

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Karboxylované calix[4]areny jako antagonisté aktivačního  
receptoru lymfocytů CD69

Carboxylated calix[4]arenes as antagonists of the lymphocyte  
activation receptor CD69

Bakalářská práce  
Praha 2008

Vypracovala: Renata Šnajdrová  
Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

**UNIVERZITA KARLOVA v Praze**  
Přirodovědecká fakulta  
Oborová knihovna chemie  
Albertov 6, 120 43 Praha 2  
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208  
UK 22

*proš. 138b/08 stud*  
*(brach.)*

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 1.9. 2008

Renata Šnajdrová

Renata Šnajdrová

## Poděkování

Děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. z Laboratoře architektury proteinů Mikrobiologického ústavu AV ČR v.v.i. za vedení bakalářské práce, za jeho cenné rady a pomoc při jejím vypracovávání.

Dále bych chtěla poděkovat Prof. Ing. Vladimíru Stiborovi z VŠCHT v Praze za poskytnutí calix[4]arenových koster, vedoucímu Laboratoře biotransformací Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. a Ing. Karlu Křenkovi z Laboratoře biotransformací za navázání karboxylových skupin na calix[4]arenové kostry.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala mým rodičům za psychickou a finanční podporu během mého studia.

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	6
ÚVOD.....	7
1.1 Calix[n]areny.....	7
1.2 Využití calix[n]arenů v organické chemii a farmakologii .....	8
1.3 Derivatizace calix[n]arenové kostry.....	9
1.4 Zabíječské lymfocyty a jejich receptory .....	10
1.4.1 NK buňky .....	10
1.4.2 Receptor CD69 .....	11
1.5 Interakce ligandů s receptory zabíječských lymfocytů .....	12
1.5.1 Interakce sacharidových ligandů s lektinovými receptory .....	12
1.5.2 Interakce calix[4]arenových derivátů s lektinovými receptory .....	13
1.6 Použití calix[4]arenů v protinádorových terapiích.....	14
2 CÍLE PRÁCE.....	15
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	16
3.1 Seznam použitých materiálů, přístrojů a zařízení .....	16
3.1.1 Použité chemikálie.....	16
3.1.2 Popis použitých ligandových dimerů a calix[4]arenových preparátů.....	16
3.1.3 Použité pomůcky, přístroje a zařízení.....	17
3.2 Precipitační testy s rozpustným CD69 receptorem značeným pomocí rhodaminu.....	18
3.2.1 Příprava rozpustného receptoru CD69 a jeho značení rhodaminem .....	18
3.2.2 Precipitační testy .....	18
3.3 Měření interakčních konstant metodou zhášení fluorescence tryptofanů .....	19
3.4 Provedení a vyhodnocení testu buněčné aktivace měřením produkce inositolfosfátů ....	20
3.4.1 Příprava CD69 pozitivních a CD69 negativních lymfocytů.....	20
3.4.2 Test buněčné aktivace měřením produkce inositolfosfátů.....	20
4 VÝSLEDKY .....	22
4.1 Precipitační testy s rozpustným CD69 receptorem značeným pomocí rhodaminu.....	22

4.2	Měření interakčních konstant metodou zhašení fluorescence tryptofanů.....	24
4.3	Ověření inhibičních účinků na živých buňkách měřením produkce inositolfosfátů .....	26
5	DISKUSE.....	30
6	ZÁVĚR.....	33
	LITERATURA .....	34

# SEZNAM ZKRATEK

CD	označení povrchových molekul leukocytů
CRD	sacharid vázající doména lektinů (z angl. carbohydrate recognition domain)
DSG	disukcinylimidoglutarát
GlcNAc	2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high pressure liquid chromatography)
InsP2	inositolbisfosfát
InsP3	inositoltrisfosfát
LPS	lipopolysacharid
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization)
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
NK	přirozený zabíječ (z angl. natural killer)
NKR-P	protein receptoru NK buňky (z angl. natural killer cell receptor protein)
NMR	nukleární magnetická resonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
PAMAM	polyamidoamin
PBMC	monojaderné buňky (z angl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PMA	forbol myristyl acetát
t-Bu	<i>terc</i> -butyl

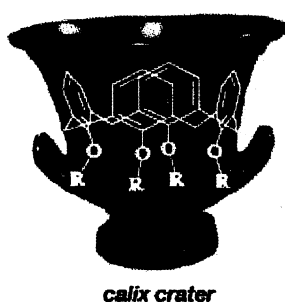
# ÚVOD

## 1.1 Calix[n]areny

Calix[n]areny, látky s unikátní molekulární architekturou, se v posledních letech dostávají do popředí vědeckého bádání. Jako první se s látkami tohoto typu setkal německý chemik Adolf von Baeyer při výzkumu fenolformaldehydových pryskyřic na konci 19. století. Ve 40. letech následujícího století pak profesor Alois Zinke navrhl cyklickou strukturu calix[n]arenů a v 70. letech profesor David Gutsche tyto látky pojmenoval a zveřejnil první návrh jejich syntézy<sup>1</sup>.

Tyto cyklické oligomery s obecným vzorcem  $4.1_n$  ( $n \geq 2$ )<sup>2</sup> vznikají kondenzací *para* substituovaných fenolů s formaldehydem v bazickém prostředí<sup>3-5</sup>. Běžně se připravují zahříváním 4-*tert*-butyl fenolu s vodným roztokem formaldehydu za přítomnosti NaOH nebo KOH s použitím různých rozpouštědel<sup>1</sup>.

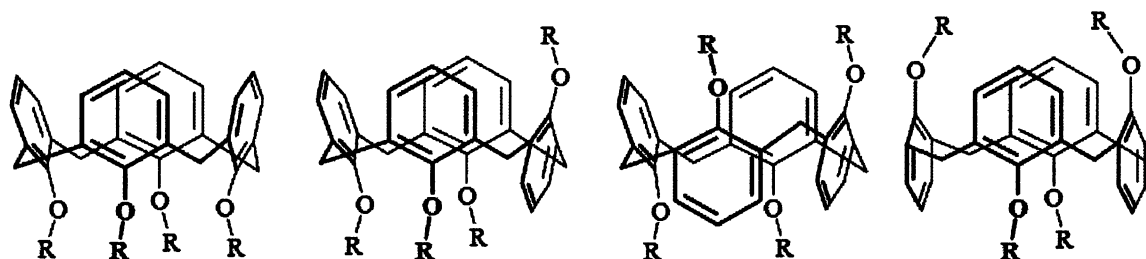
Ve své bakalářské práci používám karboxylované calix[4]areny, jejichž přesné struktury jsou uvedeny v Experimentální části na Obr. 7 na straně 16. Vzhledem ke své makrocyclické struktuře představují calix[4]areny poměrně rigidní molekuly, které za běžných podmínek zaujímají tzv. konickou konformaci, připomínající pohár nebo kalich. Právě díky této podobnosti získaly calix[4]areny svůj název podle antické vázy „calix crater“ (Obr. 1).



**Obr. 1: Podobnost konické konformace calix[4]arenu s antickou vázou<sup>2</sup>.**

Vhodnou substitucí mohou calix[4]areny zaujmout ještě další konformace a to částečně konickou, 1,2-střídavou a 1,3-střídavou (Obr. 2 na následující straně). V poslední době se podařilo syntetizovat calix[4]arenové kostry, ve kterých jsou methylenové skupiny spojující jednotlivé cykly nahrazeny atomy síry (např. použité látky 3 a 5 na Obr. 7 na straně 16). Tyto látky se označují jako thiocalix[4]areny<sup>1</sup>.





**Obr. 2:** Možné konformery calix[4]arenu<sup>2</sup>. Konformace konická, částečně konická, 1,2-střídavá a 1,3-střídavá (pořadí zleva).

Význam calixarenových koster tkví především v jejich výjimečných komplexačních schopnostech. Uvnitř jejich struktury se totiž nachází volné místo, tzv. kavita, které může být zaplněno další molekulou nebo iontem. Díky unikátním vlastnostem těchto látek je možné syntetizovat různé konformery s přesně definovanou prostorovou strukturou, čehož lze s výhodou využít při návrhu látek s vhodnými komplexačními vlastnostmi<sup>1</sup>. Díky této cenné vlastnosti se calix[4]areny staly nepostradatelnou součástí supramolekulární chemie. Velký význam má také využití calix[4]arenů ve farmakologii pro dopravu léčiv.

## 1.2 Využití calix[n]arenů v organické chemii a farmakologii

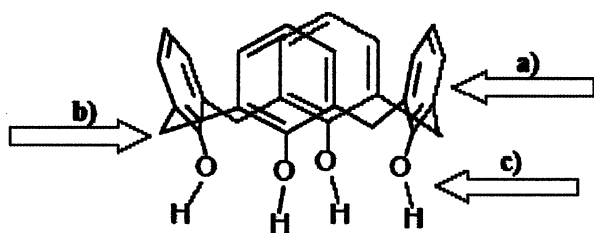
Calix[n]areny a další sloučeniny s charakteristickou makrocyclickou strukturou jako například crown ethery, fullereny a nebo porfyriny se díky svým zajímavým fyzikálně chemickým vlastnostem staly základními stavebními kameny supramolekulární chemie. Používají se při tvorbě složitějších receptorů, senzorů, modelů enzymů, rotaxanů, dendrimerů, molekulárních reaktorů a jiných supramolekulárních struktur. Vynikající vlastnosti calix[n]arenů, které lze využít ve výše zmíněném oboru jsou následující:

- a) levné a snadno dostupné výchozí látky pro jejich syntézu
- b) jejich snadná izolace a příprava i ve velkém měřítku
- c) možnost cílené syntézy derivátů s přesně definovanou velikostí kavity
- d) snadné zavádění libovolných substituentů do přesně zvoleného místa základní kostry
- e) možnost získání několika různých konformací s přesně definovanou prostorovou strukturou
- f) možnost přípravy chirálních činidel
- g) možnost přípravy derivátů rozpustných ve vodě
- h) vynikající komplexační vlastnosti vůči kationtům, aniontům a neutrálním látkám<sup>1</sup>

Jak už jsem zmínila v úvodní kapitole o calix[n]arenech, lze tyto látky využít také ve farmakologii pro dopravu léčiv. Doprava léků do organismu je proces, kdy léčivo je podáváno do těla kontrolovaným způsobem. Cílem je zlepšit kontrolu nad farmakokinetikou a farmakodynamikou léků, nad jejich nespecifickou toxicitou, imunitními reakcemi, rozpoznáváním biologických systémů a zároveň zvýšit účinnost léků. Calix[4]areny jako chemické nanostruktury mají schopnost chránit lék před chemickým a enzymatickým znehodnocením, ke kterému by mohlo dojít na jeho cestě k cílovému místu v organismu<sup>6</sup>.

### 1.3 Derivatizace calix[n]arenové kostry<sup>2</sup>

Calix[n]arenové kostry mohou být různým způsobem modifikovány, což vede k tvorbě nových makrocyclických sloučenin, které se v mnoha ohledech liší od „klasických“ calix[n]arenů. Právě proto vědci v posledních letech věnují modifikacím základního skeletu calix[n]arenů velkou pozornost. Podíváme-li se na strukturu calix[4]arenové kostry, zjistíme, že existují tři způsoby jak ji modifikovat (Obr.3). Můžeme zaměnit aromatické jádro, nahradit CH<sub>2</sub> můstky jinými skupinami a nebo zaměnit fenolické OH skupiny za jiné funkční skupiny.



**Obr. 3:** Tři způsoby modifikace calix[4]arenové kostry<sup>2</sup>, a) derivatizace na horním okraji, b) derivatizace můstkových skupin, c) derivatizace na spodním okraji.

Mezi modifikované calix[n]areny patří např. calix[n]pyrroly (kombinace jiného jádra s jinou spojkou), které jsou v současné době populární, protože vykazují dobré komplexační vlastnosti vůči aniontům. Jako další příklady modifikovaných calix[n]arenů se zajímavými komplexačními vlastnostmi mohou sloužit calix[4]furany, calix[4]thiofeny, dále deriváty, ve kterých byla OH skupina zaměněna za skupinu SH a nebo deriváty, ve kterých bylo zaměněno fenolické jádro za 1-naftol, popř. 2-methoxyazulen.

Všechny tyto látky jsou ale charakteristické nízkou stabilitou, nevýhodným konformačním chováním, nemožností následné derivatizace a obtížnou syntézou. Vzhledem k těmto špatným vlastnostem se oproti klasickým calix[n]arenům jeví jako nevýhodné. V této souvislosti se do popředí dostávají thiocalix[4]areny, které kromě běžných vlastností klasických calix[4]arenů nabízí vynikající komplexační chování a nové možnosti derivatizace základní kostry. Můstkové atomy síry lze totiž např. pomocí peroxidu vodíku chemoselektivně oxidovat za vzniku

tetrasulfoxidu a nebo tetrasulfonu. Tyto deriváty thiacalix[4]arenu vykazují výjimečné komplexační vlastnosti, které je pak možné uplatnit při návrhu nových receptorů.

Derivatizace horního okraje calixarenových koster zahrnuje Friedel-Craftsovu dealkylaci/transalkylaci následovanou elektrofilní aromatickou substitucí. Tímto způsobem je možné připravit mnoho derivátů, které lze použít pro následnou syntézu. Tak například nitroderiváty jsou výchozí látky pro aminosubstituované calix[n]areny. Sulfonace umožňuje syntézu vodorozpustných derivátů a sodné soli těchto sulfonových kyselin lze využít např. při konstrukci modelů enzymů.

Mezi nejvýznamnější reakce probíhající na spodním okraji calix[n]arenů patří alkylace a acylace, protože díky nim můžeme připravit jednotlivé konformery calix[4]arenu. Alkylové skupiny jsou stéricky objemné a v případě tetraalkylovaného calix[4]arenu blokují rotaci fenylových jader rovinou makrocyklu, což vede k „zamrznutí“ dané konformace calix[4]arenu. Můžeme tak základní molekulu calix[4]arenu tvarovat do požadované struktury, čehož lze s výhodou využít při návrhu složitějšího receptoru nebo modelu enzymu. Alkylací thiacalix[4]arenu prováděnou ethylbromacetátem v acetonu za katalýzy uhličitánem alkalického kovu můžeme získat různé konformery této látky podle toho, který z kationtů ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cs^+$ ) bude součástí katalyzátoru. Různá velikost kationtů totiž odpovídá tvorbě různě velké kavity. Takto získané deriváty thiacalix[4]arenů mají význam při syntéze složitějších struktur.

V současné době se do popředí zájmu vědců dostávají calix[4]areny nesoucí různé směrovací struktury jako sacharidy, lipidy nebo karboxyly. O calix[4]arenech substituovaných sacharidy, tzv. calix[4]arenových glykokonjugátech, bude blíže pojednáno v jedné z následujících kapitol. Tyto látky jsou zkoumány pro jejich využití při stimulaci přirozených zabíječských buněk, které zprostředkovávají protinádorovou imunitní odpověď.

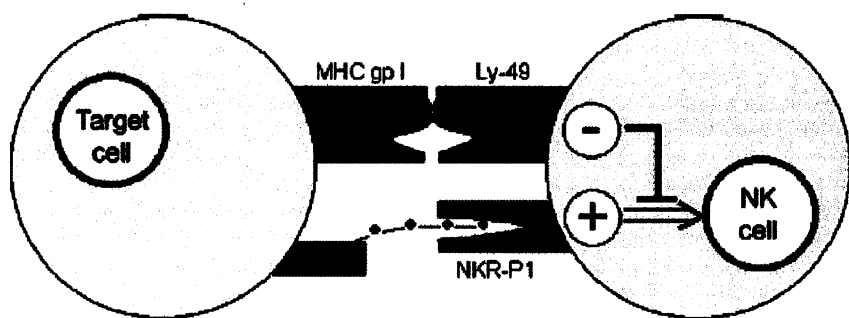
## 1.4 Zabíječské lymfocyty a jejich receptory

### 1.4.1 NK buňky

Přirozené zabíječské buňky, neboli NK buňky, jsou nepostradatelnou součástí přirozené imunity. Tato specifická populace lymfocytů má za úkol chránit organismus před nádory, viry a jinými intracelulárními patogeny.

Na povrchu NK buněk je exprimováno mnoho receptorů, které aktivují nebo naopak inhibují jejich funkci. Zdravé buňky nesoucí povrchové MHC glykoproteiny I. třídy jsou rozpoznávány inhibičními receptory, zatímco transformované nádorové buňky nebo buňky napadené mikroorganismy jsou identifikovány aktivačními receptory prostřednictvím sacharidových ligandů<sup>7</sup> (Obr. 4 na následující straně). Funkce NK buněk je tedy regulována rovnováhou mezi signály přenesenými aktivačními receptory a signály přenesenými

inhibičními receptory. Jsou-li v převaze aktivační signály, dojde k cílené likvidaci abnormální buňky. Imunologické studie prováděné na lidských, potkaních a myších lymfocytech ukazují, že velký význam při aktivaci NK buněk mají lektinové receptory typu C jako např. potkaní NKR-P1 nebo lidský CD69<sup>8</sup>. Ve své bakalářské práci pracuji pouze s rekombinantní rozpustnou formou lidského CD69, a proto se o něm zmíním blíže v následující podkapitole.



**Obr. 4: Regulační mechanismus NK buňky<sup>9</sup>.** MHC glykoprotein I. třídy na povrchu cílové buňky je rozpoznán inhibičním receptorem NK buňky Ly-49, sacharidový ligand ( ●—● ) na povrchu cílové buňky je rozpoznán aktivačním receptorem NK buňky NKR-P1.

## 1.4.2 Receptor CD69

Receptor CD69 patří mezi lektiny. Lektiny jsou proteiny, které nemají imunoglobulinovou strukturu, nepatří tedy mezi protilátky a mají schopnost vázat sacharidy bez pozměnění jejich struktury. Tato zajímavá třída proteinů byla poprvé pozorovaná u rostlin, v nichž lektiny patří k nejtoxičtějším látkám<sup>10</sup>.

Glykoprotein CD69, označovaný jako časný aktivační antigen lidských lymfocytů, hraje důležitou roli v buněčné signalizaci<sup>11</sup>. Je součástí buněčné a protinádorové imunity a podílí se na rozpoznávacích schopnostech NK buněk<sup>12</sup>.

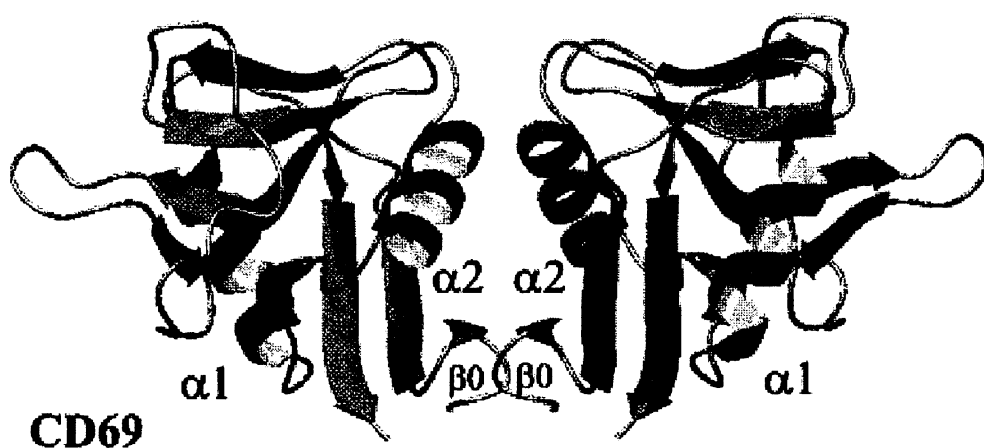
Molekula CD69 je exprimována na povrchu buněk hematopoetického původu, především na neutrofilech, monocytech, T buňkách, B buňkách, NK buňkách a krevních destičkách. Indukuje se téměř okamžitě po aktivaci T-lymfocytů<sup>13</sup>.

Receptor CD69 patří mezi transmembránové proteiny II. typu, jeho C-konec je orientován extracelulárně. Řadíme ho mezi živočišné lektiny typu C, protože na svém extracelulárním C-terminálním konci obsahuje sacharid vázající doménu (CRD - z angl. Carbohydrate Recognition Domain), jejíž vazebná aktivita je závislá na přítomnosti  $Ca^{2+}$  iontů<sup>10</sup>.

Struktura receptoru CD69 je znázorněna na Obr. 5 na následující straně. Jedná se o homodimer propojený disulfidickými můstky se dvěma fosforylovanými a různě

glykosylovanými řetězci. Rozdílná velikost podjednotek (26 až 28 kDa a 32 až 34 kDa) je dána jejich odlišnou glykosylací<sup>14</sup>. Skládá se z transmembránové domény, cytoplazmatické domény a extracelulární části, která je složena z tzv. krčku a globulární domény. Transmembránová a cytoplazmatická doména jsou zodpovědné za signalizaci a buněčnou expresi<sup>15,16</sup>. Oblast krčku obsahující Cys 68 je důležitá pro dimerizaci receptoru CD69 a globulární C-lektinová doména (Ser 100 až Lys 199) zprostředkovává vazbu protilátky, popřípadě vazbu různých ligandů<sup>16</sup>.

Fyziologické ligandy pro receptor CD69 nebyly doposud identifikovány. Byla však objevena vysoká afinita sacharidových ligandů k tomuto receptoru<sup>9</sup>. Jako dobré ligandy pro receptor CD69 se jeví heptapeptidové LELTEGY dimery a sacharidové Sia Tn TRI dimery, které používám ve své práci k precipitaci rozpustné formy receptoru CD69.



*Obr. 5: Model dimerní struktury receptoru CD69<sup>13</sup>. Jsou zde vyznačeny prvky sekundárních struktur.*

## 1.5 Interakce ligandů s receptory zabíječských lymfocytů

### 1.5.1 Interakce sacharidových ligandů s lektinovými receptory

Obecně lze říci, že vazba lektinového receptoru na sacharidový ligand je velmi slabá. Sílu této vazby je ale možné zvýšit prostřednictvím tzv. multivalentní expozice sacharidových epitopů na vhodné kostře (nízkomolekulární, dendritické, polymerní). Je-li totiž sacharidový ligand prezentován ve formě násobných kopií na vhodné kostře, dochází vlivem mnohonásobných interakcí mezi receptorem a ligandem k přirozenému zesílení vazby<sup>17,18</sup>.

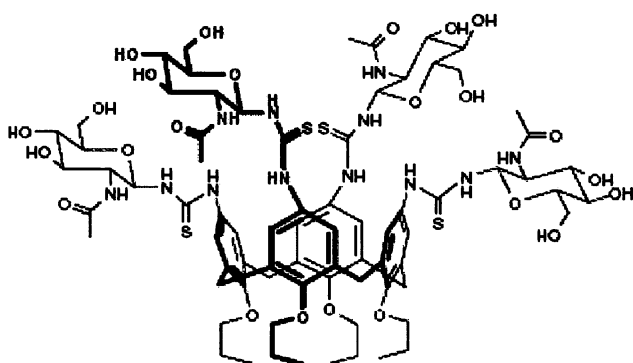
S použitím PAMAM dendrimeru substituovaného osmi GlcNAc přes thiomocovinu bylo prokázáno, že multivalence je rozhodující pro navázání sacharidových ligandů na

receptor NKR-P1 *in vitro*<sup>19</sup>. Rovněž to bylo prokázáno v experimentech *ex-vivo* (s izolovanými NK buňkami oproti NK rezistentním nádorovým buňkám) a v experimentech *in vivo* (působením aktivovaných NK buněk na nádor tlustého střeva)<sup>20</sup>.

### 1.5.2 Interakce calix[4]arenových derivátů s lektinovými receptory

Látky tohoto typu se mohou vzhledem k receptoru chovat jako agonisté (vazba na receptor vyvolá jeho precipitaci a zvýší signalizační schopnost) a nebo jako antaganonisté (vazba na receptor inhibuje signalizační schopnost).

Bylo zjištěno, že calix[4]arenové glykokonjugáty (především GlcNAc tetrasubstituovaný calix[4]aren znázorněný na Obr. 6) a karboxylovaný calix[4]aren (hydroxykarbonylmethoxy calix[4]aren v konické konformaci) se velmi silně vážou na receptor CD69 a fungují jako inhibitory vazby vysokoafinitního ligandu na tento receptor (v případě receptoru NKR-P1 byla tato inhibiční aktivita nižší)<sup>9</sup>.



**Obr. 6:** Calix[4]arenový glykokonjugát<sup>9</sup>. Calix[4]aren substituovaný prostřednictvím thiomocovinových můstek čtyřmi 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosami zaujímající konickou konformaci.

Ukázalo se, že výše popsany GlcNAc tetrasubstituovaný calix[4]aren je nejlepším doposud identifikovaným ligandem pro receptor CD69. S klesajícím počtem GlcNAc zbytků však jeho afinita k receptoru prudce klesá<sup>9</sup>, což dokazuje již dříve popsany vliv multivalence na vazbu ligand-receptor.

Tyto látky byly dále testovány na proliferaci lidských PBMC *in vitro* a bylo zjištěno, že calix[4]arenové glykokonjugáty ve svých optimálních stimulačních koncentracích mají podobný efekt na proliferaci lidských PBMC jako LPS. Oproti tomu karboxylovaný calix[4]aren nemá vliv na klidové lidské PBMC, ale blokuje proliferaci těchto buněk vyvolanou prostřednictvím LPS<sup>9</sup>.

Dále byl v experimentech *in vitro* studován vliv těchto látek na stimulaci přirozené cytotoxicity NK buněk. Nejlepší stimulační efekt oproti karboxylovanému calix[4]arenu a dříve zkoumanému PAMAM GlcNAc dendrimeru byl zaznamenán u GlcNAc tetrasubstituovaného calix[4]arenu. Tato látka je ve vyšších koncentracích navíc schopná vyvolat spontánní smrt nádorem postižených buněk<sup>9</sup>.

Výše zmíněná vlastnost karboxylovaného calix[4]arenu je pravděpodobně dána tím, že je to poměrně malá látka a chybí jí tedy možnost multivalentního kontaktu s receptorem. Lze proto usoudit, že karboxylované calix[4]areny budou vzhledem k receptoru CD69 vystupovat spíše jako antagonisté. Přesvědčit se o této skutečnosti bylo hlavním cílem mé bakalářské práce.

## 1.6 Použití calix[4]arenů v protinádorových terapiích

NK buňky jsou známé svou schopností zabíjet nádorové buňky prostřednictvím interakcí svých povrchových receptorů se sacharidovými ligandy na cílových buňkách. Bylo zjištěno, že deriváty 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-hexopyranosy vykazují vysokou afinitu k aktivačním receptorům NK buněk a lymfocytů (u potkanů a člověka)<sup>21</sup>. Této vysoké afinity cukerných derivátů je potenciálně možné využít v protinádorových terapiích.

Jak už jsem uvedla dříve, cukerné deriváty je nutné receptoru prezentovat ve formě multivalentních kopií na vhodné kostře. V dřívějších experimentech byl jako kostra použit polymer polyamidoaminové povahy. Výsledky *in vivo* pokusu s PAMAM GlcNAc<sub>8</sub> ukázaly, že tyto látky mají terapeutické účinky na zvířata s nádorovým onemocněním (potkan, myš). Způsobují pokles růstu nádoru, prodlužují délku života u léčených nemocných zvířat a zvyšují jejich imunitní odpověď (produkci cytokinů, cytotoxicitu, infiltraci nádoru aktivovanými lymfocyty)<sup>22,23</sup>.

Zdá se, že makrocykly typu calix[4]arenů by mohly být lepšími nositeli aminocukerných derivátů než dříve použité PAMAM. Je to dáno lipofilním charakterem jejich molekuly, který umožňuje silnější interakce s membránou cílové buňky. Navíc nám jednotlivé konformace calix[4]arenových koster umožňují vybrat uspořádání různých vazebných míst sacharidových zbytků. Substitucí spodního okraje calix[4]arenové kostry a změnou spojek propojujících sacharid s kostrou pak můžeme regulovat rigiditu celé molekuly a měnit její afinitu k aktivačnímu receptoru NK buňky<sup>24</sup>.

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Zjistit, zda jsou poskytnuté preparáty calix[4]arenů schopné inhibovat precipitaci rozpustného CD69 receptoru způsobenou Sia Tn TRI dimerem nebo LELTEGY dimerem.
2. Pomocí techniky zhášení fluorescence stanovit přesné hodnoty interakčních konstant.
3. Zjistit, zda jsou poskytnuté preparáty calix[4]arenů schopné inhibovat buněčnou aktivaci CD69+ lymfocytů a chovat se z tohoto hlediska jako antagonisté.
4. Získané výsledky diskutovat v kontextu současného pohledu na význam CD69 receptoru v reakcích imunitního systému.



# 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

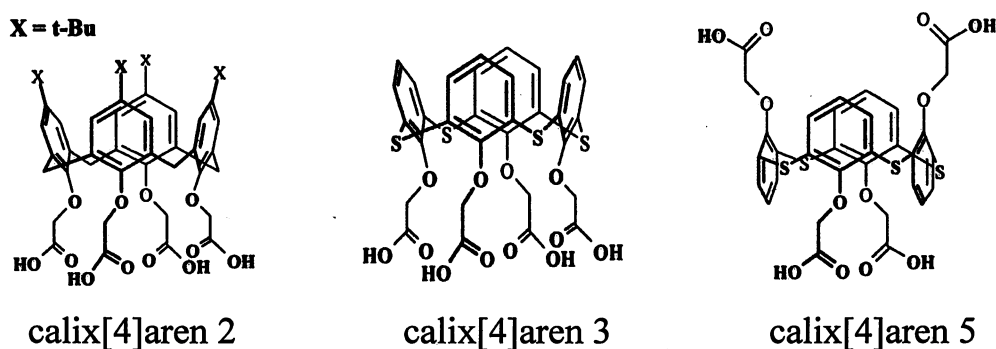
## 3.1 Seznam použitých materiálů, přístrojů a zařízení

### 3.1.1 Použité chemikálie

- Mravenčan amonný, p.a., Sigma, USA
- Kyselina mravenčí, p.a., Aldrich, USA
- $\text{NH}_4\text{OH}$ , Lachema, ČR
- PBS pufr pH 7,4 byl připraven podle návodu v manuálu Molecular Cloning<sup>25</sup>
- 0,1 M acetátový pufr pH 3,5
- Ficoll-Hypaque, Sigma, USA
- Dowex AG 1-X8, BioRad Laboratories, USA

### 3.1.2 Popis použitých ligandových dimerů a calix[4]arenových preparátů

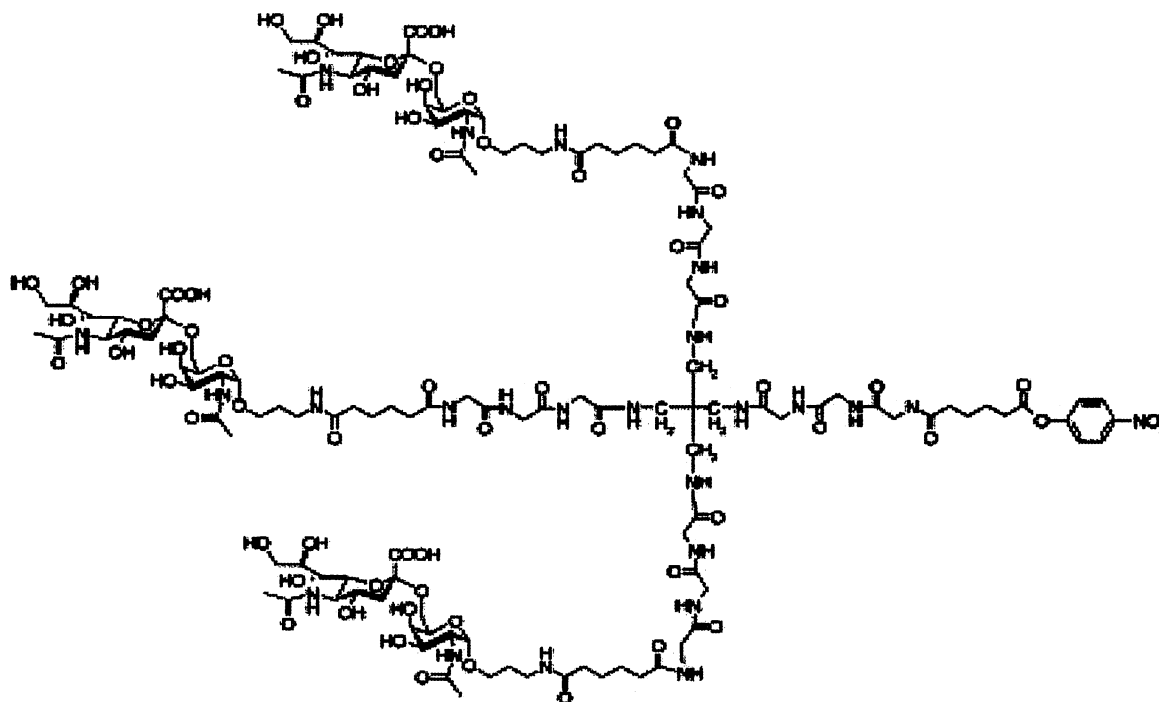
Karboxylované calix[4]areny (Obr.7) byly poskytnuty a připraveny Ing. Karlem Křenkem z Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR v.v.i. Syntéza těchto sloučenin je podrobně popsána v publikaci Křenka a spol.<sup>9</sup>



**Obr. 7:** Chemické vzorce použitých karboxylovaných calix[4]arenů 2, 3 a 5. Detaily syntéz těchto sloučenin jsou uvedeny v publikaci Křenka a spol.<sup>9</sup>

**LELTEGY-DSG dimer**, YGTELEL-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-NH-LELTEGY, látka připravena a poskytnuta Jiřím Stříbným, separována na HPLC, struktura potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI, iontově cyklotronové hmotnostní spektrometrie a NMR<sup>26</sup>.

**Sia Tn TRI dimer** (Obr. 8), jedná se o komerční preparát syntetizovaný firmou Lectinity, Helsinky, Finsko. Dvě tyto jednotky byly vzájemně spojeny po redukcí nitroskupiny na aminoskupinu provedené vodíkem na palladiovém katalyzátoru (reakci provedl Ing. Radek Gažák z MBÚ AV ČR v.v.i.) pomocí bifunkčního činidla disukcinimidylglutarátu (DSG).



**Obr. 8:** Chemický vzorec použitého Sia Tn TRI derivátu. Použitý dimerní derivát byl dimerizovaný pomocí bifunkčního činidla DSG prostřednictvím aminoarylové skupiny vzniklé redukcí koncové nitroskupiny a obsahuje tudíž centrální jádro o složení fenyl-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-NH-fenyl a 6 větví s koncovým Sia Tn antigenem tvořeným disacharidovou sekvencí Sia $\alpha$ 2->6GalNAc $\alpha$ 1->O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>.

### 3.1.3 Použité pomůcky, přístroje a zařízení

- Mikrotitrační destička s kulatým dnem, Nunc, Dánsko
- Mikrotitrační destička vhodná pro měření v ultrafialové části spektra Bio-One, Greiner, Německo
- Centrifuga Beckman J-6M vybavena rotorem a závěsy pro centrifugaci mikrotitračních destiček, Beckman – Coulter, USA
- Zařízení pro analýzu mikrotitračních destiček Safire<sup>2</sup>, Tecan, Rakousko
- Scintilační počítač Mikrobeta, Wallac, Finsko

## 3.2 Precipitační testy s rozpustným CD69 receptorem značeným pomocí rhodaminu

### 3.2.1 Příprava rozpustného receptoru CD69 a jeho značení rhodaminem

Rekombinantní rozpustná forma membránového receptoru leukocytů byla produkována v bakteriálních buňkách *Escherichia coli* kmene BL-21 (DE3) Gold transformovaných expresním plasmidem označeným jako pRSETB/hlMCD69. Protein byl poté poskládán z inkluzních tělísek a přečištěn chromatografií na S-Sepharose, chromatografií na obrácené fázi na koloně Vydac C-4 a dále gelovou filtrací na sloupci Superdexu 200. Výsledný preparát byl homogenní na SDS elektroforese a homogenita byla též potvrzena iontově cyklotronovou hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením ( $>1$  ppm)<sup>27</sup>. Celý postup prováděl Mgr. Ondřej Vaněk v rámci své diplomové práce<sup>12,27</sup>. Následně byl protein značen aktivovaným NHS-rhodaminem (Pierce) jak je popsáno v bakalářské práci Georgie Christofi<sup>28</sup> a bylo dosaženo průměrného stupně substituce asi 4,3 dle výsledku spektrofotometrického stanovení. Celý postup provedla Georgia Christofi, výsledný preparát byl zkoncentrován na 10 mg/ml a dlouhodobě uchováván v 0,1 ml objemech zmražený při  $-80$  °C.

### 3.2.2 Precipitační testy

Precipitační testy byly provedeny s použitím metodického postupu převzatého z diplomové práce Michala Navrátila<sup>29</sup>. Na titrační destičku s kulatým dnem pipetujeme 50  $\mu$ l roztoku značeného CD69 proteinu v PBS o koncentraci  $2 \times 10^{-8}$  mol/l, 1  $\mu$ l dimerního LELTEGY peptidu v PBS o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  mol/l a 50  $\mu$ l roztoku inhibitoru v PBS o dvojnásobné finální koncentraci vyšetřované v inhibičním testu. Po smíchání látek umístíme destičku na 1 hodinu do lednice při 4 °C. Poté přidáme 100  $\mu$ l chlazeného (4 °C) roztoku 20% polyethylenglykolu 8000 v PBS, promícháme a desku necháme stát ještě hodinu při 4 °C. Následuje centrifugace destičky s použitím závěsů pro centrifugaci mikrotitračních destiček v rotoru JS-5.2 centrifugy Beckman J-6M, která probíhala 30 minut při 2600 ot/min (1500 x g) v chlazené centrifuze (4 °C). Protein precipitovaný na dně jamky byl promyt třikrát 100  $\mu$ l srážecího roztoku a deska byla vždy znovu centrifugována. Po poslední centrifugaci byl supernatant pečlivě odstraněn a precipitát rozpuštěn ve 100  $\mu$ l 0,1 M acetátového pufru pH 3,5, deska byla inkubována v tomto pufru přes noc. Druhý den byl veškerý roztok v jamkách promíchán, přenesen na mikrotitrační destičku s plochým dnem a intenzita fluorescence v jednotlivých jamkách byla změřena na čtecím zařízení

Safire<sup>2</sup>. Byly použity následující parametry měření: byl použit spodní detektor nacházející se pod jamkou („Bottom Fluorescence“), excitační vlnová délka byla 546 nm, emisní vlnová délka 577 nm, šířka excitační štěrbinou byla 5 nm, šířka emisní štěrbinou 20 nm, citlivost („Gain“) byla nastavena na 55, v každé jamce byla provedena 4 měření s integračním časem 40  $\mu$ s. Měření probíhala při laboratorní teplotě (26 °C). Všechny experimenty probíhaly paralelně ve třech jamkách, z nichž byla vypočítána průměrná hodnota. Výsledek byl vyjádřen jako % inhibice precipitace proteinu CD69, přičemž 0% inhibice se odečetlo v jamkách bez inhibitoru a 100% inhibice v jamkách s nadbytkem ( $10^{-6}$  mol/l) inhibitoru. Z úplných inhibičních křivek byla nakonec extrapolována hodnota  $IC_{50}$ , koncentrace inhibitoru způsobující 50% inhibici precipitace proteinu CD69.

### 3.3 Měření interakčních konstant metodou zhášení fluorescence tryptofanů

Roztok neznačeného rekombinantního CD69 proteinu byl naředěn PBS na koncentraci 0,2 mg/ml a 50  $\mu$ l tohoto roztoku bylo pipetováno na destičku Bio-One firmy Greiner. Poté byla přidávána různá ředění ligandu v celkovém objemu 50  $\mu$ l. Oba roztoky byly smíchány, destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě a poté byla v jednotlivých jamkách měřena intenzita fluorescence v UV oblasti na čtecím zařízení Safire<sup>2</sup> za následujících podmínek: byl použit spodní detektor nacházející se pod jamkou („Bottom Fluorescence“), excitační vlnová délka byla 285 nm, emisní vlnová délka 348 nm, šířka excitační štěrbinou byla 5 nm, šířka emisní štěrbinou 10 nm, citlivost („Gain“) byla nastavena v prvním pokusu na 146 a ve druhém na 140, v každé jamce byla provedena 4 měření s integračním časem 40  $\mu$ s. Měření probíhala při laboratorní teplotě (26 °C). Všechny experimenty probíhaly paralelně ve třech jamkách, z nichž byla vypočítána průměrná hodnota. V prvním experimentu byly vyneseny pouze zprůměrované hodnoty fluorescence bez další korekce. Ve druhém experimentu s detailní ředící řadou byla data zpracovávána matematicky a to tak, že parametr  $\log [(F_0 - F) / (F - F_{max})]$  byl vynášen oproti parametru  $\log [L]$ , kde  $[L]$  je koncentrace vyšetřovaného ligandu,  $F_0$  je fluorescence proteinu bez přítomnosti inhibitoru,  $F_{max}$  je fluorescence proteinu saturovaného inhibitorem (při koncentraci  $10^{-6}$  mol/l) a  $F$  je fluorescence změřená v přítomnosti dané koncentrace inhibitoru<sup>30</sup>. Z takto získaných křivek byly stanoveny parametry vazby a to disociační konstanta  $K_d$  v místě nulové hodnoty parametru  $\log [(F_0 - F) / (F - F_{max})]$  a počet vazebných míst jako směrnice zhášecí přímky. V kontrolním experimentu byla měřena

hodnota fluorescence samotných calixarenů a bylo zjištěno, že za podmínek experimentu je vždy menší než 5% tryptofanové fluorescence.

### **3.4 Provedení a vyhodnocení testu buněčné aktivace měřením produkce inositolfosfátů**

#### **3.4.1 Příprava CD69 pozitivních a CD69 negativních lymfocytů**

Mononukleární buňky (převážně lymfocyty) zdravých dárců byly separovány centrifugací s použitím média Ficoll-Hypaque (Sigma) a dále stimulovány pomocí PMA a ionomycinu dle publikovaného protokolu<sup>31</sup>. Po stimulaci byl povrchový obsah CD69 antigenu stanoven metodou průtokové cytometrie a bylo zjištěno, že se zvýšil z cca 5 u zdravých dárců na cca 45 – 50% po stimulaci. Tato buněčná populace byla již přímo použita v experimentu. Jako kontrolní vzorek byly též použity stejně připravené mononukleární buňky zbavené CD69 pozitivních buněk imunomagnetickou separací. Získané buňky byly poté značeny [<sup>3</sup>H] inositolem inkubací v koncentraci  $5 \times 10^6$  buněk/ml v médiu s nízkým obsahem inositolů (Sigma) obsahujícím 10% fetální telecí sérum, L-glutamin, antibiotika (penicilin a streptomycin), 25  $\mu$ M 2-merkapt ethanol a 20  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H] myoinositolu (GE Healthcare, spec.aktivita 80 Ci/mmol)<sup>31</sup> po dobu tří hodin při 37 °C. Značené buňky byly promyty třikrát médiem RPMI1640, resuspendovány na  $5,6 \times 10^6$  buněk/ml a uchovávány až do okamžiku experimentu v médiu RPMI 1640 s přídavkem L-glutaminu a 10% fetálního telecího séra na ledu při 4 °C.

#### **3.4.2 Test buněčné aktivace měřením produkce inositolfosfátů**

Do jamek mikrotitrační destičky s kulatým dnem uchovávané na ledu bylo nejprve pipetováno 10  $\mu$ l dvacetinásobně koncentrovaného roztoku dimerního LELTEGY peptidu, poté 10  $\mu$ l dvacetinásobně koncentrovaných roztoků calixarenů a nakonec 180  $\mu$ l ( $10^6$ ) inositolem značených buněk. Destička byla na ledu přenesena k termostatu na 37 °C a umístěna do misky s ohřátou vodou na 2 minuty pro stanovení inositolbisfosfátů, popřípadě na 5 minut pro stanovení inositoltrisfosfátů. Poté byly desky okamžitě umístěny zpět na ledovou lázeň a během 10 minut byl obsah jednotlivých jamek (cca 200  $\mu$ l) přenesen do 1,5 ml mikrozkušavek obsahujících 0,5 ml 20% kyseliny trichloroctové. Precipitát byl odstraněn centrifugací ve stolní mikrocentrifuze (10000 x g, 5 minut, 20 °C) a supernatant přenesen do čerstvých zkumavek. Supernatant (cca 700  $\mu$ l) byl 5 x extrahován stejným objemem diethyletheru, neutralizován přidáním 44  $\mu$ l 85 mM NH<sub>4</sub>OH a bylo přidáno 300  $\mu$ l 50% vodné suspenze Dowexu AG 1-X8 (BioRad Laboratories). Suspenze byla inkubována

s ionexem při laboratorní teplotě 1 hodinu za neustálého míchání a poté centrifugována a 5 x promyta 1 ml destilované vody. Poté byly inositolbisfosfáty eluovány 0,5 ml 400 mM mravenčanu amonného titrovaného 0,1 M kyselinou mravenčí a inositoltrisfosfáty 0,5 ml 1M mravenčanu amonného titrovaného 0,1 M kyselinou mravenčí<sup>32</sup>. Obě frakce byly odpařeny, rozpuštěny ve 20  $\mu$ l destilované vody a přeneseny do jamek mikrotitrační destičky. Bylo přidáno 180  $\mu$ l kapalného scintilátoru, jamky byly pevně uzavřeny průhlednou lepenkou a množství radioaktivity v jednotlivých jamkách měřeno kapalinovou scintilací (Microbeta, program <sup>3</sup>H-thymidine). Radioaktivita v jamkách bez inhibitoru byla označena jako 0% inhibice, radioaktivita v jamkách s nadbytkem calixarenových inhibitorů byla označena jako 100% inhibice a radioaktivita v experimentálních jamkách byla vyjádřena jako % inhibice. Všechna měření byla provedena třikrát a do grafů byla vynášena úplná inhibiční křivka zahrnující všechny měřené koncentrace. Hodnota IC<sub>50</sub> byla poté vypočtena s použitím grafického programu Origin 6.0 jako koncentrace odpovídající inflexnímu bodu na jednotlivých křivkách.

## 4 VÝSLEDKY

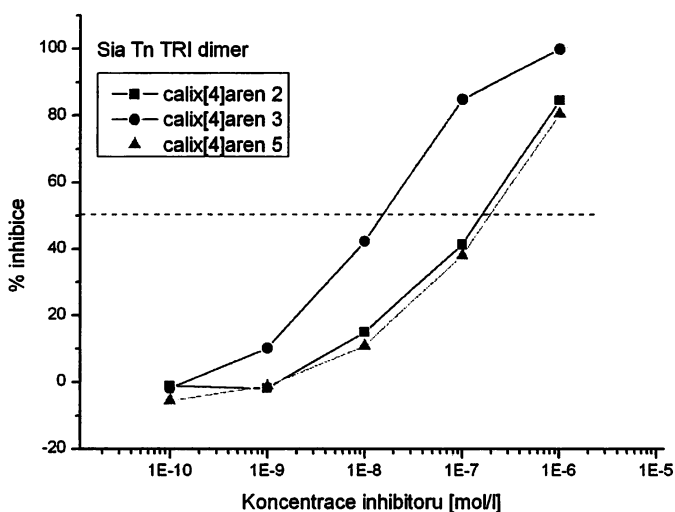
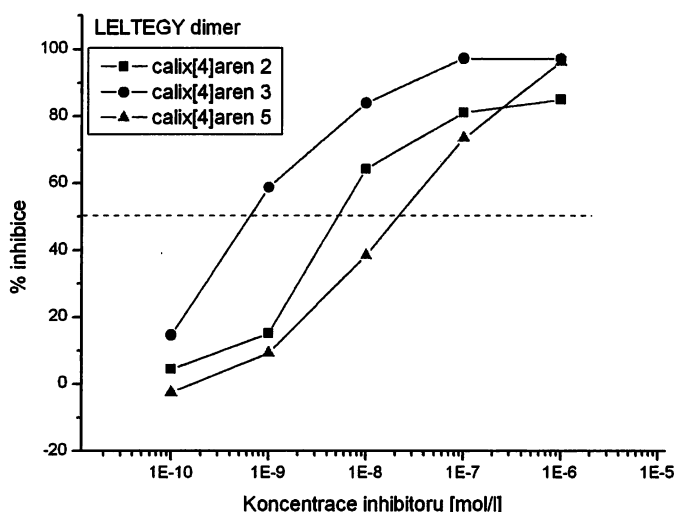
### 4.1 Precipitační testy s rozpustným CD69 receptorem značeným pomocí rhodaminu

V předběžném pokusu jsem ověřovala, zda vybrané calix[4]areny mohou zesíťovat rozpustnou formu receptoru CD69. V těchto experimentech se ovšem ukázaly calix[4]areny jako zcela nereaktivní, a proto byly jejich vlastnosti dále ověřovány zejména pomocí inhibičních experimentů. V těchto experimentech byl receptor CD69 vždy nejprve zesíťován bivalentním vysokoafinitním ligandem, například dimerním LELTEGY peptidem nebo Sia Tn TRI dimerem a po přidání různých koncentrací calix[4]arenů byla měřena jejich schopnost inhibovat výše uvedené zesíťování. Síla interakce CD69 receptoru s oběma vysokoafinitními ligandy se liší, tudíž i calix[4]areny inhibují v různých koncentračních oblastech. V případě sacharidového Sia Tn TRI dimeru, jehož interakční konstanty s receptorem dosahují nižších hodnot oproti dimerním LELTEGY peptidům, inhibují calix[4]areny v koncentracích  $10^{-6}$  až  $10^{-8}$  mol/l, v případě dimerních LELTEGY peptidů pak ještě při asi desetinásobně nižších koncentracích (Obr. 9 na následující straně). Navíc byly pozorovány též významné rozdíly v inhibičních aktivitách jednotlivých calix[4]arenů: nejlepším inhibitorem se vždy jevil být calix[4]aren 3, následovaný calix[4]arenem 2 a posléze calix[4]arenem 5.

Přehledné srovnání naměřených inhibičních parametrů je uvedené v Tabulce 1. Za povšimnutí stojí zejména velmi vysoká hodnota  $IC_{50}$  získaná pro inhibici precipitace LELTEGY dimerem pomocí calix[4]arenu 3, což ukazuje na vysokou afinitu této látky vůči CD69 receptoru (padesátiprocentní inhibice je dosažena při desetinové koncentraci LELTEGY dimeru, Obr. 9 na následující straně).

**Tabulka 1: Souhrn inhibičních konstant  $IC_{50}$  pro dva typy zesíťení CD69 proteinu.**

Typ zesíťování	$IC_{50}$ pro jednotlivé sloučeniny [mol/l]		
	Calix[4]aren 2	Calix[4]aren 3	Calix[4]aren 5
LELTEGY dimer	$5 \times 10^{-9}$	$6 \times 10^{-10}$	$2 \times 10^{-8}$
SiaTn TRI dimer	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-8}$	$2 \times 10^{-7}$



**Obr. 9:** Calix[4]areny inhibují precipitaci rozpustného CD69 receptoru vyvolanou buď dimerním LELTEGY peptidem (horní panel) nebo Sia Tn TRI dimerem (spodní panel). Reakční směs obsahovala  $10^{-8}$  mol/l rozpustného receptoru CD69,  $10^{-8}$  mol/l bivalentního ligandu (dimerní LELTEGY nebo dimerní Sia Tn TRI a zobrazené koncentrace jednotlivých calix[4]arenů v celkovém objemu 100  $\mu$ l PBS pufru pH 7,4. Po hodinové inkubaci v lednici při 4  $^{\circ}$ C byl experiment ukončen přidáním 100  $\mu$ l 10% roztoku polyethylenglykolu 8000 a dále vyhodnocen jak je uvedeno v Experimentální části.

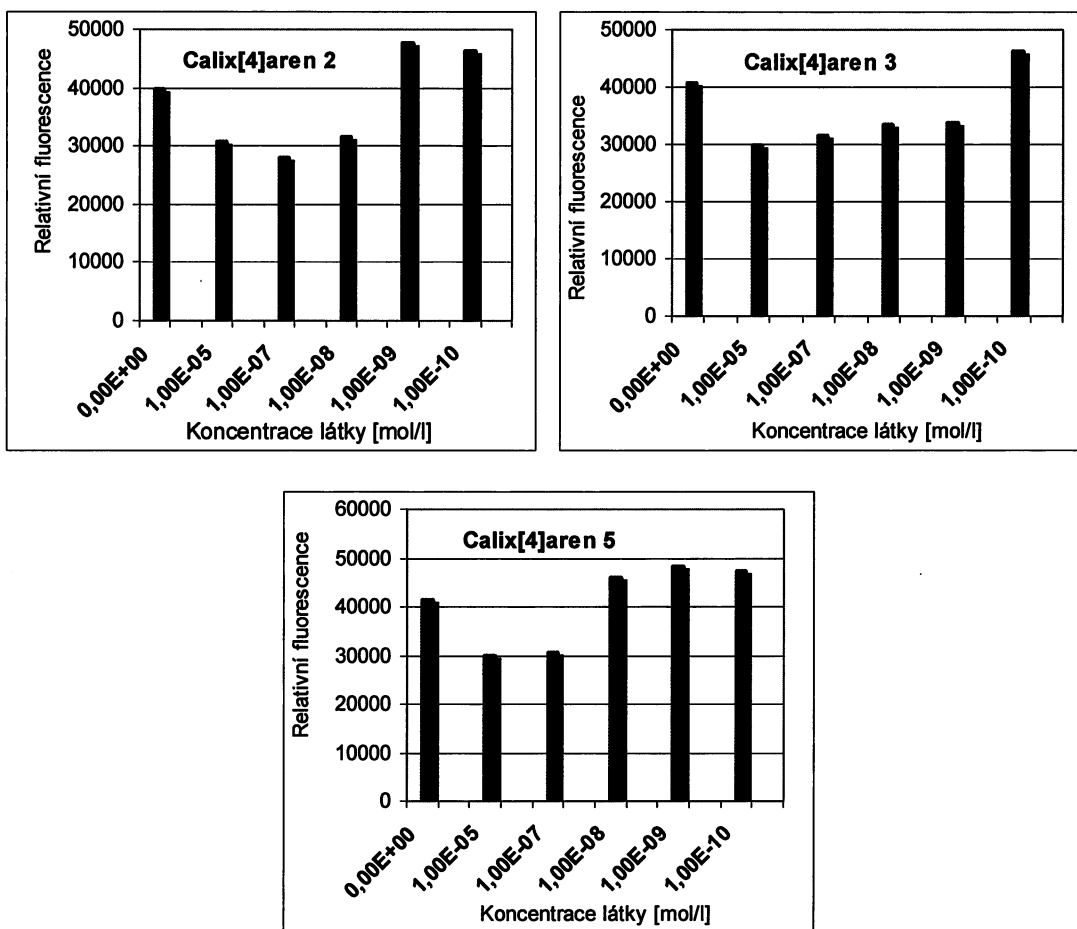


## 4.2 Měření interakčních konstant metodou zhášení fluorescence tryptofanů

V případě inhibičních experimentů je někdy obtížné stanovit přesné parametry vazby na receptor právě proto, že záleží jak na síle vazby standardního ligandu, tak i na síle vazby inhibitoru. Proto je vhodné doplnit inhibiční testy metodami přímého stanovení interakčních parametrů, k čemuž je možno využít širokého spektra různých technik jako je rovnovážná dialýza, gelová filtrace, sedimentační metody, bioafinitní techniky nebo frontální afinitní chromatografie<sup>23</sup>. Jako velmi vhodná a rychlá se jeví být metoda zhášení fluorescence tryptofanů po vazbě ligandu. Tento experiment je možný provést měřením ve spektrofluorometru nebo je možné s výhodou použít uspořádání na mikrotitračních destičkách, kdy lze stanovit vazebné parametry velkého množství vzorků najednou. Problémem této techniky ovšem zůstává, že běžné polystyrenové mikrotitrační destičky nejsou pro UV záření transparentní a jsou proto pro zhášení fluorescence tryptofanových zbytků naprosto nevhodné. V mém případě jsem proto použila speciální destičky Bio-One firmy Greiner, které jsou transparentní pro UV záření až do 220 nm. V jamkách těchto destiček jsem titrovala roztok proteinu různými koncentracemi calix[4]arenů a zhášení fluorescence tryptofanů jsem měřila při excitační vlnové délce 285 nm a emisní vlnové délce 305 nm. Experimentální hodnoty fluorescence jsem srovnávala s jamkami bez inhibitorů.

V praktickém provedení většinou provádíme uvedený pokus ve dvou krocích. V prvním experimentu vyšetřujeme zhášení fluorescence tryptofanů v přítomnosti desítkového ředění vyšetřovaných sloučenin, přičemž počáteční koncentraci v ředící řadě můžeme odhadnout právě na základě parametru  $IC_{50}$ . V našem případě ředící řada začínala koncentrací  $10^{-5}$  mol/l, neboť tato koncentrace calix[4]arenů již plně inhibovala precipitaci CD69 proteinu pro obě použité precipitační činidla a ředící řada pak byla ukončena koncentrací  $10^{-10}$  mol/l, tj. koncentrací, při níž naopak docházelo pouze k minimální inhibici v inhibičním testu. Výsledek experimentu je uveden na Obr. 10 na následující straně opět pro tři calix[4]areny použité v jiných částech této práce.

V souladu s očekáváním docházelo k významnému snížení fluorescence tryptofanů oproti kontrole v koncentraci  $10^{-5}$  mol/l u všech sledovaných látek. Jako důležitý parametr bylo poté odečteno ředění, které jako poslední ještě způsobovalo zhášení fluorescence tryptofanů. V případě calix[4]arenu 2 to byla koncentrace  $10^{-8}$  mol/l, u calix[4]arenu 3 dokonce  $10^{-9}$  mol/l, zatímco calix[4]aren 5 byl aktivní pouze při koncentraci  $10^{-7}$  mol/l.

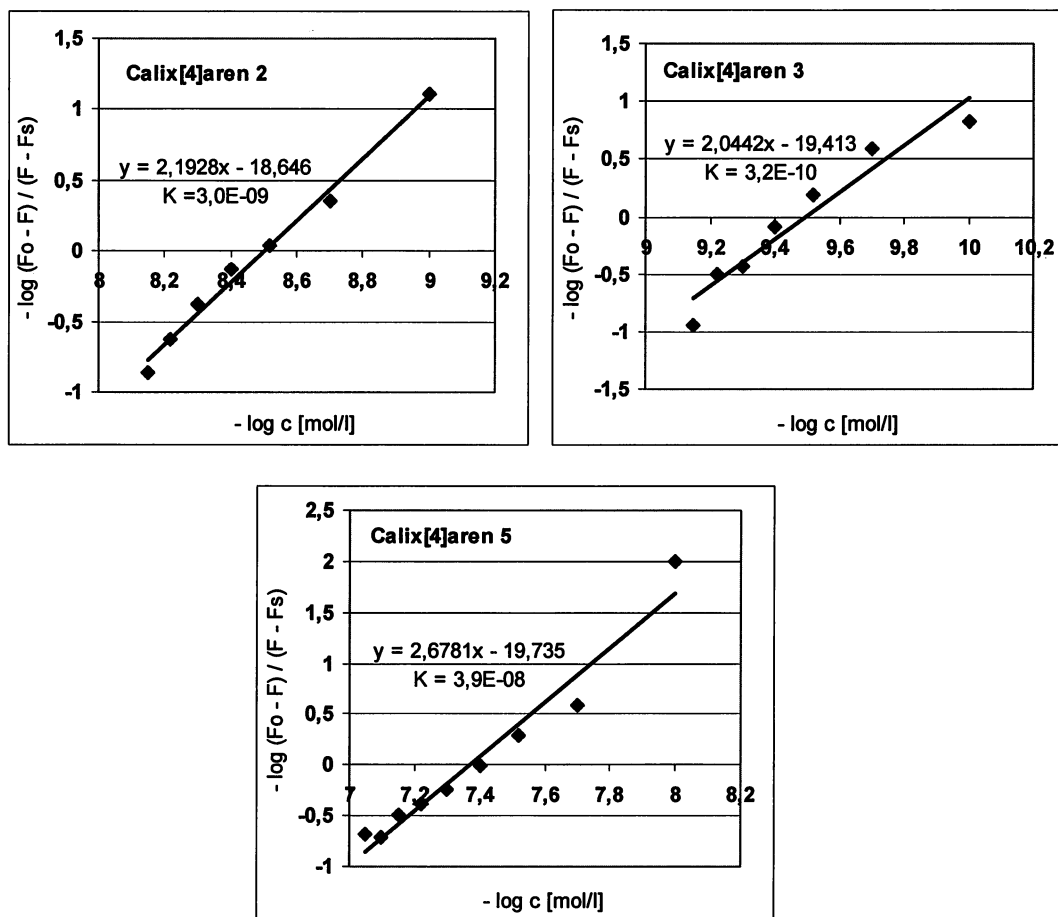


**Obr. 10: Zhášení fluorescence tryptofanu v receptoru CD69 s použitím desítkových ředicích řad. Technické detaily pokusu jsou uvedeny v Experimentální části.**

Ve druhém pokusu byl interval mezi výše uvedenou inhibující koncentrací a koncentrací již neinhibující rozdělen na deset dílů a tyto byly použity jako hodnoty následných koncentrací vyšetřovaných látek. V daném případě bylo ovšem snížení hodnoty fluorescence tryptofanových zbytků již méně výrazné a výsledné vazebné parametry byly potom extrapolovány z úplných vazebných křivek uvedených na Obr. 11 na následující straně.

Jak již bylo zdůrazněno, z těchto křivek je možné exaktně odečíst oba nejdůležitější vazebné parametry, totiž hodnotu disociační konstanty, kterou získáme jako koncentraci interagující látky, při níž nám sledovaná křivka protne nulovou hodnotu na ose y a dále počet vazebných míst na molekulu receptoru, který se získá jako směrnice přímkové závislosti. Z výsledků tohoto stanovení uvedených na Obr. 11 na následující straně je zřejmé, že všechny zkoumané látky interagovaly s molekulou receptoru ve dvou vazebných místech. Svými hodnotami disociačních konstant se ovšem mezi sebou tři zkoumané calix[4]areny výrazně lišily, což ukázal již předběžný pokus. Calix[4]aren 3 interagoval nejsilněji, hodnota

disociační konstanty dosáhla řádu  $10^{-10}$  mol/l. Na druhém místě se nacházel calix[4]aren 2 s nanomolární hodnotou disociační konstanty a nejméně silně interagoval calix[4]aren 5 s disociační konstantou řádu  $10^{-8}$  mol/l.



**Obr. 11:** Zhášení fluorescence tryptofanu v receptoru CD69 s použitím detailních ředících řad. Technické detaily pokusu jsou uvedeny v Experimentální části.

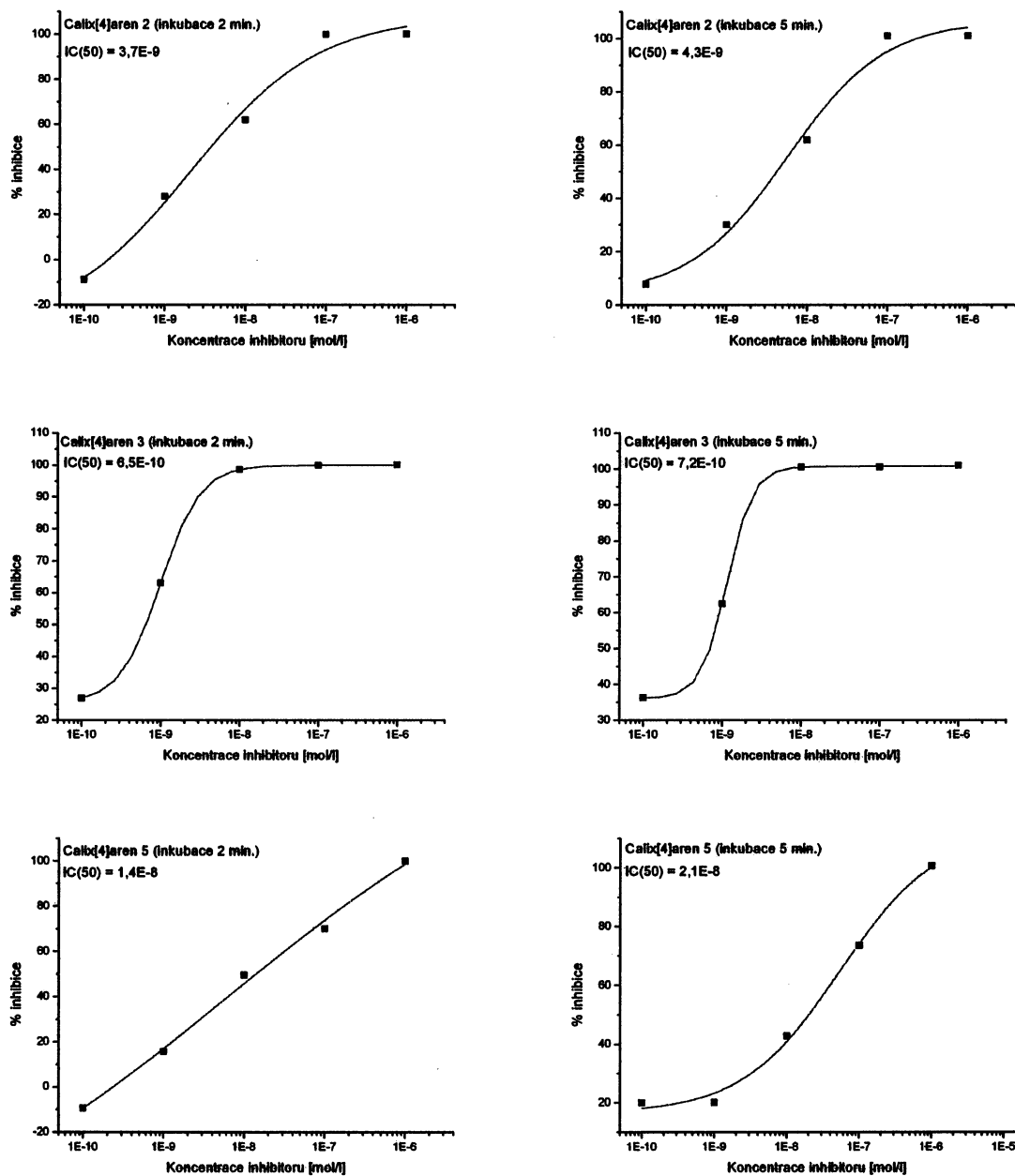
### 4.3 Ověření inhibičních účinků na živých buňkách měřením produkce inositolfosfátů

Na základě výše uvedených dat naměřených s použitím rozpustných forem CD69 receptorů se zdálo, že vyšetřované preparáty calix[4]arenů projevují silnou vazbu na tento receptor, ale nejsou schopné jej zesíťovat, pouze inhibovat aktivitu látek schopných receptor agregovat. Na základě těchto výsledků bylo možné přijmout pracovní hypotézu, že se budou všechny použité calix[4]areny ve vztahu k receptoru CD69 chovat pouze jako antagonisté. Tuto hypotézu bylo ovšem nutno ověřit na buněčně vázané formě receptoru.

Proto byl nejprve v kontrolním pokusu sledován vliv látek na CD69 negativní buňky, které obsahují na svém povrchu pouze zanedbatelná množství tohoto receptoru. Kontrolní experiment ukázal, že žádná ze zkoumaných látek nezpůsobovala aktivaci u těchto negativních buněk. Proto bylo možné přikročit k aktivaci CD69 pozitivních lymfocytů a k inhibici této aktivace calix[4]areny. Vzhledem k tomu, že na povrchu klidových lymfocytů je exprese CD69 antigenu poměrně nízká (pouze asi kolem 5% buněk obsahuje tento antigen v závislosti na dárci), jevílo se jako účelné tuto koncentraci zvýšit aktivací lymfocytů farmakologickými aktivátory – PMA (forbol myristyl acetát) a ionomycinem. Zatímco PMA je známým aktivátorem proteinkinasy C, ionomycin způsobuje zvýšení hladiny intracelulárního vápníku. Kombinovaným působením těchto činidel se zvýší povrchová exprese antigenu CD69 jeho mobilizací z intracelulárních rezerv<sup>33</sup>, takže po aktivaci je více než 50% buněk pozitivních na expresi CD69.

Při použití takto připravených buněk docházelo k signifikantní tvorbě inositolfosfátů po zesíťování CD69 antigenu pomocí protilátky, pomocí dimerního Sia Tn TRI ligandu i pomocí dimerního LELTEGY peptidu, který vykazuje vysokou afinitu vůči povrchovým dimerním CD69 receptorům. K tvorbě inositolfosfátů naopak nedocházelo při použití kontrolního dimerního LELLEGY peptidu ani při přidání vyšetřovaných calix[4]arenů (Tabulka 2 na straně 29).

Na základě těchto předběžných pokusů bylo možné vykonat experiment s inhibicí aktivace CD69+ lymfocytů sledovanými calix[4]areny. V tomto experimentu byla provedena aktivace buněk účinným síťovacím činidlem, LELTEGY dimerem, v přítomnosti různých koncentrací vyšetřovaných calix[4]arenů. Výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny na Obrázku 12 na následující straně. Ve všech případech s výjimkou jednoho pokusu se podařilo pro inhibici produkce inositolbisfosfátů (levý sloupec) i pro inhibici produkce inositoltrisfosfátů získat předpokládané sigmoidální závislosti. Z inflexních bodů úplných inhibičních křivek byl poté opět odečten parametr  $IC_{50}$ , jehož hodnoty jsou uvedeny v souhrnné formě v Tabulce 3 na straně 29. Z tabulky je zřejmé, že nezávisle na odlišnostech v průběhu jednotlivých inhibičních křivek existuje velmi dobrá shoda pro naměřené parametry  $IC_{50}$  u obou stanovovaných forem inositolfosfátů. Jako zdaleka nejlepším inhibítorem se i v tomto případě jeví calix[4]aren 3, který byl schopen inhibovat aktivaci CD69+ lymfocytů dimerním LELTEGY peptidem ještě v koncentraci cca  $7 \times 10^{-10}$  mol/l, tedy v koncentraci nižší, než byla koncentrace dimerního peptidu použitého pro zesíťování ( $1 \times 10^{-9}$  mol/l).



**Obr. 12: Calix[4]areny inhibují aktivaci lidských lymfocytů vyvolanou dimerním LELTEGY peptidem. Aktivace lymfocytů pomocí LELTEGY dimeru byla měřena na základě produkce inositolfosfátů a to v přítomnosti různých koncentrací calix[4]arenů. % inhibice bylo vyjádřeno jako % snížení produkce inositolfosfátů ve srovnání s kontrolním pokusem – zesílením dimerním LELTEGY. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočteny z inflexních bodů inhibičních křivek.**

**Tabulka 2: Aktivace CD69+ lymfocytů některými látkami při koncentraci  $10^9$  mol/l.**

Látka	PBS	Protilátka	SiaTn TRI dimer	LELTEGY monomer	LELTEGY dimer	LELEGGY dimer	Calix[4]aren 2	Calix[4]aren 3	Calix[4]aren 5
InsP2	56	1239	879	67	1352	89	67	89	23
InsP3	78	1345	987	97	1423	97	87	65	45

Čísla uvedená v tabulce jsou dpm [rozpady za minutu] extrahovaných inositolfosfátů.

**Tabulka 3: Shrnutí hodnot  $IC_{50}$  pro inhibici aktivace CD69+ lymfocytů calix[4]areny.**

Látka	$IC_{50}$ [mol/l] pro inhibici tvorby	
	InsP2	InsP3
Calix[4]aren 2	$3,7 \times 10^{-9}$	$4,3 \times 10^{-9}$
Calix[4]aren 3	$6,5 \times 10^{-10}$	$7,2 \times 10^{-10}$
Calix[4]aren 5	$1,4 \times 10^{-8}$	$2,1 \times 10^{-8}$

## 5 DISKUSE

Dlouhodobým cílem Laboratoře architektury proteinů je hledání ligandů pro lektinové receptory přirozených zabíječských buněk a ověřování jejich účinků jednak na samotné receptory a jednak na buňky nesoucí tyto receptory na svém povrchu. Jednou skupinou látek, které jsou v poslední době předmětem našeho zájmu, jsou též calix[4]areny nesoucí záporně nabitě karboxylové skupiny. Bylo zjištěno, že tyto sloučeniny se jeví jako velmi silné inhibitory vazby receptoru CD69 na vysokoafinitní ligand<sup>9</sup>. Tato pevná vazba na receptor umožňuje těmto sloučeninám fungovat jako látky typu agonistů nebo antagonistů v závislosti na tom, jak ovlivňují biologické funkce receptoru. Agonisté zvyšují signalizační schopnosti receptoru, antagonisté naopak tyto schopnosti inhibují. U agonistů většinou předpokládáme možnost multivalentní interakce s receptorem, která by měla vyústit v jeho zesílení. Předpokládá to ovšem, že se na molekule ligandu nachází několik míst vhodných pro interakci s receptorem. Z tohoto hlediska se ukazují calix[4]areny jako příliš malé a tato jejich vlastnost je spíše předurčuje k úloze antagonistů. V bakalářské práci bylo proto potřeba s použitím různých vazebných a inhibičních testů experimentálně ověřit tuto možnost.

Před zahájením experimentů jsem se přesvědčila, zda zkoumané látky, karboxylované calix[4]areny 2, 3 a 5 (Obr. 7 na straně 16) poskytnuty a připraveny Ing. Karlem Křenkem, opravdu nejsou schopné zesíťovat rozpustnou formu receptoru CD69. Na základě potvrzení této informace jsem dále zkoumala pouze inhibiční vlastnosti poskytnutých calix[4]arenových preparátů.

V prvním experimentu jsem sledovala, jak zkoumané látky inhibují precipitaci rozpustné formy receptoru CD69 vyvolanou bivalentním vysokoafinitním ligandem a to dimerním LELTEGY peptidem nebo Sia Tn TRI dimerem. Pro jednotlivé calix[4]areny jsem zaznamenala různé inhibiční aktivity, které se lišily i v závislosti na použitém precipitačním činidle (Tabulka 1 na straně 22). Nejlepší inhibiční vlastnosti jsem pozorovala u calix[4]arenu 3, který způsoboval 50% inhibici precipitace receptoru CD69 vyvolanou LELTEGY dimerem už při koncentraci  $6 \times 10^{-10}$  mol/l, na druhém místě byl calix[4]aren 2 a jako nejhorší inhibitor se jevil být calix[4]aren 5.

Mým druhým úkolem bylo přímé stanovení interakčních parametrů všech tří zkoumaných látek. Zde jsem použila metodu zhášení fluorescence tryptofanů po vazbě calix[4]arenových ligandů na rozpustnou formu receptoru CD69. V první části tohoto experimentu jsem hledala nejnižší koncentraci calix[4]arenů, která ještě zháší fluorescenci tryptofanů. V případě

calix[4]arenu 2 to byla koncentrace  $10^{-8}$  mol/l, u calix[4]arenu 3 dokonce koncentrace  $10^{-9}$  mol/l a calix[4]aren 5 byl aktivní pouze při koncentraci  $10^{-7}$  mol/l (Obr. 10 na straně 25). S využitím těchto získaných hodnot jsem provedla druhou část experimentu, jejímž výsledkem byly úplné vazebné křivky (Obr. 11 na straně 26). Z těchto křivek jsem odečetla hledané vazebné parametry. Hodnotu disociační konstanty jako koncentraci interagující látky, při níž sledovaná křivka protne nulovou hodnotu na ose y a počet vazebných míst na molekulu receptoru CD69 jako směrnici přímkové závislosti. Všechny zkoumané látky interagovaly s molekulou receptoru ve dvou vazebných místech. Calix[4]aren 3 opět interagoval nejsilněji, hodnota disociační konstanty dosáhla řádu  $10^{-10}$  mol/l. Na druhém místě byl calix[4]aren 2 ( $10^{-9}$  mol/l) a nejméně silně interagoval calix[4]aren 5 ( $10^{-8}$  mol/l).

Z výsledků výše popsaných pokusů je patrné, že použité calix[4]areny se velmi silně vážou na receptor CD69, ale nejsou schopné jej zesíťovat. Jejich vazba na receptor CD69 však inhibuje aktivitu precipitačních činidel jako je dimerní LELTEGY peptid, popř. Sia Tn TRI dimer. Lze tedy usoudit, že calix[4]areny 2, 3 a 5 se vzhledem k receptoru CD69 chovají opravdu jen jako antagonisté. V závěru mé práce jsem se pokusila ověřit tuto hypotézu na buněčně vázané formě receptoru CD69.

Posledním experimentem mé bakalářské práce tedy bylo ověření inhibičních účinků calix[4]arenových preparátů na živých buňkách měřením produkce inositolfosfátů. Inositolem značené CD69+ lymfocyty jsem aktivovala dimerním LELTEGY peptidem a následně jsem inhibovala tuto aktivaci calix[4]areny. Měřila jsem produkce inositolbisfosfátů a inositoltrisfosfátů a ze získaných hodnot jsem sestrojila inhibiční křivky pro jednotlivé calix[4]areny a obě formy stanovovaných inositolfosfátů. Ze získaných sigmoidálních inhibičních křivek jsem jako v prvním experimentu odečetla hodnoty  $IC_{50}$  (Tabulka 3 na straně 29). Jen v případě calix[4]arenu 5 při stanovování produkce InsP2 nevykazovala inhibiční křivka předpokládanou sigmoidální závislost. Naměřené parametry  $IC_{50}$  se téměř shodovaly u obou forem stanovovaných inositolfosfátů. Jako nejlepší inhibitor se i v tomto pokusu ukázal být calix[4]aren 3, který inhiboval aktivaci CD69+ lymfocytů vyvolanou LELTEGY dimerem ještě v koncentraci řádu  $10^{-10}$  mol/l.

Výsledky jednotlivých experimentů ukázaly, že z použitých calix[4]arenových preparátů je nejlepším ligandem pro receptor CD69 calix[4]aren 3. Podíváme-li se na Obr. 7 na straně 16, zjistíme, že struktury tří zkoumaných látek se v mnoha ohledech liší. Calix[4]aren 2 a 3 zaujímají konickou konformaci zatímco calix[4]aren 5 zaujímá konformaci 1,3 střídavou, což pravděpodobně způsobuje jeho poměrně slabou vazbu na receptor CD69 oproti zbylým dvěma preparátům. Calix[4]aren 2 na rozdíl od calix[4]arenu 3 má na svém horním okraji



navázané čtyři t-Bu skupiny, které značně omezují jeho konformační možnosti a tím znesnadňují vazbu tohoto ligandu na receptor CD69. Calix[4]aren 3 má navíc oproti calix[4]arenu 2 nahrazeny CH<sub>2</sub> můstky atomy síry, patří tedy mezi thiacalix[4]areny, což rovněž může být důvodem jeho lepších vazebných vlastností. Při pohledu na strukturu calix[4]arenu 5 však zjistíme, že můstkové atomy síry nejsou v tomto ohledu rozhodující, protože tato látka patří také mezi thiacalix[4]areny a přesto se jeví být nejhorším ze zkoumaných ligandů. Rozhodující vliv na afinitu k receptoru CD69 má tedy nejspíše konformace daného skeletu a její flexibilita, která může být ovlivněna přítomností substituentů.

Karboxylovaných calix[4]arenů jako antagonistů aktivačního receptoru lymfocytů CD69 lze využít při regulaci imunitních reakcí. Záměrné použití těchto látek by mohlo mít terapeutický význam pro potlačování nežádoucích imunitních reakcí například při transplantacích, chronických zánětech nebo autoimunitních onemocnění. Dále by tyto látky mohly být účinné též v nádorových imunoterapiích a to prostřednictvím své schopnosti inhibovat apoptózu (programovanou buněčnou smrt) CD69+ zabíječských buněk. Tyto možnosti jsou v současné době předmětem výzkumu řady domácích i světových pracovišť.

## 6 ZÁVĚR

Předmětem této práce bylo sledování interakcí tří různých karboxylovaných calix[4]arenů s aktivačním receptorem lymfocytů CD69. Nejprve byly provedeny precipitační testy s rozpustným CD69 receptorem značeným pomocí rhodaminu, dále byly měřeny interakční konstanty metodou zhášení fluorescence tryptofanů a na závěr byl proveden test buněčné aktivace měřením produkce inositolfosfátů. Výsledky provedených experimentů lze shrnout do následujících tří bodů.

- Bylo zjištěno, že calix[4]areny, nesoucí záporně nabitě karboxylové skupiny, projevují silnou vazbu na receptor CD69, nejsou schopné jej zesíťovat, ale pouze inhibovat aktivitu látek schopných tento receptor agregovat.
- Na základě získaných výsledků lze usoudit, že se použité calix[4]areny ve vztahu k receptoru CD69 chovají pouze jako antagonisté.
- Ukázalo se, že z použitých calix[4]arenů je nejlepším ligandem pro receptor CD69 calix[4]aren 3 s hodnotou vazebné konstanty  $3,2 \times 10^{-10}$  mol/l. Na druhém místě je calix[4]aren 2 ( $3,0 \times 10^{-9}$  mol/l) a jako nejhorší se jeví calix[4]aren 5 ( $3,9 \times 10^{-8}$  mol/l). Všechny použité calix[4]areny interagují s receptorem CD69 ve dvou vazebných místech.

# LITERATURA

1. Křenek, K.: Možnosti syntézy arylsubstituovaných calix[4]arenů. Diplomová práce, VŠCHT - Fakulta Chemické technologie Praha, Ústav organické chemie (2002)
2. [http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/4\\_Lhotak.pdf](http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/4_Lhotak.pdf) (staženo dne 4.7. 2008)
3. Gutsche, C. D.: Calixarenes; Monographs in Supramolecular Chemistry Vol. 1; J. F. Stoddart, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1989)
4. Gutsche, C. D.: Calixarenes Revisited; Monographs in Supramolecular Chemistry Vol. 1; J. F. Stoddart, Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1998)
5. Vincens, J., Böhmer, V.: Calixarenes: A Versatile Class of Macrocyclic Compounds; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1991)
6. Prnka, T., Šperlink, K.: Bionanotechnologie, nanobiotechnologie, nanomedicína, ISBN 80-7329-134-7, Repronis Ostrava (2006)
7. Raulet, D. H.: Nat. Rev. Immunol. 5, 996–1002 (2004)
8. Pisegna, S., Zingoni, A., Pirozzi, G., Cinque, B., Cifone, M. G., Morrone, S., Piccoli, M., Frati, L., Palmieri, G., Santoni, A.: J. Immunol. 169, 68–74 (2002)
9. Křenek, K., Kuldová, M., Hulíková, K., Stibor, I., Lhoták, P., Dudič, M., Budka, J., Pelantová, H., Bezouška, K., Fišerová, A., Křen, V.: Carbohydr. Res. 342, 1781-1792 (2007)
10. Bezouška, K.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 535-563 (2004)
11. Pavlíček, J., Sopko, B., Etrich, R., Kopecký, V., Baumruk, V., Man, P., Havlíček, V., Vrbacký, M., Martínková, L., Křen, V., Pospíšil, M., Bezouška, K.: Biochemistry 42, 9295-9306 (2003)
12. Vaněk, O., Nálezková, M., Kavan, D., Borovičková, I., Pompach, P., Novák, P., Kumar, V., Vannucci, L., Hudeček, J., Hofbauerová, K., Kopecký, V., Brynda, J., Kolenko, P., Dohnálek, J., Kadeřávek, P., Chmelík, J., Gorčík, L., Židek, L., Sklenář, K., Bezouška, K.: FEBS J., v tisku, (2008)
13. Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: Biochemistry 39, 14779-14786 (2000)
14. Gerosa, F., Tommasi, M., Scardoni, M., Accolla, R. S., Pozzan, T., Libonati, M., Tridente, G., Carra, G.: Mol. Immunol. 28, 159-168 (1991)
15. Hamann, J., Fiebig, H., Strauss, M.: J. Immunol. 150, 4920-4927 (1993)

16. Sancho, D., Santis, A. G., Alonso-Lebrero, J. L., Viedma, F., Tejedor, R., Sánchez-Madrid, F.: *J. Immunol.* 165, 3868-3875 (2000)
17. Turnbull, W. B., Stoddart, J. F.: *Rev. Mol. Biotechnol.* 90, 231–255 (2002)
18. Roy, R.: *Top. Curr. Chem.* 187, 241–274 (1997)
19. Bezouška, K., Křen, V., Kieburg, C., Lindhorst, T. K.: *FEBS Lett.* 426, 243–247 (1998)
20. Pospíšil, M., Vannucci, L., Fišerová, A., Krausová, K., Horváth, O., Křen, V., Mosca, F., Sadalpure, K., Lindhorst, T. K., Bezouška, K.: *Adv. Exp. Biol. Med.* 495, 343–348 (2001)
21. Křen, V., Martínková, L.: *Curr. Med. Chem. Rev.* 8, 1303-1328 (2001)
22. Bezouška, K.: *Rev. Mol. Biotechnol.* 90, 269–290 (2002)
23. Vannucci, L., Fišerová, A., Sadalpure, K., Lindhorst, T. K., Kuldová, M., Rossmann, P., Horváth, O., Křen, V., Krist, P., Bezouška, K., Luptovcová, M., Mosca, F., Pospíšil, M.: *Int. J. Oncol.* 23, 285–296 (2003)
24. <http://www.vscht.cz/lam/cukrblik/cukrblik04.pdf> (staženo dne 7.7. 2008)
25. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)
26. Stříbný, J.: *Syntéza a imunomodulační aktivity dimerních peptidů odvozených od mykobakteriálních hsp60 chaperoninů*. Bakalářská práce, UK-PřF Praha, katedra biochemie (2008)
27. Vaněk, O.: *Příprava a strukturní studie proteinu CD69, receptoru NK buněk*. Diplomová práce, UK-PřF Praha, katedra biochemie (2005)
28. Christofi, G.: *Fluorescence labeling of NK cell receptors for binding studies*. Bakalářská práce, UK-PřF Praha, katedra biochemie (2006)
29. Navrátil, M.: *Vysokoafinitní sacharidové ligandy leukocytárního lektinového receptoru CD69*. Diplomová práce, UK-PřF Praha, katedra biochemie (2007)
30. Chipman, D.M., Grisaro, V., Sharon, N.: *J. Biol. Chem.* 242, 4388-4394 (1967)
31. Harimaya, A., Tarkkanen, J., Mattila, P., Fujii, N., Ylikoshi, J., Himi, T.: *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 1130-1134 (2005)
32. Ryan, J.C., Niemi, E.C., Goldfien, R.D., Hiserodt, J.C., Seaman, W.E.: *J. Immunol.* 147, 3244-3250 (1991)
33. Imboden, J.B., Stobo, J.D.: *J. Exp. Med.* 161, 446-456 (1985)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

<b>Jméno a příjmení, adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>