

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra biochemie

**Mykobakteriální protein Hsp65
jako ligand pro leukocytární receptor
CD69**

Diplomová práce

Zuzana Kubínková

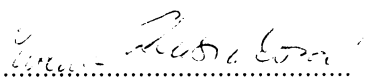
Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Karel Bezouška, CSc.

Vypracováno ve spolupráci s MBÚ AV ČR.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Karla Bezoušky, CSc. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

V Praze dne 3. května 2005



.....

Zuzana Kubínková

Děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. Karlu Bezouškovi, CSc. za podporu, rady a zázemí pro vypracování mé práce.

Dále děkuji Mgr. Petru Pompachovi za pomoc s 2D elektroforesou a analýzu vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie, Dr. Philippu Mazodierovi za laskavé poskytnutí kmenu *Streptomyces albus*, RNDr. Jiřímu Janečkovi, CSc. za jeho odbornou pomoc s kultivací streptomycet, Mgr. Danielu Kavanovi za trpělivost a pomoc s chromatografickým systémem a počítačovými programy, Janu Bílému za přípravu proteinu CD69 a všem dalším kolegům a kolegyním z laboratoře, kteří mi svými zkušenostmi a připomínkami pomáhali při vypracování mé diplomové práce.

Děkuji svým rodičům a Vítkovi Hrachovému za morální a finanční podporu během studia.

Řešení této diplomové práce bylo podporováno výzkumným záměrem MSM 21620808 a grantem A 5020403 od Grantové agentury Akademie věd ČR.

OBSAH

OBSAH	1
SEZNAM ZKRATEK	3
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	5
I. ÚVOD	6
I.1. IMUNITNÍ SYSTÉM	6
I.1.1. Vrozené imunitní mechanismy	6
I.1.2. Adaptivní imunitní mechanismy	6
I.1.3. Složky imunitního systému	7
I.1.4. Povrchové molekuly leukocytů	8
I.2. LEKTINY	9
I.2.1. Lektiny C-typu	10
I.3. PROTEIN CD69	11
I.3.1. Struktura proteinu CD69	11
I.3.2. Funkce CD69 v imunitním systému	12
I.4. HSP – PROTEINY TEPELNÉHO ŠOKU	16
I.4.1. HSP60 rodina proteinů tepelného šoku – chaperoniny	16
I.5. CHAPERONINY <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	18
I.5.1. Role Hsp65 v imunitním systému	20
II. MATERIÁL	22
II.1. PŘÍSTROJE A JINÉ VYBAVENÍ	22
II.2. CHEMIKÁLIE	23
II.3. ROZTOKY	25
III. METODY	26
III.1. VAZBA HSP65 NA RECEPTOR CD69 A JEJÍ INHIBICE PEPTIDY ODVOZENÝMI ZE SEKVENCE HSP65	26
III.1.1. Vazebné testy	26
III.1.2. Inhibiční testy	26
III.1.3. Gelová filtrační chromatografie	27
III.1.4. Ultracentrifugace na sacharosovém gradientu	28

III.2. HSP60 ZE <i>STREPTOMYCES ALBUS</i>	29
III.2.1 Kultivace buněk	29
III.2.2. Sklizení buněk a příprava lyzátů	29
III.3. ANALYTICKÉ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	30
III.3.1. SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu	30
III.3.2. Dvojměrná SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu	32
III.3.3. Barvení gelu stříbrnými solemi	33
IV. VÝSLEDKY	34
IV.1. VAZBA HSP65 NA RECEPTOR CD69 A JEJÍ INHIBICE PEPTIDY ODVOZENÝMI ZE SEKVENCE HSP65	34
IV.1.1. Vazebné testy	34
IV.1.2. Inhibiční testy	35
IV.1.3. Gelová filtrační chromatografie	38
IV.1.4. Ultracentrifugace na sacharosovém gradientu	40
IV.2. HSP60 ZE <i>STREPTOMYCES ALBUS</i>	42
IV.2.1 Kultivace buněk a sklizení buněk	42
IV.2.2. Dvojměrná SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu	42
V. DISKUSE	44
VI. SOUHRN	48
VII. SEZNAM LITERATURY	49
PŘÍLOHA	55
SROVNÁNÍ SEKVENCÍ CHAPERONINŮ	55
VYSVĚTLIVKY K PŘÍLOZE	56

SEZNAM ZKRATEK

Aminokyseliny jsou označeny standardními tří- či jednopísmennými zkratkami dle IUPAC.

Použité zkratky proteinů tepelného šoku se řídí nomenklaturou přijatou na konferenci v Cold Spring Harbor v roce 1996 [1]. Velkými písmeny jsou psány názvy rodin chaperonů, např. **HSP70**, zatímco názvy jednotlivých proteinů patřících do těchto rodin jsou psány jako Hsp, např. **Hsp70**. Malými písmeny a kursivou jsou psány názvy genů kodujících jednotlivé chaperony, např. *hsp70*.

2D PAGE	dvojměrná elektroforesa v polyakrylamidovém gelu
AA	akrylamid
APC	antigen prezentující buňka (A ntigen- P resenting C ell)
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCR	antigenní receptor B-lymfocytů (B - C ell R eceptor)
BSA	hovězí sérový albumin
CBB R250	Coomassie Brilliant Blue R250
CD	označení povrchových leukocytárních molekul (C luster of D ifferentiation)
CD69 Tg	CD69 transgen (myši) s konstitutivní expresí CD69 na povrchu lymfocytů
CD69 -/-	CD69 „knockout“ (myši) – myši s genovou delecí antigenu CD69
CIA	kolagenem indukovaná artritida (C ollagen- I nduced A rthritis)
Cpn	chaperonin
CRD	doména vázající sacharid (C arbohydrate R ecognition D omain)
CTLD	„doména podobná lektinům C-typu“ (C - T ype L ectin-like D omain)
DC	dendritická buňka (D endritic C ell)
DTT	dithiothreitol
Fc	imunoglobulinový fragment
G protein	GTP-vázající protein
hCD69	lidský protein CD69
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtOH	ethanol

HLA	hlavní histokompatibilní lidský komplex (H uman L eucocytes A ntigens)
Hsp	protein tepelného šoku (H eat S hock P rotein)
(¹²⁵I)Hsp65	protein Hsp65 značený radioaktivně pomocí (¹²⁵ I)
IAA	jodoacetamid
IEF	isoelektrická fokusace
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
LPS	lipopolysacharid
mAb	monoklonální protilátky (M onoclonal A ntibodies)
MALDI	desorpce/ionisace laserem za účasti matrice (M atrix A ssisted L aser D esorption I onization)
MeOH	methanol
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (M ajor H istocompatibility C omplex)
MS	hmotnostní spektrometrie (M ass S pectrometry)
NK	„přirozeně zabíječské buňky“ (N atural K illers)
NKC	komplex genů NK buněk (N atural K iller C omplex)
NKD	(N atural K iller D omain)
NKT	„přirozeně zabíječské“ T buňky
PLA₂	fosfolipasa A ₂
RBS	sekvence vázající ribosomy (R ibosome- B inding S equence)
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RA	rheumatoidní artritida
S1P₁	sfingosin-1-fosfát receptor 1
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS PAGE	elektroforesa v SDS polyakrylamidovém gelu
T_C	cytotoxické T lymfocyty
T_H	pomocné T lymfocyty (h elper)
TCR	antigenní receptor T-lymfocytů (T - C ell R eceptor)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TGF-β	transformující růstový faktor β (T ransforming G rowth F actor β)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Ačkoliv byl protein CD69 na povrchu lymfocytů objeven již před dvaceti lety, o jeho funkci v imunitním systému se stále spekuluje. Situace je ztížena také tím, že doposud nebyl odhalen jeho fyziologický ligand.

Tato práce se zabývá interakcí receptoru CD69 s mykobakteriálním proteinem Hsp65, který je možným ligandem pro tento receptor. Cílem práce bylo charakterisovat vazbu Hsp65 a z něj odvozených peptidů na protein CD69 a zjistit, které aminokyseliny jsou pro tuto vazbu klíčové. Dalším cílem bylo nalézt vhodný zdroj chaperoninu rodiny HSP60 obsahující sekvenci LELTE, za účelem izolace většího množství tohoto chaperoninu pro další vazebné studie.

I. ÚVOD

I.1. IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém je klíčovým homeostatickým mechanismem mnohobuněčných organismů. Rozeznává škodlivé od neškodného a poskytuje organismům ochranu před škodlivinami vnějšího prostředí. Imunitní mechanismy mohou být rozděleny do dvou základních skupin na **vrozené** (nespecifické) a **adaptivní** (antigenně specifické).

I.1.1. Vrozené imunitní mechanismy

Vrozené imunitní mechanismy jsou evolučně starší, najdeme je do různé míry u všech mnohobuněčných organismů. Zahrnují fagocytující a NK buňky, komplement, interferony, lektiny a další sérové proteiny. Jsou užitečné především při obraně proti plejádě rozličných patogenů, neboť mají schopnost rozpoznávat obecné strukturní a funkční vlastnosti společné různým patogenům, avšak nenacházející se na buňkách organismu vlastních. Aktivace vrozených imunitních mechanismů je velice rychlá (řádově minuty až hodiny), obvykle se obranných reakcí účastní jako první. Po rozpoznání cizorodých struktur na povrchu buňky se aktivují efektorové mechanismy fagocytujících buněk spolu s humorálním systémem (aktivace komplementu) a eliminují patogen. Některé fagocytující buňky jsou dále nezbytné pro zahájení antigenně specifických imunitních mechanismů, protože slouží jako buňky prezentující antigen (APC – Antigen-Presenting Cells) pro T lymfocyty.

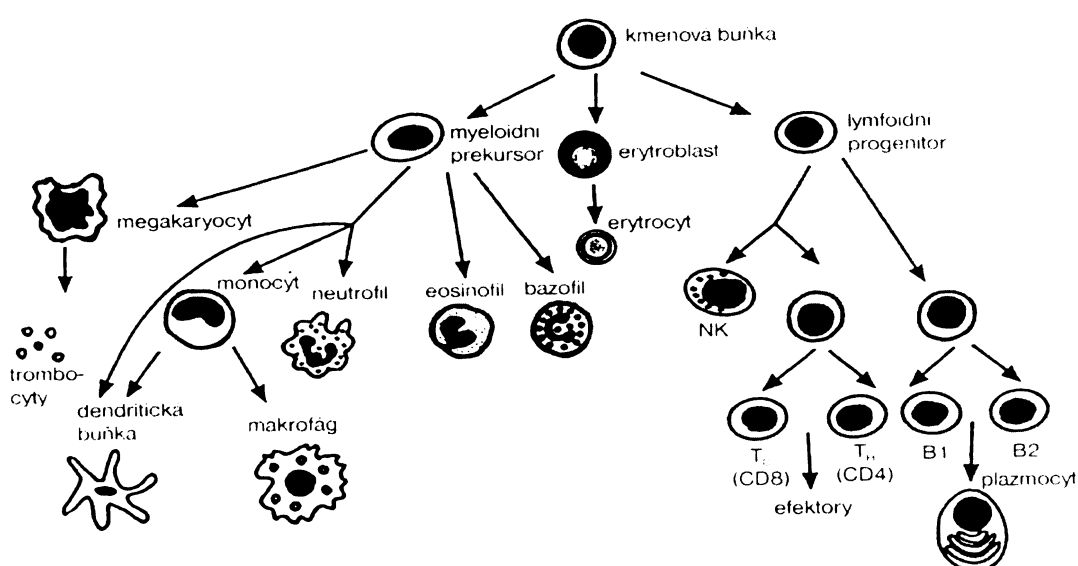
I.1.2. Adaptivní imunitní mechanismy

Adaptivní imunitní mechanismy jsou evolučně mladší, vyskytují se až u obratlovců. Tyto mechanismy rozpoznávají cizorodé struktury prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátek, antigenně specifických receptorů T lymfocytů) a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Jsou schopné uchovávat informaci o struktuře daného antigenu, tato vlastnost se označuje jako **imunologická paměť**. Plné rozběhnutí antigenně specifické imunitní odpovědi trvá delší dobu, obvykle několik dní až týdnů.

U obratlovců jsou oba dva typy imunitních mechanismů nepostradatelné a navzájem spolupracují.

I.1.3. Složky imunitního systému

Imunitní systém je tvořen různými typy buněk, makromolekul a nízkomolekulárních látek, které společně vytvářejí lymfatickou tkáň a lymfatické orgány. **Primární** lymfatické orgány (brzlík a kostní dřeň) jsou místem vzniku, diferenciaci a zrání imunokompetentních buněk, zatímco **sekundární** lymfatické orgány (slezina, lymfatické uzliny) jsou místem, kde dochází k antigenně specifickým obranným reakcím. Buňky imunitního systému – **imunocyty** – zahrnují především různé typy bílých krvinek – **leukocytů** – které se vyvíjejí pod vlivem rozličných faktorů z pluripotentních kmenových buněk kostní dřeně (obr. 1).



Obr. 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky. Převzato z [2].

Dvě základní vývojové linie jsou linie **myeloidní** a **lymfoidní**. Z myeloidní linie vznikají monocyty, granulocyty, mastocyty a dendritické buňky (dále též erytrocyty a trombocyty), které dohromady tvoří základ nespecifické části imunitního systému, zatímco z lymfoidní linie se diferencují buňky tvořící základ specifické imunity – B a T lymfocyty a také NK buňky, tvořící spojenci mezi oběma složkami imunity. Každý z těchto druhů buněk má v imunitním systému charakteristickou a nezastupitelnou roli, neboť imunitní odpověď organismu je zprostředkována právě leukocyty. V dospělosti téměř všechny vznikají, množí se a dozrávají v kostní dřeni a nacházejí se ve zralých stádiích v periferní krvi, kde zůstávají v cirkulaci, nebo vycestovávají do tkáně [2].

I.1.4. Povrchové molekuly leukocytů

Na povrchu leukocytů, stejně jako na povrchu jiných buněk, se nacházejí stovky různých druhů molekul – některé ve velmi malém počtu, jiné ve značném množství. Leukocytární povrchové molekuly lze rozdělit podle funkcí do následujících skupin [2]:

- **antigenně specifické receptory** (TCR, BCR)
- **adhezivní molekuly** (selektiny, integriny, muciny)
- **Fc receptory** (vázají Fc části imunoglobulinů)
- **komplementové receptory** (vázají různé fragmenty složek komplementu)
- **receptory cytokinů a chemokinů**
- **regulační signalizační receptory a jejich ligandy** (sem patří mimo jiné i lektinové receptory C-typu na povrchu NK buněk.)
- **transportní proteiny** (membránové pumpy a kanály zprostředkovávající transport přes membránu)
- **povrchové enzymy** (membránové proteiny, jejichž intracelulární nebo extracelulární části vykazují enzymovou aktivitu. Jsou to převážně receptorové kinyasy nebo membránové fosfatasy.)
- **receptory mikrobiálních složek**
- **molekuly prezentující antigeny** (tzv. MHC glykoproteiny, které váží na své extracelulární části peptidové fragmenty proteinů produkovaných buňkou – MHC I. třídy, případně buňkou pohlčených – MHC II. třídy)

Většina dějů v imunitním systému závisí na mezibuněčných kontaktech, které jsou zprostředkovány interakcemi mezi mnoha páry **adhezivních molekul**. Ve většině případů nepůsobí adhezivní molekuly jako pasivní „lepidlo“, ale po interakci s vazebným partnerem na povrchu druhé buňky přenášejí dovnitř buňky signály, které ji informují o tom, že došlo k adhezi a že je na ni potřeba reagovat [2]. Adhezivní molekuly mohou být exprimovány konstitutivně, nebo se na povrchu buněk objevují až po aktivaci. Do skupiny adhezivních molekul patří i lektiny, o nichž je krátce pojednáno v následující kapitole. Některé lektiny patří zároveň mezi regulační signalizační receptory NK buněk, o nich bude pojednáno ve zvláštní kapitole I.2.1.

Povrchové molekuly leukocytů se označují tzv. **CD-názvy** (původně z anglického Cluster of Differentiation). Tento názvoslovný systém je pouze inventurní, v němž nově popisované molekuly dostávají pořadová čísla. Mnohé z molekul mají alternativní názvy související s jejich strukturou či funkcí.

Mnoho povrchových molekul je sdíleno mnohými, eventuelně všemi typy leukocytů, neboť zajišťují některé společné základní funkce, např. membránový transport nebo adhezivitu. Jiné povrchové molekuly jsou však přítomné pouze na některých subpopulacích leukocytů, což souvisí s určitou funkční specializací příslušných leukocytů. Povrchové molekuly charakteristické pouze pro určité subpopulace leukocytů se nazývají „**markery**“ těchto subpopulací. Prakticky se jich využívá pro diagnostické určování jednotlivých leukocytárních subpopulací, obvykle metodou průtokové cytofluorometrie. Charakteristické molekuly, které se na povrchu leukocytů objevují až po jejich aktivaci, se souhrnně označují jako **aktivační antigeny**.

I.2. LEKTINY

Pojmem lektiny se označují proteiny nebo glykoproteiny, které rozpoznávají a reversibilně vážou sacharidové struktury [3]. Z této definice byly vyjmuty protilátky (na rozdíl od protilátek nemají lektiny typickou strukturu imunoglobulinů a nejsou schopné reagovat na antigenní podnět) a enzymy (lektiny nemění kovalentní strukturu navázaných sacharidů). Jsou rozšířené ve všech říších organismů – nacházejí se u virů, bakterií, rostlin i živočichů. Název lektin pochází z latinského slova „*legere*“ (zvolit si). Živočišné lektiny lze klasifikovat do několika rodin, na základě jejich evoluční příbuznosti, případně dalších charakteristických vlastností. Rozlišujeme tyto **strukturní rodiny lektinů** [4]:

- **lektiny C-typu** (vazba sacharidu je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů)
- **lektiny I-typu** (lektinová doména je podobná doménám imunoglobulinovým)
- **galektiny** (dříve lektiny S-typu, váží galaktosylové zbytky a jejich aktivita je závislá na thiolových skupinách)
- **pentraxiny** (jejich podjednotky tvoří pentamer)
- **lektiny P-typu** (vázají glykoproteiny obsahující mannosu-6-fosfát)
- **lektiny L-typu** (jejich lektinová doména je příbuzná s rostlinnými lektiny leguminos).

- **lektiny R-typu** (strukturně příbuzné s ricinem)
- **lektiny M-typu** (strukturně podobné některým typům manosidas)
- **calnexin** (ovlivňuje posttranslační modifikace v endoplasmatickém retikulu)

Je však třeba poznamenat, že některé nově objevené lektiny není možné zařadit do žádné z uvedených rodin.

I.2.1. Lektiny C-typu.

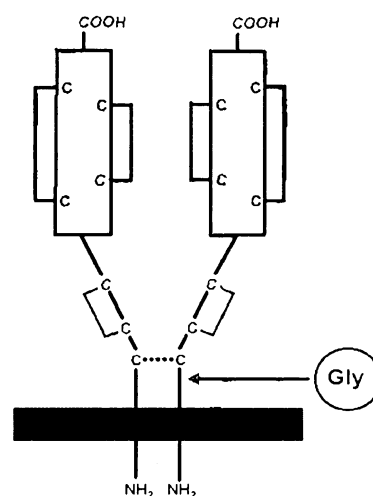
Společným znakem všech lektinů C-typu je přítomnost **sacharid vázající domény** (CRD – Carbohydrate-Recognition Domain), jejíž funkce je závislá na přítomnosti vápenatých iontů [5]. Tyto lektiny se nalézají na buněčném povrchu, nebo rozpustné v séru či extracelulární matrix. Na základě aminokyselinové sekvence bylo definováno sedm skupin lektinů C-typu:

- I. – proteoglykany
- II. – transmembránové receptory II. typu
- III. – kolektiny
- IV. – selektiny
- V. – lymfocytární membránové antigeny II. typu
- VI. – mannosové receptory makrofágů
- VII. – volné sacharid vázající domény.

V imunitním systému hrají důležitou roli lektiny ze skupiny **lymfocytárních membránových antigenů II. typu**. Vyskytují se nejvíce na povrchu NK buněk a hrají zřejmě důležitou roli v jejich protinádorové aktivitě. Tyto lektiny jsou kódovány geny v tzv. **NK genovém komplexu** a nachází se mezi nimi jak stimulační (NKR-P1), tak inhibiční (skupina receptorů NKG2) receptory NK buněk. Lektinové receptory NK buněk se od ostatních lektinů C-typu odlišují v aminokyselinové sekvenci CRD domény a to i v jejich nejvíce konzervovaných částech. Není proto divu, že mezi ligandy receptorů NK buněk C-lektinového typu patří i proteiny – např. neklasické MHC glykoproteiny I. třídy jsou ligandy pro CD94/NKG2 heterodimerní receptory [6]. CRD doména lymfocytárních membránových antigenů II. typu se pro svou odlišnost označuje jako doména podobná lektinům C-typu (CTLD – C-Type Lectin-Like Domain) nebo přímo jako **NKD** (Natural Killer Domain).

I.3. PROTEIN CD69

Molekula CD69 bývá nejčastěji charakterizována jako velice časný aktivační antigen leukocytů. Vyskytuje se konstitutivně na povrchu monocytů [7], neutrofilů [8], epidermálních Langerhansových buněk [9] a krevních destiček [10], k indukci její exprese dochází záhy po aktivaci T lymfocytů [11], B lymfocytů, NK buněk [12] a dalších buněk hematopoetického původu [13]. Protein CD69 byl poprvé popsán v roce 1986 jako molekula objevující se na povrchu T lymfocytů během jedné hodiny po jejich aktivaci [14]. Po agregaci extracelulárních částí molekul CD69 vyvolané navázáním specifických protilátek docházelo k aktivaci a proliferaci lymfocytů nesoucích CD69 na svém povrchu. Díky těmto počátečním pozorováním získal protein CD69 název EA 1 (z angl. **E**arly **A**ctivation **A**ntigen **1**) [14], během následujících let byl popsán i několika dalšími laboratořemi a byly mu přiděleny názvy AIM (z angl. **A**ctivation **I**nducer **M**olecule) [15], MLR-3 [16] nebo Leu-23 [12]. Na IV. Mezinárodní konferenci o lidských leukocytárních antigenech (1989) bylo této molekule přiřazeno jednotné označení CD69. Indukce exprese molekuly CD69 velmi dobře koreluje s dalšími měřítky aktivace lymfocytů, a proto se jí často využívá jako „markeru“ aktivovaných lymfocytů v místech chronického zánětu nebo v nádorových infiltrátech.



Obr. 2: Schema struktury proteinu CD69. Šipkou je označeno místo glykosylace, schematicky jsou vyznačeny disulfidové můstky. Černý obdélník znázorňuje plasmatickou membránu.

Převzato z [19].

I.3.1. Struktura proteinu CD69.

Gen kódující lidský protein CD69 se nachází v oblasti tzv. NK genového komplexu na 12. chromosomu [5]. Molekula CD69 patří do rodiny lektinů C-typu, která zahrnuje i další receptory NK buněk. Struktura CD69 je schematicky naznačena na obr. 2. CD69 je transmembránový protein, exprimovaný na buněčném povrchu jako kovalentní homodimer s podjednotkami o velikosti 28 nebo 32 kDa. Oba dva řetězce mají shodnou proteinovou část tvořenou polypeptidem o délce 199 aminokyselin a velikosti 22,5 kDa, mohou však být rozdílně glykosylované. N-glykosylační místo proteinu CD69 se nachází v oblasti

krčku, vně buňky těsně nad cytoplasmatickou membránou. V oblasti krčku se také nachází molekula cysteinu (Cys68) účastnící se tvorby intermolekulárního disulfidového můstku s další molekulou CD69 [13]. Extracelulární C koncová část proteinu CD69 dále zahrnuje globulární doménu podobnou lektinům C-typu (CTLD). Cytoplasmatická N-koncová doména je poměrně krátká, nebyly na ní prozatím identifikovány žádné motivy spojené se signalisací, byla však odhalena její konstitutivní fosforylace na serinech [12] a asociace s podjednotkou G proteinu [17]. Je schopna přenášet signál dovnitř buňky a je důležitá pro správnou povrchovou expresi CD69 [18].



Obr. 3: Struktura CTLD receptoru CD69. Zeleně – α -helixy, modře – β -skládané listy. Podle [21].

domén C-typu mírně odlišuje [21]. Těmto doménám chybějí konservované aminokyseliny zodpovědné za vazbu vápníku a sacharidů. Podobnou strukturu lektinové domény (nazývané pro svou mírnou odlišnost NKD – Natural Killer Domain) mají dále receptory NK buněk CD94 a Ly49A.

V současné době je k dispozici několik krystalových struktur CTLD domény proteinu CD69 [19, 20, 21], viz obr.3. Porovnáním těchto struktur s dostupnými krystalovými strukturami dalších lektinů C-typu se ukázalo, že struktura CTLD proteinu CD69, jakož i dalších receptorů NK buněk lektinové rodiny, se od struktury klasických lektinových

I.3.2. Funkce CD69 v imunitním systému.

CD69 je exprimován velice rychle, avšak pouze přechodně na povrchu různých druhů lymfocytů, je jejich aktivačním antigenem. Mezi signály vedoucí k jeho expresi patří mitogenní nebo anti-CD3 stimulace T lymfocytů, zrání lymfocytů v thymu, zesílení povrchových imunoglobulinů na povrchu B lymfocytů a cytokinová, anti-CD16 nebo anti-CD2 stimulace NK buněk. Exprese CD69 je regulována na úrovni mRNA, která je velmi rychle degradována [5, 22]. Funkce proteinu CD69 byla nejprve studována *in vitro* využitím monoklonálních protilátek proti CD69 v přítomnosti forbolmyristylacetátu (PMA) [13]. Ukázalo se, že agregace molekul CD69 vede k toku vápenatých iontů do cytosolové matrix, proliferaci, sekreci prozánětlivých cytokinů a aktivaci cytotoxických

mechanismů [7, 15]. V případě monocytů dochází k aktivaci cytosolové fosfolipasy A_2 (PLA_2), indukci sekrece oxidu dusnatého (NO) a degranulaci [7]. U krevních destiček vyvolává zesílení CD69 aktivaci PLA_2 , aktivaci metabolismu arachidonové kyseliny a následně agregaci destiček [10]. Ve světle těchto pozorování byla molekule CD69 přisuzována funkce aktivačního prozánětlivého receptoru. Byla popsána asociace cytoplasmatické části CD69 s G proteinem a závislost aktivace PLA_2 na tomto G proteinu u krevních destiček a T lymfocytů [17]. Signalizační dráha vedoucí k cytotoxické aktivitě zprostředkované zapojením receptoru CD69 však zatím odhalena nebyla. Agregace receptorů CD69 prostřednictvím mAb může ovšem vést i k apoptose různých druhů buněk, např. eosinofilů [23] a monocytů [24], byla navržena jeho možná účast na delecii autoreaktivních lymfocytů [25].

V současné době se studie funkce molekuly CD69 soustřeďují na *in vivo* modely a využívají transgenních myší exprimujících CD69 na povrchu lymfocytů konstitutivně (*CD69 Tg* myši) nebo „knockout“ myši s „vypnutým“ genem pro CD69 (*CD69 -/-* myši).

Studie charakterizující různé druhy hematopoetických buněk v *CD69 -/-* myších neodhalila žádné výrazné poruchy imunitních funkcí. V *CD69 -/-* myších dochází k normálnímu vývoji všech imunocytů, rovněž zastoupení a distribuce imunocytů se nijak neliší od divokých myších kmenů. Lymfocyty izolované z thymu, sleziny a lymfatických uzlin *CD69 -/-* myši jsou po stimulaci cytokiny či bakteriálními produkty (LPS, enterotoxin B) schopné proliferativní odpovědi, stejně tak v žádné z dalších testovaných funkcí se lymfocyty bez receptoru CD69 neodlišují od lymfocytů normálních [26]. Tato studie probíhala v podmínkách bez přítomnosti patogenů, další výzkum se proto zaměřil na imunitní odpověď *CD69 -/-* myši v různých modelech chronických zánětlivých onemocnění a nádorových onemocnění.

Jedním z modelů je kolagenem indukovaná artritida (CIA – Collagen Induced Arthritis), myší experimentální model autoimunitního zánětlivého kloubního onemocnění – rheumatoidní artritidy (RA – Rheumatoid Arthritis). U *CD69 -/-* myši se na rozdíl od myši nesoucích alelu divokého typu vyvíjí zhoršená forma CIA, doprovázená zvýšenou reaktivitou T a B lymfocytů proti kolagenu. Vážnost onemocnění koreluje se sníženou hladinou cytokinu TGF- β [27]. TGF- β je cytokin s protizánětlivou funkcí, který má i v dalších autoimunitních onemocněních protektivní roli [28]. Na spojitost snížené hladiny TGF- β s nepřítomností receptoru CD69 poukazuje fakt, že agregace CD69 pomocí mAb na

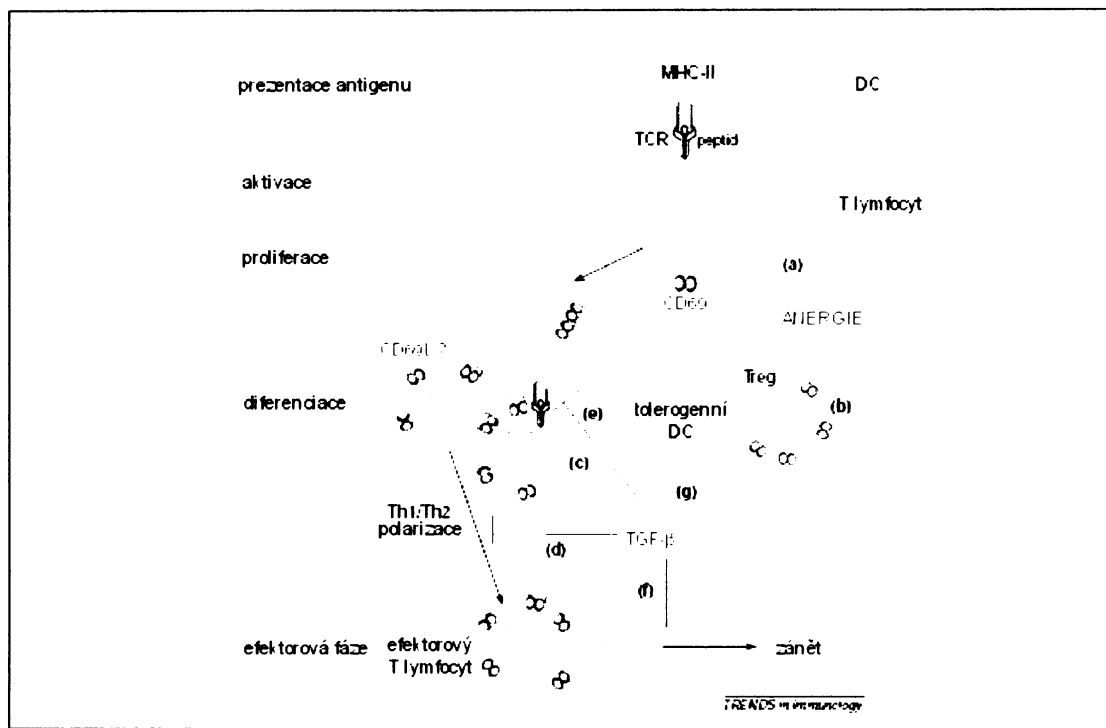
povrchu lymfocytů izolovaných z místa zánětu myši s CIA vede k produkci TGF- β [27]. V tomto případě má receptor CD69 protizánětlivou funkci. Spojení receptoru CD69 s produkcí TGF- β bylo odhaleno i v případě nádorových onemocnění u myši, nemocné *CD69*^{-/-} myši produkují méně TGF- β a současně se lépe brání nádoru, díky zvýšenému počtu cytotoxicky aktivních NK buněk a T lymfocytů [25]. V obou modelech vede nepřítomnost receptoru CD69 ke snížené hladině cytokinu TGF- β , která ústí v silnější imunitní odpověď, podporující rychlejší odhojení nádoru, nebo závažnější zánícení tkáně v případě CIA [29]. Imunitní odpověď je v těchto dvou modelech závislá především na T lymfocytech a NK buňkách. V dalším myším modelu RA, ve kterém se autoimunitní odpovědi účastní především granulocyty, se naopak u *CD69*^{-/-} myši vyvíjí mírnější forma arthritidy, která je vysvětlována chemotaktickým účinkem TGF- β na granulocyty – snížení hladiny TGF- β u *CD69*^{-/-} myši zřejmě vede ke snížení počtu granulocytů v místě zánětu a tudíž k potlačení zánětlivé reakce [30]. Zároveň je však možné, že zapojení receptoru CD69 spouští i produkci prozánětlivých cytokinů, podobně jako je tomu u *in vitro* stimulace.

V případě *CD69 Tg* myši se oproti předpokladu ukázalo, že konstitutivní exprese CD69 nepodporuje přílišnou aktivaci lymfocytů a zánětlivé podmínky [25].

Protein CD69 je přechodně exprimován na lymfocytech procházejících pozitivní a negativní selekcí v thymu [31], na *CD69 Tg* myších byla sledována funkce CD69 v tomto procesu. T lymfocyty v *CD69 Tg* myších prochází normálním vývojem a selekcí, avšak dochází k hromadění zralých T lymfocytů v dřeni thymu a zároveň ke snížení počtu T_C a T_H lymfocytů v sekundárních lymfatických orgánech [32]. Zralé T lymfocyty *CD69 Tg* myši nejsou schopné opustit thymus, mechanismus zatím není přesně znám. V nejnovější studii byla popsána asociace CD69 s receptorem S1P₁, který je nezbytný pro vycestování lymfocytů z lymfatických orgánů. Působením cytokinů IFN- α/β lze vycestování lymfocytů dočasně zastavit, u *CD69*^{-/-} myši působením těchto cytokinů k zadržování lymfocytů v lymfatických orgánech nedochází [33]. Roli CD69 v adhezi a migraci lymfocytů navrhuje i studie popisující asociaci CD69 s calreticulinem na povrchu aktivovaných B lymfocytů [62].

Tyto výsledky poukazují na to, že *in vivo* je CD69 spíše molekulou, která působí v různých mechanismech regulace imunitní odpovědi. Záhy po aktivaci lymfocytů negativní zpětnou vazbou brání přílišné aktivaci imunitního systému (prostřednictvím

sekrece cytokinu TGF- β). Další možnou funkcí CD69 je role v adhezi, která ovlivňuje cirkulaci CD69+ lymfocytů. V závislosti na konkrétním prostředí a typu imunocyty vede zapojení receptoru CD69 k různým výsledkům. Regulační kroky, ve kterých bylo navrženo zapojení receptoru CD69 jsou znázorněny schematicky na obr. 4 (str. 15).



Obr. 4: Možné zapojení proteinu CD69 na různých úrovních regulace imunitní odpovědi. Antigenně specifický signál aktivuje prostřednictvím TCR T lymfocyt a vede k expresi CD69. (a) Nedokonalá aktivace vede k anergii. (b) Některé z anergických T lymfocytů mohou fungovat jako regulační T lymfocyty (Treg) a produkovat TGF- β . Pokud dojde k plné aktivaci T lymfocytů, začnou T lymfocyty proliferovat. V tomto případě může CD69 působit regulačně na dvou různých úrovních. Zaprvé, pokud je ligand CD69 exprimován dendritickými buňkami (DC) v lymfatických uzlinách, (c) CD69⁺ T lymfocyty mohou produkovat TGF- β , který inhibuje (d) diferenciaci T lymfocytů a (e) funkci DC jako buněk prezentujících antigen. (f) Zadruhé, pokud je ligandem CD69 molekula exprimovaná na buňkách v zánětlivých infiltrátech, CD69⁺ T lymfocyty mohou prostřednictvím produkce TGF- β tlumit zánět. (g) Receptor CD69 také může definovat subpopulaci tolerogenních dendritických buněk. Podle [30].

I.4. HSP – proteiny tepelného šoku

Objev proteinů tepelného šoku (HSP – **H**eat **S**hock **P**roteins) spadá do roku 1974, kdy byla pozorována jejich zvýšená exprese ve slinných žlázách mušky *Drosophila melanogaster* vystavených tepelnému stresu [34]. Exprese proteinů tepelného šoku je ovšem indukována nejen vystavením buněk zvýšené teplotě, ale i za jiných stresujících podmínek jako je oxidativní stres, odnětí živin, fagocytosa nebo radiace. Ačkoliv při různých formách stresu dochází ke zvýšené transkripci genů pro HSP, jsou tyto proteiny přítomny v buňce i za normálních podmínek. Brzy po jejich prvním popisu byla odhalena jejich funkce při sbalování proteinů.

Proteiny tepelného šoku tvoří rodinu vysoce konzervovaných proteinů, jejíž zástupci se vyskytují ve všech říších organismů. Podle své molekulové váhy a funkce byly tyto proteiny rozděleny do několika základních rodin: malé proteiny tepelného šoku, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 a HSP110. HSP proteiny patřící do jedné rodiny se vyznačují vysokou sekvenční homologií a funkční příbuzností, zatímco s HSP proteiny jiných rodin žádnou homologii nesdílí. Za primární funkci HSP proteinů je považována pomoc při sbalování proteinů.

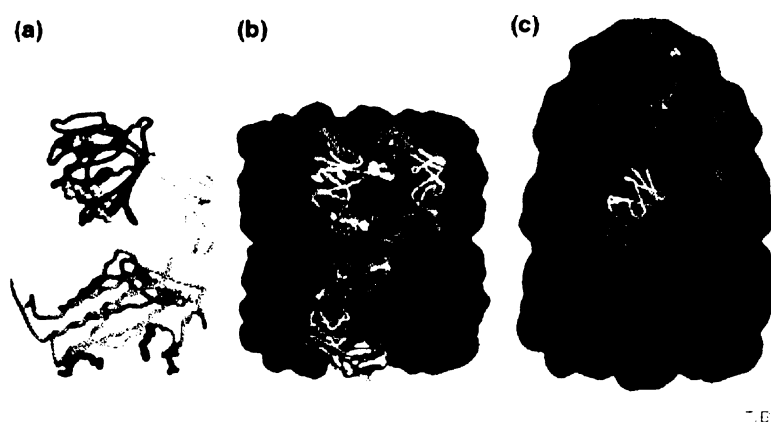
Konečná nativní konformace polypeptidu je kódována jeho aminokyselinovou sekvencí a mnoho proteinů se skutečně skládá do této konformace samovolně *in vitro* [35]. V živých buňkách ovšem vysoká koncentrace proteinů usnadňuje mezimolekulové interakce na úkor intramolekulárních, navíc nedokonale poskládané proteiny či špatně poskládané proteiny exponují hydrofobní aminokyselinové zbytky na svém povrchu. Souhra těchto okolností by vedla k agregaci proteinů *in vivo*. Aby buňka předešla tomuto nebezpečí, používá systém tzv. **molekulárních chaperonů**, které napomáhají sbalování proteinů okamžitě po translaci na ribosomech. Termín molekulární chaperon se používá k popisu skupiny funkčně příbuzných proteinů, které mají schopnost vázat se na nesbalené nebo částečně sbalené polypeptidy, vyvolat v těchto polypeptidech konformační změny a uvolnit je kontrolovaným způsobem [36]. Mnoho molekulárních chaperonů je členem některé z rodin proteinů tepelného šoku.

I.4.1. HSP60 rodina proteinů tepelného šoku – chaperoniny

Jako **chaperoniny** jsou označovány proteiny rodiny HSP60 tvořící podskupinu molekulárních chaperonů. Existují dvě skupiny chaperoninů. První skupina se vyskytuje

v eubakteriích a uvnitř mitochondrií a chloroplastů. Pro chaperoniny této rodiny je charakteristická tetradekamerární struktura a spolupráce s heptamerním **ko-chaperoninem**. Druhá skupina chaperoninů se nachází v cytosolu eukaryot a archeí a nevyžaduje pro svou funkci ko-chaperonin.

Nejvíce studovaným a nejlépe charakterizovaným chaperoninem je Hsp60 z *Escherichia coli*, obvykle označovaný jako **GroEL**. Tento protein tvoří soudkovovitý komplex skládající se ze dvou na sebe položených heptamerních kruhů, na jehož vrchol nasedá heptamerní ko-chaperonin **GroES**. Funkce celého komplexu je závislá na hydrolyze ATP, která indukuje konformační změny komplexu umožňující uvolnění polypeptidu i jeho poskládání [37]. Funkční cyklus skládání proteinů pomocí GroEL a GroES byl sledován



Obr. 5: Krystalová struktura *E. coli* GroEL a jeho komplexu s ADP a ko-chaperoninem GroES. (a) Jednotlivé domény GroEL jsou barevně odlišeny – zeleně ekvatoriální doména, žlutě intermediární doména a červeně apikální doména. Fialově je vyznačeno ATP navázané v ekvatoriální doméně, hydrofobní vazebné místo pro peptidy je vyznačeno šedě. (b) Struktura čtrnáctimeru, barevně jsou vyznačeny tři podjednotky GroEL. (c) Komplex GroEL-ADP-GroES, barevně je vyznačena jedna podjednotka GroEL a jedna podjednotka GroES. Převzato z [38].

středkovává kontakty mezi heptamerními kruhy, váže a hydrolyzuje ATP. Apikální doména na otevřených koncích soudku rozpoznává a váže prostřednictvím hydrofobních aminokyselinových zbytků nesbalené proteiny. Vazebné místo pro polypeptidy na apikální doméně je velice plastické a proto schopné vázat široké spektrum proteinů. S apikální

kryoelektronovou mikroskopií [39], k dispozici je mnoho krystalových struktur komplexů GroEL a GroES i s navázaným ATP nebo ADP [40, 41], viz obr. 5. Každý monomer komplexu GroEL (neboli každý protein Hsp60 z *E. coli*) se skládá ze tří strukturálních domén – **apikální** a **ekvatoriální** domény, které jsou spojeny doménou **intermediární**. Ekvatoriální doména je nejrozsáhlejší, zpro-

doménou také interaguje ko-chaperonin GroES. Intermediární doména je poměrně mobilní, umožňuje strukturální změny během funkčního cyklu komplexu.

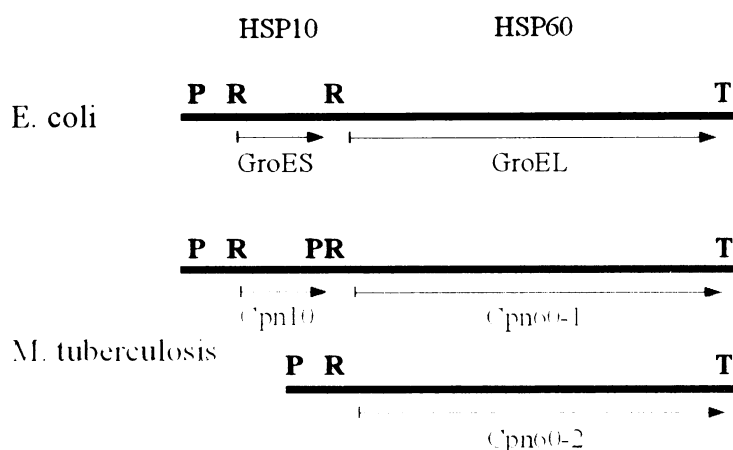
Většina známých eubakterií exprimuje pouze jeden protein rodiny HSP60. Chaperonin Hsp60 (analogický GroEL z *E. coli*) a jeho ko-chaperonin (analogický GroES z *E. coli*) jsou v eubakteriích kódovány geny *groEL* a *groES* (alternativní názvy *cpn60* a *cpn10*) uspořádanými do *groESL* operonu. Toto uspořádání umožňuje jejich koordinovanou expresi, zcela v souladu s jejich společnou funkcí při skládání proteinů.

I.5. CHAPERONINY *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Mycobacterium tuberculosis exprimuje dva chaperoniny homologní s ostatními členy rodiny proteinů HSP60. Jako první byl objeven díky své schopnosti stimulovat imunitní systém **Cpn60-2** [42], v literatuře nejčastěji označovaný jako Hsp65 nebo 65-kDa antigen. Spolu s 10-kDa proteinem Cpn10 patří mezi nejvíce imunoreaktivní proteiny *M. tuberculosis* [43]. Druhý homolog HSP60 označovaný **Cpn60-1** byl odhalen nejprve na úrovni DNA během sekvenování genomu *M. tuberculosis* a posléze objeven i v lyzátu této bakterie [44].

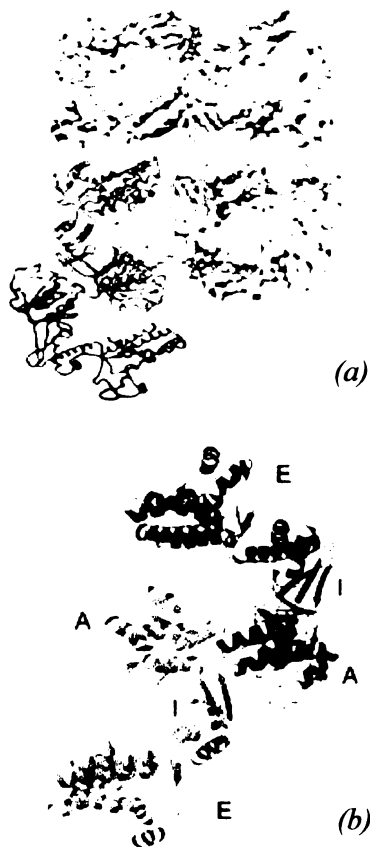
Tím, že genom *Mycobacterium tuberculosis* obsahuje dvě kopie *cpn60* genů, se odlišuje od většiny známých eubakterií. Gen *cpn60-1* (homolog *groEL*) z *M. tuberculosis* je stejně jako v případě dalších eubakterií uspořádán v operonu spolu s genem *cpn10* pro ko-chaperonin (homolog *groES*), ovšem druhá kopie genu – *cpn60-2* kódující protein Hsp65 – se vyskytuje samostatně v jiné části genomu [44], pro srovnání viz *obr. 6* (str.19). Toto zvláštní uspořádání genů pro chaperoniny bylo potvrzeno i v případě *Mycobacterium leprae* [45] a *Streptomyces sp.* [46, 47], což jsou blízké příbuzné bakterie patřící do skupiny aktinomycet.

Aminokyselinové sekvence Cpn60-1 a Hsp65 z *M. tuberculosis* vykazují 61 % sekvenční shodnost a 76 % sekvenční podobnost, liší se podstatně pouze v C-koncové části, kde Cpn60-1 obsahuje sekvenci bohatou na histidin, zatímco Hsp65 obsahuje sekvenci typickou i pro ostatní chaperoniny bohatou na methionin a glycin. Oba mykobakteriální chaperoniny Cpn60 jsou exprimovány konstitutivně. Po tepelném šoku, fagocytose makrofágy nebo vystavením jiné formě stresu dojde k jejich zvýšené expresi, tyto proteiny pak tvoří 1 až 10 % všech proteinů lyzátu [48].



Obr. 6: Schema uspořádání genů pro chaperoniny v genomu *E. coli* a *M. tuberculosis*. Silné čáry representují sekvenci DNA, šipky otevřené čtecí rámce. P, R a T značí shody s konsensus sekvencemi pro promotory (P), RBS (R) a rho-nezávislé terminační sekvence (T). Podle [44].

Při své práci na biochemické charakterisaci chaperoninů Cpn60-1 a Hsp65 z *M. tuberculosis* došli Qamra a kol. k závěru, že se tyto proteiny vyskytují ve formě **dimeru** *in vitro* i *in vivo*, na rozdíl od ostatních známých chaperoninů rodiny HSP60. Schopnost napomáhat skládání proteinů je spojována s tetradekamerní strukturou chaperoninů, spoluprací s ko-chaperoninem GroES a hydrolýzou ATP, chaperoniny z *M. tuberculosis* si však tuto schopnost zachovávají i v dimerní podobě a nevyžadují přítomnost ko-chaperoninu [49]. Mají jen velice slabou ATPasovou aktivitu a jsou schopné zabránit agregaci proteinů i bez přítomnosti ATP [49]. V poslední době byla rozřešena **krystalová struktura** Hsp65 [50]. Protein se podařilo vykrytalovat pouze jako dimer, krystalová struktura potvrdila uspořádání se třemi doménami – apikální, intermediální a ekvatoriální – velice podobné jako v GroEL bakterie *Escherichia coli*. Rozdílné je ovšem uspořádání a kontakt monomerů, molekuly Hsp65 spolu interagují především svými apikálními doménami, zatímco interakce monomer – monomer v tetradekameru GroEL jsou zajišťovány hlavně doménami ekvatoriálními (viz obr. 7, str. 20). Krystalová struktura také odhalila rozsáhlé hydrofobní struktury na povrchu dímeru Hsp65, které mohou hrát roli při navázání nesbalených proteinů a bránit tak jejich špatnému sbalení či agregaci.



Obr. 7: Nezvyklý způsob dimerisace Hsp65. (a) Superposice dimeru Hsp65 (šedivě a modře) a *E. coli* GroEL komplexu (červeně). (b) Hsp65 dimer – pohled na asociaci monomerů prostřednictvím apikálních domén. Monomery jsou odlišeny různými odstíny šedé. A, I a E značí apikální, intermediální a ekvatoriální doménu. Převzato z [50].

Zatímco většina eubakterií si vystačí s jedním chaperoninem rodiny HSP60, o potřebě dvou takových chaperoninů a jejich funkci v mykobakteriích se spekuluje. Jsou schopné napomáhat sbalování proteinů, je však možné, že kromě toho zastávají i jiné funkce. Tuto domněnku podporuje i skutečnost, že jsou tyto proteiny sekretovány do extracelulárního prostředí, ačkoliv jejich funkce molekulárních chaperonů je omezena na cytosol [51].

I.5.1. Role Hsp65 v imunitním systému

Z imunologického hlediska přitahují HSP stále více pozornosti. Mykobakteriální Hsp65, stejně jako ostatní bakteriální chaperoniny rodiny HSP60, na sebe upoutal pozornost jako vysoce imunogenní molekula schopná aktivovat velké množství T lymfocytů [52]. Napadení buňky znamená pro mykobakterii jistou formu stresu ústící ve zvýšenou produkci HSP. Napadená buňka hostitele naopak tyto proteiny degraduje na peptidy, které jsou pak v komplexu s MHC glykoproteiny II. třídy na povrchu APC presentovány imunitnímu systému. Jelikož HSP tvoří v době napadení buňky poměrně velkou část všech mykobakteriálních proteinů, jsou také v největší míře presentovány ve formě MHC komplexů.

Jedním z imunodominantních epitopů mykobakteriálního Hsp65 rozpoznávaných T lymfocyty je sekvence mezi aminokyselinami 180 – 188 (TFGLQLELT). Tato sekvence se nachází v intermediární doméně a je exponována na jejím povrchu [50].

Kromě role antigenů, byla pro bakteriální HSP60 navržena i role při přenosu a presentaci jiných antigenů. HSP proteiny jsou *in vivo* asociovány s velkým souborem

peptidů, vzniklých degradací buněčných proteinů. Také myko-bakteriální Hsp65 může díky hydrofobním oblastem na svém povrchu vázat nespecifickými hydrofobními interakcemi různé peptidy [50]. Komplexy HSP proteinů s antigenními peptidy jsou prostřednictvím specifických receptorů pohlceny antigen prezentujícími buňkami a jejich fragmenty následně prezentovány ve formě MHC komplexů.

Lidský Hsp60 vykazuje 50 % sekvenční identitu s mykobakteriálním Hsp65, dalších 20% aminokyselinových zbytků je nahrazeno podobnými aminokyselinami. Některé oblasti v molekule lidského Hsp60 jsou tak zcela identické s homologními oblastmi v mykobakteriálním Hsp65 (viz příloha). Protilátky a TCR proti mykobakteriálnímu Hsp65 z tohoto důvodu reagují i s Hsp60 organismu vlastním. Tato zkřížená reaktivita by mohla vést k indukci některých autoimunitních onemocnění. Ve většině experimentálních modelů však dochází spíše k opačné situaci a imunizace mykobakteriálními HSP proteiny má protektivní funkci a vede k odolnosti vůči pokusům indukovat autoimunitní onemocnění [53]. Exprese proteinů tepelného šoku tkáněmi v autoimunitních a chronických zánětlivých onemocněních je spojena s útlumem zánětu, namísto jeho indukce či rozšíření. T lymfocyty, které rozpoznávají HSP60 v autoimunitních onemocněních mají imunoregulační fenotyp (exprese CD25 a CD30), produkují cytokiny s regulační funkcí: TGF- β , IL-10 a IL-4 [54].

Kromě schopnosti aktivovat imunitní systém prostřednictvím protilátek a specifických T lymfocytů, byla v posledních letech popsána i schopnost HSP interagovat přímo s buňkami vrozeného imunitního systému mechanismem podobným cytokinům, aktivovat je a indukovat sekreci prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1, IL-6 a IL-12 [55]. Způsob, jakým dochází k sekreci HSP do extracelulárního prostoru zatím není znám, je také možné, že se bakteriální HSP uvolňují do prostředí v důsledku lýzy buňky.

II. MATERIÁL

II.1. PŘÍSTROJE A DALŠÍ VYBAVENÍ

- Analytické váhy *AND, USA*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman, USA*
- Centrifuga J2-2I *Beckman, USA*
- Centrifuga Z 382 K *Hermle, Německo*
- Centrifuga stolní, Spectrofuge 16M *Edison, USA*
- Čtečka destiček TECAN *Flow, UK*
- Čtečka destiček Liquid Scintillation and Luminescence Counter 1450 Microbeta TRILUX *WALLAC, Finsko*
- Filtry PVDF 0,22 μ m *Millipore, USA*
- HPLC systém BioSys 510 *Beckman, USA*
- Chladnička *Zanussi, Itálie*
- Chladnička *Skandiluxe, Dánsko*
- Koncentrátory Centriprep, Centricon, Microcon *Amicon, USA*
- Kyvety UltraClear™ 4 ml *Beckman, USA*
- LAS reader *Fuji, Japonsko*
- Magnetická míchačka MM 2A *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- Mikrotitrační destičky 96-jamkové, PVC U bottom plates *Dynex, USA*
- Mrazicí box (-80 °C) Ultra Low *Revco, USA*
- Mrazicí box (-20 °C) *Zanussi, Itálie*
- Olejová vývěva *Chirana, ČR*
- pH metr Φ 200 *Beckman, USA*
- Předvážky HF1200G *AND, USA*
- Souprava pro elektroforézu *Sigma, USA*
- Souprava pro filtraci za sníženého tlaku *Sigma, USA*
- Souprava pro isoelektrickou fokusaci *Pharmacia, USA*
- Třepačka termostatovaná *Gallenkamp, UK*

- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710
Cole-Parmer Instrument Co., USA
- Ultracentrifuga OPTIMA LE-80
Beckman, USA
- Vakuová odparka Speedvac
Jouan, Francie
- Ultrazvuková lázeň
KRAINTEK, Slovensko
- Vortexový mixér
VELP Scientifica, Itálie
- Zdroj deionizované vody MilliQ
Millipore, USA
- Zdroj napětí EPS 500/400
Pharmacia, USA

II.2. CHEMIKÁLIE

- Agarosa
Fluka, Švýcarsko
- Akrylamid
Sigma, USA
- Aldolasa
Pharmacia, USA
- Azid sodný
Sigma, USA
- β -merkptoethanol
Sigma, USA
- Blue Dextran
Pharmacia, USA
- Bromfenolová modř
Sigma, USA
- BSA
Sigma, USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250
Serva, USA
- Činidlo pro stanovení proteinů dle Bradfordové
Bio-Rad, Německo
- Dihydrogenfosforečnan draselný
Lachema, ČR
- DTT
Fluka, Švýcarsko
- Dusičnan stříbrný
Sigma, USA
- EDTA
Fluka, Švýcarsko
- Ethanol
Lachema, ČR
- Formaldehyd
Sigma, USA
- Glukosa
Lachema, ČR
- Glycerol
Sigma, USA
- Glycin
Fluka, Švýcarsko
- Hydrogenfosforečnan sodný
Lachema, ČR
- Hydrolyzát kaseinu (kyselý)
IMUNA, SR
- Hydroxid sodný
Lachema, ČR

• Chlorid amonný	<i>Lachema, ČR</i>
• Chlorid draselný	<i>Lachema, ČR</i>
• Chlorid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
• Chlorid vápenatý	<i>Sigma, USA</i>
• Jodacetamid	<i>Sigma, USA</i>
• Kyselina chlorovodíková	<i>Lachema, ČR</i>
• Kyselina octová	<i>Lachema, ČR</i>
• Leupeptin	<i>Sigma, USA</i>
• Lysozym (Hen Egg White)	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Methanol	<i>Lachema, ČR</i>
• N,N'-methylen-bis-akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
• Močovina	<i>Serva, USA</i>
• Minerální olej	<i>Sigma, USA</i>
• Pepstatin	<i>Sigma, USA</i>
• Peroxosíran amonný	<i>Sigma, USA</i>
• PMSF	<i>Sigma, USA</i>
• Sacharosa	<i>Lachema, ČR</i>
• Scintilační roztok	<i>Amersham, USA</i>
• SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Síran hořečnatý	<i>Lachema, ČR</i>
• Standard pro SDS PAGE	<i>Serva, USA</i>
• TEMED	<i>Serva, USA</i>
• Thiosíran sodný	<i>Merck, Německo</i>
• Tris	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Uhličitan draselný	<i>Sigma, USA</i>

II.3. ROZTOKY

Vzorkový pufr pro SDS PAGE redukující: 50 mM Tris.Cl, 12 % glycerol, 4 % SDS, 0,1 % bromfenolová modř, 2 % β -merkapt ethanol, (pH 6,8).

Elektrodový pufr pro tris-glycinovu SDS PAGE: 25 mM Tris.Cl, 250 mM glycin, 0,1 % SDS, (pH 8,3).

AA mix: 30 % akrylamid, 1 % N,N'-metylen-bis-akrylamid.

Barvicí roztok pro SDS PAGE: 45 % MeOH, 10 % kys. octová, 0,25 % CBB R 250.

Fixační a odbarvovací roztok pro SDS PAGE: 35 % EtOH, 10 % kys. octová.

Rehydratační pufr: DeStreak (*Pharmacia*, USA).

IPG pufr s nosičovými amfolyty: Pharmalyte, pH 3–10 (*Pharmacia*, USA).

TBS + Ca pufr: 10 mM Tris.Cl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ (pH 7,8).

Medium: 17 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8,5 mM NaCl, 18,7 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 0,2 % glukosa, 1 % kyselý hydrolyzát kaseinu, (pH 7,4).

Ekvilibrační pufr s DTT: 6 M močovina, 2 % SDS, 0,05 M Tris.Cl, 20 % glycerol, 2 % DTT, (pH 8,8).

Ekvilibrační pufr s IAA: 6 M močovina, 2% SDS, 0,05 M Tris.Cl, 20 % glycerol, 2,5 % IAA, (pH 8,8).

Katodový roztok pro IEF: 25 mM NaOH.

Anodový roztok pro IEF: 20 mM kys. octová.

III. METODY

III.1. VAZBA HSP65 NA RECEPTOR CD69 A JEJÍ INHIBICE PEPTIDY ODVOZENÝMI ZE SEKVENCE HSP65

Ve všech experimentech byly používány rekombinantně připravené komerčně dostupné preparáty Hsp65 a Hsp60. Lidský a potkaní protein CD69 byly připraveny rekombinantně v laboratoři doc. Bezoušky. Používaný konstrukt hCD69 zahrnuje extracelulární část tohoto proteinu až k Cys68. Cys68 zodpovědný za tvorbu kovalentního dimeru hCD69 však v tomto konstruktu zahrnut není.

III.1.1. Vazebné testy

Pro semikvantitativní vyhodnocení vazby ligandu na protein se využívá vazebných testů na 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách, na jejichž povrch se adsorbují proteiny. Pro stanovení specifity vazby je nejprve potřeba zjistit koncentraci ligandu a proteinu, při které dochází k 50 % nasycení této vazby. Zjištěná koncentrace je potom výchozí pro pokusy inhibice této vazby jinými ligandy. Tohoto postupu se využívá proto, že velká většina cílových struktur je velmi drahá.

Na povrch jamek mikrotitrační destičky byl adsorbován lidský nebo potkaní protein CD69 ředěný v TBS + Ca pufru na koncentraci 1 µg/ml: 50 µl roztoku proteinu bylo přidáno do každé jamky, jako kontrola byl do poslední jamky v řadě napipetován pouze TBS + Ca pufr. Adsorpce probíhala přes noc při 4 °C. Poté byla inkubací se 150 µl 1 % BSA při 4 °C blokována volná vazebná místa povrchu jamek. Po dvou hodinách byly jamky inkubovány 2 hodiny s mykobakteriálním proteinem Hsp65 nebo lidským proteinem Hsp60, radioaktivně značenými ¹²⁵I (specifická aktivita cca 10⁶ Bq/µg proteinu). Koncentrace radioaktivně značených proteinů byla ředěna v trojkové řadě. Do dvou kontrolních řad byl navíc napipetován i různě ředěný neznačený protein Hsp65 nebo h/rCD69. Po promytí TBS + Ca pufrům a vysušení byl do každé jamky přidán scintilátor a na scintilačním počítači proměřena aktivita navázaného proteinu [56].

III.1.2. Inhibiční testy

V inhibičních testech na 96-jamkových mikrotitračních destičkách byla stanovována koncentrace nezačtených ligandů (peptidů i proteinů) nezbytná pro dosažení 50 % inhibice vazby radioaktivně značeného proteinu (^{125}I)Hsp65 na imobilisovaný lidský nebo potkaní receptor CD69. Tento parametr se nazývá IC_{50} a je mírou afinity mezi receptorem CD69 a peptidovými ligandy. Je používána taková koncentrace značeného proteinu (^{125}I)Hsp65, při níž dojde k vazbě na imobilisovaný CD69 v rozsahu poloviny maximální vazby.

V inhibičním testu byl nejprve na povrch jamek adsorbován lidský nebo potkaní receptor CD69, postupováno bylo stejně jako při vazebném testu. Vazebná místa destičky byla poté blokována 1 % BSA 2 hodiny při 4 °C. Po promytí bylo přidáno do každé jamky 90 μ l radioaktivně značeného (^{125}I)Hsp65 (koncentrace 0,33 μ g/ μ l) a 10 μ l nezačteného ligandu (peptidu nebo proteinu) ředěného v desítkové řadě v rozsahu koncentrací 10^{-5} – 10^{-10} mol/l. Inkubace probíhala 2 hodiny při 4 °C. Po promytí TBS + Ca pufrem a vysušení byl do každé jamky přidán scintilátor a na scintilačním počítači byla proměřena aktivita navázaného proteinu.

Z hodnot naměřené aktivity byla vypočítána procenta inhibice (% inhibice) podle vzorce (1):

$$\% \text{ inhibice} = [1 - (\text{exp} - \text{min})/(\text{max} - \text{min})] \times 100 \quad (1)$$

kde exp značí naměřenou aktivitu, min značí minimální naměřenou aktivitu, která odpovídá 100 % inhibice, a max značí maximální naměřenou aktivitu, která odpovídá 0 % inhibice. Procenta inhibice byla vynesena do grafu proti koncentraci inhibujícího ligandu a z grafu určena hodnota IC_{50} .

Mezi testovanými inhibujícími ligandy byl jednak celý protein Hsp65, jeho fragmenty – CNBr fragment (DKVNEGVTVEESNTFGLQLELTEGM), peptid A (DKVNEGVTVEES), peptid B (NTFGLQLELTEGM), SNTFGLQ, QLELTEG, LQLELTE, LELTEGM a LELTE, a dále synteticky připravené varianty pentapeptidu LELTE – LEATE, LELLE, LELSE, AELTE, LELTD, LDLTE a LELTEGY.

III.1.3. Gelová filtrační chromatografie

Chromatografie na koloně Superdex 200 HR 10/30 byla použita analyticky pro sledování vazby lidského proteinu CD69 a mykobakteriálního Hsp65. V této metodě se

proteiny dělí na základě svého hydrodynamického objemu, který je úměrný jejich molekulové hmotnosti.

Chromatografie byla prováděna v TBS + Ca pufru, před každým nástřikem vzorku byla kolona ekvilibrována 50 ml TBS + Ca pufru (odpovídá dvěma objemům kolony). Vzorky proteinů byly před nástřikem centrifugovány při $10000 \times g$ 10 minut, objem vzorku nastříknutého na kolonu byl vždy maximálně 250 μ l. Chromatografie probíhala za průtoku 0,4 ml/min. Ke kalibraci byly použity vzorky lysozymu a BSA, k určení mrtvého objemu kolony byl použit Blue Dextran. Další vzorky obsahovaly mykobakteriální Hsp65 (100 μ g), lidský CD69 (100 μ g) a směs mykobakteriálního Hsp65 a lidského CD69. Vzorek obsahující směs proteinů Hsp65 a CD69 byl připraven inkubací 100 μ g Hsp65 s desetinásobným molárním nadbytkem proteinu CD69 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po ukončení chromatografie byla kolona promyta 1 M NaOH, poté velkým množstvím deionisované vody a nakonec 20 % ethanolem.

Pro každý protein byla vypočtena hodnota K_{av} podle vzorce (2):

$$K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0) \quad (2)$$

kde V_e značí eluční objem daného proteinu, V_0 značí mrtvý objem kolony a V_t celkový objem kolony. Hodnoty K_{av} byly vyneseny do grafu proti logaritmu molekulových hmotností proteinů použitých jako standardy. Ze získané kalibrační závislosti pak byly odečítány molekulové hmotnosti odpovídající jednotlivým vrcholům na chromatogramu vzorku směsi Hsp65 a CD69.

III.1.4. Ultracentrifugace na sacharosovém gradientu

Ultracentrifugace na sacharosovém gradientu byla provedena k dalšímu studiu formování komplexů proteinů Hsp65 a CD69, byla použita metoda sedimentačních rychlostí. Tato metoda sleduje rychlost, s jakou se molekula pohybuje vlivem odstředivé síly vytvořené v ultracentrifuze. Rychlost sedimentace závisí zároveň na molekulární hmotnosti a na tvaru molekuly. V této metodě je vzorek centrifugován při velmi vysokých otáčkách (40–60 tisíc rpm), velká odstředivá síla tlačí vzorek směrem od středové osy rotoru, po určité době centrifugace vytvoří vzorek peletu na dně centrifugační kyvety. V analytické ultracentrifuze je v určitých intervalech během experimentu snímána distribuce koncentrací měřením absorbance nebo refrakčního indexu. Výhodou této metody oproti metodě sedimentační rovnováhy je její rychlost, metoda trvá několik hodin na rozdíl od několikadenních centrifugací v případě rovnovážné ultracentrifugace.

V experimentu byla použita ultracentrifuga Optima LE–80K s výkyvným rotorem SW 60Ti, takže nejprve bylo nutné určit optimální čas centrifugace vzorků, neboť tato ultracentrifuga neumožňuje snímat absorbanci v kyvetách během centrifugace. Pro centrifugaci byl připraven 5–20 % gradient sacharosy v TBS + Ca pufru, celkový objem gradientu byl 4 ml. Na tento gradient bylo naneseno 150 μ l standardu v TBS + Ca pufru. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (M_r 66 000) a aldolasa (M_r 158 000). Po vyvážení kyvet byly vzorky centrifugovány při $257000 \times g$ (50000 rpm) a 30 °C, doba centrifugace byla 2, 4, 6 a 8 hodin. Po ukončení centrifugace byl gradient opatrně rozebrán na dvanáct frakcí po 350 μ l. Z každé frakce bylo odebráno 15 μ l, smíseno s 5 μ l 4 x koncentrovaného vzorkového pufru a analyzováno pomocí SDS PAGE.

Po určení optimální doby centrifugace byl tentýž experiment proveden i se vzorky. Dva vzorky obsahovaly 50 μ g mykobakteriálního Hsp65 ve 150 μ l TBS + Ca pufru, další dva vzorky obsahovaly 100 μ g mykobakteriálního Hsp65 s 231 μ g lidského CD69 (desetinásobný molární nadbytek), pro kontrolu byl na gradient do zbylých dvou kyvet nanesen standard. Centrifugace probíhala osm hodin za stejných podmínek jako optimalisace.

III.2. HSP60 ZE *STREPTOMYCES ALBUS*

III.2.1. Kultivace buněk

Streptomyces albus GroEL1 (-) mutant byl obdržen ve formě spor ve 20 % glycerolu. Pro oživení bakteriální kultury bylo sterilní medium zaočkováno spory – část zmražených bakteriálních spor byla odebrána sterilním očkem a přenesena do 50 ml media v 500 ml baňce s kulatým dnem. Kultura byla třepána při 30 °C a 200 rpm po dobu 20 hodin. Napěstovaná kultura byla použita k inokulaci sterilního media v dalších deseti 500 ml baňkách, vždy do 50 ml media byly přidány 2 ml předpěstované kultury. Kultura byla třepána při 200 rpm a 30 °C 15 hodin (do rané exponenciální fáze růstu), poté byla polovina baňek odebrána a třepána další dvě hodiny při 200 rpm a 30 °C, bakterie ve zbylých baňkách byly tepelně stresovány pěstováním při 40 °C po dobu dvou hodin. Tento krok byl zařazen za účelem indukovat v bakteriích expresi proteinů tepelného šoku.

III.2.2. Sklizení buněk a příprava lyzátů.

Získaná bakteriální kultura byla přenesena do 500 ml centrifugačních kyvet a stočena 10 minut při 10000 × g a 4 °C. Pelety byly několikrát omyty od media 50 mM Tris.Cl pufr (pH 7,4). Poté byly pelety resuspendovány v 50 mM Tris.Cl pufru (pH 7,4) obsahujícím inhibitory bakteriálních proteas (5 mM EDTA, 1 mM PMSF a leupeptin). Tato suspenze byla na ledu sonikována třikrát 30 sekund použitím sonikační jehly. Suspenze obsahující rozbité buňky byla centrifugována 15 minut při 10000 × g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a analysován na SDS PAGE a 2D PAGE, uchováván byl při -20 °C. Spory *Streptomyces albus* byly uchovávány ve 20 % glycerolu při -80 °C.

III.3. ANALYTICKÉ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

III.3.1. SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu

Pro analýzu směsi proteinů byla standardně používána elektroforesa v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS (SDS PAGE). Detergent dodecylsulfát sodný (SDS) denaturuje molekulu bílkoviny, obaluje ji a udílí jí jednotný záporný náboj. Bílkovina pak putuje elektrickým polem k opačně nabitě elektrodě. Na začátku elektroforesy prochází vzorek řidším gelem o nižším pH, kde dochází k jeho zaostření.

Poté se bílkoviny dělí na základě své molekulové hmotnosti ve spodním rozdělovacím gelu o vhodné velikosti porů. Velikost porů a tím i dělicí vlastnosti gelu jsou funkcí koncentrace akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu použité k přípravě gelu.

Vzorky pro elektroforesu byly připravovány rozpuštěním proteinu ve vzorkovém pufru, roztoky proteinů byly míseny s dvakrát koncentrovaným vzorkovým pufrem. Vzorky byly sonikovány 5 minut v sonikační lázni a 5 minut povařeny, aby došlo k úplné denaturaci proteinů. Před nanesením na gel byly vzorky stočeny 5 minut na $16000 \times g$ při 20°C .

Zaostřovací a vhodný rozdělovací gel byly připraveny smísením roztoků dle údajů uvedených v *tab. 1* (str. 31). Objem výsledného roztoku akrylamidu postačuje pro přípravu dvou gelů o velikosti 5×7 cm a tloušťce 0,75 mm. Jako poslední byl do roztoku přidán APS, který zahajuje polymeraci gelu. Spodní rozdělovací gel byl po nalití převrstven vodou, která zabraňuje vzdušnému kyslíku, aby difundoval do gelu a iniboval polymeraci. Po zatuhnutí gelu byla voda odlita a vysušena, na spodní gel byl nalit roztok zaostřovacího gelu a vložen hřebínek. Po zapolymerování zaostřovacího gelu byla sestavena souprava pro elektroforesu, nality elektrodové pufrы, vzorky byly naneseny pomocí pipety s kapilární špičkou do zubů v zaostřovacím gelu. Elektroforesa probíhala při 80 V pro zaostřovací gel a 120 V pro rozdělovací gel; byla ukončena, jakmile čelo elektroforesy (bromfenolová modř) dosáhlo spodního okraje gelu. Gely byly poté barveny 15 minut roztokem CBB R250 a promývány odbarvovacím roztokem do odbarvení pozadí.

Tab. 1: Složení roztoků pro přípravu akrylamidových gelů. Číselné údaje jsou v mililitrech.

rozlišovací gel	10 %	12 %	15 %	zaostřovací gel	
voda	4,0	3,3	2,3	voda	1,4
AA mix	3,3	4,0	5,0	AA mix	0,33
1,5 M Tris.Cl (pH 8,8)	2,5	2,5	2,5	1,0 M Tris.Cl (pH 6,8)	0,25
10 % SDS	0,1	0,1	0,1	10 % SDS	0,02
10 % APS	0,1	0,1	0,1	10 % APS	0,02
TEMED	0,004	0,004	0,003	TEMED	0,004

III.3.2. Dvojměrná SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu

2D PAGE byla použita k rozdělení proteinů lysátu *Streptomyces albus*, k porovnání exprese proteinů v normálních a tepelně stresovaných bakteriích *S. albus* a v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou identifikací k nalezení proteinu tepelného šoku patřícího do rodiny HSP60. V této analytické metodě byly proteiny vzorku nejprve rozděleny v prostředí s pH gradientem na základě svého isoelektrického bodu, což je pH, při kterém nenese protein žádný náboj a tudíž se v elektrickém poli dále nepohybuje. Technika využívající této vlastnosti proteinů se nazývá isoelektrická fokusace (IEF). V druhém kroku byly proteiny po IEF dále separovány na základě molekulových hmotností pomocí SDS PAGE.

IEF byla prováděna s komerčně dostupnými proužky akrylamidového gelu na pevném nosiči (v angličtině nesou označení „IPG stripy“, v dalším textu je používán název „proužek“). V „proužcích“ je pH gradient vytvořen směsí akrylamidových pufrů. Tyto deriváty akrylamidu obsahují jednak reaktivní dvojné vazby, jednak pufrující terciární aminoskupiny nebo karboxylové skupiny, a jsou zapolymerovány do polyakrylamidového gelu. Komerční „proužky“ musí být před použitím rehydratovány na svou původní tloušťku. Rehydratace „proužků“ byla spojena s nanesením vzorku na gel, neboť „proužky“ byly rehydratovány ve 340 μ l rehydratačního pufru DeStreak obsahujícím 2 % IPG pufr a 40 μ l vzorku. Rehydratace probíhala přes noc, „proužky“ ponořené v rehydratačním roztoku byly převrstveny minerálním olejem, aby se zamezilo odpařování roztoku. Isoelektrická fokusace probíhala za následujících podmínek: 300 V – 1 hodina, 500 V – 1 hodina, 1000 V – 1 hodina, 1500 V – 1 hodina, 2000 V – až do celkových 47 kWh. Po isoelektrické fokusaci následoval ekvilibrační krok, jehož cílem bylo redukovat disulfidové můstky a alkylovat sulfhydrylové skupiny na cysteinových zbytcích. Zároveň byly proteiny převedeny do pufru obsahujícího SDS. Při ekvilibraci byly „proužky“ nejprve inkubovány 15 minut v ekvilibračním pufru s DTT a poté dalších 15 minut v ekvilibračním pufru s IAA. Pro SDS PAGE byl připraven 4 % zaostřovací a 12 % rozlišovací gel. Po ekvilibraci byly „proužky“ zasunuty nad svrchní zaostřovací polyakrylamidový gel a zalaty 1 % teplou agarosou rozpuštěnou v elektrodovém pufru. Elektroforesa probíhala za následujících proudových podmínek: 15 mA pro zaputování proteinů do zaostřovacího gelu, 20 mA v zaostřovacím gelu a 25 mA v rozlišovacím gelu. Gely byly po skončení elektroforesy obarveny Coomassie Brilliant Blue R250.

Obarvené gely byly vyfoceny a porovnáním snímků byly vytipovány skvrny odpovídající proteinům, jejichž exprese se po tepelném šoku zvýšila. Tyto skvrny byly vyříznuty a analysovány pomocí MALDI hmotnostní spektroskopie.

III.3.3. Barvení gelu stříbrnými solemi

Barvením pomocí CBB R250 lze detegovat množství proteinu větší než 1 µg v jednom proužku. Menší množství proteinu je třeba zviditelnit citlivějším barvením pomocí stříbrných solí. Tento způsob barvení je 100 až 1000krát citlivější než barvení pomocí CBB R250 a umožňuje detegovat 0,1–1,0 ng polypeptidu v jednom proužku.

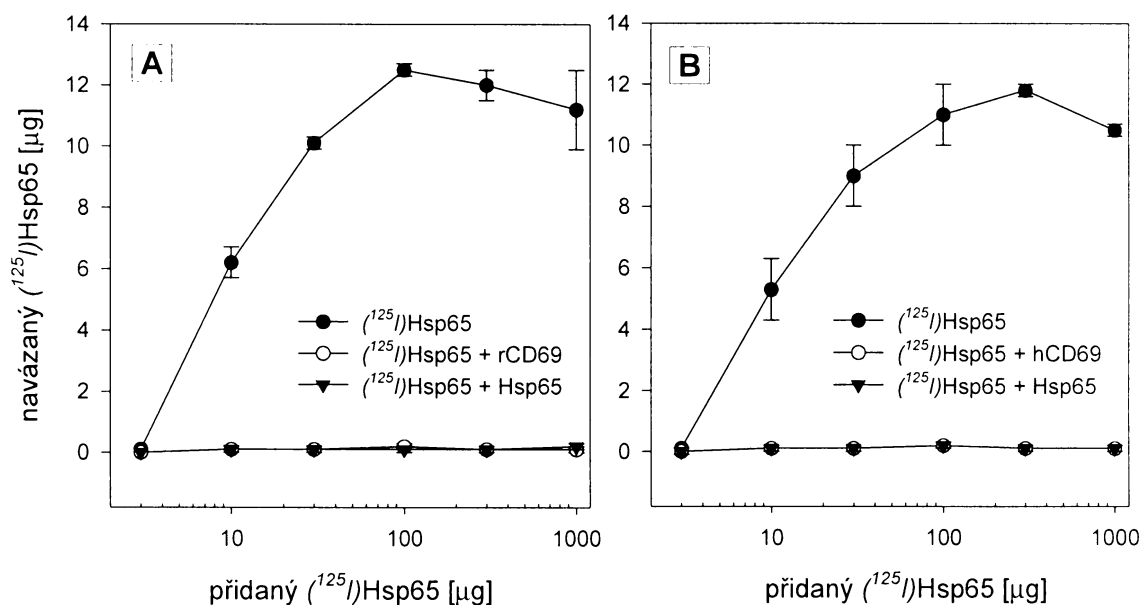
Pro barvení jednoho minigelu (5 × 7 cm, tloušťka 0,75 mm) bylo použito 50 ml každého roztoku. Po separaci na SDS PAGE byly proteiny na gelu fixovány přibližně 1,5 hodiny odbarvovacím roztokem pro SDS PAGE. Roztok byl odlit a gel byl inkubován nejprve deset minut ve 20 % ethanolu, poté 10 minut v deionisované vodě. Voda byla odlita a gel aktivován 1 minutu přidáním 0,02 % roztoku thiosíranu sodného. Poté byl gel čtyřikrát promyt deionisovanou vodou a inkubován 30 minut v 0,2 % roztoku dusičnanu stříbrného. Poté byl gel promyt 10 sekund deionisovanou vodou. K vyvolání proužků byla použita inkubace s vodným roztokem obsahujícím 3 % uhličitan draselný, 0,2 % formaldehyd a 0,001 % thiosíran sodný. Obarvené proužky proteinů se objevily během 2 až 4 minut, po dosažení požadovaného kontrastu byla reakce zastavena promytím gelu v roztoku 25 % octové kyseliny a 5 % Tris.Cl.

IV. VÝSLEDKY

IV.1. VAZBA HSP65 NA RECEPTOR CD69 A JEJÍ INHIBICE PEPTIDY ODVOZENÝMI ZE SEKVENCE HSP65

IV.1.1. Vazebné testy

Vazebné testy byly prováděny duplicitně, do grafu byla vynesena průměrná aktivita v jamce proti koncentraci přidaného radioaktivně značeného (^{125}I)Hsp65, resp. (^{125}I)Hsp60. Z grafů na *obr. 8* je patrné, že na mikrotitračních destičkách docházelo k vazbě radioaktivně značeného mykobakteriálního (^{125}I)Hsp65 na lidský i potkaní protein CD69. Tato vazba byla inhibována jak přidáním neznačeného proteinu Hsp65, tak volným proteinem CD69. Lidský Hsp60 se na proteiny CD69 vůbec nevázal. Vazba Hsp65 na lidský, resp. potkaní CD69 je satureovatelná, po přidání 10 μ g Hsp65 došlo k 50 % nasycení této vazby. Toto množství Hsp65 bylo poté využito při inhibičních testech.



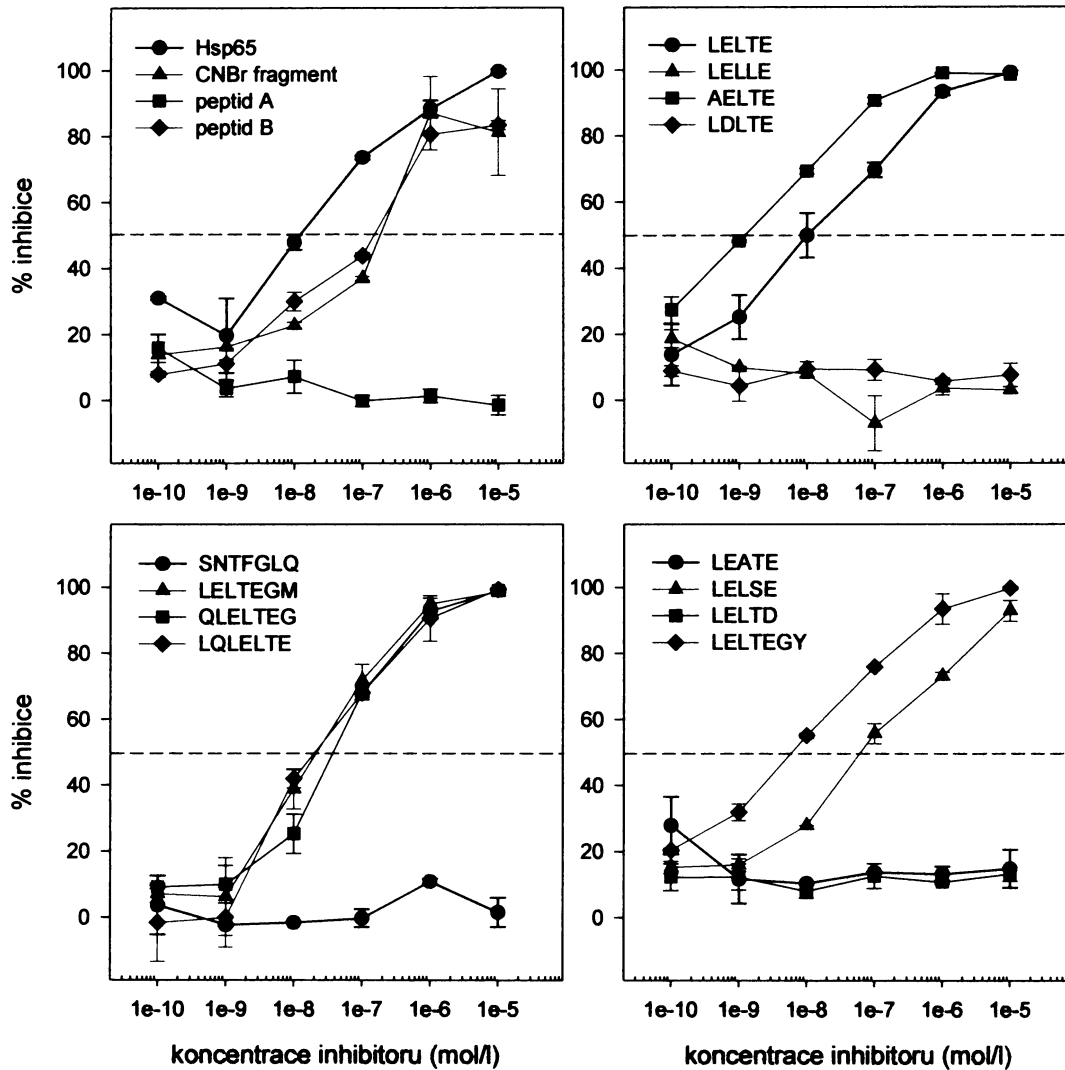
Obr. 8: Vazba radioaktivně značeného mykobakteriálního (^{125}I)Hsp65 na potkaní (A) resp. lidský (B) protein CD69 a její inhibice neznačeným Hsp65 a lidským resp. potkaním CD69.

IV.1.2. Inhibiční testy

V inhibičních testech byla sledována schopnost různě dlouhých peptidů, odvozených ze sekvence Hsp65, inhibovat vazbu (^{125}I)Hsp65 na lidský resp. potkaní CD69. V experimentu byl jako inhibitor použit jednak celý protein Hsp65, jednak jeho fragmenty zkracující se až k pentapeptidu LELTE. Nejdelší z použitých peptidů byl fragment vzniklý po štěpení Hsp65 bromkyanem, peptid A a peptid B reprezentují dvě části CNBr fragmentu vzniklé jeho rozštěpením (sekvence jednotlivých peptidů viz kapitola III.1.2.). Dále byla testována sada heptapeptidů obsahujících LELTE sekvenci uprostřed, nebo na jednom či druhém konci, sledován byl vliv aminokyselin v okolí LELTE sekvence. Jako inhibující peptidy byly poté testovány i různé varianty LELTE pentapeptidu viz *obr. 17* (str. 44) za účelem odhalit, které aminokyseliny mají vliv na vazbu tohoto peptidu na protein CD69. Inhibiční testy na mikrotitračních destičkách umožňují částečně i kvantitativní vyhodnocení, jehož výsledkem je určení parametru IC_{50} , jenž je mírou afinity mezi receptorem a ligandem.

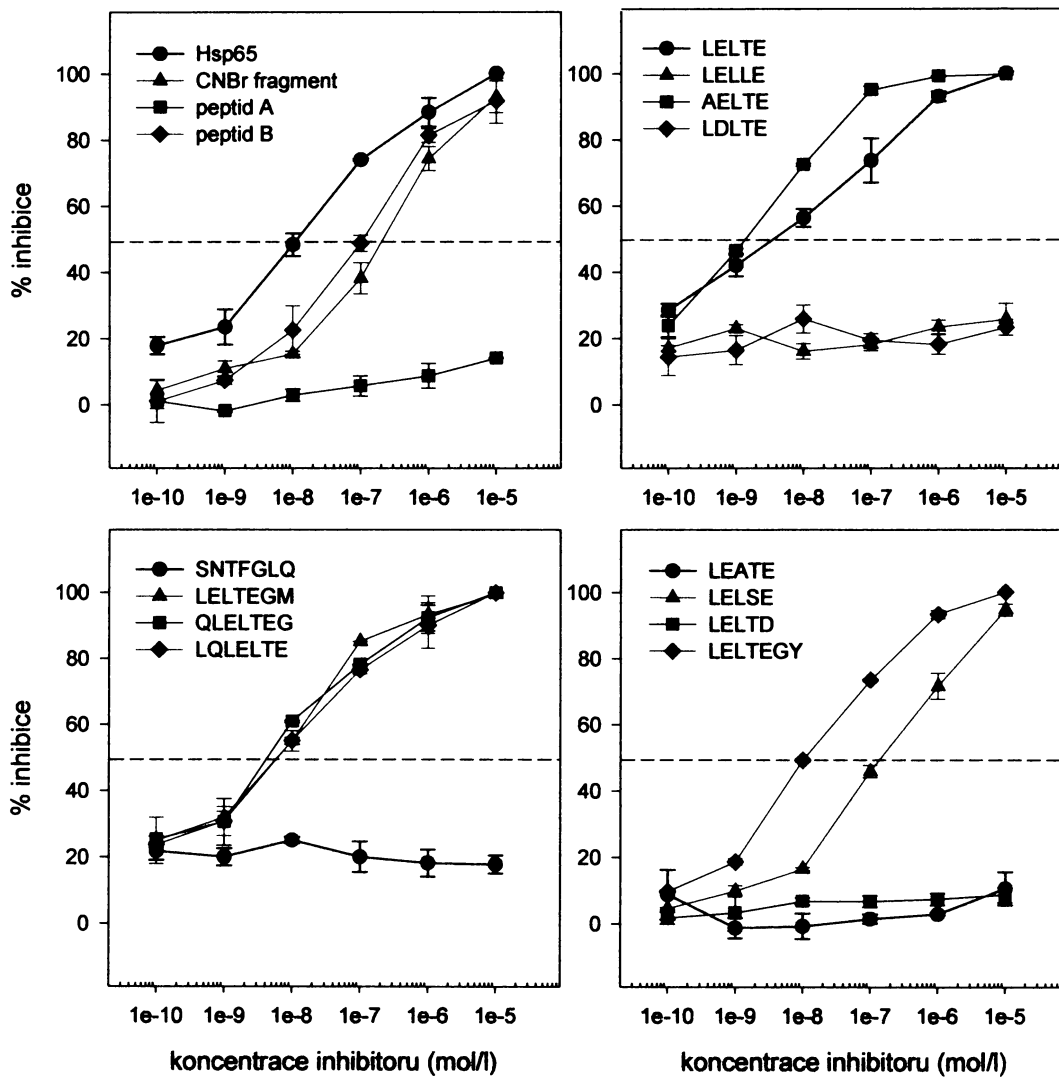
V grafech na *obr. 9* (str. 36) a *10* (str. 37) je vynesena hodnota % inhibice vypočtená dle vzorce (1) (str. 27) proti koncentraci inhibujícího peptidu, z těchto grafů byla odečtena hodnota IC_{50} . Zjištěné hodnoty IC_{50} jsou shrnuty v *tab. 2* (str. 38).

inhibice vazby Hsp65 na hCD69



Obr. 9: Inhibice vazby (125 I)Hsp65 na lidský protein CD69 různými sadami inhibujících peptidů. 50 % inhibice je vyznačena čárkovanou čarou.

inhibice vazby Hsp65 na rCD69



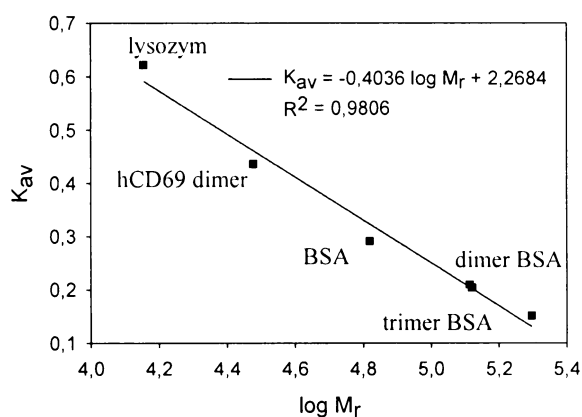
Obr. 10: Inhibice vazby (125 I)Hsp65 na potkani protein CD69 různými sadami inhibujících peptidů. 50 % inhibice je vyznačena čárkovanou čarou.

Tab. 2: Hodnoty IC_{50} pro různé peptidy inhibující vazbu radioaktivně značeného (^{125}I)Hsp65 na hCD69 resp. rCD69. Zvýrazněna je minimální sekvence odpovědná za vazbu Hsp65 na protein CD69.

inhibitor	IC_{50} [mol/l]	
	hCD69	rCD69
Hsp65	$1,2 \cdot 10^{-8}$	$1,2 \cdot 10^{-8}$
CNBr fragment	$2 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$
peptid A	neinhibuje	neinhibuje
peptid B	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$
SNTFGLQ	neinhibuje	neinhibuje
LELTE	$1 \cdot 10^{-8}$	$3,5 \cdot 10^{-9}$
LELTEGM	$2 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-9}$
QLELTEG	$3,5 \cdot 10^{-8}$	$4,5 \cdot 10^{-9}$
LQLELTE	$2 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-9}$
LELTEGY	$6,5 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-8}$
LELLE	neinhibuje	neinhibuje
LELSE	$6,5 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$
LELTD	neinhibuje	neinhibuje
AELTE	$1,3 \cdot 10^{-9}$	$1,4 \cdot 10^{-9}$
LDLTE	neinhibuje	neinhibuje
LEATE	neinhibuje	neinhibuje

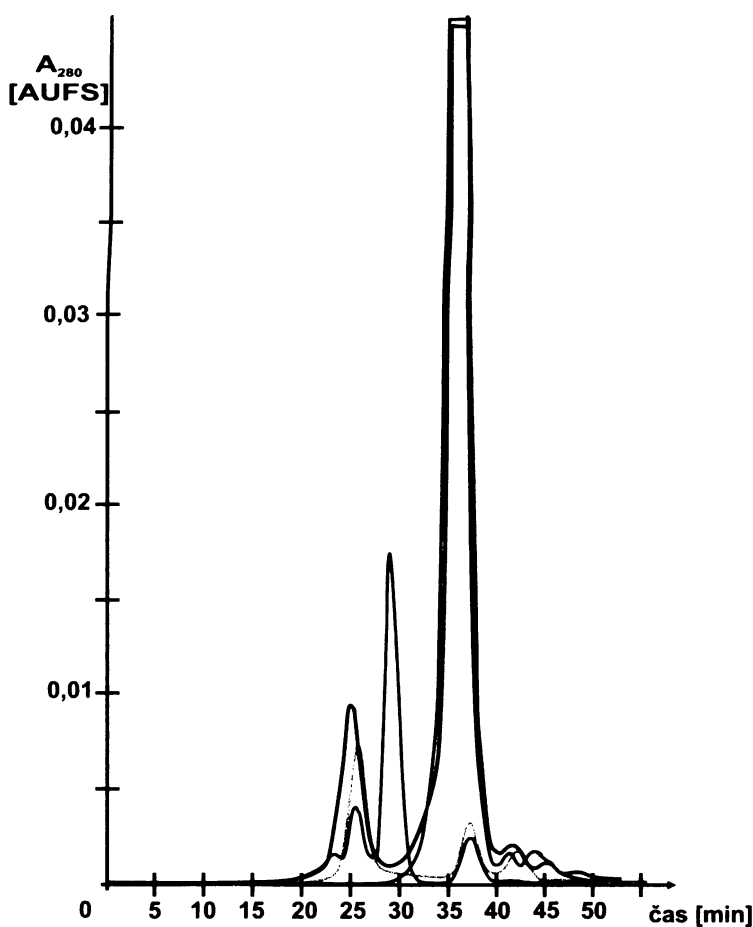
IV.1.3. Gelová filtrační chromatografie

Gelová filtrační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200, která umožňuje díky strmé křivce selektivity velice dobré rozlišení proteinů v rozsahu relativních molekulových hmotností 10000 až 600000. Po kalibraci kolony lze gelovou filtrační chromatografií využít k určení molekulových hmotností proteinů. Vzorky byly pouštěny za sebou, mezi nástřiky vzorku byla kolona ekvilibrována vždy 50 ml pufru pro gelovou filtraci. Eluční



Obr. 11: Kalibrační závislost K_{av} na $\log M_r$ pro kolonu Superdex 200.

profily jednotlivých vzorků byly přeloženy přes sebe – viz graf na *obr. 12* (str. 39). Jedním vzorkem byl Blue Dextran, který díky své velké molekulové hmotnosti není kolonou zadržován a putuje s čelem mobilní fáze, jeho eluční objem se tedy rovná mrtvému objemu kolony V_0 . Stanovený mrtvý objem kolony činí 6,7 ml. Eluční objemy jednotlivých bílkovin jsou spolu s jejich relativními molekulovými hmotnostmi shrnuty v *tab. 3* (str. 40). Pro bílkoviny použité jako standardy byla vypočtena hodnota K_{av} dle vzorce (2) (str. 28). Získaná kalibrační závislost pro kolonu Superdex 200 je vynesena v grafu na *obr. 11* (str. 38).

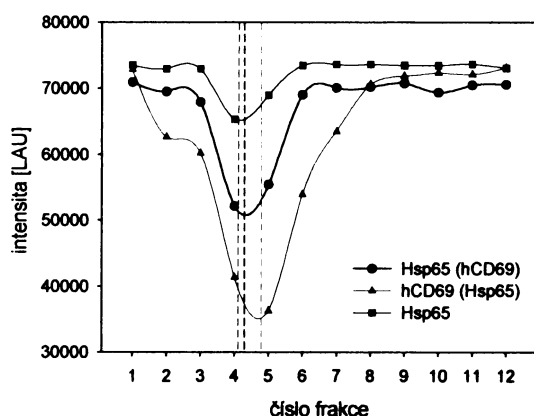


Obr. 12: Eluční profily vzorků po gelové filtrační chromatografii na koloně Superdex 200. Červeně – BSA, modře – hCD69, zeleně – Hsp65, černě – Hsp65 + hCD69.

Tab. 3: Eluční objemy a relativní molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů dělených na koloně Superdex 200. Barevně jsou vyznačeny molekulové hmotnosti určené na základě kalibrační křivky. 1. vrchol (Hsp65 + CD69) značí vrchol v chromatogramu odpovídající dříve eluovaným proteinům směsného vzorku. Analogicky 2. vrchol (Hsp65 + CD69).

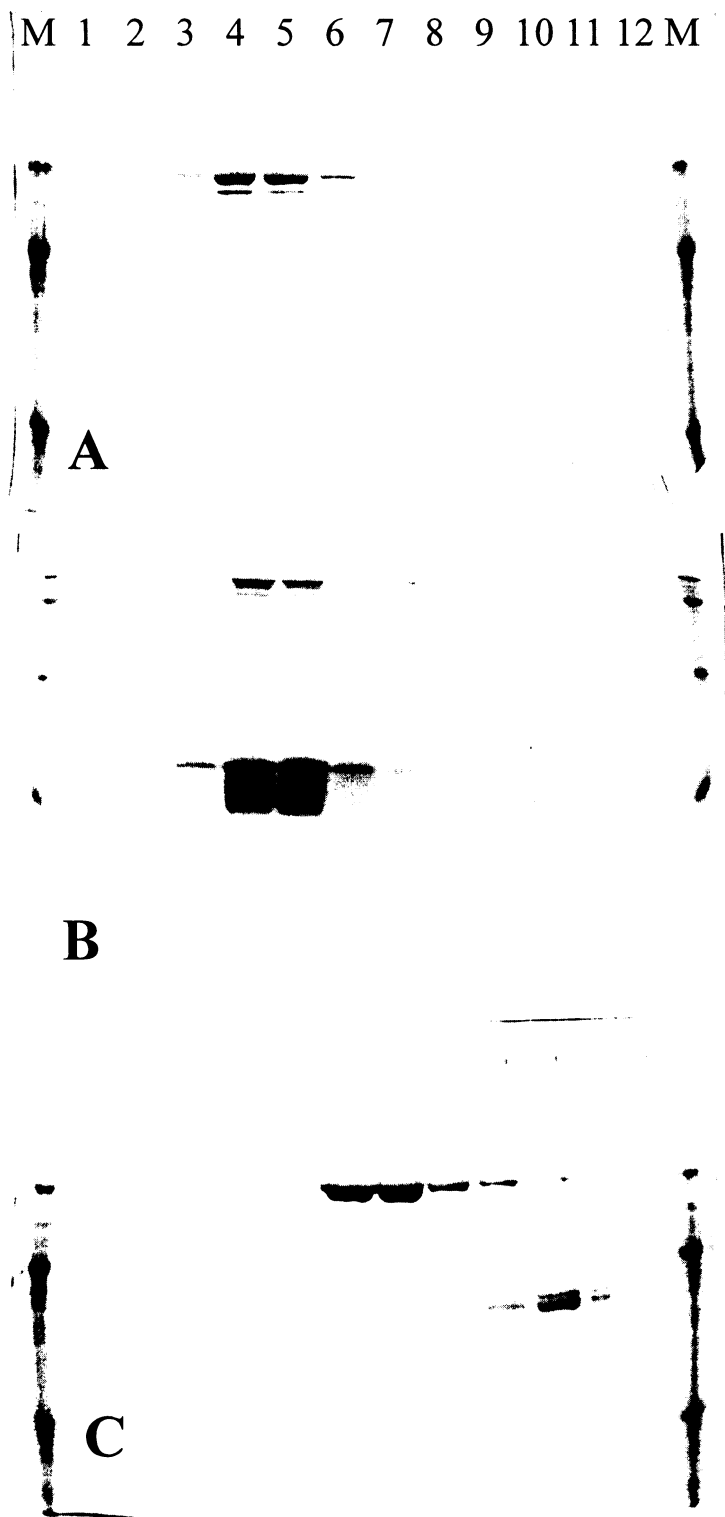
Vzorek	V _e [ml]	M _r
lysozym	17,5	14300
BSA (monomer)	11,3	66000
BSA (dimer)	10,3	132000
BSA (trimer)	9,4	198000
Hsp65 (dimer)	10,4	130000
hCD69 (dimer)	14,3	30000
1. vrchol (Hsp65 + CD69)	10	144400
2. vrchol (Hsp65 + CD69)	14,35	32000

IV.1.4. Ultracentrifugace na sacharosovém gradientu



Obr. 13: Profily intenzit zabarvení proužků na gelu obarveném CBB R250. Intenzita zabarvení proužků na gelech analyzujících frakce po ultracentrifugaci v sacharosovém gradientu byla vyhodnocena programem AIDA. Černě a červeně vyznačené intenzity odpovídají proužkům z gelu B na obr.14 (str. 41), tedy proteinům ze směsného vzorku Hsp65 a hCD69. Čárkované je vyznačeno maximum zabarvení (v grafu jako minimální intenzita světla).

Byla provedena optimalisace, pomocí které byla zjištěna doba centrifugace vhodná pro dobré rozdělení proteinů molekulových hmotností 30000 až 160000. Jako nejuvhodnější se jevila osmihodinová ultracentrifugace při $257000 \times g$. Centrifugace dalších vzorků byla prováděna za zjištěných optimálních podmínek. Analýza frakcí po ultracentrifugaci byla provedena využitím SDS PAGE na 10 % resp. 15 % polyakrylamidovém gelu. Na obr. 14 (str. 41) jsou pod sebou uvedeny snímky gelů se vzorky po ultracentrifugaci obarvených CBB R250. Na snímku gelu B (obr. 14) byla provedena analýza intenzity proužků v jednotlivých drahách pomocí programu AIDA, profily intenzit jsou



Obr. 14: Analýza frakcí po ultracentrifugaci – SDS PAGE na 15 % (B) resp. 10 % (A, C) gelu. Vzorky: A – Hsp65, B – Hsp65 + hCD69, C – BSA + aldolasa. Číslo značí frakce po ultracentrifugaci v sacharosovém gradientu, M značí marker.

vyneseny v grafu na obr. 13 (str.40). Touto analýzou bylo zjištěno, že ke změně sedimentačních rychlostí proteinů ve směsném vzorku oproti sedimentační rychlosti samotného Hsp65 prakticky nedošlo a maximální množství proteinu Hsp65 se nachází ve 4. frakci. Zároveň se ukázalo, že protein hCD69, ač má molekulovou hmotnost menší než Hsp65, putuje gradientem sacharosy rychleji a jeho největší množství se nachází ve frakci číslo 5.

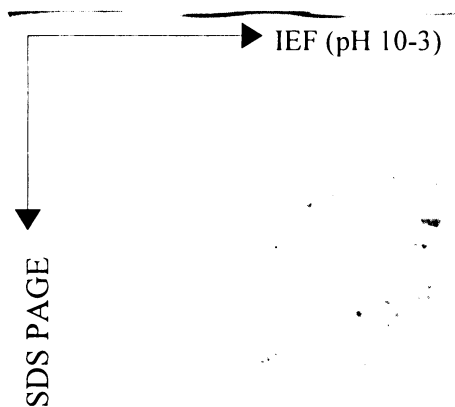
IV.2. HSP60 ZE *STREPTOMYCES ALBUS*

IV.2.1 Kultivace buněk, sklizení buněk a příprava lyzátů

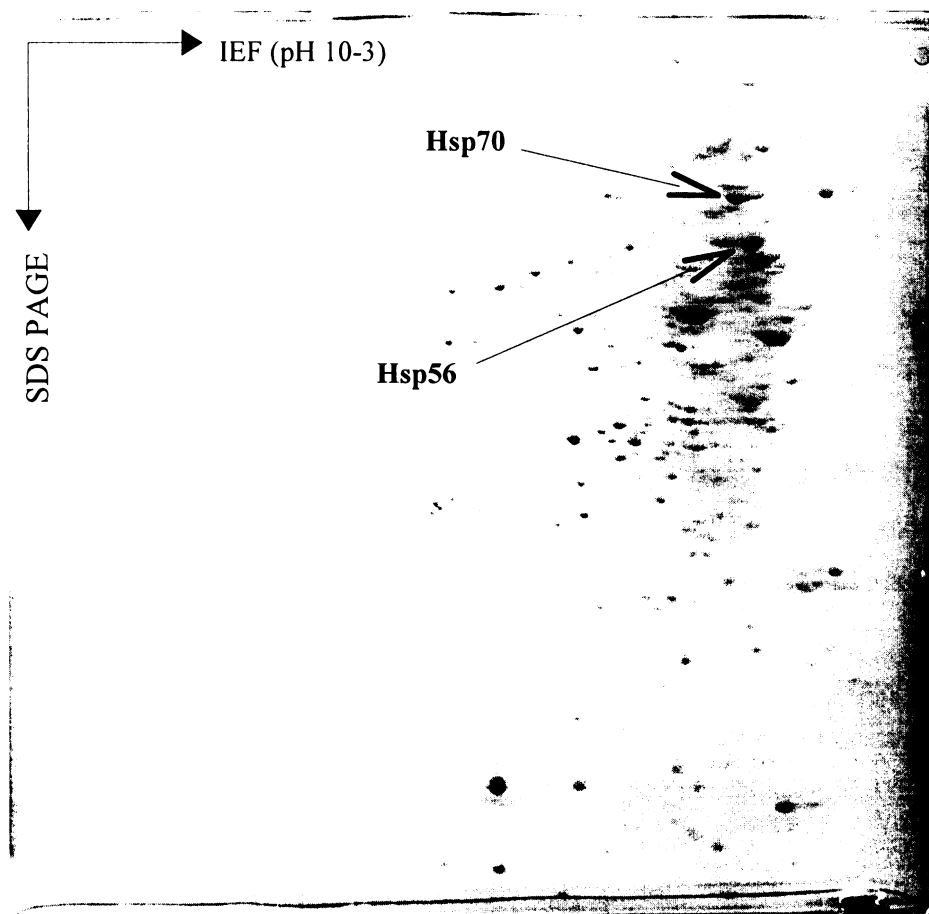
Při oživování kultury *Streptomyces albus* se dařilo oživit bakteriální kmen přímým zaočkováním media suspensí spor ve 20 % glycerolu. Po zaočkování čersvého media oživenou kulturou dosáhly bakterie *S. albus* exponenciální fáze růstu během 15 hodin. Bakterie *S. albus* vytvářely drobné kulovité kolonie velikosti špendlíkové hlavičky – takzvané vzdušné mycelium. Kulturu bylo přitom nutné hodně okysličovat, při nedostatku kyslíku začaly bakterie vytvářet mycelium vláknité. Proto bylo do 500 ml baněk přidáno pouze 50 ml media a kultura byla poměrně silně třepána (200 rpm na rotační třepáče).

IV.2.2. Dvojrozměrná elektroforesa v polyakrylamidovém gelu

Lyzáty připravené z bakterií pěstovaných při 30 °C a bakterií tepelně stresovaných dvouhodinovou kultivací při 40 °C byly analyzovány na dvojrozměrné elektroforese. Snímky gelů obarvených CBB R250 jsou na obrázcích 15 a 16 (str. 43). Šipkami označené skvrny byly vytipovány porovnáním obou gelů jako proteiny indukované po tepelném šoku. Tyto skvrny byly vyříznuty a analyzovány pomocí MALDI MS (analýzu provedl Mgr. Petr Pompach). Povedlo se zjistit identitu proteinů ve dvou skvrnách pomocí programů ProFound a MASCOT. Tyto proteiny byly identifikovány jako Hsp70 a Hsp56 ze *Streptomyces albus*.



Obr. 15: Gel s proteiny lyzátu *nestresovaných* bakterií *S. albus* rozdělenými pomocí 2D PAGE. Na obrázku je vyznačen směr, ve kterém probíhala isoelektrická fokusace (IEF) a elektroforesa (SDS PAGE).



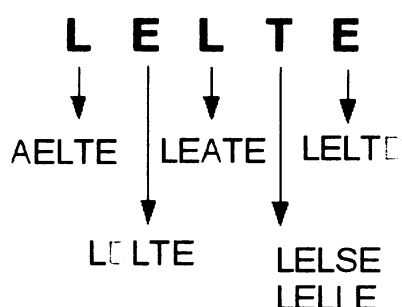
Obr. 16: Gel s proteiny lyzátu *tepelně stresovaných* bakterií *S. albus* rozdělenými pomocí 2D PAGE. Šípkami jsou označeny proteiny s molekulovou hmotností okolo 60000, k jejichž indukci došlo po tepelném šoku – srov. obr. 15. Popiskem jsou označeny proteiny identifikované pomocí MALDI MS.

V. DISKUSE

V laboratoři doc. Bezoušky byla již dříve zjištěna vazba lidského proteinu CD69 na mykobakteriální protein tepelného šoku Hsp65 využitím autoradiografické detekce proteinů z lyzátu *Mycobacterium tuberculosis* pomocí (¹²⁵I)CD69. Proteiny lyzátu byly rozděleny pomocí SDS PAGE, přeneseny metodou Western Blot na membránu a inkubovány s radioaktivně značeným CD69, protein vázající CD69 byl identifikován pomocí MALDI MS [57].

K potvrzení vazby mykobakteriálního Hsp65 na lidský receptor CD69 a určení, zda se na tento receptor váže i lidský homolog Hsp60 byly využity vazebné testy na mikrotitračních destičkách. Tyto semikvantitativní testy jsou metodou často využívanou ke sledování sacharidové specifity lektinových receptorů [56, 58], nyní byly podobným způsobem využity i pro studium peptidových ligandů. Kromě lidského CD69 byla testována i vazba na potkaní CD69.

Vazba Hsp65 na lidský i potkaní receptor CD69 byla potvrzena, jde o saturovatelnou specifickou interakci. Oproti tomu lidský Hsp60 se na žádný z proteinů CD69 nevázal, ačkoliv jde o protein s poměrně vysokou sekvenční homologií s Hsp65 (viz příloha).



Obr. 17: Varianty LELTE sekvence použité v inhibičních testech. Barevně jsou vyznačeny záměny aminokyselin.

Inhibiční testy byly prováděny se sadou fragmentů Hsp65 a synteticky připravených peptidů. LELTE sekvence byla vytipována jako minimální sekvence Hsp65 schopná vazby na lidský CD69 [57], bylo však potřeba zjistit, zda na vazbu celého proteinu Hsp65 nemají vliv i jiné aminokyseliny v okolí této sekvence, případně zda se na vazbě proteinu Hsp65 kooperativně nepodílí více vazebných míst. Porovnáním konstanty IC₅₀ pro zkracující se peptidy obsahující LELTE sekvenci bylo zjištěno, že samotná LELTE sekvence se na protein CD69 váže se stejnou afinitou jako celý protein Hsp65 či některý z jeho fragmentů obsahujících LELTE sekvenci. Fragменты Hsp65 bez LELTE sekvence (peptid A, SNTFGLQ) se na protein CD69 nevázejí. V dalších experimentech byly jako

inhibující peptidy testovány různé varianty LELTE pentapeptidu – viz obr. 17. V sadě těchto peptidů byly postupně nahrazovány jednotlivé aminokyseliny pentapeptidu LELTE: leucin za alanin, glutamová kyselina za kyselinu asparagovou, threonin za serin nebo leucin. Bylo zjištěno, že podstatný vliv na vazbu LELTE na protein CD69 mají obě dvě glutamové kyseliny, které nemohou být nahrazeny ani o uhlík kratší kyselinou asparagovou. Jako další struktura důležitá pro vazbu byla odhalena hydroxyskupina na threoninu, jehož nahrazení serinem nevedlo ke ztrátě inhibující aktivity, zatímco nahrazení hydrofobní aminokyselinou leucinem ztrátu aktivity způsobilo. Nahrazení prvního leucinu za alanin, vede k dokonce ještě větší afinitě pentapeptidu k proteinu CD69, v případě náhrady druhého leucinu za alanin se naopak afinita pentapeptidu k CD69 ztrácí a k vazbě nedochází. Srovnatelných výsledků bylo dosaženo i s potkaním receptorem CD69 (viz tab. 1, str. 31). Na základě těchto poznatků se lze domnívat, že k vazbě lidského proteinu Hsp60 nedocházelo z toho důvodu, že se v aminokyselinové sekvenci Hsp60 neobjevuje sekvence LELTE, ale LEIIE.

Odhalení aminokyselin zodpovědných za vazbu Hsp65 na protein CD69 má velký význam pro určení struktury vazebného místa na proteinu CD69, vytipování možných vazebných míst pro pentapeptid LELTE na molekule CD69 může být provedeno například počítačovým modelováním.

Gelové filtrační chromatografie si kladly za cíl charakterisovat komplex Hsp65 a hCD69. Původní idea vycházela z představy Hsp65 jako klasického nekovalentního čtrnáctimeru, analogického chaperoninu GroEL z *Escherichia coli*. Tento komplex by na sebe mohl vázat více molekul receptoru CD69, neboť LELTE sekvence je přítomna na každém monomeru – molekule Hsp65. Podle počítačového modelu Hsp65 jako oligomerního komplexu je sekvence LELTE exponována na povrchu komplexu (viz příloha). První provedené gelové filtrace však tuto domněnku nepotvrdily, na chromatogramech nebyl pozorován vrchol odpovídající očekávanému čtrnáctimernímu komplexu. V době těchto experimentů publikoval Qamra a kol. práci [50], která se zabývá oligomerními komplexy Hsp65 z *Mycobacterium tuberculosis*. Tato pracovní skupina zjistila, že namísto kanonických čtrnáctimerních komplexů tvoří Hsp65 z *M. tuberculosis* pouze dimery, jak *in vivo*, tak *in vitro* a publikovala také krystalovou strukturu dimeru Hsp65 [49] (viz úvod – kapitola I.5.). Gelové filtrační chromatografie byly tudíž zopakovány a dimerní charakter Hsp65 byl potvrzen i pro námi používaný rekombinantní

Hsp65. Zároveň byla potvrzena i tvorba nekovalentního dimeru použitého konstruktu hCD69 (dimerisaci tohoto proteinu potvrzují i další nezávislé experimenty [59]). Při gelové chromatografii směsi Hsp65 s molárním nadbytkem hCD69 došlo k posunu vrcholu Hsp65, k eluci docházelo dříve. Podle kalibrační křivky tento posun odpovídá zvýšení molekulové hmotnosti o 14300. Dochází tedy k interakci mezi proteiny Hsp65 a hCD69, z experimentu však není možné s jistotou rozhodnout o stechiometrii této interakce. Kontaktem s chaperoninem Hsp65 mohlo dojít k disociaci nekovalentního dimeru hCD69 na monomery a navázání jedné molekuly CD69 na dimerní komplex Hsp65. Zároveň je však možné, že se navázáním nekovalentního dimeru CD69 stal z protáhlého a poměrně pohyblivého Hsp65 kompaktní globulární komplex, pohybující se při gelové chromatografii kolonou pomaleji, než se podle jeho molekulové hmotnosti očekávalo.

Za účelem získat další potvrzení vazby hCD69 na dimerní komplex Hsp65 byla provedena ultracentrifugace na sacharosovém gradientu metodou sedimentační rychlosti. Tato metoda byla již předtím v laboratoři doc. Bezoušky úspěšně používána ke zjišťování dimerního či monomerního charakteru různých konstruktů CD69 [59, 60]. Pro sledování komplexů Hsp65 a hCD69 se však jako příliš vhodná neukázala. Po optimalisaci pro požadovaný rozsah molekulových hmotností byla tato metoda použita pro vzorek samotného Hsp65 a vzorek Hsp65 s molárním nadbytkem hCD69. Ačkoliv molekulová hmotnost Hsp65 (monomeru) je stejná jako molekulová hmotnost BSA (použitého standardu), pohyboval se protein Hsp65 gradientem mnohem pomaleji a po rozebrání gradientu byl nalezen ve čtvrté a páté frakci, namísto šesté a sedmé frakce, ve kterých se vyskytoval BSA. Navíc sedimentační rychlost Hsp65 byla zhruba stejná jako sedimentační rychlost hCD69, takže po ultracentrifugaci vzorku obsahujícího jejich směs byly oba proteiny nalezeny ve stejných frakcích 4 a 5. Abychom zjistili, zda přece jen nedošlo k posunu v sedimentační rychlosti proteinu Hsp65 po předpokládaném navázání hCD69 (např. více proteinu ve frakci 4 po centrifugaci samotného Hsp65 a zároveň větší množství proteinu Hsp65 ve frakci 5 po centrifugaci směsného vzorku), byla provedena analýza snímků gelů obarvených CBB R250 pomocí programu AIDA. Tento program umožňuje vyhodnocovat intenzitu světla v jednotlivých místech gelu – intenzita zabarvení jednotlivých proužků obarvených CBB R250 je intenzitou stínu, v grafu na *obr. 13* (str. 40) jsou proto vrcholy obrácené. Jak vyplývá z tohoto grafu, je největší množství proteinu Hsp65 ve frakci číslo pět, jak ve vzorku samotného Hsp65, tak ve směsném vzorku.

Rychlost sedimentace v použité metodě závisí nejen na molekulové hmotnosti bílkoviny, ale také na jejím tvaru. Zatímco extracelulární část molekuly hCD69 (zahrnutá v používaném konstruktu) je globulární, tvar molekuly Hsp65 (určený rentgenovou difrakcí) je spíše protáhlý. Hydrodynamické vlastnosti molekul Hsp65 a hCD69 neumožňovaly studium jejich vazby pomocí ultracentrifugace metodou sedimentačních rychlostí.

Pro další studium interakcí chaperoninů rodiny HSP60 a z nich získaných peptidů s receptorem CD69 by bylo vhodné mít k dispozici větší množství těchto proteinů pro kokrystalisace s receptorem CD69 nebo například rovnovážné dialýzy. Díky spolupráci s laboratoří Dr. P. Mazodiera byl získán GroEL1 (–) mutant *Streptomyces albus*. *Streptomyces albus* je druh bakterie úzce příbuzný s *Mycobacterium tuberculosis*. Podobně jako *M. tuberculosis* exprimuje dva chaperoniny rodiny HSP60, označované Hsp58 (GroEL1) a Hsp56 (GroEL2), přičemž pouze aminokyselinová sekvence Hsp56 (GroEL2) obsahuje sekvenci LELTE [47]. Získaný mutant exprimuje pouze protein Hsp56 (GroEL2), který po indukci tepelným šokem tvoří až 3 % všech proteinů v buňce [61]. Bakterie *Streptomyces albus* nejsou patogenní, dobře rostou a jsou nenáročné na živiny obsažené v mediu, v tomto ohledu by jejich velkoobjemová kultivace byla poměrně levná, rychlá a nenáročná. Jedinou nevýhodou by mohlo být to, že je tyto bakterie nutné kultivovat v omezeném objemu media, aby docházelo k dobrému okysličování kultury. K nalezení a orientačnímu zhodnocení množství proteinu Hsp56 (GroEL2) v lyzátu *S. albus* byla použita 2D PAGE, neboť klasickou SDS PAGE nebylo možné proteiny lyzátu dobře rozdělit a pomocí MALDI MS proužků vyříznutých z gelu se nepodařilo protein Hsp56 dohledat. Naopak, rozdělením proteinů na 2D PAGE, porovnáním gelů s proteiny lyzátů nestresovaných a tepelně stresovaných streptomycet a následnou hmotnostně spektrometrickou analýzou vybraných skvrn byl protein Hsp56 nalezen (viz obr. 16, str. 43). Znalost pozice Hsp56 na gelu – a z toho vyplývající znalost přibližného pI a M_r – může v dalším postupu usnadnit purifikaci tohoto proteinu.

VI. SOUHRN

- Vazebnými testy na mikrotitračních destičkách byla potvrzena vazba mykobakteriálního proteinu Hsp65 na lidský i potkaní receptor leukocytů CD69, bylo zjištěno, že lidský homolog Hsp60 se na receptory h/rCD69 neváže.
- Jako minimální sekvence vázající se na protein CD69 se stejnou afinitou jako celý mykobakteriální Hsp65 byla potvrzena sekvence LELTE, odhaleny byly aminokyseliny zodpovědné za tuto vazbu – obě glutamové kyseliny a leucin (třetí aminokyselina v sekvenci pentapeptidu) – jejichž náhrada za jinou aminokyselinu vede ke ztrátě afinity pentapeptidu k CD69.
- Gelovou filtrací byla potvrzena vazba proteinu CD69 na dimer Hsp65.
- V lyzátu *Streptomyces albus* byl nalezen protein Hsp56 (homologní s mykobakteriálním Hsp65 a obsahující LELTE sekvenci).
- Byla zahájena izolace Hsp56 ze *Streptomyces albus* pro účely kokrystalizace s proteinem CD69 a dalších vazebných studií.

VII. SEZNAM LITERATURY

- [1] Hightower, L. E., Hendershot, L. M.: Cell Stress Chaperones 2, 1-11 (1997) Molecular Chaperones and the Heat Shock Response at Cold Spring Harbor.
- [2] Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie (2. vydání), Triton, Praha (2002)
- [3] Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N.: Nature 285, 66 (1980) What Should Be Called a Lectin?
- [4] Dodd, R. B., Drickamer, K.: Glycobiology 11, 71-79 (2001) Lectin-Like Proteins in Model Organisms: Implications for Evolution of Carbohydrate-Binding Activity.
- [5] López-Cabrera, M., Santis, A. G., Fernández-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F.: J. Exp. Med. 178, 537-547 (1993) Molecular Cloning, Expression, and Chromosomal Localisation of the Human Earliest Lymphocyte Activation Antigen AIM/CD69, a New Member of the C-Type Animal Lectin Superfamily of Signal-transmitting Receptors.
- [6] Cerwenka, A., Lanier, L. L.: Immunol. Rev. 181, 158-169 (2001) Ligands for Natural Killer Cell Receptors: Redundancy or Specificity.
- [7] De-Maria, R., Cifone, M. G., Trotta, R., Rippo, M. R., Festuccia, C., Santoni, A., Testi, R.: J. Exp. Med. 180, 1999-2004 (1990) Triggering of Human Monocyte Activation Through CD69, a Member of the Natural Killer Cell Gene Complex Family of Signal Transducing Receptors.
- [8] Gavioli, R., Risso, A., Smilovich, D., Baldissarro, I., Capra, M. C., Bargellesi, A., Cosulich, M. E.: Cell. Immunol. 142, 186-196 (1992) CD69 Molecule in Human Neutrophils: Its Expression and Role in Signal-Transducing Mechanisms.
- [9] Bieber, T.: Immunol. Today 15, 52-53 (1994) Fc epsilon RI on Human Langerhans Cells: A Receptor in Search of New Functions.
- [10] Testi, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P. P., Santoni, A.: J. Exp. Med. 172, 701-707 (1990) CD69 is Expressed on Platelets and Mediates Platelet Activation and Aggregation
- [11] Testi, R., Phillips, J. H., Lanier, L. L.: J. Immunol. 143, 1123-1128 (1989) T Cell Activation via Leu-23.
- [12] Lanier, L. L., Buck, D. W., Rhodes, L., Ding, A., Evans, E., Barney, C., Phillips, J. H.: J. Exp. Med. 167, 1572-1585 (1988) IL-2 Activation of NK Cells Rapidly Induces the Expression and Phosphorylation of the Leu-23 Activation Antigen.

- [13] Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., Santoni, A.: *Immunol. Today* 15, 479-483 (1994) The CD69 Receptor: A Multipurpose Cell-Surface Trigger for Hematopoietic Cells.
- [14] Hara, T., Jung, L. K. L., Bjorndahl, J. M., Fu, S. M.: *J. Exp. Med.* 164, 1988-2005 (1986) Human T Cell Activation III. Rapid Induction of a Phosphorylated 28 kD/ 32 kD Disulfide-Linked Early Activation Antigen (EA-1) by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, Mitogens, and Antigens.
- [15] Cebrián, M., Yagüe, E., Rincón, M., López-Botet, M., de Landázuri, M. O., Sánchez-Madrid, F.: *J. Exp. Med.* 168, 1621-1637 (1988) Triggering of T Cell Proliferation Through AIM, an Activation Inducer Molecule Expressed on Activated Human Lymphocytes.
- [16] Cosulich, M. E., Rubartelli, A., Risso, A., Cozzolino, F., Bargellesi, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4205-4209 (1987) Functional Characterisation of an Antigen Involved in an Early Step of T-Cell Activation.
- [17] Risso, A., Smilovich, D., Capra, M. C., Baldissaro, I., Yan, G., Bargellesi, A., Cosulich, M. E.: *J. Immunol.* 146, 4105-4114 (1991) CD69 in Resting and Activated T Lymphocytes. Its Association with a GTP Binding Protein and Biochemical Requirements for Its Expression.
- [18] Sancho, D., Santis, A. G., Alonso-Lebrero, J. L., Viedma, F., Tejedor, R., Sánchez-Madrid, F.: *J. Immunol.* 165, 3868-3875 (2000) Functional Analysis of Ligand-Binding and Signal Transduction Domains of CD69 and CD23 C-Type Lectin Leukocyte Receptors.
- [19] Vaněk, O.: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2005)
- [20] Llera, A. S., Viedma, F., Sánchez-Madrid, F., Tormo, J.: *J. Biol. Chem.* 276, 7312-7319 (2001) Crystal Structure of the C-type Lectin-like Domain from the Human Hematopoietic Cell Receptor CD69.
- [21] Natarajan, K., Sawicki, M. W., Margulies, D. H., Mariuzza, R. A.: *Biochemistry* 39, 14779-14786 (2000) Crystal Structure of Human CD69: A C-Type Lectin-Like Activation Marker of Hematopoietic Cells
- [22] López-Cabrera, M., Muñoz, E., Blázquez, V., Ursa, M. A., Santis, A. G., Sánchez-Madrid, F.: *J. Biol. Chem.* 270, 21545-21551 (1995) Transcriptional Regulation of the Gene Encoding the Human C-Type Lectin Leukocyte Receptor AIM/CD69 and Functional Characterisation of Its Tumor Necrosis Factor- α -responsive Elements

- [23] Foerster, M., Haefner, D., Kroegel, C.: *Scand. J. Immunol.* 56, 417-428 (2002) *Bcl-2-Mediated Regulation of CD69-Induced Apoptosis of Human Eosinophils: Identification and Characterisation of a Novel Receptor-Induced Mechanism and Relationship to CD95-Transduced Signalling.*
- [24] Ramírez, R., Carracedo, J., Castedo, M., Zamzami, N., Kroemer, G.: *Cell Immunol.* 172, 192-199 (1996) *CD69-Induced Monocyte Apoptosis Involves Multiple Nonredundant Signalling Pathways.*
- [25] Esplugues, E., Sancho, D., Vega-Ramos, J., Martínez-A, C., Syrbe, U., Hamann, A., Engel, P., Sánchez-Madrid, F., Lauzurica, P.: *J. Exp. Med.* 197, 1093-1106 (2003) *Enhanced Antitumor Immunity in Mice Deficient in CD69.*
- [26] Lauzurica, P., Sancho, D., Torres, M., Albella, B., Marazuela, M., Merino, T., Bueren, J. A., Martínez, A. C., Sánchez-Madrid, F.: *Blood* 95, 2312-2320 (2000) *Phenotypic and Functional Characteristics of Hematopoietic Cell Lineages in CD69-Deficient Mice.*
- [27] Sancho, D., Gómez, M., Viedma, F., Esplugues, E., Gordón-Alonso, M., García-López, M. A., de la Fuente, H., Martínez-A, C., Lauzurica, P., Sánchez-Madrid, F.: *J. Clin. Invest.* 112, 872-882 (2003) *CD69 Downregulates Autoimmune Reactivity Through Active Transforming Growth Factor-Beta Production in Collagen-Induced Arthritis.*
- [28] Prud'homme, G. J., Piccirillo, C. A.: *J. Autoimmun.* 14, 23-42 (2000) *The Inhibitory Effects of Transforming Growth Factor-Beta-1 (TGF- β 1) in Autoimmune Diseases.*
- [29] Sancho, D., Gómez, M., Sánchez-Madrid, F.: *Trends Immunol.* 26, 136-140 (2005) *CD69 is an Immunoregulatory Molecule Induced Following Activation.*
- [30] Murata, K., Inami, M., Hasegawa, A., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S. F., Nakayama, T.: *Int. Immunol.* 15, 987-992 (2003) *CD69-Null Mice Protected from Arthritis Induced with Anti-Type II Collagen Antibodies.*
- [31] Swat, W., Dessing, M., von Boehmer, H., Kisielow, P.: *Eur. J. Immunol.* 23, 739-746 (1993) *CD69 Expression During Selection and Maturation of CD4+8+ Thymocytes.*
- [32] Feng, C., Woodside, K. J., Vance, B. A., El-Khoury, D., Canelles, M., Lee, J., Gress, R., Fowlkes, B. J., Shores, E. W., Love, P. E.: *Int. Immunol.* 14, 535-544 (2002) *A Potential Role For CD69 in Thymocyte Emigration.*

- [33] Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdičková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G., Matloubian, M.: Nature 440, 540-544 (2006) CD69 Acts Downstream of Interferon- α/β to Inhibit S1P₁ and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs.
- [34] Tissières, A., Mitchell, H. K., Tracy, U. M.: J. Mol. Biol. 84, 389-398 (1974) Protein Synthesis in Salivary Glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to Chromosome Puffs.
- [35] Dobson, C. M., Karplus, M.: Curr. Opin. Struct. Biol. 9, 92-101 (1999) The Fundamentals of Protein Folding: Bringing Together Theory and Experiment.
- [36] Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., Hartl, F. U.: Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 781-791 (2004) Pathways of Chaperone-Mediated Protein Folding in the Cytosol.
- [37] Walter, S., Buchner, J.: Angew. Chem. Int. Ed. 41, 1098-1113 (2002) Molecular Chaperones – Cellular Machines for Protein Folding
- [38] Saibil, H. R., Ranson, N. A.: Trends Biochem. Sci. 27, 627-632 (2002) The Chaperonin Folding Machine.
- [39] Chen, S., Roseman, A. M., Hunter, A. S., Wood, S. P., Burston, S. G., Ranson, N. A., Clarke, A. R., Saibil, H. R.: Nature 371, 261-264 (1994) Location of a Folding Protein and Shape Changes in GroEL-GroES Complexes Imaged by Cryo-electron Microscopy.
- [40] Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., Sigler, P. B.: Nature 371, 578-586 (1994) The Crystal Structure of the Bacterial Chaperonin GroEL at 2.8 Å.
- [41] Xu, Z., Horwich, A. L., Sigler, P. B.: Nature 388, 741-750 (1997) The Crystal Structure of the Asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ Chaperonin Complex.
- [42] De Bruyn, J., Bosmans, R., Turneer, M., Weckx, M., Nyabenda, J., Van Vooren, J. P., Falmagne, P., Wiker, H. G., Harboe, M.: Infect. Immun. 55, 245-252 (1987) Purification, Partial Characterisation and Identification of a Skin-Reactive Protein Antigen of *Mycobacterium bovis* BCG.
- [43] Silva, C. L., Pietro, R. L. R., Januarion, A., Bonato, V. L. D., Lima, V. M. F., Da Silva, M. F., Lowrie, D. B.: Immunology 86, 519-524 (1995) Protection Against Tuberculosis by Bone Marrow Cells Expressing Mycobacterial Hsp65.
- [44] Kong, T. H., Coates, A. R. M., Butcher, P. D., Hickman, C. J., Shinnick, T. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2608-2612 (1993) *Mycobacterium tuberculosis* Expresses Two Chaperonin-60 Homologs

- [45] Rinke de Wit, T. F., Bekelie, S., Osland, A., Miko, T. L., Hermans, P. W. M., van Soolinger, D., Drijfhout, J.-W., Schonings, R., Janson, A. A. M., Thole, J. E. R.: Mol. Microbiol. 6, 1995 – 2007 (1992) Mycobacteria Contain Two *groEL* Genes: The Second *Mycobacterium leprae* *groEL* Gene is Arranged in an Operon with *groES*.
- [46] Guglielmi, G., Mazodier, P., Thompson, C. J., Davies, J.: J. Bacteriol. 173, 7382-7386 (1991) Characterisation of the *groEL*-Like Genes in *Streptomyces albus*
- [47] Guglielmi, G., Mazodier, P., Thompson, C. J., Davies, J.: J. Bacteriol. 173, 7374-7381 (1991) A Survey of the Heat Shock Response in Four *Streptomyces* Species Reveals Two *GroEL*-Like genes and Three *GroEL*-Like Proteins in *Streptomyces albus*.
- [48] Young, D. B., Garbe, T. R.: Infect. Immun. 59, 3086 -3093 (1991) Heat Shock Proteins and Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*.
- [49] Qamra, R., Srinivas, V., Mande, S. C.: J. Mol. Biol. 342, 605-617 (2004) *Mycobacterium tuberculosis* *GroEL* Homologues Unusually Exist as Lower Oligomers and Retain the Ability to Suppress Aggregation of Substrate Proteins.
- [50] Qamra, R., Mande, S. C.: J. Bacteriol. 186, 8105-8113 (2004) Crystal Structure of the 65- Kilodalton Heat Shock Protein, Chaperonin 60.2, of *Mycobacterium tuberculosis*.
- [51] De Bruyn, J., Soetaert, K., Buysens, P., Calonne, I., De Coene, J. L., Gallet, X., Brasseur, R., Wattiez, R., Falmagne, P., Montrozier, H., Lanéelle, M. A., Daffé, M.: Microbiology 146, 1513-1524 (2000) Evidence for Specific and Non-Covalent Binding of Lipids to Natural and Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG
- [52] Zugel, U., Kaufmann, S. H.: Immunobiology 201, 22-35 (1999) Immune Response Against Heat-Shock Proteins in Infectious Diseases.
- [53] Van Eden, W., van der Zee, R., Paul, A. G. A., Prakken, B. J., Wendling, U., Anderton, S. M., Wauben, M. H. M.: Immunol. Today 19, 303-307 (1998) Do Heat Shock Proteins Control the Balance of T-Cell Regulation in Inflammatory Diseases?
- [54] Van Eden, W., van der Zee, R., Prakken, B. J.: Nature 5, 318-330 (2005) Heat Shock Proteins Induce T-Cell Regulation of Chronic Inflammation.
- [55] Tsan, M.-F., Gao, B.: Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 286, C739-C744 (2004) Cytokine Function of Heat Shock Proteins.
- [56] Bezouška, K., Vlahas, G., Horvath, O., Jinochová, G., Fišerová, A., Giorda, R., Chambers, W. H., Feizi, T., Pospíšil, M.: J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994). Rat Natural Killer Cell Antigen, NKR-P1, Related to C-Type Animal Lectins Is a Carbohydrate-Binding Protein.

- [57] Švábová L.: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2003)
- [58] Gange, C. T., Quinn, J. M. W., Zhou, H., Kartsogiannis, V., Gillespie, M., Ng, K. W.:
J. Biol. Chem. 279, 29043-29049 (2004) Characterisation of Sugar Binding by
Osteoclast Inhibitory Lectin.
- [59] Bílý, J.: osobní sdělení
- [60] Lejsková, Z.: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2005)
- [61] Mazodier, P.: osobní sdělení
- [62] Vance, B. A., Harley, P. H., Backlund, P. S., Ward, Y., Phelps, T. L., Gress, R. E.:
Archives of Biochemistry and Biophysics 438, 11-20 (2005) Human CD69
Associates with an N-Terminal Fragment of Calreticulin at the Cell Surface.

PŘÍLOHA

Mt_Hsp65	-----MAKTIA YDEEARRGLERGLNALADAVKVTLGPKGR	35
Sa_Hsp56	-----MAKIIAFDEEARRGLERGMNQLADAVKVTLGPKGR	35
Mt_Cpn60-1	-----MSKLI EYDETARRAMEVGM DKLADTVRVTLGPRGR	35
Ec_GroEL	-----MAAKDVKFGNDARVKMLRGVNLADAVKVTLGPKGR	36
h_Hsp60	MLRLPTVFRQMRPVSRVLA PHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGR	60
	* : : . * * : * : * * : * * : * *	
Mt_Hsp65	NVVLEKKWGA P TITNDGVSIAKEIELEDPYEKI GAELVKEVAKKTD DVAGDGT T TATVLA	95
Sa_Hsp56	NVVLEKKWGA P TITNDGVSIAKEIELEDPYEKI GAELVKEVAKKTD DVAGDGT T TATVLA	95
Mt_Cpn60-1	HVVLAKAFGGP T V TNDGVTVAREIELEDPFEDLGAQLVKS VATKTNDVAGDGT T TATILA	95
Ec_GroEL	NVVLDK SFGAP TITKDGVSAREIELEDKFENMGAQM VKEVASKANDAAGDGT T TATVLA	96
h_Hsp60	TVIIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNI GAKLVQDVANNTNEEAGDGT T TATVLA	120
	* : : * : * : * * : * : * * : * : * * : * : * * : * * : * *	
Mt_Hsp65	QALVREGLRNVAAGANPLGLKRGIEKAVEKVTETLLKGAKEVETKEQIAATAAISA-GDQ	154
Sa_Hsp56	QALVREGLRNVAAGANPMALKRGIEKAVEAVSSALLEQAKDVETKEQIASTASISA-ADT	154
Mt_Cpn60-1	QALIKGGLRLVAAGVNP IALGVGIGKAADAVSEALLASATPVSGKTGIAQVATVSS-RDE	154
Ec_GroEL	QAIIT EGLKAVAAGMNPMDLKRGI DKA VTVAVEELKALSVPCSDSKAIAQVGTISANSDE	156
h_Hsp60	RSIAKEGFEKISGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDK	180
	: : * : * : * * : * : * . * : * : * * : * * : * * : * * : *	
	183 189	
Mt_Hsp65	SIGDLIAEAMDKVGN EGVITVEESNTFGLQDELEFTEGMRFDKGYISGYFVTDPERQEAVLE	214
Sa_Hsp56	QIGELIAEAMDKV GKEGVITVEESQTFGLELELTEGMRFDKGYISAYFATDMERMEASLD	214
Mt_Cpn60-1	QIGDLVGEAMSKVGHG D VVSVEESSTLGTELEFTEGIGFDKGFLSAYFVTFDFNQAVLE	214
Ec_GroEL	TVGKLI AEAMDKV GKEGVITVEDGTGLQDELDVVEGMQFDRGYLSPYFINKPETGAVELE	216
h_Hsp60	EIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGTLNDELEIIEGMKFD RGYISPYFINTSKGQKCEFAQ	240
	* : : * : * : * * : * : * * : * : * * : * : * * : * * : * *	
Mt_Hsp65	DPYILLVSSKVSTVKDLLP LLEKVI GAGKPLLI AEDVEGEALSTLVVNKIRGTFKSVAV	274
Sa_Hsp56	DPYILIVNSKIGNVKDLLP LLEKVMQSGKPLLI AEDVEGEALSTLVVNKIRGTFKSVAV	274
Mt_Cpn60-1	DALILLHQDKISSLPDLLP LLEKVAGTGKPLLI AEDVEGEALATLVVNAIRKTLKAVAV	274
Ec_GroEL	SPFILLADKKISNIREMLPVLEAVAKAGKPLLI AEDVEGEALATLVVNTMRGIVKVAAV	276
h_Hsp60	DAYVLLSEKKISSI QSVPALEIANHRKPLVIAEDVGEALSTLVNRLKVLQVVAV	300
	. * : * : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *	
Mt_Hsp65	KAPGFGDRRKAM LQDMAITGGQVISEE-VGLTLENADLSLLGKARKVVVTKDETTIVEG	333
Sa_Hsp56	KAPGFGDRRKAM LGDIAITGGTVISEE-VGLKLENAGLDLLGRARKVVVTKDETTIVDG	333
Mt_Cpn60-1	KGPYPGDRRKAFLEDLAVV TGGQVVPD-AGMVLREVGLV LGSARRVVSKDDTVIVDG	333
Ec_GroEL	KAPGFGDRRKAM LQDIATLTGGTVISEE-IGMELEKATLEDLQAKRVVINKDTTTTIDG	335
h_Hsp60	KAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEELTNLEDVQPHDLGKVGVEVIVTKDDAMLLKG	360
	* . * * * . * * * * * * * : : * . . . * * * . * : : * * : * * : *	
Mt_Hsp65	AGDTDAIAGRVAQIRQEIENS DSDYDREKLQERLAKLAGGVAVIKAGAATEVELKERKHR	393
Sa_Hsp56	AGDTDQVNGRVAQIRAEIENS DSDYDREKLQERLANVAGGVAVIKAGAATEVELKERKHR	393
Mt_Cpn60-1	GGTAEAVANRAKHLRAEIDKSDSDWDREKLGERLAKLAGGVAVIKVGAATEVALKERKES	393
Ec_GroEL	VGEAAIQGRVAQIRQIEEATSDYDREKLQERVAKLGGVAVIKVGAATEVEMKEKKAR	395
h_Hsp60	KGDKAQIEKRIQEIIIEQLDVTTSEYEKEKLNERLAKLSDGVAVLKVGGTSDVEVNEKKDR	420
	* : * : * : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
Mt_Hsp65	IEDAVRNAKAAVEEGIVAGGGV TLL-QAAPTLDLDEL--KLEGDEATGANIVKVALEAPLKQ	450
Sa_Hsp56	IEDAVRNAKAAVEEGIVAGGGV ALL-QASSVFEKL--ELEGDEATGAAAVKLALEAPLKQ	450
Mt_Cpn60-1	VEDAVAAAKAAVEEGIVPGGGASLIHQARKALTEL RASLTGDEVLGVDVVFSEALAPLFW	453
Ec_GroEL	VEDALHATRAAVEEGV VAGGGVALI-RVASKLADLR-GQNE DQNVGIKVALRAMEAPLRQ	453
h_Hsp60	VTDALNATRAAVEEGIVLGGGCALL-RCIPALDSL T-PANEDQKIGIEIIRKRLKIPAMT	478
	: * * : : * * * * * * * * * * : * : * : * * : * : * : *	
Mt_Hsp65	IAFN SGL EPGVVAEKVRNLPAGHGLNAQTGVYEDLLAGVADPVK VTRSALQNAASIAGL	510
Sa_Hsp56	IAVNGGLEGGV VVEKVRNLSVGHGLNAATGQYVDMIAEGILDPKAVTRSALQNAASIAAL	510
Mt_Cpn60-1	IAANAGLDG S VVNVKSEL P AGHGLNVNTLSYGD LAADGVIDPVK VTRSAVLNASSVARM	513
Ec_GroEL	IVLNCGEEPSV VANTVKGGDGN YGNAATEEYGNMIDMGILDPTK VTRSALQYAASVAGL	513
h_Hsp60	IAKNAGVEGSLIVEKIMQSSEVGYDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDAAGVASL	538
	* . * * : : : : * : : : * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
Mt_Hsp65	FLTTEAVVADKPEKEKASVPGGGDMGGMDF-----	540
Sa_Hsp56	FLTTEAVIADKPEKAAAAPGGMPGGMDF-----	540
Mt_Cpn60-1	VLTTEVVVDKPAKAEDH DHHHGH AH-----	539
Ec_GroEL	MITTECMVTDLPKNDAADLGAAGMGGMGGMGGMM	548
h_Hsp60	LTAEVVVTEIPKEEKDPGMGAMGGMGGMGGMGGMF	573
	. * : * : : * :	

VYSVĚTLIVKY K PŘÍLOZE

Srovnání aminokyselinových sekvencí chaperoninů

Sekvence chaperoninů rodiny HSP60 z *Mycobacterium tuberculosis* (Mt), *Streptomyces albus* (Sa), *Escherichia coli* (Ec) a lidského Hsp60 (h) seřazené pomocí programu ClustalW (verze 1.83). Červeně jsou vyznačeny aminokyseliny ze sekvence LELTE. Hvězdičkou jsou označeny aminokyseliny konzervované ve všech sekvencích, tečkami jsou označeny náhrady za aminokyseliny podobných vlastností.

