

**KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE**  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



## DIZERTAČNÍ PRÁCE

SPECIALIZACE: MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÁ BIOLOGIE, GENETIKA A  
VIROLOGIE

# **REKOMBINANTNÍ VIRY VAKCINIE URČENÉ PRO NÁDOROVOU TERAPII; ANALÝZA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ**

**Recombinant vaccinia viruses used for tumor therapy; analysis of  
biological and biochemical features**

**Mgr. Kamila Žůrková**

Školitelka: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.  
Laboratoř: Ústav hematologie a krevní transfuze, odd. Experimentální  
virologie

Praha 2011

Práce byla podpořena granty:

- GAUK: 78608
- IGA: NS10660-3/2009 a NR9238-3/2007
- GAČR: 310/05/H5333
- Ministerstvo zdravotnictví: MZOUHK12005

Čestně prohlašuji, že tuto disertační práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury. Dále prohlašuji, že tato práce ani její jednotlivé části nebyly použity k získání stejného nebo podobného akademického titulu.

Praha 2011

Budu nadosmrti vděčná za dohled své školitelky Šárky Němečkové, která mi poskytla cenné rady a poznámky k mé práci a vytvořila opravdu přátelské prostředí, v němž jsem se mohla po celou dobu svého studia pohybovat. Také bych ráda poděkovala Ludě Kutinové a Jitce Kryštofové za jejich pomoc s některými pokusy a všem kolegům za jejich přátelství. Děkuji také své rodině a blízkým přátelům za pochopení a dlouhodobou duševní podporu ☺.

## SEZNAM ZKRATEK

4T1	nádorová buněčná linie – rakovina prsu
AAV	adeno-asociované víry
Ad	adenoviry
ADCC	na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita
ADP	adenosindifosfát
ak	aminokyselinové zbytky
A,G, T, C, N	purinové a pyrimidinové báze
A-G-X	sekvence aminokyselin alanin-glycin-libovolná
Akt	buněčná kináza
Alk5	buněčná kináza
AML	akutní myeloidní leukémie
Amp	gen pro ampicilinovou resistenci
AP-1	transkripční faktor Jun-Fos
APC	antigen-presentující buňka
ara-C	cytosinarabinosid
Arp2/3	komplex proteinů pro regulaci aktinu
B220	povrchový marker nezralých B buněk
B7.1	kostimulační molekula CD80
bp	páry bází
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BH3	bromodoména (bromhomology)
BUDR	bromouridindeoxyribonukleotid
C57BL/6	kmen imbredních myši
CAF	fibroblasty asociované s nádory
CAT	chloramfenikol acetyltransferáza
CCL/CCLR	chemokin typu C-C/chemokinový receptor
CD	diferenční antigen
CDC	na komplementu závislá buněčná cytotoxicita
cDNA	komplementární DNA (syntetizovaná dle mRNA vzoru)
CEV	virus asociovaný s buňkou
CIN	cervikální intraepiteliální neoplázie
CKII	kaseinkináza
CMRF44	aktivační marker DC
CMX001	derivát cidofoviru
COX-2	cyklooxygenáza 2
CRT	calreticulín
CT26	nádorová buněčná linie
CSF	kolonie stimulující faktor
CTLA-4	inhibiční receptor T lymfocytů (cytotoxický T lymfocytární antigen 4)
CTL	cytotoxické T lymfocyty
CXCL/CXCR	chemokin typu CXC/jeho receptor
C-X-X-X-C	sekvence aminokyselin cystein-x-x-x-cystein

DAMP	molekulární vzor spojený s nebezpečím
DC	dendritická buňka
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
EBP3	transkripční faktor
EEV	extracelulární obalený virus
EGF/EGFR	epidermální růstový faktor/jeho receptor
eIF2 $\alpha$	iniciační faktor translace 2 $\alpha$
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
E/L	časně pozdní syntetický virový promotor
EL4	nádorová buněčná linie - thymom
EMT6	nádorová buněčná linie – rakovina prsu
EpRas	nádorová buněčná linie
ER	endoplasmatické retikulum
ERGIC	markerový protein ER/GA
ERK	buněčná kináza regulovaná extracelulárními signály
FACS	průtokový cytometr
Fas/FasL	receptor smrti/jeho ligand
Fc	fragment imunoglobulinu
FcRn	neonatální Fc fragment
Flk2 = Flt3	fetální jaterní kináza
Flt3	Fms-like tyrosinkináza
Flt3-TKD	duplikace v genu pro Flt3
Flt3-JM-PM	mutace v oblasti kódující membránovou oblast Flt3
FL	Flt3 ligand
FSP1	metastazin
Foxp3	transkripční faktor T lymfocytů
G3BP	protein vázající aktivační protein Ras GTPázy
G418	geneticin
GA	Golgiho aparát
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfátdehydrogenáza
GATA-3	transkripční faktor T lymfocytů
GFP	zelený fluorescenční protein
G-CSF	kolonie stimulující faktor pro granulocyty
GM-CSF	kolonie stimulující faktor pro granulocyty/makrofágy
GM130	protein Golgiho aparátu z rodiny golginu A
GORASP	protein Golgiho aparátu pro třídění a modifikace nových proteinů
<i>gpt</i>	gen pro guanin-xantin fosforibosyl transferázu
Gr1	povrchový marker myeloidních buněk
GRASP	protein Golgiho aparátu pro udržování struktury cisteren
Grb2	protein vázající růstový receptor
GSK	firma Glaxo-Smith-Klein
GTP	guanosintrifosfát
GTPáza	enzym štěpící GTP
<i>gus</i>	gen pro $\beta$ -glukuronidázu

H5	časny virový promotor
HDAC	histondeacetyláza
HIV	virus lidské imunodeficiency
h.p.i.	hodiny po infekci
HPV	lidský papillomavirus
HSP	protein tepelného šoku
HSV	virus herpes simplex
ICAM-1	mezibuněčná adhezivní molekula
IEV	intracelulární obalený virus
IFN	interferon
IgM, IgG, IgA	imunoglobuliny typu M, G, A
IHD-J	kmen vakcínie
IκB	inhibiční protein pro NFκB
IL	interleukin
IMV	intracelulární maturovaný virus
IP-10	chemokin CCL10
IPS-1	mitochondriální protivirový signalizační protein (=MAVS)
IRAK	s receptorem pro IL asociovaná kináza
IRF	faktor vyvolávající expresi interferonů
IV	intracelulární nematurovaný virus
Jak	transkripční faktor
JIP1	kináza interagující s JNK a MAPK
JNK	Jun kináza
KAT-4	nádorová buněčná linie, thymom
kDa	1000 Daltonů
lacZ	gen pro β-galaktosidázu
LAMP	s lysozomy asociovaný membránový protein
LAP	latentně aktivovaný protein
LC16m8	kmen vakcínie odvozený z kmenu Lister
LFA	lymfocytární antigen spojený s jejich funkčností
Lin	povrchový marker hematopoietických progenitorů
LTBP	latentní TGF-β-vazebný protein
LTF	pozdní transkripční faktor
MALDI	hmotová spektrometrie
MAPK	mitogeny aktivované proteinkinázy
MCF7	nádorová buněčná linie – rakovina prsu
MDA5	cytoplasmatická RNA helikáza
MDSC	myeloidní supresorové buňky
M-CSF	kolonie stimulující faktor pro makrofágy
MHC gp	hlavní histokompatibilní komplex - glykoprotein
Mig	chemokin
M.O.I.	multiplicita infekce
mRNA	informační ribonukleová kyselina
MVA	modifikovaný virus Ankara

MyD88	adaptorová molekula k TLR
Nck	adaptorový protein v přenosu signálu od receptorů
<i>neo</i>	gen pro neomycin fosfotransferázu
NFκB	buněčný transkripční faktor
NK	přírození zabijáci
NKG2D	aktivační receptor NK buněk
NKT	buňky s fenotypem NK i T buněk
NYCBH	kmen vakcínie New York City Board of Health
NY-ESO-1	antigen u mnoha lidských nádorů
NYVAC	kmen vakcínie atenuovaný
OS	2'5'-oligo[A]syntáza
P13	Praha13
pac	puromycin acetyltransferáza
PAK1	ser/thr proteinkináza
PAMP	molekulární vzor spojený s patogeny
PARP	polymeráza poly-ADP-ribózy
PBMC	mononukleární buňky z periferní krve
PBS	fosfátový solný pufr
PDGF	růstový faktor odvozený z krevních destiček
PI-3K	kináza fostatidylinositoltrisfostátu
Pim-1	transkripční faktor
PKR	proteinkináza R
PolII	polymeráza II
pRB	protein retinoblastomu
Pu.1	transkripční faktor
RAP94	podjednotka virové RNA polymerázy
RAT-2	buněčná linie
RIG-1	cytoplasmatická RNA helikáza (gen indukovatelný retinovou kys.)
RT-PCR	kvantitativní PCR nebo reverzní PCR
Sca	povrchový marker hematopoietických progenitorů
SCF	faktor kmenových buněk
SDF1	chemokin CXCL12
SDS-PAGE	denaturující redukující akrylamidová gelová elektroforéza
serpin	inhibitor serinových proteáz
SKR1	ser/thr proteinkinázový receptor 1
Sig	signální sekvence
SigE7LAMP	fúzní konstrukt Sig + E7 antigen + LAMP
SM16	inhibitor tyrosinkináz
Smad	buněčný transkripční faktor
SP1	buněčný transkripční faktor
SPI-1, SPI-2	virové serpiny
S-S	disulfidická vazba
ST-246	tecovirimat, inhibitor poxvirů
Stat	transkripční faktor



T7	bakteriofág T7
TAA	antigen asociovaný s nádory
TAP	peptidový transporter
TBF	TATA box vazebný faktor
TβR	receptor pro TGF-β
TC-1	buněčná linie
TFIID	transkripční faktor II D
TGF-β	transformující růstový faktor beta
TGN	trans-Golgiho aparát
T <sub>H</sub>	pomocný lymfocyt T
Thy	povrchový marker hematopoietických progenitorů
TIL	lymfocyty infiltrující nádory
TK	thymidinkináza
TLR	Toll-like receptor
TM	transmembránový
TNF/TNFR	faktor nekrózy nádorů/jeho receptor
TRICOM	trojice kostimulačních molekul B7.1 + ICAM-1 + LFA-3
TSA	antigen specifický pro nádory
T <sub>reg</sub>	regulační lymfocyt T
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VETF	virový časný transkripční faktor
VGF	virový růstový faktor
VH1	virová fosfatáza
VITF	virový intermediární transkripční faktor
VLP	částice podobné viru
VLTF	virový pozdní transkripční faktor
VV	virus vakcínie
WASP	protein syndromu Wiskott-Aldrich, regulace aktinu
WIP	protein vázající WASP
WR	kmen vakcínie Western Reserve
X-Gal	bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid
YY1	buněčný transkripční faktor

# OBSAH

1	<b>ÚVOD</b> .....	1
2	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	2
2.1	<b>POXVIRY</b> .....	2
2.2	<b>VIRUS VAKCÍNIE</b> .....	3
2.2.1	STRUKTURA A ORGANIZACE GENOMU VAKCÍNIE.....	5
2.2.2	ŽIVOTNÍ CYKLUS VAKCÍNIE.....	6
2.2.3	VSTUP VAKCÍNIE DO BUŇKY.....	7
2.2.4	ŘÍZENÍ TRANSKRIPCE.....	8
2.2.5	REPLIKACE VAKCÍNIE.....	10
2.2.6	INTERMEDIÁRNÍ A POZDNÍ TRANSKRIPCE.....	12
2.2.7	STRUKTURA A MORFOGENEZE VIRIONU.....	12
2.2.8	CYTOPATICKÝ EFEKT.....	16
2.3	<b>INTERAKCE HOSTITELE S PoxVIRY</b> .....	17
2.3.1	REAKCE IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	17
2.3.1.1	Přirozená imunitní reakce.....	17
2.3.1.2	Imunitní reakce založená na NK buňkách.....	18
2.3.1.3	Reakce založená na dendritických buňkách.....	19
2.3.1.4	T lymfocyty.....	19
2.3.1.5	Imunitní odpověď založená na funkci T <sub>H1</sub> a cytotoxických T lymfocytů.....	20
2.3.1.6	Imunitní reakce založená na T <sub>H2</sub> lymfocytech a protilátkách.....	21
2.3.2	KLINICKÉ PROSTŘEDKY PRO KONTROLU INFEKCE.....	22
2.3.3	INTERFERENCE VIRU SE SLOŽKAMI IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	23
2.4	<b>VIROVÉ VAKCÍNY V BOJI PROTI RAKOVINĚ</b> .....	26
2.4.1	NÁDOROVÝ RŮST.....	26
2.4.2	PROTINÁDOROVÁ ODPOVĚĎ.....	27
2.4.3	NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ.....	28
2.4.4	VIROVÉ VEKTORY V TERAPII NÁDORŮ.....	30
2.4.5	POXVIRY JAKO VEKTOR.....	34
2.4.6	KONSTRUKCE REKOMBINANTNÍ VAKCÍNIE.....	38
2.4.6.1	Tvorba rekombinantní DNA.....	38
2.4.6.2	Selekce rekombinant.....	39
2.5	<b>VLIV REKOMBINANTNÍCH CYTOKINŮ NA VIRUS VAKCÍNIE</b> .....	41
2.6	<b>FLT3 LIGAND (FL)</b> .....	43
2.7	<b>FLT3 RECEPTOR</b> .....	48
2.8	<b>GM-CSF</b> .....	50
2.9	<b>RECEPTOR TYPU 2 PRO TGF-β (TβRII)</b> .....	51
2.10	<b>TGF-β A JEHO ROLE V KARCINOGENEZI</b> .....	52
2.11	<b>Fc-IgG1 FÚZNÍ PROTEINY</b> .....	54
2.11.1	Fc FRAGMENT IgG1.....	54
2.11.2	Fc FÚZNÍ PROTEINY.....	54
2.12	<b>PAPILOMAVIROVÁ INFEKCE SPOJENÁ S KANCEROGENEZÍ</b> .....	55
2.13	<b>E7 PROTEIN JAKO NÁDOROVÝ ANTIGEN</b> .....	59
3	<b>VÝSLEDKY</b> .....	61
3.1	Combination of intratumoral injections of vaccinia virus MVA expressing GM-CSF.....	62
3.2	The expression of the soluble isoform of hFLT3 ligand by recombinant vaccinia virus.....	71
3.3	Expression of soluble TGF-β receptor II by recombinant vaccinia virus.....	81
3.4	Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand.....	90
4	<b>DISKUSE</b> .....	106
4.1	<b>BUŇKY TC-1 JAKO NÁDOROVÝ MODEL</b> .....	106
4.2	<b>VYLEPŠENÍ VAKCÍNIOVÉHO VEKTORU POMOCÍ CYTOKINŮ</b> .....	107
4.3	<b>ATENUACE VAKCÍNIE EXPRIMUJÍCÍ FL</b> .....	112
5	<b>ZÁVĚR</b> .....	116
6	<b>LITERÁRNÍ ZDROJE</b> .....	118
7	<b>SOUHRN (SUMMARY)</b> .....	150

# 1 ÚVOD

Virus vakcínie je od 80. let minulého století využíván jako vektor vhodný pro expresi heterologních proteinů. Při infekci virem nesoucím cizorodý gen může dojít k vyvolání imunity proti produkovanému proteinu a lze tak organismus ochránit před přirozeným producentem tohoto antigenu, například před viry či nádorovými buňkami. K posílení tohoto efektu lze vkládat do vakcinačních virů i další geny, které nesou aktivitu modulující činnost imunitního systému. Zpravidla se jedná o stimulační cytokiny, růstové faktory buněk imunitního systému a kostimulační molekuly.

V naší laboratoři se pracuje na přípravě rekombinantních vakcín zaměřených proti nádorům způsobeným lidským papillomavirem typu 16 (HPV16). K vyvolání imunity se používají rekombinanty nesoucí papilomavirový gen E7 a pro zvýšení jejich imunogenosti se do nich vkládají i geny pro stimulační cytokiny. K takovým cytokinům patří také Flt3 ligand či GM-CSF, které jsou si ve svém účinku v přirozeném prostředí podobné a využívají se pro své adjuvantní vlastnosti při vyvolávání protinádorových odpovědí. Vzhledem k velkému vlivu cytokinu TGF- $\beta$  na nádorové mikroprostředí jsme dále využili rekombinantní viry nesoucí rozpustnou formu receptoru pro tento cytokin, abychom potlačili jeho stimulační účinky na růst nádoru. Některé rekombinantní viry byly studovány více do hloubky a jejich vlastnosti a chování byly charakterizovány *in vitro*.

Cíle práce:

- ověřit, zda intratumorální exprese GM-CSF produkovaného virem kmene MVA bude zvyšovat protektivní a terapeutickou protinádorovou imunitu *in vivo* v kombinaci s DNA vakcínou
- otestovat adjuvantní účinky FL exprimovaného virem kmene P13 na protektivní a terapeutickou protinádorovou imunitu
- otestovat vlastnosti a protinádorové účinky vakcíny kmene P13 exprimující sT $\beta$ RII nebo sT $\beta$ RII-Fc-Jun
- analyzovat *in vitro* biologické a biochemické vlastnosti viru exprimujícího gen pro lidský alternativně sestřížený Flt3 ligand (FL)

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 POXVIRY

Čeď Poxviridae představuje skupinu obalených virů, kde nositelkou genetické výbavy je lineární dvouřetězcová DNA uzavřená na obou koncích vlásenkovými smyčkami. Její délka se u zástupců této skupiny pohybuje mezi 130-300 tis. párů bazí (bp), nejmenší je u parapoxvirů a největší genom mají ptačí poxviry. Viriony jsou cihlovitého tvaru o velikosti kolem 200-450 x 140-260 nm. Díky velikosti virionů se poxviry řadí k největším známým virům, je možné je pozorovat optickým mikroskopem a jako vůbec první byly zobrazeny i elektronovým mikroskopem <sup>(1)</sup>. Infekční virus má komplexní strukturu, která sestává z vnitřního bikonkávního jádra, dvou laterálních tělísek a několika plasmatických membrán odvozených od membrán hostitelské buňky. Kromě DNA je v jádře uzavřena řada poxvirových proteinů, většinou enzymů, které jsou využity během životního cyklu viru <sup>(2)</sup>.

Většina eukaryotických DNA virů využívá pro replikaci své genetické informace metabolických drah hostitele. Poxviry se liší (spolu s nimi i např. mimiviry u bezobratlých živočichů). Tvoří skupinu téměř dokonale samostatných virů, jejichž DNA nevstupuje do jádra hostitelské buňky, ale zůstává v cytoplasmě, kde zneužívá translační aparát buňky a množí za přispění převážně virem kódovaných enzymů. Přibližně 100 genů z centrální oblasti genomu podílejících se na replikaci je konzervováno u všech členů skupiny chordopoxvirů <sup>(3)</sup>.

Na základě hostitelského spektra a sekvenční homologie se čeď Poxviridae člení na dvě podčeďi, Entomopoxvirinae a Chordopoxvirinae <sup>(4)</sup>. Srovnávací fylogenetická analýza mezi nimi odhalila výrazné rozdíly <sup>(5)</sup>. Zástupci obou skupin infikují dělicí se i nedělicí se buňky. Entomopoxviry (rody alfa-, beta- a gamaentomopoxvirus) hostí hmyzí řády Diptera, Coleoptera a Lepidoptera. Skupinu chordopoxvirů tvoří osm rodů, jejichž zástupci jsou uvedeni v tabulce č. 1. Rody parapoxvirus a molluscipoxvirus jsou si blízce příbuzné a pravděpodobně se oddělily od avipoxvirů <sup>(5)</sup>. Přestože orthopoxviry napadají převážně zvířata, dochází vyjíměčně i k přenosu na člověka (rody orthopoxvirus, parapoxvirus, yatapoxvirus).

<b>Rod a druh</b>	<b>Přirozený hostitel</b>	<b>Nemoc u člověka</b>
<b><i>Orthopoxvirus</i></b>		
Variola	člověk	pravé neštovice
Vakcínie	neznámý	použitá pro vakcinace, lokalizované léze
Kravský virus	hlodavci, dobytek, kočky	lokalizované kožní léze
Opičí virus	veverky, opice, člověk	podobné pravým neštovicím
Ectromelia virus	hlodavci	
<b><i>Parapoxvirus</i></b>		
Virus stomatitidy	dobytěk, člověk	lokalizované kožní léze, zřídka
Orf virus	ovce, člověk	lokalizované kožní léze, zřídka
Pseudokravský virus	dobytěk, člověk	lokalizované kožní léze, zřídka
<b><i>Yatapoxvirus</i></b>		
Tanapoxvirus	hlodavci, člověk	lokalizované kožní léze, zřídka
Yabapoxvirus	opice, člověk	lokalizované kožní léze, velmi zřídka
<b><i>Capripoxvirus</i></b>		
Ovčí virus	ovce	
Kozí virus	kozy	
<b><i>Suipoxvirus</i></b>		
Prasečí virus	prasata	
<b><i>Leporipoxvirus</i></b>		
Virus myxomatózy	králíci	
Virus fibromatózy	králíci	
Veverčí fibroma virus	veverky	
<b><i>Avipoxvirus</i></b>		
mnoho druhů	ptáci	
<b><i>Molluscipoxvirus</i></b>		
Molluscum contagiosum	člověk	hodně nodulárních kožních lézí

Tab. 1. Zástupci podčeledi Chordopoxvirinae. Převzato a upraveno podle Fenner, 1996, a Fields, 5.edice, 2007<sup>(4)</sup>.

## 2.2 VIRUS VAKCÍNIE

V 18. století se nejvýznamnější epidemií na světě staly pravé neštovice způsobené poxvirem pojmenovaným variola. V té době se lidé snažili předcházet nemoci tzv. variolací, kdy se tekutina z neštovic přenášela z člověka na člověka infekcí otevřené rány. Tato imunizace však byla často doprovázena plným projevem nemoci a častými úmrtími. Na konci 18. století si anglický lékař Edward Jenner všimnul, že dojičky krav mají jizvy způsobené nákazou virem kravských neštovic. Také si všimnul toho, že v této skupině osob jsou minimální nálezy infekce virem pravých

neštovic. Zkusil imunizovat chlapce hnísem z neštovic dojičky. Po několika týdnech otestoval jeho imunitu nákazou virem varioly. S napětím očekával, zda chlapec nákaze podlehne či nikoliv. A povedlo se. Virus kravských neštovic poskytl dostatečnou odolnost organismu proti nákaze nebezpečnými pravými neštovicemi. Stejný postup vyzkoušel i na sobě a na dalších dobrovolnících. Přes počáteční obavy veřejnosti se jeho vakcinace ujala <sup>(6)</sup>.

V první polovině 20. století se zjistilo, že všechny vakcíny obsahují jiný poxvirus – virus vakcínie <sup>(7)</sup>. Imunizace vakcíní měla mírnější průběh imunitní reakce. Kdy došlo k záměně očkovacích virů, se už dnes asi nezjistí, původ vakcínie je sporný a přirozený hostitel nebyl nalezen. Není moc pravděpodobné, že by byl virus jen odvozen od blízkce příbuzných kravských či pravých neštovic pouhými mutacemi a dlouhodobým pasážováním, vysokou míru homologie vykazuje i s opičím a buvolím poxvirem <sup>(8,9,10)</sup>. Přijatelné je tak vysvětlení, že se tento poxvirus ve svém přirozeném hostiteli již nevyskytuje. Důsledná očkovací kampaň rozšířená po celém světě vedla k úplné eradikaci viru variola z lidské populace, poslední výskyt nákazy pravými neštovicemi byl zaznamenán v roce 1977 <sup>(11)</sup>. V roce 1980 Světová zdravotnická organizace prohlásila virus varioly za vymýcený a přestalo se proti němu očkovat. V této době se začala využívat technika DNA rekombinace u viru vakcínie a byl tak položen základní kámen genetickým úpravám poxvirů a jejich využití jako rekombinantních vektorů <sup>(12)</sup>. Během mnoha let využívání vakcínie byla odvozena řada kmenů s odlišnými vlastnostmi. Nejstarší známý očkovací kmen pochází z Anglie (NYCBH), z něj je odvozený poměrně virulentní kmen Western Reserve (WR) <sup>(13)</sup>. Další kmeny byly postupně popisovány po celém světě, nejznámější jsou např. Lister, Kodaň, Wyeth, Ankara, jejich oslabené deriváty, z posledních publikovaných typů např. Acambis a kmen Tian Tian ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). V minulosti velkoplošně nejpoužívanější kmeny pro očkování proti pravým neštovicím jsou uvedeny v tab. č. 2.

Kmen	Původ	Patogenicita virulence	Účinnost	Bezpečnost
NYCBH	Anglie 1856, USA od 1876	nízká	historicky doložená	0,004% komplikací
Lister	Německo, od 1892 i Anglie	střední	historicky doložená	neznámá
EM-63	SSSR, odvozen z NYCBH	nízká	historicky doložená	neznámá
Temple of Heaven	Čína od 1926	vysoká	historicky doložená	neznámá
MVA	tkáňové kultury, Německo, Turecko	nízká	méně účinný v hemaglutinizaci a inhibici neutralizačních protilátek. Použitý jen jako „předvakcína“ pro další přeočkování, nejčastěji kmenem Lister	bezpečný u zdravých a imunosuprimovaných lidí i zvířat. Jeden z nejvíce atenuovaných kmenů

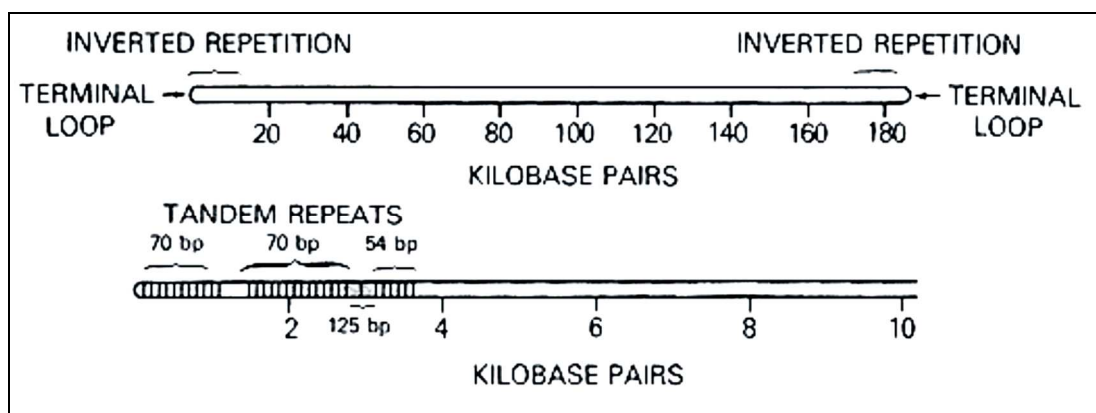
Tab. č. 2. *Kmeny nejčastěji užívané pro velkoplošnou vakcinaci. Zdroj Baxter healthcare, <http://www.baxterhealthcare.co.uk>*

Kryo-elektronová tomografie virem infikovaných buněk odhalila cihlovité partikule o rozměrech 360x270x250nm obalené 5-6nm silnou membránou. Pod ní jsou dvě laterální tělíska tvořená heterogenním materiálem bez zjevné struktury a virové jádro<sup>(14)</sup>. U vakcínie byla poprvé zjištěna přítomnost aktivní RNA polymerázy, studium vakcíniového virionového transkripčního systému hrálo hlavní roli při charakterizaci polyadenylace a čepičkové struktury u mRNA. Dnes je jedním z virových vektorů používaných při expresi heterologních proteinů, při studiu proteinových interakcí, nebo při sledování reakcí imunitního systému hostitele a vývoji rekombinantních vakcín.

## 2.2.1 STRUKTURA A ORGANIZACE GENOMU VAKCÍNIE

Délka dsDNA se pohybuje kolem 190 kbp s ohledem na daný virový kmen. Genom byl počátkem devadesátých let úplně osekvenován a bylo v něm zjištěno asi 223 pravděpodobně funkčních genů<sup>(15)</sup>. Téměř u všech genů (95%) byla potvrzena exprese pomocí metody genome tiling array, ovšem u poloviny z nich zatím není známa přesná funkce<sup>(16,17)</sup>. Lineární molekula DNA obsahuje přibližně 10 kbp dlouhé invertované terminální repeticity s úseky krátkých

tandemových opakování a je na koncích kovalentně uzavřena vlásenkami bohatými na AT páry, viz obr. 1 <sup>(18)</sup>.



Obr.č. 1. Struktura DNA viru vakcínie. Přeřazeno a upraveno z Moss ve Fieldsově virologii<sup>(4)</sup>.

Restrikční analýza ukázala, že DNA sekvence viru vakcínie a ostatních orthopoxvirů je v centrální části genomu značně konzervovaná, kóduje většinou esenciální geny, kdežto v koncových hypervariabilních oblastech jsou umístěny geny neesenciální <sup>(19)</sup>. Endonukleázou HindIII byl genom naštěpen na fragmenty různých velikostí označených písmeny A-S. Vakcíniové geny se identifikují jejich lokalizací v genomu, to znamená písmenem fragmentu, pořadovým číslem genu z některého konce a písmenem udávajícím směr transkripce doprava (R) nebo doleva (L). Geny v oblastech terminálních repetit se většinou přepisují směrem ke konci genomu, v centrální části je orientace transkripce smíšená, ojediněle zde dochází i k interferenci dvou RNA překryvem dvou opačně orientovaných čtecích rámců a vzniku dsRNA.

## 2.2.2 ŽIVOTNÍ CYKLUS VAKCÍNIE

Genová exprese během infekce je regulována na úrovni transkripce <sup>(4)</sup>. Tři třídy virových genů – časné, intermediární a pozdní – jsou součástí řízené kaskády. Z asi dvouset genů je okamžitě po infekci buněk exprimováno 35 <sup>(16)</sup>. Faktory vyžadované pro iniciaci transkripce jedné třídy jsou kódované třídou genů předcházející fáze. Specifické vakcíniové promotory jsou rozpoznávané pouze virovou RNA polymerázou. Ta je uložena spolu s dalšími enzymy (poly[A]-polymeráza, capping a methylační enzymy, helikáza, topoizomeráza) a transkripčními faktory ve virovém jádře.



Po vstupu do buňky probíhá časná transkripce přímo v intaktním jádře, kdy vznikají proteiny stimulující růst okolních buněk hostitele, faktory ovlivňující imunitní odpověď, proteiny potřebné pro následnou replikaci viru a transkripční faktory pro intermediární geny<sup>(20)</sup>. Teprve poté se virus rozbaluje a v cytoplasmě buňky dochází k replikaci genomu. Následuje transkripce intermediárních (převážně transkripční faktory) a pozdních genů (strukturní proteiny, enzymy virového jádra, proteiny účastnící se interakce s hostitelem), tvoří se dceřinné viriony a virus se šíří do okolních buněk.

### 2.2.3 VSTUP VAKCÍNIE DO BUŇKY

Dosud nebyl nalezen žádný specifický receptor pro vstup vakcínie do buňky. Pro přichycení na buňku jsou důležité glykosaminoglykany v extracelulární matrix – heparansulfát a chondroitinsulfát, s nimiž interagují virové membránové proteiny A27, D8 a H3<sup>(21,22,23)</sup>, nicméně existují i důkazy (ověřeno delečními mutantami, nebo kompeticí s volnými glykosaminoglykany), že přichycení k buňce může být i nezávislé na těchto strukturách<sup>(24)</sup>. K matrixovému proteinu lamininu se váže další membránový virové protein A26<sup>(25)</sup>. Nejnověji virový L1 je potenciálním ligandem pro zatím neznámý buněčný receptor viru vakcínie<sup>(26)</sup>.

Vakcínie tvoří dvě morfologicky a antigenně odlišné formy infekčních partikulí IEV a EEV (viz dále). Virus je neobvyklý v tom, že obě formy mohou vstoupit do buňky splynutím plasmatických membrán při neutrálním pH, nebo se pomocí endocytózy ve sníženém pH (pH=5) uvolňují do cytoplasmy<sup>(27)</sup>. To, který způsob infekce buňky si virus „vybere“ závisí za kmeni vakcínie. Infekce virulentním kmenem WR je citlivá k podání inhibitoru okyselení váčků bafilomycinu, tudíž využívá spíše kyselou endocytickou dráhu. Kmeny Kodaň, IHD-J nebo Elstree jsou méně citlivé k inhibitoru a předpokládá se, že pro infekci buněk používají fúzi membrán v normálním pH. Specifita vstupu do buněk dále závisí také na typu buněk/buněčných linií a na jejich povrchových glykosaminoglykanech<sup>(28,29)</sup>. Vakcínie používá také nezvyklý způsob infekce pomocí makropinocytózy. Ve svých obalových membránách vystavuje fosfatidylserin, který se normálně vyskytuje pouze na povrchu buněk procházejících apoptózou<sup>(30)</sup>. Tímto způsobem vakcínie uvolněná do krevního řečiště napodobuje apoptotická tělíska a láká buňky „dobrovolně“ se nechat infikovat. Při tvorbě výběžků (pomocí aktinu a myosinu II) natahujících se po viru (tzv. bleby) dochází k aktivaci receptoru pro EGF (EGFR) a k aktivaci GTPáz Rho a Rac1, následují PAK1 a PI-3 kinázy a další faktory typické pro makropinocytózu a virus penetruje do cytosolu. Opět závisí na daném kmeni vakcínie, zda bude pro penetraci nutná acidifikace či nikoliv<sup>(31,32,33,34)</sup>. Vlastní splynutí membrán zajišťuje tzv.

entry-fusion complex (EFC), soubor asi 12 interagujících proteinů, z nichž ne všechny jsou nutně zakotveny v membráně <sup>(35)</sup>. Nedávno byl objeven vůbec první malý peptidový inhibitor, který brání vstupu vakcínie do buňky právě ve fázi mezi přichycením a fúzí membrán <sup>(36)</sup>. Splýváním membrán dochází k rozbalení virových obálek a virus prochází časnou fází infekce (transkripce uvnitř vir. jádra). Z membránového cytoskeletu přeseďá obnažené jádro na mikrotubuly <sup>(37)</sup>, na kterých se pohybuje směrem k endoplasmatickému retikulu a do blízkosti buněčného jádra. Tento pohyb lze *in vitro* inhibovat přidáním kolchicinu nebo nocodazolu. Kolem jádra se později vytváří virové „factories“ (viroplasma) a probíhají tam i další fáze infekce zakončené tvorbou nových obalených virionů.

## 2.2.4 ŘÍZENÍ TRANSKRIPCE

Davison a Moss (1989) se zabývali studiem struktury vakcíniových promotorů. Zjistili, že promotory tvoří velmi krátké a jednoduché oblasti zahrnující asi 30 bp před vlastním genem. Exprese genů je řízena pouze z promotoru, není regulována žádnými jinými faktory, virus nemá ani před promotory umístěné aktivující elementy. Mezi jednotlivými třídami transkriptů se promotory liší v sekvenci, zachované je však základní uspořádání – konsensus oblast asi -12-15 bp a iniciační oblast <sup>(38,38)</sup>.

Časný promotor má asi 16 bp dlouhou kritickou oblast, ve které každá záměna nukleotidu ovlivní intenzitu transkripce. S touto oblastí sousedí 11 bp sekvence bohatá na T, po níž následuje 7 bp dlouhé místo iniciace transkripce obsahující většinou purinové báze. Velmi důležitý je také G na pozici -21. Již během transportu obnaženého virového jádra od povrchu buňky k buněčnému jádru dochází k časné transkripci uvnitř partikule. Ve virovém jádře jsou malé póry, jimiž dovnitř proudí ribonukleotidtrifosfáty a časná mRNA se dostává z jádra malými póry a spolu s DNA/RNA-vazebným proteinem L4 je dopravena po mikrotubulech k ribozomům a translatována buněčným aparátem <sup>(16,39,40)</sup>.

Intermediární transkripce je zahájena ze sekvence TTT v mínus DNA řetězci a tím se na začátku mRNA objevuje polyA leader o délce 35 nukleotidů vznikající klouzavým mechanismem závislý na přítomnosti buněčného heterodimeru G3BP/p137<sup>(41)</sup>. Intermediární promotor je podobně jako časný dlouhý 30 nukleotidů. Asi 35 genů z celkových 223 je přepisováno ve střední fázi infekce, ale u mnoha z nich není známa jejich funkce <sup>(16,42)</sup>.

Pozdní promotor je tvořen třemi odlišnými částmi – sekvence asi 20 bp bohatá na AT páry, mezeríkových 6 bp a důležitá konzervovaná oblast (-1)TAAAT(+4), kde probíhá iniciace

transkripce. Mutace v konzervované sekvenci způsobují změny v transkripci pozdních genů. Mutace v kritických oblastech vakcíniových promotorů mohou ovlivnit jeho sílu, to znamená intenzitu transkripce dané oblasti. Cílenými mutacemi či samotnou syntézou oligonukleotidů tak vznikla řada umělých promotorů, většinou kombinovaných časně pozdních, využívaných pro expresi cizorodých genů v rekombinantní vakcínii <sup>(43,44)</sup>.

Molekuly mRNA jsou podobné eukaryotním, jsou opatřeny čepičkou a polyA sekvencí. Časné mRNA přepsané z jednoho genu vypadají všechny stejně, mají 5' čepičku a 3' polyA sekvenci. U pozdních genů vznikají od jednoho genu co do délky heterologní mRNA. RNA polymeráza totiž při iniciaci transkripce sklouzává po TAAAT oblasti promotoru, takže kromě čepičky má pozdní mRNA tzv. 5' poly[A] leader 30-50 nukleotidů dlouhý<sup>(45)</sup>. Tvorbu čepičky zajišťuje heterodimerní capping enzym kódovaný geny D1R a D12L, který se mimo to účastní také terminace časné a intermediární transkripce <sup>(46)</sup>. Nebyla zaznamenána přítomnost intronů v genech, nedochází tedy ani k sestřihu mRNA. Výjimečně může dojít k posttranskripčnímu sestřihu na 3' konci genu F17R účinkem multifunkčního H5 proteinu <sup>(47)</sup>.

Také RNA polymeráza se pro přepis v různých fázích infekce částečně liší. Existuje ve dvou formách, jedna je specifická pro časné geny, druhá pro pozdní a intermediární. Obě formy sestávají z 8 podjednotek, které jsou v časné fázi (ve virionu) asociovány s proteinem RAP94. Vazba této podjednotky zajišťuje rozpoznání pouze časných promotorů, RNA polymeráza s disociovaným RAP94 nasedá pouze na pozdní promotor. Kromě proteinu RAP94 je v časné fázi infekce vyžadována i přítomnost časného transkripčního faktoru VETF. Transkripce je ukončena nejméně 30 nukleotidů za specifickým terminačním signálem TTTTNT za účasti capping enzymu.

Tento signál není v pozdějších fázích infekce rozpoznáván jako terminační. Přepis pokračuje dále i podle sousedních genů, což je také příčinou nejednotné délky pozdních transkriptů. Transkripce v intermediární a pozdní fázi se kromě RNA polymerázy účastní transkripční faktory, capping enzym a poly[A] polymeráza. Zajímavé je, že některé podjednotky enzymů se podílejí jak na transkripci, tak i na posttranskripčních úpravách (viz tab. č. 3). Na transkripci se v těchto fázích infekce podílí i buněčné jaderné faktory <sup>(48,49)</sup>.

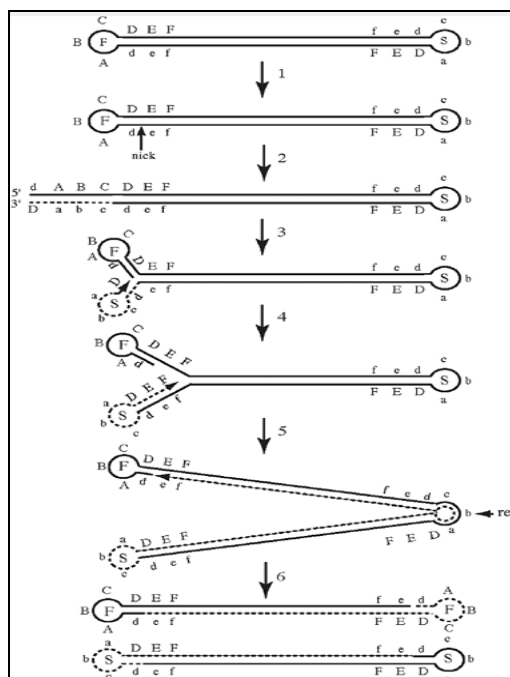
Faktor	Třída	Gen	Charakteristika
VETF	Časný	D6R,	vazba na promotor, iniciační faktor, ATPáza
		A7L	
VTF	Časný	D1R,	terminační faktor, capping enzym, transkripční faktor intermediárních genů
		D12L	
NPH I	Časný	D11L	elongace, terminace, release faktor, vazba k H4L
VITF 1	Intermediární	E4L	homolog TFIIS
VITF 3	Intermediární	A8R,	homolog Rpo30
		A23R	
VITF2	Intermediární	hostitel	jaderný transkripční faktor
Capping enzym	Intermediární	D1R,	terminační faktor, capping enzym, transkripční faktor intermediárních genů
		D12L	
J3	Intermediární	J3R	elongační faktor, poly[A] polymeráza, processivity faktor, methyltransferáza
G2	Intermediární	G2R	elongační faktor, vazba k H5R
A18	Intermediární	A18R	terminace, release faktor, helikáza, ATPáza
H5	Intermediární	H5R	
YY1	Intermediární	hostitel	Jaderný transkripční faktor
VLTF1	Pozdní	G8R	vazba k VLTF2
VLTF2	Pozdní	A1L	vazba k VLTF1
VLTF3	Pozdní	A2L	
VLTF4	Pozdní	H5R	vazba k G2R
G2	Pozdní	G2R	elongační faktor
YY1	Pozdní	hostitel	jaderný transkripční faktor
A1/B2	Pozdní	hostitel	hnRNP
RBM3	Pozdní	hostitel	hnRNP

Tab 3. Přehled transkripčních faktorů viru vakcínie. Převzato a upraveno podle Condit a Niles, 2002, a Broyles 2003 (42,50).

## 2.2.5 REPLIKACE VAKCÍNIE

Replikace nastává ve chvíli, kdy již došlo k transkripci časných genů, DNA je uvolněna z rozpadající se kapsidy do cytoplasmy hostitelské buňky a stává se citlivou k DNáze, což je asi za 2 hodiny po infekci. K replikaci dochází v tzv. „viral factories“, neboli viroplasmě, což jsou speciální hustější oblasti cytoplasmy v oblasti endoplasmatického retikula, kde se virus masivně pomnožuje a kde se hromadí materiál pro tvorbu dceřinných virionů <sup>(40)</sup>. Tyto oblasti jsou v jiné části cytoplasmy než nahromaděné časně mRNA <sup>(51)</sup>.

Přesný počátek replikace nám není znám, v místech terminálních repetit se vytvoří zlom, který poskytne volný 3'OH konec jako primer, od kterého může DNA polymeráza primáza začít syntetizovat nový řetězec<sup>(52,53)</sup>. Vzniká konkatemerní intermediát spojený duplexními formami vlásenek, který je v pozdní fázi infekce rozdělen do dceřinných virových partikulí činností A22 resolvázy a DNA ligázy, viz obrázek č. 2<sup>(54,55)</sup>.



Obr. č. 2. Self-priming model replikace vakcíniové DNA. Převzato z Moss, 2007<sup>(4)</sup>.

K enzymům zahrnutým v replikaci patří DNA polymeráza kódovaná genem E9L, která, jak vyplývá z pokusů s termosensitivní mutantou vakcínie, se účastní i rekombinace<sup>(56)</sup>. B1 protein kináza fosforyluje protein H5 (nezbytné pro replikaci), protein kódovaný genem D5R, který se pravděpodobně účastní i rekombinačních procesů, a uracil DNA glykosyláza kódovaná genem D4R. Další enzymy účastníci se metabolismu DNA jsou thymidinkináza (gen J2R), thymidylát kináza (gen A48R), ribonukleotid reduktáza (geny I4L a F4L), dUTPáza (gen F2L), proteinové produkty genů D9R a D10R podílející se na reparacích DNA, DNA topoizomeráza typu I (gen H5R), ssDNA vazebný protein I3 a DNA ligáza (gen A50R) podobná savčí ligáze II. Reparace DNA ozářené UV se účastní DNA-RNA helikáza (gen A18R) vykazující DNA dependentní ATPázovou aktivitu<sup>(57)</sup>. Omezená reparace a snížení množství replikované DNA probíhá u virů s poškozenou ligázou<sup>(58)</sup>.

## 2.2.6 INTERMEDIÁRNÍ A POZDNÍ TRANSKRIPCE

Již během replikace virové DNA dochází ve velmi krátkém časovém intervalu k expresi intermediárních genů, která je unikátně regulovaná okamžikem replikace a součinností virových a buněčných faktorů. Intermediární geny, pokud je známa jejich funkce, kódují transkripční faktory nutné pro pozdní fázi infekce. Dochází také k přesunu některých buněčných proteinů do virových „factories“, nebo alespoň do jejich blízkosti. Přímo ve „factories“ se nachází transkripční faktory YY1, SP1 a TBF, které se z jádra přesunují v okamžiku, kdy se virová DNA začne replikovat. Dalšími proteiny se změněnou lokalizací jsou PolII, TFIID a mírně i HDAC8<sup>(59)</sup>. Dochází i k přesunu GM130 proteinu z cis-Golgiho aparátu do virových factories<sup>(60)</sup>. Naopak do buněčného jádra mívají některé virové proteiny, například antiapoptotické E3L, C7L nebo virová RNA polymeráza<sup>(61,62)</sup>.

V pozdní fázi dochází převážně ke tvorbě modifikačních, strukturních a DNA-vazebných proteinů podílejících se na tvorbě nových virionů. Exprimují se také enzymy a transkripční faktory, které budou zabaleny do virového jádra tak, aby po infekci další buňky mohlo nerušeně dojít k okamžitému zahájení časné transkripce.

## 2.2.7 STRUKTURA A MORFOGENEZE VIRIONU

Během infekce buňky prochází vakcínie několika stádií tvorby virionu, kdy výsledkem je vznik dvou antigeně odlišných zralých infekčních virových částic. V pozdní fázi infekce se hromadí membránové cisterny a proteiny virového jádra v oblastech viroplasmu, kde se skládají do půlměsícového tvaru s minimálním lumenem. Zakulacením se tvoří nematurovaný virus (IV), kolem něhož se seskupují pozdní membránové proteiny. Partikule získá bikonkávní tvar štěpením prekursorů virového jádra, dochází k zabalení DNA, která se rozloží pod povrchem jádra<sup>(63)</sup>, přidá se plasmatická membrána a vzniká intracelulární maturovaný virion (IMV).

Infekční maturovaná forma, která vzniká přidáním dalších membrán odvozených od cisteren trans-Golgiho aparátu<sup>(64)</sup>, se nachází také v cytoplasmě a je označována jako intracelulární obalený virus (IEV). IMV a IEV jsou aktivně transportovány po buněčném cytoskeletu<sup>(65,66)</sup>. Infekční extracelulární forma virionu (EEV) vznikne fúzí IEV s cytoplasmatickou membránou, čímž se zbaví jedné ze svých membrán, povrchová membrána EEV je tedy antigeně odlišná od IEV. Tato forma viru je schopna šíření po organismu. Virus,

který se sice dostane ven z buňky, ale zůstane navázán na jejím povrchu, se nazývá cell-associated virus (CEV) a jeho role spočívá v šíření viru z buňky do buňky přímým buněčným kontaktem.

Postupné zrání virionů probíhá v buňce v rozsáhlých strukturách v okolí buněčného jádra, ve viroplasmě neboli virových „factories“<sup>(67)</sup>. Virové jádro tvoří tři hlavní proteiny – 4a, 4b a 25K a řada dalších proteinů<sup>(15)</sup>. Zatím nikdo nezjistil, jakým způsobem jsou směřovány proteiny virového jádra do oblastí viroplasmy. Zralé hlavní strukturální proteiny vznikají štěpením prekursorů, které jsou produkty genů A10L, A3L a L4R. Protein 25K, jak zjistili Vanslyke et al, 1993, je lokalizován mnohem blíže DNA v jádře než zbylé dva, které jsou rozprostřeny okolo, a působí jako DNA vazebné proteiny<sup>(67)</sup>. V nematurovaných partikulích se nachází důležitý protein kódovaný genem D13L<sup>(68)</sup>. Skládá se do homotrimerů, které tvoří ve viroplasmě lešení podobné včelím plástům. Obklopuje jádro, interaguje s membránovým proteinem A17 a působí jako lešení při morfogenezi virionů. Nejdříve se tvoří pŕlměsíkové útvary, do kterých se postupně hromadí komplexy DNA/DNA-vazebných proteinů. Po uzavření jádra dochází k rozvolnění A17-D13 komplexu a vytvoření kulovitých nematurovaných virionů díky proteáze I7<sup>(69)</sup>. V maturovaných partikulích již jeho přítomnost nebyla zaznamenána<sup>(70)</sup>. Pro tvorbu virionů jsou důležité i produkty genů A2.5L, E10R, G4L a L1R, redoxní proteiny vázající se navzájem disulfidickými můstky v oblasti konzervované sekvence -C-X-X-X-C- na N-koncovém  $\alpha$ -helixu<sup>(71)</sup>. Ještě v roce 2002 se tvrdilo, že v IMV partikulích nejsou žádné buněčné proteiny<sup>(72)</sup>. Až s použitím dokonalejších detekčních technik analýza IMV ukázala, že celkově je ve virionu obsaženo asi 80 virových a 55 hostitelských proteinů<sup>(73,74)</sup>. Například z virových proteinů má 30% strukturální funkci, 25% je zapojeno do transkripce, 19% je v membránách, 4% se účastní obrany proti hostiteli (viz tab. č. 4). Z hostitelských proteinů se jedná o součásti cytoskeletu, HSP, proteiny účastnící se translace a dokonce i některé mitochondriální proteiny, které ale pravděpodobně představují minoritní kontaminaci při přípravě čistých virů. Hostitelských proteinů je v podstatě 24, ale díky nálezů různých isoform jejich počet narostl na 55 (viz tab. č. 5). S tvorbou nových virionů jsou také spojeny některé buněčné proteiny. HSP70 a HSP90 se účastní počátečních stádií morfogeneze, ale ve virionu nakonec zůstává pouze HSP70<sup>(75,76)</sup>. Hlavní virové proteiny virionů jsou ukázány na obr. č. 3.

Strukturální proteiny vakcínie podléhají posttranslačnímu sestřihu na jejich N-konci většinou v oblasti sekvence -A-G\*-X-, ke štěpení dochází za glycinem. Takto „zralé“ proteiny mění svoji konformaci a mohou vytvořit virové jádro se změněnou morfologií a tím vzniká i infekční intracelulární maturovaný virion (IMV) obalený jednou membránou<sup>(77,78)</sup>. Některé strukturální proteiny jsou myristilovány, jako např. produkty genů E7, L1, A16 a G9, což usnadňuje jejich asociaci s membránou nebo stabilizuje interakce protein-protein<sup>(79)</sup>.

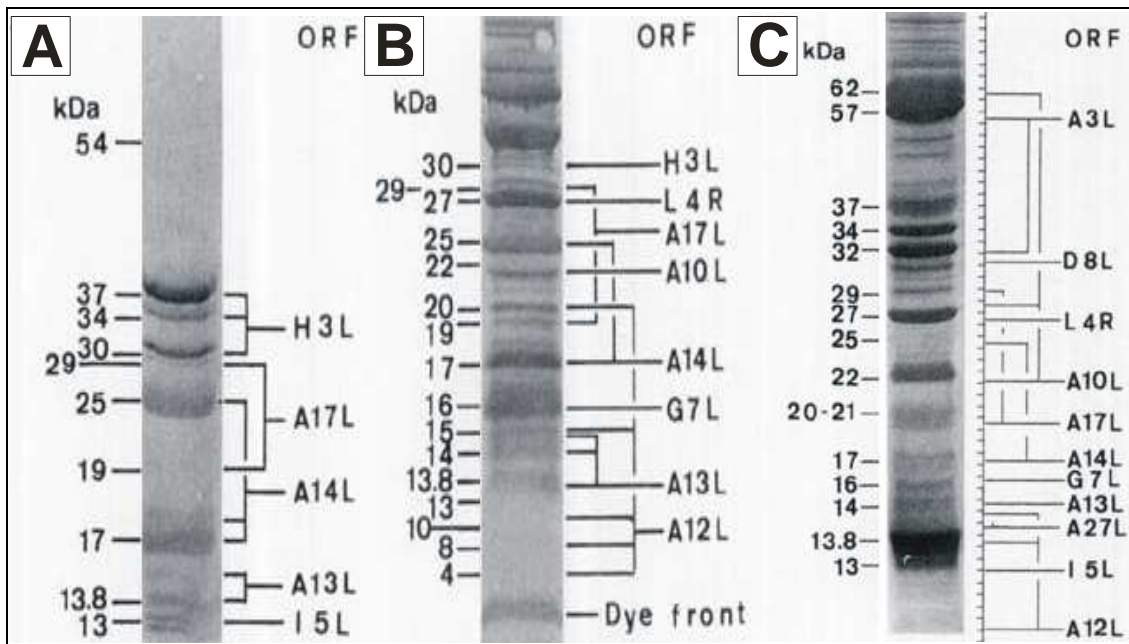
<b>Funkce</b>	<b>Virový protein</b>
<i>Struktura a morfogeneze</i>	A10, A11, A12L, A15, A30, A3, A3, D13, D2, D3, E11, D8, F10, F17, G1, G7, H5, I1, I3, I6, I7, J1, L4
<i>Transkripce</i>	A18, A24, A29, A5, A7, D11, D1, D12, D6, E1, D4, G5.5, H1, H4, H6, I8, J3, J4, J6, L3
<i>Membrána</i>	A13, AA14, A17, A26, A27, A9, D8, F9, H3, L1
<i>Proteiny pro vstup do buňky a fúzi membrán</i>	A21, A28, G9, H2, J5, L5
<i>Tvorba S-S můsteků</i>	A2.5, E10, G4
<i>Obrana proti hostiteli</i>	C22, E3, N1
<i>Další funkce</i>	A42, A45, A50, B1, E9, F13, F4, F8, K4, M1, O2
<i>Neznámá funkce</i>	A6, A19, E6

Tab. č. 4. Funkční charakterizace IMV proteinů pomocí hmotové spektrometrie. Převzato z Resch, 2007<sup>(74)</sup>.

<b>Funkce</b>	<b>Buněčný protein</b>
<i>Chaperony</i>	HSP70 - 8/iso2, HSP 70 - 1B
<i>Cytoskelet</i>	tubulin $\alpha$ 1, tubulin $\beta$ 2, aktin $\gamma$ 2, keratin 7, cofilin 1, vimentin
<i>Translace</i>	eEF1 $\alpha$ 2, 60S ribosomální protein P0
<i>Signální transdukce</i>	prohibitin, Rab-5C, Rab-7
<i>Metabolismus</i>	fosfoglycerát kináza 1, pyruvát kináza
<i>Další funkce</i>	RNA helikáza, peroxiredoxin 2, hnRNP A1
<i>Neznámá funkce</i>	podobnost s RIKEN, s polyubiginem C, s ribosomálním proteinem S27 $\alpha$ , transgelin 2, hypotet. protein LIC388524

Tab. č. 5. Buněčné proteiny nalezené v IMV při analýze hmotovou spektrometrií. Přepřacováno z Resch, 2007<sup>(74)</sup>.





Obr. č. 3. Hlavní strukturální proteiny IMV rozdělené na SDS-PAGE a obarvené Coomassie Blue. A) membránové proteiny, B) a C) celé viriony. Převzato a upraveno podle Takahashi, 1994<sup>(77)</sup>.

Hostitelské glykoproteiny jsou z virové membrány většinou vypuzeny a nahrazeny virovými<sup>(1)</sup>. Tyto jsou kotranslačně vloženy do membrány drsného endoplasmatického retikula, část jich je vložena posttranslačně<sup>(80)</sup>. Vakcíniové viriony se během procesu zrání dostávají z okolí jádra buňky směrem k jejímu povrchu pohybem po mikrotubulech díky virovým proteinům A10 a L4, kde vypučí na koncích viřem indukovaných mikroklků ven z buňky<sup>(81,82)</sup>. Virus vakcínie je schopen modifikovat jak mikrofilamentový, tak i mikrotubulový cytoskelet<sup>(65,66)</sup>. IEV virus odvozuje své membrány od endoplasmatického retikula či endosomů, čímž získává dvě přídavné membrány<sup>(64,83)</sup>. Po vytvoření nových IEV vyžaduje partikule pro další postup činnost aktinového skeletu vlákna, na kterých se virus přesune do sousední buňky (Sodeik a Krijnse-Locker, 2002). Aktinová vlákna spojená s vakcíní se vyskytují převážně pod povrchem buňky, neprochází skrz buňku. Zapojen je produkt genu A36R, který fosforylován členem Src rodiny proteinkináz váže buněčné proteiny Nck, WIP, N-WASP, Arp2/3 komplex a Grb2 k virové partikuli a indukuje tak vznik aktinového vlákna a pohyb vakcínie<sup>(84,85)</sup>. V případě blokování jednoho či druhého systému pohybu je vakcínie schopná kompenzovat dopravu k povrchu druhým způsobem. Acylováný protein p37 (gen F13L) je hlavním obalovým antigenem vakcínie. Nejedná se o transmembránový protein, je s membránou asociovaný z její vnitřní strany, kde se vyskytuje i ve formě homodimerů<sup>(86,87)</sup>. Je acylován palmitovou a olejovou kyselinou a je důležitý pro přenos viru lokálně z buňky do buňky a také pro viřem indukované formování mikroklků<sup>(88)</sup>. Další identifikované geny kódující obalové proteiny či

proteiny podílející se jiným způsobem na pohybu a uvolňování virionů jsou: A56R<sup>(89)</sup>, B5R<sup>(90)</sup>, A34R<sup>(91)</sup>, A36R<sup>(92)</sup> a A33R<sup>(93,94)</sup>. Protein F12 (spolu s A36 a E2) a je hlavním faktorem pro pohyb IEV po aktinu<sup>(95,96)</sup>. Takto se IEV dostane až k plasmatické membráně, odkud vypučí ven z buňky se ztrátou jedné membrány. Takovýto EEV (extracelulární obalený virus) má dvě membrány. U EEV partikule je známo celkem 10 virových proteinů, které jsou součástí vnější membrány – 9 glykoproteinů a 1 acylovaný protein<sup>(97)</sup>. Také zde byl potvrzen výskyt buněčných proteinů – MHC gp I,  $\beta$ 2mikroglobulin, CD29, CD81, CD71, CD59, CD46 a CD55<sup>(72)</sup>. Část virionu zůstává asociována s povrchem buňky a je označována jako CEV. Ten interaguje s kinázami umístěnými pod povrchem plasmatické membrány a nutí buňku pomocí změn v aktinu a intermediárních filamentech posunovat partikuli po povrchu buňky za účelem infekce sousedních buněk, případně dochází i k „přeskakování“ a infikování vzdálených buněk<sup>(85,98)</sup>.

## 2.2.8 CYTOPATICKÝ EFEKT

Infekce virem vakcínie vede v buňce k řadě morfologických i biochemických změn. Buňky se postupně zakulacují a ztrácejí kontakt s podkladem. Mění se tvar buňky, v průběhu infekce dochází k několika přeuspořádáním aktinového i tubulinového cytoskeletu<sup>(99,65,82,100,101)</sup>. V plasmatických membránách dochází k přechodným změnám v jejich propustnosti v časně fázi infekce, v pozdní fázi membrány zprostředkují fúzi s okolními buňkami za vzniku syncytií<sup>(102)</sup>. Během infekce se v membráně hromadí virové proteiny, které mohou být rozeznávány imunitním systémem hostitele. Vakcínie velmi účinně blokuje biosyntetické pochody v buňce, což také souvisí se změnami na plasmatické membráně. Hostitelská DNA není replikovaná, buněčné mRNA jsou rychleji odbourávány a zvýhodňuje se tak transkripce virové mRNA<sup>(103)</sup>. Do dvou hodin po infekci je zastavena syntéza téměř všech buněčných proteinů (90%), důležitá je inhibice exprese pro-apoptotických genů či genů z proteasom-ubiquitinové dráhy. Naopak exprese některých buněčných genů je při infekci zvýšena – Golgi residentní protein 60, claudin 3, pericentrin a pro pohyb vakcínie nejdůležitější WASP<sup>(104)</sup>. Za 6 hodin jsou již uvolňovány první zralé infekční partikule a k masivnímu uvolnění nových generací vakcínie dochází při lyzi buňky asi 24 hodin po infekci.

## 2.3 INTERAKCE HOSTITELE S POXVIRY

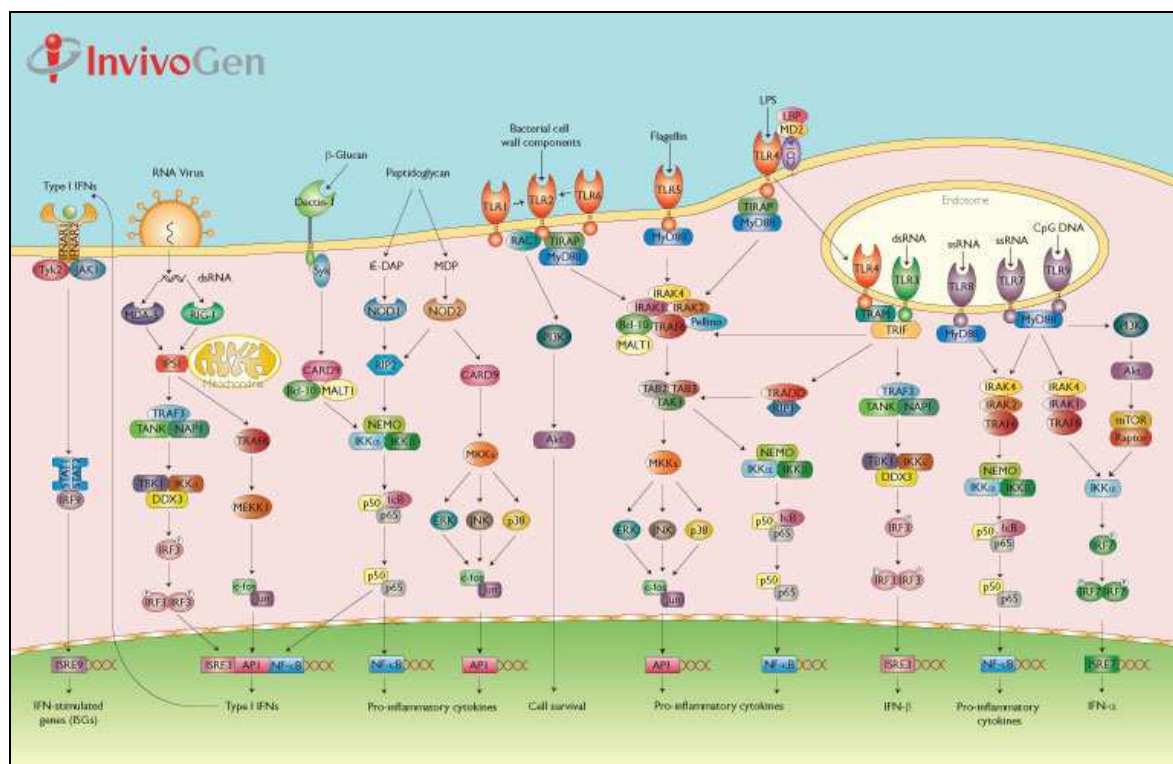
### 2.3.1 REAKCE IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Při vstupu vakcínie do živého organismu se aktivují protivirové obranné mechanismy. Zpočátku je nejdůležitější nespecifická imunitní odpověď zprostředkovaná účinky interferonů I. a II. typu, NK buňkami („natural killer“ – přirození zabijáci) a makrofágy. V časných fázích infekce dochází k výraznému nárůstu počtu aktivovaných buněk, jež zajišťují eliminaci viru<sup>(105)</sup>. Při uměle vyvolané inaktivaci NK buněk byla zaznamenána zvýšená replikace viru<sup>(106)</sup>. Spojkou mezi přirozenou a adaptivní imunitní odpovědí jsou dendritické buňky<sup>(107)</sup>. Několik dní po infekci se projeví i účinek virově specifických, cytotoxických T lymfocytů (CTL), které ničí buňky napadené virem. V poslední řadě přichází na řadu specifická protilátková odpověď zajištěná B lymfocyty<sup>(108)</sup>.

#### 2.3.1.1 Přirozená imunitní reakce

Interferony I. typu zajišťují první linii obrany proti virovým infekcím<sup>(109)</sup>. Ve tkáních kolem infikovaných buněk navozují antivirový stav expresí „interferonem stimulovaných genů“, podporují presentaci antigenů dendritickými buňkami a hrají klíčovou roli v přímé stimulaci protivirové CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-buněčné odpovědi<sup>(110,111,112)</sup>. Jejich tvorba může být spuštěna signalizací přes Toll-like receptory (TLR). Rozeznání povrchových struktur vakcínie přirozenou nespecifickou složkou imunitního systému je zprostředkováno buněčným povrchovým TLR2; přes jeho adaptorové proteiny MyD88, IRAK a další je spuštěna signální dráha vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů, viz obr. č. 4<sup>(113)</sup>. Virus vakcínie a jeho dsRNA spouští aktivační dráhu také přes endosomální TLR3 při infekci nezralých DC<sup>(114)</sup>. Na TLR-nezávislé aktivaci imunity proti vakcínii se podílí cytoplasmatické RNA helikázy MDA5 a RIG-1. Ty jsou přítomné i v nehematopoietických buňkách postrádajících TLR. RIG-I rozpoznává krátkou cytoplasmatickou RNA bez čepičky, MDA5 je přitahován k delším RNA tvořícím sekundární struktury. Vazbou virové RNA na MDA5 helikázu dochází přes caspázy-rekrutující doménu k jejich nasednutí na mitochondriální protein IPS-1, jsou aktivovány IRF3 a AP-1, spouští se produkce IFN- $\alpha/\beta$  a prozánětlivých cytokinů<sup>(115,116,117)</sup>. Další molekulou, která v cytoplasmě reaguje na přítomnost dvouřetězcové RNA, je proteinkináza PKR. Po vazbě dsRNA dimerizuje, dochází k autofosforylaci kinázy a k inaktivaci eIF-2 $\alpha$ , čímž se dosáhne zastavení proteosyntézy, suprese virové replikace a apoptotické smrti infikované buňky<sup>(118,119)</sup>. Dalším enzymem reagujícím na přítomnost cizorodé dsRNA v cytoplasmě je 2'-5' oligoadenylát syntetáza. Produkuje oligonukleotid, který aktivuje latentní ribonukleázu RNázu L štěpící všechny mRNA,

čímž je opět zastavena proteosyntéza v infikované buňce <sup>(120)</sup>. TLR závislé i nezávislé dráhy jsou potřebné pro spuštění přirozené odpovědi DC, NK či makrofágů, např. aktivace TLR na nezralých DC vede k jejich dozrávání a následné stimulaci adaptivní odpovědi vůči vakcínii *in vivo* <sup>(121,113,121)</sup>.



Obr. č. 4. Spuštění exprese interferonů a prozánětlivých cytokinů v přirozené imunitě. Převzato z [www.invivogen.com](http://www.invivogen.com)

### 2.3.1.2 Imunitní reakce založená na NK buňkách

NK buňky jsou součástí antigeně nespecifických obranných mechanismů, jejich aktivita je však do značné míry podobná cytotoxickým T lymfocytům, tzn. tvoří cytotoxické granule obsahující perforin a granzymy. Buňky infikované vakcínii se mění a stávají se cílem NK buněk. Rozpoznání změn na infikované buňce závisí na cytotoxických receptorech NKp30, p44 a p46. Důležitými aktivátory NK jsou IFN- $\alpha$  a  $\beta$  produkované při virové infekci. Samy NK sekretují IFN- $\gamma$ , IL-3 a M-CSF, které ovlivňují diferenciaci T<sub>H</sub> buněk. NK rozeznávají buňky napadené virem či nádorové buňky, u nichž dochází k potlačení exprese komplexů molekul MHC gp I. Jelikož vakcínii neindukuje expresi ligandů pro aktivační NKG2D receptor, ani nesnižuje expresi MHC gp I, je eliminace NK buňkami závislá přímo na rozpoznání časných virových produktů a na dalším rozpoznání adaptivními složkami imunitního systému <sup>(122,123)</sup>.

### 2.3.1.3 **Reakce založená na dendritických buňkách**

Profesionální antigen-presentující buňky (APC), mezi něž patří i dendritické buňky (DC), hrají ústřední úlohu ve vyvolání imunity proti virovým a nádorovým cílům. V přirozených podmínkách pohlcují a vystavují antigeny z mrtvých buněk, ale při infekci virem/mikroorganismem ukazují také antigeny patogenu. Na základě toho jsou pak antigeny dlouhodobě vystavovány na MHC gp I. a II. třídy, čímž napomáhají navození a stimulaci antigenně specifické adaptivní imunitní odpovědi<sup>(124)</sup>. Maturace DC je důležitým předpokladem pro správnou stimulaci T buněk tak, aby došlo k jejich aktivaci a k produkci IFN- $\gamma$ ; nezralé DC naopak mohou indukovat IL-10 produkující regulační CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty<sup>(125,107)</sup>. Infekce DC vakcínou má abortivní průběh, nedochází k dozrávání DC a mohla by být snížena stimulace T lymfocytů<sup>(126,127)</sup>. Při infekci zralých či nezralých DC dochází v průběhu infekce k narušení jejich antigen-presentační funkce, je poškozeno jak vystavení antigenů na MHC gp II určených pro CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, tak i na MHC gp I určených pro stimulaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů<sup>(128,129,130,131,123,132)</sup>. Infikované DC také selhávají v migraci do lymfatických uzlin na základě podnětů, které přijaly pomocí receptorů pro chemokiny CCL19 a CXCL12. Infekce u nich nezpůsobuje úbytek receptorů, nýbrž přerušuje signální dráhy na úrovni SKR1 kinázy a změny v mobilizaci Ca<sup>2+</sup><sup>(133)</sup>. Infikované (umírající) DC však alespoň tvoří materiál zpracovatelný neinfikovanými DC, které následně aktivují T lymfocyty a adaptivní imunitní odpověď<sup>(134)</sup>.

### 2.3.1.4 **T lymfocyty**

T lymfocyty se dělí podle exprese koreceptorových molekul pomáhajících rozpoznat komplexy MHC glykoproteinů typu I či II („major histocompatibility complex“, MHC gp I/II) na CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>. Jsou to prekursorové pomocných T<sub>H</sub> (CD4<sup>+</sup>) nebo cytotoxických CTL (CD8<sup>+</sup>) buněk. CTL jsou „výkonnou“ mocí imunitního systému, jsou přímo zodpovědné za smrt infikovaných buněk. Pomocné T lymfocyty se dále dělí na několik podtypů, z nichž nejdůležitější jsou T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 buňky<sup>(135)</sup>, viz dále. Existují také T<sub>H</sub>17 lymfocyty typické produkcí IL-23 a IL-17, které se účastní autoimunitních reakcí. Pro regulaci imunitních odpovědí vůči vlastním antigenům, ale i vůči nádorovým buňkám, jsou důležité T-regulační lymfocyty (T<sub>reg</sub>), produkující TGF- $\beta$  a u myši specifické expresí transkripčního faktoru Foxp3<sup>(136)</sup>. Buňkám T<sub>reg</sub> jsou podobné svým cytokinovým profilem i T<sub>H</sub>3 lymfocyty (CTLA-4, TGF- $\beta$ , IL-10, Foxp3...) <sup>(137)</sup>. Spornou skupinou jsou Tr1, které produkují IL-10 a v podstatě zahrnují všechny IL-10 produkující lymfocyty<sup>(138)</sup>. Další spornou skupinou jsou T<sub>H</sub>9 lymfocyty odvozené asi většinou

od  $T_H2$  působením  $TGF-\beta$ , který u nich spouští produkci IL-9 přes transkripční faktor GATA-3 (ovšem  $TGF-\beta$  spouští sekreci IL-9 také u části  $T_{reg}$  a  $T_H17$ ).

### **2.3.1.5 Imunitní odpověď založená na funkci $T_H1$ a cytotoxických T lymfocytů**

Zprostředkují ji zpočátku aktivované makrofágy a dendritické buňky. Jejich aktivace je výsledkem interakce s  $CD4^+$   $T_H1$  lymfocyty a ty naopak vznikají a množí se až po kontaktu infikovaných či jinak aktivovaných antigen-presentujících buněk (APC), hlavně makrofágů a dendritických buněk. Profesionální APC prezentují na povrchu buňky na molekulách MHC gp II peptidové fragmenty infekčního agens, které pohltily po rozpadu infikovaných buněk. T lymfocyt rozezná komplex MHC-peptid svým T receptorem, ale potřebuje i další aktivační signály. Kostimulační signály přes molekulu CD28 na  $T_H$  lymfocytu ( $CD4^+$ ) poskytují molekuly CD80/CD86 na APC a interleukin-12 (IL-12). Stimulované  $T_H$  diferencují a mohou tak zpětně opět stimulovat makrofágy sekrecí IFN- $\gamma$ . Aktivované makrofágy likvidují parazity a secernují další cytokiny, které v místě infekce stimulují lokální zánět.

Přes APC dochází i ke kooperaci  $T_H1$  a cytotoxických  $CD8^+$  T lymfocytů (CTL). Při infekci běžných typů buněk i samotných APC dochází k vystavení peptidů cizorodého původu, ale na molekulách MHC gp I, jedná se o tzv. přímou presentaci antigenů spojenou se stimulací  $CD8^+$  T lymfocytů. Neinfikované APC však mohou prezentovat přes MHC gp I také cizorodé pohlcené peptidy, potom se jedná o tzv. nepřímou presentaci antigenů (tzv. kros-presentace). APC tedy mohou pohlcenými antigeny z rozpadlých infikovaných buněk stimulovat jak  $CD4^+$  (MHC gp II), tak i  $CD8^+$  T lymfocyty<sup>(139)</sup>. Pro plnou aktivaci cytotoxické funkce potřebuje  $CD8^+$  lymfocyt dostat tři signály. Po rozpoznání cizorodých peptidů na MHC gp I (signál 1) spolu s kostimulací vyvolanou kontaktem molekul CD80 a CD86 na povrchu APC a CD28 na povrchu CTL (signál 2) dochází k proliferaci a diferenciaci na zralé efektorové CTL. Tomu napomáhá i sekrece IL-2 (signál 3) z antigen presentujících buněk nebo proliferujících  $T_H1$  lymfocytů<sup>(140,141,142)</sup>. CTL likvidují infikované buňky několika způsoby. 1. Cytotoxický lymfocyt se přiblíží k infikované buňce, sekretuje na ni proteázy zvané granzymy. Ty vstupují do infikované buňky pórem vytvořeným perforinem, v cytoplasmě štěpí buněčné caspázy a spouští tak apoptotickou smrt infikované buňky. 2. může dojít ke kontaktu molekul Fas-receptor/Fas-ligand (buňka/CTL) a opět je spuštěna kaskáda reakcí vedoucích k apoptóze. 3. na větší vzdálenost likvidují cílové buňky sekrecí lymfotoxinu (=TNF- $\beta$ ), který pak způsobí smrt infikované buňky podobně jako při signalizaci přes Fas receptor.

Cytotoxická odpověď proti poxvirům, jež je důležitá pro kontrolu primární viremické fáze v poxvirem infikovaných myších, vrcholí kolem 7. dne po infekci<sup>(143,144,145)</sup>. Ve fázi, kdy

vrcholí virová infekce myši kmene C57BL/6, je proti vakcínii namířena 1/3 slezinných CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Ty rozpoznávají převážně časné antigeny, zatím bylo predikováno a ověřeno 49 antigenních epitopů<sup>(146)</sup>. Paměťové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty mohou dobře sloužit i v pozdějších fázích infekce či při reinfekcích<sup>(147)</sup>. Ovšem stimulace CTL také závisí na chování daného kmene vakcínie. U replikačně kompetentní vakcínie dochází k přímé i nepřímé presentaci na APC, důležitější roli však zastává přímá presentace pomocí infikovaných APC odvozených z kostní dřeně, na rozdíl od infikovaných parenchymálních buněk<sup>(148)</sup>. U replikačně deficientního kmene MVA je nepostradatelná také kros-presentace antigenů<sup>(149)</sup>. Opět dochází ke kostimulaci lymfocytů interakcí CD28-CD80/CD86, která je důležitá pro okamžitou cytotoxickou odpověď proti poxvirům, ale již ne pro vytvoření paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů<sup>(150)</sup>.

#### **2.3.1.6 Imunitní reakce založená na T<sub>H</sub>2 lymfocytech a protilátkách**

Aktivace T<sub>H</sub>2 lymfocytů vede ke stimulaci B buněk a k sekreci protilátek. T<sub>H</sub> prekursory diferencuje po setkání s APC (dendritická buňka), která nese na povrchu komplex MHC gp II s antigenem a kostimulační molekuly CD80 a CD86. Pokud zároveň působí IL-4, vznikají zralé efektorové T<sub>H</sub>2, které pomáhají B lymfocytům sekrecí IL-4, IL-5, IL-6 a přímými buněčnými kontakty přes kostimulační molekulu B lymfocytů CD40. B lymfocyty, které mají dostat pomoc od T<sub>H</sub>2, musí presentovat na svých MHC gp II tentýž antigen jako iniciační APC. B lymfocyty pak diferencují na plasmatické buňky a sekretují protilátky proti danému antigenu. Z části B prekursory se stanou paměťové buňky, které pomáhají urychlit imunitní odpověď organismu při další infekci. Produkované protilátky jsou zpočátku nízkoafinní imunoglobuliny typu M (IgM), po afinitní maturaci B buněk se začnou tvořit IgM s vyšší afinitou i další typy imunoglobulinů (IgG, IgA).

Ukázalo se, že pro ochranu proti poxviróvé infekci nestačí jen CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, ale že je zapotřebí kooperace mezi T a B lymfocyty a produkce protilátek. Ty jsou tak nejdůležitější složkou dlouhodobé ochrany organismu<sup>(151,152,153,154)</sup>. Na povrchu B lymfocytů, CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a APC se nachází molekula CD40. Interaguje s CD154 na povrchu CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které pomáhají zahájit nejen cytotoxickou odpověď, ale později také protilátkovou. Pokusy s KO myšmi ovšem ukázaly, že pro dlouhodobé udržení resistance proti poxviróvé infekci není až tak významný CD40 (a tím aktivované CD8<sup>+</sup> T lymfocyty), ale hlavně funkční imunoglobuliny produkované B lymfocyty<sup>(155)</sup>. CD4<sup>+</sup> T lymfocyty jsou cíleny převážně proti pozdním vakcíniovým proteinům (strukturní, regulační), z nichž bylo u myši C57BL/6 identifikováno 13 epitopů, které činí asi 20% celkové CD4 odpovědi<sup>(156)</sup>. Pro inhibici množení viru v organismu mají největší význam vysokoafinitní IgG. První IgG se objevují asi 8 dní po imunizaci, ale účinné

neutralizační IgG se tvoří až za 2-3 týdny, což je na udržení kontroly nad infekcí pozdě <sup>(151)</sup>. Svoji roli tedy hrají i nízkoafinitní IgM detekovatelné již 4. den po infekci myši a schopné také neutralizovat virus podobně jako IgG <sup>(157)</sup>.

### 2.3.2 KLINICKÉ PROSTŘEDKY PRO KONTROLU INFEKCE

Vakcinace virem vakcínie může mít u oslabených osob za následek i některé nežádoucí účinky. Mezi postvakcinační komplikace patří progresivní vakcínie, ekzema vakcinatum, generalizovaná vakcínie, encefalitida či carditida. Progresivní vakcínie se projevuje rozsáhlými nekrózami u osob se selháním buněčné imunity <sup>(158)</sup>. Ekzema vakcinatum se může vyskytnout u osob s atopickou dermatitidou, kdy se vakcínie rozšíří z místa primárního očkování na ekzematickou kůži <sup>(159)</sup>. Její replikaci napomáhá zvýšená hladina IL-4/IL-13 v místě s ekzémem <sup>(160)</sup>. Generalizovaná vakcínie je nespécifický termín používaný k popisu rozšíření malých puchýřků po těle po vakcinaci, někdy bývá zaměňován s ekzema vakcinatum, nebo s časnými stádii progresivní vakcínie. V případě generalizované vakcínie může být problematické vůbec virus v těchto lézích detekovat <sup>(161)</sup>. Postvakcinační encefalomyelitida je sice velmi zřídka se vyskytující onemocnění, zato však o to vážnější. Vyskytuje se u osob poprvé očkovaných a závisí na použitém očkovacím kmeni. V několika posledních desetiletích se také stále více objevují osoby s alergiemi a ekzémy, nebo imunosuprimovaní jedinci, jež jsou např. nositeli viru HIV. U těchto osob je nutno důkladně zvážit použití živé vakcíny, a proto je potřeba pro vývoj bezpečných vakcín virus dostatečně atenuovat. Toho lze dosáhnout delecí či inaktivací virových genů, jako jsou thymidinkináza a VGF, vnesením genů nesoucích imunomodulační aktivitu a používáním vysoce atenuovaných kmenů vakcínie, např. NYVAC a MVA <sup>(162,163)</sup>.

Pokud by se náhodou infekce člověka poxvirem vymknula kontrole, je k dispozici řada antivirových léčiv. Vakcíniový imunoglobulin je směs hyperimunních sér odebraných od dobrovolníků vykazujících vysoký neutralizační titer proti intracelulární formě vakcínie. Imunoglobulin byl používán při komplikacích po vakcinaci proti pravým neštovicím, při profylaxi pacientů, u kterých nebylo možno použít vakcínu a u zdravotnických pracovníků. Jeho intravenózní podání dnes funguje lépe než klasické intramuskulární, které se používalo dříve <sup>(164)</sup>. Bohužel je v něm pouze nízká hladina protilátek proti extracelulární formě viru, který je důležitý pro šíření viru po organismu, ovšem jsou snahy vylepšit sérum i po této stránce <sup>(165)</sup>.



Cidofovir je analogem nukleosidu cytosinu používaný k léčbě infekce DNA virů – účinkuje proti herpes-, polyoma- a papillomavirům <sup>(166,167)</sup> a byl uznán jako léčivo pro nouzovou léčbu nečekaných efektů po aplikaci vakcínie <sup>(168)</sup>. Existuje mnoho derivátů cidofoviru, například CMX001, které také inhibují syntézu virové DNA, ale vykazují nižší toxicitu a nemusí být podávány intravenózně jako cidofovir <sup>(169)</sup>.

Atraktivním cílem při potlačení nežádoucího či nečekaných účinků po vakcinaci jsou buněčné kinázy. Při infekci vakcínií dochází postupně k aktivaci receptorových i intracelulárních kináz. Na počátku infekce je aktivován EGFR pomocí virového růstového faktoru. Signalizaci přes receptor lze inhibovat například Gefitinibem, který se jinak užívá pro léčbu nádorů. Inhibitory rodiny Src kináz (např. dasatinib) zase zabraňují pohybu viru podél buněčné membrány a v šíření viru do sousedních buněk <sup>(170,98)</sup>. Nově je k dispozici také český přípravek olomoucínII, jež se řadí do skupiny inhibitorů cyklin dependentních kináz a je účinný proti širokému spektru virů včetně vakcínie <sup>(171)</sup>. Malý inhibitor Tecovirimat, také známý jako ST-246, je nadějným inhibitorem poxvirů. Výhodou je možnost orální aplikace léku. Účinkuje nejen na lidské, ale i na zvířecí poxviry, což z něho činí přípravek vhodný pro inhibici zoonotických onemocnění <sup>(172)</sup>. Kombinací inhibitoru Tecovirimat a nukleosidového derivátu CMX001 bylo dosaženo synergického účinku v inhibici viru vakcínie i kravských neštovic *in vitro* a *in vivo* <sup>(173,174)</sup>.

### 2.3.3 INTERFERENCE VIRU SE SLOŽKAMI IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Vakcínie, stejně jako řada jiných virů, produkuje během infekce *in vivo* mnoho proteinů, které interferují s hostitelským imunitním systémem a zabraňují tak apoptóze infikovaných buněk. Regulace virovými proteiny se děje na úrovni buňky i celého organismu. Sekretované a cytoplasmatické virové proteiny inhibují účinky zánětlivých cytokinů, blokují signální dráhy vedoucí k apoptóze infikovaných buněk, blokují komplement či vyvazují chemokiny. Sekretované proteiny bývají nazývány virokiny či viroceptory <sup>(175)</sup>.

Chemokiny jsou malé, ale přesto důležité chemoatraktivní molekuly, které navádí leukocyty do místa infekce a nepřímo tak zprostředkují vznik zánětu. Virové geny B29R/C23L kódují proteiny vázající C-C chemokiny, čímž blokují jejich aktivitu <sup>(176)</sup>. Produkty genů C3L

(sekretovaný protein) či B5R (membránový protein) inaktivují svou vazbou některé složky komplementové kaskády <sup>(177,178,179)</sup>.

Cytokiny jsou velmi důležité pro obranu hostitele před virovými infekcemi. Nejjednodušší způsob, jak zabránit aktivaci protivirotických mechanismů, je inaktivovat cytokiny ještě před nasednutím na příslušný buněčný receptor vyvázáním pomocí virových rozpustných receptorů. Virový homolog receptoru pro TNF (faktor nekrózy nádorů) je kódován genem B2R a vyskytuje se jako solubilní i membránově vázaný protein. Zánětlivý interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) je vychytáván solubilním receptorem kódovaným genem B16R <sup>(180)</sup>. Virus zasahuje i do samotného metabolismu IL-1 $\beta$  tím, že blokuje maturaci jeho prekursoru inhibicí interleukin-1 $\beta$ -konvertujícího enzymu <sup>(181)</sup>. Nejdůležitějšími cytokiny zahrnutými v protivirotické obraně organismu jsou interferony (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ). Pokud dojde ke stimulaci buňky vazbou interferonu na příslušný buněčný receptor, spustí se signální Jak-STAT kinázová dráha vedoucí např. k expresi antivirových proteinů – proteinkinázy (PKR) a 2'5'oligoadenylát syntázy (OS), zastaví se proteosyntéza a spustí se apoptotické pochody v infikované buňce. Virus sekretuje proteiny, které interferony vychytávají a zabraňují tak jejich nasednutí na buněčné receptory - geny B8R a B19R <sup>(182,183)</sup>. V buňce pak další virový protein kódovaný genem E3L váže svou C-koncovou doménou cytoplasmatickou virovou dsRNA, která by mohla aktivovat PKR i OS <sup>(184)</sup>. E3 protein je multifunkční, jeho N-koncová doména je Z-DNA vazebná, takže část produkovaného E3 proteinu jde i do jádra, kde aktivuje transkripci *IL-6*, *NF-AT* a *p53* genů, čímž opět brání v apoptóze infikovaných buněk <sup>(61)</sup>. Protein kódovaný genem K3L zabraňuje vazbou PKR, popřípadě i její substrátové molekuly eIF2 $\alpha$ , aktivační autofosforylaci a udržuje tak eIF2 $\alpha$  v aktivním stavu <sup>(185)</sup>. IFN- $\gamma$  působí synergisticky s IFN- $\alpha/\beta$  a s TNFR, indukuje nespecifickou imunitní odpověď a zvyšuje expresi MHC gp I i II a zajišťuje tak zvýšenou prezentaci antigenů <sup>(186)</sup>. Signalizaci od receptoru pro IFN- $\gamma$  vedoucí přes Jak-STAT kinázy reguluje virová fosfatáza VH1. Zabraňuje fosforylaci buněčného Stat1 a tím zabrání jeho dimerizaci a přesunu do jádra, kde by jinak spustil expresi příslušných genů odpovídajících na stimulaci IFN- $\gamma$ . Jakožto fosfatáza má protein VH1 všeobecně afinitu k fosforylovaným tyrosinům, je inkorporován do virionů a je nezbytný pro udržení viru v buněčných kulturách – jeho nedostatek se projeví již v časných fázích infekce inhibicí transkripce <sup>(187,188)</sup>.

Receptory TLR jsou důležité pro rozpoznání struktur typických pro patogeny (PAMP); jsou přítomny jak na povrchu buněk (TLR2,4), tak i v endosomech (TLR3,7,9). Cytoplasmatické RNA helikázy RIG1 a MDA5 také nespecificky rozpoznávají napadení buněk parazitem. Spuštění drah vedoucích od TLR nebo RNA helikáz vede k aktivaci transkripčních faktorů, např. NF $\kappa$ B,

kteří v jádře zahájí expresi cytokinů a chemokinů aktivujících imunitní systém (viz kap. 2.3.1.1). Vakcinie produkuje protein N1L považovaný za neurovirulenci faktor, který se podobá BH3 doméně anti-apoptických proteinů z Bcl-2 rodiny <sup>(189,190)</sup>. Inhibuje TBK1 kinázu, jež je součástí signální kaskády vedoucí od TLR či receptorů pro IL-1 a TNF k aktivaci NFκB, čímž zamezí produkci protivirových/protizánětlivých cytokinů TNF-α, IL-1β IFN-α/β a IL-10 <sup>(191,192)</sup>. Signalizaci přes TLR4/IL-1R a následnou aktivaci NFκB inhibují další dva virové produkty, A52R a A46R. Ty vytěsňují přirozené adaptorové proteiny nasedající na intracelulární části receptorů díky podobnosti s jejich TIR doménou a zabraňují hned u zdroje aktivaci signální kaskády <sup>(193)</sup>. Vakcinie kóduje ještě další cytoplasmatické proteiny s antiapoptickými účinky. Jedná se o serpiny (inhibitory serinových proteáz) SPI-1 a SPI-2 (geny C12L/B28R a B13R), které zabraňují apoptóze spuštěné cytotoxickými T lymfocyty přes Fas nebo působením granzymu B <sup>(194,195)</sup>. Virový B1 protein je časně transkribovaná serin-threonin kináza, která je ovšem inkorporovaná i do virionů. Fosforyluje virové i buněčné proteiny. Interaguje s JIP-1 proteinem a zvyšuje jeho interakci s MAP kinázami, zvyšuje expresi a udržuje aktivitu transkripčního faktoru c-Jun, čímž způsobuje hyperfosforylaci a destabilizaci proapoptického p53 <sup>(196,197)</sup>.

*In vitro* je také mnohdy vyvolána programovaná buněčná smrt. Zjistilo se, že pochody vedoucí k apoptóze nejsou vyvolány metabolismem viru (transkripce, replikace), ale hned jeho navázáním na některý z buněčných receptorů <sup>(198)</sup>. Infekce také způsobuje výrazné snížení hladiny buněčného antiapoptického proteinu Bcl-2 <sup>(199)</sup>. Funkční geny E3L a K3L ovlivňují přežívání viru nejen v organismu, ale také v buňkách *in vitro*. Delecí jednoho nebo obou z nich dochází ke zúžení hostitelského spektra a v některých buněčných liniích se tak stává infekce virem abortivní <sup>(200)</sup>. Dalším proteinem ovlivňujícím hostitelské spektrum je C7. Jeho přesná funkce je zatím neznámá, ale v některých typech buněk je jeho anti-apoptická funkce zastupitelná s proteinem K1. Protein K1 inhibuje aktivaci NFκB stabilizací jeho komplexu s IκB <sup>(201, 202, 203)</sup>.

## 2.4 VIROVÉ VAKCÍNY V BOJI PROTI RAKOVINĚ

### 2.4.1 NÁDOROVÝ RŮST

Slovo rakovina představuje termín zastřešující přibližně 200 nemocí, které sdílí dvě společné charakteristiky: nekontrolovaný růst buněk a schopnost prorůstání a destrukce normálních tkání v místě nádoru, nebo na vzdálenějších místech v organismu v podobě metastáz. Většina buněk lidského těla se dělí po celý život, aby nahrazovaly stárnoucí a mrtvé buňky; jiné tkáně, jako jsou např. nervové buňky, se aktivně nedělí. Dělicí se buňky musí úspěšně projít celým buněčným cyklem, tzn. nahromadit zásoby, duplikovat genetickou informaci, zajistit rozdělení obsahu mateřské buňky rovnoměrně do dvou dceřinných; a to vše pokud možno bez chyb <sup>(204)</sup>. Buňka má k dispozici opravné mechanismy kontrolující kvalitu genetického materiálu, ale žádný systém není dokonalý, takže i zde může dojít k omylům, které se přenáší do dceřinné buňky. Vznik rakoviny, kancerogeneze, je v mnoha případech popsána jako proces postupného (i mnoholetého) nahromadění změn (mutací) genetického materiálu buňky. Ke zvýšení rizika vzniku mutací přispívají kromě nepřesnosti vlastních enzymů také vnější vlivy, ať už povahy fyzikální (různé druhy záření) či chemické (těžké kovy, aromatické uhlovodíky atd) a změny ve vnitřním prostředí organismu (chronický zánět, infekce). Běžné geny, většinou členové signálních kaskád, se pak mění z protoonkogenů na aktivované onkogeny podporujících růst nádorů, podobné deregulační účinky má naopak inaktivace genů kontrolujících správný průchod buněčným cyklem, tzv. tumor-supresorových genů, případně v poslední době intenzivně studované epigenetické změny.

Buňka, u které došlo k deregulaci buněčného cyklu, se označuje jako transformovaná. Zrychlené dělení buněk nezávislé na příjmu adekvátních vnějších signálů (např. růstových faktorů) má za následek rychlejší a tím i nedokonalou duplikaci genetické informace spojenou se vznikem následných mutací. Transformovaná buňka se stává více a více nezávislou na regulačních signálech z vnějšího i vnitřního prostředí (odolnost k apoptóze, ztráta buněčné adheze atd.), až se z ní stane naprosto samostatná, nekonečně se dělicí (imortalizovaná) nádorová buňka <sup>(205,206)</sup>. Nádorový růst může postihnout jakoukoliv část našeho organismu. Některé nádory jsou odvozeny z epiteliálních buněk a nazývají se karcinomy. Sarkomy vznikají z podpůrných tkání, jako jsou svaly, kosti a cévy. Krevní buňky dávají vznik leukémiím a lymfomům, nervové tkáně gliomům. Melanomy vznikají z pigmentových buněk kůže.

## 2.4.2 PROTINÁDOROVÁ ODPOVĚĎ

Kdyby mělo dojít ke vzniku nádoru pokaždé, když dojde k selhání vnitřních opravných mechanismů buňky, byl by výskyt rakoviny mnohonásobně častější, než tomu ve skutečnosti je. Naštěstí na správnou funkci všech součástí organismu dohlíží též imunitní systém. Imunitní dozor zahrnuje funkce přirozené i adaptivní složky imunitního systému, nejdůležitější roli zde hrají T lymfocyty. Imunitní systém pacienta s rakovinou je neustále vystavován nádorovým antigenům stimulujícím lymfocyty, ale rostoucí nádor svědčí o tom, že imunitní systém nedokáže eliminovat nádorové buňky, a že transformovaná/imortalizovaná buňka tomuto dozoru unikne (immune escape). Takové buňky prošly procesem imunoselekcce, mechanismy úniku jsou různé – dochází k mutacím či ztrátám nádorových antigenů (imunoeditace), jsou exprimovány molekuly ovlivňující nádorové mikroprostředí tak, aby mělo negativní vliv na nově přicházející imunitní buňky, může dojít ke snížení množství molekul zainteresovaných v prezentaci antigenů (např. snížení povrchových MHC gp), zvyšuje se odolnost nádorových buněk k působení interferonů a ustavuje se imunitní tolerance. Indukce tolerance u nádorově specifických T lymfocytů se může stát nejvážnější bariérou při léčbě nádorů a při terapii je nutno myslet na její prolomení. (207, 208, 209, 210)

Role CD8<sup>+</sup> T lymfocytů v protinádorové imunitě jsou rozličné. Tyto buňky jsou schopné lyzovat cílové buňky, které exprimují nádorově specifický antigen a prezentují ho jako součást komplexu MHC gp I. Také produkují sekretorické proteiny, jakými jsou např. cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , které oba mají protinádorové účinky<sup>(211, 212)</sup>. U makrofágů je na základě cytokinových stimulů spuštěna exprese indukibilní NO-syntetázy<sup>(213)</sup> a produkce IP-10 a Mig chemokinů jako odpovědi na interferonovou signalizaci. Chemokiny lákají NK buňky k infiltraci do místa stimulu a také inhibují angiogenezi<sup>(214, 215)</sup>. Samotný TNF- $\alpha$  také rekrutuje NK buňky do nádoru, takže umožňuje likvidaci i těch nádorových buněk, které se skrývají před jinými efektorů imunitního systému snížením svých povrchových MHC gp I molekul<sup>(216, 217)</sup>. Přímým efektem působení IFN- $\gamma$  na nádorové buňky je regulace štěpení proteinů v proteasomu a stimulace exprese samotných MHC gp I, čímž dochází ke zlepšení zpracování nádorových antigenů pro vystavení na povrchu buněk a zvyšuje se imunogenicita nádoru<sup>(218, 219)</sup>.

### 2.4.3 NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ

Poznatky z poslední doby ukazují, že pro růst nádorů není důležitá jen jeho vaskularizace, ale i komplexní vztahy v nádorovém mikroprostředí. Součástí nádorového mikroprostředí jsou (kromě nádorových buněk) také stresované normální buňky, stromální tkáň a bohatá extracelulární matrix; takové mikroprostředí se považuje za hlavní faktor pro progresi nádoru a tvorbu metastáz<sup>(220)</sup>. Stromální tkáň obsahuje fibroblasty, myofibroblasty, endotelie krevních a lymfatických cév a také infiltrující imunitní buňky, jakými jsou antigen prezentující makrofágy a dendritické buňky, NK buňky, B nebo T lymfocyty (TIL – tumor infiltrující T lymf.), viz obr. č. 5. Snížení protinádorové aktivity těchto infiltrujících imunitních buněk je považováno za důležitý krok k podpoře růstu nádoru<sup>(221, 222, 223, 224, 225, 226)</sup>. Typ, hustota a lokalizace těchto imunitních buněk se ukázala být důležitým prognostickým faktorem<sup>(227)</sup>. Také jsou zde zastoupeny složky komplementu a imunoglobuliny proti nádorovým antigenům vázající se na nádorově specifický epitop, nebo na epiteliální a mezenchymální buňky. I v nádorových buňkách nelymfoidního původu může docházet k ektopické expresi Fc receptoru vychytávajícího dostupné imunoglobuliny a nádory místo „označování“ specifickou protilátkou pro ADCC naopak získávají další stimulační signály pro svou expanzi<sup>(228, 229, 230)</sup>.

S nádory asociované fibroblasty (CAF) jsou další důležitou složkou nádorového mikroprostředí, starají se o udržování vhodných podmínek pro růst nádorů. Na rozdíl od normálních fibroblastů jsou CAF permanentně aktivovány působením TGF- $\beta$  přítomného v nádorové tkáni. Označují se také jako myofibroblasty díky podobnosti jak s fibroblasty, tak i s hladkými svalovými buňkami. Aktivované CAF se pak chovají podobně jako při hojení zranění - podporují proliferaci okolní nádorové tkáně<sup>(231, 232, 233)</sup>. Produkují nadměrná množství svalového aktinu, extracelulární matrix a membránově vázaných proteolytických enzymů (metalloproteináz) usnadňujících štěpením např. kolagenu prorůstání nádoru do okolní tkáně. Metalloproteinázy také uvolňují TGF- $\beta$  z jeho latentní formy a zvyšují množství aktivovaného cytokinu v nádoru. Expanzi nádorové tkáně podporují produkcí růstových faktorů, např. FSP1 (metastazin), nebo chemokinů, např. CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ). FSP1 inaktivuje regulační protein p53, zvyšuje motilitu buněk a tím i tvorbu metastáz. CXCL12 působí parakrinním mechanismem, váže se na nádorový receptor CXCR4 a stimuluje tyto buňky. Tvorba receptoru je vyvolána přítomností TGF- $\beta$  v nádorové tkáni<sup>(234)</sup>. CXCL12 také zvyšuje metastatický potenciál buněk jejich směrováním do plic a lymfatických uzlin. Jako chemoatraktans láká leukocyty k infiltraci nádorové tkáně<sup>(235)</sup>. Dalšími chemokiny uvolňovanými z CAF jsou CCL2, CCL5, CCL7, CXCL8, and CXCL14<sup>(236, 237)</sup>.

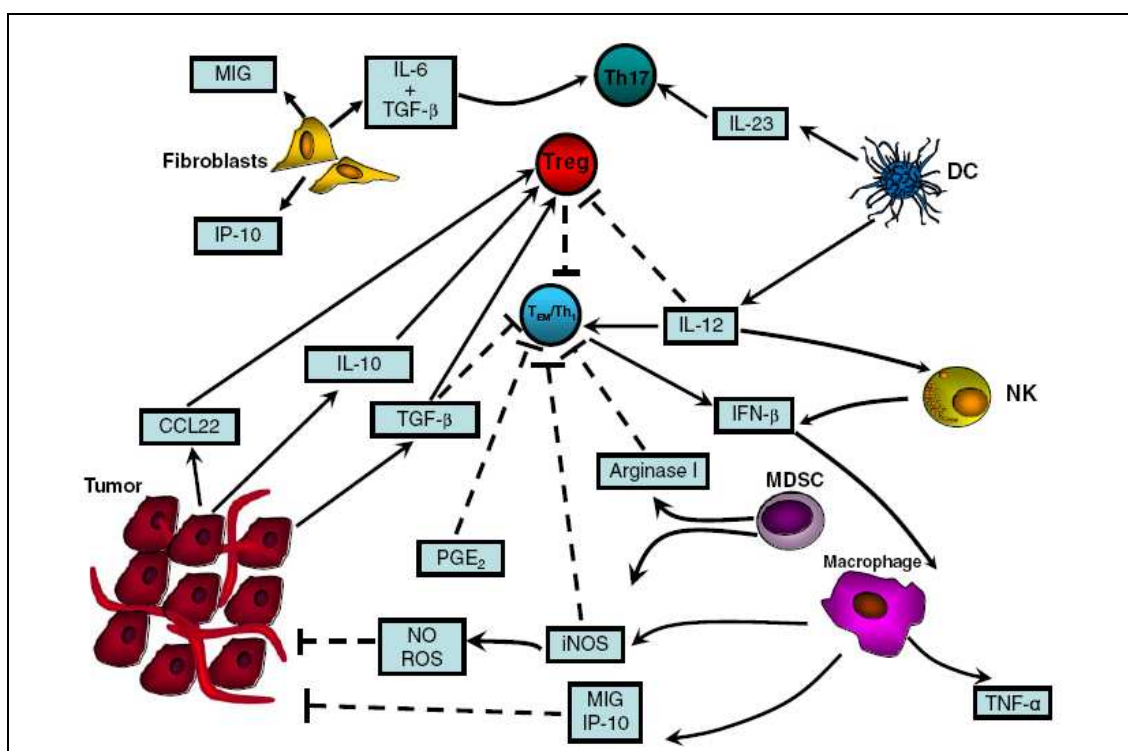
Současné studie ukazují, že chronický zánět zvyšuje riziko vzniku a rozvoje nádorové tkáně<sup>(238)</sup>. Zánět je obvykle součástí obrany hostitele proti patogenům, či při poraněních tkání. TLR hrají klíčovou roli v přirozené imunitní odpovědi a v následné indukci adaptivní odpovědi<sup>(239)</sup>. Jsou exprimované nejen na imunitních, ale i na nádorových buňkách<sup>(240)</sup>, což je podobně nezvyklé místo exprese stejně jako v případě nádorového Fc receptoru<sup>(229)</sup>. Antigeny vzniklé při poškození a nekróze nádorových buněk mohou aktivovat TLR exprimované na imunitních i nádorových buňkách. Takto aktivované buňky uvolňují do prostředí cytokiny a chemokiny, ale jejich špatné vyvážení výrazně mění nádorové mikroprostředí<sup>(241)</sup>. Aktivované TLR na nádorových buňkách mohou podpořit jejich růst a využít tak chronickou zánětlivou odpověď ve svůj prospěch ve smyslu odolnosti proti apoptóze a proti likvidaci imunitním systémem<sup>(242,243,240)</sup>. Po vystavení buněk působení TLR ligandů je zvýšena produkce prozánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$ , G-CSF, IL-1 $\alpha$ , and IL-6), chemokinů (CCL2 a CXCL12), imunosupresivních cytokinů (IL-10) a zánětlivých faktorů (COX-2). Také dochází ke zvýšení exprese TGF- $\beta$ , IL-8, CXCR4, ICAM-1 and VEGF<sup>(243,244,245)</sup>. Téměř všechny tyto látky podporují růst nádoru, jejich přítomnost je charakteristická pro nádorové mikroprostředí, kdy aktivní produkce mnoha faktorů ovlivňuje nádorové, imunitní i normální buňky.

TGF- $\beta$ , VEGF, CCL22 a IL-10 mohou indukovat vznik T-regulačních buněk (T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) v nádorovém mikroprostředí a v lymfatických uzlinách<sup>(222,246)</sup>. T<sub>reg</sub> sekretují další IL-10 a TGF- $\beta$ , které suprimují protinádorové účinky ostatních T lymfocytů. Zvýšené množství T<sub>reg</sub> v nádorech je spojeno se špatnou prognózou u mnoha typů rakoviny<sup>(247)</sup>. Makrofágy se mohou na základě vnějších signálů diferencovat na M1 nebo M2 typ, který dále podporuje T<sub>H</sub>1 nebo T<sub>H</sub>2 odpověď. IL-10 dává vzniknout z nádorově asociovaných makrofágů diferencovaným myeloidním M2c buňkám, které uvolňují do mikroprostředí proangiogenní a lymfoangiogenní faktory podporující tvorbu metastáz<sup>(248)</sup>. Zánětlivé faktory IL-1 $\beta$ , IL-6 a prostaglandin lákají do místa nádoru supresorové buňky derivované z myeloidní linie (MDSC)<sup>(249)</sup>. MDSC jsou stejně významné pro růst nádorů jako T<sub>reg</sub>. Inhibují protinádorovou odpověď produkcí arginázy (arginin je esenciální pro funkce T lymfocytů), NO syntetázy a TGF- $\beta$ <sup>(250,221)</sup>.

Dendritické buňky mohou také přispět k imunopatogenezi nádorové tkáně<sup>(251)</sup>. Plasmacytoidní DC jsou do nádoru lákány chemoatraktanty CXCL12, zde pak produkci IL-8 a TNF- $\alpha$  přispívají k neoangiogenezi, která již byla zahájena účinky VEGF a CXCL12. Nádorové plasmacytoidní DC indukují u T lymfocytů vznik supresorového fenotypu CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> nezávislého na přítomnosti CD4<sup>+</sup> supresorových buněk. IL-10 následně působí imunosupresivně

na ostatní T lymfocyty. Diferenciace myeloidní linie DC může být narušena vlivem VEGF, IL-6, IL-1, prostaglandinu či TGF- $\beta$ . Myeloidní DC jsou zodpovědné za indukci protinádorové T<sub>H</sub>1 a T buněčné odpovědi. Produkce IFN- $\gamma$  specifickými T lymfocyty tak nepřímou může být potlačena působením plasmacytoidních DC přítomných v nádoru a jimi indukovaných supresorových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů<sup>(252, 253, 254)</sup>.

Často se tak ukázalo, že organismus je sice schopný zahájit přirozenou imunitní odpověď NK a NKT buněk i adaptivní protinádorovou odpověď CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T lymfocytů a B lymfocytů, ale díky imunosupresivnímu nádorovému mikroprostředí není imunita schopna dokončit započaté odstranění nádorové tkáně<sup>(255, 256)</sup>.



Obr. č. 5. Vztahy mezi jednotlivými typy buněk v nádorovém mikroprostředí. Převzato z Barnas, 2010<sup>(257)</sup>.

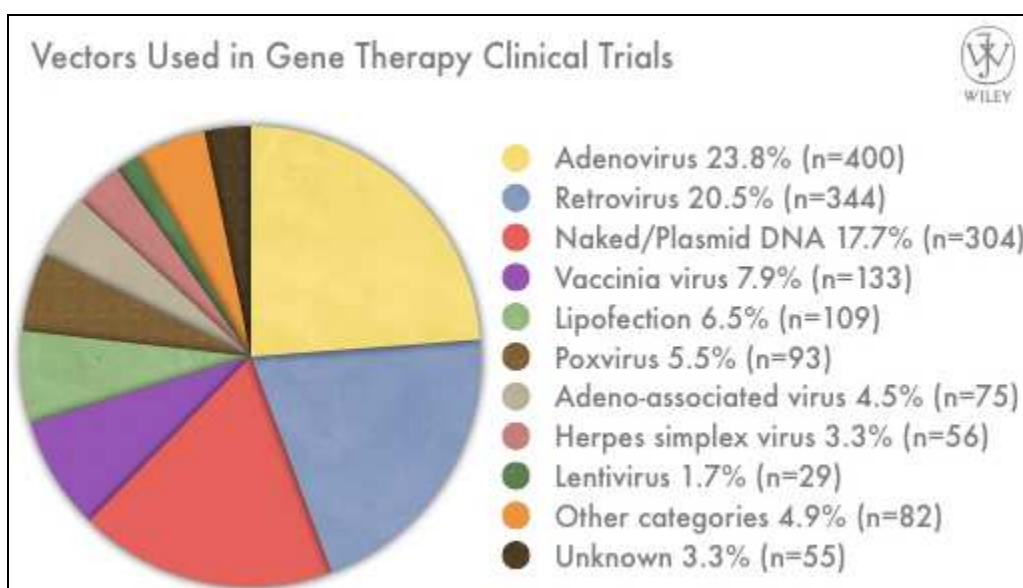
## 2.4.4 VIROVÉ VEKTORY V TERAPII NÁDORŮ

Pro imunoterapii nádorů se využívají dva léčebné přístupy. Pasivní terapie je založena na podání již funkčních/aktivovaných efektorových buněk (lymfocyty, makrofágy, DC, NK), nebo protilátek namířených např. proti nádorovým antigenům či určených k depleci buněk suprimujících protinádorovou imunitní odpověď. Aktivní imunoterapie představuje vyvolání imunitní odpovědi přímo v pacientovi. Imunita může být stimulována nespecificky, to znamená



podáním adjuvans, jakými jsou bakteriální extrakty (BCG, *L.monocytogenes*, *C.parvum*), lyzáty nádorových buněk, CpG oligonukleotidy a podpůrné cytokiny (IL-2, interferony, TNF- $\alpha$ ). Další možností aktivní obrany je vyvolání nádorově specifické imunity očkováním. To se provádí aplikací peptidů/proteinů specifických pro nádory, virus-like částicemi nesoucími nádorový antigen a expresními vektory neviróvého (DNA, RNA) či virového původu. Pro vyvolání silnější odezvy se většinou aktivní a pasivní imunoterapie kombinují.

Hnacím silou pro vývoj nádorů jsou genetické změny. Pomocí genové terapie lze tyto změny zvrátit, nebo lze naopak usnadnit zabití nádorových buněk; 60% případů využití genové terapie se zabývá právě léčbou nádorů (<http://www.wiley.com/legacy/wileyhi/genmed/clinical/>). Hlavním cílem genové terapie je dopravit genetickou informaci do žádaných buněk. Přenáší se tumor-supresorové geny, anti-sense oligonukleotidy, sebevražedné enzymy v kombinaci s proléčivem, imunomodulační a chemoprotektivní geny či geny inhibující onkogeny, angiogenezi, růst nádorů a tvorbu metastáz. Jak je vidět z předchozího výčtu, v genové terapii se počítá s trvalou expresí nového genu (např. chemoprotekce), nebo s přechodnou expresí zajišťující přímé zabití nádorových buněk, nebo podporující vytvoření imunitní odpovědi proti nim. Zvláštní odnoží imunoterapie nádorů jsou onkolytické viry. Terapeutické geny se do cílových buněk dostávají dvěma způsoby. Lze vyizolovat pacientovy cílové buňky, manipulovat s nimi *ex vivo*, a pak je vrátit zpět do organismu, nebo se vektor aplikuje přímo do pacienta, kde je terapeutický gen donesen do cílových buněk *in vivo*. Použití vektorů za rok 2010 v klinických pokusech zaměřených na genovou terapii ukazuje přehledný obrázek č. 6.



Obr. č. 6. Vektory používané v současné době v genové terapii. K dispozici každoročně aktualizované informace na [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

Pro vnesení nových genů do organismu bylo třeba vytvořit bezpečné nevirové či virové vektory. Možností je např. vložit gen pomocí komplexu DNA-polymer nebo DNA-lipid do cílových buněk vyizolovaných z pacienta a takto upravené je zase vrátit zpět. Tato metoda je bezpečná, ale bohužel účinnost stabilní transfekce buněk je nízká a naráží se na problémy s expresí transgenů v post-mitotických nebo pomalu proliferujících buňkách<sup>(258)</sup>. Vyšší účinnost přenosu a nízkou toxicitu řeší přenos genů pomocí virů<sup>(259,260)</sup>. Viry jsou v současné době nejefektivnějším prostředkem k dopravě genů. *Pro přehled viz Stone et al, 2000, a Bouard et al, 2009*<sup>(261,262)</sup>. Prvním virovým vektorem byl Shopův papilomavirus, který Rogersova skupina v roce 1973 použila (ačkoliv ne úplně úspěšně) k vnesení arginázy do buněk vyizolovaných z pacientů s poruchami imunity<sup>(263)</sup>. I přes prvotní neúspěch se časem dalším pracovním skupinám podařilo získat vektory, kterými se vnesly transgeny do buněk. Nejznámější virové vektory jsou odvozené od adenovirů (Ad), adeno-asociovaných virů (AAV), herpesvirů či retrovirové/lentivirové vektory, v současné době také některé poxvirové vektory<sup>(264,262)</sup>. Základní rozdíly mezi některými vektory jsou uvedeny v tabulce č. 6.

vektor	množení	vyvolání zánětu	tropismus	vstup do buněk	forma genomu	exprese transgenů	genotoxická
retrovirus	střední 10 <sup>10</sup>	nízké	dělící se buňky	receptor/fúze membrán	integrováný	dlouhodobě	integrace může vyvolat onkogenezi
lentivirus	vysoké 10 <sup>12</sup>	nízké	široké spektrum	receptor/fúze membrán	integrováný	dlouhodobě	nízká
HSV-1	vysoké 10 <sup>12</sup>	vysoké	široké spektrum	receptor/fúze membrán	episomální	přechodně	nízká
Adenovirus	vysoké 10 <sup>12</sup>	vysoké	široké spektrum	receptor/endosomy	episomální	velmi krátce	nízká
AAV	vysoké 10 <sup>12</sup>	nízké	široké spektrum	receptor/endosomy	episom/integrovaný	středně/dlouhodobě	neznámá
Poxvirus	střední 10 <sup>10</sup>	nízké	široké spektrum	fúze membrán	cytoplasma	přechodně	nízká

Tabulka č. 6. Hlavní vlastnosti některých virových vektorů. Upraveno podle Bouard, 2009<sup>(262)</sup>.

Virové vektory jsou rozličně upravovány pro účely terapie nádorů. Mohou být manipulovány pro expresi terapeutických genů - výměnou jejich neesenciálních genů za cizí lze získat rekombinantní vektory použitelné k infekci přirozených hostitelských buněk. Úpravou jejich obalových proteinů je možné virus nasměrovat specificky na receptor přítomný na povrchu určitého typu buněk. Specifitu infekce lze podmínit i omezením replikace v závislosti na typu buněk, expresi transgenů lze regulovat také vložením za tkáňově specifický či indukibilní

promotor. Řada vektorů byla použita k dopravě genů do buněk tak, aby poskytla transientní (Ad, vakcínie) nebo permanentní (retro-, lentiviry, AAV) expresi transgenů. Replikačně deficientní viry jsou využívány pro vnášení terapeutických genů <sup>(265,266,267)</sup>. Virové nádorové vakcíny zase exprimují nádorově specifické antigeny, cytokiny a kostimulační molekuly <sup>(268,269,270)</sup>. Přehled v současnosti nejvíce využívaných terapeutických genů je uveden v tabulce č. 7.

Typ transgenů/vektoru	Klinické zkoušky	
	počet	procento
antigen	325	19,8
cytokiny	302	18,4
nádorové supresory	173	10,5
růstové faktory	127	7,7
deficiencie	118	7,2
sebevražedné geny	118	7,2
receptory	95	5,8
inhibitory replikace	68	4,1
markery	50	3
onkolytické viry	25	1,5
transkripční faktory	22	1,3
resistence k léčivům	19	1,2
antisense	12	0,7
regulátory onkogenů	11	0,7
transportéry, poriny, kanály	11	0,7
adhezní molekuly	9	0,5
siRNA	9	0,5
ribozomy	6	0,4
hormony	5	0,3
buněčný cyklus	4	0,2

Tabulka č. 7. Příklady transgenů a vektorů použitých pro genovou terapii. Každoročně updatované informace jsou k dispozici na [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

V kontextu s léčbou nádorů je výhodou schopnost atenuovaných virů množit se specificky v nádorových buňkách <sup>(271)</sup>. Onkolytické viry snadno infikují buňky, jsou cílené pro infekci nádorové tkáně a její zničení lyzí buněk <sup>(272,273)</sup>. První generace onkolytických virů (reovirus, VSV) vykazovaly přirozenou selektivitu pro nádorové buňky; pro druhou generaci (Ad, HSV) již byly vytvářeny specifické deleční mutanty pro zvýšení selektivity vektorů pro nádorové buňky <sup>(274,275,273)</sup>. U onkolytických virů je třeba zlepšovat protinádorové účinky, podání a systemické šíření, aby se terapeutický potenciál nevyužil pouze v místě podání

(intratumorálně), ale aby se virus šířil i do oblastí s výskytem metastáz <sup>(276)</sup>. Díky relativně širokému spektru virů použitelných pro genovou terapii lze vybrat takový vektor, který svými vlastnostmi odpovídá našim požadavkům. Jedná se o požadavky na tkáňový tropismus (selektivita pro typ buněk, tkáňově specifické promotory neseného transgenu), levnou vysokokapacitní výrobu vektoru, snížení imunitní odpovědi proti samotnému vektoru a jeho nízkou patogenitu či požadavek dlouhodobé exprese transgenu.

## 2.4.5 POXVIRY JAKO VEKTOR

Na počátku 80 let 20.století se začal virus vakcínie využívat jako rekombinantní virový vektor. Holá virová DNA (bez kapsidových enzymů) je neinfekční a proto se z počátku využívalo homologní rekombinace v infikovaných buňkách <sup>(277)</sup>. Později bylo možné izolovat přímo virový genom, metodami genového inženýrství jej upravit a vnést ho zpět do buněk infikovaných helper virem <sup>(278)</sup>. Ve vakcínii i jiných poxvirech lze exprimovat geny a cDNA prokaryotického i eukaryotického původu včetně virových kódujících sekvencí <sup>(279)</sup>. Použití poxvirů jako vektorů v sobě nese řadu výhod. Izolovaná virová DNA je neinfekční. Virus napadá široké spektrum buněčných typů i organismů, množí se do vysokých titrů a buňky zabíjí, takže se zamezí nežádoucí inserční mutagenezi hostitelského genomu. Virová RNA polymeráza rozpoznává pouze vlastní promotory, vkládaný cizorodý gen musí být ve formě cDNA, protože u poxvirů neprobíhá sestřih mRNA. Sílu a načasování exprese genu lze ovlivnit výběrem promotoru; časně a časněpozdní promotory umožňují vyvolání buněčné i protilátkové odpovědi proti antigenu, pozdní promotory spíše jen tvorbu protilátek, protože v pozdní fázi infekce je snížena prezentace antigenů na MHC gp I vlivem ostatních virových produktů a tím je snížena i stimulace CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Proteiny jsou příslušným způsobem posttranslačně modifikovány, případně transportovány či sekretovány. Vzhledem k velikosti vakcíniového genomu lze vložit dlouhé úseky DNA (až 25 kbp). Po delecí některých neesenčních genů se kapacita vektoru ještě zvětší a lze vložit až dvojnásobné množství cizorodé DNA (50 kbp). Expresní systém je využíván k analýze nejrůznějších proteinů (enzymy, srážecí faktory, hormony), jejich biologické aktivity, protein-proteinových interakcí, chování mutantních a toxických forem proteinů, odezvy imunitního systému na produkci rekombinantního proteinu a s tím spojený vývoj živých rekombinantních vakcín. Poxviry jsou již využívány k expresi cizorodých antigenů a použity byly v klinických testech pro ochranu proti řadě infekčních chorob <sup>(280,281,282,283,284)</sup> či pro léčbu

nádorů<sup>(285,286,287)</sup>. Příklady některých kmenů vakcínie používaných v praxi jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Kmen	Výhody	Nevýhody
NYCBH	klinicky nejužívanější – dlouhodobé zkušenosti s vakcinací, nízká patogenita	minimální selektivita pro nádory <i>in vitro</i>
Lister	vakcinace proti pravým neštovicím, výchozí pro užívaný atenuovaný kmen LC16m8	žádná selektivita pro nádory, 3-6x vyšší patogenita než NYCBH
Kodaň	použitý pro eradikaci pravých neštovic, <i>in vitro</i> selektivita pro nádory	toxický jako neupravená vakcína, vysoká patogenita (10-20x vyšší než NYCBH)
WR	zvýšena schopnost lyze a selektivity pro nádorové buňky <i>in vitro</i>	minimální klinické použití bez atenuací – vysoká virulence, patogenita
Tian Tian	použitý pro eradikaci pravých neštovic v Asii	neznámý potenciál při použití jako onkolytického agens, neznámá patogenita
MVA	bezpečná vakcína (vysoce atenuovaný), mnohonásobné delece v genomu – odvozen z kmene Ankara, žádná replikace se v savčích buňkách	bez onkolytického potenciálu
NYVAC	bezpečná vakcína (vysoce atenuovaný), 20 definovaných delecí v genomu – odvozen z kmene Kodaň, minimální replikace se v savčích buňkách	bez onkolytického potenciálu

Tab. č. 8. Přehled kmenů vakcínie použitých jako základ pro genovou terapii. Upraveno dle Kim, 2009, Kretzschmar, 2006,<sup>(288,289)</sup> a <http://www.cdc.gov>.

Terapie pomocí poxvirů umožňuje zacílit a zničit nádorové buňky díky působení více mechanismů. Poxviry se ve spojení s rakovinou využívají dvěma způsoby – jako nosič nádorového antigenu, proti němuž se má vytvořit imunita, nebo jako onkolytické agens. Vlastnosti a účinky obou typů vakcín se zčásti překrývají.

Jeden z mechanismů, jak může imunitní systém reagovat na přítomnost nádoru, je založen na tom, že nádor prezentuje antigeny, které jsou rozpoznávány jako cizorodé. Během tumorigeneze dochází k řadě změn v expresi genů, dochází k expresi nových antigenů nebo ke vzniku abnormálních proteinů. Vznikají tzv. nádorově specifické a s nádory asociované antigeny (TSA a TAA). TSA jsou unikátní pro nádorové buňky, nejsou exprimované na normálních buňkách a jsou zodpovědné za odhojení nádoru. Většina TSA jsou málo imunogenní proteiny a špatně se identifikují. TAA jsou exprimovány na nádorových i normálních buňkách, ale dochází u nich ke změně míry exprese (zvýšení nebo obnovení). K TSA lze řadit antigeny virového původu (papilomavirové E6, E7), k TAA s obnovenou expresí embryonální alfa-fetoprotein a karcino-

embryonální antigen. Poxviry jsou vysoce imunogenní a je proti nim cílena silná odpověď cytotoxických T lymfocytů <sup>(290)</sup> i neutralizačních protilátek <sup>(291)</sup>. Rekombinantní poxviry exprimující TAA/TSA po infekci organismu zvyšují množství nádorově specifických CTL i protilátkovou odpověď. Výhodou oproti použití terapeutických monoklonálních protilátek, které jsou zaměřené pouze proti jednomu epitopu TAA, je, že virem produkovaný TAA vyvolá odpověď proti široké škále epitopů a navozuje tak účinnější zničení nádorových buněk imunitním systémem. Účinky vakcíny na zvýšení imunitní reakce lze dosáhnout vícenásobným podáním vektoru, v „prime-boost“; očkovacím schématu kombinací dvou vektorů nebo koexpresí stimulačních faktorů či jejich souběžným podáváním ve formě proteinu. Intratumorálním podáním viru exprimujícím pouze cytokin, který stimuluje funkci antigen prezentujících buněk, dochází ke zvýšené infiltraci APC a T lymfocytů do nádoru a jeho okolí, nebo k vylepšení rozpoznání nádorových buněk, což vede k posílení specifické protinádorové odpovědi a k odhojení nádorové tkáně <sup>(285),(270)</sup>.

Účinky vakcín ovšem naráží na schopnost nádorů měnit mikroprostředí v neprospěch imunitních buněk (imunosuprese), nebo dochází k imunoeditaci, která vede k oddělení a přežití subpopulace buněk odolných vůči efektorům imunitní odpovědi, jež neexprimují původní nádorový antigen. Poxviry jsou využitelné také jako onkolytické agens. Přímá infekce nádorových buněk má za následek buněčnou lyzi a odhojení nádoru. Přesný průběh destrukce nádoru závisí na použitém virovém kmeni. Onkolytické viry mohou zničit i takovou tkáň, která je ke klasické léčbě resistantní. Poxviry produkují několik antigenních forem (IMV, EEV, CEV), které se mohou šířit po organismu a napadají i metastatickou nádorovou tkáň. Dají výhodně kombinovat s další imunoterapií nebo anti-angiogenní terapií, která nebrání replikaci vakcínie v nádoru. Kombinací různých účinků vakcínie v místě nádoru dochází k jeho odhojování odlišnému od působení chemoterapie nebo radioterapie. Při uvolnění obsahu nádorové buňky organismus dostane signál nebezpečí, který informuje přirozenou složku imunitního systému o přítomnosti DAMP a PAMP molekul a uvolní se tak i přístup k nádorovým antigenům, jejichž vystavení na povrchu buněk mohlo být předtím v nádorové buňce potlačeno <sup>(292,113)</sup>. Postupně se tak aktivuje také adaptivní složka imunitního systému a dochází k vytvoření protektivní protinádorové odpovědi. Onkolytický virus tak působí jako terapeutikum a zároveň vakcinuje *in situ* <sup>(293,272,294)</sup>. Pokud jsou poxviry vyzbrojeny i terapeutickým transgenem, může se jednat například o cytokin nebo kostimulační molekulu, transgenní protein uvolněný při lyzi buňky zvyšuje vznikající protinádorovou imunitní odpověď, chemokiny a cytokiny lákají imunitní buňky do místa nádoru, kde způsobí trombózu a nekrózu tkáně. Vakcínie může napadat také cévní

řečiště zásobující nádor živinami, infikované endoteliální buňky se zhroutí a nefunkční céva tak napomáhá odumírání nádoru. <sup>(295, 293, 296)</sup>.

Mnoho znaků charakteristických pro nádorové buňky, jakými jsou inhibice apoptózy, deregulovaný buněčný cyklus a únik před imunitním systémem, jsou ovšem výhodné pro úspěšné množení poxvirů <sup>(297)</sup>. Na základě genetických modifikací poxvirového genomu pak lze dosáhnout větší selektivity pro množení viru v nádorových buňkách. Vakcínie produkuje mnoho proteinů důležitých pro virulenci – jejich delecí lze dosáhnout zvýšeného cílení terapeutického viru do nádorů. Delece virových genů požadovaných pro množení se v normálních buňkách, např. thymidinkináza, vede k úspěšné replikaci viru pouze v buňkách s funkčním enzymem <sup>(298)</sup>. Buněčná thymidinkináza je v průběhu normálního buněčného cyklu regulována transkripčním faktorem E2F a je exprimována jen krátce v S-fázi. U nádorových buněk dochází k vysoké expresi thymidinkinázy nezávisle na buněčném cyklu <sup>(299)</sup>. Další poxvirový protein – sekretovaný růstový faktor VGF – se váže na EGFR a podílí se na indukci proliferace infikovaných a okolních buněk <sup>(300, 301, 302)</sup>. V nádorových buňkách je často aktivovaná signální dráha vedoucí od EGFR, takže i virus s deletovaným VGF genem se v nich může bez problému množit <sup>(303)</sup>. Vakcínie také exprimuje řadu genů, které blokují apoptózu v infikovaných buňkách; jejich delecí, nebo kombinacemi různých delecí se může dosáhnout dalšího zvýšení selektivity vakcínie pro množení v nádorové tkáni <sup>(304, 305)</sup>. Také geny interferující s imunitním systémem hostitele, jako je např. virový rozpustný receptor pro IFN, omezí replikaci viru v normálních buňkách, ale ne v nádorových buňkách s poškozeným systémem interferonové odpovědi. Nakonec kombinací deleční mutanty s expresí vhodného transgenu lze dosáhnout maximálního terapeutického účinku (např. delece virového receptoru pro IFN a produkce transgenu IFN $\beta$ ) <sup>(293)</sup>.

Podat poxviry lze více způsoby – intravenózně, kdy se šíří systemicky krví, nebo intratumorálně, kdy je přímo zajištěna primární replikace v nádoru s dodatečným šířením po organismu s cílem vyhledání metastazujících tkání <sup>(306, 307)</sup>. Prodloužením doby cirkulace viru v krvi se zvyšuje i šance infikovat nádorové buňky. Proto se viry obalují do liposomů a syntetických polymerů, nebo se modifikují jejich membrány pomocí peptidů či protilátek <sup>(308, 309)</sup>. Cirkulaci v krvi lze ale prodloužit i naprosto jednoduchým způsobem – zvýšením produkce extracelulární formy viru (EEV), která v membráně sama přirozeně nese proteiny interferující s účinky komplementu či protilátkovou obranou organismu <sup>(310, 311, 312)</sup>.

## 2.4.6 KONSTRUKCE REKOMBINANTNÍ VAKCÍNIE

### 2.4.6.1 Tvorba rekombinantní DNA

Nejčastěji využívaný postup má dvě fáze – konstrukce inserčního plasmidu a *in vivo* homologní rekombinace. Gen se vkládá do plasmidu, který nese následující elementy: vakcíniový promotor, polylinker, sekvenci neesenciálního genu vakcínie rozloženou kolem předchozích dvou elementů, která později umožní homologní rekombinaci plasmidu do genomu vakcínie, počátek replikace pro množení plasmidu v bakteriálním systému, gen pro rezistenci proti antibiotikům nebo pro jiný způsob selekce v bakteriích<sup>(313,314)</sup>. Promotory se používají buď přirozené vakcíniové nebo syntetické. Z vakcíniových je nejhojněji využíván p7.5. Pro imunizaci rekombinantní vakcíní jsou vhodnější časné promotory nebo časně/pozdní se silnou časnou částí, lépe tak dochází ke stimulaci imunitního systému organismu prezentací peptidů rekombinantního proteinu (např. nádorový antigen) na molekulách MHC I gp. Pro produkci proteinů se používají syntetické pozdní či kombinované promotory. *In vitro* lze použít i hybridní expresní systém bakteriofág/vakcínie. Gen je vložen do plasmidu za T7 nebo SP6 promotor a rekombinantní virus vakcínie exprimuje T7 polymerázu. Současnou infekcí a transfekcí dojde k expresi genu umístěného v plasmidu díky virem vyrobené T7 polymeráze. Složitější systém řídí expresi inducibilně, zahrnuje *E.coli* lac represor, T7 RNA polymerázu pod kontrolou virového promotoru a lac operátoru a rekombinantní gen v plasmidu řízený T7 promotorem a lac operátorem<sup>(315,316,317,318)</sup>. Expresi takového rekombinantního genu se spustí koinfekcí buněk několika různými rekombinantními viry. Pfeleiderer et al, 1995, porovnávali expresi proteinů pod vakcíniovým a T7 promotorem. Zjistili, že pro expresi sekretovaných proteinů je lepší používat vakcíniový promotor a pro produkci do cytoplasmy T7 hybridní systém. Záleží ovšem i na individuální charakteristice rekombinantního proteinu, na posttranslačních úpravách, jimiž prochází, na sekrečních drahách v buňce atd<sup>(316)</sup>.

Za promotorem je polylinker, ve kterém se nevyskytuje žádný ATG triplet. První ATG ve vkládané cDNA je potom využit jako počátek translace, takže odpadá řešení problémů spojených s vložením do správné čtecí fáze či vznikem fúzních proteinů. Pro expresi řízenou časným promotorem je nutné odstranit z nukleotidové sekvence genu motiv vakcínie (T<sup>3</sup>T<sup>3</sup>T<sup>3</sup>T<sup>3</sup>N<sup>3</sup>T), aby nedocházelo k předčasné terminaci transkripce a tím vzniku defektního rekombinantního proteinu<sup>(319)</sup>.

Dostatečným množstvím vysoce čistého plasmidu se buňky transfekují a zároveň se infikují divokým typem vakcínie. Během replikace dochází k místně specifické homologní rekombinaci mezi virovou a vnášenou DNA. Vakcínie katalyzuje rekombinace mezi dvěma lineárními, dvěma



kruhovými i mezi kruhovou a lineární DNA <sup>(320)</sup>. Jednoduchým crossing-overem vznikne nestabilní rekombinanta. Je to způsobeno výskytem více homologních sekvencí umístěných blízko sebe v genomu viru. Tato nestabilita se většinou odstraní během dalších replikačních cyklů druhým crossing-overem. Vzniklé potomstvo pak vykazuje původní rodičovský nebo rekombinantní fenotyp.

Výtěžek dvojitých rekombinant je značně nízký, představuje pouhou tisícinu z nové populace. Pomocí celé řady selekčních technik lze ale identifikovat a izolovat rekombinantní virus. Vložením insertu do neesenciálního genu se často změní fenotyp viru. Serpinski et al, 1996, zkonstruovali i takový vektor, který vkládá cizorodý gen do oblasti mezi dvěma virovými geny, rekombinanta tedy nemá změněnou virulenci a lze tak pozorovat účinky rekombinantního genu na „divoký typ“ vakcínie <sup>(321)</sup>.

#### **2.4.6.2 Selekce rekombinant**

Rekombinantní viry jsou selektovány na základě změněného fenotypu způsobeného inaktivací neesenciálního virového genu (thymidinkináza, hemaglutinin) či koexpresí ještě dalšího insertovaného genu (resistence k antibiotikům, barevné markery, virové „host range“ geny). Nejběžnějším neesenciálním genem pro vkládání cizorodého genu je vakcíniová thymidinkináza (TK). Rekombinantní viry pak mohou být na základě TK- fenotypu snadno selektovány při množení viru na TK- buněčné linii <sup>(322)</sup>. Viry s vyřazenou thymidinkinázou nejsou schopné využít selekční činidlo 5-bromdeoxyuridin (BUdR, BrdU). BUdR fosforylovaný thymidinkinázou viru je vkládán do DNA a je pro další existenci viru letální. TK<sup>-</sup> rekombinanta může inkorporovat pouze nově syntetizovaný thymidin a množí se i v přítomnosti analogu nukleosidů BUdR. Nevýhodou je nutnost několikrát opakovat selekční postup, protože vakcínie může tvořit spontánní TK<sup>-</sup> mutanty, které projdou selekčním tlakem. TK<sup>-</sup> rekombinanty vykazují nižší virulenci <sup>(298)</sup>.

Jiným způsobem selekce je použit simultánně vložený marker. Takovým je gen *gpt* z *Escherichia coli* <sup>(323)</sup>. Gen kóduje guaninfosforibosyltransferázu, která se přirozeně v savčích buňkách nevyskytuje. Selekční tlak vytváří kyselina mykofenolová (MPA), která inhibuje metabolismus purinů v normálních buněčných liniích. Gpt katalyzuje konverzi exogenně podávaného xantinu/hypoxantinu na guanin.

Gen pro neomycinovou resistenci (neo) je také původem z *Escherichia coli*. Neomycin se váže na prokaryotní ribosomy a blokuje translaci. Na eukaryotní ribosomy působí blokátor eukaryotní translace antibiotikum G418. Produkt genu neo kóduje fosfotransferázu, která je schopná inaktivovat neomycin i G418 <sup>(324)</sup>. G418 suprimuje syntézu mnoha pozdních virových

proteinů, růst viru byl úspěšně z 95-99% blokován <sup>(325)</sup>. Podobně lze využít bakteriální gen pro resistenci na hygromycin B (hph).

Puromycin je inhibitorem proteosyntézy, způsobuje předčasné uvolnění nascentního polypeptidu z ribozómu. Rezistenci k droze zajišťuje gen *pac* ze *Streptomyces alboniger*, který kóduje acetyltransferázu puromycinu <sup>(326)</sup>. Sánchez-Puig a Blasco, 2000, zjistili, že puromycinová inhibice proteosyntézy koreluje s inhibicí replikace viru vakcínie. Pro inhibici množení rodičovského viru se používá ve vysokých koncentracích toxických i pro buňky tkáňových kultur, které se jeho působením uvolňují od podkladu <sup>(327)</sup>.

Použitelné jsou i markery, které neslouží k selekci viru v médiu o určitém složení, ale využívají se k pouhé identifikaci rekombinant. Vkládají se některé bakteriální markery jako chloramfenikol acetyltransferáza (CAT), dále luciferáza, zelený fluorescenční protein (GFP) nebo *lacZ* <sup>(328)</sup>. Luciferáza katalyzuje oxidaci luciferinu na oxoluciferin a emituje přitom zelenožluté světlo. Buňky infikované virem exprimujícím GFP mohou být vizualizované fluorescenční mikroskopií či pomocí průtokové cytometrie <sup>(329,330)</sup>. Méně citlivou metodou je použití genu *lacZ* kódujícího  $\beta$ -galaktosidázu <sup>(331)</sup>, který umožňuje barevné odlišení rekombinant – v přítomnosti chromogenního substrátu X-Gal v médiu se buňky infikované rekombinantními viry zbarví modře. Podobně lze použít i gen *gus* pro  $\beta$ -glukuronidázu <sup>(332)</sup>.

Hansen et al, 2002, našli selekční metodu, která umožní získat purifikované rekombinantní TK<sup>-</sup> viry ve velmi krátkém čase (pouhých 11 dní) s maximálním snížením pozadí tvořeného rodičovským virem. Vytvořili fúzní protein „BiZyme“ nesoucí dvě biologické aktivity – fosfotransferázu neomycin (gen *neo*) a zelený fluorescenční protein (gen *gfp*). Rekombinanty se selektují v médiu s antibiotikem G418 a s analogem purinových bazí BUdR, současně je lze detekovat na základě fluorescence již několik hodin po rekombinaci <sup>(333)</sup>.

Rekombinantu lze najít hybridizací DNA <sup>(334)</sup>, přímou detekcí přítomnosti rekombinantního proteinu, za pomoci porovnávání velikosti plaků <sup>(335)</sup>, nebo podle schopnosti množit se na určitých buněčných liniích <sup>(336,337)</sup>. Funkční antiapoptotické geny E3L a K3L zajišťují viru možnost množit se na širokém spektru buněk, jejich delecí v důsledku inserce transgenů není vakcínie schopná množit se na některých tkáňových kulturách a dochází k abortivní infekci <sup>(200)</sup>.

## 2.5 VLIV REKOMBINANTNÍCH CYTOKINŮ NA VIRUS VAKCÍNIE

Vakcínie je sama o sobě značně imunogenním virem, vyvolává silnou CD8<sup>+</sup> CTL odpověď<sup>(338)</sup>. Pro eliminaci infekce je rozhodující, zda převáží imunitní odpověď typu T<sub>H</sub>1 nebo T<sub>H</sub>2. Po infekci monocytů vakcíní dochází ke zvýšené tvorbě mRNA a dále i proteinů IL-10 a IL-12 a virus je zničen<sup>(339)</sup>. Pokud se aktivuje T<sub>H</sub>2 cesta, je organismus těžko schopen ubránit se virové infekci<sup>(340)</sup>. Zvýšením buněčné imunitní odpovědi insercí některých cytokinů do viru se zároveň redukuje jeho virulence<sup>(341,342)</sup>. Adjuvantní účinek cytokinu tak dává vakcíniovým vektorům šanci na jejich úspěšné využití.

Vliv IFN- $\gamma$ . Interferony hrají roli v časně fázi infekce. Inhibují virovou replikaci a stimulují imunitní systém spouštěním T<sub>H</sub>1 odpovědi. V buňkách sousedících s infikovanou buňkou navozuje IFN- $\gamma$  tzv. antivirový stav. V pokusech *in vitro* se ukázalo, že inzerce genu pro IFN- $\gamma$  inhibuje replikaci viru a snižuje jeho virulenci ještě efektivněji než IFN- $\beta$ <sup>(343)</sup>. U myši náchylných k infekci byla zjištěna snížená produkce interferonu<sup>(108)</sup>, myši s deletovaným genem pro interferon gama jsou vysoce citlivé k infekci vakcíní ve srovnání s kontrolou<sup>(344)</sup>. *In vivo* zajišťuje rekombinantní vakcínie exprimující IFN- $\gamma$  a GM-CSF zvýšenou ochranu proti rozvoji nádoru po imunizaci myši buňkami karcinomu prsu<sup>(345)</sup>.

Vliv IL-18. Tento interleukin bývá také nazýván IFN- $\gamma$ -indukující faktor. Má imunomodulační účinky - zvyšuje lytickou aktivitu NK buněk a CTL *in vitro*. U myši s nádorovými buňkami zvyšuje produkci T<sub>H</sub>1 cytokinů a tím i protinádorovou aktivitu stimulovaných NK a CTL<sup>(346)</sup>. Antivirový efekt byl zjištěn po infekci myši virem se současnou aplikací IL-18. Stimulace NK buněk byla potvrzena jejich inhibicí za použití anti-asialo GM1 protilátky<sup>(347)</sup>.

Vliv IL-2. Použití interleukinu-2 jako systemicky podávaného je značně omezené díky jeho toxickým účinkům. Expresí IL-2 rekombinantním virem dochází pouze k jeho lokálnímu působení. Vložený gen pro IL-2 chrání imunosuprimované myši před letálním průběhem infekce vakcíní aktivací NK buněk a stimulací produkce TNF (faktor nekrózy nádorů) a IFN- $\gamma$ <sup>(342)</sup>. Po imunizaci myši nádorovými buňkami infikovanými virem exprimujícím IL-2 byla zvýšena dlouhodobá odolnost proti růstu rodičovských neuroblastomových buněk<sup>(348)</sup>.

Vliv IL-12. Cytokin stimuluje cytotoxickou aktivitu NK buněk a T lymfocytů. Vakcínie s vloženým genem pro IL-12 se stává výrazně atenuovaným virem. Expresí IL-12 v infikovaném

organismu indukuje vysokou produkci IFN- $\gamma$ , který inhibuje replikaci viru. Při imunizaci rekombinantní vakcíní ale také dochází ke zvýšení specifické CD8<sup>+</sup> T buněčné odpovědi proti viru i proti dalším rekombinantním proteinům <sup>(349,350)</sup>. Intratumorální aplikace viru exprimujícího IL-12 brání růstu ustavených TC-1 nádorů a navozuje u myši dlouhodobou odolnost vůči opakovanému podání nádorových buněk <sup>(351)</sup>.

Vliv kombinace IL-2/IL-12. Oba cytokiny jsou rekombinantním virem uvolňovány pouze lokálně. Cytokiny exprimované virem společně s nádorovým antigenem či produkce rekombinantních cytokinů přímo v nádoru má za následek efektivnější protinádorovou terapii. Krátkodobá produkce cytokinů současně zajistí jen minimální toxicitu ve srovnání se systemickým podáváním <sup>(352,353)</sup>. Indukuje se produkce IFN- $\gamma$  (působením IL-12) a TNF- $\alpha$  (působením IL-2), zvyšuje se počet NK a CD25<sup>+</sup> buněk a aktivují se T lymfocyty.

Vliv IL-10. Interleukin-10 je produkován T<sub>H</sub>2 buňkami a inhibuje uvolňování T<sub>H</sub>1 cytokinů z makrofágů či NK buněk, inhibuje tak zánětlivé reakce organismu a snižuje okamžitou protivirovou odpověď snížením aktivity NK buněk a virově specifických CTL <sup>(354)</sup>. Vakcínie při infekci keratinocytů dokonce sama vyvolává produkci IL-10 a napomáhá tak vzniku T<sub>H</sub>2 odpovědi <sup>(355)</sup>. Rekombinantní vakcínie nebo fowlpoxvirus exprimující IL-10 v myších s nádorem posilují CTL protinádorovou odpověď, aniž by se změnila anti-VV protilátková odpověď nebo zvýšila mortalita infikovaných myši <sup>(356)</sup>.

Vliv IL-4. Jedná se o imunoregulační cytokin produkováný T<sub>H</sub>2 buňkami, na jeho produkci je závislý vývoj imunitní odpovědi směrem k T<sub>H</sub>2 <sup>(357)</sup>. Endogenní IL-4 spolu s IL-10 inhibují očistění organismu od viru, myši s deletovaným genem pro interleukin-4 vykazují naopak silnější T<sub>H</sub>1 odpověď cytotoxických T lymfocytů na infekci než myši kontrolní <sup>(108,344)</sup>. IL-4 exprimovaný rekombinantním virem vakcínie či příbuzným virem ectromelie suprimuje vývoj maturovaných CD8<sup>+</sup> cytotoxických T lymfocytů <sup>(358)</sup> a tlumí i tvorbu paměťových buněk <sup>(359)</sup>. Při infekci těmito viry dochází ke snížení exprese cytokinů T<sub>H</sub>1 imunitní odpovědi (IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$ ) a v návaznosti na jejich sníženou hladinu se snižuje i produkce NO, který též vykazuje antimikrobiální a antivirové účinky <sup>(358)</sup>. Virus vakcínie exprimující IL-4 se množí 100-1000krát víc než divoký typ a myši déle trvá zbavit se infekce <sup>(344)</sup>, mnohdy je nákaza pro organismus i letální <sup>(359)</sup>.

Vliv IL-17/IL-23. Interleukin 17 není ve svém účinku toxický. Indukuje proliferaci T buněk a produkci zánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ ) *in vitro* <sup>(360)</sup>. IL-17 inhibuje působení NK buněk a snižuje jejich počet <sup>(361)</sup>. V kombinaci s GM-CSF zvyšuje množství dendritických

buněk <sup>(362)</sup>. Jako rekombinantní cytokin exprimovaný vakcínou nemá žádný efekt na množení viru *in vitro*, ale *in vivo* zvyšuje virulenci viru a způsobuje odklon od antivirové T<sub>H</sub>1 k protilátkové T<sub>H</sub>2 imunitní odpovědi (převažují imunoglobuliny IgG1, IgG3 a IgA nad IgG2a)<sup>(363)</sup>. IL-23 snižuje virulenci rekombinantní vakcíny a zvyšuje mírně aktivitu CTL, ale ne NK buněk <sup>(364)</sup>. Stejně jako v případě IL-4 je použití IL-17/IL-23 jako adjuvantního cytokinu v rekombinantních vakcínách vyloučené.

## 2.6 FLT3 LIGAND (FL)

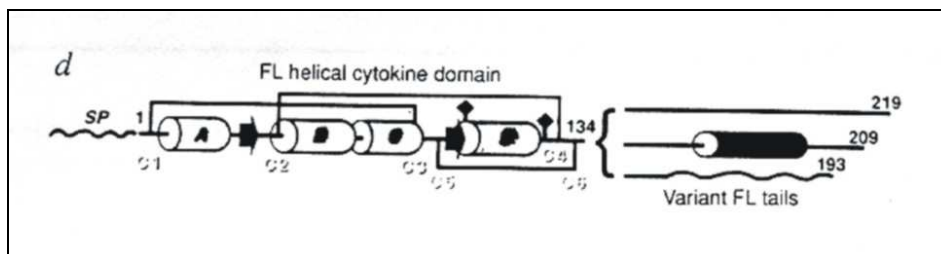
O FL jsme se začali zajímat proto, že je ve svém působení velmi podobný GM-CSF. FL je cytokin, který reguluje proliferaci, diferenciaci a přežívání hematopoietických kmenových a progenitorových buněk. Je v úzkém příbuzenském vztahu s dalšími ligandy tyrosinkinázových receptorů, M-CSF (makrofágy-kolonie stimulující faktor) a SCF (růstový faktor kmenových buněk, jinak též kit ligand či steel faktor). M-CSF reguluje růst a diferenciaci fagocytů. SCF stimuluje proliferaci myeloidních a lymfoidních buněk.

Klonování a charakterizaci flt3 ligandu se věnovali dvě skupiny vědců soustředěné kolem S.D. Lymana a Ch. Hannuma. Pomocí receptoru pro FL fúzaného s Fc částí IgG izolovali Lyman et al, 1993, ligand navázaný na membránu T buněk. Zkonstruovali cDNA expresní knihovnu, v níž našli několik klonů odpovídajících FL <sup>(365,366)</sup>. Podobně postupovala i skupina Charlese Hannuma <sup>(367)</sup>.

Klon 6C má 696 bp dlouhý otevřený čtecí rámec obklopený 5' a 3' nekódujícími oblastmi. Kóduje 231 aminokyselinových (ak) zbytků dlouhý transmembránový protein typu I. Na N-konci je signální peptid (27 ak zbytků), pokračuje 161 ak extracelulární domény, 22 ak transmembránové a 21 ak cytoplasmatické domény. V proteinu se nachází 2 glykosylační místa <sup>(365)</sup>. Hannumova skupina tento klon označila jako T110 a zjistila, že tato sestřihová varianta neobsahuje exon 6. Tuto variantu lze nalézt ve dvou biologicky aktivních formách – jako transmembránový protein, nebo jako jeho solubilní formu vzniklou proteolytickým štěpením isoformy plné délky za jejím čtvrtým cysteinovým zbytkem extracelulární domény.

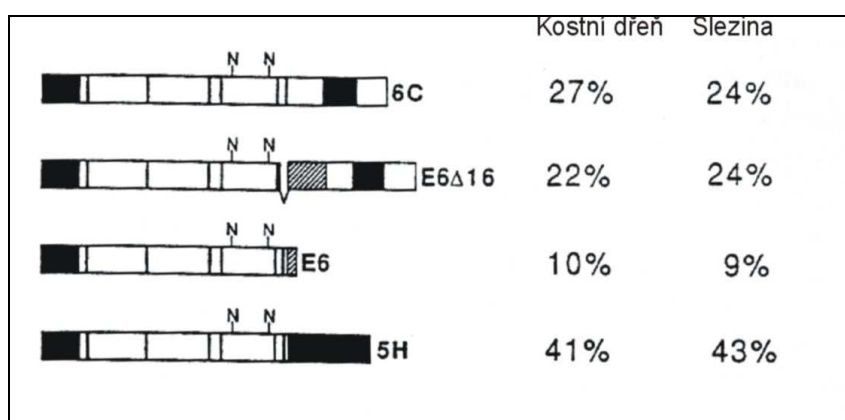
Klon 5H (= T118) je dlouhý 854 bp a v sekvenci shodný s klonem 6C v délce 163 aminokyselinových zbytků. Dále se v sekvenci na C-koncové části liší, sestřihem vzniká 3' netranslatovaná oblast. V délce 220 aminokyselinových zbytků je o 11 aminokyselin kratší než předchozí forma. Na C-konci je 57 hydrofóbních aminokyselin, které předurčují protein k vazbě

na plasmatickou membránu <sup>(365,367)</sup>. Tato isoforma je biologicky aktivní pouze jako membránově vázaná. Pokud tvoří solubilní protein, je to pouze v nedetekovatelném množství, nebo je nestabilní či postrádá biologickou aktivitu <sup>(368)</sup>.



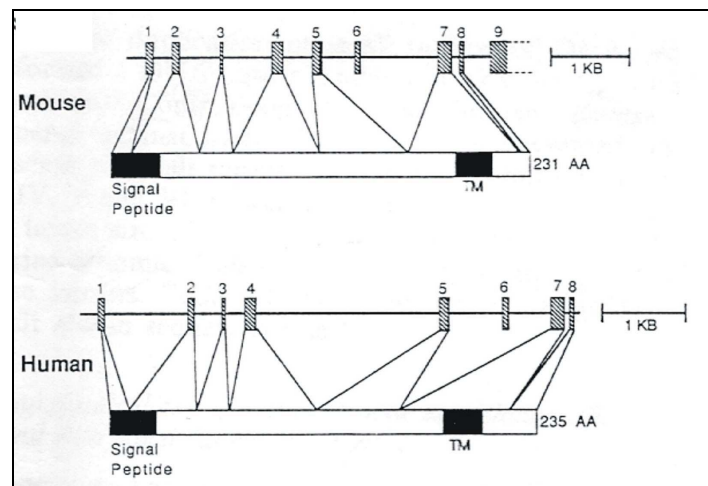
Obr. č. 7. Strukturální domény FL. Podle Hannum et al, 1994 <sup>(367)</sup>.

Později byly detegovány ještě další sestříhové varianty FL. Jsou to klony E6 a E6 $\Delta$ 16 <sup>(368)</sup>. Isoforma E6 vznikla vložením 79 bp do sekvence klonu 6C. Dává tak vzniknout zkrácené formě, která končí 8 aminokyselinových zbytků za 4. cysteinem extracelulární domény. Jedná se o čistě solubilní, biologicky aktivní variantu. Delecí 16 bp vznikla E6 $\Delta$ 16 isoforma. Ztráta je následkem použití jiného donorového místa pro sestříh v 5. exonu. Konečný produkt má o 21 aminokyselinových zbytků víc než klon 6C, takže se jedná též o transmembránový protein. Vzhledem k tomu, že postrádá jeden z cysteinů extracelulární domény, ztrácí správné prostorové uspořádání a E6 $\Delta$ 16 isoforma tvoří biologicky inaktivní protein. McClanahan et al, 1996, popisují ještě klon T169, který pravděpodobně odpovídá Lymanově isoformě E6 <sup>(369)</sup>. Má 83 bp vložených do sekvence formy T110 (6C), v extracelulární doméně pak má o 9 aminokyselinových zbytků víc. Tato unikátní sestříhová varianta se vyskytuje pouze v solubilní formě.



Obr. č. 8. Některé sestříhové varianty FL a jejich relativní výskyt v kostní dřeni a ve slezině. Podle Lyman et al, 1995b <sup>(368)</sup>.

Lidský FL gen je umístěn na 19q13.3 chromosomu a rozkládá se přes 5,9 kbp. Myší FL gen je na 7. chromosomu a je dlouhý 4 kbp<sup>(368,366)</sup>. Gen tvoří 8 exonů, mezidruhově konzervovaných sekvenčně i svou délkou. Délka intronů je odlišná. Lidský lokus je delší než myší kvůli intronům I, IV a V, ve kterých se nachází krátké repetitivní sekvence jako následky duplikací uvnitř intronů<sup>(366)</sup>. Lyman a McClanahan, analyzovali kódující sekvence a zjistili, že 1. a část 2. exonu kódují signální sekvenci, 2., 3., 4. a 5. exon kódují helixové struktury extracelulární domény, 6. exon je sestřižen, 7. exon kóduje transmembránovou oblast a 8. exon cytoplasmatickou část ligandu<sup>(366,369)</sup>. Exon 6 obsahují pouze isoformy E6 a E6Δ16. Podobnou organizaci genu mají také M-CSF a SCF. V sekvenci nukleotidů se sice od FL výrazně odlišují, avšak na úrovni proteinu jsou si velmi podobné. V extracelulární doméně se u všech vyskytují čtyři cysteinové zbytky, které tvoří dva disulfidické můstky (1.+ 3., 2.+ 4. cystein) a určují tak správné prostorové uspořádání biologicky aktivního ligandu<sup>(365)</sup>.



Obr. č. 9. Struktura genových lokusů myšičího (mouse) a lidského (human) FL. Barevně jsou odlišeny oblasti signálního peptidu a transmembránové domény (TM). Podle Lyman et al, 1995a<sup>(366)</sup>.

Biologicky aktivní forma plné délky (6C) se vyskytuje jako 65 nebo 34 kD velký protein. Tyto dvě formy jsou v rovnováze a představují dimerní a monomerní molekuly. Ligand je glykosylován, cukry se na něj vážou O- i N-glykosidickými vazbami a na váze představují až 12 kD. Jedna isoforma může být biologicky aktivní při různých stupních glykosylace. Velikost monomeru se proto pohybuje také v závislosti na isoformě od 24 do 34 kD<sup>(369)</sup>.

Příbuzné ligandy M-CSF i SCF se vyskytují membránově vázané a solubilní, obě formy jsou biologicky aktivní<sup>(370,371,372)</sup>. Flt3 ligand se vyskytuje převážně jako transmembránový protein. Poměr mezi transmembránovou a solubilní formou je dán frekvencí proteolytického

štěpení nebo na úrovni mRNA alternativního sestřihem. Expres různých isoform je také dána expresí v rozdílných tkáních <sup>(368)</sup>. Není jasné, jaký význam má tvorba různých isoform, zda mají v hematopoezi odlišné funkce <sup>(373)</sup>.

Produkce mRNA flt3 ligandu je široce rozšířená po celém organismu. Naopak výskyt receptoru, stejně jako blízkce příbuzných ligandů M-CSF a SCF, je omezen pouze na některé tkáně <sup>(369)</sup>. Výskyt mRNA FL ovšem nekoreluje s produkcí proteinu, ne ve všech tkáních, kde byla nalezena mRNA, byla detegována i přítomnost proteinu.

Za normálních fyziologických podmínek je FL produkován konstitutivně, ale zůstává uzavřen uvnitř buňky. Zde kolokalizuje s giantinem a ERGIC-53, markery Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula. Není v endosomech ani lysozomech. Na povrchu buněk kostní dřene ani v krvi není detekovatelná hladina FL. Při podání IL-2, IL-4, IL-7 nebo IL-15 do média k T buňkám dojde po třech dnech inkubace ke zvýšené expozici FL na plasmatické membráně, zvýší se i množství solubilního ligandu v médiu. Interleukiny indukují pouze přesun FL na povrch buňky. Jeho expozice na povrch buňky je blokována pouze působením brefeldinu A a cyklosporinu A, což ukazuje na posttranslační regulaci exprese FL <sup>(373, 374)</sup>.

Při onemocněních hematopoietického systému (např. ozáření či chemoterapie s následující aplázií) dochází k okamžité dopravě ligandu na povrch buněk. V séru a brzlíku pacientů se tak zvedne hladina FL z méně než 100 pg/ml na 200-700 pg/ml po 3 dnech léčby, při silné aplázií až na 2500 pg/ml a klesne teprve po normalizaci počtu buněk v krvi. Ve slezině, ledvinách, lymfatických uzlinách, mozku ani jiných orgánech se během transienční aplázie jeho hladina nemění, což ukazuje na hlavní místo regulace FL, kterým jsou lymfohematopoietické orgány. Při expozici na povrchu buňky může FL stimulovat a zvyšovat počet hematopoietických progenitorů přímo buněčným kontaktem a podporovat tak obnovení původních poměrů v kostní dřeni a krvi <sup>(373)</sup>.

Myši deficientní v genu pro FL mají 10krát snížené množství lymfoidních progenitorů B a T buněk, počet myeloidních progenitorů a počet kmenových buněk je ve srovnání s normální myši nezměněn <sup>(375, 376)</sup>. V krvi, kostní dřeni, slezině a lymfatických uzlinách klesl celkový počet nezralých buněk, množství dendritických buněk a NK bylo někdy až pod hladinou detekce <sup>(375)</sup>.

Signalizace přes FL je důležitá pro expanzi a diferenciaci časných lymfoidních progenitorů, jak to dokládá řada pokusů *in vitro* a *in vivo*. FL zvyšuje proliferaci buněk CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> v kostní dřeni a též Thy<sup>low</sup>Sca1<sup>+</sup> kmenových buněk ve větší míře než IL-3, IL-6 či SCF a je schopen zajistit vývoj hematopoietických progenitorů *in vitro* <sup>(365, 377, 378)</sup>. V kombinaci se zmiňovanými cytokiny a také s IL-11, GM-CSF či G-CSF se projevuje synergní účinek a



dochází k rychlejšímu růstu a diferenciaci primitivních buněk <sup>(377,378,379)</sup>. FL sám o sobě podporuje pouze formování kolonií myeloidních prekursorů makrofágů, ve směsi s erythropoietinem a IL-3, IL-6, či IL-1 $\beta$  však dochází k totální expanzi buněk kostní dřeně, kostimuluje růst granulocytů i eryteroidních kolonií <sup>(377,379,380)</sup>.

V kombinaci s IL-15 a SCF podporuje lymfopoiezi CD56<sup>+</sup> NK buněk, i když v tomto případě už má FL pouze redundantní účinek. Pokud se k této kombinaci cytokinů přidá i IL-7, podpoří se také lymfopoieze B buněk <sup>(381)</sup>.

FL je silným mobilizátorem hematopoietických progenitorů v krvi (CD34<sup>+</sup>Lin<sup>low</sup>Sca1<sup>+</sup>), snižuje počet zralých T a B buněk, naopak zvyšuje počet nezralých B buněk (B220<sup>+</sup>/IgM), monocytů a granulocytů. Jeho systemické podávání má za následek snížení hematokrytu (pokles počtu eryteroidních nematurovaných buněk v krvi), erytropoieze se přesunuje do sleziny <sup>(382)</sup>. Podobně jako GM-CSF také FL stimuluje T lymfocyty k produkci IFN- $\gamma$ , GM-CSF a IL-5 <sup>(383)</sup>. Zabraňuje apoptóze CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk <sup>(384)</sup>.

FL stimuluje expanzi především lymfoidní linie dendritických buněk (CD11b<sup>-</sup>CD8a<sup>+</sup>) *in vivo* a podporuje tak vznik T<sub>H</sub>1 imunitní odpovědi <sup>(383,385)</sup>. Celkově se ale systemickým podáváním FL zvyšuje celkový počet intersticiálních myeloidních i lymfoidních progenitorů dendritických buněk <sup>(386)</sup>, po 10 dnech se zvýší hladina dendritických buněk v krvi až 20krát <sup>(387)</sup>. Takovéto buňky postrádají kostimulační molekuly CD80, CD86 a CD40, neexprimují ani aktivační markery CD83 a CMRF-44. Po stimulaci *ex vivo* dozrávají, exprimují molekuly CCR7, které po návratu do organismu zabezpečí homing do sekundárních lymfatických tkání. U pacientů s pokročilou rakovinou je možné tímto způsobem získat dostatečné množství dendritických buněk, které se stimulují nádorovým antigenem *in vitro* a tyto profesionální antigen prezentující buňky se vpraví do pacienta jako vakcína <sup>(387)</sup>.

Podávání FL má význam v tom případě, že nádor je sensitivní k NK buňkám <sup>(388)</sup>. Terapie FL má silný inhibiční efekt na metastázy. Indukuje infiltraci dendritických buněk a lymfocytů a snižuje počet metastáz na pouhých 25%. Na eliminaci metastáz se podílí NK buňky, při jejichž inhibici se metastázy obnovují <sup>(389)</sup>.

Při imunizaci myši proti nádorovým buněčným liniím se využívá FL podávaný systemicky nebo jako součást vakcíny. Chen et al, 1997, i Braun et al, 1999, zjistili, že pokud zvíře imunizují nádorovými buňkami transfekovanými FL, zajistí jim to trvalou imunitu proti rodičovským nádorovým buňkám. Při systemickém podávání FL dojde k vyvolání pouze krátkodobé imunity <sup>(390,391)</sup>.

Při srovnání stimulace protinádorové imunitní odpovědi, stimulace NK a dendritických buněk je při imunizaci nádorovými buňkami transfekovanými FL účinnější než s IL-1 $\beta$ , IL-2 či GM-CSF <sup>(390,391)</sup>. Hung et al, 2001, sestrojili fúzní E7-FL gen, který po transfekci do organismu vyvolával silnější odezvu CD8<sup>+</sup> T lymfocytů než samotný onkogen E7, a to pravděpodobně díky posttranslačnímu transportu FL do endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu, čímž se zvýšila prezentace E7 peptidů na povrchu transfekovaných buněk <sup>(392)</sup>.

Pisarev et al, 2000, také používal FL k indukci antigeně specifické odpovědi. Po systemickém podání FL se zvýšila hladina IFN- $\gamma$  a IL-12, následně i počet cytotoxických T lymfocytů a dendritických buněk <sup>(385)</sup>.

Kromě stimulace protinádorové odpovědi se zkoumal i vliv FL na přijetí transplantovaných orgánů. Li et al (2001) zjistila, že po podání systemického FL se zvýšením nespecifické odpovědi myši stimulací NK buněk negativně ovlivní přijetí jaterního štěpu a vyvolá se tak jeho akutní odhojení <sup>(384)</sup>.

## 2.7 FLT3 RECEPTOR

12 exonů genu Flt3 kóduje receptorovou tyrosinkinázu III. třídy. V lidském genomu zahrnuje oblast asi 10 000 bp (párů bazí), z toho exony představují velmi krátké úseky o délce 83-154 bp <sup>(393)</sup>. Podobné vlastnosti (počet a délka exonů, sekvence) mají i další zástupci této třídy tyrosinkináz, geny kit a fms. Předpokládá se, že podobná struktura genů je důsledkem cis a trans duplikací prapůvodního genu <sup>(394)</sup>. Receptor byl klonován dvěma nezávislými pracovními skupinami. Matthews et al (1991) izolovali receptor z fetálních jater a nazvali ho flk2 (fetal liver kinase 2). Rosnet et al (1991) receptor izolovali z placenty a pojmenovali ho flt3 (fms-like tyrosinkinase 3). Kompromisem pak bylo označení flk2/flt3, dnes je však užíván převážně Rosnetův název.

Pro celou receptorovou rodinu III. třídy je charakteristická společná struktura extracelulární části – 5 imunoglobulinových domén. Celý receptor pak tvoří molekula o velikosti asi 160 kD <sup>(393,395)</sup>. Sekvence aminokyselin flt3 a flk2 jsou téměř shodné až na C koncových 31 aminokyselinových zbytků <sup>(393)</sup>. Tento rozdíl je později vysvětlován jako chyba při srovnávání sekvencí a receptory jsou považovány za produkt stejného genu.

Flt3 mRNA je exprimovaná převážně v populaci primitivních hematopoietických buněk, kterou je možné definovat pomocí povrchových antigenů jako linii CD34<sup>+</sup>Sca<sup>+</sup>Lin<sup>low</sup>. Větší část těchto buněk se nachází v aktivní části buněčného cyklu, méně pak v G<sub>0</sub> fázi<sup>(395)</sup>. Receptor se vyskytuje také v brzlíku, placentě a mozku<sup>(396,397)</sup>. Navázáním ligandu dochází k autofosforylaci receptoru, který pak zprostředkuje fosforylaci dalších molekul (Gab1/2, Shp-2, Stat5 $\alpha$ ). Přes molekuly Gab1 i Gab2 se spouští signalizace přes MAP kinázovou kaskádu k ERK kináze. Tytéž molekuly jsou schopny signalizovat i v kaskádě PI-3 kinázy<sup>(398)</sup>. Působí tak jako adaptorové proteiny v signalizaci přes flt3 receptor. Stimulací flt3 receptoru dochází i ke zvýšené expresi genu bcl-xL přes aktivaci proteinu Stat5 $\alpha$ <sup>(399)</sup>. V důsledku aktivace receptoru tak dochází k proliferaci a diferenciaci progenitorů na vyvinutější typy buněk<sup>(365,395)</sup>. FL ovlivňuje také hladinu proteinu Bax v buňkách, čímž je chrání před apoptózou vyvolanou kultivací v bezsérovém médiu<sup>(400,401)</sup>.

FLT3 je vysoce exprimován u mnoha akutních leukémií a jeho délkové mutace jsou nejčastějšími genetickými abnormalitami u akutních myeloidních leukémií (AML) a občas také u jiných typů leukémií. Overexprese FLT3 u leukemických buněk bývá spojena s jeho stálou aktivací díky autokrinní signalizaci vlastním sekretovaným FL<sup>(402)</sup>. Délkové mutace mají tendenci se akumulovat během progresu onemocnění a poskytují krevním buňkám silnou proliferační výhodu, tudíž jejich výskyt ukazuje na častější relaps AML<sup>(403)</sup>. U AML jsou známy tři typy mutací FLT3 – interní tandemové duplikace (FLT3-ITD) v juxtamembránové doméně, bodové mutace v tyrosinkinázové doméně (FLT3-TKD) a jednobodové mutace v juxtamembránové doméně (FLT3-JM-PM). Juxtamembránová doména je klíčovým autoinhibičním elementem kinázy, bodové mutace interferují s její inhibiční funkcí, čímž způsobují autonomní aktivaci kinázy a její přeměnu v onkogen<sup>(404,405)</sup>. Onkogenní mutace v FLT3 mají za následek na ligandu nezávislou, konstitutivní a deregulovanou aktivaci signálních drah včetně silně transkripčního STAT5 proteinu, který indukuje expresi cílových genů a reprimuje myeloidní transkripční faktory c/EBP-3 a Pu.1, čímž brání diferenciaci postižených buněk<sup>(406,407,408,409)</sup>. Pomocí Stat5 faktoru je regulován také Pim-1. Jeho zvýšená exprese vede ke zvýšené resistenci k cytotoxickým a apoptotickým účinkům způsobeným inhibitory proteinkinázy FLT3 a tím k přežívání leukemických buněk<sup>(410)</sup>. Dochází také k aktivaci Akt kinázy, PI-3K a k fosforylaci transkripčního faktoru FoxO3 $\alpha$ . Tato signalizace má za následek snížení exprese FOXO cílových genů, p27Kip1 a Bim (z proapoptické rodiny Bcl-2 genů) a vede k přežívání a proliferaci nádorových buněk<sup>(411)</sup>.

## 2.8 GM-CSF

Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, neboli GM-CSF, je cytokin objevený o přibližně 10 let dříve než FL<sup>(412,413)</sup>. Srovnání sekvencí lidského a myšího GM-CSF ukázalo podobnost pouze 69% v nukleotidové a 54% v aminokyselinové sekvenci kódující oblasti; lidský gen má o 9 nukleotidů = 3 aminokyseliny v oblasti 23.nt více. Podle kódující sekvence je syntetizován protein o 118 aminokyselinách a predikované molekulové hmotnosti 14kDa, ovšem skutečná hmotnost se pohybuje kolem 22kDa. Podobně jako FL je i GM-CSF glykosylován na několika místech a součástí molekuly jsou i disulfidické můstky ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch))<sup>(372)</sup>.

Receptor pro GM-CSF je exprimován na mnoha typech hematopoietických buněk a jeho stimulace ligandem je esenciální pro udržení rovnovážného stavu v krevním systému, spolu s IL-3 a IL-5 reguluje produkci a aktivaci hematopoietických buněk<sup>(414,415)</sup>. GM-CSF hraje klíčovou roli v reakcích na infekci organismu, stimuluje myelopoiesi - produkci granulocytů a makrofágů z kostní dřeně a podporuje jejich přežívání a funkční aktivaci v místech poranění nebo zánětu<sup>(416,417)</sup>. GM-CSF zvyšuje primární *in vitro* imunitní odpověď; zvyšuje buněčnou odpověď stimulací zrání a růstu profesionálních antigen prezentujících buněk (APC)<sup>(418)</sup>. Dendritické buňky prezentují antigeny dalším složkám imunitního systému, mají schopnost exprimovat MHC molekuly I. i II. třídy spolu s expresí kostimulačních molekul nutných k aktivaci T lymfocytů<sup>(419)</sup>. Dendritické buňky slouží mimo jiné jako senzory při poraněních tkání, při infekcích či maligních transformacích, a jsou tak zodpovědné za počáteční aktivaci imunitní odpovědi<sup>(420)</sup>. Vlivem na dendritické buňky a T-lymfocyty tak GM-CSF propojuje přirozenou a adaptivní složku imunitního systému. Periferní mononukleáry (PBMC), T-lymfocyty a antigen prezentující buňky (APC) kultivované s GM-CSF vykazují zvýšenou produkci cytokinů typických pro T<sub>H</sub>1 imunitní odpověď – IL-12, IFN- $\alpha$  a TNF- $\alpha$ , zatímco produkce T<sub>H</sub>2 cytokinů je snižena (IL-4 a IL-10). Ve srovnání se stimulací pomocí G-CSF jsou APC po působení GM-CSF schopné vyvolat vyšší proliferaci T-lymfocytů<sup>(421)</sup>. Rekombinantní GM-CSF významně přispívá v podpůrné léčbě pacientů s nádory, pozitivně působí na obnovení rovnováhy myeloidní populace buněk po podání cytotoxické chemoterapie. Jeho podávání se osvědčilo také při transplantacích hematopoietických progenitorových buněk<sup>(422,423)</sup>.

Schopnost generovat dendritické buňky typu 1, které řídí vývoj T buněk k T<sub>H</sub>1 fenotypu, představuje přitažlivý prostředek k dosažení protinádorových účinků v samostatném použití v imunoterapii i v kombinaci s dalšími cytokiny, např. FL, TNF- $\alpha$  a IL-4<sup>(424,425)</sup>. GM-CSF byl mnohokrát použit k vyvolání protinádorové odpovědi a přispěl ke zmenšení nádorové tkáně; za tuto aktivitu jsou zodpovědné především dendritické buňky<sup>(426,427)</sup>. Limitace ve schopnosti

GM-CSF jakožto adjuvans vyvolat imunitní odpovědi a jen středně silná aktivita jsou bohužel pozorovány v případech klinických zkoušek a nekorelují s laboratorními výsledky. Jako vždy je proto nutné přijít na to, jak vyvolat tvorbu kostimulačních signálů k prolomení imunitní tolerance, správné dávkování a načasování podání cytokinů a skloubení s vývojem nemoci a její léčby chemoterapeutiky.

Při srovnání aplikace GM-CSF injekčně a prostřednictvím rekombinantního viru vakcinie se zjistilo, že vakcínou produkováný cytokin stimuluje APC (makrofágy, dendritické buňky) ve větší míře než systemicky podávaný protein. Rekombinantní poxvirus může dopravit cytokin přímo do imunizačního místa a zvýšit tak protinádorovou imunitu proti danému nádorovému antigenu <sup>(428)</sup>. Při infekci nádorových buněk virem nesoucím rekombinantní GM-CSF dochází k omezení růstu primárního nádoru a indukuje se nádorově specifická buněčná odpověď, která chrání myš i při opakovaném podání nádorových buněk <sup>(429)</sup>. Dochází k nárůstu počtu buněk exprimujících molekuly MHC gp II a k jejich migraci do lymfatických uzlin, zvyšuje se priming T buněk a allospecifická lyze zajištěná cytotoxickými T lymfocyty. Systemické podání proteinu GM-CSF ve srovnání s virem způsobilo pouze dočasné zvýšení počtu APC v uzlinách beze změny v expresi MHC gp II <sup>(430)</sup>.

## 2.9 RECEPTOR TYPU 2 PRO TGF- $\beta$ (T $\beta$ RII)

Existují tři typy receptorů pro TGF- $\beta$ . Typ I (T $\beta$ RI) a typ II (T $\beta$ RII) jsou transmembránové serin/threonin kinázy, po vazbě TGF- $\beta$  se spojí do multimerních komplexů, nejčastěji heterotetramerů. T $\beta$ RI má na rozdíl od T $\beta$ RII v transmembránové doméně oblast bohatou na glycin a serin (GS doména). Mezi receptory 3. typu patří betaglykan a endoglin, které mají pouze regulační vlastnosti bez kinázové aktivity. Betaglykan pomáhá receptorům T $\beta$ RI a T $\beta$ RII rozpoznávat TGF- $\beta$ . Endoglin se nachází převážně na proliferujících endoteliálních buňkách cévních stěn, ovlivňuje na signalizaci přes TGF- $\beta$  receptory a zvyšuje angiogenezi, čímž přispívá k invazivitě. Isoformy TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 3 se vážou s vysokou afinitou ke všem třem typům receptorů, zatímco TGF- $\beta$ 2 se takto váže pouze k T $\beta$ RIII nádorů <sup>(431, 432)</sup>.

Signalizace po navázání ligandu na T $\beta$ RII vede přes Smad proteiny. Fosforylovaný receptor aktivuje ALK5 kinázu a ta dále fosforyluje Smad 2 a Smad 3, které vytvoří komplexy s dalšími Smad proteiny a takto vstupují do jádra, kde ovlivňují transkripci cílových genů. K těm patří geny

kódující proteiny p15 a p21 regulující průchod buněčným cyklem <sup>(433,434)</sup>. Další možná signální dráha vede přes kinázy ERK, JNK, MAPK p38, PI3K a GTPázu Rho <sup>(435)</sup>.

## 2.10 TGF- $\beta$ A JEHO ROLE V KARCINOGENEZI

Transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) byl poprvé identifikován v kultuře transformovaných myších fibroblastů a byl pojmenován podle schopnosti podporovat na růst buněčných linií nezávisle na jejich ukotvení k podkladu <sup>(436)</sup>. Do skupiny proteinů TGF patří asi 30 strukturně podobných členů, které tvoří růstové diferenciační faktory, isoformy TGF- $\beta$ , morfogenetické faktory pro růst a vývoj kostí, aktiviny a inhibiny či neurotrofní faktory.

TGF- $\beta$  je produkován mnoha typy buněk a receptory pro něj jsou zhusta na lymfoidní i myeloidní linii krevních buněk <sup>(437)</sup>. Zastává mnoho rozličných funkcí. Inhibuje růst buněk a vyvolává apoptózu, na druhou stranu reguluje i proliferaci a migraci buněk, ovlivňuje reakce imunitního systému a stimuluje produkci extracelulární matrix. Jsou známy 3 lidské izomery TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3), které jsou homologní ze 75% v aminokyselinové sekvenci. Monomerní formu TGF- $\beta$  tvoří 4 antiparalelní  $\beta$ -řetězce a 3 intramolekulární disulfidické můstky tvořící cystinový uzel. Monomery jsou spojeny přes N-terminální cystein do funkčního homodimeru či heterodimeru. TGF- $\beta$  je kódován ve formě prekurzoru, který obsahuje N-koncový signální peptid (20-30 aa) důležitý pro sekreci proteinu z buněk, centrální oblast – tzv. latentně asociovaný protein (LAP) - a C-terminální oblast (112-114 aa). Během sekrece TGF- $\beta$  je LAP sice odštěpen, ale zůstává k němu nekovalentně navázán. Komplex LAP-TGF- $\beta$  se mimo buňku váže k latentnímu TGF- $\beta$ -vazebnému proteinu (LTBP) a společně nasedají na extracelulární matrix <sup>(438,439)</sup>. Aktivátory TGF- $\beta$  mohou být proteázy, integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6, reaktivní kyslíkové sloučeniny (ROS) a nízké pH <sup>(440)</sup>.

TGF- $\beta$  hraje dvojí roli při vývoji nádorové tkáně. V časných fázích slouží jako nádorový supresor, ovšem časem přestanou být buňky k jeho inhibičním účinkům citlivé a naopak díky deregulaci signální dráhy, případně zvýšením produkce samotného TGF- $\beta$  nádorovými buňkami dochází k přesmyku účinků na podpůrnou roli. Takový TGF- $\beta$  pak stimuluje angiogenezi a tvorbu extracelulární matrix a zároveň potlačuje imunitní reakci organismu vůči nádorové tkáni <sup>(441)</sup>.

Takové prostředí nádorům poskytuje vhodné podmínky pro rychlý růst. Změnou fenotypu buněk dochází k tzv. epiteliálně-mezenchymální transformaci a buňky mají zvýšenou tendenci k migraci a tvorbě metastáz <sup>(442)</sup>. Karcinogeneze je také podpořena změnami v signalizaci přes

TGF- $\beta$  receptor, kdy se tumor-supresorová dráha vedoucí přes Smad proteiny přesmykne na Smad-nezávislou dráhu<sup>(443)</sup>. Důležitou roli v sekreci TGF- $\beta$  hrají MDSC buňky – supresorové buňky odvozené z myeloidní linie. Jejich fenotyp je charakterizován povrchovými molekulami Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> a jejich přítomnost v nádorovém mikroprostředí urychluje expanzi nádorové tkáně<sup>(444,445)</sup>.

Další možností, jak docílit růstu nádorů, je ovlivnění imunitní odpovědi. TGF- $\beta$  produkovaný nádorovými či podpůrnými buňkami nádorového prostředí potlačuje boj proti nádoru. T lymfocytům je znemožněno diferencovat v cytotoxické buňky zabíjející nádor; dokladem toho je TGF- $\beta$  sekretující fibrosarkom, který je odolný vůči CTL odpovědi<sup>(446)</sup>. TGF- $\beta$  potlačuje produkci granzymů a perforinu, molekul sekretovaných CTL za účelem porušení membránového potenciálu cílové buňky a štěpení vnitřních molekul, také snižuje expresi Fas ligandu a IFN- $\gamma$  důležitých pro vyvolání buněčné smrti a snižuje i expresi IL-2 jakožto základního cytokinu potřebného pro vývoj T lymfocytů<sup>(447)</sup>. Naopak zvyšuje podíl regulačních T lymfocytů (T<sub>reg</sub>), které působí inhibičně na protinádorovou odpověď ostatních buněk imunitního systému (CTL, NK), zpomaluje maturaci dendritických buněk důležitých pro zahájení protinádorové odpovědi<sup>(448,449)</sup>. Dendritické buňky pak neexprimují MHC gp II a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty začnou produkovat velká množství IL-17, který podporuje odolnost nádorových buněk vůči apoptóze a napomáhá tumorigenezi<sup>(450,451)</sup>. B lymfocyty jsou zastaveny na začátku buněčného cyklu a nedochází pak k produkci sekretovaných imunoglobulinů<sup>(452,453)</sup>.

Inhibiční signální dráha může být ve sporadických případech v některém kroku mutována, často se jedná o specifické mikrosatelitní sekvence kódující část extracelulární domény T $\beta$ RII<sup>(454)</sup>. Takový receptor je nefunkční; nacházíme ho např. u nádorů střev, plic, prsu, krku a hlavy<sup>(455,456)</sup>. Dochází také k mutacím následných signálních molekul Smad; např. ztráta funkce Smad4, který za normálních okolností reguluje signalizaci TGF- $\beta$  dráhy, vede k aktivaci procesů vedoucích k podpoře nádorového růstu<sup>(457,458)</sup>. Změny v expresi byly pozorovány u různých typů nádorů v případě proteinů Smad3, Smad2 i Smad 7<sup>(459,460,461,462)</sup>.

## 2.11 Fc-IgG1 FÚZNÍ PROTEINY

### 2.11.1 Fc FRAGMENT IgG1

Fc fragment imunoglobulinu typu G (IgG) je odvozen z domén CH2 a CH3 těžkého řetězce IgG, odkud jej lze odštěpit pomocí proteázy papainu. Lidské IgG se dělí na podtřídy IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, myší IgG se dělí na podtřídy IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Jednotlivé podtřídy se liší počtem cystinových můstků v pantové oblasti a drobnými odchylkami ve struktuře jednotlivých domén.

Fc fragment vyvolává na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC) a na komplementu závislou cytotoxicitu (CDC). Při ADCC se Fc fragment váže na receptor (FcγR), který se nachází na povrchu NK buněk, B lymfocytů, makrofágů, monocytů, neutrofilů a granulocytů, což vede k fagocytóze či lyzi cílové buňky. Signalizace přes FcγR může vést také k apoptóze cílových buněk. Podtřídy IgG se liší schopností aktivovat ADCC a CDC. Lidský IgG1 zprostředkovává silnou ADCC i CDC, proto je vhodný pro terapeutické použití proti patogenům a nádorovým buňkám (<http://www.invivogen.com>). Myší Fc fragment IgG1 zprostředkovává pouze mírnou CDC a neaktivuje ADCC. Fc fragment může být upravován za účelem snížení či zvýšení ADCC a CDC, vazba IgG na FcγR či na komplementový C1 protein závisí na aminokyselinových zbytcích v pantové oblasti a v CH2 doméně. Také glykosylace v konzervovaných asparaginových zbytcích CH2 domény je nezbytná pro vazbu na FcγR <sup>(463)</sup>.

### 2.11.2 Fc FÚZNÍ PROTEINY

Tyto chimerické proteiny se skládají z efektorové oblasti proteinu (např. rozpustné receptory) fúzované k Fc fragmentu IgG. Jednou z výhod Fc fúzních proteinů je jejich snadná purifikace afinitní chromatografií pomocí proteinu A či proteinu G <sup>(464)</sup>. Mezi další výhody patří zvýšení životnosti v cirkulačním systému díky vazbě k FcRn (neonatální Fc-receptor), který je exprimován na povrchu epiteliálních buněk a chrání Fc fragment před lyzozomální degradací. FcRn je příbuzný s MHC gp I. třídy a účastní se přenosu IgG z matky na dítě a reguluje celkové množství IgG v séru. K vazbě IgG na FcRn dochází v kyselém prostředí endozómu a IgG-FcRn je poté recyklován z lyzozómu zpět do cirkulace. Takto recyklovaný IgG má zvýšenou životnost v porovnání s ostatními proteiny v séru <sup>(465)</sup>. Úpravy Fc fragmentů pro lepší vazbu k FcRn zvyšují životnost IgG, což má řadu výhod (snížení dávek a nižší cenoproductů) pro fúzní proteiny i terapeutické protilátky. Například mutace v IgG1 umožňující lepší vazbu k FcRn při pH 6 vykazuje 4x delší životnost v cirkulačním systému <sup>(466, 467)</sup>.



Fc fragment také zvyšuje sekreci fúzních proteinů z buněk a zajišťuje vytvoření jejich homodimeru, který by za normálních okolností nevzniknul. Jednořetězcové rekombinantní protilátky (Fv fragment) proti specifickému antigenu fúzované k Fc fragmentu se chovají jako přirozené, dimerizují a zvyšují tím svoji aviditu. Tímto způsobem lze překročit i hranice druhů, kdy jeden Fv fragment můžeme spojit s Fc fragmenty pocházejícími z různých organismů a vytvoří se tak protilátky zaměřené proti jednomu společnému antigenu použitelné v mnoha organismech <sup>(468)</sup>. Také dimerizace sTβRII-Fc za následek lepší vazbu ligandu. Protein je translatován jako monomer a tvoří disulfidické můstky díky cysteinovým zbytkům na Fc fragmentu, čímž vzniká aktivní homodimer receptoru, který je sekretován z buněk.

V dnešní době je trhu asi 5 druhů farmaceutických přípravků využívajících výhod Fc fúzních proteinů. Látky vzniklé fúzí rozpustného cytokinového receptoru s Fc fragmentem mají řadu preklinických a klinických úspěchů. Např. rozpustné TNFR-Fc jsou využívány při léčbě řady zánětlivých onemocnění <sup>(469)</sup>. Využití sTβRII-Fc se zkoumá za účelem blokování nádorového TGF-β při léčbě řady nemocí a terapií nádorů, dochází k potlačení vzniku metastáz.

## 2.12 PAPILOMAVIROVÁ INFEKCE SPOJENÁ S KANCEROGENEZÍ

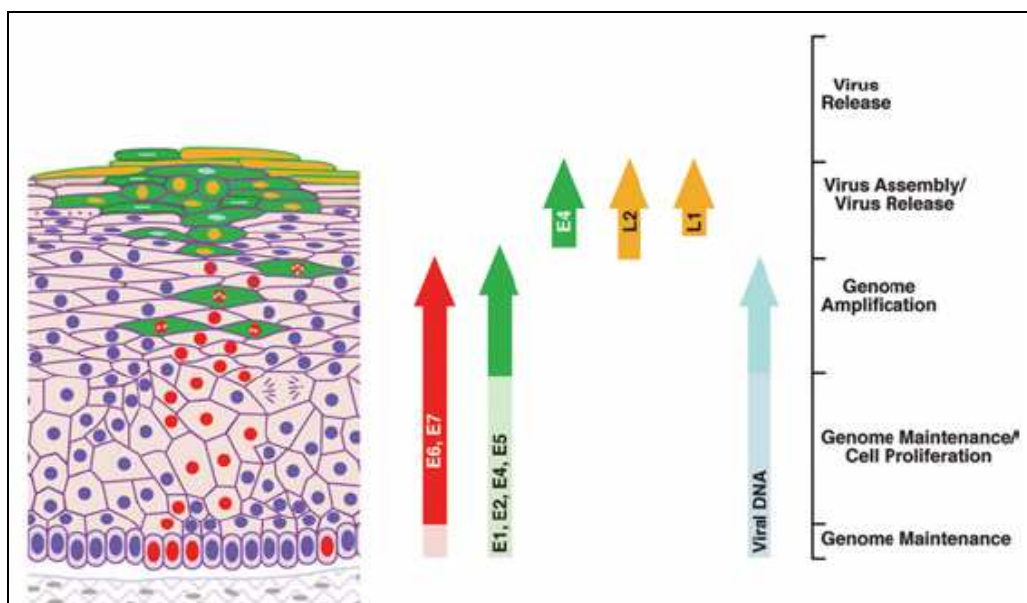
Papilomaviry patří mezi malé neobalené DNA viry. Ikozahedrická kapsida o průměru 55nm je tvořena 72 kapsomerami proteinů L1 a L2 a uzavírá v sobě cirkulární dsDNA. Genom je velký přibližně 8000pb <sup>(470,471)</sup>.

Papilomaviry jsou striktně vázány na svého hostitele, nebyl zaznamenán mezidruhový přenos. Infikují epitelální buňky kůže nebo sliznic a způsobují u nich tvorbu rozmanitých výrůstků. U člověka bylo identifikováno již přes 100 různých papilomavirů (HPV), které lze podle svého účinku na růst napadené tkáně dělit na nízkorizikové typy, které způsobují benigní onemocnění (např. HPV typu 6,11,42-44, 54,61,70,72,81...), a na typy vysokorizikové, u nichž může během infekce dojít k malignímu zvratu a imortalizaci napadených buněk (HPV typu 16,18,31,33,35,39,45,51,56...) <sup>(472)</sup>.

Lidské papilomaviry s onkogenním potenciálem vytváří především mukózní epitelální nádory. Z nich nejznámější a nejrozšířenější je nádor děložního čípku. Dále jsou to nádory anogenitální oblasti (anus, vulva, penis) a nádory hlavy a krku <sup>(473,474)</sup>. Virová persistence v buňkách je základem tvorby karcinomu cervixu. Persistence představuje udržování virové DNA po dobu 6 a více měsíců. Epidemiologické studie ukazují, že ve většině případů dochází k tvorbě

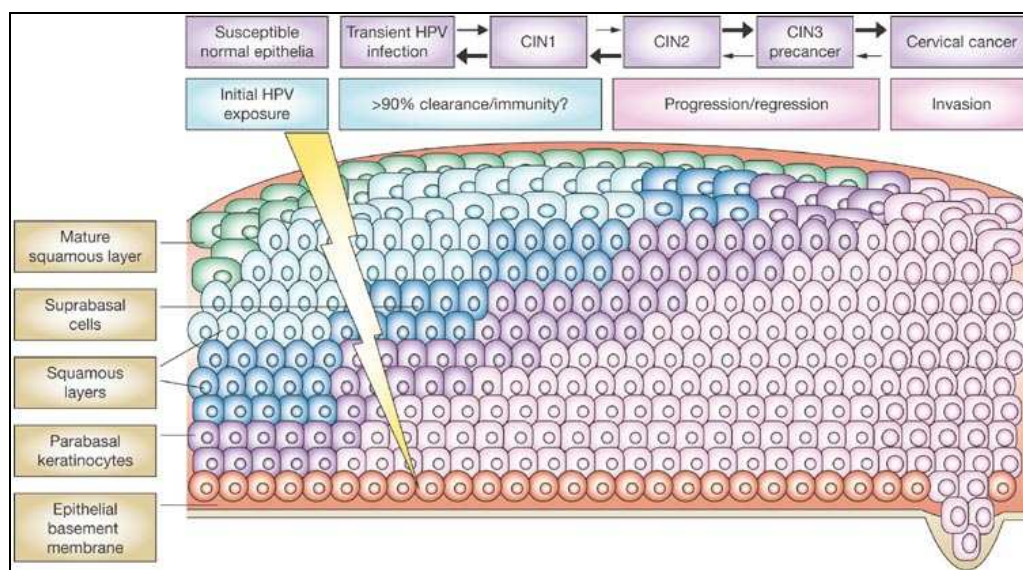
invazivního nádoru až po několika desetiletích, kdy odezněla hlavní infekce. Některé ženy mohou být infikované roky, aniž by se u nich vyvinula dysplázie, u jiných se rozvine v průběhu několika měsíců<sup>(475,476)</sup>. Kofaktorem tvorby nádoru jsou genetické faktory, kouření, hormonální antikoncepce či některé bakteriální infekce<sup>(477,478)</sup>. HPV16 je nejčastěji se vyskytujícím typem u asi 50% CIN a karcinomu cervixu následovaný typy HPV18, 31 a 45<sup>(479)</sup>. V České Republice se za posledních 10 let zvýšila incidence karcinomu cervixu o 30%, ročně se objeví asi 1000 nových případů cervikálního karcinomu a přibližně 400 žen na něj umře ([www.svod.cz](http://www.svod.cz) a<sup>(480)</sup>).

Aby došlo k akutní HPV infekci cervixu, musí virus infikovat bazální epitelální buňky, pravděpodobně přes mikrozranění. V buňce se virus dostane do jádra, kde za přispění buněčného aparátu replikuje svoji DNA. Ta zůstává v jádře infikovaných buněk v episomální formě a při jejich mitóze se dostává do dceřinných buněk, v podstatě se jedná pouze o udržování přítomnosti virového genomu v buňce. Expresí virových proteinů je také na nízké úrovni<sup>(481)</sup>. Spolu s maturací buněk dochází ke zvýšené expresi časných genů, ke zvyšování syntézy virové DNA a v terminálně diferencovaných epitelálních buňkách k expresi pozdních obalových L1 a L2 proteinů a tvorbě nových virionů, viz obr. č. 10<sup>(482,483)</sup>. K uvolnění virionů dochází při rozpadu nejvrchnější vrstvy epitelu. Celý proces probíhá bez lyze buněk, tudíž nevyvolává žádné zánětlivé procesy.



Obr. č. 10. Expresí virových proteinů HPV při infekci mukózních tkání. Převzato z Doorbar, 2006<sup>(483)</sup>.

Při chronické infekci epitelu dochází ve většině případů k integraci virového genomu do buněčné DNA nehomologní rekombinací, většinou v oblasti genů E1 či E2. Ty za normálních podmínek slouží k represi exprese onkogenů E6 a E7. Přerušení E1/E2 vede k vysoké produkci onkoproteinů a jimi zapříčiněné deregulaci buněčného cyklu, k cytopatologickým a histologickým změnám a vzniku benigní CIN1 fáze (mírná dysplázie) <sup>(484)</sup>. Ta může přejít do těžších dysplázií /CIN2,CIN3/ a neoplázie, viz obr. č. 11.



Obr. č. 11. Schéma rozvoje cytologicko-histologických změn při chronické infekci HPV v mukózní tkáni. Převzato z Wheeler, 2007 <sup>(485)</sup>.

V genomu papilomavirů je umístěno několik časných genů, jejichž produkty mohou způsobit transformaci buněk. Jedním z nich je protein E5, který hraje roli spíše u bovinních virů než u lidských. Interakcí s receptory pro EGF, CSF nebo PDGF způsobuje na ligandu nezávislou signalizaci dovnitř buňky <sup>(486,487)</sup>. Také váže vakuolární ATPázu a zabraňuje acidifikaci endosomů, čímž může zvýšit signalizaci přes EGFR a zároveň tak zasahuje do procesu presentace antigenů na MHC gp I a II <sup>(488,489,490,491)</sup>. Může stimulovat jaderné transkripční faktory Jun a Fos, které patří mezi protoonkogeny, a tím deregulovat transkripci jiných genů <sup>(492)</sup>.

Důležitým onkogenem je oblast kódující E6 antigen. U nízkorizikových HPV typů nemá téměř žádný transformační potenciál, ten se projevuje pouze u vysokorizikových typů. Onkoprotein E6 způsobuje zvýšenou ubiquitinylaci proteinu p53, který normálně řídí bezchybný průchod buněčným cyklem <sup>(493,494)</sup>. Na p53 má vliv i nepřímý, váže totiž protein p300, který pak neacetyluje p53 a tím snižuje jeho DNA-vazebnou schopnost <sup>(495)</sup>.

Dalším důležitým onkoproteinem je E7. Ten je fosforylovaný a lokalizovaný v jádře <sup>(496)</sup>. Exprese genu E7 způsobuje oslabení kontroly buněčného cyklu také na úrovni proteinu pRb, který vyvazuje a nasměřuje ho do proteazomu. Spolu se snížením p53 činností E6 proteinu tak spolu zajišťují genotoxické působení na infikovanou buňku (chromozomální zlomy, translokace, aneuploidie atd.) a její imortalizaci a následný nádorový zvrat aktivací protoonkogenů <sup>(497,498,499,500)</sup>. Proteiny E6 a E7 jsou také nezbytné pro udržování episomální formy HPV v epitelálních buňkách stimulací buněk pro průchod S-fází buněčného cyklu <sup>(501)</sup>.

Cervikální karcinom je spojen především s infekcí HPV16 a HPV18, jedná se o sexuálně přenosnou nemoc. Dnes je již na trhu vakcína, kterou lze imunizovat děti v pubertě před začátkem sexuálního života a ochránit je tak před nákazou získanou v průběhu dalších let. K dispozici je kvadrivalentní vakcína Silgard vyráběná firmou Merck, která vyvolává ochranu proti vysokorizikovým HPV16/18 a proti nízkorizikovým HPV6/11. Připravuje se ve kvasinkovém expresním systému, podává se ve formě pseudopartikulí kapsidového L1 proteinu ve třech dávkách spolu s hliníkovým adjuvans (aluminium hydroxyfosfát sulfát) a poskytuje vysokou ochranu proti daným HPV typům, částečně kros-reaguje i s dalšími typy papilomavirů neobsaženými ve vakcíně – HPV31 a 45 <sup>(502,503)</sup>. Další dostupnou vakcínou je Cervarix od firmy GSK, také na virus-like particles založená vakcína, ale je pouze bivalentní, zaměřená jen proti vysokorizikovým typům 16/18. Tato vakcína se vyrábí v bakulovirovém systému a podává se s adjuvans AS04. Obě vakcíny jsou profylaktické a jsou určeny převážně pro mladá děvčata. I přes úspěch L1-VLP vakcín stále existují pracovní skupiny zabývající se studiem minoritního L2 proteinu a jeho vlivu na imunogenost vakcíny <sup>(504,505)</sup>. Žádná z vakcín není schopná ovlivnit již probíhající infekci určitým typem papilomaviru. Profylaktické vakcíny jsou méně účinné u žen (mužů) starších 25 let, u nichž vzhledem k jejich věku indukují nižší tvorbu protilátek.

Díky tomu zůstává velký prostor pro tvorbu terapeutických vakcín pro již infikované osoby s rozvíjejícími se dyspláziemi napadených tkání. Vzhledem k povaze a chování papilomavirů v epitelech děložního čípku jsou terapeutické vakcíny zaměřeny na vyvolání CD8<sup>+</sup> T buněčné cytotoxické imunitní odpovědi <sup>(506)</sup>. Nejčastěji jsou používány proteiny E6 a E7 jakožto cílové antigeny, protože se jedná o antigeny asociované s nádory, které jsou exprimovány v buňkách karcinomů pozitivních na papilomavirovou DNA a jsou nezbytné pro buněčnou transformaci a udržování transformovaného fenotypu. Proto je také nepravděpodobné, že by mechanismus úniku imunitě nádorových buněk probíhal přes ztrátu exprese těchto antigenů. Testovány jsou vakcíny založené na rozdílných přístupech – očkování se provádí s DNA nebo buněčnými vakcínami, s peptidovými/proteinovými vakcínami nebo s virovými vektory. DNA vakcíny kódující E7 epitopy či jejich deriváty spojené s HSP70 nebo CRT jsou dobře snášeny, vyvolávají

specifickou CD8<sup>+</sup> odpověď a byly vyzkoušeny u pacientek s těžkou displázií a neoplázií (507, 508, 509). Buněčnými vakcínami se rozumí podání DC stimulovaných *in vitro* E7 antigenem, nebo podání upravených nádorových buněk exprimujících stimulační cytokiny jako např. GM-CSF; nádorové buňky byly prozatím vyzkoušeny pouze na myším modelu (510, 511). Peptidové a proteinové vakcíny E6/E7 jsou bezpečné, po podání pacientkám jsou pohlceny a zpracovány dendritickými buňkami a vystaveny na jejich MHC molekulách. V kombinaci s různými druhy adjuvans vyvolávají T buněčnou odpověď (512, 513). Proteinové vakcíny byly použity také jako fúzní molekuly v kombinaci E7 s papilomavírovým L2 nebo bakteriálním HSP65 (514, 515, 516, 517). V preklinických a klinických studiích byly zkoušeny i virové vakcíny. Nejsou sice tak bezpečné jako DNA či peptidové vakcíny, ale indukují silnější T buněčnou odpověď a mají velký terapeutický potenciál. Adenoviry, vakcínie či alfaviry byly modifikovány pro expresi E7 antigenu nebo jeho derivátu, případně byla zvýšena terapeutická účinnost souběžnou expresí cytokinu podporujícího protinádorovou odpověď, např. IL-2 nebo IL-12 (518, 519, 520). Jako u každého solidního nádoru dochází i u karcinomu cervixu ke změnám v mikroprostředí. Vakcíny proto musí být vylepšovány tak, aby se potlačily nežádoucí účinky vyvolané přítomností regulačních T buněk, které produkují cytokiny inhibující protinádorovou imunitní odpověď (521).

## 2.13 E7 PROTEIN JAKO NÁDOROVÝ ANTIGEN

Onkoprotein E7 z lidského papilomaviru je malý protein tvořený asi 100 aminokyselinami. Je fosforylován kasein kinázou II (CKII) a ve své molekule obsahuje zinkový prst (522). Je lokalizován v jádře, což znesnadňuje presentaci jeho peptidových fragmentů na povrchu buněk (523, 524).

Vystavení proteinů na MHC glykoproteinech prochází cestou membránových váčků. Cytoplasmatické a jaderné proteiny jsou degradovány na peptidy v cytoplasmě, jsou transportovány do endoplasmatického retikula a vážou se na MHC gp I, s nimiž se posléze vystavují na povrchu buňky a jsou v tomto stavu „čitelné“ pro CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. Pokud proteiny projdou endosomálním a lysosomálním kompartmentem, je u antigen presentujících buněk možná jejich vazba na MHC gp II nejen v případě pohlcených cizích částic, ale i u vlastních proteinů. Takové proteiny jsou internalizovány z plasmatické membrány, v kyselém prostředí lysozomu degradovány proteázami a peptidy vytvoří komplex s MHC gp II, ačkoliv za

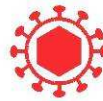
normálních podmínek by se preferenčně vázaly na MHC gp I. Takový proces umožní presentaci antigenů také CD4<sup>+</sup> T lymfocytům. <sup>(525, 526, 527, 528, 529)</sup>.

Endosomy a lysozomy jsou charakterizovány přítomností několika specifických membránových proteinů. Jedním z nich je LAMP-1, s lysozomy asociovaný membránový protein typu 1 <sup>(530)</sup>. Cytoplasmatická C-koncová doména LAMP-1 obsahuje sekvenci Tyr-Gln-Thr-Ile, která je strukturně podobná sekvenci Tyr-Xaa-Xaa sloužící k internalizaci buněčných membrán a pravděpodobně směřuje mnohé buněčné receptory do lysozomů <sup>(531, 532)</sup>. Směrování LAMP-1 do lysozomů je tedy dáno jeho C-koncovou doménou <sup>(533)</sup>.

Vytvořením fúzních konstruktů obsahujících modelový antigen navázaný na transmembránovou/cytoplasmatickou část LAMP-1 by mělo být dosaženo relokace antigenu do endosomálních a lysozomálních kompartmentů. Protein E7 je sice typickým příkladem nádorového antigenu, ale sám o sobě je jen slabě imunogenní. Fúzí s částí LAMP-1 je dosaženo zvýšené imunogennosti a zlepšení vakcinačního potenciálu daného vektoru díky zvýšené presentaci na MHC gp I. i II. třídy <sup>(534, 535)</sup>.

---

### **3 VÝSLEDKY**



RESEARCH

Open Access

## Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand

Kamila Zurkova\*<sup>1</sup>, Petr Hainz<sup>1</sup>, Jitka Krystofova<sup>1</sup>, Luda Kutinova<sup>1</sup>, Miloslav Sanda<sup>2</sup> and Sarka Nemeckova<sup>1</sup>

### Abstract

**Background:** Vaccinia virus, one of the best known members of poxvirus family, has a wide host range both *in vivo* and *in vitro*. The expression of Flt3 ligand (FL) by recombinant vaccinia virus (rVACV) highly influenced properties of the virus in dependence on the level of expression.

**Results:** High production of FL driven by the strong synthetic promoter decreased the growth of rVACV in macrophage cell line J774.G8 *in vitro* as well as its multiplication *in vivo* when inoculated in mice. The inhibition of replication *in vivo* was mirrored in low levels of antibodies against vaccinia virus (anti-VACV) which nearly approached to the negative serum level in non-infected mice. Strong FL expression changed not only the host range of the recombinant but also the basic protein contents of virions. The major proteins - H3L and D8L - which are responsible for the virus binding to the cells, and 28 K protein that serves as a virulence factor, were changed in the membrane portion of P13-E/L-FL viral particles. The core virion fraction contained multiple larger, uncleaved proteins and a higher amount of cellular proteins compared to the control virus. The overexpression of FL also resulted in its incorporation into the viral core of P13-E/L-FL IMV particles. In contrary to the equimolar ratio of glycosylated and nonglycosylated FL forms found in cells transfected with the expression plasmid, the recombinant virus incorporated mainly the smaller, nonglycosylated FL.

**Conclusions:** It has been shown that the overexpression of the Flt3L gene in VACV results in the attenuation of the virus *in vivo*.

### Background

Vaccinia virus (VACV) is the best-studied member of the Orthopoxvirus genus of the poxvirus family. It has a wide host range and is able to infect cells of many different origins. VACV has played important roles in medicine and biomedical research. As VACV highly stimulates both the innate and adaptive arms of the immune system, it was used as the vaccine for eradication of smallpox and recently, the virus has been used as a live recombinant vaccine for the induction of protective immune response against many pathogens in experimental animals. VACV genome consists of a of 190 kbp dsDNA encoding over 200 proteins. The non-essential genes are used for the insertion of our gene of interest [1]. The resultant recombinant virus (rVACV) usually expresses foreign genes without remarkable impact on viral infectivity. Recombi-

nant proteins are correctly posttranslationally modified, properly localized or secreted from infected cells.

Flt3 ligand (FL) is a hematopoietic growth factor that plays an important role in the life cycle of several blood cells. It is produced by bone marrow stromal cells, T cells and endothelial cells and by a number of organs including spleen, ovary, testis, intestine and kidney. FL alone induces differentiation of macrophages in CD34+ cell culture and stimulates increase in dendritic cell numbers [2-8]. When FL is administered to mice, hematopoietic stem cells and progenitors in the bone marrow and spleen are expanded and mobilized into the peripheral blood. FL increases beta-1-integrins or P-selectin expression and downregulates VCAM-1 on peripheral blood and follicular cells [9-13]. Moreover, the ligand acts in synergy with other cytokines, including stem cell factor (SCF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukins 3, 6, 7, 11 and 15. Stimulation by FL leads to proliferation, differentiation, maintenance and long-term reconstitution of primitive hematopoietic cells

\* Correspondence: zurkova@uhkt.cz

<sup>1</sup> Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Experimental Virology, U Nemocnice 1, CZ-128 20 Prague 2, Czech Republic  
Full list of author information is available at the end of the article





(both lymphoid and myeloid progenitors) [5,14-16]. FL dramatically enhances the production of antibodies to soluble antigens *in vivo* [17]. Systemic inoculation enhances the production of IFN- $\gamma$ , IL-12, GM-CSF and IL-5 which results in increase of cytotoxic T lymphocytes, natural killer cells and dendritic cells in blood [18-20].

Human FL shares high homology with mouse FL in themino acid sequence, mainly in the extracellular part of the molecule, and is able to activate mouse Flt3 receptor [21]. The human Flt3L gene encodes a 235-amino acid type I transmembrane protein consisting of four domains: 1) an N-terminal 26-residue signal peptide, 2) a 156-residue extracellular domain, 3) a 23-amino acids transmembrane domain, and 4) a 30-residue cytoplasmic domain [4,15,22]. FL is expressed in membrane-bound and soluble forms. The cytokine is biologically active both in the transmembrane form and in the soluble form that is thought to be released into the circulation from the cell membrane by protease cleavage or is produced directly as the alternatively spliced soluble isoform [15,22-24]. The extracellular domain alone has been shown to be sufficient for bioactivity [23]. FL exists in both monomeric and homodimeric forms. Soluble FL can be a noncovalently linked oligomer and contains six cysteine residues in each molecule that apparently form intramolecular disulfides. The integrity of the FL dimer seems to be essential for bioactivity; moreover, the fusion of two soluble FL molecules can increase the activity of the ligand [25,26]. FL belongs to the family of short chain helical cytokines where the three-dimensional structures of five members, i.e. interleukin-4 (IL-4), IL-2, IL-5, GM-CSF and MCSE, have been solved [27]. The FL monomer has the most similar protein structure to IL-4 although the effects on blood cells are of different type [25,28].

The FL receptor, Flt3 (Fms-Like Tyrosine kinase 3), belongs to members of the class III receptor tyrosine kinase family of transmembrane glycoproteins and is structurally related to the c-kit (KIT), c-fms (FMS), and platelet-derived growth factor (PDGF) receptors. The receptor is expressed only in a limited number of tissues, including the human bone marrow, thymus, spleen, liver, and lymph nodes.

In this study, we examined the influence of FL production on the life cycle of recombinant virus. We constructed two recombinant vaccinia viruses of the Praha strain (clone P13) designed for the expression of the human gene encoding a soluble isoform of FL (sFL). The rVACVs were characterized and compared for their multiplication and virulence *in vitro* and *in vivo*, and for the ability to ensure the secretion of FL from infected cells.

We found out that the FL overexpression substantially influenced the properties of rVACV. High production of FL resulted in decreased rVACV multiplication in mac-

rophages and in mice. Biochemical and electron microscopic analysis of the recombinant virions revealed changes in the protein composition and incorporation of FL into the virion core. We have shown that the overexpression of the Flt3L gene in VACV results in attenuation of the virus *in vivo*.

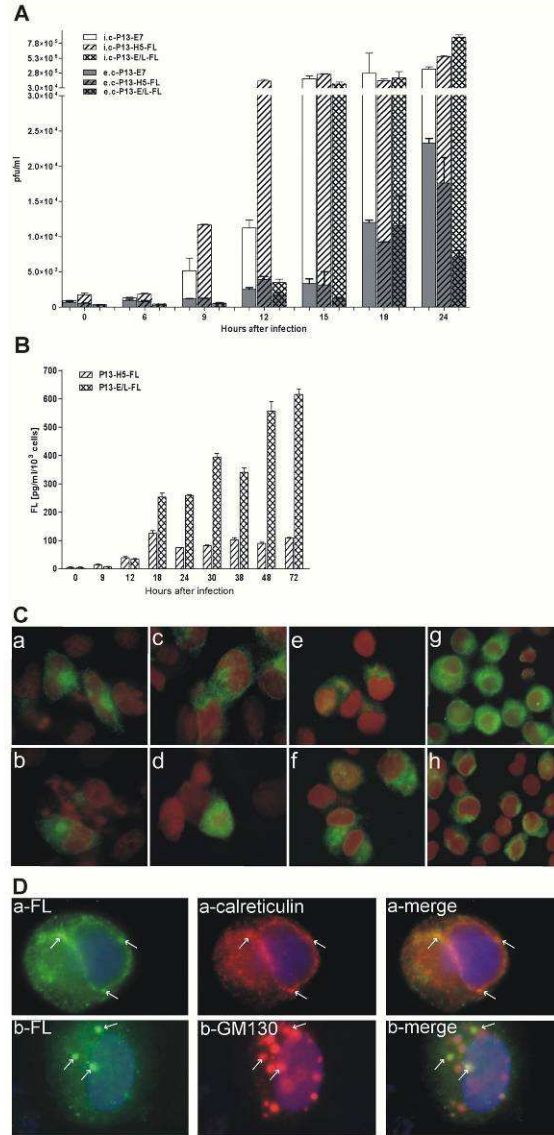
## Results

### Virus multiplication and sFL production and localization *in vitro*

We prepared recombinant vaccinia viruses expressing the gene for a soluble isoform of human Flt3 ligand (FL). In the first instance, we determined FL production and virus multiplication *in vitro*. The monolayers of CV1 cells were infected with recombinant VACV at a MOI of 2.5 and cells were cultured in the fresh medium. The medium and cells were harvested at the indicated intervals (Fig 1). The cells were frozen and thawed and the centrifuged supernatant was removed from cell debris. Both, media containing extracellular (e. c) virus and supernatants containing intracellular (i. c) virus were used for determination of infectious virus or production of FL. Replication of recombinant viruses was determined by plaque assay. The concentration of FL was measured by ELISA test.

The overall multiplication of FL-expressing recombinants and control virus in CV1 cells was similar (Fig. 1A); however, the newly formed infectious particles of P13-E/L-FL were retained in infected cells and released to the medium at later intervals after infection as compared with P13-H5-FL or control virus P13-E7. Similar rates of viral multiplication in CV1 cells were also found for double recombinant viruses expressing  $\beta$ -galactosidase gene of *E.coli* (data not shown). The production of intracellular and secreted FL was followed up to 72 h.p.i. (Fig. 1B). The peak of FL production driven by the H5 promoter was at 18 h.p.i., whereas the production from the E/L promoter increased gradually and high amount of FL was produced up to very late intervals.

To determine the sites of production, intracellular storage and transport of sFL protein in infected cells, the sFL was detected by immunofluorescent staining. Confluent cultures of CV1 and HeLa cells were infected with P13-H5-FL or P13-E/L-FL or control virus at a MOI of 2 for 30 minutes, cultured in fresh medium and stained at several time intervals. To compare the location of sFL protein expressed by rVACV and produced in the absence of virus infection, 293T cells ( $6 \times 10^4$ ) were transfected with the expression plasmid pBSC-FL (2.5  $\mu$ g) where the expression of the sFL gene was controlled by the strong cytomegalovirus promoter. Transfected cells were processed for fluorescent microscopy after 48 hours of cultivation. The localization of sFL in the transfected 293T cells (Fig. 1C-a, b) had the same fluorescent pattern as in the virus infected cells (Fig. 1C-c, d, e, f). The course of



**Figure 1** *In vitro* multiplication and sFL production by rVACV. Confluent CV-1 cell cultures were infected with purified virus at a MOI of 2.5 at 37°C for 1 hour, washed with PBS and the fresh medium was added. The medium and cells were collected, frozen and thawed, and cell debris was removed. The titers of the infectious virus (**A**) were determined in the medium and in the cell lysate. Total FL production was determined by ELISA (**B**). The columns in all graphs represent the mean  $\pm$  s.d. The intracellular location of sFL (**C**) in 293T cells (**a, b**) 48 h after transfection or in infected CV1 (**c, d**) and HeLa cells (**e, f**) 9 h after infection or in J774.G8 cells (**g, h**) 3 h after infection with P13-H5-FL (**c, e, g**) or P13-E/L-FL (**d, f, h**) as visualized by an immunofluorescent microscope at a magnification of 1000x. The colocalisation of sFL (**D**) with endoplasmic reticulum marker calreticulin or with cis-Golgi marker GM130 in HeLa cells 3 h after infection as visualized by an immunofluorescent microscope at a magnification of 1000x.

the sFL fluorescent signal in infected cells correlated in time with strength of expression directed by the H5 or E/L promoter (not shown). The H5 promoter was stronger in early phase of infection and the fluorescent signal was already visible at 3 hours after infection while the expression driven by the E/L promoter was hardly observable. The signal of the sFL expression controlled under the E/L promoter was stronger at later time intervals (followed up to 12 h.p.i.) when the signal from P13-H5-FL infected cells did no more rise (not shown). When we stained the specific markers for cellular organelles, calreticulin and GM130, we observed the sFL protein localized mainly in the endoplasmic reticulum (Fig. 1D-a). The colocalisation of sFL with the cis-Golgi marker GM130 (Fig. 1D-b) was not so obvious in infected cells and decreased in time due to a massive transition of GM130 to viral factories. The considerable portion of sFL seemed to be transported in the vesicles toward the cell surface.

#### **Multiplication of P13-E/L-FL in vivo as well as in macrophage cell line J774.G8 is impaired**

To determine the influence of FL expression on viral multiplication *in vivo*, we infected mice intraperitoneally with  $1 \times 10^6$  pfu of rVACV. The ovaries and blood serum were collected at 24-hours intervals. The virus in ovaries was determined by plaque assay of tissue homogenate or as viral DNA by quantitative PCR. The level of FL was measured by ELISA in diluted sera.

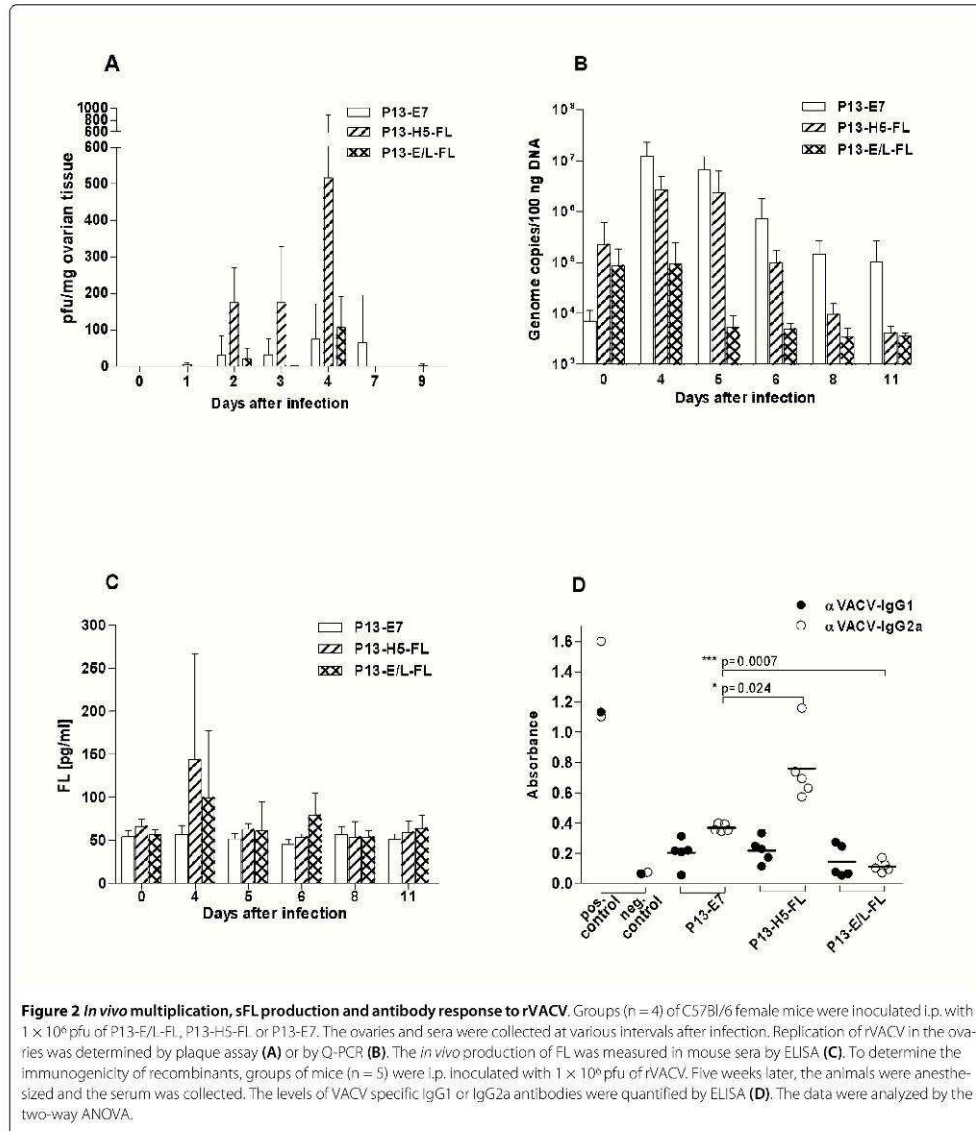
The amount of virus (Fig. 2A) and viral DNA (Fig. 2B) in the ovaries was increasing from the time of inoculation to day 4 and then dropped. The comparison of multiplication between different viruses showed that the expression of the FL gene did not affect multiplication of P13-H5-FL virus, whereas the growth of P13-E/L-FL virus was impaired in mouse ovaries, contrary to the situation in CV1 cells *in vitro*. Similarly, serum FL was higher in animals infected with P13-H5-FL virus in comparison with P13-E/L-FL (Fig. 2C). The highest amount of FL in the serum was found on day 4 after infection in accordance with the strongest virus replication in mouse ovaries. The decreased serum FL levels reflected the impaired replication of the recombinant virus expressing FL under the control of the E/L promoter as detected in the mouse ovaries.

In order to determine the impact of the attenuation of *in vivo* multiplication of P13-E/L-FL on its ability to induce immune response, we measured the amount of IgG1 and IgG2a specific for VACV by ELISA (Fig. 2D) in the mouse sera 5 weeks after virus inoculation. We observed that the multiplication of viruses correlated with the level of anti-VACV antibodies. P13-E/L-FL induced no detectable IgG1 or IgG2a antibodies against the vaccinia antigen, whereas P13-H5-FL and P13-E7 elicited anti-VACV specific antibodies predominantly of

IgG2a isotype as expected for the immune response against vaccinia virus infection.

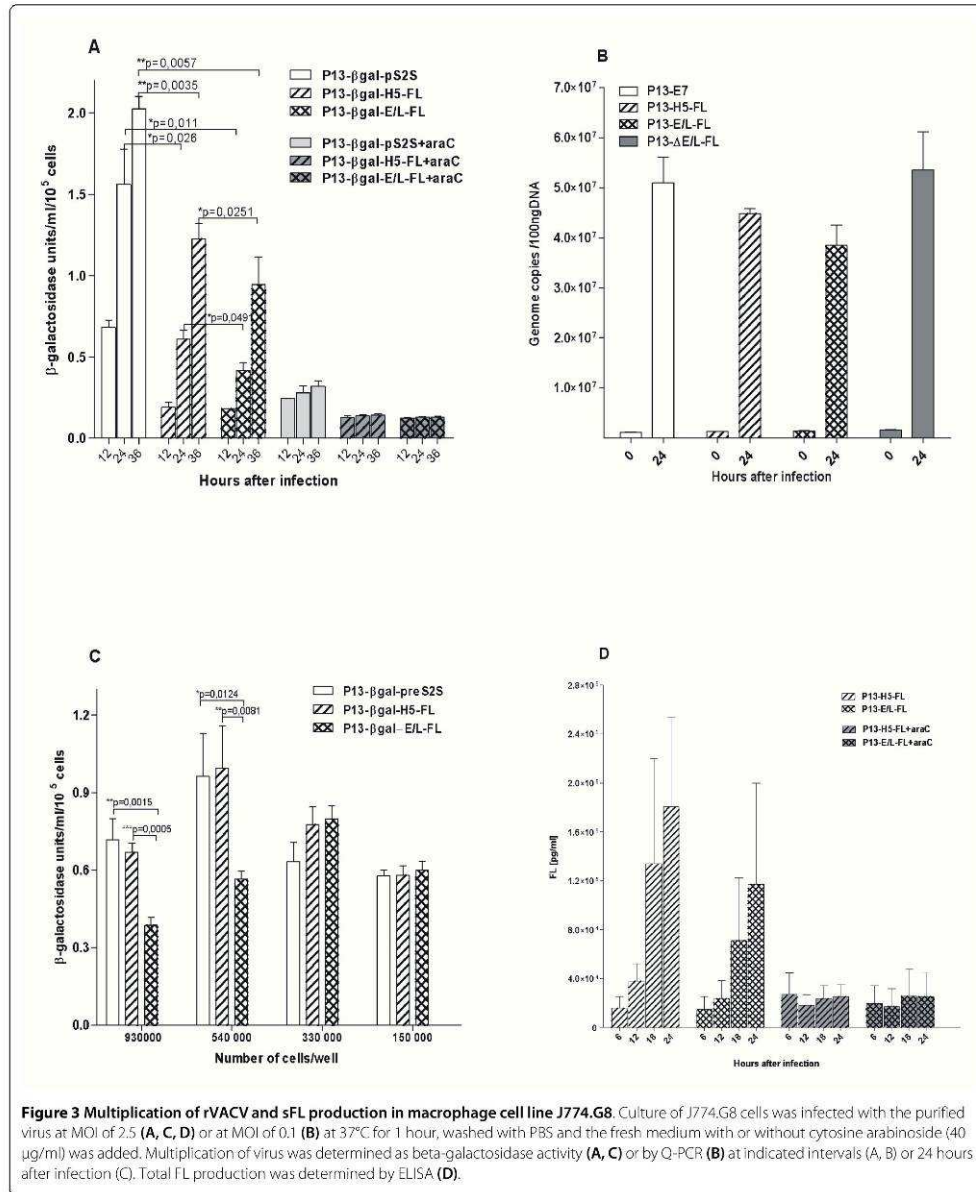
To find an *in vitro* model for the study of *in vivo* inhibition of P13-E/L-FL replication, we compared the ability of recombinants expressing sFL to multiply in cell lines of various origin such as mouse J774.G8 macrophages, 32D cells, human HeLa cells or MOLM-9 leukemic cells. We infected cells at a MOI of 1 with double recombinant viruses expressing FL or HPV16 E7, together with  $\beta$ -galactosidase serving as a reporter gene for relative multiplication of viruses. The infected cells were incubated with or without cytosine arabinoside (40  $\mu$ g/ml) to block viral DNA synthesis and consequently to prevent late gene expression [29]. The  $\beta$ -galactosidase activity was monitored up to 36 hours post infection. We found out that FL expression did not affect rVACV multiplication in HeLa cells, as the  $\beta$ -galactosidase activity was similar for all viruses at every interval (not shown). Mouse and human cell lines of hematopoietic origin, 32D and MOLM-9, were completely non-permissive for any of the rVACV tested (not shown). However, a similar situation as *in vivo* has been observed during infection of confluent culture of macrophage cell line J774.G8. In comparison with the other double recombinants, multiplication of P13- $\beta$ gal-E/L-FL virus in J774.G8 was reduced as determined by  $\beta$ -galactosidase assay (Fig. 3A), quantitative PCR of viral DNA (Fig. 3B) and titration of viral progeny produced by the single recombinants (not shown). The inhibition of FL-expressing viruses was slightly visible also in samples with added ara-C where only the early production of  $\beta$ -galactosidase occurred. Deletion of the FL gene in P13- $\Delta$ E/L-FL resulted in restoration of multiplication of the reversion mutant (Fig. 3B). The relative multiplication of P13- $\beta$ gal-E/L-FL virus, measured as the  $\beta$ -galactosidase production, depends on macrophage culture conditions. In quickly growing cells (about 40% confluence), we observed no inhibition of P13- $\beta$ gal-E/L-FL (Fig. 3C), whereas the growth of P13- $\beta$ gal-E/L-FL virus in wells containing more than  $5 \times 10^5$  J774.G8 cells was significantly restricted comparing with P13- $\beta$ gal-H5-FL or P13-E7 virus.

To determine the effect of the attenuation of P13-E/L-FL in macrophages J774.G8 on transgene expression, we measured sFL production by infected cells. Confluent culture of J774.G8 cells was infected at a MOI of 2.5 and secretion of sFL into the medium as well as the amount of intracellular FL was measured by ELISA (Fig. 3D). We noticed that FL production directed by the strong E/L promoter was lower but nearly comparable with that under the control of the H5 promoter. This result was in accordance with the reduced multiplication of the P13-E/L-FL recombinant in macrophage culture. The amount of produced FL was not influenced in early phase of infection as showed bars of samples with added ara-C, which



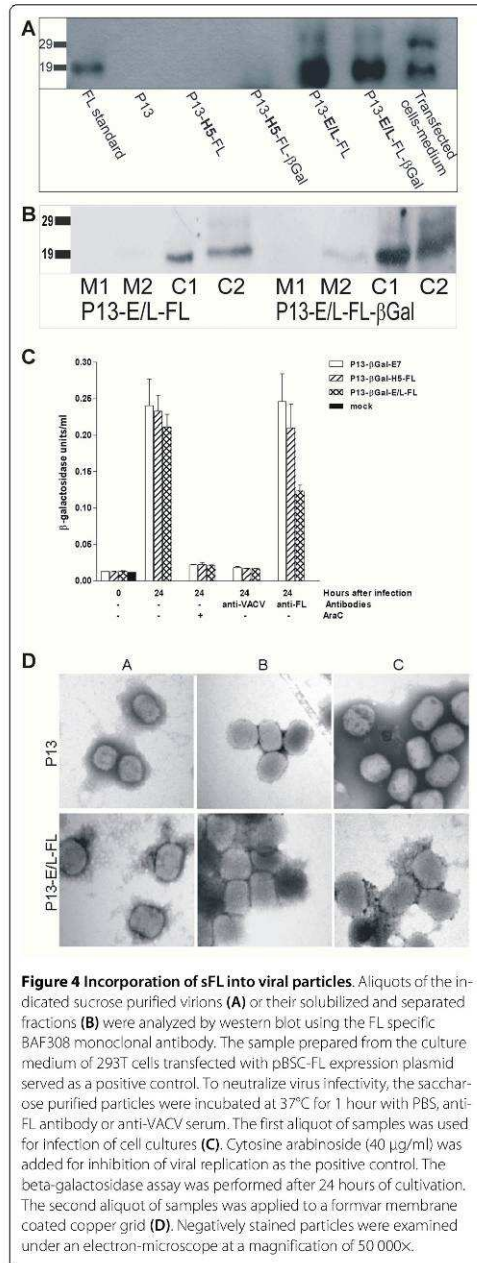
support the idea that the inhibition of virus expressing sFL under E/L promoter occurs in replicative and postreplicative phases of infection. The localization of FL in infected macrophages (Fig. 1C-g, h) determined by immunofluorescence was identical to that observed in

other tested cell types. The fluorescence signal was visible as early as 90 minutes after infection and persisted during the observed time interval. At 3 hours after infection, the signal was weaker in the macrophages infected with P13-E/L-FL compared to P13-H5-FL.



**The core of intracellular mature virions (IMV) harbours sFL**  
 In the next step, we analyzed by western blots the composition of purified intracellular mature virions (IMV) of FL-expressing viruses, P13-H5-FL, P13-E/L-FL and dou-

ble recombinants carrying both the sFL also  $\beta$ -galactosidase genes and of P13 parental virus (Fig. 4A) using FL specific antibody. We found out that high sFL expression driven by the E/L promoter resulted in the incorporation



of sFL in virus particles, whereas sFL incorporation was not found if the expression was regulated by the H5 promoter. The sFL band associated with virion cores had the same size of 19 kDa as found for the low-glycosylated sFL produced in infected cells or in cells transfected with the expression plasmid pBSC-FL. The 25 kDa glycosylated sFL produced in infected and transfected cells was not detected in purified virions.

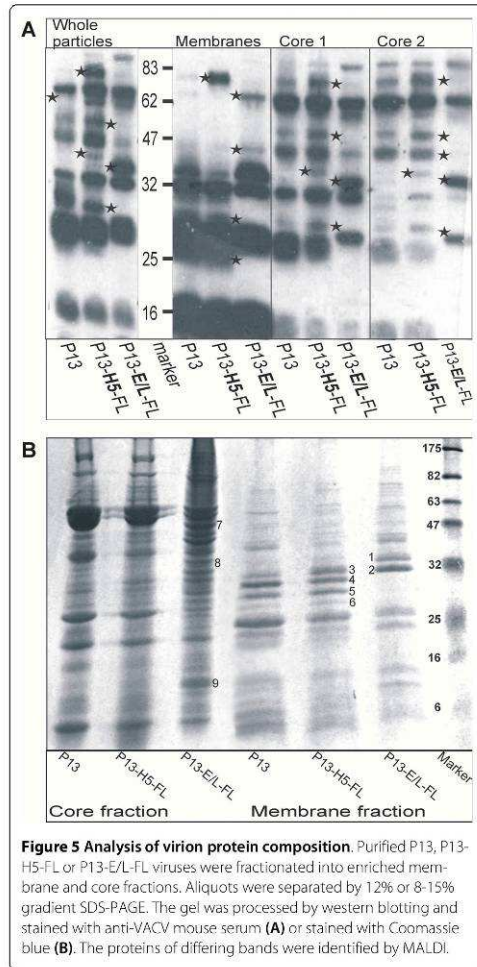
To analyze the composition of intracellular mature virions (IMV), we partitioned virions into two membrane (M1, M2) and two core fractions (C1, C2) and analyzed them by western blot using FL specific antibody (Fig. 4B). The enrichment of the membrane and core fractions was confirmed by western blot using antibodies to p16 (A14, membrane protein), 4b (A10, core protein) and convalescent anti-VACV mouse serum (not shown). We found sFL (19 kDa) predominantly in the core fractions and not in the membrane fractions of P13-E/L-FL IMV or other tested viruses.

To confirm the association of sFL with virions, we performed the neutralization assay. In this experiment, sucrose purified particles of the double recombinants carrying the β-Gal gene together with FL or a control gene were incubated with polyclonal antibody against FL or with anti-VACV rabbit or mouse serum or non-immune serum. The neutralization of virus infectivity was measured as the ability to produce beta-galactosidase in CV1 cells (Fig. 4C). The control virus P13-βgal-E7 as well as P13-βgal-H5-FL and P13-βgal-E/L-FL viruses were neutralized by incubation with anti-VACV mouse or rabbit serum. Neither P13-βgal-E7 nor P13-βgal-H5-FL was neutralized by anti-FL antibodies. The infectivity of P13-βgal-E/L-FL virus was lowered by anti-FL antibodies, but not to such an extent as observed using the positive anti-VACV serum.

We speculated that a portion of sFL was displayed on the surface of IMV, and we used the same antibodies or sera to confirm the results of the neutralization experiment by direct observation of virions. Purified virions of P13-E/L-FL or P13 viruses were incubated with sFL specific polyclonal antibody or rabbit and mouse anti-VACV serum or non-immune serum. The virus particles were negatively stained and examined under an electron microscope (Fig. 4D). The anti-VACV sera were able to aggregate viral particles of both viruses. The anti-FL antibody mediated aggregation of P13-E/L-FL particles but not of the parental P13 virus.

#### Integration of sFL in virions is associated with aberrant protein composition of viral particles

As the P13-E/L-FL virions were distinct in structure from P13-H5-FL virus particles, we looked for other differences in the protein composition. The sucrose purified



**Figure 5 Analysis of virion protein composition.** Purified P13, P13-H5-FL or P13-E/L-FL viruses were fractionated into enriched membrane and core fractions. Aliquots were separated by 12% or 8-15% gradient SDS-PAGE. The gel was processed by western blotting and stained with anti-VACV mouse serum (A) or stained with Coomassie blue (B). The proteins of differing bands were identified by MALDI.

particles were fractionated in similar way as used for FL protein detection above and afterwards analyzed by Western blot using anti-VACV mouse serum (Fig. 5A). The analysis revealed additional and missing distinct immunodominant VACV protein bands (marked with asterisks) in the membrane as well as in the core fractions of P13-E/L-FL IMV in comparison with P13-H5-FL or P13 virus. In order to uncover the differing proteins, SDS-PAGE gels were stained with Coomassie blue (Fig. 5B) and bands were cut out from the gel and identified by mass spectrometry (Table 1). The major membrane protein p35 (gene H3L, band 1) of P13-E/L-FL virus was shifted in comparison with two other viruses (band 4).

Band 1 co-migrated with annexin 5. All three viruses contained the membrane protein p32 (gene D8L) detected in band 2 or 3; however, the membranes of P13 and P13-H5-FL viruses comprised an additional form of p32 detected as band 5. The P28K protein (gene L4R, band 6) was absent in the enriched membrane fraction of P13-E/L-FL, whereas P13 and P13-H5-FL contained a faint band of this major core protein. This band was also less abundant in the core fraction of P13-E/L-FL in comparison with other two viruses. Furthermore the core fraction of P13-E/L-FL virus harbored an additional hypothetical 10 kDa viral protein (band 9) and host proteins tubulin  $\beta$  chain (band 7) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (band 8).

### Discussion

Several studies have shown that FL protein can inhibit tumor growth *in vivo* and acts as a vaccine adjuvant. Instead of direct FL protein administration, the production of FL by a viral vector might result in prolonged FL presence in the body and in improved therapeutic activity [30].

We constructed two recombinant VACVs derived from the Praha vaccine strain whose expression of FL was controlled by the natural early H5 promoter which is important for early antigen presentation, or by the synthetic E/L promoter with activity at both early and late times during VACV infection [31,32]. The original goal of our project was to use FL-expressing viruses for stimulation of antigen presenting cell activity and adaptive immunity in tumor bearing animals. Indeed, we have shown that immunization with VACV co-expressing sFL with the E7 protein of HPV16 as a tumor antigen inhibited the formation and growth of TC1 tumors in mice [33]. In that study we observed that despite high expression of FL controlled by the synthetic E/L promoter *in vitro*, the double recombinant P13-E/L-FL-SigE7LAMP induced only low levels of FL in the serum of inoculated mice. In an attempt to elucidate the nature of the inhibitory effect of FL overexpression controlled by the E/L promoter on the release of recombinant cytokine in mouse serum, we focused on a more detailed study of FL-producing recombinants.

The first step was to characterize the multiplication and FL production *in vitro*. We compared the replication of P13-H5-FL, P13-E/L-FL and control virus in CV1 cells by virus progeny titration. No distinct effect of recombinant protein expression on the replication was observed, apart from the moderately delayed release of P13-E/L-FL virus from infected cells. ELISA tests of media and cell lysates of infected cultures confirmed the generally accepted idea of the strength of natural H5 promoter of VACV which is active mainly in the early phase of infection and of the synthetic E/L promoter whose activity is increasing from the early to the late phase of infection.

**Table 1: Virion proteins identified in membrane- and core- enriched fractions detected by SDS-PAGE and mass spectrometry analysis.**

# band	ORF	Protein function (Reference)	# of identified peptides
1	H3L	IMV major membrane protein p35 [50] + annexin 5	12
2	D8L	IMV membrane protein p32 [54]	7
3	D8L	IMV membrane protein p32	7
4	H3L	IMV major membrane protein p35	13
5	D8L	IMV membrane protein p32	8
6	L4R	Major core protein 28 k [73]	8
7	Cellular	Tubulin $\beta$ chain	4
8	Cellular	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), EC1.2.1.1.	8
9	Putative AORFL	Hypothetical 10.8 kDa [74]	3

Then we administered these viruses intraperitoneally to 6-weeks-old mice and measured the expression of FL *in vivo* for several days after inoculation. The animals inoculated with P13-E/L-FL did not have highly elevated serum levels of FL, similarly to the previous experiments done with double recombinant P13-E/L-FL-SigE7LAMP. Moreover, we found out, by titration and by quantitative PCR of viral DNA in mouse ovaries, that the P13-E/L-FL virus was not able to multiply *in vivo*. It was seemingly in contradiction with our previously published results where the expression of FL under the control of the E/L promoter did not affect the multiplication of the double recombinant P13-E/L-FL-SigE7LAMP in the mouse ovaries in comparison with the control virus and with the double recombinant P13-H5-FL-SigE7LAMP [33]. When comparing the double recombinant P13-E/L-FL-SigE7LAMP with the single recombinant P13-E/L-FL *in vitro*, we found the latter to produce higher levels of Flt3L in infected CV1 cells (not shown). Decrease in FL production by double recombinant *in vitro* could be ascribed to the inactivation of the F7L locus as a result of the insertion of the SigE7LAMP gene, which is known to down-regulate the expression of the gene inserted in the TK locus [34]. The overexpression of FL by the single recombinant was so high that it resulted not only in limited production of FL *in vivo* but even in its decreased multiplication in mice. The block of P13-E/L-FL multipli-

cation was confirmed by the examination of the independently derived recombinants and by the deletion of the E/L-FL expression cassette followed by reversion to the wt phenotype. We checked also the DNA pattern of the genome of all analyzed viruses using Sall, HindIII, PstI, XhoI and KpnI endonucleases and found no obvious differences in the restriction patterns (not shown). It was evident that the inhibition of virus multiplication *in vivo* was caused by sFL overexpression under the control of the E/L promoter.

Attenuation of recombinant vaccinia vectors in consequence of the foreign gene insertion has been described for viruses expressing IL2 [35], IL12 [36] and IL15 [37]. The multiplication was inhibited *in vivo* and in lymphoid cell lines; however, the infected fibroblasts produced the control and cytokine-expressing viruses in equivalent titers.

The response to VACV infection has been studied in several species [38-40]. It has been illustrated recently in variola primate model that poxviruses productively infect large populations of circulating monocytes and macrophages in the lymph nodes, spleen and other tissues [41]. For our study, we selected as an *in vitro* target cell model the macrophage cell line J774.G8 which supports the growth of VACV. The multiplication of the P13-E/L-FL virus but not of the P13-H5-FL virus was restricted in confluent cultures of this cell line. Taken into consider-



ation, this situation is likely to simulate the *in vivo* state where the macrophages are terminally differentiated cells that rarely divide. We also determined the level of FL expression in J774.G8 cells by P13-H5-FL or P13-E/L-FL. Despite the sFL expression driven by promoters of different strengths, we found the same FL secretion level by either virus. It could mean that the inhibition of virus multiplication is not mediated by high level of extrinsic FL. This fact has been supported by the failure to find any Flt3 (CD135) molecules on the membrane of J774.G8 cells and by experimental addition of extrinsic Flt3L to J774.G8 cells that had no effect on the multiplication of the control P13-preS2S- $\beta$ gal or P13-E7 viruses at any step of infection. The inhibition of multiplication of P13-E/L-FL in macrophages might be reversible since we showed the dependence of  $\beta$ -galactosidase production by P13- $\beta$ gal-E/L-FL on the growing activity of cell cultures.

To exclude the possibility that apoptosis is responsible for inefficient multiplication of P13-E/L-FL in macrophages, the presence of the apoptosis marker Annexin-V and the cleavage of PARP were determined. For these experiments, we prepared the double recombinants expressing both the FL gene and GFP protein and used them for following up the early apoptosis marker (Annexin-V) in infected cells during virus replication. There were not significant differences among viruses in the infectivity (GFP positive cells amount) or in Annexin-V binding (not shown). We also tested the cleavage of PARP protein (late apoptosis marker) in macrophages infected by single recombinant viruses. The cleavage was obvious in cells infected by parental virus or P13-H5-FL and slightly in P13-E/L-FL infected macrophages. As a control, we added ara-C to macrophages, which caused PARP cleavage in all infected and non-infected macrophages (not shown). We concluded that the attenuation of P13-E/L-FL was not due to the enhanced apoptosis in macrophages.

After challenging the assumption that the antiviral state of macrophages is mediated by high levels of Flt3L produced by recombinants during infection, we considered the possibility of changes in the elementary protein composition of the virion itself. The strong expression of FL driven by the synthetic E/L promoter led to its incorporation into a core-associated protein fraction. This was due to the strong FL expression in BSC40 or HeLa cells used for virus stock preparation. The endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of P13-E/L-FL infected cells contained a huge amount of FL protein. The foreign gene product has been reported previously to be trapped in the virion due to protein-protein interactions during the virion assembly process [42-44]. Bereta et al. have indirectly shown that the rVV expressing CD40L gene contains biologically active CD40L protein in particles [45]. However, there is some selectivity in the encapsidation

process. There is evidence of the incorporation of recombinant protein into one or more virion compartments. Vaccinia virus expressing the bacterial CAT gene incorporated the enzyme into the virus particle [46]. The expression of the cytokine IL-12 led to the incorporation of about 0.01% of the total recombinant protein into an envelope fraction, HIV1 env (gp160-120) was tightly bound in protein-DNA complexes, and the enzyme beta-galactosidase was found exclusively in core-associated fraction [47]. Transport and sorting of viral proteins directly from the endoplasmic reticulum into the growing immature virions using non-COPII vesicles [48] could explain selective integration of the low-glycosylated FL into P13-E/L-FL virions. A similar selectivity for the integration of non-glycosylated form of a glycoprotein into the membrane of IMV particles was observed for A14 [49]. However, FL was not incorporated into a membrane fraction, but it was tightly bound to core, although it was also exposed on the surface of IMV to offer the epitopes for anti-FL antibodies as verified by neutralization assays and proven by electron microscopy. Moreover, the localization of the recombinant proteins may be facilitated by specific protein-protein interactions. Variation in the localization of recombinant protein has been reported in double recombinants expressing the protein of interest and  $\beta$ -galactosidase [47]. We also analysed the FL distribution also in double recombinant viruses P13- $\beta$ gal-H5-FL and P13- $\beta$ gal-E/L-FL and found no changes in comparison with the single recombinant viral particles.

In the present study, we have shown that the integration of sFL into the IMV virions was associated with an altered composition of the virions. We observed that P13-E/L-FL virions contained H3L of a higher molecular weight than P13 or P13-H5-FL (lanes 1 and 4). The H3 protein is an immunodominant component of IMV, binds to heparansulphate and is found in IMV in two isoforms, (1-324 aa) and (48-324 aa) [50]. Both the full length protein and N-terminally deleted form can be incorporated into the viral membrane [51] although the specific functions of the H3 isoforms are yet not known. As the H3 protein is nonessential for virus multiplication in cell monolayers [52], the integration of FL into the virion might modify the ratio of H3 isoforms. Similarly to H3, the second differently displayed virion component, the D8 protein, plays the role as the glycosaminoglycan (GAG) binding molecule [53]. It has been shown, that the D8 protein integrated into the viral particle can be cleaved by trypsin without any decrease of virus infectivity [54]. The D8 protein detected in band 5 could be a cleavage product of trypsin like protease. The unusual forms of both GAG binding structures resulting from high FL gene expression may influence the growth of virus in some cell types. Differences in these two membrane proteins in association with FL gene expression

could imply that the presence of FL in the virus core also affects the composition of the IMV core. The pattern of core proteins showed multiple band changes. One dominant band contains the p28K protein encoded by L4R. This protein is a basic DNA binding protein and plays an essential role in virus replication. The protein fragment (33-251 aa) produced by Ala-Gly-specific cleavage is usually found in the virus core in the absence of its precursor [55]. P13-E/L-FL virions contain less P28K than P13 or P13-H5-FL. As we did not analyze the adjacent bands, we cannot say whether or not decrease in the cleaved form of the L4 protein is associated with the presence of the P28K precursor in purified virions. There are reduced levels of early RNA and protein production in cells infected by L4R deficient vaccinia virus particles [56], which could also explain decreased levels of mRNA throughout the course of macrophage infection by P13-E/L-FL virus (data not shown). P13-E/L-FL virions yielded additional bands containing host proteins. Tubulin  $\beta$  chain has been found previously in non-recombinant vaccinia virus IMV where it can form up to 0.7% of protein content [57]. We found an increased amount of tubulin  $\beta$  chain in the core fraction together with increased FL in P13-E/L-FL. MALDI analysis of the core fraction yielded GAPDH. This enzyme, which is involved in many different cellular processes, has also been found incorporated in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) virions [58]. GAPDH binds actin filaments *in vitro* [59] and therefore could be incorporated in the complex with actin. Actin has been identified in virions of VACV [57] several other DNA viruses and HIV.

### Conclusions

The expression of FL highly influenced the behavior of recombinant vaccinia virus in dependence on the level of its expression. The production of FL driven by the strong synthetic promoter resulted in decreased growth of P13-E/L-FL in confluent macrophage cell line as well as in its limited multiplication *in vivo* when inoculated in mice. The specificity of the effect of high FL levels on virus multiplication was confirmed using the reversion mutant. The inhibition of *in vivo* replication was mirrored in the level of antibodies against vaccinia virus. A strong FL expression in CV1 and HeLa cells changed not only the host range of the recombinant but also the basic protein contents of virions. The major proteins - H3L and D8L - which are responsible for the virus binding to the cells, and 28 K protein that serves as a virulence factor were changed in the membrane portion of P13-E/L-FL viral particles. There also were changes in the core portion as a consequence of poorer protein processing (multiple larger, uncleaved proteins in comparison with the control virus) and the increased content of cellular proteins. The overexpression of FL also resulted in its incorporation

into the viral core of P13-E/L-FL IMV particles. In contrary to the equimolar ratio of the glycosylated to the non-glycosylated form of FL in transfected cells, the recombinant virus incorporated mainly the smaller, non-glycosylated FL. We have shown that the overexpression of the FL gene in VACV results in attenuation of the virus *in vivo*.

### Materials and methods

#### Plasmids

The pHUFLT3L plasmid containing the coding sequence of the soluble isoform of FL (ID number - U29874) was obtained from Immunex (now the part of Amgen Inc.). The plasmids pSC59-H5-FL and pSC59-E/L-FL have been described earlier [33]. The expression plasmid pBSC-FL was prepared by ligation of an EcoRI fragment of pHUFLT3L plasmid carrying the FL coding sequence with the pBSC plasmid [60] cleaved with the same enzyme. The pTK<sup>+</sup> plasmid was derived from pGS20 [61] by excision of the EcoRI fragment. The pD357 plasmid [62] containing an E.coli  $\beta$ -galactosidase gene under the control of the P7.5 promoter was used for replacement of the C23L and B29R genes by the  $\beta$ -galactosidase gene

#### Viruses

Vaccinia virus strain Praha, clone 13 [63] was used as the parental virus. Single recombinants P13-H5-FL and P13-E/L-FL were prepared by the insertion of FL gene into thymidine kinase using plasmids pSC59-H5-FL and pSC59-E/L-FL, respectively, followed by selection in medium supplemented with bromodeoxyuridine. The double recombinants P13- $\beta$ gal-H5-FL and P13- $\beta$ gal-E/L-FL were prepared by the insertion of  $\beta$ -galactosidase into the FL-expressing single recombinants using pD357 plasmid and by the selection of the virus forming stable blue plaques after three purification steps. The revertant virus P13- $\Delta$ E/L-FL was prepared using the pTK<sup>+</sup> plasmid carrying the functional thymidine kinase gene; the selection occurred in 143B cells grown in HAT supplemented E-MEM medium. Virus P13-E7 carrying the E7 early protein of HPV16 has been described earlier [64]. Virus P13- $\beta$ gal-pS2S was derived from P13-pS2S [65] using pD357 plasmid. Viruses were grown in BSC40 cells, purified by sucrose-gradient centrifugation [66] and titrated in CV-1 cells. The number of virus particles was determined from the optical density measured at 260 nm using the formula  $1 \text{ U of OD}_{260 \text{ nm}} = 1.2 \times 10^{10} \text{ viral particles/ml}$  [67]. The ratio was comparable for all the viruses used in the experiments.

#### Cell lines

CV-1 and BSC-40 African green monkey kidney cell lines were grown in Modified E-MEM medium (EPL, SEVAP-HARMA, Prague) containing bovine serum growth-

active proteins but no complete serum [68]. Human embryonic kidney 293T cells [69] kindly provided by J.A. Kleinschmidt, DKFZ, Heidelberg, Germany, human HeLa cell line and J774.G8 mouse macrophage cell line were grown in DMEM (PAA Laboratories, Linz, Austria) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories). The cell lines MOLM9 and 32D were grown in RPMI-1640 medium (Sigma, Saint Louis, MO) supplemented with 10% FBS. The 143B cell line was maintained in E-MEM medium (SEVAPHARMA, Prague) supplemented with 10% FBS. Each medium contained 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin.

#### Mice

Six-week-old C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) female mice were obtained from Charles River, Germany. Animals were maintained under standard conditions at the National Institute of Public Health (Prague). The experiments were performed in compliance with Acts Nos. 246/92 and 77/2004 on animal protection against cruelty and Decree No. 311/97 of the Ministry of Health of the Czech Republic, on the care and use of experimental animals. Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 0.5 ml PBS containing sonicated suspension of sucrose-purified particles of rVACV. Mice were anesthetized with halothane (Narcotane, Léčiva, Praha) and carotid blood was collected at indicated time intervals.

#### ELISA

FL was quantified with an Flt3 ligand ELISA detection kit (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) using the capture mouse monoclonal antibody MAB608 (100 ng/well), biotinylated detection goat polyclonal antibody BAF308 (7.5 ng/well), streptavidin-HRP (1:250) or avidin-HRP (1:1000) complex, both obtained from Pharmingen (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), and TMB substrate solution for visualization of the reaction. Samples were measured by an ELISA reader at 450 nm. Standard Flt3 ligand protein (PeproTech EC Ltd, London, UK) was diluted to 500-7,5 pg/ml. Detection of VACV-specific antibodies has been described earlier [70].

#### SDS-PAGE and western blot

Infected cells or purified viral particles were extracted with denaturing, reducing sample buffer [71]. Samples were separated by SDS-PAGE in 10% or 12% gels. Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra, Amersham) and after blocking with 10% skimmed dry milk in PBS, the membrane was incubated with primary antibody BAF308 (anti-FL, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) diluted 1:500 or convalescent mouse serum (anti-VACV) diluted

1:50 - 1:100. After washing, the membrane was incubated with rabbit anti-mouse IgG horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Proteins were visualized with the ECL Plus system (Amersham).

#### Mass spectrometry and protein identification

Electrophoretic gels were stained with Coomassie blue. Selected spots on the preparative gels were excised and destained using 50% acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate, dehydrated with 200 µl of acetonitrile for 5 min at 30°C and then vacuum-dried (SpeedVac, Thermo Scientific, Waltham, Ma). Gel pieces were rehydrated and proteins were digested for 8 hours at 37°C with 30 ng/µl trypsin (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega, Madison, WI) in 25 mM ammonium bicarbonate. After digestion, peptides were extracted from gel pieces using step by step extraction with an acetonitrile gradient (15%-60% acetonitrile with 1% trifluoroacetic acid) using sonicator (Elma, Singen, Germany) cooled with ice cubes. Extracted peptides were concentrated in SpeedVac. MALDI mass spectrometry (MALDI/MS) peptide mass fingerprint analysis was used to characterize the digests. The MALDI/MS was performed in a Reflex IV MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker). Data were processed by proteomic software Mascot.

#### Beta-galactosidase assay

Beta-galactosidase activity was determined according to Miller [72]. The samples of infected cells were frozen and thawed and then centrifuged to remove cellular debris. Beta-galactosidase activity of cell extracts was measured by a colorimetric assay using *o*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG). The absorbance of samples was determined at 450 nm.

#### Virus neutralization

Sonicated, sucrose purified virus particles were incubated in a minimal volume of PBS, with 0.5 µg of rabbit polyclonal antibody against FL (MBL, Woburn, MA) or with rabbit and mouse anti-VACV serum or negative serum. After a 1-hour-incubation at 37°C, the viruses were used for the infection of confluent cell layers or for the preparation of electron-microscopy samples.

#### Electron microscopy

Metal grids were freshly coated with a Formvar (polyvinylformal, Serva) membrane. Five to ten µl of viral suspension (sonicated or antibody-treated) were absorbed to the grid for 10 min and then washed twice with water and twice with 1% phosphotungstic acid, pH 9.0, each time for 1 min. The samples were observed by transmission electron microscope JEM1011 (JEOL, Tokyo, Japan) at indicated magnifications.

### Fluorescent microscopy

The cell monolayer grown on a round glass plate was infected with virus at a MOI of 2 at 37°C for 30 minutes. The inoculum was then removed and cells were cultivated in DMEM. At time intervals not longer than 12 hours post infection (h.p.i.), the cells were washed with cold PBS, fixed for 10 minutes in 4% paraformaldehyde (PA) and permeabilized for 10 minutes in 2% PA with 1% Triton-X100. The remaining PA was neutralized by incubation of samples with 0.1 M glycine in PBS for 10 minutes. After blocking in 10% skimmed dry milk in PBS for 30 minutes, samples were incubated with anti-FL MAB608 (diluted 1:500) and with anti-GM130 or with anti-calreticulin (both diluted 1:100; Santa Cruz Biotechnology) in 5% dry milk in PBS for 30 minutes, washed five times (PBS, 0.2% Tween 20) and incubated with secondary antibody against mouse IgG labeled with Alexa fluor 488 and/or with antibody against rabbit IgG labeled with Alexa fluor 546 (Invitrogen, USA), diluted 1:500 in 5% dry milk in PBS for 30 minutes and counterstained with 1 µg/ml propidium iodide or DAPI (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany). The washed plates were observed by Nikon E600 fluorescence microscope for green, red and blue signals at a magnification of 1000x.

### Fractionation of viral proteins

Virion samples containing equal amounts of proteins (determined by the Bradford protein assay, BioRad) were incubated in 50 mM Tris-buffer with 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.5, at 37°C for 30 minutes and subsequently supplemented with detergents for solubilization of two membrane and two core fractions (soluble lipid envelope fraction "M1", protein-matrix-like "M2", soluble core "C1" and DNA-core fraction "C2") [47]. As the supplements for the membrane and core fractions, 1% NP-40 or 1% NP-40 plus 50 mM DTT and 0.5%DOC plus 0.1% SDS or Laemmli buffer were used, respectively. Each fraction was separated from insoluble proteins by centrifugation at 13000 g for 10 min.

### Quantitative PCR (Q-PCR)

Mice were anaesthetized with halothane (Narcotan, Léčiva, Praha) and sacrificed. The ovaries were dissected, washed in PBS and homogenized. DNA was extracted using DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Real-time quantitative PCR was performed as described previously [33].

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

KZ participated in the design of the study, performed most of the experiments and drafted the manuscript. PH prepared the sucrose purified virus. JK carried out the quantitative PCR. LK performed ELISA for detection of anti-vaccinia antibodies and provided valuable background for manipulation with vaccinia virus, cell cultures and mice. MS carried out MALDI. SN conceived of the study,

participated in its design and coordination and helped in elaboration of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We would like to thank Dr. A. Patel for the generous gift of the plasmid pD357. This work was supported by grants NR 9238-3/2007, NS 10660-3/2009 and MZ0JHKT2005 of the Ministry of Health of the Czech Republic.

### Author Details

<sup>1</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Experimental Virology, U Nemocnice 1, CZ-128 20 Prague 2, Czech Republic and <sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo nám. 2, CZ-160 00 Prague 6, Czech Republic

Received: 9 March 2010 Accepted: 26 May 2010

Published: 26 May 2010

### References

1. Mackett M, Smith GL: **Vaccinia Virus Expression Vectors**. *J Gen Virol* 1986, **67**:2067-2082.
2. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR: **A Receptor Tyrosine Kinase Specific to Hematopoietic Stem and Progenitor Cell-Enriched Populations**. *Cell* 1991, **65**:1143-1152.
3. McKenna HJ, de Vries P, Brasel K, Lyman SD, Williams DE: **Effect of Flt3 Ligand on the Ex Vivo Expansion of Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells**. *Blood* 1995, **86**:3413-3420.
4. Lyman SD, James L, Vanden Bos T, de Vries P, Brasel K, Gliniak B, Hollingsworth LT, Picha KS, McKenna HJ, Splett RR: **Molecular Cloning of a Ligand for the Flt3/Flk-2 Tyrosine Kinase Receptor: A Proliferative Factor for Primitive Hematopoietic Cells**. *Cell* 1993, **75**:1157-1167.
5. Hudak S, Hunte B, Culpepper J, Menon S, Hannum C, Thompson-Snipes L, Rennick D: **FLT3/FLK2 Ligand Promotes the Growth of Murine Stem Cells and the Expansion of Colony-Forming Cells and Spleen Colony-Forming Units**. *Blood* 1995, **85**:2747-2755.
6. Zeigler FC, Bennett BD, Jordan CT, Spencer SD, Baumhueter S, Carroll KJ, Hooley J, Bauer K, Matthews W: **Cellular and Molecular Characterization of the Role of the Flk-2/Flt-3 Receptor Tyrosine Kinase in Hematopoietic Stem Cells**. *Blood* 1994, **84**:2422-2430.
7. Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE: **The FLT3 Ligand Is a Direct and Potent Stimulator of the Growth of Primitive and Committed Human CD34+ Bone Marrow Progenitor Cells in Vitro**. *Blood* 1996, **87**:1317-1325.
8. Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM: **Flt3 Ligand Induces Proliferation of Quiescent Human Bone Marrow CD34+**. *Blood* 1996, **87**:3563-3570.
9. Solanilla A, Grosset C, Duchez P, Legembre P, Pitard V, Dupouy M, Belloc F, Viillard JF, Reiffers J, Boiron JM, Coulombel L, Ripoché J: **Flt3-Ligand Induces Adhesion of Haematopoietic Progenitor Cells Via a Very Late Antigen (VLA)-4- and VLA-5-Dependent Mechanism**. *Br J Haematol* 2003, **120**:782-786.
10. Brasel K, McKenna HJ, Morrissey PJ, Charrier K, Morris AE, Lee CC, Williams DE, Lyman SD: **Hematologic Effects of Flt3 Ligand in Vivo in Mice**. *Blood* 1996, **88**:2004-2012.
11. Antonysamy MA, Thomson AW: **Flt3 Ligand (FL) and Its Influence on Immune Reactivity**. *Cytokine* 2000, **12**:87-100.
12. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De ST, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ: **Mice Lacking Flt3 Ligand Have Deficient Hematopoiesis Affecting Hematopoietic Progenitor Cells, Dendritic Cells, and Natural Killer Cells**. *Blood* 2000, **95**:3489-3497.
13. Dravid G, Rao SG: **Ex Vivo Expansion of Stem Cells From Umbilical Cord Blood: Expression of Cell Adhesion Molecules**. *Stem Cells* 2002, **20**:183-189.
14. Muench MO, Humeau L, Paek B, Ohkubo T, Lanier LL, Albanese CT, Barcena A: **Differential Effects of Interleukin-3, Interleukin-7, Interleukin 15, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in the Generation of Natural Killer and B Cells From Primitive Human Fetal Liver Progenitors**. *Exp Hematol* 2000, **28**:961-973.
15. Hannum C, Culpepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Bazan JF, Kastelein R, Hudak S, Wagner J, Mattson J: **Ligand for FLT3/FLK2 Receptor**

- Tyrosine Kinase Regulates Growth of Haematopoietic Stem Cells and Is Encoded by Variant RNAs. *Nature* 1994, **368**:643-648.
16. Lyman SD, James L, Zappone J, Sleath PR, Beckmann MP, Bird T: Characterization of the Protein Encoded by the Flt3 (Flk2) Receptor-Like Tyrosine Kinase Gene. *Oncogene* 1993, **8**:815-822.
  17. Puleniran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR: Distinct Dendritic Cell Subsets Differentially Regulate the Class of Immune Response in Vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:1036-1041.
  18. Mach N, Gillissen S, Wilson SB, Sheehan C, Mihm M, Dranoff G: Differences in Dendritic Cells Stimulated in Vivo by Tumors Engineered to Secrete Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor or Flt3-Ligand. *Cancer Res* 2000, **60**:3239-3246.
  19. Peron JM, Esche C, Subbotin VM, Maliszewski C, Lotze MT, Shurin MR: FLT3-Ligand Administration Inhibits Liver Metastases: Role of NK Cells. *J Immunol* 1998, **161**:6164-6170.
  20. Favre Felix N, Martin M, Maraskovsky E, Fromentin A, Moutet M, Solary E, Martin F, Bonnotte B: Flt3 Ligand Lessens the Growth of Tumors Obtained After Colon Cancer Cell Injection in Rats but Does Not Restore Tumor-Suppressed Dendritic Cell Function. *Int J Cancer* 2000, **86**:827-834.
  21. Lyman SD, Brasel K, Rousseau AM, Williams DE: The Flt3 Ligand: a Hematopoietic Stem Cell Factor Whose Activities Are Distinct From Steel Factor. *Stem Cells* 1994, **12**(Suppl 1):99-107.
  22. Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Escobar SS, Downey H, Splett RR, Beckmann MP, McKenna HJ: Cloning of the Human Homologue of the Murine Flt3 Ligand: a Growth Factor for Early Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood* 1994, **83**:2795-2801.
  23. Lyman SD, James L, Escobar S, Downey H, de Vries P, Brasel K, Stocking K, Beckmann MP, Copeland NG, Cleveland LS: Identification of Soluble and Membrane-Bound Isoforms of the Murine Flt3 Ligand Generated by Alternative Splicing of MRNAs. *Oncogene* 1995, **10**:149-157.
  24. McClanahan T, Culppepper J, Campbell D, Wagner J, Franz-Bacon K, Mattson J, Tsai S, Luh J, Guimaraes MJ, Mattei MG, Rosnet O, Birnbaum D, Hannun CH: Biochemical and Genetic Characterization of Multiple Splice Variants of the Flt3 Ligand. *Blood* 1996, **88**:3371-3382.
  25. Savvides SN, Boone T, Andrew KP: Flt3 Ligand Structure and Unexpected Commonalities of Helical Bundles and Cystine Knots. *Nat Struct Biol* 2000, **7**:486-491.
  26. Lu CM, Yu JF, Huang WD, Zhou X, Zhang WY, Xi H, Zhang XG: Increasing Bioactivity of Flt3 Ligand by Fusing Two Identical Soluble Domains. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2002, **34**:697-702.
  27. Rozwarski DA, Gronenborn AM, Clore GM, Bazan JF, Bohm A, Wlodawer A, Hatada M, Karplus PA: Structural Comparisons Among the Short-Chain Helical Cytokines. *Structure* 1994, **2**:159-173.
  28. Lyman SD, Stocking K, Davison B, Fletcher F, Johnson L, Escobar S: Structural Analysis of Human and Murine Flt3 Ligand Genomic Loci. *Oncogene* 1995, **11**:1165-1172.
  29. Taddie JA, Traktman P: Genetic Characterization of the Vaccinia Virus DNA Polymerase: Cytosine Arabinoside Resistance Requires a Variable Lesion Conferring Phosphonoacetate Resistance in Conjunction With an Invariant Mutation Localized to the 3'-5' Exonuclease Domain. *J Virol* 1993, **67**:4323-4336.
  30. Solheim JC, Reber AJ, Ashour AE, Robinson S, Futakuchi M, Kurz SG, Hood K, Fields RR, Shafer LR, Cornell D, Sutjipto S, Zurawski S, LaFace DM, Singh RK, Talmadge JE: Spleen but Not Tumor Infiltration by Dendritic and T Cells Is Increased by Intravenous Adenovirus-Flt3 Ligand Injection. *Cancer Gene Ther* 2007, **14**:364-371.
  31. Rosel JL, Earl PL, Weir JP, Moss B: Conserved TAAATG Sequence at the Transcriptional and Translational Initiation Sites of Vaccinia Virus Late Genes Deduced by Structural and Functional Analysis of the HindIII H Genome Fragment. *J Virol* 1986, **60**:436-449.
  32. Chakrabarti S, Sisler JR, Moss B: Compact, Synthetic, Vaccinia Virus Early/Late Promoter for Protein Expression. *Biotechniques* 1997, **23**:1094-1097.
  33. Zurkova K, Babiarova K, Hainz P, Krystofova J, Kutinova L, Otahal P, Nemeckova S: The Expression of the Soluble Isoform of HFlt3 Ligand by Recombinant Vaccinia Virus Enhances Immunogenicity of the Vector. *Oncol Rep* 2009, **21**:1335-1343.
  34. Coupur BE, Oke PG, Andrew ME: Insertion Sites for Recombinant Vaccinia Virus Construction: Effects on Expression of a Foreign Protein. *J Gen Virol* 2000, **81**(Pt 2):431-439. 81 Pt 2:431-439
  35. Flexner C, Hugin A, Moss B: Prevention of Vaccinia Virus Infection in Immunodeficient Mice by Vector-Directed IL-2 Expression. *Nature* 1987, **330**:259-262.
  36. Nemeckova S, Sroller V, Hainz P, Krystofova J, Smahel M, Kutinova L: Experimental Therapy of HPV16 Induced Tumors With IL12 Expressed by Recombinant Vaccinia Virus in Mice. *Int J Mol Med* 2003, **12**:789-796.
  37. Perera LP, Goldman CK, Waldmann TA: Comparative Assessment of Virulence of Recombinant Vaccinia Viruses Expressing IL-2 and IL-15 in Immunodeficient Mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:5146-5151.
  38. Natuk RJ, Holowczak JA: Vaccinia Virus Proteins on the Plasma Membrane of Infected Cells. III. Infection of Peritoneal Macrophages. *Virology* 1985, **147**:354-372.
  39. McLaren C, Cheng H, Spicer DL, Tompkins WA: Lymphocyte and Macrophage Responses After Vaccinia Virus Infections. *Infect Immun* 1976, **14**:1014-1021.
  40. Drillien R, Spehner D, Bohbot A, Hanau D: Vaccinia Virus-Related Events and Phenotypic Changes After Infection of Dendritic Cells Derived From Human Monocytes. *Virology* 2000, **268**:471-481.
  41. Jahrling PB, Hensley LE, Martinez MJ, Leduc JW, Rubins KH, Relman DA, Huggins JW: Exploring the Potential of Variola Virus Infection of Cynomolgus Macaques As a Model for Human Smallpox. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:15196-15200.
  42. McCraith S, Holtzman T, Moss B, Fields S: Genome-Wide Analysis of Vaccinia Virus Protein-Protein Interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(9):4879-4884.
  43. Morgan C: Vaccinia Virus Reexamined: Development and Release. *Virology* 1976, **73**:43-58.
  44. Morrison DK, Moyer RW: Detection of a Subunit of Cellular Pol II Within Highly Purified Preparations of RNA Polymerase Isolated From Rabbit Poxvirus Virions. *Cell* 1986, **44**:587-596.
  45. Bereta M, Bereta J, Park J, Medina F, Kwak H, Kaufman HL: Immune Properties of Recombinant Vaccinia Virus Encoding CD154 (CD40L) Are Determined by Expression of Virally Encoded CD40L and the Presence of CD40L Protein in Viral Particles. *Cancer Gene Ther* 2004, **11**:808-818.
  46. Franke CA, Hruby DE: Association of Non-Viral Proteins With Recombinant Vaccinia Virus Virions. *Arch Virol* 1987, **94**:347-351.
  47. Gomez CE, Esteban M: Recombinant Proteins Produced by Vaccinia Virus Vectors Can Be Incorporated Within the Virion (IMV Form) into Different Compartments. *Arch Virol* 2001, **146**:875-892.
  48. Husain M, Weisberg AS, Moss B: Sequence-Independent Targeting of Transmembrane Proteins Synthesized Within Vaccinia Virus Factories to Nascent Viral Membranes. *J Virol* 2007, **81**:2646-2655.
  49. Mercer J, Traktman P: Investigation of Structural and Functional Motifs Within the Vaccinia Virus A14 Phosphoprotein, an Essential Component of the Virus Membrane. *J Virol* 2003, **77**:8857-8871.
  50. Takahashi T, Oie M, Ichihashi Y: N-Terminal Amino Acid Sequences of Vaccinia Virus Structural Proteins. *Virology* 1994, **202**:844-852.
  51. da Fonseca FG, Wolffe EJ, Weisberg A, Moss B: Characterization of the Vaccinia Virus H3L Envelope Protein: Topology and Posttranslational Membrane Insertion Via the C-Terminal Hydrophobic Tail. *J Virol* 2000, **74**(16):7508-7517. 7508-172000
  52. da Fonseca FG, Wolffe EJ, Weisberg A, Moss B: Effects of Deletion or Stringent Repression of the H3L Envelope Gene on Vaccinia Virus Replication. *J Virol* 2000, **74**(16):7518-7528. 7518-282000
  53. Hsiao JC, Chung CS, Chang W: Vaccinia Virus Envelope D8L Protein Binds to Cell Surface Chondroitin Sulfate and Mediates the Adsorption of Intracellular Mature Virions to Cells. *J Virol* 1999, **73**:8750-8761.
  54. Niles EG, Seto J: Vaccinia Virus Gene D8 Encodes a Virion Transmembrane Protein. *J Virol* 1988, **62**:3772-3778.
  55. Weir JP, Moss B: Use of a Bacterial Expression Vector to Identify the Gene Encoding a Major Core Protein of Vaccinia Virus. *J Virol* 1985, **56**:534-540.
  56. Wilcock D, Smith GL: Vaccinia Virions Lacking Core Protein VP8 Are Deficient in Early Transcription. *J Virol* 1996, **70**:934-943.
  57. Chung CS, Chen CH, Ho MY, Huang CY, Liao CL, Chang W: Vaccinia Virus Proteome: Identification of Proteins in Vaccinia Virus Intracellular Mature Virion Particles. *J Virol* 2006, **80**:2127-2140.
  58. Ott DE, Coren LV, Chertova FN, Gagliardi TD, Schubert U: Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* 2000, **278**:111-121.
  59. Mejean C, Paris F, Beryamin Y, Roustan C: Antigenic Probes Locate Binding Sites for the Glycolytic Enzymes Glyceraldehyde-3-Phosphate

- Dehydrogenase, Aldolase and Phosphofructokinase on the Actin Monomer in Microfilaments. *Biochem J* 1989, **264**:671-677.
60. Smahel M, Sima P, Ludvikova V, Vonka V: **Modified HPV16 E7 Genes As DNA Vaccine Against E7-Containing Oncogenic Cells.** *Virology* 2001, **281**:231-238.
  61. Mackett M, Smith GL, Moss B: **General Method for Production and Selection of Infectious Vaccinia Virus Recombinants Expressing Foreign Genes.** *J Virol* 1984, **49**:857-864.
  62. Patel AH, Gaffney DF, Subak-Sharpe JH, Stow ND: **DNA Sequence of the Gene Encoding a Major Secreted Protein of Vaccinia Virus, Strain Lister.** *J Gen Virol* 1990, **71** (Pt 9):2013-2021.
  63. Kutinova L, Nemeckova S, Ludvikova V, Kunke D, Otavova M, Vonka V: **Některé Problémy Vyvoje Vakcin Zalozenych Na Rekombinantnim Viru Vakcinie. [Problems Associated With the Development of Vaccines Based on Recombinant Vaccinia Virus].** *Cas Lek Cesk* 1992, **131**:770-773.
  64. Nemeckova S, Stranska R, Subrtova J, Kutinova L, Otahal P, Hainz P, Maresova L, Sroller V, Hamsikova E, Vonka V: **Immune Response to E7 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Anchored on the Cell Surface.** *Cancer Immunol Immunother* 2002, **51**:111-119.
  65. Kutinova L, Ludvikova V, Simonova V, Otavova M, Krystofova J, Hainz P, Press M, Kunke D, Vonka V: **Search for Optimal Parent for Recombinant Vaccinia Virus Vaccines. Study of Three Vaccinia Virus Vaccinal Strains and Several Virus Lines Derived From Them.** *Vaccine* 1995, **13**:487-493.
  66. Joklik WK: **The Purification of Four Strains of Poxvirus.** *Virology* 1967, **18**:9-18.
  67. Castro AP, Carvalho TM, Moussatche N, Damaso CR: **Redistribution of Cyclophilin A to Viral Factories During Vaccinia Virus Infection and Its Incorporation into Mature Particles.** *J Virol* 2003, **77**:9052-9068.
  68. Michl J: **Metabolism of Cells in Tissue Culture in Vitro. I. The Influence of Serum Protein Fractions on the Growth of Normal and Neoplastic Cells.** *Exp Cell Res* 1961, **23**:324-334.
  69. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP: **Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System.** *Mol Cell Biol* 1987, **7**:379-387.
  70. Hamsikova E, Zavadova H, Kutinova L, Ludvikova V, Krcinak V, Nemeckova S, Vonka V: **Priming Effect of Recombinant Vaccinia Virus Coding for the Middle Hepatitis B Surface Antigen.** *Arch Virol* 1990, **113**:283-289.
  71. Laemmli UK: **Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
  72. Zubay G, Morse DE, Schrenk WJ, Miller JH: **Detection and Isolation of the Repressor Protein for the Tryptophan Operon of Escherichia Coli.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1972, **69**:1100-1103.
  73. Yang WP, Kao SY, Bauer WR: **Biosynthesis and Post-Translational Cleavage of Vaccinia Virus Structural Protein VP8.** *Virology* 1988, **167**:585-590.
  74. Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E: **The Complete DNA Sequence of Vaccinia Virus.** *Virology* 1990, **179**:247-66.

doi: 10.1186/1743-422X-7-109

Cite this article as: Zurkova et al.: Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand *Virology Journal* 2010, **7**:109

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 4 DISKUSE

### 4.1 BUŇKY TC-1 JAKO NÁDOROVÝ MODEL

Existují tři hlavní mechanismy, jak mohou infekční agens způsobit vznik rakoviny. První možností je persistentní infekce buněk vyvolávající chronický zánět. Ten může zapříčinit zvýšenou hladinu reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů produkovaných makrofágy v místě infekce. Radikály pak způsobují poškození membrán, proteinů i genetického materiálu, čímž přispívají ke karcinogenezi. Infikované buňky jsou opakovaně poškozovány a hromadí se genetické mutace, které mohou představovat počáteční fáze nádorového bujení. Druhý mechanismus vzniku nádoru je dán přímým přispěním infekčního agens k transformaci buněk díky aktivaci buněčných onkogenů, nebo inaktivaci tumor supresorových genů; příkladem jsou papilomaviry a jejich časné proteiny. Třetí možností je ovládnutí imunitního systému, jak to dělá např. HIV - imunosuprese či snížená schopnost rozpoznání infikovaných či transformovaných buněk vedou opět k možnosti vzniku nádoru. Rozpoznání příčin vzniku jednotlivých typů nádorů nám dává do rukou nástroj, jak úspěšně předcházet vzniku rakoviny.

U papilomavirů je jen část zástupců spojena s nádorových bujením; v případě karcinomu děložního čípku se jedná především o HPV16 a HPV18. Hlavními proteiny zodpovědnými za transformaci/imortalizaci buněk jsou E6 a E7. Proto jsou také často vyhledávaným cílem pro vývoj terapeutických vakcín proti papilomavirům. E7 protein sám o sobě může transformovat buňky a aktivuje v nich onkogen *Ras*. Exprese genů E6 a E7 v jedné buňce může být dostačující pro imortalizaci většiny lidských primárních buněk. U nízkorizikových typů papilomavirů jsou proteiny E6 a E7 inaktivní, nebo jen slabě aktivní ve srovnání s vysokorizikovými typy virů.

Buňky TC-1 jsou odvozeny od buněk plicního epitelu myšského kmene C57BL/6. Byly získány kotransformací geny E6 a E7 z HPV16 a také aktivovaným onkogenem *H-ras* a jsou schopné vyvolat růst nádorů v syngenních myších C57BL/6. Pochází z americké laboratoře vedené Tzyy-Chou Wu, která je umístěna v medicínských ústavech Johna Hopkinse v Baltimoru. Ačkoliv nejsou TC-1 považovány za pravou nádorovou linii, používají se jako nádorový model papilomavirové infekce po dobu více než 10 let. Při jejich použití se spoléhá na vyvolání imunitní T-buněčné odpovědi proti buňkám nesoucím specifický nádorový antigen<sup>(536,537)</sup>. Buňky jsou podávány podkožně, často do zad nebo stehna. Po implantaci tvoří ohraničený podkožní útvar, který lze snadno pozorovat a měřit jeho růst v závislosti na zvolené terapeutické metodě<sup>(538)</sup>. Pro rozšíření nádorových buněk do celého těla je také možno TC-1 vstříknout do ocasní cévy<sup>(539)</sup>.

Součástí únikových mechanismů nádorů před imunitní odpovědí je snížení prezentace vlastních antigenů v komplexu MHC gp I (změny v expresi proteinů celé dráhy – MHC řetězce, b2mikroglobulin, podjednotky proteazomu, transportér TAP). Takové buňky jsou pak „neviditelné“ pro cytotoxické T lymfocyty a unikají jisté smrti. Modelem takových buněk je sublinie buněk TC-1 nazvaná TC-1/A9, kterou vytvořil v našem ústavu Dr. Šmahel<sup>(540)</sup>. Sublinie A9 byla vyizolována z myší imunizovaných proti E7 antigenu (formou E7GGG DNA vakcíny), ve kterých i přesto po čelení TC-1 buňkami vyrostly imuno-resistantní nádory. Sublinie A9 roste rychleji než rodičovské buňky, liší se také morfologií. Tato buněčná linie byla použita jako nádorový model pro léčbu za ztížených podmínek, protože je u ní inhibována přeprava antigenů z proteazomu přes TAP do váčků s MHC gp I (snížení exprese TAP), nicméně působením IFN- $\gamma$  se prezentace antigenů obnovuje<sup>(218,540)</sup>.

Specifická imunita proti HPV-16 transformovaným nádorům v myších modelech byla vyvolána u řady vakcinačních protokolů<sup>(541)</sup>, např. podáváním E7 proteinu, epitopu E7 specifického pro H-2D<sup>b</sup>, DNA vakcína kódující E7, nebo rekombinantní viry exprimující E7<sup>(542,543,544,545,546,547)</sup>. Účinná terapeutická odpověď korelovala ve většině případů s mírou indukce cytotoxických T lymfocytů specifických pro CD8 epitop – RAHYNIVTF<sup>(548)</sup>.

## 4.2 VYLEPŠENÍ VAKCINIOVÉHO VEKTORU POMOCÍ CYTOKINŮ

Vlastnosti vakcínie jakožto protinádorové vakcíny lze pro stimulaci buněčné či protilátkové imunity vylepšit pomocí vícenásobných rekombinant nesoucích jak nádorový antigen, tak i například imunostimulační agens. V našem případě byly použity rekombinanty vakcíniových kmenů Praha13 a replikačně nekompetentního kmene MVA. Kmen Praha 13 byl vyklonován ze směsné vakcíny proti pravým neštovicím používané v České republice. Je replikačně kompetentní v široké škále buněčných linií i v námi používaném kmeni myší C57BL/6, v nichž vykazuje vysokou imunogenost a zároveň nízkou virulenci<sup>(549,550)</sup>. Kmen MVA byl odvozen z kmene Ankara, který byl mnohonásobně pasážován (>500x) primárních kuřecích fibroblastech, byl také použit jako vakcína proti pravým neštovicím<sup>(551,552)</sup>. Během pasážování došlo k rozsáhlým delecím v genomu zahrnujícím i geny pro únik před imunitním systémem hostitele, což způsobilo zúžení hostitelského spektra včetně neschopnosti množit se v lidských buňkách, a to z něho dělá ideální vektor pro klinické využití i u imunosuprimovaných pacientů<sup>(553,554,555)</sup>. Virus MVA prochází celým životním cyklem například v kuřecích fibroblastech a BHK-21



křečcích buňkách, v ostatních typech je sice schopen replikovat svoji DNA, ale v pozdní fázi infekce nevytváří zralé funkční viriony <sup>(318, 553)</sup> }.

Do obou kmenů byl vložen gen pro E7 antigen v podobě fúzního konstruktů SigE7LAMP popsaného v kapitole 2.13. Pro zvýšení imunitní odpovědi proti E7 antigenu byly do genu pro virovou thymidinkinázu vloženy geny pro cytokiny mGM-CSF či hFlt3 ligand, nebo pro extracelulární část receptoru II. typu pro TGF- $\beta$  či jeho upravenou variantu fúzovanou s Fc fragmentem IgG. Přerušení genu pro thymidinkinázu zároveň zvýšilo selektivitu viru pro nádorovou tkáň. Takto lze zasáhnout do růstu nádoru na více úrovních. Jednak je stimulován celý imunitní systém uvolněním cytokinů, na druhou stranu se virus výhodněji množí v nádorové tkáni, kde po lyzi infikovaných buněk dochází k uvolnění buněčného obsahu do prostředí a tak se zvýší i množství imunostimulačních molekul v okolí nádoru.

GM-CSF má velký potenciál pro podpůrnou léčbu nádorů. Rekombinantní viry vakcínie, adeno či herpes viry obsahující lidský GM-CSF již byly použity nejen v laboratorních, ale i v klinických podmínkách <sup>(426, 414, 415, 556, 557, 272)</sup>. Výsledky preklinických a klinických studií se ale mohou lišit, protože i lidský a myší GM-CSF si nejsou úplně podobné. Myší cytokin indukuje růst granulocytárních/makrofágových (GM) kolonií, kdežto lidský cytokin má široký záběr a podporuje růst nejen GM kolonií, ale i eosinofilů, žírných buněk, megakaryocytů či směsných hematopoietických kolonií <sup>(558)</sup>. U rekombinantního adenoviru zvýšila exprese GM-CSF jeho onkolytické účinky, u atenuovaného herpesviru zpomalila růst nádoru i jeho metastáz <sup>(559, 557)</sup>. Při intratumorálním podání zvyšuje množství imunitních buněk infiltrujících do nádoru. Byl vytvořen virus vakcínie JX-594, odvozený z kmene Wyeth s delecí thymidinkinázy, který se v pacientech replikuje a je schopen napadnout nádor i metastázy díky šíření krevním oběhem. V nádorech došlo ke zvýšené infiltraci T lymfocytů a k úbytku tkáně u různých typů solidních tumorů <sup>(560, 295, 306)</sup>. Ještě lepší výsledky byly zaznamenány i při použití další vakcínie exprimující GM-CSF pojmenované JX-963 a odvozené z replikujícího se kmene WR <sup>(294, 561)</sup>. Vakcínie má sice přirozenou selektivitu pro množení v nádorech, ale ta se mnohonásobně zvyšuje (jako v případě JX-963 rekombinanty) delecí genů pro thymidinkinázu i VGF <sup>(294)</sup>.

V našem případě byl použit nereplikující se vektor MVA exprimující GM-CSF. Jeho intratumorálním podáním jsme chtěli zvýšit rekrutování imunitních buněk do nádoru a tím i jeho likvidaci touto cestou. Zároveň vektor exprimoval nádorový antigen E7 uvolňovaný ve vysoce imunogenní variantě SigE7LAMP. Účinky virové vakcíny jsme navíc podpořili kombinovaným schématem imunizace s DNA vakcínou, která sama o sobě má jen nízkou schopnost redukce nádorů. Kombinace vakcín umožnila i léčbu nádorů tvořených buňkami TC-1/A9, které jsou značně odolné vůči imunitní obraně. Kromě zpomalení růstu nádorové masy se nám podařilo

ovlivnit také nádorové mikroprostředí, jak potvrdilo histologické zpracování nádorů i jejich FACS analýza. Ačkoliv jsme měřili více povrchových markerů imunitních buněk, k signifikantnímu rozdílu došlo pouze v počtu T lymfocytů ( $CD3^+$ ). Použitím DNA vakcíny se změnila také imunogennost nádorů zvýšením povrchové exprese MHC gp I. třídy.

Podáváním proteinu FL dochází ke zpomalení růstu implantovaných nádorů u myši<sup>(562,563)</sup>. Při stimulaci proliferace za pomoci FL se u myši používá dávka 10-20  $\mu\text{g}$  na myš podávaná denně po dobu minimálně 10 dní<sup>(564,565)</sup>. Při systemickém podávání se zvyšuje počet NK, makrofágů, dendritických buněk a T lymfocytů (Maraskovsky et al, 1996; Muench et al, 2000). Při podávání nádorových buněk produkujících FL, případně FL v kombinaci s GM-CSF, se u myši vytvoří vyšší imunita proti čelenži rodičovskými buňkami (Braun et al, 1999; Kim et al, 2002; Li, 2003 15413 /id}. Jako DNA vakcína má FL adjuvantní efekt, zvyšuje  $CD8^+$  cytotoxickou odpověď proti nádorovým antigenům<sup>(566)</sup>. Na rozdíl od systemického podání FL proteinu ale nedochází u DNA vakcíny ke zvýšení počtu NK a DC buněk<sup>(567)</sup>. Podobně jako GM-CSF byl i FL použit jako rekombinantní protein produkovaný virem. Jeho exprese v adenovirech zvýšila množství  $CD11b^+$  a  $CD11c^+$  buněk v krvi a zpomalila růst nádorů<sup>(568)</sup>.

Gen pro solubilní formu FL jsme použili pro klonování do virové thymidinkinázy replikačně kompetentního viru P13. Jelikož lidský i myší protein jsou si v účincích rovnocenné a zaměnitelné, nebyl problém použít lidský gen pro pokusy v myších. Předpokládali jsme, že infekcí myší rekombinantou exprimující FL budeme nespecificky stimulovat imunitní systém myši a připravíme ho tak lépe na boj proti nádorovým buňkám. Dále jsme předpokládali, že v kombinaci s expresí E7 antigenu podpoříme specifickou cytotoxickou imunitní odpověď myši a po čelenži buňkami TC-1 dojde k pomalejšímu růstu nádorů nebo dokonce k úplnému odhojení buněk.

Na rozdíl od myši inokulovaných virem exprimujícím GM-CSF došlo po imunizaci myši dvojitými rekombinantami exprimujícími FL a E7 geny ke krátkodobému nárůstu počtu slezinných  $CD8^+$  T lymfocytů specifických pro E7 antigen, ale po dalších třech týdnech se rozdíly mezi skupinami vyrovnaly. Podobně jako GM-CSF vykazuje FL pouze přechodné úspěchy v léčbě. Předpokládá se, že jen krátkodobé pozitivní působení GM-CSF je způsobeno pozdějším vznikem supresorových buněk (MDSC) produkujících inhibiční cytokiny TGF- $\beta$  a IL-10<sup>(569)</sup>. Tyto buňky jsou schopné potlačit funkce nádorově specifických T-lymfocytů<sup>(249)</sup>. Jedná se o heterogenní skupinu částečně nediferencovaných monocytů a granulocytů charakterizovaných markery  $Gr1^+CD11b^+$ . MDSC mají na povrchu IL-4R $\alpha$  a produkují také IFN- $\gamma$  a IL-13, jejichž kooperace má za následek paradoxně snížení  $T_H1$  odpovědi a inhibici  $CD8^+$  T lymfocytů, ačkoliv ty by se interferonem naopak měly aktivovat<sup>(570)</sup>. Měřením zastoupení buněčných subpopulací v nádorech jsme zjistili, že GM-CSF v našich pokusech naštěstí nevyvolal vzestup MDSC.

Supresorová subpopulace v nádoru může vzniknout také nadměrným podáváním GM-CSF<sup>(571)</sup>. Této situaci jsme se vyhnuli pravděpodobně díky volbě vhodného vektoru, který není schopen tento cytokin v místě nádoru overexprimovat. V pokusech, kde jsme používali rekombinanty exprimující FL, jsme sice buňky infiltrující nádory nesledovali, ale analyzovali jsme zastoupení jednotlivých subpopulací ve slezinách v různých intervalech po infekci. Zjistili jsme, že rekombinanta, která se nejlépe osvědčila v prevenci růstu TC-1 nádorů a zároveň vyvolala nejvyšší krátkodobé zvýšení E7 specifických CD8<sup>+</sup> lymfocytů (P13-SigE7LAMP-H5-FL), také produkovala FL v tak výhodné intenzitě, že zabránila vzniku a rozvoji myeloidní supresorové populace Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>.

Nádorové mikroprostředí je tvořeno komplexní sítí buněčných a biochemických interakcí, kde jednu z ústředních rolí hraje cytokin TGF- $\beta$ . Je produkován jak nádorovými buňkami, tak např. i infiltrujícími supresorovými MDSC buňkami. TGF- $\beta$  aktivuje nádorové fibroblasty (CAF), které zpětně podporují expanzi nádorů a samy také produkují další TGF- $\beta$ <sup>(445,572)</sup>. Také indukuje vznik další supresorové populace buněk odvozené z infiltrujících imunitních buněk, tentokrát odvozené od T lymfocytů – T<sub>reg</sub><sup>(573,449)</sup>. Abychom zabránili strukturním změnám v nádorech, růstu jejich tkáně a oslabení imunitní odpovědi přítomnými supresorovými buňkami, zkonstruovali jsme replikující se viry P13 nesoucí v přerušném genu pro thymidinkinázu cizorodý gen pro solubilní receptor TGF- $\beta$  (P13-sT $\beta$ RII), nebo jeho variantu kódující receptor fúzovaný s Fc fragmentem IgG1 a C-koncovou částí Jun (P13-sT $\beta$ RII-Fc-Jun). Fc fragment poskytuje fúznímu proteinu dimerizační doménu, díky níž je zvýšena afinita receptoru k volnému TGF- $\beta$ <sup>(574)</sup>. Fragment Jun připojený za Fc zachovává výhodu dimerizace, ale snižuje vazbu Fc fragmentu na FcR a tím i cytotoxicitu vázanou na protilátky či komplement (Kowalczyk, osobní sdělení). Cytotoxické T lymfocyty transdukované retrovirem kódujícím dominantně negativní formu T $\beta$ RII se ukázaly být odolné vůči působení nádorového TGF- $\beta$  a vykonávaly správně svoji funkci<sup>(575)</sup>. Účelem použití našich rekombinantních virů bylo aktivovat imunitní systém odebráním nádorového TGF- $\beta$  a zároveň poskytnout dostatečně silný stimulační signál pro vytvoření protinádorové anti-E7 imunitní odpovědi, tudíž všechny viry byly zkonstruovány i jako dvojité rekombinanty nesoucí kromě receptoru také modifikovaný gen pro E7 antigen, protože již dříve bylo zjištěno, že imunitní odpověď proti nádorovým antigenům je možné zvýšit podáním DNA kódující sT $\beta$ RII<sup>(576)</sup>.

Pokusy s transdukovanými nádorovými buňkami EpRas a CT26 exprimujícími negativně dominantní verzi T $\beta$ RII (s nefunkční kinázovou doménou) ukázaly *in vivo*, že takové buňky ve srovnání s rodičovskými vykazují snížený karcinogenní potenciál, nedochází k epiteliálně-

mezenchymální tranzici a je inhibována tvorba metastáz<sup>(577)</sup>. Zkrácené solubilní receptory o menší molekulové hmotnosti sTβRII a sTβRII-Fc-Jun již byly také vyzkoušeny v pokusech ověřujících jejich vliv na inhibici růstu nádorů. Retrovirem nesoucím gen pro sTβRII transdukované nádorové buňky EL4 (thymom) bylo dosaženo systemické neutralizace TGFβ a *in vivo* došlo k obnovení cytotoxických funkcí nádorově specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, pro které je důležitá produkce perforinu, granzymu A/B či IFN-γ<sup>(578,447)</sup>. Blokováním TGF-β pomocí solubilního receptoru je možné vyvolat odpověď proti malignímu mesoteliomu vykonávanou taktéž CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, vzrostl jejich počet ve slezinách myši s nádory<sup>(579)</sup>. Chimerický receptor TβRII-Fc účinně neutralizuje profibrogenní účinky TGF-β u cirhózy jater a hepatocelulárního karcinomu<sup>(580)</sup>. Byl použit i při experimentální léčbě nádorů prsu (buňky 4T1, MCF7 a EMT6), přerušil autokrinní stimulační signalizaci TGF-β, snížil jejich proliferaci a zvýšil tak apoptózu nádorových buněk<sup>(441,581)</sup>. Jeho exprese v MCF-7 buňkách nádoru prsu snižuje i tvorbu metastáz<sup>(234)</sup>. V kombinaci s chemoterapií zabraňuje TβRII-Fc růstu buněk karcinomu štítné žlázy KAT-4<sup>(582)</sup>. U nádorů způsobených papilomaviry je známo, že E6/E7 antigeny způsobují pokles exprese receptorů pro TGF-β, čímž těmto buňkám zajišťují odolnost vůči jeho inhibičním účinkům, narozdíl od infiltrujících imunitních buněk<sup>(583)</sup>. V léčbě TC-1 nádorů pomocí rekombinantního adenoviru exprimujícího E7 antigen bylo dosaženo inhibice růstu karcinomu zvýšením množství aktivovaných CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (CD25<sup>+</sup>) ve slezinách i v nádorové tkáni při kombinaci vakcíny s orálním podáním SM16 (inhibitor TGF-β receptorové tyrosin kinázy), nebo s intraperitoneální aplikací proteinu TβRII-Fc<sup>(584)</sup>. Receptor zde byl podáván každý třetí den po aplikaci virové vakcíny v množství 1mg/kg. V našem případě jsme virovou vakcínu rovnou upravili k expresi E7 antigenu i chimerického nebo rozpustného receptoru, u obou typů rekombinant jsme prokázali schopnost receptoru vázat TGF-β *in vitro*. Množství receptoru vyprodukovaného virem však nebylo přesně stanoveno. Samotné podání rekombinantní vakcínie nezvýšilo množství antigen-specifických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů ve slezinách. Později při terapii TC-1 nádorů virovou vakcínou sice došlo k redukci nádorové tkáně, ale k našemu překvapení jsme lepších výsledků dosáhli aplikací viru exprimujícího sTβRII než více afinitního sTβRII-Fc-Jun. Stanovovali jsme také množství T<sub>reg</sub> ve slezinách, ale nenašli jsme jejich významné snížení ve srovnání s kontrolními skupinami (nepublikované výsledky).

### 4.3 ATENUACE VAKCÍNIE EXPRIMUJÍCÍ FL

Zkonstruovali jsme replikující se viry P13 exprimující solubilní isoformu lidského Flt3 ligandu (FL). Exprese FL byla řízena slabým časným H5 promotorem, nebo silným syntetickým časně/pozdním E/L promotorem. Předpokládali jsme, že většina našeho rekombinantního proteinu bude směřována ven z infikovaných buněk a že při využití virů pro účely nádorové terapie bude FL podporovat činnost imunitního systému. Při silné expresi řízené E/L promotorem jsme však zjistili, že překvapivě velké množství proteinu zůstává také uvnitř buněk a uvolňuje se teprve po jejich lyzi v konečné fázi infekce stejně jako větší část samotných maturovaných virionů. Tento „nadbytečný“ FL se dostává do partikulí hned v raných fázích morfogeneze, jak ukázala frakcionace virionů, při které jsme FL detekovali ve virovém jádře. Bylo již několikrát prokázáno, že do partikulí mohou být vloženy jak buněčné proteiny (převážně do membrán IEV), tak i cizorodý gen exprimovaný vakcíní a to do jaderné i membránové části virionu <sup>(72,585,586,587,588)</sup>. V jaderné oblasti viru se nenachází žádné virové proteiny, které by byly glykosylované, protože glykosylované proteiny jsou až součástí IEV membrán <sup>(86)</sup>. Tomu odpovídala i nízká míra glykosylace FL proteinu, který ještě neprošel pozdějším procesem glykosylace v Golgiho aparátu. Dosud se přesně nezjistilo, jakým mechanismem dochází ke směřování proteinů do virových „factories“ <sup>(589)</sup>. U proteinů virového jádra je možné, že za lokalizaci může N-koncová sekvence spíše než terciární struktura celého proteinu <sup>(78,590)</sup>. Srovnáním sekvencí hlavních proteinů virového jádra (4a, 4b, 25K) s FL jsme nezjistili žádnou významnou shodu. Protein FL je strukturně podobný interleukinu 4. V naší laboratoři jsme sice rekombinanty exprimující IL-4 měli, ale z bezpečnostních důvodů (vysoká patogenita díky posunu k T<sub>H</sub>2 odpovědi) byly tyto viry bohužel zničeny dříve, než jsme mohli zjistit, zda se IL-4 náhodou také neinkorporuje do virionů. Pak by bylo jasné, zda se jedná o náhodnou inkorporaci, nebo o sekvenční závislost.

Zjistili jsme také, že virus P13-E/L-FL není schopen se pomnožit *in vitro* v makrofázích a *in vivo* v myších ováriích. Taková pozorování atenuace virů exprimujících cytokiny již také byla pozorována. Jelikož rekombinantní viry produkovaly IL-2, IL-12 nebo IL-15, jednalo se spíše o atenuaci způsobenou zvýšenou T<sub>H</sub>1 imunitní odpovědí proti viru <sup>(591,351,592)</sup>. Jelikož jsme již věděli, že se FL stává součástí virionů P13-E/L-FL, zkoumali jsme jeho vliv na biochemické složení partikulí. V membránách vakcínie se nachází dva hlavní proteiny zodpovědné za vazbu viru na buňky – H3 a D8 – vázající heparansulfát a chondroitinsulfát. Protein H3 byl v membránové frakci nalezen ve dvou velikostech (37 a 34kDa), molekula o nižší hmotnosti vzniká proteolytickým sestřihem při maturaci virionů <sup>(77,593,23)</sup>. Ve virionech kontrolních virů jsme našli H3 o velikosti okolo 30kDa podobně jako Lin et al, 2000 <sup>(23)</sup>. P13-E/L-FL chybí H3

o nižší hmotnosti, nicméně význam výskytu obou velikostí ve virionech není známý stejně jako jejich vliv na infekčnost. Nepřítomnost H3 proteinu zpomaluje tvorbu IMV, následně i CEV a syncytií, ale neovlivňuje inkorporaci dalších membránových proteinů, jako jsou D8, A27 a L1<sup>(594)</sup>. Z tohoto důvodu jsme předpokládali, že - ač přítomen v jiné isoformě - změna H3 nebude mít na infekčnost viru velký vliv. Predikovaná velikost proteinu D8 je 35kDa, v normálních virionech nachází v oblasti kolem 32kDa. D8 není pro růst vakcínie *in vitro* esenciální. Velká část jeho molekuly (85%) je vystavena vně virové membrány<sup>(595,22)</sup>. U kontrolních virů byly nalezeny obě velikosti D8, u viru P13-E/L-FL byl D8 protein přítomen pouze ve vyšší molekulové hmotnosti. Může být zahrnut do složitějších struktur virionu, jelikož je schopen tvořit disulfidické vazby s dalšími virovými proteiny<sup>(596)</sup>. Flt3 ligand ve své molekule také obsahuje disulfidické vazby, které mu umožňují složení do nativní konformace; ve virionu je FL pevně vázán až ve spodnějších jaderných vrstvách. Nicméně v některých vzorcích frakcionovaných virionů se nám podařilo detekovat velmi slabý signál FL i ve druhé membránové frakci, která je rozvolňovaná směsí obsahující dithiothreitol, který účinkuje jako redukční agens, což by hovořilo ve prospěch S-S vazby FL s virovými proteiny. Náhodná detekce FL však mohla být výsledkem kontaminací virionů buněčnými membránami při přípravě přečištěných preparátů, nebo nedokonalým oddělením frakcí při rozvolňování virionů. Neutralizaci infekčnosti viru P13-E/L-FL jsme byli schopni vyvolat protilátkou proti FL, která viriony shlukla k sobě a znemožnila tím infekci buněk. Pro tento výsledek jsou zde tedy dvě možnosti vysvětlení. Jednak může být FL zakotven ve virovém jádře a část jeho molekuly by mohla procházet membránou a poskytovat tak neutralizační epitop pro protilátku. Námi používaný FL je ale solubilní molekula bez transmembránové domény, čili je otázka, která část jeho molekuly může projít membránou. Další možností je, že i minimální (většinou nedetekovatelný) obsah membránově vázaného FL (vazba s D8 vně membrány?) mohl být dostačující pro neutralizaci P13-E/L-FL. V tom případě by ale bylo správné předpokládat, že by mohlo dojít k neutralizaci také u P13-H5-FL viru, který jinak nevykazoval změny oproti kontrolnímu viru. Ovšem u P13-H5-FL jsme dosáhli po inkubaci s protilátkou proti FL pouze nepatrné změny infekčnosti. Správnou odpověď na otázku přesné lokalizace FL ve virionu by nám pravděpodobně poskytla kryo-imunoelektronová mikroskopie, kterou jsme bohužel neměli možnost provést<sup>(72)</sup>.

Hlavní proteiny virového jádra jsou 4a, 4b a 25K (geny A10L, A3L a L4R) a tvoří asi 33% celkové hmoty virionu. Jsou produkovány jako vysokomolekulární prekurzory (97, 65 a 28kDa) a jejich štěpení v sekvenci Ala-Gly-X je esenciální pro tvorbu infekčních virionů; funkční proteiny jsou velké 62, 60 a 25kDa<sup>(597,598,599,600,590)</sup>. V našem případě je změna proteinového složení virového jádra patrná již v obsahu zralých forem 4a a 4b proteinů – u kontrolních virů tvoří na

SDS-PAGE jasné oddělené proužky o vysoké koncentraci, ale u P13-E/L-FL se jejich proužky ztrácí v záplavě dalších proteinů. Protože u kontrolních virů je oblast nad 60kDa poměrně chudá na přítomnost proteinů, zatímco u P13-E/L-FL je zde stále silně barvená část, nabízí se otázka, zda změny v proteinovém složení mohou být dané chybným proteolytickým štěpením při zrání virionů. Všechny virem řízené proteolytické procesy, kterým podléhají vakcíniové proteiny, se týkají tvorby IMV partikulí. Vakcíniové proteiny „zrají“ různými posttranslačními modifikacemi, jako jsou myristylace, acylace, fosforylace, glykosylace, ADP-ribosylace a proteolytické štěpení<sup>(590)</sup>. Proteolýza některých membránových proteinů (např. hemaglutinin), které jsou součástí IEV/EEV, provádí buněčné enzymy až při transportu z ER do plasmatické membrány<sup>(601)</sup>. Hlavní virové proteiny jsou však štěpeny během morfogeneze virionů vlastními virovými proteázami, G1 a I7, které jsou pak i součástí zralých virionů<sup>(602,603)</sup>. I7 proteáza je důležitější než G1, při zablokování její funkce dochází k zastavení štěpení tří hlavních jaderných proteinů a tím i bloku morfogeneze virionů<sup>(604)</sup>. Přítomnost proteáz ve virionech jsme nestanovovali. V imunoblotech sice chybí u viru P13-E/L-FL v jaderných frakcích dva proteiny detekované myším polyklonálním anti-vakcíniovým sérem, které by velikostí (68 a 49kDa) mohly odpovídat virovým proteázám, ale za našich podmínek pro MALDI analýzu (barvení Coomassie blue) jsme v oblasti jejich velikostí byli schopni rozpoznat pouze změny v obsahu jiných proteinů. Nicméně na první pohled bylo z našich výsledků patrné, že u P13-E/L-FL došlo v jaderné frakci k velkým změnám v proteinovém složení. Podle imunoblotu chybí několik proteinů, nebo jsou, jak ukázalo i barvení SDS-PAGE Coomassie blue, nesprávné velikosti a pravděpodobně tedy nedostatečně posttranslačně modifikované. Tubulin, podobně jako mnoho dalších buněčných proteinů, bývá součástí IMV partikulí, jak je vidět v tabulce č. 5 v literárním úvodu, a byl ve vyšší koncentraci než u kontrol nalezen v partikulích P13-E/L-FL. Dalším buněčným proteinem, který se v P13-E/L-FL vyskytnul ve zvýšené míře, byl GAPDH. Ten sice nebyl detekován jako součást IMV<sup>(74)</sup>, ale jedná se o běžný buněčný enzym, který je schopen se vázat i na aktinová vlákna<sup>(605)</sup>. Ta ovšem již jsou součástí IMV, do P13-E/L-FL se tedy GAPDH dostal pravděpodobně náhodně spolu s aktinem.

V souvislosti se změnami v hlavních membránových proteinech jsme zjistili, že nedocházelo *in vitro* ke změnám v infekčnosti viru P13-E/L-FL ve srovnání s kontrolami. Testovali jsme tedy, v jaké fázi infekce je množení viru v některých typech buněk inhibováno. Rozborem jednotlivých fází infekce pomocí RT-PCR a imunoblotů jsme zjistili, že k inhibici množení P13-E/L-FL dochází až na úrovni exprese pozdních proteinů. K transkripci pozdních mRNA sice dochází, ale jejich translace je silně potlačena, takže vzniká ve srovnání s neinhibovaným virem P13-H5-FL jen zlomek dceřiných virionů. Vyloučili jsme možnost

zvýšeného vyvolání apoptózy virem P13-E/L-FL, jelikož pozitivita na časné i pozdní markery buněčné smrti (annexin a štěpení PARP) byly srovnatelné či dokonce nižší než u kontrolních virů. Proč přesně tedy dochází k inhibici pozdní translace a k tak zásadním změnám v proteinovém složení partikulí P13-E/L-FL, jsme z molekulárního hlediska nezjistili.

Při příležitosti sledování pohybu FL v infikované buňce jsme také objevili nový buněčný protein (jejich přehled viz literární úvod), který mění svoji lokalizaci v průběhu infekce. Jedná se o cis-Golgi protein GM-130 umístěný z vnější strany membrán, který svou činností udržuje strukturu Golgiho aparátu a interakcí s p115, GORASP1/GRASP65 and Rab1 zajišťuje vesikulární transport mezi ER a Golgiho aparátem<sup>(606,607,608)</sup>. Protein p115 pendluje mezi ER a GA, jeho nasednutí na GA zajišťuje právě interakce s GM-130<sup>(609,610)</sup>. Několik hodin po infekci je relokalizován do virových „factories“, kde zajišťuje dosud neznámou funkci. Jelikož v cis-Golgi působí jako matrixový protein, mohl by se účastnit ve spolupráci s virovým D13 tvorby lešení nutného pro tvorbu dceřinných virionů a např. zprostředkovat interakce proteinů virového jádra s první virovou membránou.



## 5 ZÁVĚR

Virus vakcínie byl, je a určitě i bude hojně využíván jako virový vektor. V dnešní době je v běhu mnoho preklinických i klinických studií léčby nádorů, kde se využívá rekombinantní vakcínie pro dopravení a expresi genů a indukci imunitní odpovědi či k ničení nádorů pomocí onkolytických vlastností viru. Úspěšná byla léčba nádorů prsu a prostaty pomocí vakcínie exprimující mucin a IL-2<sup>(611,612,613)</sup>. Také kombinace rekombinantní vakcínie a nereplikujícího se fowlpoxviru, jež oba exprimovaly nádorový antigen NY-ESO1, přinesla úspěch. Vakcinace pacientů s různými typy nádorů vyvolala tvorbu CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup> T buněčné odpovědi proti NY-ESO1<sup>(287)</sup>. Vysoce atenuovaný MVA byl použit pro imunizace proti melanomu (antigeny NY-ESO1 nebo melan-A), ačkoliv reakce organismu nebyla silná ani v kombinaci s DNA vakcínou<sup>(614,615)</sup>. Atenuované kmeny vakcínie jakožto bezpečné vektory jsou testovány na vyvolání imunity u pacientů infikovaných malárií nebo virem HIV<sup>(616,617,618)</sup>. Pro účely vyvolání profylaxe či pro terapii imunosuprimovaných osob jsou vyvíjeny stále bezpečnější živé vakcíny. Dnes se těší stále větší oblibě poxviry s přirozenými hostiteli z ptačí říše – fowlpoxvirus a canarypoxvirus, jež se užívají v očkovacích schématech „prime-boost“ spolu s replikující se vakcínou, nebo s atenuovaným kmenem MVA. Ptačí viry se sice nemnoží v savcích a není proti nim preexistující imunita, nevýhodou použití ptačích poxvirů však při výrobě vakcíny může být inkorporace ptačích proteinů do virionů, které by následně mohly vyvolat např. potravinové alergie. U atenuovaného kmene MVA je zase problematické namnožit virus do vysokých titrů. Možnost, jak snadno atenuovat virus, nám ukázala rekombinanta P13-E/L-FL, kde silně exprimovaný cytokin inhiboval množení v myších a v některých buněčných liniích. Takový virus by se dal pravděpodobně využít pro bezpečnou intratumorální stimulaci imunitní odpovědi.

Asi nejúspěšnější vakcínou odvozenou od poxvirů je prozatím vícenásobná rekombinanta exprimující tzv TRICOM – trojici kostimulačních molekul B7.1, ICAM-1 a LFA-3 – at' už je umístěná v replikující se vakcínou, nebo v nereplikující se MVA či fowlpoxviru. Kombinace exprese TRICOM s nádorovým antigenem vyvolává specifickou T buněčnou odpověď proti řadě typů nádorů<sup>(619,620,621)</sup>. Pro podporu imunitního systému byl navíc použit i protein GM-CSF<sup>(622)</sup>. Rekombinantní vakcínie exprimující E6/E7 antigeny vyvolává silnou specifickou protinádorovou imunitu v preklinických pokusech a klinicky byla testována v různých očkovacích schématech ve zdravých dobrovolnících a ženách s rozvinutou cervikální neoplázií. Vakcíny byly pacientkami sice dobře snášeny, ale vyvolané cytotoxické odpovědi a protilátky proti E7 proteinu byly daleko slabší než proti E6 proteinu a změny klinických příznaků nebyly moc zřetelné<sup>(623,624,625,626,627,628,629,630)</sup>. My jsme se snažili protinádorovou odpověď proti

papilomavirovému E7 antigenu v modelu TC-1 buněk podpořit koexpresi pomocných molekul s nádorovým antigenem v jednom virovém vektoru. Cytokiny GM-CSF a Flt3 ligand měly vyvolat silnější odpověď stimulací proliferace imunitních buněk, solubilní receptor pro TGF- $\beta$  měl modulovat nádorové mikroprostředí a umožnit tak imunitním buňkám vzpamatovat se z inhibičních účinků nádorového TGF- $\beta$ . Množství cytotoxických T lymfocytů specifických pro E7 antigen se sice zvýšilo pouze při použití rekombinanty exprimující FL, nicméně všechny tři typy rekombinantních virů nakonec v některém z použitých schémat imunizace (profylaxe vs. terapie) byly úspěšné a redukovaly růst experimentálních nádorů.

Preklinické i klinické testy ukazují, že v imunoterapii dysplázií a neoplázií děložního čípku způsobených papilomaviry zatím neexistuje jednoduchá cesta k jejich úspěšnému vyléčení. Je nutné kombinovat staré osvědčené přístupy (chirurgie, chemoterapie, radioterapie) s novými aktivními i pasivními imunoterapeutickými metodami. Ty se neustále vyvíjí a zlepšují, jejich účelem je obnovit funkčnost imunitního systému, modulovat nádorové mikroprostředí a posílit prezentaci antigenů či zlepšovat efektorové funkce T lymfocytů cílených proti nádorovým antigenům. Volba vhodné kombinační strategie léčby pro manipulaci imunitního systému pacienta k boji proti HPV nádorům si jistě vyžádá ještě mnoho energie vložené do klinických studií.

## 6 LITERÁRNÍ ZDROJE

1. Dales, S. a Pogo, B. G.:Biology of poxviruses. *Viol.Monogr* 18, 1981; 1-109.
2. Heuser, J.:Deep-etch EM reveals that the early poxvirus envelope is a single membrane bilayer stabilized by a geodetic "honeycomb" surface coat. *J.Cell Biol.* 169, 25-4-2005; 269-283.
3. Upton, C. et al:Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *J.Virol.* 77, 2003; 7590-7600.
4. Moss, B.:Fields Virology, 5th edition. 2007; 2905-2947.
5. Xing, K. et al:Genome-based phylogeny of poxvirus. *Intervirology* 49, 2006; 207-214.
6. Porter, R.:Historie medicíny od středověku po současnost. 2001; 311-312.
7. Downie, A. W.:Jenner's cowpox inoculation. *Br.Med.J.* 2, 4-8-1951; 251-256.
8. Gubser, C. et al:Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J.Gen.Virol.* 85, 2004; 105-117.
9. Gonzalez, J. M. a Esteban, M.:A poxvirus Bcl-2-like gene family involved in regulation of host immune response: sequence similarity and evolutionary history. *Virol.J.* 7, 2010; 59.
10. Yadav, S. et al:Partial genetic characterization of viruses isolated from pox-like infection in cattle and buffaloes: evidence of buffalo pox virus circulation in Indian cows. *Arch.Virol.* 155, 2010; 255-261.
11. Fenner, F.:The global eradication of smallpox. *Med.J.Aust.* 1, 17-5-1980; 455.
12. Panicali, D. a Paoletti, E.:Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79, 1982; 4927-4931.
13. Fenner, F.:Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res.Virol.* 140, 1989; 465-6; discuss.
14. Cyrklaff, M. et al:Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 22-2-2005; 2772-2777.
15. Goebel, S. J. et al:The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179, 1990; 247-66, 517-63.
16. Assarsson, E. et al:Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 12-2-2008; 2140-2145.
17. Yen, J., Golan, R., a Rubins, K.:Vaccinia virus infection & temporal analysis of virus gene expression: part 1. *J.Vis.Exp.* 2009;
18. Baroudy, B. M., Venkatesan, S., a Moss, B.:Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 28, 1982; 315-324.
19. Esposito, J. J. a Knight, J. C.:Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology* 143, 1985; 230-251.
20. Moss, B.:Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 1996; 11341-11348.
21. Chung, C. S. et al:A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J.Virol.* 72, 1998; 1577-1585.

22. Hsiao, J. C., Chung, C. S., a Chang, W.:Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J.Virol.* 73, 1999; 8750-8761.
23. Lin, C. L. et al:Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J.Virol.* 74, 2000; 3353-3365.
24. Carter, G. C. et al:Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J.Gen.Virol.* 86, 2005; 1279-1290.
25. Chiu, W. L. et al:Vaccinia virus 4c (A26L) protein on intracellular mature virus binds to the extracellular cellular matrix laminin. *J.Virol.* 81, 2007; 2149-2157.
26. Foo, C. H. et al:Vaccinia virus L1 binds to cell surfaces and blocks virus entry independently of glycosaminoglycans. *Virology* 385, 15-3-2009; 368-382.
27. Vanderplasschen, A., Hollinshead, M., a Smith, G. L.:Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *J.Gen.Virol.* 79, 1998; 877-887.
28. Bengali, Z., Townsley, A. C., a Moss, B.:Vaccinia virus strain differences in cell attachment and entry. *Virology* 389, 20-6-2009; 132-140.
29. Whitbeck, J. C. et al:Vaccinia virus exhibits cell-type-dependent entry characteristics. *Virology* 385, 15-3-2009; 383-391.
30. Mercer, J. a Helenius, A.:Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 25-4-2008; 531-535.
31. Mercer, J. a Helenius, A.:Virus entry by macropinocytosis. *Nat.Cell Biol.* 11, 2009; 510-520.
32. Mercer, J. a Helenius, A.:Apoptotic mimicry: phosphatidylserine-mediated macropinocytosis of vaccinia virus. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1209, 2010; 49-55.
33. Mercer, J. et al:Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107, 18-5-2010; 9346-9351.
34. Mercer, J., Schelhaas, M., a Helenius, A.:Virus entry by endocytosis. *Annu.Rev.Biochem.* 79, 2010; 803-833.
35. Moss, B.:Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* 344, 5-1-2006; 48-54.
36. Altmann, S. E. et al:Inhibition of Vaccinia virus entry by a broad spectrum antiviral peptide. *Virology* 388, 5-6-2009; 248-259.
37. Carter, G. C. et al:Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J.Gen.Virol.* 84, 2003; 2443-2458.
38. Davison, A. J. a Moss, B.:Structure of vaccinia virus late promoters. *J.Mol.Biol.* 210, 1989; 771-784.
39. Mohamed, M. R. a Niles, E. G.:UUUUUNU oligonucleotide inhibition of RNA synthesis in vaccinia virus cores. *Virology* 324, 1-7-2004; 493-500.
40. Mallardo, M. et al:Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. *J.Virol.* 76, 2002; 5167-5183.
41. Katsafanas, G. C. a Moss, B.:Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer. *J.Biol.Chem.* 279, 10-12-2004; 52210-52217.
42. Broyles, S. S.:Vaccinia virus transcription. *J.Gen.Virol.* 84, 2003; 2293-2303.

43. Hammond, J. M., Oke, P. G., a Coupar, B. E.:A synthetic vaccinia virus promoter with enhanced early and late activity. *J.Virol.Methods* 66, 1997; 135-138.
44. Chakrabarti, S., Sisler, J. R., a Moss, B.:Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *Biotechniques* 23, 1997; 1094-1097.
45. Baldick, C. J., Jr. a Moss, B.:Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *J.Virol.* 67, 1993; 3515-3527.
46. Shatzer, A. N., Kato, S. E., a Condit, R. C.:Phenotypic analysis of a temperature sensitive mutant in the large subunit of the vaccinia virus mRNA capping enzyme. *Virology* 375, 25-5-2008; 236-252.
47. D'Costa, S. M., Bainbridge, T. W., a Condit, R. C.:Purification and properties of the vaccinia virus mRNA processing factor. *J.Biol.Chem.* 283, 29-2-2008; 5267-5275.
48. Rosales, R. et al:Purification and identification of a vaccinia virus-encoded intermediate stage promoter-specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TFIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit. *J.Biol.Chem.* 269, 1994; 14260-14267.
49. Broyles, S. S. et al:Transcription factor YY1 is a vaccinia virus late promoter activator. *J.Biol.Chem.* 274, 10-12-1999; 35662-35667.
50. Condit, R. C. a Niles, E. G.:Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochim.Biophys.Acta* 1577, 13-9-2002; 325-336.
51. Mallardo, M., Schleich, S., a Krijnse, L. J.:Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol.Biol.Cell* 12, 2001; 3875-3891.
52. Moyer, R. W. a Graves, R. L.:The mechanism of cytoplasmic orthopoxvirus DNA replication. *Cell* 27, 1981; 391-401.
53. De Silva, F. S. et al:Poxvirus DNA primase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 20-11-2007; 18724-18729.
54. Eckert, D. et al:Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035). *J.Virol.* 79, 2005; 15084-15090.
55. Culyba, M. J. et al:DNA branch nuclease activity of vaccinia A22 resolvase. *J.Biol.Chem.* 282, 30-11-2007; 34644-34652.
56. Willer, D. O. et al:Vaccinia virus DNA polymerase promotes DNA pairing and strand-transfer reactions. *Virology* 257, 10-5-1999; 511-523.
57. Passarelli, A. L., Kovacs, G. R., a Moss, B.:Transcription of a vaccinia virus late promoter template: Requirement for the product of the A2L intermediate-stage gene. *J.Virol.* 70, 1996; 4444-4450.
58. Parks, R. J. et al:DNA ligase gene disruptions can depress viral growth and replication in poxvirus-infected cells. *Virus Res.* 56, 1998; 135-147.
59. Oh, J. a Broyles, S. S.:Host cell nuclear proteins are recruited to cytoplasmic vaccinia virus replication complexes. *J.Virol.* 79, 2005; 12852-12860.
60. Zurkova, K. et al:Attenuation of vaccinia virus by the expression of human Flt3 ligand. *Virology* 7, 26-5-2010; 109.
61. Kwon, J. A. a Rich, A.:Biological function of the vaccinia virus Z-DNA-binding protein E3L: gene transactivation and antiapoptotic activity in HeLa cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 6-9-2005; 12759-12764.
62. Wing, D. a Weissbach, A.:Vaccinia virus RNA polymerase associated with nuclei of infected HeLa cells. *J.Virol.* 49, 1984; 26-34.

63. Harauz, G. et al:Electron spectroscopic imaging of encapsidated DNA in vaccinia virus. *Can.J.Microbiol.* 41, 1995; 889-894.
64. Schmelz, M. et al:Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J.Virol.* 68, 1994; 130-147.
65. Cudmore, S. et al:Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378, 1995; 636-638.
66. Hollinshead, M. et al:Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J.Cell Biol.* 154, 23-7-2001; 389-402.
67. Vanslyke, J. K. et al:Isolation and analysis of vaccinia virus previrions. *Virus Genes* 7, 1993; 311-324.
68. Zhang, Y. a Moss, B.:Immature viral envelope formation is interrupted at the same stage by lac operator-mediated repression of the vaccinia virus D13L gene and by the drug rifampicin. *Virology* 187, 1992; 643-653.
69. Bisht, H. et al:Assembly and disassembly of the capsid-like external scaffold of immature virions during vaccinia virus morphogenesis. *J.Virol.* 83, 2009; 9140-9150.
70. Mohandas, A. R. a Dales, S.:Involvement of spicules in the formation of vaccinia virus envelopes elucidated by a conditional lethal mutant. *Virology* 214, 1995; 494-502.
71. Senkevich, T. G. et al:Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 14-5-2002; 6667-6672.
72. Krauss, O. et al:An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles. *J.Gen.Virol.* 83, 2002; 2347-2359.
73. Chung, C. S. et al:Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles. *J.Virol.* 80, 2006; 2127-2140.
74. Resch, W. et al:Protein composition of the vaccinia virus mature virion. *Virology* 358, 5-2-2007; 233-247.
75. Jindal, S. a Young, R. A.:Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of Hsp70 with viral proteins. *J.Virol.* 66, 1992; 5357-5362.
76. Hung, J. J., Chung, C. S., a Chang, W.:Molecular chaperone Hsp90 is important for vaccinia virus growth in cells. *J.Virol.* 76, 2002; 1379-1390.
77. Takahashi, T., Oie, M., a Ichihashi, Y.:N-terminal amino acid sequences of vaccinia virus structural proteins. *Virology* 202, 1-8-1994; 844-852.
78. Lee, P. a Hruby, D. E.:Proteolytic cleavage of vaccinia virus virion proteins. Mutational analysis of the specificity determinants. *J.Biol.Chem.* 269, 1994; 8616-8622.
79. Martin, K. H. et al:Identification and analysis of three myristylated vaccinia virus late proteins. *J.Virol.* 71, 1997; 5218-5226.
80. Rapoport, T. A., Rolls, M. M., a Jungnickel, B.:Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8, 1996; 499-504.
81. Schepis, A. et al:Vaccinia virus-induced microtubule-dependent cellular rearrangements. *Traffic.* 7, 2006; 308-323.
82. Ploubidou, A. et al:Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *EMBO J.* 19, 1-8-2000; 3932-3944.
83. Tooze, J. et al:Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur.J.Cell Biol.* 60, 1993; 163-178.

84. Moreau, V. et al: A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat. Cell Biol.* 2, 2000; 441-448.
85. Scaplehorn, N. et al: Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr. Biol.* 12, 30-4-2002; 740-745.
86. Schmutz, C. et al: Biochemical analysis of the major vaccinia virus envelope antigen. *Virology* 213, 1995; 19-27.
87. Schmutz, C. a Wittek, R.: Release of extracellular particles by recombinant vaccinia virus over-expressing the major envelope protein p37K. *J. Gen. Virol.* 76, 1995; 2963-2968.
88. Blasco, R. a Moss, B.: Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J. Virol.* 65, 1991; 5910-5920.
89. Shida, H.: Nucleotide sequence of the vaccinia virus hemagglutinin gene. *Virology* 150, 1986; 451-462.
90. Isaacs, S. N. et al: Characterization of a vaccinia virus-encoded 42-kilodalton class I membrane glycoprotein component of the extracellular virus envelope. *J. Virol.* 66, 1992; 7217-7224.
91. Duncan, S. A. a Smith, G. L.: Identification and characterization of an extracellular envelope glycoprotein affecting vaccinia virus egress. *J. Virol.* 66, 1992; 1610-1621.
92. Parkinson, J. E. a Smith, G. L.: Vaccinia virus gene A36R encodes a M(r) 43-50 K protein on the surface of extracellular enveloped virus. *Virology* 204, 1994; 376-390.
93. Pros and cons of vaccinia immunization. *J. Occup. Med.* 34, 1992; 757.
94. Roper, R. L., Payne, L. G., a Moss, B.: Extracellular vaccinia virus envelope glycoprotein encoded by the A33R gene. *J. Virol.* 70, 1996; 3753-3762.
95. Dodding, M. P. et al: An E2-F12 complex is required for IEV morphogenesis during vaccinia infection. *Cell Microbiol.* 4-2-2009;
96. Domi, A., Weisberg, A. S., a Moss, B.: Vaccinia virus E2L null mutants exhibit a major reduction in extracellular virion formation and virus spread. *J. Virol.* 82, 2008; 4215-4226.
97. Hiller, G. a Weber, K.: Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment. *J. Virol.* 55, 1985; 651-659.
98. Reeves, P. M. et al: Variola and monkeypox viruses utilize conserved mechanisms of virion motility and release that depend on abl and SRC family tyrosine kinases. *J. Virol.* 85, 2011; 21-31.
99. Rottger, S. et al: Interactions between vaccinia virus IEV membrane proteins and their roles in IEV assembly and actin tail formation. *J. Virol.* 73, 1999; 2863-2875.
100. Sanderson, C. M. et al: Roles of vaccinia virus EEV-specific proteins in intracellular actin tail formation and low pH-induced cell-cell fusion. *J. Gen. Virol.* 79, 1998; 1415-1425.
101. Sanderson, C. M., Way, M., a Smith, G. L.: Virus-induced cell motility. *J. Virol.* 72, 1998; 1235-1243.
102. Carrasco, L. a Esteban, M.: Modification of membrane permeability in vaccinia virus-infected cells. *Virology* 117, 1982; 62-69.
103. Pedley, S. a Cooper, R. J.: The inhibition of HeLa cell RNA synthesis following infection with vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 65, 1984; 1687-1697.
104. Guerra, S. et al: Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J. Virol.* 77, 2003; 6493-6506.

105. Dokun, A. O. et al: Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat.Immunol.* 2, 2001; 951-956.
106. Bukowski, J. F. et al: Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J.Immunol.* 131, 1983; 1531-1538.
107. Steinman, R. M.: Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt.Sinai J.Med.* 68, 2001; 160-166.
108. Karupiah, G.: Type 1 and type 2 cytokines in antiviral defense. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 63, 15-5-1998; 105-109.
109. Rodriguez, J. R., Rodriguez, D., a Esteban, M.: Interferon treatment inhibits early events in vaccinia virus gene expression in infected mice. *Virology* 185, 1991; 929-933.
110. Havenar-Daughton, C., Kolumam, G. A., a Murali-Krishna, K.: Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection. *J.Immunol.* 176, 15-3-2006; 3315-3319.
111. Kolumam, G. A. et al: Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J.Exp.Med.* 202, 5-9-2005; 637-650.
112. Barber, G. N.: Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death.Differ.* 8, 2001; 113-126.
113. Zhu, J. et al: Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta. *Blood* 109, 15-1-2007; 619-625.
114. Guerra, S. et al: Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J.Virol.* 81, 2007; 8707-8721.
115. Yoneyama, M. et al: Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J.Immunol.* 175, 1-9-2005; 2851-2858.
116. Pichlmair, A. et al: Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J.Virol.* 83, 2009; 10761-10769.
117. Delaloye, J. et al: Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS.Pathog.* 5, 2009; e1000480.
118. Sadler, A. J. a Williams, B. R.: Structure and function of the protein kinase R. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 316, 2007; 253-292.
119. Hsu, L. C. et al: The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* 428, 18-3-2004; 341-345.
120. Sen, G. C. a Peters, G. A.: Viral stress-inducible genes. *Adv.Virus Res.* 70, 2007; 233-263.
121. Pasare, C. a Medzhitov, R.: Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes.Infect.* 6, 2004; 1382-1387.
122. Chisholm, S. E. a Reyburn, H. T.: Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *J.Virol.* 80, 2006; 2225-2233.
123. Yao, Y. et al: Vaccinia virus infection induces dendritic cell maturation but inhibits antigen presentation by MHC class II. *Cell Immunol.* 246, 2007; 92-102.
124. Albert, M. L., Sauter, B., a Bhardwaj, N.: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 5-3-1998; 86-89.



125. Dhodapkar, M. V. et al:Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J.Exp.Med.*2001.Jan.15.;193.(2.):233.-8. 193, 15-1-2001; 233-238.
126. Engelmayer, J. et al:Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J.Immunol.* 163, 15-12-1999; 6762-6768.
127. Larsson, M. et al:Requirement of mature dendritic cells for efficient activation of influenza A-specific memory CD8+ T cells. *J.Immunol.* 165, 1-8-2000; 1182-1190.
128. Coupar, B. E. et al:Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in vaccinia virus recombinants and effects on the immune response. *Eur.J.Immunol.* 16, 1986; 1479-1487.
129. Tewalt, E. F. et al:Viral sequestration of antigen subverts cross presentation to CD8(+) T cells. *PLoS.Pathog.* 5, 2009; e1000457.
130. Rehm, K. E. et al:Vaccinia virus decreases major histocompatibility complex (MHC) class II antigen presentation, T-cell priming, and peptide association with MHC class II. *Immunology* 128, 2009; 381-392.
131. Deng, L. et al:Vaccinia virus infection attenuates innate immune responses and antigen presentation by epidermal dendritic cells. *J.Virol.* 80, 2006; 9977-9987.
132. Li, P. et al:Disruption of MHC class II-restricted antigen presentation by vaccinia virus. *J.Immunol.* 175, 15-11-2005; 6481-6488.
133. Humrich, J. Y. et al:Vaccinia virus impairs directional migration and chemokine receptor switch of human dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 37, 2007; 954-965.
134. Ignatius, R. et al:Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion [In Process Citation]. *J.Virol.*2000.Dec.;74(23.):11329.-38. 74, 2000; 11329-11338.
135. Mosmann, T. R. et al:Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136, 1-4-1986; 2348-2357.
136. Chen, W. et al:Conversion of peripheral CD4+. *J.Exp.Med.* 198, 15-12-2003; 1875-1886.
137. Weiner, H. L.:Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol.Rev.* 182, 2001; 207-214.
138. Groux, H. et al:A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 16-10-1997; 737-742.
139. Heath, W. R. et al:Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol.Rev.* 199, 2004; 9-26.
140. Hosoi, A. et al:Memory Th1 cells augment tumor-specific CTL following transcutaneous peptide immunization. *Cancer Res.* 68, 15-5-2008; 3941-3949.
141. Mailliard, R. B. et al:Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+ T cells: helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses. *J.Exp.Med.* 195, 18-2-2002; 473-483.
142. Mailliard, R. B. et al:Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J.Immunol.* 171, 1-9-2003; 2366-2373.
143. Sigal, L. J. et al:Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen [see comments]. *Nature* 398, 4-3-1999; 77-80.
144. Ahmed, R. a Gray, D.:Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 5-4-1996; 54-60.

145. Mathurin, K. S. et al:CD4 T-cell-mediated heterologous immunity between mycobacteria and poxviruses. *J.Virol.* 83, 2009; 3528-3539.
146. Moutaftsi, M. et al:A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus. *Nat.Biotechnol.* 24, 2006; 817-819.
147. Welsh, R. M., Selin, L. K., a Szomolanyi-Tsuda, E.:Immunological memory to viral infections. *Annu.Rev.Immunol.* 22, 2004; 711-743.
148. Xu, R. H. et al:Direct presentation is sufficient for an efficient anti-viral CD8+ T cell response. *PLoS.Pathog.* 6, 2010; e1000768.
149. Gasteiger, G. et al:Cross-priming of cytotoxic T cells dictates antigen requisites for modified vaccinia virus Ankara vector vaccines. *J.Virol.* 81, 2007; 11925-11936.
150. Fang, M. a Sigal, L. J.:Direct CD28 costimulation is required for CD8+ T cell-mediated resistance to an acute viral disease in a natural host. *J.Immunol.* 177, 1-12-2006; 8027-8036.
151. Amanna, I. J., Slifka, M. K., a Crotty, S.:Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. *Immunol.Rev.* 211, 2006; 320-337.
152. Panchanathan, V., Chaudhri, G., a Karupiah, G.:Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where does antibody stand? *Immunol.Cell Biol.* 86, 2008; 80-86.
153. Bachmann, M. F. et al:Maintenance of memory CTL responses by T helper cells and CD40-CD40 ligand: antibodies provide the key. *Eur.J.Immunol.* 34, 2004; 317-326.
154. Nakayama, Y. et al:Role of PKR and Type I IFNs in viral control during primary and secondary infection. *PLoS.Pathog.* 6, 2010; e1000966.
155. Fang, M. a Sigal, L. J.:Antibodies and CD8+ T cells are complementary and essential for natural resistance to a highly lethal cytopathic virus. *J.Immunol.* 175, 15-11-2005; 6829-6836.
156. Sette, A. et al:Definition of epitopes and antigens recognized by vaccinia specific immune responses: their conservation in variola virus sequences, and use as a model system to study complex pathogens. *Vaccine* 27 Suppl 6, 30-12-2009; G21-G26.
157. Moyron-Quiroz, J. E. et al:The smallpox vaccine induces an early neutralizing IgM response. *Vaccine* 28, 10-12-2009; 140-147.
158. Bray, M. a Wright, M. E.:Progressive vaccinia. *Clin.Infect.Dis.* 36, 15-3-2003; 766-774.
159. Copeman, P. W. a Banatvala, J. E.:The skin and vaccination against smallpox. *Br.J.Dermatol.* 84, 1971; 169-173.
160. Howell, M. D. et al:Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity.* 24, 2006; 341-348.
161. Lane, J. M. a Goldstein, J.:Adverse events occurring after smallpox vaccination. *Semin.Pediatr.Infect.Dis.* 14, 2003; 189-195.
162. Gomez, C. E. et al:The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr.Gene Ther.* 8, 2008; 97-120.
163. Esteban, M.:Attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC as promising vaccine candidates against HIV/AIDS. *Hum.Vaccin.* 5, 2009; 867-871.
164. Hopkins, R. J. a Lane, J. M.:Clinical efficacy of intramuscular vaccinia immune globulin: a literature review. *Clin.Infect.Dis.* 39, 15-9-2004; 819-826.

165. Law, M., Putz, M. M., a Smith, G. L.:An investigation of the therapeutic value of vaccinia-immune IgG in a mouse pneumonia model. *J.Gen.Virol.* 86, 2005; 991-1000.
166. Andrei, G. et al: Dual infection with polyomavirus BK and acyclovir-resistant herpes simplex virus successfully treated with cidofovir in a bone marrow transplant recipient. *Transpl.Infect.Dis.* 9, 2007; 126-131.
167. Bonatti, H. et al: Local administration of cidofovir for human papilloma virus associated skin lesions in transplant recipients. *Transpl.Int.* 20, 2007; 238-246.
168. Quenelle, D. C., Collins, D. J., a Kern, E. R.: Cutaneous infections of mice with vaccinia or cowpox viruses and efficacy of cidofovir. *Antiviral Res.* 63, 2004; 33-40.
169. Parker, S. et al: Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether-lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antiviral Res.* 77, 2008; 39-49.
170. Langhammer, S. et al: Inhibition of poxvirus spreading by the anti-tumor drug Gefitinib (Iressa). *Antiviral Res.* 89, 2011; 64-70.
171. Holcakova, J. et al: The inhibitor of cyclin-dependent kinases, olomoucine II, exhibits potent antiviral properties. *Antivir.Chem.Chemother.* 20, 2010; 133-142.
172. Jordan, R. et al: Safety and pharmacokinetics of the antiorthopoxvirus compound ST-246 following repeat oral dosing in healthy adult subjects. *Antimicrob.Agents Chemother.* 54, 2010; 2560-2566.
173. Chen, N. et al: Poxvirus interleukin-4 expression overcomes inherent resistance and vaccine-induced immunity: pathogenesis, prophylaxis, and antiviral therapy. *Virology* 409, 20-1-2011; 328-337.
174. Quenelle, D. C. et al: Synergistic efficacy of the combination of ST-246 with CMX001 against orthopoxviruses. *Antimicrob.Agents Chemother.* 51, 2007; 4118-4124.
175. Kotwal, G. J.: Purification of virokines using ultrafiltration. *Am.Biotechnol.Lab.* 12, 1994; 76-77.
176. Alcami, A. et al: Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J.Immunol.* 160, 15-1-1998; 624-633.
177. Kotwal, G. J. a Moss, B.: Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature* 335, 1988; 176-178.
178. Kotwal, G. J. et al: Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science* 250, 1990; 827-830.
179. Smith, G. L. et al: Vaccinia virus immune evasion. *Immunol.Rev.* 159, 1997; 137-154.
180. Alcami, A. a Smith, G. L.: A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71, 1992; 153-167.
181. Pickup, D. J. et al: Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83, 1986; 7698-7702.
182. Patel, D. D., Pickup, D. J., a Joklik, W. K.: Isolation of cowpox virus A-type inclusions and characterization of their major protein component. *Virology* 149, 1986; 174-189.
183. Beattie, E., Tartaglia, J., a Paoletti, E.: Vaccinia virus-encoded eIF-2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology* 183, 1991; 419-422.
184. Chang, H. W. a Jacobs, B. L.: Identification of a conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA. *Virology* 194, 1993; 537-547.
185. Carroll, K. et al: Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. *J.Biol.Chem.* 268, 1993; 12837-12842.

186. Muller, U. et al:Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 24-6-1994; 1918-1921.
187. Najarro, P., Traktman, P., a Lewis, J. A.:Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J.Virol.* 75, 2001; 3185-3196.
188. Liu, K., Lemon, B., a Traktman, P.:The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription in vivo and in vitro. *J.Virol.* 69, 1995; 7823-7834.
189. Mohan, K. V., Zhang, C. X., a Atreya, C. D.:The proteoglycan bamacan is a host cellular ligand of vaccinia virus neurovirulence factor N1L. *J.Neurovirol.* 15, 2009; 229-237.
190. Aoyagi, M. et al:Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Sci.* 16, 2007; 118-124.
191. DiPerna, G. et al:Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J.Biol.Chem.* 279, 27-8-2004; 36570-36578.
192. Zhang, Z. et al:The vaccinia virus N1L protein influences cytokine secretion in vitro after infection. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1056, 2005; 69-86.
193. Bowie, A. et al:A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 29-8-2000; 10162-10167.
194. Macen, J. L. et al:Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. *Virology* 218, 1996; 232-237.
195. Dobbstein, M. a Shenk, T.:Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *J.Virol.* 70, 1996; 6479-6485.
196. Santos, C. R. et al:The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism. *Virology* 328, 25-10-2004; 254-265.
197. Santos, C. R. et al:Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signaling. *J.Virol.* 80, 2006; 7667-7675.
198. Ramsey-Ewing, A. a Moss, B.:Apoptosis induced by a postbinding step of vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. *Virology* 242, 1-3-1998; 138-149.
199. Baixeras, E. et al:Vaccinia virus-induced apoptosis in immature B lymphocytes: role of cellular Bcl-2. *Virus Res.* 58, 1998; 107-113.
200. Langland, J. O. a Jacobs, B. L.:The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* 299, 20-7-2002; 133-141.
201. Sutter, G. et al:Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant. *J.Virol.* 68, 1994; 4109-4116.
202. Perkus, M. E. et al:Vaccinia virus host range genes. *Virology* 179, 1990; 276-286.
203. Oguiura, N., Spehner, D., a Drillien, R.:Detection of a protein encoded by the vaccinia virus C7L open reading frame and study of its effect on virus multiplication in different cell lines. *J.Gen.Virol.* 74, 1993; 1409-1413.
204. van Vugt, M. A. a Yaffe, M. B.:Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints: Giving it some gas to shut off the breaks! *Cell Cycle* 9, 17-6-2010;
205. De, F. M. a De, L. A.:Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. *Curr.Pharm.Des* 16, 2010; 1417-1426.

206. Paternot, S. et al:Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase. *Cell Cycle* 9, 15-2-2010; 689-699.
207. Gannage, M. a Munz, C.:MHC presentation via autophagy and how viruses escape from it. *Semin.Immunopathol.* 32, 2010; 373-381.
208. Khan, A. R. et al:Tumor infiltrating regulatory T cells: tractable targets for immunotherapy. *Int.Rev.Immunol.* 29, 2010; 461-484.
209. Korangy, F. et al:Immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Expert.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 4, 2010; 345-353.
210. van den Broek, M., von, B. L., a Knuth, A.:Developments in cancer immunotherapy. *Dig.Dis.* 28, 2010; 51-56.
211. Prevost-Blondel, A. et al:Differential requirement of perforin and IFN-gamma in CD8 T cell-mediated immune responses against B16.F10 melanoma cells expressing a viral antigen. *Eur.J.Immunol.* 30, 2000; 2507-2515.
212. Prevost-Blondel, A. et al:Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J.Immunol.* 164, 1-4-2000; 3645-3651.
213. Drapier, J. C., Wietzerbin, J., a Hibbs, J. B., Jr.:Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur.J.Immunol.* 18, 1988; 1587-1592.
214. Taub, D. D. et al:Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J.Immunol.* 155, 15-10-1995; 3877-3888.
215. Sgadari, C. et al:Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood* 89, 15-4-1997; 2635-2643.
216. Glas, R. et al:Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J.Exp.Med.* 191, 3-1-2000; 129-138.
217. Kashii, Y. et al:Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J.Immunol.* 163, 15-11-1999; 5358-5366.
218. Boehm, U. et al:Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 15, 1997; 749-795.
219. Yang, Y. et al:Proteasomes are regulated by interferon gamma: implications for antigen processing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 1-6-1992; 4928-4932.
220. Whiteside, T. L.:The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27, 6-10-2008; 5904-5912.
221. Li, H. et al:Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J.Immunol.* 182, 1-1-2009; 240-249.
222. Strauss, L., Bergmann, C., a Whiteside, T. L.:Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J.Immunol.* 182, 1-2-2009; 1469-1480.
223. Haskill, S. et al:Mononuclear-cell infiltration in ovarian cancer. I. Inflammatory-cell infiltrates from tumour and ascites material. *Br.J.Cancer* 45, 1982; 728-736.
224. Haskill, S. et al:Mononuclear-cell infiltration in ovarian cancer. III. Suppressor-cell and ADCC activity of macrophages from ascitic and solid ovarian tumours. *Br.J.Cancer* 45, 1982; 747-753.
225. Brubaker, D. B. a Whiteside, T. L.:Localization of human T lymphocytes in tissue sections by a rosetting technique. *Am.J.Pathol.* 88, 1977; 323-332.

226. Vose, B. M. et al:Natural cytotoxicity in man: activity of lymph node and tumor-infiltrating lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 7, 1977; 353-357.
227. Galon, J. et al:Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 29-9-2006; 1960-1964.
228. Ran, M. a Witz, I. P.:Tumor-associated immunoglobulins. Enhancement of syngeneic tumors by IgG2-containing tumor eluates. *Int.J.Cancer* 9, 15-1-1972; 242-247.
229. Ran, M. et al:In vivo acquisition of Fc gamma RII expression on polyoma virus-transformed cells derived from tumors of long latency. *Cancer Res.* 51, 15-1-1991; 612-618.
230. Braslawsky, G. R. et al:Receptors for immune complexes on cells within a non-lymphoid murine tumor. *J.Immunol.* 116, 1976; 1571-1578.
231. Li, H., Fan, X., a Houghton, J.:Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J.Cell Biochem.* 101, 1-7-2007; 805-815.
232. Haviv, I. et al:Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle* 8, 15-2-2009; 589-595.
233. Bhowmick, N. A. et al:TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303, 6-2-2004; 848-851.
234. Zhao, X. P. et al:Transforming growth factor-beta1 upregulates the expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) in human breast cancer MCF-7 cells. *Acta Pharmacol.Sin.* 31, 2010; 347-354.
235. Kojima, Y. et al:Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107, 16-11-2010; 20009-20014.
236. Mi, Z. et al:Osteopontin Promotes CCL5-Mesenchymal Stromal Cell Mediated Breast Cancer Metastasis. *Carcinogenesis* 20-1-2011;
237. Mishra, P., Banerjee, D., a Ben-Baruch, A.:Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. *J.Leukoc.Biol.* 89, 2011; 31-39.
238. Mantovani, A. et al:Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 24-7-2008; 436-444.
239. O'Neill, L. A.:When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity.* 29, 18-7-2008; 12-20.
240. Goto, Y. et al:Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. *Mol.Cancer Ther.* 7, 2008; 3642-3653.
241. Sato, Y. et al:Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2 Suppl 1, 2009; 205-214.
242. Kelly, M. G. et al:TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66, 1-4-2006; 3859-3868.
243. He, W. et al:TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol.Immunol.* 44, 2007; 2850-2859.
244. Zhou, M. et al:Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors. *Cancer Immunol.Immunother.* 58, 2009; 1375-1385.
245. Ren, T. et al:Functional expression of TLR9 is associated to the metastatic potential of human lung cancer cell: functional active role of TLR9 on tumor metastasis. *Cancer Biol.Ther.* 6, 2007; 1704-1709.
246. Linehan, D. C. a Goedegebuure, P. S.:CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunol.Res.* 32, 2005; 155-168.

247. Perrone, G. et al: Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur.J.Cancer* 44, 2008; 1875-1882.
248. Martinez, F. O. et al: Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13, 2008; 453-461.
249. Marigo, I. et al: Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol.Rev.* 222, 2008; 162-179.
250. Rodriguez, P. C. a Ochoa, A. C.: Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol.Rev.* 222, 2008; 180-191.
251. Zou, W.: Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat.Rev.Cancer* 5, 2005; 263-274.
252. Wei, S. et al: Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 65, 15-6-2005; 5020-5026.
253. Kryczek, I. et al: CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res.* 65, 15-1-2005; 465-472.
254. Gabrilovich, D. I. et al: Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat.Med.* 2, 1996; 1096-1103.
255. Dunn, G. P. et al: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat.Immunol.* 3, 2002; 991-998.
256. Pardoll, D.: Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu.Rev.Immunol.* 21, 2003; 807-839.
257. Barnas, J. L. et al: T cells and stromal fibroblasts in human tumor microenvironments represent potential therapeutic targets. *Cancer Microenviron.* 3, 2010; 29-47.
258. Lowenstein, P. R., Thomas, C. E., a Castro, M. G.: Politically correct gene therapy? A "clean environment" improves gene delivery to the brain! *Gene Ther.* 6, 1999; 463-464.
259. Aiuti, A.: Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 4, 2002; 515-522.
260. Hacein-Bey-Abina, S. et al: Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N.Engl.J.Med.* 346, 18-4-2002; 1185-1193.
261. Stone, D. et al: Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J.Endocrinol.* 164, 2000; 103-118.
262. Bouard, D., Alazard-Dany, D., a Cosset, F. L.: Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br.J.Pharmacol.* 157, 2009; 153-165.
263. Rogers, S. et al: Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient. *J.Exp.Med.* 137, 1-4-1973; 1091-1096.
264. Schaffer, D. V., Koerber, J. T., a Lim, K. I.: Molecular engineering of viral gene delivery vehicles. *Annu.Rev.Biomed.Eng* 10, 2008; 169-194.
265. Kerr, D.: Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nat.Rev.Cancer* 3, 2003; 615-622.
266. Zeimet, A. G. a Marth, C.: Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol.* 4, 2003; 415-422.
267. McCormick, F.: Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat.Rev.Cancer* 1, 2001; 130-141.
268. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., a Restifo, N. P.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat.Med.* 10, 2004; 909-915.

269. Amato, R. J. et al: Vaccination of prostate cancer patients with modified vaccinia ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax): a phase 2 trial. *J.Immunother.* 31, 2008; 577-585.
270. Gulley, J. L. et al: Pilot study of vaccination with recombinant CEA-MUC-1-TRICOM poxviral-based vaccines in patients with metastatic carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 14, 15-5-2008; 3060-3069.
271. Young, L. S. et al: Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J.Pathol.* 208, 2006; 299-318.
272. Kim, J. H. et al: Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol.Ther.* 14, 2006; 361-370.
273. Heise, C. et al: An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat.Med.* 6, 2000; 1134-1139.
274. Coffey, M. C. et al: Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282, 13-11-1998; 1332-1334.
275. Stojdl, D. F. et al: VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 2003; 263-275.
276. Liu, T. C. et al: Translation of targeted oncolytic virotherapeutics from the lab into the clinic, and back again: a high-value iterative loop. *Mol.Ther.* 16, 2008; 1006-1008.
277. Mackett, M. a Smith, G. L.: Vaccinia virus expression vectors. *J.Gen.Virol.* 67 ( Pt 10), 1986; 2067-2082.
278. Merchinsky, M. et al: Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. *Virology* 238, 24-11-1997; 444-451.
279. Evans, E. a Traktman, P.: Molecular genetic analysis of a vaccinia virus gene with an essential role in DNA replication. *J.Virol.* 61, 1987; 3152-3162.
280. Graham, B. S. et al: Determinants of antibody response after recombinant gp160 boosting in vaccinia-naive volunteers primed with gp160-recombinant vaccinia virus. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *J.Infect.Dis.* 170, 1994; 782-786.
281. Kanesa-athan, N. et al: Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus-poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* 19, 15-10-2000; 483-491.
282. McClain, D. J. et al: Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine. *J.Med.Virol.* 60, 2000; 77-85.
283. Cadoz, M. et al: Immunisation with canarypox virus expressing rabies glycoprotein. *Lancet* 339, 13-6-1992; 1429-1432.
284. Ockenhouse, C. F. et al: Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria. *J.Infect.Dis.* 177, 1998; 1664-1673.
285. Doehn, C. et al: Drug evaluation: Therion's rV-PSA-TRICOM + rF-PSA-TRICOM prime-boost prostate cancer vaccine. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 9, 2007; 183-189.
286. Rochlitz, C. et al: Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer. *J.Gene Med.* 5, 2003; 690-699.
287. Jager, E. et al: Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 26-9-2006; 14453-14458.
288. Kim, D. H. a Thorne, S. H.: Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat.Rev.Cancer* 9, 2009; 64-71.



289. Kretzschmar, M. et al:Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS.Med.* 3, 2006; e272.
290. Miller, J. D. et al:Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity.* 28, 2008; 710-722.
291. Putz, M. M. et al:Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nat.Med.* 12, 2006; 1310-1315.
292. Rubartelli, A. a Lotze, M. T.:Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 28, 2007; 429-436.
293. Kim, D. H. et al:Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS.Med.* 4, 2007; e353.
294. Thorne, S. H. et al:Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J.Clin.Invest* 117, 2007; 3350-3358.
295. Liu, T. C. et al:The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol.Ther.* 16, 2008; 1637-1642.
296. Breitbach, C. J. et al:Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol.Ther.* 15, 2007; 1686-1693.
297. Hanahan, D. a Weinberg, R. A.:The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 7-1-2000; 57-70.
298. Buller, R. M. et al:Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* 317, 1985; 813-815.
299. Hengstschlager, M. et al:Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA tumor virus-transformed cells. *J.Biol.Chem.* 269, 13-5-1994; 13836-13842.
300. Buller, R. M. et al:Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology* 164, 1988; 182-192.
301. Tzahar, E. et al:Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. *EMBO J.* 17, 15-10-1998; 5948-5963.
302. de Magalhaes, J. C. et al:A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J.Biol.Chem.* 276, 19-10-2001; 38353-38360.
303. McCart, J. A. et al:Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res.* 61, 15-12-2001; 8751-8757.
304. Yang, S. et al:A new recombinant vaccinia with targeted deletion of three viral genes: its safety and efficacy as an oncolytic virus. *Gene Ther.* 14, 2007; 638-647.
305. Guo, Z. S. et al:The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2. *Cancer Res.* 65, 1-11-2005; 9991-9998.
306. Park, B. H. et al:Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol.* 9, 2008; 533-542.
307. Kim, D. H. et al:Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res.* 68, 1-4-2008; 2071-2075.
308. Green, N. K. et al:Retargeting polymer-coated adenovirus to the FGF receptor allows productive infection and mediates efficacy in a peritoneal model of human ovarian cancer. *J.Gene Med.* 10, 2008; 280-289.

309. Naito, T., Kaneko, Y., a Kozbor, D.:Oral vaccination with modified vaccinia virus Ankara attached covalently to TMPEG-modified cationic liposomes overcomes pre-existing poxvirus immunity from recombinant vaccinia immunization. *J.Gen.Virol.* 88, 2007; 61-70.
310. Vanderplasschen, A. et al:Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 23-6-1998; 7544-7549.
311. Bell, E. et al:Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology* 325, 1-8-2004; 425-431.
312. Blasco, R., Sisler, J. R., a Moss, B.:Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *J.Virol.* 67, 1993; 3319-3325.
313. Broder, C. C. a Earl, P. L.:Design and construction of recombinant vaccinia viruses. *Methods Mol.Biol.* 62, 1997; 173-197.
314. Mackett, M. et al:Vaccinia virus recombinants: expression of VSV genes and protective immunization of mice and cattle. *Science* 227, 1985; 433-435.
315. Fuerst, T. R. et al:Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83, 1986; 8122-8126.
316. Pfeleiderer, M., Falkner, F. G., a Dorner, F.:Requirements for optimal expression of secreted and nonsecreted recombinant proteins in vaccinia virus systems. *Protein Express.Purif.* 6, 1995; 559-569.
317. Zhang, H. a Air, G. M.:Expression of functional influenza virus A polymerase proteins and template from cloned cDNAs in recombinant vaccinia virus infected cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 200, 1994; 95-101.
318. Carroll, M. W. a Moss, B.:Poxviruses as expression vectors. *Curr.Opin.Biotechnol.* 8, 1997; 573-577.
319. Earl, P. L., Hugin, A. W., a Moss, B.:Removal of cryptic poxvirus transcription termination signals from the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene enhances expression and immunogenicity of a recombinant vaccinia virus. *J.Virol.* 64, 1990; 2448-2451.
320. Yao, X. D. a Evans, D. H.:Effects of DNA structure and homology length on vaccinia virus recombination. *J.Virol.*2001.Aug.;75.(15.):6923.-32. 75, 2001; 6923-6932.
321. Serpinski, O. I. et al:[Construction of recombinant variants or orthopoxviruses by inserting foreign genes into intragenic region of viral genome]. *Mol.Biol.(Mosk)* 30, 1996; 1055-1065.
322. Mackett, M., Smith, G. L., a Moss, B.:Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79, 1982; 7415-7419.
323. Falkner, F. G. a Moss, B.:Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J.Virol.* 62, 1988; 1849-1854.
324. Coupar, B. E., Andrew, M. E., a Boyle, D. B.:A general method for the construction of recombinant vaccinia viruses expressing multiple foreign genes. *Gene* 68, 1988; 1-10.
325. Franke, C. A. et al:Immunisation of cattle with a recombinant togavirus-vaccinia virus strain. *Res.Vet.Sci.* 39, 1985; 113-115.
326. Lacalle, R. A. et al:Molecular analysis of the pac gene encoding a puromycin N-acetyl transferase from *Streptomyces alboniger*. *Gene* 79, 15-7-1989; 375-380.
327. Sanchez-Puig, J. M. a Blasco, R.:Puromycin resistance (pac) gene as a selectable marker in vaccinia virus. *Gene* 257, 17-10-2000; 57-65.

328. Krivogornitsyn, A. B. a Riazankina, O. I.: [Use of markers for selecting recombinant vaccinia viruses] Ispol'zovanie markerov dlia otbora rekombinantnykh virusov ospovaktsiny. *Mol.Biol.Mosk.* 29, 1995; 9-15.
329. del-Mar-Lorenzo, M. et al: Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: role of the cytoplasmic tail. *Virology* 252, 20-12-1998; 450-457.
330. Dominguez, J., Lorenzo, M. M., a Blasco, R.: Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 220, 1-11-1998; 115-121.
331. Chakrabarti, S., Brechling, K., a Moss, B.: Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol.Cell Biol.* 5, 1985; 3403-3409.
332. Carroll, M. W. a Moss, B.: E-coli beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques* 19, 1995; 352.
333. Hansen, S. G., Cope, T. A., a Hruby, D. E.: BiZyme: a novel fusion protein-mediated selection of vaccinia virus recombinants by fluorescence and antibiotic resistance. *Biotechniques* 32, 2002; 1178, 1180, 1182-1178, 1180, 1187.
334. Lai, A. C. a Chu, Y.: A rapid method for screening vaccinia virus recombinants. *Biotechniques* 10, 1991; 564-565.
335. Rodriguez, J. F. a Esteban, M.: Plaque size phenotype as a selectable marker to generate vaccinia virus recombinants. *J.Virol.* 63, 1989; 997-1001.
336. Perkus, M. E., Limbach, K., a Paoletti, E.: Cloning and expression of foreign genes in vaccinia virus, using a host range selection system. *J.Virol.* 63, 1989; 3829-3836.
337. Holzer, G. W. et al: Dominant host range selection of vaccinia recombinants by rescue of an essential gene. *Virology* 249, 15-9-1998; 160-166.
338. Karupiah, G., Blanden, R. V., a Ramshaw, I. A.: Interferon gamma is involved in the recovery of athymic nude mice from recombinant vaccinia virus/interleukin 2 infection. *J.Exp.Med.* 172, 1-11-1990; 1495-1503.
339. Slezak, K., Guzik, K., a Rokita, H.: Regulation of interleukin 12 and interleukin 10 expression in vaccinia virus-infected human monocytes and U-937 cell line. *Cytokine* 12, 2000; 900-908.
340. Wirth, S. et al: CD8(+) T cells secreting type 2 lymphokines are defective in protection against viral infection. *Cell Immunol.* 202, 25-5-2000; 13-22.
341. Ramshaw, I. et al: Expression of cytokines by recombinant vaccinia viruses: a model for studying cytokines in virus infections in vivo. *Immunol.Rev.* 127, 1992; 157-182.
342. Hugin, A. W., Flexner, C., a Moss, B.: Clearance of recombinant vaccinia virus expressing IL-2: role of local host immune responses. *Cell Immunol.* 152, 1993; 499-509.
343. Nishikawa, Y. et al: Expression of canine interferon-gamma by a recombinant vaccinia virus and its antiviral effect. *Virus Res.* 75, 2001; 113-121.
344. van Den, B. M. et al: IL-4 and IL-10 antagonize IL-12-mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of IFN-gamma and nitric oxide synthetase 2. *J.Immunol.* 2000.Jan.1; 164.(1):371-8. 164, 1-1-2000; 371-378.
345. Peplinski, G. R. et al: Prevention of murine breast cancer by vaccination with tumor cells modified by cytokine-producing recombinant vaccinia viruses. *Ann.Surg.Oncol.* 3, 1996; 15-23.
346. Ushio, S. et al: Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J.Immunol.* 156, 1-6-1996; 4274-4279.
347. Tanaka-Kataoka, M. et al: In vivo antiviral effect of interleukin 18 in a mouse model of vaccinia virus infection. *Cytokine* 11, 1999; 593-599.

348. Qin, H. a Chatterjee, S. K.:Recombinant vaccinia expressing interleukin-2 for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 3, 1996; 163-167.
349. Gherardi, M. M., Ramirez, J. C., a Esteban, M.:Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. *J.Virol.* 74, 2000; 6278-6286.
350. Gherardi, M. M. et al:IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. *J.Immunol.* 162, 1-6-1999; 6724-6733.
351. Nemeckova, S. et al:Experimental therapy of HPV16 induced tumors with IL12 expressed by recombinant vaccinia virus in mice. *Int.J.Mol.Med.* 12, 2003; 789-796.
352. Chen, B. et al:Evaluation of cytokine toxicity induced by vaccinia virus-mediated IL-2 and IL-12 antitumor immunotherapy. *Cytokine* 15, 21-9-2001; 305-314.
353. Kaufman, H. L. et al:Insertion of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes into vaccinia virus results in effective anti-tumor responses without toxicity. *Vaccine* 20, 15-3-2002; 1862-1869.
354. Kurilla, M. G. et al:Effects of virally expressed interleukin-10 on vaccinia virus infection in mice. *J.Virol.* 67, 1993; 7623-7628.
355. Liu, L. et al:Vaccinia virus induces strong immunoregulatory cytokine production in healthy human epidermal keratinocytes: a novel strategy for immune evasion. *J.Virol.* 79, 2005; 7363-7370.
356. Kaufman, H. L. et al:Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model. *J.Immunother.* 22, 1999; 489-496.
357. Seder, R. A. a Paul, W. E.:Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 12, 1994; 635-673.
358. Sharma, D. P. et al:Interleukin-4 mediates down regulation of antiviral cytokine expression and cytotoxic T-lymphocyte responses and exacerbates vaccinia virus infection in vivo. *J Virol* 70, 1996; 7103-7107.
359. Jackson, R. J. et al:Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J.Virol.* 75, 2001; 1205-1210.
360. Yao, Z. et al:Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J.Immunol.* 155, 15-12-1995; 5483-5486.
361. Patera, A. C. et al:Interleukin 17 modulates the immune response to vaccinia virus infection. *Virology* 299, 20-7-2002; 56-63.
362. Liu, B. et al:IL-17 is a potent synergistic factor with GM-CSF in mice in stimulating myelopoiesis, dendritic cell expansion, proliferation, and functional enhancement. *Exp.Hematol.* 38, 2010; 877-884.
363. Oyoshi, M. K. et al:Vaccinia virus inoculation in sites of allergic skin inflammation elicits a vigorous cutaneous IL-17 response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 1-9-2009; 14954-14959.
364. Kohyama, S. et al:IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a mechanism partly involving IL-17. *J.Immunol.* 179, 15-9-2007; 3917-3925.
365. Lyman, S. D. et al:Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75, 17-12-1993; 1157-1167.
366. Lyman, S. D. et al:Structural analysis of human and murine flt3 ligand genomic loci. *Oncogene* 11, 21-9-1995; 1165-1172.

367. Hannum, C. et al:Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368, 14-4-1994; 643-648.
368. Lyman, S. D. et al:Identification of soluble and membrane-bound isoforms of the murine flt3 ligand generated by alternative splicing of mRNAs. *Oncogene* 10, 5-1-1995; 149-157.
369. McClanahan, T. et al:Biochemical and genetic characterization of multiple splice variants of the Flt3 ligand. *Blood* 88, 1-11-1996; 3371-3382.
370. Stein, J., Borzillo, G. V., a Rettenmier, C. W.:Direct stimulation of cells expressing receptors for macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) by a plasma membrane-bound precursor of human CSF-1. *Blood* 76, 1-10-1990; 1308-1314.
371. Anderson, D. M. et al:Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 63, 5-10-1990; 235-243.
372. Cantrell, M. A. et al:Cloning, sequence, and expression of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 1985; 6250-6254.
373. Chklovskaja, E. et al:Mechanism of flt3 ligand expression in bone marrow failure: translocation from intracellular stores to the surface of T lymphocytes after chemotherapy-induced suppression of hematopoiesis. *Blood* 93, 15-4-1999; 2595-2604.
374. Chklovskaja, E. et al:Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A. *Blood* 97, 15-2-2001; 1027-1034.
375. McKenna, H. J. et al:Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 1-6-2000; 3489-3497.
376. Sitnicka, E. et al:Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity*. 17, 2002; 463-472.
377. Hudak, S. et al:FLT3/FLK2 ligand promotes the growth of murine stem cells and the expansion of colony-forming cells and spleen colony-forming units. *Blood* 85, 15-5-1995; 2747-2755.
378. Shah, A. J. et al:Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+. *Blood* 87, 1-5-1996; 3563-3570.
379. Rusten, L. S. et al:The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood* 87, 15-2-1996; 1317-1325.
380. McKenna, H. J. et al:Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 86, 1-11-1995; 3413-3420.
381. Muench, M. O. et al:Differential effects of interleukin-3, interleukin-7, interleukin 15, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors. *Exp.Hematol.* 28, 2000; 961-973.
382. Brasel, K. et al:Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood* 88, 15-9-1996; 2004-2012.
383. Mach, N. et al:Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 60, 15-6-2000; 3239-3246.
384. Li, W. et al:IL-12 antagonism enhances apoptotic death of T cells within hepatic allografts from Flt3 ligand-treated donors and promotes graft acceptance. *J.Immunol.* 166, 1-5-2001; 5619-5628.
385. Pisarev, V. M. et al:Flt3 ligand enhances the immunogenicity of a gag-based HIV-1 vaccine. *Int.J.Immunopharmacol.* 22, 2000; 865-876.

386. Maraskovsky, E. et al: Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184, 1-11-1996; 1953-1962.
387. Fong, L. et al: Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 17-7-2001; 8809-8814.
388. Pawlowska, A. B. et al: In vitro tumor-pulsed or in vivo Flt3 ligand-generated dendritic cells provide protection against acute myelogenous leukemia in nontransplanted or syngeneic bone marrow-transplanted mice. *Blood* 97, 1-3-2001; 1474-1482.
389. Peron, J. M. et al: FLT3-ligand administration inhibits liver metastases: role of NK cells. *J. Immunol.* 161, 1-12-1998; 6164-6170.
390. Chen, K. et al: Antitumor activity and immunotherapeutic properties of Flt3-ligand in a murine breast cancer model. *Cancer Res.* 57, 15-8-1997; 3511-3516.
391. Braun, S. E. et al: Flt3 ligand antitumor activity in a murine breast cancer model: a comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and a potential mechanism of action. *Hum. Gene Ther.* 10, 1-9-1999; 2141-2151.
392. Hung, C. F. et al: Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to a gene encoding the extracellular domain of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand. *Cancer Res.* 61, 1-2-2001; 1080-1088.
393. Lyman, S. D. et al: Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene* 8, 1993; 815-822.
394. Agnes, F. et al: Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene* 145, 5-8-1994; 283-288.
395. Zeigler, F. C. et al: Cellular and molecular characterization of the role of the flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood* 84, 15-10-1994; 2422-2430.
396. Rosnet, O. et al: Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 6, 1991; 1641-1650.
397. Rosnet, O. et al: Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 82, 15-8-1993; 1110-1119.
398. Zhang, S. a Broxmeyer, H. E.: Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 14-10-2000; 195-199.
399. Zhang, S. et al: Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J. Exp. Med.* 192, 4-9-2000; 719-728.
400. Lisovsky, M. et al: Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 88, 15-11-1996; 3987-3997.
401. Lisovsky, M. et al: Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia* 10, 1996; 1012-1018.
402. Zheng, R. et al: Lack of KIT or FMS internal tandem duplications but co-expression with ligands in AML. *Leuk. Res.* 28, 2004; 121-126.
403. Schnittger, S. et al: FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol.* 112, 2004; 68-78.
404. Reindl, C. a Spiekermann, K.: From kinases to cancer: leakiness, loss of autoinhibition and leukemia. *Cell Cycle* 5, 2006; 599-602.

405. Reindl, C. et al:Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 107, 1-5-2006; 3700-3707.
406. Zheng, R. et al:Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. *Blood* 103, 1-3-2004; 1883-1890.
407. Parcells, B. W. et al:FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cells* 24, 2006; 1174-1184.
408. Choudhary, C. et al:Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* 110, 1-7-2007; 370-374.
409. Choudhary, C. et al:Signal transduction of oncogenic Flt3. *Int.J.Hematol.* 82, 2005; 93-99.
410. Kim, K. T. et al:Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* 105, 15-2-2005; 1759-1767.
411. Scheijen, B. et al:FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene* 23, 22-4-2004; 3338-3349.
412. Miyatake, S. et al:Structure of the chromosomal gene for granulocyte-macrophage colony stimulating factor: comparison of the mouse and human genes. *EMBO J.* 4, 1985; 2561-2568.
413. Inaba, K. et al:Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* 176, 1-12-1992; 1693-1702.
414. Dranoff, G. et al:Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264, 29-4-1994; 713-716.
415. Dranoff, G. a Mulligan, R. C.:Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor revealed by gene transfer and gene knockout studies. *Stem Cells* 12 Suppl 1, 1994; 173-182.
416. Nakata, K. et al:Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes the proliferation of human alveolar macrophages in vitro. *J.Immunol.* 147, 15-8-1991; 1266-1272.
417. Hamilton, J. A. a Anderson, G. P.:GM-CSF Biology. *Growth Factors* 22, 2004; 225-231.
418. Steinman, R. M.:The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* 9, 1991; 271-296.
419. Banchereau, J. a Steinman, R. M.:Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 19-3-1998; 245-252.
420. Ridge, J. P., Di Rosa, F., a Matzinger, P.:A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell [see comments]. *Nature* 393, 4-6-1998; 474-478.
421. Eksioglu, E. A. et al:GM-CSF promotes differentiation of human dendritic cells and T lymphocytes toward a predominantly type 1 proinflammatory response. *Exp.Hematol.* 35, 2007; 1163-1171.
422. Lonial, S.:Immunomodulation: the role of hematopoietic cytokines. *Support.Cancer Ther.* 1, 1-1-2004; 80-88.
423. Cashen, A. F. et al:Cytokines and stem cell mobilization for autologous and allogeneic transplantation. *Curr.Hematol.Rep.* 3, 2004; 406-412.
424. Ferlazzo, G. et al:Dendritic cells generated from CD34+ progenitor cells with flt3 ligand, c-kit ligand, GM-CSF, IL-4, and TNF-alpha are functional antigen-presenting cells resembling mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunother* 23, 2000; 48-58.
425. Ferlazzo, G. et al:Dendritic cells generated from CD34+ progenitor cells with flt3 ligand, c-kit ligand, GM-CSF, IL-4, and TNF-alpha are functional antigen-presenting cells resembling mature monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunother.* 23, 2000; 48-58.

426. Dranoff, G. et al:Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 15-4-1993; 3539-3543.
427. Davidson, J. A. et al:Intralesional cytokine therapy in cancer: a pilot study of GM-CSF infusion in mesothelioma. *J.Immunother.* 21, 1998; 389-398.
428. Kass, E. et al:Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor produced by recombinant avian poxviruses enriches the regional lymph nodes with antigen-presenting cells and acts as an immunoadjuvant. *Cancer Res.* 61, 1-1-2001; 206-214.
429. Mclaughlin, J. P. et al:Immunization with a syngeneic tumor infected with recombinant vaccinia virus expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces tumor regression and long-lasting systemic immunity. *J.Immunother.* 20, 1997; 449-459.
430. Kass, E. et al:Comparative studies of the effects of recombinant GM-CSF and GM-CSF administered via a poxvirus to enhance the concentration of antigen- presenting cells in regional lymph nodes. *Cytokine.*2000.Jul.;12.(7.):960.-71. 12, 2000; 960-971.
431. Perez-Gomez, E. et al:The role of the tgf-Beta coreceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal.* 10, 2010; 2367-2384.
432. Lebrin, F. et al:Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 23, 13-10-2004; 4018-4028.
433. Li, C. Y., Suardet, L., a Little, J. B.:Potential role of WAF1/Cip1/p21 as a mediator of TGF-beta cytoinhibitory effect. *J.Biol.Chem.* 270, 10-3-1995; 4971-4974.
434. Elbendary, A. et al:Transforming growth factor beta 1 can induce CIP1/WAF1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells. *Cell Growth Differ.* 5, 1994; 1301-1307.
435. Derynck, R., Akhurst, R. J., a Balmain, A.:TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat.Genet.* 29, 2001; 117-129.
436. De Larco, J. E. a Todaro, G. J.:Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75, 1978; 4001-4005.
437. Kehrl, J. H.:Transforming growth factor-beta: an important mediator of immunoregulation. *Int.J.Cell Cloning* 9, 1991; 438-450.
438. Taipale, J. et al:Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 270, 3-3-1995; 4689-4696.
439. Hyytiainen, M., Penttinen, C., a Keski-Oja, J.:Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev.Clin.Lab Sci.* 41, 2004; 233-264.
440. Annes, J. P., Munger, J. S., a Rifkin, D. B.:Making sense of latent TGFbeta activation. *J.Cell Sci.* 116, 15-1-2003; 217-224.
441. Muraoka, R. S. et al:Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J.Clin.Invest* 109, 2002; 1551-1559.
442. Gotzmann, J. et al:Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat.Res.* 566, 2004; 9-20.
443. Nagaraj, N. S. a Datta, P. K.:Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 19, 2010; 77-91.



444. Ghiringhelli, F. et al: Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J.Exp.Med.* 202, 3-10-2005; 919-929.
445. Yang, L. et al: Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13, 2008; 23-35.
446. Torre-Amione, G. et al: A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 1990; 1486-1490.
447. Thomas, D. A. a Massague, J.: TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 2005; 369-380.
448. Strobl, H. a Knapp, W.: TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes.Infect.* 1, 1999; 1283-1290.
449. Yang, S. et al: Foxp3+IL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J.Leukoc.Biol.* 89, 2011; 85-91.
450. Dong, Y. et al: The Smad3 protein is involved in TGF-beta inhibition of class II transactivator and class II MHC expression. *J.Immunol.* 167, 1-7-2001; 311-319.
451. Nam, J. S. et al: Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res.* 68, 15-5-2008; 3915-3923.
452. Bouchard, C., Fridman, W. H., a Sautes, C.: Mechanism of inhibition of lipopolysaccharide-stimulated mouse B-cell responses by transforming growth factor-beta 1. *Immunol.Lett.* 40, 1994; 105-110.
453. Kehrl, J. H. et al: Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J.Immunol.* 146, 1-6-1991; 4016-4023.
454. Lu, S. L. et al: Two divergent signaling pathways for TGF-beta separated by a mutation of its type II receptor gene. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 259, 7-6-1999; 385-390.
455. Sun, L. et al: Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J.Biol.Chem.* 269, 21-10-1994; 26449-26455.
456. Garrigue-Antar, L. et al: Missense mutations of the transforming growth factor beta type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res.* 55, 15-9-1995; 3982-3987.
457. Miyaki, M. et al: Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 18, 20-5-1999; 3098-3103.
458. Zhang, B. et al: Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2010; 969-980.
459. Maliekal, T. T. et al: Loss of expression, and mutations of Smad 2 and Smad 4 in human cervical cancer. *Oncogene* 22, 31-7-2003; 4889-4897.
460. Levy, L. a Hill, C. S.: Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 2006; 41-58.
461. Ku, J. L. et al: Genetic alterations of the TGF-beta signaling pathway in colorectal cancer cell lines: a novel mutation in Smad3 associated with the inactivation of TGF-beta-induced transcriptional activation. *Cancer Lett.* 247, 18-3-2007; 283-292.
462. Massague, J.: TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 25-7-2008; 215-230.
463. Shields, R. L. et al: High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J.Biol.Chem.* 276, 2-3-2001; 6591-6604.

464. Ghose, S. et al:Antibody variable region interactions with Protein A: implications for the development of generic purification processes. *Biotechnol.Bioeng.* 92, 20-12-2005; 665-673.
465. Ghetie, V. a Ward, E. S.:Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. *Annu.Rev.Immunol.* 18, 2000; 739-766.
466. Dall'Acqua, W. F., Kiener, P. A., a Wu, H.:Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J.Biol.Chem.* 281, 18-8-2006; 23514-23524.
467. Dall'Acqua, W. F. et al:Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region. *J.Immunol.* 177, 15-7-2006; 1129-1138.
468. Moutel, S. et al:A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC.Biotechnol.* 9, 2009; 14.
469. Gatto, B.:Biologics targeted at TNF: design, production and challenges. *Reumatismo.* 58, 2006; 94-103.
470. Baker, T. S. et al:Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys.J.* 60, 1991; 1445-1456.
471. Crawford, L. V. a CRAWFORD, E. M.:A COMPARATIVE STUDY OF POLYOMA AND PAPILOMA VIRUSES. *Virology* 21, 1963; 258-263.
472. de Villiers, E. M. et al:Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 20-6-2004; 17-27.
473. Canadas, M. P. et al:Concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a high-risk population. *J.Clin.Microbiol.* 42, 2004; 1330-1332.
474. de-Sanjose S. a Palefsky, J.:Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res.* 89, 2002; 201-211.
475. Josefsson, A. M. et al:Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355, 24-6-2000; 2189-2193.
476. Richart, R. M. a Barron, B. A.:A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 105, 1-10-1969; 386-393.
477. Ghaderi, M. et al:Risk of invasive cervical cancer associated with polymorphic HLA DR/DQ haplotypes. *Int.J.Cancer* 100, 20-8-2002; 698-701.
478. Hakama, M. et al:Joint effect of HPV16 with Chlamydia trachomatis and smoking on risk of cervical cancer: antagonism or misclassification (Nordic countries). *Cancer Causes Control* 11, 2000; 783-790.
479. Munoz, N. et al:Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N.Engl.J.Med.* 348, 6-2-2003; 518-527.
480. Tachezy, R. a Rob, L.:Cervical cancer screening in the Czech Republic. *Coll.Antropol.* 31 Suppl 2, 2007; 27-29.
481. von Knebel, D. M.:New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur.J.Cancer* 38, 2002; 2229-2242.
482. Doorbar, J. et al:Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* 238, 10-11-1997; 40-52.
483. Doorbar, J.:Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin.Sci.(Lond)* 110, 2006; 525-541.
484. Jenson, A. B., Kurman, R. J., a Lancaster, W. D.:Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. *Obstet.Gynecol.Clin.North Am.* 14, 1987; 397-406.

485. Wheeler, C. M.:Advances in primary and secondary interventions for cervical cancer: human papillomavirus prophylactic vaccines and testing. *Nat.Clin.Pract.Oncol.* 4, 2007; 224-235.
486. McCance, D. J. et al:Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, 1988; 7169-7173.
487. Petti, L. a DiMaio, D.:Specific interaction between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and the beta receptor for platelet-derived growth factor in stably transformed and acutely transfected cells. *J.Virol.* 68, 1994; 3582-3592.
488. Rodriguez, M. I., Finbow, M. E., a Alonso, A.:Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* 19, 3-8-2000; 3727-3732.
489. Zhang, B. et al:The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* 310, 25-5-2003; 100-108.
490. Kim, S. W. a Yang, J. S.:Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target. *Yonsei Med.J.* 47, 28-2-2006; 1-14.
491. Crusius, K., Auvinen, E., a Alonso, A.:Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 15, 18-9-1997; 1437-1444.
492. Jin, H., Wang, J., a Zuo, Y.:[Expression of c-jun, c-fos and MDM2 mRNA in cultured keratinocytes through transfecting HPV16]. *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* 81, 10-2-2001; 171-173.
493. Stanley, M. A.:Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection. *Expert.Rev.Vaccines.* 2, 2003; 381-389.
494. Scheffner, M. et al:The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 5-11-1993; 495-505.
495. Zimmermann, H. et al:Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J.Gen.Virol.* 81, 2000; 2617-2623.
496. Scheffner, M. et al:Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. *J.Virol.* 66, 1992; 5100-5105.
497. Scheffner, M. et al:The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 1-7-1991; 5523-5527.
498. Shamanin, V. A. a Androphy, E. J.:Immortalization of human mammary epithelial cells is associated with inactivation of the p14ARF-p53 pathway. *Mol.Cell Biol.* 24, 2004; 2144-2152.
499. White, A. E., Livanos, E. M., a Tlsty, T. D.:Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev.* 8, 15-3-1994; 666-677.
500. Phelps, W. C. et al:The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53, 20-5-1988; 539-547.
501. Flores, E. R. et al:The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J.Virol.* 74, 2000; 6622-6631.
502. McCormack, P. L. a Joura, E. A.:Quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil(R)): a review of its use in the prevention of premalignant genital lesions, genital cancer and genital warts in women. *Drugs* 70, 24-12-2010; 2449-2474.
503. David, M. P. et al:Long-term persistence of anti-HPV-16 and -18 antibodies induced by vaccination with the AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: modeling of sustained antibody responses. *Gynecol.Oncol.* 115, 2009; S1-S6.

504. Day, P. M. et al: In vivo mechanisms of vaccine-induced protection against HPV infection. *Cell Host.Microbe* 8, 16-9-2010; 260-270.
505. Campo, M. S. a Roden, R. B.: Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches. *J.Virol.* 84, 2010; 1214-1220.
506. Cid-Arregui, A.: Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *Open.Virol.J.* 3, 2009; 67-83.
507. Sheets, E. E. et al: Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 188, 2003; 916-926.
508. Klencke, B. et al: Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a Phase I study of ZYC101. *Clin.Cancer Res.* 8, 2002; 1028-1037.
509. Lin, K. et al: Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *J.Formos.Med.Assoc.* 109, 2010; 4-24.
510. Santin, A. D. et al: Vaccination with HPV-18 E7-pulsed dendritic cells in a patient with metastatic cervical cancer. *N.Engl.J.Med.* 346, 30-5-2002; 1752-1753.
511. Chang, E. Y. et al: Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine. *Int.J.Cancer* 86, 1-6-2000; 725-730.
512. Kenter, G. G. et al: Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N.Engl.J.Med.* 361, 5-11-2009; 1838-1847.
513. Welters, M. J. et al: Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin.Cancer Res.* 14, 1-1-2008; 178-187.
514. Einstein, M. H. et al: Heat shock fusion protein-based immunotherapy for treatment of cervical intraepithelial neoplasia III. *Gynecol.Oncol.* 106, 2007; 453-460.
515. Thompson, H. S. et al: Phase I safety and antigenicity of TA-GW: a recombinant HPV6 L2E7 vaccine for the treatment of genital warts. *Vaccine* 17, 1999; 40-49.
516. Hallez, S. et al: Phase I/II trial of immunogenicity of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein-based vaccine in women with oncogenic HPV-positive cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Immunol.Immunother.* 53, 2004; 642-650.
517. Kenter, G. G. et al: Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. *Clin.Cancer Res.* 14, 1-1-2008; 169-177.
518. Riezebos-Brilman, A. et al: Augmentation of alphavirus vector-induced human papilloma virus-specific immune and anti-tumour responses by co-expression of interleukin-12. *Vaccine* 27, 29-1-2009; 701-707.
519. Gomez-Gutierrez, J. G. et al: Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol.Immunother.* 56, 2007; 997-1007.
520. Kaufmann, A. M. et al: Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clin.Cancer Res.* 8, 2002; 3676-3685.
521. Chuang, C. M. et al: Enhancing therapeutic HPV DNA vaccine potency through depletion of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Vaccine* 27, 29-1-2009; 684-689.

522. Kim, K. H. et al:Expression and localization of human papillomavirus type 16 E6 and E7 open reading frame proteins in human epidermal keratinocyte. *Yonsei.Med.J.* 35, 1994; 1-9.
523. Meneguzzi, G. et al:Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7. *Virology* 181, 1991; 62-69.
524. Sato, H. et al:Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in *Escherichia coli* and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology* 170, 1989; 311-315.
525. Germain, R. N. et al:Structure and function of murine class II major histocompatibility complex genes. *Mt.Sinai J.Med.* 53, 1986; 194-201.
526. Neefjes, J. J. et al:The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61, 6-4-1990; 171-183.
527. Schumacher, T. N. et al:Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell* 62, 10-8-1990; 563-567.
528. Polydefkis, M. et al:Anchor sequence-dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4+ T cell recognition. *J.Exp.Med.* 171, 1990; 875-887.
529. Eager, K. B. et al:Murine cell lines stably expressing the influenza virus hemagglutinin gene introduced by a recombinant retrovirus vector are constitutive targets for MHC class I- and class II-restricted T lymphocytes. *J.Immunol.* 143, 1-10-1989; 2328-2335.
530. Chen, J. W. et al:Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J.Cell Biol.* 101, 1985; 85-95.
531. Peters, C. et al:Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* 9, 1990; 3497-3506.
532. Casanova, J. E. et al:Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis. *Science* 248, 11-5-1990; 742-745.
533. Williams, M. A. a Fukuda, M.:Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J.Cell Biol.* 111, 1990; 955-966.
534. Wu, T. C. et al:Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 1995; 11671-11675.
535. Kang, T. H. et al:Enhancement of dendritic cell-based vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments. *Immunol.Lett.* 106, 15-8-2006; 126-134.
536. Boon, T. et al:Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 12, 1994; 337-365.
537. Chen, C. H. a Wu, T. C.:Experimental vaccine strategies for cancer immunotherapy. *J.Biomed.Sci.* 5, 1998; 231-252.
538. Chu, N. R. et al:Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin.Exp.Immunol.* 121, 2000; 216-225.
539. Cheng, W. F. et al:Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J.Clin.Invest* 108, 2001; 669-678.
540. Smahel, M. et al:Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules. *Vaccine* 21, 7-3-2003; 1125-1136.
541. Tindle, R. W.:Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr.Opin.Immunol.* 8, 1996; 643-650.

542. Li, Y. L. et al:Vaccination of full-length HPV16 E6 or E7 protein inhibits the growth of HPV16 associated tumors. *Oncol.Rep.* 24, 2010; 1323-1329.
543. Kim, D. et al:DNA vaccine with alpha-galactosylceramide at prime phase enhances anti-tumor immunity after boosting with antigen-expressing dendritic cells. *Vaccine* 28, 21-10-2010; 7297-7305.
544. Ghaemi, A. et al:Recombinant lambda-phage nanobioparticles for tumor therapy in mice models. *Genet.Vaccines.Ther.* 8, 2010; 3.
545. Boursnell, M. E. G. et al:Construction and characterisation of a recombinant vaccinia was expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine* 14, 1996; 1485-1494.
546. Lamikanra, A. et al:Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8(+) T-cell responses that home to the tumor site. *J.Virol.* 75, 2001; 9654-9664.
547. Zurkova, K. et al:The expression of the soluble isoform of hFlt3 ligand by recombinant vaccinia virus enhances immunogenicity of the vector. *Oncol.Rep.* 21, 2009; 1335-1343.
548. Feltkamp, M. C. et al:Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur.J.Immunol.* 23, 1993; 2242-2249.
549. Kutinova, L. et al:Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 13, 1995; 487-493.
550. Ludvikova, V. et al:Evaluation of various virulence tests with low virulence vaccinia virus in mice. *Biologicals.* 22, 1994; 187-190.
551. Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V., a Stickl, H.:Abstammung, Eigenschaften und Verwendung de attenuierten Vaccinia Stammes MVA. *Infection* 3, 1975; 6-16.
552. Mahnel, H.:[Vaccination against mouse pox] Schutzimpfung gegen Mausepocken. *Tierarztl.Prax.* 13, 1985; 403-407.
553. Sutter, G. a Moss, B.:Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 1992; 10847-10851.
554. Antoine, G. et al:The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244, 10-5-1998; 365-396.
555. Wyatt, L. S. et al:Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara. *Virology* 251, 25-11-1998; 334-342.
556. Ramesh, N. et al:CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor--armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. *Clin.Cancer Res.* 12, 1-1-2006; 305-313.
557. Kohno, S. I. et al:Oncolytic virotherapy with an HSV amplicon vector expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using the replication-competent HSV type 1 mutant HF10 as a helper virus. *Cancer Gene Ther.* 14, 2007; 918-926.
558. Nishijima, I. et al:A human GM-CSF receptor expressed in transgenic mice stimulates proliferation and differentiation of hemopoietic progenitors to all lineages in response to human GM-CSF. *Mol.Biol.Cell* 6, 1995; 497-508.
559. Malhotra, S. et al:Use of an oncolytic virus secreting GM-CSF as combined oncolytic and immunotherapy for treatment of colorectal and hepatic adenocarcinomas. *Surgery* 141, 2007; 520-529.
560. Lun, X. et al:Efficacy and safety/toxicity study of recombinant vaccinia virus JX-594 in two immunocompetent animal models of glioma. *Mol.Ther.* 18, 2010; 1927-1936.

561. Lee, J. H. et al:Oncolytic and immunostimulatory efficacy of a targeted oncolytic poxvirus expressing human GM-CSF following intravenous administration in a rabbit tumor model. *Cancer Gene Ther.* 17, 2010; 73-79.
562. Averbook, B. J. et al:Antitumor effects of Flt3 ligand in transplanted murine tumor models. *J.Immunother.* 25, 2002; 27-35.
563. Zhou, Q. et al:Augmented humoral and cellular immune response of hepatitis B virus DNA vaccine by micro-needle vaccination using Flt3L as an adjuvant. *Vaccine* 28, 3-2-2010; 1357-1362.
564. Esche, C. et al:Differential regulation of epidermal and dermal dendritic cells by IL-12 and Flt3 ligand. *J.Invest Dermatol.* 113, 1999; 1028-1032.
565. Silver, D. F. et al:Flt-3 ligand inhibits growth of human ovarian tumors engrafted in severe combined immunodeficient mice. *Gynecol.Oncol.* 77, 2000; 377-382.
566. Seo, S. H. et al:Optimal induction of HPV DNA vaccine-induced CD8+ T cell responses and therapeutic antitumor effect by antigen engineering and electroporation. *Vaccine* 27, 25-9-2009; 5906-5912.
567. Encke, J. et al:Genetic vaccination with Flt3-L and GM-CSF as adjuvants: Enhancement of cellular and humoral immune responses that results in protective immunity in a murine model of hepatitis C virus infection. *World J.Gastroenterol.* 12, 28-11-2006; 7118-7125.
568. Bernt, K. M. et al:Assessment of a combined, adenovirus-mediated oncolytic and immunostimulatory tumor therapy. *Cancer Res.* 65, 15-5-2005; 4343-4352.
569. Nair, R. E. et al:Chronic immune therapy induces a progressive increase in intratumoral T suppressor activity and a concurrent loss of tumor-specific CD8+ T effectors in her-2/neu transgenic mice bearing advanced spontaneous tumors. *J.Immunol.* 176, 15-6-2006; 7325-7334.
570. Gallina, G. et al:Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J.Clin.Invest* 116, 2006; 2777-2790.
571. Serafini, P. et al:High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 64, 1-9-2004; 6337-6343.
572. Rosenthal, E. et al:Elevated expression of TGF-beta1 in head and neck cancer-associated fibroblasts. *Mol.Carcinog.* 40, 2004; 116-121.
573. Ostroukhova, M. et al:Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J.Clin.Invest* 114, 2004; 28-38.
574. Komesli, S., Vivien, D., a Dutartre, P.:Chimeric extracellular domain type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF-beta antagonist. *Eur.J.Biochem.* 254, 15-6-1998; 505-513.
575. Foster, A. E. et al:Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF-beta receptor. *J.Immunother.* 31, 2008; 500-505.
576. Kontani, K. et al:Spontaneous elicitation of potent antitumor immunity and eradication of established tumors by administration of DNA encoding soluble transforming growth factor-beta II receptor without active antigen-sensitization. *Cancer Immunol.Immunother.* 55, 2006; 579-587.
577. Oft, M., Heider, K. H., a Beug, H.:TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr.Biol.* 8, 19-11-1998; 1243-1252.
578. Won, J. et al:Tumorigenicity of mouse thymoma is suppressed by soluble type II transforming growth factor beta receptor therapy. *Cancer Res.* 59, 15-3-1999; 1273-1277.

579. Suzuki, E. et al:Soluble type II transforming growth factor-beta receptor inhibits established murine malignant mesothelioma tumor growth by augmenting host antitumor immunity. *Clin.Cancer Res.* 10, 1-9-2004; 5907-5918.
580. Breitkopf, K. et al:Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 29, 2005; 121S-131S.
581. Muraoka, R. S. et al:Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1. *Mol.Cell Biol.* 23, 2003; 8691-8703.
582. Salnikov, A. V. et al:Inhibition of TGF-beta modulates macrophages and vessel maturation in parallel to a lowering of interstitial fluid pressure in experimental carcinoma. *Lab Invest* 85, 2005; 512-521.
583. Hypes, M. K., Pirisi, L., a Creek, K. E.:Mechanisms of decreased expression of transforming growth factor-beta receptor type I at late stages of HPV16-mediated transformation. *Cancer Lett.* 282, 18-9-2009; 177-186.
584. Kim, S. et al:Systemic blockade of transforming growth factor-beta signaling augments the efficacy of immunogene therapy. *Cancer Res.* 68, 15-12-2008; 10247-10256.
585. Bereta, M. et al:Immune properties of recombinant vaccinia virus encoding CD154 (CD40L) are determined by expression of virally encoded CD40L and the presence of CD40L protein in viral particles. *Cancer Gene Ther.* 11, 2004; 808-818.
586. Franke, C. A. a Hruby, D. E.:Association of non-viral proteins with recombinant vaccinia virus virions. *Arch.Virol.* 94, 1987; 347-351.
587. Gomez, C. E. a Esteban, M.:Recombinant proteins produced by vaccinia virus vectors can be incorporated within the virion (IMV form) into different compartments. *Arch.Virol.* 146, 2001; 875-892.
588. Castro, A. P. et al:Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles. *J.Virol.* 77, 2003; 9052-9068.
589. Husain, M., Weisberg, A. S., a Moss, B.:Sequence-independent targeting of transmembrane proteins synthesized within vaccinia virus factories to nascent viral membranes. *J.Virol.* 81, 2007; 2646-2655.
590. Byrd, C. M. a Hruby, D. E.:Vaccinia virus proteolysis--a review. *Rev.Med.Virol.* 16, 2006; 187-202.
591. Flexner, C., Hugin, A., a Moss, B.:Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression. *Nature* 330, 1987; 259-262.
592. Perera, L. P., Goldman, C. K., a Waldmann, T. A.:Comparative assessment of virulence of recombinant vaccinia viruses expressing IL-2 and IL-15 in immunodeficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 24-4-2001; 5146-5151.
593. da Fonseca, F. G. et al:Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail. *J.Virol.*2000.Aug.;74.(16.):7508.-17. 74, 2000; 7508-7517.
594. da Fonseca, F. G. et al:Effects of deletion or stringent repression of the H3L envelope gene on vaccinia virus replication. *J.Virol.*2000.Aug.;74.(16.):7518.-28. 74, 2000; 7518-7528.
595. Niles, E. G. a Seto, J.:Vaccinia virus gene D8 encodes a virion transmembrane protein. *J.Virol.* 62, 1988; 3772-3778.
596. Ichihashi, Y.:Unit Complex of vaccinia polypeptides linked by disulfide bridges. *Virology* 113, 1981; 277-284.
597. Heljasvaara, R. et al:The major core protein P4a (A10L gene) of vaccinia virus is essential for correct assembly of viral DNA into the nucleoprotein complex to form immature viral particles. *J.Virol.* 75, 2001; 5778-5795.



598. Vanslyke, J. K., Franke, C. A., a Hruby, D. E.:Proteolytic maturation of vaccinia virus core proteins: identification of a conserved motif at the N termini of the 4b and 25K virion proteins. *J.Gen.Virol.* 72, 1991; 411-416.
599. Vanslyke, J. K. a Hruby, D. E.:Immunolocalization of vaccinia virus structural proteins during virion formation. *Virology* 198, 1994; 624-635.
600. Jensen, O. N. et al:Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis. *J.Virol.* 70, 1996; 7485-7497.
601. Payne, L. G.:Characterization of vaccinia virus glycoproteins by monoclonal antibody precipitation. *Virology* 187, 1992; 251-260.
602. Byrd, C. M. a Hruby, D. E.:Development of an in vitro cleavage assay system to examine vaccinia virus I7L cysteine proteinase activity. *Virol.J.* 2, 2005; 63.
603. Hedengren-Olcott, M. et al:The vaccinia virus G1L putative metalloproteinase is essential for viral replication in vivo. *J.Virol.* 78, 2004; 9947-9953.
604. Byrd, C. M. et al:New class of orthopoxvirus antiviral drugs that block viral maturation. *J.Virol.* 78, 2004; 12147-12156.
605. Mejean, C. et al:Antigenic probes locate binding sites for the glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase and phosphofructokinase on the actin monomer in microfilaments. *Biochem.J.* 264, 15-12-1989; 671-677.
606. Puthenveedu, M. A. et al:GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat.Cell Biol.* 8, 2006; 238-248.
607. Puthenveedu, M. A. a Linstedt, A. D.:Gene replacement reveals that p115/SNARE interactions are essential for Golgi biogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 3-2-2004; 1253-1256.
608. Puthenveedu, M. A. a Linstedt, A. D.:Evidence that Golgi structure depends on a p115 activity that is independent of the vesicle tether components giantin and GM130. *J.Cell Biol.* 155, 15-10-2001; 227-238.
609. Alvarez, C. et al:The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic. *J.Biol.Chem.* 276, 26-1-2001; 2693-2700.
610. Nelson, D. S. et al:The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function. *J.Cell Biol.* 143, 19-10-1998; 319-331.
611. Scholl, S. M. et al:Recombinant vaccinia virus encoding human MUC1 and IL2 as immunotherapy in patients with breast cancer. *J.Immunother.* 23, 2000; 570-580.
612. Scholl, S. et al:Metastatic Breast Tumour Regression Following Treatment by a Gene-Modified Vaccinia Virus Expressing MUC1 and IL-2. *J.Biomed.Biotechnol.* 2003, 2003; 194-201.
613. Pantuck, A. J. et al:Phase I trial of antigen-specific gene therapy using a recombinant vaccinia virus encoding MUC-1 and IL-2 in MUC-1-positive patients with advanced prostate cancer. *J.Immunother.* 27, 2004; 240-253.
614. Smith, C. L. et al:Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara. *J.Immunol.* 175, 15-12-2005; 8431-8437.
615. Smith, C. L. et al:Recombinant modified vaccinia Ankara primes functionally activated CTL specific for a melanoma tumor antigen epitope in melanoma patients with a high risk of disease recurrence. *Int.J.Cancer* 113, 10-1-2005; 259-266.
616. Goepfert, P. A. et al:Phase 1 Safety and Immunogenicity Testing of DNA and Recombinant Modified Vaccinia Ankara Vaccines Expressing HIV-1 Virus-like Particles. *J.Infect.Dis.* 203, 2011; 610-619.

617. Dunachie, S. J. et al: MIG and the regulatory cytokines IL-10 and TGF-beta1 correlate with malaria vaccine immunogenicity and efficacy. *PLoS.One.* 5, 2010; e12557.
618. Howles, S. et al: Vaccination with a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-vectored HIV-1 immunogen induces modest vector-specific T cell responses in human subjects. *Vaccine* 28, 21-10-2010; 7306-7312.
619. Litzinger, M. T. et al: Comparative analysis of MVA-CD40L and MVA-TRICOM vectors for enhancing the immunogenicity of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk.Res.* 34, 2010; 1351-1357.
620. Madan, R. A. et al: Prostavac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 18, 2009; 1001-1011.
621. Yang, S. a Schlom, J.: Antigen-presenting cells containing multiple costimulatory molecules promote activation and expansion of human antigen-specific memory CD8+ T cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 58, 2009; 503-515.
622. Marshall, J. L. et al: Phase I study of sequential vaccinations with fowlpox-CEA(6D)-TRICOM alone and sequentially with vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas. *J.Clin.Oncol.* 23, 1-2-2005; 720-731.
623. Lin, C. T. et al: Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-Specific T cell precursor frequencies and antitumor effects of HPV-16 E7-expressing Sindbis virus replicon particles. *Mol.Ther.* 8, 2003; 559-566.
624. Kim, T. W. et al: DNA vaccines employing intracellular targeting strategies and a strategy to prolong dendritic cell life generate a higher number of CD8+ memory T cells and better long-term antitumor effects compared with a DNA prime-vaccinia boost regimen. *Hum.Gene Ther.* 16, 2005; 26-34.
625. Radaelli, A. et al: Fowlpox virus recombinants expressing HPV-16 E6 and E7 oncogenes for the therapy of cervical carcinoma elicit humoral and cell-mediated responses in rabbits. *J.Transl.Med.* 8, 2010; 40.
626. Mackova, J. et al: Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunol.Immunother.* 55, 2006; 39-46.
627. Davidson, E. J. et al: Effect of TA-CIN (HPV 16 L2E6E7) booster immunisation in vulval intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV 16/18 E6E7). *Vaccine* 22, 29-7-2004; 2722-2729.
628. Smyth, L. J. et al: Immunological responses in women with human papillomavirus type 16 (HPV-16)-associated anogenital intraepithelial neoplasia induced by heterologous prime-boost HPV-16 oncogene vaccination. *Clin.Cancer Res.* 10, 1-5-2004; 2954-2961.
629. Borysiewicz, L. K. et al: A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 347, 1996; 1523-1527.
630. Fiander, A. N. et al: Prime-boost vaccination strategy in women with high-grade, noncervical anogenital intraepithelial neoplasia: clinical results from a multicenter phase II trial. *Int.J.Gynecol.Cancer* 16, 2006; 1075-1081.

## 7 SOUHRN

Virus vakcínie lze využít pro vyvolání imunitní reakce proti virem produkovanému heterolognímu proteinu a organismus tak připravit na obranu proti přirozenému producentu tohoto antigenu, např. viru nebo nádorových buněk. V naší laboratoři jsou vyvíjeny vakcíny proti nádorům způsobeným lidským papilomavirem typu 16 (HPV16). Používají se rekombinantní viry vakcínie odvozené z replikujícího se kmene P13 nebo atenuovaného MVA. Rekombinantní viry byly použity v profylaktických i terapeutických schématech léčby u myšího modelu nádorových buněk TC-1 či TC-1/A9. Rekombinanty exprimovaly papilomavirový onkogen E7 ve formě vysoce imunogenního SigE7LAMP fúzního konstruktů. Pro podporu imunitního systému byly do virů vloženy navíc i geny pro stimulační cytokiny GM-CSF nebo Flt3 ligand, které vykazují adjuvantní vlastnosti při vyvolání protinádorových odpovědí. Pro imunomodulaci nádorového mikroprostředí byly do rekombinantních virů vloženy geny pro solubilní receptory pro TGF- $\beta$ , jejichž funkcí bylo snížit inhibiční vliv nádorového cytokinu TGF- $\beta$ . Intratumorální či intraperitoneální podání virů vedlo ke zvýšení protinádorové odpovědi, u virů exprimujících Flt3 ligand také ke zvýšení počtu cytotoxických E7-specifických T lymfocytů. Expres GM-CSF a Flt3 ligandu zabránila vzniku supresorových MDSC buněk, ale exprese receptoru pro TGF- $\beta$  překvapivě neovlivnila počet supresorových T-regulačních lymfocytů.

Dále jsme zjistili, že silná exprese Flt3 ligandu *in vitro* u jednoduché rekombinanty vedla ke změnám v proteinovém složení virionů. Málo glykosylovaná molekula ligandu je inkorporována do virionu, docházelo ke špatnému proteolytickému štěpení proteinů virového jádra a ke změnám v obsahu hlavních virových membránových proteinů. Virus byl inhibován při množení v buněčných kulturách krevního původu a v myších ováriích. Inhibice *in vivo* měla také ve srovnání s málo produkujícím virem za následek sníženou hladinu Flt3 ligandu v séru infikovaných myší.

## 8 SUMMARY

Recombinant vaccinia virus has been used for elicitation of the immune response against expressed heterologous proteins which has led to protection of the host organisms against the agents producing that antigen (viruses, cancer cells). In our laboratory, we designed and evaluated several vaccines against cancer caused by human papillomavirus type 16 (HPV16). Vaccinia viruses derived from replication competent strain P13 or attenuated MVA were used for construction of recombinant viruses expressing HPV16-E7 in highly immunogenic fusion construct SigE7LAMP. Recombinant viruses were used both in prophylactic and therapeutic settings in mouse tumor models using TC-1 or TC-1/A9 cells. The genes encoding stimulatory cytokines GM-CSF or Flt3 ligand were inserted into the above viruses to support the immune system and to potentiate the anticancer response. Tumor microenvironment was modified using the recombinant viruses expressing both the E7 gene and soluble receptor for TGF- $\beta$  which should decrease the inhibition of immune system caused by tumor TGF- $\beta$  cytokine and elicit the response against tumor cells. Intratumoral or intraperitoneal administration of viruses enhanced anticancer response in mice, the viruses expressing Flt3 ligand induced the proliferation of E7-specific cytotoxic T lymphocytes. The expression of GM-CSF and Flt3 ligand prevented the formation of suppressor cells MDSC; however, the expression of receptor for TGF- $\beta$  did not influence the numbers of suppressor regulatory T lymphocytes.

We further determined that the strong Flt3 ligand expression by single recombinant virus led to several changes in protein composition of virions *in vitro*. The low-glycosylated molecule of the ligand was incorporated into virion core, proteolytical cleavage of viral proteins was incorrect and there were also changes in composition of major viral membrane proteins. The virus multiplication was affected in cell cultures derived from hematopoietic cells as well as in mouse ovaries. The attenuation of virus *in vivo* has led also to decreased Flt3 ligand level in serum of infected mice in comparison with other recombinant viruses expressing the cytokine.