

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



**Intracelulární izoformy IL-1RA a jejich exprese v B a T
lymfocytech**

Bakalářská práce

Autor: Martina Bajzíkova

Vedoucí práce: RNDr. Šárka Růžičková

Praha, akademický rok 2008/2009

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Šárce Růžičkové za vedení této práce, ochotu a trpělivost při konzultacích.

Obsah

Poděkování.....	2
Seznam zkratk.....	4
Abstrakt.....	7
1. Úvod.....	9
2. IL-1 rodina.....	10
2.1. Vztah IL-1 a IL-1RA.....	11
3. IL-1RN – Gen kódující IL-1RA proteinové izoformy.....	14
3.1. Isoformy IL-1RA.....	17
3.1.1. sIL-1RA.....	20
3.1.2. icIL-1RA1.....	21
3.1.3. icIL-1RA2.....	22
3.1.4. icIL-1RA3.....	23
4. Exprese IL-1RA v B a T lymfocytech – pilotní experiment.....	25
5. Terapeutické využití IL-1RA v léčbě autoimunitních chorob.....	30
5.1. Metody distribuce a účinky rekombinantního IL-1RA v organismu.....	30
6. Závěr.....	33
Seznam použité literatury.....	34

Seznam použitých zkratek

A	alela (allele) adenin
AA	aminokyselina (amino acid)
Alu	sekvence rozeznávaná restriční endonukleázou Alu izolovanou z <i>Arthrobacter luteus</i>
AP-1	aktivační protein (activating protein)
APP	protein akutní fáze (acute-phase protein)
AS	ankylózní spondylitida (ankylosing spondylitis)
B lymfocyty	lymfocyty Fabriciovy burzy (lymphocytes of bursa of Fabricius)
(k)bp	(kilo) pár bazí (base pair)
C	cytosin COOH konec peptidu
Caco-2	lidské adenokarcinomové buňky (human colonic adenomacarcinoma cells)
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation) Crohnova choroba (Crohn's disease)
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
CIAS1	chladem indukovaný zánětlivý syndrom (cold induced autoinflammatory syndrome 1), synonymum NALP3
CRE	element odpovídající na cAMP (cAMP response element)
C/EBP	CCAAT-enhancer vazebný protein (CCAAT-enhancer-binding protein)
(k)Da	(kilo) Dalton
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ECV304	kultura lidských endoteliálních buněk
G	guanin
GM-CSF	faktor stimuluje kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte-monocyte colonic-stimulating factor)
GRO	růstový onkogen (growth-related oncogene)

HLA	hlavní lidský (histokompatibilní) antigen leukocytů (human leukocyte antigen), synonymum MHC
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin (immunoglobulin)
ic	intracelulární (intracellular)
IL	interleukin
IL-1F	IL-1 rodina (IL-1 family)
IL-1R	IL-1 receptor
IL-1RA	IL-1 receptorový antagonist (IL-1 receptor antagonist)
IL-1RAcP	IL-1R akcesorní protein (IL-1R accessory protein)
IRAK	IL-1R asociovaná kináza (IL-1R associated kinase)
IL-1RN	gen pro IL-1RA (gene for IL-1RA)
JIA	juvenilní idiopatická artritida (juvenile idiopathic arthritis)
LPS	lipopolysacharid (lipopolysaccharide)
MAP-K	mitogeny aktivovaná protein-kináza (mitogen-activated protein-kinase)
mRNA	informační ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MWS	Muckle-Wells syndrom
N	NH ₂ konec peptidu
NF-κB	jaderný faktor kappa lehkého řetězce aktivovaných B buněk (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells)
NFIL-1A	jaderný faktor IL-1 (nuclear faktor IL-1)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
Nod	oligomerizující doména vázající nukleotid (nucleotide-binding oligomerization domain)
nt	nukleotid (nucleotide)
OA	osteoartróza (osteoarthritis)
PCR	polyřetězcová reakce (poly-chain reaction)
PMA	phorbolmyristyl acetát (phorbol myristate acetate)
PBMC	periferní krevní mononukleární buňky (perifer blood mononuclear cells)
preIL-1	prekurzor IL-1 (precursor of IL-1)
PU.1	transkripční faktor vázající PU box (purine rich DNA sequence), synonymum Spi-1

RA	revmatoidní artritida (rheumatoid arthritis)
s	sekretovaný
SjS	Sjögrenův syndrom (Sjögren's syndrom)
SLE	systémový lupus erythematosus (systemic lupus erythematosus)
SSc	systémová skleróza (systemic sclerosis)
T	thymin
T lymfocyty	thymové lymfocyty (thymus lymphocytes)
TF	transkripční faktor (transcription factor)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
UTR	nepřekládaná oblast (untranslated region)
UC	ulcerativní kolitida (ulcerative colitis)
VNTR	variabilní tandemové repetice (variable tandem repeat)

Abstrakt

IL-1RA (interleukin-1 receptorový antagonist) se řadí do tzv. IL-1 rodiny, která zahrnuje proteiny účastnící se regulace funkcí složek přirozené a adaptivní imunity. Hlavní roli v tomto ohledu má sekretovaná izoforma IL-1RA s její funkcí přirozeného inhibitoru prozánětlivého IL-1. Kromě této izoformy se IL-1RA vyskytuje ve formě dalších třech intracelulárních izoform. Expres jednotlivých izoform byla popsána u nejrůznějších typů buněk, avšak během našich pilotních experimentů jsme pomocí průtokové cytometrie objevili dosud nepopsanou poměrně významnou expresi IL-1RA v lidských B a T lymfocytech. Otázkou je, zda se jedná o sekretovanou nebo některou z intracelulárních izoform a zda nějak ovlivňují funkce uvedených typů lymfocytů. Cílem práce je shrnout již publikované poznatky o IL-1RA a naše pilotní experimentální data, a dále navrhnout další postup, který v rámci navazující diplomové práce povede ke zjištění expresního spektra jednotlivých izoform v lidských B a T lymfocytech a stanovení jejich vlivu na biologické funkce uvedených buněk.

Klíčová slova

IL-1RA, IL-1/IL-1RA rovnováha, IL-1RA izoformy, B a T lymfocyty, autoimunitní onemocnění

Abstract

The IL-1RA (IL-1 receptor antagonist) is a member of the IL-1 family, which includes proteins regulating functions of the innate and adaptive immunity. In this regard, secreted isoform of IL-1RA represents the key player mainly due to its function as a natural inhibitor of pro-inflammatory IL-1. It has been shown that IL-1RA is produced in the form of additional three intracellular isoforms. The expression of the particular isoforms has been demonstrated in the various types of cells however, so far undescribed production of IL-1RA in human B and T lymphocytes was observed by our pilot flow cytometry experiments. It remains unclear whether the detected IL-1RA represents either secreted or intracellular isoforms and whether they might display effects directly affecting biological functions of above mentioned lymphocytes. The aim of the study is therefore to summarise published data concerning IL-1RA and our preliminary experimental findings, and further to suggest experimental design of consequential diploma thesis, which will be focused on the analysis of expression profile of particular IL-1RA isoforms in human B and T lymphocytes as well as on the evaluation of their putative impacts on biological functions of mentioned lymphocytes.

Key words

IL-1RA, IL-1/IL-1RA balance, IL-1RA isoforms, B and T lymphocytes, autoimmune diseases

1. Úvod

Interleukin 1 receptorový antagonist (IL-1RA) působí jako přirozený protizánětlivý cytokin, který potlačuje projevy svého agonisty – prozánětlivého interleukinu 1 (IL-1). Oba patří do stejné interleukinové rodiny (tzv. IL-1 rodina, IL-1 cluster) spolu s dvěma receptory (IL-1RI, IL-1RII), na které se váží.

IL-1 je jedním z hlavních mediátorů zánětlivých autoimunitních onemocnění, jako je revmatoidní artritida (RA), Sjögrenův syndrom (SjS), osteoartróza (OA), systémový lupus erythematosus (SLE) a další. V tomto kontextu IL-1RA představuje jeden z nejdůležitějších přirozených inhibitorů prozánětlivé aktivity IL-1. Jejich vzájemná rovnováha sehrává zásadní roli v procesu vzniku a průběhu autoimunitních nemocí.

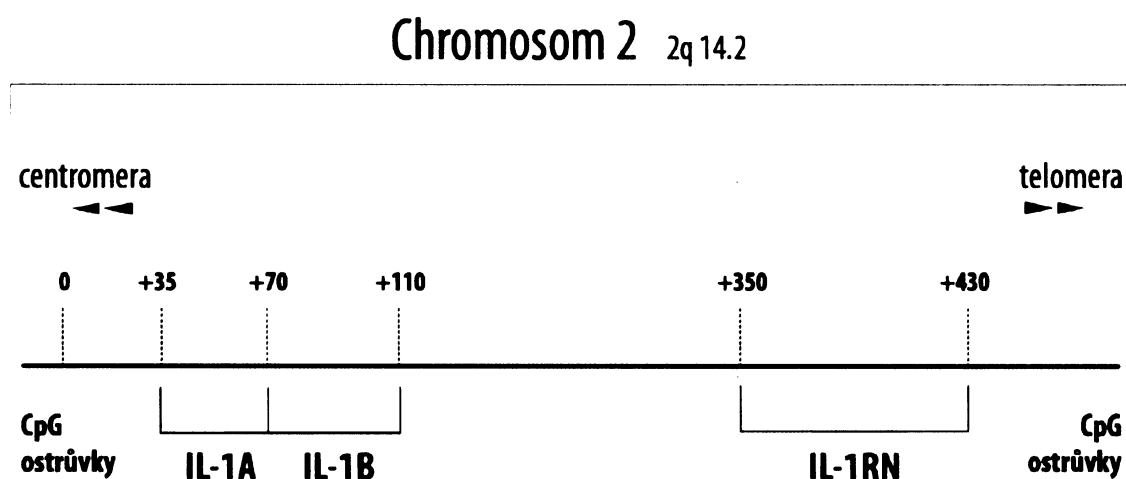
Na rozvoji těchto onemocnění se podílejí jak genetická predispozice, tak faktory vnějšího prostředí (infekce, kouření, stres, špatná výživa atd.). Rostoucí prevalence a závažnost výskytu autoimunitních onemocnění v posledních desetiletích významně ovlivňuje nejen kvalitu života postiženého jedince, ale také společnost jako celek s ohledem na ekonomické dopady. Proto studium vzájemného působení IL-1RA a IL-1 může napomoci lépe pochopit etiopatogenezi zmíněných chorob a rozšířit spektrum prostředků vhodných pro léčbu a prevenci zánětlivých autoimunitních chorob obecně.

Je známo, že oba interleukiny jsou produkovány mnoha buněčnými typy, u IL-1RA zejména makrofágy, granulocyty, neutrofilny a fibroblasty. Uvedené buněčné typy však neprodukují pouze sekretovanou formu IL-1RA (sIL-1RA), ale také tři další izoformy, které se v buňkách vyskytují intracelulárně (tzv. intracelulární izoformy, icIL-1RA).

V průběhu experimentů v naší laboratoři se však ukázalo, že IL-1RA je produkován také B a T lymfocyty, a to v množstvích srovnatelných např. s makrofágy (viz dále). Protože tento nálezn nebyl dosud publikován a IL-1RA je navíc produkován ve formě několika izoform, prvním problémem bude definovat konkrétní expresní spektrum jednotlivých izoform IL-1RA v lidských B a T lymfocytech periferní krve.

2. Interleukin 1 rodina

Interleukiny zahrnujeme pod obecnější skupinu imunologicky aktivních látek tzn. cytokinů. Cytokiny se spolu s dalšími látkami, jako jsou různé receptory, protilátky, adhezivní molekuly a další povrchové molekuly, účastní regulace funkcí imunitního systému. Působí hlavně jako tzv. tkáňové hormony sekretované leukocyty a jinými typy buněk a prostřednictvím svých specifických receptorů působí na různé buňky. Většinou po navázání na receptor vyvolají signál, který kaskádovitě ovlivňuje produkci dalších pro- nebo protizánětlivých cytokinů. Jejich vzájemné působení pak vyvolává nejrůznější odpovědi u daných buněk a ovlivňuje tím jejich fyziologické nebo patologické chování.



Obr. 1: Lokalizace genů IL-1 rodiny na chromosomu 2q14.2
(IL-1A = IL-1 α , IL-1B = IL-1 β)

Interleukinová rodina typu 1 (IL-1 family, IL-1F) se účastní především regulací zánětlivých procesů a jejich indukce. Geny pro interleukin-1 (IL-1) rodinu jsou lokalizovány na dlouhém rameni chromosomu 2 (2q14.2, obr. 1) někdy

označovaného IL-1 klastr (IL-1 cluster, Nicklin et al., 1994). Sekvence aminokyselin (AA), struktura i intron-exonová organizace genů této rodiny napovídá tomu, že její zástupci vznikly pravděpodobně duplikací jediného genu, který existoval před 350 milióny lety (Taylor et al., 2002). IL-1 rodina tedy zahrnuje molekuly dvou agonistů IL-1alfa (IL-1 α) a IL-1beta (IL-1 β), specifického IL-1 receptorového antagonistu (IL-1RA, gen se většinou označuje IL-1RN, obr.1) a dva receptory, IL-1R typu I (IL-1RI) a IL-1R typu II (IL-1RII) a IL-1RAcP (IL-1R accessory protein, Arend, 2001). IL-1 α a IL-1 β jsou nejznámější protizánětlivé cytokiny, jejichž hlavní funkcí je kostimulovat T lymfocyty a indukovat další protizánětlivé cytokiny, např. TNF α a IL-8.

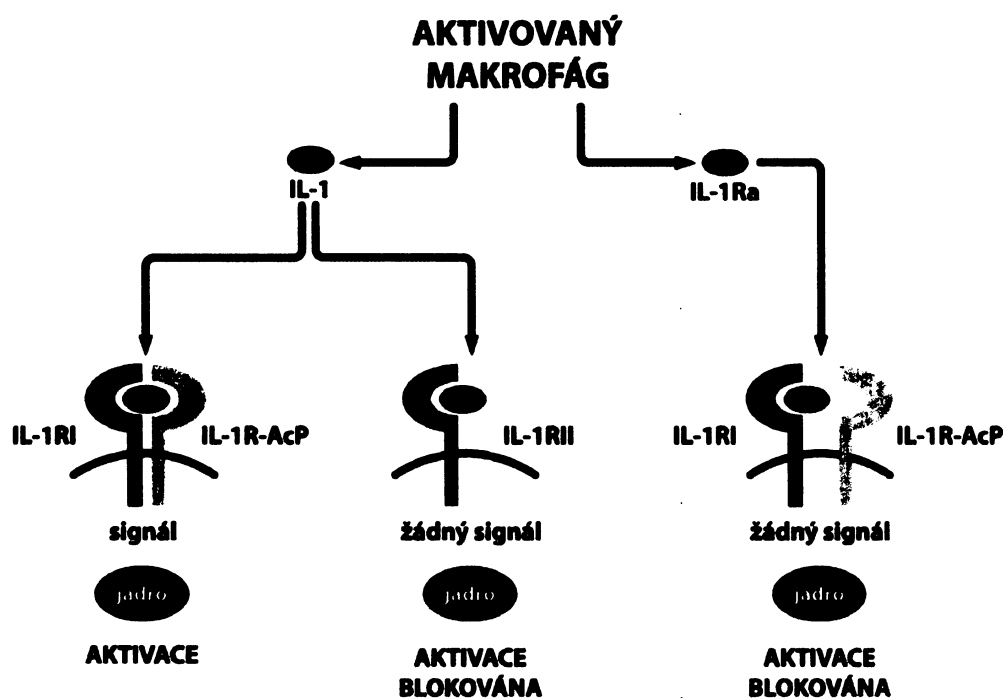
IL-1 je indukován jako odpověď na podněty buď exogenní (cizorodé látky z vnějšího prostředí – mikroorganismy a jejich produkty, viry, chemické a fyzikální faktory, Auron et al., 1994), anebo endogenní (látky produkované organismem samotným, např. po rozpadu buněk, degradační produkty, Auron et al., 1994).

Mezi typické buňky produkující oba typy IL-1 patří monocyty, makrofágy, dendritické buňky (DC), B lymfocyty a NK buňky. Obě tyto formy lze detekovat jak v séru u pacientů s RA, tak i v synovialní tkáni postižených kloubů a jejich hladiny s aktivitou této nemoci dokonce korelují (Duff, 1993). IL-1 mRNA byla také objevena v CD14⁺ makrofázích, které infiltrovaly RA synovialní tkáň kloubu postiženého zánětem (Eastgate et al., 1991).

2.1. Vztah IL-1 a IL-1RA

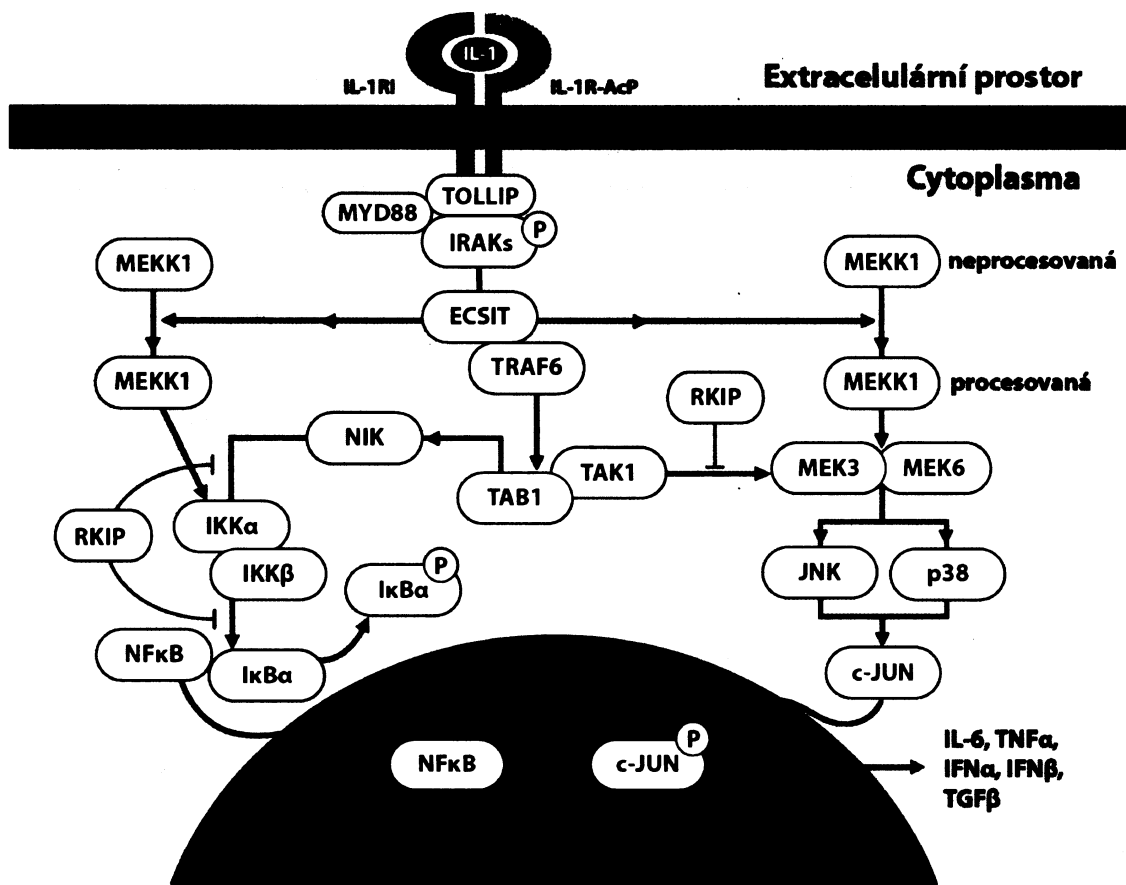
Na stejném lokusu jako IL-1 je lokalizován gen IL-1RN, kódující protein IL-1RA (IL-1Ra, obr. 1) kompetující s IL-1 o vazebné místo na IL-1R (Khan et al., 2004).

IL-1RA je tedy přirozeným inhibítozem IL-1 a má výrazně protizánětlivou funkci. Důkaz byl podán v experimentu, kdy byl myším tento gen vyřazen z funkce (tzv. knock-out myši, Hirsch et al., 1996). Deficience IL-1RA měla za následek rozvoj artritidy s podobnými znaky jako u lidí (Horai et al., 2000). Tím bylo nepochybně prokázáno, že v rozvoji autoimunitních nemocí hraje zásadní roli rovnováha mezi zánětlivou (IL-1) a protizánětlivou (IL-1RA) složkou (Arend, 2002). To bylo navíc podpořeno zjištěním, že deficience IL-1 u myši nevede k manifestaci žádných patologických abnormalit (Hirsch et al., 1993).



Obr. 2: Vazba IL-1 a IL-1RA na IL-1 receptory typu I a II
(upraveno podle: www.hopkins-arthritis.org)

IL-1RA je z 26% sekvenčně homologický k IL-1 β a z 19% k IL-1 α . Tím se vysvětluje jeho schopnost vázat se na IL-1R a ovlivňovat jeho signalizační potenciál (obr. 2). IL-1RII nemá na rozdíl od IL-1RI funkční cytoplazmatickou Toll homologickou doménu, a proto navázání IL-1 k tomuto receptoru nespouští signální kaskádu typicky začínající kinázou vázanou na IL-1R (IRAK) a vedoucí přes další molekuly až k translokaci transkripčního faktoru NF- κ B do jádra, který se zde váže ke specifickému místu na DNA (obr. 3) a tím ovlivňuje transkripci některých genů, jako jsou např. geny pro IL-6, TGF α , IFN α i β a další (McMahan et al., 1991). Díky této strukturní odlišnosti může být IL-1RII použit k vyvazování IL-1 a potlačení zánětlivých procesů. IL-1 a IL-1RA se liší svou afinitou k receptorům obou typů. Afinita pro IL-1RI klesá od IL-1 α , přes IL-1RA, k IL-1 β . Nejvyšší afinitu k IL-1RII vykazuje IL-1 β , dále IL-1 α a nejnižší afinitu má IL-1RA.

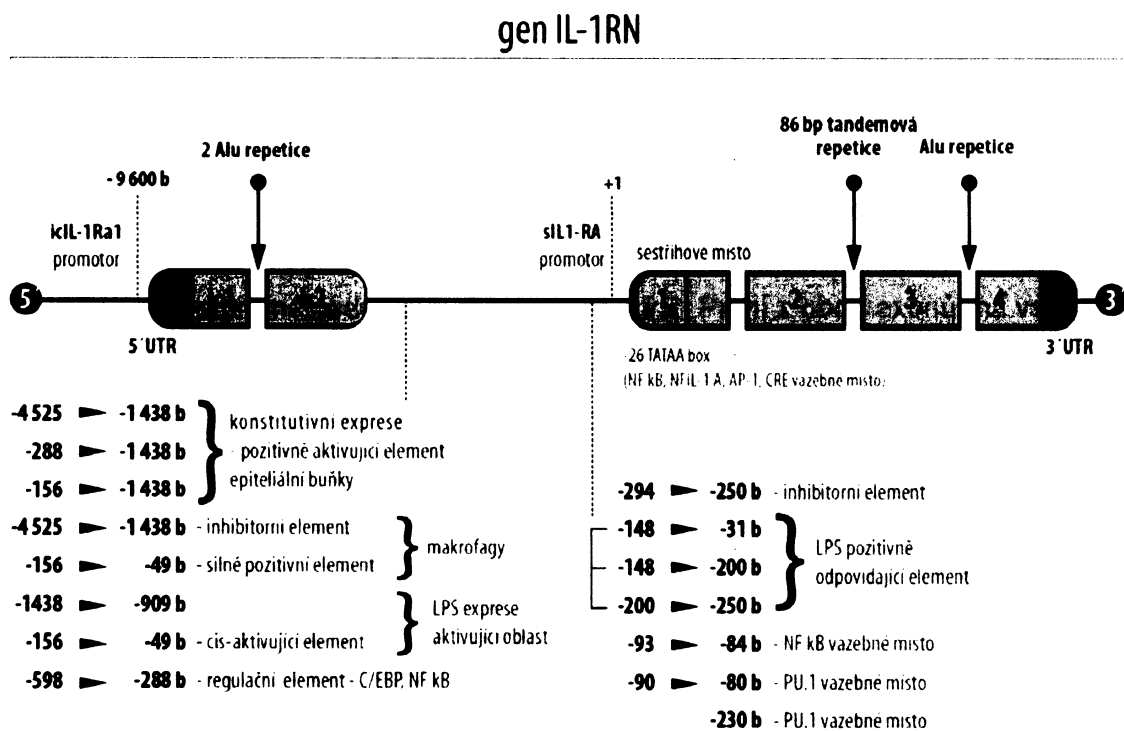


Obr. 3: IL-1 signální dráha

(upraveno podle: www.biocarta.com)

Signál typický pro IL-1 se šíří jen po jeho navázání na IL-1RI, avšak za podmínky spoluúčasti IL-1RAcP (Cullinan et al., 1998, obr. 2 a 3). Vazba IL-1 na IL-1RI vyvolává konformační změny vedoucí k rozpoznávání tohoto komplexu IL-1RAcP a teprve tato interakce je postačující pro vlastní zahájení přenosu signálu (Greenfeder et al., 1995). Pokud se však k IL-1RI naváže IL-1RA, k interakci s IL-1RAcP nedochází a signál se nešíří (Evans et al., 1994a).

3. IL-1RN – Gen pro IL-1RA proteinové izoformy



Obr. 4: Schéma genu IL-1RN

Struktura IL-1RN genu o délce 16,5 kbp (gen pro IL-1RA) je znázorněna na obr. 4 (Lennard et al., 1992). Jednotlivé nukleotidy v genu jsou číslovány od promotoru sekretované izoformy IL-1RA (sIL-1RA). Tuto část genu tvoří 4 exony – 1. exon obsahuje místo pro alternativní sestřih (splicing) a 4. exon obsahuje 3' nepřekládanou oblast (3' UTR). Mezi 2. a 3. exonem se nachází 86 bp tandemová repetice, mezi 3. a 4. exonem je jedna Alu repetice.

Promotor sIL-1RA (-26 bp) obsahuje klasický TATAA box a konsensuální sekvence pro vazbu transkripčních faktorů NF-κB, NFIL-1A a AP-1 a dále CRE vazebné místo. Další významné oblasti regulace leží 5' směrem (tzv. upstream) od promotoru (obr. 4). Zajímavé jsou především elementy odpovídající na stimulaci lipopolysacharidu (LPS), které jsou umístěné ve třech úsecích na sebe navazujících

od – 31 po – 250 bp. Obklopuje je inhibiční oblast v místě – 294 a na opačné straně tři vazebná místa – dvě pro PU.1 a jedno pro NF-κB (Smith et al., 1998).

Jak je patrné z obr.4, gen IL-1RN se může exprimovat za vzniku více forem IL-1RA (tzv. IL-1RA izoformy) proteinů s odlišnou strukturou a funkcí, která u některých izoform stáje ještě není úplně objasněna. Jednotlivé izoformy budou popsány níže. Jedná se o již zmíněnou sekretovanou izoformu IL-1RA (sIL-1RA, viz výše) a další tzv. intracelulární izoformy IL-1RA (icIL-1RA).

Tvorby icIL-1RA1 a 2 se účastní i exony před sIL-1RA promotorem (ve směru 5' od 1. exonu sIL-1RA). Tato část genu obsahuje na místě – 9600 promotor pro icIL-1RA, za kterým následují dva exony – ic1 a ic2. První z obou exonů má ve své sekvenci také 5' nepřekládanou oblast (5'UTR). Mezi exony se vyskytují opět Alu repetice, tentokrát ve dvou kopiích. Za exony se pak rozkládá rozsáhlá regulační oblast (tj. mezi exonem ic2 a prvním -26 promotorem sIL-1RA), přičemž se místa regulace a jejich funkce značně liší podle typu buněk, ve kterých jsou jednotlivé izoformy exprimovány.

V genu pro IL-1RA existuje několik polymorfních oblastí obsahujících variabilní počet repetic (obr. 4). Nejvýznamnější polymorfismus se vyskytuje ve druhém intronu části genu kódující sIL-1RA a je podmíněn variabilním počtem tandemových repetic (variable number of tandem repeats, VNTR, obr. 4, Tarlow et al., 1993). V tomto případě jde o repetici úseku o délce 86 párů bazí, který se v genu vyskytuje v počtu 2 - 6 kopií, takže se jedná o systém pěti alel. Alela 1 (A1) má 4 tyto repetice a představuje nejběžnější alelu v lidské populaci přibližně se 74% výskytem (Clay et al., 1996). Alela 2 (A2) obsahuje pouze dvě tandemové repetice a její četnost v populaci dosahuje asi 21% (Clay et al., 1996). Ostatní tři typy alel (A3 – 5 repetic, A4 – 3 repetice, A5 – 6 repetic) jsou spíše minoritní (Tarlow et al., 1993). Význam popsaneho VNTR polymorfismu je dán především jeho objevenou asociací s mnoha zánětlivými nebo přímo autoimunitními chorobami, přičemž jako významná z hlediska vnímavosti k těmto chorobám se jeví vždy alela A2. Její frekvence byla významně zvýšená (vždy oproti relevantní skupině kontrolních osob) u pacientů s následujícími vesměs zánětlivými chorobami: alopecia erata (Tarlow et al., 1994), systémové revmatoidní autoimunitní choroby - např. systémový lupus erthematosus (SLE), Sjögrenův syndrom (SjS, Perier et al., 1998), primární osteoartróza kolenního kloubu (OA, Růžičková et al., 2007), což svedčí o roli této alely ve vnímavosti k rozvoji uvedených onemocnění. Navíc se ukazuje, že tato alela může hrát roli jako aditivní

faktor predisponující jedince k závažnějšímu průběhu choroby nebo k rozvoji její konkrétní formy, jako je tomu např. u asociaci alely A2 s entesitidami u juvenilní formy revmatoidní artritidy (JIA, Vencovský et al., 2001).

Počet prací popisujících nově asociace alely A2 s různými nemocemi každoročně stoupá, avšak ve všech případech nelze jednoznačně říci, že přítomnost alely (v hetero-/homozygotní konstituci) je jediným a primárním rizikovým faktorem určujícím rozvoj všech studovaných onemocnění. Dokonce existují autoimunitní choroby, jako např. RA, kde nebyl pozorován rozdíl v četnosti alely A2 mezi skupinou pacientů a zdravých kontrol a její spoluúčast na patogenezi nemoci se tedy nepotvrdila (Perier et al., 1998).

Mechanismus, jímž by alela A2 ovlivňovala rozvoj zánětlivých nebo autoimunitních chorob, není prozatím znám, stejně jako její vliv na produkci samotného sekretovaného IL-1RA. Ve studii porovnávající množství produkovaného IL-1RA v tkáňových kulturách periferních krevních mononukleárních buněk (PMBC) jedinců s alelami 1 a 2 byl zjištěn specifický pokles mRNA kódující tuto izoformu v závislosti na přítomnosti alely A2, přičemž tento pokles byl až čtyřnásobný oproti buňkám s alelou A1 (Redlitz et al., 2004). Z poznatků této studie její autoři vyvozují, že alelicky specifické rozdíly v produkci izoform IL-1RA jsou v souvislosti s regulací transkripce genu. Bylo totiž popsáno, že 86 bp tandemová repetice obsahuje vazebná místa pro transkripční faktory (TF, Tarlow et al., 1993), takže v případě různého počtu repetic se může měnit počet a dostupnost vazebných míst pro TF, čímž může být ovlivněna výsledná síla transkripce.

Na druhou stranu je popsáno také zvýšení množství IL-1RA ve spojitosti s alelou 2, a to u pacientů s Crohnovou chorobou (CD) nebo ulcerativní kolitidou (UC) (Andus et al., 1997). U těchto pacientů je posunuta rovnováha IL-1/IL-1RA směrem k IL-1, tedy k prozánětlivé složce, a to i přes výše popsanou větší produkci IL-1RA. Důvodem je, to že zvýšení produkce IL-1 převyšuje zvýšení produkce popsané u IL-1RA.

Závěrečným shrnutím poznatků z výše popsaných studií, které jsou protichůdné ve spojitosti s produkcí IL-1RA, může být, že ať už se u různých buněk hladina IL-1RA nebo jeho izoform snižuje či zvyšuje, podstatné je, že alelu 2 vždy v nějaké míře doprovází zvýšení produkce IL-1 (Santilla et al., 1998). Toto se zdá být hlavním důvodem, proč je spojována s autoimunitními onemocněními.

Z obr. 4 je zřejmé, že gen IL-1RN neobsahuje ve druhém intronu části genu kódující sIL-1RA pouze uvedený VNTR polymorfismus. Jako další byly identifikovány tzv. Alu repetice, které jsou lokalizovány mezi třetím a čtvrtým exonem (1 Alu repetice) a mezi exony ic1 a ic2 (2 Alu repetice, Lennard et al., 1992). Není známo, zda existuje variabilita v počtu těchto repetic nebo v rámci jejich sekvence a rovněž jejich úloha v expresi IL-1RN zatím nebyla studována.

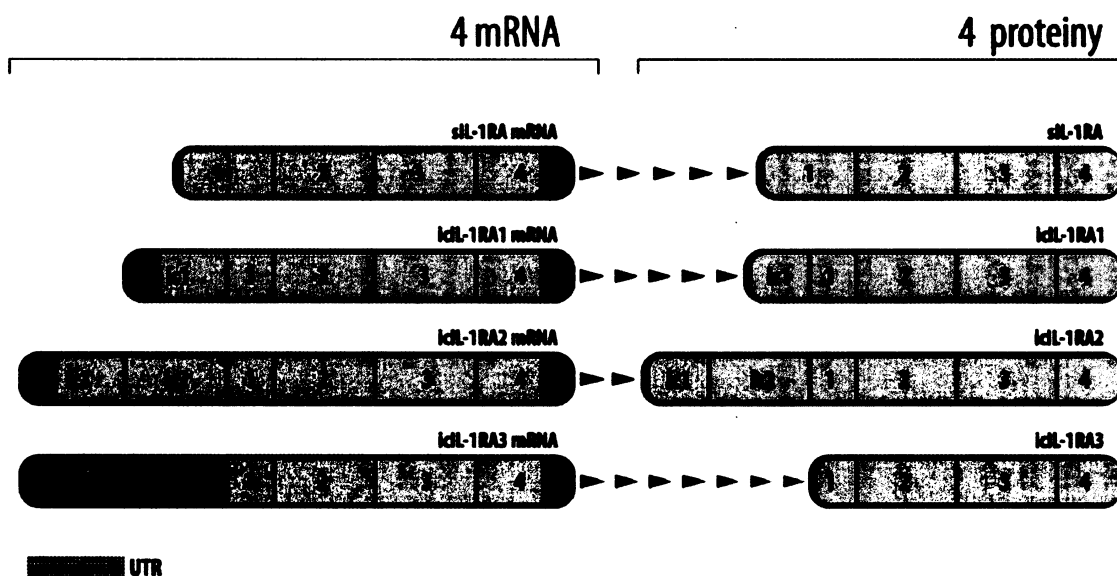
Kromě uvedených oblastí repetic jsou v genu IL-1RN popsána i další polymorfní místa, jejichž význam z hlediska asociace s různými chorobami není znám. Jedná se většinou o záměny nukleotidů v jednotlivých úsecích genu IL-1RN, např. záměna 1 A za G v icIL-1RA promotoru. V jednom ze tří možných míst nepřekládané 5' UTR oblasti exonu ic1 se vyskytuje stejná záměna, ve druhé pak G za A a ve třetí C za G. V exonu 2 byla identifikována záměna T za C (Clay et al., 1996). Také v těchto případech nebyla dosud analyzována asociace těchto mutací s chorobami ani vliv na produkci samotných IL-1RA izoform. Tyto záměny ale vesměs nevedou ke změně aminokyselinové sekvence (Clay et al., 1996). Jde tedy o tzv. tichou mutaci (silent mutation) neprojevuující se v konečném důsledku na funkci produkovaného proteinu, může se jednat také o přirozený polymorfismus bez nějakého dalšího významu.

3.1. Izoformy IL-1RA

Jak bylo výše uvedeno, gen IL-1RN nekóduje jeden protein, ale celkem 4 izoformy, z nichž jedna je sekretovaná (sIL-1RA) a tři intracelulární (icIL-1RA1, icIL-1RA2 a icIL-1RA3) a pro každou z nich existuje jedna mRNA (proto se někdy hovoří také o IL-1RA mRNA izofomách). Způsob a zastoupení příslušných oblastí genu pro IL-1RN v jednotlivých izofomách mRNA a potažmo proteinů je schematicky naznačeno na obr. 4.

Obecně je gen IL1-RN pomocí alternativního sestřihu přepisován na 3, respektive 4 druhy mRNA, z nichž uvedené IL-1RA izoformy vznikají (obr. 4, 5). Společnou vlastností všech izoform je přítomnost oblasti obsahující druhý až čtvrtý exon s identickou sekvencí 1562 nt končící 1133 nt dlouhou 3'UTR nepřekládanou oblastí. Tato oblast pak tvoří C-koncovou část finálního proteinu, jež je pro všechny izoformy stejná. Oblast signálního (leader) peptidu lokalizovaná na N-terminálním

zbytku 25 AA se však nachází pouze u sekretované formy IL-1RA, zatímco všechny intracelulární formy ji postrádají.



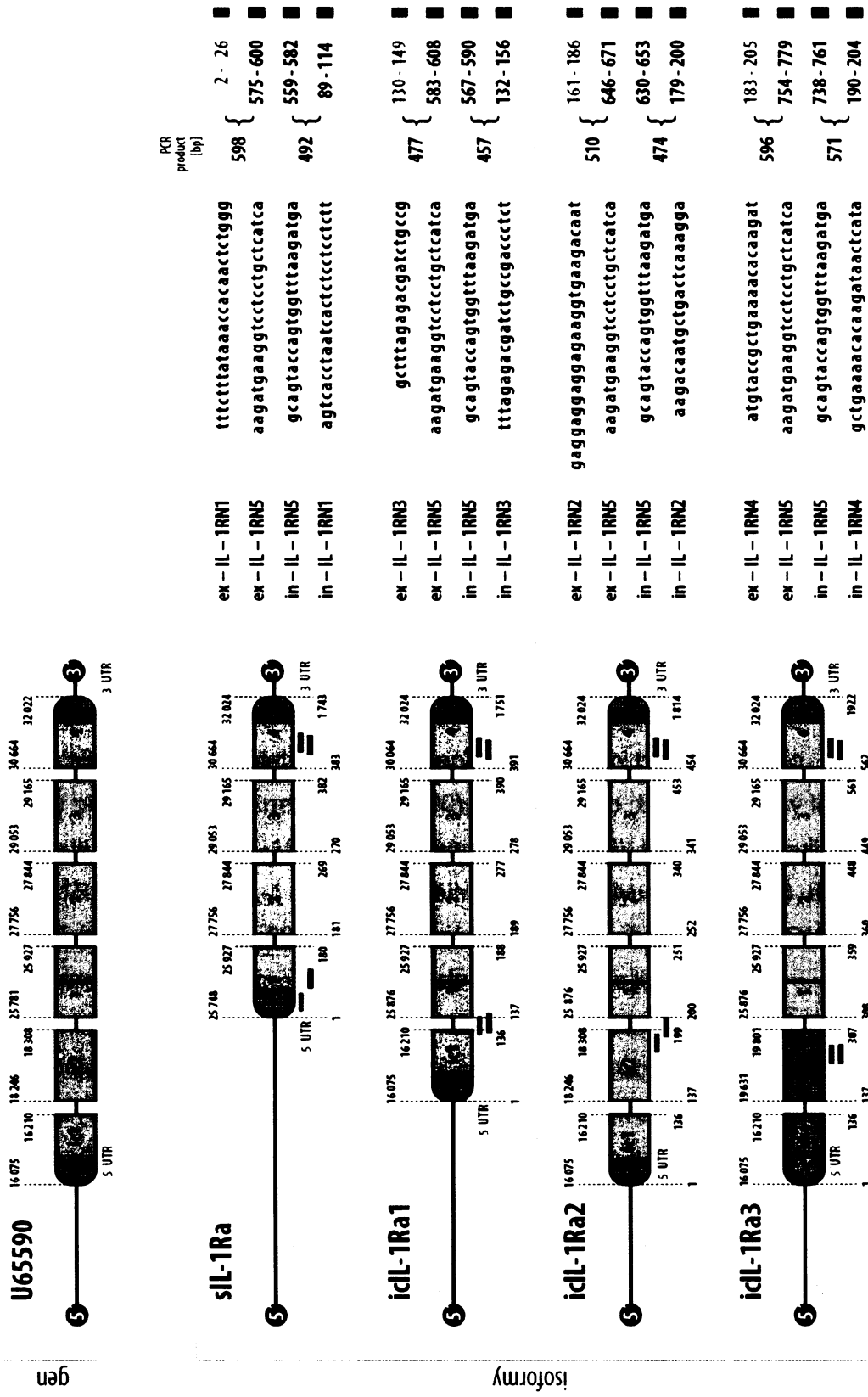
Obr. 5: mRNA a proteiny IL-1RA

(modré obdélníčky označují exony, čísla a písmena v nich označují název exonu a jeho pořadí v mRNA a UTR je 5' nebo 3' nepřekládaná oblast vyznačená hnědým tečkováním)

Popis vlastností a struktury izoform IL-1RA dosud používaný různými vědeckými skupinami není jednotný a velmi závisí na zdrojích, z nichž jednotlivá pracoviště čerpají. Proto jsme se rozhodli používat jeden typ označení založený na exonech charakteristických pro jednotlivé izoformy a sekvencích příslušných deoxynukleotidů definovaných v genomové sekvenci genu v databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>, obr. 6). Na schématu jsou pro větší přehlednost uvedeny jako hlavní naše názvy jednotlivých izoform, dále kódy sekvencí genomové DNA a mRNA pro jednotlivé izoformy a konečně horní čísla jsou pozice odpovídajících úseků na genomové DNA a příslušné mRNA pro konkrétní IL-1RA mRNA izoformu. Na tomto schématu jsou také podrobněji zaznamenány oblasti exonů, primery a očekávané PCR produkty všech čtyř molekul.

EXONY IL1-RA

PRIMERY IL1-RA



Obr. 6: Exony a primery pro detekci IL-1RA jednotlivých IL-1RA mRNA izoforem

3.1.1. sIL-1RA

Nejvíce prozkoumaná je sekretovaná izoforma IL1-Ra, sIL-1Ra, která se nejnámenněji účastní IL-1/IL-1RA rovnováhy a jejich vzájemné kompetice o vazebné místo na povrchu receptoru. Význam této izoformy byl přesvědčivě prokázán při podávání rekombinantního lidského sIL-1RA pacientům s autoimunitními chorobami provázeným výrazným zlepšením klinického stavu (Arrend et al., 2000).

Kódující oblasti sIL-1Ra jsou tvořeny následujícími exony – 1, 2, 3 a 4 (obr. 3, 4 a 6). Exon s označením 1 navíc obsahuje místo pro alternativní sestřih pro mRNA kódující izoformu icIL-1RA3 (viz kap. 3.1.4, Carter 1990) .

Sekretovaná izoforma je syntetizována jako prekurzorový protein s 177 aminokyselinami (AA) a signálním peptidem, následně procesovaný do podoby 17kDa molekuly (152 AA) se signálním peptidem. Ta pak opouští buňku jako variabilně glykosylovaná molekula o velikosti 22 – 25 kDa, přičemž místem glykosylace je oblast mezi 333. a 339. nukleotidem (Malyak et al., 1998a).

Biologický význam má sIL-1RA především jako inhibitor IL-1 s vazebnou kapacitou na povrchový IL-1RI. Tato forma je produkována převážně monocyty a makrofágy, ale může být syntetizována veškerými buněčnými typy, u nichž je popsána také produkce IL-1 (Arrend et al., 2000). Bylo zjištěno, že maturovaný IL-1 dokonce stimuluje produkci sIL-1RA (Merhi-Soussi et al., 2005). Faktory indukujícími produkci sIL-1RA jsou mimo IL-1 např. bakteriální LPS (lipopolysacharid), IL-4, IL-6, IgG, GM-CSF (Schröder et al., 2005). Při podání LPS lidským neutrofilům a PBMC bylo zvýšení produkce mRNA pro sIL-1RA detekovatelné už po jedné hodině (Schröder et al., 2005). U myši bylo sIL-1RA možné detekovat až po čtyřech hodinách od injekce LPS a mezi hlavní místa této indukované exprese patřily plíce, slezina a játra (Gabay et al., 1997b). Játra jsou obecně hlavním orgánem produkujícím sIL-1RA, který je v současné době považován za další protein akutní fáze (acute phase protein, APP, Gabay et al., 1997a). Tím je mimo jiné také vysvětlena sekrece IL-1RA během odpovědi na stimulaci výše uvedenými indukujícími faktory, jejichž zvýšená produkce obvykle svědčí o probíhající infekci nebo rozvoji autoimunitních onemocnění (Arrend et al., 2000), ačkoli bazální hladiny sIL-1RA byly pozorovány také v séru zdravých jedinců (Granowitz et al., 1992).

3.1.2. icIL-1RA1

Až na 5'konec, kde má ještě ic1 exon, je téměř celá mRNA kódující tuto intracelulární izoformu shodná s sIL-1Ra mRNA (Carter et al., 1990). Podstatný rozdíl je v 5'konci obsahujícím ic1 exon a postrádajícím sekvenci kódující signální peptid nutný pro sekreci z buňky (Haskill et al., 1991). Výsledný protein by proto neměl být sekretován. Tato izoforma nepodléhá glykosylaci a je velká 18kDa (159 AA, Carter et al., 1990). Mezi typické produkující buňky patří fibroblasty, dále keratinocyty a ostatní epiteliální buňky (Bigler et al., 1992). Je produkován také monocyty a makrofágy, avšak např. neutrofilů jej neprodukuje vůbec (Malyak et al., 1998a). Produkce icIL-1RA1 je u keratinocytů zvyšována za přítomnosti TNF α , IL-1 α , u fibroblastů také TNF α a IL-1, dále PMA (phorbolmyristyl acetát) a LPS (Schröder et al., 2005). Aberantní zvýšení exprese icIL-1RA1 proteinu u fibroblastů může vést k rozvoji fenotypu typického pro systémovou sklerózu (SSc, Kanangat et al., 2006).

Izoforma icIL-1RA1 se váže k IL-1RI se stejnou afinitou jako sIL-1RA. Mezi některé popsané vlivy icIL-1Ra1 patří například regulace stimulačního efektu prekursoru IL-1 α (preIL-1 α) na buněčnou motilitu (Merhi-Soussi et al., 2005). Kotransfekce buněčné kultury ECV304 proteiny preIL-1 α a icIL-1Ra1 má za následek potlačení stimulace buněčné motility vyvolané preIL-1 α (Merhi-Soussi et al., 2005). Ačkoli by icIL-1RA1 protein vzhledem k absenci signální sekvence neměl být schopen dostat se z buňky, byl detekován v supernatantu buněčné kultury epiteliálních buněk stimulovaných např. kortikosteroidy, a tedy je pravděpodobné, že se také může vázat na povrchový IL-1RI (Levine et al., 1997). Tento náález je velmi důležitý především proto, že za určitých podmínek by icIL-1RA1 izoforma mohla sloužit jako další přirozený inhibitor IL-1 kompetující o vazbu na IL-1RI.

Dalším zajímavým příkladem vztahu molekul icIL-1RA1 a IL-1 může být inhibice účinků IL-1 indukovaného růstového onkogenu (GRO) díky destabilizaci jeho mRNA popsané u lidských nádorových buněk epitelu vaječníků (Watson et al., 1995). Princip je založen na nadprodukci icIL-1RA1 u icIL-1RA1 negativních buněčných linií použitím retrovirového expresního systému a měření poločasu života (half-life) GRO mRNA po expozici IL-1 β . Half-life mRNA u těchto buněk byl snížen asi na polovinu oproti kontrolní buněčné linii.

Dále tato izoforma negativně reguluje IL-1 expresi vyvolanou IL-6 a IL-8 u lidských intersticiálních epiteliálních buněk linie Caco-2 (Garat et al., 2003). IL-1 aktivuje všechny 3 členy rodiny MAP kináz (mitogeny aktivovaná protein-kináza) účastnících se signalizačních procesů v buňce, které vedou k prozánětlivým reakcím. V této studii bylo popsáno, že icIL-1RA1 inhibuje jednu z těchto kináz, a to p38 MAP kinázu. Dále také zabraňuje translokaci transkripčního faktoru NF- κ B do jádra po jeho stimulaci IL-1. Intracelulární protizánětlivá aktivita icIL-1RA1 je tedy výsledkem potlačení funkcí těchto dvou molekul.

Mezi nejnovějšími poznatky bylo publikováno, že icIL-1RA1 se dokáže vázat na 3. komponentu COP9 signalosomu (tato komponenta dokáže fosforylovat řadu cytoplazmatických proteinů a tím je aktivovat) a prostřednictvím této interakce snižovat IL-1 indukovanou produkci cytokinů v keratinocytech (Banda et al., 2005).

3.1.3. icIL-1RA2

Tato intracelulární izoforma je translatovaná z mRNA obohacené oproti předešlé izoformě o další exon ic2 o velikosti 63 bp vložený mezi exony ic1 a 1, jehož přesné umístění je 2 kb vpravo (downstream) od icIL-1RA1 promotoru (obr. 3). Díky jeho přítomnosti nabývá protein icIL-1RA2 velikosti 25 kDa (180 AA) a stává se největším z intracelulárních typů (Muzio et al., 1995). Exon 1 zahrnuje již zmiňované místo alternativního sestřihu (viz. kap. 3 a obr. 4). Pro tuto i další intracelulární izoformy je typické, že na rozdíl od sIL-1RA v tomto místě alternativní sestřih probíhá a úsek mRNA společný všem izoformám (exony 1 – 4) je tudíž u intracelulárních izoform kratší a výsledný protein nemůže podléhat glykosylaci. IcIL-1RA2 zatím patří k nejméně prostudovaným izoformám IL-1RA. Přítomnost její cDNA byla popsána u fibroblastů a keratinocytů, avšak výskyt 25kDa proteinu nebyl doposud zaznamenán u žádného typu buněk, a proto je otázkou, zda vůbec tento protein existuje in vivo a za jakých podmínek je jeho tvorba indukována (Muzio et al., 1999).

3.1.4. icIL-1RA3

Jde o poslední objevenou z intracelulárních izoform, jejíž mRNA je pravděpodobně shodná s sIL-1RA isoformou, ale protein vzniká alternativní translací na sestřihovém místě v exonu 1 (Gabay et al., 1997b). Této představě o struktuře mRNA icIL-1RA1 odporuje objev nově popsaného exonu. Nový exon by měl být situován mezi ic1 exonem a exonem 1 (Weissbach et al., 1998). Tato izoforma by tedy byla podobná spíše icIL-1RA1 než sIL-1RA. Sekvence nukleotidů a umístění exonů u izoformy odpovídá spíše druhé hypotéze.

Na obr. 6 jsou schematicky znázorněny exony této izoformy. Jako výchozí byla použita sekvence IL-1RN genu na úrovni genomové DNA (U65590) a v ní jsme na základě literatury identifikovali přesné lokalizace jednotlivých exonů pro každou z IL-1RA izoform.

icIL-1RA3 tedy zahrnuje 6 exonů, lze si povšimnout, že první exon je pojmenovaný ic1 like (podobný ic1). To právě z důvodu, že se jeho lokalizace shoduje s lokalizací exonu ic1 u icIL-1RA1, avšak u izoformy icIL-1RA3 se chová jako UTR oblast. Stejně tak vlastnosti spíše nepřekládané oblasti má i druhý exon situovaný mezi ic1 exonem a exonem 1. Tento exon s umístěním mezi 19631. a 19801. nukleotidem na genomové DNA, jak je vidět na obr. 6, je v sekvenci genomové DNA v intronové části a exonem v pravém slova smyslu se stává až po alternativním sestřihu na úrovni mRNA pro icIL-1RA3. Translace této mRNA je podle sekvence možná z několika kodónů pro methionin situovaných v této 5'UTR oblasti (Weissbach et al., 1998), nejpravděpodobněji translace začíná na druhém AUG (Malyak et al., 1998b). Protože je 2. exon pro icIL-1RA3 jedinečný, dala by se znalost jeho sekvence použít k odlišení této izoformy od ostatních (viz níže).

Molekulová hmotnost icIL-1Ra3 je 16kDa (143 AA) a produkce byla popsána u keratinocytů, monocytů, makrofágů, epitheliálních buněk, hepatocytů a neutrofilů (Malyak et al., 1998a). U neutrofilů a PBMC buněk byl popisován zajímavý rozdíl v expresi této izoformy a sIL-1RA, kdy icIL-1RA3 byl produkován konstitutivně, zatímco produkce sIL-1RA byla indukovatelná LPS a během inkubace s ním se zvyšovala (Malyak et al., 1998a).

Experimentem na kultuře myších thymocytů byla prokázána asi 2 – 5 krát nižší afinita k IL-1RI než sIL-1Ra nebo icIL-1RA1 (Malyak et al., 1998b). To je

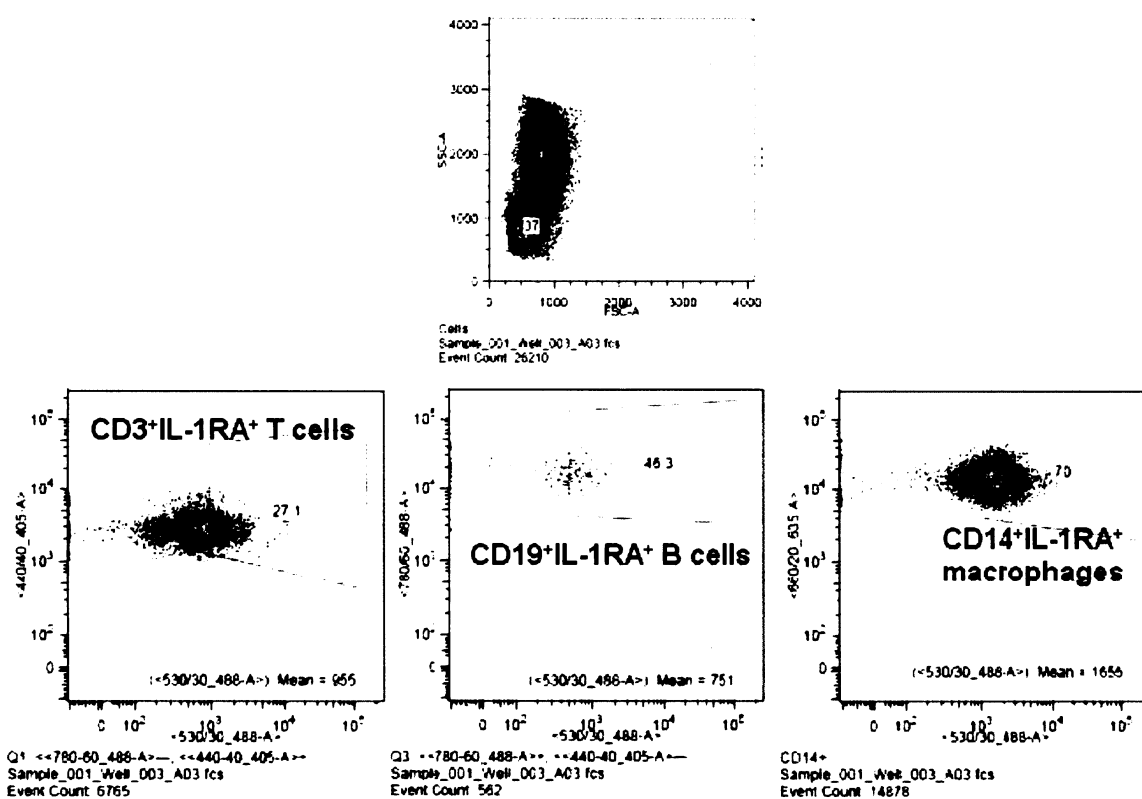
pravděpodobně v důsledku konformačních změn, v kdy je u této izoformy zakryto některé z 5 kritických míst IL-1RA nutných pro vazbu na IL-1R (Evans et al., 1995).

Biologické funkce icIL-1RA3 jsou stále neznámé, existují představy o možném regulačním potenciálu, který by moduloval expresi nebo funkce ostatních izoform, avšak zatím chybí jakékoli experimentální důkazy.

Dále je možné, že by icIL-1RA3 mohla představovat jakousi intracelulární zásobu IL-1RA, která by se dosud neznámým mechanismem dostávala za určitých podmínek do extracelulárního prostoru (např. při nekrotické smrti buňky) a tím by měla možnost inhibovat účinky IL-1 buď prostřednictvím vazby na IL-1RI, anebo ovlivněním IL-1 uvnitř buňky ještě před jeho sekrecí (Malyak et al., 1998a).

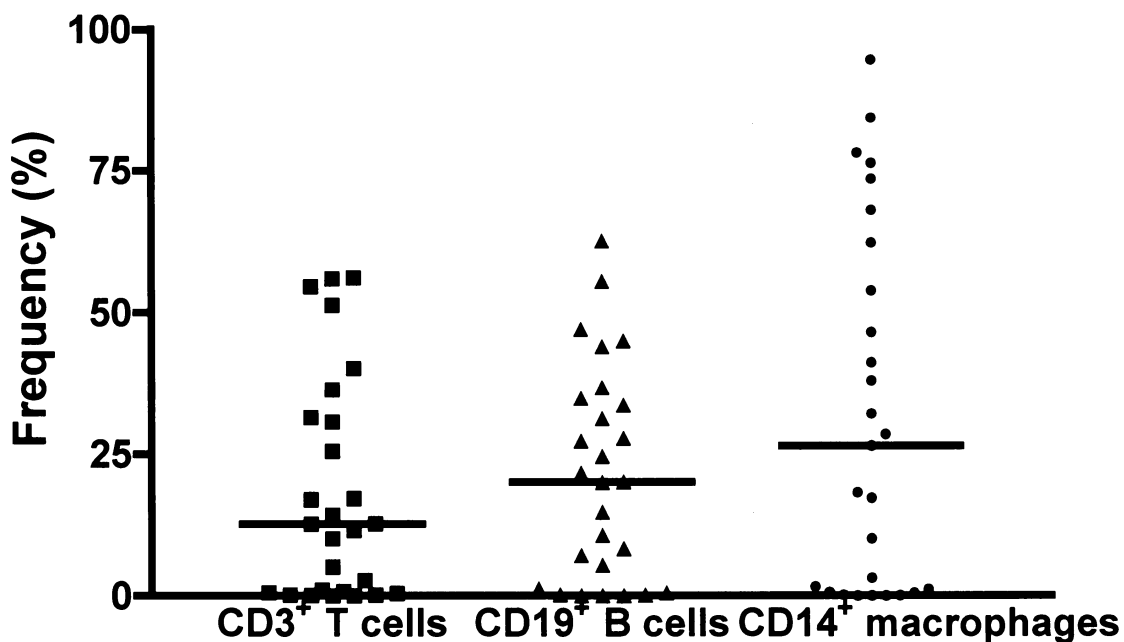
4. Expres IL-1RA v B a T lymfocytech – pilotní experiment

Jak bylo uvedeno výše, exprese jednotlivých izoform IL-1RA byla popsána u různých buněčných typů, avšak o jejich produkci u B nebo T lymfocytů nejsou v literatuře dostupné žádné údaje. Výsledky našich pilotních experimentů s využitím průtokové cytometrie a intracelulárního značení pomocí monoklonální protilátky proti IL-1RA však přinesly důkaz o expresi IL-1RA v B a T lymfocytech periferní krve zdravých dárců (obr. 6).



Obr. 7: Intracelulární výskyt IL-1RA u B a T lymfocytů a makrofágů periferní krve kontrol (nepublikováno)

Na horním histogramu je vidět celkové spektrum značených lymfocytů, respektive makrofágů, na dalších třech histogramech osa x odpovídá značení buněk pomocí anti-IL-1RA FITC (Abcam, Cambridge, USA, klon AS17) a osa y odpovídá značení T buněk pomocí anti-CD3 Pacific Blue (Dako, Glostrup, Dánsko, klon UCHT1) (b), B buněk pomocí anti-CD19 PE (Dako, klon 4G7) (c) a anti-CD14 APC (Dako, klon MO-59) (d). Buňky dvojitě pozitivní jsou zvýrazněny v rámečku s číslem označujícím frekvenci v procentech. Podstata tohoto postupu je pouze v tom, že buňky musí být před vlastním značením permeabilizovány podle instrukcí výrobce (IntraStain kit, Dako).



Obr. 8: Frekvence intracelulárního IL-1RA u B a T lymfocytů a makrofágů (nepublikováno)

Podobný experiment jsme pak provedli s periferní krví pacientů s revmatoidní artritidou a porovnali frekvence IL-1RA pozitivních CD19⁺ B lymfocytů (0,0-62,6%; median 20,11±3,63; 95%CI 14,05-28,97), CD3⁺ T lymfocytů (0,11-56,1%; median 12,70±3,76; 95%CI 10,38-25,85) a CD14⁺ monocytů/makrofágů (0,04-94,7%; median 26,50±6,11; 95%CI 19,20-44,34; obr. 8). Zjištěné frekvence B a T lymfocytů s intracelulárním IL-1RA byly velmi podobné naměřeným frekvencím v populaci CD14⁺ monocytů/makrofágů.

Použitá monoklonální protilátka proti IL-1RA však nedovolila rozlišit přesně o jakou izoformu IL-1RA se jedná, ani zda je sekretovaná nebo intracelulární. Proto stále zůstává nezodpovězeno, jaké izoformy B a T buňky produkují, případně jaké druhy regulace se v jejich expresi uplatňují. Další otázkou je funkce jednotlivých izoform v těchto buňkách nebo biologická příčina této produkce.

Díky znalosti sekvence nukleotidů jak genomové DNA, tak mRNA všech 4 izoform (Gene Bank) a také díky vědeckým pracím identifikujících jednotlivé izoformy bylo možné propojit charakteristické vlastnosti izoform s jejich nukleotidovým zápisem v DNA, respektive mRNA. Konečným výstupem potřebným pro budoucí práci se tedy stala sekvence mRNA každé izoformy (obr. 9) a specifické primery pro každou z nich navržené pro jejich identifikaci (obr. 6).

Jak je patrné na obr. 6, jsou námi navržené primery pro detekci jednotlivých izoform IL-1RA mRNA dvojího typu – externí a interní. Toho lze využít při dvojkrokové amplifikaci při PCR, kdy se nejprve díky externím primerům namnoží o něco delší úsek cDNA a následně se takto namnoženého materiálu využije pro další cyklus PCR tentokrát už s primery interními. S ohledem na to, že veškeré izoformy IL-1RA mají stejný C-konec (1. – 4. exon), dá se jako reverzní primer použít pouze jeden primer (IL-1RN5) pro amplifikaci všech izoform. K jejich rozlišení postačuje druhý (přímý) primer, který již je pro každou izoformu specifický (IL-1RN 1 – 4).

Pro sIL-1RA je jeho umístění v oblasti exonu 1, která u ostatních izoform kvůli alternativnímu sestřihu probíhající v tomto exonu chybí. Primer určený pro icIL-1RA1 byl navržen do intronové oblasti mezi ic1 a 1. exonem. Primer specifický pro icIL-1RA2 se nachází v exonu ic2 a poslední z těchto primerů pro icIL-1RA3 izoformu je umístěn v UTR oblasti této mRNA.

5. Terapeutické využití IL-1RA v léčbě autoimunitních chorob

Autoimunitní revmatoidní onemocnění si získávají v posledních desetiletích stále větší pozornost zejména v důsledku jejich zvyšujícího se výskytu. Hlavními cytokiny způsobující zánětlivé projevy jsou IL-1 β a TNF α . Z toho vychází většina terapeutických přístupů s cílem zánětlivý proces v průběhu nebo na začátku nemoci potlačit.

Možností jak ovlivňovat a zlepšovat stav těchto onemocnění se nabízí několik. Jako první můžeme jmenovat blokování aktivit a funkcí jednotlivých cytokinů. V reakcích modulovaných cytokiny existuje určitá redundance, a proto bylo otázkou, zda zasažení jedné molekuly nějak významně přispěje ke zlepšení stavu pacientů. Úspěšným příkladem je antagonist TNF α použitý v léčbě RA, který značně snižuje degradaci chrupavek a další manifestace RA (Feldmann et al., 2001). IL-1RA se díky svým probádaným vlastnostem (viz výše) stává stále častěji dalším z kandidátů pro terapii těchto autoimunitních zánětlivých onemocnění.

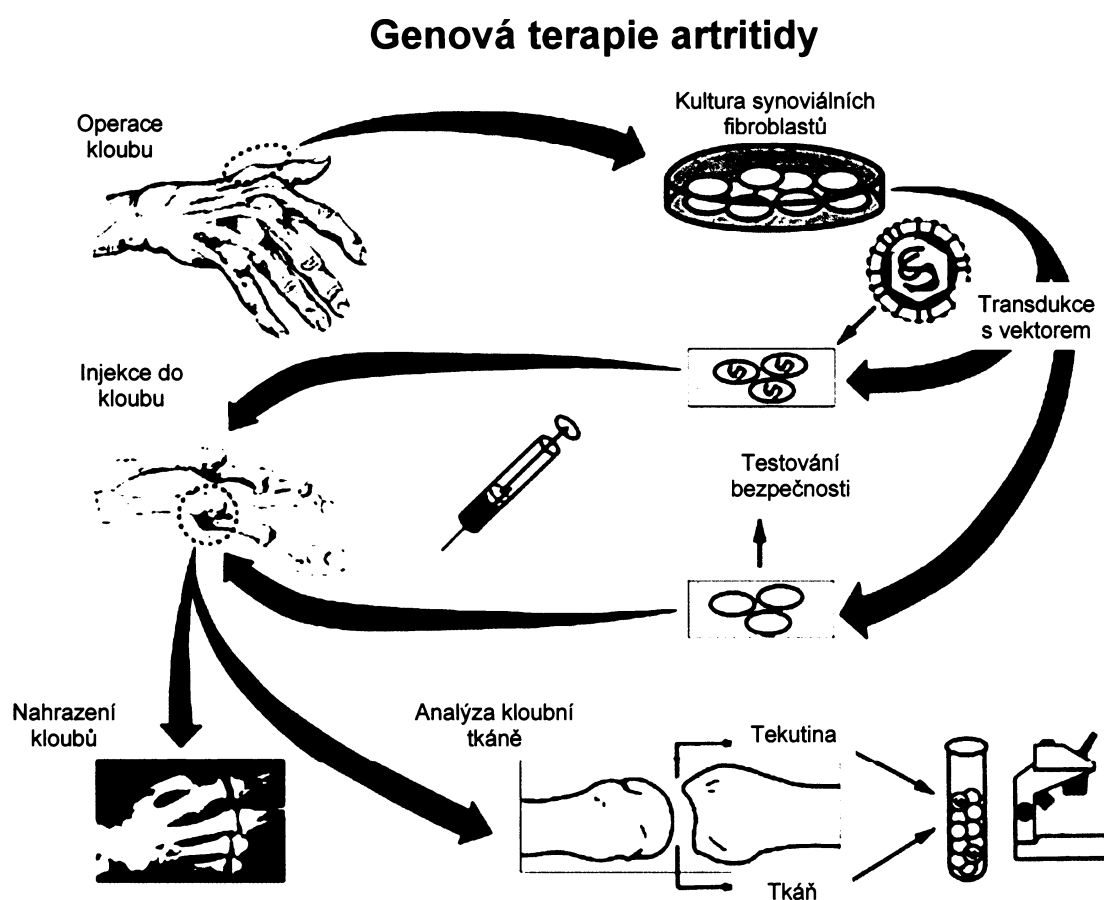
5.1. Metody distribuce a účinky rekombinantního IL-1RA v organismu

Hlavním problémem distribuce IL-1RA je, jak protein vůbec do organismu dostat. Klasické cesty podávání léku, jako perorální podání je pro IL-1RA nevýhodné, protože se jako všechny proteiny vlivem pH žaludku a dalších mechanismů štěpí. Při intravenózní injekci je zase čas jeho přežití značně omezen. Nejvýhodnější by tak mohlo být podkožní podání, kdy díky extracelulární matrix je protein schopen plnit svou funkci až několik hodin (www.kineretrx.com).

Nejnámějším vyvinutým rekombinantním proteinem IL-1RA, který se podává nejčastěji právě posledním jmenovaným způsobem, je Anakinra (Kineret, www.kineretrx.com). Anakinra je rekombinantní, neglykosylovaná verze lidského sIL-1RA připravená z geneticky modifikované *Escherichia coli*. Protein obsahuje 153 AA a má hmotnost 17,3 kDa (www.kineretrx.com). Díky svým vlastnostem lze Anakinru využít při léčbě revmatoidních onemocnění, kde nahrazuje funkce přirozeného

IL-1RA se všemi důsledky. Nevýhodou značně omezující hlavně pacienta je každodenní nutnost doplnění hladiny IL-1RA rekombinatního proteinu. Další překážkou takového podávání je, že k potlačení vlivů IL-1 je nutná několikrát přesahující (10 – 10000 krát) koncentrace IL-1RA (Bendele et al., 2000).

Z výše popsaných důvodů bylo nutné se zamyslet nad využitím jiných léčebných postupů, než nabízí zhotovené rekombinatní proteiny. Metoda transferu genu IL-1RA (IL-1RN) do buňky by měla tyto již zmíněné komplikace překonat (obr. 10, Evans et al., 1994b).



Obr. 10: Schéma metodiky genového transferu
(upraveno z: Evans et al., 2005)

Operace kloubu (ruky nebo nohy) postiženého artritidou slouží pro odběr a následující kultivaci synoviálních fibroblastů. Poté se tyto fibroblasty transdukuje retrovirovým vektorem. Pro následnou injekci takto upravených

fibroblastů je podmínkou testování bezpečnosti. Výhodou malých kloubů ruky nebo nohy je možnost injektovat některé klouby transdukovanými buňkami a jiné buňkami kontrolními. Po týdnu se oba typy kloubů operativně odstraní a nahradí umělými. Následně se porovnáním kloubů s transdukovanými a kontrolními buňkami analyzuje úspěšnost genového transferu (obr. 10, Evans et al., 2005).

Porovnání obou přístupů a jejich relativních účinků bylo propracováno na případě RA, z výsledků této studie byla hodnocena lépe druhá metoda (Gouze et al., 2003). Výhodou genového transferu IL-1RA je bezpochyby možnost kontinuálního doplňování proteinu, udržení takovéto konstantní koncentrace dostačuje pro potlačení IL-1. Dalším pozitivem je translace proteinu přímo v buňce, čímž je zajištěna potranslační modifikace ve smyslu glykosylace (Gouze et al., 2003). Na rozdíl od rekombinantní formy IL-1RA, která je do buňky vnášena už jako hotový protein a není tedy glykosylovaná, je biologický potenciál genového transferu IL-1RA větší (Gouze et al., 2003). Terapeutický efekt transgenní exprese dokonce přetrvává u synoviálních buněk až 6 měsíců, proto by se mohl stát účinným nástrojem k léčbě chronické fáze nemoci. U použitého králičího modelu neměla distribuce rekombinantního proteinu žádný účinek, na rozdíl od proteinu vzniklého genovým transferem, jehož bezpečnost byla navíc prokázána u lidských pacientů (Evans et al., 1996).

Na druhé straně ale existují studie potvrzující velmi pozitivní vliv Anakinry na průběh jiných zánětlivých onemocnění. Tímto onemocněním je Muckle-Wells syndrom (MWS), autoimunitní syndrom s autosomálně dominantní dědičností (Hull et al., 2003). MWS je asociován s mutací genu CIAS1. Jeho produktem je cryopyrin – receptor z Nod receptorové rodiny. Tato mutace způsobuje spontánní tvorbu cryopyrinového inflasomu, který reguluje, respektive zvyšuje tvorbu IL-1 β (Hoffman et al., 2003). Anakinra samozřejmě u tohoto syndromu potlačuje efekty vyvolané IL-1 β (Yamakazi et al., 2008). U MWS bylo pozorováno významné a dlouhotrvající klinické zlepšení po podávání Anakinry, což např. u pacientů s RA není typické a použití preparátu u nich má někdy kontroverzní výsledky (Yamakazi et al., 2008).

	4. 10. 2006 8:50	4. 10. 2006 10:50
CD3 ⁺	62.1%	74%
CD19 ⁺	14.9%	14.9%
CD3 ⁺ IL-1RA ⁺	50.9%	3.89%
CD19 ⁺ IL-1RA ⁺	47.3%	10.7%
CD14 ⁺ IL-1RA ⁺	9.43%	0.69%

Obr. 11: Tabulka procentuálního zastoupení B a T lymfocytů a makrofágů IL-1RA pozitivních u pacientů s MWS po podání Anakinry (nepublikováno)

V naší laboratoři byly měřeny hodnoty procentuálního zastoupení u CD19⁺ B lymfocytů, CD3⁺ T lymfocytů a CD14⁺ monocytů/makrofágů MWS pacienta po podání Anakinry. Z tabulky 11 jasně vyplývá, že frekvence výskytu buněk s intracelulární zásobárnou sIL-1RA byla signifikantně snížena, a to již po dvou hodinách od aplikace.

Nejnovějšími výzkumné projekty navazující na Anakinru a jiné rekombinantní proteiny přicházejí se strategií inhibice vazby IL-1 k IL-1RI pomoci malého peptidu namísto celého proteinu (Quiniou et al., 2008). Touto vědeckou skupinou bylo vytvořeno 15 takovýchto malých proteinů odvozených ze skruktury IL-1RacP s předpokládanou možností vazby na IL-1RI. Nejvíce prostudován byl zatím jeden z nich nazvaný 101.10 (Quiniou et al., 2008). Tento malý peptid 101.10 se neváže na IL-1RI deficientní myší buňky a stejně tak se jeho funkce nemůže projevit in vivo u IL-1RI knock-outovaných myší. U tohoto peptidu byl v rámci ovlivnění blokování IL-1RI signalizačních drah objeven i jistý polymorfismus, jakási funkční selektivita, toho na které dráhy spojené s tímto receptorem působí. Rozvoj těchto studií by mohl napomoci vyvinout technicky méně náročnou syntézu uměle připravených inhibitorů IL-1.

Závěr

V oblasti vývoje protirevmatoidních léčiv dochází neustále ke hledání a vývoji účinnějších a k pacientům šetrnějších léčebných postupů a terapeutik. Jedním z nich je rekombinantní IL-1RA fungující jako přirozený modulátor rovnováhy mezi prozánětlivým IL-1 a protizánětlivým IL-1RA.

V našich pilotních experimentech s periferní krví zdravých kontrol a pacientů s RA jsme prokázali přítomnost B a T lymfocytů produkujících IL-1RA, a to ve frekvencích srovnatelných s typickými producenty IL-1RA, tj. makrofágy.

Rekombinantní IL-1RA (tzv. Anakinra) je dnes široce využívaným alternativním lékem především u pacientů s pokročilým nebo závažným průběhem nemoci. Avšak jeho použití má různé účinky a zatímco u RA není jeho efekt stoprocentní, u chorob, jako je MWS, je zlepšení zcela prokazatelné a navíc dlouho přetrvává. U jednoho pacienta jsme již po dvou hodinách od aplikace léku prokázali významný úbytek B a T lymfocytů spolu s makrofágy/monocyty s intracelulární zásobárnou IL-1RA.

Jedním z cílů výzkumu je tedy zjistit a porovnat expresní spektrum jednotlivých izoform IL-1RA v B a T lymfocytech u zdravého dárce a posléze u pacientů, např. s MWS nebo RA, a to na úrovni mRNA a také proteinu.

Pro tento účel byly během bakalářské práce přesně popsány jednotlivé mRNA izoformy IL-1RA a v nich přesně identifikovány úseky a primery, jež budou sloužit při specifické detekci a analýze expresního spektra jednotlivých mRNA izoform ve výše uvedených buňkách pomocí RT-PCR a následné PCR. Jako alternativní přístup detekce mRNA izoform budou zjištěné úseky odlišující jednotlivé mRNA izoformy IL-1RA sloužit jako sondy použitelné pro analýzu pomocí Northern blotingu.

Z dlouhodobého hlediska by konečným výstupem měla být produkce jednotlivých IL-1RA izoform ve formě proteinů. Následná imunizace myší by měla vést ke tvorbě specifických monoklonálních protilátek umožňujících rozpoznání izoform IL-1RA dovolujících studium přesné lokalizace IL-1RA proteinů v B a T lymfocytech, zjištění případných rozdílů mezi buňkami kontrol a pacientů s autoimunitními/zánětlivými nemocemi a role intracelulárních IL-1RA forem v udržování IL-1/ IL-1RA rovnováhy. Výše uvedené plánované výzkumné činnosti budou tématem mé navazující diplomové práce.

Seznam použité literatury

- Andus T, Daig R, Vogl D, Aschenbrenner E, Lock G, Hollerbach S, Köllinger M, Schölmerich J, Gross V: Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa – association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor agonist genotype 2, *Gut*, 1997, 41, 651-657
- Arend WP, Guthridge CJ: Biological role interleukin 1 receptor antagonist isoforms, *Ann Rheum Dis*, 2000, 59, i60-i64
- Arend WP: The balance between IL-1 and IL-1RA in disease. *Cytok Growth Factor*, 2002, 13, 323-340
- Auron PE, Webb AC: Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels, *Eur Cytok Netw*, 1994, 5, 573-592
- Banda NK, Guthridge C, Sheppard D, Cairns KS, Muggli M, Bech-Otschir D, Dubiel W, Arend WP: Intracellular IL- receptor antagonist type 1 Inhibits IL-1-induced cytokine production in keratinocytes through binding to the third component of the COP9 signalosome, *J Immunol*, 2005, 174, 3608-3616
- Bendele AM, Chlipala ES, Scherrer J, Frazier J, Sennello G, Rich WJ, Edwards CK: Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors interleukin-1 receptor antagonist and PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis, *Arth Rheum*, 2000, 12, 2648-2659
- Carter DB, Deibel MRJr, Dunn CJ: Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein, *Nature*, 1990, 344, 633-638
- Clay FE, Tarlow JK, Cork MJ, Cox A, Nickli MJH, Duff GV: Novel interleukin-1 receptor antagonist exon polymorphisms and their use in allele-specific mRNA assessment, *Hum Genet*, 1996, 97, 723-726
- Cullinan EB, Kwee I, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW, Chizzonite RA, Labow MA: IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor, *J Immunol* 1998, 161, 5614-5620
- de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YPM, Wesoly J, Hulsmans HJ, Craen AJM, Breedveld FC, Dijkmans BAC, Allaart CF, Huizinga TWJ: Ex vivo interleukin 1 receptor antagonist production on lipopolysaccharide stimulation is

- associated with rheumatoid arthritis and with joint damage, *Ann Rheum Dis*, 2007, 66, 1033-1037
- Deleuran By BW, Chu CQ, Field M, Brennan FM, Katsikis P, Feldmann M, Maini RN: Localization of Interleukin-1 α , type 1 Interleukin-1 receptor and Interleukin-1 receptor antagonist in the synovial membrane and cartilage/pannus junction in rheumatoid arthritis, *Br J Rheumatol*, 1992, 31, 801-809
- Dewberry RM, Crossman DC, Francis SE: Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) genotype modulates the replicative capacity of human endothelial cells, *Circulation Res*, 2003, 92, 1285-1287
- Duff GW, edited by JJ Oppenheim, JL Rossio, AJH Gearing: Cytokines and rheumatoid arthritis, clinical application of cytokines, Oxford Univers Press, 1993
- Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Capper, Duff GW: Plasma levels of interleukin 1 alpha in rheumatoid arthritis, *Br J Rheumatol* 1991, 30, 295-297
- Evans RJ, Bray J, Childs JD: Mapping receptor binding sites in IL-1 receptor antagonist and IL-1 β by site-directed mutagenesis: identification of a single site in IL-1R α and two sites in IL-1 β , *J Biol Chem*, 1994a, 270, 11477-11483
- Evans CH, Robbins PD: The interleukin-1 receptor antagonist and its delivery by gene transfer, *Receptor*, 1994b, 4, 9-15
- Evans, RJ, Bray J, Childs JD, Vigers GPA, Brandhuber BJ, Skalicky JJ, Thompson RC, Eisenberg SP: Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1b by site-directed mutagenesis: identification of a single site in IL-1Ra and two sites in IL-1b, *J Biol Chem*, 1995, 270, 11477
- Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Herndon JH, Kang R, Bahnson AB, Barranger JA, Elders EM, Gay S, Tomaino MM, Wasko MC, Watkins SC, Whiteside TL, Glorioso JC, Lotze MT, Wright TM: Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis, *Hum Gene Ther*, 1996, 7, 1261-1280
- Evans ChH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Wasko MCh, Tomaino MM, Kang R, Muzzonigro TA, Vogt M, Elder ME, Whiteside TE, WatkinsSC, Herndon JH: Gene transfer to human joints: Progress toward a gene therapy of arthritis, *PNAS*, 2005, 24, 8698–8703

- Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP: Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein, *J Clin Invest*, 1997a, 99, 2930-2940
- Gabay C, Porter B, Fantuzzi G, Arend WP: Mouse IL-1 receptor antagonist isoforms: complementary DNA cloning and protein expression of intracellular isoform and tissue distribution of secreted and intracellular IL-1 receptor antagonist in vivo, *J Immunol*, 1997b, 159, 5905-5913
- Garat C, Arend WP: Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways, 2003, 23, 31-40
- Garrone P, Djossou O, Fossiez F, Reyes J, Ait-Yahia S, Maat C, Ho S, Hauser T, Dayer J-M, Greffe J, Miossec P, Lebecque S, Rousset F, Banchereau J: Generation and characterization of a human monoclonal autoantibody that acts as a high affinity Interleukin-1 α specific inhibitor, *Mol Immunol*, 1996, 7/8, 649-658
- Genant HK: Interleukin-1 receptor antagonist treatment of Rheumatoid arthritis patients: radiologic progression and correlation of Genant/Sharp and Larsen scoring methods, *Semin Arth & Rheum*, 2001, 5, 26-32
- Gouze J-N, Gouze E, Palmer GD, Liew VS, Pascher A, Betz OB, Thornhill TS, Evans ChH, Grodzinsky AJ, Ghivizzani SC: A comparative study of the inhibitory effect of interleukin-1 receptor antagonist following administration as a recombinant protein or by gene transfer, *Arthr res Ther*, 2003, 5, 301-309
- Granowitz EV, Porat R, Mier JW, Pribble JP, Stiles DM, Bloedow DC, Catalano MA, Wolff SM, Dinarello CA: Pharmacokinetics, safety and immunomodulatory effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in healthy humans, *Cytok*, 1992, 5, 353-360
- Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G: Molecular cloning and characterization of a second subunit of interleukin 1 receptor complex, *J Biol Chem*, 1995, 23, 13757-13765
- Grundtman C, Salomonsson S, Dorph Ch, Bruton J, Andersson U, Lundberg IE: Immunolocalization of Interleukin-1 receptor in the sarcolemma and nuclei of skeletal muscle in patients with idiopathic inflammatory myopathies, *Arth & Rheum*, 2007, 2, 674-687

- Haskill S, Martin G, Van Le L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S, Arend WP, Ralph P: cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 3681-3685
- Hawkins PN, Lachmann HJ, Aganna E, McDermott M: Spectrum of clinical in Muckle-Wells syndrome and response to Anakinra, *Arth & Rheum*, 2004, 2, 607-612
- Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D: Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 11008-11013
- Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD: Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome, *Nat Genet* 2001, 29, 301-305
- Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A: Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice, *J Exp Medicine* 2000, 191, 303-311
- Hulkkonen J, Laippala P, Hurme M: A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals, *Eur Cytok New*, 2000, 11, 251-255
- Hull KM, Shoham N, Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL: The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations. *Curr Opin Rheum*, 2003, 15, 61-69
- Chou C-T, Timms AE, Wei JCC, Tsai WC, Wordsworth BP, Brown MA: Replication of association of IL 1 gene complex members with ankylosing spondylitis in Taiwanese Chinese, *Ann Rheum Dis*, 2006, 65, 1106-1109
- Church LD, Cook GP, McDermott MF: Primer: inflammasomes and interleukin 1 β in inflammatory disorders, *Nature Clin Pract Rheum*, 2008, 1, 35-42
- Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Vermudo Ch, Rohner-Jeanrenaud F, Burger D, Dayer JM, Meier ChA: Adipose tissue is a major source of Interleukin-1 receptor antagonist, *Diabetes*, 2003, 52, 1104-1110
- Kanangat S, Postlethwaite AE, Higgins GC, Hasty KA: Novel functions of intracellular IL-1ra in human dermal fibroblasts: implications in the pathogenesis of fibrosis, *J Investig Derm*, 2006, 126, 756-765

- Khan JA, Brint EK, O'Neill LAJ, Tong L: Crystal Structure of the Toll/Interleukin-1 Receptor Domain of Human IL-1RAPL, *J Biol Chem*, 2004, 279, 31664-31670
- Liou L-B: Serum and in vitro production of IL-1 receptor antagonist correlate with C-reactive protein levels in newly diagnosed, untreated lupus patients, *Clin Exp Rheum*, 2001, 19, 515-523
- Ma T, Miyanishi K, Trindade MCD, Genovese M, Regula D, Smith RL, Goodman SB: Interleukin 1 receptor antagonist inhibits localized bone formation in vivo, *J Rheum*, 2003, 30, 2547-52
- Malyak M, Smith MF, Jr, Abel AA, Hance KR, Arend WP: The differential production of tree forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes, *J Immunol*, 1998a, 161, 2004-2010
- Maylak M, Guthridge JM, Hance KR: Characterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist, *J Immunol*, 1998b, 161, 1997-2003
- Matsuki T, Nakae S, Sudo K, Horai R, Iwakura Y: Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Inter Immunol*, 2006, 2, 399-407
- McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, Copeland NG, Huebner K, Croce CM, Cannizzarro LA, Benjamin D, Dower SK, Spriggs MK, Sims JE: A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types, *EMBO J*, 1991, 10, 2821-2832
- Merhi-Soussi F, Berti M, Wehrle-Haller B, Gabay C: Intracellular interleukin-1 receptor antagonist type 1 antagonizes the stimulatory effect of interleukin-1 α precursor on cell motility, *Elsevier, Cytok*, 2005, 1-8
- Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Höhlig K, Sieper J, Müller B: Association of genotypes affecting the expression of Interleukin-1 β or Interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis, *Arth & Rheum*, 2000, 11, 2417-2422
- Nicklin MJH, Weith A, Duff GW: A physical map of the region encompassing the human interleukin-1a, interleukin-1b and interleukin-1 receptor antagonist genes, *Genomics* 1994, 19, 382-384

- Perrier S, Coussediere C, Dubost JJ, Albuissou E, Sauvezie B: IL-1 Receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphism in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis, *Clin Immunol Immunopat*, 1998, 3, 309-313
- Quiniou C, Sapieha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, Leduc M, Rihakova L, Joyal JS, Nadeau S, Heveker N, Lubell W, Sennlaub F, Gobeil F Jr, Miller G, Pshezhetsky AV, Chemtob S: Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor, *J Immunol*, 2008, 180, 6977-6987
- Redlich K, Schett G, Steiner G, Hayer S, Wagner EF: Rheumatoid arthritis therapy after tumor necrosis factor and Interleukin-1 blockade, *Arth Rheum*, 2003, 12, 3308-3319
- Redlitz KH, Yamshchikov VF, Cominelli F: Differential contribution of IL-1Ra isoforms to allele-specific IL-1Ra mRNA accumulation, *J Interferon Cytok Res*, 2004, 24, 253-60
- Růžičková Š, Šenolt L, Gatterová J, Vencovský J, Pavelka K: The lack of correlation between the increased frequency of allele IL-1RN*2 of Interleukin-1 Receptor antagonist gene in Czech patients with knee osteoarthritis and the markers of cartilage degradation, *Folia Biologica*, 2008, 54, 115-120
- Santilla S, Savinainen K, Hurme M: Presence of the IL-1RA allele 2 (IL-1RN*2) is associated with enhanced IL-1 beta production in vitro, *Scand J Immunol*, 1994, 47, 195-198
- Semana G, Yaouanq J, Alizadeh M, Clanet M, Edan G: Interleukin-1 receptor antagonist gene in multiple sclerosis, *The Lancet*, 1997, 349, 476
- Schiff MH: Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis*, 2000, 59, 103-108
- Smith ME Jr, Carl VS, Lodie T, Fenton MJ: Secretory interleukin-1 receptor antagonist gene expression requires both a PU.1 and a novel composite NfκB/PU.1/GA-binding protein binding site, *J Biol Chem*, 1998, 273, 24272-24279
- Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, Duff GW: Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat, *Hum Genet*, 1993, 91, 403-404

- Tarlow JK, Clay FE, Cork MJ, Blakemore AI, McDonagh AJ, Messenger AG, Duff GWJ: Severity of alopecia areata is associated with a polymorphism in interleukin-1 receptor antagonist gene, *Invest Dermatol*, 1994, 103, 387-390
- Taylor SL, Renshaw BR, Garka KE, Smith DE, Sims J: Genomic organization of the Interleukin-1 locus. *Genomics*, 2002, 726-733
- Vamvakopoulos J, Green C, Metcalfe S: Genetic control of IL-1B bioactivity through differential regulation of the IL-1 receptor antagonist, *Eur. J Immunol*, 2002, 32, 2988-2996
- Vencovský J, Jarošová K, Růžičková S, Němcová D, Niederlová J, Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Ollier WE, Mageed RA: Higher frequency of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*, 2001, 44, 2387-2391
- Watson JM, Lofquist AK, Rinehart CA, Olsen JC, Makarov SS, Kaufman DG, The intracellular IL-1 receptor antagonist alters IL-1-inducible gene expression without blocking exogenous signaling by IL-1beta, *J Immunol*, 1995, 155, 4467-4475
- Weissbach L, Tran K, Colquhoun SA, Champlaud M-F, Towle ChA: Detection of an Interleukin-1 intracellular receptor antagonist mRNA variant, *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 244, 91-95
- Yamazaki T, Masumoto J, Agematsu K, Sawai N, Kobayashi S, Shigemura T, Yasui K, Koike K: Anakinra improves sensory deafness in a Japanese patient with Muckle-Wells syndrome, possibly by inhibiting the cryopyrin inflammasome, *Arth Rheum*. 2008, 58, 864-868
- Zhou F, He X, Iwakura Y, Horai R, Stuart JM: Arthritis in mice that are deficient in Interleukin-1 receptor antagonist is dependent on genetic background, *Arth Rheum*, 2005, 12, 3731-3738

www.biocarta.com

www.hopkins-arthritis.org

www.kineretrx.com

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>