

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Výzkum signalizačních aktivit receptorů NK buněk po jejich zesíťování peptidovými dimery

**Bakalářská práce
Praha 2008**

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233218437

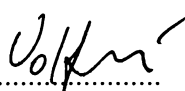
Vypracovala: Barbora Volfová
Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

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

pr.č. 113b/08 stud
(biochemie)

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

V Praze dne 6. 6. 2008

Podpis: 

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

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

OBSAH

Seznam zkratek.....	5
1. Úvod.....	6
1.1 Imunitní systém.....	6
1.2 Složky imunitního systému.....	6
1.2.1 Orgány imunitního systému.....	6
1.2.2 Buňky imunitního systému.....	7
1.2.3 Molekuly imunitního systému.....	9
1.3 Povrchové molekuly buněk imunitního systému.....	10
1.3.1 Adhezivní molekuly.....	10
1.3.2 Receptory buněk imunitního systému.....	10
1.3.2.1 Receptory fagocytů.....	10
1.3.2.2 Receptory B lymfocytů.....	11
1.3.2.3 Receptory T lymfocytů.....	11
1.3.2.4 Receptory NK buňek.....	11
1.4 C-lektiny.....	13
1.5 Molekula CD69.....	13
1.6 Hsp65 chaperonin z <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
2. Cíle práce.....	17
3. Experimentální část.....	18
3.1 Seznam použitých materiálů, přístrojů a zařízení.....	18
3.1.1 Přístroje a zařízení.....	18
3.1.2 Chemikálie.....	18
3.2 Precipitační experimenty.....	19
3.3 Inhibice precipitace CD69 proteinu monovalentními peptidy.....	20
3.4 Měření buněčné signalizace na základě produkce inositolfosfátů.....	21
4. Výsledky.....	23
4.1 Precipitace rozpustného CD69 receptoru bivalentními LELTEGY peptidy.....	23
4.2 Inhibice precipitace CD69 proteinu monovalentními peptidy.....	25
4.3 Měření buněčné signalizace na základě produkce inositolfosfátů.....	26
5. Diskuse.....	28
6. Závěr.....	33
Seznam použité literatury.....	34

SEZNAM ZKRATEK

PAMPs	pathogen-associated molecular patterns – struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
T _H	pomocné T lymfocyty (helpers)
T _C	cytotoxické T lymfocyty (cytotoxic)
T _{Reg}	regulační T lymfocyty (regulatory)
NK buňky	natural killers – přirození zabijáci
APC	antigen presenting cells – buňky které na svém povrchu prezentují antigen
CTL	cytotoxic T lymphocytes – cytotoxické T lymfocyty
NKT buňky	buňky podobné jak NK buňkám tak T lymfocytům
MHC	major histocompatibility complex – hlavní histokompatibilní komplex
HLA	human leukocyte antigens – hlavní lidský histokompatibilní antigen
TLR	Toll-like receptors – receptory podobné Toll receptorům
BCR	B cell receptor – receptor pro antigen B lymfocytů
TCR	T cell receptor – receptor pro antigen T lymfocytů
CAM	cell adhesion molecule – molekula buněčné adheze
Ig	Imunoglobulin
KIR	killer inhibitor receptor – inhibiční receptor NK buněk
CRD	“carbohydrate recognition domains” – domény rozpoznávající uhlovodíky
ICAM	intracellular adhesive molecule – mezibuněčná adhezivní molekula
VCAM	vascular cell adhesion molecule – cévní adhezivní molekula
CTLDs	C-type lectin like domains
MBP	mannose binding protein – protein vázající manózu
Hsp	heat shock protein – protein tepelného šoku
DST	Disuccinimidyl tartarate
DSG	Disuccinimidyl glutarate
DSS	Disuccinimidyl suberate
DSP	Dithiobis[succinimidylpropionate]
DSC	Di(N-succinimidyl) carbonate
DSO	Di(N-succinimidyl) oxalate

1. ÚVOD

1.1 Imunitní systém

Lidský imunitní systém je souhrn mechanismů zajišťujících integritu organismu rozeznáváním a likvidací cizích či vlastních, ale potenciálně škodlivých struktur. Projevuje se obranyschopností organismu, autotolerancí (schopnost rozpoznávat vlastní tkáň organismu a udržovat toleranci vůči nim¹) a imunitním dohledem nad vnitřními škodlivinami. Obranyschopnost se vztahuje nejen k patogenním mikroorganismům, ale také k vlastním buňkám které jsou nějakým způsobem poškozené a chovají se abnormálně. Látky které imunitní systém rozpoznává a reaguje na ně se nazývají antigeny.

Imunitní systém funguje dvěma různými mechanismy: nespecifický (neadaptivní) a antigenně specifický (adaptivní).¹ Nespecifická imunita je zajišťována molekulami (humorální složky) a buňkami, které jsou obvykle účinné proti mnoha různým patogenům zároveň. Mezi buňky nespecifické imunity patří NK buňky, humorální složky tvořící komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny.¹ Rozpustné a membránově vázané receptory neadaptivní části imunitního systému rozeznávají molekulární struktury charakteristické pro celé skupiny mikroorganismů (tzv. „pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs)². Nespecifické mechanismy působí velmi rychle a narozdíl od specifických nemají imunologickou paměť. Specifické mechanismy jsou vývojově mladší a reagují podle vysoce specifických látek pouze na určité patogenní organizmy. Patří mezi ně mechanismy humorální (založené na protilátkách) a buněčně zprostředkované (založené hlavně na T lymfocytech).¹ K úplnému rozvoji specifické imunitní reakce je zapotřebí mnohem delšího času než u nespecifických mechanismů, řádově několik dnů až týdnů.

1.2 Složky imunitního systému

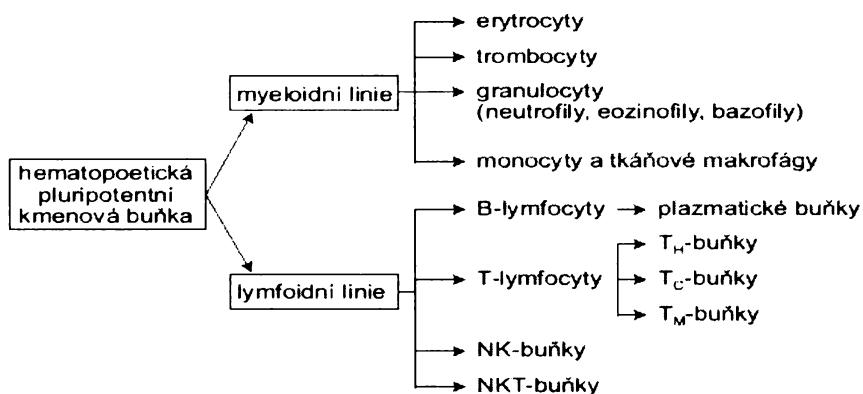
1.2.1 Orgány imunitního systému

Funkčními a anatomickými celky imunitního systému jsou lymfatické tkáň a orgány.¹ Lymfatické orgány označujeme buď jako primární, nebo sekundární. Primární orgány jsou takto označovány protože v nich dochází ke vzniku, diferenciaci a zrání buněk imunitního systému. Patří mezi ně kostní dřeň, thymus, u ptáků Fabriciova burza a

Peyerovy plaky¹. V sekundárních lymfatických orgánech a tkáních dochází k hlavním fázím antigenně specifických imunitních reakcí. Patří mezi ně lymfatické uzliny a slezina.

1.2.2 Buňky imunitního systému

Hlavními komponenty imunitního systému jsou různé druhy bílých krvinek. V kostní dřeni jakožto v primárním lymfatickém orgánu vznikají pluripotentní kmenové buňky které se pod vlivem různých faktorů diferencují na různé typy leukocytů. Nejprve se ovšem diferencují na myeloidní a lymfoidní prekurzory, které jsou základními buňkami myeloidní a lymfoidní linie (Obr.1). V myeloidní linii vznikají monocyty které se později diferencují na makrofágy a dendritické buňky , dále tři druhy granulocytů – neutrofilů, eozinofilů a bazofilů¹, nebo také megakaryocyt, ze kterého vznikají trombocyty a erytroblast ze kterého vznikají erytrocyty (Obr.1). Do této linie také patří žírné buňky, neboli mastocyty, které jsou formou bazofilů vyskytujících se v tkáních. Většina buněk myeloidní linie plní funkci fagocytů, mají schopnost pohlcovat mikroorganismy, nebo vlastní buňky přestárlé, poškozené a jejich zbytky.



Obr.1: Přehled buněk imunitního systému³

Granulocyty se dělí na neutrofilů, eozinofilů a bazofilů na základě různé buněčné morfologie a různého množství, barvy a tvaru cytoplazmatických granulí.⁴ Neutrofilů a eozinofilů mají funkci fagocytů, bazofilů hrají důležitou roli v alergických odpovědích. Nejvíce je neutrofilů (50-70%), méně je eozinofilů (1-3%) a bazofilů (<1%).⁴

Z lymfoidního prekurzoru se diferencují B, T lymfocyty a NK buňky (Obr.1).

B lymfocyty, jejichž název je odvozen od místa dozrávání těchto buněk u ptáků – Fabriciovy burzy, v lidském organismu dozrávají v kostní dřeni. Jejich vývoj se dokončuje až po setkání s antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech. Konečným

diferenčním stádiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky (plazmocyty).¹ Plazmatické buňky se z B lymfocytů stávají po setkání s antigenem a jejich hlavní funkcí je produkce velkého množství protilátek, které se dostávají do krve a tím do celého lidského organismu. B lymfocyty se po setkání s antigenem také mohou přeměnit na paměťové B lymfocyty, které mají mnohem delší život a na svém povrchu exprimují stejné protilátky, jako jejich mateřské B lymfocyty.⁴ Tyto buňky zprostředkovávají takzvanou imunologickou paměť organismu.

Název T lymfocytů je opět odvozen od místa jejich maturace, thymu (brzlíku). Již v brzlíku se T lymfocyty diferencují na T pomocné buňky T_H (helpers) a T cytotoxické buňky T_C (cytotoxic). V poslední době byly také objeveny takzvané T regulační buňky T_{Reg} (regulatory).⁴ Nezralé T_H buňky dozrávají po setkání s antigenem na povrchu vhodných antigen prezentujících buněk – APC (antigen presenting cells).¹ T_H buňky jsou pomocné buňky které díky produkci cytokinů napomáhají správné funkci ostatních lymfocytů, podporují B lymfocyty k tvorbě protilátek a zvyšují účinnost T_C lymfocytů. Dále napomáhají aktivaci makrofágů a ostatních buněk, které se podílejí na imunitní reakci organismu.⁴ Těmito T_H buňkám se říká efektorové, také však mohou vznikat takzvané paměťové T_H buňky, které jsou součástí imunologické paměti organismu. T_C buňky jsou buňky, které cytotoxicky zabíjejí buňky napadené mikroorganismy, nebo poškozené. Po setkání s APC se z T_C lymfocytů stávají CTL (cytotoxic T lymphocyte) nebo opět paměťové buňky. T_{Reg} buňky potlačují imunitní odpověď, jsou to negativní regulátoři imunitního systému.⁴

NK buňky jsou morfologicky velké granulární lymfocyty, které spíše patří do nespecifické imunity protože nemají antigenně specifické receptory. Podobně jako T_C lymfocyty napadají buňky mikroorganismů nebo poškozené buňky těla a hlavně buňky, které se naučily maskovat před T_C lymfocyty snížením exprese MHC glykoproteinů. Zahrnují až 15% periferních krevních lymfocytů, a vyskytují se také v periferních tkáních, včetně jater, perorální dutiny a placenty.⁵ Receptory které používají NK buňky k přichycení k cílovým buňkám jsou transmembránové lectin-like receptory. Většina těchto receptorů jsou membránové proteiny typu II s C-lectinovým motivem, který prioritně váže MHC-I antigeny (více odstavec 1.3.2.4).

Hlavními cytotoxickými nástroji T_C lymfocytů a NK buněk jsou cytotoxické granule obsahující perforin a granzymy.¹

Mezi buňky lymfoidní linie také patří NKT buňky, které na svém povrchu mají molekuly vlastní jak T lymfocytům, tak NK buňkám.

1.2.3 Molekuly imunitního systému

Mezi jedny z významných molekul důležitých pro funkci imunitního systému, patří MHC glykoproteiny. Můžeme je rozdělit podle funkce na MHC glykoproteiny I. třídy a MHC glykoproteiny II. třídy. MHC glykoproteiny I. třídy jsou přítomny na všech buňkách organismu, které mají jádro.⁴ Jejich hlavní funkcí je vázat peptidové fragmenty proteinů produkovaných buňkou na jejím povrchu. MHC glykoproteiny II. třídy jsou přítomné pouze na ACP čili buňkách prezentujících antigen a jejich hlavní funkcí je vázat peptidové fragmenty proteinů pohlcených buňkou.¹ Podle těchto molekul T_C lymfocyty rozpoznávají buňky škodlivé a zabíjejí je. Pokud buňka na svém povrchu nemá MHC molekuly, T_C lymfocyty nejsou schopny ji identifikovat. NK buňky působí na základě toho, že všechny jaderné buňky organismu MHC molekuly mají. Působí cytotoxicky na buňky které MHC glykoprotein na svém povrchu nemají. Buňky bez jader jako například červené krvinky se před NK buňkami chrání nedostatkem adhezivních molekul. Lidské MHC glykoproteiny se označují jako HLA (human leukocyte antigens).¹

Další významné molekuly imunitního systému jsou imunoglobuliny. Jsou to molekuly protilátek, které jsou sekretovány konečným stádiem B lymfocytů, plazmatickými buňkami. Skládají se ze dvou identických lehkých (L) řetězců a dvou identických těžkých (H) řetězců, které dohromady tvoří tetramer (L₂H₂) spojený disulfidickými můstky ve tvaru písmene Y.⁶ Na N koncích se nacházejí variabilní domény které zajišťují specifitu vazby protilátky na antigen. Pokud jsou vázány v membránách, potom C konce jsou situovány dovnitř buňky. V lidském organismu bylo nalezeno 5 různých typů těžkých (H) řetězců. Podle toho dělíme imunoglobuliny do pěti různých tříd: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE.⁶

Základní regulátory imunitního systému jsou cytokiny. Jsou to proteiny sekretované leukocyty a jinými buňkami, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj.¹

Dalšími molekulami imunitního systému jsou antigenně specifické receptory na povrchu T a B lymfocytů (více odstavce 1.3.2), adhezivní molekuly (viz. 1.3.1), Fc receptory, kostimulační molekuly, „nespecifické“ receptory složek mikrobiálních povrchů a složky komplementového systému.¹

1.3 Povrchové molekuly buněk imunitního systému

1.3.1 Adhezivní molekuly

Většinu adhezivních molekul (CAM) můžeme zařadit do čtyř hlavních skupin: Kadheriny, Imunoglobulinová (Ig) superrodina, Integriny a Selektiny.⁷ Velká část dějů imunitního systému je založená na adhezivních molekulách. Jejich funkcí je přichytit buňku na jinou pomocí adhezivních molekul obou buněk. Jedná se o interakci ligandu s receptorem kde je ovšem těžké určit která molekula je ligand a která receptor. Většina adhezivních molekul má také funkci přenašeče signálu do buňky. Informují buňku o tom že došlo k adhezi a že je potřeba na ni reagovat.¹

Integriny patří do třídy membránových glykoproteinů které se skládají ze dvou podjednotek α a β . Tyto molekuly nejsou důležité pouze pro funkci imunitního systému ale například váží komponenty mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix).¹

Kadheriny patří do třídy glykoproteinů zapojených v Ca^{2+} dependentním mechanismu adhezivních interakcí.⁹ Podle různé imunologické specifikace a rozložení v tkáních se dělí do 3 skupin: E-, N- a P-kadheriny.

Do imunoglobulinové skupiny patří proteiny, u, kterých se alespoň jedna nebo více extracelulárních domén podobá charakteristickým imunoglobulinovým doménám. Mezi nejvýznamnější z nich patří ligandy leukocytárních integrinů molekuly ICAM-1,-2,-3, VCAM-1 a další.

Selektiny se podle místa výskytu dělí na 3 skupiny. Jsou to buď leukocytární L-selektiny, endoteliální E-selektiny nebo trombocytární (platelet) P-selektiny. Na rozdíl od jiných adhezivních molekul, které váží různé proteiny, selektiny se váží na sacharidy. Skládají se z dlouhého flexibilního „stonku“ na jehož konci je lektinová doména.

1.3.2 Receptory buněk imunitního systému

1.3.2.1 Receptory fagocytů

Mezi nejdůležitější povrchové receptory fagocytů patří tzv. Toll-like receptors (TLR). Jejich název je odvozen od receptoru Toll popsáného poprvé u mušky octomilky (*Drosophila*).² Díky nim mohou fagocyty sami přímo rozeznávat mikroorganismy. Navázání příslušných ligandů na receptory TLR vyvolá signalizační procesy, které nakonec vedou k aktivaci fagocytů a sekreci cytokinů a jiných látek vyvolávajících

zánětlivé reakce.² Další důležité receptory fagocytů se nazývají Fc receptory. Tyto receptory rozpoznávají protilátky vázané na mikroorganismy.¹

1.3.2.2 Receptory B lymfocytů

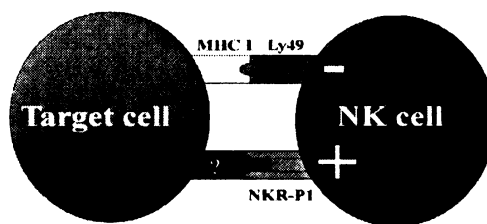
Antigenně specifické receptory B lymfocytů jsou povrchové imunoglobuliny (BCR). Strukturně jsou stejné jako sekretované volné imunoglobuliny. Pomocí specifického úseku 20 hydrofóbních aminokyselin v C terminální části jsou zakotveny v membráně¹, tak že N terminální část je situovaná extracelulárně. Povrchové imunoglobuliny mají v membráně asociované signalizační molekuly, které po navázání imunoglobulinu na antigen spouští v buňce složité signalizační kaskády. V membráně B lymfocytů se též nachází povrchový receptor komplementu CR2 (CD21), který může výrazně zesílit signál vycházející z imunoglobulinu. Nejčastěji jsou povrchovými imunoglobuliny třídy IgM a IgD.¹

1.3.2.3 Receptory T lymfocytů

Antigenně specifické receptory T lymfocytů jsou tzv. T-receptory (TCR). Tyto receptory jsou schopné rozpoznat pouze komplex MHC glykoproteinu s peptidovým fragmentem antigenu.¹ TCR receptory se skládají ze dvou komplexů, z komplexu, který rozpoznává antigen a z komplexu, který předává signály do buňky (CD3 komplex). Extracelulární část, tzn. komplex, který rozpoznává antigen je strukturně podobný imunoglobulinům. T lymfocyty mají ještě další pomocné receptory které jsou specifické pro T_C a T_H buňky. Tyto receptory pomáhají TCR receptorům vázat se na MHC glykoproteiny I. či II. třídy. T_C buňky mají na svém povrchu CD8 receptor, který napomáhá vazbě komplexů obsahujících MHC glykoproteiny I. třídy a T_H buňky mají na svém povrchu receptor CD4, který pomáhá vázat komplexy obsahující MHC glykoproteiny II. třídy.

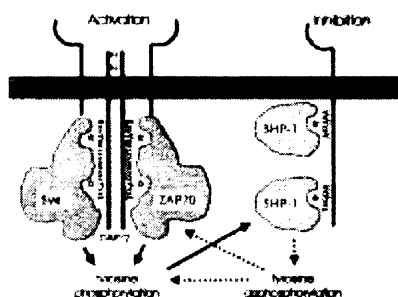
1.3.2.4 Receptory NK buněk

NK buňky mají na svém povrchu dva typy receptorů, a to receptory aktivační (pozitivní) a receptory inhibiční (negativní) (Obr. 2). Funkce NK buněk je regulována rovnováhou mezi signály přenesenými aktivačními receptory, které poznají ligandy na nádorových a virově nakažených buňkách, a inhibičními receptory specifickými pro molekuly MHC třídy I.⁵



Obr.2: Aktivační a inhibiční receptory NK buněk¹⁰

Extracelulární struktury obou těchto receptorů jsou velmi podobné, naopak intracelulární jsou dosti odlišné (Obr. 3)¹¹. Inhibiční receptory váží právě MHC glykoprotein I. Pokud je ho na příslušné buňce málo, je inhibiční signál příliš slabý a aktivační receptory vyvolávají destrukční reakce vedoucí k likvidaci abnormální buňky. Aktivační receptory rozeznávají většinou tzv. neklasické MHC molekuly, ale i některé jiné struktury² a aktivují buňku a její cytotoxické mechanismy.



Obr.3: Struktura aktivačních a inhibičních receptorů NK buněk¹¹

Většina inhibičních receptorů NK buněk patří buď do imunoglobulinové Ig superrodiny, nebo do C-lektinů.¹¹ Inhibiční receptory imunoglobulinové Ig superrodiny se v lidském organismu nazývají KIR (killer inhibitor receptors). Extracelulární části molekul C-lektinové superrodiny (více viz kapitola 1.4) se nazývají “carbohydrate recognition domains” (CRD).¹¹

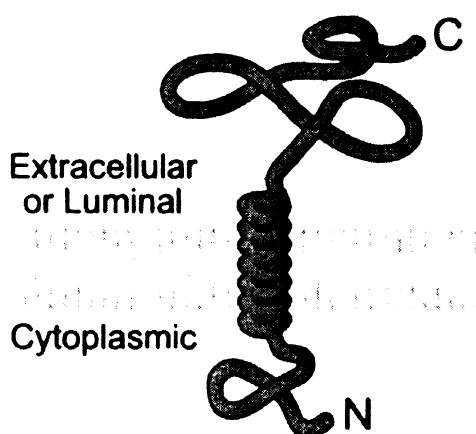
1.4 C-lektiny

Další molekuly lektinového typu (podobně jako selektiny), tzn. proteiny obsahující jednu nebo více lektinových domén se nazývají lektiny C-typu, podle toho, že

jejich vazebná aktivita je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Lektiny jsou proteiny, které jsou charakteristické tím, že specificky vážou cukry. Mnoho druhů zvířecích lektinů zajišťuje jak rozpoznání patogenu, tak vzájemnou interakci mezi buňkami za použití domény rozpoznávající uhlovodíky která je závislá na Ca^{2+} iontech (C - type CRDs). Rozpoznání patogenu je provedeno vázáním terminálních monosacharidových zbytků charakteristických pro povrchy bakterií a buněk hub.¹² Široká selektivita monosacharid-vazacího místa a geometrické uspořádání mnohonásobných CRDs v lektinech vysvětluje schopnost proteinů rozlišovat vazbu mezi vlastními a cizími receptory. Další proteiny, obzvláště receptory na povrchu NK buněk, obsahují domény podobné C-lektinům (CTLDS) které jsou evoluční odlišné od C-lektinů. CTLDS se spojují mezi sebou skrz několik různých povrchů a tvoří dimery a trimery, čímž je ligand-vazací místo různě orientováno.¹³

1.5 Molekula CD69

Molekula CD69, také známá jako molekula indukující aktivaci, časný aktivační antigen, MLR-3 a Leu-23, je členem rodiny genového komplexu NK buněk. CD69 je transmembránový glykoprotein typu II¹⁴ (obr. 4) s N-terminálními 40 aminokyselinami v cytoplazmě, transmembránovou doménou z 21 aminokyselin, a C-terminalními 138 aminokyselinami jako extracelulární doménou.¹⁵ Tato molekula společně s dalším receptorem NK buněk NKR-P1 patří do zvláštní oddělené skupiny C-lektinů, skupiny V.

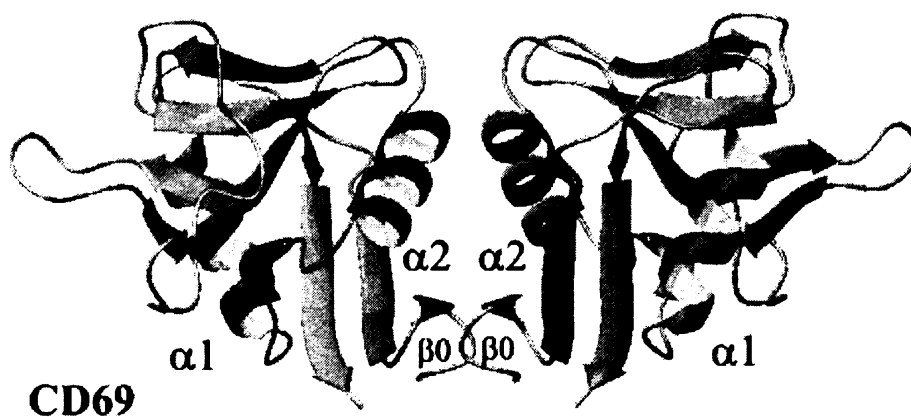


Obr. 4: transmembránový glykoprotein typ II¹⁶

Molekula CD69 je inducibilně exprimována na zrajících T lymfocytech a dále pak na nezralých thymocytech, B lymfocytech, NK buňkách, monocytech, neutrofilech a eozinofilech.¹⁷ Struktura, chromozomální lokalizace a funkce CD69 ukazuje, že je to pravděpodobný pleiotropický imunní regulátor, potenciálně důležitý nejen ve funkci NK buněk ale také v aktivaci a diferenciaci široké škály hematopoietických buněk.¹⁷ Tato molekula má také za úkol přenášet signál do buňky a účastní se proliferace lymfocytů.

Studium genomové struktury lidského genu kódujícího CD69 ukázalo, že kódující sekvence je rozdělená do pěti exonů oddělených čtyřmi introny. První dva exony odpovídají odděleným funkčním doménám proteinu (cytoplazmatický ocas a transmembránový region), zatímco koncové tři exony kódují takzvanou carbohydrate-recognition domain (CRD) - doménu rozpoznávající uhlovodík.¹⁸

Protein, který existuje jako disulfidovými můstky spojený homodimer na buněčném povrchu, krystaluje jako souměrný dimer, podobný těm utvářeným příbuznými NK buněčnými receptory Ly49A a CD94 (Obr. 5). Struktura odhaluje zachování C - type lectin-like rýhy, včetně zachování dvou R-helikálních regionů nalezených v Ly49A a manózu vázajícím proteinu (MBP). Avšak, jen jeden z devíti zbytkových koordinovaných Ca^{2+} v MBP je zachován v CD69 a žádný vázaný Ca^{2+} není evidentní v krystalové struktuře.¹⁹



Obr. 5.: Model dimerního receptoru CD69. Sekundární prvky struktury spojené s dimerovou formací jsou označeny.¹⁹

1.6 Hsp65 chaperonin z *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis exprimuje dva chaperoniny homologní s ostatními členy rodiny proteinů HSP60. Jako první byl objeven díky své schopnosti stimulovat imunitní systém **Cpn60-2**, v literatuře nejčastěji označovaný jako Hsp65 nebo 65-kDa antigen. Spolu s 10-kDa proteinem Cpn10 patří mezi nejvíce imunoreaktivní proteiny *M. tuberculosis*²⁰. Druhý homolog HSP60 označovaný **Cpn60-1** byl odhalen nejprve na úrovni DNA během sekvenování genomu *M. tuberculosis* a posléze objeven i v lyzátu této bakterie. Aminokyselinové sekvence Cpn60-1 a Hsp65 z *M. tuberculosis* vykazují 61 % sekvenční shodnost a 76 % sekvenční podobnost, liší se podstatně pouze v C-koncové části, kde Cpn60-1 obsahuje sekvenci bohatou na histidin, zatímco Hsp65 obsahuje sekvenci typickou i pro ostatní chaperoniny bohatou na methionin a glycin. Oba mykobakteriální chaperoniny Cpn60 jsou exprimovány konstitutivně. Po tepelném šoku, fagocytose makrofágy nebo vystavením jiné formě stresu dojde k jejich zvýšené expresi, tyto proteiny pak tvoří 1 až 10 % všech proteinů lyzátu .

Při své práci na biochemické charakterizaci chaperoninů Cpn60-1 a Hsp65 z *M. tuberculosis* došli Qamra a kol.²¹ k závěru, že se tyto proteiny vyskytují ve formě **dimeru** *in vitro* i *in vivo*, na rozdíl od ostatních známých chaperoninů rodiny HSP60. Schopnost napomáhat skládání proteinů je spojována s tetradekamerní strukturou chaperoninů, spoluprací s ko-chaperoninem GroES a hydrolýzou ATP, chaperoniny z *M. tuberculosis* si však tuto schopnost zachovávají i v dimerní podobě a nevyžadují přítomnost ko-chaperoninu.

Z imunologického hlediska přitahují HSP stále více pozornosti. Mykobakteriální Hsp65, stejně jako ostatní bakteriální chaperoniny rodiny HSP60, na sebe upoutal pozornost jako vysoce imunogenní molekula schopná aktivovat T lymfocyty²². Napadení buňky znamená pro mykobakterii jistou formu stresu ústící ve zvýšenou produkci HSP. Napadená buňka hostitele naopak tyto proteiny degraduje na peptidy, které jsou pak v komplexu s MHC glykoproteiny II. třídy na povrchu APC presentovány imunitnímu systému. Jelikož HSP tvoří v době napadení buňky poměrně velkou část všech mykobakteriálních proteinů, jsou také v největší míře presentovány ve formě MHC komplexů.

V naší laboratoři byly v rámci řešení Evropského projektu identifikovány mykobakteriální proteiny schopné interagovat s lektinovými receptory NK buněk, proteiny CD69 a NKR-P1. Pomocí vazebných a inhibičních studií byl jako jedna z cílových

struktur CD69 receptoru identifikován právě protein Hsp60. Detailní vazebné studie poté přispěly k identifikaci jednoduchého vazebného epitopu ve formě pentapeptidové sekvence LELTE, která je obsažena v mykobakteriálním hsp60 chaperoninu, ale není přítomná v obdobné molekule z nepatogenní bakterie *Escherichia coli*, ani není obsažena v hsp65 chaperoninech člověka a dalších eukaryotických organismů²³. Tato unikátní distribuce LELTE sekvence, stejně jako její přítomnost v molekule Galektinu-3 objevující se na povrchu nádorově transformovaných buněk vedla k hypotéze, že by mohla být součástí molekulárních mechanismů alarmujících a probouzejících imunitní systém v případě hrozícího nebezpečí (tzv. „danger“ hypotéza). Pokud ovšem byly monomerní LELTE peptid nebo peptidy obsahující obdobné sekvence sledovány v různých imunitních systémech zahrnujících CD69+ buňky *in vitro*, byla zjištěna pouze velmi nízká schopnost aktivace těchto systémů. Tento překvapivý stav trval až do okamžiku, kdy byly tyto peptidy zkoušeny ve své dimerní podobě schopné zesíťovat příslušný receptor na buněčném povrchu. Dimerní LELTEGY peptidy, nikoliv však kontrolní LELLEGY peptidy, dramaticky zvyšují proliferaci klidových periferních lymfocytů, a cytotoxickou aktivitu přirozených zabíječských buněk vůči některým nádorům.

V návaznosti na výše uvedené výsledky jsem se v předkládané práci detailně zabývala vlivem způsobu dimerizace na biochemické a imunologické aktivity LELTEGY dimerních peptidů.

2. CÍLE PRÁCE

- Změřit aktivitu dimerních LELTEGY a kontrolních LELLEGY peptidů při precipitaci rozpustného CD69 receptoru.
- Zjistit možnost inhibice vzniku precipitátu CD69 receptoru pomocí LELTEGY-DSG dimeru v přítomnosti různých koncentrací monovalentních látek
- Ověřit precipitační aktivitu také na membránové formě CD69 s použitím CD69+ lymfocytů a měření buněčné aktivity na základě produkce inositolfosfátů.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých materiálů, přístrojů a zařízení

3.1.1 Přístroje a zařízení

- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Chladnička *Zanussi, Itálie*
- Destičkový spektrofotometr Safire 2 *Tecan, Švýcarsko*
- TRILUX MicroBeta 1450 Liquid *Wallace, Finsko*
- Mikrotitrační destičky *Nunc, Dánsko*

3.1.2 Chemikálie

- CD69 receptor značný rhodaminem *Laskavě poskytnut
Georgiou Christofi²⁴*

Peptidy:

- LELTEGY *Xaia Peptides, Švédsko*
- LELLEGY *Xaia Peptides, Švédsko*
- LELTE *PPI, Česká Republika*
- AELTE *PPI, Česká Republika*
- LDLTE *PPI, Česká Republika*
- LELSE *PPI, Česká Republika*
- SiaTn dimer *Lectinity, Finsko*
- Dimerní LELTEGY popř. LELLEGY peptidy zesíťované pomocí DSG, DSP, DSS a DST – *laskavě poskytnuty kolegou Jiřím Stříbným*

Pufry

- PBS pufr: 10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH = 7,4
- RPRI 1640 pufr Medium + 10mM Hepes + NaOH pH 7,4

Buňky

- CD69+ lymfocyty, připraveny z periferní krve zdravých dárců po izolaci mononukleárních buněk na médiu Ficoll-Hypaque, a stimulací pomocí PMA a ionomycinu. Lymfocytární frakce obsahovala asi 50 % CD69+ lymfocytů.

Buňky byly laskavě připraveny a poskytnuty Dr. Miladou Šírovou ze sektoru imunologie a gnotobiologie MBÚ

3.2 Precipitační experimenty

Do mikrotitrační destičky o rozměrech 8 x 12 jamek bylo napipetováno 50 μ l rozpustného receptoru CD69 máčeného rhodaminem ($c = 10^{-8}$ M) do všech jamek. Dále bylo pipetováno 50 μ l ligandů o různých koncentracích (každá koncentrace byla pipetována 2x) dle tabulky 1. V tabulce jsou uváděny koncentrace v M. Ligandy byly ředěny pufrům PBS.

		číslo jamky					
řádek	ligand	1+2	3+4	5+6	7+8	9+10	11+12
A	LELTEGY-DST	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
B	LELTEGY-DSG	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
C	LELTEGY-DST	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
D	LELTEGY-DSG	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
E	LELTEGY-DSS	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
F	LELTEGY-DSP	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
G	LELTEGY-DSS	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
H	LELTEGY-DSP	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0

Do další mikrotitrační destičky o těch samých rozměrech bylo opět napipetováno 50 μ l rozpustného receptoru CD69 do všech jamek v řádcích A až E. Dále bylo pipetováno 50 μ l ligandů rozpuštěných v pufru PBS o různých koncentracích (každá koncentrace byla pipetována 2x) dle tabulky 2. V tabulce jsou uváděny koncentrace v M. V řádku A byla testována LELTEGY koncentrační inhibice. Koncentrace LELTEGY inhibitoru byla 1mM.

		číslo jamky					
řádek	ligand	1+2	3+4	5+6	7+8	9+10	11+12
A	LELTEGY-DST	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
	+ LELTEGY koncentrační inhibice 1mM, 5 μ l						
B	LELTEGY-DSC	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
C	LELTEGY-DSO	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
D	LELTEGY-DSC	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
E	LELTEGY-DSO	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0

Do takto napipetovaných mikrotitračních destiček byl přidán polyethylenglykol, jímž je komplex proteinu s ligandem srážen, a poté získán centrifugací. Nakonec byla měřena fluorescence na přístroji Safire 2. Na tomto přístroji byly zadány následující parametry:

Measurement mode:	Fluorescence Bottom
Excitation wavelength:	546 nm
Emission wavelength:	577 nm
Excitation bandwidth:	5,0 nm
Emission bandwidth:	20,0 nm
Gain (Manual):	55
Number of reads:	2
FlashMode:	High sensitivity
Integration time:	40 μ s
Lag time:	0 μ s

3.3 Inhibice precipitace CD69 proteinu monovalentními peptidy

Byly provedeny pokusy inhibovat vznik precipitátu CD69 receptor pomocí LELTEGY-DSG dimeru v přítomnosti různých koncentrací monovalentních látek - inhibitorů. Jako receptor byl opět použit rozpustný receptor CD69, máčený rhodaminem, výsledná koncentrace 10^{-8} M. Jako inhibitory byly použity peptidy LELTEGY, LELLEGY, LELTE, AELTE, LDLTE, LELSE a SiaTn dimer. Nejprve byla provedena precipitace ligandem LELTEGY-DSG o koncentraci 4×10^{-8} M a poté inhibice různými monovalentními peptidy.

Do mikrotitrační destičky o rozměrech 8 x 12 jamek bylo napipetováno 50 μ l rozpustného receptoru CD69 do všech jamek v řádcích A-G. Dále bylo do všech jamek v těch samých řádcích napipetováno 25 μ l ligandu LELTEGY-DSG, $c = 4 \times 10^{-8}$ M. Nakonec bylo napipetováno 25 μ l různých inhybitorů o různých koncentracích (každá koncentrace byla pipetována 2x) dle tabulky 3. Inhibitory byly ředěny puftrem PBS. V tabulce jsou uváděny koncentrace v M.

		číslo jamky					
řádek	inhibitor	1+2	3+4	5+6	7+8	9+10	11+12
A	LELTEGY	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0
B	LELEGY	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0
C	LELTE	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0
D	AELTE	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0
E	LDLTE	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0
F	LELSE	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0
G	SiaTn dimer	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0

Do takto napipetované mikrotitrační destičky byl opět přidán polyethylenglykol, jímž je komplex proteinu s ligandem srážen, a poté získán centrifugací. Nakonec byla měřena fluorescence na přístroji Safire 2. Na přístroji byly zadány stejné parametry jako u předchozího experimentu (viz str.18).

3.4 Měření buněčné signalizace na základě produkce inositolfosfátů

Precipitační účinky některých dimerních LELTEGY peptidů byly ověřovány na membránové, vázané formě receptoru CD69. K tomuto experimentu byly použity CD69+ lymfocyty značené izotopy tritia a ligandy LELTEGY-DST, -DSG, -DSS, -DSO a jako kontrolní peptidy LELLEGY s těmi samými bifunkčními činidly.

Do mikrotitrační destičky s oblémi jamkami na buňky o rozměrech 8 x 12 jamek bylo napipetováno 50 μ l CD69+ lymfocytů do všech. Bylo nutno pracovat za chladu. Dále bylo napipetováno 50 μ l ligandů o různých koncentracích (každá koncentrace byla pipetována 2x) dle tabulky 4. V tabulce jsou uváděny koncentrace v M. K ředění byl použit pufr na lymfoidní buňky RPRI 1640 Medium s přídavkem 10mM Hepes a pH upraveným na 7,4.

		číslo jamky					
řádek	ligand	1+2	3+4	5+6	7+8	9+10	11+12
A	LELTEGY-DST	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
B	LELTEGY-DSG	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
C	LELTEGY-DSS	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0

D	LELTEGY-DSO	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
E	LELEGY-DST	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
F	LELEGY-DSG	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
G	LELEGY-DSS	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0
H	LELEGY-DSO	10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$	10^{-8}	$3,3 \times 10^{-8}$	10^{-9}	0

Tento experiment byl prováděn 2x. Jednou byly měřeny inositoltrisfosfáty a jednou inositolbisfosfáty. Takto napipetované mikrotitrační destičky byly přelepeny průhlednou lepící páskou a dány do inkubace první na 2 minuty a druhá na 5 minut. Nakonec byla měřena produkce inositolfosfátů na přístroji Trilux MicroBeta s použitím dříve popsané metodiky²⁵.

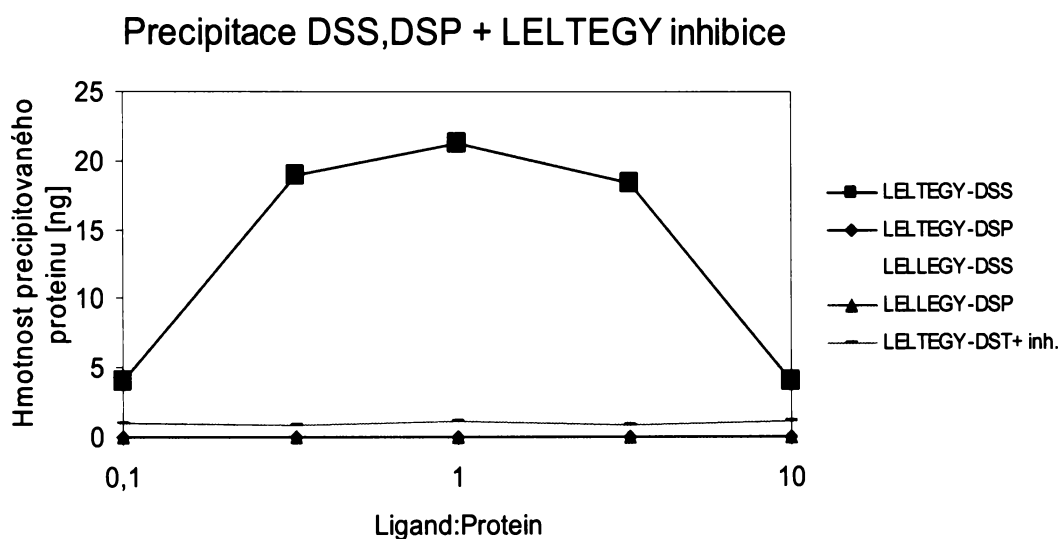
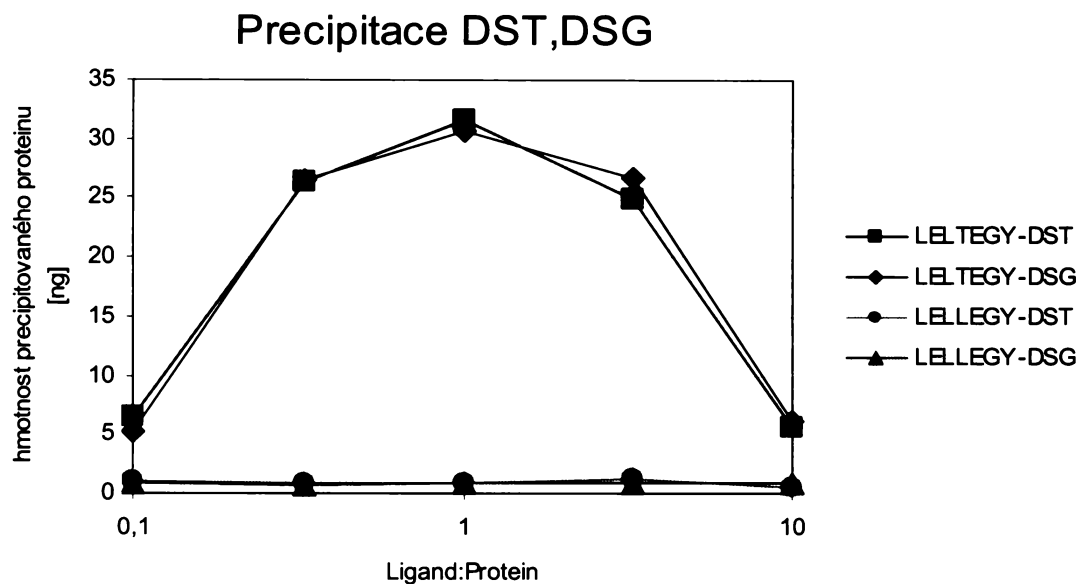
4. VÝSLEDKY

4.1 Precipitace rozpustného CD69 receptoru bivalentními LELTEGY peptidy

V Laboratoři architektury proteinů byly v předcházejících létech identifikovány imunoreaktivní peptidy obsahující sekvenci LELTE nalezené jako ligandy CD69 receptoru v extraktech *Mycobacterium tuberculosis*. V diplomové práci Zuzany Kubínkové již byly popsány reaktivity různých derivátů odvozených od LELTE aminokyselinové sekvence. Práce Petry Bašové naopak ukázala různé možnosti prezentace těchto peptidových sekvencí pomocí jejich vazby na dendrimerické kostry. Vzhledem k tomu, že syntéza těchto derivátů je velmi složitá, probíhají v posledních letech v Laboratoři pokusy o jednodušší formu prezentace LELTE sekvence, například pomocí dimerizace LELTE peptidů proteinovými bifunkčními činidly. S touto kategorií látek jsem také pracovala ve své bakalářské práci. Konkrétně se jednalo o imunoreaktivní LELTEGY heptapeptid a neaktivní kontrolní LELLEGY heptapeptid dimerizovaný pomocí řady bifunkčních činidel zahrnujících DSG, DST, DSS, DSP, DSC a DSO.

Interakce receptorů imunitního systému s ligandy může probíhat různým způsobem. Za fyziologických podmínek je kritické zesíťování receptorů na povrchu buněk, které může vyústit až v buněčnou aktivaci. Interakci receptorů s jejich ligandy je ovšem možno sledovat též biochemickými metodami s využitím rozpustných forem těchto receptorů. V těchto experimentech záleží na počtu vazebných míst pro ligand v molekule receptoru, a též na způsobu prezentace ligandů. V mém případě receptoru CD69 jde o interakci bivalentního dimeru receptorové bílkoviny s monomerním nebo dimerním ligandem. U dimerických ligandů může též dojít k zesíťování receptorového proteinu i v roztoku, vznikají potom ohromné polymerní řetězce, rozpustnost takto precipitovaného receptoru klesá, a komplex je náchylný k precipitaci. Na těchto zákonitostech je založený precipitační experiment, v němž je komplex proteinu s ligandem srážen přidávkem polyethylenglykolu, a poté získán centrifugací²⁵. V mnou prováděném experimentu docházelo k precipitaci v případě použití LELTEGY peptidu zesíťovaného činidlem DST, DSG a DSS (Obr.6). Při použití jiných forem linkerů (DSP) však k precipitaci nedocházelo (Obr.6). Dále bylo provedeno několik experimentů pro ověření specifity interakce. V případě použití neaktivního homologu LELLEGY k precipitaci nedocházelo. Navíc

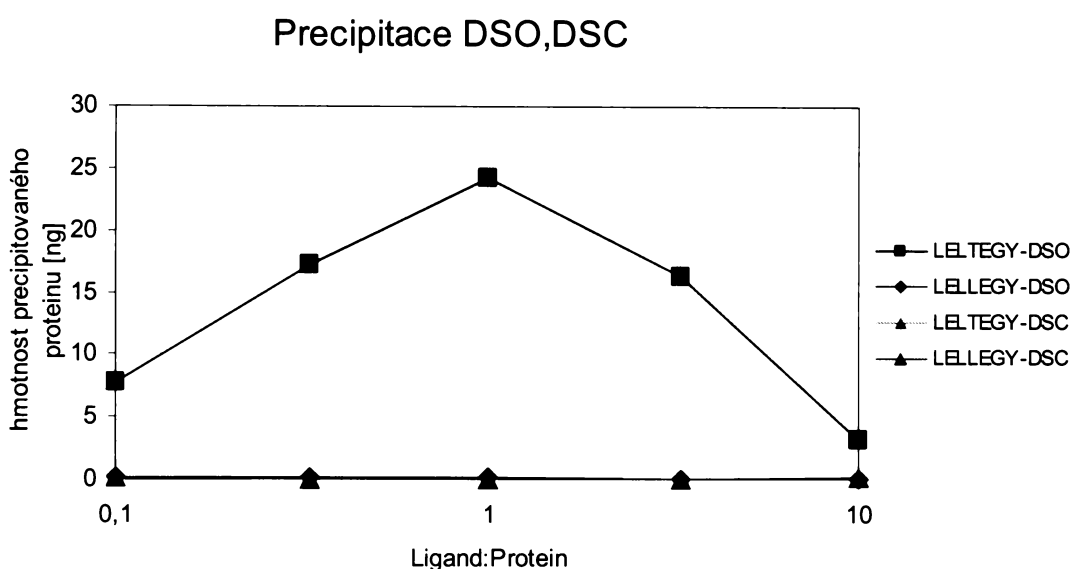
precipitace byla účinně inhibována přidavkem tisícinásobného nadbytku monovalentního LELTEGY peptidu,, který kompetuje o vazebná místa, a tím precipitát proteinu rozpouští (Obr.6).



Obr. 6A, 6B Precipitace rekombinantního CD69 receptoru různými deriváty dimerního LELTEGY a LELLEGY peptidu. Množství precipitovaného proteinu bylo stanoveno jako intenzita fluorescence rhodaminu.

Závislost účinnosti precipitace na charakteru použitého linkeru naznačovala, že může existovat dimerní LELTEGY peptid s optimální vzdáleností mezi oběma peptidy.

Pokud je tato vzdálenost příliš malá, nemůže dojít k účinnému spojení vazebných míst, a k precipitaci nedochází. Při použití příliš velké délky linkeru dochází k ohybu molekuly, někdy dokonce i k vzájemné interakci aktivních složek mezi sebou. V mém případě se jevil jako optimální linker s 4 – 5 uhlíky (DST, DSG), nebo delší linker DSS . V dalším experimentu jsem proto sledovala minimální délku linkeru, a zjistila jsem, že s příliš krátkým linkerem (DSC) již k precipitaci nedocházelo (Obr. 7). S linkerem DSO,, který je pouze o 1 C delší už opět docházelo k precipitaci. (Obr. 7).

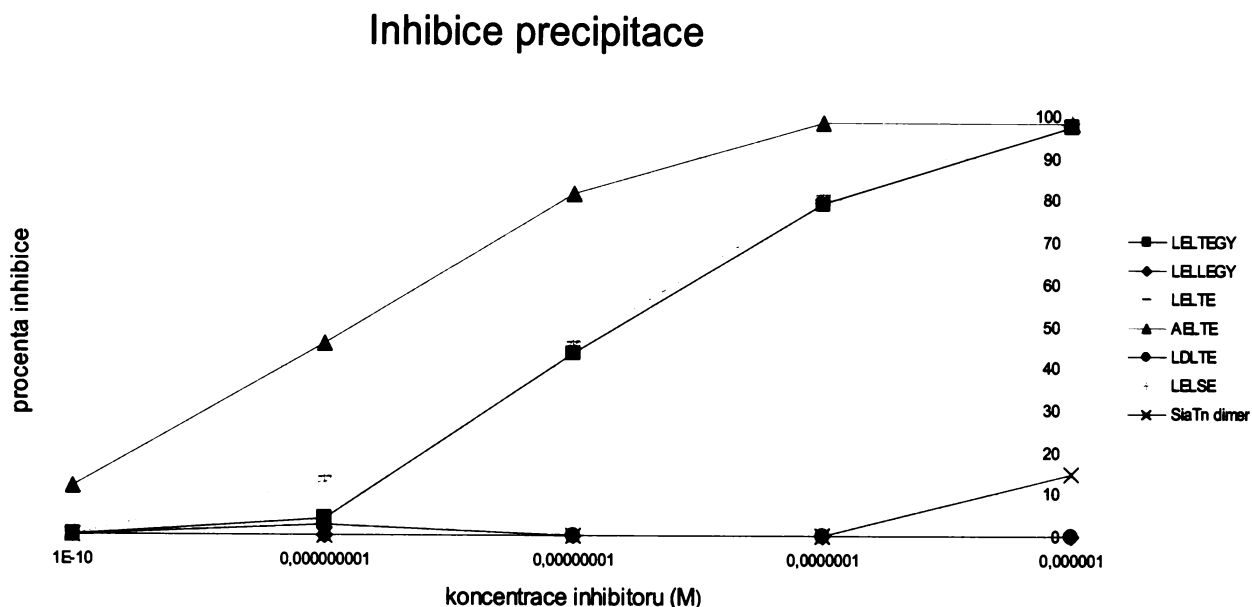


Obr. 7 Precipitace rekombinantního CD69 receptoru různými deriváty dimerního LELTEGY peptidu. Množství precipitovaného proteinu bylo stanoveno jako intenzita fluorescence rhodaminu.

4.2 Inhibice precipitace CD69 proteinu monovalentními peptidy

Interakce rozpustných receptorů s dimerními ligandy bývá vratnou reakcí, receptorový komplex je proto možné rozpustit v nadbytku monovalentního ligandu. Pokud sledujeme tuto závislost kvantitativně, je možno z inhibičních křivek odhadnout dokonce i sílu interakce (látky, které inhibují vznik precipitátu v nižších koncentracích jeví silnější vazbu). Z tohoto důvodu jsem se pokoušela inhibovat vznik precipitátu CD69 receptor pomocí LELTEGY-DSG dimeru v přítomnosti různých koncentrací monovalentních látek.

V mém případě k inhibici nejlépe docházelo u monomerní formy peptidu AELTE, při vyšších koncentracích také u monomerních forem peptidů LELTEGY, LELTE a LELSE (Obr. 8)

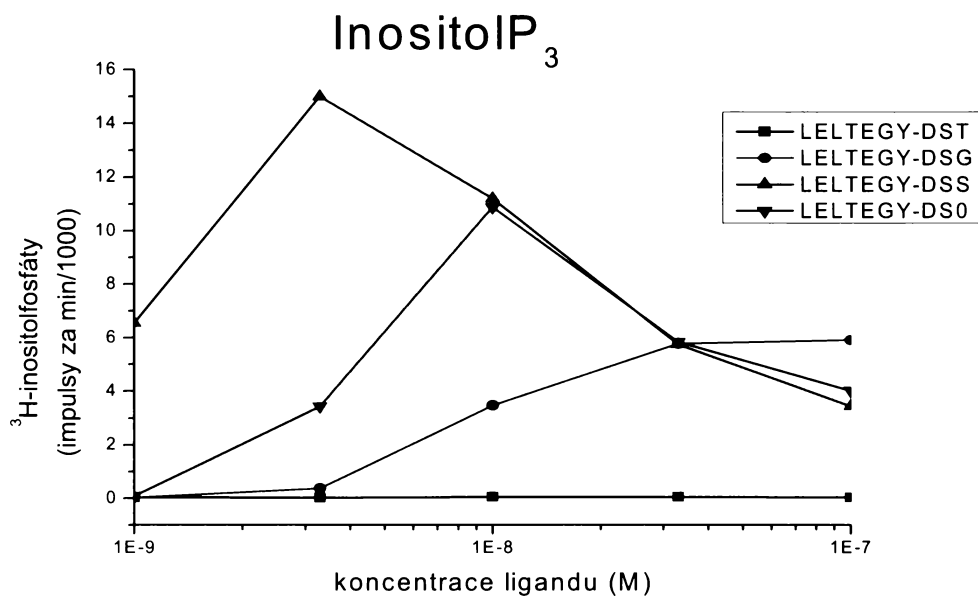


Obr. 8: Inhibice precipitace rekombinantního CD69 receptoru pomocí LELTEGY-DSG dimeru v přítomnosti různých monovalentních látek. Množství precipitovaného proteinu bylo stanoveno jako intenzita fluorescence rhodaminu.

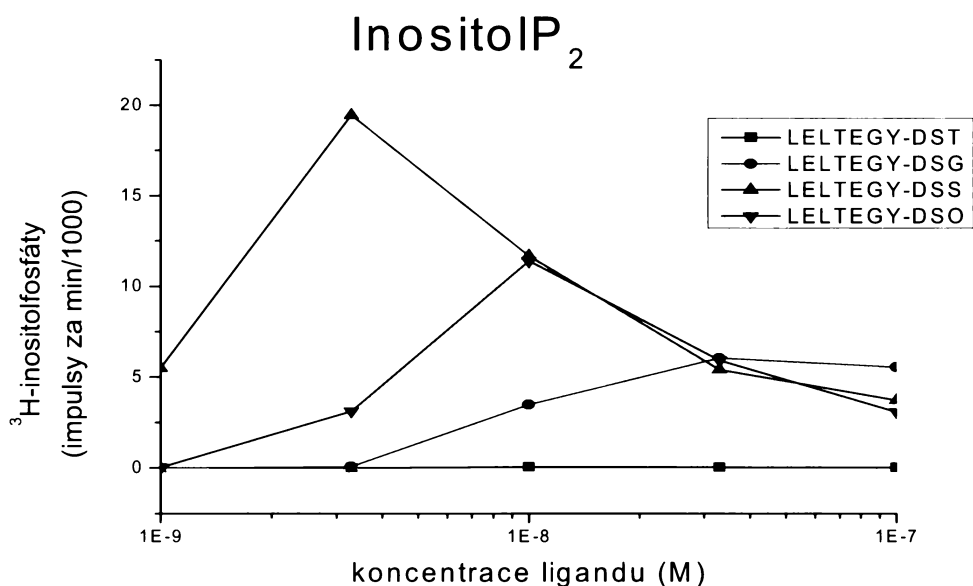
4.3 Měření buněčné signalizace na základě produkce inositolfosfátů

Na základě interakce mezi membránovou formou proteinu CD69 a dimerními LELTEGY peptidy se hydrolyzují některé komponenty membrán a tvoří se inositolfosfáty. V tomto experimentu jsem ověřovala precipitační aktivitu LELTEGY peptidů dimerizovaných pomocí linkerů DST, DSG, DSS a DSO, které se v předchozích experimentech ukázaly jako vhodné, na membránové formě receptoru CD69 s použitím CD69+ lymfocytů. Měřila jsem buněčnou aktivaci na základě produkce inositolfosfátů, konkrétně inositolbisfosfátu IP₂ a inositoltrisfosfátů IP₃.

Z těchto experimentů jsem zjistila, že při buněčné aktivaci jsou nejvíce preferovány dimerní LELTEGY peptidy s dlouhými linkery (DSS), trochu méně preferovány jsou dimerní LELTEGY peptidy s řetězcem DSG a DSO (Obr.9,10). V případě použití neaktivního homologu LELLEGY k produkci inositolfosfátů nedocházelo.



Obr. 9: Produkce Inositoltrisfosfátů u CD69+ lymfocytů po jejich aktivaci dimerními LELTEGY peptidy s různými linkery. Pufr na lymfoidní buňky RPRI 1640 Medium s přidávkem 10mM Hepes a pH upraveným na 7,4., práce za chladu, inkubace 2 min, měřena produkce inositolfosfátů na přístroji Trilux MicroBeta s použitím dříve popsané metodiky²⁵



Obr.10: Produkce Inositolbisfosfátů u CD69+ lymfocytů po jejich aktivaci dimerními LELTEGY peptidy s různými linkery. Pufr na lymfoidní buňky RPRI 1640 Medium s přidávkem 10mM Hepes a pH upraveným na 7,4., práce za chladu, inkubace 5 min, měřena produkce inositolfosfátů na přístroji Trilux MicroBeta s použitím dříve popsané metodiky²⁵

5. DISKUSE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo změřit precipitační aktivitu dimerních LELTEGY a kontrolních LELLEGY peptidů na rozpustném CD69 receptoru na základě různých vlastností linkerů,, kterými jsou tyto dimery tvořeny a dále pak ověřit tuto precipitační aktivitu na membránové formě receptoru CD69.

Pomocí vazebných a inhibičních testů bylo objeveno, že za vazbu Hsp65 chaperoninu z *M. Tuberculosis* je zodpovědná pentapeptidová sekvence LELTE. V mých pokusech byl použit heptapeptid LELTEGY oproti dříve používanému peptapeptidu z důvodu snazší detekce: tyrosylový zbytek vázaný na aktivní sekvenci LELTE pomocí glycinové spojky je velmi výhodný, protože absorbuje v blízké oblasti UV spektra (při 280 nm) a navíc je možné celý derivát pro stopovací studie citlivě značit pomocí radioaktivního jodu. Práci s dimerními peptidy lze odůvodnit tak, že když byl monomerní LELTE peptid nebo peptidy obsahující obdobné sekvence sledovány v různých imunitních systémech zahrnujících CD69+ buňky *in vitro*, byla zjištěna pouze velmi nízká schopnost aktivace těchto systémů. Tato překvapivá situace byla vyřešena teprve tehdy, když byly tyto peptidy zkoušeny ve své dimerní podobě schopné zesíťovat příslušný receptor na buněčném povrchu. Dimerní LELTEGY peptidy, nikoliv však kontrolní LELLEGY peptidy, dramaticky zvyšují proliferaci klidových periferních lymfocytů, a cytotoxickou aktivitu přirozených zabíječských buněk vůči některým nádorům.

V testech optimalizace reakčních podmínek syntézy dimerních LELTEGY peptidů kolegy Jiřího Stříbného se jako nejlepší ukázalo složení reakční směsi obsahující 80 % DMSO a 20 % pufru o pH 7,5. Při těchto podmínkách bylo téměř 80 % výchozího peptidu konvertováno na peptidový dimer. Tyto reakční podmínky pak byly použity pro syntézu látek pro mou bakalářskou práci. Dimerní peptid LELTEGY-DSC vytvořen nebyl, jednalo se o reakční směs, ale pozdější analýza prokázala nepřítomnost požadované látky.²⁶

V mých testech byla nejprve interakce LELTEGY dimerů s proteinem CD69 zkoumána na základě precipitace rozpustné rekombinantní formy tohoto receptoru. V těchto experimentech záleží na počtu vazebných míst pro ligand v molekule receptoru, a též na způsobu prezentace ligandů. Výsledky ukázaly, že při precipitační reakci neexistuje striktní preference z hlediska délky nebo chemických charakteristik linkerů, a uspokojivě

fungovaly dimery s dvojuhlíkatým (DSO, počítáno včetně CO skupin), čtyřuhlíkatým hydrofilním (DST), pětiuhlíkatým hydrofobním (DSG), nebo šestiuhlíkatým hydrofobním (DSS) linkerem. Naopak šestičlenný linker s obsahem disulfidového můstku (DSP) a jednočlenný linker (DSC, počítáno včetně CO skupin) nebyly z hlediska precipitačních reakcí příliš vhodné. Naopak v testech buněčné aktivace – produkce inositolfosfátů – projevoval nejvyšší aktivitu šestiuhlíkatý hydrofobní linker (DSS), i když určité aktivace bylo dosaženo i pomocí DSO a DSG linkerů.

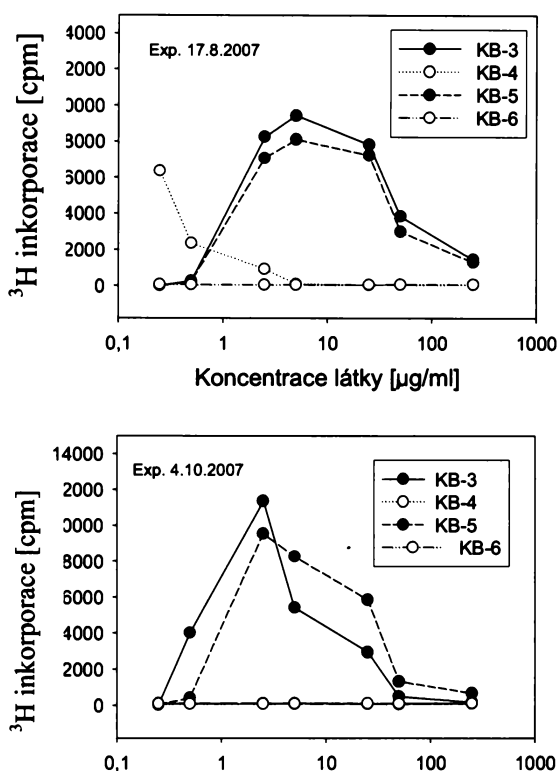
Jelikož interakce rozpustných receptorů s dimerními ligandy bývá vratnou reakcí, receptorový komplex je proto možné rozpustit v nadbytku monovalentního ligandu, neboli lze vznik daného precipitátu tímto monovalentním ligandem inhibovat. Pokud sledujeme tuto závislost kvantitativně, je možno z inhibičních křivek odhadnout dokonce i sílu interakce (látky, které inhibují vznik precipitátu v nižších koncentracích jeví silnější vazbu). Z tohoto důvodu byla testována možnost inhibice vzniku precipitátu CD69 receptoru pomocí LELTEGY-DSG dimeru v přítomnosti různých koncentrací různých monovalentních látek. Dle předpokladů se jako dobré inhibitory jeví peptidy LELTE a LELTEGY, které jsou jak již bylo zjištěno dobrými ligandy pro receptor CD69. Dále pak se jako dobré inhibitory jeví peptidy AELTE a LELSE.

V Laboratoři humorální a protinádorové imunity (Prof. RNDr. Blanka Říhová DrSc., Mgr. Marek Kovář PhD.) byly jako součást úkolů řešených v rámci Centra cílených terapeutik MŠMT ČR provedeny další biochemické a imunologické experimenty pomocí nichž byly ověřovány některé další klíčové aktivity peptidových dimerů. Důležitou vlastností pro biochemické a imunologické testy je rozpustnost látek ve vodných roztocích, například v pufru PBS. Ukázalo se, že LELTEGY dimerní peptidy jsou ve vodných pufrách dobře rozpustné ještě v koncentraci řádu mg/ml. LELTEGY dimerní (kontrolní) peptidy se rozpouštějí hůře, příprava milimolárních roztoků byla možná pouze ve směsích pufru s obsahem organických rozpouštědel (PBS s 20 % EtOH), a ze směsného rozpouštědla byly dalším ředěním PBS připraveny výchozí roztoky pro mou práci o koncentraci 2×10^{-6} mol/l. Obsah ethanolu do 1 % nebyl v těchto roztocích na závadu následným biochemickým ani imunologickým testům.

Nejprve probíhalo *in vitro* imunologické testování kdy byla ověřována hypotéza o signalizační úloze zkoumaných látek v rámci probuzení imunitního systému na základě detekce látek organismu nebezpečných (angl. „danger“ signals, signály nebezpečí). Proto byla měřena proliferační aktivita aktivovaných lymfocytů a klidových periferních

lymfocytů, také byla testována produkce cytokinů důležitých pro spuštění protilátkové (IL-4, IL-10) i buněčné (IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF) imunity. Poté byly látky testovány přímo v cytotoxickém testu po preinkubaci se zabíječskými buňkami.

Následovaly další imunologické testy jako je například test buněčné proliferace (inkorporace volného ^3H -thymidinu do DNA) kdy zkoumané látky projevovaly velmi výraznou aktivitu pouze při zvýšení proliferace klidových (nestimulovaných) lymfocytů. Výsledky pokusů s lymfocyty dvou zdravých dárců jsou uvedeny na Obr. 11. Obě zde použité aktivní látky, LELTEGY dimer s linkery DST nebo DSG, poskytovaly

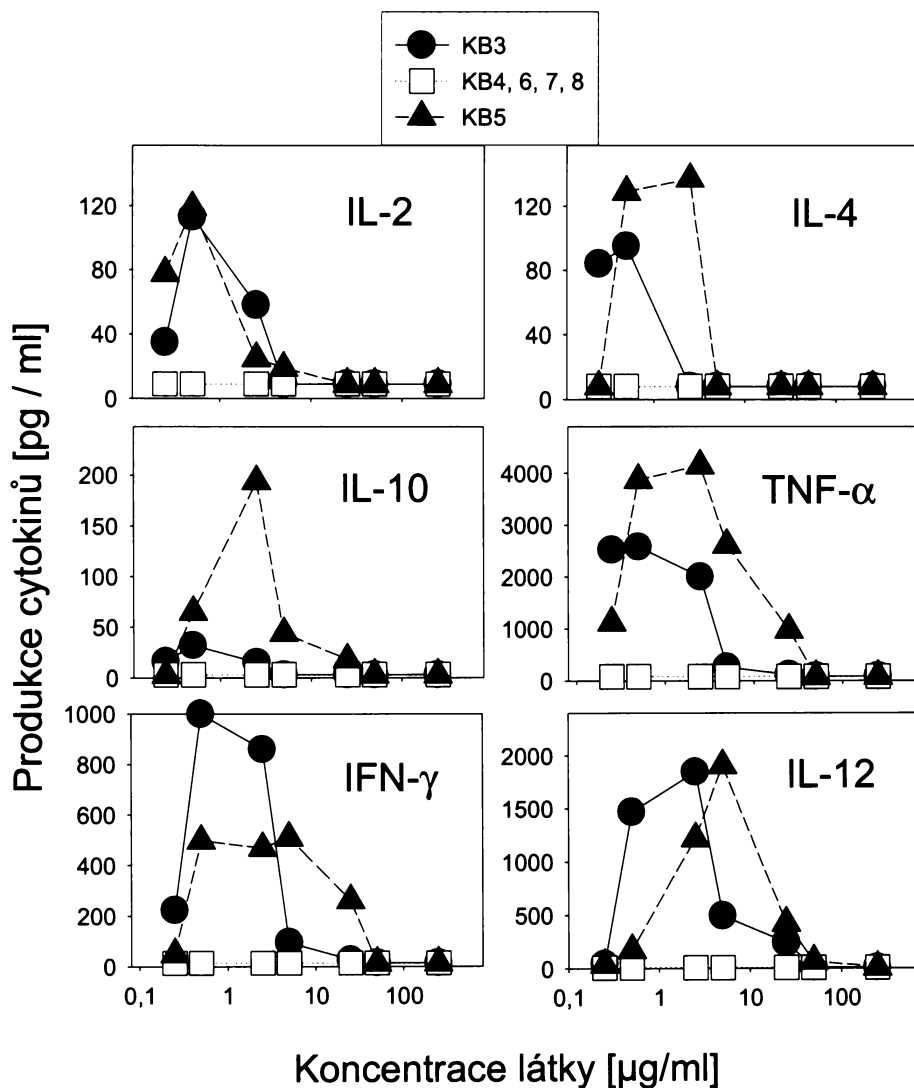


Obr. 11: Výsledky dvou testů proliferace klidových periferních lymfocytů pomocí dimerních LELTEGY peptidů (KB3: LELTEGY-DST, KB5: LELTEGY-DSG) a kontrolních peptidů (KB4: LELTEGY-DST, KB6: LELTEGY-DSG). Nestimulované lidské PBL (10^6 buněk v 1 ml média) byly inkubovány 24 hodin v přítomnosti testovaných látek v médiu s ^3H -thymidinem. Na konci inkubace byly buňky harvestovány na skleněném filtru, a inkorporace thymidinu do buněčné DNA byla měřena kapalinovou scintilací na zařízení Microbeta Trilux (Wallac, Turku, Finsko). V grafu jsou uvedeny nekorigované hodnoty inkorporovaných radioaktivit.

podobné aktivity, i když kontrolní peptid dimerizovaný pomocí DST jevil v pokuse ze 17. 8. 2007 vyšší nespecifickou aktivitu při vyšších koncentracích. Celkově však byly kontrolní LELTEGY peptidy zcela neaktivní, což potvrdilo, že aktivita látek je závislá na

charakteru peptidové komponenty, a je pouze minimálně ovlivněna chemickým charakterem spojky.

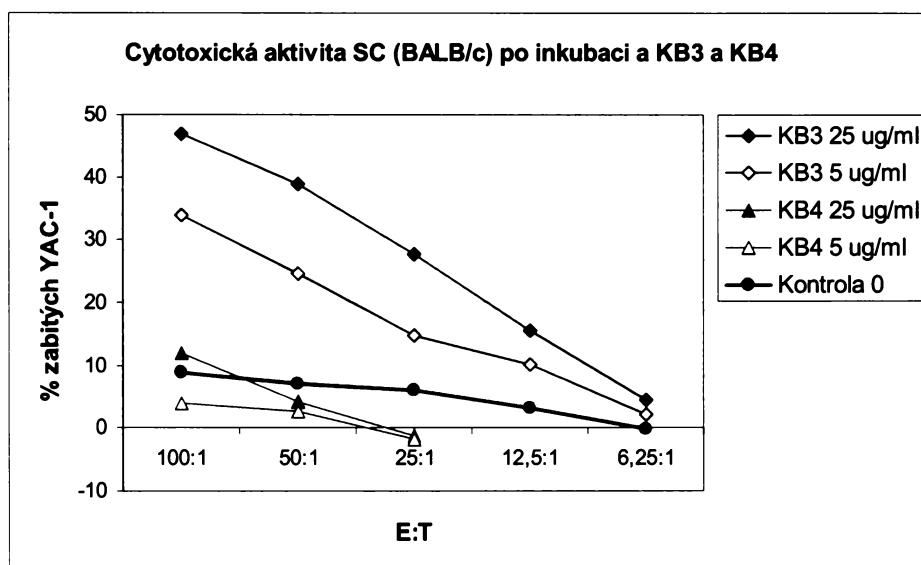
V následujícím imunologickém testu tvorby cytokinů, který měřil schopnosti syntetizovaných dimerních peptidů aktivovat lymfocyty periferní krve s následnou produkcí cytokinů alarmující imunitní systém o možnosti mykobakteriální infekce bylo



Obr. 12: Produkce cytokinů nestimulovanými lidskými PBL. Nestimulované lidské PBL (10^6 buněk v 1 ml média) byly inkubovány 12 hodin (IL-2, IL-4), 24 hodin (IL-10, IL-12), nebo 48 hodin (IFN- γ , TNF- α) v přítomnosti testovaných látek, poté byly buňky centrifugovány a v supernatantu byly měřeny koncentrace jednotlivých cytokinů s použitím komerčně dostupných kitů firmy BD. KB7, KB8-inaktivní LELLEGY dimerní peptidy

dosaženo podobných výsledků jako v předchozím testu. Výsledky uvedené v obrázku 12 jasně ukazují, že přítomnost mikrogramových množství imunoaktivního dimerního peptidu LELTEGY vedla k produkci některých klíčových cytokinů imunitního systému, zatímco dimerní kontrolní peptidy nebo monomerní (nedimerizované) peptidy byly zcela neaktivní.

Posledním imunologický test buněčného zabíjení zejména přirozenými zabíječskými buňkami (frakce myších slezinných buněk) po aktivaci experimentálními



Obr. 13: Test buněčného zabíjení. Imunoaktivní dimerní LELTEGY peptid stimuloval zabíječské buňky ve frakci myších slezinných buněk. Myší slezinné buňky v koncentraci 2×10^6 /ml byly inkubovány po dobu dvou hodin se zkoumanými látkami, poté byly látky odmyty, a slezinné buňky testovány v testu buněčné cytotoxicity vůči myší nádorové leukemické linii YAC-1. Poměr efektorových a cílových buněk je označen jako E:T.

LELTEGY dimery a kontrolními LELLEGY dimery. Na obrázku 13 lze vidět, že jako v předešlých testech docházelo ke zlepšení zabíječských schopností zkoumané buněčné frakce vlivem imunoaktivního LELTEGY dimeru do koncentrace 5 μ g/ml, kontrolní LELLEGY dimerní peptid byl neaktivní ve všech použitých koncentracích.

6. ZÁVĚR

- Při experimentu precipitace CD69 v roztoku fungoval pouze LELTEGY dimer, aktivita je závislá na vlastnostech linkeru. Nejlépe se osvědčily linkery DST a DSG.
- Precipitaci lze inhibovat monomerním peptidem. Nejvíce fungovaly peptidy AELTE, LELTE, LELTEGY a LELSE.
- Buněčná aktivace (produkce inositol fosfátů) – nejvíce je preferován LELTEGY dimer s delším – šestiuhlíkatým hydrofóbním linkerem (DSS).

Seznam použité literatury

1. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie, TRITON, Praha (2002)
2. Hořejší, V.: Ústav molekulární genetiky AVČR a Přírodovědecká fakulta UK, Molekulární a buněčné mechanismy fungování imunitního systému
3. http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_23965.html, staženo dne 20.5.2008
4. Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A.: Kuby Immunology, W.H. Freeman and Company, New York (2007)
5. Cerwenka, A., Lanier, L.L., Nat. Rev. Immunol. 1, 41-49 (2001), Natural killer cells, viruses and cancer
6. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: Harper's Illustrated Biochemistry, The McGraw-Hill Companies, USA (2003)
7. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, Ch.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., Darnell, J.: Molecular cell biology, W.H. Freeman, USA (2005)
8. Ruoslahti, E.: J Clin. Invest. 87, 1-5 (1991). Integrins.
9. Takeichi, M.: Development 102, 639-655 (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis.
10. Bezouška, K.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 535-563 (2004), Carbohydrate and non-carbohydrate ligands for the C-type lectin-like receptors of natural killer cells.
11. Hahn, A.B.: ASHI quarterly Scientific Communications 1, 13-15 (2002), Natural Killer Cell Receptors: Defining a New Role for MHC Class I Molecules
12. Weis, W. I., Taylor, M. E., Drickamer, K.: Immunol. Rev. 163, 19-34 (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system.
13. Drickamer, K.: Current Opinion in Structural Biology 9, Issue 5, 585-590 (1999), C-type lectin-like domains
14. Marzio, R., Mauël, J., Betz-Corradin, S.: Immunopharmacol. Immunotoxicol. 21, 565-582 (1999). CD69 and regulation of the immune function.
15. Hamann, J., Fiebig, H., Strauss, M.: J. Immunol. 150, 4920-4927 (1993). Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain.
16. <http://www.cs.cityu.edu.hk/~howard/Bioinformatics/Membrane/membrane.htm>, staženo dne 20.5.2008

17. Ziegler, S.F., Ramsdell, F., Alderson, M.R.: *Stem Cells* 12, 456-465 (1994). The activation antigen CD69.
18. Lopez-Cabrera, M., Hamann, J., Strauss, M., Sanchez-Madrid, F.: *Eur. J. Immunol.* 24, 1692-1697 (1991). Structure of the gene coding for the human early lymphocyte activation antigen CD69: a C - type lectin receptor evolutionarily related with the gene families of natural killer cell-specific receptors.
19. Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: *Biochemistry* 39, 14779-14786 (2000). Crystal Structure of Human CD69: A C-Type Lectin-Like Activation Marker of Hematopoietic Cells
20. Silva, C. L., Pietro, R. L. R., Januarion, A., Bonato, V. L. D., Lima, V. M. F., Da Silva, M. F., Lowrie, D. B.: *Immunology* 86, 519-524 (1995). Protection against tuberculosis by bone marrow cells expressing mycobacterial hsp65.
21. Qamra, R., Mande, S. C.: *J. Bacteriol.* 186, 8105-8113 (2004). Crystal structure of the 65- kilodalton heat shock protein, chaperonin 60.2 of *Mycobacterium tuberculosis*.
22. Zugel, U., Kaufmann, S. H.: *Immunobiology* 201, 22-35 (1999). Immune response against heat-shock proteins in infectious diseases.
23. Nguyen, T.T.H., Bezouška, K., Vavřincová, P., Sedláček, P., Hromadníková, I.: *Cell Stress Chaperone* 10, 266-273 (2006). Humoral response against *Mycobacterium bovis* hsp65 derived fragments in children and young people under pathologic and physiologic state.
24. Imboden, J.B., Stobo, J.D.: *J. Exp. Med.* 161, 446-456. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor.
25. Navrátil, M.: Vysokoafinitní sacharidové ligandy leukocytárního lektinového receptoru CD69. Diplomová práce, UK-PřF Praha, Katedra biochemie (2007).
26. Stříbný, J.: Osobní sdělení

