

4 ZÁVĚRY

PRODUKCE INTEGRINU CD11b/CD18

PRODUKCE A PURIFIKACE PODJEDNOTKY CD11b PRO PŘÍPRAVU PROTILÁTEK VHODNÝCH K DETEKCI METODOU WESTERN BLOT

- Byly produkovány a purifikovány čtyři části podjednotky CD11b, které byly použity pro imunizaci myší a přípravu specifických protilátek.

PRODUKCE INTEGRINU CD11b/CD18 V S2 BUŇKÁCH - HMYZÍM EXPRESNÍM SYSTÉMU

- Bylo ukázáno, že přestože byla detekována nízká hladina intracelulární exprese podjednotky CD11b, tak S2 buňky nejsou schopny účinně transportovat tuto podjednotku na svůj povrch nebo sekretovat její extracelulární doménu do média. A to ani v případě, že je opatřena signálním peptidem specifickým pro tyto buňky. Dále bylo prokázáno, že použití plasmidů pro konstitutivní nebo indukibilní expresi proteinů nemá vliv na hladinu exprese podjednotky CD18.

ANALÝSA INTERAKCE RTX TOXINŮ S β_2 INTEGRINY – ROLE GLYKOSYLACE RECEPTORŮ VE VAZBĚ RTX TOXINŮ

- Vazba CyaA/233FLAG na buňky CHO-CD11b/CD18, J774A.1 nebo lidské neutrofilny vyžaduje glykosylaci integrinového receptoru CD11b/CD18. A zároveň bylo ukázáno, že snížení vazby CyaA po odstranění sacharidových řetězců není způsobeno nižším množstvím integrinu CD11b/CD18 na buněčném povrchu nebo jeho rozpadem na jednotlivé podjednotky CD11b a CD18.
- Vazbu CyaA na buňky produkující integrin CD11b/CD18 je možno inhibovat volnými sacharidy - chitobiosou, chitotriosou, D-mannosou, N-acetyllaktosaminem a sialovou kyselinou – sacharidy, které jsou obsaženy v N-glykosidicky vázaném oligosaccharidovém řetězci. To ukazuje na lektinovou aktivitu CyaA.
- Intoxikace buněk cAMP způsobená CyaA závisí na stavu glykosylace integrinového receptoru CD11b/CD18, která určuje vazbu CyaA.
- Glykosylace β_2 integrinových receptorů hraje klíčovou roli i ve vazbě a cytotoxické aktivitě dalších RTX toxinů.

IMUNOLOGICKÉ VYUŽITÍ CyaA JAKO NOSIČE PRO DOPRAVU MYKOBAKTERIÁLNÍCH EPITOPŮ DO ANTIGEN PREZENTUJÍCÍCH BUNĚK

- CyaA toxoid, který v pozici 336 nesl antigen TB10.4:1-96, nebyl schopen prezentovat epitop OVA:257-264 (pozice 108) na molekulách MHC I.
- Rekombinantní toxoidy CyaA-TB10.4 byly schopny prezentovat epitop TB10.4:20-28 na molekulách MHC I se stejnou nebo vyšší účinností než samotný minimální epitop TB10.4:20-28.
- Všechny toxoidy s vloženým epitopem v pozici 233, s výjimkou CyaA-TB10.4:20-28-OVA, dopravovaly antigen a prezentovaly jej s vyšší účinností než pozici 336
- Rekombinantní toxoidy CyaA-TB10.4 indukovaly silnou a specifickou cytotoxickou T-buněčnou odpověď proti peptidu TB10.4:20-28.
- Toxoid CyaA-TB10.4:1-96-OVA indukoval silnou proliferativní odpověď slezinných buněk.
- Imunizace toxoidy CyaA-TB10.4:1-96-OVA a CyaA-TB10.4:15-33-OVA nenavodila ochranu proti infekci *M. tuberculosis*.