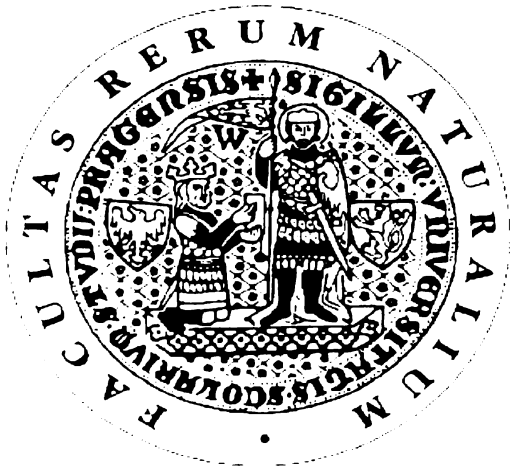
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra biochemie



Analýza receptorových komplexů přirozených zabíječských buněk s využitím nativní elektroforesy

Bakalářská práce

Vypracovala: Jitka Jermanová

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Praha 2008

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE
3233218474

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

př. č. 92 b/08 stud
(brosch.)

Prohlášení

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

V Praze dne 6.6.08 Podpis .....

Děkuji Prof.RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. a členům laboratoře za rady, připomínky a ochotu kdykoliv pomoci.

OBSAH 4

Seznam použitých zkratek 6

1. Teoretický úvod 8

1.1 Imunitní systém 8

1.1.1 Druhy imunitních mechanismů 8

1.1.2 Složky imunitního systému 9

1.1.2.1 Buňky imunitního systému 9

1.1.2.2 B-lymfocyty 10

1.1.2.3 T-lymfocyty 10

1.1.2.4 Povrchové molekuly leukocytů 11

1.2 NK-buňky 12

1.2.1 NK-buněčné rozpoznávání 12

1.2.2 Funkce NK buněk v organismu 13

1.2.3 Receptory NK-buněk 13

1.2.3.1 Aktivační receptory 13

1.2.3.2 Inhibiční receptory 14

1.2.3.3 Receptory imunoglobulinové rodiny 14

1.2.3.4 Receptory lektinové rodiny C-typu 14

1.3 Molekula CD69 15

1.3.1 Struktura a funkce molekuly CD69 15

1.4 Molekula NKR-P1 16

1.4.1 Struktura a funkce molekuly NKR-P1 16

1.5 Membránové mikrodomény 17

1.5.1 Biomembrány 17

1.5.2 Membránové mikrodomény a jejich složení 17

1.5.3 Signalizace pomocí lipidových raftů 18

2. Cíle práce 19

3. Experimentální část 20

3.1 Seznam použitých chemikálií, materiálů, přístrojů a zařízení 20

3.1.1 Použité chemikálie 20

3.1.2 Polyklonální králičí antiséra 21
3.1.3 Použitá media a roztoky....22
3.1.4 Použitý materiál a přístroje....22
3.2 Metody....23
3.2.1 Příprava membránových mikrodomén ultracentrifugací v sacharosovém gradientu.23
3.2.2 Příprava vzorků membránových mikrodomén pro BN-PAGE....24
3.2.3 Příprava gradientových gelů pro BN-PAGE....24
3.2.4 Separace proteinových komplexů – BN-PAGE....25
3.2.5 Western blott – elektropřenos....25
3.2.6 Imunobarvení – detekce protilátkami....25
3.2.7 Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií....26
4. Výsledky....27
5. Diskuse....31
6. Závěr....33
7. Seznam použité literatury....34

Seznam použitých zkratek

AB – akrylamid/N,N´methylen-bis-akrylamid

Ab – protilátka (Antibody)

ACN - acetonitril

ADCC – Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

Ag – antigen

AMK – aminokyselina

APC – antigen prezentující buňka (Antigen Presentig Cell)

APS – peroxosíran amonný

Bis-Tris – bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan

BN-PAGE – modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza (Blue-Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Brij 58 – polyoxyethylen-20-cetylether

CBB – Coomassie Briliant Blue

CD - označení povrchových leukocytárních molekul (Cluster of Differentiation)

CTL – cytotoxické T-lymfocyty (Cytotoxic T-Lymfocyte)

CRD – sacharid rozpoznávající doména (Carbohydrate Recognition Domain)

DMSO - dimethylsulfoxid

ECL – zesílená chemiluminescence (Enhanced Chemiluminiscence)

EDTA – ethylendiamin tetraoctová kyselina

EGF – epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)

GB – gelový pufr (Gel Buffer)

GPI – glykosylfosfatidylinositol

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina

HLA – lidské leukocytární antigeny (Human Leukocyte Antigens)

IFN - interferon

ITAM - imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif)

ITIM - imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif)

KIR - zabíječský receptor imunoglobulinového typu (Killer Immunoglobulin Receptor)

LAT – adaptorový protein (Linker of Activated T-cells)

MHC – hlaní hiskompatibilní komplex (Major Hiscompatibility Complex)

MS – hmotnostní spektroskopie

NC - nitrocelulosa

NK – „přirozené zabíječské buňky“ (Natural Killers)

NKC - komplex genů NK buněk (Natural Killer Complex)

NKT - „přirozeně zabíječské“ T buňky

PBS – fosfátový fyziologický roztok

PTK – proteintyrosin kináza

TCR – antigenní receptor T-lymfocytů (T-cell Receptor)

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

Tricin - N-tris(hydroxymethyl)-methyl glycin

Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethan

T_{Reg} – regulační T lymfocyty (regulation)

T_C - cytotoxické T lymfocyty (cytotoxicity)

T_H - pomocné T lymfocyty (helper)

TRAIL – ligand příbuzný TNF indukující apoptosu (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)

PDGF – růstový faktor krevních destiček (Platelet-Derived Growth Factor)

TNF – faktor nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Factor)

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je základním homeostatickým mechanismem organismu. Jeho hlavní funkcí je udržet vnitřní prostředí organismu v jeho přirozené rovnováze. Tento mechanismus dokáže rozpoznávat „škodlivé" od „neškodného", a tím chrání organismus proti škodlivým látkám a parazitům z vnějšího i vnitřního prostředí. Schopnost rozpoznání se projevuje ve třech hlavních směrech, jako obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled.

Imunitní systém je tvořen širokou řadou makromolekul, nízkomolárních látek, jednotlivých buněk, tkání a orgánů. Ty jako celek tvoří lymfatickou tkáň a lymfatické orgány. V lymfatických orgánech dochází ke vzniku, diferenciaci a zrání jednotlivých buněk imunitního systému. Jsou také místem, kde probíhají hlavní fáze imunitních reakcí[1].

1.1.1 Druhy imunitních mechanismů

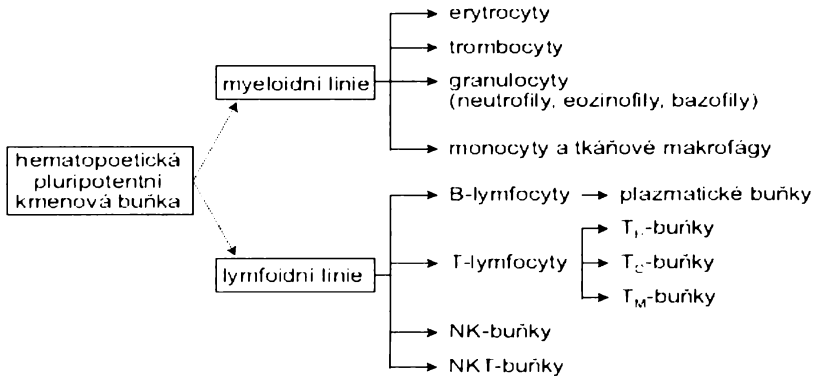
Imunitní mechanismy můžeme rozdělit na dva různé typy. Prvním typem je evolučně starší, neadaptivní mechanismus imunitní reakce. Tento mechanismus zajišťují molekuly a buňky, které jsou v organismu stále připraveny, jsou účinné proti mnoha patogenům a na přítomnost škodlivin v organismu reagují velmi rychle, řádově se jedná o minuty. Nespecifické mechanismy tvoří složky buněčné, které představují fagocytující buňky a NK (*Natural Killers*) buňky, a složky humorální, reprezentované komplementovým systémem, interferony, lektiny a jinými sérovými proteiny. Druhým typem je evolučně mladší mechanismus, který se nazývá adaptivní, též specifický. K aktivaci těchto mechanismů dochází teprve po setkání s antigenem, kdy vznikají vysoce specifické struktury, protilátky a povrchové receptory. S tím také souvisí charakteristický rys těchto imunitních reakcí, a tím je imunologická paměť. Tato schopnost umožňuje vyvolat vyšší stav imunitní reaktivity při opakovaném setkání s antigenem. K nástupu imunitní reakce dochází až po několika dnech či týdnech. U obratlovců dochází k vzájemnému propojení a kooperaci těchto dvou mechanismů, které jsou pro život nepostradatelné[1].

1.1.2 Složky imunitního systému

Imunitní systém je složen z mnoha různých druhů buněk a molekul, které vzájemně spolupracují, doplňují se a společně vytvářejí vysoké orgánové systémy, kterými jsou lymfatická tkáň a lymfatické orgány[1]. Podle funkce je rozlišujeme na primární a sekundární . Jako primární orgány se označují kostní dřeň, thymus a u ptáků Fabriziova bursa. V těchto místech buňky imunitního systému vznikají, postupně se diferencují a zrají. Jako sekundární orgány značíme slezinu, lymfatické uzliny a jejich organizované shluky. Hlavní fáze antigenně specifických imunitních reakcí probíhají právě v těchto místech[1].

1.1.2.1 Buňky imunitního systému

Základní součástí imunitního systému jsou buňky imunitního systému – imunocyty, jejichž podstatnou část tvoří bílé krvinky, neboli leukocyty. Leukocyty pocházejí z pluripotentních kmenových buněk, které jsou přítomny v kostní dřeni a v malém počtu se zde udržují po celý život. Vlivem různých faktorů se nadále diferencují (obr.1).



Obr.1 Dělení buněk imunitního systému[2]

Z kmenových buněk vychází dvě základní linie – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie se tvoří monocyty, dále se diferencující na makrofágy a dendritické buňky, tři druhy garnulocytů – neutrofily, eosinofily a bazofily, jejichž tkáňovou formou jsou mastocyty (žírné buňky), dále z této linie pocházejí erytrocyty (červené krvinky) a trombocyty (krevní destičky). Buňky vycházející z myeloidních prekursorů tvoří převážně základ nespecifické části imunitního systému. Naopak buňky zodpovědné za specifické mechanismy imunity se vytvářejí z lymfoidní linie. Jsou to NK buňky a lymfocyty B a T[1].

1.1.2.2 B - lymfocyty (B- buňky)

Vývoj B – lymfocytů u člověka probíhá v kostní dřeni, jejich název je však spojen s místem jejich maturace u ptáků, jež probíhá ve Fabriziově burse. K dokončení vývoje dochází až po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Po prvním setkání naivní B – buňky (ta, která ještě nepřišla do styku s antigenem) s antigenem, který rozpozná její membránově vázanou protilátku, dochází k vazbě Ag – Ab. Tato vazba podnítí rychlé dělení buňky a její následnou diferenciaci na efektorové, neboli plazmatické buňky, a paměťové buňky. Paměťové buňky mají delší životní období než naivní buňky a exprimují stejné membránově vázané protilátky jako jejich rodičovské B - buňky. Plasmatické buňky, jež jsou konečným stadiem diferenciace, produkují protilátky ve formě, která je vylučována a mají velmi malé nebo žádné membránově vázané protilátky. Ačkoli plasmatické buňky žijí pouze krátkou dobu, jsou vysoce specializovány na sekreci protilátek a jsou schopny vyloučit stovky až tisíce molekul protilátek za sekundu[3].

1.1.2.3 T – lymfocyty

T – lymfocyty se tvoří také v kostní dřeni, ale hlavní část jejich vývoje probíhá až v brzlíku (thymus), odkud také plyne jejich název[4]. Během jejich maturace tyto buňky exprimují na své membráně jedinečné antigen vázající molekuly, nazývané T – buněčné receptory (TCR). Na rozdíl od B - lymfocytů, jejichž membránově vázané protilátky rozeznávají samotný antigen, TCR rozpoznají pouze antigen, který je vázaný k buněčným membránovým proteinům nazývaným MHC molekuly (Major Histocompatibility Complex). MHC molekuly jsou polymorfní glykoproteiny, u kterých rozlišujeme dva základní typy[3].

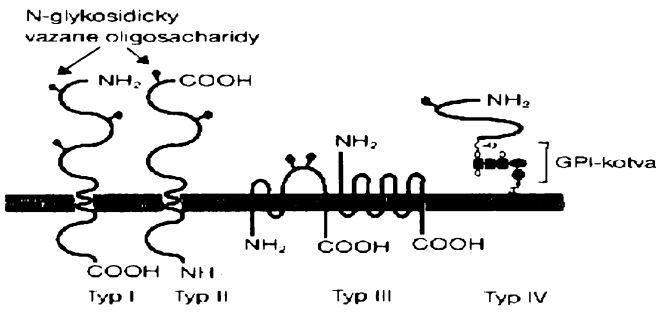
Prvním typem je třída MHC I molekul, které exprimují téměř všechny jaderné buňky obratlovců. Druhým typem je třída MHC II molekul, které jsou exprimovány jen několika málo typy buňek specializovanými pro prezentaci antigenu (APCs). T - buňky se diferencují na T - pomocné buňky (T_H – T-helpers) a T - cytotoxické buňky (T_C). Vzájemně se od sebe odlišují přítomností receptorů CD4(T_H) a CD8(T_C) na svém povrchu. Je známa i třetí subpopulace, kterou představují T – regulační buňky (T_{Reg}). Zralé T_H buňky, aktivované interakcí s antigenem sdruženým s komplexem MHC, se diferencují na efektorové buňky, které napomáhají aktivaci a správné funkci B - buněk, T_C – buněk, makrofágů a ostatních buněk participujících na imunitní odpovědi. Některé T_H buňky se mohou diferenciovat na tzv. paměťové buňky. Zralé T_C buňky se dělí na paměťové buňky a

cytotoxické T lymfocyty (CTL). CTL monitorují buňky těla a eliminují virově infikované buňky, nádorové buňky a buňky cizích transplantovaných tkání. T_{Reg} buňky jsou negativními regulátory imunitního systému, tedy potlačují imunitní odpověď[3].

1.1.2.4 Povrchové molekuly leukocytů

Téměř veškeré děje probíhající při imunitních reakcích jsou závislé na mezibuněčné komunikaci. Tuto komunikaci zajišťují molekuly, které se nacházejí na povrchu membrán buněk imunitního systému i ostatních buněk v organismu. Jsou to molekuly převážně proteinové nebo glykoproteinové povahy. Mají úlohu signalizační, adhezivní, regulační, rozpoznávací a transportní[1]. V dnešní době je známo více než třista druhů leukocytárních povrchových molekul, a proto byl zaveden tzv. CD systém (Cluster of Differenciation), v němž jsou jednotlivé molekuly seřazeny[5]. Každé nově popsané molekule je za označením CD připsáno pořadové číslo, které však nesouvisí s její funkcí ani strukturou[6].

Povrchové molekuly můžeme rozdělit podle několika hledisek. Podle způsobu zakotvení v membráně se tyto proteiny dělí do 4 skupin (viz obr.2). U proteinů I. typu je N-terminální část lokalizována extracelulárně, membránou prochází hydrofobní úsek o délce přibližně 20 aminokyselin a C-terminální část proteinu se nachází v cytoplasmě. Tento typ se nejběžněji vyskytuje. Proteiny II. typu, jež je méně běžný, mají C-terminální část extracelulární a N-terminální část intracelulární. Pro proteiny III. typu je typický opakovaný průchod polypeptidového řetězce napříč cytoplasmatickou membránou (obvykle 4krát nebo 7krát). U posledního, IV. typu proteinů, je celý řetězec lokalizován extracelulárně, přičemž s membránou je molekula asociována pomocí tzv. glykolipidové kotvy a na C-koncové části je navázán glykosylfosfatidylinositol-GPI. Podle strukturní podobnosti dále můžeme povrchové molekuly dělit do tzv. rodin nebo superrodin. Toto dělení se provádí na základě aminokyselinové sekvence molekul[7].



Obr. 2 Druhy povrchových proteinů[8]

1.2 NK- buňky

NK-buňky byly poprvé popsány v roce 1975 jako lymfocyty, schopné bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciace rychle zabíjet nádorové a virově infikované buňky[1].

Přirozené zabíječské buňky jsou velké granulární lymfocyty, které se vyvíjejí z pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni společně s ostatními lymfocyty. Sdílejí některé povrchové znaky s T - lymfocyty, kterým jsou proto vývojově bližší, a jejich vzájemné spojení dokazuje také existence skupiny lymfocytů nesoucích na svém povrchu TCR receptor charakteristický pro T - lymfocyty a zároveň některé markery NK-buněk, například receptor NKR-P1. Tyto buňky byly pojmenovány NKT[9].

NK-buňky jsou součástí přirozené imunitní reakce proti cizorodým prvkům v organismu a fungují na principu vrozených mechanismů imunitní odpovědi. Rozpoznávají a likvidují nádorové buňky, brání organismus během virové infekce a vytvářejí rezistenci proti virům[10]. Velkou roli také hraje jejich schopnost regulace autoimunitních reakcí. Aktivované NK-buňky se zapojují do buněčně řízené cytotoxicity a produkují obrovské množství molekul, které zahrnují zejména antimikrobiální a imunorelgulační cytosiny a chemokiny[11].

1.2.1 NK - buněčné rozpoznávání

Ačkoliv se na povrchu NK-buněk nevyskytují žádné antigenně specifické receptory, dokáží NK-buňky rozpoznávat a likvidovat nádorové, i jinak poškozené nebo virem infikované buňky. NK-buňky na svém povrchu exprimují receptory, které rozpoznávají MHC I glykoproteiny a mají schopnost prvořadě zabíjet buňky nedostatečně produkující právě MHC I. Takto sníženou produkcí MHC I se vyznačují nádorově či virově pozměněné buňky, které se tím snaží zabránit likvidaci T - lymfocyty. NK-buňky po setkání s takto poškozenou buňkou aktivují své cytotoxické mechanismy a danou buňku zničí. Tato hypotéza, která popisuje jedinečný způsob obranného mechanismu imunitního systému, se nazývá „self-missing" hypotéza[12].

Aktivita NK-buněk je regulována rovnováhou mezi pozitivními či negativními signály, které přicházejí z aktivačních nebo inhibičních receptorů nacházejících se na jejich membráně[13].

1.2.2 Funkce NK - buněk v organismu

NK-buňky zajišťují v organismu mnoho funkcí, k nejvýznamnějším potom patří jejich antivirová funkce, regulační funkce, protinádorová aktivita a buněčně řízená cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC – Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)[3].

K likvidaci zavádných buněk NK-buňkami může docházet lytickou cestou, která je závislá na vápníku a využívá sekreci cytolytických granulí obsahujících cytolysin, perforin a granzymy[14], nebo apoptotickou cestou přes tzv. receptory smrti vázané v membráně. NK-buňky na svém povrchu exprimují tři druhy těchto receptorů - FAS ligand, TNF (Tumor Necrosis Factor) a TNF příbuzný apoptosu indukující ligand TRAIL[15].

1.2.3 Receptory NK- buněk

Mezibuněčný kontakt, na kterém závisí většina dějů probíhajících v imunitním systému, je u NK-buněk zajišťován povrchovými receptory umístěnými na membráně. Podle své funkce je můžeme rozdělit na aktivační a inhibiční, podle strukturních rysů je dělíme do dvou rodin, první z nich je rodina imunoglobulinová, do které patří KIRs a leukocytární inhibiční receptory, druhou je rodina C-lektinová[16].

1.2.3.1 Aktivační receptory

Interakcí aktivačního receptoru s ligandem dochází k přenosu signálu do buňky. Aktivační receptory mají v intracelulární části receptoru oblast, která je bohatá na aminokyseliny a interaguje s transmembránovými adaptorovými molekulami, jakými jsou např. DAP10, DAP12. Tyto molekuly obsahují imunoreceptorový-tyrosin vázající aktivační motiv ITAM[17], jehož tyrosinové zbytky jsou po vazbě ligandu fosforylovány pomocí protein-tyrosinkinas (PTK) z rodiny Src. Následné signalizační dráhy využívají fosfatidylinositol-3-kinázy a PTK ZAP 10 a SYK. K přenosu signálu může dojít také za pomoci G-proteinů (Guanine nucleotide binding proteins) asociovaných s receptory. Mezi aktivační receptory řadíme lidský receptor NKR-P1, CD69, NKG2D, myší receptor NKR-PA, CD69, receptory zodpovědné za spontánní cytotoxicitu NK-buněk NKp30,NKp44, protilátkový receptor CD16 a další[18]

1.2.3.2 Inhibiční receptory

Po navázání ligandu na inhibiční receptor, který ve své intracelulární oblasti obsahuje imunoreceptorový-tyrosin vázající inhibiční motiv ITIM, dochází k fosforylaci

tyrosinových zbytků pomocí tyrosinových fosfatas SHP1 a SHP2[19] a následnému spuštění signalizační kaskády. Pro inhibiční receptory jsou specifickými ligandy molekuly MHC I. Lidské molekuly MHC I se nazývají HLA (Human Leukocyte Antigen) a dělí se na klasické – HLA-A–C a neklasické HLA-E–G[20]. Mezi lidské inhibiční receptory patří KIR2DL a CD94/NKG2A, mezi myší molekuly patří např. Ly49 a CD94[18].

1.2.3.3 Receptory imunoglobulinové rodiny

Do této skupiny receptorů patří vysoce specifické receptory NCR (Natural Cytotoxicity Receptors) a receptory KIR (Killer Inhibition Receptors), které byly doposud identifikovány pouze na lidských NK-buňkách[21]. Podle počtu domén imunoglobulinového typu v extracelulární oblasti je rozdělujeme do dvou podrodin, první obsahuje 2 domény (KIR2D) a druhá 3 domény (KIR3D) imunoglobulinového typu. Ligandy pro tyto receptory jsou klasické HLA.

1.2.3.4 Receptory lektinové rodiny C-typu

Lektinové receptory C-typu, které se nacházejí na povrchu NK-buněk, se řadí mezi integrální membránové proteiny II. typu[22]. V extracelulární části se nachází sacharid vázající CRD doména, která je charakteristým znakem této rodiny proteinů[23]. Geny kódující tyto receptory se nacházejí v oblasti označované jako NK-buněčný komplex-NKC. U myší se tento komplex nachází na 6. chromozomu, u potkanů na 4. a u člověka na chromozomu 12[22]. Receptory lektinové rodiny C-typu můžeme rozdělit do několika nadrodin. Rodina Ly49, zahrnující zejména hlodavčí receptory[22], se skládá nejméně ze třinácti členů Ly49A-J a Ly 49-L,-O,-P[25]. Tyto membránové glykoproteiny II. typu jsou na povrch buňky exprimovány jako disulfidicky vázané homodimery. Mají jak aktivační, tak inhibiční funkci[26]. Ligandy rodiny Ly49 jsou polymorfní molekuly H-2 třídy I. Zatím nebyl nalezen jejich lidský homolog, vyskytují se pouze u myší a potkanů.

Další objevenou rodinou receptorů lektinů C-typu je skupina genů NKG2A-E. Mají vysokou variabilitu ve vazbě ligandu i přenosu signálu, kterou jim udílí přítomnost extracelulární nebo cytoplasmatické domény. NKG2 glykoproteiny tvoří disulfidicky vázané heterodimery s dalšími glykoproteiny nazývanými CD94. Pokud nedojde k navázání k molekule CD94, nejsou glykoproteiny NKG2 exprimovány na buněčný povrch[22,27]. Ligandy pro tyto receptory jsou neklasické molekuly HLA-A-E třídy[28].

Receptory Ly49 a NKG2/CD94 nejsou přímo strukturními homology, přesto vykazují řadu podobných funkcí[27].

1.3 Molekula CD69

Molekula CD69, která byla poprvé identifikována v roce 1986[29] patří mezi glykoproteiny II. třídy a strukturně se řadí do lektinové rodiny C-typu[30]. Tento povrchový leukocytární receptor je známý také jako časný aktivační antigen leukocytů, neboť je inducibilně exprimovám velmi brzy po aktivaci buněk[31]. Vyskytuje se na povrchu NK-buněk, T-lymfocytů a dalších buněk hematopoetické řady[30]. Na buněčný povrch je tato molekula exprimována jako disulfidicky spojený homodimer o různé molekulové hmotnosti, která je dána rozdílným stupněm glykosylace extracelulární N-koncové části molekuly. V dnešní době jsou zatím známy homology myší, potkaní a lidské molekuly CD69[32].

1.3.1 Struktura a funkce molekuly CD69

Délka řetězce lidské molekuly CD69 je 199 aminokyselin. Řetězec je složen z intracelulární části délky 40 AMK zbytků, transmembránové části o délce 21 AMK zbytků a extracelulární části složené z krčku o velikosti 21 AMK a globulární C-lektinové části o velikosti 117 AMK zbytků[33]. Tato doména obsahuje dvě α-helikální struktury a dvě antiparalelní struktury β-skládaného listu[34]. Řetězce v extracelulární části jsou propojeny třemi disulfidickými můstky. Mezi aminokyselinami 148-152, 158-162, 169-171 a 177-180 jsou lokalizovány 4 smyčky, které mezi sebou spojují jednotlivé strukturní části a často také obsahují vazebné místo pro ligand[35]. Po navázaní specifického ligandu dochází k agregaci vnějších částí receptoru a následné aktivaci buněk produkujících na svém povrchu molekulu CD69. Takto aktivované buňky začínají proliferovat a plnit svou efektorovou funkci. Mechanismus signalizace pomocí molekuly CD69 není doposud dostatečně znám[36].

1.4 Molekula NKR-P1

Molekula NKR-P1 je aktivačním receptorem, který byl poprvé charakterizován na NK-buňkách potkana v roce 1989. Postupně byla tato molekula nalezena i na myších a lidských NK-buňkách. Její výskyt byl také prokázán na povrchu T-buněk, monocytů a dendritických buněk[37]. Strukturními studiemi byla zjištěna existence homologních genů, kódujících nejméně dvě isoformy. Na povrchu lidských NK-buněk byla nalezena pouze

isoforma NKR-P1A, zatímco na potkaních NK-buňkách byly nalezeny isoformy NKR-P1 A-C a na myších dokonce isoformy NKR-P1A-E.

1.4.1 Struktura a funkce molekuly NKR-P1

Rodina NKR-P1 je strukturně příbuzná s dalšími receptory kódovanými NK genovým komplexem. NKR-P1 jsou transmembránové glykoproteiny II. třídy a jako ostatní členové rodiny lektinů C-typu mají lektinovou doménu závislou na vápníku[38].Na buněčný povrch jsou exprimovány jako disulfidicky vázané homodimery. Jejich signalizační funkce je závislá na interakci se sacharidovým ligandem. Jsou to aktivační receptory stimulující proteintyrosinovou fosforylaci, sekreci BLT-esterasy, zvyšují koncentraci vápníku uvnitř buňky a produkci IFNγ, který aktivuje buněčné zabíjení a podporuje degranulaci[39]. U isoformy myšího a potkaního receptoru NKR-P1B však byla dokázána přítomnost inhibičního motivu ITIM, což vede k předpokladu,že některé isoformy těchto receptorů mají inhibiční funkci[16]. Receptory NKR-P1 se v organismu účastní např. mezibuněčné adheze , rozpoznávání antigenů, fagocytární aktivace a řídí produkci celé řady cytosinů a chemokinů[3,39].

1.5 Membránové mikrodomény

1.5.1 Biomembrány

Biomembrány mají zásadní význam pro život buňky. Vytváří důležité rozhraní mezi buňkou (organelami) a prostředím, přispívají k trvalé homeostaze a v neposlední řadě také umožňují pohyb látek uvnitř organismu (mezi sousedními a vzdálenými buňkami) a mezi organismem a okolním prostředím[40]. Biomembrány jsou převážně tvořeny z různých druhů lipidů a řady proteinů. Poměr lipidů a proteinů v membráně se liší podle její funkce, druhu a stavu, ale ve většině případů je alespoň z poloviny tvořena proteiny. Hlavní lipidovou složkou biomembrán jsou glycerofosfolipidy a sfingolipidy[41]. Molekuly lipidů jsou uspořádány do dvojvrstvy a orientovány hydrofobními konci dovnitř a hydrofilními konci vně membrány. Za fyziologických podmínek molekuly tvořící membránu nejsou fixovány, ale nachází se v tekutém stavu, neboli stavu tekutého krystalu. V této struktuře se pohybují laterální nebo příčnou difuzí. U živočišných membrám jsou další lipidovou složkou steroly, zejména cholesterol. Kondenzovaný systém cholesterolu zabraňuje pohybu řetězců mastných kyselin a tím snižuje tekutost biomembrán a zároveň přispívá k jejich zpevnění. Bílkovinou složkou biomembrán jsou membránové proteiny. Mohou být připojeny

k cytoskeletu a membránu ukotvovat, ale převážná většina jich slouží k transportu signálu, látek a mezibuněčné adhezi[40,42].

1.5.2 Membránové mikrodomény a jejich složení

Membránové mikrodomény, též lipidové rafty jsou malé specializované oblasti membránách. Lipidové rafty mají dvojvrstevnou strukturu, která se liší výskytem lipidů na vnější straně, kde se nacházejí hlavně sfingomyeliny, glykosfinfolipidy a cholesterol, a vnitřní straně membrány, kde se vyskytují převážně lipidy obsahující ethanolamin. Jsou formovány převážně protein-lipidovými interakcemi[41].

Od ostatní membrány se mikrodomény liší hlavně lipidovým složením, které je specifické obsahem cholesterolu, glykosfingolipidů a glykolipidů. Z těchto mikrodomén je vyloučena převážná většina transmembránových proteinů, naopak jsou obohaceny cytoplazmatické proteiny jako proteinkinázy skupiny Src, GPI-vázané proteiny, nízkomolekulární a heterotrimerické G-proteiny a fosfolipidy[1]. Jejich součástí jsou také některé transmembránové adaptorové proteiny (např.LAT). Dalšími proteiny, které se zde vyskytují jsou například EGF (Epidermal Growth Factor) a PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) receptory, proteinkinasa C a některé fosfatasy. Cytoplasmatické a transmembránové proteiny jsou kotveny v mikrodoménách pomocí kovalentně připojených mastných kyselin (myristová, palmitová)[1,41].

1.5.3 Signalizace pomocí lipidových raftů

Účast v buněčné signalizaci patří k nejdůležitějším úlohám lipidových raftů. Mikrodomény jako dynamické struktury, obsahující receptory, adhezivní molekuly a efektorové enzymy, jsou schopny rychle se přeskupovat, pohybovat a slučovat do vyšších celků, které se poté účastní přenosu signálu[44]. V signalizačních mikrodoménách je přítomna většina molekul potřebných k zahájení imunoreceptorové signalizace. Ke spojení a splynutí se signalizačními mikrodoménami dochází po navázání imunoreceptorů na své ligandy. Cytoplasmatické konce řetězců imunoreceptorových komlexů se tak dostanou prostředí bohatého na proteinkinázy skupiny Src, které je začnou fosforylovat na specifických tyrosinových zbytcích v ITAM sekvencích. Na fosforylované tyrosiny se poté naváží další enzymy, proteinkinázy skupiny Syk, které fosforylují další složky mikrodomén, na nichž jsou vázány jiné proteiny. Vznikají tak uvedené signalosomy a

rozbíhají příslušné signalizační kaskády. V klidovém stavu však nejsou imunoreceptory s kinasami asociováné a tím je zabráněno nespecifické signalizaci[1].

2. CÍLE PRÁCE

1. Optimalizovat techniku modré nativní elektroforesy pro separaci membránových mikrodomén buněk imunitního systému

2. Imunochemickou analýzou identifikovat membránové komplexy důležitých aktivačních receptorů buněk NK, molekul CD69, NKR-P1 a NKG2D

3. Použít hmotnostní spektrometrii k identifikaci proteinového složení těchto komplexů

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých chemikálií, materiálů, přístrojů a zařízení

3.1.1 Použité chemikálie

3-aminophtalhydrazid	Fluka, Švýcarsko
6-aminokapronová kyselina	Fluka, Švýcarsko
Acetonitril	Merck, Německo
Akrylamid	Sigma, USA
APS	Sigma, USA
Azid sodný	Sigma, USA
Bis Tris	Fluka, Švýcarsko
Brij 58	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva, Německo
Dihydrogenfosforečnan draselný	Penta, ČR
Dodecylsulfát sodný	Fluka, Švýcarsko
DMSO	Jersey Lab Supply, USA
ECL™ system	Amersham, USA
EDTA	Fluka, Švýcarsko
Ethidiumbromid	Sigma, USA
GAR-Px, sekundární kozí protilátka proti králičímu imunoglobulinu značená peroxidasou	Sigma, USA
Glycerol	Sigma, USA
Glycin	Penta, ČR
HEPES	Serva, Německo
Hydrogenfosorečnan sodný	Lach-ner, ČR

Chlorid sodný	Lach-ner, ČR
Chlorid draselný	Lach-ner, ČR
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Peroxid vodíku	Lachema, ČR
p-kumarová kyselina	Fluka, Švýcarsko
Methanol	Lachema, ČR
N,N´-methylen-bis-akrylamid	Sigma, USA
N-dodecyl-β-D-maltosid	Fluka, Švýcarsko
Nitrocelulosová membrána (0,45 μm)	Schleicher & Schuell, USA
Odtučněné sušené mléko	Lactos, Praha
p-kumarová kyselina	Sigma, USA
Sacharosa	Lach-ner., ČR
TEMED	Serva, Německo
Tricin	Sigma,USA
Tris	Jersey Lab Supply, USA
Ostatní chemikálie p. a.	Lachema, ČR

3.1.2. Polyklonální králičí antiséra

Anti hCD69	O.Lukšan, antisérum připravené imunizací králíka čistým rekombinantním CD69 proteinem
Anti hNKR-P1	O.Lukšan, antisérum připravené imunizací králíka čistým rekombinantním NKR-P1 proteinem
Anti hNKG2D	O.Lukšan, antisérum připravené imunizací králíka rekombinantním NKG2D proteinem

3.1.3 Použitá média a roztoky

1% a 5% roztok odtučněného sušeného mléka v PBS

Anodový pufr pro BN-PAGE: 50 mM Bis-Tris-Cl (pH 7,0)

AB mix pro BN-PAGE: 48% akrylamid a 1,5% bisakrylamid

ECL1: 22,5 mg 3-aminophtalhydrazid v 0,5 ml DMSO do 50 ml 0,1M Tris-Cl (pH 8,8) +18,5 mg parakumarové kyseliny v 1,25 ml DMSO

ECL 2 : 5,4 mM H_2O_2 v 0,1M Tris-Cl (pH 8,8)

Gelový pufr pro BN-PAGE, 3 x koncentrovaný: 1,5mM kyselina 6-aminokapronová; 150 mM Bis-Tris-Cl (pH 7,0)

Mitochondriální pufr pro BN-PAGE: 750mM kyselina 6-aminokapronová; 50 mM Bis-Tris-Cl (pH 7,0); 0,5 mM EDTA

Modrý katodový pufr pro BN-PAGE: 15 mM Bis-Tris-Cl(pH 7,0); 50 mM Tricin; 0,02% CBB G 250

PBS pufr: 10 mM Na_2HPO_4; 150 mM NaCl; 2 mM KCl; 2 mM KH_2PO_4; pH = 7,4

Pufr pro elektropřenos: 25mM Tris-Cl (pH 8,3); 150 mM glycin; 20% methanol

3.1.4 Použitý materiál a přístroje

Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety	
Chladnička	Whirlpool
Chladnička	Calex
Kyvety 4ml, Ultra-clear^{TM}Tubes,11 x 60 mm	Beckman, USA
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha
pH metr Φ 200	Beckman, USA
Předvážky HF-1200G	AND, USA
Rentgenový film XBU, 13 x 18 cm	Forma, ČR

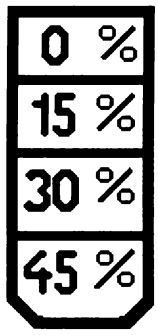
Rotor SW 60 Ti	Beckman, USA
Souprava pro vertikální elektroforesu Mighty Small II	Hoefer Scientific Instruments, USA
Termstatovaná cirkulační lázeň MultiTempIII	Pharmacia, Švédsko
Ultracentrifuga Beckman L7-65	Beckman, USA
VN zdroj 3kV, 200 mA	Dílny ČSAV, ČR

3.2. Metody

3.2.1 Příprava membránových mikrodomén ultracentrifugací v sacharosovém gradientu

Připravené lysáty cytoplasmatických membrán lidských NK buněk a lymfocytů byly extrahovány po dobu 1 hodiny v extrakčním pufru na ledu. Následně byly centrifugovány 10 minut při 9500 RPM. Supernatanty byly naneseny na sacharosový gradient. Příprava sacharosových roztoků:

15% w/v sacharosa v detergenčním pufru, 30% w/v sacharosa v detergenčním pufru, 45% w/v sacharosa v detergenčním pufru. Navrstvení gradientu viz Obr. 1.



Obr.1 Schematické znázornění sacharosového gradientu v kyvetě

Takto připravené vzorky byly centrifugovány při 250 000g/18 hod při teplotě 4°C. Po 18-ti hodinách centrifugace byly odebrány z každé zkumavky dvě lehké frakce po 200 µl.

3.2.2 Příprava vzorků membránových mikrodomén pro BN-PAGE

Ke všem odebraným frakcím bylo přidáno 100µl mitochondriálního pufru a 10ti % roztok laurylmaltosidu (do výsledné koncentrace 1%). Vzorky byly ponechány 20minut na ledu. Poté byly centrifugovány při 23 000g/20minut. K těmto roztokům byla přidána CBB G 250 ve výsledné koncentraci 0,25% a vzorky byly aplikovány na BN-PAGE. Všechny kroky probíhaly za neustálého chlazení na ledu.

3.2.3 Příprava gradientových gelů pro BN-PAGE

Gradientové gely byly připraveny v rozsahu celkových koncentrací akrylamidu v N, N´-methylen-bis(akrylamidu) T = 4 – 16%. Šířka gelu byla 10 cm, délka 8,5 cm a tloušťka 1 mm. Složky pro přípravu gelu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka1. Složky pro přípravu gradientového polyakrylamidového gelu

Koncentrace separačního gelu	4%	16%
Celkový objem	***15ml***	***15ml***
GB 3krát konc.	4,99ml	4,99ml
AB mix	1,2ml	6ml
H_2O	8,69ml	1,98ml
Glycerol(87%)	-	1,99ml
TEMED	7,5µl	6µl
10% APS	100µl	20µl

3.2.4 Separace proteinových komplexů – BN-PAGE

Separace vzorků probíhala v gradientovém polyakrylamidovém gelu. Pro separaci jsem použila přístroj Mighty small II(Hoefer Scientific instruments,USA). Elektroforesa probíhala v chladové místnosti při 4°C a systém byl ještě chlazen na 4°C termostatovanou cirkulační lázní a ledem. Dělení bylo prováděno v soustavě odpovídajících elektrodových pufrů (anodový a modrý katodový pufr pro BN-PAGE, viz odstavec 3.1.3). Separace probíhala při konstantní intenzitě elektrického proudu 5 mA na gel nejprve 20 minut při el. napětí 45 V a pak cca 6 hodin při maximální hodnétě el. napětí 250 V do doby, kdy volná CBB g, tvořící čelní zónu separovaného vzorku opustila gel.

3.2.5 Western blott - elektropřenos

Polosuchý elektropřenos byl prováděn na nitrocelulosovou membránu o rozměrech, které odpovídaly velikosti gelu. Membrána byla umístěna na šest filtračních papírů o tloušťce 6mm, předem namočených v transferovém pufru. Na membránu byl opatrně umístěn polyakrylamidový gel, předem ekvilibrovaný v transferovém pufru a překryt šesti filtračními papíry o tloušťce 6 mm. Elektropřenos byl prováděn při hodnotě proudu 0,8mA/cm^2 po dobu 2 hodin.

3.2.6 Imunobarvení - detekce protilátkami

Volná vazebná místa na membráně byla zablokována 5% roztokem nízkotučného sušeného mléka v PBS pufru po dobu 1hodiny. Následně byly membrány inkubovány po dobu 1 hodiny s primární polyklonální protilátkou. Protilátka byl naředěna v poměru 1: 500 v 1% roztoku nízkotučného sušeného mléka v PBS. Nadbytek protilátky byl odmyt pomocí PBS 3 krát 10 minut. Poté byly membrány inkubovány po dobu 1 hodiny se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidasou. Sekundární protilátka byla naředěna v poměru 1:1000 v 1% roztoku nízkotučného sušeného mléka v PBS. Náledně byly membrány oplachovány 3 krát 10 minut v PBS.

Na takto připravené a osušené membrány byla nanesena směs předem připravených roztoků ECL1 a ECL2 v poměru 1:1. Membrány byly osušeny a exponovány na fotografický film. Byla prováděna 5 ti minutová expozice.

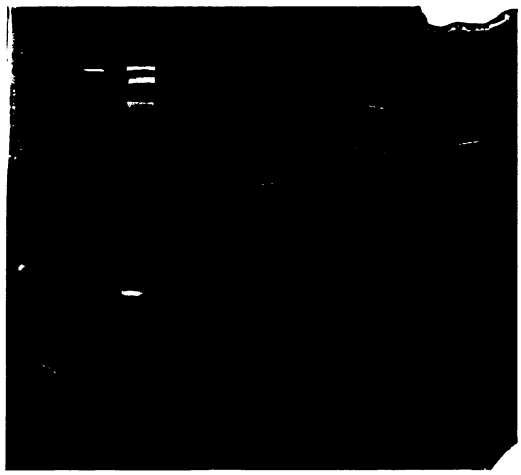
3.2.7 Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

Pro identifikaci proteinových komplexů obsahujících receptory lidských NK buněk byl použit gel z modré nativní elektroforesy, z nehož byla odpovídající část vyříznuta, a přítomné proteiny identifikovány technikou peptidového mapování[21]. Vyříznuté pruhy z SDS gelu byly nejprve odbarveny (100mM ethylmorfoline-acetátový pufr : acetonitril v poměru 1:1). Poté bylo ke vzorkům přidáno redukční činidlo TCEP (50mM) a vzorky byly zahřívány na 95 °C po dobu 15minut. Poté byl ke vzorkům přidám roztok 50mM iodoacetamidu (1h, ve tmě, laboratorní teplota) kvůli alkylaci zredukovaných cysteinů. Kousky gelu byly poté inkubovány přes noc při 37 C v 50mM ethylmorfoline-acetátovém pufru s trypsinem (0.5μg). Vzniklé peptidy byly extrahovány z gelu roztokem 80% acetonitrilem, 0.1% TFA. Vzorky byly vysušeny na zařízení SpeedVac, rozpuštěny ve 100μL 0.1% TFA ve vodě. Pomocí MicroTrap kolony byly vzorky odsoleny a zkoncentrovány na objem 10μL. Tyto vzorky byly nastříknuty na mikrokapilární kolonu (Michrom, C18AQ, 5u, 200A, 0.2x150mm) spojenou přímo s hmotnostním spektrometrem LCQ DECA (Thermo Finnigan). Naměřená fragmentační spektra byla analyzována pomocí softwaru SEQUEST a prohledávána proti databázi vytvořenou ze všech známých savčích proteinů.

4. VÝSLEDKY

Dlouhodobým cílem Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR je studium aktivujících receptorů přirozených zabíječských buněk včetně nativních proteinových komplexů, v nichž se tyto receptory vyskytují. Ve své bakalářské práci jsem navazovala na diplomovou práci Dany Ulbrichové, která identifikovala nativní membránový komplex receptoru NKR-P1A potkana o velikosti asi 240 kDa. Proto jsem se snažila využít předchozích zkušeností, a optimalizovat separační techniky vhodné pro analýzu obdobných receptorů lidských NK buněk.

Analýza membránových receptorových komplexů je jednou z nejnáročnějších experimentálních technik v biochemii. Začíná isolací čistých NK buněk a přípravou plasmatických membrán. Vzhledem k velké experimentální náročnosti jsem tuto část práce neprováděla, a použila jsem již připravené membrány uchovávané při – 80 °C. Takto získané membrány jsem rozpouštěla v šetrném detergentu Brij58, a separovala standardní technikou centrifugace v sacharidovém gradientu. Přitom je potřeba zejména dbát na neustálé chlazení vzorku, aby nedošlo k rozpadu membránových komplexů a tvorbě artefaktů. Celé membránové mikrodomény jsem poté rozpustila ve vzorkovém pufru obsahujícím laurylmaltosid, a dále separovala již menší proteinové komplexy pomocí modré nativní elektroforesy. Při separaci byl použit gradient polyakrylamidového gelu v rozsahu 4 – 16 %, a celý experiment opět probíhal za neustálého chlazení. Pro vyzkoušení této náročné experimentální techniky jsem nejprve analyzovala membrány lidských lymfocytů, protože jsou mnohem dostupnější oproti membránám NK buněk. Pečlivým dodržováním experimentálních podmínek se podařilo separovat jednotlivé proteinové komplexy ve formě diskrétních zon, které potom mohly být vyříznuty pro analýzu hmotnostní spektrometrií (Obr. 1, str.26). V Tabulce 1 je uveden seznam proteinů identifikovaných v jednotlivých zonách.



Obr.1 Mikrodomény lymfocytárních membrán separované centrifugací v sacharidovém gradientu a nativní modrou elektroforesou. Membrány lymfocytů byly rozpuštěny v detergentu Brij58, a poté separovány na sacharidovém gradientu a nativní modrou elektroforesou jak je podrobně popsáno v metodické části. Detailně bylo analyzováno 5 membránových komplexů (označeno 1 až 5).

Jak je vidět z tabulky 1, byly identifikovány zejména podjednotky proteinového komplexu ATP-syntasy, který je součástí mikrodomém lymfocytárních membrán[44].

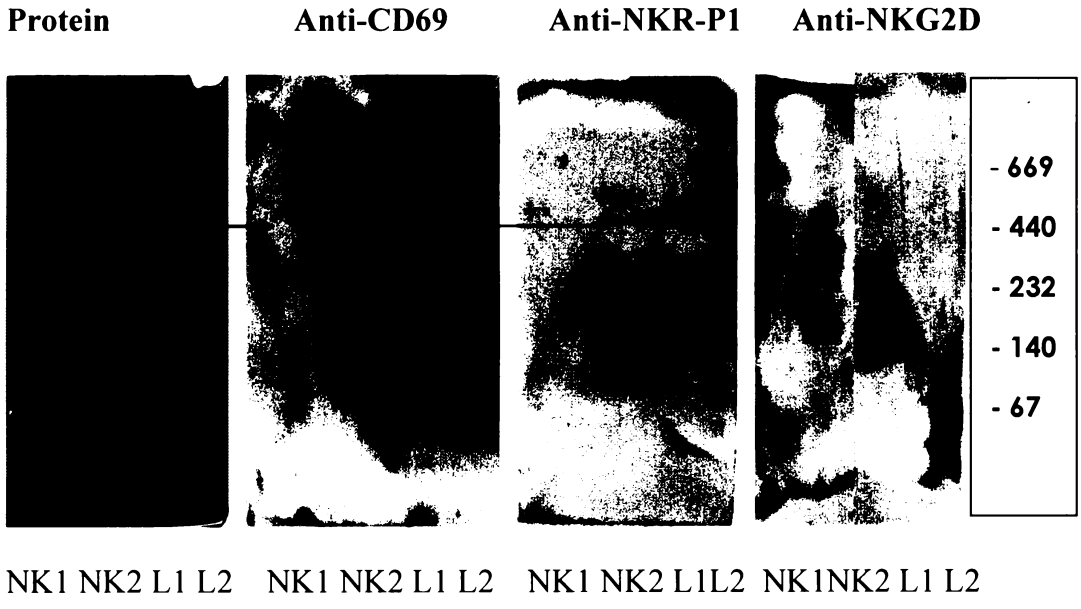
Tabulka 1. Souhrn identifikovaných proteinů v membránových komplexech lymfocytů

Zóna číslo	Identifikovaný protein
1	ATP-syntasa F1, α podjednotka, ATP-syntasa F1, β podjednotka
2	ATP-syntasa F1, β podjednotka
3	ATP-syntasa F1, α podjednotka
4	ATP-syntasa F1, podjednotka 0
5	ATP-syntasa F0, podjednotka b

Po vyzkoušení techniky nativní modré elektroforesy jsem přistoupila k vlastní identifikaci membránových receptorových komplexů . Přitom jsem paralelně analyzovala jak vzorky extrahované z membrán NK buněk, tak také proteinové komplexy z membrán lymfocytů. Důvodem pro tuto paralelní analýzu je, že NK buňky jsem ve svém proteinovém složení hodně podobné lymfocytům, s nimiž mají podobné prekursory.

Separované mebránové proteinové komplexy jsem přenesla na nitrocelulosovou mebránu technikou polosuchého elektropřenosu, tzv. Western blottu. Následovala samotná identifikace receptorů v komlexech, kterou jsem provedla pomocí detekce protilátkami. Nejprve bylo nutné blokovat volná místa na mebráně. K blokaci jsem použila roztok sušeného odtučněného mléka v PBS. Pro detekci jsem použila polyklonální protilátky (králičí antiséra) anti-CD69, anti-NKR-P1 a anti-NKG2D a sekundární protilátky proti králičím imunoglobulinům, značené křenovou peroxidasou. Následovala fotografická expozice, kdy na membrány byla nanesena směs ECL1 a ECL2, obsahující peroxid vodíku, který reaguje s peroxidasou, a látku s chemiluminescenčními vlastnostmi, kterou oxiduje uvolněný kyslík. Světelné kvantum vzniklé chemiluminiscencí se nakonec zaznamená na citlivý rentgenový film.

Výsledné receptory proteinových komplexů jsou vidět na obrázku 2(str. 29). Na proteinovém barvení nejsou bohužel patrné jednotlivé diskrétní zóny. Přesto se pomocí imunoblottingu s citlivou detekcí pomocí chemiluminiscence podařilo identifikovat reaktivní membránové komplexy náležící antigenu CD69 (černá šipka) a NKR-P1 (červená šipka).



Obr.2 Receptory proteinových komplexů plasmatických membrán lidských NK-buněk a lymfocytů. Komplexy separovány pomocí BN-PAGE, přeneseny polosuchým elektropřenosem na NC membránu a receptory detekovány imunochemickým barvením protilátkami. Přibližná molekulová hmotnost jednotlivých proteinových markerů je uvedena v pravé části obrázku v kDa. Membránový komplex CD69 je vyznačen černou šipkou, a membránový komplex NKR-P1 červenou šipkou.

Receptorový komplex CD69 byl identifikován v obou vzorcích NK buněk a lymfocytů. Naopak membránový komplex receptoru NKR-P1 byl identifikován pouze v případě lymfocytů. Membránový komplex receptoru NKG-2D identifikován nebyl, docházelo pouze k nespecifické vazbě.

5. DISKUSE

Laboratoř architektury proteinů MBÚ AV ČR se dlouhodobě zabývá studiem aktivujících receptorů přirozených zabíječských buněk včetně nativních proteinových komplexů, v nichž se tyto receptory vyskytují. Analýza membránových receptorových komplexů je jednou z nejnáročnějších experimentálních technik v biochemii. Začíná isolací čistých NK buněk a přípravou plasmatických membrán. Takto získané membrány jsem rozpouštěla v šetrném detergentu a separovala standardní technikou centrifugace v sacharidovém gradientu. Přitom je potřeba zejména dbát na neustálé chlazení vzorku, aby nedošlo k rozpadu membránových komplexů a tvorbě artefaktů. Celé membránové mikrodomény jsem poté rozpustila ve vzorkovém pufru obsahujícím laurylmaltosid, a dále separovala již menší proteinové komplexy pomocí modré nativní elektroforesy. Při separaci se použit gradient polyakrylamidového gelu v rozsahu 4 – 16 %, a celý experiment opět probíhal za neustálého chlazení.

Jednotlivé mnou používané techniky již byly v Laboratoři využívány, avšak vždy pouze isolovaně v kombinaci s citlivými analytickými metodami, zejména Western blotem a hmotnostní spektrometrií. V diplomové práci Dany Ulbrichové byla použita technika modré nativní elektroforesy v kombinací s imunoblotem pomocí monoklonální protilátky proti NKR-P1A receptoru potkana. Byl zjištěn výskyt tohoto receptoru v membránovém komplexu o velikosti 240 kDa dle nativní elektroforesy, což je mnohonásobně více, než je velikost samotného receptoru (kovalentní dimer o velikosti 60 kDa). Bylo by velmi zajímavé identifikovat též jiné proteinové komponenty tohoto komplexu, avšak veškeré dosavadní pokusy o tuto identifikaci byly neúspěšné. Podobně byla v práci Mana a kol[44] použita centrifugace v sacharidovém gradientu pro isolaci membránových mikrodomén a jejich další charakterizaci hmotnostní spektrometrií.

Kombinace gradientové centrifugace s modrou nativní elektroforesou a následnou identifikací zatím v Laboratoři zkoušena nebyla, vyzkoušení této techniky bylo cílem mé bakalářské práce. Spojení obou těchto dosti složitých experimentálních technik v rámci jednoho experimentu je ovšem velmi náročné, časově i experimentálně. Toto spojení může mít teoreticky výhodu v mnohem lepším rozlišení membránových komplexů oproti postupům používajícím pouze jednu ze separačních technik. Na druhé straně je tato kombinace velmi náročná i na množství výchozího materiálu, které navíc nelze v experimentu libovolně zvyšovat (byla by překročena separační kapacita těchto technik).

Mé dosavadní zkušenosti s kombinací obou experimentálních technik ukazují, že je možné imunochemicky identifikovat proteinové komplexy pro receptory CD69 a NKR-P1 o velikosti asi 440 kDa. Zajímavé je, že zatímco receptorový komplex CD69 byl identifikován ve všech analyzovaných frakcích, NKR-P1 receptorový komplex byl nalezen pouze u lymfocytů. Tento výsledek odpovídá publikovaným výsledkům buněčné distribuce těchto receptorů. CD69 antigen není specifický pouze pro NK buňky, ale vyskytuje se na všech subpopulacích leukocytů, zejména po jejich aktivaci[45]. V případě lidského NKR-P1 receptoru (na rozdíl od podobných molekul u hlodavců) bylo zjištěno, že není specifický pro NK buňky, ale vyskytuje se i na povrchu například T-lymfocytů[46].

V případě receptoru NKG2D nebyl podobný „velký" receptorový komplex identifikován, i když se na blotu vyskytoval určitý signál putující s čelem na nativním gelu. Tento výsledek tedy lze vysvětlit několika způsoby, například malou koncentrací tohoto receptoru v membránách nedostatečnou pro imunochemickou identifikaci. Možností však též zůstává, že tento receptor se může v membráně vyskytovat isolovaně, čímž by jeho velikost (25 kDa) byla příliš malá pro analýzu nativní modrou elektroforesou.

Prvý pokus o identifikaci proteinů přítomných v jednotlivých receptorových komplexech hmotnostní spektrometrií nebyl úspěšný, což koresponduje mj. též s nepřítomností zón na proteinovém barvení. Pravděpodobně byla tedy koncentrace analyzovaných proteinů pod detekčním limitem hmotnostní spektrometrie v daném uspořádání. Pokusy o identifikaci těchto proteinů pomocí alternativních technik hmotnostní spektrometrie budou pokračovat.

6. ZÁVĚR

- Isolovány membránové mikrodomény plasmatických membrán lidských NK-buněk a lymfocytů
- Proteinové komplexy separovány technikou BN-PAGE
- Technikou imunobarvení identifikovány komplexy receptorů CD69 a NKR-P1
- Provedena hmotnostní spektrometrie – identifikace proteinových komplexů

Seznam použité literatury

1. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie, Triton, Praha (2005)

2. http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_23965.html, staženo dne 3.4. 2008

3. Kindt, J.T., Goldsby, R.A., Osborne, B.A.: Kuby Immunology, 6th edition, W. H. Freeman and company (2007)

4. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.: Immunology, 6th edition, Mosby (2001)

5. Belov, L., De la Vega, O., Dos Remedios, C.G., Mulligan, S.P., Christopherson, R. I.: Cancer Res., 61, 4483-4489, (2001)

6. Möller P.: Virchows. Archiv. A Patol. Anat., 1991, 419, 1-5

7. Hořejší,V.: Molekulární imunologie, skriptum PřF UK, Praha (1993)

8. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie, Triton, (2005)

9. Hammond, K.J.L., Godfrey, D.I.: Tissue Antigens, 59, 353-363, (2002)

10. Biron, Ch.A., Brossay L.: Curr. Opin. Immunol., 13,458-464, (2001)

11. Kiessling, R., Petrami, G., Karre, K,, Jondal, M., Tracey,D., Wigzell,H.: J. Exp. Med., 143, 772-780, (1976)

12. Ljunggren, H.G., Kärre, K.: Immunol. Today, 11, 237-244, (1990)

13. Colluci, F., Di Santo, J.P., Leibson, P.J.: Nat. Immunol, 3, 807-813, (2002)

14. Trapani, J.A., Davis, J., Sutton, V.R., Smyth, M.J.: Curr. Opin. Immunol, 12, 323-329, (2000)

15. Ashkenazi, A: Nat. Rev. Cancer, 2, 420-430, (2002)

16. Lanier, L.L.: Annu. Rev. Immunol., 16, 359-393, (1998)

17. Blery, M., Olcese, L., Vivier, E.: Human Immunol. , 61, 51-64, (2000)

18. Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H.: Nat. Rev. Immunol, 2, 850-861, (2002)

19. Famiglietti, S.J., Nakamura, K., Cambier, J.C.: Immunol. Lett., 68, 35-40, (1998)

20. Anastassiou, G., Reimann, V., Wagner, S., Bornfeld, N., Grosse-Wilde, H.: IOVS, 44, 2016-2019, (2003)

21. Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Pende, D., Millo, R., Moretta, R., Bottino, C., Moretta, A.: Mol. Immunol., 37, 1015-1024, (2000)

22. Ryan, J. C., Seaman, W. E.: Immunol ev., 155, 79-89, (1997)

23. Drickamer, K.: Curr. Opin. Struct. Biol., 3, 393-400, (1993)

24. Bezouška, K.: Collect. Czech. Chem. Commun., 69, 536, (2004)

25. Tanamachi, D.M., Hanke, T., Takizawa, H., Jamieson, A.M., Raulet, D.H.: J. Exp. Med., 193, 307-316, (2001)

26. Dumasi, N., Sawicki, M.W., Reineck ,L.A., Li, Y., Natarajan, K., Margulies, D.H., Mariuzza, R. A.: J. Mol. Biol., 320, 573-585, (2002)

27. Lanier, L. L.: Immunity, 6, 371-378, (1997)

28. Sullivan L., C., Clements, C.S., Beddoe, T., Johnson, D., Hoare, H.L., Lin, J., Ryton, T., Hopkins, E. J., Rejd, H.H., Wilce, M.C., Kabat, J., Bodego, F., Coligan, J.E., Rossjohn, J., Brooks, A.G.: Immunity, 27, 900-911, (2007)

29. Hara, T., Jung, L.K., Bjorndahl, J.M., Fu, S. M.: J. Exp. Med. 164, 1988-2005 (1986)

30. Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: Biochemistry, 39, 14779-14786, (2000)

31. Cebrián, M., Yague, E., Rincón, M., López-Botet, M., De Landázuri, M.O., Sánchez-Madrid, F.: J. Exp. Med., 168, 1621-1637, (1988)

32. Yokoyama, W.M., Seaman, W.E.: Annu. Rev.Immunol., 11, 613-635, (1993)

33. Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F., Tormo, J.: J.Biol. Chem., 276, 7312-7319, (2000)

34. Drickamer, K.: J. Biol. Chem., 263, 9557-9560, (1998)

35. Lera, A.S., Viedma, F., Sánchez-Madrid, F., Carruthers, R.A., Feizi, T.: Protein Expr. Purif., 20, 10-20, (2000)

36. Mrázek, H.: Diplomová práce, Praha, (2007)

37. Poggi, A., Rubartelli,A., Moretta, L., Zocti, M.R.: Eur. J. Immunol, 27, 2965-2970, (1997)

38. Plihal, O., Byrtusova, P., Pavlicek, J., Mihok, L., Ettrich, R., Man, P., Pompach, P., Havlicek, V., Husakova, L., Bezouska, K.: Czech. Chem. Commun., 69, 631-644, (2004)

39. Černý, J., Fišerová, A., Horváth, O., Bezouška, K., Pospíšil, M. Hořejší, V.: Immunogenetics, 46, 231-236, (1997)

40. Benda, V., Babůrek, I., Kotrba, P.: Základy biologie, 1. vyd., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, (2006)

41. Ulbrichová, D., Diplomová práce, Praha (2003)

42. Dylevský, I., Druga, R., Mrázková, O.: Funkční anatomie člověka, Grada, (2000)

43. McCann, F.E., Vanherberghen, B., Eleme, K., Carlin, L.M., Newsam, R.J., Goulding, D., Davis, D.M.: J. Immunol., 170, 2862-2870, (2003)

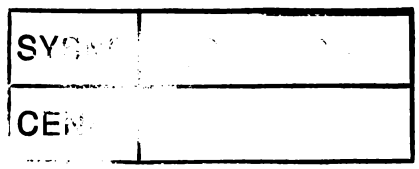
44. Man, P., Novák, P., Cebecaurer, M., Horváth, O., Fišerová, A., Havlíček, V., Bezouška K.: Proteomics, 5, 113-122, (2005)

45. Sancho, D., Gomez, M., Sanchez-Madrid, F.: Trends Immunol, 26, 136-140, (2004)

46. Lanier, L.L., Chang, C., Phillips, J.H.: J. Immunol., 153, 2417-2428 (1994)

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

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka


SYC
CE