

Bio

Ročník 27 • Číslo 4/2017

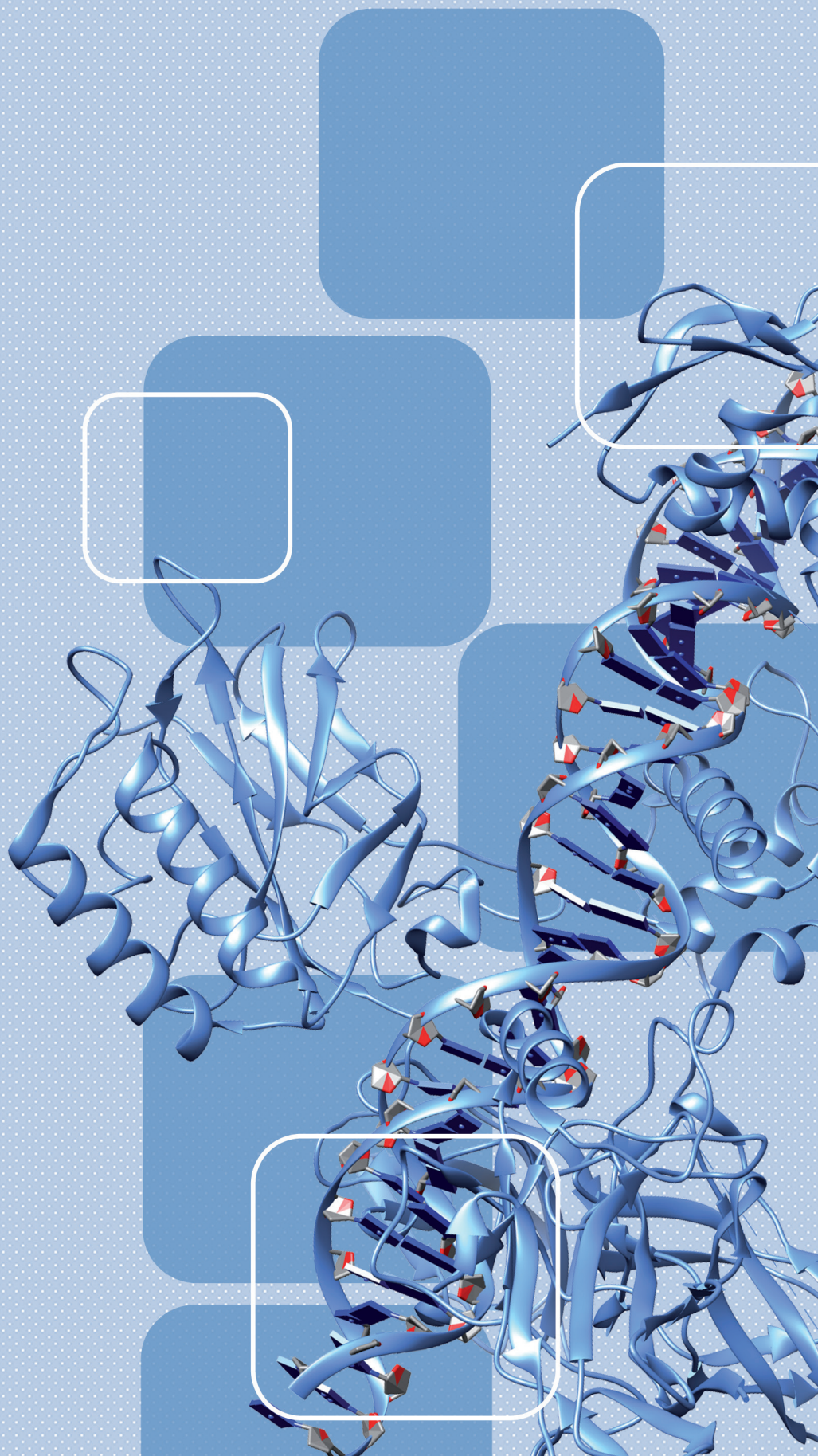
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

končí rok 2017, který byl bohatý na události v naší společnosti a je na místě se zamyslet nad našimi aktivitami v příštím roce. Mezi naše permanentní aktivity patří zajištění kvalitního obsahu čtyř čísel Biopropectu. Proto se na Vás obracíme s žádostí o zaslání vhodných příspěvků i návrhů na témata, která by Vás zajímala. Z další naší ediční činnosti můžeme počítat se speciálním číslem časopisu *Biotechnology Advances* pod zastřešujícím názvem „Prospects in Biotechnology“ vydávaným v anglickém jazyce nakladatelstvím Elsevier. Zatím otevřená zůstává náplň našich obvyklých seminářů a jejich termíny. O možnostech účasti na zahraničních akcích Vás informujeme pomocí měsíčního (a někdy i mimořádného) zpravodaje Evropské biotechnologické federace (Newsletter EFB). Pokud nejste dosud zařazení do e-mailového servisu, stačí nám oznámit Váš zájem a budete zařazení. V příštím roce můžeme doporučit účast na Evropském biotechnologickém kongresu (EBC 2018), který se bude konat 1. – 4. července 2018 ve švýcarské Ženevě (www.ecb2018.com).

Již v r. 2016 ISAAA (viz výroční zpráva ISAAA – International Service for the Acquisition for Agri-Biotech Association, www.isaaa.org) citovala zprávu U.S. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, že biotechnologické (GM) plodiny se neodlišují od konvenčně pěstovaných plodin z hlediska rizika pro lidské zdraví a životní prostředí. Toto prohlášení bylo vydáno na základě stanoviska více jak 100 předních vědců, včetně nositelů Nobelovy ceny. Prohlášení má podpořit názor, že biotechnologie v zemědělství je významným prostředkem pomáhajícím řešit tíživé problémy jako je hlad, podvýživa a chudoba v mnoha částech světa i klimatické změny. Současný stav využívaných i testovaných geneticky modifikovaných plodin lze nalézt na výše uvedených webových stránkách ISAAA. Zájemci,

kterí chtějí tuto problematiku sledovat, mohou dostávat e-mailem zadarmo měsíční zpravodaj (newsletter), pokud si jej na uvedených stránkách objednají. Vrátit se k problematice genetických modifikací zemědělských plodin mě přiměla zpráva, že oxfordským vědcům se podařilo zvýšit výnosy rýže až o 50 %. Rýže, vedle pšenice a kukuřice, patří mezi 3 nejvýznamnější obiloviny zajišťující lidskou výživu a proto je tento úspěch velmi významný. Tohoto výsledku bylo dosaženo vnesením jednoho kukuřičného genu do genetické výbavy rýže, čímž se změnil způsob její fotosynthesy. Ze školních lavic si možná ještě pamatujete, že rostliny používají Calvinův cyklus k produkci cukrů ze vzdušného CO₂, ale při tom používají různý způsob jeho fixace, který je uzpůsoben environmentálním podmínkám, ve kterých rostlina vegetuje. Z tohoto pohledu rozlišujeme 3 typy fotosynthesy (resp. rostliny), které označujeme C3, C4 a CAM (=crassulacean acid metabolism, u rostlin vegetujících za velkého horka a sucha). Tyto metabolické dráhy pro fixaci CO₂ mají různé výhody a nevýhody. C3 mechanismus je vhodný pro chladné a vlhké prostředí, zatímco mechanismus C4 je výhodný pro teplé a slunné prostředí a CAM pro velmi teplé a suché prostředí. Běžná rýže používá C3 metabolickou dráhu, která je za teplého a suchého počasí málo efektivní. Metabolická dráha C4, kterou využívají kukuřice a čirok je za běžných klimatických podmínek efektivnější. Vědci předpokládají, že „přeprogramováním“ rýže z C3 fotosynthesy na C4 se zvýší její produktivita až o 50 % (<http://www.ox.ac.uk/research/innovation-and-partnership/news-and-events>). Vzhledem k významu rýže pro lidskou výživu by zavedení jejích vyšších výnosů představovalo významný příspěvek k podpoře potravinových zdrojů pro rostoucí populaci.

Na druhé straně řešení zmíněných sociálních poměrů lze podpořit nejen zvyšováním produkce potravin, ale také jejich racionálnějším využíváním. Říjnový editorial zpravodaje Food Engineering & Ingredience (www.fei-online.com) pod názvem „From farm to fork to elsewhere“ přináší podrobnou statistiku neuvěřitelného plýtvání potravinami v „bohatém“ světě. Konkrétně, roční potravinový odpad v EU činil 89 milionů tun, což odpovídá 180 kg na jednoho obyvatele. Podle WWF: Z každých tří kalorií vyprodukovaných potravin je jedna kalorie nevyužita. Tyto nevyužité kalorie by mohly uživit 10 x více obyvatel než mají USA nebo dvojnásobek obyvatel Číny nebo trojnásobek podvyživených na planetě. Tyto alarmující údaje jistě stojí za zamyšlení.

Na závěr našeho úvodníku bychom Vám rádi popřáli příjemné prožití vánočních svátků a pro příští rok pevné zdraví, spokojenost a splnění všech Vašich přání v osobním i profesním životě.

Těšíme se na další spolupráci
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová



Upozorňujeme Vás na nové webové stránky EFB připravené k jejímu 40. výročí založení:
www.efbiotechnology.org



18TH EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY
1-4 JULY, 2018 • GENEVA, SWITZERLAND



www.ecb2018.com



tfigroup



VÝZNAMNÉ ŽIVOTNÍ JUBILEUM prof. Ing. MICHALA DOHÁNYOSE, CSc.

Zakládající člen naší společnosti a její dlouholetý funkcionář prof. Ing. Michal Dohányos, CSc. se v plné svěžesti dožívá 13. prosince 80 let. Michalovi přejeme pevné zdraví a těšíme se na pokračující spolupráci.

Michal se narodil v kouzelném městě jihovýchodního Maďarska Békéscaba, kde v dřívějších dobách žilo více Slováků než Maďarů. Svoji chemickou kariéru zahájil vystudováním chemické průmyslovky v Bratislavě (1957). Po jejím absolvování byl jeho profesní život již plně spojen s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, kterou absolvoval v roce 1962. Zde také získal titul, CSc. (1967) a pak zde působil na katedře technologie vody jako odborný asistent, vědecký pracovník, docent a od r. 1994 jako profesor pro obor technologie vody na Ústavu technologie vody a prostředí. Zastával celou řadu významných funkcí, jako např. proděkan pro vědu a výzkum Fakulty technologie ochrany prostředí VŠCHT, vedoucí Ústavu technologie vody a prostředí, člen vědecké rady a akademického senátu Fakulty technologie ochrany prostředí a řady komisí. Od r. 2013 působí na VŠCHT jako emeritní profesor. Jeho pedagogická činnost byla velmi pestrá. Přednášel Anaerobní čistírenské procesy, Kalové hospodářství čistíren odpadních vod, Bioinženýrství a Biotechnologie v ochraně životního prostředí. Samozřejmě vedl velký počet diplomových a doktorských disertačních prací.

Tato pedagogická činnost vycházela z jeho rozsáhlé výzkumné činnosti, která zahrnovala biologické čištění odpadních vod, anaerobní čistírenské procesy, čištění odpadních vod a stabilizaci kalů, vysokovýkonné anaerobní reaktory, anaerobní rozložitelnosti xenobiotik, vývoj metod pro stanovení aktivity anaerobní bio-

masy, stimulaci a intenzifikaci anaerobní stabilizace kalů a produkci a využívání bioplynu, zapracování bioplynových stanic, kofermentaci, minimalizaci produkce kalů a jejich hygienizaci. Profesor Dohányos působí v Biotechnologické společnosti od jejího založení, kde zastával funkci místopředsedy a v současné době je členem revizní komise. Je též členem a bývalým dlouholetým předsedou Odborné skupiny Kaly a odpady při České vodohospodářské společnosti (nyní při České asociaci pro vodu) a v mezinárodní organizaci International Water Association (IWA) působil ve výkonných radách dvou odborných skupin (IWA Specialist Group on Anaerobic Digestion a IWA Specialist Group on Sludge Management).

Profesor Dohányos publikoval 375 vědeckých prací, podílel se na 8 učebních textech a na napsání několika knih. Přednesl množství přednášek nejen v ČR, ale i v zahraničí. Je také nositelem 13 patentů. Všichni, kteří prof. Dohányose znají, si ho váží nejen pro jeho znalosti a pedagogické schopnosti, ale i pro jeho skvělé osobní vlastnosti.

Milý Michale, všichni Ti přejeme mnoho dalších let aktivního života!

Za všechny přátele
z Biotechnologické společnosti
Jan Káš

VZTAH STRUKTURY A FUNKCE RNA DEPENDENTNÍCH RNA POLYMERAS VYBRANÝCH VIRŮ

Anna Dubánková, Evžen Bouřa

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR; Dubankova@uochb.cas.cz

Úvod

Centrální dogma molekulární biologie popisuje cestu přenosu genetické informace: replikaci DNA podle DNA, transkripci DNA do RNA a translaci RNA do proteinů¹. Replikace RNA dle RNA templátu, která je zprostředkována třídou enzymů zvaných RNA dependentní RNA polymerasy (RdRp), stojí mimo toto schéma. RdRp jsou buď evolučně staré proteiny z dob, kdy byla RNA primárním genetickým materiálem, nebo se u virů vyvinuly *de novo*. V každém případě však mají zásadní funkci v současné biologii. RdRp jsou kódovány širokou řadou RNA virů, které je využívají k replikaci svého genomu a syntéze mRNA.

Viry jsou obligátně intracelulární paraziti, jejichž genetický materiál může být uložen buď v podobě DNA, nebo RNA. Replikace virového genomu i samotná produkce virových partikul je závislá na hostitelské buňce. Často je kvůli vysoké mutační rychlosti obtížné rozdělit viry do jednotlivých tříd a čeledí. Nejrozšířenější je Baltimorova klasifikace¹, která člení viry na základě jejich genetické informace obsažené ve virionech, strategie replikace a genové exprese.

O cestě, kterou virus získá mRNA, částečně vypovídá jeho genom: nukleová kyselina (NA z angl. „nucleic acid“) uložená buď ve dvouvláknové (ss z angl. „single strand“), nebo jednovláknové (ds z angl. „double strand“) formě. ssRNA pak může být v podobě plus anebo minus na základě jejího směru. Plus ssRNA má stejný směr jako mRNA a může být tedy okamžitě translatována hostitelskou buňkou. Minus ssRNA je komplementární k mRNA a před translací musí být přepsána do plus ssRNA (Tab. I).

Tab. I: Baltimorova klasifikace virů. Zařazení virů do (sub) tříd na základě jejich genomu a replikační strategie.

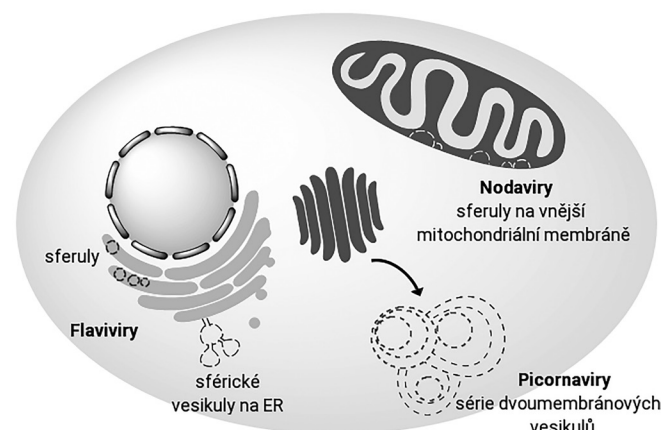
Genom		Zástupci
DNA	dsDNA	Adenovirus, Herpesvirus, Poxvirus
	ssDNA	Parvovirus
RNA	dsRNA	Reovirus
	plus ssRNA	Picornavirus, Flavivirus, Coronavirus
	minus ssRNA	Paramyxovirus, Rhabdovirus
RT	dsDNA	Hepadnavirus
	plus ssRNA	Retrovirus

*RT – reversní transkriptasa

Replikační továrny

Replikace virů probíhá v takzvaných replikačních továrnách. Replikační továrny jsou intracelulární membránové kompartmenty, které zvyšují efektivitu replikace a chrání replikační komplex před neadaptibilním imunitním systémem. Tyto továrny vznikají přeuspořádáním hostitelských membrán a lze je rozdělit na dva typy: cytoplasmatické a jaderné. Jaderné replikační továrny vytvářejí převážně velké DNA viry, zde se budeme zabývat především cytoplasmatickými replikačními továrnami plus RNA virů. V rámci cytoplasmatických replikačních továren můžeme dle uspořádání membrány rozlišit sferuly a dvoumembránové vesikuly.

Sferuly jsou invaginace na membránách různých organel. Na vnitřním povrchu endosomů a lysosomů vytváří své replikační továrny alphaviry, Semliki Forest virus, Sindbis virus a Rubella virus (virus zarděnek)². Nodaviry vytváří sferuly na vnější mitochondriální membráně³.



Obr. 1: Replikační továrny vybraných plus ssRNA virů.

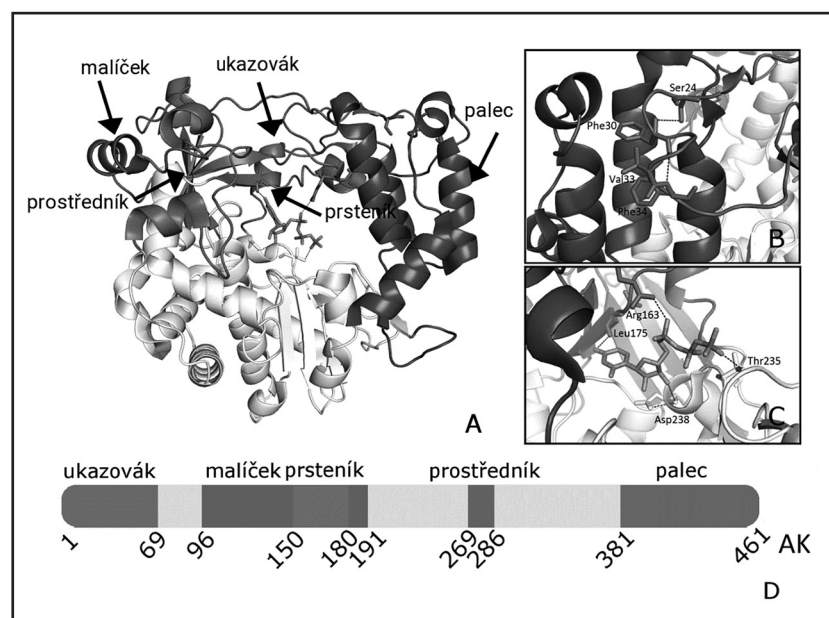
Picornaviry vytváří sérii dvoumembránových vesikulů odvozených od Golgiho aparátu. Flaviviry vytváří sférické vesikuly pučící z endoplasmatického retikula (ER). Mezi vesikulem a ER se nachází hrdlo, které umožňuje přepravu virové RNA⁴. Picornaviry vytvářejí sérii překrývajících se dvoumembránových struktur odvozených od Golgiho aparátu. Takovéto útvary se jeví jako multilamelární vesikuly. Replikační továrny těchto virů jsou schématicky vyobrazeny na Obr. 1. Dosud není znám přesný mechanismus, jakým dochází k uvolnění vzniklé RNA z takovýchto multilamelárních vesikulů, je možné že slouží jen ke skladování virové RNA⁵.

RNA dependentní RNA polymerasy (RdRp)

RdRp hrají významnou roli v replikačním cyklu RNA virů, mají důležitou katalytickou funkci, replikaci RNA. RdRp katalyzují tvorbu fosfodiesterové vazby mezi ribonukleotidy v nově vznikajícím vlákně RNA. Všechny známé RNA viry používají k replikaci svého genomu RdRp⁶. V současné době jsou struktury virových RdRp intenzivně studovány. RdRp mají evolučně konzervovanou terciární strukturu, takzvanou strukturu pravé ruky, která zahrnuje jednotlivé domény zvané: prsty (vyjma palce), dlaň a palec^{6,7}. Tyto strukturní prvky jsou společné i pro DNA dependentní DNA polymerasy, DNA dependentní RNA polymerasy a RNA dependentní DNA polymerasy (reversní transkriptasy)⁸.

Krystalové struktury RdRp ukazují jejich dvě základní konformace: sevřenou a otevřenou dlaň⁹. V konformaci sevřené dlaň dochází k interakci domén prstů a palce skrze N – konec proteinu a smyček vyčnívajících z prstů (tzv. konečků prstů), které obklopují aktivní místo enzymu¹⁰⁻¹¹. Doména prstů se skládá ze 4 propletených strukturních motivů, které jsou pojmenovány po jednotlivých prstech ruky: ukazovák, prostředník, prsteník a malíček, jak je uvedeno na Obr. 2.

Motiv ukazováku se nachází na N – konci RdRp, vytváří smyčku, která vede přes celý protein k palcové doméně a zpět. Motiv prostředníku se skládá z antiparalelních β – skládaných listů s β – otočkou na konečku prstu. Motiv prsteníku zaujímá strukturu dvou antiparalelních β – skládaných listů, které vedou skrz aktivní centrum RdRp. Koneček prstu ukazovákového motivu sahá do hydrofobní kapsy palcové domény (která se nachází na na C – konci proteinu⁷) a tím vytváří NTP (NTP z angl.: „nucleotide triphosphate“) vstupní kanál (Obr. 2).



Obr 2: Strukturní domény RdRp. Na obrázku A je uveden model RdRp z polioviru v komplexu s UTP (PDB ID 2IM2^{13,18}). Na struktuře jsou označeny jednotlivé domény: dlaň, palec a prsty, které jsou rozděleny na jednotlivé strukturní motivy: ukazovák, prostředník, prsteník a malíček. V části B je detail fenylnalaninových zbytků 30 a 34 ukazovákového motivu, které interakcí s palcovou doménou vytváří NTP vstupní kanál. V části C je zobrazen detail vazby UTP. Na obrázku D je schematicky znázorněna aminokyselinová sekvence RdRp polioviru, na kterém jsou označeny jednotlivé domény. Čísla pod schématem značí umístění motivu v počtu aminokyselin.

Klíčové interdoménové kontakty tvoří dva konzervované fenylnalaniny. Přerušením této interakce dojde k dramatickému poklesu elongační aktivity proteinu¹²⁻¹³. Celkem byly ve strukturách RdRp nalezeny tři důležité kanály: templátový kanál, který slouží ke vstupu templátu RNA, NTP kanál pro vstup nukleosidtrifosfátů a centrální kanál, kterým odchází dvouvláknová RNA ven z enzymu¹⁴.

U virových RdRp je pozoruhodná jejich vysoká chybovost. Většina lidských polymeras je vysoce přesná i účinná. Pro viry bylo evolučně výhodnější upřednostnit účinnost před přesností. Virové polymerasy díky své nízké přesnosti vytváří mnoho variant své genomové RNA, a proto dokáží soupeřit s adaptivním imunitním systémem. Bylo ukázáno, že existuje jedna bodová mutace, která markantně zvýší přesnost RdRp polioviru, čímž znemožní viru rychle mutovat¹⁵.

RdRp – mechanismus replikace RNA

Katalytický cyklus RdRp plus RNA virů se skládá z šesti kroků, během kterých dochází k opakovanému otevření a uzavření aktivního místa. V prvním kroku je navázán RNA templát a aktivní místo je otevřeno. V druhém kroku dochází k vazbě nukleotidu do aktivního místa na základě párování basí, což vede ke třetímu kroku: uzavření aktivního místa a tvorbě tzv. prekatalytického komplexu. Ten iniciuje čtvrtý krok, ve kterém RdRp přechází do tzv. postkatalytického stavu. V následujícím pátém kroku je aktivní místo znovu otevřeno. Předpokládá se existence kroku šest, ve kterém dochází k translokaci proteinu podél templátové RNA¹⁶. V prvním cyklu vznikne minus ssRNA, která je použita jako templátová RNA pro druhý cyklus, při kterém vzniká plus ssRNA. Plus ssRNA může být použita jako mRNA pro translaci,

templát pro replikaci, nebo jako substrát pro enkapsidaci do virové kapsidy. Plus ssRNA genom je translatován jako jeden polyprotein, který je nascentně štěpen do tří polyproteinů: P1, P2 a P3. Polyprotein P1 je prekursor virových strukturních proteinů, P2 a P3 jsou prekursory nestrukturních proteinů.

Dvoukovový mechanismus

Pro enzymatickou aktivitu RdRp je nezbytná přítomnost dvou dvoumocných kovových iontů^{16,17}. Přicházející NTP je doprovázen dvěma ionty kovu (většinou hořčíku), které se vážou na fosfát nukleotidu a dva evolučně konservované aspartáty. První iont kovu koordinuje α – fosfátovou skupinu NTP a 3' OH skupinu primeru a karboxyl. Druhý iont kovu koordinuje β – a γ – fosfátovou skupinu NTP. Při této katalýze leží akceptory vodíkové vazby v identické poloze pro všechny správné Watson – Crickovy páry basí, reakce tedy majoritně probíhá pro korektní párování¹⁸.

Závěr

Plus RNA viry jsou rozsáhlá skupina virů, která zahrnuje významné lidské patogeny

způsobující závažná onemocnění jako je dětská obrna, SARS, žlutá zimnice, ebola a další.

Replikace RNA těchto virů probíhá na membránových útvarcích zvaných replikační továrny. Klíčovou roli v replikaci RNA hrají virové RdRp. Tyto RdRp jsou esenciální pro množení viru a následnou virovou infekci. Znalost přesného mechanismu jak biologické funkce, tak i způsobu, jakým manipulují s hostitelskými buňkami, je nezbytný k vývoji nových vysoce specifických inhibitorů.

Literatura

1. Baltimore D: Bacteriol. Rev. 35, 235 (1971).
2. Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng WP: Virology 405, 579 (2010).
3. Miller DJ, Schwartz MD, Ahlquist P: J. Virol. 75, 11664 (2001).
4. Welsch S, Miller S, Romere-Brey I, et al.: Cell Host Microbe 5, 365 (2009).
5. Netherton CL, Wileman T: Curr. Opin. Virol. 1, 381 (2011).
6. Ahlquist P: Science 296, 1270 (2002).
7. Hansen JL, Long AM, Schultz SC: J. Mol. Biol. 267, 1109 (1997).
8. Ollis DL, Brick P, Hamlin R, et al.: Nature 313, 762 (1985).
9. Richards OC, Ehrenfeld E: Current Topics in Microbiology and Immunology 89 (1990).
10. Ferrer-Orta C, Arias A, Escarmís C, et al.: Curr. Opin. Struct. Biol. 16, 27 (2006).
11. Ferrer-Orta C, Ferrero D, Verdaguer N: Viruses 7, 4438 (2015).
12. Hobson SD: EMBO J. 20, 1153 (2001).
13. Thompson AA, Albertini RA, Peersen OB: J. Mol. Biol. 366, 1459 (2007).
14. Belov GA, Fogg MH, Ehrenfeld E: J. Virol. 79, 7207 (2005).
15. Pfeiffer JK, Kirkegaard K: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 7289–7294 (2003).
16. Gong P, Peersen OB: Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 22505 (2010).
17. Jablonski SA, Morrow CD: J. Virol. 69, 1532 (1995).
18. Steitz TAA: Nature 391, 231 (1998).

Souhrn

Dubánková A., Bouřa E.: Vztah struktury a funkce RNA dependentních RNA polymeras vybraných virů

RNA viry při své replikaci manipulují s membránami hostitelských buněk, aby vytvořily tzv. replikační továrny. Tyto továrny napomáhají tvorbě replikačního komplexu a zároveň chrání před aktivací imunitního systému hostitelské buňky.

Virové RNA dependentní RNA polymerasy (RdRp) jsou enzymy, které virům umožňují replikovat svůj genom a také připravit mediátorovou RNA pro translaci virových proteinů. Díky své relativní evoluční konzervovanosti jsou RdRp dobrým cílem pro design léčiv.

Klíčová slova: RNA dependentní RNA polymerasa (RdRp), replikační továrna, RNA viry, replikace RNA

Summary

Dubánková A., Bouřa E.: Relationship of structure and function of RNA dependent RNA polymerases of selected viruses

RNA viruses manipulate host cell membranes to create replication factories during its replication. These factories help the creation of replication complex and at the same time protect from host cell innate immunity activation.

Viral RNA dependent RNA polymerases (RdRps) are enzymes which enable RNA viruses to replicate their genome and to prepare mRNA for translation of viral proteins. RdRps are good targets for drug design thanks to its relative evolutionary conservation.

Keywords: RNA dependent RNA polymerase (RdRp), replication factory, RNA virus, RNA replication

ZKŘÍŽENÁ PREZENTACE ANTIGENU – MECHANISMUS A BIOLOGICKÝ VÝZNAM V KONTEXTU IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Šárka Boháčová^{1,2}, Kvido Stříšovský¹

¹Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, ²Katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova; kvido.strisovsky@uochb.cas.cz

Úvod

Imunitní systém sestává z části adaptivní a vrozené. Jedním z důležitých úkolů fagocytů vrozené imunity je vhodným způsobem předkládat (prezentovat) nebezpečné pohlcené antigeny buňkám adaptivní části imunitního systému – hlavně T lymfocytům, a tím je aktivovat (tzn. spustit jejich diferenciaci a klonální expanzi)¹. Toho jsou schopné makrofágy a zejména DC, společně označované jako profesionální antigen-prezentující buňky (APC).

Že se jedná o antigeny potenciálně nebezpečné, rozpoznává neadaptivní imunita pomocí pattern recognition receptorů (PRR), které jsou specifické například pro bakteriální lipopolysacharidy, či virovou DNA. Kromě těchto tzv. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), mohou být signálem nebezpečí i danger-associated molecular patterns (DAMPs) – struktury spojené s poškozením vlastních tkání, např. ATP či jiné nukleosidy a DNA vazebné proteiny.

Pokud fagocyt zaznamená přítomnost PAMPs či DAMPs, zvýší se jeho aktivita, mnohem efektivněji pohlcuje vzorky svého okolí, vystavuje přítomné proteiny na MHC glykoproteinech, exprimuje kostimulační molekuly a produkuje cytokiny. Typ PRR, které jsou aktivovány, určuje, jakým konkrétním způsobem se aktivuje APC a následně jak konkrétně se polarizuje imunitní odpověď, přičemž záleží také, v jaké části organismu byly antigeny zachyceny. Dendritické buňky se dělí na řadu subpopulací a předpokládá se, že každá je schopna aktivovat T lymfocyty trochu jinak.

Při setkání dendritické buňky s T lymfocyt, který je specifický pro antigen vystavený na jejím povrchu, dochází k těsné interakci těchto dvou buněk – utváří se imunologická synapse². Součástí imunologické synapse jsou molekuly antigen specifické, adhezní a kostimulační. T lymfocyt se váže svým T-buněčným receptorem (TCR) na komplex MHC-antigenní peptid, kostimulační molekuly jako CD80, CD86 a mnohé další se propojují se svými protějšky na T lymfocytu (CD28 aj.). Cytokiny hrají roli nejen v aktivaci T lymfocytu, ale také v následné diferenciaci do konkrétního buněčného podtypu. Vhodná prezentace antigenu spočívá tedy v poskytnutí všech tří typů signálů – MHC-peptid komplex, kostimulační molekuly, cytokiny. Pokud lymfocyt nedostane potřebné signály, nedochází k aktivaci a je naopak umlčen. Tímto způsobem je zajištěno, že aktivovány jsou pouze ty lymfocyty, které jsou právě potřeba (co do specifity). Prezentace antigenu je tedy zásadní proces, jímž vrozená imunita předává zprávu imunitě adaptivní.

Antigen-prezentující a rozpoznávající buňky

Aby buňka mohla prezentovat antigeny buňkám imunitního systému, musí na svém povrchu nést MHC glykoproteiny, které jsou v komplexu s peptidy rozpoznávány prostřednictvím TCR. MHC-I glykoproteiny nesou na svém povrchu všechny jaderné buňky a prezentují na nich své vnitřní antigeny³. Umožňují tak imunitnímu systému kontrolu nad svým vnitřním obsahem. Fragmenty z proteinů exprimovaných uvnitř buňky jsou v komplexu s MHC-I rozpoznávány cytotoxickými T lymfocyty (CTL, efektorové stadium CD8+ T lymfocytů, kdy CD8 je koreceptor uplatňující se při vazbě na MHCI), jednou z hlavních výkonných složek adaptivní imunity⁴.

Pakliže je buňka napadena intracelulárním patogenem, či nádorově transformována, projeví se to na skladbě peptidů prezentovaných na jejích MHC-I molekulách. To rozpozná CTL a buňku usmrtí. Schopnost zabít tělní buňky, jenž představují riziko pro zbytek organismu, je velmi důležitá. Tímto způsobem je eliminováno šíření virové či intracelulární bakteriální nákazy nebo bujení nádoru. Na druhou stranu to představuje i potenciálně nebezpečný mechanismus, pokud CTL omylem zaútočí na zdravé a pro tělo nezbytné buňky, jako jsou třeba β buňky slinivky břišní produkující inzulín. Jejich prostřednictvím tak vznikají mnohá autoimunitní onemocnění nebo opožděné alergické reakce (hypersenzitivita IV. typu).

Aktivita CTL musí být proto dobře regulována a CTL rozpoznávající vlastní antigeny jsou efektivně eliminovány jednak při jejich vývoji v brzlíku a následně i na periférii. K jejich aktivaci, jenž zahrnuje diferenciaci z naivního CD8+ T lymfocytu na CTL a významnou klonální expanzi, je třeba APC, typicky DC. Ta pohltí a v lymfatických uzlinách či slezině vhodně předloží antigen, k němuž je naivní T lymfocyt specifický. Až pak může CTL zaútočit na buňky, jenž na svém povrchu nesou stejný komplex MHC-I-peptid, jako nesla DC. K zabíjení buněk využívají CTL různých mechanismů, například a především lysosomálních váčků s obsahem cytotoxických látek granzymů a perforinů.

MHC-II glykoproteiny nesou konstitutivně pouze profesionální APC a jsou na nich prezentovány peptidy pocházející z vnějšího prostředí⁵. Mezi profesionální APC řadíme makrofágy, DC a B lymfocyty, ale také Langerhansovy buňky (DC kůže) a Kupferovy buňky (jaterní makrofágy). Některé buňky mají schopnost změnit se v APC za stimulačních podmínek. V zánětlivém prostředí jsou tohoto schopny některé epiteliální buňky. MHC-II molekuly rozpoznávají CD4+ T lymfocyty, souhrnně označované jako pomocné T lymfocyty (CD4 je opět koreceptor podílející se na vazbě k MHC-II). Pomocné T lymfocyty jsou na rozdíl od CTL velmi širokou skupinou T lymfocytů s rozmanitými funkcemi podmíněnými produkcí odlišných cytokinů⁵. Zjednodušeně se však dá říct, že jejich rolí je vskutku napomáhání imunitní odpovědi. Jejich prostřednictvím jsou diferencovány, aktivovány, či ve své funkci podporovány nebo naopak potlačovány efektorové lymfocyty (CTL a B lymfocyty produkující protilátky) stejně tak jako samotné APC a další pomocné T lymfocyty.

Oproti těmto klasickým cestám prezentace antigenů ovšem existují výjimky. CD8+ T lymfocyty totiž nejsou schopny rozpoznávat antigenní peptidy na MHC-II, jejich CD8 koreceptor umožňuje interakci jedině s MHC-I. Přitom musí být pomocí APC aktivovány dříve, než diferencují na efektorové CTL. APC sice nesou oba typy glykoproteinů (MHC-I i MHC-II), poněvadž jsou jadernými buňkami, ale běžnou cestou antigenní prezentace by se na MHC-I neměly dostat žádné antigeny pocházející zvenčí. Prakticky by tak mohly být aktivovány jedině CTL specifické k vnitřním antigenům z APC. V případě, že by sama APC byla nakažena intracelulárním patogenem, tento mechanismus by byl dostačující. V řadě případů však patogen infikuje pouze určité tkáně a APC nikoliv. Také nádory mohou být odvozeny od spousty jiných tělních buněk. Proto existuje takzvaná **zkřížená prezentace antigenu**, kdy se na MHC-I glykoproteinech mohou objevit antigeny z vnějšího prostředí⁶. Z analogického důvodu, kvůli aktivaci pomocných T lymfocytů, se na MHC-II mohou vyskytnout antigeny vnitřní, což je založeno na procesu autofagie.

MHC-I

Podívejme se nyní blíže na jednotlivé molekulární složky účastnící se prezentace antigenů. MHC je zkratka z anglického výrazu major histocompatibility complex, která byla zavedena během transplantačních experimentů, pro genovou oblast odpovědnou za odmítnu-

tí transplantátu příjemcem. V dnešní literatuře se však používá pro označení příslušné genové oblasti i samotných proteinů. Lidské MHC proteiny jsou běžně označovány také zkratkou HLA (human leukocyte antigen).

Exprese a skládání MHC-I

Geny HLA-I jsou exprimovány u všech jaderných buněk. Jejich produkty jsou membránově vázané glykoproteiny fungující v podobě heterodimeru s invariantním beta2-mikroglobulinem (β_2m). K jejich skládání tak dochází v endoplasmatickém retikulu (ER). Je to složitý proces, který vyžaduje přítomnost mnohých chaperonů: kalnexinu a kalretikulinu (chaperony lektinového typu), ERp57 (thiol-oxidoreduktasa patřící mezi protein-disulfid-izomerasy) a tapasinu⁷. Po translokaci do ER těžký řetězec MHC-I asociuje s kalnexinem a s ERp57. Dochází ke sbalení a následně propojení s β_2m . Poté se místo kalnexinu připojuje kalretikulin, tapasin a utváří se tzv. peptide loading complex (PLC), v překladu komplex vázající peptid na MHC. Jeho součástí je kromě již zmíněných molekul transportér asociovaný se zpracováním antigenu 1 (TAP1) a TAP2, které společně utváří transportní kanál pro peptidy generované v cytosolu proteazomem, a též aminopeptidasy ERAP1 a ERAP2, které přichází peptidy upravují na vhodnou délku. PLC zajišťuje nasazení vhodného peptidu do vazebného žlábků HLA-I.

Buněčné proteiny, které jsou poškozené či již nejsou potřeba, jsou označovány řetízky ubiquitinu a rozpoznány a degradovány proteazomem. Proteazom je multipodjednotkový komplex, jehož jednotlivé podjednotky se podílí na rozpoznání, vazbě, rozložení a enzymatické degradaci substrátových proteinů⁸. Některé podjednotky proteazomu mohou být za stimulačních podmínek (IFN gama) vyměněny a vzniká tzv. imunoproteazom, který generuje odlišné peptidy než proteazom běžný. Zvyšuje se tak šance, že některý z peptidů bude rozpoznán T lymfocyty. Peptidy z proteazomu jsou obvykle dlouhé okolo 9 aminokyselin (AMK) a ty, které jsou delší, jsou uvnitř ER dále zastříženy na délku 8 – 10 AMK aminopeptidasami ERAP1 a ERAP2. Různé peptidy transientně asociují s HLA-I a až některý vytvoří dostatečně stabilní komplex, je HLA-I kompletní. Peptid musí být přichycen do žlábků dost silně, aby v něm vydržel transport a pobyt na buněčném povrchu. Pouze správně složené molekuly HLA-I s navázaným peptidem se přesouvají do Golgiho aparátu (GA), kde dochází k jejich další glykosylaci a následnému transportu na plasmatickou membránu.

MHCII

Klasické HLAII molekuly jsou označovány jako HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP³. Podobně jako HLA-I, tvoří heterodimery, nikoli však s invariantním β_2m . Oba partneři jsou kódováni pospolu, označují se jako geny A a B (HLA-DRA, HLA-DRB, atd.). Výsledná struktura HLAII je podobná struktuře HLA-I, prezentované peptidy však mohou být delší než 9 AMK a přesahovat vazebný žlábek.

Exprese MHCII a vazba antigenních peptidů

Na MHCII molekulách jsou vystavovány převážně peptidy pocházející zvenčí, které některá z APC pohli-

tila prostřednictvím fagocytózy, pinocytózy, receptorem zprostředkované endocytózy, trogocytózy, či pohlcením exosomů⁸. V případě B lymfocytů jsou vnější struktury zachytávány B receptorem a internalizovány společně s ním receptorem-indukovanou endocytózou. Dendritické buňky a makrofágy zachycují kromě patogenů také apoptotická tělíska, fragmenty z nekrotických buněk a částice opsonizované protilátkami či komplementem. Zdrojem endogenních peptidů mohou být autofagosomy. Ve všech případech se antigenní proteiny dostávají do endosomů. Jejich zrání je aktivováno PRR, jako jsou Toll-like receptory (TLR), které rozpoznají přítomnost určitých PAMPs či DAMPs. Endosomy pak splývají s lysosomy, které obsahují peptidasy (aminopeptidasy, karboxypeptidasy, cathepsiny) a vzniká pozdní endosom, nebo též fagolysosom. Peptidasy nashtěpí proteiny na peptidy asi 25 AMK dlouhé, dále jsou zastříženy na délku 14 – 15 AMK. V pozdním endosomu, označovaném jako MHCII kompartment, pak dochází k navázání vzniklých peptidů do žlábků MHCII.

MHCII je složeno v ER, přesto zde nedochází k navázání endogenních peptidů do žlábků – tomu brání invariantní gama řetězec (Ii), který se k heterodimeru připojuje⁹. Zároveň ho i stabilizuje a navádí směrem do fagolysosomu. Ve fagolysosomu je pak invariantní gama řetězec odštěpen cathepsinem B, ale část, která blokuje vazebný žlábek, zůstává (označuje se jako CLIP). Výměnu CLIPu za některý z antigenních peptidů katalyzují neklasické MHCII molekuly jako HLA-DM, které umožňují výměnu CLIPu za peptid aniž by došlo k poškození struktury MHCII. Teprve když antigenní peptid vytvoří s MHCII dostatečně stabilní komplex, může tento být transportován na buněčný povrch váčkovým transportem.

Fyziologický význam zkřížené prezentace antigenu

Zkřížená prezentace antigenů je proces, kdy jsou exogenní struktury (obvykle peptidy) prezentovány na MHC-I glykoproteinech. Aktivace CD8+ T lymfocytů tímto mechanismem se označuje jako zkřížená aktivace (cross-priming). Poprvé byla pozorována při transplantacích experimentech již v 70. letech¹⁰. Později bylo zjištěno, že zkřížená prezentace hraje roli nejen pro aktivaci, ale i navození tolerance u CD8+ T lymfocytů^{11,12}. Cytotoxická aktivita CD8+ T lymfocytů je zásadní při eliminaci intracelulárních patogenů a nádorových buněk. Schopnost tolerance brání vzniku autoimunitních onemocnění a možnost jejího navození je zásadní při transplantacích.

Mezi APC, jejichž úkolem je pomocí zkřížené prezentace aktivovat CD8+ T lymfocyty, patří zejména DC^{13,14}, neboť právě jejich odstranění brání procesu aktivace i tolerizace CD8+ T lymfocytů. Nejedná se však obecně o všechny typy DC¹⁵. Některé podtypy DC jsou *in vivo* schopny zkřížené prezentovat lépe za běžných nezánných podmínek, jiné naopak vyžadují zánětlivé podmínky. Zkříženě prezentující podtypy DC jsou obvykle popisovány pomocí povrchových markerů jako CD8 α + či CD103+, dosud však není jasné, co konkrétně způsobuje, že prezentují lépe.

Intracelulární patogeny – víry, bakterie, parazité

V případě, že virus neinfikuje DC ale pouze určitou tkáň, CD8+ T lymfocyty nemohou být aktivovány běžnou MHC-I prezentací¹⁶. Samotné nakažené tkáňové buňky nejsou schopny CD8+ T lymfocyty aktivovat, neb sice nesou MHC-I-peptid komplexy, ale chybí jim příslušné kostimulační molekuly. Zkřížená prezentace exogenních antigenů na MHC-I v dendritických buňkách je tudíž prakticky jediným mechanismem, jak může být CTL odpověď v tomto případě generována. Příkladem může být virus Epstein-Barrové, jenž infikuje zejména B lymfocyty a v některých případech způsobuje vznik nádorů¹⁷. V rámci DC nebyla detekována exprese virových proteinů, což vylučuje možnost jejich nakažení. V primární fázi infekce jsou latentní virové antigeny v umírajících B lymfocytech pohlceny a zkříženě prezentovány DC, které aktivují CD8+ T lymfocyty. Ty následně efektivně potlačují rozvoj onemocnění.

Některé víry disponují mechanismy, jimiž brání klasické MHC-I prezentaci a snaží se tak uniknout imunitnímu systému, kupříkladu lidský cytomegalovirus (CMV). Ten dokáže poměrně výrazně potlačit funkci imunitního systému, přičemž zásadní je narušení funkce DC¹⁸. CMV mimo jiné výrazně negativně ovlivňuje schopnost DC aktivovat CD8+ T lymfocyty. Bylo zjištěno, že na aktivaci CD8+ T lymfocytů specifických proti CMV se proto podílí nenakažené DC, jenž pohltí antigeny zvenčí a prostřednictvím zkřížené prezentace je vystaví na svém MHC-I¹⁹. Zkřížená prezentace hraje významnou roli i během mnohých dalších virových onemocnění, ač pravděpodobně ne tak výlučnou, jako ve výše zmíněných. Příkladem zde může být virus chřipky²⁰.

Z bakteriálních onemocnění se jedná například o tuberkulózu, způsobenou patogenem *Mycobacterium tuberculosis*²¹. Ten ukrytý uvnitř makrofágů uniká protilátkám, komplementu i fagocytům. Pokud však nakažená buňka zahyne apoptózou, DC ji pohltí a zkříženě aktivuje CD8+ T lymfocyty, jenž mohou následně zlikvidovat zbytek nakažených buněk společně s infekcí. Existují také mnohobuněční intracelulární parazité, vůči nimž je zkřížená prezentace významným obranným mechanismem, například *Chlamydia trachomatis*²².

Tolerance

DC indukují toleranci u CD8+ T lymfocytů zejména v případě, kdy nejsou stimulovány k maturaci²³ prostřednictvím PRR, zánětlivých cytokinů či již aktivovaných T lymfocytů. Tehdy DC exprimují málo kostimulačních molekul a CD8+ T lymfocyty tak neobdrží dostatečně silný aktivační signál. Následně dochází k jejich delecii, či anergii, kdy sice v těle zůstávají, ale na antigeny nijak nereagují. Pro navození tolerance je rovněž důležitá abundance příslušného antigenu. Pokud se antigen vyskytuje v těle ve velkém množství a po dlouhou dobu, u CD8+ T lymfocytů je navozena tolerance. V některých případech však tento mechanismus evidentně selhává a DC namísto tolerance indukují rozvoj autoimunitního onemocnění. Typickým příkladem je diabetes I typu, kdy jsou prostřednictvím CTL, aktivovaných zkříženou prezentací, zlikvidovány β buňky pankreatu jenž pro-

dukují inzulin²⁴. A konečně, v případě transplantací je zkřížená aktivace CD8+ T lymfocytů důležitým mechanismem podílejícím se na odvržení transplantátu²⁵. Pokud by bylo možné zde uplatnit poznatky z fyziologické tolerogenní činnosti DC, mohli bychom transplantát před útokem CTL specificky ochránit.

Nádorová onemocnění

CD8+ T lymfocyty zkříženě aktivované vůči nádorovým antigenům jsou zásadní pro likvidaci nádorových buněk²⁶. Samotné nádorové buňky T lymfocyty aktivovat nemůžou. Jejich fragmenty musí být pohlceny DC v rámci spádových lymfatických uzlin a vystaveny na MHC-I. Avšak v mnohých případech organismus nevytváří dostatečně silnou CTL odpověď a nádorové onemocnění se rozvíjí. Dalo by se říct, že v řadě aspektů je bující nádor příliš podobný našemu organismu, antigeny jsou přítomny trvale, současně se nevyskytují známky zánětu či patogenů, a místo aktivace je tak u T lymfocytů navozena tolerance²⁷.

Je zřejmé, že význam zkřížené prezentace v rámci imunitního systému je velký, a proto je dodnes velmi intenzivně studována. Kvalitní porozumění jejímu mechanismu by medicíně poskytlo nový přístup, jak léčit autoimunitní onemocnění, rakovinu či efektivně transplantovat orgány bez nutnosti celkové imunosuprese. Bohužel i přesto jak dlouho se zkřížená prezentace nejrovněžší vědecké skupiny věnují, kompletní molekulární mechanismus stále není objasněn. V následujících kapitolách se pokusím shrnout, co je o molekulárním mechanismu zkřížené prezentace doposud známo.

Základní molekulární mechanismy zkřížené prezentace

Již několikrát bylo zmíněno, že principem zkřížené prezentace je vystavit antigenní peptid pocházející z extracelulárního antigenu na MHC-I. Aby k tomuto došlo, je zřejmé, že antigen musí být nejprve naštěpen na peptidy o vhodné délce a ty se musí navázat na MHC-I molekuly. Principiálně existuje mnoho variant, jak by k něčemu takovému mohlo dojít, dnes je však obecně přijímán koncept dvou hlavních intracelulárních cest, kterými zkřížená prezentace může proběhnout – tzv. cytosolickou či vakuolární cestou. Prvním společným krokem je vždy internalizace antigenu zvenčí. Cesta cytosolická je pak charakteristická výstupem antigenu z fagosomu do cytosolu, kde dochází k degradaci prostřednictvím proteazomu. Cesta vakuolární naopak výstup antigenu z fagosomu neuvažuje, dle ní přímo ve fagosomu dochází k naštěpení na peptidy a jejich následnému navázání na MHC-I. Cytosolická cesta je v poslední době dělena ještě na dva podtypy dle místa, kde vzniklé peptidy nasedají na MHC-I. „ER cesta“ předpokládá navázání v rámci ER, zatímco „fagosomální/endosomální cesta“ uvažuje navázání ve fagosomu/endosomu, kam jsou nezbytné komponenty z ER dopraveny. Proces zkřížené prezentace je složitý, založený na komunikaci mezi fagocytózou, endocytózou a klasickou MHC-I prezentací. Je rovněž ovlivněn řadou aspektů, mezi nimiž je velmi významný způsob pohlcení antigenu.

Cytosolická cesta

První důkaz existence cesty fagosom → cytosol a v souvislosti tedy i možnosti, že by skutečně mohla existovat cytosolická cesta zkřížené prezentace, byl podán v roce 1995²⁸. Po tomto objevu byla nasnadě varianta, že pohlcenému antigenu, který pronikl do cytosolu, by nemuselo nic bránit v napojení se na dobře prozkoumanou cestu klasické MHC-I prezentace. Ve snaze tuto variantu ověřit vznikla řada studií, z jejichž výsledků byla vyvozena základní koncepce cytosolické cesty zkřížené prezentace. Dle ní pohlcený antigen opouští fagosom, je degradován proteazomem v cytosolu, pomocí TAP transportován do ER, kde je navázán na MHC-I, a následně v komplexu MHC-I-peptid exportován na buněčný povrch²⁸.

Význam TAP pro zkříženou prezentaci však není tak zřejmý, jak se zpočátku zdálo. Je důležité si uvědomit, že pokud TAP nefunguje, na čemž byly studie založeny, na MHC-I molekuly nemohou být ani klasicky navázány peptidy a komplex pak nemůže být transportován na buněčný povrch²⁹. Dnes je stále jistější, že významným zdrojem MHC-I molekul pro zkříženou prezentaci mohou být MHC-I recyklované z buněčného povrchu. Narušení zkřížené prezentace při umlčení exprese TAP tak může být pouze důsledkem nefunkčnosti klasické MHC-I dráhy jako takové³⁰.

Zapojení proteazomu do procesu zkřížené prezentace je ověřováno použitím jeho inhibitorů. Existuje však podezření, že narušení zkřížené prezentace při jeho inhibici nemusí být přímým důsledkem zapojení proteazomu, ale důsledkem nedostatku ubiquitinu (Ub). Pokud je zablokován proteazom, budou se totiž hromadit ubiquitinylované proteiny označené takto pro degradaci. Ub se účastní též modifikace histonů a při jeho nedostatku může docházet k deubikvitinylaci a změně genové exprese, která nakonec může být tím, co ovlivní průběh zkřížené prezentace³¹.

Model cytosolické cesty zkřížené prezentace je postaven na faktu, že obsah fagosomu se musí dostat do cytosolu. Jak k tomu ale dochází? Bylo vysloveno několik teorií, mezi nimi např. varianta prasknutí fagosomu, která je ovšem výrazně nefyziologická. Takovýto proces by pravděpodobně spustil u DC apoptózu³². Mnohem pravděpodobnější je varianta, že na membrány fagosomů se dostává nějaký proteinový komplex, který únik proteinů z fagosomu umožňuje. Vzhledem k tomu, že dochází ke splývání fagosomů s membránami z ER³³, zdá se pravděpodobné, že onen proteinový komplex by mohl pocházet rovněž odtud. V ER jeden takový komplex je, účastní se procesu označovaného jako ER-asociovaná degradace (ERAD). Proteiny v ER, které se nezládnou složit do nativní konformace, jsou mechanismem ERAD exportovány vně ER, do cytosolu, označeny Ub a degradovány proteazomem. Je to velmi důležitý proces, neboť pokud by špatně sbalené proteiny nemohly z ER uniknout, hromadily by se zde a brzy začaly působit na buňku toxicky. Proteinový komplex těchto vlastností je přesně to, co by fagosom potřeboval k dopravě antigenů ze svého nitra do cytosolu.

Ve velmi recentním článku bylo ověřeno, že ERAD hraje při zkřížené prezentaci významnou roli, konkrétně

jeho složka Sec61³⁴. Sec61 je translokon, který se účastní nejen ERAD procesu, ale rovněž je zcela zásadní pro základní transportní mechanismus ve směru do ER³⁵. Umlčení exprese takového proteinu má pochopitelně řadu důsledků (t.j. může mít pleiotropní efekt). Zehner et al. však význam Sec61 translokonu pro zkříženou prezentaci, a konkrétně pro export jak solubilních tak partikulárních antigenů do cytosolu, elegantně prokázali. Velmi přesvědčivým důkazem bylo zablokování zkřížené prezentace, když donutili Sec61 zůstat v ER prostřednictvím ER-retenční sekvence a necestovat do endosomů, aniž by tím jakkoliv narušili jeho translokační funkci v ER. Že se Sec61 na membránách fagosomů/endosomů obsahujících antigeny opravdu vyskytuje a tudíž může fungovat tak, jak z výsledků vyplývá, bylo již známo dříve³⁶. Nebylo však známo, jak se Sec61 na fagosomální membránu dostává a Zehner et al. ukázali, že tento proces je závislý na signalizaci přes TLR. Přítomnost Sec61 translokonu ve fagosomech/endosomech je tedy ovlivněna přítomností mikrobiálních struktur ve fagosomech/endosomech, které signalizaci skrz TLR iniciují.

Závěrem lze říci, že dnešní koncept cytosolické cesty se od původního trochu liší. Zůstává transport antigenu do cytosolu a jeho degradace proteazomem. Není však jisté, kde dochází k navázání antigenu na MHC-I. Ve hře jsou kromě ER také endocytické kompartmenty, kam jsou komponenty PLC dopravovány³⁷. Je pravděpodobné, že lokalizace navázání antigenu záleží na konkrétní situaci, tzn. na typu antigenu, způsobu jeho pohlcení, konkrétní cytokinové situaci, typu DC a podobně³⁸.

Vakuolární cesta

První článek dokumentující proces vakuolární cesty ukazuje, že ke zkřížené prezentaci antigenu dojde v makrofázích zcela nezávisle na klasické MHCI prezentaci a transportu sekreční dráhou mezi ER a GA³⁹. Na snímcích z elektronového mikroskopu je vidět, že fagosomy obsahující pohlcené bakterie záhy splývají s lysosomy a ani po hodině nedošlo k viditelnému úniku bakteriálních antigenů do cytosolu. Nezávislost na transportu mezi ER a GA naznačuje, že MHC-I molekuly použité ke zkřížené prezentaci musí pocházet z kompartmentů v sekreční dráze postavených až za Golgiho aparátem. V úvahu tedy přichází plasmatická membrána, endocytické a recyklující kompartmenty. Článek pracuje také s variantou zpětného vyvrhnutí zpracovaných antigenů ven z buňky, kde by se mohly navázat na MHC-I, tato varianta však byla pozdějšími pracemi vyvrácena.

Další podobně zaměřená práce byla zveřejněna o tři roky později⁴⁰, kde kromě zablokování proteazomu a dráhy ER-GA, které nevedlo k narušení zkřížené prezentace, byla umlčena také exprese TAP. Bylo zjištěno, že její umlčení sice neblokuje zkříženou prezentaci zcela, ale vede ke snížení intenzity tohoto procesu. Teprve po inkubaci TAP-deficientních makrofágů ve 26 °C došlo k obnovení běžné intenzity zkřížené prezentace. S vysvětlením tohoto jevu přichází v poměrně recentním článku Merzougui et al.³⁰. Inkubace APC při této teplotě vede k obnovení běžných množství

MHC-I-peptid komplexů na plasmatické membráně. A právě recyklované MHC-I z PM se zdají být pravděpodobným zdrojem pro zkříženou prezentaci vakuolární cestou⁴¹. O deset let později je identifikován katepsin S jako klíčový hráč vakuolární cesty zkřížené prezentace⁴².

Efektivita vakuolární cesty zkřížené prezentace se zdá nižší, než v případě cesty cytosolické³⁸. Při zpracování pohlceného antigenu na krátké peptidy se uplatňují fago/endolysosomální proteasy. Je možné, že řada potenciálních antigenních epitopů je takto zničena a proto se efektivita oproti cytosolické cestě snižuje. Vzniklé peptidy jsou následně přímo ve fagosomu navázány na MHC-I. Obecně se tento proces hodně překrývá s MHC-II prezentací. Jaký je však skutečný význam vakuolární cesty oproti cytosolické cestě není známo. Zdá se, že vakuolární cesta se uplatňuje spíše, pokud APC pohltí velké množství antigenů¹⁵. Mohla by se tudíž primárně uplatňovat při zpracování velkých fagocytovaných objektů, jako jsou celé buňky.

Nejdiskutovanější adaptace DC na zkříženou prezentaci

Když DC pohltí nějakou vnější strukturu, dochází ke vzniku intracelulárního útvaru označovaného jako endosom v její cytoplasmě. Pokud se jednalo o větší strukturu (např. celou bakterii), obvykle se užívá označení fagosom. Endocytické váčky vznikají jako vchlípeniny plasmatické membrány, kterýžto proces může být facilitován strukturním proteinem klathrinem (např. internalizace transferrinového receptoru), či nikoliv (např. MHC-I). Po odstranění obalového proteinu pak váčky fúzí a dávají vznik takzvaným třídícím endosomům. Tento název souvisí s pozorováním, že v tomto kompartmentu jsou například oddělovány receptory od jejich nákladu, obsah váčku je tedy tříděn podle toho, co chce buňka zachovat a co degradovat. Panuje zde poněkud kyselejší pH, které umožňuje oddělení receptorů od nákladu. Receptory obvykle putují buď do endosomů recyklačních, odkud jsou transportovány zpět na plasmatickou membránu, nebo mohou být na plasmatickou membránu poslány přímo, tzv. rychlou recyklační cestou. Náklad je naopak často zpracováván v pozdních endosomech splývajících s lysosomy. V imunologické literatuře je toto rozdělení různých typů endosomů obvykle zjednodušováno, kdy recyklující a třídící endosomy jsou slučovány dohromady a označovány jako endosomy časně. Obsah časných endosomů bývá pouze slabě kyselý, směrem k lysozomu pH váčku postupně klesá až k pH 5. Peptidy, které jsou vystavovány při zkřížené prezentaci, musí endocytickými váčky projít, než se dostanou na MHC-I molekuly. Proto problematika endo/fagosomů, jejich okyselování, splývání s dalšími váčky, obohacování o další aktivní proteiny, a podobně, je v souvislosti se zkříženou prezentací studována. Zároveň, za jeden ze základních důvodů, proč dendritické buňky ve zkřížené prezentaci vynikají nad jiné APC, je považována schopnost udržet pohlcené antigeny po dlouhou dobu nenaštěpené.

Již dlouho je známo, že u DC oproti makrofágům je výrazně omezena aktivita lysosomálních proteas a tato

skutečnost je zároveň velmi prospěšná pro účinnost klasické antigenní prezentace na MHC-II⁴³. Snížená proteolytická aktivita nejspíše uchovává pohlcené antigeny s jejich potenciálními epitopy, což může být podstatné zejména pro DC, které putují do lymfatických uzlin několik dní a postupně shromažďují materiál k prezentaci⁴³. Chatterjee et al se zaměřili na význam zjištěného konkrétně pro účinnost zkřížené prezentace u DC⁴⁴. Studovali antigeny internalizované receptorem zprostředkovanou endocytózou. Receptor CD40, který navádí pohlcený materiál do časných endosomů byl sledován mnohem efektivnějším pro následnou zkříženou prezentaci, než receptor DEC205, který navádí antigeny naopak do endosomů pozdních. V pozdních endosomech byly antigeny degradovány dříve, než se mohly dostat do cytosolu, kde by je rozštěpil proteazom a vznikly by tak peptidy vhodné pro nasazení na MHC-I molekuly. Pakliže byla omezena proteolytická aktivita endosomů, zkřížená prezentace opět probíhala efektivně. Pokud však byly podány příliš vysoké dávky inhibitorů proteas, narušilo to i zkříženou prezentaci antigenů cílených na CD40. Z toho vyplývá, že určitá malá míra degradace je před exportem do cytosolu potřeba, ale přílišná proteolytická aktivita v endosomech procesu zkřížené prezentace škodí. Společně s lysosomálními proteasami, které endosomy získávají během zrání, také nižší pH napomáhá účinné degradaci obsahu původního váčku. Neboť většina lysosomálních proteas, má kyselé pH optimum⁴⁵. K okyselování dochází zejména prostřednictvím membránového přenašeče, který koncentruje protony z cytosolu uvnitř váčku na úkor spotřeby ATP, obvykle je označován jako V-ATPasa.

Další mechanismus, vedle nízké koncentrace proteas, který k zachování potenciálních epitopů přispívá, je produkce reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) NADPH oxidasou v endo/fagosomech dendritických buněk^{46–48}. NADPH oxidasa, označovaná jako NOX2, se vyskytuje na membránách fagosomů myších DC, zajišťuje alkalizaci fagosomů, udržuje v nich pH vyšší než 7 a působí tak proti aktivitě V-ATPasy a potažmo proteas. Tím zajišťuje, že pohlcené antigeny jsou degradovány v menší míře a zvyšuje efektivitu zkřížené prezentace⁴⁶. I u lidských DC je NOX2 důležitým hráčem při zkřížené prezentaci antigenů, zřejmě však zde významnou roli vedle produkce ROS hraje i nízká aktivita či rekrutace V-ATPasy, případně nějakého dalšího protonového přenašeče⁴⁷. NOX2 přenáší elektrony z cytosolického NADPH přes fagosomální membránu a produkuje superoxidový anion dovnitř fagosomů. Ten se následně mění v další ROS jako je peroxid vodíku a jiné a přitom spotřebovává přítomné protony. Ve výsledku činnosti NOX2 dochází nejen k produkci ROS, které zabíjejí mikroorganismy ve fagosomech (proces označovaný jako oxidativní vzplanutí), ale zároveň pH uvnitř fagosomů rapidně roste. A právě prostřednictvím pH je tedy pravděpodobně možné proteasy s kyselým optimem ve fago/endosomech DC efektivně regulovat. Tak, aby pohlcené proteiny byly naštěpeny pouze do té míry, která usnadní transport do cytosolu, a přitom maximum potenciálních epitopů bylo zachováno. Mimo to bylo navrženo, že pozitivní role vyššího pH pro zkříženou prezentaci antigenů může být vysvětlována i ji-

nak, než jen prostřednictvím inhibice přílišné aktivity proteas. Je možné, že některý z mechanismů, který je ke zpracování antigenu nezbytný, jako transport antigenu do cytosolu, či samotné nasedání hotových peptidů na MHC-I molekuly, je nízkým pH blokován⁴⁷.

Abyste se NOX2 dostala na fagosomální membránu, je třeba GTPasy Rab27a⁴⁹. Tato GTPasa zajišťuje transport NOX2 na membránu fagosomů prostřednictvím fúze vezikulů podobných lysosomům s vzniklými fagosomy. K rekrutaci NOX2 navíc dochází nezávisle na signalizaci skrze TLR⁴¹. Další identifikovanou molekulou, která se podílí na funkci NOX2 ve fagosomech je GTPasa Rac2⁵⁰. Zajišťuje správné sesednutí komplexu NOX2 na fagosomální membránu, který sestává z několika membránových a cytosolických podjednotek.

Naproti výše zmíněným studiím stojí recentnější výzkum, kde je ukázáno, že NOX2 ovlivňuje aktivitu fagosomálních cysteinových proteas přímo, skrze redoxní reakce a nikoliv prostřednictvím pH⁴⁸. Cysteinové katepsiny (B, S, L) vyžadují pro svou aktivitu redukční prostředí, které NOX2 produkcí ROS narušuje. Autoři studie navrhuje, že se zřejmě jedná o další mechanismus, jak NOX2 reguluje proteolytické vlastnosti fagosomů. To, že nebyl pozorován nárůst pH přisuzují odlišnému experimentálnímu uspořádání, ve kterém bylo pH fagosomů měřeno. Přestože podnikli řadu experimentů ve snaze zopakovat výsledky Savina et al., neuspěli. Ve prospěch svých výsledků argumentují, že jelikož aktivita NOX2 ve fagosomech vede k produkci záporně nabitého superoxidového aniontu, musí být nějak udržována uvnitř fagosomů elektroneutralita, pokud má být funkce NOX2 zachována. A bylo zjištěno, že elektroneutralizačním procesem je zde zejména vstup protonů. Aktivita NOX2 byla výrazně narušena, pokud byla zablokována V-ATPasa společně s dalším protonovým kanálem Hv1. Na jeden vzniklý superoxidový anion by tak byl spotřebován jeden proton při vzniku peroxidu vodíku (mechanismus alkalizace), ale zároveň by jeden proton vešel dovnitř fagosomu (mechanismus udržení elektroneutrálnosti). Tedy ve výsledku by se pH vůbec neměnilo, což podporuje jejich pozorování. Z analýzy literatury je ovšem patrné, že tento model působení NOX2 je hůře akceptován, než výsledky výzkumů a modely z laboratoře Sebastiana Amigoreny^{46,47,49,50}. Jak je vidno, mechanismus působení NOX2 ve zkřížené prezentaci je nejasný a zasluhuje další hlubší a nezávislou analýzu.

Teprve nedávno bylo zjištěno, že DC aktivované skrze TLR jsou schopné zabránit značnému přísunu lysosomálních proteas do fagosomů znemožněním fago-lysosomální fúze⁵¹. Jako hlavní regulátor tohoto děje byla identifikována GTPasa Rab34, jenž zajišťuje nahloučení lysosomů v oblasti okolo jádra. Naopak transkripční faktor TFEB reguluje účinnost zkřížené prezentace negativně⁵². Stimuluje expresi lysosomálních proteas a struktur odpovědných za acidifikaci fagosomů, čímž umocňuje proteolytickou aktivitu a degradaci pohlcených antigenů. Jeho aktivace namísto zkřížené prezentace podporuje antigenní prezentaci na MHC-II. U DC dochází k aktivaci TFEB dlouho poté, co pohltily původní antigen, jenž je stimuloval prostřednictvím TLR ke zkřížené prezentaci. V tom okamžiku jsou již antigenní peptidy v komplexu s MHC-I vystaveny na povr-

chu pro CD8+ T lymfocyty a exogenní antigeny tak mohou začít být zpracovány i pro CD4+ T lymfocyty. Autoři této studie navrhuje, že TFEB funguje jako molekulární přepínač mezi zkříženou a MHC-II prezentací, které obě zpracovávají exogenní antigeny, stimulují však imunitní systém odlišně.

Typickým znakem endosomů, které se účastní zkřížené prezentace v DC, je peptidasa IRAP (insulin-regulated aminopeptidase), kterou obsahují^{53,54}. Pokud není tato aminopeptidasa exprimována, zkřížená prezentace je narušena. Její jméno je odvozeno od již dříve zjištěného výskytu v recyklujících endosomech adipocytů a svalových buněk společně s glukózovým přenašečem Glut4. Pro problematiku zkřížené prezentace je však zejména podstatné, že IRAP je peptidasa příbuzná peptidasám ERAP1 a ERAP2, které jsou důležité při vazbě endogenních peptidů na MHCI molekuly v ER, kde je jejich rolí finální zastřížení peptidů vzniklých v proteazomu na vhodnou délku. IRAP má v porovnání s ERAPy širší spektrum substrátů, které je schopna štěpit a svou aktivitou se vyrovná ERAP1 a ERAP2 dohromady. Nachází se společně s MHCI molekulami v endosomech DC, kam je transportována z endosomálního recyklujícího kompartmentu (ERC). ERAP se v endosomech nenachází a IRAP by tak mohla zde vskutku suplovat její funkci. Pokud byla zablokována exprese IRAP i ERAP zároveň, zkřížená prezentace fagocytovaného antigenu byla narušena ještě více, než při umlčení pouze IRAP⁵³. Z těchto výsledků vyplývá, že se jedná o dvě na sobě nezávislé cesty, jimiž fagocytované antigeny mohou být v DC finálně zastříženy – v ER pomocí ERAP, či v endosomu/fagosomu pomocí IRAP.

Vnitrobuněčný transport komponent mašinerie zajišťující vazbu peptidů na MHC-I

V kapitole o základních molekulárních mechanismech zkřížené prezentace bylo v závěru zmíněno, že dnes není s jistotou známo, kde dochází k navázání antigenních peptidů na MHC-I při cytosolické cestě. Vedle ER, které se zpočátku zdálo jediným možným místem, se totiž objevila další varianta – k navázání by mohlo docházet ve fagosomech, jimiž antigeny do DC vstoupily. Oproti vazbě peptidů na MHC-I v ER tato varianta přináší nespornou výhodu; antigenní peptidy vznikající naštěpením pohlcených částic nemusí kompetovat se spoustou endogenních peptidů a exogenních peptidů z jiných fagosomů, jak tomu je, když vše probíhá společně v ER. Takto se můžou jednotlivé fagosomy plně „soustředit“ na svůj náklad a jeho zkříženou prezentaci. Jak však tato myšlenka vznikla? Hlavním impulzem bylo překvapivé zjištění, že fagosomy obsahují prakticky všechny proteiny, které jsou součástí PLC, tedy mašinerie účastnící se vazby antigenních peptidů na MHC-I v ER^{33,36,55}.

Na základě proteomických studií bylo nejprve zjištěno, že fagosomy z makrofágů obsahují a asociují s proteiny jako Ub-ligasy, proteazomy, TAP komplexy, MHC-I molekuly i Sec61⁵⁵. Podobně i u DC byly v rámci časných fagosomů nalezeny komponenty PLC a další ER-rezidentní proteiny^{33,36}, MHC-I molekuly, kalretiku-

lin, kalnexin, tapasin, Erp57, TAP 1/2 a Sec61/62. Součástí časných fagosomů se staly velmi záhy po pohlcení antigenu, prostřednictvím fúze membrán ER a fagosomu. PLC byl ve fagosomech navíc funkčně propojen a byl schopen katalyzovat vazbu peptidů na MHC-I.

Na základě těchto zjištění byla rozvinuta teorie o vazbě antigenních peptidů na MHC-I ve fagosomech, kdy je antigen v cytosolu naštěpen proteazomem, pomocí TAP se dostávají vzniklé peptidy zpět do fagosomu, a zde je PLC váže na MHC-I molekuly. Po úspěšném nasednutí peptidu na MHC-I je komplex přenesen na buněčný povrch, aniž by se vracel do ER. Komplexy MHC-I:peptid bylo dokonce možné ve fagosomech detekovat. Navíc bylo zjištěno, že i solubilní antigeny se dostávají do váčků, které obsahují komponenty z ER, tudíž tato teorie nebyla nutně omezena jen na velké fagocytované antigeny. Postupem času časné fagosomy dozrávaly ve fagolysosomy a množství ER-rezidentních proteinů v nich klesalo. Pravděpodobně jsou rozštěpeny při umocňující se proteolytické aktivitě ve fagolysosomech.

Jak dochází k fúzi membrán ER a fagosomů u DC bylo objasněno teprve nedávno. Nedochozí k tvorbě fagosomů za přispění membrán ER, ale komponenty z ER se do fagosomů dostávají váčkovým transportem³⁷. Respektive nejde přímo o membrány ER, ale ER-Golgi středního kompartmentu (ERGIC), kde se ER rezidentní proteiny nezbytné pro zkříženou prezentaci shlukují. Specifitu váčkového transportu zajišťuje párování proteinu Sec22b (ERGIC) a Syntaxinu 4 (fagosomy/endosomy). Sec22b je SNARE protein a neboť zajišťuje transport ER rezidentních proteinů z ERGIC nejen do fagosomů, ale i do endosomů, tento proces je zásadní pro zkříženou prezentaci bez ohledu na to, jestli se jedná o antigeny solubilní či partikulární. Do fagosomů/endosomů jsou takto dopravovány proteiny z PLC, struktury podstatné pro export pohlcených antigenů do cytosolu (mohlo by se jednat o komponenty ERAD mašinérie) a v důsledku dochází také ke zpomalení maturace fagosomů (méně fúzí s lysosomy, proteiny uvnitř jsou méně degradovány).

Vnitrobuněčný transport MHC-I molekul

Ať už jsou pohlcené struktury štěpeny v endosomech/fagosomech, či proteazomem v cytosolu, v každém případě se vzniklé antigenní peptidy musí potkat s MHC-I, aby mohly být navázány a následně vystaveny na buněčném povrchu. Z dosavadních výzkumů vyplývá, že k tomu může docházet i v endosomech/fagosomech kam se komponenty mašinérie vázající peptid na MHC dostávají. Jakým způsobem však cestuje do těchto kompartmentů samotné MHC-I molekuly dlouho nebylo (a dosud není zcela) podrobně známo. Dnes se zdá nejpravděpodobnější, že jsou to MHC-I recyklované z plasmatické membrány, které putují skrze různé recyklační kompartmenty, až se setkají s peptidy určenými ke zkřížené prezentaci.

Již delší dobu je známo, že MHC-I molekuly vystavené na povrchu buněk jsou po určité době internalizovány a mohou na ně být znovu navázány jiné peptidy⁵⁶. Tento proces vyžaduje lehce kyselé prostředí

v kompartmentu, kde k „výměně nákladu“ dochází. V předchozí kapitole jsem se věnovala transportu ER-rezidentních proteinů z ERGIC do fagosomů a endosomů. Snadno se nabízí, že MHC-I molekuly by mohly být transportovány stejným mechanismem. Několik pozorování ovšem ukazuje, že tomu tak není. V recentním článku bylo objeveno „hlavní buněčné skladiště“ MHC-I molekul, které je MHC-I molekulami zásobováno nezávisle na fúzi membrán ERGIC a fagosomů, tedy nezávisle na Sec22b⁴¹. Rovněž v případě vakuolární cesty, kdy jiné ER-rezidentní proteiny nejsou pro zpracování antigenu třeba, je zkřížená prezentace na Sec22b nezávislá⁵⁷. Neznámou jsou na tomto poli MHC-I molekuly z povrchu buněk, které jsou společně s pohlcovanými antigeny učiněny součástí fagosomů. Ač by se mohlo zdát, že tyto molekuly budou pro zkříženou prezentaci významné, experimenty tomu zatím nenasvědčují³⁸. Každopádně je dost pravděpodobné, že MHC-I molekuly necestují pouze jedním způsobem ve všech případech. Nedávno bylo například zjištěno, že dlouhé peptidy (které jsou jako typ antigenů studovány, neb se zdají být velmi dobrými kandidáty pro protinádorovou vakcinaci) mohou být v rámci endosomu navázány na nascentní MHC-I molekuly, tedy takové, které na plasmatické membráně ještě vůbec nebyly, a přitom nepřichází ani přímo z ER⁵⁷. Ve výsledku tedy není možné říct, jak se tyto MHC-I molekuly k peptidům dostanou. Je možné, že putují skrze GA rovnou do nějakých recyklačních kompartmentů, či využívají dosud zcela neznámou transportní cestu. V této publikaci bylo rovněž zjištěno, že důležitým materiálem pro zkříženou prezentaci jsou MHC-I s nedokonale navázanými peptidy, jež umožňují snadnou výměnu za jiné.

Na vnitrobuněčném transportu MHC-I molekul se podílí řada Rab GTPas

Protože transport MHC-I molekul buňkou je zřejmě založen na vezikulárním transportu, byla prověřena řada různých Rab GTPas, co do funkce při zkřížené prezentaci⁵⁸. Rab GTPasy jsou proteiny schopné specificky asociovat s různými membránami, přivádět na jejich povrch další komponenty a regulovat tak vezikulární transfer v závislosti na vazbě GTP/GDP. Narušení zkřížené prezentace bylo nalezeno při umlčení exprese dvacíti různých Rab GTPas⁵⁸, z čehož vyplývá, že se jedná o velmi komplexní proces. Mezi nimi, Rab3b/3c GTPasy byly navíc objeveny v kolokalizaci s MHC-I a transferinovým receptorem v tubulárních strukturách poblíž jádra, kam se MHC-I molekuly dostávají po internalizaci. Rab3b/3c tedy označují nějaký recyklující endosomální kompartment a je možné že hrají zásadní roli pro jeho vznik.

O recyklujících endosomech již byla zmínka na začátku kapitoly o adaptacích DC ke zkřížené prezentaci. Je to jedno z míst, kam mohou být přesouvány internalizované struktury. Často jsou souhrnně označovány jako endosomální recyklující kompartment (ERC). Tento se nachází poblíž jádra nebo organizačního centra mikrotubulů a je tvořen směsí tubulů a váčků. Hodnota pH je v něm prakticky neutrální a nedochází v rámci něj k žádnému dozrávání spojenému s okyselením či pro-

teolýzou³⁸. Tubuly ERC vybíhají k plasmatické membráně, kde z nich probíhá recyklace dříve internalizovaných struktur zpět na buněčný povrch. V recentním článku je ERC hlouběji popsáno pomocí super-rezolučních mikroskopických přístupů⁵⁹, které ukázaly, že struktury, které přichází z třídících endosomů, jsou aktivně udržovány v ERC odděleně, aby už nemusely být tříděny znovu. Tudíž s nimi může být rozmanitě nakládáno.

Dnes jsou identifikovány i další Rab GTPasy, které jsou významné pro mechanismus zkřížené prezentace. Jednou z nich je Rab22a⁶⁰, jejíž umlčení výrazně ovlivnilo recyklaci MHC-I molekul a došlo ke značnému zmenšení buněčných zásob MHC-I. Zároveň byla u Rab22a-deficientních DC narušena zkřížená prezentace antigenů solubilních i partikulárních. Za běžných podmínek se Rab22a dostává na membrány fagosomů i endosomů, nejspíše společně s MHC-I. Jaká je však její konkrétní role v rámci mechanismu zkřížené prezentace není dosud známo.

Za jeden z nejvýznamnějších článků poslední doby ohledně vnitrobuněčného transportu MHC-I molekul je považována práce, kde autoři nalézají jednak další GTPasu Rab11a regulující zkříženou prezentaci, zjišťují význam signalizace přes TLR pro transport MHC-I molekul a nakonec nalézají buněčné „shromaždiště“ MHC-I molekul v DC⁴¹. Nejprve bylo zjištěno, že pokud myší DC fagocyticky pohltí nějakou částici (ne solubilní antigen), ať už se jedná o bakterii, nakaženou apoptotickou buňku, či latexovou kuličku konjugovanou s LPS (lipopolysacharid, tvoří vnější část membrány bakterií), následná signalizace přes TLR má pozitivní efekt na zkříženou prezentaci peptidů odvozených od pohlčeného antigenu. Pokud však k signalizaci skrz TLR nedojde, tzn. DC pohltí nenakaženou apoptotickou buňku, CD8+ T lymfocyty nejsou významně aktivovány. Pravděpodobně zde nejde jen o TLR, ale důležité signalizace se účastní i další typy PRR.

Jedním z přímých důsledků aktivace TLR bylo nabohacení MHC-I molekul na fagosomech, kde byly TLR aktivovány. MHC-I molekuly však nepřicházely společně s PLC z ERGIC. Komponenty PLC se na fagosomy dostávaly nezávisle na TLR signalizaci, prostřednictvím Sec22b, kdežto MHC-I molekuly byly hotové skladovány samostatně, převážně v ERC, jehož hlavními markery byly VAMP8, VAMP3 a Rab11a. Internalizace MHC-I z plasmatické membrány nebyla závislá na klathrinu ani dynaminu a transport z třídících do recyklujících endosomů zajistila GTPasa Rab11a. Rab11a hrála zásadní roli pro udržení rezerv MHC-I. Obzvláště zajímavé je, že MHC-I molekuly byly mobilizovány z ERC ve chvíli, kdy DC něco fagocytovala, ale na konkrétní fagosomy přicházely až na popud signalizace skrz TLR. Po aktivaci TLR totiž došlo k aktivaci MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) a následně IKK2 (druhá podjednotka kinasy inhibitoru jaderného faktoru kapa-B), která fosforylovala fagosomální SNAP23 a tím stabilizovala SNARE komplexy vznikající při fúzi fagosomů s ERC. Tyto komplexy tvoří na fagosomální straně SNAP23 a Syntaxin4, na ERC straně VAMP3 a VAMP8. Jedná se tedy o proces, kdy fagosomy obsahující TLR-ligandy jsou selektivně obohaceny o MHC-I molekuly, neboť fúzování s váčky z ERC je

preferované oproti těm fagosomům, které žádné TLR-ligandy neobsahují.

Poznatky o vnitrobuněčném transportu MHC-I molekul, které jsou více méně etablované, lze shrnout do několika vět. MHC-I molekuly mohou být recyklovány z buněčného povrchu a klathrin-nezávislou endocytózou se dostávají do třídících endosomů společně s řadou dalších molekul. Z třídících endosomů může proběhnout rychlá recyklace přímo na plasmatickou membránu, nebo dojde k transportu do ERC. Z ERC se MHC-I molekuly dostávají na popud signalizace skrz TLR do příslušných fagosomů. TLR svou aktivací spouští signální kaskádu, kdy je aktivován MyD88, IKK2 a nakonec fosforylován SNAP23, který stabilizuje SNARE komplexy, které vznikají při splývání ERC a fagosomu. MHC-I molekuly se tak dostanou specificky do fagosomů, které nesou antigeny stimulující TLR. Antigenní peptidy od nich odvozené pak vynesou na buněčný povrch a prezentují CD8+ T lymfocytům. Aby mohly být ony antigenní peptidy na MHC-I molekuly navázány, je nezbytné, aby se do fagosomů dostaly ER-rezidentní proteiny jako je TAP a další. Tyto jsou do fagosomů dopravovány na MHC-I molekulách i signalizaci skrze TLR nezávisle, z ERGIC. Ve výsledku existují tedy dvě hlavní nezávislé transportní cesty zodpovědné za přetvoření fagosomu v kompartment umožňující zkříženou prezentaci.

Mechanismus ERAD a zkřížená prezentace

V rámci kapitoly o cytosolické cestě zkřížené prezentace byl zmíněn nedávno potvrzený význam translokonu Sec61 pro přenos pohlčených antigenů skrze fagosomální membránu do cytosolu. Sec61 je jednak translokon umožňující cestu proteinů sekreční dráhy do ER, mimo to je však schopen i procesu opačného a je tak jedním z kanálů, u nějž předpokládáme roli v rámci ER-asociované degradace (ERAD). Mechanismus ERADu je dosti komplexní, složitý a dosud ne zcela objasněný, podobně jako je tomu u zkřížené prezentace. Obecně se však jedná o souhru mnoha proteinů, jejichž zásadní úlohou je přemístit špatně složený protein z ER do cytosolu, přičemž je ubiquitinylován a následně degradován proteazomem. Takto jsou přenášeny jak proteiny solubilní, tak membránově vázané a je pozorována určitá substrátová specifita v tom smyslu, že rozličné ERAD substráty využívají různé komponenty ERAD mašinérie. Obvykle je rozlišován ERAD-L pro solubilní substráty v lumen ER, ERAD-M pro membránově vázané substráty, které mají špatně složenou doménu v lumen ER nebo v membráně, a ERAD-C pro membránově vázané substráty, které mají špatně složenou doménu v cytosolu. Právě takový transport přes membránu, jako v případě ERAD-L, je potřeba při cytosolické cestě zkřížené prezentace. Dokonce když uvážíme, že ve fagosomu, v němž se nachází antigen, panuje mírně kyselé pH a určitá míra proteolytické degradace, zdá se dost pravděpodobné, že proteiny v něm obsažené budou vykazovat některé charakteristiky špatně sbalených solubilních proteinů v ER. Dá se tedy předpokládat, že Sec61 nebude jediným článkem ERAD mašinérie, který je do fagosomů dopravován. Případně,

že se ve fagosomech nacházejí proteiny jiné, ale s analogickou funkcí ke komponentám ERADu.

Základní mechanismus ERADu špatně složených solubilních proteinů v lumen ER (ERAD-L)

Mechanismus ERADu je studován převážně na kvasinkách. V zásadě ho lze rozdělit do několika důležitých kroků⁶¹. Prvním je jistě rozpoznání špatně sbaleného proteinu. Následně musí být tento protein přenesen přes membránu a již v rámci přenosu, či až po něm, proběhne ubiquitylace. Posledním krokem je pak degradace v proteazomu. K rozpoznání slouží jednak lektiny v lumen ER, neboť řada proteinů je v rámci ER glykosylována, cukerné zbytky jsou následně zkracovány během skládání proteinu do vhodné konformace a pakliže tuto konformaci není schopen po delší dobu zaujmout, nabydou jeho cukerné zbytky konkrétní podoby, kterou rozpoznají lektiny ERADu. Vedle lektinů jsou to pak některé Hsp70 proteiny jako Kar2 a Hrd3, které rozpoznávají vyložené tu špatně sbalenou část proteinu. Po rozpoznání je protein ubiquitylován E3 Ub ligasou specifickou pro ERAD – Hrd1 nebo Doa10. Obě jsou v cytosolické části vybaveny tzv. RING doménou, již asociují s E2 Ub-ligasou nesoucí Ub a následně přenesou tento Ub z E2 na rozpoznávaný protein. Zatím nedefinovanou roli někdy okolo okamžiku ubiquitylace hraje též protein Der1.

Translokace proteinu přes membránu probíhá buď prostřednictvím proteinového kanálu a to před, či současně s ubiquitylací. Alternativní model předpokládá pozměnění struktury fosfolipidové membrány prostřednictvím nějakých proteinových faktorů, které tak sníží energii nezbytnou k překonání této bariéry a umožňují prostup proteinu přímo skrze membránu⁶¹. Každopádně tak, jako import proteinů do ER vyžaduje energii (je poháněn energií samotné proteosyntézy), tak upravená membrána či kanál je pravděpodobně pouze pasivním otvorem, který prostup umožňuje, ale musí zde existovat nějaký pohonný zdroj energie. Zde hraje roli nejspíše cytosolická ATPasa Cdc48 (u savců p97), která za spotřeby ATP uvolňuje protein z membrány.

Retrotranslokony

Který protein vytváří retrotranslokační kanál, případně destabilizuje membránu je předmětem debat. Momentálně jsou zvažovány tři hlavní možné mechanismy pro transport špatně složených proteinů přes membránu ER⁶². Jeden z nich uvažuje jako výstupní kanál Sec61 translokou, druhý E3 Ub ligasu Hrd1 a třetí pseudoproteasu Der1. Je samozřejmě možné, že se tohoto procesu účastní všechny tři zároveň, nebo že záleží na typu proteinu určeného k degradaci. A neboť výstupní kanál je pravděpodobně jednou z nejdůležitějších součástí exportního mechanismu, i vzhledem k roli pro zkříženou prezentaci zde shrnu recentní zjištění o jejich funkci.

Sec61 translokou

Existují články hovořící jak pro, tak proti funkci Sec61 translokou při retrotranslokaci, v závislosti na charak-

teru špatně sbaleného proteinu. Solubilní proteiny tento kanál zřejmě mohou využívat⁶³, na rozdíl od proteinů membránových, které jsou retrotranslokovány jiným mechanismem⁶⁴.

Bohužel zásadním problémem při analýze funkce Sec61 pro ERAD je pleiotropní efekt jeho umlčení/inhibice funkce. V dřívějších studiích byly využívány teplotně senzitivní mutanty Sec61 kanálu, které byly při vyšší teplotě zcela funkční, při nízké teplotě pracovat přestaly. To však stejně znamená, že v okamžiku snížení teploty nefungovaly řádně pro přenos ani tam, ani zpět. Navíc snížení teploty mohlo ovlivnit též stabilitu ERAD substrátu a tím zmírnit jeho degradaci, aniž by zde nefunkčnost Sec61 hrála významnou roli.

V poslední době se však objevila mutace specifická právě pro exportní a nikoliv importní funkci Sec61 translokou. Mutace Y344H (tyrosin na pozici 344 nahrazen histidinem) byla primárně nalezena u myši trpící diabetem⁶⁵. Nedostatek inzulinu byl způsoben apoptózou beta buněk pankreatu v důsledku stresu v ER. Cisterny ER byly zvětšené, což naznačuje, že primárním důvodem mohl být problém v odstraňování špatně sbalených proteinů. Expresí nemutovaného Sec61 v beta buňkách pankreatu vedla k obnovení homeostázy v ER – beta buňky přestaly apoptoticky umírat a došlo k vyléčení diabetu. Při analýze translokou bylo zjištěno, že import proteinů do ER zřejmě narušen nebyl, což bylo ověřeno pomocí analogické mutace translokou u kvasinky⁶⁶. S pomocí těchto mutantů by v budoucnu mělo být snazší analyzovat roli Sec61 pro ERAD či jiné buněčné procesy.

Ubiquitin ligasa Hrd1

Tato E3 Ub ligasa byla v několika recentních pracích označena jako membránový protein umožňující přenos špatně sbalených proteinů přes membránu ER. Má 6 transmembránových domén, což je teoreticky dostačující pro tvorbu transmembránového kanálu.

V jedné z těchto prací byl proces ERADu-L rekonstituován *in vitro* z purifikovaných komponent z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*⁶⁷. Z výsledků vyplývá, že Hrd1 je centrálním proteinem procesu ERAD-L, neb je schopná rozpoznat špatně sbalené proteiny, ubiquitylovat je i sebe a přivést ATPasu Cdc48, která špatně sbalený protein vyprostí z Hrd1 do cytosolu. Hrd1 by tedy byla multifunkční komponentou uplatňující se mimo jiné i jako transmembránový kanál. Použitý experimentální přístup však těmto výsledkům ubírá na věrohodnosti. Z počátku byl celý proces rekonstituován pouze v detergentu. Následně se autoři sice pokusili zopakovat pozorování na membráně proteoliposomu, avšak, vedle špatně sbaleného proteinu, Hrd1 liposomy opouštěla také a ve větší míře. Navíc protein byl asociován s Hrd1 ještě před vytvořením liposomů. Ani jedno by se na membráně ER běžně dít nemělo. O několik let později byl proto proveden podobný výzkum, ve snaze výsledky ověřit⁶⁸. Jako substrát ERADu byla použita mutovaná karboxypeptidasa Y, byla modifikována přídatnou transmembránovou doménou na C konci (CPY*-TM), jejímž prostřednictvím se sama stala součástí proteoliposomu ve fyziologické orientaci. Váček byl poté jemně solubilizován, dodatečně přidaná

Hrd1 se do něj začlenila, a znovu zpevněná. Následně byl detekován export CPY*-TM z proteoliposomu za přítomnosti ATP a ubikvitinylační mašinérie. Bohužel však nebylo ukázáno, že při začleňování Hrd1 do liposomů nedošlo k asociaci s CPY. Pokud by tomu tak bylo, ve výsledku by se tento přístup příliš nelišil od původního. Nelze tedy zcela vyloučit, že Hrd1 sama o sobě kanál nevytváří, ale je pouze jeho částí a ve fyziologických podmínkách potřebuje ke správné funkci třeba právě Der1, či další komponenty.

V každém případě však Hrd1 hraje při retrotranslokaci v rámci ERADu význačnou roli, jak bylo potvrzeno na savcích buňkách⁶⁹. Bylo zde využito speciálně upraveného fluorescentního proteinu (odvozeného od Venus fluorescent protein), který začne fluoreskovat pouze, pokud je nejdříve v ER glykosylován a následně deglykosylován v cytosolu, kam se z ER může dostat jediné retrotranslokací, využívanou při ERADu. Prostřednictvím siRNA byla umlčena exprese různých proteinů, které by při ERADu mohly hrát roli, a byl pozorován vliv na fluorescenci tohoto proteinu. Nejvýznamnější efekt vykazovalo umlčení právě Hrd1 a její další savčí podjednotky, až po ní následoval Sec61 a ještě menší roli hrály homology Der1. Problematický je zde fakt, že u savců se nacházejí dva homology Sec61 a umlčet oba dva nelze bez vedlejších účinků (včetně letality). Je možné, že z toho důvodu může být význam Sec61 v této studii podceněn.

Význam Der1 pro retrotranslokaci

Konkrétní význam proteinu Der1 obecně pro ERAD není doposud uspokojivě znám. Vedle jiných byla navržena též možná role v samotné retrotranslokaci⁷⁰. Protein Der1 má pravděpodobně 6 transmembránových domén a také je schopen oligomerizace, jejímž prostřednictvím by mohl vytvářet kanál. Der1 asociuje se substráty pro ERAD, a to jak svými ER-luminálními, tak membránovými doménami, což významně naznačuje, že je součástí retrotranslokační mašinérie. Zdá se však, že je podjednotkou, která je potřeba pouze pro určité typy substrátů, hlavně pro solubilní ERAD substráty. Autoři navrhli model, kdy špatně sbalené proteiny jsou od rozpoznávacího chaperonu Hrd3 předány právě Der1, který zprostředkuje jejich přenos skrze membránu. Na cytosolické straně membrány jsou proteiny následně ubikvitinylovány Hrd1 Ubliigasou. Samotný kanál by přitom mohl být tvořen transmembránovými doménami Der1 i Hrd1 současně.

Význam ERADu pro zkříženou prezentaci

Jedním z prvních výzkumů zaměřených čistě na toto téma je práce z roku 2006 publikovaná ve významném imunologickém časopise⁷¹. Původní myšlenka vychází ze zjištění, že ER-rezidentní proteiny se stávají součástí endosomů a fagosomů nesoucích antigeny ke zkřížené prezentaci, jak už bylo zmíněno výše. Tyto antigeny jsou mnohdy zpracovány tzv. cytosolickou cestou, která ve svém principu předpokládá transport antigenu skrze fagosomální membránu. V ER se k vyřešení tohoto problému naskytá retrotranslokační mašinérie uplatňující se při ERADu. Ackerman et al. testovali jako retrotranslokou Sec61 kanál pomocí reverzibilního inhi-

bitoru Exotoxinu A (ExoA)⁷¹. Blokáce Sec61 kanálu sice zabránila transportu antigenu (OVA) z fagosomu do cytosolu, ale výsledky spojené s inhibicí Sec61 jsou doprovázeny řadou pochybností, neb se dá předpokládat pleiotropní účinek takové inhibice. Sec61 kanál se tak touto prací dostal do podvědomí badatelů na poli zkřížené prezentace, ale nebyl přijat jako prokázaný. V roli antigenu zde byla použita také luciferasa. Bylo zjištěno, že její transport z váčků do cytosolu je závislý na přítomnosti cytosolických komponent a ATP. To napovídá roli cytosolické ATPasy p97, která napomáhá vytažení proteinu skrze membránu ER při ERADu. Její význam pro zkříženou prezentaci zde byl potvrzen. Tato práce tedy ukázala na pravděpodobnou roli dvou komponent ERADu, ATPasy p97 a kanálu Sec61, pro zkříženou prezentaci. Jako u všeho nového je však na místě obezřetnost a proto ještě řada recentnějších článků musela tuto problematiku prověřit, než bylo zapojení ERAD mašinérie ve zkřížené prezentaci obecně přijato.

Jedním z nich je poměrně recentní práce na zkřížené prezentaci dlouhých peptidů⁷². Zkoumaný peptid byl fluorescenčně označen a pozorován konfokální mikroskopií. Zpracování těchto peptidů na kratší proběhlo cytosolickou cestou. Umlčení ATPasy p97, vedlo k výraznému narušení zkřížené prezentace, což značí, že se na transportu do cytosolu tato ATPasa opravdu podílí. Naopak role Sec61 byla vyvrácena, neb použití jeho inhibitoru ExoA ani jeho umlčení zkříženou prezentaci nijak výrazně neovlivnilo. Podobně ani umlčení proteinu Derlin-1 nemělo na zkříženou prezentaci vliv.

Avšak ještě recentnější studie, která již byla zmíněna v kapitole o cytosolické cestě zkřížené prezentace, na roli Sec61 ukazuje³⁴. Při použití stejného inhibitoru (ExoA), avšak jiného typu antigenu (solubilní či partikulární OVA) bylo pozorováno výrazné narušení zkřížené prezentace. V dalším kroku byla navíc role Sec61 dokázána natolik elegantním způsobem, že se není třeba obávat ani pleiotropních účinků při jeho inhibici. Rovněž byla analyzována možná role Derlinu-1, která však ani zde nebyla potvrzena. Poslední komponentou ERAD, na kterou se zde zaměřili byla Hrd1. Při jejím umlčení došlo ke snížení exportu antigenu do cytosolu i nižší aktivaci CD8+ T lymfocytů. Bohužel však byla zároveň ovlivněna i prezentace na MHC-II, pro kterou by export do cytosolu neměl hrát žádnou roli. Není tudíž jasné, zda snížení účinnosti zkřížené prezentace bylo důsledkem nefunkčnosti translokační dráhy, nebo jiného nespecifického efektu při umlčení Hrd1.

Role p97 pro zkříženou prezentaci byla navržena i o něco dříve v souvislosti s polyubikvitinylací manoso-vého receptoru (MR) a zdá se tedy dosti pravděpodobná⁷³. Jako antigen zde byl použit OVA cílený na MR, jenž má na svém cytosolickém konci lysinový zbytek, který je po vazbě OVA polyubikvitinylován. Po mutaci tohoto lysinu nebyla nijak ovlivněna internalizace OVA, ani jeho zacílení do časných endosomů, ale zkřížená prezentace a export do cytosolu byly narušeny výrazně. Polyubikvitinylace cytosolické části tohoto receptoru tedy zřejmě hraje pro export OVA z endosomu roli. ATPasy p97 je schopná polyubikvitinylované proteiny vázat prostřednictvím svých kofaktorů a MR by tak mohl prostřednictvím své polyubikvitinylace tento protein přivádět

na endosomální membránu a umožňovat tak jeho participaci na exportu antigenů z endosomu. Tato teorie zde byla výsledky potvrzena.

Zdá se tedy, že minimálně některé komponenty ERAD mašinerie se zkřížené prezentace vskutku účastní. Z recentních výzkumů vyplývá role hlavně pro Sec61 a ATPasu p97, zatímco význam Hrd1 je nutné ověřit. Z pohledu exportu antigenu do cytosolu je tedy k dispozici kanál i pohonný mechanismus k protažení antigenů skrze něj. V ER je však mechanismus prostupu proteinů do cytosolu mnohem komplexnější. Dá se proto předpokládat, že ještě několik komponent v rámci fagosomů zbývá nalézt. Nemusí se nutně jednat o proteiny z ER, pravděpodobně jim však budou minimálně funkčně příbuzné. Rovněž je z dosavadního výzkumu zřejmé, že tak jako existuje více mechanismů zkřížené prezentace, tak jsou potřeba různé ERAD faktory v závislosti na konkrétním typu pohlceného antigenu. Výše uvedenými důvody lze i vysvětlit fakt, že většina tělních buněk zkřížené prezentace není schopna. Zatímco téměř všechny tělní buňky ERAD mašinerii alespoň v nějaké základní formě exprimují, je možné, že jim právě chybějí tyto, zatím nepopsané, komponenty ERADu nutné pro mechanismus zkřížené prezentace.

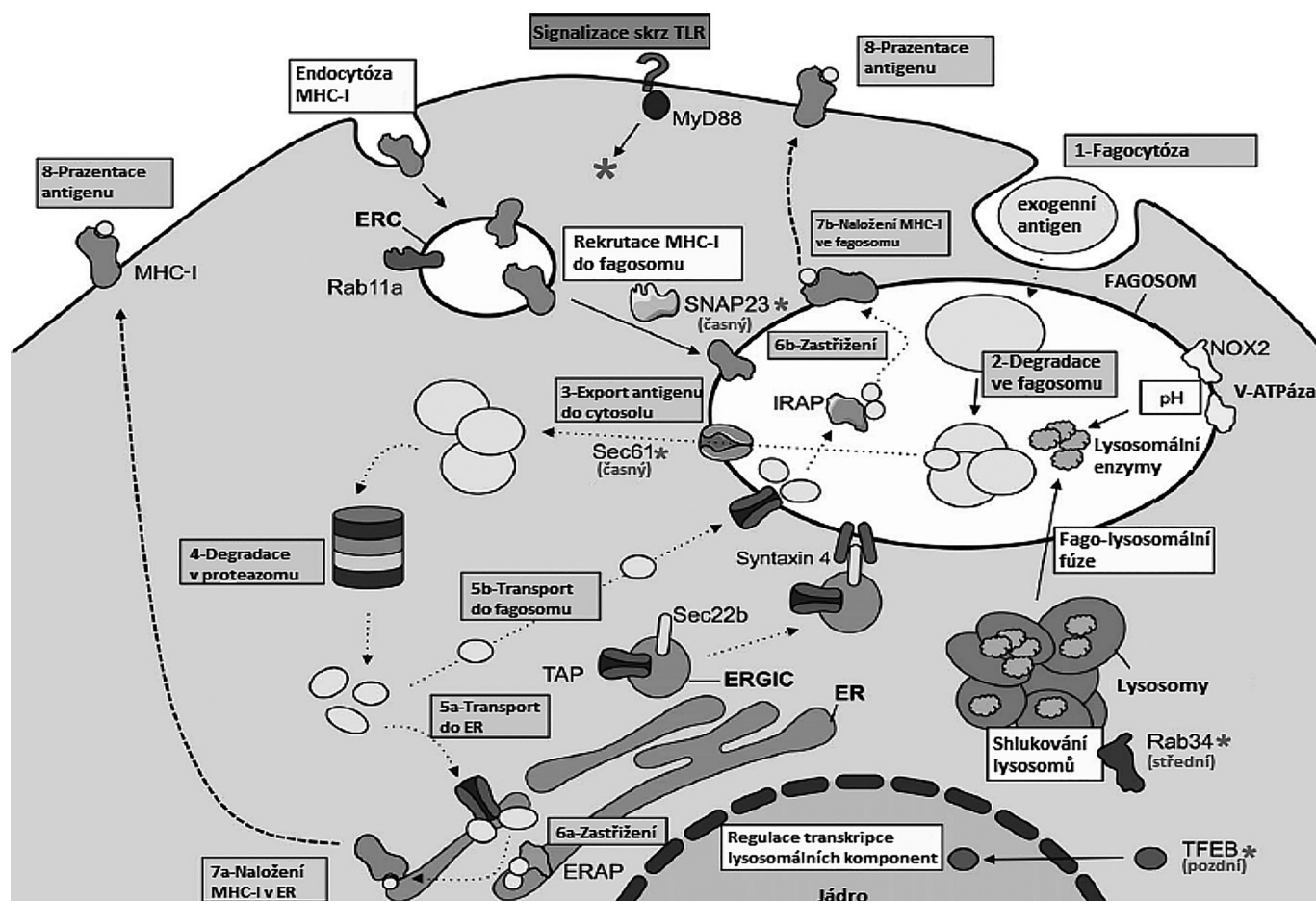
Závěr

Fyziologický význam zkřížené prezentující DC v boji proti intracelulárním patogenům, rakovině a autoreaktivním T lymfocytům je poměrně dobře etablován, molekulární podstata zkřížené prezentace však dosud není

uspokojivě objasněna. Rovněž propojení mezi molekulárním mechanismem a fyziologickým významem zatím neznáme, tedy není známo, jak konkrétně probíhá zkřížená prezentace při navození tolerance oproti procesu navození aktivace u T lymfocytů.

Diskutované molekulární mechanismy zkřížené prezentace jsou pro přehlednost shrnuty na Obr. 1. Pomocí čísel a šipek je zde naznačen sled událostí od pohlcení exogenního antigenu až po prezentaci od něj odvozených peptidů na buněčném povrchu. Struktury ovlivněné signalizací skrze TLR jsou označeny červenou hvězdičkou, kdy v závorce je uvedeno, v jaké fázi dozrávání DC (k tzv. dozrávání dochází právě po stimulaci TLR) se projevují. Například Sec61 se na membrány fagosomů dostává záhy po pohlcení antigenu, naopak TFEB se projevuje až mnohem později a zkříženou prezentaci vlastně zastavuje.

Důvodem, proč dosud není mechanismus zkřížené prezentace zcela objasněn, ačkoliv se jím zabývá a zabývala řada laboratoří, je pravděpodobně nesnadnost propojování jednotlivých výsledků v celistvý obrázek, neboť se během celého procesu zkřížené prezentace projevuje spousta různých faktorů. Nejen že záleží na typu antigenu a způsobu jeho pohlcení, ale s mechanismem zkřížené prezentace úzce souvisí problematika dendritických buněk, jejichž podtypů, které se liší svými vlastnostmi a funkcemi, nacházíme v rámci člověka celou řadu¹⁵. Přitom mnoho informací o zkřížené prezentaci bylo objeveno na myších DC, které se od lidských DC liší. Rovněž momentální stav imunitního systému,



Obr. 1: Molekulární mechanismus zkřížené prezentace (převzato a upraveno z⁷⁴)

přítomnost konkrétních cytokinů a patogenních struktur ovlivňuje dendritické buňky společně s procesy, které v nich probíhají. Po stimulaci skrze PRR DC dozrávají a v různých fázích dozrávání vykazují rozmanité vlastnosti, i co se zkřížené prezentace týče⁷⁴. Komplexní porozumění problematice zkřížené prezentace a jejímu fyziologickému významu se pravděpodobně neobejde bez využití moderních systémových přístupů, které umožní zohlednit řadu proměnných zároveň. Bylo by

skvělé, kdyby jednoho dne bylo možné namodelovat průběh zkřížené prezentace a specificky tak umět stimulovat či tolerizovat příslušné T lymfocyty.

Poděkování

Vznik této práce byl podpořen projektem NPU LO1302 Ministerstva kultury, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura

1. Iwasaki A, Medzhitov R: *Nat. Immunol.* 16, 343 (2015).
2. Dustin ML: *Cancer Immunol. Res.* 2, 1023 (2014).
3. Goldberg AC, Rizzo LV: *Einstein (Sao Paulo)*. 13, 153 (2015).
4. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, et al.: *J. Invest. Dermatol.* 126, 32 (2006).
5. Abbas AK, Murphy KM, Sher A: *Nature* 383, 787 (1996).
6. Joffre OP, Segura E, Savina A, et al.: *Nat. Rev. Immunol.* 12, 557 (2012).
7. Wearsch PA, Cresswell P: *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 624 (2008).
8. Goldberg AC, Rizzo LV: *Einstein (Sao Paulo)*. 13, 157 (2015).
9. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, et al.: *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823 (2011).
10. Bevan MJ: *J. Exp. Med.* 143, 1283 (1976).
11. Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, et al.: *J. Exp. Med.* 186, 239 (1997).
12. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, et al.: *J. Exp. Med.* 184, 923 (1996).
13. Kurts C, Cannarile M, Klebba I, et al.: *J. Immunol.* 166, 1439 (2001).
14. Jung S, Unutmaz D, Wong P, et al.: *Immunity* 17, 211 (2002).
15. Gutiérrez-Martínez E, Planès R, Anselmi G, et al.: *Front. Immunol.* 6 (2015).
16. Rock KL, Sigal LJ, Crotty S, et al.: *Nature* 398, 77 (1999).
17. Bickham K, Goodman K, Paludan C, et al.: *J. Exp. Med.* 198, 1653 (2003).
18. Andrews DM, Andoniu CE, Granucci F, et al.: *Nat. Immunol.* 2, 1077 (2001).
19. Busche A, Jirmo AC, Welten SPM, et al.: *J. Immunol.* 190, 2767 (2013).
20. Ballesteros-Tato A, León B, Lund FE, et al.: *Nat. Immunol.* 11, 216 (2010).
21. Tzelepis F, Verway M, Daoud J, et al.: *J. Clin. Invest.* 125, 752 (2015).
22. Steele LN, Balsara ZR, Starnbach MN: *J. Immunol.* 173, 6327 (2004).
23. Redmond WL, Sherman LA: *Immunity* 22, 275 (2005).
24. de Jersey J, Snelgrove SL, Palmer SE, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1295 (2007).
25. Sutherland RM, Zhan Y, Carrington EM, et al.: *Cell Transplant.* 20, 467 (2011).
26. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, et al.: *Science* 264, 961 (1994).
27. Lyman MA, Aung S, Biggs JA, et al.: *J. Immunol.* 172, 6558 (2004).
28. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL: *Science* 267, 243 (1995).
29. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, et al.: *Cell* 71, 1205 (1992).
30. Merzougui N, Kratzer R, Saveanu L, et al.: *EMBO Rep.* 12, 1257 (2011).
31. Dantuma NP, Groothuis TAM, Salomons FA, et al.: *J. Cell Biol.* 173, 19 (2006).
32. Wang Y, Wang L, Hu Z, et al.: *Cancer Lett.* 329, 207 (2013).
33. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, et al.: *Nature* 425, 397 (2003).
34. Zehner M, Marschall ALL, Bos E, et al.: *Immunity* 42, 850 (2015).
35. Rapoport TA: *Nature* 450, 663 (2007).
36. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12889 (2003).
37. Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, et al.: *Cell* 147, 1355 (2011).
38. van Endert P: *Immunol. Rev.* 272, 80 (2016).
39. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, et al.: *Nature* 361, 359 (1993).
40. Song R, Harding C V: *J. Immunol.* 156, 4182 (1996).
41. Nair-Gupta P, Baccarini A, Tung N, et al.: *Cell* 158, 506 (2014).
42. Shen L, Sigal LJ, Boes M, et al.: *Immunity* 21, 155 (2004).
43. Delamarre L, Pack M, Chang H, et al.: *Science* 307, 1630 (2005).
44. Chatterjee B, Smed-Sörensen A, Cohn L, et al.: *Blood* 120, 2011 (2012).
45. Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, et al.: *J. Mol. Cell Biol.* 5, 214 (2013).
46. Savina A, Jancic C, Hugues S, et al.: *Cell* 126, 205 (2006).
47. Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, et al.: *Blood* 112, 4712 (2008).
48. Rybicka JM, Balce DR, Chaudhuri S, et al.: *EMBO J.* 31, 932 (2012).
49. Jancic C, Savina A, Wasmeier C, et al.: *Nat. Cell Biol.* 9, 367 (2007).
50. Savina A, Peres A, Cebrian I, et al.: *Immunity* 30, 544 (2009).
51. Alloati A, Kotsias F, Pauwels A-M, et al.: *Immunity* 43, 1087 (2015).
52. Samie M, Cresswell P: *Nat. Immunol.* 16, 729 (2015).
53. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, et al.: *Science* 325, 213 (2009).

Literatura (pokračování)

54. Weimershaus M, Maschalidi S, Sepulveda F, et al.: *J. Immunol.* 188, 1840 (2012).
55. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, et al.: *Nature* 425, 402 (2003).
56. Grommé M, Uytdehaag FG, Janssen H, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10326 (1999).
57. Ma W, Zhang Y, Vigneron N, et al.: *J. Immunol.* 196 (2016).
58. Zou L, Zhou J, Zhang J, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15801 (2009).
59. Xie S, Bahl K, Reinecke JB, et al.: *Mol. Biol. Cell* 27, 108 (2016).
60. Cebrían I, Croce C, Guerrero NA, et al.: *EMBO Rep.* 17, 1753 (2016).
61. Zattas D, Hochstrasser M: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50, 1 (2015).
62. Römisch K: *Trends Biochem. Sci.* 42, 171 (2017).
63. Willer M, Forte GMA, Stirling CJ: *J. Biol. Chem.* 283, 33883 (2008).
64. Huyer G, Piluek WF, Fansler Z, et al.: *J. Biol. Chem.* 279, 38369 (2004).
65. Lloyd DJ, Wheeler MC, Gekakis N: *Diabetes* 59, 460 (2010).
66. Wheeler MC, Gekakis N: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427, 768 (2012).
67. Stein A, Ruggiano A, Carvalho P, et al.: *Cell* 158, 1375 (2014).
68. Baldrige RD, Rapoport TA: *Cell* 166, 394 (2016).
69. Grotzke JE, Lu Q, Cresswell P: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3393 (2013).
70. Mehnert M, Sommer T, Jarosch E: *Nat. Cell Biol.* 16, 77 (2014).
71. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P, et al.: *Immunity* 25, 607 (2006).
72. Ménager J, Ebstein F, Oger R, et al.: *PLoS One* 9, e89897 (2014).
73. Zehner M, Chasan AI, Schuette V, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9933 (2011).
74. Alloati A, Kotsias F, Magalhaes JG, et al.: *Immunol. Rev.* 272 (2016).

Souhrn

Boháčová Š., Stříšovský K.: Zkřížená prezentace antigenu – mechanismus a biologický význam v kontextu imunitního systému

Zkřížená prezentace antigenů je proces, kdy dendritické buňky předkládají antigeny zvenčí CD8+ T lymfocytům na MHC I glykoproteinech. Jako zkřížená se označuje proto, že oproti cestám klasické prezentace vede vskutku křížem, protože vnější antigeny jsou zpravidla prezentovány na MHC II a vnitřní na MHC I glykoproteinech. Molekulární mechanismus zkřížené prezentace doposud není uspokojivě objasněn. Uvažují se dvě hlavní cesty – vakuolární a cytosolická. Vakuolární cesta předpokládá, že pohlcené antigeny jsou naštěpeny v endosomu pomocí proteas a následně navázány na MHC I. Cytosolická cesta předpokládá, že pohlcený antigen proniká z váčku do cytosolu, kde je naštěpen v proteazomu. Odtud putuje buď do endoplasmatického retikula (ER), kde dochází k vazbě peptidu na MHC I i při klasické prezentaci antigenu, nebo zpět do endosomu, kam se mašinérie vázající peptid na MHC I přesouvá. Procesu se účastní proteiny z ER, včetně těch, které spolupracují na mechanismu ERAD, Rab GTPasy regulující váčkový transport a struktury podílející se na maturaci endosomů. Zkřížená prezentace má svůj význam z medicínského hlediska, jelikož aktivuje CD8+ T lymfocyty proti intracelulárním patogenům a rakovinným buňkám a také navozuje toleranci na periférii.

Klíčová slova: prezentace antigenu; zkřížená prezentace; dendritická buňka; MHC I; CD8+ T lymfocyt

Summary

Boháčová Š., Stříšovský K.: Antigen cross-presentation – mechanisms and biological roles in the immune system

Antigen cross-presentation is a process, when dendritic cells present exogenous antigens in context of MHC I to CD8+ T lymphocytes. Unlike classical antigen presentation, this one goes crosswise, because exogenous antigens are otherwise usually presented on MHC-II and endogenous antigens on MHC-I glycoproteins. Molecular mechanism of cross-presentation has not been well established yet. Two major pathways are considered – vacuolar and cytosolic. In the vacuolar pathway, the internalised antigens are cleaved in the endosome by proteases and then loaded onto MHC I. In the cytosolic pathway, the internalised antigens leave the endosome to be cleaved by the proteasome in the cytosol. They are then imported into the endoplasmic reticulum (ER) to be loaded onto MHC I as in classical antigen presentation, or they go back into the endosome where the MHC-I loading machinery is trafficked. This process is mediated by ER proteins including those participating in ERAD, by Rab GTPases regulating vesicular transport, and by structures important for endosome maturation. Cross presentation is important in medicine, because it ensures activation of CD8+ T lymphocytes against intracellular pathogens and cancer cells, and induction of tolerance at the periphery.

Keywords: antigen presentation; cross-presentation; dendritic cell; MHC I; CD8+ T lymphocyte

DIGITÁLNÍ PCR A JEJÍ POROVNÁNÍ S PCR I. A II. GENERACE

Eliška Fialová, Kamila Zdeňková, Kateřina Demnerová

Vysoká škola chemickotechnologická v Praze; fialovae@vscht.cz

Úvod

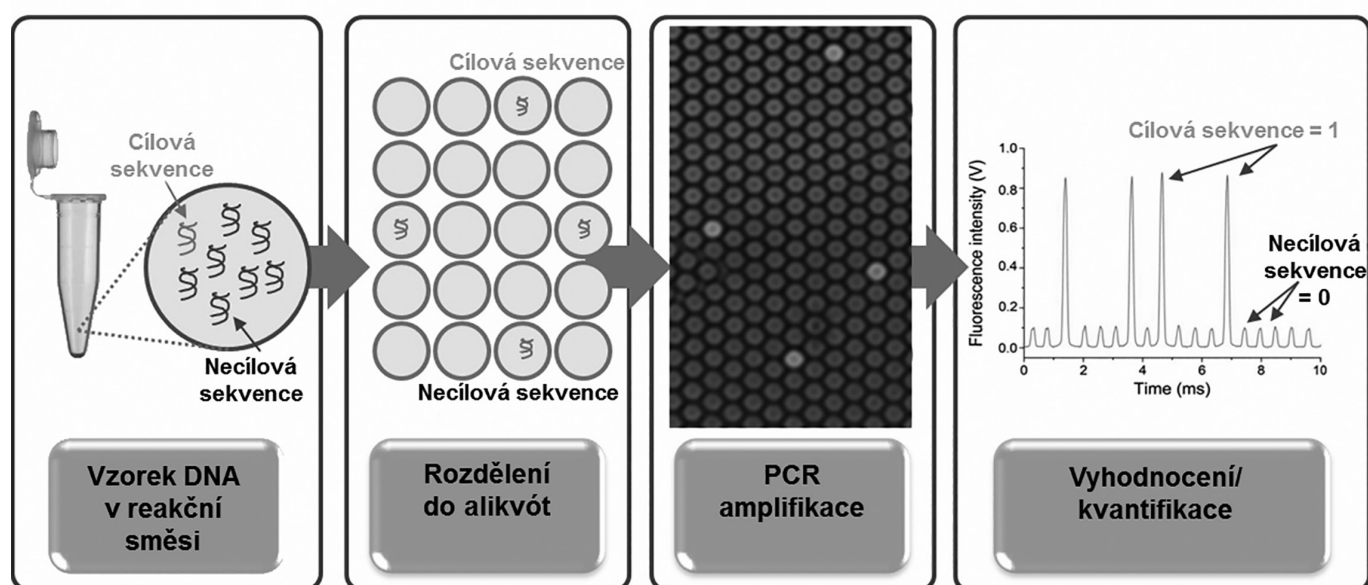
Polymerasová řetězová reakce (PCR) je metoda používaná pro selektivní množení (amplifikaci) krátkého úseku nukleové kyseliny. Amplifikace specifické sekvence je založena na principu enzymatické replikace *in vitro*, která se cyklicky opakuje. Metoda PCR byla poprvé popsána americkým biochemikem Kary B. Mullisem v roce 1983. Od té doby prošla řadou úprav a v současné době patří, díky svým výhodám jako je například specifita, rychlost, potřeba malého množství templátové DNA nebo malý reakční objem, k rutinním metodám v řadě výzkumných i komerčních oblastech. Postupně došlo k rozvoji metody do mnoha variant, vývoj se dnes dělí do tří generací – tradiční PCR (I. generace), kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase – qPCR (II. generace) a digitální PCR – dPCR (III. generace)¹⁻⁴.

Digitální PCR

Všechny tři generace PCR jsou používány pro selektivní amplifikaci krátkého úseku DNA ohraničeného primery. Složení amplifikační směsi se mezi jednotlivými generacemi PCR významně neliší; zahrnuje vždy DNA polymerasu, templátovou DNA, primery a nukleotidy ve vhodném reakčním pufru. Do dPCR se, stejně jako do qPCR, přidává sonda nebo interkalační fluorescenční barvivo. Specifikem digitální PCR je rozdělení reakční směsi s analyzovanou DNA do velkého množství alikvót (Obr. 1). Počet alikvót bývá nejčastěji 20 000, některé přístroje však umožňují distribuci vzorku až do 10 milionů alikvót. Objem reakční směsi dPCR bývá mezi 20 až 50 μl , objem v jedné alikvótě je tedy několik pikolitrů až desítky nanolitů. Rozdělování do alikvót je

prováděno dvěma způsoby: pomocí mikročipu, kdy je vzorek rozdělen do mnoha malých komůrek pomocí mikrokapilár, nebo vytvořením emulze olejových kapiček. V obou případech, tedy v komůrkách na čipu nebo v reverzních micelách, posléze probíhá klasická PCR. Kapacita čipu (počet komůrek), popř. počet kapek, ovlivňuje množství templátové DNA, které je možné úspěšně kvantifikovat v jedné dPCR. Pro přesnou kvantifikaci je zcela zásadní náhodná distribuce templátů do jednotlivých alikvót. V průběhu vyhodnocování lze zohlednit možnou přítomnost více cílových molekul v dané alikvótě současně, nejčastěji využitím korekce na základě tzv. Poissonova rozdělení. Statistická analýza je možná díky lineárnímu charakteru získaných dat^{1, 5-8}. Díky principu dPCR, kdy je měřena end-point fluorescence, je eliminován vliv inhibitorů PCR na vyhodnocení kvantifikace.

Přívlastek „digitální“ dostala metoda právě na základě individuálního sběru dat z jednotlivých alikvót a jejich vyhodnocení systémem „jedniček a nul“. Pozitivní výsledek amplifikace v reakčním oddílu (obsahující jednu nebo více cílových molekul DNA) se označí hodnotou 1, negativní (alikvóty na detektoru poskytují signál pod nastavenou mezí detekce) se označí číslem 0. Pro výpočet koncentrace cílových molekul je nutné znát počet a objem reakčních oddílů a dále množství negativních, popř. pozitivních, oddílů⁹⁻¹². Výsledek se pak vyjadřuje kumulativně za všechny alikvóty^{5, 9}. Zjištěný počet kopií templátové DNA lze snadno přepočítat na objem směsi, popř. extraktu⁵. Nutným předpokladem je volba vhodné koncentrace DNA tak, aby systém nebyl zcela saturován (nutná je přítomnost negativních reakčních oddílů). V porovnání s qPCR, kde je pro kvantifikaci



Obr. 1: Digitální PCR (upraveno dle^{16, 21})

potřeba kalibrační křivka a stanovení mezního cyklu (Cq), v němž intenzita fluorescence přesáhne prahovou hodnotu, je absolutní kvantifikace pomocí dPCR přesnější a jednodušší, což je vhodné pro analýzy vzorků vyžadující vysokou citlivost a/nebo majících omezené množství vzorku.

Dnes již existuje několik forem digitální PCR. Liší se kapacitou, cenou i způsobem rozdělení vzorku do alikvót. V případě dropletové digitální PCR (*digital droplet PCR*, ddPCR) probíhá emulgace vzorku v generátoru kapének (aliquót). Kapénky jsou následně amplifikovány emulzní PCR. Fluorescence jednotlivých alikvót se vyhodnocuje v mikrofluidním zařízení, tzv. čtečce kapínek, kde jsou kapénky systémem mikrotubiček nasávány a pomalu posouvány k detektoru^{5, 11, 12}. Zvláštní formou ddPCR je tzv. BEAMing formát. Název je odvozen od anglického pojmenování čtyř hlavních komponent: kuličky (*beads*), emulze (*emulsion*), amplifikace (*amplification*) a magnetismus (*magnetics*). Metoda využívá magnetické kuličky s navázanými biotinylovanými oligonukleotidy, které slouží při PCR jako primery pro amplifikaci cílového úseku DNA. Vodný roztok kuliček a reakční směsi s templátovou DNA je smíchán se směsí voda/olej/detergent za tvorby mikroemulzí. Dojde tak ke vzniku reakčních oddílů, jež obvykle obsahují jednu či žádnou cílovou molekulu a/nebo kuličku. Po PCR jsou díky svým magnetickým vlastnostem kuličky izolovány a přečištěny. Následně jsou kuličky s PCR produkty rozlišeny pomocí fluorescenčně značených sond; počet je stanoven pomocí průtokové cytometrie¹³.

Druhou variantou dPCR je čipová dPCR (*chamber digital PCR*, cdPCR), u níž je vzorek pipetován do hlavního průtokového kanálu mikrofluidního čipu a následně je rozvodnými kanálky, za využití tlaku vychylujícího membrány mezi kanálky a komůrkami v čipu, rovnoměrně rozdělen do alikvót po celé jeho ploše, ve kterých proběhnou amplifikace cílové molekuly¹⁴. V závislosti na vybraném přístroji může u této platformy analýza probíhat jak v reálném čase, tak v koncovém bodě (tzv. end-point) PCR¹⁵. Výhodou přístrojů pro cdPCR oproti ddPCR je možnost zopakování analýzy, pokud se prvotní čtení fluorescence na čipu jeví jako špatné¹⁶⁻¹⁸.

Další možností je krystalová dPCR, která využívá 2D uspořádání čipových forem v kombinaci s tvorbou monodisperzních kapének, což je charakteristické pro ddPCR. Reakční směs je pipetována do jamek speciálně navrženého čipu, následně dojde k jejímu rozdělení do kapének. Ty se poté v čipu spontánně organizují do struktury podobné uspořádání atomů v krystalu. Bezprostředně po jejich vzniku je zahájena PCR amplifikace. Analýza probíhá pomocí fluorescenčního mikroskopu s filtry pro červenou, zelenou a modrou část barevného spektra; to umožňuje použití celé řady fluoroforů^{19, 20}.

Mnohonásobná dPCR

Mnohonásobná (angl. multiplex) PCR využívá najednou několik párů primerů v jedné reakci, což umožňuje současnou amplifikaci odlišných cílových úseků DNA. Mnohonásobná PCR (mPCR) tak umožňuje nejen zkrá-

tit čas potřebný pro analýzu daného vzorku, ale také snížit spotřebu chemikálií, a tedy i cenu analýzy. Multiplexování je možné díky označení jednotlivých sond fluorofory s různými emisními spektry a/nebo lze sledovat intenzitu fluorescence barvy jedné (využití odlišných amplitud, viz dále). Přístroj dPCR testuje fluorescenci každé alikvóty, čímž detekuje přítomnost cílových sekvencí^{15, 21, 22}. V současné době je pro dPCR nejčastěji používaná detekce dvou různých emisních vlnových délek, a to obvykle kombinace fluorescenčních filtrů pro fluorofory FAM (EvaGreen) a VIC (HEX). Většina systémů dostupných na trhu tedy umožňuje duplex reakce. Krystalová DNA pracuje s třemi fluorescenčními kanály. Detekční postupy je rovněž možné zkombinovat a navýšit tak množství odlišitelných produktů v reakci. Dobnik a kol.²² navrhli multiplex systém, který umožňuje současně kvantifikovat čtyři cílové úseky (kvadruplex) v přístroji firmy Bio-Rad se dvěma detekčními kanály. Toho docílili použitím různých koncentrací primerů a sond (FAM a VIC). Systém založený na odlišné amplitudě však nemusí být spolehlivý v přítomnosti inhibitorů nebo v případě použití nukleové kyseliny špatné kvality. Robustnější metodou tak je přiřazení jednoho vzorku na jeden fluorescenční kanál^{5, 11, 19}.

Aplikace dPCR

Digitální PCR je efektivním řešením pro celou řadu aplikací. Výhodou je její robustnost a senzitivita. Pro svou citlivost se dPCR využívá například pro detekci minoritních, mimořádně vzácných cílů. Díky zředění celého vzorku DNA dojde ke snížení poměru divokého typu cílové sekvence amplifikace k mutantu, čímž je zvýšena šance na jeho detekci. dPCR tak byla úspěšně aplikována pro diagnostiku nádorů (detekci amplifikace genů spojených s maligní transformací), monitorování odmítnutí transplantovaných orgánů nebo hodnocení volně cirkulujících fragmentů fetální DNA v plazmě matky (prenatální vyšetření plodu). Dále lze dPCR využít pro absolutní kvantifikaci patogenů a analýzu jejich nukleových kyselin. Například Shen a kol.²³ publikovali slibnou metodu pro detekci přenosu HIV z matky na dítě, a to pomocí digitální RT-PCR. Mimo oblast medicíny je metoda využívána i v jiných oborech, například v různých odvětvích genetiky (forenzní genetik, detekce a kvantifikace geneticky modifikovaných organismů, sledování genové exprese), mikrobiologii, biochemii a dalších^{1, 5-7, 15, 23-28}.

V současné době se stále více používá mnohonásobná dPCR (mdPCR), a to nejen u vzácně dostupných vzorků nebo vzorků malého množství, ale i u ostatních analýz za účelem ušetření času a financí¹⁹. Příkladem mohou být dva systémy mnohonásobné ddPCR pro detekci geneticky modifikované kukuřice, které publikovali Dobnik a kol.²². Pomocí každého multiplexu bylo možné kvantifikovat čtyři cílové sekvence DNA v jedné reakci. Jiný příklad využití mdPCR publikovali například Andersen a kol.²⁹, kteří použili systém mdPCR pro screening až 31 mutací ve 4 genech cirkulující nádorové DNA. Celkem bylo pro analýzu použito osm multiplexů, přičemž každý test detekoval 3 – 5 mutací. Pozitivní vzorky byly dále analyzovány duplexní dPCR, během které byly identifikovány a kvantifikovány zjištěné mutace.

Porovnání tří generací PCR

U PCR I. a II. generace dochází k amplifikaci hned několika molekul DNA templátu najednou. V důsledku toho soutěží molekuly o reagenty přítomné v reakční směsi. Oproti tomu PCR III. generace již využívá specifických podmínek, které zaručují amplifikaci jednotlivých molekul DNA v oddělených prostorech (sektoru čipu, kapce olejové emulze) ¹. Porovnání tří generací PCR je uvedeno v Tabulce I.

Závěr

V současné době je stále větší snaha o urychlení a automatizování analýz vzorků. Digitální PCR je citlivá metoda umožňující detekci i kvantifikaci nukleových kyselin. Ve srovnání s qPCR, která je rovněž používána pro detekci a kvantifikaci nukleových kyselin, je pořizovací cena přístrojů a příslušenství pro dPCR vyšší. Zís-

kané kvantitativní výsledky jsou však mnohem přesnější a riziko chyb vlivem lidského faktoru je nižší, neboť manipulace se vzorkem pracovníkem je minimální. Rovněž binární charakter dat přináší, v porovnání s exponenciální povahou signálu qPCR, jisté výhody, a to umožnění statistické analýzy. Kvantifikace cílového úseku je měřena přímo, není nutné porovnání se standardní křivkou. Metoda dPCR je také vhodná pro mnohonásobné analýzy, díky čemuž je možné dosáhnout finančních i časových úspor. Pro své výhody tak nalézá dPCR široké analytické uplatnění, dochází k jejímu masivnímu vývoji a řadí se mezi stále častěji používané techniky molekulární biologie.

Poděkování: Grantu MZe (NAZV) QJ1530272: „Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvovýroba – spotřebitel“.

Tab. I: Přehled PCR přístupů. ^{1, 16, 30}

	Typ PCR		
	PCR	qPCR	dPCR
Stanovení produktu	Stanoví celkové množství nahromaděných PCR produktů na konci PCR (detekce probíhá až v platé fázi amplifikační křivky)	Stanoví množství PCR produktů v každém reakčním cyklu (v reálném čase)	Kvantifikuje počet pozitivních a negativních frakcí daného vzorku, a to na konci amplifikace
Možnost kvantifikace	Ne: porovnání intenzity pásma amplikonu se standardem o známé koncentraci na gelu může poskytnout semikvantitativní výsledek	Ano: data jsou sbírána během fáze exponenciálního růstu (log) amplifikační křivky, kdy je množství PCR produktu přímo úměrné množství templátové nukleové kyseliny; lze relativní i absolutní kvantifikace	Ano: frakce negativních PCR je vhodná pro Poissonův statistický algoritmus; stanovení absolutního počtu kopií
Výhody	- relativně nízké pořizovací i provozní náklady, - snadné provedení, - jednodušší přístroj (není potřeba čtení fluorescence) - vhodná k analýze jednoduchých i komplexních vzorků	- širší dynamický rozsah detekce/kvantifikace - schopnost rozlišit méně jak dvojnásobný rozdíl, - nárůst fluorescence je přímo úměrný množství vznikajících PCR amplikonů, - lze použít sondy (přesnější, finančně náročnější) i interkalační barvivo (levnější, specifita obdobná jako u PCR) - není nutná post-PCR analýza - vhodná k analýze jednoduchých i komplexních vzorků	- přímá úměra mezi počtem replikátů a přesností celkové kvantifikace, - díky rozdělení do alikvót není potřeba technických replikátů - bez nutnosti použít kvantitativní standardy, - stanovení počtu kopií v lineárním módu umožňuje detekci i nepatrných rozdílů, - vysoká tolerance k inhibitorům, - není nutná post-PCR analýza, - vhodná k analýze jednoduchých i komplexních vzorků, - vhodná pro kvantifikaci nízké koncentrace cílového úseku ve vysokém množství doprovodné nukleové kyseliny
Nevýhody	- nutná post-PCR analýza, - nízké rozlišení, - nížší citlivost, - malý dynamický rozsah analýzy, - rozlišení pouze na základě velikosti PCR produktu, - výsledky nejsou vyjádřeny jako čísla, - neautomatizované, (použití toxického EtBr)	- nákladnější instrumentace, cena vlastního stanovení (při použití sond) - náročnější vyhodnocení než u PCR, - pro kvantifikaci je nutné použití standardu	nákladnější instrumentace i cena vlastního stanovení
Příklady aplikace	amplifikace DNA pro klonování, genotypizaci, sekvenování, detekci cílové sekvence (např. patogenů)	- kvantifikace genové exprese, - stanovení počtu kopií studovaného genu, - detekce SNP, detekce patogenů	- absolutní kvantifikace: NGS knihoven, exprese genu, standardů nukleových kyselin, virionů - detekce vzácných alel

Literatura

1. Hrstka R, Kolářová T, et al.: *Klin. Onkol.* 27, 569 (2014).
2. Šmarda J, Doškař J, et al.: *Metody molekulární biologie*, Masarykova univerzita, Brno 2005.
3. Rahman MT, Uddin MS, et al.: *Anwer Khan Mod. Med. Coll. J.* 4, 30 (2013).
4. <https://www.karymullis.com/pcr.shtml>, staženo 26. 9. 2017.
5. Beránek M (2016): Digitální PCR. In: *Molekulární genetiky pro bioanalytiku* (U. K. v Praze ed.), Karolinum, Praha, 100-103.
6. Vogelstein B and Kinzler KW: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 9236 (1999).
7. Pohl G and Shih I-M: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4, 41 (2004).
8. <http://raindancetech.com/>, staženo 20. 10. 2017.
9. Cao L, Cui X, et al.: *Biosens. Bioelectron.* 90, 459 (2017).
10. Hindson CM, Chevillet JR, et al.: *Nat. Methods* 10, 1003 (2013).
11. <http://www.bio-rad.com/>, staženo 20. 9. 2017.
12. Hindson BJ, Ness KD, et al.: *Anal. Chem.* 83, 8604 (2011).
13. Dressman D, Yan H, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8817 (2003).
14. Zhang C and Xing D: *Nucleic Acids Res.* 35, 4223 (2007).
15. <https://www.fluidigm.com>, staženo 6. 10. 2017.
16. <https://www.thermofisher.com>, staženo 26. 9. 2017.
17. Pinheiro LB, Coleman VA, et al.: *Anal. Chem.* 84, 1003 (2012).
18. Ding X and Mu Y (2016): Digital Nucleic Acid Detection Based on Microfluidic Lab-on-a-Chip Devices. In: *Lab-on-a-Chip Fabrication and Application* (M. Stoytcheva & R. Zlatev ed.), InTech, Rijeka, Ch. 06.
19. Madic J, Zocovic A, et al.: *Biomol. Detect. Quantif.* 10, 34 (2016).
20. <http://www.stillatechnologies.com>, staženo 6. 10. 2017.
21. <http://www.idtdna.com/>, staženo 20. 9. 2017.
22. Dobnik D, Štebih D, et al.: *Sci. Rep.* 6, 35451 (2016).
23. Shen F, Sun B, et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 133, 17705 (2011).
24. Huggett JF, Foy CA, et al.: *Clin. Chem.* 59, 892 (2013).
25. Pekin D, Skhiri Y, et al.: *Lab Chip* 11, 2156 (2011).
26. Day E, Dear PH, et al.: *Methods* 59, 101 (2013).
27. Lievens A, Jacchia S, et al.: *PLoS ONE* 11, e0153317 (2016).
28. Whale AS, Cowen S, et al.: *PLoS ONE* 8, e58177 (2013).
29. Andersen RF and Jakobsen A: *Clin. Chim. Acta* 458, 138 (2016).
30. Weaver S, Dube S, et al.: *Methods* 50, 271 (2010).

Souhrn

Fialová E., Zdeňková K., Demnerová K.: Digitální PCR a její porovnání s PCR I. a II. generace

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je metoda používaná pro namnožení specifického úseku DNA. Pro své vlastnosti se stala tato technika oblíbenou a v praxi hojně používanou metodou. V současné době rozlišujeme tři generace PCR – tradiční PCR (I. generace), kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase – qPCR (II. generace) a digitální PCR – dPCR (III. generace). dPCR je robustní a citlivá metoda, díky čemuž nachází uplatnění v mnoha oblastech jako je mikrobiologie, analýza potravin, onkologie apod. Využívá se především pro absolutní kvantifikaci a/nebo detekci vzácných cílů. Její výhodou je, v porovnání s qPCR, přesnější kvantifikace nezávislá na počtu amplifikačních cyklů a kalibrační křivce.

Klíčová slova: DNA, PCR, kvantitativní PCR, digitální PCR, mnohonásobná PCR

Summary

Fialová E., Zdeňková K., Demnerová K.: Digital PCR and its comparison with PCR 1st and 2nd generation

Polymerase chain reaction (PCR) is a technique used to amplify a specific DNA segment. For its qualities, this technique has become popular and widely used method in practise. Nowadays, we distinguish three generations of PCR – traditional PCR (1st Generation), quantitative PCR with fluorescence detection – qPCR (2nd generation) and digital PCR – dPCR (3rd generation). dPCR is robust and sensitive method, which is applied in many fields such as microbiology, food analysis, oncology, etc. It is mainly used for absolute quantification and / or detection of rare targets. Its advantage, in comparison to qPCR, is more precise quantification independent of the number of amplification cycles and the calibration curve.

Keywords: DNA, PCR, quantitative PCR, digital PCR, multiplex PCR

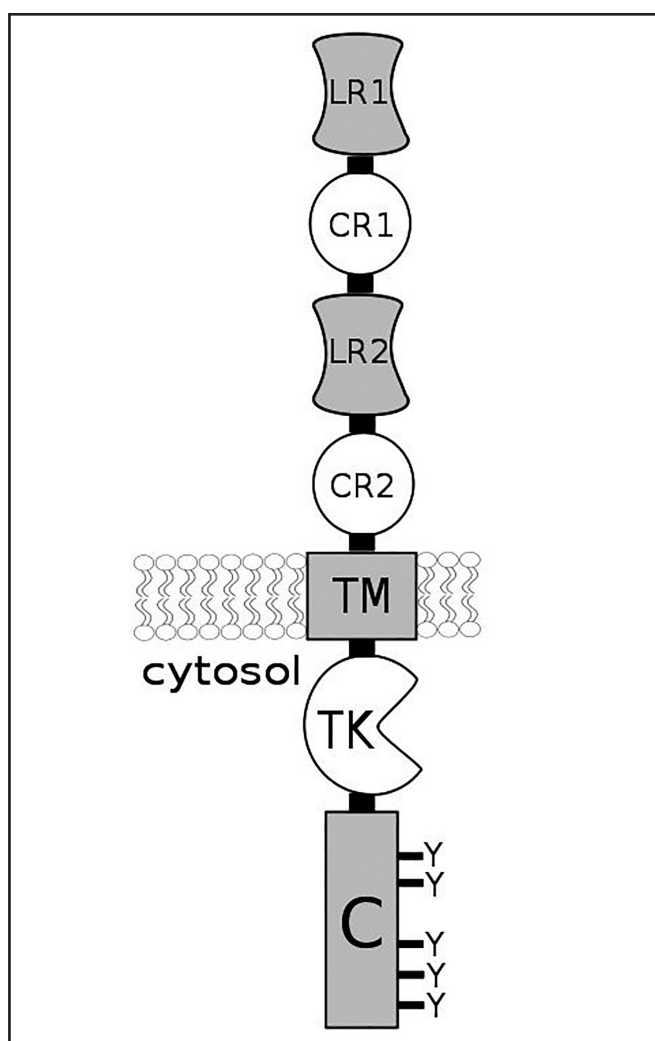
EVOLUCE REGULAČNÍCH MECHANISMŮ AKTIVACE EGF RECEPTORU

Květa Trávníčková^{1,2}, Kvido Strišovský¹

¹Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, ²Katedra buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova; kvido.strisovsky@uochb.cas.cz

Úvod

Receptor pro epidermální růstový faktor (dále EGF receptor¹) je transmembránový protein patřící do skupiny receptorů s vlastní tyrosinkinasovou aktivitou¹. Je přítomen u organismů napříč fylogenetickým spektrem, nevýjimaje oblíbené modelové organismy (*Cænorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* či *Mus musculus*) ani moderního člověka (*Homo sapiens sapiens*). Jeho cílovou destinací v rámci buňky je plasmatická membrána, kde plní roli senzoru signálů z vnějšího prostředí a spouštěče adekvátních odpovědí uvnitř buňky.

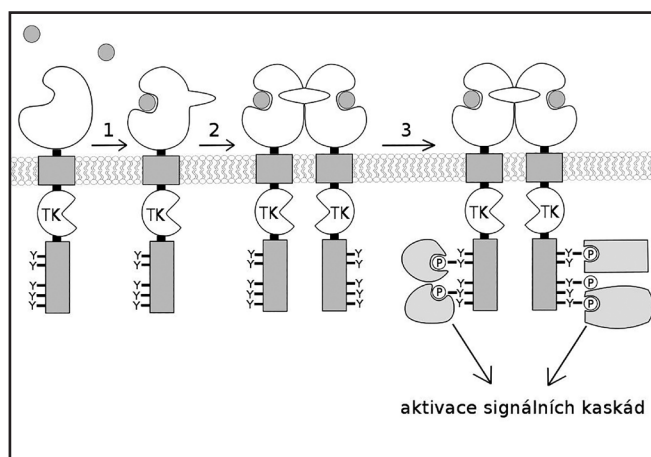


Obr. 1: Schéma struktury EGF receptoru. L, na leucin bohaté domény; CR, na cystein bohaté domény; TM, transmembránová doména; TK, tyrosinkinasová doména; C, C-koncová doména obsahující fosforylovatelné tyrosiny (Y; jejich počet na obrázku neodpovídá skutečnosti). Podle (Bogdan a Klámbt, 2001)¹¹⁶.

EGF receptor je transmembránový protein typu I. Lipidovou dvojvrstvou tedy prostupuje pouze jednou, jsa svým C-koncem orientován do cytosolu (Obr. 1). Jeho extracelulární část obsahuje dvě domény bohaté na cystein (CR domény) uplatňující se jak při zachování neaktivní konformace, tak při tvorbě dimerů po aktivaci receptoru². Zbývající dvě domény extracelulární části – pro obsah leucinových motivů zvané L1 a L2 – tvoří vazebné místo pro ligand³, jsou od sebe v neaktivním stavu oddáleny díky interakci CR domén⁴. Za transmembránovým α -helixem následuje konservovaná tyrosinkinasová doména a variabilní C-koncová část s tyrosiny podstupujícími fosforylaci.

Mechanismus aktivace EGF receptoru

Poté, co se do vazebného místa mezi doménami L1 a L2 naváže ligand, dojde k přerušení interakcí CR domén držících receptor v neaktivním stavu a k vytržení „dimerizačního raménka“, jež umožní vytvoření dimeru s jiným párem EGF receptor-ligand⁴. Následuje vzájemná fosforylace tyrosinových zbytků v C-koncových doménách obou receptorů, která vede ke zvýšení kinasové aktivity receptoru a k vytvoření vazebných míst pro proteiny signální transdukce (Obr. 2). Odlišnost od signalisace skrz ostatní tyrosinkinasové receptory tkví v tom, že k vytvoření dimeru EGF receptorů může dojít až po navázání molekuly ligandu na každý z dimerizačních partnerů, neboť ligand se vazebných interakcí s protějškem „svého“ receptoru vůbec neúčastní⁵.



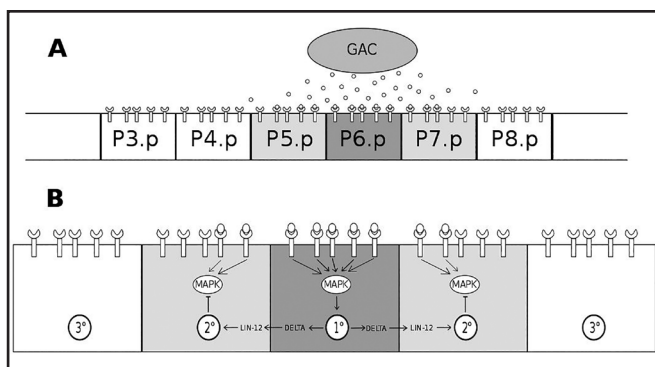
Obr. 2: Schéma průběhu aktivace EGF receptoru. Po navázání ligandu (1) následuje změna konformace receptoru provázaná vytržením dimerizačního raménka. Poté dojde k dimerizaci (2) a vzájemné fosforylaci tyrosinových zbytků obou receptorů v C-koncových doménách (3). Fosforylované tyrosiny poté slouží jako vazebná místa pro proteiny signální transdukce.

¹Poznámka: V odborné literatuře je pojem „EGF receptor“ užíván jednak ve smyslu obecném, tedy pro označení receptoru aktivovatelného ligandem s EGF-like doménou, dle toho pro označení molekuly ErbB1, jednoho ze čtyř EGF receptorů přítomných u savců. Za účelem vyhnutí se nejednoznačnosti je v tomto článku termín EGF receptor (EGFR) vždy míněn *sensu lato*.

Caenorhabditis elegans

Úvod

U *C. elegans* je přítomen jediný EGF receptor zvaný Let-23. Svě jméno obdržel na základě pozorování, že jeho absence způsobuje letalitu larev⁷. Uplatňuje se při vzniku vulvy, posteriorního ektodermu a samčích spikul. Jeho činnost je rovněž důležitá pro plodnost hermafroditů a životaschopnost larev. Nejlépe probádaným procesem z hlediska uplatnění signalisace skrz Let-23 je indukce vzniku vulvy (Obr. 3), pročež při popisu způsobů jeho regulace budeme vycházet především z poznatků shromážděných o tomto ději.



Obr. 3: Indukce 1° a 2° buněčných linií při vývoji vulvy prostřednictvím signalisace přes Let-23 receptor. GAC, ukotvující buňka; MAPK, MAP kinasová signální kaskáda. Překresleno podle (Escobar-Restrepo a Hajnal, 2014)¹¹⁷.

Během prvního a druhého larválního stadia je z jedné buňky (označovaných Pn.p) ventrální epidermis vybráno šest, které mají potenciál diferencovat ve vulvální buňky a v jejichž plasmatických membránách je Let-23 přítomen. Poté začne buňka nacházející se dorsálně od nich, tzv. ukotvující buňka (*gonadal anchor cell*, GAC), sekretovat molekulu LIN-3, jediný ligand Let-23 receptoru. Největší množství tohoto parakrinního signálu obdrží buňka P6.p, která je ukotvující buňce nejbližší; spuštění MAP kinasové dráhy v ní kromě posílení exprese *let-23* vyvolá přeměnu v předka 1° linie. P6.p také u svých sousedek, P5.p a P7.p, produkcí DELTA ligandů indukuje spuštění LIN-12/Notch dráhy. Ta v nich způsobí umlčení Let-23 signalisace a umožní proměnu v prekursor 2° linie. Zbylé z šesti vyvolených buněk dostávají pouze slabý LIN-3 i DELTA signál a následují 3° osud, tedy splynutí s epidermálním syncytiem hyp7 (shrnuto v⁸).

Při vzniku jednoho jediného orgánu tedy dochází k uplatnění jak pozitivních tak negativních regulačních mechanismů aktivace EGF receptoru. Dokonce jsme svědky situace, kdy se jejich využití liší u dvou bezprostředně sousedících buněk.

Transkripční regulace Let-23 signalisace

Expres Let-23 je v buňce P6.p pozitivně regulována chromatin remodelujícím komplexem SWI/SNF⁹. V jiných buňkách však SWI/SNF expresi *let-23* zabraňuje, pročež je nasnadě, že se v tomto způsobu regulace angažuje ještě nějaká jiná molekula/molekuly. V případě ligandu hraje nezastupitelnou roli 59 bp dlouhý zesilovač transkripce uvnitř jednoho z intronů. Jeho sekvence

obsahuje dva E-box elementy a jedno vazebné místo pro nuclear hormone receptor (NHR). Další geny, které se regulace transkripce *lin-3* účastní, lze najít pod souhrnným názvem *synMuv*, neboť mutace v nich u háďátek způsobuje „*synthetic multivulva*“ fenotyp. Jedná se z velké části o jaderné a chromatin remodelující proteiny.

Regulace alternativním sestřihem receptoru u *C. elegans*

mRNA genu *let-23* se vyskytuje ve dvou sestřihových variantách. První z nich obsahuje exony 1–18, druhá na 5' konci začíná tzv. splice leader 1 (SL1) sekvencí, vyskytující se i na jiných mRNA tohoto organismu¹⁰. Na ni navazují dva exony kódované před exonem 1, který je však v průběhu úprav pre-mRNA vystřižen, takže zbytek sekvence je tvořen exony 2–18. Není však známo, zda se jejich role v organismu liší.

Regulace lokalisací receptoru u *C. elegans*

Šest potenciálních předchůdkyň vulválních buněk je součástí polarisovaného epitelu¹¹, což znamená, že jejich apikální a basolaterální strana se vzájemně liší co do skladby membránových komponent, lipidů i proteinů. Za fyziologického stavu je receptor Let-23 rozmístěn rovnoměrně po celém obvodu epitelální buňky a je tak připraven reagovat na signál přicházející z basolaterální strany od ukotvující buňky. Jeho cílení na basolaterální membránu je úkolem komplexu proteinů Lin-2, Lin-7 a Lin-10. Aktivitu této trojice proteinů antagonizuje proteinový komplex AGEF-1/Arf GTPasa/AP-1. Dalším faktorem ovlivňujícím lokalisaci receptoru je protein Erm-1. Jeho funkcí je propojení transmembránových či s membránou asociovaných proteinů s aktinovým cytoskeletem. U P6.p buňky fixuje neaktivní Let-23 na basolaterální membráně a brání jeho endocytose. Žádaným efektem pak může být, že buňky 1° linie mají na své basolaterální membráně stále k dispozici zásobu EGF receptorů, které mohou být aktivovatelné LIN-3 signálem a zajistit tak dlouhodobou stimulaci MAP kinasové dráhy¹².

Regulace vazbou ligandu u *C. elegans*

Jediným ligandem Let-23 je LIN-3, ortolog savčího epidermálního růstového faktoru. Během indukce tvorby vulvy je jeho hlavním zdrojem ukotvující buňka¹³ (Obr. 3). Vazba LIN-3 receptor aktivuje a vyústí ve spuštění MAP kinasové signální dráhy, jejímž cílem jsou rozličné jaderné molekuly jako transkripční faktory LIN-1 a LIN-31, gen pro fibroblastový růstový faktor (FGF) *egl-17* nebo Hox-protein LIN-39. Zároveň také dochází k endocytose receptoru a tím pádem též k ukončení signalisace¹⁴. Ektopická exprese LIN-3 internalisací Let-23 ještě posílí a navodí jeho hromadění na apikální straně předchůdkyň vulválních buněk (VPC).

Regulace alternativním sestřihem ligandu u *C. elegans*

U háďátka byly nalezeny celkem tři sestřihové varianty LIN-3: krátká LIN-3S, delší LIN-3L a nejdelší LIN-3XL¹⁵. Ukotvující buňka, hlavní a nezastupitelný zdroj LIN-3 při vývoji vulvy, sekretuje LIN-3S, zato pro-

dukce formy LIN-3L je lokalisována v prekursorových buňkách vulvy a je závislá na aktivitě intramembránové proteasy ROM-1 z rodiny rhomboid-like proteas. LIN-3L isoforma se od krátké varianty liší pouze v patnácti aminokyselinách přidaných vedle štěpicího místa ROM-1. Ty mohou hrát roli retenčního signálu pro Golgiho aparát (GA) a zapříčinit tak nezbytnost proteolytického štěpení pro úspěšné projití na konec sekretorické dráhy, podobně jako v případě EGFR ligandu Spitz u octomilky (viz odst. Regulace vazbou ligandu u *D. melanogaster*). Stejní autoři též nabízejí model, podle něhož při indukcii tvorby vulvy dochází k sekvenčnímu zesílení signálu: jako odpověď na signál v podobě LIN-3S od ukotvující buňky je v buňce P6.p zesílena exprese ROM-1, díky čemuž se nastartuje produkce LIN-3L, která společně s laterální LIN-12/Notch signalisací u buněk P5.p a P7.p indukuje přeměnu na 2° linii. Funkce varianty LIN-3XL nebyla dosud uspokojivě prozkoumána.

Regulace dostupností receptoru u *C. elegans*

Po aktivaci EGF receptoru vazbou ligandu následuje endocytosa receptoru, čímž se snižuje množství molekul, které mohou na signál z extracelulárního prostředí odpovídat. Internalisovaný receptor se vydává na jednu ze dvou možných cest: buď se vrací na původní membránu (recyklace), nebo putuje z časných endosomů do multivesicular bodies (MVB) a odtud do lysosomů, kde je rozložen (degradativní cesta)¹⁶.

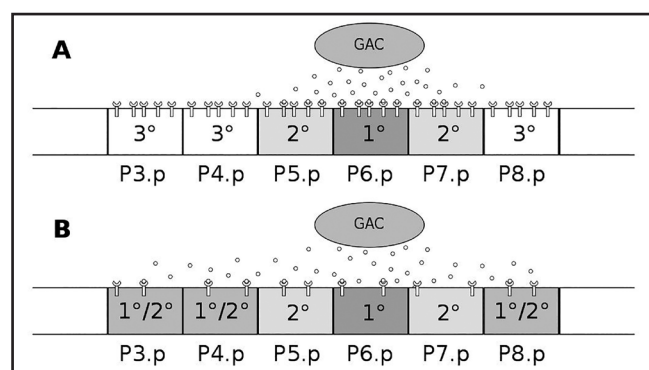
Endocytované receptory mohou svojí cytosolickou částí dále signalisovat, neboť zůstávají asociovány s adaptorovými a efektorovými proteiny. Význam tohoto jevu teprve začíná být doceňován. Ukazuje se totiž, že právě uzavření aktivovaných EGF receptorů do váčků a jejich putování do nitra buňky se podílí na zesilování signálu směrem k jádru, kam by se složky MAP kinasové dráhy prostou difusí ve fosforylovaném stavu dostávaly dlouho vzhledem k buněčným časovým poměrům (shrnuť v¹⁷).

Úplné umlčení Let-23 signalisace tedy zajišťují proteiny, které napomáhají jeho vstupu do degradativní cesty. Mezi ně patří Sli-1 (ortolog savčí c-Cbl)¹⁸, což je E3 podjednotka ubikvitinligasy. Ta s aktivovaným EGF receptorem interaguje skrz vazbu své SH2 domény na jeho fosforylovaný tyrosin 1225 (viz odst. Regulace fosforylací tyrosinových zbytků u *C. elegans*) a navazuje na něj ubikvitinylové zbytky předurčující jej k degradaci¹⁹. Dále je to GTPasa Rab-7, jež zajišťuje dopravu Let-23 z pozdních endosomů/MVB do lysosomů. Negativním regulátorem negativního regulátoru Rab-5 je protein Eps-8. Jeho exprese je v buňce P6.p posílena díky pozitivní zpětné vazbě při aktivaci Let-23. Eps-8 asociuje s komplexem LIN-7/LIN-2/LIN-10 zajišťujícím basolaterální lokalizaci receptoru (viz odst. Regulace lokalisací receptoru u *C. elegans*) a brání jeho endocytose²⁰.

Regulace dostupností ligandu u *C. elegans*

Obdržení (silného) signálu v podobě LIN-3 od GAC v buňce P6.p mimo jiné způsobí zesílení exprese Let-23²¹. Tudíž se na povrchu této buňky objeví více vazebných míst pro LIN-3, jehož difuze ke vzdálenějším VPC je takto omezena (Obr. 4). Tento model potvrzují pozorování, že mutace částečně oslabující aktivitu

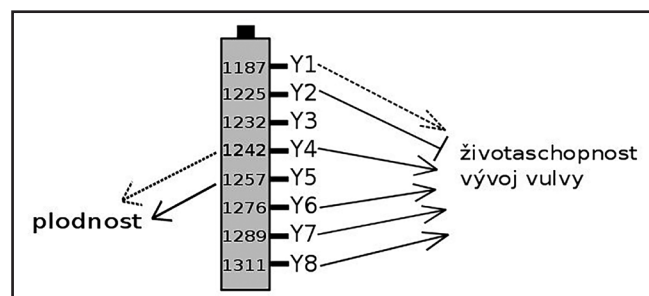
Let-23 překvapivě vedou k vytvoření „multivulva“ fenotypu a že overexprese Let-23 tento fenotyp neutralisuje.



Obr. 4: **A** – U normálního jedince dochází k vyvázání ligandu EGF receptory na P6.p (i P5.p a P7.p) buňkách a zamezení ektopického vzniku vulvy. **B** – U mutantu v genu *let-23* a *gap-1* je sekvestrace ligandu nedostatečná a citlivost vůči aktivaci Let-23 receptoru zvýšená. Buňky P3.p, P4.p a P8.p na signál od GAC reagují přeměnou na 1°, 2° nebo smíšenou (1°/2°) linii. GAC, ukotvující buňka. Překresleno podle (Hajnal et al., 1997)¹¹⁸.

Regulace fosforylací tyrosinových zbytků u *C. elegans*

V C-koncové části Let-23 se nachází osm potencionálních vazebných míst pro domény SH2, jejichž součástí je fosforylovatelný tyrosin (Obr. 5). Projevy ztráty každého z nich však nejsou uniformní²². Tyrosiny s čísly 1 a 3 (číslováno od N-konce Let-23 receptoru) se při transdukcii signálu patrně neuplatňují, zato fosforylace tyrosinu 5 je nezbytná a dostačující pro plodnost. Tyrosiny 6, 7 a 8 pak hrají roli při indukcii vulvy a podmiňují životaschopnost. Tyrosin 4 je multifunkční, pozitivně ovlivňuje životaschopnost, plodnost i vývoj vulvy. Tyrosin 2 má negativní vliv na životaschopnost a vývoj vulvy a představuje těžší přímé či nepřímé vazebné místo pro Sli-1, protein negativně regulující signalisaci skrz Let-23 (viz odst. Regulace dostupností receptoru u *C. Elegans*)¹⁹. Receptor zbavený všech osmi klíčových tyrosinů však stále vykazuje asi 10 % aktivitu vzhledem



Obr. 5: Fosforylace jednotlivých tyrosinových zbytků je klíčová pro různé fenotypové projevy. Zobrazena je pouze C-koncová doména EGF receptoru. Podle (Lesca a Sternberg, 1997)²³.

k svému nezměněnému protějšku. Je tedy možné, že některé signál předávající proteiny s Let-23 interagují jinak než prostřednictvím SH2 domén nebo že signalisace může probíhat také skrz fosforylací tyrosinů v jiných částech receptoru²³.

Drosophila melanogaster

Úvod

U octomilky se rovněž vyskytuje jediný EGF receptor, zvaný DER (*Drosophila* EGF receptor)²⁴. Na rozdíl od háďátka se při jeho regulaci uplatňují hned čtyři ligandy. Aktivovaný EGF receptor spouští MAP kinasovou signální kaskádu, která následně posílí transkripci jader-
ných genů nezbytných pro započetí buněčného dělení nebo diferenciaci. Signalisace skrze DER je nezbytná pro mnoho různých procesů napříč stadii ontogene-
tického vývoje: od indukce ventrálního ektodermu a položení základů nervové soustavy v raném embryonálním stadiu^{25, 26} přes položení základu křídel, cév a očí u larvy či kukly^{27–29} po ustanovení obou hlavních tělních os při zrání oocytů u dospělého³⁰. Není tedy divu, že nulová mutace v *der* genu je embryonálně letální, což výzkum funkce EGF receptoru značně ztěžuje^{6, 31}.

Transkripční regulace DER signalisace

Jelikož je EGF receptor exprimován hojně v mnoha tkáních, vypadá to, že hlavní regulace jeho aktivity se odehrává posttranskripčně³². Naproti tomu exprese většiny ligandů DER vykazuje výraznou tkáňovou specifi-
citu, transkripční regulace u nich tedy hraje klíčovou roli. Jedinou výjimkou je Spitz, jenž je hojně exprimován napříč tkáněmi i ontogenetickými stadii a regulace jeho biologické aktivity se odehrává na posttranslační úrovni (viz odst. Regulace vazbou ligandu u *D. melanogaster*)³³.

Regulace alternativním sestřihem receptoru u D. melanogaster

Byly popsány celkem tři sestřihové varianty DER lišící se v sekvenci na nejzazším 5' konci transkriptu³⁴. Jelikož však jejich distribuce u embrya, larvy i dospělého vy-
kazuje nápadnou uniformitu, je nejvyšší pravděpodobné, že významnou regulační roli nehrají.

Regulace vazbou ligandu u D. melanogaster

U octomilky byly dosud objeveny čtyři ligandy EGF receptoru: Spitz, Vein, Gurken a Keren. Tři z nich jsou, podobně jako LIN-3 u háďátka nebo EGF u savců, tvo-
řeny ve formě transmembránových prekurzorů, pouze Vein je produkován jako solubilní protein. Při uvolňo-
vání sekretovaných forem ligandů se uplatňují intra-
membránové proteasy z rodiny rhomboid, jichž je v ge-
nomu octomilky kódováno celkem sedm, z toho šest aktivních. Ke štěpení dochází v Golgiho aparátu, kam se z ER ligandy EGF receptoru dostávají díky proteinu Star^{35–37}. Pro uvolňování ligandu Gurken je navíc po-
třebný protein Cornichon. Ligandy se od sebe liší co do tkáňové lokalisace i potenciálu aktivovat EGF re-
ceptor, avšak jejich funkce se částečně překrývají (např. Spitz a Vein se účastní vzniku žilek, Spitz a Keren vzniku složených očí).

Regulace negativní zpětnou vazbou u D. melanogaster

Silnou aktivaci EGF receptoru zpravidla následuje sekrece proteinu Argos³⁸. Ten z okolí buňky vyvazuje

Spitz a působí tak utlumení signalisace skrze DER³⁹. Ačkoli bylo předpokládáno, že Argos jako solubilní mo-
lekula působí na dlouhou vzdálenost (model tzv. vzdá-
lené inhibice³⁸), výsledky výpočetní analýzy naznačují, že pravdou může být pravý opak⁴⁰.

Aktivaci EGF receptoru je spouštěna také exprese transmembránového proteinu Kekkon^{**}, která však na rozdíl od Argosu vykazuje stupňovitý charakter. Kekkon se pomocí na leucin bohatých domén ve své extracelulární části váže na DER tak, že znemožňuje vazbu ligandu⁴². Na této interakci se podílí také jeho transmembránový úsek, zatímco cytosolická část Kekkonu je nezbytná pro jeho správnou – apikální – lo-
kalisaci. Mutace v tomto regulačním proteinu se ve fenotypu nijak výrazně neprojevují, což je známkou překrývajících se funkcí inhibitorů DER.

Dalším proteinem, jehož exprese je podmíněna akti-
vací MAP kinasové dráhy, je Sprouty. Jedná se o intra-
celulární protein asociovaný s vnitřní stranou plasma-
tické membrány⁴³. Princip jeho inhibičního působení je zřejmě založen na znemožnění správného sestavení proteinů signální transdukce do komplexu vazbou na dva z nich, Drk a Gap-1⁴³.

Echinoid je transmembránový protein s šesti Ig-like doménami, který interaguje se svými protějšky na okol-
ních buňkách a také podstupuje odštěpování ektodo-
mény⁴⁴. Na rozdíl od výše popsaných inhibitorů DER však zřejmě nepodléhá transkripční regulaci. Podle mo-
delu vycházejícího z poznatků o inhibitorych aktivity ty-
rosinkinase receptorů u obratlovců se na fosforylo-
vaný Echinoid váže protein Corkscrew, který tím pádem nemůže zprostředkovat interakce mezi efektorovými proteiny signální transdukce⁴⁵.

Regulace dostupností receptoru u D. melanogaster

Podobně jako u *C. elegans* je i u octomilky množství receptoru dostupného pro navázání ligandu negativně ovlivňováno ubiquitinligasou D-Cbl, která po jeho aktivaci napomáhá endocytose⁴⁶. D-Cbl se vyskytu-
je ve dvou isoformách: isoforma L obsahuje jak RING doménu klíčovou pro internalisaci EGF receptoru, tak na prolin bohatou doménu (proline-rich region, PRR), u isoformy S však PRR chybí. D-CblL navozuje endocy-
tosu aktivovaného EGF receptoru v závislosti na míře své exprese, zatímco činnost D-CblS tuto závislost nevykazuje. L-forma ubiquitinligasy endocytovaný re-
ceptor cílí do Rab5/Rab7 dráhy končící jeho degradací v lysosomech⁴⁷. S ohledem na skutečnost, že buněčná lokalisace forem S a L se zdá být odlišná, lze předpo-
kládat, že EGF receptor endocytovaný za účasti D-CblS směřuje do jiné transportní dráhy⁴⁸.

Regulace dostupností ligandu u D. melanogaster

Pozoruhodnou roli hraje výše zmíněná D-Cbl ubiq-
uitinligasa při zrání oocytu. Bylo prokázáno, že efektivní pohlcování EGF receptoru s navázaným proteinem Gurken buňkami folikulu mimo jiné zamezuje příliš daleké difuzi tohoto ligandu a tedy i dorsalisaci embrya⁴⁷.

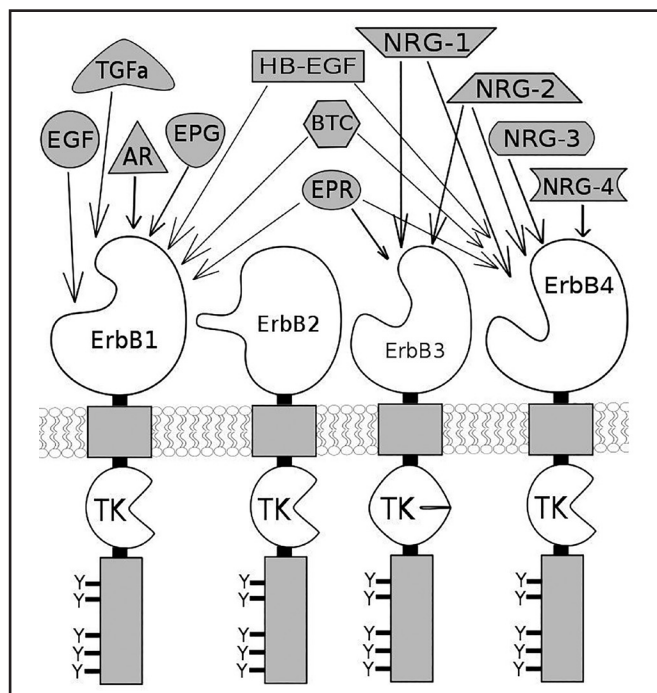
^{**}V genomu *Drosophily* bylo dosud identifikováno celkem šest lokusů nazývaných *kekkon*, avšak inhibiční vliv na DER byl dosud popsán pouze u Kekkonu 1⁴¹. Není-li uvedeno jinak, je v této práci pod pojmem Kekkon míněn vždy pouze proteinový produkt tohoto genu.

Jiným proteinem podílejícím se na regulaci dostupnosti ligandů je Rhomboid 5 – nazývaný také iRhom –, který postrádá proteolytickou aktivitu⁴⁹. Jeho exprese byla prokázána v buňkách dávajících vznik nervové soustavě u všech ontogenetických stadií a jeho absence je spojena s častějším upadáním do spánku⁵⁰. iRhom se vyskytuje hlavně v endoplasmatickém retikulu, kde interaguje s prekursory ligandů DER a vysílá je na cestu tzv. degradace asociované s endoplasmatickým retikulem (ER-associated degradation, ERAD)⁵⁰, která končí degradací v proteasomu. Tento mechanismus ukazuje, jak se základní mechanismus kontroly kvality proteinů zajímavě vyvinul v prvek regulující mezibuněčnou signalizaci.

Homo sapiens sapiens

Diversita lidských EGF receptorů

U člověka jsou přítomny hned čtyři EGF receptory: ErbB1 známý jako EGFR nebo HER1, ErbB2 označovaný HER2 či Neu, ErbB3 zvaný též HER3 a konečně ErbB4 neboli HER4^{51–54}. Za účelem zachování jednotné terminologie budeme dále používat názvy ErbB1, ErbB2, ErbB3 a ErbB4. Prvním popsáným EGF receptorem se stal ErbB1. Nachází se na všech epiteliálních a stromálních buňkách, na vybraných buňkách gliových a některých buňkách hladkých svalů (shrnutí v⁵⁵), ve fibroblastech a naopak chybí v melanocytech. U polarizovaných buněk epitelů je přítomen především na basolaterální straně, čímž je zabráněno jeho nežádoucí aktivaci ligandy produkovanými do lumen⁵⁶. ErbB1 má zachovanou jak schopnost vázat ligandy (viz odst. Regulace vazbou ligandu u *H. sapiens*) tak tyrosinkinasovou aktivitu (Obr. 6)⁵⁷.



Obr. 6: Schematické znázornění čtyř EGF receptorů u savců a jejich interakcí s ligandy. AR – amphiregulin, BTC – betacellulin, EGF – epidermální růstový faktor, EPR – epiregulin, EPG – epigen, HB-EGF – heparin vazebný EGF, NRG – neuregulin, TGFα – transformující růstový faktor α. Podle (Seshacharyulu et al., 2012)¹¹⁹.

Naproti tomu ErbB2 schopnost vázat ligandy zřejmě nemá, neboť žádná přirozeně se naň vážící molekula přes velkou snahu dosud nebyla identifikována. Krytalová struktura jeho extracelulární domény odhalila, že domény L1 a L2 svou posicí napodobují konformaci receptoru s navázaným ligandem. Tyrosinkinasová doména tohoto EGF receptoru však je plně funkční⁵⁸. ErbB2 najdeme na nervosvalových spojích a také v mléčné žláze, v keratinocytech, melanocytech, epitelech žláz i ve fibroblastech.

Receptor ErbB3 se vyskytuje v keratinocytech, melanocytech, epitelu žaludku, plic či ledvin, také v mozku, v placentě a na nervosvalových spojích. Co do signálních vlastností je přesným opakem ErbB2: na jeho extracelulární část se váží rozličné ligandy (viz odst. Regulace vazbou ligandu u *H. sapiens*), avšak doména tyrosinkinasová má, ve srovnání s ErbB1, prakticky nulovou schopnost fosforylovat⁵⁹.

Poslední z ErbB receptorů, ErbB4, se rovněž vyskytuje na postsynaptických membránách nervosvalových spojů, hojně v mozku, srdci, ledvinách, mozečku, míše a v mléčné žláze. Podobně jako ErbB1 je aktivován několika ligandy a rovněž jeho tyrosinkinasová aktivita je neporušena^{54, 60}.

Mnohé pokusy osvětlující biologickou funkci EGF receptoru, např. s knock-outy genů, byly prováděny na myších a teprve podle jejich výsledků bylo usuzováno na způsob fungování dotyčných molekul v lidském těle.

Transkripční regulace EGFR signalisace

Co se ErbB receptorů týče, bylo zatím vyzkoumáno, že v mléčné žláze je transkripce ErbB1 i ErbB2 regulována přítomností estrogenu a to jak negativně^{61, 62} tak pozitivně⁶³. O transkripční regulaci ligandů je toho známo mnohem více. Transkripci TGFα a amphiregulinu posiluje protein Ras, jenž je sám aktivován skrze EGF receptory a účastní se tudíž pozitivní zpětnovazebné smyčky⁶⁴. Ektodysplasín skrze NFκB pozitivně reguluje transkripci amphiregulinu a epigenu v kůži⁶⁵. Interleukin-13 má u myši též vliv na transkripci epigenu v horních cestách dýchacích⁶⁶. Luteinizační hormon a choriogonadotropin zase stimulují expresi amphiregulinu, epigenu a epiregulinu v granulosaových buňkách myších vaječných folikulů⁶⁷.

Regulace alternativním sestřihem receptorů u *H. sapiens*

Všechny ErbB receptory se vyskytují v několika sestřihových variantách. U ErbB1, 2 a 3 byly popsány solubilní formy receptorů, popř. formy s membránou asociované a solubilními se stávající po odštěpení ektodomény metalloproteasami ADAM. Solubilní formy ErbB receptorů jsou schopny bránit aktivaci plnodělkových transmembránových receptorů vyvazováním ligandů v okolí buněk^{68–70}. Není bez zajímavosti, že u některých typů rakovin byly objeveny aberantní alternativní transkripty ErbB1 i ErbB2⁷¹, jakož i fakt, že obsah solubilní formy ErbB2 v séru pacienta je využíván jako indikátor při odhadu účinnosti léčby na něj cílené (shrnutí v Baron et al., 2009)⁷². V případě ErbB4 hraje alternativní sestřih klíčovou regulační roli. Kromě plnodělkové varianty byla objevena forma odolná vůči odštěpová-

ní ektodomény⁷³ i forma postrádající vazebné místo pro PI-3 kinasu, a tudíž neschopná skrze tento protein signální transdukce komunikovat^{74, 75}.

Regulace vazbou ligandu u *H. sapiens*

U lidských ErbB receptorů byla identifikována více než jedna desítka ligandů (shrnuto v Singh a Coffey, 2014)⁷⁶. Všechny jsou produkovány ve formě transmembránových prekursorů a z nich poté odštěpovány metalloproteasami skupiny ADAM (shrnuto v Blobel, 2005)⁷⁷. Ligandy se vzájemně liší tkáňovou expresí, specificitou vazby vůči jednotlivým ErbB molekulám (Obr. 6) a afinitou k receptoru (např. EGF se na ErbB1 váže silněji než epiregulin či epigen). Pole působnosti ligandů se *in vivo* často překrývají, což má za následek, že 1) knock-out jediného z nich se nemusí vůbec projevit, neboť ostatní ligandy jej hravě zaskočí, 2) odstranění více než jednoho genu zároveň má horší důsledky než součet efektů jejich separátních nulových mutací.

Regulace alternativním sestřihem ligandu u *H. sapiens*

Neuregulin-1 se vyskytuje v mnoha isoformách (shrnuto ve Falls, 2003)⁷⁸. Některé z nich jsou solubilní, jiné procházející membránou jedenkrát či dvakrát. Isoformy mohou obsahovat EGF-like doménu buď typu α , nebo β (typ β je silnějším aktivátorem ErbB receptorů). Sestřihové varianty neuregulinu-1 se dále liší svou N-koncovou sekvencí. Ta může být buď typu I nebo II (pak je u obou následována Ig-like doménou), nebo typu III, v kterémžto případě zahrnuje na cystein bohatou doménu. Výsledky mnoha experimentů naznačují, že formy typu I a II podstupují odštěpování ektodomény metalloproteasou ADAM-17 a účastní se tudíž parakrinní signalisace, zatímco u typu III se setkáváme spíše se signalisací juxtakrinní. Několik sestřihových variant se zřejmě vyskytuje také v případě všech ostatních neuregulinů.

Regulace dostupností ligandu u *H. sapiens*

Všechny ligandy ErbB receptorů jsou produkovány jako transmembránové prekursory^{**}, a odštěpování jejich biologicky aktivní N-koncové části, tzv. ektodomény, tudíž představuje klíčový regulační krok. Tento úkol zastávají především membránově zakotvené metalloproteasy z rodiny ADAM (Tabulka I), hlavně ADAM17 a v menší míře ADAM10. Produkci některých ligandů zásadně ovlivňují také pseudoproteasy iRhom-1 a 2 (t. j. sekvencně příbuzné proteasám z rodiny rhomboidů, ale postrádající proteasovou aktivitu), a to tím, že zajišťují dopravu ADAM17 z ER do Golgiho aparátu a umožňují tak její maturaci, aktivaci a sekreci ligandů⁷⁹. Navíc se ukazuje, že iRhom působí jako jakýsi stabilní kofaktor ADAM-17⁸⁰ ovlivňující její proteolytickou specifitu⁸¹.

Tabulka I: Metalloproteasy účastnící se odštěpování ektodomén ligandů EGF receptoru. Podle^{83, 85, 114, 115}

ADAM9	HB-EGF
ADAM10	betacellulin, EGF
ADAM17	TGF α , HB-EGF, amphiregulin epiregulin, betacellulin, epigen, neureguliny
ADAM19	neuregulin-1

^{**}Kromě některých solubilních isoform neuregulinů⁵⁸.

Regulace dimerisací u *H. sapiens*

Po vazbě ligandu a vytrčení dimerisačního raménka může ErbB receptor vytvořit dimer s jiným ErbB receptorem vyskytujícím se na téže membráně. Interagovat spolu mohou molekuly stejné, což vede k tvorbě homodimerů, nebo rozdílné, čímž vznikají silněji signalisující heterodimery. Různé kombinace aktivovaných ErbB receptorů přitom přivábí různé efektorové proteiny a vedou k různým buněčným odpovědím, nejsou tedy vzájemně zastupitelné^{60, 82}. Upřednostňovaným dimerisačním partnerem je ErbB2, který signalisaci skrze ostatní ErbB receptory posiluje. Jak již bylo zmíněno výše, ErbB2 není schopen vázat žádné ligandy. Rozřešení jeho krystalové struktury ukázalo, že má neustále vytrčené dimerisační raménko⁸³. Tyto dvě skutečnosti dobře vysvětlují jeho ohromný signalisační potenciál: k vytvoření dimeru s ErbB2 stačí vazba pouze jedné molekuly ligandu. Vznik homodimerů ErbB2, které by signalisovaly i bez přítomnosti ligandu, by však pro organismus představoval velké nebezpečí, a proto je mu *in vivo* bráněno nejspíš vzájemnou elektrostatickou repulzí ramének. Byla také popsána asymetrická homodimerisace ErbB2 způsobem „hlava k ocasu“, což může představovat další způsob, jak nežádoucí aktivaci tohoto receptoru zabránit⁸⁴. Homodimer ErbB3 zase není schopen předat signál přes plasmatickou membránu z důvodu nefunkční tyrosinkinasové domény. Čtyři lidské ErbB receptory tedy skýtají paletu celkem osmi různých dimerů, které se mohou podílet na modulaci signálu⁸⁵. Kuriosně se z nich jako nejschopnější *in vitro* ukázal být právě vzájemně se doplňující heterodimer ErbB2-ErbB3^{85, 86}.

Regulace dostupností receptoru u *H. sapiens*

ErbB receptory se u polarizovaných epitelů vyskytují na basolaterální membráně, čímž je zabráněno jejich nežádoucí aktivaci růstovými faktory produkovány do lumen. Nicméně menšinová populace receptorů na apikální straně preferenčně spouští jiné signální kaskády a je také pomaleji endocytována⁸⁷. Za basolaterální lokalisaci EGF receptorů odpovídají proteiny CASK, mLIN-7 a X11 α (neboli Mint-1), homology proteinů LIN-2, 7 a 10 u hádátka⁸⁸. Míru aktivace ErbB molekul také může ovlivnit jejich přednostní dopravení do kaveol, kde snáze narazí na dimerisačního partnera nebo proteiny signální transdukce⁸⁹.

Dimer aktivovaných receptorů s navázanými ligandy záhy podstupuje internalisaci do endocytotických váčků¹⁴. Jeho další osud závisí na několika faktorech. Prvním je typ vytvořeného dimeru. Zatímco homodimer ErbB1 prakticky vždycky skončí v lysosomech, homodimery ErbB3 a heterodimery obsahující ErbB2 jsou navraceny („recyklovány“) na plasmatickou membránu^{90, 91}. Dalším faktorem je typ navázaného ligandu.

Vazba EGF na ErbB1 je odolná vůči kyselému pH v endosomech, komplex ligand-receptor se tedy nerozpadá a před MVB putuje do lysosomů, kde je degradován⁹². Naproti tomu TGF α od svého receptoru v endosomu disociuje a, nastoupiv sám degradativní cestu, umožní mu návrat na plasmatickou membránu⁹³. Stejně jako TGF α fungují i epiregulin a epigen^{94, 95}. Internalisaci ErbB receptorů a jejich cílení do lysosomů posiluje také činnost ubikvitinligas: c-Cbl interaguje s ErbB1⁹⁶, CHIP s ErbB2⁹⁷. Některé experimenty naznačují, že ErbB1 může být z MVB dopravován do exosomů a v nich podstupovat proteolytické štěpení⁹⁸.

Regulace skrz ostatní signální kaskády u *H. sapiens*

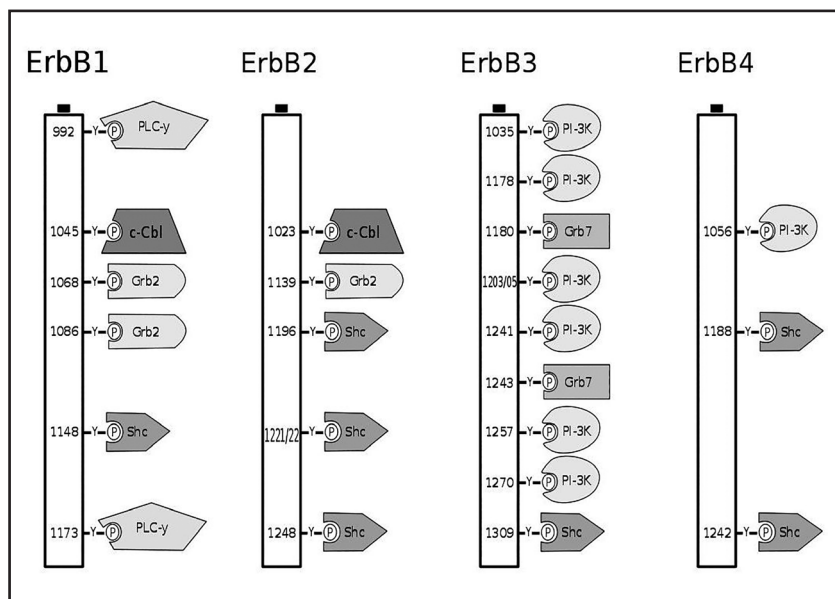
K aktivaci ErbB receptorů může docházet také v důsledku spuštění signalisace přes jiné receptory. V tomto případě hovoříme o tzv. signálu tříkrát procházejícím membránou (triple membrane-passing signal, TMPS)⁹⁹. Přijetí signálu z vnějšího prostředí vede k aktivaci příslušné ADAM metalloproteasy, ta z prekursoru ligandu EGF receptoru odštěpí jeho ektodoménu, která se naváže na ErbB receptor, jenž je tímto aktivován a standardním způsobem předá signál dovnitř buňky. Tento proces byl dosud popsán u HB-EGF, TGF α , amphiregulinu a epiregulinu, kde v roli metalloproteasy vystupuje ADAM17^{81, 100}. Pro transaktivaci ErbB receptorů jsou naprosto klíčové iRhomy, které regulují dopravu ADAM17 do Golgiho aparátu (viz odst. Regulace dostupnosti ligandu u *H. sapiens*)⁷⁹ i její aktivitu a substrátovou specifitu na plasmatické membráně^{80, 81}. Receptory spřažené s G-proteiny nebo cytokinové receptory mohou zároveň vyvolat fosforylaci proteinů ErbB, a to nezávisle na jejich vlastní kinasové aktivitě. Děje se tak například prostřednictvím Src nebo Jak kinas^{101, 102}.

Regulace odštěpováním ektodomény receptoru u *H. sapiens*

Podobně jako jejich ligandy podstupují též některé isoformy ErbB receptorů odštěpování ektodomény za účasti ADAM proteas. Plnodělkový ErbB1 je vůči tomuto štěpení odolný¹⁰³, jeho isoforma vznikající z 3 kb transkriptu jako transmembránový protein je však substrátem ADAM17¹⁰⁴. Uvolňování ektodomény ErbB2 za účasti ADAM10 bylo popsáno u buněk rakoviny prsu^{105, 106}. Z isoform ErbB4 tomuto procesu podléhá pouze JM-a, která je specificky štěpena ADAM17¹⁰⁷. Pozoruhodné je, že v membráně pozůstalý zbytek receptoru může být dále štěpen γ -sekretasou a poté jako solubilní molekula dopraven do jádra¹⁰⁸, kde spolu s ostatními proteiny ovlivňuje transkripci genů. Jiným překvapujícím zjištěním bylo, že při silné (uměle navozené) nadprodukci může být ErbB1 substrátem pro intramembránovou proteasu RHBDL2 (Rhomboid-like protein 2)¹⁰⁹. Jestli se tento mechanismus skutečně uplatňuje při endogenních expresních úrovních daných proteinů nebo *in vivo* však není známo.

Regulace fosforylací tyrosinových zbytků u *H. sapiens*

Fosforylací jednotlivých tyrosinových zbytků v cytosolických doménách ErbB receptorů vznikají vazebná místa pro mnoho proteinů účastnících se transdukce signálu (Obr. 7) (shrnuto v Olayioye *et al.*, 2000)¹¹⁰. Do jaké míry však jsou tyto zbytky potřebné pro vznik té které buněčné odpovědi nebo do jaké míry jsou vzájemně zastupitelné není dosud u všech ErbB molekul jednoznačně prokázáno. V případě ErbB2 byly čtyři z pěti fosforylovatelných tyrosinů vůči Ras/MAP kinasové dráze identifikovány jako aktivační a vzájemně zastupitelné, zbylý tyrosin pak jako inhibiční¹⁶⁴. U ErbB1 bylo prokázáno, že role jednotlivých tyrosinových zbytků se při zapínání různých buněčných odpovědí mohou lišit¹¹¹ a že jejich přítomnost je klíčová pro efektivní internalisaci receptoru s navázaným ligandem^{112, 113}.



Obr. 7: Jednotlivé fosforylované tyrosiny v C-koncových částech ErbB receptorů představují vazebná místa pro různé proteiny signálních drah. PI-3 K, fosfoinositidkinasa. Překresleno podle (Olayioye *et al.*, 2000)¹¹⁰.

Závěr

Sledování vývoje regulačních mechanismů aktivace EGF receptorů ukazuje, že jejich komplexita roste se zvyšující se složitostí organismu. Na základě informací shromážděných na předchozích stránkách vysvítá několik zřetelných trendů, které se při tomto procesu uplatnily.

1. Zmnožení (multiplikace): Zatímco u hádátka signalisace probíhá prostřednictvím jednoho EGF receptoru s jedním ligandem, u octomilky jsou již k dispozici ligandy čtyři. U člověka počet EGF receptorů vzrůstá na čtyři a počet ligandů na jedenáct. Roste tudíž i počet kvalitativně odlišných dimerů, jež spolu mohou aktivované receptory vytvářet.

2. Rozrůznění (diversifikace): Větší počet ligandů i receptorů umožňuje efektivní rozdělení jejich rolí. U hádátka aktivace EGF receptoru probíhá vždy prostřednictvím jediného ligandu, modulace síly signálu se tedy musí odehrávat ovlivněním jeho množství, ať už na transkripční, posttranslační či postsekreční úrovni. Mezi ligandy octomilky nalezneme silné i slabé aktivá-

tory EGF receptoru, které se navíc liší svou tkáňovou lokalizací. U člověka se k rozrůzněnosti vlastností a tkáňové distribuce ligandů přidává též jejich rozdílná specifita pro jednotlivé typy EGF receptorů (a *vice versa* z pohledu receptorů). Za extrémní příklad diversifikace rolí lze považovat receptory ErbB2 a ErbB3. Zatímco první jmenovaný není schopen vazby ligandu, ale má zachovanou tyrosinkinasovou aktivitu, ErbB3 ligandy vázat dovede, avšak tyrosinkinasová doména u něj funkční není. Tyto dva receptory, ač jako jednotlivci transdukce signálu neschopní, se ve svých omezeních vzájemně doplňují a vytvářejí spolu silně signalisující heterodimer.

3. Zachování (konservace): Některé regulační mechanismy zůstávají zachovány u všech analyzovaných organismů, např. endocytosa receptoru nebo řízení jeho lokalizace. Za pozornost také stojí, že role proteinů z rodiny rhomboidů jakožto modulátorů signalisace přes EGF receptor zůstává zachována napříč fylogenetickým spektrem organismů. U háďátka se podílejí

na sekvenčním zesilování signálu, u octomilky plní funkci hlavních regulátorů produkce ligandů. V případě člověka (savců) byly v roli producentů solubilních forem ligandů vystřídány metalloproteasami ADAM, avšak ukazuje se, že iRhomy tento proces kontrolují právě regulací proteinů ADAM, ponechávající si rovněž svůj vliv na ERAD prekursorů ligandů.

4. Spolupráce (kooperace): Úlohy jednotlivých ligandů se *in vivo* často překrývají, což je ve zdánlivém rozporu s výše zmíněnou diversifikací. Tento trend však souvisí se zachováním robustnosti signalizačního systému. V případě poškození genu pro některý z ligandů totiž jeho funkci mohou ostatní kompenzovat

Poděkování

Vznik této práce byl podpořen projektem NPU LO1302 Ministerstva kultury, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura

- Cohen S, Fava RA, Sawyer ST: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 6237 (1982).
- Aroian RV, Koga M, Mendel JE, et al.: *Nature* 348, 693 (1990).
- Mineev KS, Bocharov EV, Pustovalova YE, et al.: *J. Mol. Biol.* 400, 231 (2010).
- Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, et al.: *Mol. Cell* 11, 507 (2003).
- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, et al.: *Cell* 110, 775 (2002).
- Freeman M: *Cell* 87, 651 (1996).
- Herman RK: *Genetics* 88, 49 (1978).
- Sternberg PW: *WormBook* (2005). Available at: http://www.wormbook.org/chapters/www_vulval-dev/vulvaldev.html. Accessed March 17, 2017.
- Flibotte S, Kim BR, Van de Laar E, et al.: *Dev. Biol.* 415, 46 (2016).
- Krause M, Hirsh D: *Cell* 49, 753 (1987).
- Kim SK: *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 853 (1997).
- Haag A, Gutierrez P, Bühler A, et al.: *PLoS Genet.* 10 (2014). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4006739/>. Accessed April 12, 2017.
- Hill RJ, Sternberg PW: *Nature* 358, 470 (1992).
- Haigler HT, McKanna JA, Cohen S: *J. Cell Biol.* 81, 382 (1979).
- Dutt A, Canevascini S, Froehli-Hoier E, et al.: *PLoS Biol.* 2 (2004). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC519001/>. Accessed March 22, 2017.
- Burke P, Schooler K, Wiley HS: *Mol. Biol. Cell* 12, 1897 (2001).
- Kholodenko BN: *Trends Cell Biol.* 12, 173 (2002).
- Jongeward GD, Clandinin TR, Sternberg PW: *Genetics* 139, 1553 (1995).
- Yoon CH, Chang C, Hopper NA, et al.: *Mol. Biol. Cell* 11, 4019 (2000).
- Stetak A, Hoier EF, Croce A, et al.: *EMBO J.* 25, 2347 (2006).
- Simske JS, Kaech SM, Harp SA, et al.: *Cell* 85, 195 (1996).
- Kimble J: *Dev. Biol.* 87, 286 (1981).
- Lesca GM, Sternberg PW: *Mol. Biol. Cell* 8, 779 (1997).
- Livneh E, Glazer L, Segal D, et al.: *Cell* 40, 599 (1985).
- Raz E, Shilo BZ: *Genes Dev.* 7, 1937 (1993).
- Skeath JB: *Development* 125, 3301 (1998).
- Domínguez M, Wasserman JD, Freeman M: *Curr. Biol.* 8, 1039 (1998).
- Martin-Blanco E, Roch F, Noll E, et al.: *Development* 126, 5739 (1999).
- Nagaraj R, Pickup AT, Howes R, et al.: *Development* 126, 975 (1999).
- Neuman-Silberberg FS, Schüpbach T: *Mech. Dev.* 59, 105 (1996).
- Price JV, Clifford RJ, Schüpbach T: *Cell* 56, 1085 (1989).
- Zak NB, Wides RJ, Schejter ED, et al.: *Development* 109, 865 (1990).
- Schweitzer R, Shaharabany M, Seger R, et al.: *Genes Dev.* 9, 1518 (1995).
- Schejter ED, Segal D, Glazer L, et al.: *Cell* 46, 1091 (1986).
- Reich A, Shilo B-Z: *EMBO J.* 21, 4287 (2002).
- Lee JR, Urban S, Garvey CF, et al.: *Cell* 107, 161 (2001).
- Urban S, Lee JR, Freeman M: *Cell* 107, 173 (2001).
- Golembo M, Schweitzer R, Freeman M, et al.: *Development* 122, 223 (1996).
- Klein DE, Nappl VM, Shvartsman SY, et al.: *Nature* 430, 1040 (2004).
- Reeves GT, Kalifa R, Klein DE, et al.: *Dev. Biol.* 284, 523 (2005).
- Alvarado D, Rice AH, Duffy JB: *Genetics* 167, 187 (2004).
- Ghiglione C, Amundadottir L, Andresdottir M, et al.: *Development* 130, 4483 (2003).
- Casci T, Vinós J, Freeman M: *Cell* 96, 655 (1999).
- Bai J, Chiu W, Wang J, et al.: *Development* 128, 591 (2001).
- Spencer SA, Cagan RL: *Development* 130, 3725 (2003).

Literatura (pokračování)

46. Pai L-M, Barcelo G, Schüpbach T: *Cell* 103, 51 (2000).
47. Chang W-L, Liou W, Pen H-C, et al.: *Development* 135, 1923 (2008).
48. Pai L-M, Wang P-Y, Chen S-R, et al.: *Mech. Dev.* 123, 450 (2006).
49. Urban S, Lee JR, Freeman M: *EMBO J.* 21, 4277 (2002).
50. Zettl M, Adrain C, Strisovsky K, et al.: *Cell* 145, 79 (2011).
51. Cohen S, Carpenter G, King L: *J. Biol. Chem.* 255, 4834 (1980).
52. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, et al.: *Nature* 319, 230 (1986).
53. Kraus MH, Issing W, Miki T, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9193 (1989).
54. Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1746 (1993).
55. Wells A: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 637 (1999).
56. Marti U, Burwen SJ, Jones AL: *Hepatology* 9, 126 (1989).
57. Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C, et al.: *J. Biol. Chem.* 257, 1523 (1982).
58. Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, et al.: *Science* 256, 1205 (1992).
59. Neve RM, Sutterlüty H, Pullen N, et al.: *Oncogene* 19, 1647 (2000).
60. Riese DJ, Bermingham Y, van Raaij TM, et al.: *Oncogene* 12, 345 (1996).
61. Yarden RI, Wilson MA, Chrysogelos SA: *J. Cell. Biochem.* 81, 232 (2001).
62. Borg Å, Baldetorp B, Fernö M, et al.: *Cancer Lett.* 81, 137 (1994).
63. Salvatori L, Ravenna L, Felli MP, et al.: *Endocrinology* 141, 2266 (2000).
64. Sizemore N, Cox AD, Barnard JA, et al.: *Gastroenterology* 117, 567 (1999).
65. Voutilainen M, Lindfors PH, Lefebvre S, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5744 (2012).
66. Taniguchi K, Yamamoto S, Aoki S, et al.: *Exp. Lung Res.* 37, 461 (2011).
67. Carletti MZ, Christenson LK: *Reprod. Camb. Engl.* 137, 843 (2009).
68. Reiter JL, Maihle NJ: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 39 (2003).
69. Doherty JK, Bond C, Jardim A, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10869 (1999).
70. Lee H, Akita RW, Sliwkowski MX, et al.: *Cancer Res.* 61, 4467 (2001).
71. Omenn GS, Guan Y, Menon R: *J. Proteomics* 0, 103 (2014).
72. Baron AT, Wilken JA, Haggstrom DE, et al.: *IDrugs Investig. Drugs J.* 12, 302 (2009).
73. Elenius K, Corfas G, Paul S, et al.: *J. Biol. Chem.* 272, 26761 (1997).
74. Elenius K, Choi CJ, Subroto P, et al.: *Publ. Online* 23 April 1999 Doi101038sjonc1202612 18 (1999). Available at: <https://www.nature.com/onc/journal/v18/n16/full/1202612a.html>. Accessed April 21, 2017.
75. Sawyer C, Hiles I, Page M, et al.: *Publ. Online* 18 August 1998 Doi101038sjonc1202015 17 (1998). Available at: <https://www.nature.com/onc/journal/v17/n7/abs/1202015a.html>. Accessed April 21, 2017.
76. Singh B, Coffey RJ: *Annu. Rev. Physiol.* 76, 275 (2014).
77. Blobel CP: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32 (2005).
78. Falls DL: *Exp. Cell Res.* 284, 14 (2003).
79. Li X, Maretzky T, Weskamp G, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6080 (2015).
80. Grieve AG, Xu H, Künzel U, et al.: *eLife* 6 (2017).
81. Maretzky T, McIlwain DR, Issuree PDA, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11433 (2013).
82. Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, et al.: *J. Biol. Chem.* 274, 17209 (1999).
83. Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, et al.: *Mol. Cell* 11, 495 (2003).
84. Hu S, Sun Y, Meng Y, et al.: *Oncotarget* 6, 1695 (2015).
85. Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al.: *Mol. Cell. Biol.* 16, 5276 (1996).
86. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al.: *EMBO J.* 15, 2452 (1996).
87. Amsler K, Kuwada SK: *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* 276, C91 (1999).
88. Borg J-P, Straight SW, Kaech SM, et al.: *J. Biol. Chem.* 273, 31633 (1998).
89. Mineo C, James GL, Smart EJ, et al.: *J. Biol. Chem.* 271, 11930 (1996).
90. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, et al.: *J. Biol. Chem.* 271, 5251 (1996).
91. Waterman H, Sabanai I, Geiger B, et al.: *J. Biol. Chem.* 273, 13819 (1998).
92. Herbst JJ, Opresko LK, Walsh BJ, et al.: *J. Biol. Chem.* 269, 12865 (1994).
93. Korc M, Finman JE: *J. Biol. Chem.* 264, 14990 (1989).
94. Kochupurakkal BS, Harari D, Di-Segni A, et al.: *J. Biol. Chem.* 280, 8503 (2005).
95. Shelly M, Pinkas-Kramarski R, Guarino BC, et al.: *J. Biol. Chem.* 273, 10496 (1998).
96. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, et al.: *Genes Dev.* 12, 3663 (1998).
97. Xu W, Marcu M, Yuan X, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12847 (2002).
98. Sanderson MP, Keller S, Alonso A, et al.: *J. Cell. Biochem.* 103, 1783 (2008).
99. Prenzel N, Zwick E, Daub H, et al.: *Nature* 402, 884 (1999).
100. Maretzky T, Evers A, Zhou W, et al.: *Nat. Commun.* 2, 229 (2011).
101. Andreev J, Galisteo ML, Kranenburg O, et al.: *J. Biol. Chem.* 276, 20130 (2001).
102. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, et al.: *Nature* 390, 91 (1997).
103. Vecchi M, Baulida J, Carpenter G: *J. Biol. Chem.* 271, 18989 (1996).
104. Wilken JA, Perez-Torres M, Nieves-Alicea R, et al.: *Biochemistry (Mosc.)* 52, 4531 (2013).
105. Liu PCC, Liu X, Li Y, et al.: *Cancer Biol. Ther.* 5, 657 (2006).

Literatura (pokračování)

106. Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ, et al.: *J. Biol. Chem.* 266, 1716 (1991).
107. Rio C, Buxbaum JD, Peschon JJ, et al.: *J. Biol. Chem.* 275, 10379 (2000).
108. Ni CY, Murphy MP, Golde TE, et al.: *Science* 294, 2179 (2001).
109. Liao H-J, Carpenter G: *Traffic Cph. Den.* 13, 1106 (2012).
110. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, et al.: *EMBO J.* 19, 3159 (2000).
111. Yamaoka T, Frey MR, Dise RS, et al.: *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol.* 301, G368 (2011).
112. Sorkin A, Waters C, Overholser KA, et al.: *J. Biol. Chem.* 266, 8355 (1991).
113. Sorkin A, Helin K, Waters CM, et al.: *J. Biol. Chem.* 267, 8672 (1992).
114. Harari D, Tzahar E, Romano J, et al.: *Oncogene* 18, 2681 (1999).
115. Citri A, Skaria KB, Yarden Y: *Exp. Cell Res.* 284, 54 (2003).
116. Bogdan S, Klämbt C: *Curr. Biol.* 11, R292 (2001).
117. Escobar-Restrepo JM, Hajnal A: *Worm* 3, e965605 (2014).
118. Hajnal A, Whitfield CW, Kim SK: *Genes Dev.* 11, 2715 (1997).
119. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, et al.: *Expert Opin. Ther. Targets* 16, 15 (2012).

Souhrn

Trávníčková K., Strišovský K.: Evoluce regulačních mechanismů aktivace EGF receptoru

Signalisace prostřednictvím EGF receptoru je klíčová pro správný průběh ontogenetického vývoje i udržování homeostasy v tělech organismů. Jsou skrze ni regulovány procesy jako proliferace, migrace či diferenciace buněk. Na příkladu tří dobře probádaných organismů, *C. elegans*, *D. melanogaster* a *H. sapiens sapiens*, jsou v tomto článku vyloženy principy regulace EGF receptoru a na jejich základě poté vyvozeny trendy, které se při jejich evoluci uplatnily. Zvláštní pozornost je přitom věnována proteinům z rodiny rhomboidů, jejichž činnost je se signalisací EGF receptoru pevně spjata. Narušení regulace EGF receptoru významně přispívá k projevům některých onemocnění, předně mnohých typů rakovin, ale také schizofrenie, lupénky a kardiovaskulárních chorob. Proto mají výsledky výzkumu na tomto poli potenciál uplatnit se při vývoji nových léčebných prostředků.

Klíčová slova: EGF receptor, regulační mechanismy, evoluční trendy, signální transdukce, dimerisace, odštěpování ektodomény, rhomboid, endocytosa, autofosforylace, tyrosinkinasa

Summary

Trávníčková K., Strišovský K.: Evolution of regulatory mechanisms of EGF receptor activation

Signalling through the EGF receptor is crucial both for ontogenesis and for maintaining homeostasis in adult organisms. It is involved in controlling cellular behaviours such as proliferation, migration or differentiation. This thesis provides an insight into evolution of the regulatory mechanisms of EGF receptor activation by discussing their principles in *C. elegans*, *D. melanogaster* and *H. sapiens sapiens*, on the basis of which conclusions about their evolutionary tendencies are made. Attention is focused on the roles of the rhomboid family of proteins, whose activity is tightly associated with EGF receptor signalling. Dysregulation of the EGF receptor unnegligibly contributes to the development of various diseases, mainly many types of cancer, but also schizophrenia, psoriasis and cardiovascular disorders. Experimental results obtained on this field of research therefore have the potential to be applied in drug design.

Keywords: EGF receptor, regulatory mechanisms, evolutionary trends, signal transduction, dimerisation, ectodomain shedding, rhomboid, endocytosis, autophosphorylation, tyrosin kinase

AUXÍNOM INDUKOVANÁ ŠPECIFICKÁ DEGRADÁCIA PROTEÍNŮV V CICAČÍCH BUNKÁCH AKO EXPERIMENTÁLNY NÁSTROJ PRE ŠTÚDIUM FUNKCIE PROTEÍNŮV

Ivana Ferencová, Petr Šolc

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Laboratoř integrity DNA, Centrum PIGMOD; ferencova@iapg.cas.cz

Úvod

Regulácia fyziologických procesov je u všetkých organizmov podmienená správnou reguláciou expzie proteínov v danom mieste (tkanivo) a čase (napr. fáza bunkového cyklu, fáza ontogenetického vývoja). Oplyvnenie expzie, predovšetkým jej zníženie, sa využíva pre identifikáciu funkcie proteínu. Pre deláciu proteínu (úplne zrušenie expzie) sa dnes vo výskume využívajú dva hlavné metodické prístupy: 1) delácia génu kódujúceho proteín (DNA knock-out)¹ alebo 2) RNA interferencia cielená na destabilizáciu alebo degradáciu mRNA daného proteínu². V oboch prípadoch sa jed-

ná o nepriamu reguláciu expzie proteínu. V prípade stabilnejších proteínov nie je možné týmito prístupmi dosiahnuť ich úplnú deláciu v krátkom čase. Takýto proteín je degradovaný postupne, pričom sa fenotyp delácie neprejaví ihneď, ale postupne a výsledkom môže byť nesprávne stanovenie funkcie proteínu. Riešením je metóda schopná úplnej a špecifickej degradácie proteínu v krátkom časovom intervale. Túto možnosť poskytuje nedávno objavený systém degradácie proteínov indukovanej auxínom, tzv. AID (Auxin Inducible Degron) systém³. Jedná sa o akútnu degradáciu špecifickeho proteínu indukovanú fytohormónom auxínom. Prístup indukovanej degradácie proteínov poskytuje

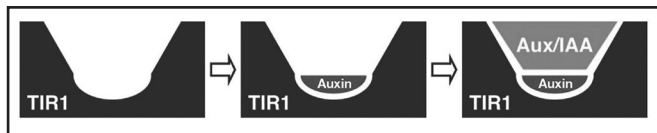
možnosť regulovať degradáciu v čase v závislosti na prítomnosti / absencii induktora, v prípade AID systému auxínu. To je výhodou v porovnaní s úplnou deléciou proteínu v organizme, kedy je delécia génu pre daný proteín trvalá a stabilná. Prečo AID systém predstavuje revolučný metodický prístup v štúdiu funkcie proteínov u cicavčích buniek? Ako bol tento systém objavený a čo je jeho podstatou? Cieľom tohto článku je odpovedať na tieto otázky.

Mechanizmus auxínom indukovanej degradácie proteínov u rastlín

Auxín je fytohormón, ktorý zohráva u rastlín centrálnu úlohu v regulácii väčšiny procesov rastu a vývoja⁴. Reguluje expresiu Aux/IAA (auxín / indol-3-octová kyselina) proteínov, ktoré fungujú ako transkripčné represory blokujúce expresiu ARF (auxin response factor) transkripčných faktorov. V prítomnosti nízkej hladiny auxínu sú Aux/IAA proteíny stabilné a inhibujú funkciu ARF. Nárast koncentrácie auxínu vedie naopak k degradácii Aux/IAA proteínov, čo spôsobí uvoľnenie ARF transkripčných faktorov pre reguláciu exprese proteínov auxínovej dráhy^{5,6}.

Degradácia Aux/IAA proteínov v prítomnosti auxínu prebieha prostredníctvom proteazómu. Proteíny cieleňé pre túto degradáciu sú označené kovalentne viazaným polyubiquitínom (Ub) v procese ubiquitinylácie. E3 Ub ligáza (u eukaryotických organizmov je to najčastejšie SCF ligáza) je na konci tohto procesu a prenáša aktivovaný Ub na lyzín proteínu cieleňého pre degradáciu. SCF ligáza je tvorená komplexom proteínov: Rbx-1, Cul1, Skp1 a F-box (SCFF-b^{ox})⁷. Jednotlivé druhy SCF ligáz sa od seba líšia typom F-box proteínu, ktorý určuje špecifitu pre cieľový substrát určený k degradácii⁸.

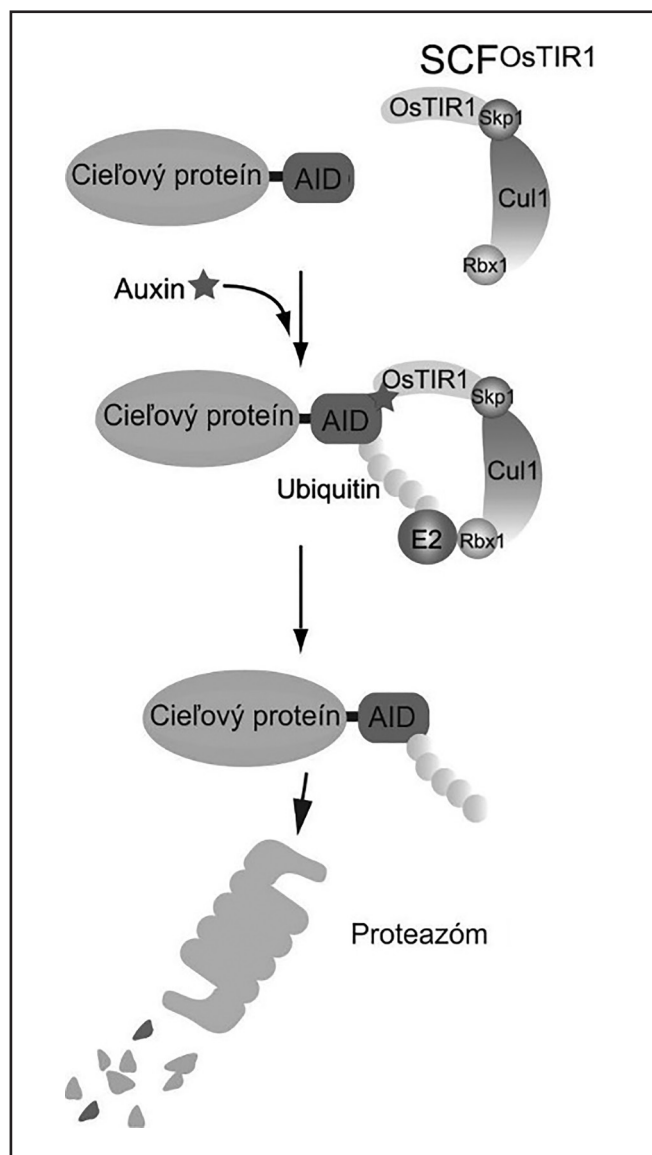
U rastlín sú Aux/IAA proteíny ubiquitinylované prostredníctvom SCF ligázy, kde F-box proteín je reprezentovaný TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) proteínom (SCF^{TIR1})^{9,10}. V prítomnosti auxínu je TIR1 schopný rozpoznať tzv. AID doménu u Aux/IAA proteínov: auxín sa naviaže na TIR1, čím vytvorí väzbové miesto pre Aux/IAA (Obr. 1). Auxín teda predstavuje „molekulárne lepidlo“ stabilizujúce väzbu medzi TIR1 a Aux/IAA proteínom¹¹. Následne sú Aux/IAA proteíny ubiquitinylované SCF^{TIR1} ligázou, a nakoniec degradované v proteazóme.



Obr. 1: Model väzby TIR1 a AU/IAA proteínov regulovaný účinkom auxínu. TIR1 viaže AUX/IAA proteíny obsahujúce AID doménu, ale len v prítomnosti fytohormónu auxínu. Auxín zvyšuje afinitu týchto dvoch proteínov na základe interakcie s nimi bez významnej konformačnej zmeny TIR1 (upravené podľa Xu et al., 2007).

Aplikácia AID systému u cicavčích buniek

Proteíny môžu byť v bunke exprimované z prirodzeného lokusu (t.j. vzniká endogénny proteín z genómu bunky) alebo ektopicky (t.j. po mikroinjekcii / transfekcii DNA vektora alebo mRNA pre daný proteín). TIR1



Obr. 2: Schematické znázornenie degradácie proteínov prostredníctvom AID systému u cicavčích buniek. U cicavčích buniek je exogénny OsTIR1 (TIR1 proteín exprimovaný *Oryza Sativa* – ryža siata) schopný vytvoriť s ostatnými endogénnymi proteínmi (Rbx-1, Cul1, Skp1) funkčný komplex SCF^{OsTIR1}. Proteíny degradované AID systémom obsahujú AID doménu. V prítomnosti fytohormónu – auxínu je AID doména rozpoznávaná TIR1 proteínom, dochádza k ubiquitinylácie tohto proteínu prostredníctvom SCF^{OsTIR1}, a nakoniec k jeho degradácii v proteazóme (upravené podľa Natsume et al., 2016).

a rovnako Aux/IAA proteíny sú endogénne exprimované len u rastlín. Avšak sekvencia Skp1 proteínu, na ktorú sa viaže TIR1 za vzniku SCF^{TIR1} (Rbx-1-Cul1-Skp1-TIR1) komplexu, je u väčšiny eukaryotických organizmov (rastliny, kvasinky, myš, človek) konzervovaná³. Tiež sa zistilo, že termostabilný TIR1 proteín exprimovaný u rastliny *Oryza sativa* – ryža siata (OsTIR1) funguje aj pri 37 °C (t.j. teplote pre kultiváciu cicavčích buniek) a je schopný po ektopickej expresii v cicavčích bunkách vytvoriť funkčný SCF^{TIR1} komplex s ostatnými endogénnymi komponentami SCF (Rbx-1-Cul1-Skp1)³ (Obr. 2). Aby u cicavčích buniek mohlo dôjsť k rozpoznaní proteínu prostredníctvom OsTIR1, musí študovaný proteín obsahovať sekvenciu AID domény (ďalej v texte označenie proteín-AID) (Obr. 2). U ľudských

buniek ektopicky exprimujúcich proteín-AID a OsTIR1 je možné účinkom auxínu veľmi efektívne degradovať proteín-AID. Naopak odmytie auxínu vedie k nárastu hladín proteín-AID³. Holland et al. (2012) navyše ukázali, že AID systém je možné využiť pre rýchlu a efektívnu degradáciu proteínov bez ohľadu na to, či sú voľné alebo súčasťou komplexu, lokalizované v cytosole alebo v jadre, pričom k tejto degradácii dochádza v každej fáze bunkového cyklu¹².

Akým spôsobom je možné napr. v ľudskej bunkovej línii pomocou AID systému rýchlo odstrániť študovaný proteín pre sledovanie fenotypového prejavu jeho absencie? Pri súčasných technológiách sa ponúkajú 3 základné prístupy: 1) Znížiť prípadne úplne umlčať expresiu príslušnej mRNA pomocou RNA interferencie. Zároveň v bunke exprimovať proti RNA interferencii rezistentnú variantu príslušnej mRNA, kedy v kódujúcej časti je navyše sekvenca pre AID. 2) Ďalšou možnosťou je využiť bunky deficientné pre gén kódujúci daný proteín a v nich opäť exprimovať príslušnú mRNA obsahujúcu navyše i sekvenciu pre AID. 3) Poslednou a pravdepodobne najelegantnejšou možnosťou je vložiť sekvenciu AID do oboch alel kódujúcich študovaný proteín. Vo všetkých troch uvedených možnostiach máme vo výsledku bunky, ktoré neexprimujú pôvodnú variantu proteínu, ale exprimujú jeho modifikovanú variantu t.j. proteín-AID. Hlavnou nevýhodou prvého prístupu je, že stále môže byť v malom množstve prítomný pôvodný proteín, ktorého stabilita nie je ovplyvnená auxínom. Pre prvý a druhý prístup je tiež spoločnou nevýhodou, že exprimovaný proteín-AID nemusí byť prítomný v rovnakom množstve ako pôvodný proteín. To možno čiastočne vyriešiť využitím odpovedajúceho promotora, ale riziko nie úplne korektnej miery expresie je stále prítomné. Tretí prístup tieto nevýhody nemá, pretože študovaný proteín je exprimovaný z endogénnych lokusov, len má pripojenú AID sekvenciu. Tento prístup je však metodicky najnáročnejší, pretože vyžaduje presnú editáciu oboch kópií daného génu. Navyše ale umožňuje vykonať akútnu degradáciu proteínu, ktorého trvalá absencia (pri knock-out alebo RNA interferencií) je pre bunku úplne letálna a nie je tak napr. možné precízne študovať rolu tohto proteínu v konkrétnej fáze bunkového cyklu.

Využitie AID systému sa ukázalo ako účinný nástroj pre degradáciu ektopicky exprimovaných proteínov u rôznych typov cicavčích buniek (myš, škrečok, opica a človek)^{3,12}. Aplikácia AID systému tým prekonala limity inhibície expresie proteínu na úrovni DNA a mRNA, ktoré sú v prípade degradácie veľmi stabilných proteínov málo efektívne a v prípade úplne esenciálnych proteínov obtiažne interpretovateľné. Bolo preukázané, že napr. CENP-A proteín patriaci do skupiny veľmi

stabilných proteínov¹³ je možné vďaka AID systému degradovať efektívne a rýchlo¹².

Aplikácia AID systému sa ukázala ako elegantný prístup, ktorým je možné u cicavčích buniek reverzibilne manipulovať aj stabilitu proteínu exprimovaného z prirodzeného endogénneho lokusu. To umožňuje sledovať jeho špecifickú úlohu aj v tak rýchlych procesoch, akým je prechod bunkovým cyklom. Prvýkrát sa o degradáciu endogénneho proteínu pomocou AID systému pokúsili vo vedeckej publikácii Lambrus et al. (2015). Vytvorili bunkovú líniu, kde obe alely endogénneho Plk4 (Polo-like kinase 4) proteínu boli doplnené o AID sekvenciu (Plk4^{AID/AID}). Hladiny endogénneho Plk4 manipulovali u týchto buniek po stabilnej expresii OsTIR1 na základe prítomnosti / absencie auxínu. To umožnilo analýzu proteínov asociovaných s Plk4 v bunkových procesoch, a tiež pomohlo odhaliť úlohu Plk4 v signalizačnej dráhe¹⁴. Navyše sa nedávno podarilo kombináciou AID systému a CRISPR/Cas (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats/**CRISPR-associated**) techniky vytvoriť ľudské línie exprimujúce rôzne typy endogénnych proteínov-AID. Aplikácia auxínu aj v tomto prípade viedla k efektívnej degradácii cytosolického aj jadrového proteínu-AID. Rovnako sa ukázalo, že je možné týmto prístupom indukovať degradáciu endogénnych proteínov aj u myších embryonálnych kmeňových buniek¹⁵. Kombinácia AID systému s CRISPR/Cas technológiou prináša nástroj pre uľahčenie tvorby rôznych typov endogénnych proteínov cielených pre degradáciu AID systémom.

Záver

Štúdium funkcie proteínov vyžaduje ich akútnu a rýchlu degradáciu. V opačnom prípade je skúmaný proteín degradovaný postupne, čo je sprevádzané obtiažne interpretovateľnými efektmi na fenotyp. Výsledkom môže byť nesprávna charakterizácia jeho funkcie. Rastlinný AID systém bol účinne aplikovaný u cicavčích buniek pri štúdiu rôznych proteínov^{12,14}. Výhodou tohto systému je jeho rýchly účinok a efektívna degradácia cieľového proteínu. V porovnaní s metódami regulujúcimi degradáciu proteínu na úrovni DNA alebo mRNA, ktoré boli zatiaľ v prípade štúdia funkcie proteínu používané, je účinok AID systému reverzibilný. K akumulácii proteínu dochádza už niekoľko desiatok minút po odmytí auxínu^{12,15}. V kombinácii s CRISPR/Cas9 technikou prináša aplikácia AID systému v oblasti regulácie expresie endogénnych proteínov u cicavčích buniek veľký potenciál do budúcnosti.

PodĎakovanie: Táto práca vznikla s podporou projektu č. LO1609 za finančnej podpory MŠMT v rámci programu NPU I.

Literatúra

1. Hall B, Limaye A, and Kulkarni AB: *Curr. Protoc. Cell Biol.* 19 (2009).
2. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al.: *Nature* 411, 494 (2001).
3. Nishimura K, Fukagawa T, Takisawa H, et al.: *Nature Methods* 6, 917 (2009).
4. Teale WD, Paponov IA, and Palme K: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 847 (2006).
5. Wang R, and Estelle M: *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 51 (2014).
6. Lavy M, and Estelle M: *Development* 143, 3226 (2016).

Literatúra (pokračovanie)

7. Ang XL, and Harper JW: *Oncogene* 24, 2860 (2005).
8. Skaar JR, Pagan JK, and Pagano M: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 14, 369 (2013).
9. Dharmasiri N, Dharmasiri S, and Estelle M: *Nature* 435, 441 (2005).
10. Kepinski S, and Leyser O: *Nature* 435, 446 (2005).
11. Xu T, Calderon-Villalobos LIA, Michal S, et al.: *Nature* 446, 6400 (2007).
12. Holland AJ, Fachinetti D, Han JS, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, E3350 (2012).
13. Jansen LE, Black BE, Foltz DR, et al.: *J. Cell Biol.* 176, 795 (2007).
14. Lambrus BG, Uetake Y, Clutario KM, et al.: *J. Cell Biol.* 210, 63 (2015).
15. Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, et al.: *Cell Rep.* 15, 210 (2016).

Súhrn

Ferencová I., Šolc P. : Auxínom indukovaná špecifická degradácia proteínov v cicavčích bunkách ako experimentálny nástroj pre štúdium funkcie proteínov

AID (**A**uxin **I**nducible **D**egron) systém bol objavený u rastlín ako degradačná dráha regulovaná fytohormónom – auxínom. Tento systém možno aplikovať aj u cicavcov a využiť pre rýchlu a špecifickú degradáciu exogénnych aj endogénnych proteínov. Aby v prítomnosti auxínu bol študovaný proteín u cicavcov degradovaný, musí obsahovať AID sekvenciu a bunky musia zároveň exprimovať receptor pre AID – t.j. OsTIR proteín (TIR1 proteín exprimovaný u *Oryza Sativa* – ryža siata). Vďaka svojej rýchlosti, efektívnosti degradácie a reverzibilnému účinku predstavuje AID systém ideálnu metódu pre štúdium funkcie proteínov u cicavcov.

Kľúčové slová: auxín, degradácia proteínov, určenie funkcie proteínu

Summary

Ferencová I., Šolc P.: Specific auxin-induced protein degradation in mammalian cells: an experimental tool for protein function determination

AID (**A**uxin **I**nducible **D**egron) system was discovered in plants as a protein degradation pathway regulated by the phytohormone auxin. This system is applicable also in mammals and it can be used for rapid and specific degradation of exogenic as well as endogenic proteins. In order to be degraded in presence of auxin in mammals, the protein has to contain the AID sequence and the cells have to express the AID receptor – i.e. OsTIR. Thanks to a rapid, effective degradation and reversibility effect, AID system represents an ideal approach for studying protein functions in mammals.

Keywords: auxin, protein degradation, protein function determination

OBSAH

Úvod	73
Pozvánka na konferenci	74
Gratulace k jubileu	74
Dubánková A., Bouřa E.: Vztah struktury a funkce RNA dependentních RNA polymeras vybraných virů	75
Boháčová Š., Stříšovský K.: Zkřížená prezentace antigenu – mechanismus a biologický význam v kontextu imunitního systému	77
Fialová E., Zdeňková K., Demnerová K.: Digitální PCR a její porovnání s PCR I. a II. generace	91
Trávníčková K., Stříšovský K.: Evoluce regulačních mechanismů aktivace EGF receptoru	95
Ferencová I., Šolc P.: Auxinom indukovaná špecifická degradácia proteínov v cicavčích bunkách ako experimentálny nástroj pre štúdium funkcie proteínov	104

CONTENTS

Editorial	73
Conference invitation	74
Congratulations to the jubilee	74
Dubánková A., Bouřa E.: Relationship of structure and function of RNA dependent RNA polymerases of selected viruses	75
Boháčová Š., Stříšovský K.: Antigen cross-presentation – mechanisms and biological roles in the immune system	77
Fialová E., Zdeňková K., Demnerová K.: Digital PCR and its comparison with PCR 1st and 2nd generation	91
Trávníčková K., Stříšovský K.: Evolution of regulatory mechanisms of EGF receptor activation	95
Ferencová I., Šolc P.: Specific auxin-induced protein degradation in mammalian cells: an experimental tool for protein function determination	104

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skácel, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers. In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z.: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).