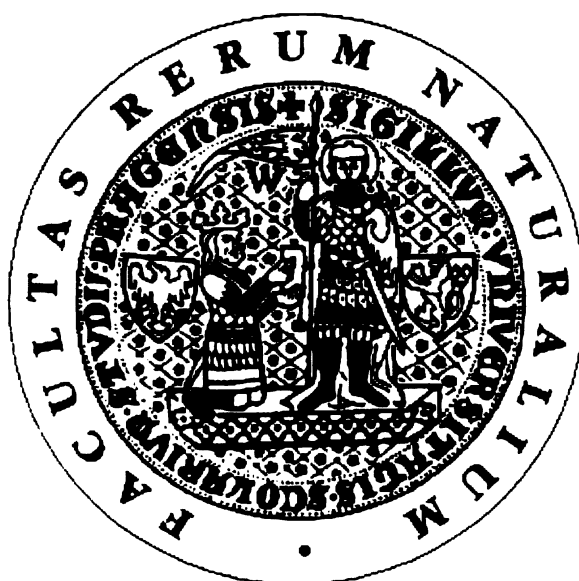


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Identifikace sacharidových ligandů PAG glykoproteinu
interagujících s NK receptory

Bakalářská práce

Vypracovala: Ljubina Ivanova
Vedoucí práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.
Škola: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Studijní obor: Biochemie
Akademický rok: 2007/2008

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233218471

Pr.č.: 93 8/08 Brno

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

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 *6.6.2008*

Podpis: *Ljubina Ivanova*

Děkuji Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za vedení bakalářské práce, za rady, připomínky a ochotu kdykoliv poradit.

Dále děkuji všem členům Laboratoře architektury proteinů Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky za cenné rady a pomoc při provádění experimentů.

Obsah

Seznam zkratk	5
Teoretická část	6
I. Úvod	6
1. Imunitní systém	6
1.1 Komponenty imunitního systému	6
1.2 Membránové proteiny	7
2. NK buňky – přirození zabíječi	8
2.1 Funkce NK buněk v organismu	8
2.2 Receptory NK buněk	9
3. Lektiny	12
3.1 Charakteristika lektinů	12
3.2 Lektiny C-typu	12
4. Glykoprotein PAG	13
4.1 Charakteristika glykoproteinu PAG	13
4.2 Exprese glykoproteinu PAG	14
4.3 Funkce glykoproteinu PAG	14
II. Cíle bakalářské práce	16
Experimentální část	17
III. Materiál a přístroje	17
1. Přístroje	17
2. Chemikálie	17
3. Roztoky a pufrы	18
4. Další materiály	19
5. Vzorke PAG glykoproteinů	19
IV. Použité metody	19
1. Desialylace glykoproteinových vzorků	19
2. Příprava a značení lymfocytárních receptorů	19
3. Sledování vazby pomocí ligandového blotu	20
4. Sledování vazby technikou sacharidových arrayů	20
V. Výsledky	22
1. Sledování reaktivity PAG glykoproteinů s lektiny NK buněk pomocí techniky ligandových blotů	22
2. Vazba zkoumaných glykoproteinů na polystyrenové destičky	23
3. Sledování reaktivity PAG glykoproteinů s lektiny NK buněk pomocí sacharidových arrayů	24
VI. Diskuse	26
VII. Závěr	28
Seznam literatury	29

Seznam zkratek

AA	akrylamid
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity, buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
AMK	aminokyselina/y
APS	ammonium persulfate
BNCs	binucleate trophoblast giant cells, binukleární obří buňky trofoblastů
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CRD	carbohydrate recognition domain, sacharid rozpoznávající doména
DTT	dithiothreitol
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GPI	glykosylfosfatidylinositol
HLA	Human Leukocyte Antigen, hlavní lidský antigen
IFN	interferon
IL	interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif, inhibiční motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu
KIR	Killer Inhibitory Receptor, inhibiční receptor NK buněk
MHC	Major Histocompatibility Complex, hlavní histokompatibilitní komplex
NCRs	Natural Cytotoxicity Receptors
NK	natural killer, přirozený zabijec
NKC	NK complex
PAG	pregnancy-associated glycoprotein
PRP-I	prolactin-related protein I
PSPB	pregnancy-specific glycoprotein B
SDS	dodecylsulfát sodný
THG	Tamm-Horsfallův glykoprotein

Teoretická část

I. Úvod

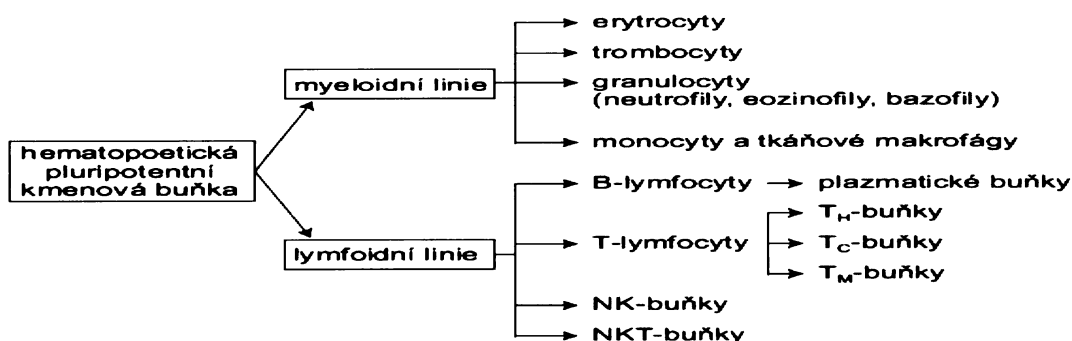
1. Imunitní systém

Imunitní, endokrinní a nervový systém se spolu podílí na udržování stálosti vnitřního prostředí organismu (homeostáze).¹ Základním úkolem imunitního systému je nejen obrana organismu proti cizorodým látkám a mikroorganismům, ale také zneškodnění vlastních buněk, které se začaly chovat abnormálně a mohly by proto představovat nebezpečí.² Imunitní systém tak musí být schopen rozlišovat „cizí“ od „vlastního“, resp. škodlivé od užitečného pomocí specifických a nespecifických mechanismů. Mezi základní funkce imunitního systému dále autotolerance (rozpoznávání a tolerování vlastních tkání) a odstraňování abnormálních buněk - nádorových, poškozených aj. (imunitní dohled).³

1.1 Komponenty imunitního systému

Hlavními součástmi imunitního systému jsou lymfatická tkáň a lymfatické orgány. Každá z buněk imunitního systému plní určitou funkci, jejíž cílem je rozpoznat a reagovat na jakoukoliv částici tělu cizí. Velká část buněk je tvořena rozdílnými typy bílých krvinek - **leukocyty**, jež se tvoří z pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni. Z kmenových buněk vychází dvě základní linie - **myeloidní** a **lymfoidní**³ (Obr.1, str.7).

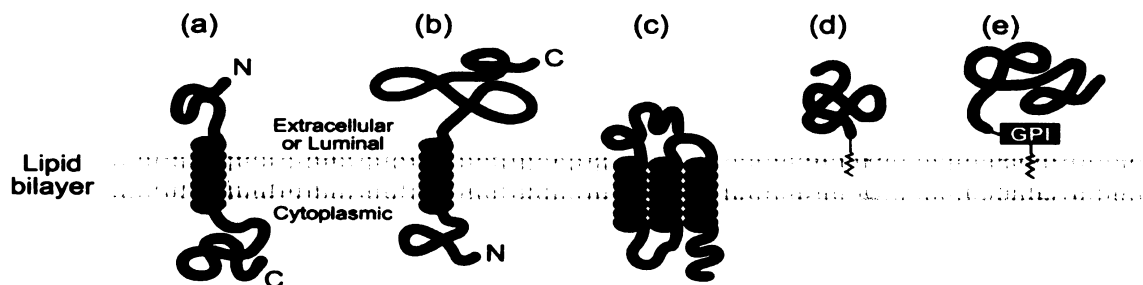
Podstatnou část buněk, které vznikají z myeloidní linie, jsou fagocytující leukocyty se schopností produkce cytokinů a prezentace antigenu T buňkám. Patří sem monocyty, granulocyty, neutrofilové i dendritické buňky. Tyto buňky, které zasahují vždy stejným způsobem a stejnou silou i po několikanásobném setkání s daným antigenem, pracují na principu **nespecifických** mechanismů.^{3,4} Z lymfoidní linie diferencují buňky odpovědné za **specifické** mechanismy imunity – lymfocyty B a T a dále NK buňky (z angl. **natural killer** – přirození zabíječi). Každá specifická imunitní buňka je předurčena k rozpoznání pouze jediného typu antigenu. Opakované setkání s antigenem vyvolává stále silnější a rychlejší imunitní odpověď. Jedná se o dlouhožijící paměťové buňky.¹



Obr.1: Buňky imunitního systému⁵

1.2 Membránové proteiny

Na povrchu buněk se vyskytuje celá řada jiných molekul.³ Tyto povrchové molekuly zprostředkovávají kontakt buňky s okolím, mají úlohu adhezni, signalizační, transportní i rozpoznávací.⁶ Převážnou většinu komunikace buňky s vnějším prostředím mají na starosti membránové (glyko)proteiny.⁷ Můžeme je rozdělit na integrální a periferní membránové proteiny⁸, či podle způsobu zakotvení v membráně. Membránové proteiny I. třídy mají N-konec umístěný extracelulárně, samotnou lipidovou membránou prochází část hydrofobního řetězce o délce kolem 20 aminokyselin a C-konec se nachází v cytoplasmě (Obr.2a). Je to nejčastější případ transmembránových proteinů. Méně běžným typem je II. třída membránových proteinů, která má C-terminální část vně buňky a N-konec je v cytoplasmě (Obr.2b). Na rozdíl od I. a II. třídy se u III. typu vyskytují proteiny, jenž prochází membránou vícekrát (většinou čtyřikrát či sedmkrát) (Obr.2c). Další skupina proteinů je tvořena molekulami, které jsou na membráně upevněny pomocí glykolipidové kotvy. Polypeptidový řetězec leží v extracelulárním prostoru a na C-koncové AMK (aminokyselina) je napojen glykosylfosfatidylinositol (GPI) (Obr.2e).³



Obr.2: Druhy membránových proteinů⁹

Všechny složky imunitního systému spolu velmi úzce interagují a vzájemně se ovlivňují pomocí adhezních molekul, tj. přímým kontaktem, nebo rozpustnými cytokiny.¹

2. NK buňky – přirození zabijáci

NK buňky jsou vedle B a T lymfocytů jedním z typů bílých krvinek. Řadí se do skupiny lymfocytů, jenž jsou nositeli specifické imunity. NK buňky patří mezi velké granulární lymfocyty.³ Velmi rychle reagují proti škodlivinám a patogenům. Jejich úlohou je obrana organismu během virové infekce a vytvoření resistance proti virům.¹⁰ NK buňky jsou dále známé svojí schopností zabít nádorové buňky. Toho je dosaženo interakcí mezi ligandy na nádorové buňce a množstvím receptorů na NK lymfocytu. Membrána cílové buňky je poškozena působením perforinů nebo indukci apoptózy. Výsledkem je uvolnění cytotoxických granul NK buněk. Znalosti z nových studií o nádorovém bujení a protinádorové imunitě jsou aplikovány v diagnostice a terapii malignit.³

Přestože NK buňky nemají antigenně specifické receptory, mají schopnost rozpoznat a zabít nádorové buňky nebo buňky napadené virem a zároveň se vyvarovat poškození normálních buněk vlastního organismu.³ Aktivita NK buněk je výslednicí rovnováhy mezi pozitivními (aktivujícími) a inhibičními (negativními) signály pocházejících z membránových receptorů.¹¹ Tzv. „missing self“ hypotéza se snaží objasnit signalizační mechanismus. Podle ní mají NK buňky za úkol rozpoznávat a eliminovat všechny buňky, které nedostatečně vylučují MHC molekuly I. třídy.¹² Takové viry infikované či nádorové buňky se brání útoku T lymfocytů právě tím, že se snaží snížit produkci MHC I. molekul na svém povrchu. To však vede k aktivaci NK buněk a k zahájení imunitních reakcí. Na druhé straně, jestliže se receptory cílové buňky naváží na MHC molekulu vlastního organismu, začnou vysílat signály, jež inhibují NK buňky a tím chrání vlastní buňky.¹³

2.1 Funkce NK buněk v organismu

NK buňky mají mnoho různých funkcí v organismu. Mezi nejvýznamnější patří cytotoxická aktivita, regulační funkce, obrana proti virům a infekcím a protinádorová aktivita.

NK buňky ničí terčové buňky prostřednictvím mechanismů vyžadujících přímý kontakt mezi NK buňkou a cílovou buňkou. Příslušné cytotoxické mechanismy jsou buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (Antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC), lytická cesta závislá na vápníku (Ca^{2+}) a mechanismus zprostředkovaný tzv. receptory smrti.^{3,14}

Vedle cytotoxického působení NK buněk je třeba upozornit také na jejich podstatný regulační význam v imunitním systému. Spolupráce NK buněk s ostatními komponentami imunity je zprostředkována hlavně prostřednictvím sekretovaných cytokinů.³ Cytokiny produkované NK buňkami v periferní krvi mohou mít důležité funkce v děložní tkáni. Kromě svého vlivu na trofoblasty hrají také zásadní roli při regulaci dalších typů děložních buněk.¹⁵ Na příkladu procesu tolerance ve vztahu matka-plod se ukazuje, jak je organismus matky schopen uživit plod. Studie prokázaly, že během těhotenství se NK buňky v těle matky tvoří ve zvýšeném množství. Embryonální trofoblasty, tvořící kontakt mezi buňkami matky a plodu, exprimují neklasické molekuly MHC I. třídy, HLA-G, které slouží jako ligandy pro NK receptory a inhibují NK buňky. Tím je plod chráněn před poškozením.^{16,17}

Další funkcí NK buněk je jejich antivirové působení. NK lymfocyty využívají rozmanitých mechanismů na obranu proti virovým infekcím a existují různé popudy, které spouští tuto antivirovou aktivitu.¹⁸ Počtem studií se zjistilo, že virem infikované buňky aktivují NK buňky k produkci IFN γ . Některé viry indukují expresi IL-12, tím je vyvolána produkce IFN γ NK buňkami a dochází k napadání a ničení jiných infikovaných buněk.¹⁹ NK buňky zasahují například proti herpesviru, chřipkovému viru, retrovirům, adenovirům a mnoha dalším.²⁰

Na boji s abnormálními a nádorovými buňkami se podílí jak dendritické a cytotoxické T buňky, tak i NK lymfocyty. Cytotoxické mechanismy, které umožňují NK buňkám ničit nádorové buňky, jsou cesta, při níž se využívají cytotoxické granule s perforinem a granzymy, nebo navození apoptosy přes receptory smrti.³

2.2 Receptory NK buněk

Reakce a kontakt NK buněk s okolím jsou zprostředkovány řadou povrchových receptorů. NK buňky mají dva druhy receptorů. Interakce receptorů na NK buňkách s ligandy na cílové buňce jsou buď **aktivační**, které způsobují cytotoxickou reaktivitu NK buněk, nebo **inhibiční** vyvolávající potlačení cytotoxicity.²¹ Rozdělením receptorů podle struktury získáváme receptory imunoglobulinové rodiny, zahrnující KIRs (z angl. **K**iller **I**nhibitory **R**eceptors), a receptory rodiny lektinů C-typu.²²

2.2.1 Inhibiční receptory

Inhibiční receptory obsahují jeden či více imunoreceptorových tyrosin vázajících motivů ITIM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif). Jedná se o sekvenci I/VxYxxL/V. Inhibiční aktivita těchto receptorů je z velké části dána interakcí mezi fosforylovanými tyrosinovými zbytky a cytoplasmatickými efektory. Signalizační kaskáda je spuštěna právě fosforylací tyrosinových zbytků pomocí protein tyrosinových fosfatas SHP-1 SHP-2.²³

Specifickými ligandy inhibičních receptorů jsou molekuly MHC I.²⁴ Lidské molekuly MHC se nazývají HLA (Human Leukocyte Antigen)²⁵ a dělí se na klasické HLA-A, -B a -C a neklasické HLA-E, -F, -G.²⁶ Příkladem lidských inhibičních receptorů jsou molekuly KIR2DL a CD94/NKG2A, mezi myší molekuly patří NKR-P1B a Ly49.^{27,28,29}

2.2.2 Aktivační receptory

Interakcí aktivačního receptoru s ligandem dochází k transportu signálu. Takový přenos signálu velmi závisí na cytoplasmatickém imunoreceptorovém tyrosin vázající aktivačním motivu ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif).³⁰ Po navázání ligandu se uskutečňuje fosforylace tyrosinových zbytků v ITAM pomocí PTKas z rodiny Src,³¹ což umožňuje iniciaci signalizačních dějů.³⁰

Mezi aktivační receptory patří lidské receptory CD69, NKR-P1³² a CD94/NKG2C³³, a myší receptor NKR-P1A.³⁴

2.2.3 Receptory imunoglobulinové rodiny

Mezi imunoglobulinové receptory patří především KIRs a NCRs (z angl. Natural Cytotoxicity Receptors). NCRs jsou skupinou aktivačních receptorů, zahrnující receptory Nkp46 (lidský i myší), Nkp30 (lidský a neexprimovaný myší pseudogen) a Nkp44 (pouze lidský).³⁵ Receptory KIR jsou pouze lidskými receptory a jejich ligandy jsou klasické molekuly HLA-A, -B, -C.³³ Pro rozdíly v transmembránových, intracelulárních a cytoplasmatických doménách existují dva funkčně rozdílné druhy KIRs – inhibiční a aktivační.³³ V závislosti na počtu imunoglobulinových domén v extracelulární oblasti molekuly dělíme KIRs do dvou podrodin. První skupina obsahuje dvě domény imunoglobulinového typu – KIR2D, druhá podrodina má tři takovéto domény – KIR3D.

Podle délky cytoplasmatické domény se dále třídí na KIR s dlouhým cytoplasmatickým „ocasem“ – KIR2DL, KIR3DL, které obsahují inhibiční motiv ITIM, a na KIR s krátkou cytoplasmatickou doménou - KIR2DS, KIR3DS, jejichž součástí je motiv ITAM, který jim dává schopnost aktivovat.³⁶ Tyto receptory jsou monomerní a jsou specifické pro celou řadu molekul MHC I. třídy.³³

2.2.4 Receptory lektinové rodiny C-typu

Lektinové receptory C-typu jsou integrální membránové proteiny II. typu vyskytující se na povrchu NK buněk. Geny kódující tyto receptory jsou lokalizovány v oblasti pojmenované jako NK komplex, NKC (z angl. NK complex).³⁷ NKC se u lidí vyskytuje na chromosomu 12, u myši na 6. a u potkanů na 4. chromosomu.³⁸ Zahrnuje několik rodin genů, které jsou exprimovány lidským i myším organismem. Patří sem rodina Ly49, rodina NKR-P1 (u potkanů, myši i lidí), NKG2 (v lidském a potkaním organismu) a rodina CD94 vyskytující se pouze u lidí.^{37,39}

Rodina Ly49 se skládá nejméně z třinácti členů Ly49A-J a Ly49-L, -O a -P, z nichž některé obsahují inhibiční motiv ITIM v cytoplasmatických doménách.^{40,41} Jedná se o homodimerní transmembránové glykoproteiny II. typu, které mají jak aktivační, tak i inhibiční funkce.⁴² Jejich ligandy patří mezi molekuly H-2 třídy I.⁴⁰

Další rodinou receptorů lektinů C-typu je skupina genů NKG2. Dělí se na extracelulární a cytoplasmatické domény, což jí dává vysokou heterogenitu v signálním přenosu i ve vazbě ligandů. Na rozdíl od disulfidicky vázaných homodimerů Ly49 NKG2 glykoproteiny tvoří disulfidicky vázané heterodimery s dalšími glykoproteiny nazývanými CD94.⁴³ Molekula CD94 je membránový protein II. typu s velmi krátkou intracytoplasmatickou částí, která neobsahuje signalizační sekvenci.⁴⁴ Navázáním polypeptidu CD94 na specifické NKG2 isoformy vzniká velká skupina funkčně odlišných heterodimerních receptorů.⁴⁵ Tyto receptory jsou vylučovány převážně na povrchu NK buněk a na CD8⁺ T lymfocytech. Ukazuje se, že jejich úlohou je regulace imunitní odpovědi a ničení infikovaných a nádorových buněk, tj. mají funkci cytotoxickou a supresorovou.⁴⁶ Ligandy pro CD94/NKG2 receptor jsou neklasické molekuly HLA-E třídy I. Avšak vazba receptor-ligand není dosud plně známá.⁴⁵

3. Lektiny

3.1 Charakteristika lektinů

V roce 1954 byl ve spojitosti se schopností rostlinných aglutininů rozeznávat erythrocyty různých krevních skupin poprvé použit název lektiny. Pochází z latinského slova *legere* znamenající zvolit si.⁴⁷ Podle definice jsou lektiny proteiny, které jsou schopné vázat sacharidy a dokáží shlukovat buňky či precipitovat glykokonjugáty.⁴⁸ Lektiny nepatří mezi protilátky (nemají imunoglobulinovou strukturu) a enzymy, jelikož vazbou na sacharidy nemění jejich strukturu.^{49,38} Schopnost lektinů vázat sacharidy pochází z polypeptidového úseku, z tzv. sacharid rozpoznávající domény CRD (z angl. *carbohydrate recognition domain*).⁴⁷ Lektiny se vyskytují v bakteriích, rostlinách i živočiších. Působení živočišných lektinů je velmi široké, neboť se účastní buněčných interakcí, transportu proteinů i obranných mechanismů.⁴⁹

3.2 Lektiny C-typu

Rodina živočišných lektinů C-typu obsahuje CRD doménu, jejíž aktivita je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů v molekule. Z této skutečnosti byl odvozen i název lektinů C-typu (z angl. *Calcium-dependent lectins*).⁵⁰ Mnoho z CRDs lektinů C-typu jsou aromatické a alifatické hydrofobní AMK tvořící dvě hydrofobní jádra domény ve formě dvou α helixů a tří párů antiparalelních β listů. Vazebné místo pro ligandy se nachází v oblasti variabilních smyček a atom vápníku je účastníkem vazby sacharidu.³⁸ Skupina receptorů, která postrádá úseky pro vazbu vápníku, což způsobuje neschopnost navázání sacharidu, obsahuje tzv. CTLDs (z angl. *C-type lectin-like domains*). Tento druh domén je evolučně odlišný od klasických lektinů C-typu a předpokládá se, že jeho funkce podléhají jiným mechanismům.^{51,52}

V imunitním systému hrají roli ochránců před patogeny dva druhy buněk – buňky dendritické a Langerhansovy. Zaměřují se na rozpoznání škodlivin a jsou přítomné v každé tkáni a orgánu, kde pracují na vztahu mezi vrozenou a adaptivní imunitou. V posledních letech bylo zjištěno, že existují lektiny C-typu a lektinové receptory, které jsou hojně a přímo exprimovány na povrchu těchto antigen prezentujících buněk. Proto jsou lektiny C-typu důležité při migraci dendritických buněk, mezibuněčném kontaktu,⁵³ buněčné adhezi i při specifickém rozpoznávání buněk pomocí sacharidových ligandů.⁵⁴

4. Glykoprotein PAG

Oboustranné propojení mezi zárodkem a matkou je zajištěno pomocí placenty. Placenta slouží k výživě embrya, dodává mu potřebné látky a minerály, odvádí xenobiotika a nepotřebné metabolity a zajišťuje endokrinní funkce, pro které jsou důležité některé glykoproteiny. Ty signalizují vývoj trofoblastu - vrstva periferních embryonálních buněk, ze kterých je tvořena placenta.^{55,56}

V roce 1982 byl glykoprotein B specifický pro těhotenství (PSPB, z angl. **pregnancy-specific glycoprotein B**) izolován z králíčího antiséra po podání dávky extraktů z kravské dělohy. Později se podařilo izolovat i glykoprotein PAG (z angl. **pregnancy-associated glycoprotein**). Podle analýz se jedná o stejnou molekulu. Glykoprotein PAG je obsažen v těle krav, ovcí, vysoké zvěře, koz, bizonů a amerických losů. Dále byl objeven v placentě prasat a koní.⁵⁶

4.1 Charakteristika glykoproteinu PAG

PAGs glykoproteiny přežvýkavců tvoří rozsáhlou proteinovou rodinu. V kravském a ovčím genomu bylo napočítáno nejméně 100 PAG genů. PAGs patří do proteinové rodiny aspartatových proteinas, kam se také řadí žaludeční enzymy pepsin, chymosin, a katepsin E a D, a metabolické enzymy jako renin. Z důvodů mutací v aktivní části molekul a proteolytické neaktivity se došlo k závěru, že kravské i ovčí PAGs jsou s největší pravděpodobností neschopné proteinasové aktivity. Podle analýz na sekvenci aminokyselin PAGs jsou na 60% homologní s rodinou pepsinogenů.^{56,57}

Kravské PAGs mají strukturu dvoulaločných makromolekul se štěrbinou umožňující navázání polypeptidu o délce 7-8 AMK.⁵⁶ Molekulová hmotnost purifikovaných PAGs vykazuje velkou rozmanitost. Vypočítané údaje dosahují 55 až 70 kDa, což jsou mnohem vyšší hodnoty než je očekávaná molekulová hmotnost jejich proteinového jádra (37 kDa).⁵⁸

Jak sám název napovídá, PAGs jsou glykoproteiny podléhající N- i O-glykosylaci. Připojení sacharidové složky N-glykosylací na čtyři možná vazebná místa vede k výraznému zvyšování růstu i heterogenity. Kromě glykosylace PAGs podléhají také posttranslačním úpravám jako je fosforylace.^{56,57}

4.2 Exprese glykoproteinu PAG

Binukleární obří buňky trofoblastu BNCs (z angl. *binucleate trophoblast giant cells*) jsou charakteristickým rysem placenty přežvýkavců. Vyvíjejí se z jednojaderných buněk trofoblastu a mitosou se z nich stávají buňky binukleární. Po dozrání migrují směrem k děložnímu epitelu a spojují se s jeho buňkami. Výsledkem jsou hybridní trojjaderné buňky, které uvolňují svá granula do basální membrány děložní tkáně. BNC granula mají schopnost velmi specificky vázat některé druhy lektinů (*Dolichos biflorus*, *Vicia villosa* a *Wisteria floribunda* aglutininy). Koncový *N*-acetylgalaktosamin je rozpoznáván těmito lektiny. Výskyt poměrně neobvyklých *N*-acetylgalactosaminyl glykanů spojených asparaginem, které se nachází na sekrečních proteinech BNC buněk, naznačuje funkční poslání této specifické glykosylace. Kravské BNC granula váží převážně glykoprotein PAG a protein I sdružený s prolaktinem, PRP-I (z angl. prolactin-related protein I).^{59,60}

PAGs jsou hlavní sekreční proteiny trofoblastů přežvýkavců. BNC buňky zásobují tyto proteiny v sekrečních váčcích a po fúzi s buňkami děložní tkáně matky je vylučují do mateřského organismu.⁶¹ Od chvíle, kdy je zárodek dostatečně blízko děložní stěny, začíná utváření placenty.⁵⁸ Zásluhou přenosu glykoproteinů PAG z trofoblastu do placentálního stromatu a cévního oběhu matky je možné rozeznávat proteiny v krvi matky během těhotenství. To hraje důležitou roli v diagnostice těhotenství přežvýkavců.⁵⁹

4.3 Funkce glykoproteinu PAG

Existují dvě hlavní hypotézy týkající se funkce glykoproteinu PAG. Jedna mluví o PAGs jako o placentálních hormonech transportovaných do organismu matky pravděpodobně činností žlutého tělíska. Některé studie ukazují, že PAGs dokáží zvýšit produkci prostanoidů, které výrazně ovlivní fertilitu.^{62,57} Druhá hypotéza pojednává o podpoře imunologické tolerance vyvíjejícího se plodu pomocí imunitního systému matky.⁵⁷

Mezi významné úlohy glykoproteinů PAGs také patří jejich role jako proteinasy. Je těžké vyloučit nedostatek enzymové aktivity s výjimkou případů, kdy se v katalytickém centru objeví inaktivní mutace. Ať tak či onak, některé PAGs dokáží vázat peptidové ligandy jako například pepstatin A. Tato schopnost interagovat s peptidy či proteiny, aniž by proběhla jejich hydrolýza, odráží funkci glykoproteinů PAGs. Možná jsou transportními

molekulami, nebo je jejich štěrbina vázající substrát predeterminuje jako specifické receptory.⁶²

Molekula PAG byla rozpoznána na povrchu membrán lidských lymfocytů a monocytů v periferní krvi. Podle jedné z mnoha studií frakce získaná ze séra těhotné matky a bohatá na PAG zakrývá expresi Fc receptoru i detekci HLA-DR antigenu na povrchu lidských monocytů. Tato skutečnost může vysvětlit inhibici buněčných funkcí závislých na receptoru a navrhnout mechanismus snížení zánětlivých a imunologických nemocí v průběhu těhotenství.⁶³

II. Cíle bakalářské práce

- Zjistit, zda PAG glykoprotein interaguje s lektinovými receptory NKR-P1A, CD69, NKG2D a DCL-1
- Sledovat výše uvedené interakce pomocí moderních technologií sacharidových arrayů

Experimentální část

III. Materiál a přístroje

1. Přístroje

384-jamkové destičky	Pierce, USA
Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety	Gilson, USA
Centrifuga Z233 MK-2	Hermle, Německo
Chladnička	Whirlpool, USA
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Geigerova trubice	Mini-Instruments Ltd., Velká Británie
pH metr Φ200	Beckman, USA
Předvážky HF-1200G	AND, USA
Přístroj na měření fluorescence Safire 2	Tecan-Schoeller Instruments, Rakousko
Souprava pro elektroforézu	Sigma, USA
Souprava pro elektropřenos	Scientific Co., USA
Třepačka Grand Boeckel VSR 23	VELP Scientifica, Itálie
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody MilliO	Millipore, USA
Zdroj napětí EPS 500/400	Pharmacia, USA

2. Chemikálie

Akrylamid	Serva, Německo
APS	Serva, Německo
Azid sodný	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Německo
Dihydrogenfosforečnan draselný	Penta, ČR
DTT	Fluka, Švýcarsko
Ethanol	Lachema, ČR
Glycin	Fluka, Švýcarsko
HEPES	Serva, Německo
Hydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
Hydroxid draselný	Lachema, ČR
Hydroxid sodný	Lach-Ner, ČR
Chlorid draselný	Lachema, ČR
Chlorid hořečnatý	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Lach-Ner, ČR

Chlorid vápenatý	Sigma, USA
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina trifluoroctová	Lachema, ČR
Methanol	Lachema, ČR
Nitrocelulózní membrána (0.45 µm)	Schleicher & Schuell, USA
SDS	Serva, Německo
TEMED	Serva, Německo
Tris	Serva, Německo
Ustalovač	Kodak, USA
Vývojka	Kodak, USA

3. Roztoky a pufrů

- *Fixační a odbarvovací roztok pro AA SDS elektroforézu:*
35% EtOH, 10% HAc
- *Fixační a odbarvovací roztok pro nitrocelulózní membránu:*
45% MeOH, 10% HAc
- *Barvicí roztok pro SDS elektroforézu:*
45% MeOH, 10% HAc, 0,25% CBB R-250
- *PBS pufr:* 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH = 7,4
- *Transformační pufr (TB):*
10 mM HEPES, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl
pH upraveno pomocí KOH na 6,7 a přidáno 1,1% MnCl₂
- *Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu:*
250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH = 8,3
- *Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu:*
50 mM Tris-Cl pH = 6,8
100 mM DTT
2% SDS
0,01% bromfenolová modř
10% glycerol
- *Pufr pro elektropřenos:* 25 mM Tris pH = 8,3; 150 mM glycin, 20% methanol

4. Další materiály

Standardní sérové glykoproteiny, bovinní fetuin a lidský transferin byly komerční preparáty dodané firmou SIGMA, a použité bez další purifikace.

5. Vzorky PAG glykoproteinů

Vzorky PAG glykoproteinů byly laskavě poskytnuty Dr. Karlem Klischem z Medical School v Hannoveru, SRN. Tyto glykoproteiny byly extrahovány z homogenizovaných hovězích placent a poté purifikovány na základě publikované metody⁶¹. Dle publikovaných výsledků putuje tento glykoprotein na SDS elektroforese ve formě tří proužků o molekulové hmotnosti 56, 66 a 75 kDa.

IV. Použité metody

1. Desialylace glykoproteinových vzorků

Vzorky použitých glykoproteinů byly desialovány chemickou metodou s použitím 0.01 M kyseliny sírové zahřátím v kyselém prostředí o pH 2.0 na 80 °C po dobu 1 hodiny. Po skončení reakce byly vzorky neutralizovány na pH 6.8 pomocí 1 M roztoku Tris-HCl pH 8.0, a přímo použity pro SDS elektroforesu, ligandový blot, a glykoproteinové arraye.

2. Příprava a značení lymfocytárních receptorů

V experimentech byl použit panel lidských lymfocytárních receptorů, jednalo se o rekombinantní dimerické rozpustné formy těchto receptorů označované jako hNKR-P1, hCD69, hNKG-2D, a hDCL-1. Tyto receptory byly připraveny podle publikované metodiky⁵⁵, a značeny isotopem jodu ¹²⁵I s použitím Iodogenového protokolu⁶⁴. Pro použití v glykoproteinové arrayi byly lektiny značeny pomocí NHS-fluoresceinu a NHS-rhodaminu jak bylo popsáno v bakalářské práci Georgie Christofi⁶⁵. Isotopově značené lektinové preparáty je potřeba použít nejpozději do měsíce od jejich označení, zatímco fluorescenčně značené preparáty jsou dlouhodobě stabilní po zmrazení při -80°C v puftru s obsahem 20 % glycerolu. Po rozmrazení a naředění na cílové koncentrace mohou být takové preparáty použity i několik let po jejich fluorescenčním značení.

3. Sledování vazby pomocí ligandového blotu

Vzorky vyšetřovaných glykoproteinů (1 – 2 μg na dráhu) jsou separovány pomocí SDS elektroforezy ve 12% polyakrylamidovém gelu, a poté přeneseny na nitrocelulóзовou membránu elektropřenosem prováděným v Tris-glycinovém elektroodovém pufru s obsahem 20% methanolu. Po přenosu je membrána krátce promyta v destilované vodě, a přenesené proteiny jsou vizualizovány Coomassie Brilliant Blue R-250, a odbarvovány krátce v 50% methanolu a 10% kyselině octové. Membrána je několikrát promyta v PBS pufru, a přenesené obarvené proteiny dokumentovány s použitím běžného scanneru. Poté je membrána blokována nejméně 2 hodiny v PBS pufru s přídavkem 2% BSA, přenesena do chladové místnosti, a inkubována s radioaktivně značenými vzorky lektinů (cca 100 kBq na pokus) v chladové místnosti přes noc. Následuje opláchnutí chladným PBS puferem 4 x 1 min, osušení membrány, a proměření intenzity radioaktivního signálu laboratorním monitorem s Geigerovou trubicí series 900 mini-monitor (Mini-Instruments Ltd., Velká Británie). Podle intenzity změřené fluorescence je poté stanovena expozice autoradiografickou technikou v kazetě z použitím filmu Agfa CP-VB (Agfa-Gevaert N.V., Belgie) v expoziční kazetě s intenzifikační obrazovkou Wolf L-Plus (Sigma Laboratory Supplies). Po exponování je film vyvolán 5 min v ochranném červeném světle vytvářeném filtrem Kodak GBX-2 (Sigma Laboratory Supplies) s použitím vývojky Kodak Polymax RT developer, a poté promyt a 5 min ustálen v ustalovači Kodak Polymax RT fixer. Vyvolaný film je skenován na standardním scanneru, a zobrazen bez jakékoliv další elektronické manipulace.

4. Sledování vazby technikou sacharidových arrayů

Pro experiment se používá 384 jamková (formát 24 x 16 jamek) mikrotitrační destička CovaLink amino plate firmy Pierce (USA) s víčkem obsahující kovalentně vázané aminoskupiny. Do čtvercových jamek této destičky o objemu cca 100 μl pipetujeme ve formátu 3 x 2 vždy šest opakování vyšetřovaných látek zahrnujících 90 μl BSA, GalNAc₂₃BSA, AGP, asialoAGP, THG, asialoTHG, PAG, a asialoPAG v koncentraci 10 mg/ml v pufru PBS, a dále 10 μl bifunkčního činidla DSS rozpuštěného v DMSO v koncentraci 5 mg/ml. Po dokonalém promíchání obou komponent probíhá imobilizační reakce, jejíž účinnost je monitorována pomocí radioaktivně značených látek o známe specifické aktivitě. Po skončení reakce jsou desky pětkrát promyty PBS, a blokovány

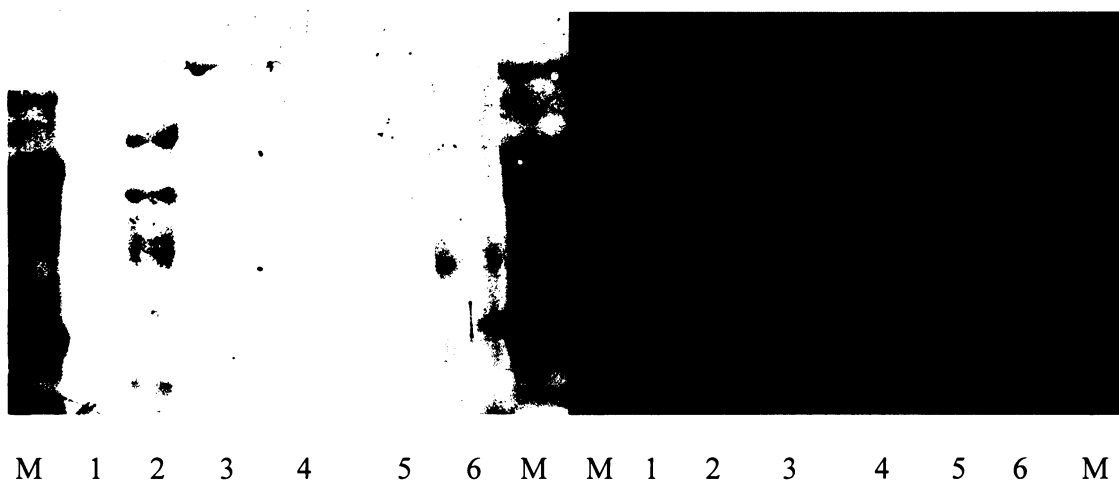
v přítomnosti 5% (50 mg/ml) BSA v PBS po dobu nejméně dvou hodin. Blokované desky jsou opět pětkrát promyty pufrům PBS, a buďto okamžitě použity pro vazebný experiment, nebo vysušeny a skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vlastní vazebný pokus začíná přidáním fluorescenčně značených proteinů (0.1 mg/ml) ve formě dvojic rozpustných receptorů, z nichž jeden je značen pomocí fluoresceinu a druhý pomocí rhodaminu. Deska je inkubována se značenými receptory v lednici ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) nejméně dvě hodiny, poté je pětkrát promyta pufrům PBS, a navázané molekuly receptoru jsou disociovány a převedeny do roztoku přidávkem 100 μl 0.1 M sodno-acetátového pufru pH 3.5 po dobu nejméně dvou hodin. Poté je intenzita fluorescence v jednotlivých jamkách měřena pomocí zařízení Safire 2 (Tecan) na základě níže uvedených parametrů. Pro fluoresceinem značené proteiny byla měřena fluorescence na dně jamky („fluorescence bottom“), excitační vlnová délka byla 496 nm, emisní vlnová délka 519 nm, šířka excitační štěrby 5 nm, šířka emisní štěrby 20 nm, citlivost měření (gain) 50, měření bylo čtyřikrát opakováno, čas integrace signálu byl 40 μs , a měření probíhalo při laboratorní teplotě ($27,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pro rhodaminem značené proteiny byla též měřena fluorescence na dně jamky („fluorescence bottom“) při excitační vlnové délce 546 nm, emisní vlnová délka byla 577 nm, šířka excitační štěrby 5 nm, šířka emisní štěrby 20 nm, citlivost měření (gain) 55, měření bylo opakováno čtyřikrát, čas integrace signálu byl 40 μs , měření probíhalo při laboratorní teplotě ($26,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Hodnoty intenzity fluorescence naměřené ve všech šesti jamkách byly statisticky vyhodnoceny, a výsledek byl vyjádřen jako průměr šesti změřených čtveřic \pm směrodatná odchylka.

V. Výsledky

1. Sledování reaktivity PAG glykoproteinů s lektiny NK buněk pomocí techniky ligandových blotů

Jako první metoda pro sledování interakce PAG glykoproteinů s lektinovými receptory NK buněk byla vybrána metoda tzv. ligandového blotu s převrstvením elektroforeogramů značenými receptory. Tato metoda využívá elektropřenosu sledovaných glykoproteinů na nitrocelulosovou membránu po jejich separaci SDS elektroforesou. Elektropřenos se provede v duplikátu, jedna membrána je poté barvena proteinovými barvivy, zatímco druhá je blokována pomocí BSA, a poté převrstvena roztokem sledovaného lektinu značeného radioaktivně. Po krátké inkubaci v chladové místnosti při 4 °C se provede promytí nezreagovaných lektinových receptorů, poté je membrána vysušena, zabalena do ochranné fólie, a vazba lektinů zviditelněna pomocí přímé autoradiografie.

V experimentu byly použity čtyři různé lektinové receptory lidských NK buněk, proteiny hCD69, hNKR-P1A, hNKG2D, a hDCL-1. Výsledek pro proteiny hNKR-P1A a hNKG2D bylo obtížné odečíst, protože docházelo k silné nespecifické vazbě na nitrocelulosovou membránu, a na blotech bylo vysoké pozadí oproti signálu. V případě hDCL-1 nebyla žádná vazba na vyšetřované glykoproteiny pozorována. Při použití proteinu hCD69 docházelo k vazbě na nativní fetuin umístěný ve dráze 1, i když jeho následnou desialylací se vazba významně snížila (při proteinovém barvení se poněkud snížila mobilita tohoto glykoproteinu – viz. obr. 3, dráha 2). K vazbě na molekulu transferinu putující v dráze 3 nedocházelo, stejně negativní byl i desialovaný transferin v dráze 4. Zajímavý výsledek byl získán pro sledovaný glykoprotein PAG (obr.3, dráha 5 a 6): lektinový receptor hCD69 pravděpodobně reagoval pouze s nejmenší formou tohoto glykoproteinu o velikosti 56 kDa, a reaktivita se v tomto případě naopak zvýšila po desialylací. Zbývající molekulární formy PAG glykoproteinu o velikosti 75 kDa a 66 kDa reagovaly pouze slabě.



Obr.3: Reaktivita některých standardních proteinů krevního séra, a PAG glykoproteinu s lektinem NK buněk hCD69. V jednotlivých drahách byly separovány následující vzorky: M, marker, 1, fetuin nativní, 2, fetuin desialovaný, 3, transferin nativní, 4, transferin desialovaný, 5, PAG nativní, 6, PAG desialovaný, přeneseny na nitrocelulózovou membránu, a membrána byla barvena Coomassie Brilliant Blue R-250 (panel A), nebo blokována BSA a převrstvena značeným NKR-P1A proteinem, po jehož odmytí byla reaktivita detekována autoradiograficky (panel B).

2. Vazba zkoumaných glykoproteinů na polystyrenové destičky

Technika sacharidových arrayů je moderní rychlá technika měření protein – sacharidových interakcí, která je velmi reprodukovatelná, vyžaduje pouze minimální množství interagujících sloučenin, a lze ji do různé míry automatizovat. Proto se tato technika stává stále populárnější v současném glykobiologickém výzkumu. Aby bylo možno výsledky vazby lektinů na imobilizované sacharidy správně vyhodnotit, je potřeba nejprve zjistit účinnost imobilizace přidaných sacharidových ligandů na mikrotitrační destičku. Za tím účelem jsou většinou imobilizované látky radioaktivně značené do známé specifické aktivity, a na základě měření radioaktivity v jamkách po imobilizaci sacharidů nebo glykoproteinů a jejich promytí zjistíme množství navázaných ligandů.

Výsledky těchto stanovení jsou uvedené v přehledné podobě v tabulce 1. Panel sledovaných látek byl poněkud pozměněn zařazením neoglykoproteinu GalNAc₃₀BSA, a záměnou nereaktivního transferinu za Tamm-Horsfallův glykoprotein lidské moči, který obsahuje stejné Sd(a) sacharidové antigeny jako PAG, i když v menší hustotě. Výsledky testu imobilizace ukazují, že její účinnost je závislá jednak na chemickém charakteru použitého glykoproteinu, jednak též na koncentraci. Ve všech případech bylo nejlepší

účinnosti imobilizace dosaženo při 1 μg přidávané látky, a tato koncentrace byla potom též použita ve standardní sacharidové arrayi.

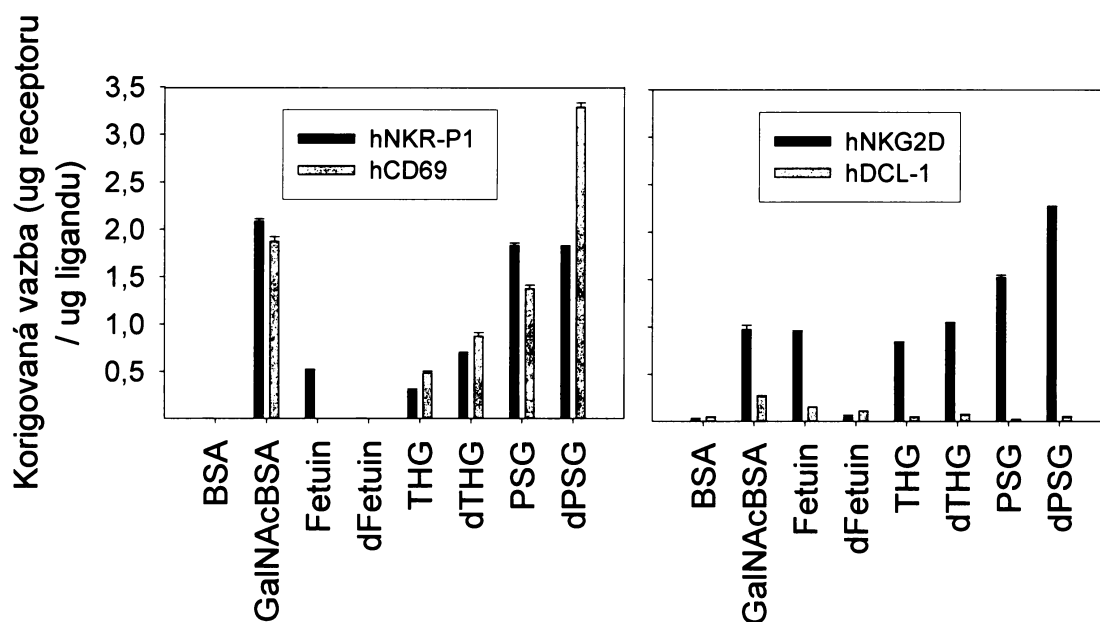
Tabulka 1. Měření účinnosti imobilizace některých glykoproteinů a neoglykoproteinů na jamky polystyrénových titračních destiček Nunc384f

Látka	μg látky navázané v jamkách po přidání		
	0.1 μg	1 μg	10 μg
BSA	0.085	0.90	7.5
GalNAc ₃₀ BSA	0.082	0.85	7.2
Fetuin	0.050	0.54	4.5
Asialofetuin	0.053	0.60	5.5
THG	0.066	0.70	6.4
AsialoTHG	0.070	0.74	6.6
PAG	0.076	0.80	7.4
AsialoPAG	0.079	0.85	7.8

3. Sledování reaktivity PAG glykoproteinů s lektiny NK buněk pomocí sacharidových arrayů

Po předběžném experimentu popsaném v části 4.2 byl proveden vlastní vazebný test na sacharidové arrayi prezentované v destičce Nunc384f. Vzhledem k tomu, že byl použit panel 8 látek popsaných v Tabulce 1, a vzhledem k formátu desky 24 x 16, byly použity dva řádky této desky, a jednotlivé látky byly aplikovány vždy šestkrát, tj. ve formátu 3 x 2. Po důkladném zablokování desky neaktivním proteinem BSA, byly do jamek pipetovány vždy dva proteiny značené pomocí fluoresceinu a rhodaminu, a byla použita možnost současného měření obou fluorescenčních signálů vedle sebe. Na celý pokus se tedy použily pouze čtyři řádky z šestnáctiřádkové desky, dva řádky na vyšetření vazby hCD69 a hNKR-P1A, a dva řádky na vyšetření vazby hNKG2D a hDCL-1. Intenzita vazby byla korigována na stupeň pokrytí desky (viz. 4.2), a vyjadřována jako μg vázaného receptoru na 1 μg imobilizovaného ligandu.

Výsledek vazebného testu čtyř lidských rekombinantních NK receptorů na glykoproteinovou array je uveden na obr. 4. Z výsledků je zřejmé, že s výjimkou

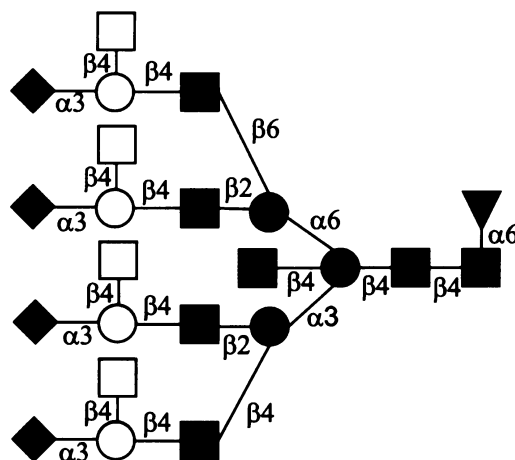


Sledovaný glykoprotein

Obr.4: Sledování vazby 4 lidských lektinových receptorů na vybraný soubor glykoproteinů s použitím sacharidové arraye. Detailní popis experimentu je uveden v textu a v metodické části.

receptoru hDCL-1 docházelo k vazbě všech tří ostatních receptorů na sledované sloučeniny, i když v různé míře. Vazba receptorů hCD69 a hNKR-P1A byla podobná, s výjimkou zvýšení vazby na desialovaný PAG v případě receptoru hCD69. Vazba receptoru hNKG2D sleduje podobný trend jako vazba hNKR-P1A, i když je patrná kvantitativně poněkud nižší vazba na GalNAcBSA neoglykoprotein, a naopak poněkud vyšší vazba na přirozený glykoprotein fetuin.

VI. Diskuse



Obr.5: Struktura N-glykosidicky vázaného oligosacharidového řetězce glykoproteinu PAG⁶¹

Glykoprotein PAG plní několik důležitých úloh, které se uplatňují v průběhu těhotenství. Tato molekula může podléhat specifické glykosylaci s následnou důležitou imunoregulační funkcí během těhotenství. Glykosylace proteinů je podstatným rysem regulace poločasu života sérových proteinů. Glykany s koncovým GalNAc jsou potenciálními ligandy asialovaných glykoproteinových receptorů. Tento fakt je významný pro odstranění asialovaných glykoproteinů z krve.⁵⁹

Poskytnutím vzorků glykoproteinu PAG Dr. Karlem Klischem z Medical School v Hannoveru mi bylo umožněno zahájení vypracování této bakalářské práce. Cílem pak bylo zkoumat případné interakce PAG se čtyřmi lektinovými receptory: NKR-P1A, CD69, NKG2D a DCL-1.

V samotné experimentální části jsem se nejprve snažila zjistit, zda glykoprotein PAG interaguje s lektinovými receptory metodou převrstvování blotů. Poté jsem použila destičkový vazebný test pro sledování eventuálních interakcí.

Pomocí techniky ligandových blotů se ukázalo, že pouze některé lektinové receptory lidských NK buněk reagují se zkoumanými glykoproteiny PAG. Reaktivita proteinu hCD69 se zvyšovala po desialylaci glykoproteinu. Tento lektinový receptor nejvíce reagoval s formou glykoproteinu PAG o velikosti 56 kDa, ostatní dvě izoformy (75 kDa a 66 kDa) projevily slabší vazbu. Receptory hNKR-P1A a hNKG2D se velmi nespecificky vážaly na nitrocelulosovou membránu, a proto se nepodařilo získat

uspokojivé výsledky. U proteinu hDCL-1 byl resultát negativní, tj. nedocházelo k vazbě na žádnou formu sledovaných glykoproteinů.

Glykoprotein PAG obsahuje tetraantenární oligosacharidové řetězce nesoucí unikátní Sd(a) epitopy, které jsou připojeny na kostru glykoproteinu na čtyřech vazebných místech. Lidský Tamm-Horsfallův glykoprotein také nese ve své struktuře Sd(a) antigen, ale v mnohem menší hustotě než PAG. Vyšší reaktivity receptorů s PAG ve srovnání s THG ukazující na důležitou roli hustoty epitopu potvrzují domněnku, že taková reaktivita doopravdy prostupuje skrz Sd(a) epitop.

Sacharidové arraye prezentují výsledky, z nichž jsou patrné vazby receptorů na zkoumané glykoproteiny. Proteiny hNKR-P1A a hCD69 vykazují podobné výsledky, rozdíl je vidět pouze v navýšení vazby hCD69 na desialovaný PAG a silnější interakce mezi hNKR-P1 a nativním fetuinem. Receptor hNKG2D projevuje analogické tendence jako proteiny hNKR-P1A a hCD69 s rozdílem vyšší vazby na nativní fetuin a nižší vazby na GalNAcBSA neoglykoprotein. Protein hDCL-1 neprokázal žádnou interakci se sledovanými sloučeninami.

Na základě dosud popsané sacharidové specifity receptoru CD69 lze předpokládat reaktivitu se zbytky β -glykosidicky vázaných GalNAc a s kyselinami sialovými. V případě kyselin sialových ovšem reaktivita ještě závisí na typu vazby, receptor přednostně reaguje pouze s alfa 2-6 vázanou sialovou kyselinou. Tento druh reaktivity se potvrdil u jednoho z vyšetřovaných kontrolních glykoproteinů u fetuinu. Značený NKR-P1A receptor reagoval s nativním fetuinem obsahujícím alfa 2-6 vázané kyseliny sialové, (obr. 3, dráha 1), ale nereagoval s desialovaným fetuinem (obr. 3, dráha 2), ani s nativním transferinem obsahujícím kyseliny sialové vázané alfa 2-3 vazbou. V případě vyšetřovaného PAG glykoproteinu je jasně zřetelná reaktivita s desialovanou formou (obr. 3, dráha 6), s nativní formou PAG tento lektin příliš nereagoval. Pravděpodobně docházelo k maskování GalNAc epitopu na reaktivním Sd(a) antigenu zbytky kyselin sialových.

VII. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo sledování možných interakcí glykoproteinů PAG s lektinovými receptory NKR-P1A, CD69, NKG2D a DCL-1. Použitím metod převrstvování blotů a sacharidových arrayů se zjistilo:

- Nejvíce reaktivní byl protein hCD69, který se silně vázal na desialovaný PAG o velikosti 56 kDa
- Proteiny hNKR-P1A a hCD69 mají podobné vazebné interakce se sledovanými sloučeninami, rozdíl je v navýšení vazby hCD69 na desialovaný PAG a silnější interakce mezi hNKR-P1A a nativním fetuinem
- Receptor hNKG2D se váže na nativní fetuin, ale má nižší afinitu na GalNAcBSA neoglykoprotein oproti proteinům hNKR-P1A a hCD69
- Protein hDCL-1 neinteragoval s glykoproteinem PAG, ani s žádnými dalšími sledovanými sloučeninami

Seznam literatury

1. Bartůňková, J., Šedivá, A.: *Imunologie minimum pro praxi*, Triton, Praha (2001)
2. Hořejší, V.: *Vesmír* 73, 615 (1994)
3. Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (2001)
4. Janeway, Ch. A. Jr., Medzhitov, R.: *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216 (2002)
5. http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_23965.html, staženo dne 22.3.2008
6. Möller, P.: *Virchows. Archiv. A Patol. Anat.* 419, 1-5 (1991)
7. Hořejší, V.: *Vesmír* 74, 625 (1995)
8. Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, Darnell: *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman and company, 2000
9. <http://www.cs.cityu.edu.hk/~howard/Bioinformatics/Membrane/membrane.htm>, staženo dne 22.3.2008
10. Biron, Ch. A., Brossay, L.: *Curr. Opin. Immunol.* 13, 458-464 (2001)
11. Borg, Ch., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., Ryffel, B., Cambi, A., Figdor, C., Vainchenker, W., Galy, A., Caignard, A., Zitvogel, L.: *Blood* 104, 3267-3275 (2004)
12. Ljunggren, H.-G., Kärre, K.: *Immunol. Today* 11, 237-244 (1990)
13. Johansson, S., Johansson, M., Rosmaraki, E., Vahlne, G., Mehr, R., Salmon-Divon, M., Lemonnier, F., Kärre, K., Höglund, P.: *J. Exp. Med.* 201, 1145-1155 (2005)
14. Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L., Degli-Esposti, M. A., Hayakawa, Y.: *Mol. Immunol.* 42, 501-510 (2005)
15. Loke, Y. W., King, A.: *Biochem. Soc. Trans.* 28, 196-198 (2000)
16. Szekeres-Bartho, J.: *Reprod. Biomed. Online* 16, 211-217 (2008)
17. Yokoyama, W. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5998-6000 (1997)
18. Lee, S.-H., Miyagi, T., Biron, Ch.A.: *Trends Immunol.* 28, 252-259 (2007)
19. Biron, Ch.A.: *Curr. Opin. Immunol.* 9, 24-34 (1997)
20. Cerwenka, A., Lanier, L. L.: *Nat. Rev. Immunol.* 1, 41-49 (2001)
21. Kelley, J., Walter, L., Trowsdale, J.: *PloS Genet.* 1, 27 (2005)
22. Chen, X., Trivedi, P. P., Ge, B., Krzewski, K., Strominger, J. L.: *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 104, 6329-6334 (2007)
23. Famiglietti, S. J., Nakamura, K., Cambier, J. C.: *Immunol. Lett.* 68, 35-40 (1999)
24. Raulet, D. H., Vance, R. E., McMahon, Ch. W.: *Annu. Rev. Immunol.* 19, 291-330 (2001)
25. Hasenkamp, J., Borgerding, A., Uhrberg, M., Falk, C., Chapuy, B., Wulf, G., Jung, W., Trümper, L., Glass, B.: *Scand. J. Immunol.* 67, 218-229 (2008)
26. Anastassiou, G., Rebmann, V., Wagner, S., Bornfeld, N., Grosse-Wilde, H.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2016-2019 (2003)
27. Fan, Q. R., Long, E. O., Wiley, D. C.: *Nat. Immunol.* 2, 452-460 (2001)
28. Borrego, F., Kabat, J., Sanni, T. B., Coligan, J. E.: *J. Immunol.* 169, 6102-6111 (2002)
29. Kung, S. K., Su, R. C., Shannon, J., Miller, R. G.: *J. Immunol.* 162, 5876-5887 (1999)

30. Lohi, O., Lehto, V.-P.: *Apoptosis* **3**, 335-336 (1998)
31. Leibson, P. J.: *Immunity* **6**, 655-661 (1997)
32. Schnittger, S., Hamann, J., Dannenberg, Ch., Fiebig, H., Strauss, M., Fonatsch, Ch.: *Eur. J. Immunol.* **23**, 2711-2713 (1993)
33. Farag, S. S., Fehniger, T. A., Ruggeri, L., Velardi, A., Caligiuri, M. A.: *Blood* **100**, 1935-1947 (2002)
34. Ryan, J. C., Niemi, E. C., Nakamura, M. C., Seaman, W. E.: *J. Exp. Med.* **181**, 1911-1915 (1995)
35. Hollyoake, M., Duncan, Campbell, R., Aguado, R.: *Mol. Biol. Evol.* **22**, 1661-1672 (2005)
36. Maenaka, K., Juji, T., Nakayama, T., Wyer, J. R., Gao, G. F., Maenaka, T., Zaccari, N. R., Kikuchi, A., Yabe, T., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Stuart, D., Jones, E., Y., van der Merwe, P. A.: *J. Biol. Chem.* **274**, 28329-28334 (1999)
37. Ryan, J. C., Seaman, W. E.: *Immunol. Rev.* **155**, 79-89 (1997)
38. Bezouška, K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69**, 536 (2004)
39. Ho, E. L., Heusel, J. W., Brown, M. G., Matsumoto, K., Scalzo, A. A., Yokoyama, W. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6320-6325 (1998)
40. Tanamachi, D. M., Hanke, T., Takizawa, H., Jamieson, A. M., Raulet, D. H.: *J. Exp. Med.* **193**, 307-316 (2001)
41. Makrigiannis, A. P., Anderson, S. K.: *Immunol. Res.* **21**, 39-47 (2000)
42. Dimasi, N., Sawicki, M. W., Reineck, L. A., Li, Y., Natarajan, K., Margulies, D. H., Mariuzza, R. A.: *J. Mol. Biol.* **320**, 573-585 (2002)
43. Lanier, L. L.: *Immunity* **6**, 371-378 (1997)
44. Romero, P., Ortega, C., Palma, A., Molina, I. J., Peña, J., Santamaria, M.: *J. Leukoc. Biol.* **70**, 219-224 (2001)
45. Sullivan, L. C., Clements, C. S., Beddoe, T., Johnson, D., Hoare, H. L., Lin, J., Huyton, T., Hopkins, E. J., Reid, H. H., Wilce, M. C., Kabat, J., Borrego, F., Coligan, J. E., Rossjohn, J., Brooks, A. G.: *Immunity* **27**, 900-911 (2007)
46. Borrego, F., Masilamani, M., Marusina, A. I., Tang, X., Coligan, J. E.: *Immunol. Res.* **35**, 263-277 (2006)
47. Sharon, N., Lis, H.: *Glycobiology* **14**, 53-62 (2004)
48. Dixon, H. B. F.: *J. Biol. Chem.* **256**, 12-14 (1981)
49. Tasumi, S., Ohira, T., Kawazoe, I., Suetake, H., Suzuki, Y., Aida, K.: *J. Biol. Chem.* **277**, 27305-27311 (2002)
50. Ao, J., Ling, E., Xiao-Qiang, Y.: *Mol. Immunol.* **44**, 2541-2548 (2007)
51. Weis, W.I., Taylor, M. E., Drickamer, K.: *Immunol. Rev.* **163**, 19-34 (1998)
52. Wong, S. Y. C., Arsequell, G.: *Immunology of Carbohydrates*, Kluwer Academic/Plenum publishers, Springer (2003)
53. Figdor, C. G., van Kooyk, Y., Adema, G. J.: *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 77-84 (2002)
54. Drickamer, K., Fadden, A. J.: *Biochem. Soc. Symp.* **69**, 59-72 (2002)

55. Kekuda, R., Prasad, P. D., Wu, X., Wang, H., You-Jun Fei, Leibach, F. H., Ganapathy, V.: *J. Biol. Chem.* 273, 15971-15979 (1998)
56. Mol, J. A., Clegg, R. A.: *Biology of the Mammary Gland*, Springer (2000)
57. Stout, T. A. E., Wade, J. F.: *R&W Communications, Havemeyer Foundation Monograph Series No. 16* (2005)
58. Sousa, N M., Ayad, A., Beckers, J. F., Gajewski, Z.: *J Physiol. Pharmacol.* 57, 153-171 (2006)
59. Klisch, K., Boos, A., Friedrich, M., Herzog, K., Feldmann, M., Sousa, N. M., Beckers, J. F., Leiser, R., Schuler, G.: *Reproduction* 132, 791-798 (2006)
60. Klisch, K., Leiser, R.: *Histochem. Cell Biol.* 119, 211-217 (2003)
61. Klisch, K., Jeanrond, E., Pang, P. C., Pich, A., Schuler, G., Dantzer, V., Kowalewski, M. P., Dell, A.: *Glycobiology* 18, 42-52 (2008)
62. Green, J. A., Xie, S., Roberts, R. M.: *Rev. Reprod.* 3, 62-69 (1998)
63. Persellin, R. H., Rhodes, J.: *Clin. Exp. Immunol.* 46, 350-354 (1981)
64. Iodogenový protokol – firemní literatura, firma Pierce
65. Christof, G.: *Bakalářská práce, Katedra biochemie PFF UK, Praha (2004)*

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

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka