

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra biochemie**

Diplomová práce

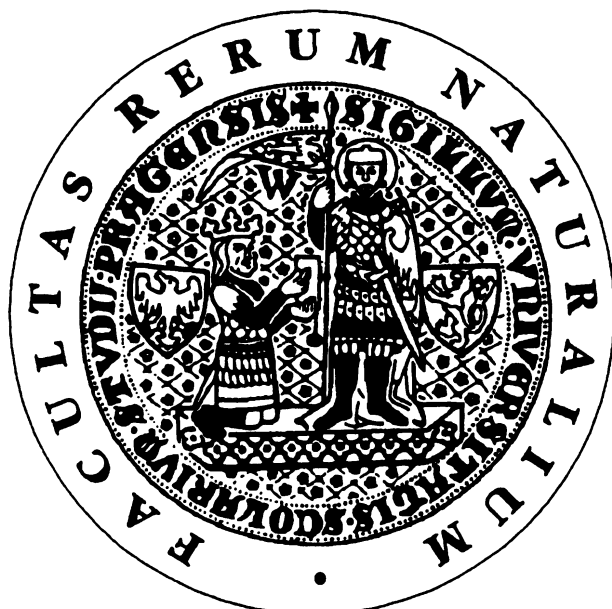
PRAHA 2004

Jan Svoboda

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra biochemie**

**Studium účinku glykodendrimerů na expresi
leukocytárních znaků a signalizaci**

Diplomová práce



Jan Svoboda


Vedoucí diplomové práce:

MUDr. A. Fišerová, CSc
Prof. Dr. M. Pospíšil, DrSc

PRAHA 2004

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelů MUDr. A. Fišerové, CSc. a Prof. Dr. M. Pospíšila, DrSc. v laboratoři přirozené buněčné imunity, oddělení imunologie a gnotobiologie MBÚ AV ČR za použití uvedených literárních pramenů.

V Praze dne 7. května 2004


.....
Jan Svoboda

Zde bych chtěl poděkovat svým školitelům Prof. Dr. Pospíšilovi a Dr. Fišerové za intelektuální, psychickou i materiální podporu a především za nekonečnou trpělivost. Vedoucímu Laboratoře architektury proteinů Doc. Dr. Bezouškovi děkuji za předané zkušenosti, ochotu a péči. Mgr. Luptovcové a Mgr. Kuldové děkuji za pomoc při každodenní práci v laboratoři, Mgr. Pucové a Mgr. Lukšanovi za užitečné rady a pomoc při zvládnutí používaných postupů. Dále děkuji kolektivům laboratoří Dr. Tučkové, Dr. Petříčka a Dr. Holubové za poskytování laboratorních přístrojů a všem nejmenovaným kolegyním a kolegům kteří projevili ochotu pomoci mi při práci.

Největší poděkování však patří mým rodičům, sourozencům a přátelům za psychickou a materiální podporu během celého studia.

Finanční podpora byla zajištěna z grantového projektu : 312/98/K034

PŘEDMLUVA

Nádorová onemocnění a boj s nimi představují pro vědu velmi závažný problém. Vedle běžně používaných postupů, jako je chemoterapie, radioterapie a chirurgické odstraňování nádorů se věda snaží uplatnit i další postupy na základě stále nově získávaných poznatků z oblasti biologie, fyziologie, imunologie, biochemie a především molekulární biologie.

Právě nové poznatky o procesech kancerogeneze a o jejich projevech dovolují v dnešním výzkumu posilovat imunitní systém organismu v boji proti nádorovému onemocnění. Při rozpoznávání a následné likvidaci nádorových buněk hrají vedle dalších faktorů důležitou roli cytotoxické T-lymfocyty (CTL), přirození zabíječi (NK buňky z angl. Natural Killer) a populace buněk nesoucí jak znaky T lymfocytů, tak znaky NK buněk (NKT buňky). Jejich receptorová a enzymová výbava dovoluje v určitých případech rozpoznat struktury na povrchu nádorové buňky a následně ji zlikvidovat. Problémem nádorového onemocnění je fakt, že transformované buňky mají schopnost měnit membránové receptory a zabránit buďto vlastnímu rozpoznání nebo cytotoxickému účinku a v některých případech dokáží v imunokompetentní buňce vyvolat trvalou anergizaci či apoptotickou smrt.

Cílem této práce je studium účinku podání sacharidových ligandů s vysokou afinitou k NK-buněčnému receptoru NKR-P1 na efektivitu rozpoznávacích a cytotoxických mechanismů u imunokompetentních buněk za použití biochemických, imunologických a molekulárně biologických metod. Práce je věnována studiu účinku podání glykodendrimerů na změnu v zastoupení určitých buněčných subpopulací a studiu změn signalizačních drah lymfocytů a nádorových buněk, vedených heterotrimerními GTP-vázajícími proteiny, spojených s podáním vysokoafinitního sacharidového ligandu.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| PŘEDMLUVA | 3 |
| OBSAH | 4 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 6 |
| 1. ÚVOD | 8 |
| 1.1. Imunitní systém organismu | 8 |
| 1.1.1. Součásti imunitního aparátu..... | 8 |
| 1.1.1.1. Buňky myeloidní řady..... | 8 |
| 1.1.1.2. Buňky lymfoidní řady | 9 |
| 1.1.2. Povrchové molekuly lymfocytů..... | 10 |
| 1.1.2.1. Povrchové proteiny lektinového typu | 11 |
| 1.2. Protein NKR-P1 | 12 |
| 1.3. Úloha NK buněk v protinádorové imunitě | 13 |
| 1.4. Nádorová onemocnění | 15 |
| 1.4.1. Únik nádorů imunitnímu dohledu | 15 |
| 1.5. Buněčná signalizace | 16 |
| 1.5.1. Signalizace zprostředkovaná proteinkinázami..... | 17 |
| 1.5.2. Signalizace zprostředkovaná trimerními G-proteiny | 18 |
| 1.5.3. Úloha G-proteinů v signalizačních mechanismech buněčné cytotoxicity | 22 |
| 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 24 |
| 2.1. Materiál | 24 |
| 2.1.1. Použité chemikálie | 24 |
| 2.1.2. Roztoky a média | 25 |
| 2.1.3. Spotřební materiál a použité přístroje | 26 |
| 2.1.4. Buněčné linie | 27 |
| 2.1.5. Experimentální zvířata | 27 |
| 2.2. Metody | 27 |
| 2.2.1. Izolační postupy | 27 |
| 2.2.1.1. Izolace slezinných buněk | 27 |
| 2.2.1.2. Izolace nádorových buněk | 28 |
| 2.2.1.3. Izolace buněčných membrán..... | 28 |
| 2.2.1.4. Cholátová extrakce membránových proteinů | 29 |
| 2.2.2. Kultivace buněk | 29 |
| 2.2.2.1. Kultivace izolovaných splenocytů | 29 |
| 2.2.2.2. Kultivace slezinných tkání | 29 |
| 2.2.2.3. Kultivace buněčných linií | 30 |
| 2.2.3. Průtoková cytometrie | 30 |
| 2.2.3.1. Značení buněk pro určení povrchových znaků | 30 |
| 2.2.3.2. Značení buněk pro určení intracelulárních znaků | 31 |
| 2.2.4. Cytotoxický test | 31 |
| 2.2.5. ELISA stanovení G _α -proteinových subjednotek..... | 32 |
| 2.2.6. Metoda Dot-Blot | 33 |
| 3. Výsledky | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1. Sledování účinku glykodendrimeru na imunokompetentní buňky..... | 34 |
| 3.1.1. Izolace a příprava buněk pro stanovení G-proteinů | 34 |
| 3.1.1.1. ELISA | 35 |
| 3.1.2. Dot Blot..... | 40 |
| 3.1.3. Izolace a příprava buněk pro FACS analýzu | 41 |
| 3.1.2.1. FACS analýza | 41 |
| 3.1.4. Cytotoxický test | 45 |
| 3.2. Sledování účinku glykodendrimeru na nádorové buňky | 47 |
| 3.2.1. Studium účinku glykodendrimeru na signalizaci C6 gliomové linie..... | 47 |
| 3.2.2. Studium účinku glykodendrimeru na signalizaci B16/F10 melanomové linie | 49 |
| 4. DISKUSE | 51 |
| 5. ZÁVĚR..... | 54 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 55 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-----------------|--|
| ADCC | protilátkou zprostředkovaná buněčná cytotoxicita (z angl. Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) |
| AK | aminokyselina |
| APC | antigen prezentující buňka (z angl. Antigene Presenting Cell) |
| BCR | B-buněčný receptor (z angl. B-Cell Receptor) |
| cAMP | cyklický adenosinmonofosfát |
| CD | diferenční znak (z angl. cluster of differentiation) |
| CRD | sacharid vážící doména (z angl. Carbohydrate-Recognition Domain) |
| CTL | cytotoxický T-lymfocyt |
| DAG | diacylglycerol |
| DC | dendritická buňka (z angl. Dendritic Cell) |
| ELISA | (z angl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) |
| FACS | (z angl. Fluorescence Activated Cell Sorter) |
| GN8 | PAMAM-GlcNAc ₈ , tj. N-acetyl-D-glukosamin vázaný na polyamidoaminové kostře |
| gp | glykoprotein |
| G-protein | GTP-vázající protein |
| GPI | glykosylfosfatidylinositol |
| GTP | guanidintrifosfát |
| IFN | interferon |
| IL | interleukin |
| IP ₃ | inositoltrisfosfát |
| ITAM | (z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) |
| ITIM | (z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major Histocompatibility Complex) |
| NK | přírozený zabíječ (z angl. Natural Killer) |
| NKR | NK buněčný Receptor |
| NKT | NK buňka, nesoucí zároveň T buněčný znak |
| PLC | fosfolipáza - C |

| | |
|---------------------|---|
| PMN | polymorfonukleární buňka |
| PTK | proteintyrozinkináza |
| SH | Src Homology |
| TCR | T-buněčný receptor (z angl. T-Cell Receptor) |
| TGF | (z angl. Tumor Generating Factor) |
| TK H ₂ O | tkáňová voda |
| TMH | Transmembránový helix |
| TNF | (z angl. Tumor Necrosis Factor) |
| TRAIL | (z angl. TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) |

1. ÚVOD

1.1. Imunitní systém organismu

Imunitní systém lze charakterizovat jako soustavu, která je ve spolupráci s ostatními tělními systémy schopna identifikovat nežádoucí změny ve vnějším i vnitřním prostředí a reagovat na ně. Cílem fungování imunitní soustavy je udržení podmínek stálého vnitřního prostředí, tj. homeostázy.¹ K udržení homeostázy imunitní systém využívá různé mechanismy, popsané jako základní projevy imunitního aparátu²:

obranyschopnost - organismus je schopen rozpoznat vnější patogeny a bránit se jejich účinku.

tolerance - organismus rozpoznává nepoškozené a funkční součásti jemu vlastní a je vůči nim intaktní.

imunitní dohled - organismus dokáže identifikovat a následně zlikvidovat vlastní poškozené, transformované či nefunkční součásti.²

1.1.1. Součásti imunitního aparátu

Výkonnou složkou imunitního systému jsou leukocyty. Tyto v dospělosti vznikají a dozrávají v kostní dřeni. Zralé buňky poté cestují do sekundárních lymfoidních orgánů, kde diferencují na specializované buněčné subpopulace, které jsou již schopné výkonné funkce a cirkulují v periferní krvi, nebo vcestovávají do tkání. Během vývoje pluripotentní kmenové buňky kostní dřene dochází k oddělení dvou základních buněčných populací. Přirozená imunita je závislá na leukocytech myeloidní řady, hlavně fagocytech a NK buňkách. Adaptivní imunitní reakce je založena na dlouhodobé paměťové schopnosti některých T- a B-lymfocytů a jejich vlastnosti specificky rozpoznat a likvidovat infekci.

1.1.1.1. Buňky myeloidní řady

Myeloidní progenitor dává vznik buňkám nespecifické přirozené imunity jako jsou polymorfonukleární leukocyty (PMN), monocyty a tkáňové buňky strukturně i funkčně jim podobné, jako jsou makrofágy, žírné buňky a nově popsané antigen prezentující dendritické buňky (APC a DC). Mechanizmy imunitní odpovědi této linie jsou převážně antigenně nespecifické a jejich základní funkcí je fagocytóza cizorodých látek či poškozených buněčných struktur, jejich intracelulární zpracování a následná prezentace jejich fragmentů na buněčném povrchu.

Granulocyty, vzhledem k obsahu granulí, které vznikají postupně během jejich dozrávání, tvoří asi 60 až 70% celkového počtu cirkulujících leukocytů a dělí se do tří skupin podle barvitelnosti granulí metodou podle Wrighta nebo Giemsy na neutrofilů, eozinofilů a bazofilů.³

Vývojová linie monocytů zahrnuje skupinu fagocytujících buněk, jejichž společným jmenovatelem je jednotný původ a shodná funkce.³ Patří k nim krevní monocyty a volné i tkáňové makrofágy. Z krevního řečiště do tkání pronikají mechanismem diapedézy (extravazace)² a dále se pohybují stejným způsobem jako PMN, i když pomaleji a s výraznou citlivostí na chemotaktické podněty. Velmi aktivně fagocytují a mohou pohlcovat poškozené buňky včetně exogenních bakterií, virů, imunokomplexů (komplex antigen-protilátka) i některých anorganických substrátů (uhlík, křemík, azbest, apod...). Charakteristickými povrchovými znaky jsou Fc-receptory a receptory pro C3b složku komplementu.³

1.1.1.2. Buňky lymfoidní řady

K tvorbě a zrání buněk lymfoidní řady dochází v kostní dřeni a v thymu. Lymfocyty spoluvytváří obranné mechanismy specifické imunity, které za normálních okolností udržují homeostázu organismu a v případě jejího ohrožení navíc zapojují příslušné buněčné subpopulace k výkonné obranné funkci. Vývoj a diferenciaci lymfocytů probíhá ve třech základních liniích, B buňky (z anglického Bone marrow), T buňky (Thymus) a přirození zabijedci NK (z anglického Natural Killer). Funkce lymfocytů je dále odvislá od antigen-prezentujících buněk (APC), mezi něž patří dnes velmi sledovaná populace dendritických buněk (DC), které vstupují do tkání a jako nezralé fagocyty se specializují na zpracování antigenů. Jako antigen-prezentující buňky následně dozrávají, migrují do sekundárních lymfoidních orgánů a umožňují tak aktivaci a diferenciaci zralých T- a B-lymfocytů a rozvinutí obranných procesů.²

Cytotoxicita, patří k nejzákladnějším obranným reakcím. Efektorové imunokompetentní buňky, zabijedce, nalézáme především v adaptivní imunitě, zprostředkované buňkami T a v přirozené imunitě, pro kterou jsou charakteristické buňky NK a další buněčné subpopulace, disponující buněčnými znaky obou subpopulací (NKT buňky). Mezi buněčné znaky patří glykoproteiny, které umožňují buňkám imunitní rozpoznávání a vzájemnou komunikaci, jak na úrovni mezibuněčného kontaktu, tak rozpoznávání rozpustných molekul přítomných v tělních tekutinách (cytokiny, chemotaktické látky, atd.).

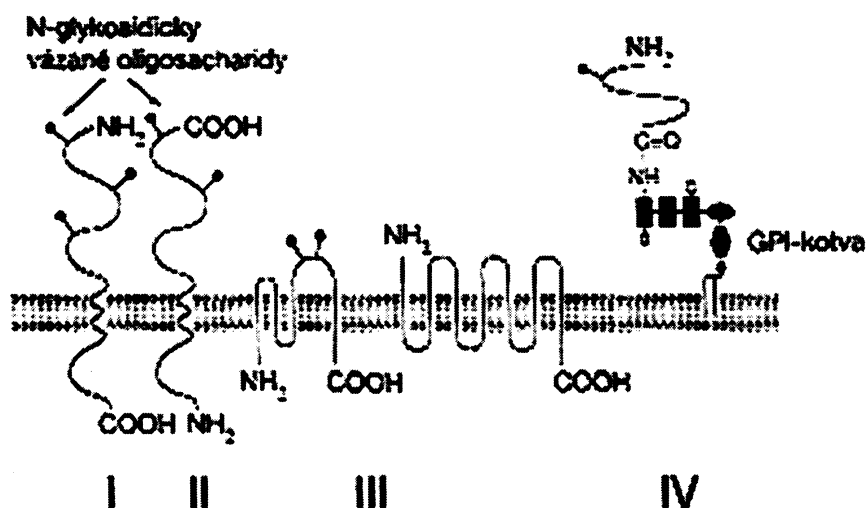
V protinádorové imunitě se vedle typických zabijců jako jsou T_c buňky ($CD3^+$, $CD8^+$) a NK buňky ($NKR-P1^+$, $CD3^-$), setkáváme i s populací T_h lymfocytů ($CD3^+$, $CD4^+$), které zajišťují nejen správnou funkci T_c lymfocytů, ale také vykazují přímou cytotoxickou aktivitu. Funkce buněk rozpoznávajících antigeny buněk cizích, infikovaných či transformovaných, je tedy závislá na buněčném imunitním rozpoznávání, přenosu informace přes cytoplazmatickou membránu za pomoci výkonných signalizačních mechanismů a adaptačních molekul.

1.1.2. Povrchové molekuly lymfocytů

Pro udržení homeostázy organismu je důležité, aby byly buňky imunitního aparátu v neustálém kontaktu se svým okolím. Toho je docíleno přenosem informací ve formě extracelulárních secernovaných molekul (hormonů, cytokinů, mitogenů, neurotransmiterů a dalších) a schopností přijímat a dále přenášet signál. Místem účinku extracelulárních signálních molekul jsou převážně membránové receptor-efektorové systémy, které přenášejí vnější signál do nitra buňky, tzv. transdukce signálu (transmembránový přenos).

Povrchových molekul je v dnešní době známo veliké množství (již je popsáno přes 200 různých povrchových molekul a je zřejmé, že jich ještě velké množství není objeveno). Proto bylo zavedeno tzv. CD-názvosloví (z anglického „Cluster of Differentiation“). „Clusters“ je označení pro skupiny monoklonálních protilátek, které s nimi reagují a vzájemně je od sebe diferencují (toto názvosloví tedy nevyovídá nic o funkci daných molekul, ale slouží pouze jako jakési „inventární číslo“). Název pak je tvořen písmeny CD, za kterými následuje pořadové číslo molekuly.

CD systém sám o sobě nijak neusnadňuje orientaci mezi povrchovými molekulami, proto se vedle něj používá i řada dalších způsobů řazení podle funkce, struktury, nebo umístění dané molekuly. Například transmembránové proteiny (glykoproteiny) řadíme podle způsobu zakotvení v membráně. Řadíme je na transmembránové proteiny I., II., III. a IV. třídy.



Obr. 1.² : Rozdělení TM (glyko)proteinů. I. třídy: C-konec intracelulárně, II. třídy: C - konec extracelulárně, III. třídy: řetězec prochází membránou opakovaně (nejčastěji 4x a 7x), IV. třídy: celý řetězec je umístěn extracelulárně a k membráně je přichycen glykolipidovou kotvou, nejčastěji přes GPI.²

Podle funkce můžeme dělit povrchové molekuly do následujících skupin:

Antigenně specifické receptory: Patří sem například NKR (receptory NK buněk), TCR a BCR (z anglického T/B-Cell Receptor) nacházející se u T/B lymfocytů a s nimi spřažené molekuly (CD79 α,β ; CD3, atd.), tzv. koreceptory.

Adhezivní molekuly: Zprostředkovávají kontakt mezi buňkami. Spadají sem podskupiny integrinů, selektinů, mucinů, atd.

MHC glykoproteiny: Povrchové glykoproteiny vážící na své extracelulární části peptidové fragmenty proteinů produkovaných buňkou (MHCgp I.třídy), respektive buňkou pohlcených (MHCgp II.třídy) a prezentující tyto fragmenty ostatním buňkám.

Komplementové receptory: Váží složky komplementu.

Povrchové enzymy: Membránové proteiny, jejichž intracelulární nebo extracelulární části vykazují enzymovou aktivitu (převážně receptorové kinázy nebo membránové fosfatázy skupiny CD45).

Fc-receptory: váží Fc-části imunoglobulinů.

Transportní proteiny: Spadají sem membránové pumpy a kanály zprostředkovávající transport molekul přes membránu

1.1.2.1. Povrchové proteiny lektinového typu

Jednou z rodin (rodina zahrnuje látky podobné aminokyselinové sekvence a tudíž i prostorové struktury) povrchových a rozpustných proteinů jsou i lektiny. Tyto látky specificky rozpoznávají a reverzibilně vážou určité sacharidové struktury. Tato vazba je vedena přes specifickou sacharid vážící doménu (CRD, z anglického „Carbohydrate-Recognition Domain“). Ačkoli každá z těchto CRD váže svůj specifický ligand, je

celková vazebná schopnost lektinu do značné míry určena tím, s jakými dalšími doménami se CRD kombinují. Navíc je velmi časté, že dochází ke shlukování více CRD v rámci molekuly lektinu, což ovlivňuje i afinitu vazby k sacharidům.

Název lektin pochází z latinského slova „legere = zvolit si“ a byl navržen v roce 1954 americkým imunologem Boydem. Lektiny jsou v současné době děleny do šesti základních skupin:

Lektiny C-typu: vazba ligandů závisí na přítomnosti Ca^{2+} iontů.

Lektiny I-typu: CRD imunoglobulinového typu.

Galektiny: dříve lektiny S-typu, váží β -galaktosidy.

Pentraxiny: podjednotky tvoří pentamery.

Lektiny P-typu: váží glykoproteiny obsahující manoso-6-fosfát.

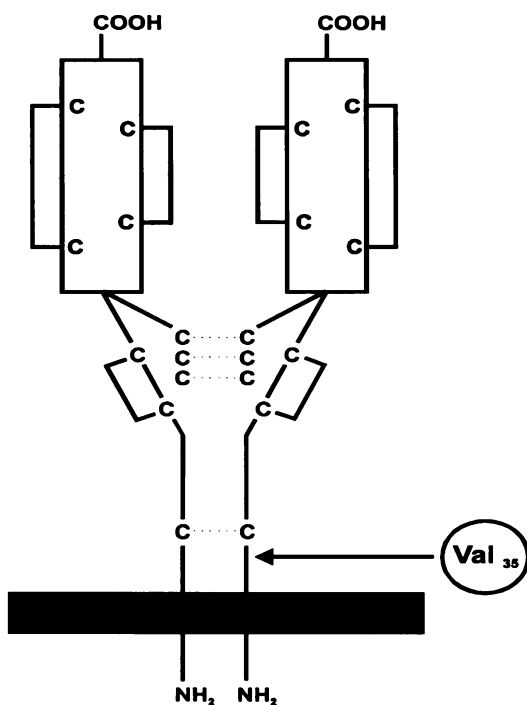
Lektiny L-typu: CRD homologní s rostlinnými lektiny leguminóz.

Toto dělení ovšem není absolutní, neboť jsou stále objevovány další látky spadající do lektinové superrodiny, z nichž některé se nedají zařadit do žádné z uvedených šesti skupin. Významnou úlohu v imunologických studiích mají i některé rostlinné lektiny, jako například konkanavalin A (ze semen bobovité rostliny *Canavalia ensiformis*) nebo fytohemaglutinin (ze semen fazole – *Phaseolus vulgaris*), které působí na lymfocyty jako silné mitogeny.²

Jednou z nejvýznamnějších rodin živočišných lektinů jsou lektiny typu C. Základní charakteristickou vlastností těchto molekul je, že jejich vazebná aktivita je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Odtud pochází i jejich jméno (z anglického Ca^{2+} -dependent lectins). Tyto lektiny se nacházejí v krevním séru, extracelulární matrix a na membránách, kde plní mnoho fyziologických funkcí. Hlavními zástupci této skupiny jsou molekuly NKR-P1, CD69, Ly49 a NKG2/CD94, exprimované především na NK buňkách.

1.2. Protein NKR-P1

Molekula NKR-P1 (též označovaná jako CD161) je povrchový leukocytární glykoprotein II. třídy (jeho C-konec je orientován extracelulárně), vyskytující se na NK buňkách, monocitech, T buněčných subpopulacích a thymocitech.² Patří do rodiny lektinů typu C, neboť ve svém řetězci obsahuje CRD domény s vazebnou schopností závislou na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Ačkoli fyziologický ligand pro tento receptor není dosud znám, byla zjištěna vysokoafinitní vazba na N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc)⁴.



Na buněčném povrchu je molekula NKR-P1 prezentována jako disulfidicky vázaný homodimer s podjednotkami o velikosti 30kDa.⁵ Má adhezní, signalizační a aktivační funkci na povrchu NK buněk, které po aktivaci spouštějí cytotoxické mechanismy a uvolňují IFN- γ . U potkanů bylo identifikováno šest homologních genů pro NKR-P1 s označením NKR-P1 (A, B, C, D, E a F).^{6,7,8,9,10}

Obr. 2.: Schematické znázornění povrchového receptoru NKR-P1 s vyznačením disulfidických vazeb (plná čára - vyznačení disulfidické vazby v rámci podjednotky, tečkovaná čára - vyznačení disulfidické vazby mezi podjednotkami).

NKR-P1 receptor je označován jako NK buněčný aktivační antigen. Při kontaktu s cílovou buňkou dochází k přenosu signálů jak aktivačních (NKR-P1, CD69, atd.), tak inhibičních (MHCgp-receptor). V NK buňce poté dojde k vyhodnocení těchto signálů a v závislosti na povaze výsledného signálu dochází buďto k aktivaci cytotoxických a degranulačních mechanismů, či opuštění cílové buňky (v některých případech může dojít i k inaktivaci, trvalé anergizaci, či apoptotické smrti NK buňky).

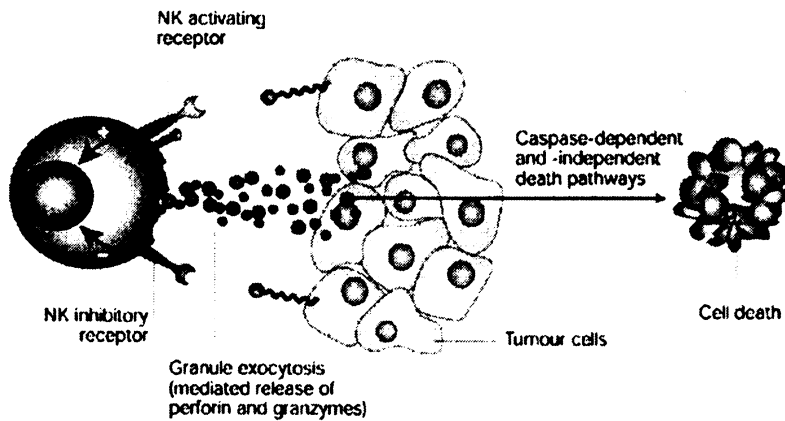
1.3. Úloha NK buněk v protinádorové imunitě

NK buňky tvoří první linii obrany proti vnějším patogenům, stresovaným, nádorovým nebo jinak pozměněným buňkám. Jsou to lymfocyty přirozené imunity, které se podílejí na homeostáze organismu a plní různé biologické funkce, včetně rozpoznání a následného zničení buněk infikovaných a transformovaných.¹¹ Neaktivované NK buňky cirkulují v periferní krvi, ale po aktivaci cytokiny jsou schopné extravazace a infiltrace do většiny tkání, které obsahují patogeny infikované či maligní buňky.^{12,13,14,15} Dále jsou schopné produkovat některé cytokiny, např. IFN- γ po interakci povrchových receptorů s ligandy.

NK buňky jsou schopné zničit cílovou buňku několika různými mechanismy:

Exocytóza granulí: je mechanismus při němž NK buňka po obdržení pozitivního signálu z povrchových receptorů uvolňuje cytoplasmatické granule, obsahující perforin a

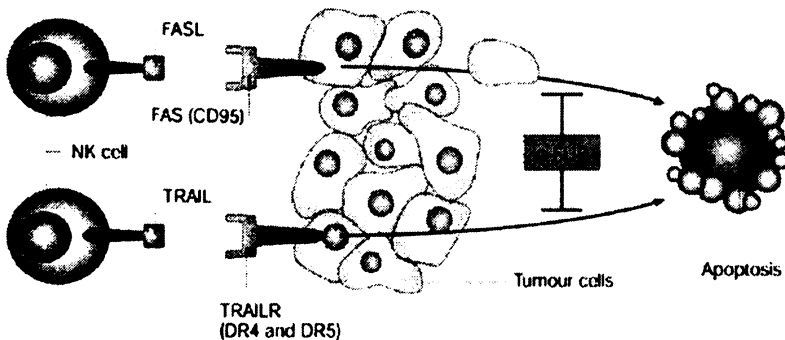
granzymy (serinové proteázy), směrem k cílové buňce. Perforin vytvoří póry v membráně



cílové buňky a umožní tak granzymům proniknout do cytoplasmy cílové buňky:

Obr. 3.¹⁶: Schematické znázornění exocytózy granulí NK buňkou, po aktivaci signálem z aktivačního povrchového receptoru.

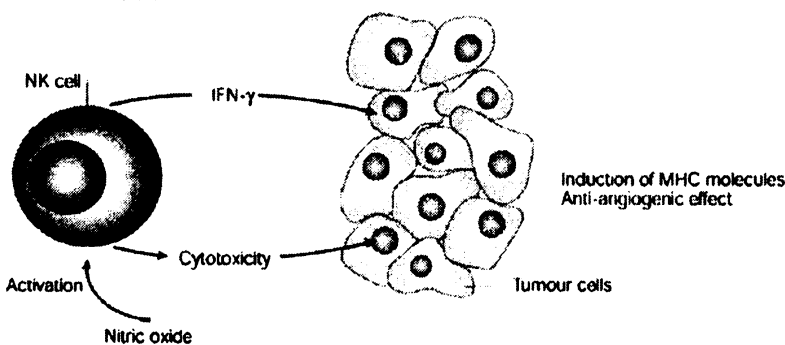
Receptorová cesta: je mechanismus při kterém NK buňka využívá kontaktu různých receptorů, které exprimuje na svém povrchu. Jedná se především o ligandy tzv. TNF-rodiny (z angl. Tumor Necrosis Factor): CD95 ligand (FAS ligand), TNF a s TNF příbuzný apoptózu indukující ligand TRAIL (z angl. TNF-Related Apoptosis Inducing



Ligand), které dokáží při správné funkci indukovat apoptózu cílové nádorové buňky:

Obr. 4.¹⁶: Schematické znázornění receptory vyvolané apoptózy NK buňkou.

Cytokinová cesta: je mechanismus, při němž aktivovaná NK buňka uvolňuje IFN- γ , který má nejen vliv na potlačení virů a jiných patogenů¹⁷, ale současné výzkumy ukazují, že se také účastní efektorových mechanismů proti nádorovým metastázám a proti



chemicky indukovaným sarkomům¹⁸:

Obr. 5.¹⁶: Schematické znázornění efektu IFN- γ na cílovou buňku uvolňovaného aktivovanou NK buňkou.

1.4. Nádorová onemocnění

Vlastní nádory je možné rozdělit podle zhoubnosti na benigní a maligní. Benigní (nezhoubné) nádory jsou izolované od okolní tkáně a nejsou proto schopné rozšiřovat se do okolních tkání či neomezeně růst. Maligní nádory jsou naopak charakteristické svým nekontrolovatelným růstem, průnikem do okolních tkání a rozsevem do vzdálených orgánů (tzv. tvorba metastáz). Takto se malé shluky nádorových buněk dostávají krevním, či lymfatickým řečištěm do jiných částí organismu, kde dávají vznik sekundárním nádorovým ložiskům.¹⁹

Maligní nádory klasifikujeme podle tkání, ze kterých vznikají. Karcinomy mají endodermální či ektodermální původ, sarkomy mezodermální, a lymfomy a leukemie vznikají z hematopoietických buněk kostní dřeně.²⁰

Nádorové bujení je důsledkem narušení regulačních procesů, které určují, zda buňka zůstane v klidovém stavu, nebo zda proběhne proliferace, diferenciací, popřípadě apoptotická smrt²¹ (programovaná buněčná smrt). Toto narušení je obvykle vyvolané mutacemi v tzv. onkogenech nebo antionkogenech, které za normálních podmínek kódují signalizační molekuly, transkripční faktory, nebo molekuly regulující adhezivitu buněk či apoptózu.²

1.4.1. Únik nádorů imunitnímu dohledu

Vznik nádorového bujení je výsledkem úniku nádorových buněk před imunitním dohledem. Existuje několik mechanismů, které to umožňují.

Některé protilátky vytvořené proti nádorovým antigenům mohou mít paradoxně stimulační efekt na růst nádoru, ať už při pasivní či aktivní imunizaci pokusného zvířete. Svou vazbou na specifické nádorové antigeny mohou tyto protilátky také nádorovou buňku "maskovat" před rozpoznáním imunokompetentní buňkou. Protilátka může také tvořit imunokomplex s příslušným nádorovým antigenem a blokovat tak aktivitu NK buněk či makrofágů vazbou na jejich Fc receptory.

Dalším mechanismem obrany nádorové buňky vůči imunitnímu aparátu je její "neviditelnost" pro imunokompetentní buňky. Toto je zapříčiněno vznikem mutantních forem postrádajících specifický nádorový antigen, vlivem značné variability, které nádorové buňky podléhají. Snížením, popř. úplnou ztrátou exprese MHCgp I. třídy se mnohé nádory brání rozpoznání cytotoxickými T lymfocyty (CTL).

Zvýšená glykolizace a tzv. „aberrantní glykosylace“ povrchu nádorových buněk může vést k zamaskování některých epitopů specifických nádorových antigenů, rozpoznávaných imunokompetentními buňkami.

Některé nádory jsou schopné produkce faktorů, které blokují vlastní imunitní odpověď organismu - rozpustné formy nádorových antigenů, adenozinů či cytokinů s inhibičním účinkem (např. TGF- β , IL-10).²⁰

1.5. Buněčná signalizace

Pro udržení homeostázy organismu je důležité, aby byly buňky imunitního aparátu v neustálém kontaktu se svým okolím. Toho je docíleno mezibuněčným přenosem informací ve formě secernovaných molekul (hormonů, cytokinů, mitogenů, neurotransmiterů a dalších) a schopností přijímat a dále šířit tento signál. Místem účinku extracelulárních signálních molekul jsou převážně membránové, receptor-efektorové systémy, ale také byly popsány mechanismy průniku lipofilních látek přes membránu do nitra buňky, kde se váží přímo na cytoplazmatické receptory. Zde následně probíhá přeměna vnějšího signálu na intracelulární, tzv. transdukce signálu. Vazba antigenu vede ke změnám prostorového uspořádání povrchového receptor-efektorového systému (tyto změny jsou často dány agregací většího počtu receptorů nebo několika domén jednoho receptoru). V buňce dochází vlivem těchto změn k vytvoření signální molekuly nebo k akumulaci některých iontů, které jsou zodpovědné za spuštění signální kaskády a následné buněčné odpovědi na zevní podnět. Přenos signálu uvnitř buňky zajišťují tzv. druzí poslové (second messengers - prvním poslem je endogenní ligand), mezi které patří cAMP, cGMP, metabolity fosfatidylinositolu (zejména diacylglycerol a inositoltrisfosfát, dále jen DAG a IP₃) a kyseliny arachidonové. Druzí poslové pak spouští další signalizační dráhy uvnitř buňky, nejčastěji ve formě fosforylačních kaskád, které vedou k finální specifické genové expresi jaderné DNA. Tím je také zajištěna specifická odpověď buňky.

V současné době jsou popsány tři základní mechanismy zprostředkující přenos signálu. Dva z nich popisují transdukci zprostředkovanou receptorem, který je přímo napojen na efektorový systém. Jedná se o receptory aktivující kanály pro přenos anorganických iontů (Ca²⁺, Na⁺, K⁺ a Cl⁻) a receptory spřažené s proteinkinázami (receptory hematopoetinové, např. IL-2R β a γ , IL-3 α a β , IL-4, IL-5 α , IL-6, IL-7, IL-9, IL-12R- a interferonové).²² Příkladem iontového kanálu je nikotinový cholinergní

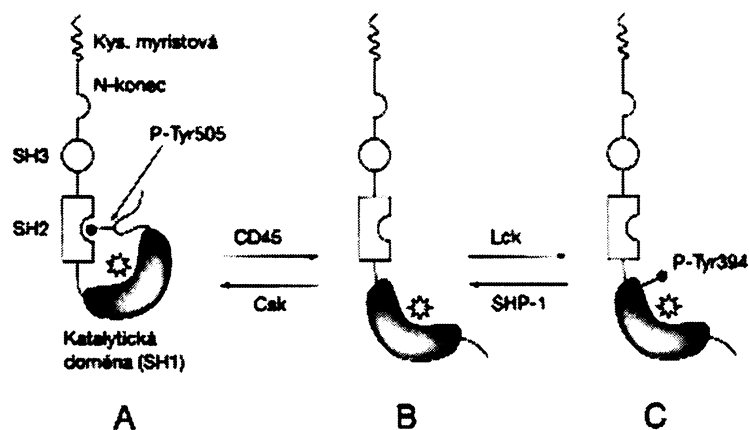
receptor, který vytváří Na^+ a K^+ kanál. Za přenos signálu je zodpovědná změna iontového složení v nitru buňky a membránového potenciálu.

1.5.1. Signalizace zprostředkovaná proteinkinázami

Kinázy asociované přímo s receptorem jsou ve většině případů tyrozinové proteinkinázy (PTKs). V cílových proteinech fosforylují tyrozinové zbytky. Některé receptory samy vykazují kinázovou aktivitu, většinou se však jedná o přidružené molekuly postrádající transmembránové a extracelulární domény charakteristické pro receptory. Všechny tyrozinové proteinkinázy mají sekvenčně homologický úsek o délce zhruba 300 AMK, který podmiňuje vlastní katalytickou aktivitu a označuje se jako kinázová doména. Nereceptorové tyrozinové kinázy situované v buněčné membráně se dělí do tří rodin:

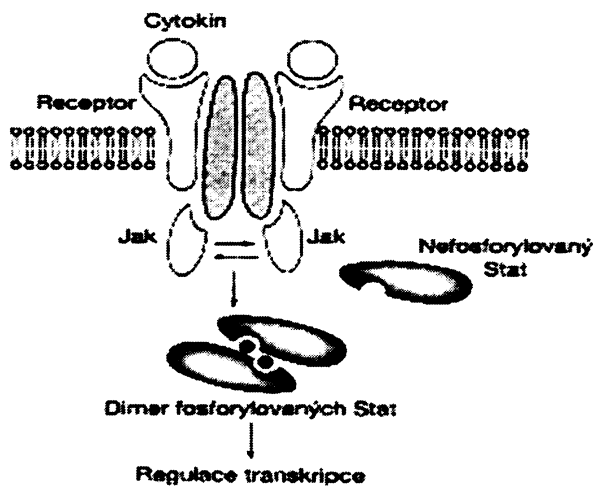
Proteinkinázy rodiny Src: Patří sem kinázy Csk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes a Yrk. Do plazmatické membrány jsou zakotveny myristylací. Katalytickou schopnost této rodiny zprostředkovávají domény SH2, SH3 a kinázovou doménu SH1. SH2 a SH3 slouží k zachycení specifické AMK sekvence a doména SH1 vykazuje samostatnou fosforylační

aktivitu. Src proteinkinázy jsou schopny asociace s receptory a mají vlastní kinázovou aktivitu.



Obr. 6.:² Struktura a regulace aktivity PTKs (zde Lck). Dosažení plné aktivace (stav C) dochází vlastní autofosforylací pozitivně regulačního tyrozinu poblíž aktivního centra enzymu.²

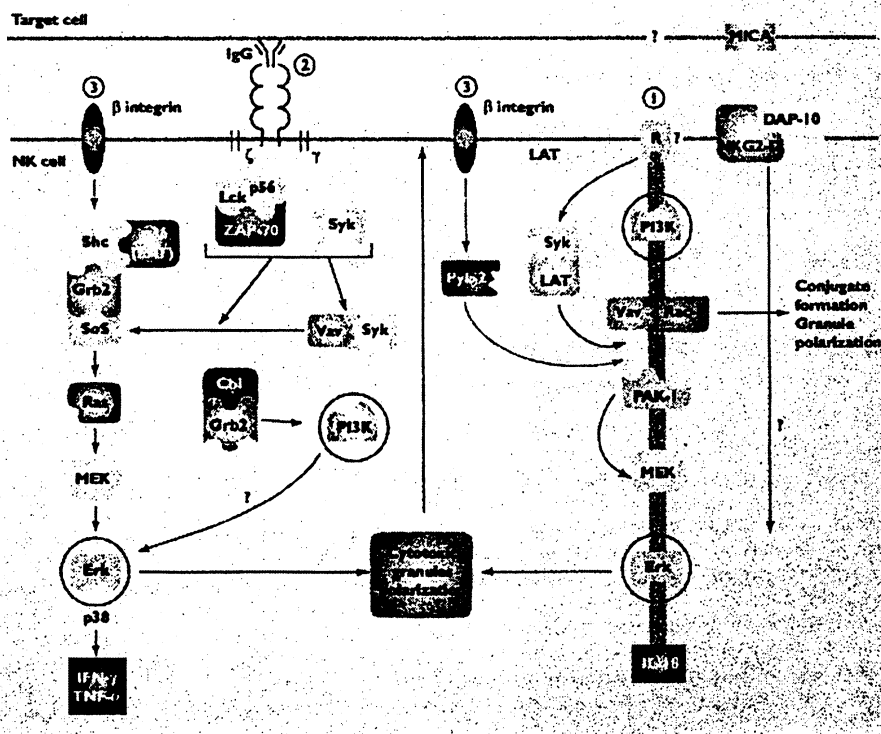
Proteinkinázy Janusovy rodiny: Jsou nazývány i jako kinázy rodiny Jak. Typickými zástupci jsou Jak1, Jak2, Jak3 a Tyk2. Na rozdíl od Src-kináz neobsahují SH2 a SH3 domény, ale pouze doménu tyrozinokinázovou. Jsou přímo aktivovány receptory pro interferon. Tyto receptory pak fosforylují, což umožňuje následné navázání dalších signalizačních faktorů přímo na receptor.



Obr. 7.:² Schéma signalizace cytokinovými receptory (agregace indukovaná cytokinem, fosforylační aktivace asociovaných kináz skupiny Jak, fosforylace transkripčních faktorů skupiny Stat).²

Proteinkinázy rodiny Syk: Patří sem proteinkinázy Syk a ZAP-70. Jako jediné z uvedených tří rodin nejsou myristylovány. Ve své struktuře obsahují dvě SH2 domény.

Signální dráhy vedoucí k cytotoxické výkonné funkci efektorových buněk a v nich zapojené příslušné proteinkinázy znázorňuje následující obrázek:



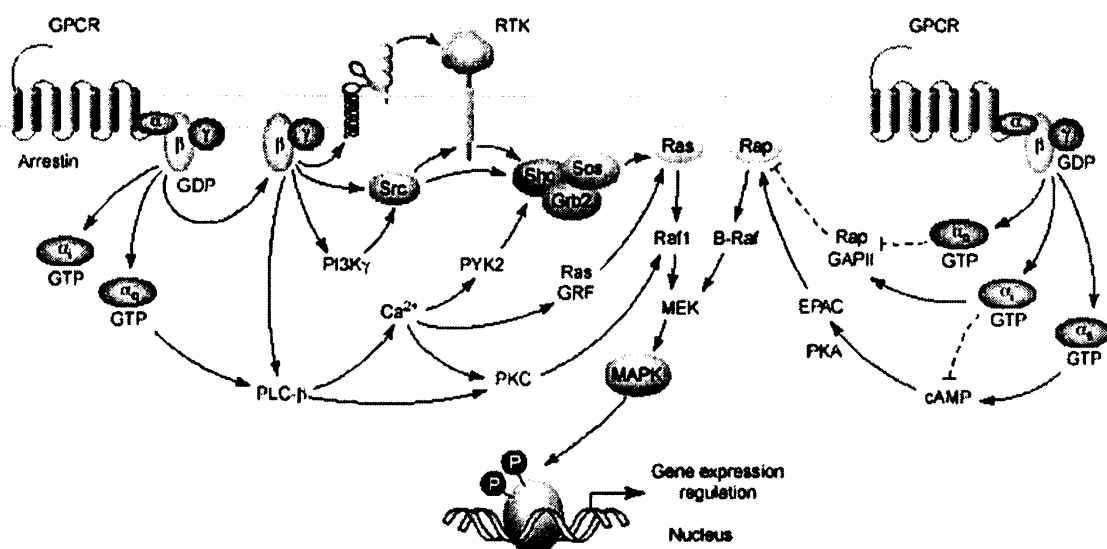
Obr. 8.:²³ Srovnání ADCC (vlevo) a přirozené buněčné cytotoxicity (vpravo) a jejich příslušných signálních drah, vedoucích k polarizaci a následnému uvolnění cytotoxických granulí.

1.5.2. Signalizace zprostředkovaná trimerními G-proteiny

Některé receptory využívají k transdukcí signálu GTP-vázající proteinové struktury nazývané G-proteiny. Jedná se o proteiny, které se vyznačují GTPázovou aktivitou v inaktivním stavu váží GDP a aktivují se jeho výměnou za GTP. G-proteiny jsou

lokalizovány v plazmatické membráně a vazba GTP (tedy jejich aktivace) je umožněna konformačními změnami v intracelulárním řetězci přidruženého receptoru po agregaci s antigenem. Strukturně se profilují ve dvou typech s odlišnou funkcí i mechanismem působení na monomerní a trimerní G-proteiny. Molekula monomerního G-proteinu sestává pouze z jednoho polypeptidu. Nejvýznamnějšími zástupci této třídy jsou Ras-proteiny, například p21^{Ras}, významný inhibitor cyklin-dependentních proteinkináz (jedním z biologických projevů této inhibice je zbrždění vstupu buňky do G1-fáze buněčného cyklu).²⁴ Membránový signální komplex se skládá z receptoru, G-proteinu a efektoru. Regulační G-proteiny zastávají funkci přenašeče - signál přenášejí na efektorové systémy včetně enzymů katalyzujících tvorbu druhých posílů jako adenylátcykláza, kinázy, fosfolipázy a iontové kanály.^{25,26}

Strukturně se jedná o heterotrimery složené z podjednotek α , β a γ . Guanosinnukleotid je vázán na podjednotku α , která je také zodpovědná za přenos signálu, i když mírná transdukční aktivita byla zjištěna i u dimeru $\beta\gamma$. Nekovalentně vázaný dimer $\beta\gamma$ slouží převážně jako strukturální jednotka vážící v inaktivním stavu G-protein na buněčnou membránu a zprostředkující kontakt s receptorem. Receptory spřažené s G-proteiny exprimované na povrchu buněk jsou nejčastěji glykoproteiny III. třídy, tedy molekuly s extracelulárním N-koncem a intracelulárním C-koncem, procházející několikrát (obvykle sedmkrát) plazmatickou membránou.²⁷



Obr. 9.: Znárodnění signálních drah, vedoucích od receptorů spřažených s trimerními G-proteiny až k vlastní regulaci exprese genů.

Vazebné místo pro ligand je tvořeno N-koncem a může se na něm podílet i

transmembránový segment, respektive může být tvořeno pouze transmembránovým segmentem. Malé ligandy se váží na transmembránové helixy (TMH), peptidy využívají k vazbě na receptor extracelulární smyčky i TMH a vazebné místo pro polypeptidy spoluvytváří N-konec, extracelulární smyčky i TMH.²⁸ V současné době byly trimerní G-proteinové struktury rozpoznány i v signálních komplexech receptorů lektinového typu.²⁸

Trimerní G-protein je aktivován konformační změnou intracelulární části receptoru po vazbě antigenu. Toto nové prostorové uspořádání umožní výměnu guanosinnukleotidu na α -podjednotce. Vazba GTP vyvolá sterické pnutí v molekule, které vede k disociaci proteinu na α -protomer a dimer $\beta\gamma$. Tím je zahájen přenos signálu. α -protomer následně putuje po vnitřní straně plazmatické membrány, dokud není rozpoznán efektozem. Efektory jsou převážně enzymy s vysokou substrátovou specifitou. Vazba příslušného typu podjednotek α vyvolá jeho aktivaci a dochází tak k předání signálu, nejčastěji ve formě druhých posílů. Vlivem GTPázové aktivity α -protomeru za několik sekund zhydrolyzuje GTP na GDP a uvolní se tak místo pro vazbu na protomery β a γ . Tato vazba probíhá samovolně a výsledkem je opět trimerní G-protein v inaktivním stavu. Regulace G-proteinů probíhá právě v tomto guanosinnukleotidovém cyklu.^{17,18} Stav, kdy je snížena schopnost G-proteinu odpovídat na vazbu agonisty na receptor, nazýváme desenzitizací²⁹. Desenzitizace může být způsobena fosforylací komplexu receptor-agonista specifickou receptorovou kinázou. Fosforylace zabraňuje asociaci receptoru se signalizačními proteiny nebo umožňuje vazbu proteinu, který působí jako blokátor.³⁰ Kinázy receptorů asociovaných s G-proteiny mohou být regulovány i hladinou β - γ dimeru. Receptory mohou nespecificky fosforylovat také kinázy závislé na druhých posledech, PKA a PKC.³¹ Důležitou roli hrají také RGS proteiny (regulátory G-proteinové signalizace), které urychlují hydrolyzu GTP α -podjednotkou a tím tvoří součást procesu desenzitizace.³²

Všechny tři typy podjednotek trimerních G-proteinů se vyskytují v několika odlišných formách. Dnes je identifikováno již 27 podjednotek α , 5 β a 14 γ jejichž kombinacemi je zajištěna G-proteinová různorodost.³³ Podle podobnosti a aminokyselinové sekvence byly navrženy čtyři základní rodiny G-proteinů: $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ a $G\alpha_{12}$. Vzhledem k tomu, že nejvýznamnější složku těchto proteinů tvoří podjednotky $G\alpha$ (funkčních projevů přenášeného signálu závisí právě na konkrétním typu $G\alpha$ -podjednotky), jsou G-proteiny označovány podle nich. $G\alpha_s$ stimuluje adenylátcyklázu a vyvolávají akumulaci druhého posla cAMP, $G\alpha_q$ aktivují fosfolipázu $C\beta$, což vede k hydrolyze

fostatidylinositolbisfosfátu a vzniku druhých posílů DAG a IP₃, Gα_i inhibují adenylátcyklázu, působí tak proti Gα_s a Gα₁₂ podporují výměnu iontů a změny v cytoskeletu. V NK buňkách, které jsou předmětem zájmu našeho výzkumu jsou produkovány převážně tyto typy podjednotek Gα: Gα_s, Gα_q, Gα_i, Gα₀ (jejichž aktivita souvisí s funkcí iontových kanálů pro Ca²⁺, Cl⁻, K⁺) a Gα_z, které byly objeveny později než ostatní podjednotky. Funkčními projevy Gα_z-proteinů je inhibice produkce cAMP, buněčné proliferace a indukce cytotoxické aktivity přirozených zabijců. Členové jednotlivých rodin se navzájem odlišují také podle citlivosti k různým bakteriálním toxinům (což také hrálo velkou roli při jejich studiu, kde byly využívány jako specifické inhibitory). Proteiny rodin Gα_q, Gα₁₂ a typu Gα_z nejsou citlivé na žádné bakteriální toxiny, oproti tomu Gα_s jsou citlivé na cholera toxin a Gα_i, Gα₀ na pertusis toxin.³⁴ Bližší podrobnosti k jednotlivým rodinám a jejich zástupcům jsou uvedeny v tabulce č.1.:

| Skupina podjednotek | Mr (kDa) | % AMK shodnosti | Tkáňová distribuce | Efektor - funkce |
|-----------------------|----------|-----------------|--|---|
| Gα_s | | | | |
| α _{s(S)} | 44,2 | 100 | řada tkání | stimulace adenylátcyklázy |
| α _{s(L)} | 45,7 | | řada tkání | stimulace Ca ²⁺ kanálů inhibice Na ⁺ kanálů |
| α _{olf} | 44,7 | 88 | olfaktorní neuroepitel | stimulace adenylátcyklázy, regulace Ca ²⁺ , K ⁺ a Na ⁺ kanálů |
| Gα_i | | | | |
| α _{i1} | 40,3 | 100 | téměř všude | inhibice adenylátcyklázy |
| α _{i2} | 40,5 | 88 | řada tkání | stimulace K ⁺ kanálů |
| α _{i3} | 40,5 | 94 | téměř všude | stimulace fosfolipázy A ₂ |
| α _{oA} | 40,0 | 73 | mozek | inhibice Ca ²⁺ kanálů |
| α _{oB} | 40,1 | 73 | mozek | inhibice adenylátcyklázy |
| α _{t1} | 40,0 | 68 | tyčinky v sítnici | stimulace cGMP |
| α _{t2} | 40,1 | 68 | čípky v sítnici | regulace fosfodiesterázy |
| α _g | 40,5 | 67 | chuťové pohárky | |
| α _z | 40,9 | 60 | mozek, nadledvinky, krevní destičky | inhibice adenylátcyklázy |
| Gα_q | | | | |
| α _q | 42 | 100 | téměř všude | |
| α ₁₁ | 42 | 88 | téměř všude | |
| α ₁₄ | 41,5 | 79 | plíce, ledviny, játra | stimulace fosfolipázy |

| | | | | |
|----------------------------------|------|-----|--------------------------------------|--|
| α_{15} | 43 | 57 | B-lymfocyty, buňky myeloidní řady | |
| α_{16} | 43,5 | 58 | T-lymfocyty, buňky myeloidní řady | |
| Gα_{12} | | | | |
| α_{12} | 44 | 100 | řada tkání | |
| α_{13} | 44 | 67 | řada tkání | |

Tab.1.:³⁵ Klasifikace α -podjednotek G-proteinů, jejich výskyt a funkce.

Signalizace zprostředkovaná trimerními G-proteiny se uplatňuje i u některých aktivačních lektinových receptorů lymfocytů (například proteiny G α_o tvoří součást signálních drah receptoru NKR-P1).

1.5.3. Úloha G-proteinů v signalizačních mechanismech buněčné cytotoxicity

Buněčnou cytotoxicitu můžeme v zásadě rozdělit na dva druhy, podle událostí které jí předcházejí.

Protilátkově zprostředkovaná buněčná cytotoxicita (ADCC - Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity) vyžaduje předchozí aktivaci efektorové buňky a přítomnost specifických protilátek, které po navázání na antigenní struktury cílové buňky reagují s nízkoafinitivními Fc γ RIIIA receptory NK buňky.³⁶ Fc γ RIIIA je multimerní receptorový komplex obsahující intracelulární ITAM motivy (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs), které jsou zodpovědné za intracelulární hromadění druhých poslů po vazbě na Fc doménu imunoglobulinu a následné vyvolání cytotoxicity.³⁶

Přirozená cytotoxicita je schopnost NK buňky vyvolat protinádorovou či antivirovou odpověď bez předchozí senzitivace a bez přítomnosti protilátky.³⁶ Oproti ADCC, při přirozené cytotoxicitě nebyl identifikován samostatný receptor, který by za ni byl zodpovědný. Jedná se zřejmě o výsledek signalizace několika různých receptorů a kostimulačních molekul. Například molekula NKR-P1, NKT-R, a jiné jsou zapojeny do rozvoje určitých forem NK buněčně zprostředkované cytotoxicity.^{5,37, 38} Dosud provedené studie demonstrují, že aktivace PTK, PLC-katalyzované uvolnění DAG, IP₃ a zvýšení koncentrace Ca²⁺ iontů, patří k časným událostem během většiny forem přirozené cytotoxicity.³⁹

Zatímco G-proteinová podjednotka G α_q stimuluje aktivitu PLC a G α_s stimuluje aktivitu adenylátcyklázy (tvorba cAMP - ovlivnění cAMP-dependentních kináz), čímž

obě pozitivně ovlivňují vývoj cytotoxického účinku, subjednotka G α i tuto stimulaci potlačuje.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Materiál

2.1.1. Použité chemikálie

- Glykodendrimery:
 - PAMAM-GlcNAc₈
- Monoklonální Protilátky:
 - Mouse anti-Rat CD3-FITC - *Pharmingen, USA*
 - Mouse anti-Rat CD4-PE-Cy5 - *Pharmingen, USA*
 - Mouse anti-Rat CD8a-PE - *Pharmingen, USA*
 - Mouse anti-Rat CD8b-FITC - *Pharmingen, USA*
 - Mouse anti-Rat NKR-P1A-biotin - *Pharmingen, USA*
 - Anti-biotin Streptavidin-PE-Cy7 - *Pharmingen, USA*
- Polyklonální protilátky:
 - Rabbit anti-Gα_{Q11} - *Doc. H. Kovářů, Brno*
 - Rabbit anti-Gα_S - *Doc. H. Kovářů, Brno*
 - Rabbit anti-Gα_{11,2} - *Doc. H. Kovářů, Brno*
 - Rabbit anti-Gα₀ - *Doc. H. Kovářů, Brno*
 - HRP-F(ab')₂-Goat-Anti Rabbit IgG (H+L) - *ZYMED, USA*
- Ostatní chemikálie:
 - Amphotericin B (Fungizone) - *Squitt, CH*
 - APS - *Sigma, USA*
 - Azid sodný - *Sigma chemical Co., USA*
 - BSA - *Sigma chemical Co., USA*
 - DTT - *Fluka, SRN*
 - ECL systém - *Amersham, USA*
 - EDTA - *Jersey Lab Supply, USA*
 - Ethanol (EtOH) - *Lachema, CZ*
 - Ethidiumbromid - *Sigma, USA*
 - Fenol - *Sigma, USA*
 - Fetální telecí sérum - *BioClot Ltd., SRN*
 - Ficoll 400 - *Sigma chemical Co., USA*

- Gentamycin - *Lek Pharmaceutical and Chemical Comp., SR*
- Glukosa (25%) - *ÚMG, Praha ČR*
- Glycerol - *Sigma, USA*
- H₂O₂ - *Sigma, USA*
- Heparin - *Léčiva, ČR*
- Chloroform - *Merck, SRN*
- KH₂PO₄ - *ÚMG, Praha ČR*
- Kultivační médium RPMI 1640 - *ÚMG, Praha ČR*
- L-glutamin - *ÚMG, Praha ČR*
- Médium H-MEMd - *ÚMG, Praha ČR*
- NaCl - *ÚMG, Praha ČR*
- NaHCO₃ - *ÚMG, Praha ČR*
- Na₂HPO₄ - *ÚMG, Praha ČR*
- Na-pyruvát - *ÚMG, Praha ČR*
- PI (propidium jodid) - *Molecular Probes, USA*
- PMSF - *Fluka, SRN*
- Telebrix N380 - *Léčiva, ČR*
- Trizma base (TRIS) - *Merck, SRN*
- Türkův roztok - *Sigma Chemical Co., USA*
- Tween 20 - *Lachema, ČR*
- želatina - *Sigma Chemical Co., USA*
- β-merkaptioethanol - *Sigma, USA*

(Použité chemikálie byly čistoty *p.a.*, popřípadě nejvyšší komerčně dostupné čistoty)

2.1.2. Roztoky a média

- *Blokovací pufr ELISA*: 1% BSA v PBS
- *Cholátový pufr*: 20mM TRIS, 25mM NaCl, 2mM DTT, 1mM EDTA, 0.5mM bezamidine HCl, 0.5mM PMSF, 10mg/ml cholátu sodného, pH=8.0
- *Dělicí médium Ficoll-Telebrix (F-T)*: 8% Ficoll + 6,8% Telebrix v poměru 24:10
- *ELISA pufr B*: 200mM TRIS, 250mM NaCl, 100mM EDTA, pH=8.0
- *FACS - roztok*: PBS + 0,1% Na-azid + 0,2% želatina
- *Hypotonický roztok*: 50mM TRIS, 2mM DTT, 1mM EDTA, 0.5mM bezamidine HCl, 0.5mM PMSF, pH=7.4

- *H-MEMd médium*: H-MEMd 10x ředěné TK H₂O + 50mg/l gentamycin, pH upraveno na 7,2 pomocí 7,5% NaHCO₃
- *Kultivační médium RPMI 1640 s 10% FTS*: RPMI 1640 5x ředěné tkH₂O + 2mmol L-glutamin + 0,011% Na-pyruvát + 20μmol β-merkapt ethanol + 20mg/l thiamutin + 25mg/l Amphotericinu B + 50mg/l gentamycin + 10% FTS, pH upraveno na 7,0-7,3 pomocí 7,5% NaHCO₃
- *PBS*: 140,0mM NaCl + 2,7mM KCl + 10,0mM Na₂HPO₄ + 1,8mM KH₂PO₄, pH=7,2
- *PBS-T*: 1 0mM N a₂HPO₄, 1 50mM N aCl, 2 mM KCl, 2 mM K H₂PO₄, 1 % Tween 2 0, pH=7.4
- *TK H₂O*: tkáňová voda. Deionizace vysokoafinitními filtry (R=18MΩ).
- *Türkův roztok*: 3 x naředěn v TK vodě
- *Uhličitanový pufr*: 0.1M NaHCO₃, pH upraveno 0.1M Na₂CO₃ na hodnotu 9.6

2.1.3. Spotřební materiál a použité přístroje

| | |
|---|------------------------------|
| Automatické pipety (1-10, 2-20, 20-200, 200-1000μl) | Gilson, USA |
| Centrifuga MPW-365 | Mechanika Precyzyjna, Polsko |
| Centrifuga OTD Combi | Sorvall, |
| Centrifuga Shelton Scientific USMC13 | Mars Biomedical Product, USA |
| Chladnička | Skandiluxe, Dánsko |
| DC Power Supply SP100-400V/0,2A | S Power s.r.o., Slovensko |
| Electrophoresis Power Supply EPS 500/400 – zdroj napětí | Pharmacia, USA |
| ELISA reader | Tecan Spectra, USA |
| FACS Sort, FACS Vantage SE | Becton Dickinson, USA |
| LAS reader | Fuji, Japonsko |
| Magnetická míchačka | Lab. přístroje Praha, ČR |
| Mrazcí box (-80°C) | Revco, USA |
| Mrazicí box (-20°C) | Zanussi, Itálie |
| Mikrotitrační destičky High Binding s kulatým dnem | Costar, USA |
| Mikrotitrační destičky Medium Sorb s rovným dnem | Nunc, Dánsko |
| Optický mikroskop | Meopta, ČR |
| pH metr Φ200 | Beckman, USA |

| | |
|---|-----------------------------------|
| Předvážky HF1200G | AND, USA |
| Sterilní box | Jouan, Francie |
| Ultrazvuková sonda (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series) | Cole-Parmer Instrument Co., USA |
| Váhy Precisa 125 A SCS | Precisa Instruments AG, Švýcarsko |
| VN regulovatelný zdroj 3kV, 200mA | Dílny ČSAV, ČR |
| Vodní lázeň | MLW Prüfgeräte, NDR |
| Vortexový mixér | Sigma, USA |

2.1.4. Buněčné linie

- C6 – potkaní gliomová linie, syngenní pro kmen potkanů Wistar
- B16/F10 – myší melanomová linie, syngenní pro kmen myší C57/BL6
- IC21 – myší makrofágová NKR-P1 dependentní nádorová linie, syngenní pro kmen myší C57/BL6

2.1.5. Experimentální zvířata

- Wistar – potkaní kmen, outbrední samci, váha cca 300g, Anlab, Praha
- C57/BL6 – myší kmen, inbrední samci, váha 25-30g, FgÚ AVČR, Praha

2.2. Metody

2.2.1. Izolační postupy

2.2.1.1. Izolace slezinných buněk

Po usmrcení pokusného zvířete byla slezina odebrána do 5ml sterilního média H-MEMd. Poté byla slezina homogenizována pístem injekční stříkačky ve sterilním sítku a v průběhu homogenizace promývána malými množstvími sterilního H-MEMd. Filtrát byl poté centrifugován při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, po dobu několika sekund pro oddělení hrubých, nehomogenizovaných částí tkáně. Odebraný supernatant obsahující splenocyty byl centrifugován při 200x g, teplotě 22°C, zrychlení 9, po dobu 10 minut. Po

odstranění supernatantu byly sedimentované splenocyty resuspendovány v 5ml kultivačního RPMI 1640 s 5% FTS.

50 μ l buněčné suspenze bylo 20x naředěno v Türkově roztoku a splenocyty byly spočítány pod mikroskopem v Bürgerově komůrce. Příslušný počet buněk byl poté oddělen pro kultivaci (kap. 2.4.2.), FACS analýzu (kap. 2.4.3.) či cytotoxické testy (kap. 2.4.4.).

2.2.1.2. Izolace nádorových buněk

Nádorové tkáně byly převedeny do 5ml hypotonického roztoku obsahujícího inhibitory proteináz. Tkáň byla homogenizována v homogenizátoru Elvehjem-Potterově při teplotě 4°C a poté centrifugována při 200x g, teplotě 4°C, zrychlení 9, po dobu několika sekund pro oddělení hrubých, nehomogenizovaných částí tkáně. Oddělený supernatant obsahující nádorové buňky byl centrifugován při 200x g, teplotě 4°C, zrychlení 9, po dobu 10 minut. Sediment byl poté resuspendován v 10ml hypotonického roztoku.

2.2.1.3. Izolace buněčných membrán

Buněčná suspenze byla po případné kultivaci (kap. 2.4.2.) převedena do 15ml kyvet a centrifugována (200x g, 22°C, zrychlení 9, 10min). Buňky byly převedeny do 10ml hypotonického roztoku jehož základem je 50mM TRIS, pH=7,4 a inhibitory proteáz (PMSF, benzamidin-HCl). V tomto roztoku byly třikrát promyty v 10ml hypotonického pufru a následně homogenizovány ve 3ml hypotonického roztoku působením ultrazvuku o amplitudě 20U přístroje Ultrasonic Homogenizer od firmy Cole-Palmer Inst. Sonikace probíhala opakovaně v intervalech 5-6 sekund, dokud nebylo 80-90% buněk rozbito. Účinnost sonikace se průběžně kontrolovala po každém intervalu v optickém mikroskopu. Centrifugací (200x g, 4°C, zrychlení 9, 10 min.) byla oddělena nukleární frakce a zbylé nerozbité buňky (sediment). Supernatant byl převeden do ultracentrifugačních kyvet značky Beckman a ultracentrifugován (Sorvall OTD Combi, 40000x g, 4°C, zrychlení N, 20 min.). Vzniklý pelet obsahoval mikrozomální frakci tvořenou fragmenty cytoplazmatických membrán.

2.2.1.4. Cholátová extrakce membránových proteinů

Sediment, obsahující cytoplazmatické membrány, byl resuspendován v 1-2ml cholátového pufru, jehož základem je 20mM TRIS pH=8,0 a 25mM NaCl. Roztok byl opět sonikován při nízké amplitudě za chladu, dokud se pelet neresuspendoval a poté se ponechal k extrakci při 4°C přes noc. Ultracentrifugací (Sorvall OTD Combi, 100000x g, 4°C, zrychlení N, 60min.) byly odděleny části organel a fragmenty membrán od extrahovaných membránových proteinů. Konečná proteinová frakce byla rozdělena do několika mikrozkušavek a uchována při -80°C k dalšímu zpracování. Před zamražením bylo z každého vzorku odebráno 20μl suspenze ke stanovení koncentrace proteinů metodou barvení BCA (běžná komerční souprava). Po obarvení roztokem BCA byla koncentrace stanovena spektrofotometricky při 520nm oproti kalibrační řadě roztoku BSA o známých koncentracích.

2.2.2. Kultivace buněk

2.2.2.1. Kultivace izolovaných splenocytů

Izolované splenocyty v koncentraci $5 \cdot 10^6$ /ml byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI 1640 s 5% FTS s přídavkem, nebo bez přídavku anti-NKR-P1 Ab (2000x ředění), při 37°C, po dobu 2hodin. Po skončení inkubace byla provedena centrifugace (200x g, 22°C, zrychlení 9, 10min.) a sediment byl resuspendován v 10ml hypotonického roztoku (příprava pro izolaci membrán).

2.2.2.2. Kultivace slezinných tkání

Z odebrané sleziny byla odstříhnuta cca 1/3 tkáně (cca 1cm³) a převedena do 5ml kultivačního RPMI 1640 s 5% FTS s přídavkem či bez přídavku anti-NKR-P1 Ab (2000x ředění), a inkubována při 37°C, po dobu 2hodin. Po skončení inkubace byly slezinné tkáně opatrně homogenizovány v 15ml kyvetách pomocí skleněné tyčinky a poté centrifugovány (200x g, 22°C, zrychlení 9, po dobu několika sekund) pro odstranění nezhomogenizovaných částí. Buněčná suspenze (supernatant) byla poté centrifugována (200x g, 22°C, zrychlení 9, 10min.) a sediment resuspendován v 10ml hypotonického roztoku.

2.2.2.3. Kultivace buněčných linií

Nádorové buněčné linie C6 (potkaní gliom) a B16/F10 (myší melanom) byly kultivovány v Petriho miskách v CO₂ inkubátoru při 37°C, 5% CO₂, a 100% vlhkosti v atmosféře v kultivačním RPMI 1640 s 10% FTS. Kultury byly pasážovány po 48 až 72 hodinách.

Při sledování krátkodobého účinku glykodendrimeru *in vitro* byla C6 linie kultivována za výše uvedených podmínek v přítomnosti 1·10⁻⁶M PAMAM-GlcNAc₈ po dobu 2 hodin. Takto kultivované buňky jsou dále v textu označovány jako C6+GN₈.

Při sledování dlouhodobého účinku glykodendrimeru *in vitro* byla C6 a B16/F10 linie kultivována za výše uvedených podmínek v přítomnosti 1·10⁻⁸M PAMAM-GlcNAc₈ po dobu minimálně 7 dní. Takto kultivované buňky jsou dále v textu označovány jako C6/GN₈.

Kultivované adherentní C6 a B16/F10 buňky byly poté odděleny ode dna Petriho misky špachtlí (popř. intenzivním pipetováním) a převedeny do 50ml kyvet a poté centrifugovány (200x g, 22°C, zrychlení 9, 10min.). Sediment byl resuspendován v 10ml hypotonického roztoku a připraven pro izolaci membrán.

2.2.3. Průtoková cytometrie

Značení a promývání buněk bylo prováděno v 96-ti jamkových destičkách s kulatým dnem (zn. Nunclon). Každý vzorek (jamka) obsahoval 2-3·10⁵ izolovaných buněk. Centrifugace buněk (v destičce) byla prováděna při 400x g, 4°C, zrychlení 9, 5minut.

2.2.3.1. Značení buněk pro určení povrchových znaků

Jednotlivé vzorky byly naneseny na destičku podle příslušného protokolu v množství 2-3·10⁵ buněk na jamku. Destička byla centrifugována (viz. výše), supernatant byl rychlým vyklepnutím odstraněn, pelety roztřepány (Vortex mixer) a resuspendovány ve 200μl (na vzorek) chlazeného FACS roztoku. Následovala opět centrifugace a další promytí 200μl chlazeného FACS roztoku.

Takto promyté buňky, zbavené supernatantu, byly inkubovány s 10μl značené primární protilátky za tmy, při 0°C, 30 minut. Po skončení inkubace byly vzorky 3x promyty 200μl chlazeného FACS roztoku (centrifugace viz. výše). V případě použití primární protilátky konjugované pouze s biotinem, byly vzorky opět inkubovány s 10μl

sekundární protilátky za tmy, při 0°C, 20 minut a opět 3x promyty 200μl chlazeného FACS roztoku.

Po promytí byly buňky resuspendovány v 50μl chlazeného FACS roztoku a z destičky přeneseny pipetou do mikrozkmavek. Před vlastním měřením bylo ke každému vzorku přidáno 10μl reagentie H_öechst (1200x ředění) pro odlišení mrtvých buněk.

2.2.3.2. Značení buněk pro určení intracelulárních znaků

Pro intracelulární značení bylo použito trojnásobné množství buněk na jamku ($6-9 \cdot 10^5$ buněk) pro vyšší ztráty během odsávání supernatantů.

Vzorky byly po nanesení na destičku 3x promyty chlazeným FACS roztokem (promývání a centrifugace viz. výše, odstraňování supernatantu bylo prováděno 200μl osmikanálovou pipetou) a poté fixovány 1% PFA (paraformaldehyd) v 200μl FACS roztoku, při 4°C, po dobu 5minut (fixace povrchových znaků). Vzorky byly opět 3x promyty 200μl chlazeného FACS roztoku a po odstranění supernatantu inkubovány s 50μl FACS-Permeabilizačního roztoku (50x ředění), při 4°C, 10 minut. Po skončení inkubace byly vzorky opět 3x promyty 200μl chlazeného FACS roztoku a po odstranění supernatantu bylo provedeno značení primárními (popřípadě i sekundárními) protilátkami, jak bylo popsáno výše (kap. 2.4.3.1. druhý odstavec). Po skončení značení protilátkami byly intracelulární znaky fixovány 1% PFA, jak bylo popsáno na začátku odstavce.

2.2.4. Cytotoxický test

Cílové buňky gliomové linie C6 a NKR-P1 dependentní makrofágová buněčná linie IC21 v množství $1 \cdot 10^6$ buněk byly inkubovány 90 min. s Na₂⁵¹CrO₄ (0,37MBq), při 37°C, v CO₂ inkubátoru se 100% vlhkostí v atmosféře ve 100μl kultivačního média RPMI 1640 s 10% FTS. Po skončení inkubace byly buňky 3x promyty (promývání a centrifugace viz. výše) kultivačním médiem RPMI 1640 s 2,5% FTS, spočítány a naředěny v médiu RPMI 1640 s 2,5% FTS.

Do každé jamky 96-ti jamkové destičky s kulatými dny bylo nanášeno 100μl buněčné suspenze efektorových buněk (izolované lymfocyty), 100μl buněčné suspenze cílových buněk (značených ⁵¹Cr) a 50μl média RPMI 1640 s 2,5% FTS.

Do jamek určených pro měření spontánního rozpadu bylo nanášeno 100μl buněčné suspenze cílových buněk a 150μl média RPMI 1640 s 2,5% FTS.

Do jamek určených pro měření maximálního rozpadu bylo nanášeno 100µl buněčné suspenze cílových buněk, 100µl média RPMI 1640 s 2,5% FTS a 50µl 10% reagentie Triton X-100.

Destička byla inkubována 3,5 hodiny v CO₂ inkubátoru, při 37°C a 100% vlhkosti v atmosféře. Po skončení inkubace byla destička centrifugována při 200x g, teplotě 4°C, zrychlení 9, po dobu 10 minut. Poté bylo z každé jamky odebráno do 96-ti jamkové destičky 25µl supernatantu. K odebranému supernatantu bylo přidáno 100µl scintilačního roztoku, destička byla zakryta průhlednou lepící páskou a intenzivně protřepávána po dobu 3 minut na Vortex mixeru. Poté byla destička centrifugována při 200x g, teplotě 4°C, zrychlení 9, po dobu 5 minut. Množství uvolněného ⁵¹Cr bylo změřeno na scintilačním počítací Microbeta.⁴⁰

Ze získaných výsledků byla stanovena cytotoxická aktivita v procentech cytotoxicity (%ctx) dle uvedeného vzorce:

$$\%ctx = \frac{cpm_{exp} - cpm_{spont}}{cpm_{max} - cpm_{spont}} \cdot 100$$

cpm_{exp} - množství ⁵¹Cr uvolněného ze směsi lymfocytů a cílových buněk

cpm_{spont} - množství ⁵¹Cr uvolněného samotnými cílovými buňkami

cpm_{max} - maximální množství uvolněného ⁵¹Cr po použití detergentu (10% Triton X-100)

2.2.5. ELISA stanovení G_α-proteinových subjednotek

Touto metodou bylo stanoveno kvantitativní zastoupení jednotlivých typů α podjednotek G-proteinů pomocí králičích polyklonálních protilátek specifických pro C-terminální dekaeptidy jednotlivých typů α-podjednotek: α_{11,2}, α_{Q/11}, α_S, α₀. Na dno mikrotitračních destiček byl nanášen specifický ligand (C-terminální dekaeptidy) pro primární protilátku a ponechán k adsorpci při 4°C přes noc.

Druhý den byl obsah jednotlivých jamek vyklepnut a tyto byly 3x promyty roztokem PBS a 1x PBS-T (200µl na jamku v obou případech). Následovala dvouhodinová blokáce v roztoku 1% BSA v PBS (150µl na jamku), při teplotě 37°C. V průběhu blokáce byla v mikrozkušavkách připravena reakční směs obsahující známé množství primární protilátky a vzorku (proteinové frakce z cholátové extrakce) v ELISA-roztoku (několik zkušavek bylo připraveno bez obsahu vzorku a sloužilo jako maximální pozadí). Takto připravená směs byla inkubována po dobu 1,5h při laboratorní teplotě a po promytí

destičky byla reakční směs převedena do jamek mikrotitrační destičky. Následovala inkubace při 4°C přes noc.

Třetí den byly destičky promyty a do jamek byl přidán roztok sekundární protilátky v PBS (Goat-Anti rabbit HRP conjugate). Aktivita HRP byla detekována pomocí dvojsložkového substrátu pro peroxidázu TMB od firmy KPL. Míra enzymové aktivity byla změřena spektrofotometricky na základě barevné reakce při přeměně substrátu. Měření bylo prováděno na přístroji ELISA-reader při vlnové délce 450nm. Po odečtení absorbance vzorků od maximální absorbance pozadí bylo získáno relativní zastoupení G α -proteinových podjednotek.

2.2.6. Metoda Dot-Blot

Touto metodou bylo ověřeno stanovení jednotlivých typů G-proteinů metodou ELISA. Byly zde použity stejné králičí polyklonální protilátky jako v metodě ELISA, specifické pro C-terminální deka-peptidy jednotlivých typů α -podjednotek. Na nitrocelulóзовou membránu byly nanесeny vzorky v řadách pomocí speciálního dávkovače, připojeného k vývěvě (vzorky byly "prosáty" přes nitrocelulóзовou membránu, na kterou se proteiny navázaly). Membrána byla poté ponechána přes noc při teplotě 4°C v blokovacím roztoku (5% sušené odtučněné mléko v TBS) k vysycení volných míst pro nespecifickou adsorpci protilátky.

Druhý den byla membrána promyta v TBS-T roztoku za stálého míchání na Vortex mixeru (poprvé jen opláchnuta a poté 2x 5min., 1x 10min. a 1x 20min., ponechána v 10-15ml čerstvého TBS-T) a převedena do roztoku TBS s primární protilátkou. Inkubace proběhla při laboratorní teplotě po dobu 1,5h. Membrána byla opět promyta a převedena do roztoku sekundární protilátky v TBS (inkubace 1,5h při laboratorní teplotě). Používaná sekundární protilátka byla enzymově značená křenovou peroxidázou (dále jen HRP). Detekce značených zón byla provedena pomocí luminiscenčního roztoku ECL (Enhanced ChemiLuminescence Western blotting luminol reagent od firmy Santa Cruz Biotechnology) a vyvoláním na digitálním fotodetekčním přístroji Fuji Las.

3. Výsledky

3.1. Sledování účinku glykodendrimeru na imunokompetentní buňky

Experimentální zvířata určená pro sledování účinku podání glykodendrimeru (PAMAM-GlcNAc₈) na indukci cytotoxické odpovědi, zastoupení buněčných populací a expresi G α -proteinových podjednotek byla rozdělena do tří skupin po dvou zvířatech. Rovněž byly sledovány změny v zastoupení G α -proteinových podjednotek v nádorové tkáni (kap. 3.2., str. 46) izolované ze stejných zvířat:

- K: Potkani s gliomem C6 - neléčení.
- 1xGN₈: Potkani s gliomem C6 - podání 1 dávky (0,015mg/potkana), 1h před usmrcením.
- 3xGN₈ (4xGN8): Potkani s gliomem C6 - podání 3-4 dávek dle časového rozpisu.

Časový rozpis podávání glykodendrimeru pro prováděné experimenty:

| Experiment | 0.den | 11.den | 14.den | 17. den | 20. den |
|------------|-------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| č.1 | nádorové b. | 1.dávka GN ₈ | 2.dávka GN ₈ | 3.dávka GN ₈ - † | |
| č.2 | nádorové b. | 1.dávka GN ₈ | 2.dávka GN ₈ | 3.dávka GN ₈ | 4.dávka GN ₈ - † |

Tab. 2.: Nádorové buňky podány subkutánně ($2 \cdot 10^7$ buněk/potkana v PBS), GN₈ podáváno intraperitoneálně (0,015mg/potkana v PBS), † - usmrcení vykrvením 1h po podání příslušné dávky.

Skupině K byly implantovány nádorové buňky a podána 1 dávka PBS, skupině 1xGN₈ nádorové buňky a jedna dávka GN₈ 17. den (při druhém stanovení 20.den) a skupině 3xGN₈ (4xGN8) nádorové buňky a 3-4 dávky GN₈.

3.1.1. Izolace a příprava buněk pro stanovení G-proteinů

Části slezinné tkáně (o objemu cca 1cm³) byly rozděleny na dvě skupiny a ihned inkubovány samostatně, nebo s přidáním anti-NKR-P1 protilátky (2000x ředění) v kultivačním médiu RPMI 1640 s 5% FTS, při 37°C, 2 hodiny podle tabulky:

| Skupina: | Inkubace: |
|----------|--|
| K | 5ml RPMI 1640 + 5% FTS |
| 1xGN8 | 5ml RPMI 1640 + 5% FTS |
| 3xGN8 | 5ml RPMI 1640 + 5% FTS |
| K+Ab | 5ml RPMI 1640 + 5% FTS + Anti - NKR-P1 Ab (2000x ředění) |
| 1xGN8+Ab | 5ml RPMI 1640 + 5% FTS + Anti - NKR-P1 Ab (2000x ředění) |
| 3xGN8+Ab | 5ml RPMI 1640 + 5% FTS + Anti - NKR-P1 Ab (2000x ředění) |

Tab. 3.: Rozdělení skupin při indukci signálu pomocí Anti - NKR-P1 protilátky.

Stejný postup byl použit pro izolované splenocyty, s tím, že buňky byly kultivovány v koncentraci $1 \cdot 10^7$ /ml v celkovém objemu 10 ml na vzorek (izolace dle kap.2.2.1.1., str. 27).

Po dvouhodinové inkubaci byla provedena izolace membrán a extrakce G-proteinových podjednotek, jak bylo popsáno dříve. Relativní zastoupení izolovaných G-proteinových podjednotek bylo provedeno metodou ELISA.

3.1.1.1. ELISA

Metoda ELISA byla prováděna na 96 jamkových mikrotitračních destičkách Nunc MediumSorb (pro $G\alpha_{1,2}$ a $G\alpha_o$) a Costar High Binding ($G\alpha_s$ a $G\alpha_{Q/11}$). Podrobný postup metody je popsán v kapitole 2.2.5., str. 32. Výchozí materiál je charakterizován následující tabulkou:

| vzorek | inkubace | koncentrace membránových proteinů [mg/ml] |
|----------|------------|---|
| K | - | 0,63 |
| 1xGN8 | - | 0,57 |
| 3xGN8 | - | 0,32 |
| K+Ab | antiNKR-P1 | 0,60 |
| 1xGN8+Ab | antiNKR-P1 | 0,82 |
| 3xGN8+Ab | antiNKR-P1 | 0,68 |

Tab. 4.: Charakteristika vzorků použitých při metodě ELISA č.1/1.

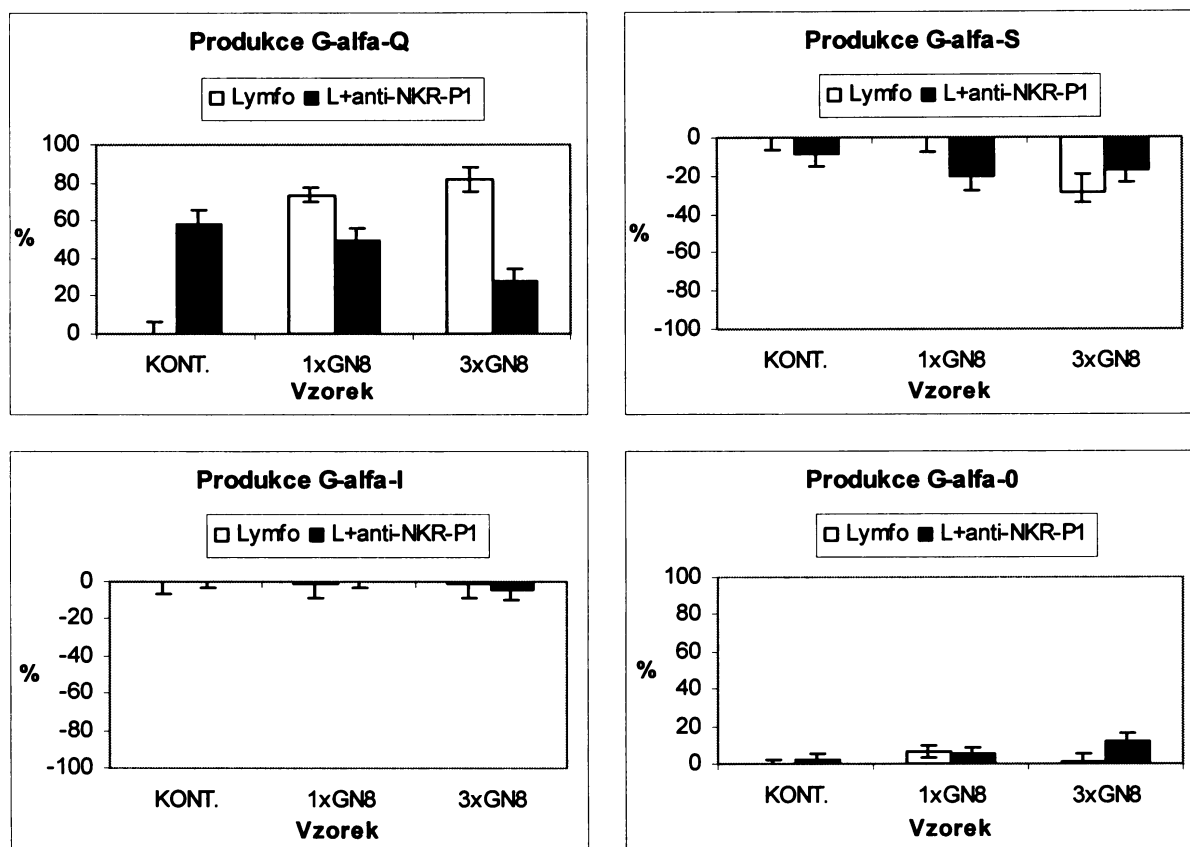
Na mikrotitrační destičky byl nanesen specifický ligand (C-terminální deka-peptid) pro primární protilátku po 100 μ l na jamku (stejný objem peptidu na jamku byl nanášen i ve všech následujících krocích). Po inkubaci přes noc při 4°C byla destička 3x promyta PBS a jednou PBS-T. Následovalo 2 hodinové vysycení volných míst k zabránění nespecifické adsorpce blokovacím roztokem. Během vysycování byla do 24 mikrozkušavek (na každý sloupec destičky jedna) připravena reakční směs s obsahem na jednu jamku: 20 μ l primární protilátky, 20 μ g proteinu z cholátové extrakce, ELISA-roztok do výsledného objemu 100 μ l (tj. na 8 jamek sloupce plus 2 jamky jako rezerva: 200 μ l primární protilátky, 200 μ g proteinu a ELISA-roztok do výsledného objemu 1ml). Primární protilátky určené pro stanovení maximálního pozadí byly připraveny stejně, ale bez přidání proteinu z cholátové extrakce. Primární polyklonální protilátky byly připraveny imunizací laboratorních králíků na lékařské fakultě v Brně a poskytnuty paní Doc. H. Kovářů. Takto připravená reakční směs byla ponechána po 1,5h při laboratorní teplotě k navázání volných $G\alpha$ -proteinových podjednotek do vazebného místa protilátky. Po ukončení blokace a promytí destičky byl

obsah mikrozkumavek nanesen na destičku. Inkubace primární protilátky s jejím specifickým ligandem probíhala po dobu 1,5h. Vysycená protilátka (s navázanými podjednotkami G-proteinů) byla odmyta a na destičku byla nanášena sekundární protilátka GAR IgG (H+L) značená HRP od firmy Jackson Immuno Research. Inkubace trvala 1,5h. Následovalo poslední promytí a nanášení TMB, dvojsložkového substrátu pro peroxidázu a 5ti minutová inkubace ve tmě, která vyvolala barevnou reakci. Enzymatická reakce byla zastavena přidáním 100 μ l 1M H₃PO₄. Intenzita zbarvení, byla změřena spektrofotometricky na přístroji ELISA-reader při vlnové délce 450nm. Ředění jednotlivých protilátek znázorňuje následující tabulka:

| Reagencie | ředění |
|---|---------------|
| dekaeptidy G α -podjednotek: G $\alpha_{11,2}$, G $\alpha_{Q/11}$, G α_S , G α_0 | 1 : 4000 |
| <i>Primární protilátka</i> | |
| Anti-G α_S | 1 : 1000 |
| Anti-G $\alpha_{Q/11}$ | 1 : 2400 |
| Anti-G $\alpha_{11,2}$ | 1 : 2000 |
| Anti-G α_0 | 1 : 1000 |
| <i>Sekundární protilátka</i> | |
| HRP konjugovaný s Affini Pure GAR IgG (H+L) | 1 : 2000 |

Tab. 5.: Ředění jednotlivých protilátek použitých při metodě ELISA.

Zastoupení jednotlivých G α -proteinových podjednotek vyjádřené v procentech neléčené kontrolní skupiny K. Výsledek stanovení po inkubaci celých slezinných tkání vyjadřují následující grafy:



Obr. 10.: Grafické vyhodnocení exprese $G\alpha$ -proteinových podjednotek stanovených metodou ELISA č. 1/1 v procentech kontroly pro specifické $G\alpha$ -proteinové podjednotky (absorbance kontrolní skupiny stanovena jako 0%). Skupiny inkubované s Anti-NKR-P1 protilátkou jsou znázorněny černě. KONT. = K

Při ovlivnění slezinných buněk glykodendrimerem dochází k aktivačním změnám ve struktuře G-proteinů. Projevem tohoto děje je uvolnění $G\alpha$ podjednotek z inaktivních trimerních komplexů. Na grafech vyobrazených v obr. 10. je znázorněna změna exprese jednotlivých α -podjednotek buněk ovlivněných anti-NKR-P1 oproti buňkám stejně zpracovávaným ale neovlivněným. Jak je patrné z obr. 10., dochází ke zvýšení exprese podjednotek $G\alpha_q$ a naopak aktivita $G\alpha_s$ je inhibována. Snižující se tendence u $G\alpha_s$ sice napovídá jisté ovlivnění vzhledem k dávkové závislosti GN_8 , ale změna jejich exprese nepřesáhne v žádném z případů 30% ve srovnání s kontrolní skupinou. U ostatních podjednotek se hodnoty pohybují v rozmezí směrodatné odchylky při stanovení, která činí 5-10%. Z naměřených hodnot je tedy pouze patrné ovlivnění $G\alpha_{q/11}$ podjednotky, kde je v dávkové závislosti patrná stoupající tendence. V případě aktivace specifickou protilátkou proti NKR-P1 je patrná klesající tendence signalizace přes $G\alpha_{q/11}$ (obr. 10. černě vyznačená řada).

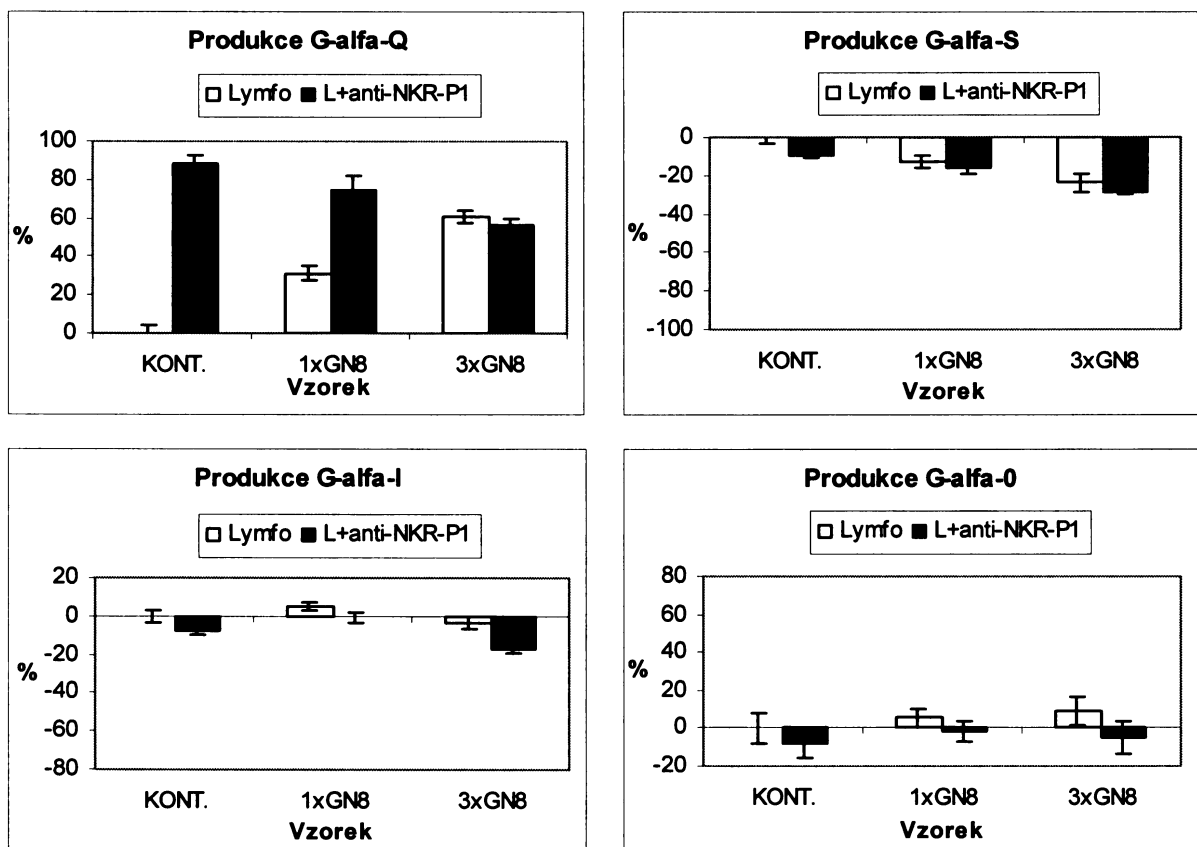
V dalším měření byly sledovány izolované slezinné leukocyty pro odlišení případné signalizační aktivity způsobené podpurnými buňkami, případně stresem, který by mohl

během izolačních postupů nastat. V předchozím stanovení byly inkubovány celé slezinné tkáně, aby se tak stresové faktory, které mohou během izolace buněk vznikat, omezily na minimum:

| vzorek | inkubace | počet buněk | konzentrace membránových proteinů [mg/ml] |
|-----------------|------------|-----------------|---|
| K | - | 1×10^8 | 1,66 |
| 1xGN8 | - | 1×10^8 | 1,83 |
| 3xGN8 | - | 1×10^8 | 1,24 |
| K _{Ab} | antiNKR-P1 | 1×10^8 | 1,64 |
| 1xGN8+Ab | antiNKR-P1 | 1×10^8 | 2,10 |
| 3xGN8+Ab | antiNKR-P1 | 1×10^8 | 1,70 |

Tab. 6.: Charakteristika vzorků použitých při metodě ELISA č.1/2.

Po skončení inkubace byl postup při stanovení totožný s předchozím:



Obr. 11.: Grafické vyhodnocení metody ELISA č. 1/2 v procentech kontroly pro specifické G_α-proteinové podjednotky. Skupiny inkubované s anti-NKR-P1 protilátkou jsou znázorněny černě. KONT. = K

Změna aktivity jednotlivých G-proteinů vykazuje stejnou tendenci jako v předchozím měření (ke srovnání obr. 10., str. 37 a obr. 11.). Dochází ke zvyšování exprese G_{αq/11}-podjednotky v závislosti na počtu dávek GN₈ a ke snižování intenzity signálu vyvolaného anti-NKR-P1 protilátkou, která byla rovněž přímo závislá na počtu podaných dávek GN₈. Tendence u G_{αs}-podjednotky je totožná s předchozím stanovením, procentuální změny v

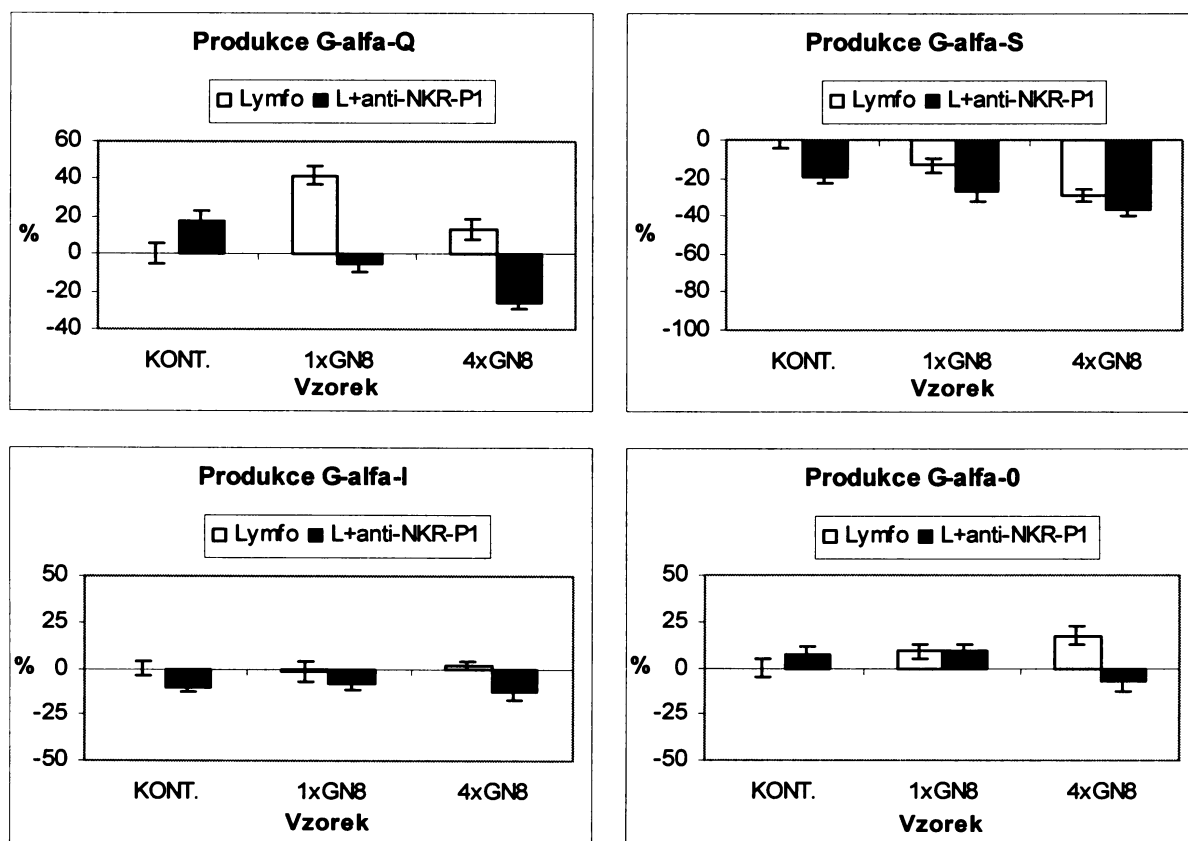
expresi opět nepřesahují 30%, a proto tyto hodnoty nemohou být brány jako směrodatné. Hodnoty exprese $G_{\alpha 1,2}$ a $G_{\alpha 0}$ podobně, jako v prvním případě při použití celých tkání nejsou glykodendrimerem ovlivněny. Z obr. 11. je dále patrné, že signál vyvolaný během inkubace specifickou protilátkou proti NKR-P1 má vyšší intenzitu než v předchozím případě, která může být dána lepší dostupností protilátky k izolovaným buňkám.

V dalším měření byly inkubovány slezinné tkáně z druhého stanovení z nové sady experimentálních zvířat podle tab. 2, exp. č. 2, str. 34:

| vzorek | inkubace | počet buněk | koncentrace membránových proteinů [mg/ml] |
|-----------------|------------|-----------------|---|
| K | - | 1×10^8 | 1,71 |
| 1xGN8 | - | 1×10^8 | 1,46 |
| 4xGN8 | - | 1×10^8 | 0,82 |
| K _{Ab} | antiNKR-P1 | 1×10^8 | 0,91 |
| 1xGN8+Ab | antiNKR-P1 | 1×10^8 | 1,11 |
| 4xGN8+Ab | antiNKR-P1 | 1×10^8 | 0,60 |

Tab. 7.: Charakteristika vzorků použitých při metodě ELISA č. 2.

Po skončení inkubace byly z tkání izolovány splenocyty a následně membránové proteiny shodně s dříve uvedenými postupy. Výsledek ELISA stanovení č.2 ukazují následující grafy:

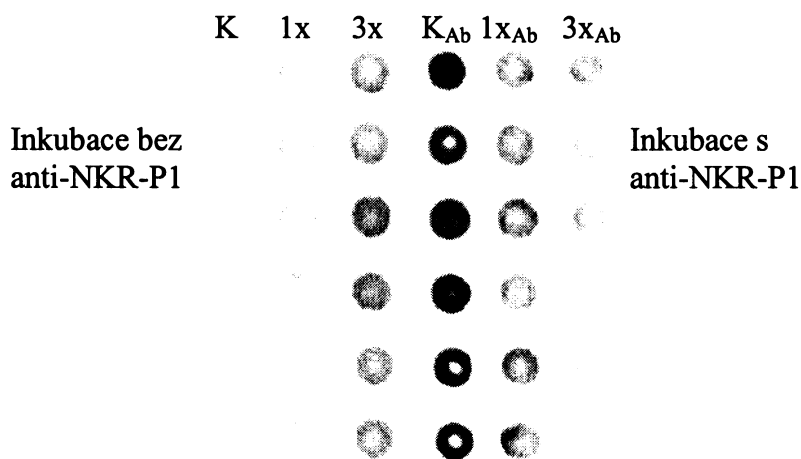


Obr. 12.: Grafické vyhodnocení metody ELISA č. 2 v procentech kontroly pro specifické G_{α} -proteinové podjednotky. Skupiny inkubované s anti-NKR-P1 protilátkou jsou znázorněny černě. KONT. = K

Dříve sledovaný nárůst exprese $G\alpha_{q/11}$ -proteinových podjednotek v závislosti na počtu podaných dávek glykodendrimeru je patrný pouze pro první dvě skupiny, třetí skupina (4xGN8) vykazuje expresi srovnatelnou s kontrolní skupinou. Pokles exprese $G\alpha_{q/11}$ -proteinových podjednotek pro skupiny inkubované s anti-NKR-P1 protilátkou je i zde viditelný, i přes skutečnost, že počáteční signál (K+Ab skupiny) není tak výrazný jako v předchozích stanoveních (ELISA č.1/1 a 1/2, obr. 10 a 11, str. 37, 38). Klesající tendence v expresi $G\alpha_s$ -proteinových podjednotek sledovaná v předchozích stanoveních je i zde viditelná a vzhledem k několikanásobnému opakování tohoto jevu považována za směrodatnou.

3.1.2. Dot Blot

Touto metodou měly být ověřeny hodnoty a výsledky získané metodou ELISA č. 1/2. Pro metodu dot blot byly použity frakce membránových proteinů získaných a použitých ve stanovení ELISA č. 1/2 a jednotlivé skupiny byly identifikovány primární králičí protilátkou pouze proti $G\alpha_{q/11}$ -proteinové podjednotce:



Obr. 13.: Výsledek metody dot blot. 1x=1xGN8, 3x=3xGN8, 1x_{Ab} a 3x_{Ab} = 1xGN8 a 3xGN8 s anti-NKR-P1. Každý vzorek byl nanesen šestkrát v koncentraci 30 μ g/jamku.

Z obr. 13. je patrná zvyšující se intenzita luminiscence, naměřená pomocí přidání ECL substrátu na přístroji Fuji-LAS, pro první tři skupiny odpovídající naměřeným hodnotám pomocí metody ELISA při stanovení č. 1/2. Dále je patrná klesající tendence u zbylých tří skupin, odpovídající skupinám inkubovaným s anti-NKR-P1 protilátkou stejně jako při metodě ELISA při stanovení č. 1/2 (pro srovnání obr. 12., produkce $G\alpha_{q/11}$, str. 39 a obr.

13.). Toto ověření metody ELISA bylo považováno za průkazné a z časových důvodů nebylo pro další ELISA stanovení prováděno.

3.1.3. Izolace a příprava buněk pro FACS analýzu

Slezinné buňky (SC) byly izolovány homogenizací slezinných tkání jak bylo popsáno v kapitole 2.2.1.1., str. 27. Po identifikaci počtu buněk byly vzorky nanášeny na 96-ti jamkovou destičku s kulatými dny (Nunclon) v množství $2-3 \cdot 10^5$ na jamku. Dále byly vzorky značeny pro detekci extracelulárních znaků, jak bylo popsáno v kapitole 2.2.3.1., str. 30.

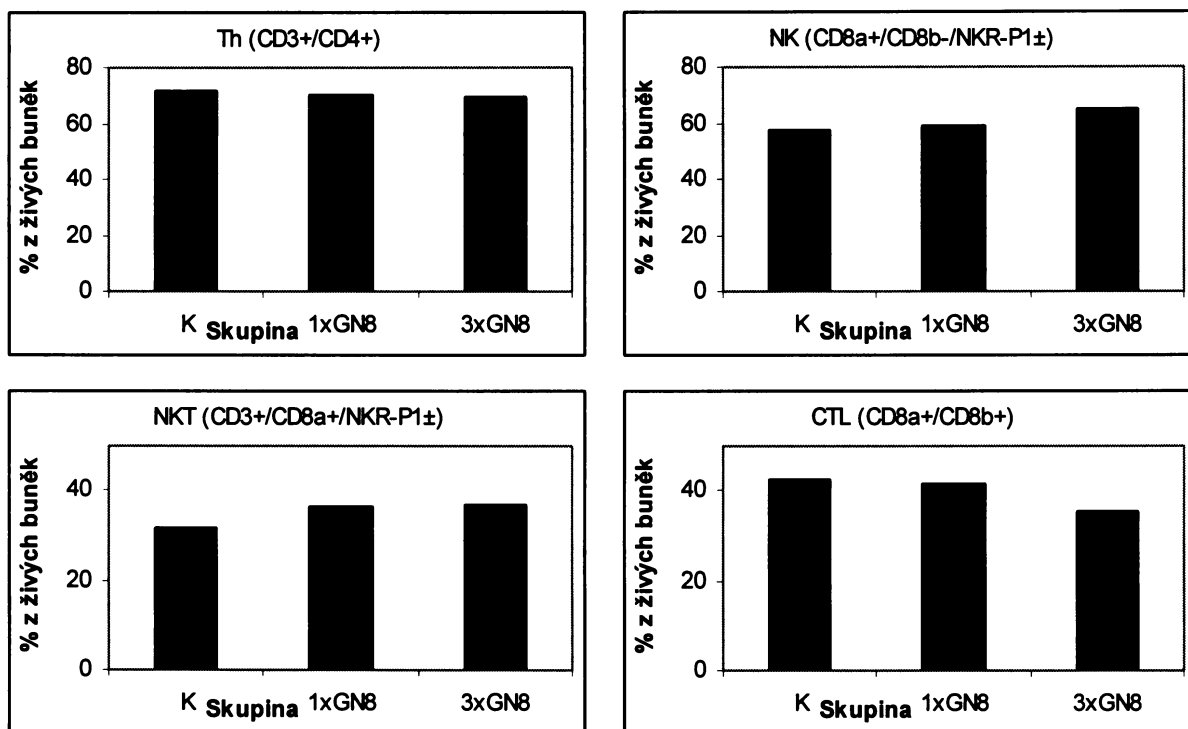
3.1.2.1. FACS analýza

Hodnoty každého vzorku byly proměřovány na 20000 událostech (to odpovídá cca 10000 živých lymfocytů) a během měření byly sledovány následující buněčné subpopulace:

| Subpopulace: | Znaková specifikace: |
|----------------------------|----------------------|
| T _h - lymfocyty | CD3+/CD4+ |
| NK | CD8a+/CD8b-/NKR-P1± |
| NK-T | CD3+/CD8a+/NKR-P1± |
| CTL | CD8a+/CD8b+ |

Tab. 8.: Znázornění sledovaných buněčných populací a jejich specifických znaků.

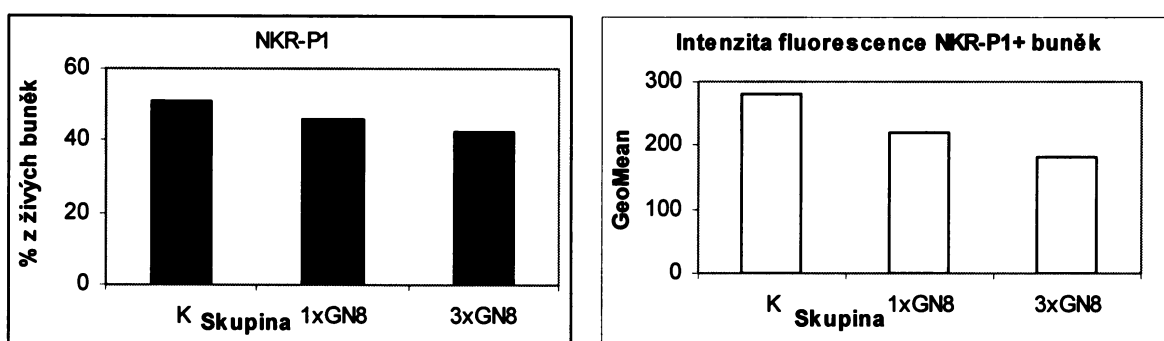
Po skončení značení bylo měřeno procento pozitivních buněk na jednotlivé znaky a vyhodnoceny na živých lymfocytech programem FlowJo. Procentuální hodnoty se vztahují vždy k těm buňkám, které jsou pozitivní na první znak v pořadí (např. Th lymfocyty jsou CD4 pozitivní v 70% ze všech CD3 pozitivních lymfocytů – CD3 znak je v pořadí první, NK buňky jsou CD8b- a NKR-P1± v 60% ze všech CD8a pozitivních lymfocytů). Zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací vyjadřují následující grafy:



Obr. 14.: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací u zkoumaných vzorků, použitých při FACS stanovení č.1.

Z grafů na obr. 14. je pouze patrné mírné zvýšení zastoupení populace NK-buněk a NKT-lymfocytů a snížení procenta pozitivních buněk u populace cytotoxických T-lymfocytů (CTL) ve slezině pokusných zvířat.

Dále bylo sledováno procentuální zastoupení NKR-P1 pozitivních buněk a intenzita fluorescence tohoto znaku vyjádřená geometrickým průměrem (GeoMean), která vyjadřuje celkové zastoupení toho receptoru na analyzovaných buňkách:



Obr. 15.: Grafické znázornění intenzity fluorescence NKR-P1⁺ buněk u jednotlivých vzorků použitých při FACS stanovení č.1.

Zde je klesající tendence exprese NKR-P1 receptoru v závislosti na množství aplikovaných dávek glykodendrimeru jasně patrná.

Druhé stanovení bylo provedeno na vzorcích připravených podle tabulky č.2 (kap. 3.1., str., 34, experiment č.2). Izolace a příprava buněk byla provedena stejně jako při

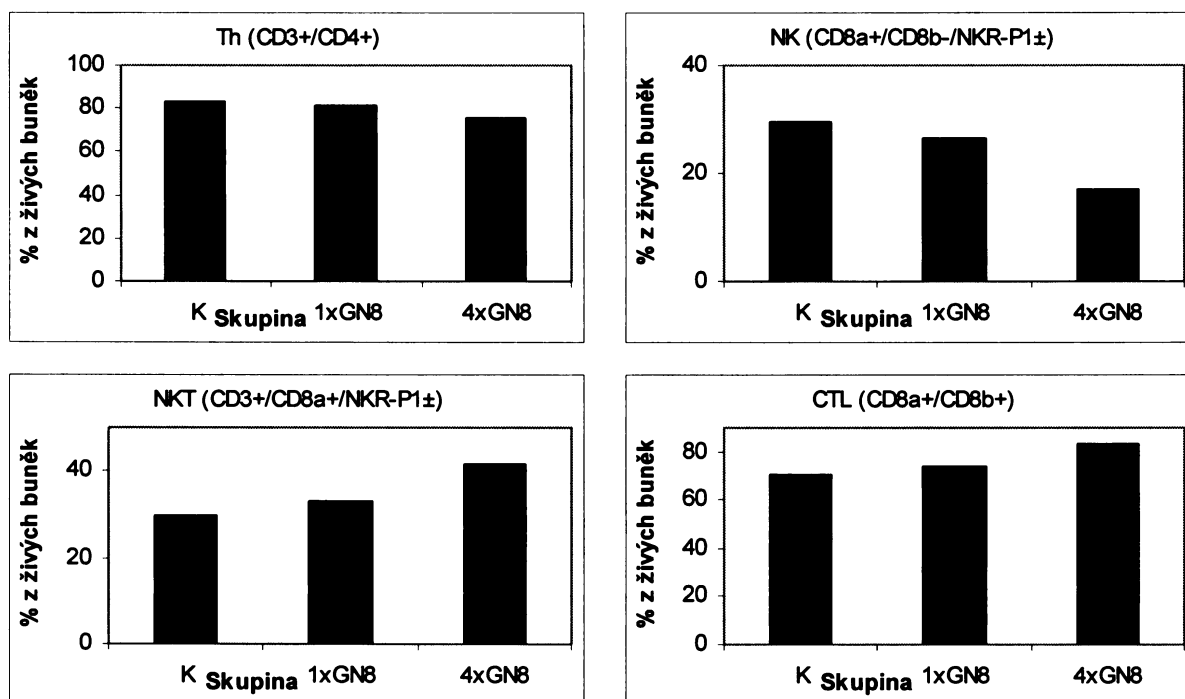
prvním stanovení (kap. 3.1.1., str. 34). Navíc bylo ještě provedeno intracelulární značení pomocí anti-NKR-P1 protilátky, jak je popsáno v kap. 2.2.3.2., str. 31.

Během měření byly sledovány následující buněčné subpopulace:

| Subpopulace: | Znaková specifikace: |
|----------------------------|----------------------|
| T _h - lymfocyty | CD3+/CD4+ |
| NK | CD8a+/CD8b-/NKR-P1± |
| NK-T | CD3+/CD8a+/NKR-P1± |
| CTL | CD8a+/CD8b+ |

Tab. 9.: Znázornění sledovaných buněčných populací a jejich specifických znaků.

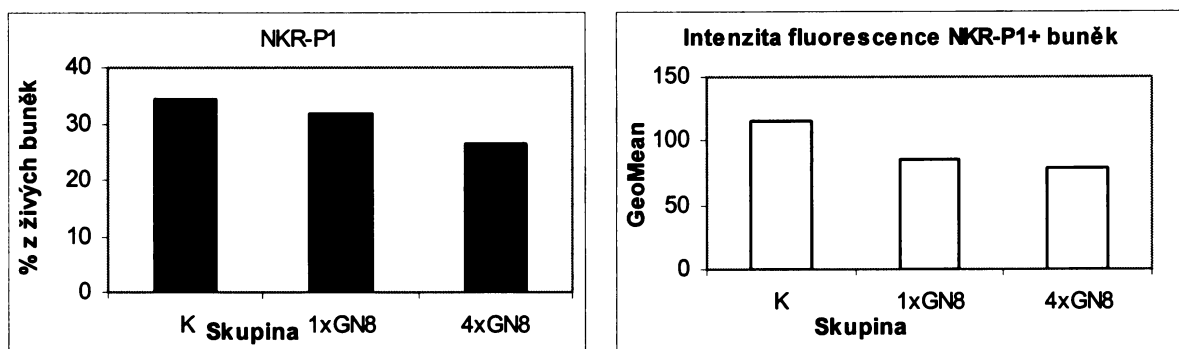
Stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací vyjadřují následující grafy:



Obr. 16.: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací u jednotlivých vzorků použitých při FACS stanovení č.2.

Z grafů na obr. 16. je patrný nárůst NKT populace a pokles v populaci NK buněk. Procentuální zastoupení ostatních populací a populace NK vzhledem k předchozímu stanovení nemůže být považováno za potvrzené.

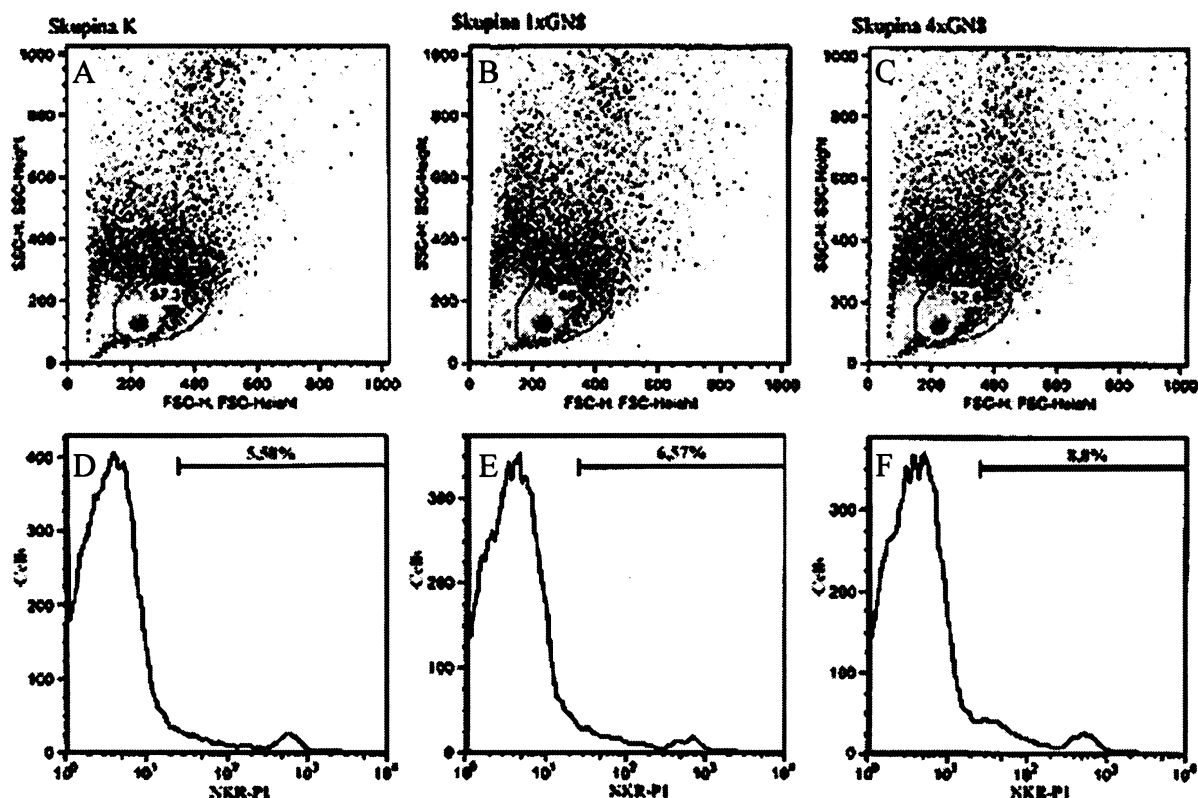
Dále bylo u jednotlivých vzorků opět sledováno procentuální zastoupení a intenzita fluorescence NKR-P1⁺ buněk, vyjadřující celkové zastoupení NKR-P1 receptoru u jednotlivých skupin:



Obr. 17.: Grafické znázornění intenzity fluorescence NKR-P1⁺ buněk u jednotlivých vzorků použitých při FACS stanovení č.2.

I zde je jasně patrná klesající tendence u procentuálního zastoupení populace nesoucí znak NKR-P1 i u intenzity fluorescence v závislosti na počtu podaných dávek glykodendrimeru.

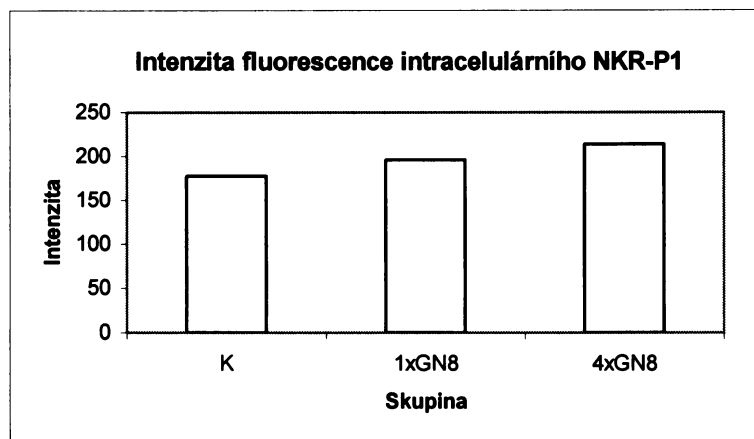
Získané výsledky ze sledování buněčné signalizace a FACS analýzy povrchových znaků nás vedly k domněnce, že může docházet k internalizaci NKR-P1 receptoru. Proto jsme sledovali také přítomnost této molekuly v buněčné cytoplasmě pomocí intracelulárního značení za použití stejné protilátky:



Obr. 18.: Znázornění bodové (A, B, C) a histogramové (D, E, F) statistiky intracelulárního výskytu receptoru NKR-P1 u vzorků ze stanovení FACS č.2., pomocí programu pro vyhodnocování dat z průtokové cytometrie FlowJo v4.5

Z histogramů na obr. 18. je patrné zvýšení procentuálního zastoupení buněk s přítomností intracelulárního NKR-P1 v závislosti na dávce glykodendrimeru.

Sledování intenzity fluorescence intracelulárního NKR-P1, která vyjadřuje zastoupení NKR-P1 receptoru uvnitř NKR-P1 pozitivních buněk sledovaných skupin:

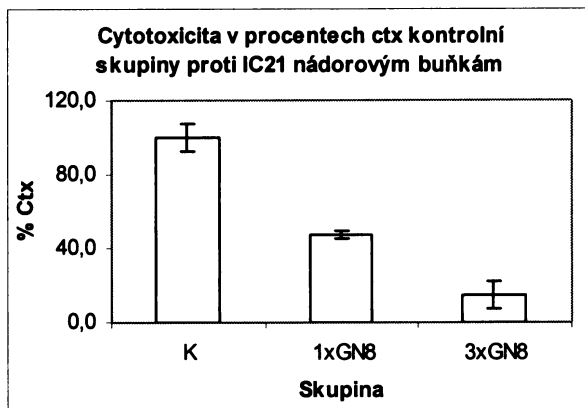
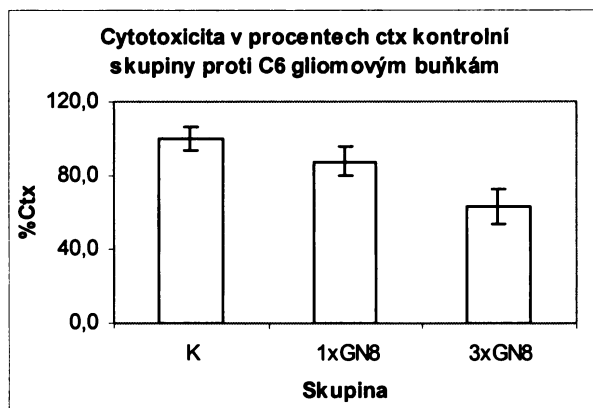


Obr. 19.: Grafické znázornění intenzity fluorescence intracelulárního NKR-P1 u jednotlivých vzorků použitých při FACS stanovení č.2.

Z obr. 19. je jasně viditelné zvyšování intenzity fluorescence NKR-P1 receptoru v buněčné cytoplasmě. Společně s předchozím výsledkem (obr. 18., str. 44 a 19.) potvrzuje domněnku o internalizaci NKR-P1 buněčného receptoru.

3.1.4. Cytotoxický test

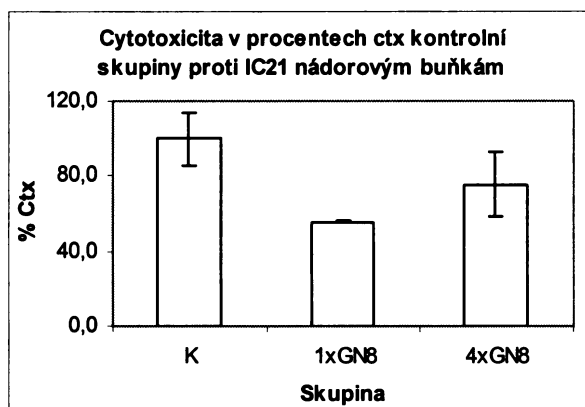
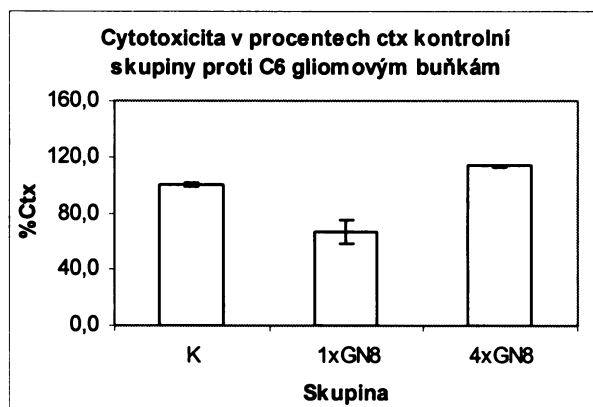
Při cytotoxickém testu byl sledován vliv podání glykodendrimeru na cytotoxickou výkonnou funkci imunokompetentních buněk. Pro stanovení byly použity C6 gliomová linie a NKR-P1 dependentní makrofágová nádorová linie IC21, podle postupu v kap. 2.2.4., str. 31. Byla sledována cytotoxicita (vyjádřená v procentech cytotoxicity kontrolní skupiny) jednotlivých skupin izolovaných splenocytů, použitých při FACS analýze č.1 (str. 41) a ELISA stanovení $G\alpha$ -proteinových podjednotek č.1/2 (str. 38). Poměr počtu efektorových buněk k cílovým (E:T) byl 32:1 a hodnoty %Ctx (ze vzorce v kap. 2.2.4., str. 32) se u kontrolních skupin pohybovaly v rozmezí 6,5-10%Ctx (pro C6 linie) a 8,5-11%Ctx (pro IC21 linie):



Obr. 20.: Grafické znázornění výsledku cytotoxického testu vyjádřeného v procentech kontroly, při stanovení cytotoxické aktivity slezinných buněk pokusu č. 1.

Z obr. 20. je patrný pokles cytotoxické účinnosti imunokompetentních buněk proti C6 gliomové linii a zejména proti NKR-P1 dependentní nádorové linii IC21, v závislosti na množství podaných dávek glykodendrimeru.

Pro druhý cytotoxický test byly opět použity izolované slezinné buňky podobně jako pro FACS analýzu č.2 (str. 43) a ELISA stanovení Gα-proteinových podjednotek č.2 (str. 39):



Obr. 21.: Grafické znázornění výsledku cytotoxického testu vyjádřeného v procentech kontroly, při stanovení cytotoxické aktivity slezinných buněk pokusu č.2.

Z obr. 21. je pokles cytotoxického účinku patrný pouze u prvních dvou skupin. Skupina třetí (4xGN8) vykazuje cytotoxickou aktivitu, která je srovnatelná s hodnotami kontrolní skupiny (K). Pokles cytotoxicity v závislosti na počtu podaných dávek glykodendrimeru byl tedy pozorován při obou stanoveních (pro srovnání obr. 20. a obr 21.).

3.2. Sledování účinku glykodendrimeru na nádorové buňky

Při sledování účinku glykodendrimeru na nádorové linie, byly použity potkaní C6 gliomová linie a myši B16/F10 melanomová linie (pro odlišení „obecného“, případně nádorově specifického účinku glykodendrimeru). Pro srovnání účinku glykodendrimeru a imunokompetentních buněk byla sledována exprese α -proteinových podjednotek u nádorových buněk *in vitro* a *ex vivo*.

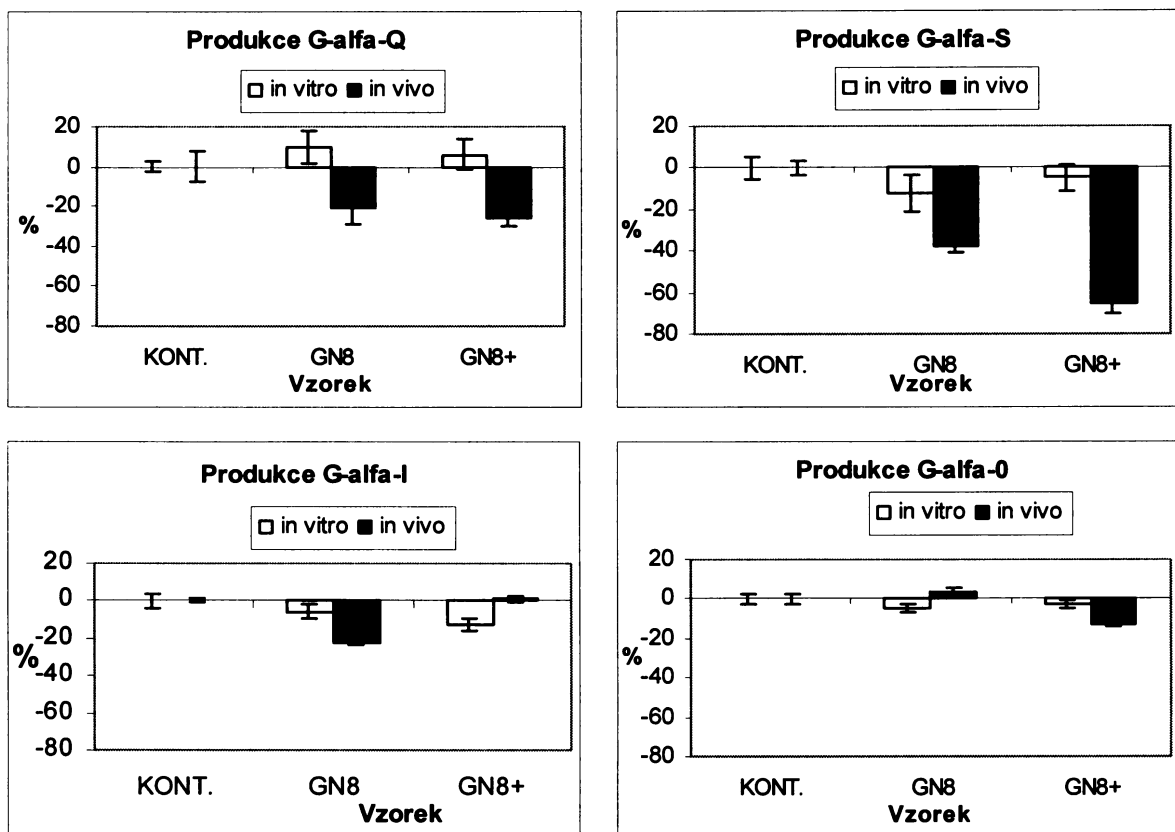
3.2.1. Studium účinku glykodendrimeru na signalizaci C6 gliomové linie

Pro studium signalizace C6 linie *in vitro* byly použity C6 buňky kultivované v kulturačním RPMI 1640 médiu s 10% FTS samostatně, nebo s přidáním $1 \cdot 10^{-6}$ M (krátkodobě – 2h) či $1 \cdot 10^{-8}$ M (dlouhodobě – 10 dní a $1 \cdot 10^{-6}$ M 2h před stanovením) PAMAM-GlcNAc₈ podle postupu v kap. 2.2.2.3., str. 30. Pro stanovení změny exprese α -proteinových podjednotek *in vivo* byly použity nádorové tkáně experimentálních zvířat použitých při předchozích stanoveních (tab. 2., str. 34, exp. č. 1). Stanovení α -proteinových podjednotek bylo provedeno stejným způsobem jako u imunokompetentních buněk u následujících skupin:

| Skupina | kontrolní | krátkodobá inkubace s GN8 | dlouhodobá inkubace s GN8 |
|-----------------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| <i>In vitro</i> | K | C6+GN8 | C6/GN8 |
| <i>Ex vivo</i> | K | 1xGN8 | 3xGN8 |
| <i>Graf</i> | KONT. | GN8 | GN8+ |

Tab. 10.: Odpovídající skupiny pro *in vitro* a *ex vivo* stanovení α -proteinových podjednotek nádorových buněk.

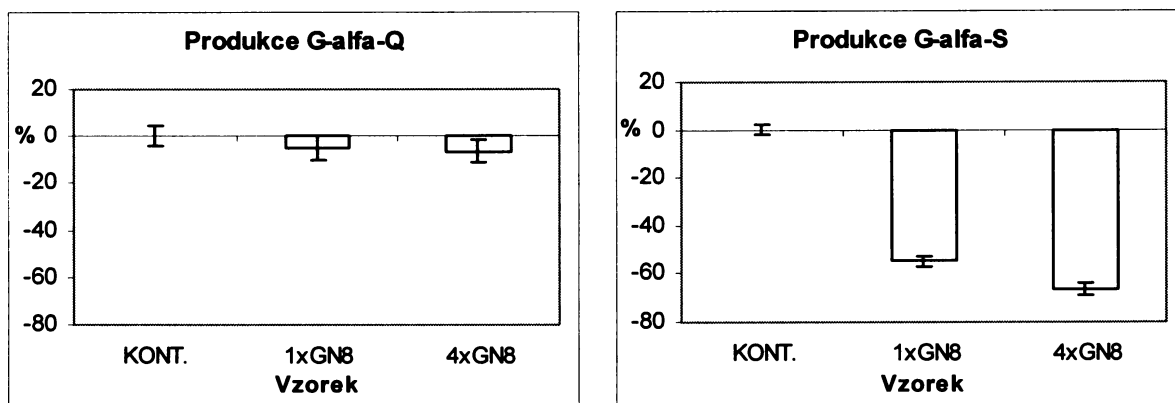
Výsledky stanovení α -proteinových podjednotek C6 gliomových buněk metodou ELISA znázorňují následující grafy:



Obr. 22.: Grafické vyhodnocení metody ELISA č. 3/1 v procentech kontroly pro specifické G α -proteinové podjednotky nádorových buněk. Skupiny *in vitro* stanovení jsou znázorněny bíle a *ex vivo* stanovení jsou znázorněny černě. K=kontrola, C6+GN8=krátkodobá inkubace s GN8 odpovídající skupině 1xGN8 *ex vivo* stanovení, C6/GN8=dlouhodobá kultivace s GN8 odpovídající skupině 3xGN8 *ex vivo* stanovení.

Z obr. 22. je patrný značný pokles exprese G α s-proteinových podjednotek v závislosti na počtu podaných dávek glykodendrimeru při *ex vivo* stanovení. Ostatní hodnoty *ex vivo* stanovení a všechny hodnoty *in vitro* stanovení nevykazují prokazatelnou změnu exprese po ovlivnění glykodendrimerem.

V dalším stanovení byl studován pouze účinek *ex vivo* vzhledem k výsledkům předchozího stanovení. Pro druhé stanovení byly použity gliomové tkáně pokusných zvířat z experimentu č.2 použitých při studiu účinku glykodendrimeru na imunokompetentní buňky. Výsledky druhého stanovení ukazují následující grafy:



Obr. 23.: Grafické vyhodnocení metody ELISA č. 3/2 v procentech kontroly pro specifické G_{α} -proteinové podjednotky nádorových buněk u stejných skupin jako při stanovení pro imunokompetentní buňky.

Z obr. 23. je patrný pokles exprese $G_{\alpha s}$ -proteinové podjednotky, který byl rovněž sledován při předchozím stanovení (ELISA č. 3/1, obr. 22, str. 48) a je tedy považován za směrodatný. Pokles v expresi $G_{\alpha q/11}$ -proteinových podjednotek je vzhledem k nízkým hodnotám neprůkazný, i přes fakt, že byl sledován i při předchozím stanovení. Změna v expresi $G_{\alpha i_{1,2}}$ a $G_{\alpha 0}$ -proteinových podjednotek nebyla vzhledem k výsledkům předchozích stanovení sledována.

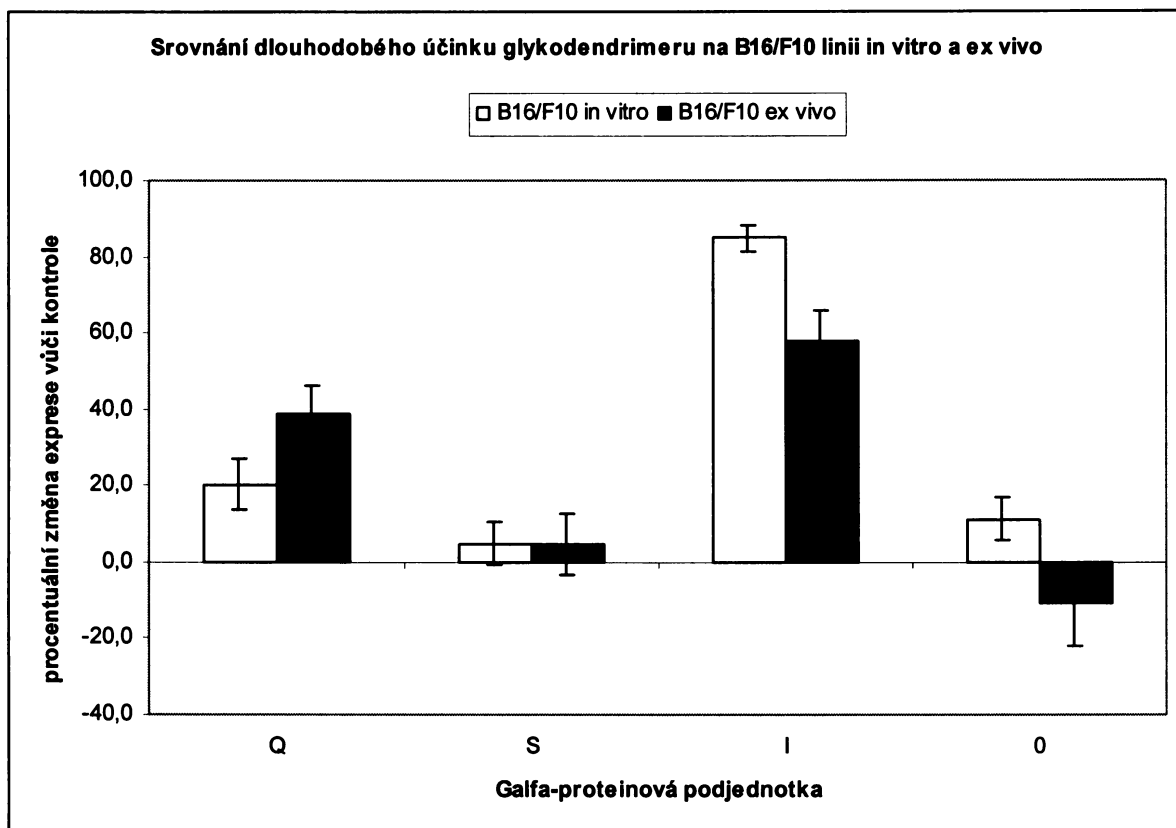
3.2.2. Studium účinku glykodendrimeru na signalizaci B16/F10 melanomové linie

Pro studium vlivu podání glykodendrimeru na G_{α} -proteinovou signalizaci *in vitro* byly použity buňky B16/F10 myši melanomové linie, kultivované stejným způsobem jako linie C6 v předchozí kapitole, s tím, že nebyl studován krátkodobý účinek podání glykodendrimeru (2h, $1 \cdot 10^{-6}$ M GN8). Pro stanovení stejného účinku *ex vivo* byly použity melanomové tkáně experimentálních zvířat v těchto skupinách:

| Skupina: | Dávky <i>in vitro</i> : | Odpovídající <i>in vivo</i> skupina: |
|----------|---------------------------------|--|
| K | Žádná | K – neléčená kontrolní skupina s B16/F10 melanomem |
| 3xGN8 | $1 \cdot 10^{-8}$ M GN8, 10 dní | 3 dávky GN8 (0,015mg/myš) během 10ti dní |

Tab. 11.: Rozdělení skupin experimentálních myši s melanomem s různými dávkami podaného glykodendrimeru. Poslední dávka *in vivo* podání glykodendrimeru byla podána 24hodin před usmrcením.

Porovnání účinku glykodendrimeru na G_{α} -proteinovou signalizaci v *in vitro* a *ex vivo* stanovení metodou ELISA znázorňuje následující graf:



Obr. 24.: Grafické vyhodnocení metody ELISA č. 4 v procentech kontroly pro specifické G_{α} -proteinové podjednotky nádorových buněk B16/F10.

Z obr. 24. je jasně patrný nárůst v expresi $G_{\alpha i}$ -proteinových podjednotek a mírný nárůst exprese $G_{\alpha q}$. Dále je patrné, že účinek glykodendrimeru při *in vitro* i *ex vivo* podání indukuje expresi $G_{\alpha i,2}$ -proteinových podjednotek. Nižší exprese $G_{\alpha i,2}$ -podjednotky v případě *ex vivo* stanovení je pravděpodobně způsobena 24-hodinovou prodlevou mezi poslední dávkou a samotným stanovením (v případě *in vitro* stanovení činila prodleva 2 hodiny).

4. DISKUSE

Práce vychází z předchozích studií, kde byla sledována afinita vazby rekombinantního NKR-P1A buněčného receptoru na různé oligosacharidové ligandy a byla zjištěna nejvyšší afinita vazby na N-acetyl-D-glukosamin.⁴ Tento se v dalších studiích navazoval na dendrimerní nosiče pro docílení sdružení většího počtu NKR-P1 molekul a následného vyvolání silného aktivačního signálu a výkonné efektorové funkce.⁴¹

V této práci byl účinek glykodendrimeru sledován na imunokompetentních slezinných buňkách a nádorových tkáních experimentálních potkanů kmene Wistar, kterým byl implantován syngenní gliom C6 a různé počty dávek glykodendrimeru. Dále byl sledován účinek glykodendrimeru na B16/F10 melanomové linii (syngenní pro kmen myší C57/BL6) pro odlišení „obecného“, či nádorově specifického ovlivnění.

Během studia účinku podání glykodendrimeru na G-proteinovou signalizaci imunokompetentních buněk byla zjištěna zvyšující se exprese $G\alpha_{q/11}$ -proteinových podjednotek. Stejný účinek byl zjištěn během dvou různých procesů kultivace (celých slezinných tkání či izolovaných splenocytů) a byl potvrzen ve dvou nezávislých pokusech s výjimkou extrémních hodnot vykazovaných třetí skupinou ve druhém experimentu - 4xGN8 během všech stanovení, která může být dána variabilitou imunitní odpovědi jednotlivých zvířat. Avšak i přes tyto rozdíly je zachována tendence glykodendrimeru kompetovat s anti-NKR-P1 protilátkou o přenos signálu $G\alpha_{q/11}$ -proteinovou podjednotkou a poukazuje tak na silnou afinitu vazby mezi glykodendrimerem a NKR-P1 receptorem.

Zvýšení exprese $G\alpha_q$ -proteinových subjednotek má za následek aktivaci fosfolipázy $C\beta$ (PLC) a tím i zvýšení koncentrace PLC vytvářených produktů v buněčné cytoplasmě (DAG, IP_3 , následně i koncentrace Ca^{2+} iontů), což patří k časným událostem během většiny forem přirozené cytotoxicity.³⁹ To by mělo vést k nárůstu cytotoxického účinku imunokompetentních buněk proti cílovým, nádorovým buňkám a obecně ke stimulaci imunitního aparátu proti nádorovému onemocnění.

Cytotoxické testy mají ovšem opačný průběh, než implikují výsledky studia G-proteinové signalizace, zde se cytotoxicita s počtem dávek glykodendrimeru snižuje. Výjimku činí třetí skupina druhého stanovení (skupina 4xGN8), která vykazuje nadměrnou cytotoxickou aktivitu, která může být způsobena výrazným nárůstem v zastoupení NKT buněčné subpopulace ($CD8a^+/CD8b^+/NKR-P1^+$), případně dalších subpopulací, které se mohou spolupodílet na cytotoxické výkonné funkci přímo nebo nepřímo ($CD11b/c^+$). I přes nadměrné hodnoty, které během cytotoxických testů skupina

4xGN8 vykazala, jsou tyto stále srovnatelné s cytotoxickým účinkem buněk kontrolní skupiny.

Snížení cytotoxické aktivity může být zapříčiněno ztrátou povrchové exprese NKR-P1A aktivačního receptoru, jak bylo prokázáno průtokovou cytometrií (FACS) na NK buňkách ($CD8a^+/CD8b^-/NKR-P1^+$), který je pro rozpoznání a spuštění lytického procesu (zejména NKR-P1 dependentních IC21 cílových buněk) nezbytný.⁹ Receptor se prokazatelně po interakci s glykodendrimerem internalizuje do buněčné cytoplasmy a následně tak snižuje možnost přenosu signálu (vyjádřenou expresí $G\alpha_{q/11}$ -proteinových podjednotek) původně vyvolaného interakcí s anti-NKR-P1 protilátkou. To by odpovídalo ztrátě cytotoxického účinku proti NKR-P1 dependentní IC21 nádorové linii, která byla v cytotoxických testech pozorována. Příčina tohoto jevu a mechanismus účinku glykodendrimeru nebyl zatím objasněn, ale výsledky v této práci naznačují, že zde dochází ke kompetici s přenosem signálu a funkcí molekuly NKR-P1.

Snížení cytotoxicity proti C6 gliomové a IC21 nádorové linii poukazuje na to, že rozpoznání a následný lytický účinek je zprostředkován v obou případech především buňkami nesoucími NKR-P1 receptor. Průtoková cytometrie navíc prokázala, že působením PAMAM-GlcNAc₈ dendrimerů dochází k internalizaci NKR-P1 molekuly. Toto zjištění je nové a zatím nebylo v literatuře popsáno. Mechanismus internalizace bude pravděpodobně složitější a bude souviset s dalšími receptory, které se v NKR-P1 receptorové doméně běžně vyskytují, protože součástí signálních drah NKR-P1 receptoru je $G\alpha_0$ -proteinová podjednotka, která během signalizačních studií změnu exprese nevykazovala. Ligand se pravděpodobně vzhledem ke svému dendrimernímu charakteru kromě NKR-P1 receptoru váže ještě na další povrchové molekuly v této doméně, popřípadě touto vazbou vyvolává konformační změny v samotném NKR-P1 receptoru a následně v molekulách, které se vyskytují v jeho blízkosti. Tyto změny jsou pak pravděpodobně příčinou přenosu signálu přes $G\alpha_{q/11}$ -proteinovou podjednotku, který byl během práce sledován. Ověření těchto výsledků a bližší charakterizace mechanismu interakce bude předmětem dalšího studia. Signalizace přes $G\alpha_{q/11}$ -proteinovou podjednotku ovšem s NKR-P1 receptorem prokazatelně souvisí, jak bylo sledováno na G-proteinové signalizaci imunokompetentních buněk, kultivovaných v přítomnosti anti-NKR-P1 protilátky, která po vazbě na receptor vyvolala zvýšení exprese $G\alpha_{q/11}$ -proteinové podjednotky.

Naproti tomu reakce nádorových buněk na glykodendrimer se liší v závislosti na orgánové specifitě (expresi povrchových glykoproteinů)^{42,43} Signalizační studie u C6 gliomových buněk poukázaly na snížení exprese G α s-proteinové subjednotky, což má za následek sníženou aktivaci adenylátcyklázy a následný úbytek tvorby druhého posla cAMP. V případě B16/F10 melanomové linie, dochází ke zvýšení exprese G α i_{1,2}-proteinové podjednotky, která má finálně stejný účinek, tj. inhibici adenylátcyklázy. Oba tyto jevy mají za následek úbytek cAMP a sníženou funkci cyklin-dependentních kináz, zodpovědných za vstup buňky do G1 fáze buněčného cyklu. Zabránění vstupu buňky do G1 fáze zastavuje růst nádoru snížením proliferace buněk, která byla prokázána v předchozích *in vivo* experimentech na syngenním myším nádorovém modelu (B16/F10).⁴⁴ Snížení katalytické funkce adenylátcyklázy by mělo být ověřeno stanovením enzymové aktivity a bude předmětem dalšího studia, stejně jako proliferační a apoptotické studie takto ovlivněných nádorových buněk.

Dále je z obou stanovení jasný fakt, že glykodendrimer účinkuje odlišnou cestou na obě nádorové linie. V případě gliomové linie C6 je ze srovnání *ex vivo* a *in vitro* stanovení prokazatelný vliv imunitního aparátu, případně podpůrných buněk přítomných v nádorové tkáni, jelikož po *in vitro* podání glykodendrimer G-proteinovou signalizaci neovlivňuje. Účinek glykodendrimeru na C6 buněčnou linii je tedy nepřímý.

V případě B16/F10 melanomové linie je výsledek *ex vivo* a *in vitro* stanovení srovnatelný a vede nás k závěru, že na tuto linii glykodendrimer působí přímo. Snížení exprese G α i_{1,2}-proteinové podjednotky v případě *ex vivo* stanovení je pravděpodobně zapříčiněno delší časovou prodlevou před samotným stanovením, protože při *in vitro* stanovení byla prodleva 2 hodiny a při *ex vivo* činila 24 hodin po podání poslední dávky. Proto výsledky obou stanovení považujeme za srovnatelně stejné. Z tohoto závěru plyne skutečnost, že na změnách v G-proteinové signalizaci B16/F10 nádorové linie se imunitní aparát nijak výrazně nepodílí, nebo je jeho účinek na G-proteinovou signalizaci nádorových buněk „přehlušen“ účinkem glykodendrimeru.

Tato zjištění poukazují na interakci glykodendrimeru s NKR-P1 buněčným receptorem jak bylo původně zamýšleno. Výsledky v této práci ovšem ukazují na nový jev, který během této interakce nastává – a to na internalizaci NKR-P1 receptoru po podání glykodendrimeru. Mechanismus a příčina tohoto jevu by měla být co nejdříve objasněna, aby mohl být tento negativní účinek odstraněn. Pochopení a popsání mechanismů této interakce by mělo být předmětem dalšího studia.

5. ZÁVĚR

Získané poznatky o účinku glykodendrimeru lze charakterizovat následovně:

Bylo zjištěno, že GlcNAc₈ dendrimery ovlivňují jak lymfoidní, tak i nádorové buňky, a že účinek glykodendrimerů je přímo závislý na počtu podaných dávek v *in vitro* i *ex vivo* systému.

Z analýzy průtokovou cytometrií plyne závěr, že glykodendrimer indukuje nárůst v zastoupení NKT-buněčné subpopulace a vyvolává internalizaci NKR-P1 receptoru.

Signalizační studie poukazují na kompetici glykodendrimeru s anti-NKR-P1 protilátkou při přenosu signálu zprostředkovaného Gα_{q/11}-proteinovými podjednotkami a zvýšení exprese těchto podjednotek v závislosti na počtu podaných dávek. Kompetiční studie poukazuje na afinitu glykodendrimeru k NKR-P1 receptoru.

U nádorových buněk snižuje expresi Gα_s-proteinových podjednotek (u C6 linie) a zvyšuje expresi Gα_{i1,2}-proteinových podjednotek (u B16/F10 linie).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Krejsek J., Kopecký O.: *Klinická imunologie*. Nucleus HK, Pardubice (2004)
- 2 Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy Imunologie*. Triton, Praha (1998)
- 3 Bier O. G., da Silva W. D., Götze D., Mota I.: *Základy imunologie*. Avicenum, Praha (1984)
- 4 Bezouška K., et. al.: *Nature*, 372, 150-157 (1994)
- 5 Chambers, W. H., Vujanovic N. L., DeLeo A. B., Olszowy M. W., Herberman R. B., Hiserodt J. C.: *J. Exp. Med.*, 169:1373 (1989)
- 6 Vivier E., Tomasello E., Paul P.: *Curr. Opin. Immunol.*, 14, 306-311 (2002)
- 7 Hofer E., Sobanov Y., Brostjan Ch., Lehrach H., Dühler M.: *Immunol. Rev.*, 181, 5-19 (2001)
- 8 Biassoni R., et. al.: *Immunol. Rev.*, 181, 203-214 (2001)
- 9 Li J., Rabinovich B.A., Hurren R., Shannon J., Miller R.G.: *Inter. Immunol.*, 15(3), 411-416 (2003)
- 10 Ryan J. C., Seaman W. E.: *Immunol. Rev.*, 155, 79-89 (1997)
- 11 Cerwenka A., Lanier L. L.: *Nature Rev. Immunol.*, 1, 41-49 (2001)
- 12 Wiltrout R. H., et al.: *J. Exp. Med.*, 160, 1431-1449 (1984)
- 13 Fogler W. E., et al.: *J. Immunol.*, 156, 4707-4714 (1996)
- 14 Biron C. A.: *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 24-34 (1997)
- 15 Glas R., et al.: *J. Exp. Med.*, 191, 129-138 (2000)
- 16 Smyth M. J., Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H.: *Nature Rev. Cancer*, 2, 850-861
- 17 Biron C. A., Nguyen K. B., Pien G. C., Cousens L. P., Salazar-Mather T. P.: *Rev. Immunol.*, 17, 189-220 (1999)
- 18 Street S. E., Cretney E., Smyth M. J.: *Blood*, 97, 192-197 (2001)
- 19 Cohen E. P.: *Trends Mol. Med.*, 7, 175-179 (2001)
- 20 Bruce A., et. al.: *Molecular biology of the cell, Garlands science*, (2002)
- 21 Souhami R. L., et. al.: *Oncology, second edition, vol. 2, Oxford University press* (2002)
- 22 Kovář J.: *Buněčná proliferace a mechanismy její regulace*. PPF UK, Praha (1999)
- 23 Perussia B.: *Nat. Immunol.*, 5, 373 (2000)
- 24 Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie 2*. PPF Masarykovy univerzity, Brno (1999)
- 25 Spiegel A. M., Weinsin L. S., Shenker, A.: *J. Clin. Invest.*, 92, 11119-25 (1999)
- 26 Weiss J., *FASEB J.*, 11, 346-354 (1997)
- 27 Conklin B.R., Borune H.R.: *Cell*, 73, 631-641 (1993)
- 28 Gershengorn M.C., Osman R.: *Endocrinology*, 142, 2-10 (2001)
- 29 Hausdorff W. P., et al.: *FASEB J.*, 4, 2881-2889 (1990)
- 30 Le Vine H.: *Mol. Neurobiol.*, 19, 111-149 (1999)
- 31 Chuang T. T., et al.: *TiPS*, 17, 416-421 (1996)
- 32 Sowa M.E., Wei H., Wensel T.G., Lichtare O.: *PNAS*, 97, 1483-1488 (2000)
- 33 Hamm H. E., et al.: *J. Biol. Chem.* 273, 669-672 (1998)
- 34 Maghazachi A. A., Al-Aoukaty A.: *FASEB J.*, 12, 913-924 (1998)
- 35 Lukšan O.: *Diplomová práce*, 24 (2003)
- 36 Leibson P. J.: *Immunity*, 6, 655-661 (1997)
- 37 Ryan J. C., Niemi E. C., Nakamura M. C., Seaman W. E.: *J. Exp. Med.*, 181, 1911-1915 (1995)
- 38 Frey J. L., Bino T., Kantor R. R. S., Segal D. M., Giardina S. L., Roder J., Anderson S., Ortaldo J. R.: *J. Exp. Med.*, 174, 1527-1536 (1991)
- 39 Brumbaugh K. M., Binstadt B. A., Leibson P. J.: *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* (1998)
- 40 Kerry S., Cambell M., Colomna M.: *Natural Killer Cell Protocols, Cellular and Molecular Methods*, Humanna Press, New Jersey, USA (1999)
- 41 Bezouska K.: *J. Biotech.*, 90(3-4), 269-290 (2002)
- 42 Mani K., Cheng F., Havsmark B., David S., Fransson L.A.: *J. Biol. Chem.*, 279, 12978-12923 (2004)
- 43 Mujoo K., Spiro R.C., Reisfeld R.A.: *J. Biol. Chem.*, 267, 10299-10305 (1986)
- 44 Vannuci L., et. al.: *Int. J. Oncol.*, 23(2), 285-296 (2003)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů:

| Jméno a příjmení s adresou | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|-----------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
|--|--|--|--|