

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

# OPTIMALIZACE METOD PRO STANOVENÍ AKTIVACE RECEPTORU CD44

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ivana NĚMEČKOVÁ, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Kristina NEŠPOROVÁ

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Nela SKALICKÁ

Ráda bych poděkovala Mgr. Kristině Nešporové za ochotu, trpělivost a vedení při praktickém vypracování diplomové práce. Zároveň děkuji společnosti Contipro za možnost využívat moderní vybavení a zapojit se do práce ve výzkumném týmu Fyziologie buňky.

Mé poděkování patří také RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za pomoc a cenné rady, které jsem uplatnila při sepisování této práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 19. 4. 2016

Podpis:

# OBSAH

1. ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT .....	7
2. ÚVOD .....	8
3. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE .....	9
4. TEORETICKÝ ÚVOD .....	10
4.1 Hyaluronová kyselina .....	10
4.1.1 Struktura .....	10
4.1.2 Vlastnosti HA .....	11
4.1.3 Metabolismus HA .....	12
4.1.4 Význam HA .....	14
4.1.5 Receptory .....	16
4.2 CD44 .....	18
4.2.1 Struktura .....	18
4.2.2 Aktivace .....	21
4.2.3 Interakce s HA .....	24
4.2.4 Význam, funkce .....	24
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
5.1 Materiál a technické vybavení .....	27
5.1.1 Buněčné linie .....	27
5.1.2 Chemikálie, roztoky a kultivační média .....	28
5.1.3 Protilátky .....	32
5.2 Metoda Western Blot .....	33
5.2.1 Kultivace buněčných linií .....	33
5.2.2 Ovlivnění buněk .....	33
5.2.3 Zpracování vzorků .....	33
5.2.4 Měření a úprava koncentrace vzorku .....	34
5.2.5 Elektroforéza a Western Blot .....	34
5.3 Fluorescenční mikroskopie zafixovaných MDA-MB-231 .....	34
5.4 Fluorescenční mikroskopie transfekovaných HT-29 v čase .....	35
5.5 ELISA .....	35
5.6 Průtoková cytometrie .....	36

6.	VÝSLEDKY .....	37
6.1	Vliv PMA a HA na doménovou strukturu receptoru CD44 .....	37
6.1.1	Detekce receptoru CD44 a jeho domén metodou Western Blot.....	37
6.1.2	Stanovení ECD CD44 metodou ELISA .....	38
6.2	Stanovení množství CD44 na buněčném povrchu pomocí průtokové cytometrie	41
6.3	Vliv PMA na translokaci intracelulární domény CD44.....	49
6.3.1	Příprava ICD podjednotky CD44 značené GFP pomocí transfekce a sledování její translokace v čase .....	49
6.3.2	Detekce ICD podjednotky CD44 na zafixovaných buňkách pomocí imunofluorescence .....	55
6.4	Vliv PMA a HA na buněčnou smrt.....	57
7.	DISKUZE.....	61
8.	ZÁVĚR.....	65
9.	SEZNAM NEJPOUŽÍVANĚJŠÍCH ZKRATEK .....	66
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK .....	67
11.	SEZNAM PŘÍLOH.....	70
12.	POUŽITÁ LITERATURA.....	71

# 1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Název diplomové práce:

Optimalizace metod pro stanovení aktivace receptoru CD44.

CD44 je transmembránový glykoprotein přítomný na většině buněčných typů, který je zapojen do řady fyziologických i patologických procesů, taktéž představuje hlavní receptor pro kyselinu hyaluronovou (HA). HA je nesulfatovaný glykosaminoglykan, přítomný ve velké míře v extracelulární hmotě, kde zajišťuje hydrataci buněk, je zapojen do nádorových procesů, ovlivňuje buněčnou migraci, podporuje angiogenezi, podílí se na hojení ran. V této práci jsme se zaměřili na optimalizaci metod sledujících aktivaci, množství a štěpení receptoru CD44 u buněčné linie HT-29.

Pomocí metod Western Blot, ELISA a průtokové cytometrie jsme pozorovali množství celkového receptoru a jeho rozštěpených domén. K aktivaci jsme využili HA o molekulové hmotnosti 71 kDa a PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate). Po aktivaci došlo k časově závislým změnám množství celkového CD44 i jeho fragmentů. Sledovali jsme také buněčnou smrt v závislosti na přítomnosti HA a PMA. Neprokázali jsme žádný významný vliv těchto látek na viabilitu buněk. Pro vizuální vyhodnocení translokace odštěpené intracelulární domény do jádra jsme použili fluorescenční a konfokální mikroskopii. Po vlivu PMA jsme pozorovali, jak se v čase přesouvá GFP-značená intracelulární doména směrem k jádru.

V této práci se nám podařilo přispět k optimalizaci postupů, kterými je možné sledovat aktivaci receptoru CD44 u buněčné linie HT-29.

**Klíčová slova:** kyselina hyaluronová, CD44, Western Blot, ELISA, průtoková cytometrie, mikroskopie

# ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biological and Medical Sciences

Title of diploma thesis:

Optimalisation of methods for determination of CD44 receptor activation.

CD44 is a transmembrane glycoprotein present in most cell types which is involved in many physiological and pathological processes and it represents the main hyaluronic acid (HA) receptor. HA is a nonsulfated glycosaminoglycan that is present extensively in extracellular matrix, where it provides cell hydration. HA is involved in cancer, affects cell migration, supports an angiogenesis and participates in wound healing. In this study, we focused on the optimization of methods for the evaluation of activation, the amount and cleavage of CD44 receptor in HT-29 cell line.

We observed the total amount of the receptor and its cleaved domains using methods Western Blot, ELISA and flow cytometry. We used HA molecular weight 71 kDa and PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) for activation. Time-dependent changes appeared in the amount of total CD44 and its fragments after activation. We also observed cell death depending on the presence of HA and PMA. We demonstrated no significant effects of these substances on cell viability. We used fluorescent and confocal microscopy for visual evaluation of the cleaved intracellular domain localization. In the presence of PMA, we observed the GFP-tagged intracellular domain translocation inside the nucleus in time.

In this work, we have managed to help optimize methods, which can be used to observe the CD44 receptor activation in HT-29 cell line.

Keywords: hyaluronic acid, CD44, Western Blot, ELISA, flow cytometry, microscopy

## 2. ÚVOD

Kyselina hyaluronová je významná látka široce využívaná v kosmetice, medicíně i farmacii. Hraje důležitou roli v nádorových i nenádorových buněčných procesech, např. ovlivňuje buněčnou migraci, a tedy zasahuje do procesu hojení ran, podporuje angiogenezi a jako hlavní součást extracelulární matrix udržuje dostatečnou hydrataci buněk. Její schopnost ovlivňovat buněčné pochody je částečně zprostředkována specifickou vazbou na receptor CD44. Tento receptor může být také aktivován působením dalších látek, například forbol myristát acetátu (PMA). CD44 po aktivaci buď vstupuje do jádra, kde má nepřímý vliv na transkripci, nebo interaguje s cytoskeletem, čímž výrazně podporuje migraci buněk. Plní také funkci koreceptoru pro řadu molekul. Receptor CD44 je významný pro svou schopnost interagovat s HA, podílí se na vývoji organismu, podporuje správnou funkci imunity. CD44 může sloužit jako diagnostický marker pro řadu nádorů, u nichž bylo zpozorováno jeho abnormálně snížené nebo zvýšené množství. Aktivaci CD44 jsme schopni pozorovat na několika úrovních: a) změnou fosforylace specifických aminokyselin, b) štěpením domén CD44, c) translokací intracelulární domény CD44.



### 3. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo vytvořit soubor experimentálních metodických postupů, kterými je možné sledovat aktivaci receptoru CD44. Metody, které jsme k tomuto účelu použili, byly mimo jiné a) Western Blot

b) ELISA

c) průtoková cytometrie

d) fluorescenční a konfokální mikroskopie.

## 4. TEORETICKÝ ÚVOD

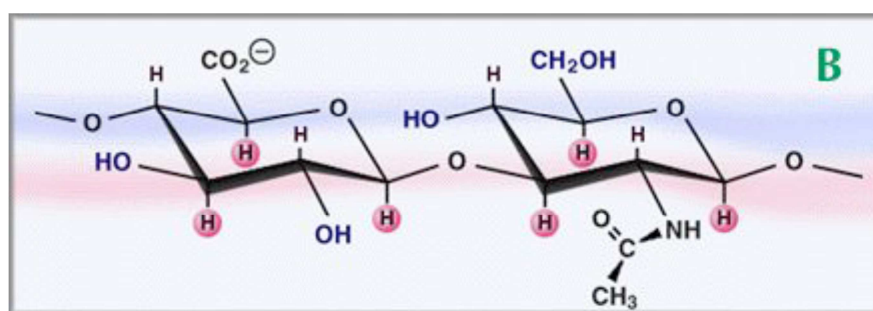
### 4.1 Hyaluronová kyselina

Hyaluronová kyselina (HA) byla poprvé izolována v roce 1934 ze sklivce skotu. Častěji bývá označována jako hyaluronan, což odráží skutečnost, že se *in vivo* vyskytuje ve formě polyaniontu. (Hascall a Laurent, 1997)

#### 4.1.1 Struktura

##### Primární struktura

Základní jednotkou HA je disacharid složený z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu spojených střídavě  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3 glykosidovými vazbami (Obr. 1). Takto spojené jednotky tvoří nevětvený polysacharid, který dosahuje velikosti 0,2 - 10 MDa. Obě složky disacharidu jsou prostorově podobné glukóze, která v  $\beta$  konfiguraci umožní všem svým objemnějším skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu, zatímco vodíky zůstanou v axiální pozici. Z toho vyplývá velká energetická stabilita. HA je zařazena do skupiny glykosaminoglykanů, ale na rozdíl od dalších (př. heparin, chondroitin) se vyskytuje nesulfatovaná. (Hascall a Laurent, 1997; Garg a Hales, 2004a)



Obr. 1 Konformační vzorec disacharidové jednotky HA tvořené ( $\beta$ -1-4)-D-glukuronovou kyselinou a ( $\beta$ -1-3)-N-acetyl-D-glukosaminem Převzato z: (Hascall a Laurent, 1997)

pKa karboxylové skupiny na glukuronové kyselině je 3 - 4, tedy při fyziologickém pH 7 se tyto skupiny vyskytují převážně ionizované. HA se stává polyaniontem nesoucím

stovky negativních nábojů na každém řetězci. Tyto náboje jsou vyváženy kationty okolního prostředí nejčastěji sodnými, draselnými, vápenatými a hořečnatými a jsou důležité pro zajištění rozpustnosti ve vodě. (Hascall a Laurent, 1997; Scott, 1998)

### **Sekundární struktura**

HA obsahuje dva typy vazeb, jedny v rámci disacharidové jednotky relativně tvarově stálé a druhé glykosidové mezi těmito jednotkami, které jsou tvořeny kyslíkovým atomem. Vazby vycházející z kyslíků zaujímají tvar písmene V a umožňují rotaci navázaných složek až o 360°. Tato volnost by molekule umožnila zaujímat nespočet tvarů, ovšem je dokázané, že HA preferuje jen určité tvary. Nukleární magnetická rezonance potvrdila přítomnost uspořádané struktury, kde je každý disacharid otočen o 180° vůči okolním. Ve fyziologickém roztoku základní osu molekuly zpevňuje kombinace několika faktorů. Zaprvé je to stabilní struktura disacharidu, zadruhé vnitřní vodíkové vazby a zatřetí interakce s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy vytvářejí nepolární relativně hydrofobní část, zatímco skupiny na ekvatoriálních vazbách jsou polárnější, tzn. hydrofilnější. Tyto strukturní předpoklady vedou ke vzniku tvaru dvojnásobné šroubovice. (Hascall a Laurent, 1997; Scott, 1998)

### **Terciární struktura**

Uspořádaná sekundární struktura HA na sobě nese hydrofobní úsek představovaný 8 uhlíkovými atomy. To znamená, že tato v základu hydrofilní molekula má amfifilní charakter. Tyto hydrofobní úseky se ve vodném prostředí shlukují, aby dosáhly menší styčné plochy s rozpouštědlem.

Na vzniku organizované terciární síťovité struktury se podílejí jak přitažlivé hydrofobní interakce a vodíkové můstky mezi karboxylovými a acetamino skupinami, tak elektrostatické odpudivé síly negativních nábojů. Interakce držící síť pohromadě jsou poměrně slabé, takže shlukování a disociace jsou závislé na vnějších podmínkách a teplotě. Stejnými interakcemi má HA schopnost reagovat s ostatními glykosaminoglykany.

Na této úrovni se projevují rozdíly v molekulové hmotnosti HA. Vysokomolekulární HA vytváří již v malých koncentracích (1 µg/ml) nekonečnou síť, každá jednotlivá molekula je spojena s ostatními. Naopak síť tvořena nízkomolekulární HA je ostrůvkovitá. (Scott, 1998)

#### **4.1.2 Vlastnosti HA**

HA v roztoku vykazuje elastické i viskózní vlastnosti. Při koncentraci 10 mg/ml má schopnost zvýšit viskozitu vody až 5000×. (Slíva a Minárik, 2009)

Trojrozměrná síť HA vytváří póry, které mají vliv na prostup velkých molekul, zatímco malé molekuly, např. voda, živiny a elektrolyty mohou strukturou volně procházet. Molekuly s velkou hmotností, např. proteiny jsou částečně vyloučeny z prostoru vyplněného HA sítí. To vede k tomu, že kompartmenty neobsahující HA, dosahují vyšší koncentrace těchto molekul. HA řetězce se neustále v roztoku pohybují, tedy mění velikost účinných pórů, to znamená, že všechny molekuly mohou projít skrz, ale s různým stupněm zpomalení závisícím na jejich hydrodynamickém objemu. (Hascall a Laurent, 1997)

### 4.1.3 Metabolismus HA

Metabolismus HA je velmi dynamický proces. Některé buňky aktivně syntetizují a katabolizují HA po celou dobu své existence. Syntéza a katabolismus HA jsou obvykle vyvážené, což umožní udržet konstantní koncentraci v tkáni. Biologický poločas HA se v různých tkáních liší, např. v chrupavce je 2 - 3 týdny, v kůži méně než den, v krvi několik minut. Za den se metabolicky odstraní a obmění téměř 1/3 celkového množství HA. (Hascall a Laurent, 1997)

#### **Syntéza**

Na syntéze HA se podílí mnoho typů buněk, nejaktivnější jsou ovšem fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty. (Slíva a Minárik, 2009) Tyto buňky obsahují ve větší míře hyaluronan-syntázy, enzymy syntetizující velké lineární polymery z opakujících se disacharidových jednotek. Střídavě připojují aktivní formy UDP-glukuronové kyseliny a UDP-*N*-acetylglukosaminu do rostoucího řetězce. (Hascall a Laurent, 1997)

Syntéza je regulována celou řadou vnějších podnětů a signálních molekul. Stimulaci zajišťuje i transformující růstový faktor (TGF-beta1), který podporuje vznik hyaluronan-syntázy zvýšením exprese její mRNA. (Slíva a Minárik, 2009)

V kůži mají vliv na syntézu HA hormony, cytokiny a růstové faktory. Retinová kyselina stimuluje syntézu HA a zdvojnásobuje její obsah v epidermis. Hydrokortison ve všech koncentracích inhibuje katabolismus HA, ve farmakologických dávkách inhibuje také její syntézu. (Tammi a Tammi, 1998)

Vlivem lidského chorionického gonadotropinu se v matrix okolo buněk obklopujících vajíčko začne kumulovat HA, dokud nedosáhne dvacetinásobku původního objemu, čehož docílí těsně před ovulací. HA se tak stane převládající složkou této matrix. Syntéza je řízená na úrovni transkripce mRNA pro hyaluronan-syntázu-2. (Salustri a Fulop, 1998)

## **Katabolismus**

Existují dva významné způsoby katabolismu HA. Jeden slouží k odbourávání HA intracelulárně, kdy je internalizovaná do buněk a degradovaná v lysozomech. Druhý mechanismus vede k tomu, že extracelulární HA je převedena do oběhu a odtud vychytána játry, ledvinami a lymfou. Méně významná je cesta neenzymatická. Konečnými produkty enzymatické degradace jsou glukuronová kyselina a *N*-acetylglucosamin.

### 1. Přímé vychytávání

V tkáních s nízkou lymfatickou drenáží je HA degradována přímo v buňkách. Oligosacharidy HA vstupují do buněk pinocytózou, zatímco větší molekuly vyžadují vazbu na membránové receptory. Takovým receptorem se schopností vázat a internalizovat HA je CD44. (Garg a Hales, 2004b) HA je nejdříve navázána na buněčný povrch, poté internalizována a přivedena do lysozomu. V posledním kroku je rozštěpena kyselými hydrolázami. (Underhill, 1992) Tohoto procesu se účastní hyaluronidáza typu 1 (HYAL-1) štěpící molekuly na tetrasacharidy, jež jsou následně rozloženy  $\beta$ -glukuronidázou a  $\beta$ -*N*-acetylglukozaminidázou na základní jednotky. Tyto jednotky mohou být definitivně katabolizovány v pentózovém cyklu nebo recyklovány. (Slíva a Minárik, 2009)

### 2. Katabolismus přes lymfatický systém

Po uvolnění z matrix polymer HA vstupuje do lymfatického systému. Metabolická degradace probíhá hlavně v lymfatické tkáni, kudy HA prochází z periferních tkání do krevního řečiště. Zbývající HA o menší molekulové hmotnosti vstoupí do krve, ze které je více jak 80% rychle odstraněno jaterními sinusoidami a přibližně 10% vyfiltrují ledviny. Pro vychytání HA v těchto orgánech jsou nezbytné receptory HARE a LYVE-1. (Garg a Hales, 2004b)

### 3. Neenzymatická cesta

Štěpení řetězců může být vyvoláno i nescifickými vlivy. Jedním z nich je ozařování, další působení volných radikálů, fyzikální namáhání, změny pH. Jako důsledek normální aerobní respirace vznikají v buňkách reaktivní kyslíkové částice, u těchto byl zaznamenán vliv na štěpení HA: hydroxylové radikály, superoxid, chlornan a částice odvozené od peroxinitritu. (Garg a Hales, 2004b)

## **Katabolismus a hyaluronidázy**

Je známo více typů hyaluronidáz, jednou z nich je již dříve zmíněná HYAL-1. Kromě buněčných lysozomů se nachází v plazmě a lidské moči. Dále je HYAL-1 exprimována řadou tkání, ačkoli je enzymaticky aktivní pouze pod pH 5,5. HYAL-1 získaná z moči pocházející z rakovinou postiženého močového měchýře vykazuje mírně odlišné pH pro aktivaci než HYAL-1 izolovaná z moči zdravých lidí, což je zapříčiněno odlišnými posttranslačními modifikacemi jejího polypeptidového řetězce.

HYAL-2 je exprimována téměř ve všech tkáních, kromě dospělého mozku. HYAL-2 vyvíjí optimální aktivitu při pH 4. Nachází se jak v lysozomech, tak v membránové frakci jako protein vázaný s GPI. HYAL-2 je aktivně zahrnuta v hydrolýze extracelulární HA sítě (přednostně před vychytáním HA) a tedy může hrát důležitou roli v remodelaci tkáně a buněčné migraci. (Garg a Hales, 2004b)

Třetím typem hyaluronidázy je PH-20. Ta má nezastupitelnou úlohu během procesu oplodnění. Okolo oocyty se nachází podpůrné buňky obklopené matrix bohatou na HA, tato hmota tvoří selektivní bariéru, která vylučuje z konkurence funkčně nebo enzymaticky defektní spermie. Pro úspěšné oplodnění spermie musí prostoupit skrz tuto matrix. Umožňuje jim to přítomnost PH-20 navázané na plazmatické membráně hlaviček spermií. Jakmile se dostane do přímého kontaktu s HA, dojde k jejímu našťipání a to umožní spermii během pár minut prostoupit do vajíčka. (Salustri a Fulop, 1998)

#### 4.1.4 Význam HA

##### **Výskyt**

HA je přítomná u všech obratlovců a také v pouzdře některých kmenů Streptokoků, které pravděpodobně převzaly enzymatickou výbavu z hostitelských obratlovců. HA je hlavní složkou extracelulární hmoty, sklivce lidského oka, synoviální tekutiny kloubů nebo hmoty produkované buňkami obklopujícími oocyt (viz výše). V chrupavce vytváří lešení pro navázání velkých proteoglykanů chondroitin sulfátu. Největší množství HA se vyskytuje v kůži (50 % celkového množství). Nejvyšší koncentrace HA se vyskytuje v kohoutích hřebíncích (více jak 7,5 mg/ml). (Hascall a Laurent, 1997) Koncentrace se v různých tkáních lidského těla značně liší. Celková hmotnost HA v těle 70kg osoby je přibližně 15 g. (Garg a Hales, 2004b)

##### **Vývoj tkání**

Některé buněčné typy se vyznačují vysoce hydratovanou pericelulární maticí tvořenou HA. Tato hmota poskytuje prostředí vhodné pro řadu základních fyziologických procesů, zároveň ovlivňuje chování buněk v mnoha ohledech. Za prvé: hraje důležitou úlohu v buněčném dělení. Aktivita hyaluronan-syntázy kolísá s buněčným cyklem s vrcholem v mitóze. Nahromaděná HA poskytuje hydratované mikro-prostředí, které usnadňuje zakulacování buněk a podporuje jejich oddělení. Za druhé: usnadňuje buněčnou migraci. HA vytváří hydratované „cesty“ umožňující buňkám penetrovat přes buněčné a vláknité bariéry. Tato funkce je regulována změnou stupně navázaných proteoglykanů. Pokusy *in vitro* dokazují, že pohyblivost buněk závisí na přítomnosti HA a v případě její degradace popř. blokády receptorů dochází k jejímu utlumení. Za třetí: HA má vliv na diferenciaci. V případě, že se díky proliferaci a migraci shromáždí v daném místě dostatek

buněk, změní se interakce jejich povrchu s HA, v důsledku dochází ke snížení její koncentrace. Toto přechodné stádium aktivně podpoří buněčné interakce nezbytné pro diferenciaci. (Toole, 1998)

### **Strukturní složka**

HA je také hlavní složkou vyplňující extracelulární prostory chrupavky, dermis a od mezenchymu odvozených tkání. Naopak minimální strukturní vliv má v epitelových tkáních, kde jsou buňky uspořádané těsně u sebe a vyšší koncentrace HA by mohly zvětšovat extracelulární prostory, což by narušilo soudržnost epitelu a ohrozilo jeho bariérovou funkci. Většina jednoduchých epitelů exprimuje minimální nebo nulové množství HA. (Tammi a Tammi, 1998)

### **Kůže**

Zřejmá úloha HA je udržení určitého extracelulárního prostoru mezi keratinocyty ve spodních vrstvách epidermis. Tím je usnadněna difuze živin a odpadních látek k vrchnějším vrstvám. Tendence tohoto prostoru se zvětšovat díky přítomnosti vysoké koncentrace HA může destabilizovat desmozomy mezi přilehlými buňkami a zvýšit tak jejich obrat.

HA efektivně vychytává volné radikály. V kůži proto může vychytávat reaktivní kyslíkové částice vytvářené ultrafialovým zářením. Rychlý obrat HA může pomoci k odstranění a vyčištění škodlivých látek z epidermis. HA také usnadňuje pohyb buněk imunitního systému skrz pokožku, díky vytvoření propustnějších extracelulárních prostor. (Tammi a Tammi, 1998)

### **Kancerogeneze**

Většina zhoubných nádorů obsahuje zvýšené množství HA, těmto vysokým hladinám odpovídá nízká diferenciaci buněk. Dochází k tomu vlivem zvýšené produkce HA tumorem samotným nebo interakcí mezi nádorovými a obklopujícími stromálními buňkami, která u nich spustí zvýšenou tvorbu HA. HA zlepšuje adhezi tumoru a migraci, také vytváří ochrannou bariéru okolo nádorových buněk a tím jim napomáhá uniknout imunitnímu dohledu. Na zvířecích modelech se prokázalo, že protilátky proti HA receptorům, hyaluronidázám a HA oligomerům efektivně inhibují růst nádoru a šíření metastáz. (Toole, 1998; Murai a kol., 2003)

Ačkoliv HA existuje za fyziologických podmínek v extracelulární matrix především jako vysokomolekulární, ve spojitosti s určitými patologickými procesy (př. zánět, nádor) se nachází v mnohem nižších molekulových hmotnostech. Nízkomolekulární fragmenty mohou spouštět různé biologické události jako buněčná proliferace,

angiogeneze, aktivace transkripčních faktorů a vyznačují se mnohem silnější účinností u těchto procesů než vysokomolekulární HA. (Murai a kol., 2003)

## **Hojení**

HA je dále významně zapojena do procesu hojení jak ve fázi granulace tak reepitelizace. V průběhu granulace podporuje množení fibroblastů a také novotvorbu kolagenu typu I a III. Tyto nové buňky pak mají schopnost vyplnit chybějící prostor v tkáni. Studie také potvrdily, že PDGF-B (platelet derived growth factor) zvyšuje mitózu pouze u těch fibroblastů, které mají na svých receptorech CD44 navázanou HA. K reepitelizaci přispívá HA tak, že v případě narušení struktury kůže nebo sliznice dojde k místnímu zvýšení její produkce a depozice v extracelulárních prostorech. Přispívá k migraci a proliferaci keratinocytů a buněk ve stratum germinativum. Defekty se zacelí vmigrovanými buňkami. Z pokusů na zvířatech vyplývá, že HA výrazně usnadňuje hojení a omezuje vznik jizev. HA aplikovaná ve formě krému u lidí zkrátí čas potřebný k hojení ran, popálenin a odřenin a navíc minimalizuje tvorbu exsudátu. (Slíva a Minárik, 2009)

### **4.1.5 Receptory**

Existují důkazy o tom, že HA plní odlišné funkce jako signální molekula v závislosti na molekulové hmotnosti. V některých případech se vysokomolekulární a nízkomolekulární HA váží na stejné receptory, ale spouští odlišné procesy. HA interaguje s různými buněčnými typy a různými extracelulárními molekulami souhrnně nazvanými hyaladheriny. Hyaladheriny jsou zahrnuty v mezibuněčných interakcích, interakcích mezi buňkami a matrix i clearance HA z krve a tkání. Receptory buněčného povrchu jsou kromě CD44 (detailně popsán v kapitole 4.2): RHAMM, TLR4, layilin, PH-20, LYVE-1 a HARE. (Garg a Hales, 2004c)

#### **RHAMM**

Receptor for HA-mediated motility (RHAMM) je protein napojený na membránu (neobsahuje tedy transmembránovou doménu) o velikosti 59 - 80 kDa. Bylo detekováno nejméně pět přirozeně se vyskytujících sestřihových isoform. RHAMM je exprimován většinou buněčných typů a jeho hlavní funkcí jako odpověď na navázanou HA je zprostředkování adheze a buněčné pohyblivosti. RHAMM se vyskytuje v řadě struktur jako buněčný povrch, cytoskelet, mitochondrie nebo jádro. RHAMM je schopen vázat jak vysokomolekulární HA polymery tak fragmenty. Nadměrná exprese RHAMM způsobí buněčné změny. (Garg a Hales, 2004c) Aktivovaný receptor zvyšuje fosforylací tyrozinu u dalších proteinů včetně klíčových složek pro adhezi. (Toole, 1998) Navíc RHAMM



urychluje G<sub>2</sub> a M fázi buněčného cyklu a podporuje novotvorbu cév. (Slíva a Minárik, 2009)

## **TLR4**

Toll-like receptor 4 (TLR4) patří do skupiny interleukin-1 receptorů. TLR4 je široce zastoupen v tkáních včetně srdce, mozku, jater a ledvin. TLR obecně jsou zodpovědné za aktivaci monocytů, makrofágů, dendritických buněk a tedy jsou součástí vrozené obranyschopnosti proti bakteriálním infekcím. Nízkomolekulární HA se váže na TLR4 a účastní se tím dozrávání dendritických buněk. TLR obsahují extracelulární doménu s úseky bohatými na leucin, jednoduchou transmembránovou doménu a cytoplazmatickou doménu se signální částí homologní k interleukinu-1. (Garg a Hales, 2004c)

## **Layilin**

Layilin je exprimován ve většině tkání zahrnujících vaječníky, srdce, plíce, ledviny, mozek, játra a prsní tkáň. Hlavní ligand pro tento receptor je HA (nikoli žádné další glykosaminoglykany). Zajímavé je, že extracelulární HA-vazebná doména nemá homologii s jinými HA-vazebnými proteiny jako CD44, RHAMM. (Garg a Hales, 2004c)

## **PH-20**

PH-20 váže a katalyzuje HA jako hyaluronidáza, ale také plní úlohu receptoru a rozpoznává zónu pellucidu obklopující oocyt. PH-20 je také produkována dalšími reprodukčními orgány a některými fibroblasty. V prsní tkáni a ženských pohlavních orgánech hladina osciluje s estrogenním cyklem. Abnormální exprese PH-20 byla zaznamenána u některých typů nádorů. (Garg a Hales, 2004c)

## **LYVE-1**

The lymphatic vessel endothelial HA receptor-1 (LYVE-1) byl poprvé identifikován jako základní protein vychytávající HA na lymfatickém endotelu. Na základě struktury byl zařazen spolu s CD44 do skupiny Link proteinů ale, přestože mají podobné vazebné regiony, LYVE-1 přednostně váže větší HA fragmenty než CD44. (Garg a Hales, 2004c)

## **HARE**

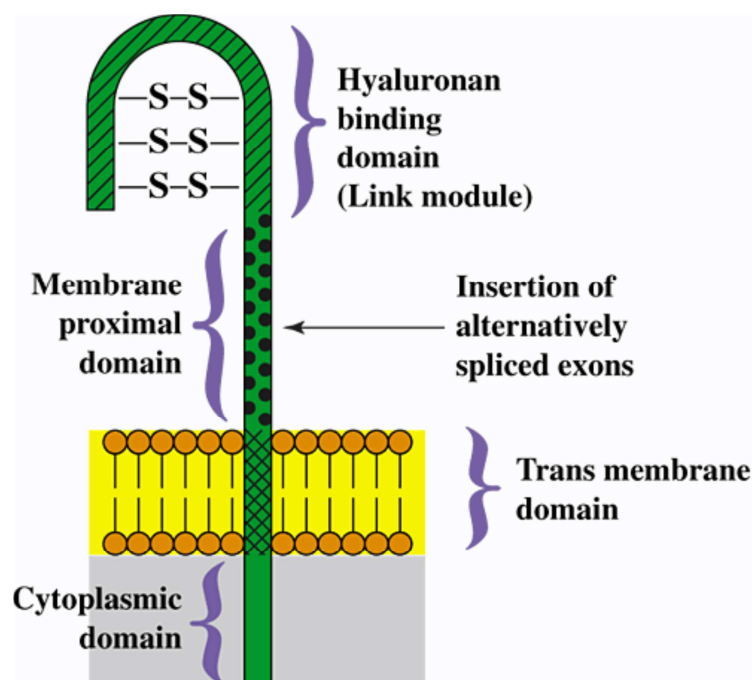
Glykoprotein HARE (hyaluronan receptor for endocytosis) byl poprvé identifikován v jaterním endotelu. Byly rozpoznány dvě formy 175 kDa a 300 kDa. Spolu s LYVE-1 slouží jako receptory pro endocytózu a degradaci HA. (Garg a Hales, 2004c)

## 4.2 CD44

CD44 patří do skupiny proteinů nazývaných Clusters of Differentiation (CD) nalezených na povrchu bílých krvinek. (Underhill, 1992) CD44 je široce distribuovaný glykoprotein, který je kódován jediným genem, ale exprimován v mnoha isoformách. (Toole, 1998) CD44 je přítomen na většině buněčných typů, je zapojen do řady fyziologických i patologických procesů a představuje hlavní hyaladherin. (Thorne a kol., 2004) Exprese CD44 je zvýšená v důsledku transkripční aktivace, která nastane po působení prozánětlivých cytokinů např. IL1 (interleukin 1), TNF $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ), růstové faktory jako EGF (epidermální růstový faktor). (Garg a Hales, 2004d)

### 4.2.1 Struktura

CD44 je polymorfní skupina proteinů v rozsahu velikostí 80 - 200 kDa s doménovou strukturou (Obr. 2). Transkripty podléhají alternativnímu sestřihu, který ovlivňuje převážně extracelulární strukturu v blízkosti membrány. Heterogenita je také zčásti dána posttranslačními modifikacemi, které se liší v závislosti na buněčném typu a růstových podmínkách.



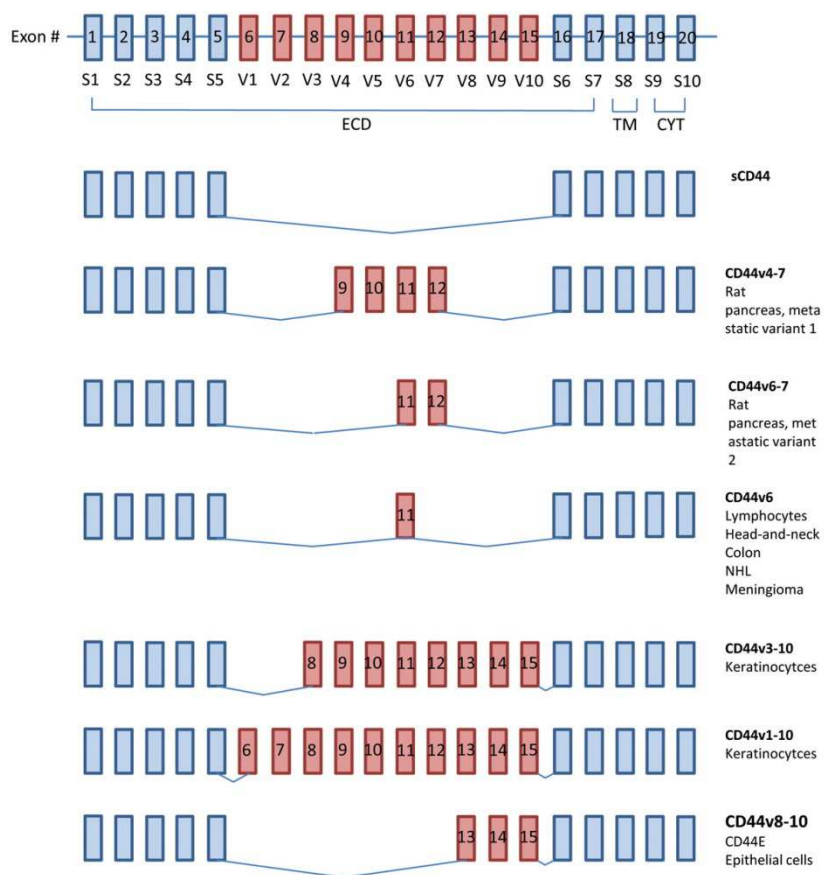
Obr. 2 Struktura receptoru CD44 znázorňující čtyři hlavní domény, tj. hyaluronan vázající, blízko membráně, transmembránovou a cytoplasmatickou. Převzato z: (Toole, 1998)

## **Doména vázající HA**

Prvních pět exonů CD44 kóduje amino-terminální globulární doménu, také označovanou jako extracelulární doména (ECD). Tato doména obsahuje vazebné místo pro několik složek extracelulární matrix včetně HA a dalších glykosaminoglykanů. Afinita CD44 pro navázání ligandů je ovlivněna četnými negativními a pozitivními vlivy z ostatních částí molekuly, např. glykosylace, alternativní sestřih, dimerizace, shlukování v plazmatické membráně a celistvost cytoplazmatické domény. Glykosylace je velmi variabilní a může dosahovat vysokého stupně. Určitá data podporují spojitost mezi vazbou HA a shlukováním CD44. Pro stabilitu této struktury jsou zásadní čtyři cysteiny, které vytvářejí disulfidické můstky. (Ponta a kol., 2003; Toole, 1998)

## **Oblast alternativního sestřihu**

Jedná se o část molekuly ležící mezi HA vazebnou doménou a transmembránovou doménou, v angličtině je označována jako „stem“ region. V této oblasti se nachází 10 variantních exonů (Obr. 3), které svými kombinacemi dávají vzniknout odlišným isoformám CD44. (Toole, 1998) Nejmenší isoforma CD44 je nazvaná standardní (CD44s) nebo vzhledem k tomu, že je převážně exprimovaná na hematopoetických buňkách také zkracována jako CD44H. (Garg a Hales, 2004d) CD44s je oddělena od plazmatické membrány krátkým úsekem 46 aminokyselin, který může být rozšířen sekvencemi kódovanými variantními exony. Zahrnutí těchto sekvencí do struktury je částečně závislé na mitogenních signálech regulujících alternativní sestřih. Větší isoformy se vyskytují v rakovinných buňkách a v proliferujících buňkách. (Ponta a kol., 2003)



Obr. 3 **Oblast alternativního sestřihu CD44.** CD44 mRNA je kódována 20 exony. 10 z nich je regulováno alternativním sestřihem (v1 – v10). Na obrázku je ukázáno několik příkladů isoformů vyskytujících se na odlišných buňkách. *Převzato z:* (Weidle a kol., 2011)

### Transmembránová doména

Transmembránová doména se skládá z 23 hydrofobních aminokyselin a je v podstatě strukturně neměnná. Stabilizuje CD44 v plazmatické membráně a podporuje jeho shlukování. Membránová oblast může být zodpovědná za spojitost CD44 s lipidovým raftem. Vliv lipidů a okolních membránových proteinů interagujících s doménou ovlivňuje vazbu ligandů na receptor. (Ponta a kol., 2003; Thorne a kol., 2004; Garg a Hales, 2004d)

### Intracelulární doména

Část receptoru zasahující do cytoplazmy se nazývá intracelulární doména (ICD). Z hlediska struktury je vysoce konzervativní, díky čemu se dá tvrdit, že má rozhodující vliv na funkci CD44. Téměř všechny isoformy CD44 neobsahují v této doméně exon 19. (Thorne a kol., 2004) V případě, že je exon 19 přítomen, cytoplazmatický konec je

ukončen Arg-294 a nevykazuje žádnou kapacitu pro interakci se složkami cytoskeletu, i když mu zůstane zachovaná možnost fosforylace Ser-291. Ve větším zastoupení se nachází isoforma zakončená exonem 20, která obsahuje 72 aminokyselin dlouhý cytoplazmatický konec, umožňující interakci s dalšími proteiny. (Garg a Hales, 2004d) CD44 isoforma s exonem 19 působí jako výrazný inhibitor klasické CD44 tím, že soutěží o navázání ligandu, ale postrádá informační charakter. (Thorne a kol., 2004)

Proteiny vázající se na několik motivů ICD zprostředkovávají spojení CD44 s cytoskeletem. Jedním z takto spolupracujících proteinů je ankyrin. Ankyrin umožňuje zprostředkování kontaktu s cytoskeletálním spektrinem a toto vzájemné působení má vliv na adhezi a motilitu buňky. Další je skupina ERM proteinů (ezrin, radixin a moesin). ERM proteiny propojují CD44 s aktinem a dalšími proteiny. ERM mají vliv na migraci a tvar buňky. Fosforylace a defosforylace serinů (Ser) v ICD vyvolaná protein kinázou C (PKC) zvyšuje navázání ERM. Také ERM mohou svou fosforylací tyrozinu nebo threoninu zvýšit vaznost na CD44. (Ponta a kol., 2003)

### **Posttranslační modifikace**

Jako jiné transmembránové proteiny i CD44 podléhá značným posttranslačním modifikacím včetně glykosylace, fosforylace, palmitoylace a některé isoformy CD44 na sebe váží heparan-sulfátové nebo chondroitin-sulfátové řetězce. (Garg a Hales, 2004d) **Fosforylace.** ICD je fosforylována na Ser325 až u 40% CD44. **Palmitoylace.** Na CD44 je reverzibilně navázán zbytek kyseliny palmitové. Očekávané vazebné místo je Cys286 nebo 295. Acylace zlepšuje spojení CD44 s ankyrinem a reguluje spojení s ERM proteiny. **Modifikace proteolytickým procesem.** ECD se podrobuje regulaci proteolytickým štěpením. Dochází ke vzniku několika štěpných produktů s různou funkcí. **Glykosylace.** Buněčné typy se výrazně liší ve své schopnosti vázat HA, zdá se, že tyto odlišnosti odrážejí různou receptorovou glykosylaci. (Thorne a kol., 2004)

### 4.2.2 Aktivace

Všechny aktivační mechanismy musí vzít v potaz strukturní heterogenitu CD44 proteinu. CD44 může interagovat s rozpustnými extracelulárními složkami a s extracelulární hmotou. Tato schopnost může být regulována zevnitř buňky, například určitými modifikacemi CD44 nebo vzestupem jeho množství, což zvýší pravděpodobnost shluknutí. Tyto interakce vyúsťují vznikem intracelulárního signálu a spouští buněčnou odpověď. (Ponta a kol., 2003)

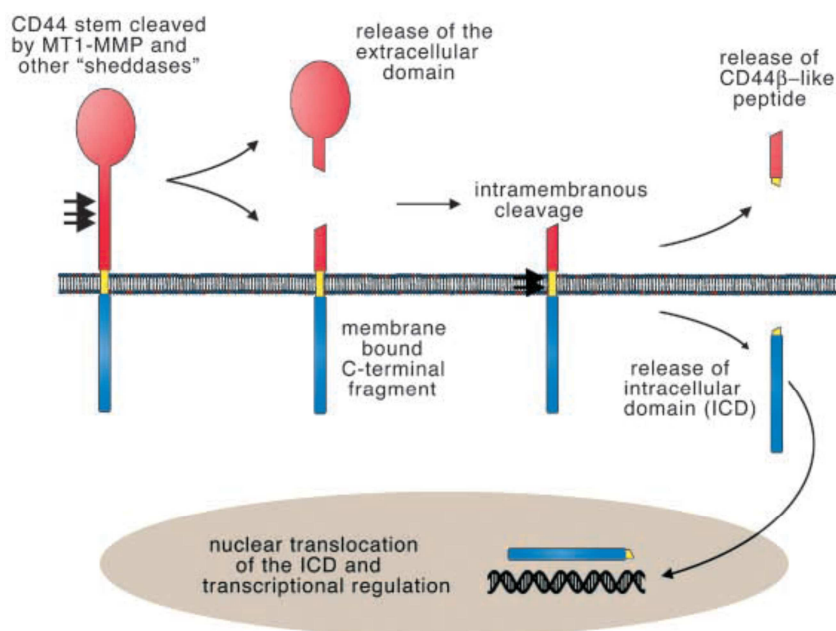
## Fosforylace a defosforylace Ser

U buněk v klidovém stádiu nacházíme fosforylovaný Ser325. Po navázání ligandu na CD44 se aktivuje PKC, která dvojitým regulačním vlivem vede k defosforylaci Ser325 a současně fosforylaci Ser291. Celková hladina fosforylace tedy zůstává stejná. Přepínání mezi těmito dvěma stavy má výrazný vliv na funkci receptoru. Fosforylační místo Ser291 je lokalizováno těsně vedle vazebného místa pro ERM proteiny. Navázání fosfátu na Ser291 vede ke změně náboje, která je následována snížením vazby ERM proteinů. *In vivo* je obrat komplexu CD44-ezrin velmi dynamický. (Legg a kol., 2002)

## Štěpení CD44

CD44 podléhá v prvním kroku sekvenčnímu proteolytickému štěpení v ECD. Štěpení zajišťuje enzym metaloproteáza. Z molekuly se uvolní extracelulární fragment, který je sekretován do okolního prostředí (Obr. 4). Odštěpení ECD je regulováno řadou okolností jako aktivace PKC, influx extracelulárních vápenatých iontů, malými guanosinotriphosfatázami. Tento krok je nezbytný pro následující proces štěpení.

V další fázi dochází působením presenilinu-1 nebo  $\gamma$ -sekretázy k štěpení v transmembránové doméně. Z membránově navázaného C-terminálního fragmentu o velikosti 25 kDa se štěpením oddělí 12kDa fragment ICD, který se následně uvolní do cytoplasmy. Zbytek nazvaný CD44 $\beta$ -like peptid se uvolní z buňky a jeho možný úkol je podpora odstraňování transmembránové domény. (Thorne a kol., 2004; Okamoto a kol., 2001)



Obr. 4 **Štěpení CD44 na frakce.** Jsou zde znázorněna dvě místa molekuly podléhající štěpení a následné uvolnění extracelulární frakce, intracelulární frakce a CD44 $\beta$ -like peptidu. *Převzato z:* (Thorne a kol., 2004)

## **Translokace CD44 ICD do jádra a vliv na transkripci**

CD44 ICD dále plní roli signální molekuly a přesouvá se do jádra, kde aktivuje transkripci prostřednictvím 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsivního elementu, který se nachází v mnoha genech zahrnutých v rozmanitých buněčných procesech. CD44 ICD sama o sobě není schopna vyvolat transkripční odpověď, ale umocňuje ji díky funkční kooperaci s transkripčními koaktivátory, CREB-vazebným proteinem a p300. Jedním z cílových genů je gen pro CD44 samotnou. Díky tomu podporuje ICD rychlejší obměnu CD44 důležitou pro efektivní migraci. (Okamoto a kol., 2001)

## **Interakce s cytoskeletem**

U buněk byl zjištěn významný výskyt CD44 na aktinu cytoskeletu. Protože CD44 ICD neobsahuje vazebné místo pro aktin, musí být tato interakce zprostředkována proteiny vázajícími se na cytoskelet, tj. ERM proteiny a merlinem. Na CD44 ICD můžeme nalézt vazebnou oblast pro tyto proteiny v blízkosti transmembránového úseku. ERM proteiny jsou přirozeně v neaktivní podobě, po navázání CD44 ICD dochází k jejich fosforylaci a aktivaci, tedy „otevření“ vazebné oblasti pro aktin. Naopak merlin vázající CD44 se aktivuje defosforylací. Schopnost ERM/merlin proteinů měnit své aktivní a neaktivní konformace dohromady s jejich vzájemným soutěžením o vazebné místo vede k vytváření a rušení vazeb CD44 s cytoskeletem a významně tak podporuje migraci. (Thorne a kol., 2004) Aktivace merlinu způsobuje značnou reorganizaci aktinového cytoskeletu a zároveň blokuje Ras aktivaci. (Ponta a kol., 2003)

## **CD44 jako koreceptor**

Byly zaznamenány dvě koreceptorové funkce CD44. Za prvé CD44 může vázat růstové faktory, cytokiny a matrixové metaloproteinázy, a tedy nepřímo podporuje signální události modulací aktivity, afinity nebo lokalizované koncentrace signálních faktorů. Za druhé upravuje funkci receptorů pro růstové faktory (Thorne a kol., 2004) a tyrozin-kinázové receptory. Tyto receptory prostupují plazmatickou membránou a jejich cytoplazmatická doména má katalytickou aktivitu. Aktivované domény na sobě nesou vazebné místo pro mnoho složek intracelulárních signálních drah. Aktivace těchto receptorů je velmi komplexní a většinou je zapotřebí více spouštěcích asociací. Právě CD44, který samotný postrádá kinázovou doménu, dokáže svým působením vést k aktivaci tyrozin-kinázového receptoru. Tato signalizace je důležitá například pro receptor pro hepatocytární růstový faktor. (Ponta a kol., 2003)

### 4.2.3 Interakce s HA

CD44 patří do podskupiny hyaladherinů obsahujících tzv. link doménu. V oblasti této domény jsou dva definované regiony aminokyselin zodpovědné za vazbu HA. V případě mutace na těchto regionech dochází k znatelnému snížení schopnosti vázat HA. (Garg a Hales, 2004d) Na molekulární úrovni CD44 ECD váže sekvenci šesti cukerných jednotek HA. Pro interakci je optimální neutrální pH. Zvýšení iontové síly média zvyšuje vazbu HA, je to pravděpodobně způsobeno neutralizací iontového odporu mezi negativně nabitým CD44 a HA. (Underhill, 1992)

Malé HA oligosacharidy 6 - 36mery, nikoli velké polymery, efektivně zvyšují štěpení CD44 a podporují migraci. Malé dimery - tetramery a také molekuly nad 36 kDa mají minimální vliv na štěpení CD44. (Murai a kol., 2003)

Afinita vazby HA s CD44 je řízena intracelulárními i extracelulárními signály. Ovlivňují ji mitogenní podněty, glykosylace ECD, fosforylace Ser nebo typ isoformy. Navázání HA na buněčný povrch je multivalentní interakce, kde mnoho receptorů CD44 může vázat jedinou HA. Díky tomu dochází ke shluknutí několika CD44 k sobě a takto vzniklý útvar opět vykazuje větší vazebnou afinitu. Modulace afinity je důležitá pro migraci v hmotě bohaté na HA, pro adhezi a přestup leukocytů. (Ponta a kol., 2003; Underhill, 1992) Štěpení CD44 ovšem není nezbytně následováno migrací buněk, jak dokazuje aktivace receptoru pomocí PMA. (Murai a kol., 2003)

### **Internalizace HA**

Některé druhy buněk mají schopnost vychytávat HA, internalizovat a následně degradovat. V případě narušení tohoto děje dochází k patologické kumulaci HA v extracelulárních prostorech (Thorne a kol., 2004), což může být zásadní v mnoha situacích. Například v plicní tkáni poškozuje správný přestup plynů. Řádná degradace HA je nezbytná pro správnou embryogenezi a vývoj orgánů (zde je množství exprimovaného CD44 nepřímo úměrné množství HA). (Underhill, 1992)

### 4.2.4 Význam, funkce

Funkce CD44 můžeme rozdělit do dvou kategorií. Jedna je tvořena efekty, které zprostředkuje CD44 jako HA-receptor, druhá, která může nebo nemusí být závislá na vazbě jiného ligandu. (Garg a Hales, 2004d)

### **Shromažďování enzymů a substrátů**

CD44 může vychytávat a koncentrovat faktory důležité pro růst a zprostředkovat tak kontakt substrátů a enzymů navzájem. Tato funkce jakési platformy je důležitá pro



procesy jak na dlouhou tak krátkou vzdálenost, protože v obou případech je stěžejní dostat do blízkosti dostatek vzájemně reagujících molekul. (Ponta a kol., 2003)

### **Obklopení buněk pericelulární hmotou**

Některé typy buněk se vyznačují silnou okolní vrstvou HA, která zajišťuje dostatečnou vlhkost. CD44 zprostředkovává navázáním HA udržení této hmoty v potřebném množství. I když HA je na povrchu přichycena i jinými mechanismy, vazba na CD44 je primární a je zodpovědná za celkovou organizaci pericelulární matrix. Například v chrupavce tvoří matrix unikátní strukturní složku, která chrání buňky a přispívá k charakteristickým vlastnostem diferencované tkáně. (Toole, 1998; Garg a Hales, 2004d)

### **Morfogeneze a diferenciacie epidermis**

Mnoho zárodečných tkání je bohatých na HA, která jim poskytuje prostor a poddajnost pro další vývoj. CD44 je důležitý především pro diferenciaci epidermis. V raných fázích vývoje je kůže tvořená dvěma jednoduchými vrstvami, jež neobsahují žádný CD44. Tento receptor se objeví až po aktivaci jeho genu v pozdější fázi diferenciacie. (Tammi a Tammi, 1998)

### **Prostup lymfocytů do tkání**

CD44 usnadňuje vyžrávání, adhezi a zároveň zprostředkovává přestup aktivovaných T-lymfocytů z krve do tkáně, ve které probíhá zánětlivý proces. (Slíva a Minárik, 2009)

CD44 slouží jako marker nezralých T-lymfocytů a usnadňuje jejich přestup a usazení v kostní dřeni. CD44s, ale ne CD44v6 nebo CD44v7, má hlavní účinek na vstup progenitorových buněk do thymu. V pozdějších stádiích vyžrávání T-lymfocytů působí CD44 jako pomocná molekula, spouští a podporuje TCR/CD3-komplexem zprostředkovanou signální transdukcii thymocytů. (Rajasagi a kol., 2009) Další funkcí CD44 je zprostředkování prostupu lymfocytů do středních lymfatických tkání. Tento děj je umožněn interakcí střední domény CD44H na lymfocytech s proteiny přítomnými na endotelu cév Peyerových plátů. (Underhill, 1992)

### **Úloha CD44 v patologiích**

CD44 protein má zásadní význam pro správný vývoj a funkci organismu. Byl zaznamenán rozdíl, zda organismus ztratí CD44 v raném vývoji nebo později. V případě

rané embryogeneze je funkce převzata jinými zástupnými proteiny. Procesy závislé na těchto receptorech ovlivňují vývoj orgánů, mnoho imunitních funkcí, krvetvorbu. U myši s vyřazeným genem pro CD44 byly zaznamenány abnormality v migraci myeloidních progenitorů, v kolonizaci kostní dřeně a prostupu lymfocytů do mízních uzlin a thymu. Další narušení funkce vedlo k výrazným deficitům kůže jako opožděná zánětlivá odpověď, zhoršené hojení a růst vlasových folikulů.

Vazba HA na CD44 spouští její metabolismus a tím udržuje její homeostázu. V případě absence CD44 se HA patologicky kumuluje. Tímto mechanismem může CD44 ovlivňovat vazbu buněk k extracelulární matrix. (Ponta a kol., 2003)

CD44 je také zapojen do přímé interakce mezi bakterií a hostitelskou buňkou epitelu. Zasahuje do signálních dějů měnících hostitelskou buňku a zvyšuje její citlivost k infekci. Například *Streptococcus pyogenes* se přichytí na buňku díky svému obalu bohatému na HA, který se naváže na CD44 a spustí kaskádu tyrozinové fosforylace proteinů a následně změní uspořádání cytoskeletu. Dále dojde k poklesu počtu tight junctions, což usnadní vstup bakterie do subepitelové tkáně. (Cywes a kol., 2000)

### **CD44 a rakovina**

Některé typy nádorů se vyznačují vysokou aktivitou hyaluronidázy, která zodpovídá za vznik HA fragmentů schopných indukovat štěpení CD44 a navíc podporovat angiogenezi. Důsledkem štěpení je zlepšení schopnosti migrovat a aktivace nádorových integrinů. (Murai a kol., 2003)

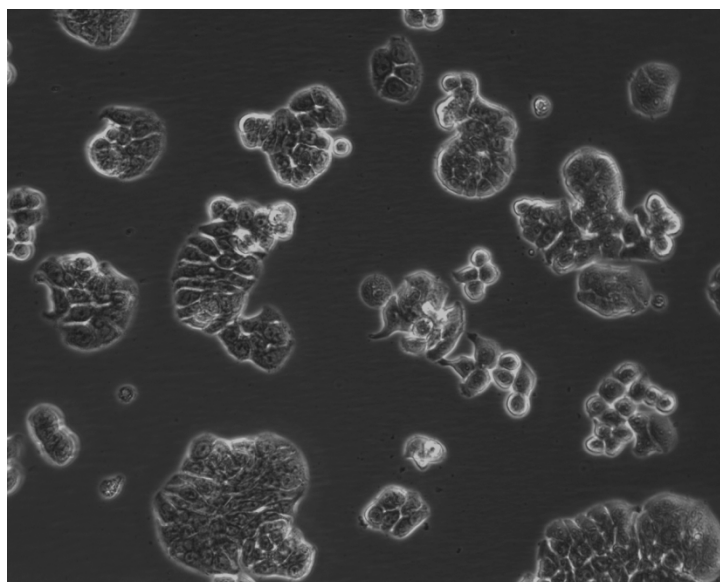
V nádorových buňkách jsou tři procesy řízené CD44: inhibice apoptózy, degradace kolagenu IV a neovaskularizace, každý z těchto procesů je stěžejní pro metastázi. Abnormální exprese CD44 v dané tkáni je spjata s genetickými změnami vedoucími k nádorovému růstu a metastázi. Výzkumy ukázaly, že různé varianty CD44 jsou exprimovány u lidských nádorů a podle typu isoformy se dá odhadnout prognóza. V nádoru prostaty nebo neuroblastomu je naopak absence CD44 příznačná pro horší prognózu. CD44 se dá tedy využít jako diagnostický a prognostický marker rakoviny. (Ponta a kol., 2003)

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Materiál a technické vybavení

#### 5.1.1 Buněčné linie

K většině pokusů byla použita linie lidských nádorových buněk HT-29 (Obr. 5). Tyto buňky byly izolovány v roce 1964 z primárního kolorektálního adenokarcinomu 44-leté ženy. Především jsou využívány jako *in vitro* model pro sledování absorpce, transportu a sekrece střevních buněk. Za standardních kultivačních podmínek tyto buňky rostou ve více vrstvách a jsou nepolarizované a nediferencované. (Fogh a kol., 1977)



Obr. 5 HT-29 200x

Druhým využitým typem buněk byla linie MDA-MB-231, která byla získána v roce 1973 z nádoru prsu ženy. Morfologicky se podobají buňkám epitelu s vřetenovitým tvarem. V *in vitro* kultivaci má tato linie invazivní fenotyp. (Cailleau a kol., 1974) MDA-MB-231 jsou schopny růst na agaróze a vyznačují se vysokou schopností utvářet kolonie. Po aplikaci intravenózní injekcí do ocasní žíly může být využita tato linie v *in vivo* pokusech pro vytvoření experimentálních metastáz u holých myší. (web interval)

## 5.1.2 Chemikálie, roztoky a kultivační média

### KULTIVACE A PŘÍPRAVA BUNĚK

Chemikálie	Zkratka/Poznámka	Výrobce/Dodavatel	Stát
Trypsin/EDTA 10x		Sigma Aldrich	Německo
Phorbol-12-Myristate-13-Acetate	PMA	Sigma Aldrich	Německo
Hyaluronová kyselina 71kDa	HA 71kDa	Contipro	Česká republika
Hyaluronová kyselina 1,57 MDa	HA 1,57MDa	Contipro	Česká republika
Oligosacharid kyseliny hyaluronové	SH 10	Contipro	Česká republika
Dulbecco's modified eagle's medium	DMEM	Sigma Aldrich	Německo
Fetal bovine serum	BOFES	Sigma Aldrich	Německo
L-Glutamin		Sigma Aldrich	Německo
Penicilin/Streptomycin	Pen/Str	Sigma Aldrich	Německo
McCoy's 5A medium		Sigma Aldrich	Německo
RPMI - 1640 medium		Sigma Aldrich	Německo

### KULTIVAČNÍ MÉDIA:

DMEM (pro MDA-MB-231)	0% séra	10% séra
DMEM	490 ml	440 ml
BOFES	x	50 ml
L-Glutamin	5 ml	5 ml
Pen/Str	5 ml	5 ml

McCoy's (HT-29)	0% séra	10% séra
McCoy's 5A médium	490 ml	440 ml
BOFES	x	50 ml
L-Glutamin	5 ml	5 ml
Pen/Str	5 ml	5 ml

RPMI 0%	
RPMI - 1640	490 ml
L-Glutamin	5 ml
Pen/Str	5 ml

## WESTERN BLOT

<b>Chemikálie</b>	<b>Zkratka/Poznámka</b>	<b>Výrobce/Dodavatel</b>	<b>Stát</b>
Tetramethylethylenediamine	TEMED	Sigma Aldrich	Německo
Trisma base	Tris	Sigma Aldrich	Německo
Sodium dodecyl sulfat	SDS	Sigma Aldrich	Německo
Ammonium persulfate	APS	Sigma Aldrich	Německo
Akrylamid	AA	Sigma Aldrich	Německo
Methylenbisacrylamide	MBAA	Sigma Aldrich	Německo
Nízkotučné sušené mléko		Artifex instant s.r.o.	Česká republika
Kyselina chlorovodíková 35%	HCl 35%	Penta	Česká republika
Hydroxid sodný	NaOH	Penta	Česká republika
Glycin		Sigma Aldrich	Německo
Methanol	MetOH	Lach-Ner	Česká republika
Chlorid sodný	NaCl	Penta	Česká republika
Bromfenolová modř	BPB	Penta	Česká republika
Glycerol		Sigma Aldrich	Německo
2-merkptoethanol	$\beta$ -ME	Sigma Aldrich	Německo
Tween 20		Sigma Aldrich	Německo
Bovine serum albumin	BSA	Sigma Aldrich	Německo
Butanol		Sigma Aldrich	Německo
Azid sodný		Penta	Česká republika
Precision Plus Protein Standards		Bio-Rad	USA
SuperSignal West Femto Maximum sensitivity substrate		Thermo Scientific	USA
Chemiluminescent Peroxidase Substrate		Sigma Aldrich	Německo
Triton X-100		P-Lab	Česká republika
PhosSTOP (inhibitor fosfatáz)		Roche	Švýcarsko
Complete mini protease inhibitor		Roche	Švýcarsko
Pierce BCA Protein Assay Kit		Thermo Scientific	USA

<b>Roztoky</b>	<b>Složení</b>
5% roztok mléka	5g mléka do 100ml TBS-T(0,1%)
AA/MBAA 30%	29,2g AA a 0,8g MBAA doplnit vodou na 100g, míchat do rozpuštění
TRIS (1,5M)+TEMED, pH 8,9	45,38g Tris a 575ul TEMED doplnit vodou na 230g, po rozpuštění upravit pH (HCl) na 8,9, doplnit vodou na 250g
TRIS (0,5M) +TEMED, pH 6,9	3g Tris a 230ul TEMED doplnit vodou na 45g, po rozpuštění upravit pH (HCl) na 6,9, doplnit vodou na 50g
SDS 10%	2,5g SDS doplnit vodou na 25g
APS 3%	0,3g APS doplnit vodou na 10g
PBS	viz.Příprava buňek
Lyzační pufr	0,87g NaCl, 0,1g SDS a 0,61g Tris rozpustit v 99ml vody, poté přidat 1ml Triton X-100; upravit pH (HCl) na 8,0; podle potřeby rozpustit 1 tabletu inhibitoru proteáz a fosfatáz
Laemmlli roztok	379mg Tris do 42ml vody, upravit pH (HCl) na 6,8, poté přidat 0,5g SDS a 0,75ug BPB a 5ml glycerolu, doplnit objem vodou na 50 ml
Vzorkový pufr	Laemmlli roztok promíchat s $\beta$ -ME v poměru 9:1
Pufr pro transfer 10x	30,3g Tris a 144g glycinu do 600ml vody, po rozpuštění doplnit na 1l; před použitím smísit zásobní roztok, methanol a voda v poměru 1:2:7
Pufr pro elektroforézu 10x	10g SDS, 30,3g Tris a 144g glycinu do 600ml vody, po rozpuštění doplnit na 1l, zkontrolovat pH a upravit na 8-8,5; před použitím zředit zásobní roztok s vodou 1:9
Solný Tris pufr (TBS-T (0,1%))	24,2g Tris a 80g NaCl do 600ml vody po rozpuštění doplnit na 1l, upravit pH na 7,4-7,6, před použitím zředit zásobní roztok s vodou 1:9 a za míchání přidat 1 ml Tweenu/1l

## FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Chemikálie	Zkratka/Poznámka	Výrobce/Dodavatel	Stát
Formaldehyd 4%		Penta	Česká republika
Triton X-100		P-Lab	Česká republika
Bovine serum albumine 0,5%	BSA 0,5%	Sigma Aldrich	Německo
Hoechst		Thermo Scientific	USA
Attractene Transfection Reagent	Transfekční činidlo	Qiagen	Německo
PrecisionShuttle mammalian vector with C-terminal mGFP s vloženou sekvencí CD44st.	cDNA pro CD44st varianta 1 vložena do plazmidu pCMV6-AC-mGFP	OriGene	USA

Roztoky	Složení
PBS	viz. Příprava buněk
McCoy's 10%	viz. Média
Triton X-100 0,2%	0,2g do 100ml 0,5% BSA

## ELISA

Chemikálie	Poznámka	Výrobce/Dodavatel	Stát
Human s CD44std Instant ELISA	kit	eBioscience	Rakousko

## PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel	Stát
Trypsin	Sigma Aldrich	Německo
Apoflowex FITC Kit	EXBIO	Česká republika

Roztoky	Složení
PBS	viz. Příprava buněk
DMEM 10%	viz. Média

### 5.1.3 Protilátky

#### WB

Protilátka	Specifikace	Výrobce/Dodavatel	Stát	Klon
$\beta$ -Actin prim. protilátka	myš monoklonální	Sigma Aldrich	Německo	clone AC-74
phCD44 prim. protilátka	králík polyklonální	Sigma Aldrich	Německo	
ICD CD44 prim. protilátka	králík polyklonální	TransGenic Inc.	Japonsko	
CD44 prim. protilátka	myš monoklonální	EXBIO	Česká republika	MEM-263
Anti-mouse IgG sek. protilátka	konjugováno s křenovou peroxidázou	Sigma Aldrich	Německo	
Anti-rabbit IgG sek. Protilátka	konjugováno s křenovou peroxidázou	Cell Signaling	USA	cr-1

#### FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Protilátka	Specifikace	Výrobce/Dodavatel	Stát
ICD CD44 prim. protilátka	králík polyklonální	TransGenic Inc.	Japonsko
Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	králík IgG	Molecular Probes	USA

#### PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Protilátka	Specifikace	Výrobce/Dodavatel	Stát	Klon
Mouse IgG1 Isotype Control	myš IgG1 monoklonální	EXBIO	Česká republika	PPV-06
Conjugated Antibody CD44/FITC	myš monoklonální	EXBIO	Česká republika	MEM-85



## 5.2 Metoda Western Blot

### 5.2.1 Kultivace buněčných linií

Buňky byly po rozmrazení kultivovány v termálním boxu při teplotě 37°C a koncentraci oxidu uhličitého 5% za použití média Mc'Coys 10%. Před zahájením pokusu byly zpasážovány a nasazeny na šesti-jamkový panel tímto způsobem: nejdříve bylo odsáto stávající médium a buňky byly opláchnuty EDTA v PBS. Poté byl přidán 1ml trypsinu na jednu kultivační lahev a buňky byly ponechány v 37°C 5 minut. Následně bylo doplněno médium, celý obsah lahve byl přenesen do zkumavky a zcentrifugován (1200 g, 5 minut, 24°C). Na závěr byl slit supernatant, buňky byly resuspendovány v potřebném množství média a nasazeny v koncentraci  $1,5 \times 10^6$  buněk/jamka. Následující den bylo vyměněno médium za bezsérové Mc'Coys 0%.

### 5.2.2 Ovlivnění buněk

Po uplynutí jednoho dne byl zahájen pokus ovlivňováním jednotlivých jamek v různých časech tj. 4 hod, 2 hod, 1 hod, 30 min a 10 min. Buňky byly opláchnuty PBS a následně bylo přidáno Mc'Coys 0% médium s přídatkem určené koncentrace testované látky (např. 500 ng/ml PMA, 100 µg/ml HA 71 kDa) a byly ponechány v termálním boxu do uplynutí požadované doby. Kontrole bylo vyměněno médium za nové.

### 5.2.3 Zpracování vzorků

Panel byl položen na led a 2× rychle opláchnut vychlazeným PBS. Následovalo přidání 80 µl lyzačního roztoku s inhibitory proteáz a fosfatáz a rychlé přenesení do mrazáku (-80°C), kde se vzorek ponechal minimálně jednu hodinu. Po vytažení z mrazáku byl panel opět položen na led a škrabkou byly seškrabány dna jamek a obsah přenesen do mikrozkuavek. Takto vzniklé vzorky byly zahřáty na 95°C a poté znovu udržovány na ledu. Za průběžného chlazení byl každý vzorek 3× (7 vteřin) podroben vlivu ultrazvukových vln s amplitudou 65 %. Opět byla provedena fáze zahřívání (95°C). Na závěr zpracování byl vzorek zcentrifugován (12000 g, 24 min, 4°C) a supernatant byl uchován pro další zpracování.

#### 5.2.4 Měření a úprava koncentrace vzorku

Koncentraci proteinu jsme změřili pomocí BCA Assay Kit (Thermo Fischer Scientific Inc., USA). Naměřené hodnoty byly zpracovány a bylo z nich vypočítáno ředění tak, aby bylo dosaženo stejné koncentrace proteinů v každém vzorku. Ředění koncentrovanějších vzorků bylo provedeno lyzačním pufrům bez inhibitorů proteáz a fosfatáz. Posledním krokem bylo přidání vzorkového pufru v poměru vzorek: pufr 5: 1.

#### 5.2.5 Elektroforéza a Western Blot

Připravené vzorky byly naneseny na 12% akrylamidový gel (Tab. 1). Na oba okraje byly napipetovány proteinové standardy molekulové hmotnosti. Následovalo spuštění elektroforézy při 90 V. Poté co se viditelný standard začal rozdělovat, bylo napětí zvýšeno na 120 V. Proteiny byly z gelu přeneseny na PVDF membránu. Membrána byla 1 hodinu blokována 5% roztokem mléka při RT za neustálého třepání. Dále byla membrána přes noc inkubována ve 4°C s požadovanými primárními protilátkami ředěnými v 5% roztoku mléka takto:  $\beta$ -aktin 1: 1000, CD44 1: 1000, ICD CD44 1: 400, phCD44 1:500. Následující den byly membrány 3× 10 min promyty v TBS-T pro odstranění nespecificky vázané protilátky. V dalším kroku byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou v 5% roztoku mléka 1 hodinu při RT ředěnými 1: 1000 (anti-rabbit) a 1: 1500 (anti-mouse) a následovalo promytí TBS-T 3× 10 minut. Na membránu byl nanesen substrát s křenovou peroxidázou, po jehož odstranění a uzavření membrány do průhledné folie bylo provedeno vyvolání pomocí zařízení pro detekci chemiluminiscence Uvitec.

Tab. 1 Složení akrylamidového gelu

Chemikálie	ml	Separáčn1 12% gel	Zaostřovac1 gel
H <sub>2</sub> O	ml	1,45	1,25
AA	$\mu$ l	2000	333
Tris 6,9	$\mu$ l	-	250
Tris 8,9	$\mu$ l	1250	-
SDS 10%	$\mu$ l	50	20
APS 4%	$\mu$ l	250	150

Množství odpovídající 1 (1mm) gelu

### 5.3 Fluorescenční mikroskopie zafixovaných MDA-MB-231

Na 96ti-jamkový panel bylo nasazeno 16 jamek po 300 000 buňkách. Následující den bylo vyměněno médium polovině za sérové a polovině za bezsérové. Třetí den byly

buňky ovlivněny 100 ng/ml PMA v časech 30, 60, 120 minut a jedna jamka byla ponechána jako kontrola. Poté byly jamky opláchnuty PBS a zafixovány 4% formaldehydem 15 minut. Následovala permeabilizace 0,2% Tritonem X-100 naředěném v 0,5% BSA po dobu 30 minut. Jamky byly 2× opláchnuty PBS a byly ponechány 1 hodinu v 0,5% BSA. Potom byla k buňkám přidána primární protilátka na ICD CD44 o koncentraci 50 µg/ml v 0,5% BSA a celý panel byl inkubován přes noc při 4°C. Jamky byly opět 2× opláchnuty PBS a byla přidána sekundární protilátka Alexa fluor 488 2 µg/ml, po 30 minutách byla opláchnuta pomocí PBS a do jamek bylo přidáno barvivo HOECHST 2 µg/ml na 10 minut. Závěrečným krokem bylo důkladné opláchnutí PBS, aby sekundární protilátka nezářila v pozadí a bylo přistoupeno k fluorescenční mikroskopii.

#### 5.4 Fluorescenční mikroskopie transfekovaných HT-29 v čase

Nejdříve byly připraveny roztoky média, plazmidu a transfekčního činidla Attractene v různých poměrech (Tab. 2), které byly inkubovány při RT 15 minut. V mezičase bylo buňkám vyměněno médium 500 µl/jamka a následně pomalu přidáno 80 µl roztoku. Panely byly umístěny do mikroskopu a do jamek bylo přidáno PMA ve třech různých koncentracích tj. 500 ng/ml, 1000 ng/ml a 2000 ng/ml. Byl opatřen záznam reakce buněk na přítomnou látku.

Tab. 2 Složení ovlivňovacího roztoku

Označení roztoku	Médium [µl]	Transfekční činidlo [µl]	Plazmid [µl]
A	80	0	0
B	79,5	1,125	0,325
C	77,1	2,25	0,65
D	74,2	4,5	1,3
E	68,4	9	2,6
F	74,85	4,5	0,65
G	69,7	9	1,3

#### 5.5 ELISA

Při přípravě vzorků pro metodu Western Blot bylo odebráno a zamraženo médium (odsáté z ovlivněných buněk po uplynutí určeného času). Pro detekci jsme použili Human s CD44std Instant ELISA kit v souladu s instrukcemi výrobce.

## 5.6 Průtoková cytometrie

Buňky byly ovlivněny HA 71kDa a PMA vždy v duplikátu v čase 1 a 4 hodiny, nařazenými v odpovídajícím sérovém/bezsérovém médiu. Kontrole bylo vyměněno médium za nové. Poté bylo médium odsáto (v případě stanovení apoptózy uschováno), buňky byly opláchnuty PBS a bylo přidáno 250  $\mu$ l trypsinu. Po krátkém uchování při 37°C a uvolnění buněk ze dna jamky byl trypsin inaktivován sérovým médiem a obsah byl přenesen do zkumavek. Následně byla provedena centrifugace vzorků (1500 g, 5 minut, 5°C). Pelety byly promyty vychlazeným PBS a resuspendovány v 1ml PBS (v případě apoptózy se použije Annexin V Binding Buffer z kitu Apoflowex FITC Kit, který nahrazuje PBS i v dalších krocích) a byly přidány protilátky na 15 minut. Pro odstranění protilátek byly buňky centrifugovány a promyty PBS. Výsledné pelety byly resuspendovány do 200  $\mu$ l PBS a změřeny na průtokovém cytometru (proměřeno 20 000 událostí).

## 6. VÝSLEDKY

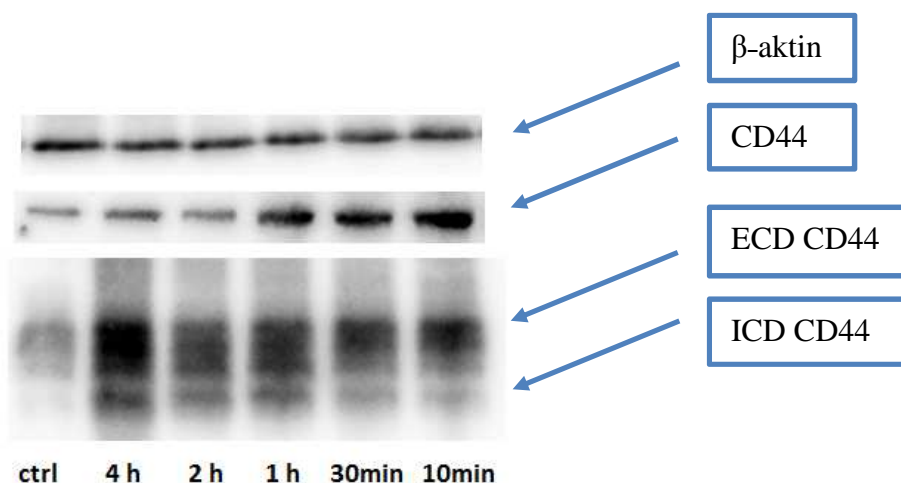
### 6.1 Vliv PMA a HA na doménovou strukturu receptoru CD44

#### 6.1.1 Detekce receptoru CD44 a jeho domén metodou Western Blot

Western Blot byl proveden na buňkách HT-29, které nesou receptor CD44 (ověřeno dále pomocí průtokové cytometrie). Pilotní studie ukázala, že po ovlivnění buněk 500 ng/ml PMA byl efekt výraznější a jasněji detekovatelný, než při použití 100 ng/ml PMA.

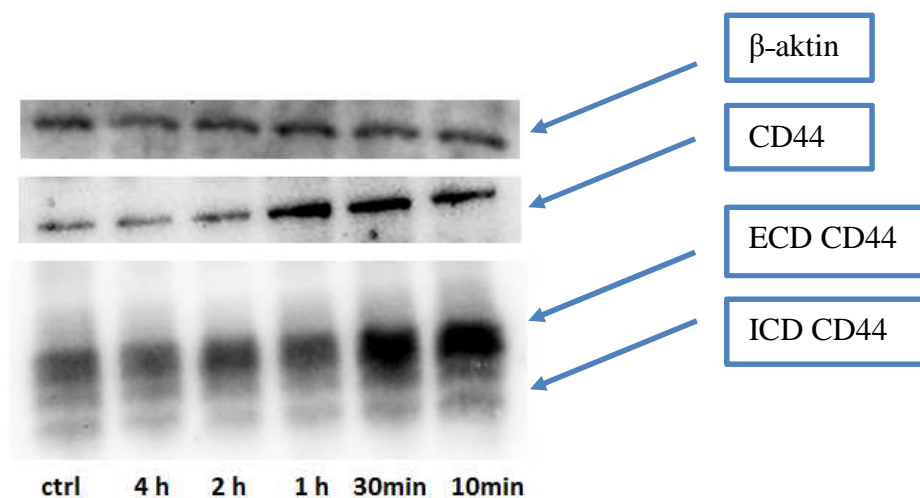
Úzký výběr monoklonálních protilátek nám neumožnil kvalitní detekci fosforylované formy CD44 (phCD44), proto zde není uvedena. Všechny pokusy byly provedeny v triplikátu.

Na obrázku 6 je patrný vliv PMA na buňky. U celkového množství receptoru CD44 jsme zaznamenali nárůst v krátkých časech (nejvíce po 10 minutách). S přibývajícím časem docházelo k poklesu jeho množství až na původní hodnoty (2 a 4 hodiny), pravděpodobně díky zvýšenému štěpení na podjednotky. Intracelulární a extracelulární doména byly vlivem PMA aktivovány a zvýšil se jejich výskyt už po krátkém ovlivnění (10 minut). Se vzrůstajícími časy narůstala i přítomnost těchto podjednotek (nejvýrazněji po 4 hodinách).



Obr. 6 Membrána se vzorky po ovlivnění 500 ng/ml PMA

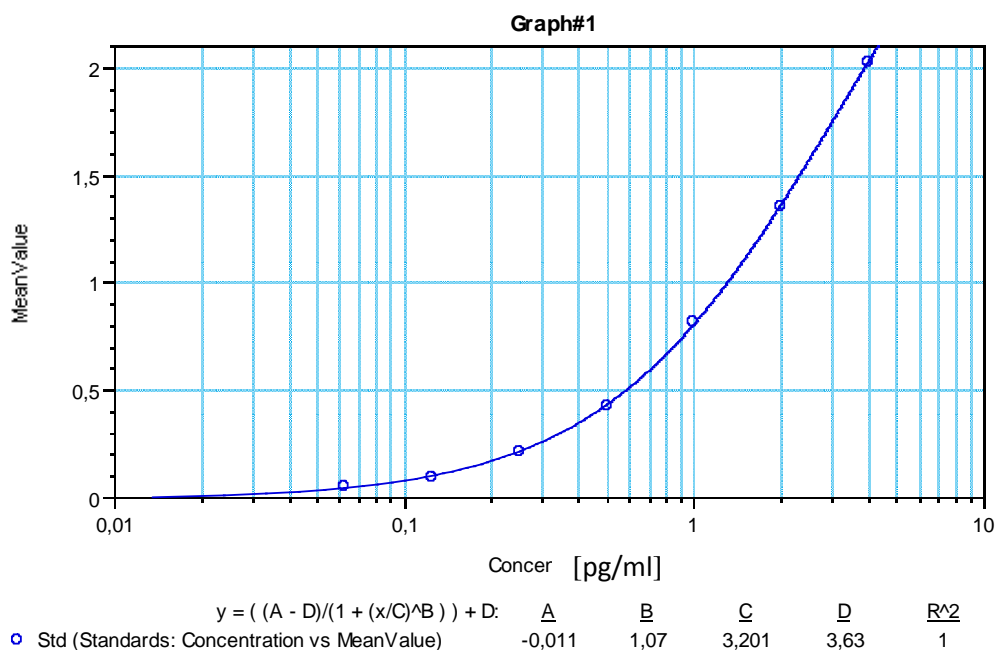
Na obrázku 7 jsme zaznamenali působení HA na receptor CD44. Buňky reagovaly na přítomnost HA zvýšenou produkcí CD44. Stejně jako v předchozím případě více v krátkých časech. Po delším vlivu HA množství celého receptoru pokleslo. ECD a ICD vzrostly nejvíce po 10 minutách a s přibývajícím časem následoval pokles jejich množství.



Obr. 7 Membrána se vzorky po ovlivnění 100 µg/ml HA

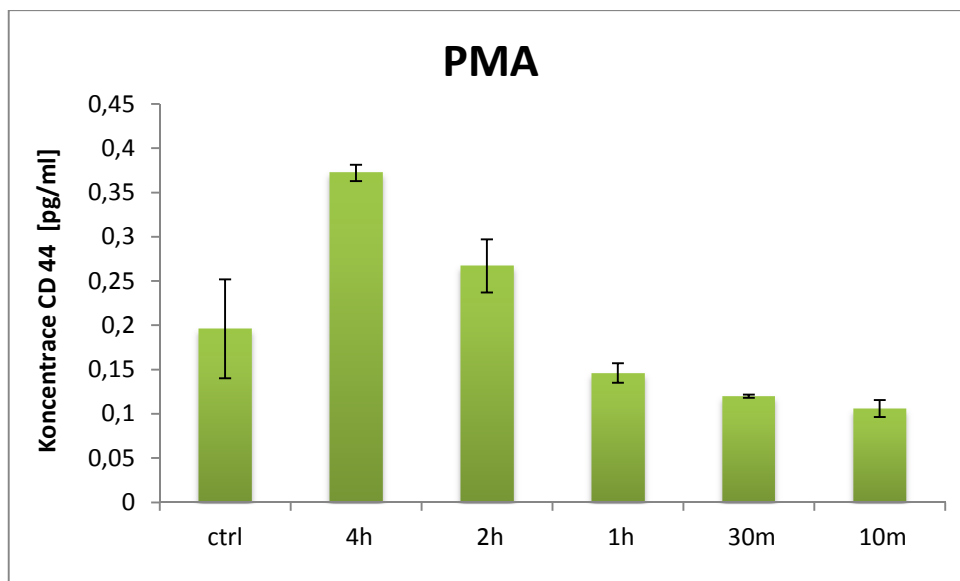
### 6.1.2 Stanovení ECD CD44 metodou ELISA

Touto metodou jsme sledovali množství odštěpené extracelulární domény receptoru CD44 do okolního prostředí po jeho aktivaci pomocí HA a PMA. Naměřené hodnoty jsme zpracovali pomocí kalibrační křivky (Obr. 8).

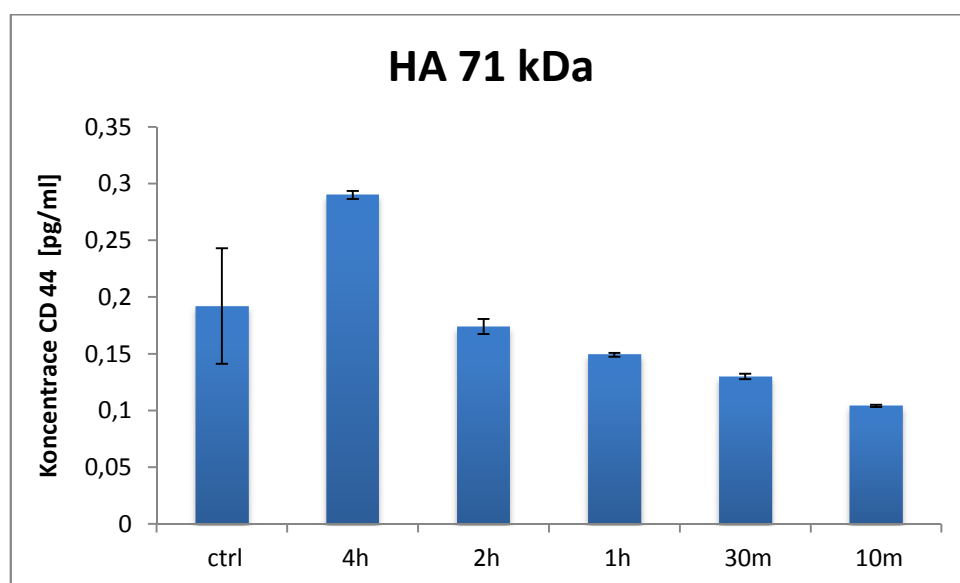


**Obr. 8 Kalibrační křivka.** Koncentrace standardů CD44 v rozmezí od 62,5 pg/ml do 4000 pg/ml.

Na grafech 9 a 10 vidíme analogickou odpověď buněk na přidání aktivační látky (HA a PMA). V obou případech jsme zaznamenali pokles extracelulární domény v médiu po 10 minutách, 30 minutách a 1 hodině oproti kontrole. Naproti tomu, po 4 hodinách došlo k výraznému vzestupu koncentrace ECD v porovnání s kontrolním vzorkem. Celkově byl efekt PMA ve vyšších časech významnější než efekt HA.



**Graf 9 Množství ECD CD44 ve vzorku média po ovlivnění 500 ng/ml PMA**  
 Graf byl vytvořen jako průměr dvou měření. Data jsou znázorněna jako průměr  $\pm$  SEM.

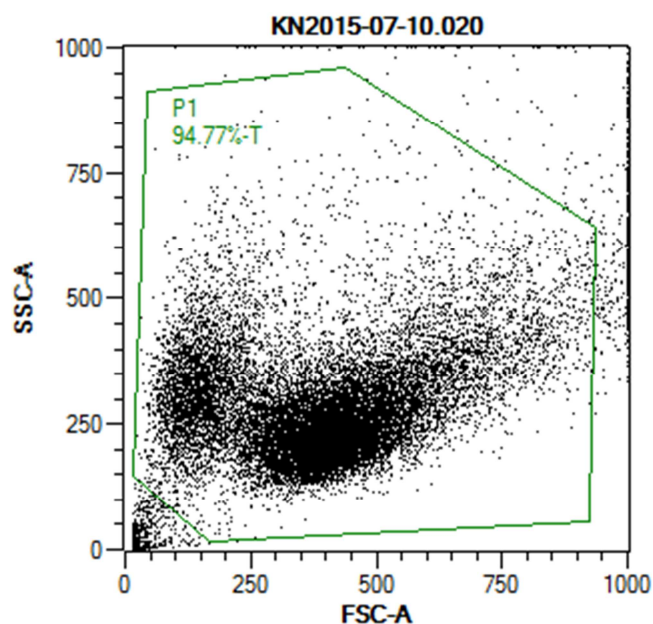


**Graf 10 Množství ECD CD44 ve vzorku média po ovlivnění 100 µg/ml HA**  
 Graf byl vytvořen jako průměr dvou měření. Data jsou znázorněna jako průměr  $\pm$  SEM.



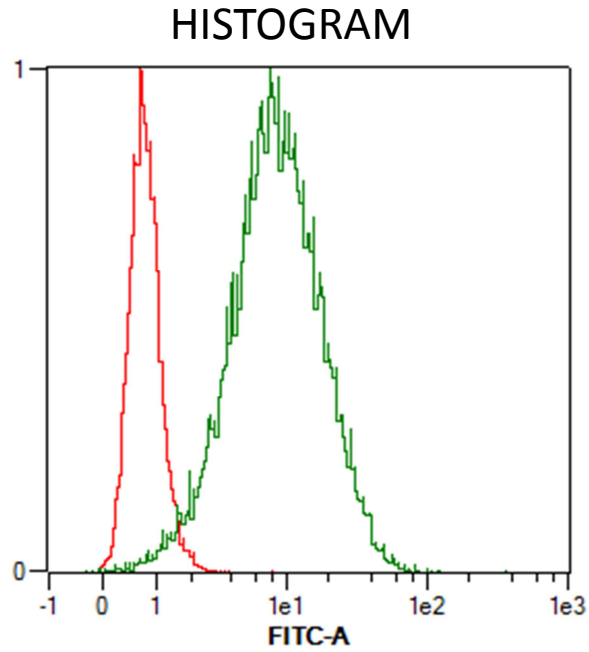
## 6.2 Stanovení množství CD44 na buněčném povrchu pomocí průtokové cytometrie

Pro zpracování výsledků jsme použili ohraničenou oblast buněk (ukázáno na obrázku 11). V blízkosti počátku grafu se nachází debris, tj. malé částice a rozpadlé buňky, které jsou pro vyhodnocení nežádoucí. Stejně tak v horní části grafu odfiltrujeme nestandardně velké buňky a jejich shluky.



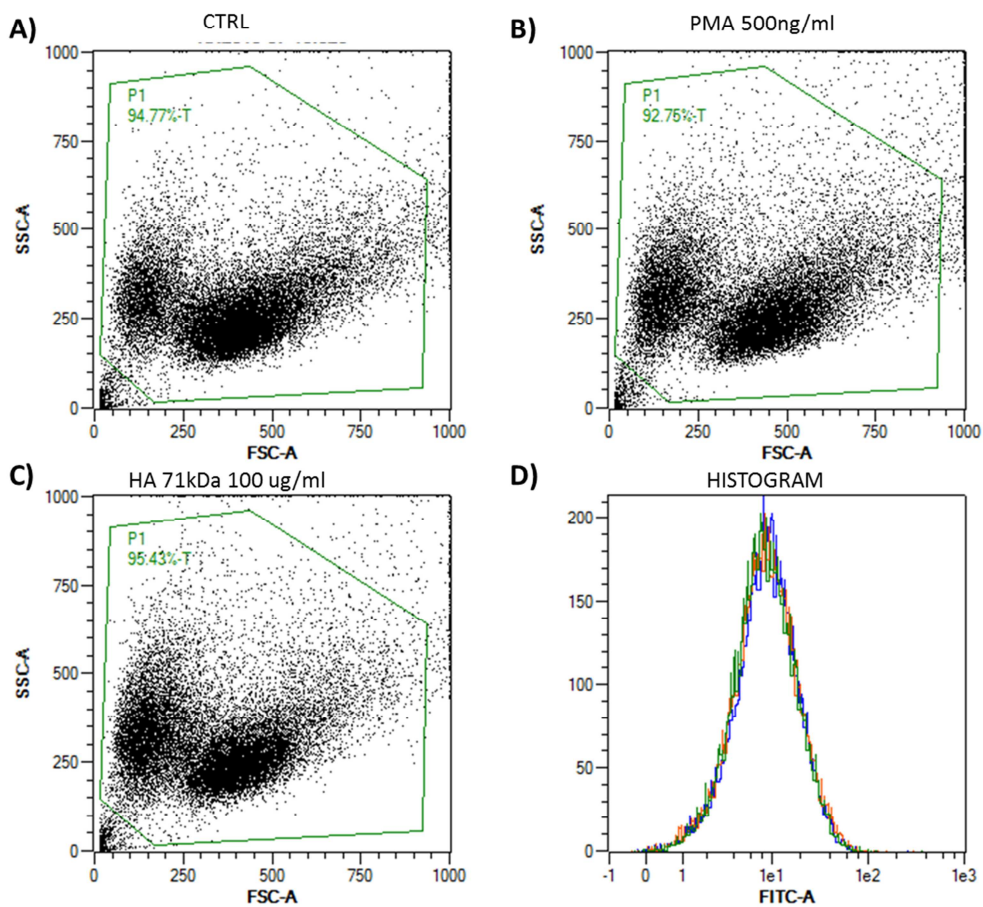
Obr. 11 Ohraničení populace

Na histogramu pozorujeme dvě křivky (Obr. 12). Červená křivka patří isotypové kontrole. Její signál je minimální a blíží se nule, což nám potvrzuje specificitu vazby protilátky na CD44 (zelená).



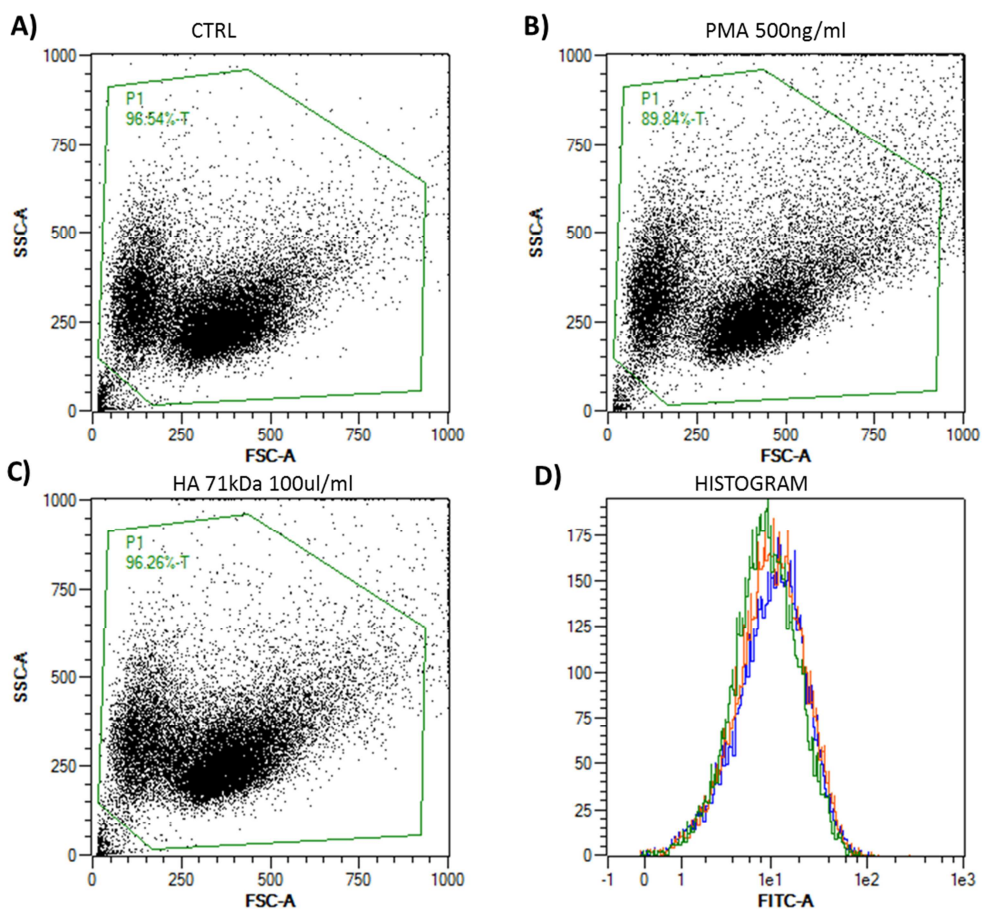
Obr. 12 **Histogram vyjadřující specifitu použité protilátky proti CD44**  
Červená křivka představuje isotopovou kontrolu, zelená křivka je protilátka na CD44.

1 hod, 0% médium

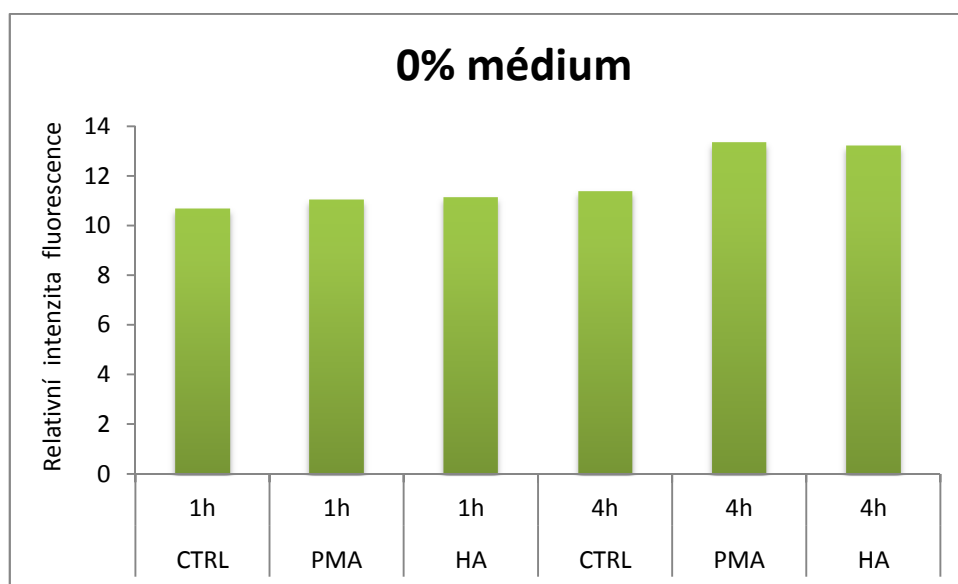


Obr. 13 Průtoková cytometrie- grafy zobrazující množství CD44 na HT-29 v bezsérovém médiu po 1 hodině. Histogram zaznamenává 3 křivky odpovídající kontrole (modrá), vzorku ovlivněném PMA (zelená) a vzorku ovlivněném HA (červená).

4 hod, 0% médium

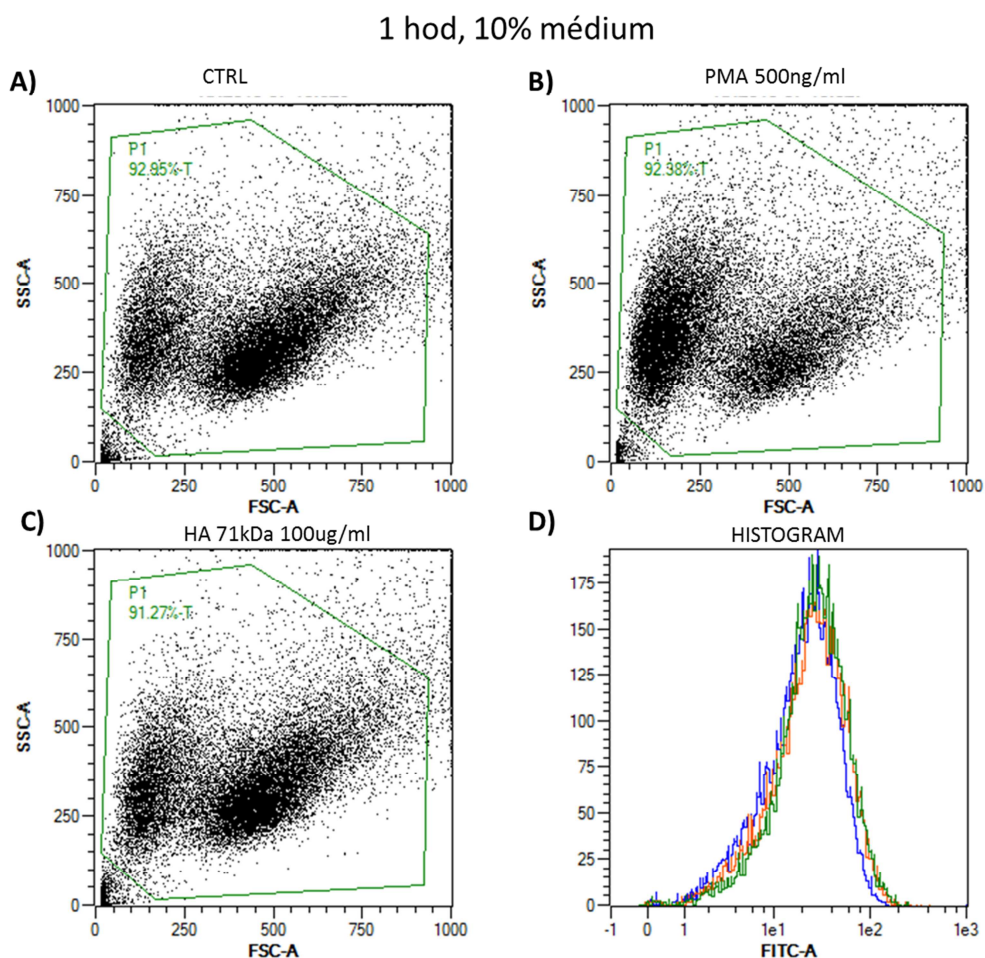


Obr. 14 Průtoková cytometrie- grafy zobrazující množství CD44 na HT-29 v bezsérovém médiu po 4 hodinách. Histogram zaznamenává 3 křivky odpovídající kontrole (modrá), vzorku ovlivněném PMA (zelená) a vzorku ovlivněném HA (červená).



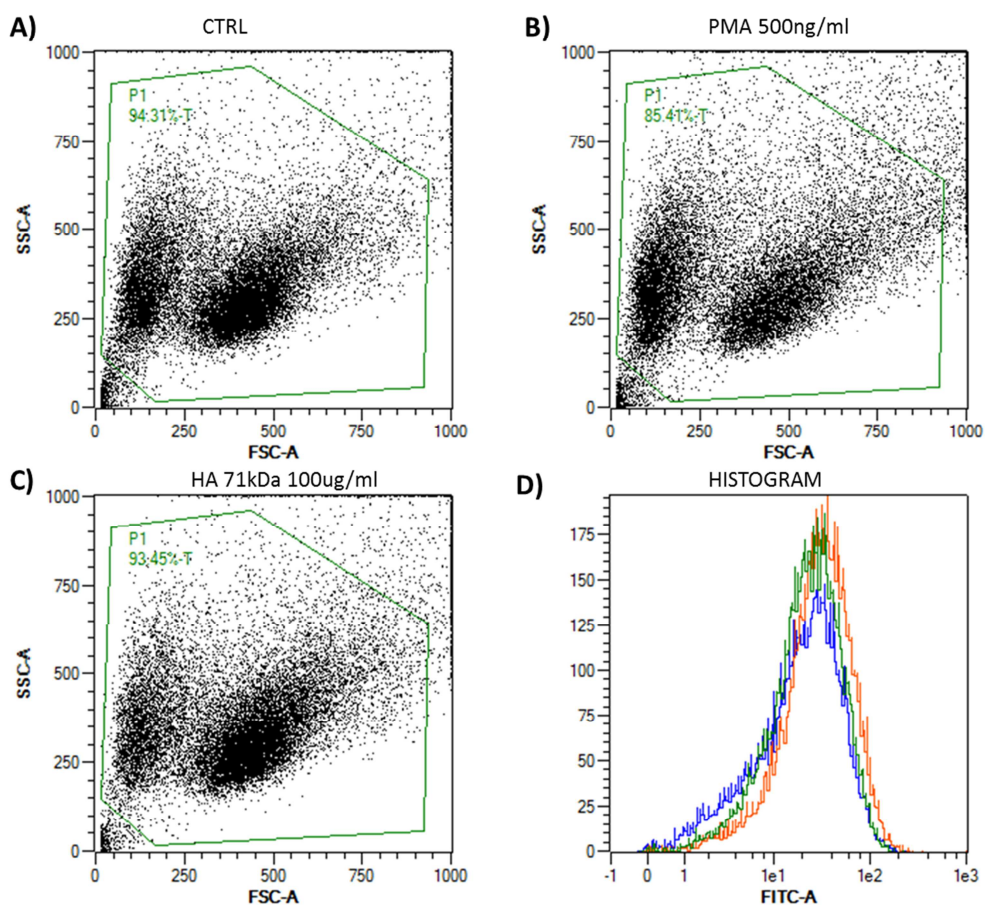
Graf 15 Množství CD44 ve vzorku s bezsérovým médiem. Průměr relativních hodnot fluorescence.

Jak na křivkách histogramu, tak na grafu (obrázky 13, 14 a graf 15) můžeme pozorovat, že v bezsérovém médiu nemá po jedné hodině HA ani PMA výraznější vliv. Po uplynutí 4 hodin se však množství receptoru CD44 na povrchu buněk za přítomnosti těchto látek mírně zvýší.

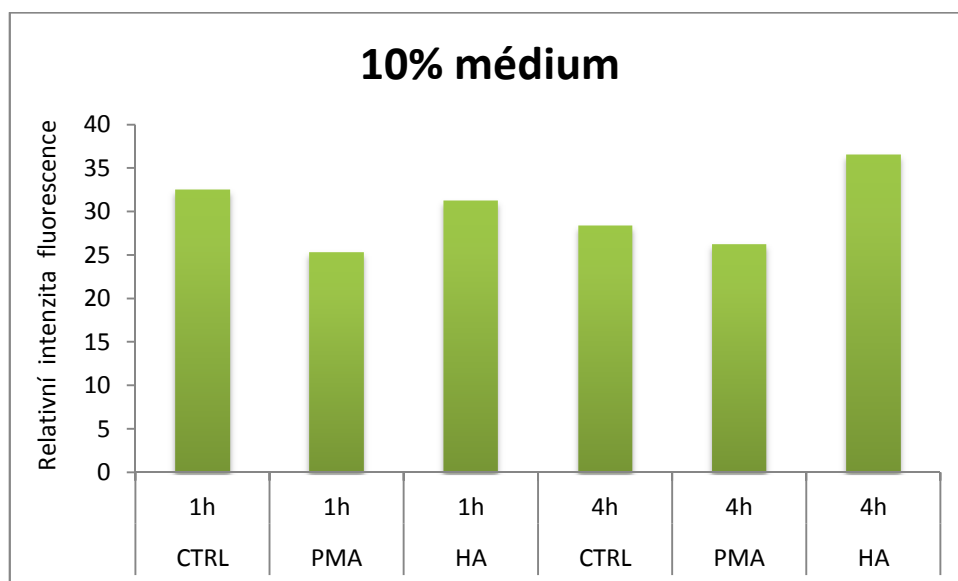


Obr. 16 Průtoková cytometrie- grafy zobrazující množství CD44 na HT-29 v sérovém médiu po 1 hodině. Histogram zaznamenává 3 křivky odpovídající kontrole (modrá), vzorku ovlivněném PMA (zelená) a vzorku ovlivněném HA (červená).

4 hod, 10% médium



Obr. 17 Průtoková cytometrie- grafy zobrazující množství CD44 na HT-29 v sérovém médiu po 4 hodinách. Histogram zaznamenává 3 křivky odpovídající kontrole (modrá), vzorku ovlivněném PMA (zelená) a vzorku ovlivněném HA (červená).

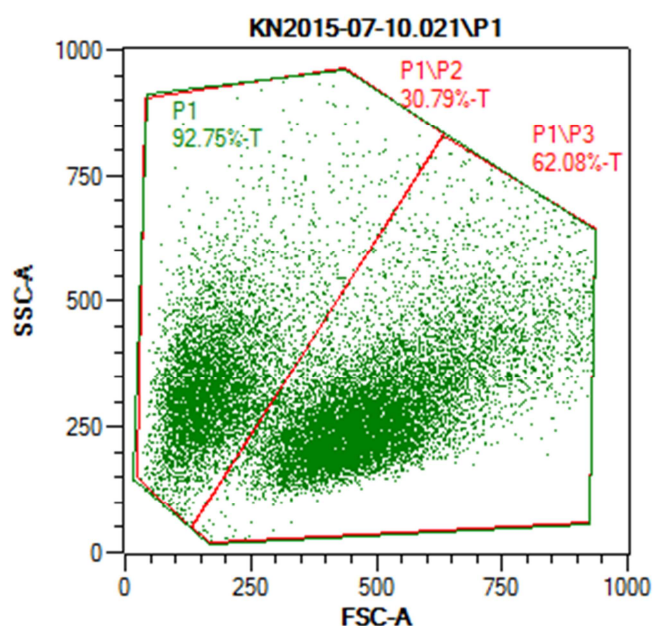


Graf 18 Množství CD44 ve vzorku se sérovým médiem. Průměr relativních hodnot fluorescence.



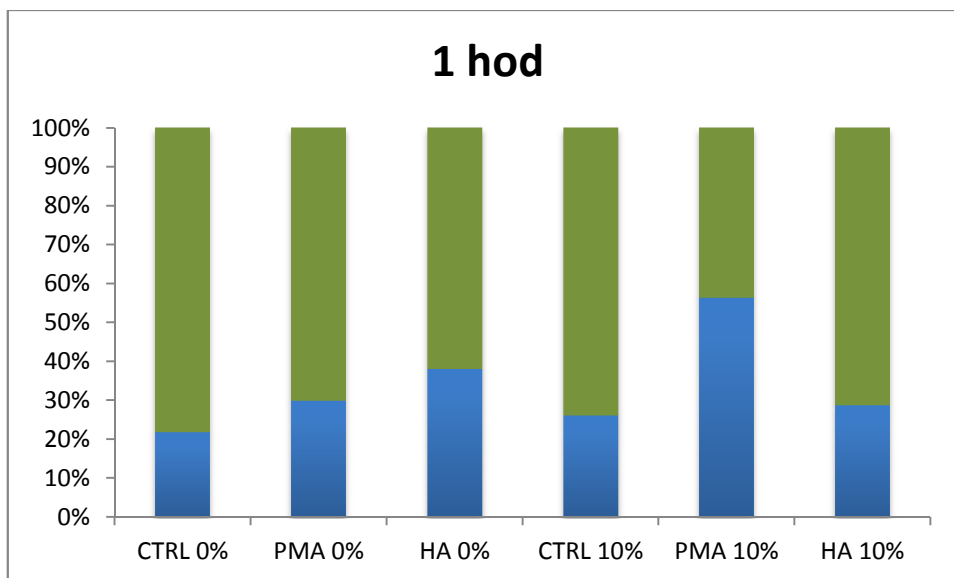
Na celkové množství receptoru CD44 má vliv i samotná přítomnost séra (graf 15 a 18), která zvýší relativní množství CD44 přibližně trojnásobně. V čase 1 hodiny má PMA za následek pokles množství receptoru a HA má zanedbatelný vliv (obrázek 16, 17 a graf 18). Po 4 hodinách dochází k výraznému navýšení CD44 vlivem HA oproti kontrole.

U všech vzorků jsme při vyhodnocování pozorovali dvě oddělené populace (Obr. 19). Procentuální zastoupení populací je zpracováno v grafech 20 a 21. Do levé části se přesouvají buňky apoptotické nebo jinak diferenciované. Proto, abychom zjistili příčinu, jsme provedli průtokovou cytometrii na detekci buněčné smrti.

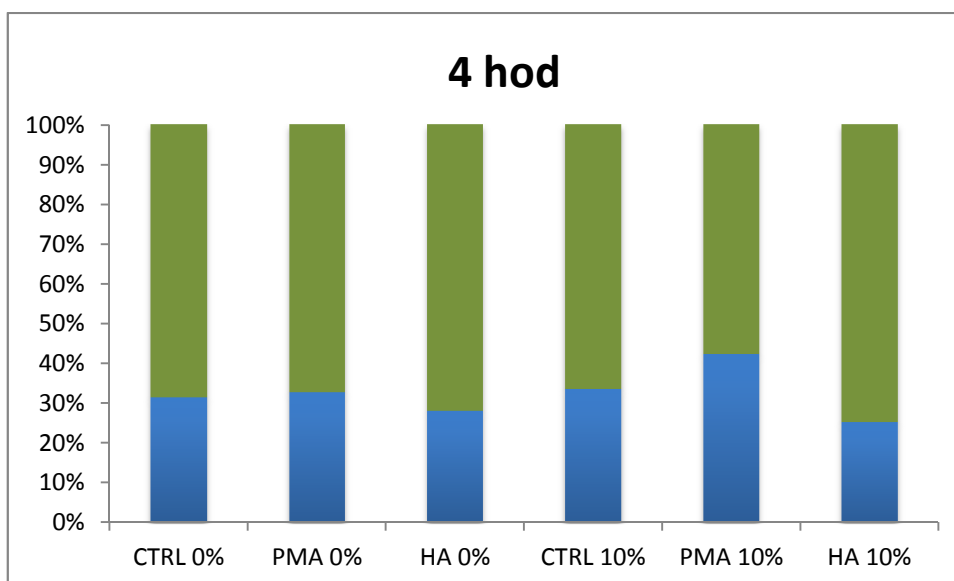


Obr. 19 Oddělení dvou významných populací

Vlivem PMA i HA dochází v krátkém čase k přesunu buněk do levé části, charakteristické pro buňky s nižšími hodnotami intenzity procházejícího a rozptýleného světla. To naznačuje, že buňky jsou menší a méně granulární. Po 4 hodinách se buňky přesunou pouze po vlivu PMA v sérovém médiu.



Graf 20 **Graf procentuálního zastoupení buněk ve dvou populacích po 1 hodině.**  
Modře označena populace vlevo, zeleně populace vpravo.



Graf 21 **Graf procentuálního zastoupení buněk ve dvou populacích po 4 hodinách.**  
Modře označena populace vlevo, zeleně populace vpravo.

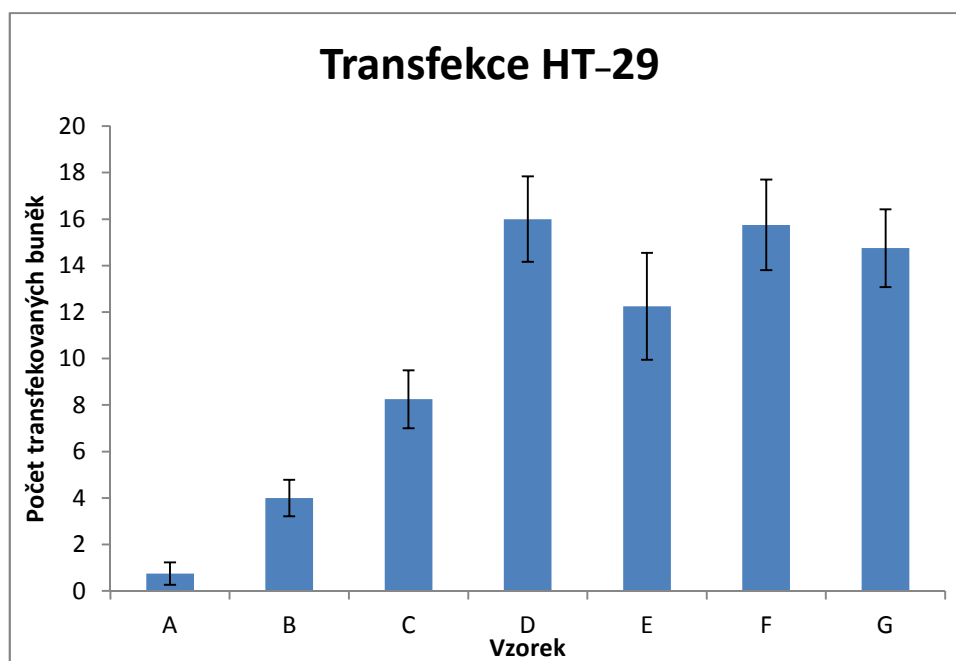


## 6.3 Vliv PMA na translokaci intracelulární domény CD44

### 6.3.1 Příprava ICD podjednotky CD44 značené GFP pomocí transfekce a sledování její translokace v čase

Transfekce byla provedena na HT-29 z toho důvodu, abychom zaznamenali vliv aktivačních činidel na receptor CD44 v reálném čase. Nejdříve jsme se u těchto buněk snažili docílit co neoptimálnější transfekční úspěšnosti. Použili jsme tedy různé kombinace množství atraktantu a plazmidu (Tab. 2). V každé jamce jsme po transfekci zachytili stejnou plochu a spočítali množství zářících, tedy úspěšně transfekovaných buněk. Vyhodnocení vidíme na grafu číslo 22.

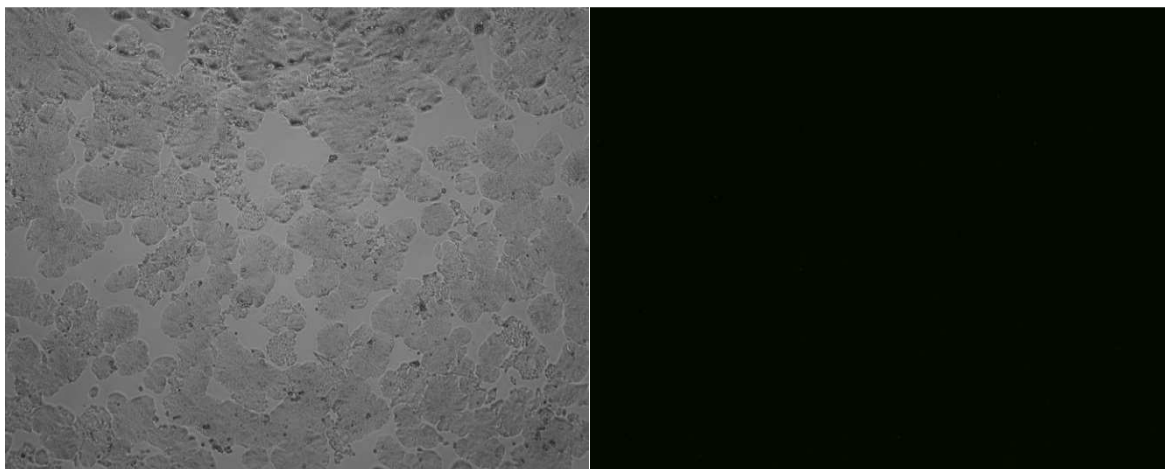
Když zvyšujeme ve stejném poměru množství atraktantu a plazmidu B-D, zároveň tím zvyšujeme účinnost barvení a množství fluoreskujících buněk. Další zvyšování v případě E však nepřináší výhodu a buňky jsou mírně změněny. F-G kombinace jsou nevhodné, protože dochází k viditelné změně a poškození buněk.



Graf 22 **Počet úspěšně transfekovaných buněk v zorném poli.**  
Počítáno na stejně velké ploše. Průměr ze 4 opakování.

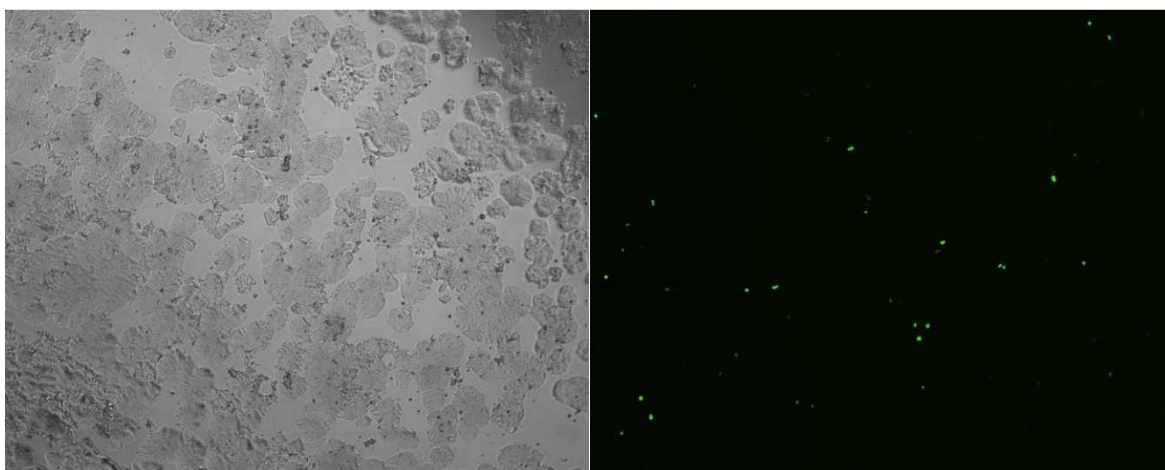
Následují 3 ukázky fotek, ze kterých jsme vycházeli při hodnocení (obrázky 23, 24 a 25). Na kontrolním vzorku vidíme zdravé buňky (vlevo) a žádnou fluorescenci (vpravo). Na neoptimálnějším vzorku D vidíme, že buňky jsou nezměněny (vlevo), ale zároveň řada

z nich fluoreskuje (vpravo). Na posledním vzorku G jsou buňky poškozené, tvarem nepřírozané (vlevo), z toho důvodu nepoužitelné i přes dostatečnou fluorescenci (vpravo).



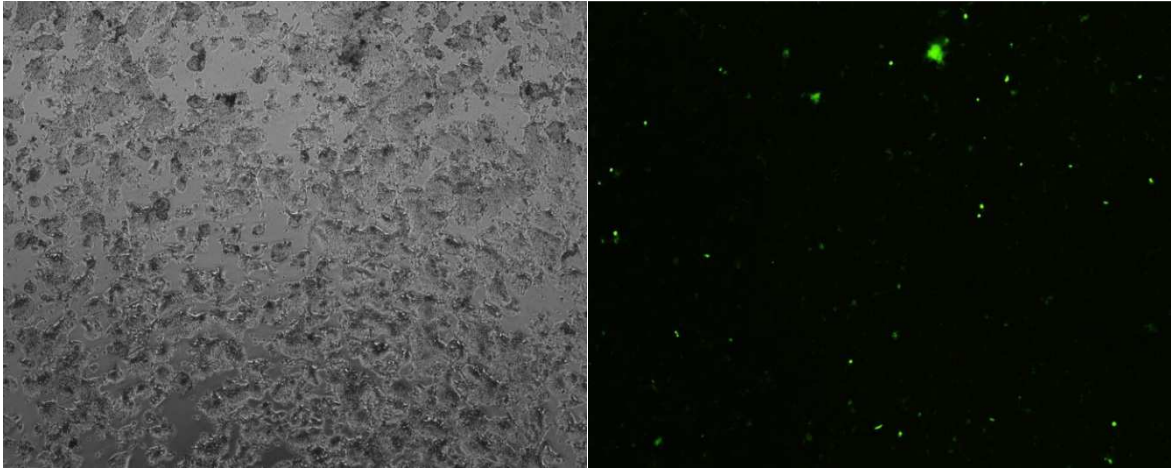
**Obr. 23 ICD CD44 značená GFP, vzorek A (kontrola)**

Vlevo světelná mikroskopie, vpravo fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 40×.



**Obr. 24 ICD CD44 značená GFP, vzorek D**

Vlevo světelná mikroskopie, vpravo fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 40×.

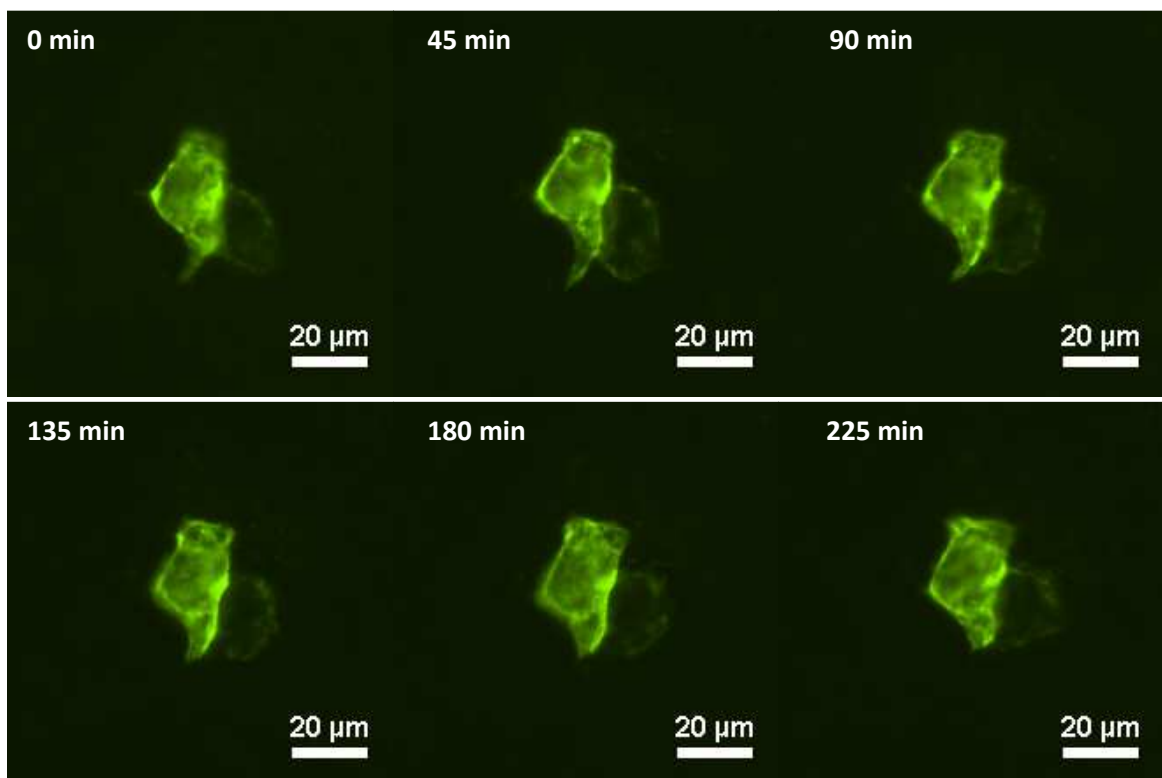


Obr. 25 ICD CD44 značená GFP, vzorek G

Vlevo světelná mikroskopie, vpravo fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 40×.

Dále jsme pro pokusy používali kombinaci transfekčního činidla a plazmidu D. Na takto připravených buňkách jsme zaznamenali odpověď receptoru CD44 na přítomnost PMA v různých koncentracích. Časový sběr trval přibližně 4 hodiny.

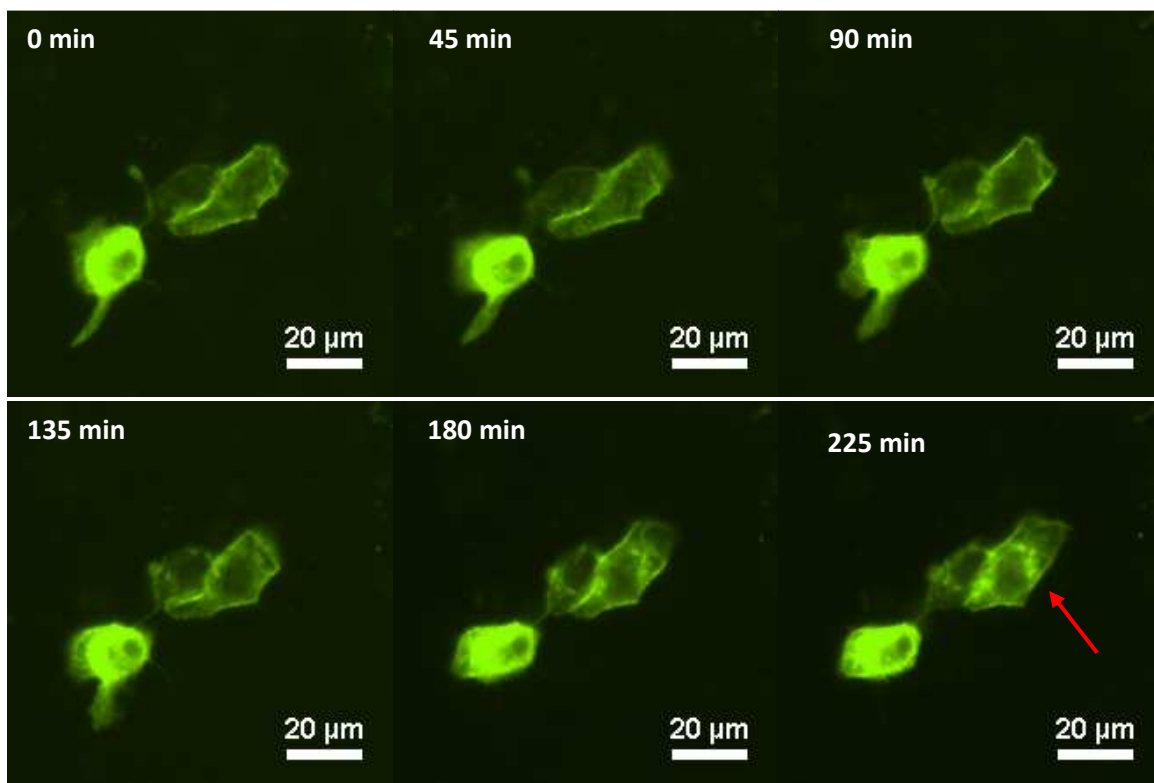
Na kontrolním vzorku (Obr. 26) se zdá, že nedochází k translokaci ICD CD44 do jádra. I v nejvyšším čase zůstávají výraznější okraje buňky, tj. membrána.



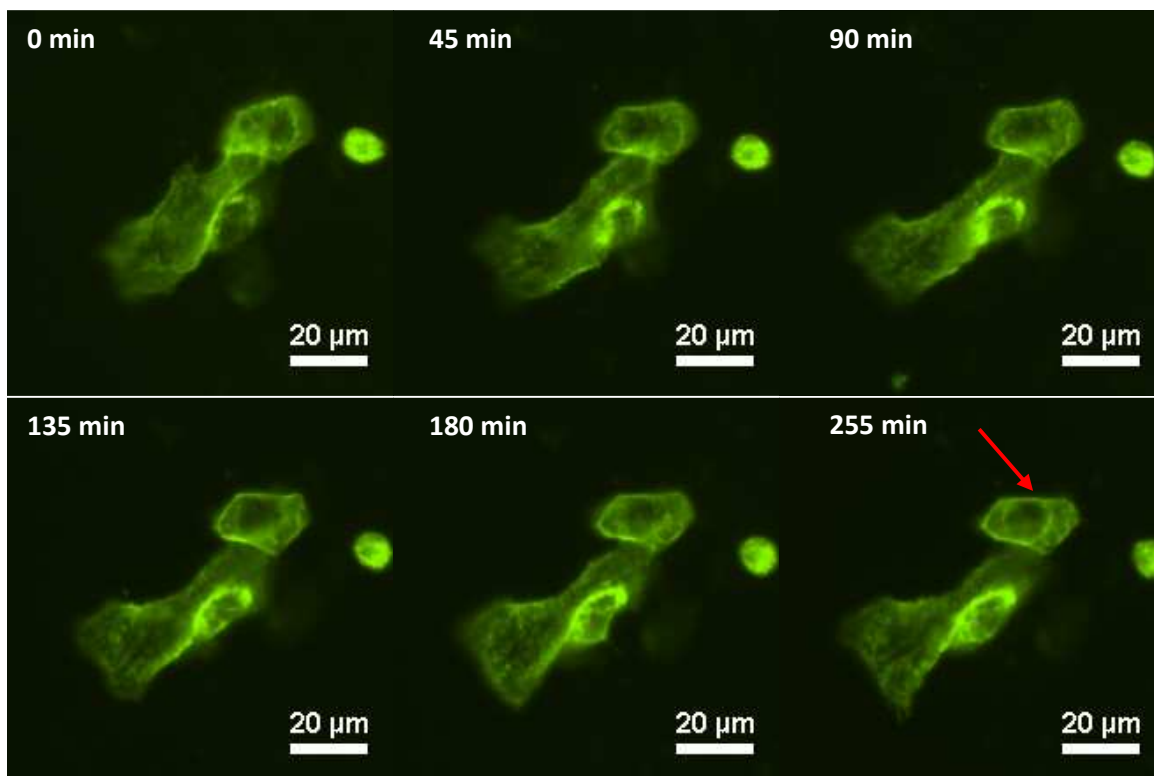
Obr. 26 Časový sběr translokace ICD CD44 do jádra - kontrola

Zeleně značená intracelulární CD44.

Efekt u vlivu PMA v koncentracích 500 ng/ml, 1000 ng/ml a 2000 ng/ml je srovnatelný. Ve všech případech dochází k translokaci ICD CD44 směrem do jádra. Na posledních snímcích v sérii pozorujeme, jak fluorescenční signál obklopuje a zvýrazňuje jádro (Obr. 27, 28 a 29 zvýrazněno červenou šipkou).

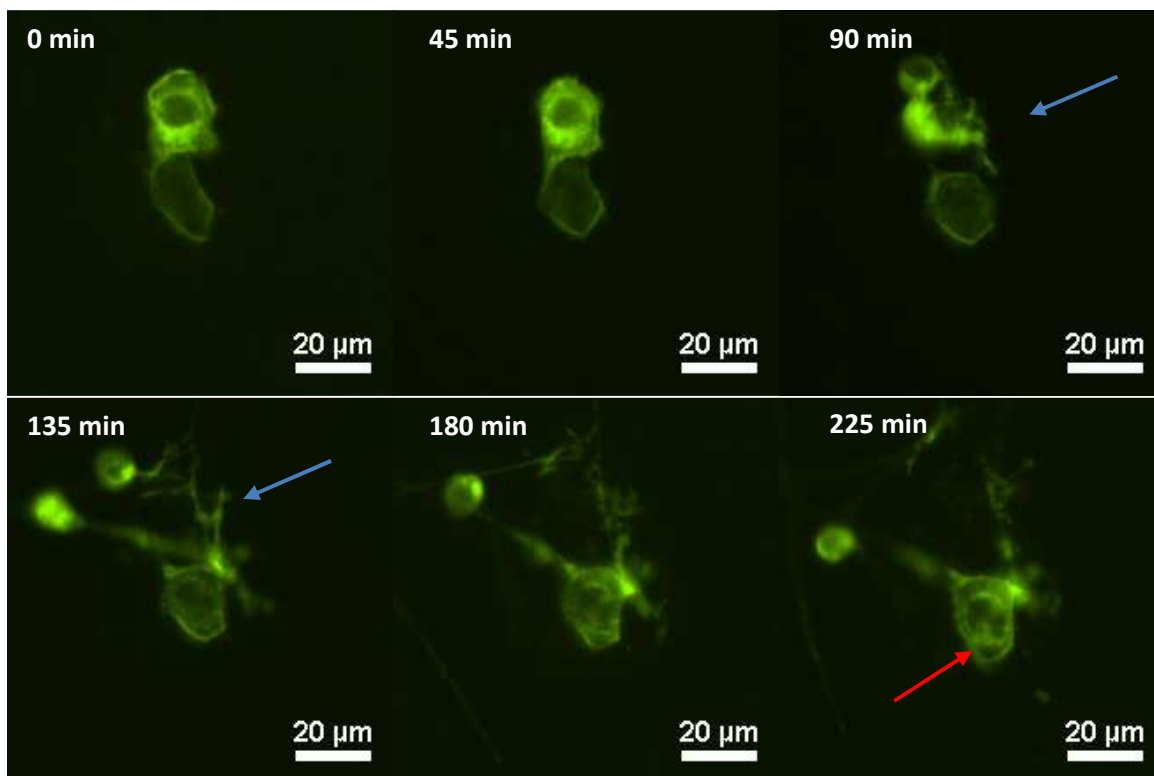


Obr. 27 Časový sběr translokace ICD CD44 do jádra - po ovlivnění 500 ng/ml PMA  
Zeleně značená intracelulární CD44.



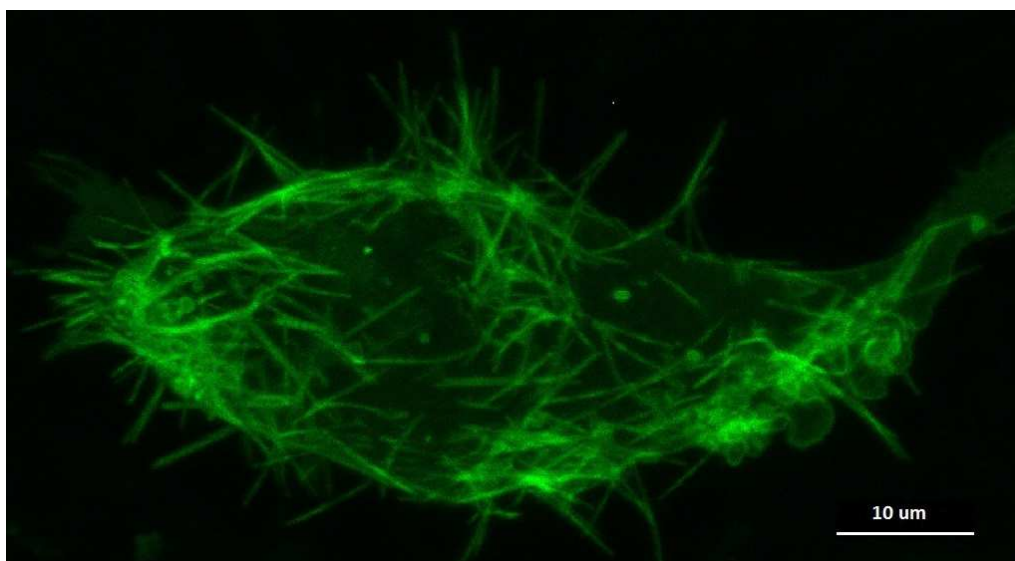
Obr. 28 Časový sběr translokace ICD CD44 do jádra - po ovlivnění 1000 ng/ml PMA  
Zeleně značená intracelulární CD44.

U koncentrace 2000 ng/ml PMA se nám podařilo zaznamenat buněčnou smrt (Obr. 29), což byl druhý impulz pro to, abychom stanovili buněčnou smrt průtokovou cytometrií a zjistili, zda má PMA také tento vliv na buňky.



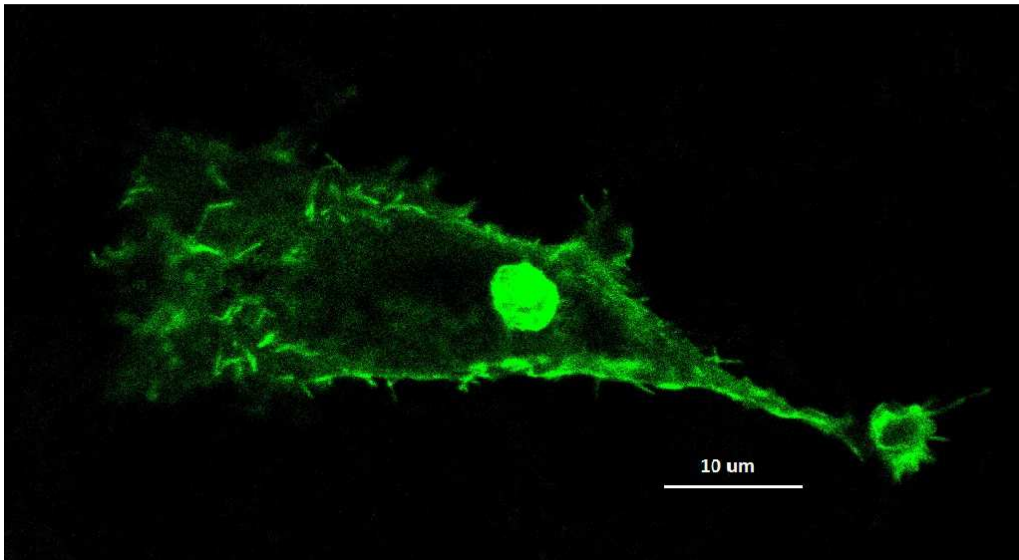
Obr. 29 Časový sběr translokace ICD CD44 do jádra - po ovlivnění 2000 ng/ml PMA  
Zeleně značená intracelulární CD44. Modrá šipka upozorňuje na buněčnou smrt.

Přesnou strukturu povrchu transfekovaných buněk jsme pozorovali pomocí konfokálního mikroskopu (Obr. 30). Na obrázku 31 je vidět obarvené jádro fluoreskující ICD CD44 po ovlivnění PMA.



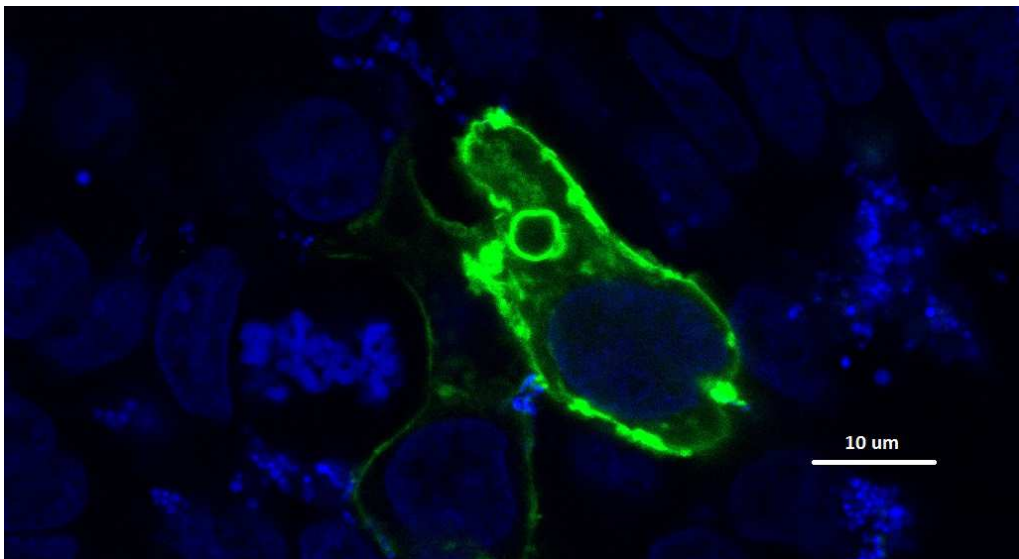
Obr. 30 Buňka HT-29  
Zeleně značená intracelulární CD44.





Obr. 31 **Buňka HT-29** po ovlivnění 500 ng/ml PMA  
Zeleně značená intracelulární CD44.

Na obrázku 32 jsme si zvýraznili jádro modře pomocí barviva HOECHST. Zeleně pak zůstává označena ICD CD44.



Obr. 32 **Buňka HT-29**  
Zeleně značená intracelulární CD44 a modře značené jádro.

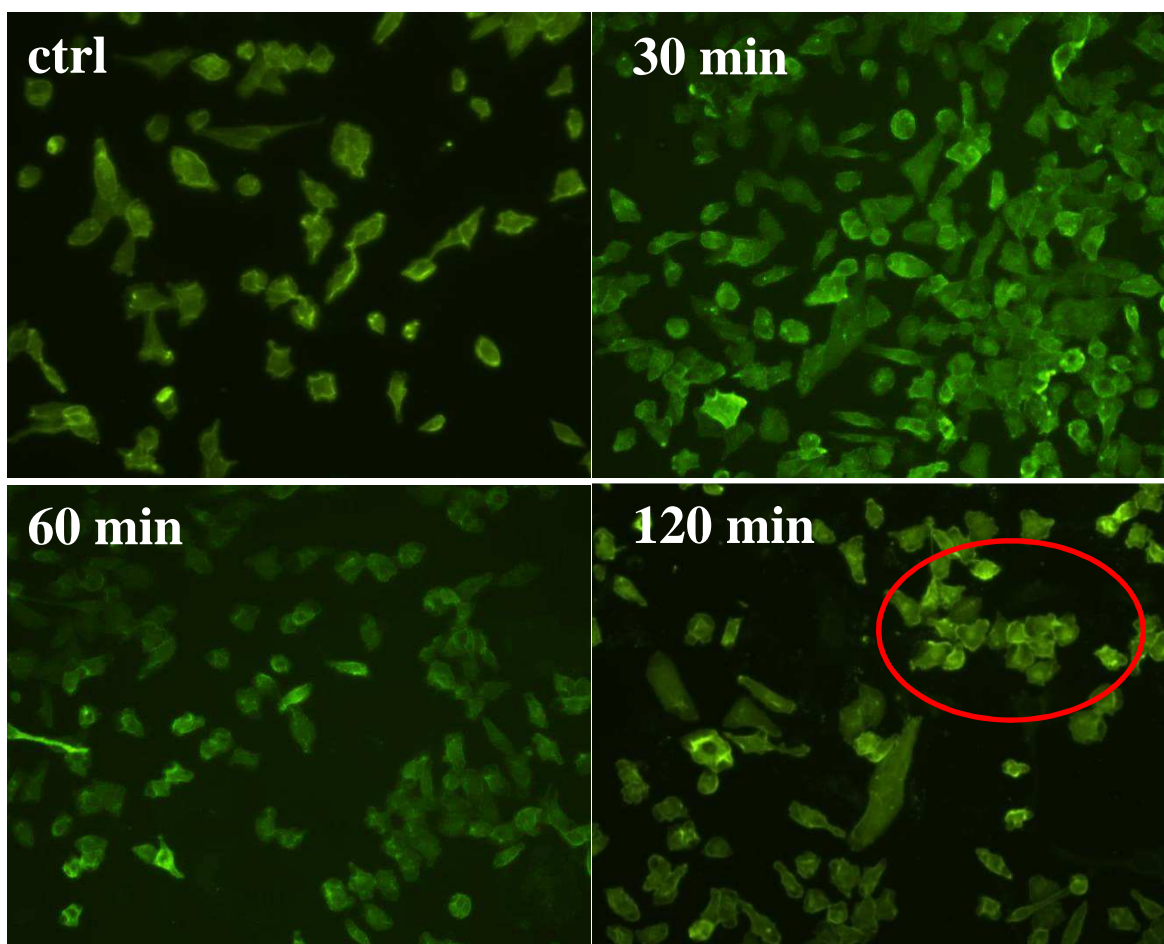
### 6.3.2 Detekce ICD podjednotky CD44 na zafixovaných buňkách pomocí imunofluorescence

Díky transfekci jsme získali pohled na děje v buňce v reálném čase. Abychom mohli pozorovat efekt na větším množství buněk, však transfekční účinnost nebyla dostatečná. Využili jsme metodu, ve které jsme buňky MDA-MB-231 (známé svojí

vysokou expresí receptoru CD44) nejdříve vystavili působení PMA a následně je zafixovali. Na takto stabilní preparáty jsme navázali primární protilátku na ICD CD44 a následně fluorochromem značenou sekundární protilátku (Obr. 33, 34).

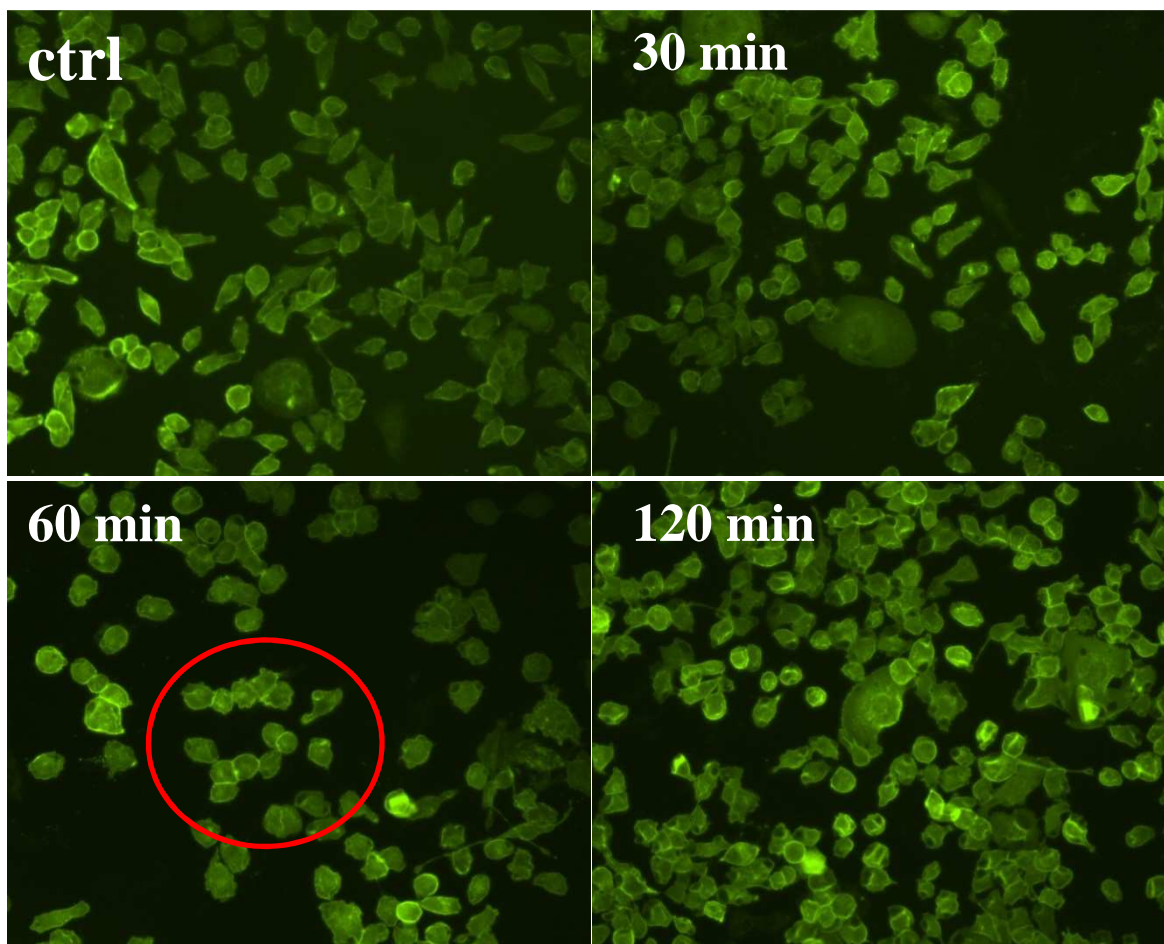
Pokusy jsme provedli s 500 ng/ml PMA na buňkách v sérovém a bezsérovém médiu. V obou případech byl efekt stejný, ale u 10% média se zdál být výraznější. Tento jev odpovídá i záznamu z průtokového cytometru (kapitola 6.1.3.), tj. buňky v sérovém médiu mají celkově větší množství receptoru CD44.

V kontrolním vzorku pozorujeme výraznější zabarvení okrajů buněk a tedy větší koncentraci receptoru na membráně. Po 30 minutách je ICD CD44 více přítomna uvnitř buňky. V 60. a především 120. minutě ICD CD44 obklopuje jádro a je více soustředěná v centru buňky.



Obr. 33 Translokace ICD CD44 do jádra po ovlivnění 500 ng/ml PMA v bezsérovém médiu (0%). Zeleně značená ICD CD44.





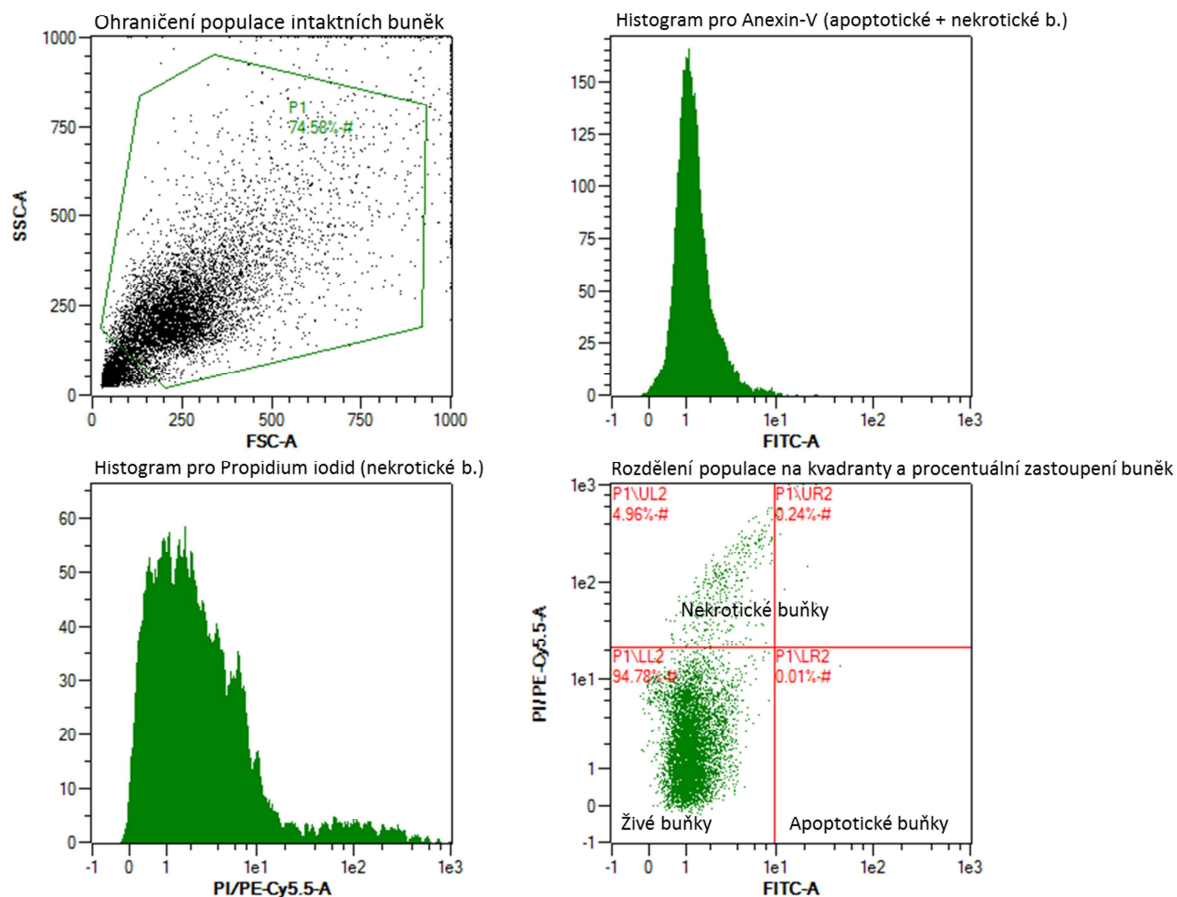
Obr. 34 Translokace ICD CD44 do jádra po ovlivnění 500 ng/ml PMA v sérovém médiu (10%). Zeleně značená ICD CD44.

#### 6.4 Vliv PMA a HA na buněčnou smrt

*Fluorescenčně značený Annexin V se váže na fosfatidylserin, který na svůj povrch translokují apoptotické buňky. U nekrotických buněk se však může vázat i na fosfatidylserin uvolněný rozpadem buněčných struktur. Proto, aby bylo možné rozlišit tyto dva typy buněčné smrti, se musí ještě nekrotické buňky označit fluorescenční molekulou propidium iodidu, která prochází pouze narušenou membránou nekrotických buněk a do celistvých buněk neproniká.*

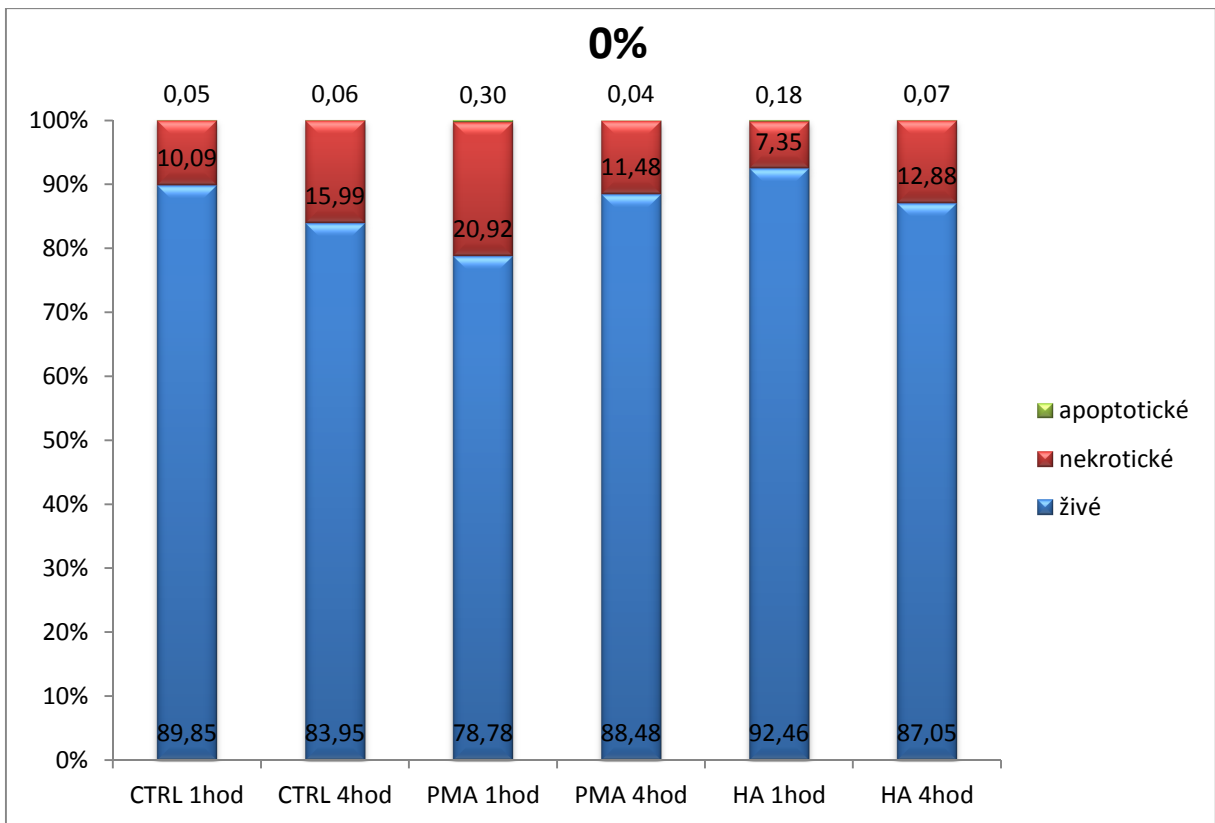
Abychom zjistili, zda PMA a HA zasahují do viability buněk, provedli jsme test pomocí průtokového cytometru. Vzorky obarvené propidium iodidem a Annexinem V jsme vyhodnotili podle grafu rozděleného na kvadranty (příklad na Obr. 35).

### CTRL 10% 1hod



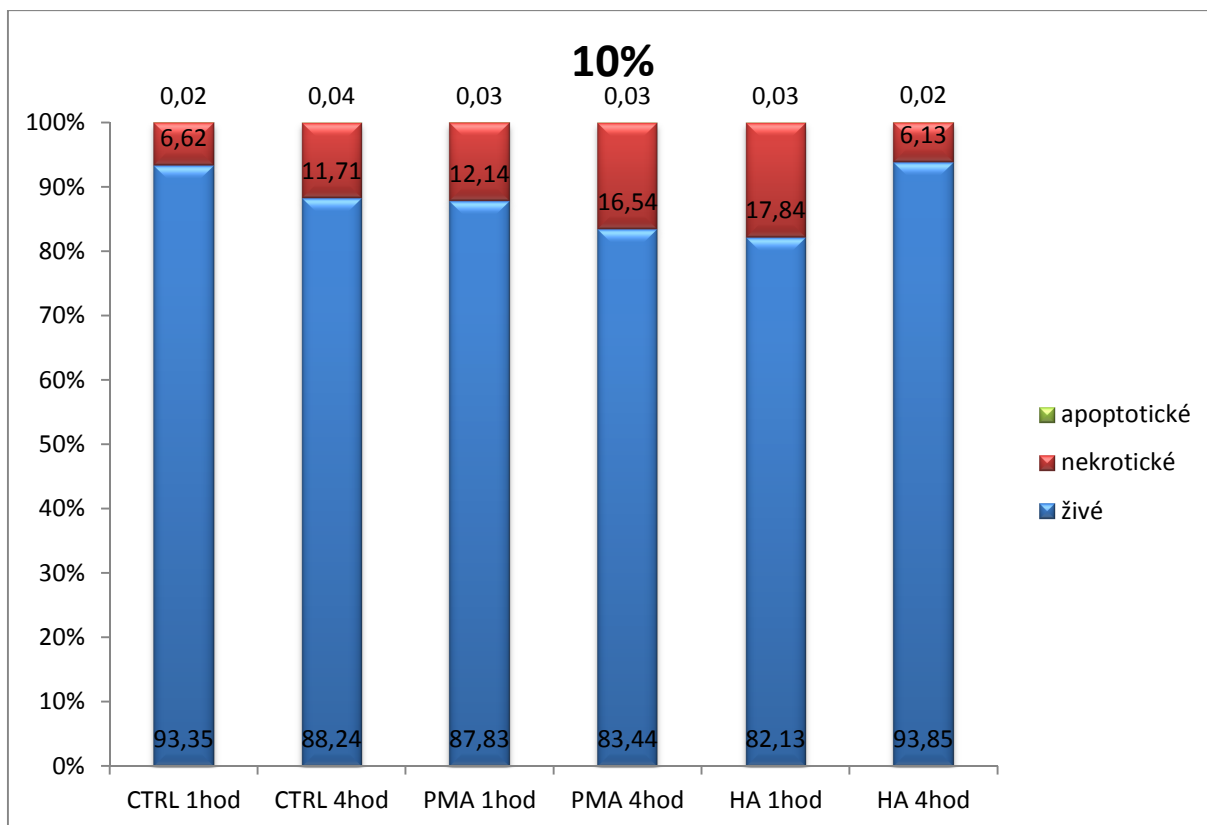
Obr. 35 Reprezentativní obrázek grafického hodnocení buněčné smrti na průtokovém cytometru

PMA po jedné hodině v bezsérovém médiu mírně zvýšila množství mrtvých buněk (graf 36). Všechny ostatní hodnoty však naznačují, že dané látky nemají výrazný vliv na apoptózu (grafy 36 a 37).



**Graf 36 Graf procentuálního zastoupení živých/ apoptotických/ nekrotických buněk v populaci kultivované v bezsérovém médiu (0%)**

Hodnoty jsou průměr ze dvou stanovení.



**Graf 37 Graf procentuálního zastoupení živých/ apoptotických/ nekrotických buněk v populaci kultivované v sérovém médiu (10%)**

Hodnoty jsou průměr ze dvou stanovení.

## 7. DISKUZE

HA je nesulfatovaný glykosaminoglykan, přítomný ve velké míře v extracelulární hmotě, kde zajišťuje hydrataci buněk. Dále je HA zapojená do nádorových procesů, ovlivňuje buněčnou migraci, podporuje angiogenezi a podílí se na hojení ran. HA je proto široce využívána v kosmetice, medicíně i farmacii. Její schopnost působit na buňky je zprostředkována specifickou interakcí s receptorem CD44. CD44 je transmembránový glykoprotein přítomný na většině buněčných typů, který se podílí na vývoji organismu, podporuje správnou funkci imunity nebo může sloužit jako diagnostický marker pro řadu nádorů.

V této práci jsme několika metodami sledovali změny receptoru CD44 po ovlivnění 100 µg/ml HA a 500 ng/ml PMA. PMA je používán jako účinný aktivátor řady signálních drah včetně signalizace skrze CD44. Např. Okamoto a kolektiv (1999) dokázali, že PMA zvyšuje štěpení CD44 a vyvolává redistribuci tohoto receptoru v buňkách U251MG. Ladedá s kolektivem (1998) zjistili, že určité koncentrace PMA zvyšují expresi a celkové množství CD44 u F3II buněk. Huang a kol. (2014) prokázali, že PMA v závislosti na koncentraci vyvolává buněčnou smrt K562. PMA má také další schopnosti ovlivňovat buněčné pochody, například indukuje diferenciaci K562, jež slouží jako klasický model diferenciacie krevních buněk (Huang a kol., 2014). Mechanismus účinku PMA je následující: nejdříve dojde k jeho navázání na CD44 což vede k aktivaci PKC (protein kinázy C), v dalším kroku tato kaskáda uvede v činnost metaloproteázy, které jsou zodpovědné za štěpení CD44. Influx extracelulárních vápenatých iontů zvyšuje štěpení přes účinek na metaloproteázy. (Okamoto a kol., 1999)

V této práci jsme se nejdříve zaměřili na vliv PMA a HA na doménovou strukturu a celkové množství receptoru CD44 u buněk HT-29. Buňky jsme nechali inkubovat 10 minut až 4 hodiny v přítomnosti PMA a HA v bezsérovém médiu. Zjistili jsme pomocí metody Western Blot, že PMA i HA zvyšují celkové množství receptoru CD44 nejvíce v krátkých časech a s narůstající dobou klesá až na původní hodnoty. Ladedá a kol. (1998) na rozdíl od nás sledovali u buněčné linie F3II nárůst receptoru po 2 hodinovém vlivu 62 ng/ml PMA (5 % FBS). Vliv na rozdílné výsledky mohla mít přítomnost séra a typ buněk. Nobunori a kol. (2010) se zabývali HA oligosacharidy a jejich působením na množství CD44 u chondrocytů. Jejich závěr zněl, že nemají vliv na celkové množství CD44. Poté, co je receptor CD44 aktivován, dochází k štěpení jeho extracelulární domény a její odloučení do séra následované uvolněním intracelulární domény. Proto jsme dále detekovali množství štěpných produktů vyvolaných působením PMA a HA. U PMA jsme zřetelně prokázali, že podporuje štěpení a tedy zvyšuje množství ECD a ICD CD44, čímž jsme potvrdili výsledky získané na různých buněčných kulturách v různých časech a koncentracích PMA 100 ng/ml : U251MG linie, 40 min (Okamoto a kol., 2001; Okamoto a kol., 1999) nebo MIA PaCa-2 linie, 30 min (Murai a kol., 2003). Když se zaměříme na vliv

PMA v čase, zjistíme, že dochází k časově závislému nárůstu štěpných produktů. Tento výsledek se neshoduje s tím, který naměřili Nagano a Saya (2004), kteří detekovali mohutný nárůst štěpů v krátkém čase a jejich postupný pokles od 3 hodin výše. Odlišné výsledky mohou být dány jiným typem buněk U251MG a přítomností séra v médiu. Oertli a kol.(1998) využili metodu Western Blot k tomu, aby vyhodnotili množství ECD CD44 v supernatantu po 48 hodinách přítomnosti 20 µg/ml PMA a tímto způsobem také potvrdili aktivační schopnost PMA. Navrhovaný význam tohoto štěpení z buněčného povrchu je takový, že buňky tímto způsobem inhibují interakci mezi ligandem a receptorem. (Oertli a kol., 1998) Ovlivnění pomocí HA 71 kDa působilo na množství ICD a ECD CD44 opačně v porovnání s PMA, tedy prudké zvýšení po 10 minutách následované poklesem množství, od 1 hodiny výše bylo množství srovnatelné s kontrolou. Tyto výsledky se shodují s Murai a kol. (2003), po 1 hodině vlivu HA s molekulovou hmotností nad 36 kDa nedochází k aktivaci štěpení. Nejlepších výsledků se v této studii využívající MIA PaCa-2 buňky dosáhlo použitím 6,9 kDa HA.

Pro lepší detekci ICD a ECD CD44 by bylo možné nechat buňky inkubovat s MG132 proteázovým inhibitorem, který by zaručil, že se rozštěpené domény nezačnou odbourávat, ještě než dojde k jejich detekci. (Okamoto a kol., 1999; Murai a kol., 2003) Vzhledem k tomu, že ECD CD44 neposkytuje jeden band, ale je rozptýlena v určitém rozmezí molekulových hmotností, nabízí se vysvětlení, že existuje více míst štěpení na molekule CD44 nebo dochází k následné modifikaci těchto produktů. (Okamoto a kol., 1999)

Pro to, abychom se detailněji podívali na odštěpenou ECD CD44 jsme použili médium buněk ovlivněných PMA nebo HA a vyhodnotili ho pomocí metody ELISA. Vlivem PMA došlo k poklesu ECD do doby jedné hodiny. V časech 2 a 4 hodin byl zaznamenán nárůst. Naše výsledky jsou v rozporu s těmi, které naměřili Murai a kolektiv (2003) na MIA PaCa-2 buňkách, kdy zaznamenal aktivaci štěpení už po 30 minutách přítomnosti 100 ng/ml PMA. Taktéž Cichy a kolektiv (2005) změřil u HTB58 po 90 minutách výrazné zvýšení ECD CD44 s 308 ng/ml PMA. Z jejich výsledků vyplývá, že PMA vyvolává štěpení CD44 vedoucí k uvolnění rozpustné CD44, která si buď zachová schopnost vázat ligand, nebo změní svou vazebnou kapacitu pro HA. Navrhují, že rozpustná CD44 může různě ovlivnit CD44-HA zprostředkované procesy. Okamoto s kolektivem (1999) zkoumali množství uvolněné ECD v závislosti na čase u U251MG. Zjistili časovou závislost vzestupu EDC na PMA. Při aplikaci 500 ng/ml PMA byl efekt výraznější než při 100 ng/ml. Výsledek byl detekovatelný už po 10 minutách. U HA jsme vyhodnotili vzestup ECD po uplynutí 4 hodin, v nižších časech k štěpení CD44 v našem případě nedošlo.

Pro zjištění přítomnosti receptoru CD44 přímo na buněčném povrchu a změn jeho množství po přidání PMA nebo HA jsme uplatnili průtokovou cytometrii. V případě vzorků kultivovaných v bezsérovém médiu s přidavkem PMA jsme nepozorovali žádný vliv po uplynutí jedné hodiny, což odpovídá práci Gepperta a Lipskyho (1991). Po 4 hodinách už byl patrný vzestup intenzity fluorescence, což znamená větší přítomnost CD44. Tyto výsledky se shodují s výsledky Sionova a Naora (1998), kteří provedli

experiment na buňkách HA9 a LB lymfocytech se stejným závěrem v obou případech tj. po 18 hodinách přítomnosti PMA v rozsahu koncentrací 0,5-10 ng/ml došlo k vzestupu množství celkové CD44. Čím vyšší byla koncentrace, tím vyšší výskyt receptoru. Pokud bylo použito médium s příměsí 10 % FBS, došlo i přes celkový nárůst koncentrace CD44 po vlivu PMA k poklesu tohoto receptoru a to v čase 1 i 4 hodin. Tímto jsme potvrdili výsledky Cichy a kolektivu (2005). Jejich pozorování zahrnovalo téměř srovnatelné podmínky 90 minut vlivu 308 ng/ml PMA na HTB58 (rakovinné buňky) taktéž za přítomnosti 10 % FBS. HA kopírovala ve všech případech chování po PMA až na její 4 hodinovou přítomnost u sérových buněk, kdy došlo k nárůstu množství receptoru CD44. Celkové množství CD44 na povrchu buněk bylo přibližně trojnásobné v přítomnosti 10% FBS oproti bezsérovému médiu.

Proto, abychom zviditelnili efekt PMA na štěpení CD44 a následnou translokaci jeho intracelulární domény do jádra, jsme si HT-29 transfekovali vektorem nesoucím sekvenci CD44 s přidanou sekvencí GFP na C-konci CD44. Zjistili jsme, že nejlepší účinnost transfekce je při použití kombinace 74,2  $\mu$ l media Mc'Coys, 4,5  $\mu$ l atraktantu a 1,3  $\mu$ l plazmidu. Přesto byla celková účinnost transfekce u tohoto typu buněk velmi nízká. Takto připravené buňky jsme nechali buď bez ovlivnění nebo s 500 - 2000 ng/ml PMA a v čase zaznamenávali za použití fluorescenční mikroskopie jejich změny. Ověřili jsme náš předpoklad, tj. v kontrolním vzorku nedošlo k žádným změnám, zatímco u všech koncentrací PMA se ICD translokovala do okolí jádra. Stejných výsledků na větším množství buněk jsme dosáhli při použití MDA-MB-231, u kterých jsme aplikovali protilátky na ICD CD44. Miletti-González s kolektivem (2012) v obdobném pokusu zjistili, že u stabilně transfekovaných MCF-7 buněk byla ICD CD44 standardně nalezena jak v cytoplazmě, tak v menší míře i v jádře. Okamoto a kolektiv (1999) na rozdíl od nás pozorovali vliv PMA na lokalizaci CD44 s použitím U251MG buněčné linie. Bez ovlivnění se CD44 nachází na polymerovaném aktinu koncentrovaném na vnitřní straně membrány. Obdobnou lokalizaci vykazují i ERM proteiny. PMA způsobuje vrásnění cytoplazmatické membrány a změny v cytoskeletu, které vedou k redistribuci CD44 a současně ERM směrem k jádru.

Dále jsme chtěli zjistit, zda nám výsledky neovlivňuje nadměrná buněčná smrt. Proto jsme provedli procentuální vyhodnocení nekrotických a apoptotických buněk pomocí průtokového cytometru. Neprokázali jsme výrazný vliv ani PMA ani HA na viabilitu HT-29. HA vyvolala mírné snížení buněčné smrti. Zhu a kolektiv (2013) se zabývali touto problematikou ve vztahu k molekulové hmotnosti HA a zjistili, že u DSC buněk dochází vlivem vysokomolekulární HA (více než 950 kDa) po 48 hodinách k inhibici apoptózy, zatímco u středních a nízkých molekulových hmotností je tomu naopak. Jiných výsledků dosáhli Ruffell a Johnson (2008), kteří si pro stanovení buněčné smrti v závislosti na HA připravili Jurkat T-lymfocyty transfekované CD44 zmutovaným na S180, který se vyznačuje vyšší hladinou navázané HA. Buňky nabyly touto úpravou větší citlivosti k aktivaci buněčné smrti. Vysokomolekulární HA buněčnou smrt aktivoval, kdežto nízkomolekulární neměl žádný vliv. Dále sledovali, že se vzrůstající koncentrací HA vzrůstá i buněčná smrt. PMA v naší práci vyvolal mírné zvýšení buněčné smrti. Huang a

kolektiv (2014) se zabývali apoptózou na pluripotentních buňkách K562. Po 72 hodinách působení PMA v rozmezí koncentrací 1,2 - 12,3 ng/ml zaznamenali vzrůstající apoptózu spolu s koncentrací. Opačné výsledků dosáhli Illera s kolektivem (1993). Nejdříve zaznamenali spontánní vzestup apoptózy korelující s narůstajícím časem, po přidání PMA se míra apoptotických buněk snížila. Ruffell a Johnson (2008) vyhodnotili mírný vzestup apoptotických Jurkat T-lymfocytů (S180 CD44) s narůstajícím časem (až do 16 hodin), po 4 hodinách byl efekt nepatrný.

Některé z našich výsledků se neshodovaly s jinými uvedenými autory, což přičítáme odlišným podmínkám a různým buněčným liniím. Nejlepších výsledků jsme dosáhli metodou Western Blot, která nám sice neumožnila výsledky kvantifikovat, ale zřetelně zobrazila vývoj situace v čase. Také se nám podařilo dosáhnout dobrých výsledků při fluorescenčním mikroskopickém pozorování translokace ICD CD44 do jádra.



## 8. ZÁVĚR

V této práci se nám podařilo přispět k optimalizaci postupů, kterými je možné sledovat aktivaci receptoru CD44 u HT-29 buněčné linie v závislosti na čase. Vybrané metody nám umožnily nahlédnout jak na celkové množství receptoru u buněk, tak na jeho štěpení na jednotlivé domény. Jako pozitivní kontrolu jsme zvolili PMA a jako přirozený aktivátor kyselinu hyaluronovou 71 kDa. Získané výsledky můžeme shrnout do několika bodů:

- Western Blot: Změna celkového množství receptoru vlivem PMA a HA byla shodná, jeho množství prudce vzrostlo a s narůstajícím časem klesalo. U produktů štěpení byla zaznamenána opačná reakce, tj. vlivem HA se množství ECD zvýšilo nejvíce po 10 minutách, naopak po PMA vzrostlo nejvíce po 4 hodinách.
- ELISA: Při stanovení odštěpené ECD CD44 uvolněné do média jsme zaznamenali analogickou odpověď receptoru na PMA i HA (v nízkých časech pokles, po 4 hodinách zvýšení) s tím, že po 2 a 4 hodinách s PMA byl nárůst ECD výraznější.
- Průtoková cytometrie: V bezsérovém médiu se vliv HA a PMA na nárůst povrchového CD44 projevil až po 4 hodinách. HA vyvolala stejnou odezvu i v médiu s přídatkem 10% FBS, kdežto vlivem PMA došlo ke snížení množství CD44. Přítomnost CD44 na povrchu buněk byla přibližně trojnásobná při použití 10% FBS média oproti bezsérovému.

Na grafech jsme pozorovali formování dvou populací, tento jev nás nasměroval k prověření buněčné smrti. Při stanovení buněčné smrti jsme však nezaznamenali výrazný vliv PMA ani HA na viabilitu buněk.

- Fluorescenční a konfokální mikroskopie: V prvním kroku jsme zjistili optimální složení transfekční směsi (poměr transfekčního činidla a plazmidu) pro přípravu ICD CD44 značené GFP. Dále jsme na takto připravených buňkách zaznamenali vliv PMA. Vzorky vykazovaly pozorovatelnou translokaci ICD CD44 do jádra. Zde jsme použili také jinou buněčnou linii (MDA-MB-231) pro pozorování shodného jevu na větším množství buněk.

## 9. SEZNAM NEJPOUŽÍVANĚJŠÍCH ZKRATEK

Zkratka	Význam anglicky	Význam česky
CD (44)	Clusters of Differentiation	
CD44s		Standardní isoforma CD44
ctrl	Control	Kontrola
ECD	Extracellular domain	Extracelulární doména
ERM		ezrin, radixin, moesin proteiny
FBS	Fetal bovine serum	Fetální hovězí sérum
HA	Hyaluronic acid	Hyaluronová kyselina
HARE	Hyaluronan receptor for endocytosis	
HYAL		Hyaluronidáza
ICD	Intracellular domain	Intracelulární doména
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor	
PKC		Protein kináza C
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate	
RHAMM	Hyaluronan-mediated motility receptor	
RT	Room temperature	Pokojová teplota
TLR	Toll-like receptor	
WB	Western Blot	

## 10. SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

### Seznam obrázků:

<b>Obr. 1</b>	Konformační vzorec disacharidové jednotky HA tvořené ( $\beta$ -1-4)-D-glukuronovou kyselinou a ( $\beta$ -1-3)- <i>N</i> -acetyl-D-glukosaminem.....	10
<b>Obr. 2</b>	Struktura receptoru CD44 znázorňující čtyři hlavní domény, tj. hyaluronan vázající, blízko membráně, transmembránovou a cytoplazmatickou .....	18
<b>Obr. 3</b>	Oblast alternativního sestřihu CD44 .....	20
<b>Obr. 4</b>	Štěpení CD44 na frakce .....	22
<b>Obr. 5</b>	HT-29 200x .....	27
<b>Obr. 6</b>	Membrána se vzorky po ovlivnění 500 ng/ml PMA .....	37
<b>Obr. 7</b>	Membrána se vzorky po ovlivnění 100 $\mu$ g/ml HA .....	38
<b>Obr. 8</b>	Kalibrační křivka .....	39
<b>Obr. 11</b>	Ohraničení populace .....	41
<b>Obr. 12</b>	Histogram vyjadřující specifitu použité protilátky proti CD44 .....	42
<b>Obr. 13</b>	Průtoková cytometrie- grafy zobrazující množství CD44 na HT-29 v bezsérovém médiu po 1 hodině. ....	43
<b>Obr. 14</b>	Průtoková cytometrie- grafy zobrazující množství CD44 na HT-29 v bezsérovém médiu po 4 hodinách. ....	44
<b>Obr. 16</b>	Průtoková cytometrie- grafy zobrazující množství CD44 na HT-29 v sérovém médiu po 1 hodině. ....	45
<b>Obr. 17</b>	Průtoková cytometrie- grafy zobrazující množství CD44 na HT-29 v sérovém médiu po 4 hodinách. ....	46
<b>Obr. 19</b>	Oddělení dvou významných populací .....	47
<b>Obr. 23</b>	ICD CD44 značená GFP, vzorek A (kontrola) .....	50

<b>Obr. 24</b>	ICD CD44 značená GFP, vzorek D .....	50
<b>Obr. 25</b>	ICD CD44 značená GFP, vzorek G .....	51
<b>Obr. 26</b>	Časový sběr translokace ICD CD44 do jádra - kontrola .....	51
<b>Obr. 27</b>	Časový sběr translokace ICD CD44 do jádra - po ovlivnění 500 ng/ml PMA .....	52
<b>Obr. 28</b>	Časový sběr translokace ICD CD44 do jádra - po ovlivnění 1000 ng/ml PMA .....	53
<b>Obr. 29</b>	Časový sběr translokace ICD CD44 do jádra - po ovlivnění 2000 ng/ml PMA .....	54
<b>Obr. 30</b>	Buňka HT-29 .....	54
<b>Obr. 31</b>	Buňka HT-29 po ovlivnění 500 ng/ml PMA .....	55
<b>Obr. 32</b>	Buňka HT-29 .....	55
<b>Obr. 33</b>	Translokace ICD CD44 do jádra po ovlivnění 500 ng/ml PMA v bezsérovém médiu (0%). .....	56
<b>Obr. 34</b>	Translokace ICD CD44 do jádra po ovlivnění 500 ng/ml PMA v sérovém médiu (10%). .....	57
<b>Obr. 35</b>	Reprezentativní obrázek grafického hodnocení buněčné smrti na průtokovém cytometru .....	58

### Seznam grafů:

<b>Graf 9</b>	Množství ECD CD44 ve vzorku média po ovlivnění 500 ng/ml PMA .....	40
<b>Graf 10</b>	Množství ECD CD44 ve vzorku média po ovlivnění 100 µg/ml HA .....	40
<b>Graf 15</b>	Množství CD44 ve vzorku s bezsérovým médiem. Průměr relativních hodnot fluorescence. ....	44
<b>Graf 18</b>	Množství CD44 ve vzorku se sérovým médiem. Průměr relativních hodnot fluorescence. ....	46
<b>Graf 20</b>	Graf procentuálního zastoupení buněk ve dvou populacích po 1 hodině. ....	48

<b>Graf 21</b>	Graf procentuálního zastoupení buněk ve dvou populacích po 4 hodinách. ...	48
<b>Graf 22</b>	Počet úspěšně transfekovaných buněk .....	49
<b>Graf 36</b>	Graf procentuálního zastoupení živých/ apoptotických/ nekrotických buněk v populaci kultivované v bezsérovém médiu (0%) .....	59
<b>Graf 37</b>	Graf procentuálního zastoupení živých/ apoptotických/ nekrotických buněk v populaci kultivované v sérovém médiu (10%) .....	60

Seznam tabulek:

<b>Tab. 1</b>	Složení akrylamidového gelu .....	34
<b>Tab. 2</b>	Složení ovlivňovacího roztoku .....	35

## 11. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha: Fluorescenční mikroskopie - translokace ICD CD44 v čase po ovlivnění 0, 500, 1000 a 2000 ng/ml PMA. CD nosič.

## 12. POUŽITÁ LITERATURA

### Knižní publikace:

1. GARG, H., HALES C. (eds.): *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1.vyd. Amsterdam: Elsevier, 2004a, s. 21 - 36. ISBN 0-08-044382-6.
2. GARG, H., HALES C. (eds.): *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1.vyd. Amsterdam: Elsevier, 2004b, s. 73 - 79. ISBN 0-08-044382-6.
3. GARG, H., HALES C. (eds.): *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1.vyd. Amsterdam: Elsevier, 2004c, s. 153 - 175. ISBN 0-08-044382-6.
4. GARG, H., HALES C. (eds.): *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1.vyd. Amsterdam: Elsevier, 2004d, s. 83 - 111. ISBN 0-08-044382-6.

### Články:

5. CAILLEAU, R., YOUNG, R., OLIVE, M., a kol.: Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions. *Journal of the national cancer institute.*, 1974, roč. 53, č. 3, s. 661 - 674.
6. CICHY, J., KULIG, P., PURÉ, E.: Regulation of the release and function of tumor cell-derived soluble CD44. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2005, roč. 1745, č. 1, s. 59 - 64.
7. CYWES, C., STAMENKOVIC, I., WESSELS, M.: CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus*. *The journal of clinical investigation.*, 2000, roč. 106, s. 995 - 1002.

8. FOGH, J., FOGH, M., ORFEO, T.: One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute.*, 1977, roč. 59, s. 221 - 226.
9. GEPPERT, TD., LIPSKY, PE.: Association of various T cell-surface molecules with the cytoskeleton. Effect of cross-linking and activation. *The Journal of Immunology.*, 1991, roč. 146, č. 10, s. 3298 - 3305. *Abstrakt databáze PubMed.*
10. HUANG, R., ZHAO, L., CHEN, H., a kol.: Megakaryocytic differentiation of K562 cells induced by PMA reduced the activity of respiratory chain complex IV. *Plos One.*, 2014, roč. 9, č. 5, s. 1 - 12.
11. ILLERA, VA., PERANDONES, CE., STUNZ, LL., a kol.: Apoptosis in splenic B lymphocytes. Regulation by protein kinase C and IL-4. *The Journal of Immunology.*, 1993, roč. 151, č. 6, s. 2965 - 2973. *Abstrakt databáze PubMed.*
12. LADEDA, V., AGUIRRE GHISO, J., KIER JOFFÉ, E.: Function and expression of CD44 during spreading, migration, and invasion of murine carcinoma cells. *Experimental cell research.*, 1998, roč. 242, s. 515 - 527.
13. LEGG, JW., LEWIS, CA., PARSONS, M., a kol.: A novel PKC-regulated mechanism controls CD44-ezrin association and directional cell motility. *Nature cell biology.*, 2002, roč. 4, s. 399 - 407.
14. MILETTI-GONZÁLEZ, K. E., MURPHY, K., KUMARAN, M., a kol.: Identification of function for CD44 intracytoplasmic domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) transcription via novel promoter response element. *The journal of biological chemistry.*, 2012, roč. 287, č. 23, s. 18995 - 19007.
15. MURAI, T., SUGAHARA, K., NISHINAKAMURA, H., a kol.: Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *The journal of biological chemistry.*, 2003, roč. 278, č. 34, s. 32259 - 32265.
16. NAGANO, O., SAYA, H.: Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Science.*, 2004, roč. 95, č. 12, s. 930 - 935.



17. OERTLI, B., FAN, X., WÜTHRICH, R. P.: Characterization of CD44-mediated hyaluronan binding by renal tubular epithelial cells. *Nephrology, Dialysis, Transplantation.*, 1998, roč. 13, č. 2, s. 271 - 278.
18. OKAMOTO, I., KAWANO, Y., MATSUMOTO, M., a kol.: Regulated CD44 cleavage under the control of protein kinase C, calcium influx, and the Rho family of small G proteins. *The journal of biological chemistry.*, 1999, roč. 274, č. 36, s. 25525 - 25534.
19. OKAMOTO, I., KAWANO, Y., MURAKAMI, D., a kol.: Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *The journal of cell biology.*, 2001, roč. 155, č. 5, s. 755 - 762.
20. PONTA, H., SHERMAN, L., HERRLICH, P.: CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews molecular cell biology.*, 2003, roč. 4, č. 1, s. 33 - 45.
21. RAJASAGI, M., VITACOLONNA, M., BENJAK, B., a kol.: CD44 promotes progenitor homing into the thymus and T cell maturation. *Journal of Leukocyte Biology.*, 2009, roč. 85, č. 2, s. 251 - 261. Abstrakt databáze PubMed.
22. RUFFELL, B., JOHNSON, P.: Hyaluronan induces cell death in activated T cells through CD44. *The Journal of Immunology.*, 2008, roč. 181, s. 7044 - 7054.
23. SIONOV, R. V., NAOR, D.: Calcium- and calmodulin-dependent PMA-activation of the CD44 adhesion molecule. *Cell Adhesion and Communication.*, 1998, roč. 6, č. 6, s. 503 - 523.
24. SLÍVA, J., MINÁRIK, J.: Hyaluronát - nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *Praktická gynekologie.*, 2009, roč. 2009, č. 3, s. 143 - 147.
25. TAKAHASHI, N., KNUDSON, C., THANKAMONY, S., a kol.: Induction of CD44 Cleavage in Articular Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism.*, 2010, roč. 62, č. 5, s. 1338 - 1348. Abstrakt databáze PubMed.

26. THORNE, R., LEGG, J., ISACKE, C.: The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *Journal of cell science.*, 2004, roč. 117, s. 373 - 380.
27. UNDERHILL, CH.: CD44: The hyaluronan receptor. *Journal of cell science.*, 1992, roč. 103, s. 293 - 298.
28. WEIDLE, U., MAISEL, D., KLOSTERMANN, S., a kol.: Differential Splicing Generates New Transmembrane Receptor and Extracellular Matrix-related Targets for Antibody-based Therapy of Cancer. *Cancer Genomics and Proteomics.*, 2011, roč. 8, č. 5, s. 211 - 226.
29. ZHU, R., WANG, S-C., SUN, C., a kol.: Hyaluronan-CD44 Interaction Promotes Growth of Decidual Stromal Cells in Human First-Trimester Pregnancy. *Plos One.*, 2013, roč. 8, č. 9, s. 1 - 10.

#### Internetové zdroje:

30. HASCALL, V., LAURENT, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties, 1997, [cit. 2016-02-13]  
<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
31. SALUSTRI, A., FULOP, C.: Role of Hyaluronan during ovulation and fertilization, 1998, [cit. 2016-02-13]  
<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA03/HA03E.html>
32. SCOTT, J.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences., 1998, [cit. 2016-02-13]  
<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
33. TAMMI, R., TAMMI, M.: Hyaluronan in the epidermis, 1998, [cit. 2016-02-13]  
<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA04/HA04E.html>
34. TOOLE, B.: Hyaluronan in morphogenesis and tissue remodeling, 1998, [cit. 2016-02-13] <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA08/HA08E.html>

35. Web interval, MDA-MB-231/GFP Cell Line, [cit. 2016-03-16]  
<http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-201-gfp-mda-231-cell-line.pdf>