymu beveik visai neformavo mozaikinių VPD (19 pav.). VP1-TMH-4 baltymai ir toliau liko beveik netirpūs, buvo sunku juos gryninti, o gautos VPD buvo nehomogeniškos: VPD skersmuo svyravo nuo standartinio 45 nm (poliomos virusams būdingo) iki 20 nm (19 pav.).

VP1-eGFP-4-stop baltymo sintezė kartu su „pagalbinio“ VP1 baltymu (23 pav.), chimerinio baltymo raišką pagerino apie 5 kartus, o gauti baltymai buvo tirpesni. Chimerinis VP1-eGFP-4-stop baltymas mozaikines VPD su VP1 baltymu formavo ne taip efektyviai kaip VP1-eGFP-4, turintis natyvų C-galą [nepublikuoti EGIS duomenys], tačiau daug efektyviau negu kiti šiame darbe tirti, turintys modifikuotą C-galą chimeriniai VP1 baltymai. Po pirmojo centrifugavimo per CsCl gradientą NDS-PAGE geliuose buvo galima matyti, kad skirtingose CsCl tankio frakcijose aptinkami VP1-eGFP-4-stop ir VP1 baltymai tarpusavyje į VPD jungiasi

¹² Mozaikinių VPD pavadinimas sudaromas iš chimerinio ir ne „pagalbinio“ baltymų pavadinimų, juos sujungiant dviem pasviraisiais brūkšniais (/).

skirtingais santykiais (23 pav., B). VP1-eGFP-4-stop//VP1 baltymų mėginių analizė elektroniniu mikroskopu parodė, kad nemodifikuoto VP1 baltymo buvimas pagerino chimerinio baltymo gebėjimą formuoti VPD – dauguma VPD buvo 45 nm diametro, tačiau buvo nemažai ir pentamerų, pentamerų agregatų, ypač tuose mėginiuose, kur nemodifikuoto VP1 baltymo buvo mažiau.



23 pav. Chimerinio VP1-eGFP-4-stop baltymo, sintetinamo mielių ląstelėse vieno arba kartu su VP1 baltymu, NDS-PAGE elektroforegramų nuotraukos. (A) NDS-PAGE elektroforegrama su VP1-eGFP-4-stop baltymo, sintetinamo vieno ir (B) kartu su VP1 baltymu „pagalbininku“ frakcijomis po centrifugavimo per CsCl gradientą. Naudojamas baltymų molekulinės masės žymeklis #SM0431 (Fermentas, Lietuva).

Šioje darbo dalyje buvo parodyta, kad mozaikinių VPD kūrimas („pagalbinių“ nemodifikuotų struktūrinių viruso baltymų sintezė drauge su chimeriniais) pagerino chimerinių baltymų su trumpais CTL intarpais VPD formavimosi efektyvumą, palengvino jų gryninimą, leido išgryninti didesnius chimerinių baltymų kiekius (22 lentelė). Šis metodas tinka probleminių chimerinių baltymų su 2–3 trumpų CTL epitopų intarpais išėgų ir VPD formavimosi pagerinimui.

22 lentelė. Chimerinių VP1 baltymų, skirtų mozaikinių VPD gavimui, savybių apibendrinimas

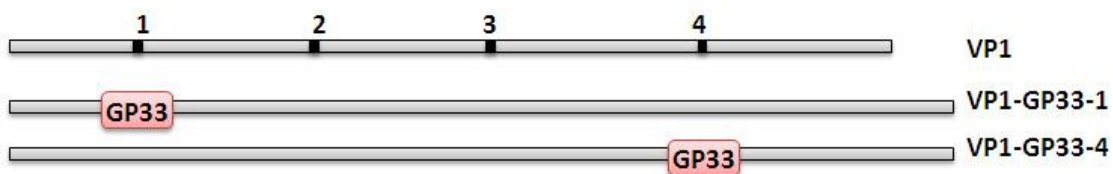
Chimerinio baltymo pavadinimas	Pagalbinio VP1 baltymo sintezė	Pagalbinio VP2 baltymo sintezė	Chimerinio baltymo sintezės efektyvumas	VPD formavimas	Išgrynintų VPD išeigos, mg
VP1(J)-MAGE 1+4			prastas	geras	6
VP1(J)-MAGE 1+4	+		geras	puikus	13
VP1(J)-MAGE 1+4 stop			prastas	prastas	2
VP1(J)-MAGE 1+4 stop	+		prastas	prastas	3
VP1(J)-CMV 1+4			prastas	geras	7
VP1(J)-CMV 1+4	+		geras	puikus	15
VP1(J)-1T3M4H			geras	prastas	4
VP1(J)-1T3M4H	+		geras	geras	6
VP1(J)-TMH-4			prastas	prastas	2
VP1(J)-TMH-4	+		prastas	prastas	2
VP1(J)-TMH-4		+	prastas	prastas	2
VP1(J)-TMH-4-stop			prastas	prastas	2
VP1(J)-TMH-4-stop	+		prastas	prastas	2
VP1(J)-eGFP-4-stop			geras	prastas	3
VP1(J)-eGFP-4-stop	+		puikus	geras	15

Grafose „pagalbinio VP1 (arba VP2) baltymo sintezė“ pliuso ženklas reiškia pagalbinio baltymo panaudojimą. Grafoje „Chimerinio baltymo sintezės efektyvumas“ apibūdinimas „puikus“ reiškia, kad chimerinio baltymo sintezė buvo tokia pat efektyvi kaip ir nemodifikuoto VP1 baltymo, „gera“ – chimerinio baltymo sintezė iki 20 % prastesnė už nemodifikuoto VP1 baltymo, „prasta“ – chimerinio baltymo sintezė >50 % prastesnė už nemodifikuoto VP1 baltymo. „VPD formavimas“: „puikus“ – chimerinis baltymas formuoja nemodifikuotam VP1 baltymui būdingas 45 nm skersmens VPD, mėginyje nėra mažesnių VPD ar pentamerų, VPD labai daug, „geras“ – chimerinis baltymas formuoja nemodifikuotam VP1 baltymui būdingas 45 nm VPD, mėginyje nėra mažesnių VPD ar pentamerų, „prastas“ – chimerinis baltymas formuoja nemodifikuotam VP1 baltymui būdingas 45 nm VPD, bet jų labai mažai, mėginyje taip pat yra ir mažesnių VPD ar pentamerų. „Išgrynintų baltymų išeigos“ – nusako kiek mg chimerinių baltymų buvo išgryninta iš 20 g šlapios mielių biomasės, palyginimui – VP1 baltymo buvo išgryninama 20 mg.

3.1.5. Chimerinių VPD su modeliniu GP33 CTL epitopu kūrimas

CTL imuninio atsako *in vivo* tyrimams buvo sukurtos modelinės VPD. Modeliniu antigenu buvo pasirinktas GP33 CTL antigenas (žr. 1.4. skyrių, 17 pav.). Naudojantis Šveicarijos bioinformatikos instituto ExPASy ProtParam įrankiu [<http://expasy.org/tools/protparam.html>] buvo paskaičiuotas GP33 peptido hidropatiškumo indeksas – 0,344. Mūsų patirtis su įvairiais CTL epitopų tarpais parodė, kad tokį hidropatiškumo indeksą turinčių peptidų tarpai VP1 baltyme yra puikiai toleruojami, todėl papildomų jungtukų sekų naudoti nebūtina.

VP1-GP33¹³ chimerines VPD buvo nuspręsta panaudoti kaip modelį imunologiniuose eksperimentuose, leidžiančiuose įvertinti šių VPD gebėjimą sukelti antigenui specifinį imuninį atsaką *in vivo*. GP33 peptidą buvo nutarta įterpti į 1 ir 4 VP1 baltymo pozicijas, nes ankstesnių eksperimentų metu nustatėme, kad VP1 baltymas įvairius CTL epitopų tarpus šiose pozicijose toleravo geriausiai. Dvi skirtingos įterpimo vietos buvo pasirinktos tam, kad galėtumėme įvertinti skirtingų VP1 baltymo vietų indėlį sukeliant imuninį atsaką.



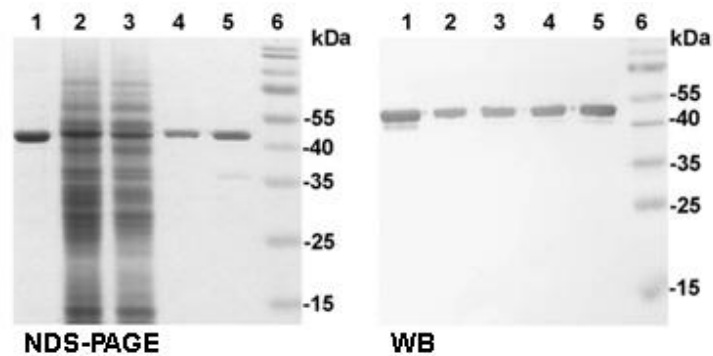
24 pav. Chimerinių VP1-GP33 baltymų schemas. Pilkos spalvos juostos – VP1 baltymas; juodi kvadratai – galimos CTL epitopų įterpimo vietos (1 – tarp 80-89ar., 4 – tarp 288-295ar.); raudoni stačiakampiai – GP33 epitopo intarpai (ar. seka KAVYNFATM).

Chimeriniai VP1-GP33 baltymai (24 pav.) buvo sintetiniai mielių ląstelėse ir išgryninti standartiniu jau aprašytu metodu. Naudojant baltymų mėginius (paruoštus iš grubių ląstelių lizatų, taip pat po centrifugavimo per sacharozės pagalvę ir po gryninimo per CsCl gradientą), buvo vykdoma baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAGE) ir Western blotas su monokloniniais anti-VP1 antikūnais (25 pav.).

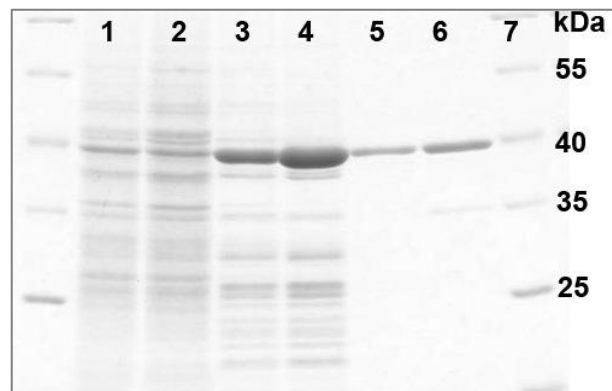
25 paveikslo NDS-PAGE ir Western bloto rezultatai patvirtino, kad abu VP1-GP33 baltymai mielių ląstelėse buvo sintetiniai, o jų raiškos lygis buvo artimas nemodifikuoto VP1 baltymo raiškai (paveiksle neparodyta), tačiau abiejų išgrynintų VP1-GP33 baltymų išėigos nusileido nemodifikuoto VP1 baltymo išėigai kelis kartus (10 mg vs 20 mg iš 20 g mielių biomasės). VPD gryninimo metu buvo pastebėta, kad, lyginant su

¹³ VP1-GP33 – bendras chimerinių VP1-GP33-1 ir VP1-GP33-4 VPD pavadinimas

nemodifikuotu VP1 baltymu, VP1-GP33 baltymai blogiau tirpo, buvo linę agreguotis.



25 pav. VP1-GP33 baltymų sintezės tyrimo mielėse *S.cerevisiae* NDS-PAGE elektroforegramos ir Western bloto (WB) nuotraukos. Takeliuose – 1: išgrynintas VP1 baltymas, 2: mielių ląstelių sintetinančių VP1-GP33-1 baltymą, lizatas, 3: mielių ląstelių, sintetinančių VP1-GP33-4, lizatas, 4: išgrynintas VP1-GP33-1 baltymas, 5: VP1-GP33-4 baltymas, 6: baltymų molekulinės masės standartas (#SM0671, Fermentas, Lietuva). WB buvo atliktas su monokloniniais antikūnais anti-VP1 6D11.



26 pav. NDS-PAGE elektroforegrama su VP1-GP33-4 baltymo mėginiais VPD gryninimo eigoje. Takučiuose – 1: mielių ląstelių, sintetinančių VP1-GP33-4 baltymą, lizatas; 2: nuskaidrintas lizatas; 3: baltymo mėginys po I centrifugavimo per sacharozės tirpalų gradientą; 4: baltymo mėginys po II centrifugavimo per sacharozės tirpalų gradientą; 5: baltymo mėginys po centrifugavimo per CsCl gradientą; 6: baltymo mėginys po dializės, prieš liofilizavimą; 7: baltymų molekulinės masės žymeklis (#SM0671, Fermentas, Lietuva).

Siekiant pagerinti VP1-GP33 baltymų tirpumą ir palengvinti jų gryninimą, buvo pakeista baltymų gryninimo buferių sudėtis (buvo keičiama druskų koncentracija, pridedama glicerolio, tween-20 ar/ir L – arginino) ir nustatyta, kad VP1-GP33 baltymai geriausiai tirpo, kai į

gryninimo buferį buvo pridedama 0.25 M L-arginino aminorūgštis. Be to, buvo nuspręsta VP1-GP33 baltymus pirmiausiai gryninti centrifuguojant per 20-60 % sacharozės tirpalų gradientą, po kurio baltymai plūduriuotų sacharozės tirpale viename debesėlyje, o ne nusėstų į nuosėdas, kurias vėliau sunku ištirpinti. Po 2-3 centrifugavimų per sacharozės tirpalų gradientus gryninamas baltymas buvo ne tik grynesnis, bet ir pakankamai sukonzentruotas – tinkamas gryninimui centrifuguojant per CsCl tirpalų gradientą (26 pav.). Dėl VPD gryninimo metodikos pakeitimo, grynam baltymui gauti užteko tik vieno centrifugavimo per CsCl gradientą etapo, o ne 2-3 kaip buvo daroma anksčiau.

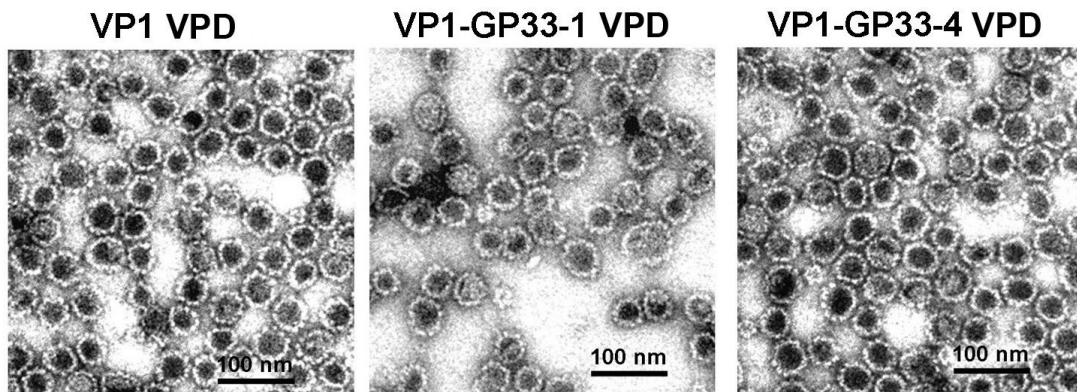
Standartinės VPD gryninimo metodikos pakeitimas į naują (23 lentelė) leido VPD gryninimo procedūrą pagreitinti ir atpiginti. Be to, ši VPD gryninimo modifikacija pagerino išgrynintų VP1-GP33 VPD išeigą (ji tapo ~ 20 mg iš 20g mielių) ir grynumą.

23 lentelė. VPD gryninimo schemų palyginimas

Procedūra	Standartinis VPD gryninimas	Modifikuotas VPD gryninimas
Mielių ląstelių suardymas. <i>Trukmė – 1 val.</i>	1	1
Ląstelių lizato nuskaidrinimas. <i>Trukmė – 0,5 val.</i>	1	1
Centrifugavimas per sacharozės „pagalvę“ <i>Trukmė - 4 val.</i>	1	0
Centrifugavimas per sacharozės tirpalų gradientą <i>Trukmė - 4 val.</i>	0	2-3
Centrifugavimas per CsCl tirpalų gradientą <i>Trukmė - 48 val.</i>	2-3	1
VPD sukonzentravimas. <i>Trukmė – 12 val.</i>	1	1
Dializė. <i>Trukmė – 24 val.</i>	1	1
Liofilizavimas. <i>Trukmė – 24 val.</i>	1	1

Lentelėje skaičiai nurodo kiek konkrečių procedūrų buvo atliekama VPD gryninimo metu.

Išgrynintų VP1-GP33 baltymų mėginių analizė elektroniniu mikroskopu patvirtino, kad jie formuoja homogeniškas, taisyklingos formos, poliomos virusams būdingo 45 nm diametro VPD (27 pav.).



27 pav. Natyvaus VP1 ir modeliųjų chimerinių VP1-GP33 baltymų formuojamų į virusus panašių dalelių (VPD) elektroninės mikroskopijos nuotraukos.

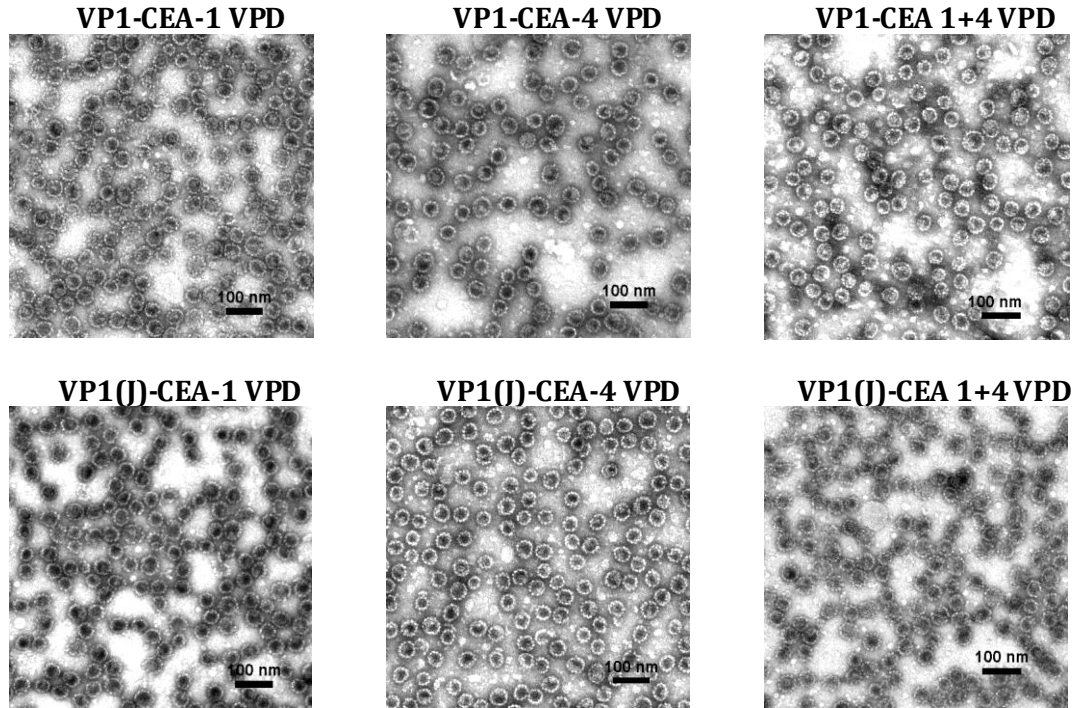
Išgrynintos VPD buvo nudializuotos, išpilstytos po 25, 50, 100 µg ir išliofilizuotos ilgalaikiam saugojimui. Taip paruoštos VP1-GP33 modelinės chimerinės VPD toliau buvo naudojamos *in vitro* ir *in vivo* eksperimentams.

3.2. Chimerinių HaPyV VP1 pagrindu sukurtų VPD gebėjimo sukelti humoralinį imuninį atsaką *in vivo* tyrimas

3.2.1. VP1-CEA VPD gebėjimo indukuoti antikūnų prieš chimerines VPD sintezę pelėse tyrimas

Norint nustatyti ar VP1-CEA chimerinės VPD su 1, 2 ar 4 CEA intarpais bei su GSSG jungtukais arba be jų (VP1-CEA-1, VP1-CEA-4, VP1(J)-CEA-1, VP1(J)-CEA-4, VP1-CEA 1+4, VP1(J)-CEA 1+4, VP1(J)-CEA-1234) (28 pav.) yra imunogeniškos ir ar sukelia pelėse VPD specifinių antikūnų sintezę, pelės buvo imunizuotos po pilvaplėve minėtomis VPD be adjuvantų. VP1(J)-CEA-1234 chimeriniai baltymai VPD neformavo. Po 6 savaičių imunizacija buvo pakartota, o dar po 7 dienų pelių kraujyje IFA metodu buvo nustatomas antikūnų specifinių VPD ir specifinių CEA epitopui buvimas (šių eksperimento dalį atliko kolegos iš Potsdamo universiteto, Vokietijoje). Visų pelių kraujo serumuose, išskyrus tų, kurios

buvo imunizuotos VP1(J)-CEA-1234 baltymais, buvo rasta antikūnų, reaguojančių su CEA peptidu (IFA plokštelės buvo padengtos CEA peptidu su JSA).



28 pav. Chimerinių VP1-CEA baltymų formuojamų VPD elektroninės mikroskopijos nuotraukos. Skaičiai nurodo VP1 baltymo pozicijas, į kurias buvo įterptas CEA epitopas. (J) – GSSG jungtukas, turintis palengvinti baltymams įgyti teisingą konformaciją.

Visose pelėse (3 iš 3) imunizuotose VP1-CEA-1, VP1(J)-CEA-1, VP1(J)-CEA 1+4 VPD buvo aptikta CEA epitopui specifinių antikūnų, tačiau jų turėjo tik 1 ar 2 pelės iš VP1-CEA-4, VP1(J)-CEA-4, VP1-CEA 1+4 VPD imunizuotų pelių grupių. Pelių imunizuotų VP1-CEA-1, VP1(J)-CEA-1 VPD, CEA peptidui specifinių antikūnų titrų vidurkiai buvo didesni nei kitose pelių grupėse.

Visose pelėse, imunizuotose VPD, išskyrus grupę pelių, imunizuotų VP1(J)-CEA-1234, susidarė VP1 baltymui specifinių antikūnų, tačiau VP1 baltymui specifinių antikūnų titrai pelėse, imunizuotose chimerinėmis VPD, buvo mažesni nei pelėse, imunizuotose nmodifikuotomis VP1 VPD. Didžiausi antikūnų titrai tiek prieš VP1 VPD, tiek ir CEA peptidą buvo gauti

tose pelėse, kurios buvo imunizuotos chimeriniais baltymais, turinčiais tik vieną CEA epitopo kopiją.

24 lentelė. Pelių imunizuotų su VP1-CEA chimerinėmis VPD antikūnų titrai, nustatyti pelių kraujo serumuose IFA metodu

Antigenas, naudotas pelių imunizacijai	Pelės Nr.	Antikūnų titras			
		IFA su VP1		IFA su CEA+JSA	
		7 dienos	6 mėnesiai	7 dienos	6 mėnesiai
VP1-CEA-1	1	24300	20000	2400	2000
	2	8100	-	2400	-
	3	24300	20000	>9600	3000
VP1(J)-CEA-1	4	24300	10000	4800	600
	5	24300	10000	600	300
	6	72900	20000	4800	600
VP1-CEA-4	7	2700	-	<300	-
	8	8100	-	2400	-
	9	8100	-	1200	-
VP1(J)-CEA-4	10	8100	-	<300	-
	11	24300	-	300	-
	12	72900	-	<300	-
VP1-CEA 1+4	13	2700	-	1200	-
	14	8100	-	1200	-
	15	900	-	2400	-
VP1(J)-CEA 1+4	16	24300	5000	<300	300
	17	24300	5000	<300	300
	18	24300	5000	<300	300
VP1(J)-CEA-1234	19	<100	-	<300	-
	20	<100	-	<300	-
	21	<100	-	<300	-
VP1	22	72900	10000	<300	<300
	23	72900	10000	<300	<300
	24	24300	-	<300	-

Pelės buvo imunizuotos VPD, po 6 savaičių imunizacija pakartota. Antikūnų titras nustatytas praėjus 7 dienoms ir 6 mėnesiams po pakartotinės imunizacijos [Lawatscheck et al., 2007]. Lentelėje minuso ženklas reiškia, kad antikūnų titras nebuvo nustatomas. IFA analizei antigenais buvo naudojamos VP1 VPD arba CEA peptidas su JSA.

Siekiant nustatyti ar VPD sukeltas humoralinis imuninis atsakas yra ilgalaikis, VP1 baltymui ir CEA peptidui specifinių antikūnų titras buvo tikrinamas pelių, imunizuotų VP1-CEA-1, VP1(J)-CEA-1, VP1(J)-CEA 1+4 VPD, grupėse, praėjus 6 mėnesiams po paskutinės VPD injekcijos. Visų pelių kraujo serumuose buvo aptikta CEA peptidui specifinių antikūnų. Daugiausia jų buvo rasta pelėse imunizuotose su VP1-CEA-1 baltymu. Šių pelių serumuose antikūnų titras buvo beveik toks pat aukštas kaip ir praėjus savaitei po paskutinės VPD injekcijos (24 lentelė) [Lawatscheck et al., 2007].

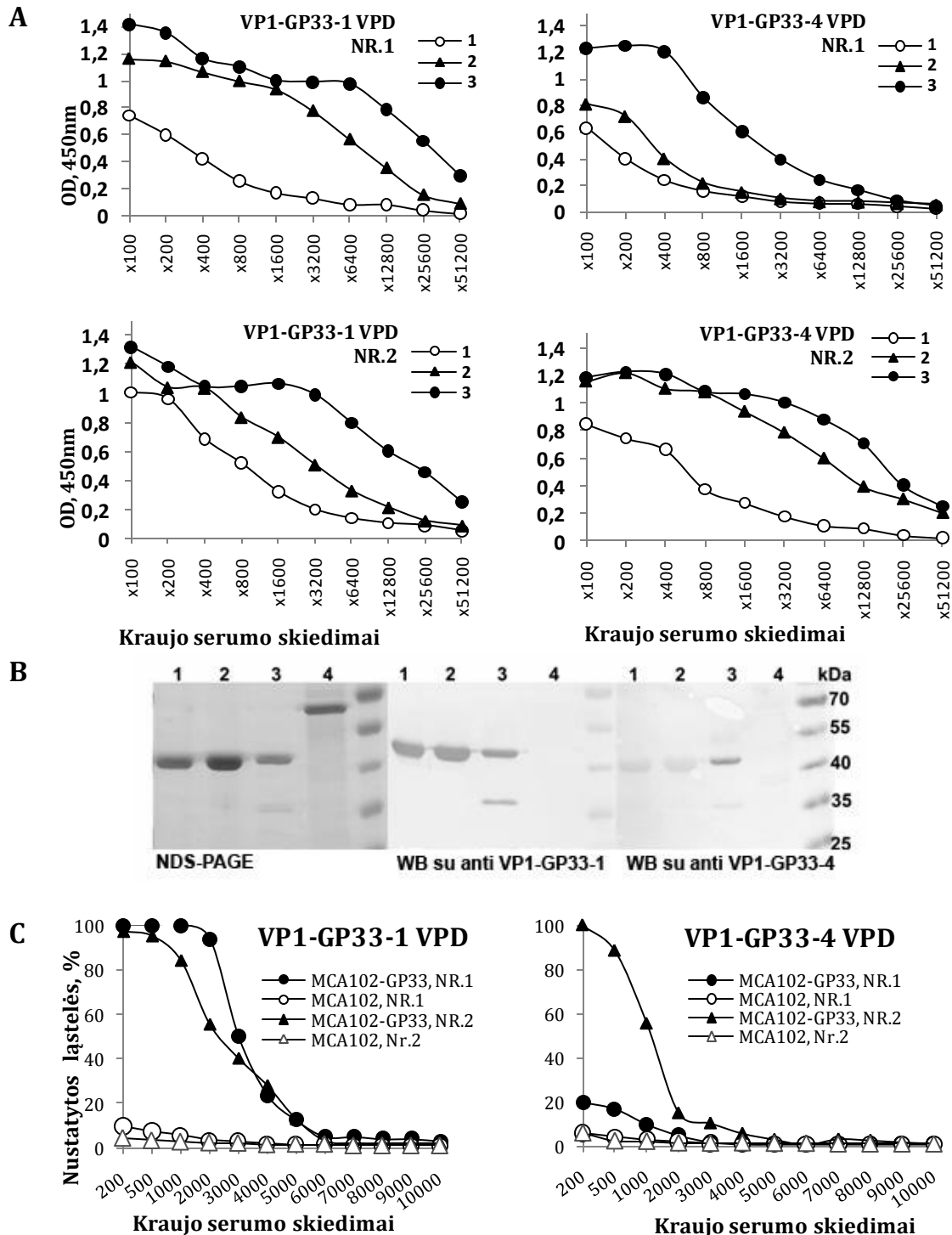
Pelių imunizacijos chimerinėmis VP1-CEA be adjuvantų sukėlė ilgalaikį humoralinį imuninį atsaką, antikūnų prieš VP1 bei prieš CEA peptidą susidarymą. Geriausią humoralinį imuninį atsaką *in vivo* sukėlė tos VPD, kuriose CEA epitopas buvo įterptas į 1 VP1 baltymo poziciją.

3.2.2. Modelinių VP1-GP33 VPD gebėjimo sukelti antikūnų sintezę pelėse tyrimas

Siekiant nustatyti, ar modelinės chimerinės VP1-GP33 VPD gali indukuoti humoralinio imuninio atsako prieš VPD susidarymą, B6 pelėms 3 kartus 1 mėnesio intervalais buvo suleista VP1-GP33-1 arba VP1-GP33-4 VPD (50 µg be adjuvantų, į veną, po 2 peles kiekvienoje grupėje). Praėjus mėnesiui po kiekvienos imunizacijos buvo surinkti kraujo serumo mėginiai, su kuriais buvo atlikta imunofermentinė analizė (IFA) bei Western blotas (antigenais buvo naudotos VP1 ir VP1-GP33 VPD). IFA rezultatai parodė, kad visų keturių pelių kraujo serumuose buvo VPD specifinių antikūnų, o jų kiekis po kiekvienos imunizacijos augo (29 pav., A). Visi VP1-GP33 VPD imunizuotų pelių kraujo serumai buvo iširti Western blotuose, kurie patvirtino antikūnų prieš chimerines VPD susidarymą (27 pav., B).

GP33 antigenui specifinių antikūnų VP1-GP33 VPD imunizuotų pelių kraujo serumuose buvo nustatyti panaudojant tėkmės citometrą. MCA102-GP33 ląstelės, savo paviršiuje turinčios GP33 antigeną, buvo inkubuojamos su pelių kraujo serumais, po to, buvo pažymėtos antriniais antikūnais (prieš pelės IgG) su fluorescuojančia žyme ir analizuotos tėkmės citometru. Kontrolei buvo naudojamos MCA102 ląstelės, kurios nuo MCA102-GP33 skyrėsi tik tuo, kad savo paviršiuje GP33 antigeno neturėjo. Naudoto metodo pagalba buvo nustatyta, kad 3 iš 4 chimerinėmis VP1-GP33 VPD imunizuotų pelių kraujo serumuose buvo GP33 antigenui specifinių IgG antikūnų: abiejų pelių, imunizuotų su VP1-

GP33-1 VPD, ir vienos iš dviejų pelių, imunizuotų su VP1-GP33-4 VPD (29 pav., C).



29 pav. Humoralinio imuninio atsako prieš chimerines VP1-GP33 VPD pelių kraujo serumuose nustatymas. B6 pelėms 3 kartus vieno mėnesio intervalais į veną buvo suleista 50 µg VP1-GP33-1 arba VP1-GP33-4 VPD. Antikūnai prieš VPD pelių kraujo serumuose buvo nustatomi IFA (A), Western bloto (B) ir tėkmės citometrijos metodais (C). (A) IFA rezultatai, kai antigenu naudotos VP1 VPD. Skaičiai 1, 2, 3 nurodo

kiek VPD imunizacijų buvo atlikta. IFA rezultatai, kai antigenais buvo naudotos chimerinės VPD buvo analogiški čia pateiktiesiems. Paveiksle pateikti vieno konkretaus matavimo duomenys. (B) Antikūnų prieš VP1-GP33 pelių kraujo serumuose nustatymas Western blotu – WB. Takeliuose: 1 – išgrynintas VP1 baltymas, 2 – išgrynintas VP1-GP33-1 baltymas, 3 – VP1-GP33-4 baltymas, 4 – neigiama kontrolė, Boca viruso VP2 baltymas ir baltymų molekulinės masės standartas (#SM0671, Fermentas, Lietuva). Paveiksle pateikti tik vienos pelės kraujo serumo po 3 imunizacijų VP1-GP33-1 ir VP1-GP33-4 VPD duomenys. Rezultatai su kitų pelių serumais buvo analogiški. (C) GP33 antigenui specifinių antikūnų nustatymas pelių kraujo serumuose po 3 imunizacijų chimerinėmis VP1-GP33 VPD tėkmės citometrijos būdu. MCA102 ir MCA102-GP33 ląstelės buvo inkubuotos su serumais, po to su anti-pelės IgG antikūnais pažymėtoms fluorescuojančia žyme ir buvo suskaičiuota kurią dalį iš visų ląstelių atpažino serume esantys antikūnai.

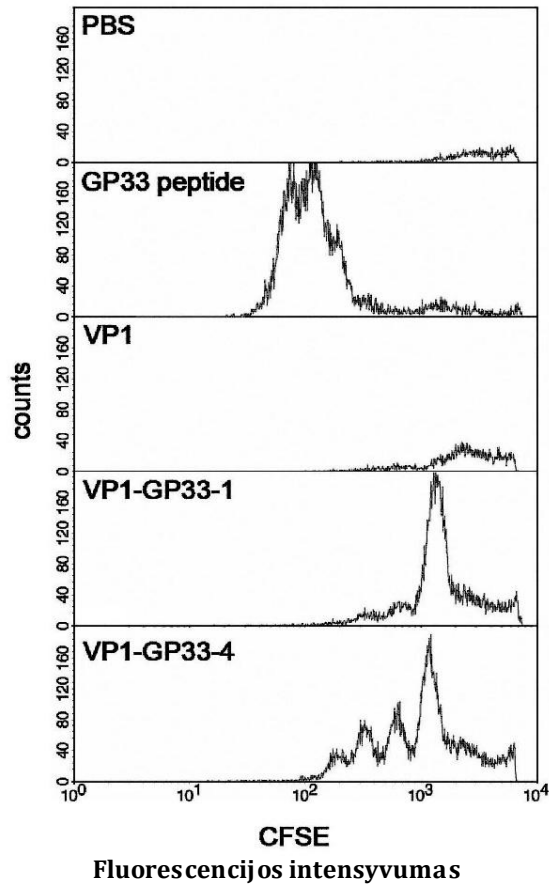
Pakartotinės pelių imunizacijos modelinėmis chimerinėmis VP1-GP33 VPD B6 pelėse sukėlė efektyvų humoralinį imuninį atsaką, pelėse susidarė antikūnai tiek prieš VP1 baltymą-nešiklį, tiek ir prieš įterptą GP33 CTL antigeną.

3.3. Modelinių chimerinių VP1-GP33 VPD gebėjimo sukelti intarpui specifinį CTL imuninį atsaką tyrimas

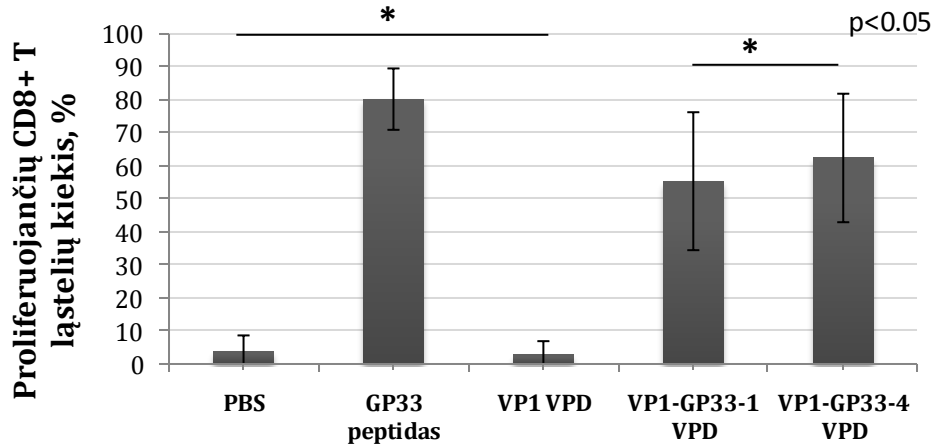
3.3.1. Antigenui specifinių CTL ląstelių stimuliavimas VP1-GP33 VPD *in vitro*

Siekiant nustatyti ar modelinės VP1-GP33 VPD gali pateikti GP33 epitopą jau egzistuojančioms GP33-specifinėms CD8⁺ T ląstelėms ir jas stimuliuoti, buvo atliekamas transgeninių P14 pelių, kurių CD8⁺ T ląstelės yra specifinės LCMV GP33 antigenui, blužnies ląstelių proliferacijos *in vitro* eksperimentas. Su CFSE nudažytos blužnies ląstelės buvo inkubuojamos *in vitro* su VP1-GP33 arba VP1 VPD bei PBS ir GP33 peptidu (neigiamai ir teigiamai kontrolėms). Specifiškai aktyvintoms CD8⁺ T ląstelėms pradėjus proliferuoti, apytiksliai po 5 dienų jos buvo pažymimos α -CD8⁺ antikūnais ir tėkmės citometru skaičiuojama, kuri CTL ląstelių dalis proliferuoja.

A



B



30 pav. GP33-specifinių CD8⁺ T ląstelių, stimuliuotų VPD, proliferacija *in vitro*. P14 pelių blužnies ląstelės nudažytos su CFSE, 5 dienas buvo inkubuojamos su VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4). Neigiamai kontrolei buvo pridedama PBS, o teigiamai – GP33 peptido. (A) paveikslo dalyje pateiktos vieno konkretaus eksperimento tėkmės citometrijos rezultatų histogramos, o (B) dalyje pateikti susumuoti keturių nepriklausomų eksperimentų duomenys – pateikti reikšmių vidurkiai +/-SN, p<0,05. Žvaigždute (*) pažymėti skirtumai statistiškai yra nereikšmingi.

Gauti rezultatai parodė (30 pav.), kad chimerinės VP1-GP33 VPD specifiškai stimuliuo GP33-specifinių CD8⁺ T ląstelių proliferaciją

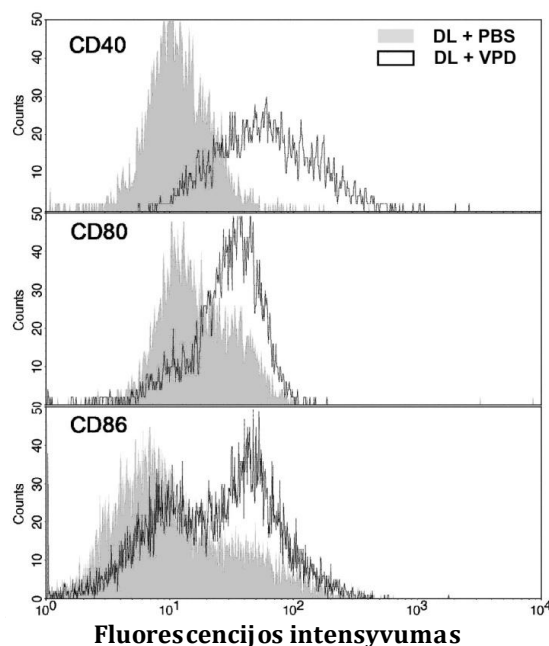
(>50%), beveik taip pat gerai, kaip pats GP33 peptidas. VP1 VPD ir PBS CD8⁺ T ląstelių proliferacijos nestimuliavo (~1%). Lyginant VP1-GP33-1 ir VP1-GP33-4 VPD poveikį tarpusavyje, VP1-GP33-4 VPD indukuota GP33 CD8⁺ T ląstelių proliferacija buvo nežymiai stipresnė.

Modelinės chimerinės VP1-GP33 VPD efektyviai ir specifiskai stimuliuo GP33 antigenui specifinių CD8⁺ T ląstelių proliferaciją *in vitro*.

3.3.2. Dendritinių ląstelių brandinimas VP1-GP33 VPD *in vitro*

Antigenui specifines CTL ląsteles (efektorines ląsteles gebančias žudyti virusais infekuotas ir vėžines ląsteles) gali suaktyvinti profesionaliausios antigenus pateikiančiosios dendritinės ląstelės (DL), todėl buvo labai svarbu įvertinti modelinių chimerinių VP1-GP33 VPD gebėjimą subrandinti dendritines ląsteles *in vitro*. Tam iš B6 pelių kaulų čiulpų *in vitro* buvo užaugintos nesubrendusios dendritinės ląstelės. DL buvo identifikuojamos tėkmės citometru, jas pažymėjus antikūnais, atpažįstančiais dendritinių ląstelių žymenis (α -CD11c, α -MHCII). ~80% ląstelių buvo identifikuotos kaip CD11c⁺MHCII⁺ ląstelės (DL).

Nesubrendusios DL *in vitro* buvo brandinamos pridedant VP1-GP33-1, VP1-GP33-4, VP1 VPD arba PBS (neigiamai kontrolei) ir LPS (teigiamai eksperimento kontrolei). Po 72 valandų brandinimo, tėkmės citometru buvo skaičiuojama, kaip pakito subrendusių DL CD80, CD86, CD40 paviršiaus žymenų raiška, lyginant su nesubrendusiomis DL, kurios buvo inkubuojamos su PBS. Tėkmės citometrijos būdu gautų histogramų duomenys parodė (31 pav.), kad po inkubavimo su VPD CD80, CD86, CD40 molekulių raiška DL paviršiuje padidėjo nuo 10-30 % iki 50-90 %. DL brandinant su skirtingomis VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4) jokių paviršiaus žymenų raiškos skirtumų pastebėta nebuvo.



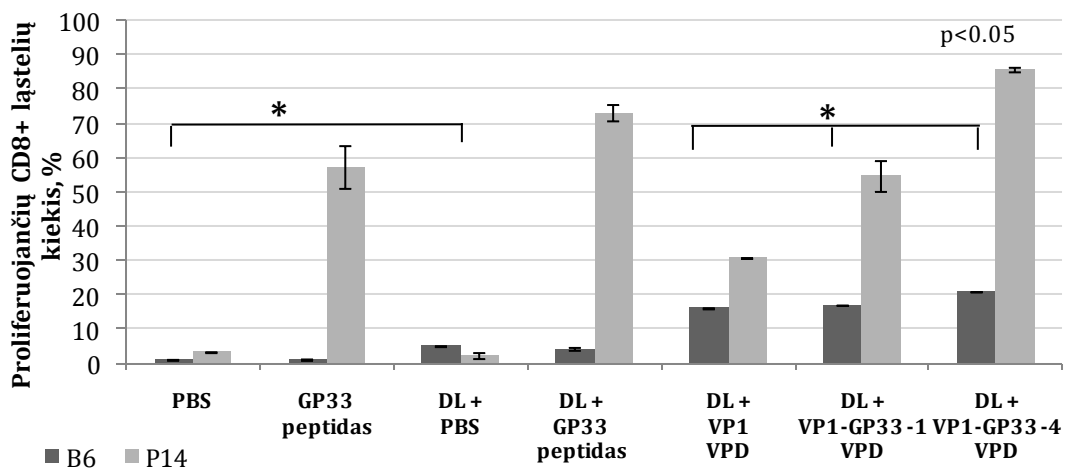
31 pav. Pelių dendritinių ląstelių brandinimo *in vitro* HaPyV VP1 pagrindu sukurtais VPD rezultatai. Iš B6 pelių kaulų čiulpų užaugintos dendritinės ląstelės (~80 % CD11c⁺MHCII⁺) buvo brandinamos 72val., pridėjus 10 µg/mL VPD (VP1, VP1-GP33-1 arba VP1-GP33-4) arba PBS neigiamai kontrolei. Tėkmės citometru buvo matuojama, kaip pakito subrendusių dendritinių ląstelių paviršiaus markerių CD80, CD86, CD40 raiška DL paviršiuje. Ląstelės buvo inkubuojamos su FITC pažymėtais mAk (α CD80, α CD86, α CD40) ir analizuojamos tėkmės citometru. Pilki histogramos pikai atspindi nesubrendusių DL paviršiaus žymenų raišką, o tuščiaviduriai – subrendusių. Piko aukštis atspindi ląstelių kiekį, o pasislinkimas į dešinę – paviršiaus žymenų raiškos padidėjimą. Paveiksle pateikti vieno reprezentatyvaus eksperimento (iš trijų), kai DL buvo brandintos su VP1 VPD duomenys. Visos VPD dendritines ląsteles brandino identišškai.

VP1 pagrindu sukurtos VPD efektyviai subrandino iš pelių kaulų čiulpų užaugintas dendritines ląsteles *in vitro*.

3.3.3. GP33 antigenui specifinių CD8⁺ T ląstelių stimuliavimas dendritinėmis ląstelėmis, subrandintomis su VP1-GP33 VPD, *in vitro*

Siekiant nustatyti, ar dendritinės ląstelės, subrandintos po inkubacijos su VP1-GP33 VPD *in vitro*, gali stimuliuoti GP33 antigenui specifines CTL ląsteles buvo atliekamas žemiau aprašytas eksperimentas. CFSE nudažytos P14 pelių blužnies ląstelės (transgeninių P14 pelių >90% CTL ląstelių yra specifinės GP33 antigenui), buvo inkubuojamos su VPD pagalba subrandintomis DL *in vitro*. Neigiamai kontrolei eksperimente

buvo naudojamos nesubrendusios DL arba PBS, kurios negali stimuliuoti antigenui specifinių CD8⁺ T ląstelių. Teigiamai kontrolei buvo naudojamas GP33 peptidas arba juo stimuliuotos dendritinės ląstelės. Nespecifinės proliferacijos nustatymui, šiame eksperimente buvo naudojamos B6 pelių blužnies ląstelės. Po inkubacijos ląstelės buvo pažymėtos fluorescuojančiais αCD8 antikūnais ir tėkmės citometru buvo analizuojama, kuri CD8⁺ ląstelių dalis buvo specifiškai suaktyvintos ir proliferavo (32 pav.).



32 pav. CD8⁺ T ląstelių, specifinių GP33 antigenui, stimuliuotų dendritinėmis ląstelėmis (subbrandintomis su VPD), proliferacijos *in vitro* rezultatai. Dendritinės ląstelės 72 val. buvo brandinamos su 10 μ g/mL VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4). Po to DL buvo 4-5 dienas inkubuojamos su CFSE nudažytomis P14 arba B6 pelių blužnies ląstelėmis (10⁶ blužnies ląstelių + 10⁵ DL/mL). Neigiamai kontrolei buvo naudojamos nesubrendusios DL (DL+PBS) arba PBS, o teigiamai – GP33 peptidas ir DL stimuliuotos GP33 peptidu. Po inkubacijos ląstelės buvo pažymėtos αCD8/PE antikūnais ir tėkmės citometru buvo analizuojama, kuri CD8⁺ T ląstelių dalis proliferavo. Paveiksle pateikti dviejų nepriklausomų eksperimentų rezultatų vidurkiai +/-SN, p<0,05 (* - statistiškai nereikšmingi skirtumai).

Eksperimento rezultatai parodė, kad dendritinės ląstelės brandintos su modelinėmis chimerinėmis VP1-GP33 VPD efektyviai stimuliuo GP33-specifinių CD8⁺ T ląstelių proliferaciją *in vitro*. Nesubrendusios dendritinės ląstelės ar PBS minėtos proliferacijos nesukėlė. Be to, DL subbrandintos su VP1-GP33 VPD, stimuliuo GP33-specifinių CD8⁺ T ląstelių proliferaciją taip pat gerai, kaip ir pats GP33 peptidas, bei 2-3

kartus geriau nei DL, brandintos GP33 antigeno neturinčiomis VP1 VPD. Šie duomenys rodo, kad CTL ląstelių proliferacija buvo GP33 antigenui specifinė. Be to, šiame eksperimente VP1-GP33-4 VPD subrandintos DL buvo ženkliai pranašesnės už VP1-GP33-1 VPD paveiktas DL. VP1-GP33-4 VPD subrandintų DL sukelta GP33-specifinių CD8⁺ T ląstelių proliferacija buvo net stipresnė, negu paties GP33 peptido ar peptidu paveiktų DL sukelta CTL ląstelių proliferacija. Nespecifinė B6 CD8⁺ T ląstelių proliferacija buvo nežymi (B6 vs P14) ir vienodo lygio visomis VPD stimuliuotose ląstelių grupėse.

DL, subrandintos modelinėmis chimerinėmis VP1-GP33 VPD, efektyviai ir specifiškai stimuliuo GP33 antigenui specifinių CD8⁺ T ląstelių proliferaciją *in vitro*.

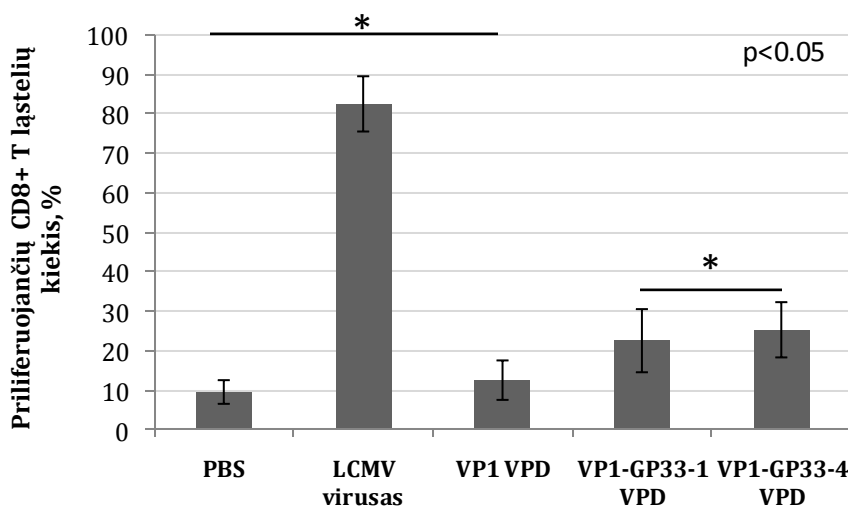
3.3.4. Antigenui specifinio ilgalaikio CTL imuninio atsako stimuliavimas VP1-GP33 VPD *in vivo*

Modelinių chimerinių VP1-GP33 VPD sukulto ilgalaikio CTL imuninio atsako, specifinio GP33 peptidui, susidarymo *in vivo* tyrimui, B6 pelėms į veną buvo atliktos vienkartinės imunizacijos su 50 µg VPD (VP1, VP1-GP33-1, VP1-GP33-4) be jokių adjuvantų. Praėjus 8 savaitėms po imunizacijos (tokio laiko tarpo užtenka, kad susidarytų atminties imuninės ląstelės) blužnies ląstelių suspencijoje buvo ieškoma GP33-specifinių CD8⁺ T ląstelių. Teigiamai kontrolei pelės III saugumo lygmens laboratorijoje į veną buvo imunizuotos LCMV (200 pfu), nes šio viruso infekcija sukelia GP33 specifinių CD8⁺ T atminties ląstelių susidarymą. Neigiamai kontrolei pelėms buvo sušvirkšta PBS tirpalo.

Viena imunizuotų pelių blužnies ląstelių dalis buvo nudažyta su CFSE ir panaudota proliferacijos *in vitro* eksperimente. Blužnies ląstelės buvo inkubuojamos (restimuliuojamos) su GP33 peptidu ir po 5 dienų tėkmės

citometru buvo analizuojama, kuri dalis CD8⁺ T ląstelių proliferavo (proliferuoja tik tos CD8⁺ T ląstelės yra GP33 antigenui specifinės).

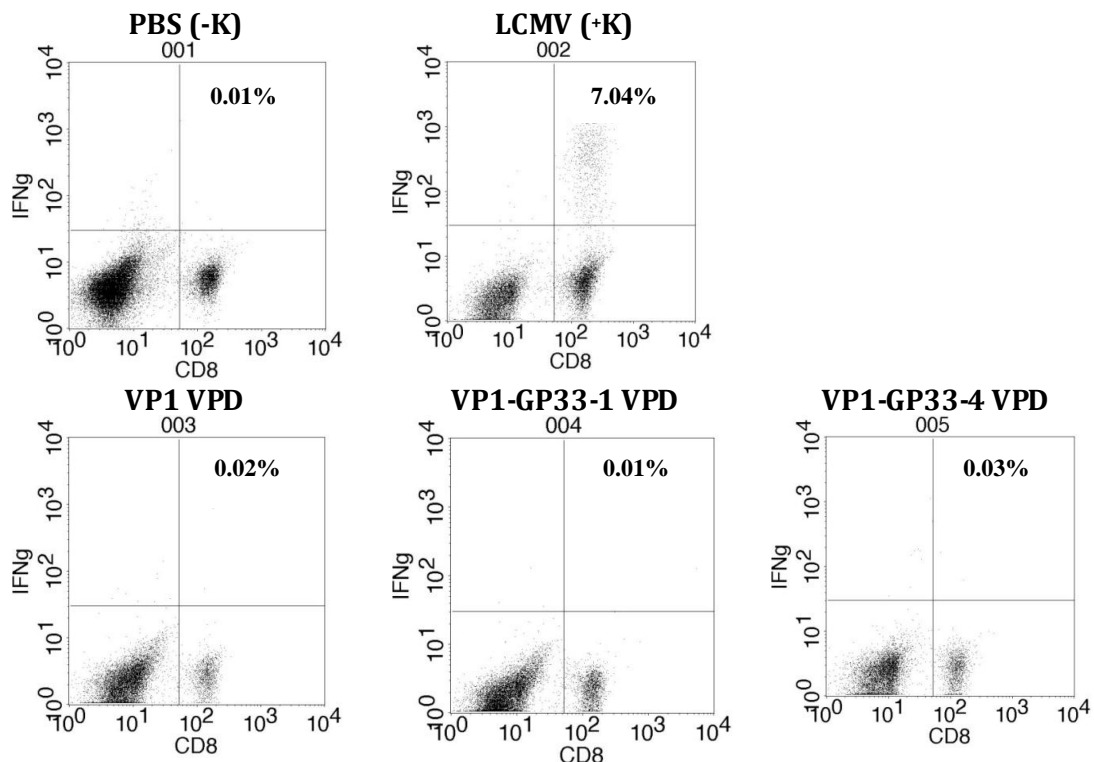
Gauti rezultatai parodė, kad pelėse, imunizuotose chimerinėmis VP1-GP33 VPD, susidarė GP33 antigenui specifinių atminties CTL ląstelių. Chimerinėmis VP1-GP33 VPD imunizuotų pelių CD8⁺ T ląstelės proliferavo du kartus stipriau, nei pelių, imunizuotų tik su VP1 VPD, tačiau apie tris kartus silpniau negu pelių, infekuotų LCMV (31 pav.). VP1-GP33-1 ir VP1-GP33-4 VPD imunizuotose pelėse GP33 antigenui specifinių atminties CTL ląstelių susidarymo efektyvumas buvo vienodas.



33 pav. CD8⁺ T ląstelių, specifinių GP33 antigenui, nustatymas B6 pelėse po imunizacijos modelinėmis chimerinėmis VP1-GP33 VPD, įvertinant jų proliferaciją *in vitro*. B6 pelės buvo į veną imunizuotos su 50 μg VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4). Neigiamai kontrolei pelėms buvo suleista PBS tirpalo, o teigiamai - 200 pfu LCMV. Po 8 savaičių blužnies ląstelės buvo restimuliuotos GP33 peptidu. Po to ląstelės buvo pažymėtos αCD8-PE antikūnais ir tėkmės citometru buvo analizuojama, kuri CD8⁺ T ląstelių dalis proliferuoja. Paveiksle pateikti trijų nepriklausomų eksperimentų rezultatų vidurkiai ±SN, p<0,05 (* - skirtumas statistiškai nereikšmingas).

Antra imunizuotų pelių blužnies ląstelių dalis buvo panaudota IFN γ gaminančių CD8⁺T ląstelių paieškai *in vitro*. Blužnies ląstelės 5, 12, 24 valandas buvo restimuliuojamos GP33 peptidu, esant brefeldino A. Po to ląstelės buvo pažymėtos fluorescuojančiais α-IFN γ bei α-CD8 antikūnais ir tėkmės citometru buvo nustatomas CD8⁺ T ląstelių, turinčių viduląstelinio

IFN γ , kiekis. IFN γ sekrecija yra efektorinių CD8⁺ T ląstelių savybė. Deja, pelių, imunizuotų VPD, blužnies ląstelių, sintetinančių viduląstelinį IFN γ , po restimuliacijos peptidu nebuvo aptikta, lyginant su teigiamos kontrolės ląstelėmis, kuriose IFN γ buvo gaminamas (34 pav.). Viduląstelinio IFN γ turinčių CD8⁺ T ląstelių buvo ieškoma ir B6 pelių, tris kartus imunizuotų VP1-GP33 VPD 1 mėnesio intervalais, blužnies ląstelėse. Blužnies ląstelių populiacijoje viduląstelinio IFN γ turinčių CD8⁺ T ląstelių nebuvo aptikta nei po antros, nei po trečios pelių imunizacijos VPD (duomenys nepateikti, nes jie analogiški 34 pav. duomenims).



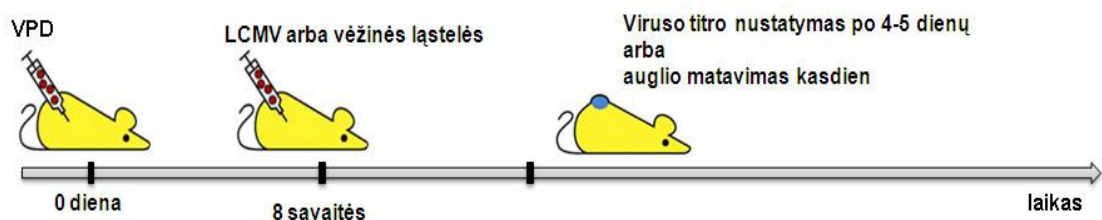
34 pav. Viduląstelinio IFN γ nustatymas pelių, imunizuotų VPD, blužnies CD8⁺ T ląstelių populiacijoje. B6 pelės buvo imunizuotos VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4), PBS (neigiamai kontrolei) arba LCMV (teigiamai kontrolei). Po 8 savaičių blužnies ląstelės buvo restimuliuotos GP33 peptidu esant brefeldino A. Paveiksle taškinės diagramos pavidalu pateikti vieno konkretaus charakteringo eksperimento (po 12val. restimuliacijos) tėkmės citometrijos duomenys. Rodomos tik gyvos ląstelės (*angl. gated on livig cells*). CD8⁺ T ląstelės, gaminančios IFN γ , buvo identifikuotos jas pažymėjus α -CD8/FITC bei α -IFN γ /PE antikūnais.

GP33 antigenui specifinių CD8⁺ T atminties ląstelių susidarymui *in vivo* pakako vienkartinės pelių imunizacijos chimerinėmis VP1-GP33 VPD be jokių adjuvantų.

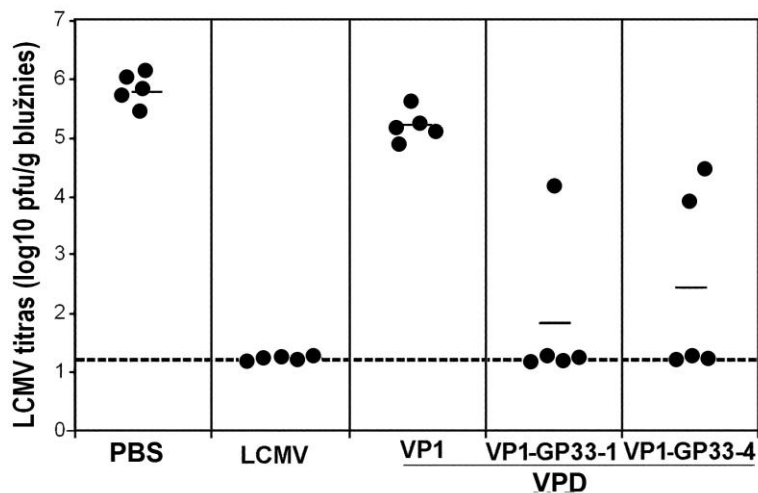
3.3.5. Profilaktinės imunizacijos VP1–GP33 VPD poveikio, apsaugant peles nuo LCMV infekcijos, tyrimas *in vivo*

Nustačius, kad chimerinės VP1–GP33 VPD pelėms sukėlė GP33 antigenui specifinių CD8⁺ T ląstelių atsaką, reikėjo išsiaiškinti, ar šis atsakas yra efektyvus ir gali apsaugoti peles nuo LCMV infekcijos. Jei chimerinėmis VP1–GP33 dalelėmis indukuotos GP33 specifinės CD8⁺ T ląstelės yra efektyvios ląstelės žudikės, jos gali sunaikinti taikinio ląsteles, turinčias GP33 antigeną *in vivo*, ir apsaugoti peles nuo LCMV infekcijos. Pelių atsparumas viruso infekcijai buvo tiriamas praėjus 8 savaitėms po pelių vienkartinės imunizacijos VPD be jokio adjuvanto, sušvirkščiant 200 pfu LCMV į veną. 4–5 dieną po viruso injekcijos infekuotų pelių blužnyje buvo skaičiuojami viruso titrai (35 pav.). Neigiamai kontrolei buvo naudojamos B6 pelės, kurioms buvo sušvirkšta PBS, o teigiamai – LCMV imunizuotos pelės.

Gauti rezultatai parodė, kad visos pelės, kurios buvo imunizuotos LCMV, buvo apsaugotos nuo pakartotinės viruso infekcijos, nes jose viruso nebuvo. 4 iš 5 (80 %) VP1–GP33–1 VPD imunizuotų pelių bei 3/5 (60 %) VP1–GP33–4 VPD pelių taip pat buvo visiškai apsaugotos nuo viruso infekcijos. Likusios pelės minėtose grupėse (3/10) nuo LCMV infekcijos buvo apsaugotos dalinai – jose nustatyti virusų titrai buvo mažesni, negu kontrolinėse PBS ar VP1 VPD pelių grupėse (36 pav).



35 pav. Eksperimento, skirto modelinių chimerinių VPD profilaktinio poveikio nustatymui, schema. B6 pelės į veną buvo imunizuotos VP1-GP33 VPD (50 µg) be jokio adjuvanto. Po 8 savaičių, per kurias susidaro ilgalaikis imuninis atsakas, pelėms buvo sušvirkšta LCMV arba vėžinių ląstelių ir buvo tikrinama, ar susidaręs imuninis atsakas pajėgus kovoti su GP33 antigeną turinčiomis ląstelėmis.



36 pav. LCMV titrai pelių, imunizuotų VP1-GP33VPD, blužnyse. B6 pelės buvo imunizuotos VPD, arba LCMV ir PBS kontrolėms. Po 8 savaičių pelėms buvo sušviršta LCMV, o dar po keturių dienų buvo nustatomas viruso titras blužnyje. Kiekvienas taškas atspindi atskirą pelę, horizontalus brūkšniukas – visų titrų konkrečioje grupėje aritmetinis vidurkis, punktyrinė linija – minimali titro riba kurią galima nustatyti naudotu metodu. Skirtumai tarp grupių yra statistiškai patikimi ($p < 0,05$) išskyrus skirtumą tarp VP1-GP33-1 ir VP1-GP33-4 grupių.

Vienkartinė pelių profilaktinė imunizacija modelinėmis chimerinėmis VP1-GP33 VPD be adjuvantų indukavo ilgalaikio CTL atsako susidarymą, kuris ~70 % pelių visiškai, o ~ 30 % pelių iš dalies apsaugojo nuo antigenui specifinio viruso infekcijos.

3.3.6. Profilaktinės imunizacijos VP1-GP33 VPD poveikio MCA102-GP33 vėžinių ląstelių augimui tyrimas *in vivo*

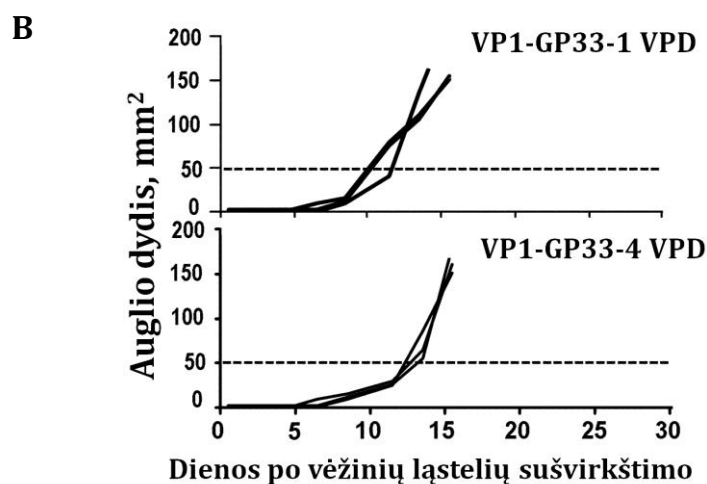
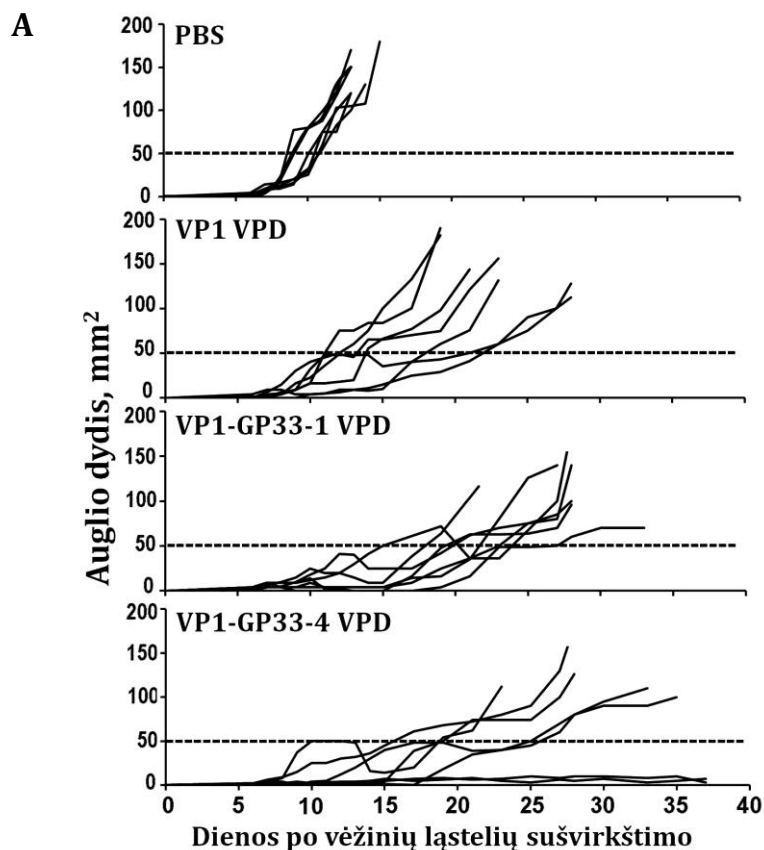
Pelėse susidariusių GP33 specifinių CD8⁺ T ląstelių sugebėjimas žudyti GP33 antigeną turinčias ląsteles *in vivo* buvo tiriamas panaudojant labai agresyvias vėžines MCA102-GP33 fibrosarkomos ląsteles. Tam, VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4), LCMV ar PBS imunizuotoms pelėms, praėjus 8 savaitėms po imunizacijos, po oda buvo sušviršta 1×10^6 MCA102-GP33 fibrosarkomos vėžinių ląstelių. VPD imunizacijos priešvėžinis veikimas pelėse buvo vertinamas kasdien stebint auglio susidarymą, matuojant auglio skersmenį, suskaičiuojant jo dydį (ilgis x plotis, išreiškiama mm²). Norint įsitikinti, kad stebimas poveikis buvo

GP33 antigenui specifinis, dviems pelių grupėms buvo sušvirkšta MCA102 ląstelių, kurios nuo MCA102–GP33 ląstelių skiriasi tuo, kad savo paviršiuje neturi GP33 antigenų. Augliams pasiekus >10 mm skersmenį (dydis >100 mm²) eksperimentas, laikantis etikos taisyklių, buvo nutraukiamas.

Gauti rezultatai parodė, kad pelėse, imunizuotose chimerinėmis VP1–GP33 VPD, GP33 antigenui nespecifinis atsakas (37 pav. A) buvo analogiškas atsakui gautam su kontrolinėmis pelėmis, imunizuotomis su PBS tirpalu (37 pav. B) – visų auglių augimas buvo progresyvus. MCA102–GP33 augliai visose PBS imunizuotose pelėse ir visi MCA102 augliai VP1–GP33 VPD imunizuotose pelėse pasiekė 50 mm² dydį praėjus 12–14 dienų po vėžinių ląstelių sušvirkštimo. Tuo tarpu VP1–GP33 VPD pelėse MCA102–GP33 auglių augimas buvo prislopintas: praėjus 12 dienų po vėžinių ląstelių sušvirkštimo nei viena iš septynių (0/7) iš VP1–GP33–1 VPD imunizuotų pelių ir tik 1/7 VP1–GP33–4 VPD imunizuotų pelių, bei 3/7 VP1 VPD imunizuotų pelių (lyginant su 7/7 kontrolinių pelių) turėjo 50 mm² dydžio auglius. Priešvėžinis VP1–GP33 VPD sukeltas veikimas buvo stipresnis, lyginant su VP1 VPD poveikiu (37 pav. B).

Po dar 10 dienų (22 dieną po vėžinių ląstelių sušvirkštimo) visose 7/7 (100%) VP1 VPD imunizuotose pelėse augliai jau buvo >50 mm² dydžio, o 5/7 (71%) pelių augliai pasiekė 100 mm² dydį. Tuo pat metu 3/7 (42%) ir 4/7 (57%) VP1–GP33–1 ir VP1–GP33–4 VPD imunizuotų pelių (atitinkamai) turėjo <50 mm² dydžio auglius ir tik 1/7 ir 1/7 (14%) auglių pasiekė 100 mm² dydį (37 pav. B).

27 dieną visų 7/7 VP1 VPD imunizuotų pelių augliai buvo didesni nei 100 mm², kai tuo tarpu abiejose chimerinių VP1–GP33 VPD pelių grupėse daugiau nei pusės pelių (4/7 ir 4/7 arba 8/14 57%) augliai buvo mažesni už 100 mm². Be to, 2 iš 7 (28%) VP1–GP33–4 VPD imunizuotų pelių augliai visai neišsivystė (37 pav. B).

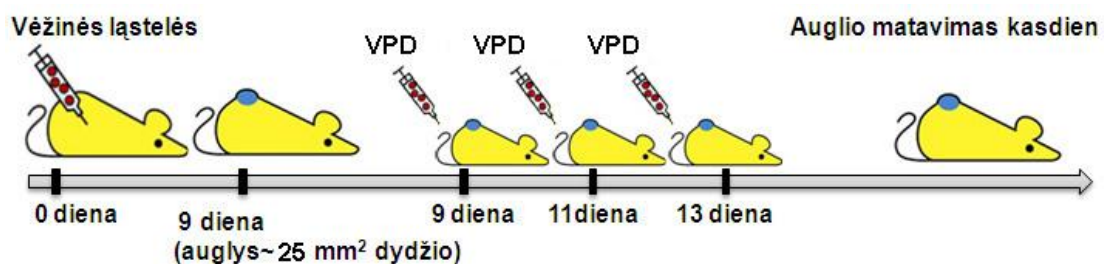


37 pav. MCA102–GP33 auglių augimo pelėse, po profilaktinės imunizacijos VPD, tyrimas. B6 pelės buvo imunizuotos VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4). Po 8 savaičių pelėms po oda buvo sušvirkšta 1×10^6 MCA102-GP33 (A) arba kontrolei MCA102 (B) vėžinių ląstelių suspensijos. Kasdien buvo stebimas auglių augimas, slankmačiu matuojamas jų skersmuo. Kiekviena kreivė atspindi vienos konkrečios pelės auglio dydžio (auglio ilgis x plotis, išreiškiamas mm²) kitimą laike. Paveiksle pateikti vieno konkretaus eksperimento duomenys, viso buvo atlikti trys pakartotiniai eksperimentai. Kai auglių skersmuo pasiekdavo >10 mm eksperimentas buvo sustabdomas.

Vienkartinė pelių profilaktinė imunizacija modelinėmis chimerinėmis VP1-GP33 sulėtino ar laikinai pristabdė agresyvių auglių, turinčių modelinį GP33 antigeną augimą, nes VPD indukavo ilgalaikio specifinio CTL atsako susidarymą.

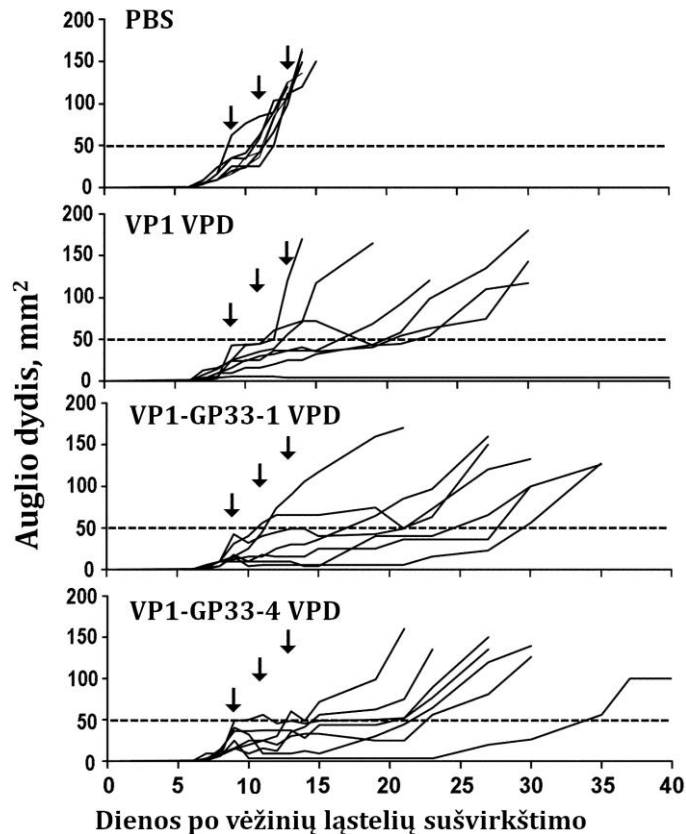
3.3.7. Terapinio priešvėžinio VP1-GP33 VPD poveikio tyrimas *in vivo*

Nustačius, kad pelių profilaktinė imunizacija chimerinėmis modelinėmis VP1-GP33 VPD buvo efektyvi ir visiškai arba dalinai apsaugojo peles nuo viruso infekcijos bei sulėtino auglių augimą buvo ištirtas chimerinių VP1-GP33 VPD terapinis veikimas (38 pav.).



38 pav. Eksperimento, skirto terapiniam modelinių chimerinių VP1-GP33 VPD poveikiui ištirti, schema. B6 pelėms (po 7 peles kiekvienoje grupėje) po oda buvo sušvirškšta po 1×10^6 MCA102-GP33 vėžinių ląstelių. Kai 9 dieną po vėžinių ląstelių suspensijos sušvirškštimo pelėms išsivystė $\sim 25 \text{ mm}^2$ dydžio standūs augliai, pelėms buvo tris kartus kas antrą dieną į veną sušvirškšta po $10 \mu\text{g}$ VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4). Kasdien buvo stebimas ir matuojamas auglių dydžio pasikeitimas.

B6 pelėms (po 7 peles kiekvienoje grupėje) po oda buvo sušvirškšta po 1×10^6 MCA102-GP33 vėžinių ląstelių. 9 dieną po vėžinių ląstelių suspensijos sušvirškštimo pelėms išsivystė $\sim 25 \text{ mm}^2$ dydžio standūs augliai. Po to pelėms tris kartus kas antrą dieną į veną buvo sušvirškščiamas po $10 \mu\text{g}$ VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4). Kasdien buvo stebimas auglių augimas, matuojant jų dydžio pasikeitimus. VPD imunizacijos efektyvumas buvo nustatomas, lyginant laiko intervalus, kurių reikėjo, kad augliai užaugtų iki tam tikro dydžio. Neigiamai kontrolei auglius turinčioms pelėms vietoj VPD buvo švirškščiamas PBS tirpalas.



39 pav. MCA102–GP33 auglių augimo pelėse, po gydymo terapinių VPD injekcijomis, tyrimas. B6 pelėms po oda buvo sušvirkšta MCA102-GP33 vėžinių ląstelių, o augliams užaugus iki ~25 mm² dydžio, pelėms į veną tris kartus 9, 11 ir 13 dienomis (juodos rodyklės) buvo suleista po10 µg VPD (VP1, VP1-GP33-1 ar VP1-GP33-4).

Po terapinių VPD injekcijų visose kontrolinėse pelėse augliai augo progresyviai (39 pav). 12 dieną po vėžinių ląstelių sušvirkštimo visi 7/7 augliai buvo didesni nei 50 mm². Į VPD terapinį sušvirkštimą neragavo ir 2/7 (29 %) VP1 VPD bei 1/7 (14 %) VP1–GP33–1 VPD injekcijas gavusių pelių. Vienai iš terapines VP1 VPD injekcijas gavusiai pelei auglys neaugo nuo eksperimento pradžios. Auglių augimo sulėtėjimas buvo stebimas visose pelių grupėse, gavusiose VPD (VP1–GP33 ir VP1) jau po pirmos VPD injekcijos. VP1–GP33 VPD sukeltas priešvėžinis terapinis poveikis buvo truputį stipresnis nei VP1 VPD. Pelių, gydytų VP1 VPD injekcijomis (išskyrus vieną pelę kurioje 15–19 eksperimento dienomis auglys sumažėjo), augliai augo progresyviai, bet lėčiau, negu pelių gydytų PBS tirpalu. Terapinės chimerinių VP1–GP33 VPD injekcijos auglių augimą pristabdė, sustabdė ar net sukėlė trumpalaikę regresiją. Panašią, tik kiek

stipresnę MCA102–GP33 auglių regresiją sukelia terapinės LCMV injekcijos, kurios taip pat yra laikinos [Prevost-Blondel et al., 1998]. 21 eksperimento dieną didesnius nei 50 mm² auglius turėjo 5/7 (71%) VP1 VPD, ir tik 4/14 (2/7 ir 2/7 arba 29%) VP1–GP33 VPD injekcijomis gydytos pelės. Nors pirminis terapinis VPD poveikis buvo stiprus ir pristabdė auglių augimą, vėliau jie toliau progresyviai augo.

Pelių su standžiais MCA102–GP33 augliais gydymas chimerinių modelinių VP1–GP33 VPD injekcijomis turėjo terapinį priešvėžinį poveikį: sulėtino ar laikinai pristabdė agresyvių auglių augimą.

3.3.8. Teorinių CTL epitopų HaPyV VP1 baltymo sekoje nustatymas

Siekiant nustatyti ar HaPyV VP1 baltymas gali turėti CTL epitopų, su kuriais galėtų kryžmiškai reaguoti GP33 peptidas, internetinėje duombazėje „Immune Epitope Database and analysis resource“ [www.immuneepitope.org] buvo atlikta šio baltymo aminorūgščių sekos analizė ir teorinių HaPyV VP1 baltymo CTL epitopų paieška. Nustatytų galimų epitopų aminorūgščių sekos buvo palygintos su GP33 aminorūgščių seka (naudojantis MUSCLE sekų palyginimo programą) (24 lentelė). Analizės rezultatai parodė, kad VP1 baltymas turi 6 galimus CTL epitopus (apribotus H-2D^b), kurie yra dalinai panašūs į GP33 peptidą. Kadangi CTL peptidų kryžminiam reagavimui užtenka labai nedidelės peptidų homologijos – kelių identiškų ir kelių konservatyviai pakeistų aminorūgščių, teoriškai surasti epitopai ar bent vienas iš epitopų galėtų būti atsakingi už VP1 VPD GP33 specifinio atsako sukėlimą.

24 lentelė. Teoriškai nustatytų galimų HaPyV VP1 CTL epitopų (H-2 Db) dalinai homologiškų GP33 peptidui sąrašas

Nr.	Nustatyti galimi HaPyV VP1 baltymo CTL epitopai	IC50(nM) reikšmė	Epitopo vieta VP1 baltyme (ar.)	GP33 ar. sekos palyginimas su nustatytais galimais CTL epitopais
1	AAIVSIKTV	2301.9	174-182	KAVYNFATM AAIVSIKTV * : . : * :
2	KAMTSTNQV	4088.9	185-193	KAVYNFATM KAMTSTNQV ** : . : :
3	MQFTNTLTT	3155.2	239-247	KAVYNFATM MQFTNTLTT . * *
4	FTNTLTTVL	718.9	241-249	KAVYNFATM- -FTNTLTTVL . . : : * :
5	AADVMGWYI	825.1	268-276	-KAVYNFATM AADVMGWYI- * . :
6	RWVKNPYPV	3325.3	299-307	KAVYNFATM RWVKNPYPV : * * . :

“*” – identiškios ar., “:” – konservatyvūs pakeitimai, “.” – pusiau konservatyvūs pakeitimai. IC50(nM) reikšmės parodo peptido afiniškumą MHC I molekulei: kuo reikšmė yra mažesnė, tuo afiniškumas didesnis. IC50(nM) reikšmės: <50nM – labai aukštas afiniškumas, <500 – vidutinis, <5000 – žemas. Nei vienas iš žinomų T ląstelių epitopų neturi IC50(nM) reikšmės didesnės nei 5000, todėl į lentelę surašyti tik tie peptidai, kurių IC50(nM) reikšmės <5000.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Į virusus panašios dalelės (VPD) yra patraukli rekombinantinių vakcinų kūrimo platforma, pasižyminti svarbiausiais vakcinoms būdingais bruožais [Jennings ir Bachmann, 2007]. Taip yra todėl, kad baltymai, sudarantys VPD, gali savaime susirinkti į daleles, jų gamyba paprasta, o pačios VPD pasižymi adjuvantinėmis savybėmis. Be to, VPD *in vivo* sukelia humoralinio, o kartais ir ląstelinio imuninio atsako susidarymą. Humoralinį imuninį atsaką gali sužadinti daugumos virusų pagrindu sukurtos VPD, tačiau retai kurios VPD stimuliuoja ilgalaikio CTL imuninio atsako susidarymą, ypač nenaudojant papildomų adjuvantų [Martinez et al., 2003; Lacasse et al., 2008; Ding et al., 2009]. Be to, kai kurių virusų VPD galima panaudoti norimų epitopų nešikliais.

HaPyV VP1 baltymo pagrindu sukurtos VPD yra įvairaus ilgio ir kilmės svetimų peptidų intarpus toleruojanti sistema [Gedvilaite et al., 2000, 2004]. Eksperimentais buvo parodyta, kad HaPyV VP1 VPD *in vivo* tinka VPD specifinio humoralinio imuninio atsako sužaditimui, o *in vitro* subrandina žmogaus dendritines ląsteles [Zvirbliene et al., 2006; Lawascheck et al., 2007; Dorn et al., 2008]. Deja, iki šiol nebuvo duomenų apie HaPyV VP1 baltymo pagrindu sukurtų chimerinių VPD gebėjimą sukelti CTL imuninį atsaką, o tokie duomenys yra būtini, norint nustatyti HaPyV VP1 baltymo pagrindu sukurtų VPD tinkamumą vakcinų kūrimui. Šiame darbe buvo ištirtas HaPyV VP1 baltymo tinkamumas būti CTL epitopų nešikliu ir gebėjimas *in vivo* sužadinti konkrečiam antigenui specifinį CTL imuninį atsaką. *In vivo* VPD sukeltas ląstelinis imuninis atsakas buvo tiriamas panaudojant modelines chimerines HaPyV VP1 VPD su GP33 CTL epitopo intarpu.

Įvairūs CTL epitopai į VP1 baltymą buvo įterpti, siekiant nustatyti skirtingų VP1 baltymo vietų tinkamumą svetimų sekų įterpimui bei toleruojamą intarpų kopijų skaičių. Buvo sukurta visa paletė chimerinių

VP1 baltymų. Į VP1 baltymą buvo įterpta nuo vieno iki keturių vienuodų ar skirtingų CTL epitopų kopijų, tačiau, didesnis įterptų epitopų skaičius neigiamai paveikė chimerinių baltymų raišką ir apsunkino VPD gryninimą. Eksperimentai parodė, kad HaPyV VP1 baltymas geriausiai toleravo 1–2 CTL epitopų (Muc, CEA, WT1, htert, TRP, MAGE, Flu, CMV, GP33) kopijų įterpimą, nes gauti chimeriniai baltymai formavo poliomos virusams būdingo dydžio ir formos VPD (17, 16 pav., 20 lentelė). Nors paaiškėjo, kad atskirais atvejais įmanoma gauti VPD į VP1 baltymą įterpiant 3 CTL epitopų kopijas, tačiau tokių chimerinių baltymų sintezė ir VPD formavimasis buvo neefektyvūs. Esant poreikiui į VP1 baltymą įterpti tris skirtingus CTL epitopus, geresnis būdas buvo epitopų įterpimas po vieną į skirtingas VP1 baltymo vietas, o ne sulieto iš trijų epitopų peptido įterpimas į vieną iš VP1 baltymo pozicijų [Aleksaitė ir Gedvilaitė, 2006] (18, 19 pav.). GSSG jungtukų panaudojimas heterologinių sekų įterpimui palengvino chimerinių VPD formavimąsi tik atskirais atvejais. Paprasčiausias, lengviausias ir efektyviausias chimerinių VPD gavimo būdas buvo vienos norimo epitopo kopijos įterpimas į VP1 baltymą.

Be CTL peptidų įterpimo buvo bandoma mielių ląstelėse sintetinti VP1 baltymus su C-galinės baltymo srities iškrita (nuo 4 VP1 pozicijos - 288-295 ar. iki baltymo galo) bei su prijungtais ir baltymo gale kabančiais įvairaus ilgio peptidais (22 pav.). Šis chimerinių VPD gavimo būdas buvo panaudotas, nustatant, kad HaPyV VP1 baltymai turintys sutrumpintą C-galinę baltymo sritį, kuri *in vivo* yra labai imunogeniška, kai kuriais atvejais formuoja VPD [Gedvilaitė et al., 2006]. Rezultatai nebuvo labai sėkmingi, nes VP1 baltymai, turintys sutrumpintą C-galinę baltymo dalį ir su prijungtais trumpais (9 ar. – vienas CTL epitopas) ir ilgesniais (27 ar. – trys sulieti CTL epitopai ir 239 ar. – eGFP baltymas) peptidais formavo tik pavienes VPD, pentametrus bei jų agregatus, t. y., VPD formavimasis buvo neefektyvus (22, 23 pav.).

Kadangi daugumos chimerinių baltymų su CTL epitopų intarpais raiška ir išgrynintų baltymų išeigos buvo mažesnės negu nemodifikuoto VP1 baltymo, buvo ieškoma būdų, kaip pagerinti chimerinių VPD gavimą. Vienas iš tokių būdų buvo mozaikinių VPD gaminimas, kai vienu metu su chimeriniais baltymais mielių ląstelėse buvo sintetinami ir nemodifikuoti viruso struktūriniai baltymai (VP1 arba VP2) (22 lentelė). Chimeriniams baltymams su įterptais trumpais CTL epitopais (9 ar.) „pagalbinio“ VP1 baltymo sintezė padėjo: pagerėjo chimerinio baltymo raiška, tirpumas ir VPD formavimosi efektyvumas, dėl to baltymų gryninimas tapo lengvesnis, o išeigos didesnės. Chimeriniams baltymams su ilgesniu trigubu CTL epitopu (27 ar.) VP1 baltymo „pagalbininko“ pridėjimas šiek tiek padidino išgrynintų baltymų išeigas, tačiau VPD formavimosi efektyvumo nepagerino. Panaudojus VP1 baltymą „pagalbininką“ su chimeriniais VP1 baltymais, turinčiais C-galinės dalies iškritą, mozaikinės VPD formavosi tik tada, kai VP1 C-gale buvo prikabintas vienas CTL epitopas (9 ar.) ar visas eGFP baltymas, bet nesiformavo, kai buvo prijungtas ilgesnis 27 ar. trijų CTL epitopų peptidas. Mozaikinių VPD formavimosi galimybes įtakojo prijungtų konkrečių sekų savybės. Nors eGFP baltymas, lyginant su CTL epitopais, yra didelis (239 ar. ilgio), bet jis tirpus ir hidrofiliškas baltymas, tuo tarpu TMH peptidą sudaro tik 27 ar., tačiau dauguma jų hidrofobinės. TMH peptido prijungimas akivaizdžiai trukdė mozaikinių VPD formavimuisi. VP1 baltymo „pagalbininko“ panaudojimas pasiteisino gaminant mozaikines VPD su chimeriniais VP1 baltymais, turinčiais trumpų peptidų intarpus (pagerino chimerinių baltymų sintezę, gryninimą ir VPD išeigas), tačiau netiko mozaikinių VPD iš chimerinių VP1 baltymų, turinčių C-galinės baltymo dalies iškritą gavimui.

Apibendrinant CTL epitopų įterpimo į VP1 baltymą rezultatus galima teigti, kad chimerinių VPD savybės labai priklauso nuo konkrečios į VP1 baltymą įterptos svetimės sekos savybių (ypač nuo jos hidrofobiškumo). Kiekvienam įterpiamam antigenui reikia parinkti konkrečiai jam

tinkamiausią chimerinių VPD gavimo būdą: įterpimo vietą, intarpų kopijų skaičių, papildomų sekų-jungtukų panaudojimą, pagalbinių nemodifikuotų baltymų pridėjimą ir kt.

Dalis šiame darbe sukurtų chimerinių VPD (su 1 ar 2 CTL epitopų intarpais) buvo panaudotos pelių imunizacijoms ir VPD sukkelto intarpui specifinio humoralinio imuninio atsako tyrimui. Rezultatai parodė, kad chimerinių HaPyV VP1 pagrindu sukurtos VPD su CTL epitopų intarpais (MUC, CEA, MAGE, WT1) *in vivo* sukelia ilgalaikį epitopui specifinį humoralinį atsaką [Zvirbliene et al., 2006 ir neskelbti duomenys; Lawascheck et al., 2007; Dorn et al., 2008]. Sukurtos chimerinės HaPyV VP1 VPD prisidėjo prie monokloninių antikūnų prieš trumpus peptidus, kurie, kol nėra sulieti su VP1 baltymu, yra visiškai neimunogeniški, gamybos technologijos sukūrimo ir užpatentavimo [Zvirbliene et al., 2006]. Įdomu, kad prieš į chimerines VP1-MUC1 VPD įterptą vėžinį Muc CTL epitopą sukurti specifiniai monokloniniai antikūnai atpažino įvairias savo paviršiuje turinčias pakitusį mucino 1 baltymą vėžines ląsteles, tačiau neatpažino sveikų ląstelių, kurių mucino 1 baltymas buvo nepakitęs. Be to, VP1-MUC1 VPD efektyviai brandino žmogaus dendritines ląsteles, kurios stimuliuo antigenui specifines T ląsteles *in vitro* [Dorn et al., 2008].

Siekiant atsakyti į pagrindinį šio darbo klausimą – ar gali HaPyV VP1 baltymo pagrindu sukurtos chimerinės VPD sukelti įterptam konkrečiam epitopui specifinį CTL imuninį atsaką, buvo sukurtos chimerinės VP1-GP33 VPD su modeliniu CTL epitopu – GP33 (LCMV glikoproteino antigenas) (22, 25 pav.). GP33 modelinis antigenas buvo pasirinktas dėl patogumo, nes turėjome reikiamus įrankius norimiems eksperimentams atlikti: LCMV virusą, antikūnų prieš LCMV, vėžinių ląstelių savo paviršiuje turinčių GP33 antigeną (MCA102-GP33), taip pat transgeninių pelių P14, kurių >90 % CTL ląstelių yra GP33 specifinės. Pasigamintos modelinės chimerinės VP1-GP33 VPD buvo panaudotos GP33 specifinio imuninio

atsako *in vivo* tyrimams. Gryninant VP1-GP33 VPD buvo patobulinta chimerinių VPD gryninimo schema, todėl pagerėjo išgrynintų VPD kokybė, o išgrynintų VPD išeigos prilygo nemodifikuoto VP1 baltymo išeigoms (25 pav.).

Analizuojant VP1-GP33 VPD gebėjimą sukelti CTL imuninį atsaką, pirmiausiai buvo tiriamas modelinių chimerinių VP1-GP33 VPD gebėjimas stimuliuoti dendritines ląsteles (DL), nes be VPD patekimo į antigenus pateikiančiąsias ląsteles CTL imuninis atsakas neįmanomas. Skirtingai nuo GP33 peptido, kuris šiame darbe buvo naudojamas teigiamoms kontrolėms, VPD negali tiesiogiai prisijungti prie MHC I klasės molekulių. VPD turi būti dendritinių ląstelių sugautos, procesuotos ir tik tada, kai gautas teisingas CTL antigenas pateikiamas subrendusios DL paviršiuje, DL gali stimuliuoti CTL ląsteles (6 pav.). Atliktų eksperimentų rezultatai parodė, kad modelinės VP1-GP33 VPD ne tik efektyviai stimuliuo DL brendimą *in vitro*, bet taip pat gerai kaip ir GP33 peptidas aktyvavo GP33 antigenui specifinių pelių blužnies CD8⁺ ląstelių proliferaciją (30, 31, 32 pav.). Be to, VP1-GP33-4 VPD subrandintos DL stimuliuo P14 pelių blužnies GP33 antigenui specifinių CD8⁺ T ląstelių proliferaciją geriau, negu pats GP33 peptidas ar DL, paveiktos GP33 peptidu. Gauti rezultatai patvirtino, kad GP33 CTL antigenas, įterptas į HaPyV VP1 baltymą, DL buvo teisingai procesuotas ir teisingas GP33 peptidas buvo kryžmiškai pateiktas DL paviršiuje. VPD kryžminį pateikimą su nesireplikuojančiomis VPD yra aprašę ir kiti autoriai [Keller et al., 2010; Storni and Bachmann 2004; Ruedl et al., 2002; Storni et al., 2002].

Siekiant nustatyti, ar VP1-GP33 VPD *in vivo* gali sukelti GP33 specifinį ilgalaikį imuninį atsaką, pelėms vieną kartą be jokių adjuvantų buvo sušvirkšta VPD. VP1-GP33 VPD imunizuotų pelių blužnies GP33 antigenui specifinių CD8⁺ T ląstelių gebėjimas proliferuoti įrodė, kad pelėse susidarė atminties CD8⁺ T ląstelės, kurios sugebėjo atpažinti GP33 antigeną bei

dalintis. Nors aprašyti eksperimentai parodė, kad VP1-GP33 VPD injekcija sukėlė GP33 specifinio CTL imuninio atsako susidarymą, bet dar neįrodė CTL ląstelių gebėjimo atlikti savo pagrindinę efektorinę funkciją – žudyti taikinio ląsteles. GP33 antigenui specifinių CD8⁺ T ląstelių efektorinė funkcija buvo tiriama, atliekant eksperimentus su LCMV ir MCA102-GP33 vėžinėmis ląstelėmis, nes tiek LCMV užkrėstos ląstelės, tiek MCA102-GP33 vėžinės ląstelės turi GP33 antigeną ir yra GP33 specifinių CTL ląstelių taikiniai.

Yra žinoma, kad LCMV infekciją reguliuoja CD8⁺ ląstelės, todėl viruso aptikimas blužnyje 4–5 dieną po LCMV sušvirkštimo byloja apie CTL ląstelių pelėse neveiklumą [Bachmann, 1997]. Vieną kartą peles imunizavus modelinėmis VPD be adjuvantų net 7 iš 10 (70 %) pelių buvo visiškai apsaugotos nuo viruso infekcijos, o 3 iš 10 (30 %) pelių buvo apsaugotos dalinai (36 pav.). Dalinė, o ne pilna apsauga nuo viruso infekcijos, kai kuriose pelėse galėjo būti gauta todėl, kad buvo sužadintas nepakankamas (slenkstinis) GP33 specifinių CD8⁺ ląstelių kiekis, neužtikrinantis pilnos apsaugos nuo LCMV infekcijos. Eksperimentai parodė, kad chimerinėmis VPD imunizuotų pelių GP33 specifinė CD8⁺ ląstelių proliferacija *in vitro* buvo silpnesnė nei LCMV imunizuotų pelių (33 pav.), kurios buvo visiškai apsaugotos nuo LCMV infekcijos. Literatūroje yra duomenų, kad net tokio stipraus antigeno, kaip hepatito B viruso šerdies antigeno pagrindu sukurtos chimerinės VPD su tuo pačiu GP33 epitopu, visiškai apsaugojo peles nuo viruso infekcijos tik panaudojus adjuvantą (CpG turtingas DNR sekas) [Storni et al., 2002]. Mūsų atliktuose eksperimentuose virusu infekuotos ląstelės *in vivo* CTL ląstelių buvo visiškai arba dalinai sunaikintos, todėl tai įrodo, kad VP1-GP33 VPD sukėlė efektyvaus imuninio atsako susidarymą.

VP1-GP33 VPD imunizuotų pelių atsparumo labai agresyvių MCA102-GP33 vėžinių ląstelių augimui tyrimas papildė ir patvirtino pelių

apsaugojimo nuo LCMV infekcijos eksperimento rezultatus. Tik profilaktiškai LCMV imunizuotos pelės būna visiškai apsaugotos nuo MCA102-GP33 vėžinių ląstelių augimo. Terapinės LCMV injekcijos MCA102-GP33 auglio augimą sustabdo tik laikinai: augliai kuriam laikui sumažėja ar visai išnyksta, tačiau vėliau pradeda augti auglių „escape“ variantai, kurių vėžinės ląstelės praranda GP33 antigeną [Blohm et al., 2002].

Pelėse, kurios buvo profilaktiškai imunizuotos VP1-GP33 VPD, MCA102-GP33 auglių vystymasis ir augimas buvo lėtesnis, lyginant su VPD neimunizuotomis pelėmis, vadinasi, GP33 antigenui specifinės atminties CD8⁺ T ląstelės buvo suaktyvintos ir turėjo citotoksinį poveikį. Duomenis apie profilaktinių VP1-GP33 VPD injekcijų sukeltą efektyvų CTL imuninį atsaką pelėse sustiprino ir rezultatai gauti po terapinių VPD injekcijų. Pelėms su jau pradėjusiais augti MCA102-GP33 augliais terapiškai sušvirškus VP1-GP33 VPD, auglių augimas sulėtėjo arba laikinai sustojo, reiškia gydymui panaudotos VPD aktyvavo pelių imuninę sistemą, kuri atpažino auglį ir ėmė naikinti vėžines ląsteles. Terapinis VP1-GP33 VPD poveikis ypatingai svarbus, nes jis parodo, jog VPD aktyvintas imunitetas kovojo ne tik su pavienėmis vėžinėmis ląstelėmis (profilaktinio eksperimento metu pelėms buvo sušvirškčiama ląstelių suspensija), bet sugebėjo kovoti ir su jau esančiu standžiu augliu (terapinis poveikis), kuris imuninės sistemos ląstelėms yra daug sunkiau prieinamas. Kaip ir LCMV atveju, VPD sukeltas priešvėžinis veikimas buvo laikinas. Be to, jis buvo trumpesnis, negu LCMV atveju, nes GP33 specifinės CD8⁺ T ląstelės negamino IFN γ , kuris, kaip nustatyta, yra būtinas MCA102-GP33 ląstelių žudymui [Blohm et al, 2002]. Ateityje būtų įdomu paanalizuoti, koku keliu VPD indukuotos CTL ląstelės žudė taikinio ląsteles.

Nemodifikuoto VP1 baltymo formuojamos VPD, mūsų nuostabai, taip pat sukėlė dalinį priešvėžinį ir silpną priešvirusinį atsaką. Tai reikštų, kad

VP1 VPD, nors silpniau negu VP1-GP33 VPD, bet aktyvavo GP33 specifines CD8⁺ T ląsteles. Priešvėžinis VPD veikimas buvo gautas panašus visose VPD imunizuotų pelių grupėse, o esami auglių dydžio kitimo kreivių skirtumai buvo ryškesni ankstesnėse eksperimento stadijose (37, 39 pav.). Vienas iš paaiškinimų galėtų būti VP1 VPD nespecifinis imuninės sistemos aktyvavimas, kuris ir padėjo kovoti su virusu infekuotomis arba vėžinėmis ląstelėmis. Tačiau eksperimentai parodė, kad VP1-GP33 VPD specifiškai aktyvavo CD8⁺ T ląsteles *in vitro* (30 pav.), o profilaktinės VPD imunizacijos sulėtino tik MCA102-GP33, bet ne MCA102 vėžinių ląstelių augimą (37 pav.). Kita VP1 VPD sukulto veikimo priežastis galėtų būti kryžmiškai su GP33 epitopu reaguojančių atminties CD8⁺ T ląstelių aktyvavimas. Yra žinoma, kad aktyvinant antigenui specifines atminties CTL ląsteles, TCR receptorius, skirtingai nei pirminio imuninio atsako metu, sąveikauja tik su keliomis peptido aminorūgštimis. Peptidas, esantis komplekse su MHC, gali būti tik panašus, nebūtinai identiškas tikrajam CTL epitopui. Kryžmiškai reaguojantis epitopas gali turėti kelių aminorūgščių pakeitimus arba būti visai kitos kilmės ir atsitiktinai reikiamoje vietoje turėti kelias aminorūgštis, kurių užtenka prisijungimui prie TCR, esančiam atminties ląstelių paviršiuje. Toks kryžminis reaktyvumas yra pastebėtas tarp visai nesusijusių virusų, pvz., LCMV ir Vaccinia [Kim et al., 2005], gripo ir HIV [Acierno et al., 2003], papiloma ir corona [Nilges et al., 2003] virusų. Galbūt panašus kryžminis reaktyvumas yra ir tarp LCMV bei HaPyV. Internetinėje imuninių epitopų duomenų bazėje [Selin et al., 2006] pavyko nustatyti, kad HaPyV VP1 baltymas turi 6 potencialius CTL epitopus (H-2D^b), kurie yra panašūs į GP33 ir galėtų kryžmiškai reaguoti su GP33 specifinėmis CTL ląstelėmis (24 lentelė). Norint šią hipotezę patvirtinti, reiktų atlikti papildomus eksperimentus, pvz., pakeisti kelias VP1 aminorūgštis aptiktų CTL epitopų vietose ir patikrinti, ar dingsta kryžminis reagavimas bei nustatyti kaip pakinta tokių VPD sukeltas imuninis atsakas.

Šiame darbe panaudotos modelinės chimerinės VP1-GP33 VPD tarpusavyje skyrėsi tik GP33 intarpo vieta VP1 baltyme: VP1-GP33-1 epitopas yra tarp 80-89 ar., o VP1-GP33-4 VPD tarp 288-295 ar. Įvertinus gautus rezultatus, galima teigti, kad abiejų rūšių VPD buvo efektyvios visuose atliktuose eksperimentuose, tačiau aktyvinant CTL ląsteles geresni rezultatai buvo gauti su VP1-GP33-4 VPD, o stimuliuojant humoralinį imuninį atsaką – su VP1-GP33-1 VPD. Šie rezultatai sutapo su duomenimis, gautais panaudojant HaPyV VP1 pagrindu sukurtas chimerines VP1-CEA VPD (su įterptu CEA epitopu), kai stipresnį humoralinį imuninį atsaką prieš intarpą sukėlė VP1-CEA-1 VPD. Skirtumai tarp VP1-GP33-1 ir VP1-GP33-4 VPD ar VP1-CEA-1 ir VP1-CEA-4 VPD, sužadinant imuninį atsaką, gali būti susiję su skirtingu peptidų pateikimu VP1 baltymo paviršiuje, o tai gali įtakoti antikūnų susidarymo efektyvumą. Be to, VP1 baltymo vieta, į kurią įterptas tikslinis antigenas, dėl intarpus supančių skirtingų aminorūgščių gali paveikti VPD procesavimo į peptidus efektyvumą antigenus pateikiančiose ląstelėse ir atitinkamai – CTL atsako kokybę.

Šiame darbe buvo parodyta, kad peles imunizavus VP1-GP33 VPD susidaro VPD specifiniai antikūnai (29 pav.). Literatūroje yra duomenų, kad VPD specifinių antikūnų buvimas gali slopinti CTL imuninio atsako susidarymą [Da Silva et al., 2001], bet dažniau pasitaiko atveju, kai jį sustiprina [Den Hann ir Bevan, 2002; Kalergis ir Ravetch, 2002; Ruedl et al., 2005]. Modelinės chimerinės VP1-GP33 VPD sužadino tiek humoralinio, tiek ląstelinio imuninio atsako susidarymą, todėl panašu, jog antikūnų, specifinių chimerinėms VPD, buvimas CTL atsakui netrukdo. Gali būti, kad VPD specifinių antikūnų buvimas padeda antigenus pateikiančiosioms ląstelėms sugauti VPD (opsonizacija), o tai atitinkamai sustiprina CTL ląstelių aktyvavimą. HaPyV VP1 pagrindu sukurtų VPD gebėjimas sukelti tiek humoralinį, tiek ląstelinį imuninį atsaką gali būti šių VPD pranašumas.

Apibendrinant, HaPyV VP1 baltymas yra geras CTL epitopų nešiklis, o jo pagrindu sukurtos chimerinės VPD yra tinkamos vakcinų, skirtų imuniniam atsakui prieš norimą CTL epitopą sukelti, kūrimui. Chimerinės HaPyV VP1 baltymo pagrindu sukurtos VPD *in vivo* yra procesuojamos dendritinėse ląstelėse, įterpti CTL epitopai yra kryžmiškai pateikiami dendritinių ląstelių paviršiuje ir yra sukeliama šiems CTL epitopams specifinis imuninis atsakas. VP1 pagrindu sukurtos chimerinės VPD yra universalios, nes jos gali būti naudojamos ir humoraliniam, ir ląsteliniam antigenui specifiniam imuniniam atsakui sukelti bei tinka tiek profilaktinių, tiek terapinių vakcinų kūrimui.

5. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Į virusus panašios dalelės (VPD) gali būti perspektyvi peptidinių vakcinų, skirtų imuniniam atsakui prieš CTL epitopus sukelti, alternatyva, kadangi VPD pasižymi virusams būdingomis savybėmis – pasikartojančiu paviršiumi, virusine kilme, dydžiu, gebėjimu sukelti humoralinį ir (ar) ląstelinį imuninį atsaką. Šiame darbe buvo parodytos rekombinantinių HaPyV VP1 baltymų formuojamų VPD panaudojimo priešvėžinių vakcinų kūrimui galimybės, įvertintas svetimų CTL epitopų įterpimo į VP 1 baltymą toleravimas, VPD formavimosi efektyvumas bei įterptam antigenui sukeltas specifinis imuninis atsakas.

Pirmiausia buvo sukurti mielių *Saccharomyces cerevisiae* producentai, gaminantys HaPyV VP1 pagrindu sukonstruotus chimerinius (su įvairiais CTL epitopų intarpais) baltymus, su kuriais buvo ištirtos HaPyV viruso pagrindinio kapsidės baltymo VP1 – svetimų CTL epitopų nešiklio, savybės. Buvo nustatyta, kad HaPyV VP1 toleruoja įvairius CTL epitopų interpus, todėl šis baltymas tinka chimerinių VPD gavimui mielėse *S. cerevisiae*. Buvo parodyta, kad HaPyV VP1 baltymas geriausiai toleravo vieno ir dviejų CTL epitopų kopijų įterpimą. Taip pat buvo nustatyta, kad GSSG jungtukų panaudojimas svetimų sekų įterpimui palengvino chimerinių VPD formavimąsi tik atskirais atvejais. Ištyrėme, kad chimerinių VPD su trimis skirtingais CTL epitopais gavimui geriau buvo po vieną CTL epitopus įterpti į skirtingas VP1 baltymo pozicijas, negu ilgesnio polipeptido, gauto suliejus tris CTL epitopus, įterpimas į vieną VP1 baltymo vietą. Nustatėme, kad VP1 baltymo su sutrumpintu C-galu panaudojimas CTL epitopų prijungimui netinka. Pasiteisino mozaikinių VPD, sudarytų iš „pagalbinio“ nemodifikuoto VP1 baltymo ir chimerinių VP1 baltymų kūrimas, nes pagerėjo chimerinių baltymų raiška ir išgrynintų VPD išėigos. Taip pat buvo sukurta efektyvesnė chimerinių VPD

gryninimo schema, kuri sutrumpino ir atpigino chimerinių VPD gryninimą, padidino išgrynintų VPD išeiigas.

Buvo ištirtas chimerinių VPD su įterptais CTL epitopais gebėjimas sukelti antikūnų prieš įterptus peptidus sintezę pelėse. Buvo nustatyta, kad chimerinės VPD su CTL epitopų tarpais (MUC, CEA, GP33) pelėse sukėlė VP1 baltymui bei įterptiems 9 aminorūgščių ilgio CTL epitopams specifinį humoralinį imuninį atsaką. Stipresnis atsakas buvo su VPD, turinčiomis CTL epitopą 1-ojoje VP1 baltymo pozicijoje (80-89 ar.).

Norint ištirti HaPyV VP1 pagrindu sukurtų chimerinių VPD gebėjimą sukelti įterptai sekai specifinį CTL imuninį atsaką, buvo sukurtos chimerinės VP1-GP33 VPD, turinčios įterptą modelinį GP33 CTL epitopą.

Pirmiausia su modelinėmis chimerinėmis VPD *in vitro* buvo ištirtas VPD gebėjimas subrandinti dendritines ląsteles bei stimuliuoti GP33 antigenui specifines CTL ląsteles. Taip pat buvo parodyta, kad chimerinės VPD su CTL epitopų tarpais žmogaus bei pelės dendritinių ląstelių buvo teisingai procesuojamos, jas subrandino, o subrendusios dendritinės ląstelės efektyviai stimuliuo epitolui specifines CTL ląsteles.

Tiriant modelinių chimerinių VP1-GP33 VPD gebėjimą sukelti GP33 specifinį CTL imuninį atsaką *in vivo*, buvo parodyta, kad vienkartinis VPD sušvirkštimas be jokių adjuvantų pelėse sužadino ilgalaikio GP33 antigenui specifinio imuninio atsako susidarymą, o susidaręs imuninis atsakas buvo efektyvus – jis iš dalies arba visiškai apsaugojo peles nuo LCMV infekcijos. Be to, buvo nustatyta, kad profilaktinė pelių imunizacija modelinėmis VPD be adjuvantų pristabdė modeliniam antigenui specifinių vėžinių ląstelių augimą, o pakartotiniai terapiniai VPD sušvirkštimai slopino jau esamų antigenui specifinių auglių augimą.

HaPyV VP1 baltymas yra geras CTL epitopų nešiklis, o jo pagrindu sukurtos chimerinės VPD tinka vakcinų, skirtų imuniniam atsakui prieš norimą CTL epitopą sukelti, kūrimui.

IŠVADOS

1. HaPyV viruso pagrindinis kapsidės baltymas VP1 toleruoja įvairių svetimų CTL epitopų tarpus, todėl VP1 yra tinkamas baltymas-nešiklis chimerinių VPD gavimui mielėse *S. cerevisiae*.
2. Chimerinių VPD savybės priklauso nuo konkrečios į VP1 baltymą įterptos svetimos sekos savybių, tačiau parinkus įterpiamam antigenui tinkamiausią chimerinių VPD gavimo būdą (įterpimo vietą, tarpų kopijų skaičių, papildomų sekų-jungtukų panaudojimą, pagalbinių nemodifikuotų baltymų pridėjimą ir kt.) galima pagerinti VPD susidarymo efektyvumą ir išeigas.
3. Chimerinės HaPyV VP1 pagrindu sukurtos VPD su CTL epitopų tarpais pelėse sukelia tiek baltymui nešikliui, tiek ir įterptiems CTL epitopams specifinį humoralinį imuninį atsaką.
4. Chimerinės HaPyV VP1 VPD su CTL epitopų tarpais subrandina dendritines ląsteles, kurios efektyviai stimuliuoja į VP1 baltymą įterptam epitopui specifines CTL ląsteles *in vitro*.
5. Modelinių chimerinių VP1-GP33 VPD sušvirkštimas pelėms sužadina antigenui specifinio CTL imuninio atsako susidarymą *in vivo*:
 - 5.1 vienkartinė pelių imunizacija chimerinėmis VP1-GP33 VPD be jokių adjuvantų sužadina ilgalaikio antigenui specifinio CTL imuninio atsako susidarymą ir visiškai arba iš dalies apsaugo peles nuo modeliniam CTL epitopui specifinio LCMV viruso infekcijos;
 - 5.2 profilaktinė pelių imunizacija VP1-GP33 VPD be adjuvantų pristabdo modeliniam antigenui specifinių vėžinių ląstelių augimą, o pakartotinės terapinės injekcijos slopina jau esamų auglių augimą.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

1. Dorn DL, Lawatscheck R, Zvirbliene A, **Aleksaite E**, Pecher G, Sasnauskas K, Özel M, Raftery M, Schönrich G, Ulrich RG, Gedvilaite A. Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope. *Viral Immunol.* **2008.** 21(1):12-27.
2. Lawatscheck R*, **Aleksaite E***, Schenk JA, Micheel B, Jandrig B, Holland G, Sasnauskas K, Gedvilaite A, Ulrich RG. Chimeric polyomavirus-derived virus-like particles: the immunogenicity of an inserted peptide applied without adjuvant to mice depends on its insertion site and its flanking linker sequence. *Viral Immunol.* **2007.** 20(3):453-60.
**du pirmieji autoriai, abiejų indėlis vienodas.*
3. Gedvilaite A, **Aleksaite E**, Staniulis J, Ulrich R, Sasnauskas K. Size and position of truncations in the carboxy-terminal region of major capsid protein VP1 of hamster polyomavirus expressed in yeast determine its assembly capacity. *Arch Virol.* **2006.** 151(9):1811-25.
4. **Aleksaite E**, Gedvilaite A. Generation of chimeric hamster polyomavirus VP1 virus-like particles harboring three tumor-associated antigens. *Biologija.* **2006.** 3: 83–87.

KONFERENCIJOS

1. Stendinis pranešimas „Chimeric virus-like particles based on HaPyV VP1 with model GP33 peptide insert induce protective CTL immune response against virus and tumor challenge” 14-tame tarptautiniame imunologų kongrese (**E. Aleksaite**, A. Gedvilaite, U. Blohm; 2010 08 20-29; Kobe, Japonija).
2. Stendinis pranešimas „Hamster polyomavirus-derived recombinant virus-like particles induce activation and maturation of murine and human dendritic cells” 14-tame tarptautiniame imunologų kongrese (A. Gedvilaite, A. Zvirbliene, **E. Aleksaite**, U. Blohm, R. Ulrich; 2010 08 20-29; Kobė, Japonija).
3. Stendinis pranešimas „Assembly capacity of major capsid protein VP1 of hamster polyomavirus are influenced by size and position of truncations at its carboxy-terminal region” 35-ajame FEBS kongrese (A. Gedvilaite, **E. Aleksaite**; 2010 06 26 - 07 01; Gioteburgas, Švedija).
4. Stendinis pranešimas „Generation of chimeric hamster polyomavirus VP1 virus-like particles harboring three tumor-associated antigens” IX-jame Lietuvos biochemikų draugijos suvažiavime (**E. Aleksaite**, A. Gedvilaite; 2006 06 16-18; Tolieja, Lietuva).

FINANSINĖ PARAMA

Šis darbas iš dalies buvo finansuojamas iš Biotechnologijos instituto ir Humbolto Universiteto Virusologijos instituto projekto WTZ-LTU-20-002 „Virusus primenančių dalelių panaudojimas priešvėžinių vakcinų kūrimui“ lėšų, taip pat Lietuvos valstybinio mokslo ir studijų fondo projektų Nr. V-03029, V-04027, V-05093 lėšų.

Eglės Mažeikės stažuotė Vokietijoje (Friedrich-Löffler Institute) iš dalies finansavo Vokietijos katalikiškasis akademinių mainų fondas KAAD (*vok.* Katholischer Akademischer Ausländer-Dienst).

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė Ankstesnė pavardė	Eglė Mažeikė Aleksaitė
Gimimo data	1981 05 07
Darbo adresas	Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas, Eukariotų genų inžinerijos skyrius, V.A. Graičiūno g. 8-207, Vilnius LT-02241, Lietuva
Telefonai	+370 5 2602888 (darbo) +370 670 13562 (asmeninis)
Faksas	+370 5 2 2602116
E-pašto adresai	aegle@ibt.lt, Egle.Mazeike@bti.vu.lt (darbo) Egle.Mazeike@gmail.com (asmeninis)
Išsilavinimas	
1999 – 2003	Biochemijos bakalauras Vilniaus Universitetas (Vilnius, Lietuva)
2003 – 2005	Biochemijos magistras Vilniaus Universitetas (Vilnius, Lietuva)
2005 – 2009	Biochemijos doktorantūros studijos Vilniaus Universitete ir Biotechnologijos institute (Vilnius, Lietuva)
Darbo patirtis	Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriaus:
2002 – 2005	Laborantė
2005 – 2009	Bioinžinierė
2009 – dabar	Jaunesnioji mokslo darbuotoja

NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Acierno PM, Newton DA, Brown E.A, Maes LA, Baatz JE, Gattoni-Celli S. Cross-reactivity between HLA-A2-restricted FLU-M1:58-66 and HIV p17 GAG:77-85 epitopes in HIV-infected and uninfected individuals. *J Trans Med.* 2003. 1:3-7.
2. Acres B, Limacher JM, Bonnefoy JY. Discovery and development of therapeutic cancer vaccines. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007. 10:185-192.
3. Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, and Torres-Suarez AI. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers – liposomes and microspheres – on the phagocytosis by macrophages. *J. Control. Release.* 2002. 79, 29–40.
4. Aichele P, Kyburz D, Ohashi PS, Odermatt B, Zinkernagel RM, Hengartner H et al. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *PNAS.* 1994. 91(2):444-8.
5. Aichele P, Kyburz D, Ohashi PS, Odermatt B, Zinkernagel RM, Hengartner H, Pircher HP. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *PNAS.* 1994. 91(2):444-8.
6. Aleksaite E, Gedvilaite A. Generation of chimeric hamster polyomavirus VP1 virus-like particles harboring three tumor-associated antigens. *Biologija.* 2006. 3: 83–87.
7. Allander T, Andersson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Presson MA et al. Identification of the third human polyomavirus. *J Virol.* 2007. 81:4130-6.
8. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures.* Atlanta, GA: American Cancer Society. 2009.
9. Andreasson K, Tegerstedt K, Eriksson M, Curcio C, Cavallo F, Forni G, Dalianis T, Ramqvist T. Murine pneumotropic virus chimeric Her2/neu virus-like particles as prophylactic and therapeutic vaccines against Her2/neu expressing tumors. *Int J Cancer.* 2009. 1;124(1):150-6.
10. Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol.* 1994. 24(5):1097-1101.
11. Bachmann MF and Zinkernagel RM. Neutralizing antiviral B-cell responses. *Annu Rev Immunol.* 1997. 15, 235–270.
12. Bachmann MF and Zinkernagel RM. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotypeformation. *Immunol Today.* 1996. 17, 553–558.
13. Bachmann MF, Hengartner H and Zinkernagel RM. T helper cell-independent neutralizing B-cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B-cell induction? *Eur J Immunol.* 1995. 25, 3445–3451.
14. Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, Burki K, Hengartner H and Zinkernagel RM. The influence of antigen organization on B-cell responsiveness. *Science.* 1993. 262, 1448–1451.
15. Bachmann, MF. Evaluation of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T cell responses. In: *Immunology Methods Manual.* Lefkovits I, editor. New York, Academic Press Ltd. 1997. 1921-1933.
16. Balsari A, Marolda R, Gambacorti-Passerini C, Sciorelli G, Tona G, Cosulich E, Taramelli D, Fossati G, Parmiani P, Cascinelli N. Systemic administration of autologous, alloactivated helper-enriched lymphocytes to patients with metastatic melanoma of the lung: a phase I study. *Cancer Immunol Immunother.* 1986. 21:148-155.

17. Baron-Bodo V, Doceur P, Lefebvre ML, Labroquere K, Defaye C, Boyer A, Nardin A. Anti-tumor properties of human-activated macrophages produced in large scale for clinical application. *Immunobiology*. 2005. 210:267-277.
18. Barouch D H and Harrison S. Interactions among the Major and Minor Coat Proteins of Polyomavirus. *J Virol*. 1994. 168:3982-3989.
19. Battegay M, Cooper S, Althage A, Baenziger J, Hengartner H, Zinkernagel RM. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24 or 96 well plates. 1991. *J Virol Methods* 33: 191-198.
20. Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M. Cancer immunotherapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009. 46:167-189.
21. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signaling. *Nature*. 1998. 393(6684), 478–480.
22. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic T-lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Ann Rev Immunol*. 1994. 12, 735–773.
23. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest*. 2004. 113:1515-1525.
24. Blohm U, Roth E, Brommer K, Dumrese T, Rosenthal FM, Pircher H. Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 2002. 169(10):5522-30.
25. Bok RA. Treatment of prostate cancer: therapeutic potential of targeted immunotherapy with VLP. 8015. *Ther Clin Risk Manag*. 2008. 4:79-85.
26. Brinkman M, Walter J, Grein S, Thies MJ, Schulz TW, Herrmann M, Reiser CO, Hess J. Beneficial therapeutic effects with different particulate structures of murine polyomavirus VP1-coat protein carrying self or non-self CD8 T cell epitopes against murine melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2005. 54(6):611-22.
27. Brinkman M, Walter J, Grein S, Thies MJW, Tchulz TW, Herrmann M et al. Beneficial therapeutic effects with different particulate structures of murine polyomavirus VP1-coat protein carrying self or non-self CD8 T cell epitopes against murine melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2005. 54(6):611-22.
28. Brown CK, Kirkwood JM. Immunotherapy of cancer. In: Golden GA, ed. *Horizons in Cancer Therapeutics*. West Conshohocken, PA: Meniscus Limited; 2001. 3-25.
29. Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon A. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991. 254(5038), 1643-1647.
30. Buonaguro L, Racioppi L, Tornesello ML, Arra C, Visciano ML, Biryahwaho B et al. Induction of neutralizing antibodies and cytotoxic T lymphocytes in Balb/c mice immunized with virus-like particles presenting a gp120 molecule from a HIV-1 isolate of clade A. *Antiviral Res*. 2002. 54(3):189-201.
31. Chackerian B. Virus-like particles: flexible platform for vaccine development. 2007. *Expert Rev Vaccines*. 2007. 6:381-90.
32. Chaudhuri D, Suriano R, Mittelman A, Tiwari RK. Targeting the immune system in cancer. *Cur Pharm Biotech*. 2009. 10,166-184.
33. Chen W, Peace DJ, Rovira DK, You SG, Cheever MA. T-cell immunity to the joining region of p210BCR-ABL protein. *PNAS*. 1992. 89(4), 1468-1472.
34. Chen X, Stehle T, Harrison S. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBOJ*. 1998. 17 (12), 3233-3240.
35. Clark JW, Smith JW 2nd, Steis RG, Urba WJ, Crum E, Miller R, McKnight J, Beman J, Stevenson HC, Creekmore S, et al. Interleukin 2 and lymphokine-activated killer cell therapy: analysis of a bolus interleukin 2 and a continuous infusion interleukin 2 regimen. *Cancer Res*. 1990. 50:7343-7350.

36. Coates T, Wilson R, Patrick G, Andre F and Watson V. Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther.* 2001. 23, 392–403.
37. Coley WB. End results in Hodgkin's disease and lymphosarcoma treated by the mixed toxins of erysipelas and bacillus prodigiosus, alone or combined with radiation. *Ann Surg.* 1928. 88:641-667.
38. Coley WB. The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas: With a Report of Ten Original Cases. *Am J Med Sci.* 1893. 10: 487–511.
39. Copier J, Dalgleish AG, Britten CM, Finke LH, Gaudernack G, Gnjatic S, Kallen K, Kiessling R, Schuessler-Lenz M, Singh H, Talmadge J, Zwierzina H, Hakansson L. Improving the efficacy of cancer immunotherapy. *Eur J Cancer.* 2009. 45:1424-1431.
40. Da Silva DM, Pastrana DV, Schiller JT, Kast WK. Effect of pre-existing neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccine. *Virology.* 2001. 290:350-60.
41. Dalianis T, Garcea RL. Welcome to the Poliomoviridae. *Semin Cancer Biol.* 2009. 19(4):209-10.
42. David Machin, Yin Bun Cheung, Mahesh KB. Parmar. Survival Analysis: A Practical Approach, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd. 2006. Den Hann JM, Bevan MJ. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation in immune complexity by CD8(+) and CD8(-) dendritic cell in vivo. *J Exp M.* 2002. 196:817-27.
43. Den Hann JM, Bevan MJ. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation in immune complexity by CD8(+) and CD8(-) dendritic cell in vivo. *J Exp M* 2002; 196:817-27.
44. Ding FX, Wang F, Lu YM, Li K, Wang KH, He XW et al. Multiepitope peptide-loaded virus-like particles as a vaccine against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009. 49(5):1492-502.
45. Dintzis RZ, Vogelstein B and Dintzis HM. Specific cellular stimulation in the primary immune response: experimental test of a quantized model. *PNAS.* 1982. 79, 884–888.
46. Doerries K. Virus-host interactions and diagnosis of human polyomavirus-associated disease. *Intervirol.* 1996. 39:165–175.
47. Dorn DL, Lawatscheck R, Zvirbliene A, Aleksaite E, Pecher G, Sasnauskas K, Özel M, Raftery M, Schönrich G, Ulrich RG, Gedvilaite A. Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope. *Viral Immunol.* 2008. 21(1):12-27.
48. Drake CG, Jaffe E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol.* 2006. 90, 51-81.
49. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Can.* 2004. 4, 11-22.
50. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2005. 23:2346-2357.
51. Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4⁺CD27⁻ lymphocyte subpopulation. *J Immunol.* 1995. 154(9):4294-4301.
52. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, and Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc γ receptor mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol.* 1996. 157, 541–548.
53. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008. 319: 1096-100.

54. Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF and Plebanski M. Size dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol.* 2004. 173, 3148–3154.
55. Finke LH, Wentworth K, Blumenstein B, Rudolph NS, Levitsky H, Hoos A. Lessons from randomized phase III studies with active cancer immunotherapies – outcomes from the 2006 Meeting of the Cancer Vaccine Consortium (CVC). *Vaccine.* 2007. 25S:B97-B109.
56. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, 5th ed. John Wiley & Sons, 2005, 672p.
57. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N. Engl J Med.* 2007. 356, 1928–1943.
58. Gatto D, Ruedl C, Odermatt B, and Bachmann MF. Rapid response of marginal zone B-cells to viral particles. *J Immunol.* 2004. 173, 4308–4316.
59. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, WuG et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PloS Pathog.* 2007. 3:e64.
60. Gazdar AF, Butel JS, Carbone M. SV40 and human tumors: myth, association or causality? *Nature Reviews Cancer.* 2002. 2, 957-964.
61. Gedvilaite A, Aleksaite E, Staniulis J, Ulrich R, Sasnauskas K. Size and position of truncations in the carboxy-terminal region of major capsid protein VP1 of hamster polyomavirus expressed in yeast determine its assembly capacity. *Arch Virol.* 2006. 151(9):1811-25.
62. Gedvilaite A, Dorn DL, Sasnauskas K, Pecher G, Bulavaite A, Lawatscheck R et al. Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology.* 2006. 354(2):252-60.
63. Gedvilaitė A, Frömmel C, Sasnauskas K, Micheel B, Özel M, Behrsing O, Staniulis J, Jandrig B, Scherneck S, Ulrich R. Formation of Immunogenic Virus-like Particles by Inserting Epitopes into Surface-Exposed Regions of Hamster Polyomavirus Major Capsid Protein. *Virol.* 2000. 273, 21-35.
64. Gedvilaite A, Zvirbliene A, Staniulis J, Sasnauskas K, Kruger DH, Ulrich R. Segments of puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice. *Viral Immunol.* 2004. 17(1):51-68.
65. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol.* 1993. 11, 403–450.
66. Ghaffar A, Nagarkatti P. Immunology – chapter sixteen: tolerance and autoimmunity. *Microbiology and Immunology On-Line Textbook*. University of South Carolina School of Medicine. <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/tolerance2000.htm>.
67. Giuntoli RL 2nd, Lu J, Kobayashi H, Kennedy R, Celis E. Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T-cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. *Clin Cancer Res.* 2002. 8(3), 922–931. Gleiter S, Stubenrauch K, Lilie H. Changing the Surface of a Virus Shell Fusion of an Enzyme to Poliomos VP1. *Protein Science.* 1999. 8, 2562-2569.
68. Goldman B, DeFrancesco L. The cancer vaccine roller coaster. *Nat Biotechnol.* 2009. 27:129-139.
69. Goldman, M and Lambert PH. Immunological safety of vaccines: facts hypothesis and allegations. In: *Novel Vaccination Strategies*, S.H.E. Kaufmann, ed. (Weinheim, Germany: Wiley-VCH), 2004, 595–611.

70. Grabbe S, Beissert S, Schwartz T, Granstein RD. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today*. 1996.16, 116–120.
71. Graffi A, Schramm T, Bender E, Bierwolf D, Graffi I. On a new virus containing skin tumor in golden hamster. *Arch Geschwulstforsch*. 1967. 30:277-83.
72. Graffi A, Schramm T, Graffi I, Bierwolf D, Bender E. Virus-associated skin tumors of the Syrian hamster: preliminary note. *J Natl Cancer Inst*. 1968.40: 867-73.
73. Greenberg PD. Adoptive T-cell therapy of tumors, mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol*. 1991.49, 281–355.
74. Grgacic EV and Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*. 2006. 40, 60–65.
75. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon: lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*. 1982. 155:1823-1841.
76. Gross L. A filterable agent, recovered from Al leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Bio Med*. 1953. 83:414-21.
77. Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T-cell stimulation by dendritic cells. *Ann Rev Immunol*. 2002. 20, 621–667.
78. Gulley JL, Madan RA, Arlen PM. Enhancing efficacy of therapeutic vaccinations by combination with other modalities. *Vaccine*. 2007. 25(Suppl 2):B89-B96.
79. Harding CV and Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol*. 1994. 153, 4925–4933.
80. Herbst-Kralovetz M, Mason HS, Chen Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2010. 9(3):299-307.
81. Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen down regulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today*. 1999. 5(4), 178-186.
82. Higano CS, Corman JM, Smith DL, Centeno AS, Steidle CP, Gittleman M, Simons JW, Sacks N, Aimi J, Small EJ. Phase ½ dose-escalation study of a GM-CSF-secreting, allogenic, cellular immunotherapy for metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*. 2008. 113:975-984.
83. Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, Provost N, Frohlich MW. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer*. 2009. 115:3670-3679.
84. Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *Exp Med*. 1994.180(1), 1-4.
85. Intron A [package insert]. Kenilworth, NJ: Schering Corporation; 2007.
86. Jager E, Ringhoffer M, Dienes H, Arand M, Karbach J, Jäger D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, Knuth A. Granulocyte – macrophage colony- stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer*. 1996. 67, 54–62.
87. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol*. 2002. 20, 197–216.
88. Jegerlehner A, Maurer P, Bessa J, Heather H, Kopf M, and Bachmann MF. TLR9 signaling in B-cells determines class switch recombination to IgG2a. *J Immunol*. 2007. 178, 2415–2420.
89. Jegerlehner A, Storni T, Lipowsky G, Schmid M, Pumpens P, and Bachmann MF. Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation. *Eur J Immunol*. 2002. 32, 3305–3314.

90. Jennings GT, Bachmann MF. Designing recombinant vaccines with viral properties: A rational approach to more effective vaccines. *Curr Mol Med.* 2007. 7(2): 143-155.
91. Jennings GT, Bachmann MF. The coming age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem.* 2008. 389:521-37.
92. Jung S, Schluesener HJ. Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated, oncogenic ras proteins. *J Exp Med.* 1991. 173(1), 273-276.
93. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993. 159(1-2):197-207.
94. Justewicz DM, Doherty PC, and Webster RG. The B-cell response in lymphoid tissue of mice immunized with various antigenic forms of the influenza virus hemagglutinin. *J Virol.* 1995. 69, 5414–5421.
95. Kalergis AM, Ravetch JV. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fc gamma receptors on dendritic cells. *J Exp M.* 2002. 195(12):1653-59.
96. Kang SM, Yoo DG, Lipatov AS, Song JM, Davis CT, Quan FS et al. Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles. *PLoS One.* 2009. 4(3):e4667.
97. Kantoff PW, Schuetz TJ, Blumenstein BA, Glode LM, Bilhartz DL, Wyand M, Manson K, Panicali DL, Laus R, Schlom J, Dahut WL, Arlen PM, Gulley JL, Godfrey WR. Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2010. 28(7):1099-105.
98. Karupiah G. *Fields Virology*, 4th edition. Edited by David M Knipe and Peter M Howley, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, 2001. 3280 pages.
99. Kaufmann AM, Nieland JD, Jochmus I, Baur S, Friese K, Gabelsberger J, Giesekeing F, Gissmann L, Glasschro der B, Grubert T, et al. Vaccination trial with HPV16 L1 E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3). *Int J Cancer.* 2007. 121, 2794–2800.
100. Kawakami Y, Fujita T, Matsuzaki Y, Sakurai T, Tsukamoto M, Toda M, Sumimoto H. Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci.* 2004. 95(10), 784-791.
101. Keller SA, Schwarz K, Manolova V, Allmen CE, Kinzler MG, Bauer M et al. Innate signaling regulates cross-priming at the level of DL licensing and not antigen presentation. *Eur J Immunol.* 2010. 40: 102-12.
102. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 2002. 3(11), 999-1005.
103. Kiessling R, Choudhury A. Cancer vaccines. *Br J Surg.* 2007. 94:1449-1450. Kim SK, Cornberg M, Wang XZ, Chen HD, Selin LK, Welsh RM. Private specificities of CD8 T cell responses control patterns of heterologous immunity. *J Exp M.* 2005. 201:523-33.
104. Kipp RT, McNeel DG. Immunotherapy for prostate cancer – recent progress in clinical trials. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2007. 5:465-479.
105. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, and Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *PNAS.* 1992. 89, 12180–12184.
106. Kovacovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, and Rock KL. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *PNAS.* 1993. 90, 4942–4946.
107. Krieg AM. Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006. 5, 471–484.
108. Krumbholz A, Bininda-Emonds OR, Wutzler P, Zell R. Phylogenetics, evolution, and medical importance of polyomaviruses. 2009. *Infect Genet Evol.* 9:784-99.

109. Kurte M, Lopez M, Aguirre A, Escobar A, Aguillon JC, Charo J, Larsen CG, Kiessling R, Salazar-Onfray F. A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *J Immunol.* 2004. 173(3), 1731-1737.
110. Kyburz D, Aichele P, Speiser DE, Hengartner H, Zinkernagel RM, Pircher H. T-cell immunity after a viral infection versus T-cell tolerance induced by soluble viral peptides. *Eur J Immunol.* 1993. 23(8), 1956-1962.
111. Lacasse P, Denis J, Lapointe R, Leclerc D, Lamarre A. Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *J Virol.* 2008. 82:785-94.
112. Lawatscheck R, Aleksaite E, Schenk JA, Micheel B, Jandrig B, Holland G, Sasnauskas K, Gedvilaite A, Ulrich RG. Chimeric polyomavirus-derived virus-like particles: the immunogenicity of an inserted peptide applied without adjuvant to mice depends on its insertion site and its flanking linker sequence. *Viral Immunol.* 2007. 20(3):453-60.
113. Lefkowitz I., *Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques.* Academic Press, Inc., 1996, 2176 pp.
114. Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR, and Schiller JT. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol.* 2001. 166, 5346-5355.
115. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006. 24, 99-146.
116. Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of Simian Virus 40 at 3.8-Å Resolution. *Nature.* 1991. 354, 278-284.
117. Lim JH, Kim SP, Gabrielson E, Park YB, Park JW, Kwon TK. Activation of human cancer/testis antigen gene, XAGE-1, in tumor cells is correlated with CpG island hypomethylation. *Int J Cancer.* 2005. 116(2), 200-206.
118. Lindenburg CE, Stolte I, Langendam MW, Miedema F, Williams IG, Colebunders R, Weber JN, Fisher M, and Coutinho RA. Long-term follow-up: no effect of therapeutic vaccination with HIV-1 p17/p24: Ty virus-like particles on HIV-1 disease progression. *Vaccine.* 2002. 20, 2343-2347.
119. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immuno Today.* 1990. 11(7), 237-244.
120. Loose D, Van de Wiele C. The immune system and cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009. 24:369-376.
121. Loyo M, Guerrero-Preston R, Brait M, Hoque M, Chuang A, Kim M, Sharma R, Liegeois N, Koch W, Califano J, Westra W, Sidransky D. Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J Cancer.* 2009. 15:9.1496-8.
122. Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol.* 2007. 18(6):537-45.
123. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 1999. 223(1):77-92.
124. Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G et al. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by the gene MAGE-3. *Int J Cancer.* 1995.63:883-5.
125. Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y, et al. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer.* 1995. 63, 883-885.

126. Marrari A, Iero M, Pilla L, Villa S, Salvioni R, Valdagni R, Parmiani G, Rivoltini L. Vaccination therapy in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2007. 56:429-445.
127. Martinez X, Regner M, Kovarik J, Zarei S, Hauser C, Lambert PH et al. CD4-independent protective cytotoxic T cell induced in early life by a non-replicative delivery system based virus-like particles. *Virology.* 2003. 305:428-35.
128. Matsushita M and Fujita T. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev.* 2001. 180, 78–85.
129. Mayer G. Immunology – chapter one: innate (non-specific) immunity. Microbiology and Immunology On-Line Textbook. University of South Carolina School of Medicine. <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/innate.htm>.
130. MBI Fermentas. Molecular Biology Catalog And Product Application Guide, 2010-2011.
131. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J.* 2006. 26:154-158.
132. McNeel DG. Active specific immunotherapy in cancer: cellular immunotherapies for prostate cancer. *Biomed Pharmacother.* 2007. 61:315-322.
133. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev Immunol.* 2001. 1(2),135–145.
134. Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 2010 Jul 29;6(7):e1001024.
135. Melief CJ, Kast WM. T-cell immunotherapy of cancer. *Res Immunol.* 1991. 142, 425–429.
136. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen-processing machines. *Cell.* 2001. 106(3), 255–258.
137. Mildažienė V, Jarmalaitė S, Daugelavičius R. *Laštelės biologija.* Kaunas: VDU leidykla, 2003.
138. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol.* 2005. 78(5), 1043-1051.
139. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO.* 2002. 21, 4754 – 4762.
140. Moor KW, Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001. 19, 683-765.
141. Moscovitis D, Lechner F, Pircher HP, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature.* 1993. 362:758-761.
142. Murphy K, Travers P, Walport M. *Jeneway's immunobiology.* Seventh edition. *Garlands Science, Taylor & Francis Group, LLC.* 2008.
143. Nabholz M, MacDonald HR. Cytolytic T-lymphocytes. *Ann Rev Immunol.* 1983. 1, 273–305.
144. National Institutes of Health ClinicalTrials.gov Web site. Nr.1. A phase II study of active immunotherapy with GRNVAC1, autologous mature dendritic cells transfected with mRNA encoding human telomerase reverse transcriptase, in patients with acute myelogenous leukemia in complete clinical remission. <http://www.clinicaltrials.gov>.
145. National Institutes of Health ClinicalTrials.gov Web site. Nr.2. A phase II study of matured dendritic cells pulsed ex vivo with 3 melanoma cell line lysates (IDD-3) in patients with in-transit or metastatic melanoma. <http://www.clinicaltrials.gov>.
146. National Institutes of Health ClinicalTrials.gov Web site. Nr.3. A randomized phase II trial using dendritic cells transduced with an adenoviral vector containing the p53 gene to immunize patients with extensive stage small cell lung

- cancer in combination with chemotherapy with or without all trans retinoic acid. [http:// www. clinicaltrials. gov](http://www.clinicaltrials.gov).
147. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med*. 1998. 4(3), 328–332.
 148. Nie Y, Yang GY, Song Y, Zhao X, So C, Liao J, Wang LD, Yang CS. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 2001. 22(10), 1615-1623.
 149. Nilges K, Höhn H, Pilch H, Neukirch C, Freitag K, Talbot PJ et al. Human papillomavirus type 16, E7 peptide-directed CD8⁺ T cells from patients with cervical cancer and cross-reactive with the coronavirus NS2 protein. *J Virol*. 2003. 75:5464-74.
 150. Ormerod M, ed. *Flow Cytometry Protocols* 2nd ed. Oxford University Press, 2000.
 151. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomized controlled trial. *Lancet*. 2007. 69, 2161–2170.
 152. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies *Immunology and Cell Biology*. 1999. 77, 499–508
 153. Park JW, Melisko ME, Esserman LJ, Jones LA, Wollan JB, Sims R. Treatment with autologous antigen-presenting cells activated with the HER-2–based antigen lapuleucel-T: results of a phase I study in immunologic and clinical activity in HER-2–overexpressing breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007. 25:3680-3687.
 154. Perez SA, von Hofe E, Kallinteris NL, Gritzapis AD, Peoples GE, Papamichail M et al. A new era in anticancer peptide vaccines. *Cancer*. 2010. 116(9):2071-80.
 155. Pircher H, Burki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature*. 1989. 342:559–61.
 156. Pircher H, Moskophidis D, Rohrer U, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel R M. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants *in vivo*. *Nature* 1990; 346:629-33.
 157. Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med*. 2005. 11 (Suppl. 4), S5–S11.
 158. Prevost-Blondel A, Roth E, Rosenthal FM, Pircher H. Crucial role of TNF- α in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells *in vivo*. *J Immunol*. 2000. 164(7), 3645-3651.
 159. Proleukin [package insert]. Emeryville, CA: Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Inc.; 2008.
 160. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods*. 1995. 188(1):117-128.
 161. Pumpens P and Grens E. HBV core particles as a carrier for B-cell/T-cell epitopes. *Intervirology*. 2001. 44, 98–114.
 162. Pumpens P, Grens E. Artificial genes for chimeric virus-like particles. In: *Artificial DNA: Methods and Applications*. Khudyakov YE, Fields HA, editors. Boca Raton, CRC Press LLC. 2002. 249-327.
 163. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007. 25, 267-296.
 164. Rescigno M, Avogadri F, Curigliano G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2007. 1776:108-123.

165. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med*. 1993. 177(2), 265-272.
166. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. Aconditioned dendritic cell can be atemporal bridge between a CD4⁺T helper and a T killer cell. *Nature*. 1998. 393(6684), 474-478.
167. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med*. 1998. 4(3):321-7.
168. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Med*. 1998. 4(3), 321-327.
169. Rozkova D, Tiserova H, Fuckkova J, Lastovicka J, Podrazil M, Ulcova H, Budinsky V, Prausova J, Linke Z, Minarik I, Sediva A, Spisek R, Bartunkova J. FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Immunol*. 2009. 131:1-10.
170. Ruedl C, Schwarz K, Jegerlehner A, Storni T, Manolova V, Bachmann MF. Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies. *J Virol*. 2005. 717-24.
171. Ruedl C, Storni T, Lechner F, Bachi T, Bachmann MF. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur J Immunol*. 2002. 32:818-25.
172. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000. 101(5), 455-458.
173. Salunke DM, Caspar DLD, Garcea RL. Self-Assembly of Purified Polyomavirus Capsid Protein VP1. *Cell*. 1986. 46, 895-904.
174. Sambrook, J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
175. Sander B, Hoiden I, Andersson U, Moller E, Abrams JS. Similar frequencies and kinetics of cytokine producing cells in murine peripheral blood and spleen. Cytokine detection by immunoassay and intracellular immunostaining. *J Immunol Methods*. 1993. 166(2):201-214.
176. Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A et al. Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology*. 2002. 45:308-17.
177. Sasnauskas K, Buzaitė O, Vogel F, Jandrig B, Razanskas R, Staniulis J, Scherneck S, Krüger DH and Ulrich R. Yeast cells allow the high-level expression and formation of polyomavirus - virus like particles. *Biol Chem*. 1999. 380: 381- 386.
178. Scalan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun*. 2004. 4:1.
179. Schiller J and Lowy D. Papillomavirus-like particle vaccines. *J Natl Cancer Inst. Monogr*. 2001. 28, 50-54.
180. Schodel F, Peterson D, Zheng J, Jones JE, Hughes JL and Milich DR. Structure of hepatitis B virus core and e-antigen. A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. *J. Biol. Chem*. 1993. 268, 1332-1337.
181. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T-lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 1998. 393(6684), 480-483.

182. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe*. 2010. 7(6):509-15.
183. Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J. Exp. Med.* 1997. 186, 1183–1187.
184. Schwarz K, Meijerink E, Speiser DE, Tissot AC, Cielens I, Renhof R, Dishlers A, Pumpens P, and Bachmann MF. Efficient homologous prime-boost strategies for T-cell vaccination based on virus-like particles. *Eur J Immunol*. 2005. 35, 816–821.
185. Schwarz K, Storni T, Manolova V, Didierlaurent A, Sirard JC, Rothlisberger P, and Bachmann MF. Role of Toll-like receptors in co stimulating cytotoxic T-cell responses. *Eur J Immunol*. 2003. 33, 1465–1470.
186. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B. A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPV). *J Virol*. 2011 Feb 9. [Epub ahead of print].
187. Selin LK, Brehm MA, Naumov YN, Cornberg M, Kim S-K, Clute SC et al. Memory of mice and men: CD8⁺ T-cell cross-reactivity and heterologous immunity. *Immunol Rev*. 2006. 211:164-81.
188. Siray H, Frommel C, Voronkova T, Hahn S, Arnold W, Schneider-Mergener J, Scherneck S, Ulrich R. An immunodominant, crossreactive B-cell epitope region is located at the C-terminal part of the hamster polyomavirus major capsid protein VP1. 2000. *Viral Immunol*. 13: 533–545.
189. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, Valone FH. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*. 2000. 18:3894-3903.
190. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002. 2(11), 850-861.
191. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann Re. Immunol*. 1991. 9, 271–296.
192. Stewart SE. leukemia in mice produced by a filterable agent present in AKR leukemic tissues, with notes on a sarcoma produced by the same agent. *Anat Rec*. 1953. 117:532.
193. Storni T and Bachmann MF. Loading of MHC class I and II presentation pathways by exogenous antigens: a quantitative in vivo comparison. *J Immunol*. 2004. 172, 6129– 6135.
194. Storni T, Lechner F, Erdmann I, Bachi T, Jegerlehner A, Dumrese T, Kundig TM, Ruedl C and Bachmann MF. Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T-cell responses after vaccination with virus-like particles. *J Immunol*. 2002. 168, 2880–2886.
195. Swiss Institute of Bioinformatics, ViralZone, www.expasy.ch/viralzone.
196. Tabi Z, Man S. Cancer vaccines and immune monitoring (an overview). In: Hayat MA, ed. *Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis*. Volume 2. Dordrecht, Netherlands: Springer Scientific; 2008. 129-159.
197. Takeuchi O and Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev*. 2007. 220, 214–224.
198. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 2005. 8(5), 369-380.
199. Thyagarajan R, Arunkumar N and Song W. Polyvalent antigens stabilize B-cell antigen receptor surface signaling microdomains. *J Immunol*. 2003. 170, 6099–6106.

200. Todar K. Immune defense against bacterial pathogens: adaptive or acquired immunity. Todar's Online Textbook of Bacteriology. 2008. <http://textbookofbacteriology.net/>.
201. Toes RE, Blom RJ, Offringa R, Kast WM, Melief CJ. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol.* 1996. 156(10):3911-8.
202. Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief C J, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *PNAS.* 1996. 93(15):7855-60.
203. Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *PNAS.* 1996. 93(15), 7855-7860.
204. Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, Kast WM, Offringa R, Melief CJ. Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol.* 1998. 160(9), 4449-4456.
205. Traversari C, Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A, Boon T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med.* 1992. 176(5), 1453-1457.
206. Ulrich R, Nassal M, Meisel H, and Kruger DH. Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv Virus Res.* 1998. 50, 141-182.
207. Waal Malefyt R, Hannen J, Spits H, Roncarolo MG, Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991. 174(4), 915-924.
208. Walther M, Dunachie S, Keating S, Vuola JM, Berthoud T, Schmidt A, Maier C, Andrews L, Andersen RF, Gilbert S, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of a preerythrocytic malaria candidate vaccine, ICC-1132 formulated in Seppic ISA 720. *Vaccine.* 2005. 23, 857-864.
209. Wampler DE, Lehman ED, Boger J, McAleer WJ, and Scolnick EM. Multiple chemical forms of hepatitis B surface antigen produced in yeast. *PNAS.* 1985. 82, 6830-6834.
210. Weber J, Hua F, Spears L, Marty V, Kuniyoshi C, Celis E. A Phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma. *J Immunother.* 1999. 22, 431-440.
211. Webster WS, Small EJ, Rini BI, Kwon ED. Prostate cancer immunology: biology, therapeutics, and challenges. *J Clin Oncol.* 2005. 23:8262-8269.
212. Weinberg R.A. The biology of cancer. Garland, Taylor & Francis Group, LLC. 2007.
213. Whiteside TL. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system. *Br J Cancer.* 2005. 92(2), 209-211.
214. Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol.* 2006. 16(1), 3-15.
215. Widmann C, Romero P, Marjanski J, Coradin G, Valmori D. T-helper epitopes enhance the cytotoxic response of mice immunized with MHC Class I-restricted malaria peptides. *Immunol Meth.* 1992. 155, 95.
216. Wieland U, mauch C, Kreuter A, Krieg T, Pfister H. Merkel cell polyomavirus DNA in persons without Merkel cell carcinoma. *Emerg Infect Dis.* 2009. 15, 1496-1498.

217. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nat Rev Immunol*. 2007. 7, 543-555.
218. Wrzesinski C, Paulos CM, Gattinoni L, Palmer DL, Kaiser A, Yu Z, Rosenberg SA, Restifo NP. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8⁺ T cells. *J Clin Invest*. 2007. 117:492-501.
219. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *PNAS*. 2002. 99:16168-16173.
220. Zaks TZ, Rosenberg SA. Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER2/neu⁺ tumors. *Cancer Res*. 1998. 58:4902-8.
221. Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC- restricted cytotoxic T-cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol*. 1979. 27, 51-177.
222. Zinkernagel RM, Hengartner H. Regulation of the immune response by antigen. *Science*. 2001. 293(5528), 251-153.
223. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006. 6, 295-307.
224. Zvirbliene A, Samonskyte L, Gedvilaite A, Voronkova T, Ulrich R, Sasnauskas K. Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *J Immunol Methods*. 2006. 11(1-2):57-70.

PADĖKA

Visų pirmiausiai esu dėkinga savo Mamai, už įskiepytą žinių troškimą (nuo tada kai dar net nėjau į mokyklą) ir už meilę, palaikymą bei pasiaukojimą, kuriuos jaučiu kiekvieną savo gyvenimo akimirką. Be Tavęs aš niekada nebūčiau tapusi tuo kuo esu.

Ačiū dr. Jonui Rubikui, kuris pirmasis mane supažindino su biochemiko darbu tikroje laboratorijoje ir taip gražiai bei uždegančiai papasakojo apie DNR 3' ir 5' galus, kad mokslininko darbu nesusižavėti negalėjau!

Ačiū prof. Kęstučiui Sasnauskui, kad mane priėmė į savo laboratorijos šeimą ir suteikė puikias darbo sąlygas. Taip pat dėkoju už vertingas pastabas ir patarimus rašant disertacijos rankraštį.

Ypatingai dėkoju savo darbo vadovei dr. Almai Gedvilaitei, už vadovavimą, mokymą, žinias, už tyrimų objektą, darbo sąlygas, už įgytą didelę darbo patirtį, už parodytą pasitikėjimą ir už visas man suteiktas galimybes.

Nuoširdžiai dėkoju dr. Ulrikei Blohm už rūpestį ir šiltą atmosferą, ilgą stažuočių jos laboratorijoje metu, bei jos laborantei Steffanie Knöffel už pagalbą III klasės saugumo laboratorijoje.

Ačiū dr. Raineriui Ulrich už galimybę stažuotis jo laboratorijoje ir už šaunias mokslines diskusijas.

Dėkoju dr. Aurelijai Žvirblienei už neišsemiamus antikūnų klodus, konsultacijas imunologijos klausimais ir vertingus patarimus rašant disertaciją, dr. Juozui Staniuliui už pirmąsias dirbo su elektroniniu mikroskopu pamokas, P. Grigui už konsultacijas statistikos klausimais.

Esu dėkinga laboratorijos vadovui dr. Gintautui Žvirbliui, dr. Lolitai, bei EGIS'o kolektyvui už palaikymą; draugiškas žvilgsnis ir šiltas žodis daro stebuklus.

Taip pat ačiū visam tuzinui savo mažųjų studentų, kuriuos mokydama iš jų mokiausi ir pati. Laikas praleistas dirbant su studentais man teikė didžiulį malonumą.

Nuoširdžiai dėkoju draugams dr. Martui ir dr. Virgai Krupovičiams, kurie visus doktorantūros studijų metus man siuntė tuntus straipsnių pdf formatu, kiek ir kokių tik užsigeisdavau. Jūsų kantrybė begalinė!

Ačiū dėstytojams, bendramoksliams ir draugams, tiesiai ar per aplinkui (žiniomis, patirtimi, tvirtu petim), Jūs visi prisidėjote prie to, kad aš šiandien rašau paskutines disertacijos eilutes.

Ir ypatingai esu dėkinga savo vyrui Egidijui. Už besąlygišką meilę ir supratimą, už begalinę kantrybę ir palaikymą, kurį jaučiu visur ir visada. Ačiū Tau.

Eglė

2011 balandis, Vilnius