

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Charakteristika a laboratorní vyšetřování cytotoxických T lymfocytů

Zdeňka Fulková

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zdeňka Fulková**
Osobní číslo: **C12216**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Charakteristika a laboratorní vyšetřování cytotoxických T lymfocytů.**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se literárními zdroji týkajícími se charakteristiky a CD znaků cytotoxických T lymfocytů. Přehledně diskutujte jejich úlohu v imunitních mechanismech včetně uvedení vývojových fází T lymfocytů.
2. Zaměřte se na rozpoznání peptidů receptorem T lymfocytů. Vyhledejte informace o procesu zpracování peptidu v Endoplazmatickém retikulu a esenciální roli chaperon-peptidových komplexů.
3. Zpracujte aktuální přehled laboratorní detekce cytotoxických T lymfocytů a vyšetřování jejich funkcí.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Původní zdroje z webových databází <http://isiknowledge.com/>,
<http://www.pubmed.gov>, <http://www.sciencedirect.com/> ne starší 10 let.
Laboratorní encyklopedie SEKK (<http://www.enclabmed.cz/>).**

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **12. prosince 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. července 2015**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2015

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4.7. 2017

Zdeňka Fulková

Poděkování

Mé poděkování patří Mgr. Slovákové Marcele PhDr. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

ANOTACE

Práce je věnována cytotoxickým T lymfocytům, se zaměřením na jejich povrchové CD znaky a proteiny nacházející se na povrchu, i mimo jejich plazmatickou membránu. Tyto znaky mají mnoho funkcí, pro člověka je důležitá především tato: cytotoxické T lymfocyty „kontrolují“ antigeny zpracované buňkou, tedy i nádorové a virové. Díky některým těmto CD znakům a dalšími proteinovými složkami buňky, jako je například chaperon, jsou schopné se proteiny přeskupit do tzv. jednodušších forem, aby jednodušeji procházely přes membránu do endoplasmatického retikula.

KLÍČOVÁ SLOVA

cytotoxické T lymfocyty, CD znaky, proteiny, chaperon, co-chaperon

TITLE

Characteristics and laboratory investigation of cytotoxic T lymphocytes

ANNOTATION

The work is devoted to cytotoxic T lymphocytes focusing on the surface features of CD and proteins found on the surface and beyond their plasma membrane. These features have many features, especially for humans: cytotoxic T lymphocytes "control" antigens developed by the cell, i.e., tumor and viral. Thanks to some of these CD features and other protein components of cells, such as chaperon, it is possible to convert proteins into so-called simpler forms to more easily pass through the membrane into the endoplasmic reticulum.

KEYWORDS

Cytotoxic T lymphocytes, CD signs, proteins, chaperon, co-chaperon

Obsah

Úvod.....	12
1 Cytotoxické T lymfocyty.....	13
1.1 Povrchové a CD znaky T lymfocytů.....	13
1.1.1 Membránové CD znaky T lymfocytů.....	13
1.1.2 Membránový receptor T lymfocytů	15
1.2 Vývoj cytotoxických T lymfocytů	17
1.3 Role cytotoxických T lymfocytů v imunitních mechanizmech.....	18
1.3.1 Úloha nespecifické (přírozené) imunity v aktivaci cytotoxických T lymfocytů	18
1.3.2 Úloha specifické (získané) imunity v aktivaci cytotoxických T lymfocytů ..	19
2 Struktura předkládaného peptidu.....	21
3 Chaperon.....	23
3.1 Základní rozdělení, úloha a funkce chaperonu	25
3.2 Druhy chaperonů.....	28
3.2.1 gp96	28
3.2.2 Mini chaperony	29
3.2.3 Hsp100.....	29
3.2.4 Hsp 90.....	30
3.2.5 Kalnexin a kalretikulin.....	34
3.2.6 Hsp70 a Hsc70	34
3.2.7 Hsp60.....	37
3.2.8 sHsp	38
3.2.9 Spouštěcí faktor.....	39
3.2.10 NAC chaperon.....	40
3.2.11 SecB	40
3.3 Co - chaperon	40
3.3.1 GroE(S)	41
3.3.2 Hsp40 a Hsc70.....	42
4 Laboratorní detekce cytotoxických T lymfocytů a vyšetřování jejich funkcí.....	44
4.1 Obecný princip průtokové cytometrie.....	44
4.2 Vlastní detekce cytotoxických T lymfocytů	44

5	Závěr.....	46
6	Použitá literatura.....	47

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: <i>Spolupráce membránových a intracelulárních molekul na přenosu informace o antigenu vázaného na TCR</i>	16
Obrázek 2: <i>Životní fáze proteinů v buňce</i>	22
Obrázek 3: <i>Chaperon - asistované skládání proteinů</i>	24
Obrázek 5: <i>Model pro režim p23</i>	33
Obrázek 6: <i>Struktura malého proteinu tepelného šoku z archaea Methanococcus jannaschii</i>	31
Obrázek 4: <i>Struktura GroE chaperonu z E. coli, určená rentgenovou krystalografií</i>	41
Tabulka 1: <i>Přehled chaperonů</i>	26

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Ab	Protilátka (protilátky)
Ag	Antigen (antigeny)
APC	Antigen prezentující buňka (ky)
ATP	adenindinukleotidfosfát
BCL-X _L	B buněčný lymfom – extra velký
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
CD8+	aktivovaný T _C
CNS	centrálně nervový systém
CR	komplementový receptor (complement receptor)
ER	Endoplasmatické retikulum
GADS	Grb2-related adaptor downstream of Shc
GRB2	growth factor receptor – bound protein 2 (protein 2 vázaný na receptoru růstového faktoru)
HPD	histidin – prolin - asparát
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
IFN	interferon
IO	imunitní odpověď
KD	kostní dřeň
LFA	adhezivní molekula leukocytů (leukocyte – function – associated antigen)
MAC	komplex (komplementový) aktivující membránu
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (major histocompatibility complex)

NBD	N – terminální ATPázové domény
NK	nukleová kyselina
PI3K	fosfatidilinositol-3-kinasa
SBD	C – terminální vazebné domény substrátu
SH2	Src homology 2
TCR	Receptor T lymfocytů pro antigen (T – cell receptor)
T _C	cytotoxický T lymfocyt (cytotoxin T – cell)
T _H	Pomocný T lymfocyt (helper T – cell)
T _S	supresorové T lymfocyty
TF	spouštěcí faktor
TNF	tumor – nekrosis faktor
Treg	regulační T lymfocyt
TRIM	TCR-interacting molekule (molekula interagující T buněčný receptor)
ZAP	ζ-associated protein

Úvod

Tato práce se zabývá cytotoxickými T lymfocyty. Uvádí základní povrchové znaky T lymfocytů, společně s jejich funkcí v lidském organismu. Povrchové znaky CD8 a CD4 rozdělují T lymfocyty na cytotoxické a pomocné. Se všemi CD znaky je spojená aktivace, díky které se zahájí imunitní odpověď na neznámý patogen, nebo pozměněný vnitřní antigen, např. nádorový.

Tato práce se zabývá i momentem zahájení imunitní reakce, ve kterém spolu komunikují antigen prezentující buňka (APC) a T lymfocyt prostřednictvím molekul HLA (Human leucocyte antigen = lidský lymfocytární antigen) a TCR (receptor T lymfocytů). Jednotlivé molekuly HLA systému jsou na povrchu buněk uspořádány do komplexů, které se podle charakteru a funkce řadí do dvou základních tříd. Molekuly I. třídy jsou obsaženy na povrchu všech jaderných buněk a jsou důležité pro rozpoznání buněk. Cizí antigen (virový, nádorový) prezentovaný ve spojení s těmito antigeny umožní cytotoxickým T lymfocytům (CD8+) reagovat. Molekuly II. třídy jsou na povrchu pouze některých buněk, a to zejm. buněk prezentujících antigen (APC), které následně předkládají zpracovaný antigen T lymfocytům. Čímž nenavodí imunitní odpověď. Důležitými produkty imunitní reakce jsou také protilátky Ig, ležící na povrchu buněk, dále cytokiny jako např. IL – 2, IL – 4, IL 10, atd. a také CD40L, které jsou produkovány buňkami imunitního systému (T lymfocyty) a jsou schopné navodit např. rychlé dělení buněk, a také aktivují buňky ke změně tvaru a funkce a sami po přeměně např. v makrofág pohlcují okolní patogen. Protilátky produkované B lymfocytymají proteinový charakter, jsou složeny z aminokyselin (AK) a různých peptidických spojů. Sekvence AK a velikost molekul z nich tvořených je důležitá pro vlastní charakter molekuly.

Tato práce se také zabývá proteinem, který napomáhá správnému sbalování polypeptidového řetězce do vyšších struktur a skládání podjednotek do nadmolekulárních celků nazývaná chaperon. Chaperon se např. váže na určité oblasti vznikajícího polypeptidu, čímž brání vzniku nežádoucí vzájemné interakce této oblasti s jinými úseky téhož polypeptidu, nesprávnému uspořádání či předčasné degradaci. Toto má v této práci především význam pro TCR, reagující na cizorodé antigeny. Práce je doplněna přehledem laboratorních metod, kterými lze detekovat a sledovat funkci cytotoxických T lymfocytů.

1 Cytotoxické T lymfocyty

Cytotoxické T lymfocyty společně s pomocnými T lymfocyty patří do skupiny bílých krvinek. Představují asi 23% lymfocytů v periferní krvi. Nacházejí se v krvi, v lymfě a specializovaných lymfatických tkáních. Specificky rozpoznávají antigen a patří do specifické imunity [1, 2].

Vznikají na různých místech, ale především v lymfatických uzlinách, slezině, KD a v lymfatických ostrůvcích střešní sliznice. Díky těmto orgánům má svůj název (lymfocyt = lymfa), kde i vyžívá a „učí se“ svému specifickému chování (proliferace, diferenciaci a dozrávání v imunokompetentní buňku). Vyvíjí se do dalších subpopulací. Zralé lymfocyty se kontinuálně pohybují mezi krví a lymfou. Po prostoupení tkání se hromadí v malých lymfatických cévách, dále přecházejí do větších cév a přes *ductus thoracicus* jdou zpět do krve. Tu po několika málo hodinách T lymfocyt opět opustí, aby se přes lymfatickou tkáň znovu vrátil do lymfatických cév. To usnadňuje setkávání s Ag, ke kterému dochází většinou v lymfatické tkáni. Tento pohyb vede k nepřetržitému imunitnímu dohledu [2,3, 4].

1.1 Povrchové a CD znaky T lymfocytů

1.1.1 Membránové CD znaky T lymfocytů

T lymfocyty lze rozlišit pomocí membránových znaků CD, kterými je určen typ, diferenciací a vývojové stádium buňky a další charakteristiky. V následujících odstavcích jsou uvedeny CD molekuly důležité pro pomocné a cytotoxické T lymfocyty [3].

T lymfocyty lze dělit na dvě fenotypové skupiny podle přítomnosti znaků CD4 anebo CD8. CD4 pozitivní T lymfocyt je označen jako tzv. pomahačský (helper). Znak CD4 je koreceptorem receptoru TCR, jehož ligandem je MHC gp II a patří do imunoglobulinové rodiny. T lymfocyty rozpoznávají Ag v komplexu s HLA II. třídy. Pomahačský T lymfocyt se po setkání s Ag a dalšími faktory, především cytokinů, diferencují do dvou podskupin T_H1 a T_H2 . Ty produkují různé spektrum cytokinů. T_H1 produkuje IFN - γ , IL - 2 a indikuje imunitní reakci buněčného typu. T_H2 produkuje IL - 4, 5, 6, 10. CD4 znak je humorálního typu. Některé lymfocyty T produkující velké množství IL - 10 a ty se značí jako Th3. CD4+ mají sekreční schopnosti a tím i schopnost aktivovat jiné buněčné populace. A proto se některé CD4 znaky i v malé míře nacházejí na povrchu, makrofágů, monocytů, dendritických, Langerhansových a některých dalších buněk. Zúčastňují se tu prezentace exogenních antigenů

předkládané buňkami ve formě komplexu HLA II. třídy. Takto se např. chová i receptor pro virus HIV vyvolávající onemocnění AIDS. [2, 4, 5]

CD8 znak je transmembránový glykoprotein imunoglobulinového typu. CD8 znak T lymfocytu je koreceptorem receptoru pro Ag (TCR), jehož ligandem je MHC gp I. Funkce CD8 pozitivních T lymfocytů je cytotoxická (tzv. usmrcují defektní buňky), paměťová, supresorová (bb. T_s) a regulační funkce díky produkci cytokinů [2, 4, 5].

CD8+ T lymfocyty jsou hlavními efektorovými buňkami pro buněčnou adaptivní imunitu a jsou schopny rozpoznat a zabít viry, infikované buňky a nádorové buňky. Jejich funkce však může být některými nádory narušena. Studie autorů Redegeld a spol a Mandler a spol ukázala, že Ag - specifické funkce T lymfocytů mohou být náchylnější k nízké hodnotě pH [6].

CD1 je glykoproteinová molekula, která se nachází na povrchu tymocytů, a dále také β – buněk, dendritových buněk, interdigitujících buněk a Langerhansových buněk kůže. CD1 molekula se pojí s β_2 – mikroglobulinem do dimeru podobného HLA gp I. třídy. Je podstatně méně polymorfní, než α – řetězce HLA I. CD1 prezentují lipidové a glykolipidové Ag na povrchu APC a to zejména T lymfocytům, které nesou receptor pro Ag typu $\gamma\delta$. Tento způsob rozpoznání se uplatňuje v oblasti např. obrany proti mykobakteriím a jiným parazitům a také u některých fosfolipidových syndromů, např. různé trombózy a hemolytické anémie [4].

CD2 molekula je transmembránový glykoprotein, který se nachází zejména na povrchu tymocytů a zralých T lymfocytů. Na tuto molekulu adsorbují ovčí erytrocyty, díky kterým lze testy určit počet T lymfocytů [4].

Receptor CD3 je molekula složená s pěti polypeptidových řetězců imunoglobulinového charakteru pojící se (je součástí) k receptoru TCR. Ten váže nabídnutý prezentovaný Ag ve spojení s molekulami HLA. Nachází se na všech zralých T lymfocytech. Jejich funkcí je přenášet signál z TCR do buňky [4].

CD17 slouží jako prognostický faktor pro terapii myeloidní leukemie.[7]

CD28 podporuje proliferaci a produkci cytokinů, přispívá k přijímání lipidových raftů (glykolipoproteinové mikrodomény v membráně), které jsou bohaté na spojení signálních proteinů, v místě mezi TCR a APC Po aktivaci T lymfocytů, je znak CD28 fosforylován tyrosinem. T lymfocyty se znaky CD28 poskytují nedostačující pomoc B lymfocytům po infekci nebo imunizaci. B lymfocyty nejsou tedy schopny změny imunoglobulinů [8, 9].

CD40 je jeden z nejlépe charakterizovaných kostimulačních molekul. Spouští aktivaci a diferenciaci T-buněk hlavně cytotoxických linií. Také je to jeden z receptorů faktoru nekrosy nádorů B lymfocytů. CD40 se váže na ligand CD40L (také označován jako CD154), který je přechodně exprimován na T lymfocytech a dalších buňkách zánětlivých podmínek. Interakce mezi CD40 a CD40L představují tedy hlavní kostimulační systém, který zesiluje imunitní reakci a může tak podporovat zánět. Pozitivně kostimulační. CD40L je součástí TNF se sendvičovou konstrukcí a za zánětlivých podmínek je indukována na monocyty, NK buňky, žírné buňky a bazofily [10, 11, 12].

Znak CD56+ mají NK buňky takzvaní přirození zabíječi, jsou velmi blízké T lymfocytům s přímým cytotoxickým působením. Nemají však specifické receptory a jsou součástí vrozené imunity. NK buňky mohou pravděpodobně ovlivňovat spolu s cílovými buňkami i řadu různých povrchových molekul, některé se podílejí na buněčné adhezi, některé aktivují cytolytický program NK buněk (7, 8) a ty ostatní jsou schopny inhibovat aktivaci negativní signalizace (jak je přezkoumána odkaz 9). Inhibiční receptor NK buněk působí proti nádorově [2, 13].

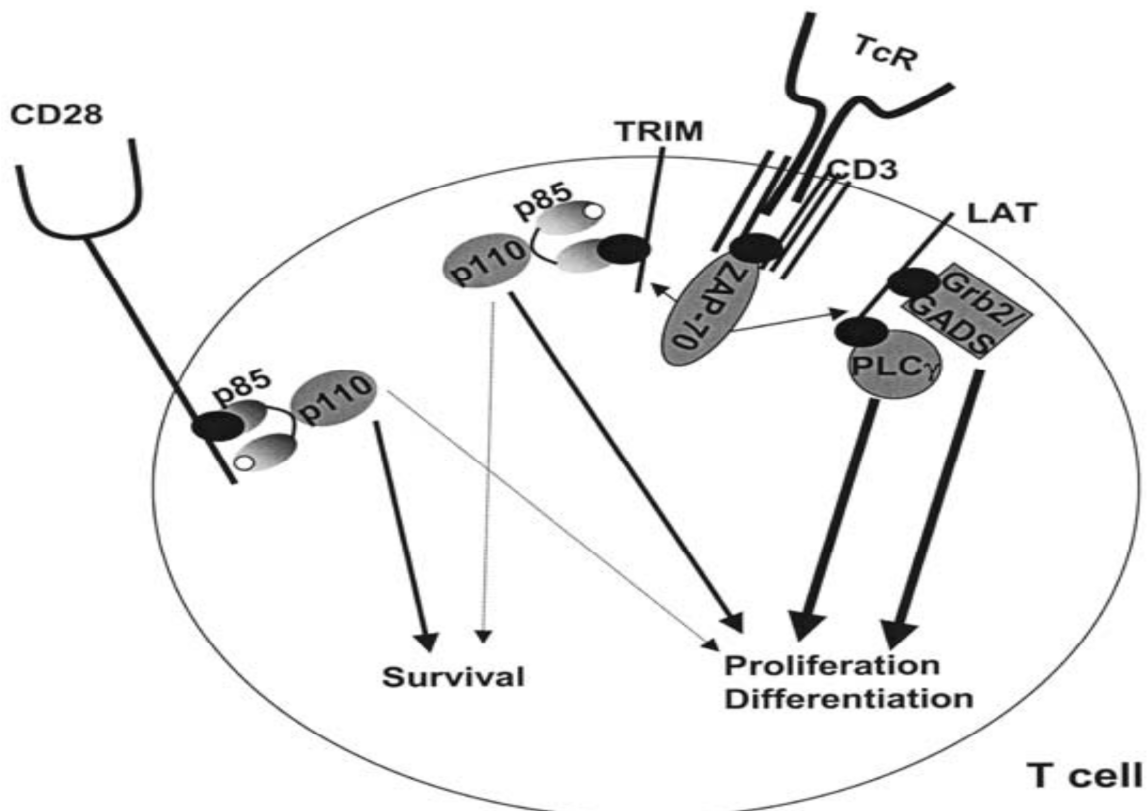
NK buňky jsou vybaveny schopností přímo eliminovat transformované nebo infikované buňky a jsou také schopny regulovat adaptivní imunitní odpovědi prostřednictvím produkce cytokinů. Rozpoznávání svých cílových buněk se děje na principu rovnováhy inhibitoru a akceptoru. Mezi NK buňkami a T lymfocyty jsou ostré rozdíly v trvání kontaktu mezi efektorovými buňkami a jejich specifickými cíly. NK buňky interagují pouze krátce, zatímco T_C udržují prodloužené kontakty i s pohyblivými terči [14].

1.1.2 Membránový receptor T lymfocytů

Rozpoznávání T lymfocytů je součástí centrální části imunitní odpovědi k cizím subjektům. Toto rozpoznávání zprostředkovává TCR. To je heterodimer, který je stejně jako protilátka schopný vytvářet obrovské množství jiných proměnných sekvencí prostřednictvím přeskupování DNA a dalších mechanismů a zároveň je to komplex integrálních membránových proteinů, který se podílí na aktivaci T lymfocytů v odpovědi na prezentaci antigenu. Narozdíl od protilátek, TCR stále zůstává na povrchu buněk. Podle prezentace Ag je lze rozdělit na nesoucí TCR typu $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$. U savců jsou nejčastěji typy $\alpha\beta$ – TCR. Téměř všechny potřebují ke svému vývoji thymové prostředí. Rozeznávají specifické fragmenty antigenů (peptidů) v komplexech s MHC gp. tříd $\gamma\delta$ – TCR jsou v menšinovém zastoupení v těle, vyvíjejí se i mimo thymus a rozeznávají jiné Ag než jsou komplexy MHC. Mohou to

být nativní Ag, organické látky (př. Aminy) nebo produkované mikroorganismy, kterými jsou výrazně stimulovány [5, 15, 16].

Stimulace TCR se spouští MHC molekulami na buňkách prezentujících antigen, které vystavují peptidy antigenu a vyvolávají řadu intracelulárních signálních kaskád. Zapojení TCR iniciuje pozitivní signál (pro zvýšení) a negativní signál (polehčující), kaskády, které v konečném důsledku vede k buněčné proliferaci, diferenciaci, produkci cytokinů anebo k aktivaci indukované buněčné smrti (obr. 1). Tyto signální kaskády regulují na vývoj T lymfocytů, homeostázu, aktivaci a pořízení efektorové funkce a apoptózu [15, 17].



Obrázek 1: Spolupráce membránových a intracelulárních molekul na přenosu informace o antigenu vázaného na TCR

Přestože TCR může regulovat nábor PI3K fosforylací TRIM (představuje TCR asociovaný adapter proteinů), zůstává nejasné přesně to, jak je TCR spojen s aktivací PI3K. Dostupné důkazy naznačují důležitou úlohu pro PI3K při přenosu signálů, které regulují proliferaci a diferenciaci při působení antigenu na TCR. Naproti tomu CD28 se váže přímo na SH2 domény p85, ale podporuje proliferaci a produkci cytokinů nezávisle na této asociaci. Aktivace PI3K CD28 však podporuje přežití, což přispívá k vyšší regulaci exprese Bcl-X_L. TCR využívá aktivaci PI3K k regulaci proliferace, zatímco CD28 vyžaduje PI3K k podpoře přežití. Toto diferenciální využití signalizace PI3K je indikováno silným

porovnáním s tečkovanými čarami, ZAP (*ζ*-asociovaným proteínem; GADS (proteínu příbuzného Grb2 v proudu od Shc.))[9, 18].

NK T lymfocyty jsou zvláštní typy, které mají TCR $\alpha\beta$ a disponují řadou receptorů charakteristických pro NK buňky. Rozeznávají komplexy CD1 s lipidy mikrobiálního nebo vlastního původu. NK T lymfocyty jsou heterogenní, mají různé typy CD znaků a některé je nemusejí ani mít. Díky těmto rozdílům lze rozeznávat různé typy T lymfocytů [5].

1.2 Vývoj cytotoxických T lymfocytů

Prekurzory T lymfocytů přicházejí do thymu z kostní dřeně a nazývají se pro-thymocyty.

Nezralé T lymfocyty exprimují jak CD4 tak CD8 receptory, které se vážou na molekuly MHC II a MHC I, respektive T lymfocyty tzv. "předurčené" pro molekuly MHC I. třídy ztratí po nastávající expresi CD4 znaky, aby se stali CD8 pozitivními T lymfocyty. Zatímco ty, které "zvolí" molekuly MHC II. třídy ztratí díky expresi CD8 znaky pro získání CD4 pozitivních T lymfocytů. T lymfocyty CD4⁺ a CD8⁺, které přežijí výběr v thymu, migrují do lymfatických uzlin a sleziny. Kde spolupracují s APC jako např. dendritickými buňkami [9, 19].

Při vývoji T lymfocytů dochází k náhodnému přeskupování genů pro receptor TCR. Nejprve se v nich přeskupí geny pro TCR β a TCR δ . Po úspěšném přeskupení TCR β , se vyskytne na povrchu časných thymocytů nejprve pre-TCR seskupený z β -řetězce, tzv. pre-TCR α a CD3 komplexu. Dále následuje přeskupování genů pro TCR α a vznik definitivního TCR z řetězců α a β (a CD3 – přenáší signál z TCR do buňky). Thymocyty v tomto stupni stádia vývoje tvoří většinu buněk v thymu. Na povrchu těchto buněk se nacházejí i koreceptory CD8 a CD4. Dochází k negativní selekci autoreaktivních buněk a buněk s nefunkčním TCR, které nerozeznávají MHC proteiny (pozitivní selekce). K negativní selekci dochází při dostatečně silné vazbě svým TCR na jakýkoli komplex MHC s normálními peptidy, po setkání na povrchu s thymových buněk. Tento signál vede k rychlé apoptotické smrti. I ten T lymfocyt, který se nenaváže na TCR vůbec, hyne. Pozitivně selektovány jsou jen ty, kteří rozeznávají s nízkou afinitou MHC proteiny. Ty si poté zanechávají expresi CD8 nebo CD4. Takto zralé buňky opouštějí thymus a usídlují se v sekundárních lymfoidních orgánech. Z neeliminovaných thymocytů vzniknou tzv. regulační T lymfocyty (Treg), které udržují periferní toleranci vlastních tkání [1, 3, 4, 5].

1.3 Role cytotoxických T lymfocytů v imunitních mechanismech

Imunitní systém se účastní spolu s nervovým a endokrinním systémem na udržování homeostázy. Jeho základní funkcí jsou: obranyschopnost – chrání organismus proti infekcím, imunitní dohled – průběžně kontroluje a odstraňuje staré a nádorově změněné buňky, autotolerance – udržuje toleranci vůči vlastním tkáňovým organismům.[3]

Svou úlohu mají T lymfocyty téměř ve všech mechanismech imunitního systému. Imunitní systém využívá specializované kontakty na povrchu buněk, přenáší signály mezi jejich součástmi buněčných populací. Iniclace a progresse imunitní reakce závisí na pečlivé regulaci aktivace lymfocytů. Podle klasického modelu "dvou signálů". T lymfocyty vyžadují vstup ze dvou "zdrojů", aby se staly plně aktivními. První signál, který dává specifitu imunitní reakce, je interakcí hlavních antigenů MHC II s antigenem uznané TCR. Druhý signál je dodáván do APC. Aktivovaný T lymfocyt zprostředkovává vhodnou imunitní odpověď. V důsledku toho jsou obrovské slizniční plochy složitě osídleny buňkami a lymfatickými orgány specializujícími se na vytvoření ochranné protilátky a buněčné imunity. Imunitní systém tedy funguje velice podobným způsobem jako u nervového systému neurony. Receptor pro antigen stimuluje T a B lymfocyty, které vedou ke koncentraci a segregaci proteinů tvořící supramolekulární aktivační shluky, tzv. imunitní synapse [20, 21, 22].

Interakce mezi CD40 a CD40L generuje nitrobuněčné signály a sekreci povrchu molekuly, které v konečném důsledku ovlivňují, jak humorální tak i buněčnou imunitu [23].

1.3.1 Úloha nespecifické (přirozené) imunity v aktivaci cytotoxických T lymfocytů

Nespecifická imunita zajistí schopnost organismu reagovat proti cizorodým mikroorganismům. Je tvořena molekulami a buňkami, které jsou přichystané v organismu reagovat na cizorodé patogeny díky svým společným rysům. Tvoří ji složky buněčné a humorální. Buněčné složky jsou představovány fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami. Humorální imunita je vytvářena komplementovým systémem, interferony, lektiny a jinými sérovými proteiny. Nespecifické složky imunity reagují v minutách a nemají žádnou paměť. Mezi přirozené neimunní obranné mechanismy patří i neporušený povrch kůže a sliznic [1, 5].

Z jedné fagocytujících buněk jsou makrofágy a dendritické buňky, které jsou vybaveny množstvím rozpoznávajících receptorů, které aktivují mikrobiální konstrukční prvky a genetický materiál. Mnohé z těchto receptorů snímají přítomnost virové RNA a DNA a aktivují signalizační kaskády vedoucí k indukci interferonů, dalších cytokinů a antivirových proteinů [24].

1.3.2 Úloha specifické (získané) imunity v aktivaci cytotoxických T lymfocytů

Je pomalejší, reaguje v průběhu dnů a je antigenně specifická. Účinkuje tedy díky vysoce specifickým molekulám a aktivuje se až po setkání s Ag (látka, kterou je imunitní systém schopen rozeznat a je schopna vyvolat v organismu imunitní odpověď). Mezi specifickou imunitu patří složky humorální a to jsou protilátky (Ab) a buňkami zprostředkovaná odpověď na Ag. Specifická a nejznámější funkce této imunity je imunologická paměť. V této odpovědi hrají svojí roli i různé signální molekuly, kterými jsou lymfokiny, cytokiny či chemokiny. Buněčné složky specifické imunity jsou hlavně T lymfocyty ale i B lymfocyty. Po setkání s Ag proliferujícími B lymfocyty, které se diferencují do plazmatických buněk tvořící Ab (imunoglobuliny) a to díky "zapojení" molekuly CD40, vznikají s nimi zároveň i paměťové buňky. Podobným způsobem se i diferencují T lymfocyty na T_c a T_h lymfocyty [1, 5, 25, 26].

Zvláštním druhem buněk jsou specializované dendritické buňky a makrofágy (jsou to APC). Tyto buňky jsou schopné štěpit Ag na peptidy a ve spojení MHC je překládat T lymfocytům [25].

B lymfocyty rozpoznávají proteinové a polysacharidové Ag, některé lipidy, nukleové kyseliny a hapteny. Aktivace molekuly CD40 v imunitních buňkách vede k diferenciaci B lymfocytů a k produkci protilátek. T lymfocyty s molekulou CD40 vedou k produkci makrofágů, výrobě cytokinu, chemokinu. Následně k up-regulaci adhezních molekul, která vede k apoptóze [25, 27].

Peptidy jsou generovány degradací buněčných proteinů v cytosolu a jsou transportovány do endoplasmatického retikula (ER), přes přenašeče asociované se zpracováním antigenních (TAP) molekul. Ab se uplatňují v obraně proti extracelulárním (exogenním) Ag, které neutralizují, opsonizují nebo vedou k aktivaci komplementu a lýze patogenů. V obraně proti

intracelulárním (endogenním) patogenům se uplatňuje buňkami zprostředkovaná odpověď s účastí T lymfocytů [28, 25].

Několik studií prokázalo, že funkce imunitních buněk, včetně T_C, je závislá na patofyziologických podmínkách [29].

Aktivace IFN systému je velmi důležitá, neboť antivirová přirozená imunita podporuje aktivaci získané imunity. Tyto imunitní reakce organizují vymýcení infikovaných virů. Efektivní obranyschopnost imunity proti virovým infekcím závisí však na správných funkcích rozpoznávání receptorů a prostřednictvím stovky genů [21, 30, 31].

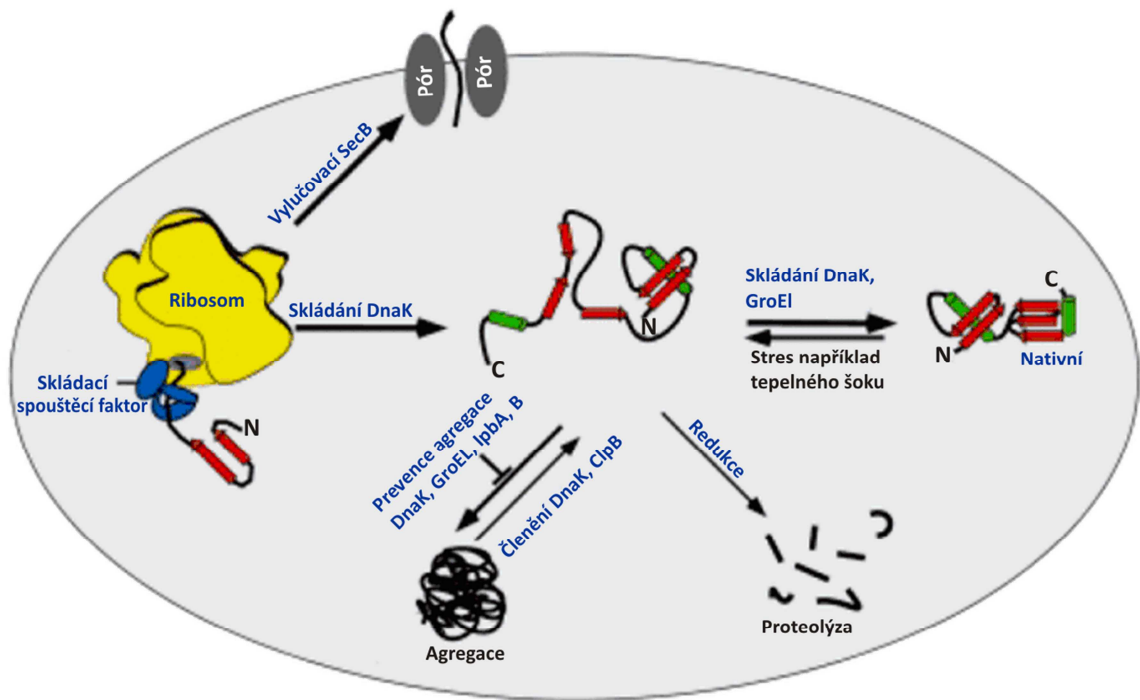
2 Struktura předkládaného peptidu

Všechny buněčné proteiny podléhají kontinuální syntéze a degradaci. Tato trvalá obnova je nezbytná pro udržení funkčního proteomu a umožnění rychlých změn hladin specifických proteinů s regulačními účely. Jako např.: receptor T lymfocytů se váže s peptidovými epitopy prezentovanými molekulami MHC třídy II, které se nacházejí na povrchu APC (buněk prezentujících antigen). APC je klíčovým krokem při spouštění antigen-specifické imunitní odpovědi se schopností iniciovat aktivaci specifických T lymfocytů a regulovat jejich funkce sekrecí cytokinů [32, 33, 34].

Proteiny jsou zodpovědné za molekulární procesy v těle a jsou nezbytné pro přežití. Funkce jakéhokoliv proteinu je závislá na jeho struktuře, která je rozdělena do čtyř hlavních oblastí: primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární struktura je určitá sekvence aminokyselin proteinů a je uvedena a zapsána ve struktuře nukleových kyselin. To je to, co nejvýznamněji určuje konečnou strukturu všech proteinů, a proto i jejich funkce. Konstrukce je dále rozvinuta prostřednictvím jedinečného a přesného „přehnutí“, které umožní správnou a optimální funkci proteinů. Aminokyselinová sekvence je přeložena z mRNA v ribozomu z ER do transmembránových lumenálních proteinů [35].

Funkční diverzita proteinu je tedy založena na rozdílu v prostorovém uspořádání jejich aminokyselin. Jednou ze základních otázek molekulární biologie je mechanismus proteinu skládání, což je proces, ve kterém se přenáší lineární sekvence aminokyselin v proteinu syntézy bílkovin ve specifické trojrozměrné struktuře. Nicméně, skládání proteinů je obvykle rychlý proces v rozmezí od několika sekund nebo dokonce milisekund. Proteiny jsou syntetizovány *in vivo* na ribozomech vektorově od N- k C-konci (obrázek 2) [36].

Některé proteiny vyžadují při svém skládání kromě správné izomerace peptidové vazby mezi jakýmkoli aminokyselinami a aminokyselinou prolinu. Důležitá je také správná tvorba disulfidových vazeb mezi cysteinem a aminokyselinami, zejména pro vylučované proteiny cysteinu. Skládání meziproductů se špatnou prolinovou izomerií nebo vzniku nesprávné disulfidové vazby může být také agregací rizik. Obě reakce jsou skládané pomocí katalýzy speciálními enzymy s PPIase nebo proteindisulfidisomerasou [44, 37].



Obrázek2:Životní fáze proteinů v buňce.

Proteiny jsou syntetizovány na ribozomu a to buď secernovány, nebo složeny po oddělení od ribozomu ze své přirozené struktury. Během tohoto procesu, jsou proteiny náchylné k agregaci nebo mohou být degradovány v misfolding. Molekulární chaperony (zobrazené jsou prokaryotické zástupci Escherichia coli) doprovázejí všechny životní cykly proteinů. Červené šipky naznačují β -řetězce a α -helixy zelenými válci; obě jsou možné jako sekundární struktury v proteinech.[36]

Skládací stav je termodynamicky nestabilní a proteiny jsou ovlivněny změnami v buněčném prostředí: stresovými podmínkami, jako je například rychlé zvýšení teploty, může například vést k tzv. misfolding (špatnému poskládání) a agregaci nebo k proteolytické degradaci mnoha proteinů (obrázek 2). Molekuly známé jako chaperony pomáhají překonávat nestabilitu tím, že poskytují dlouhé aminokyselinové sekvence pro nově vznikající proteiny s vhodným prostředím a s dostatkem energie ve formě ATP [36, 35].

3 Chaperon

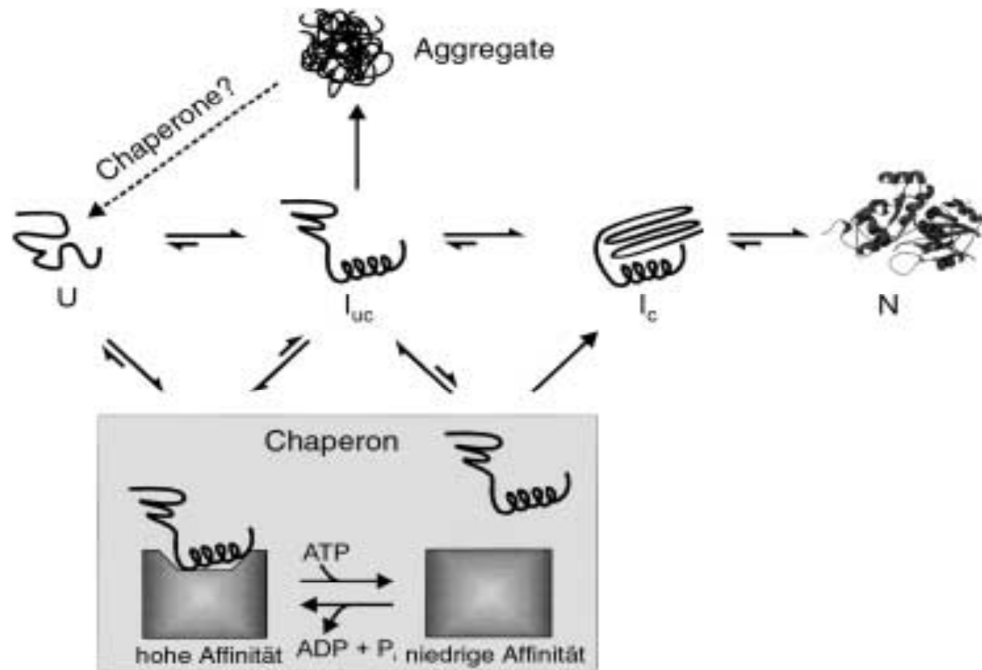
Hartl a spol. (2011) definují molekulární chaperon jako "*jakýkoliv protein, který interaguje, stabilizuje nebo pomáhá jinému proteinu získat jeho funkčně aktivní konformaci, aniž by byl přítomen ve své konečné struktuře.*" Chaperony existují v cytoplazmě, mitochondriích, endoplazmatickém retikulu a v jádru savčí buňky. (Voisine et al., 2010). A byly poprvé pozorovány v kvasinkách [39, 40].

Molekulární chaperony jsou vysoce konzervativní proteiny, které pomáhají při nastavení bílkovin při skládání do správné konformace, tzv. efektivní skládání. Protože vznik chaperonů je indukován řadou environmentálních stresorů, jako jsou teplo, oxidační činidla a některé toxické látky, byly původně popsány a jsou známé ještě jako proteiny tepelného šoku nebo proteiny tepelného stresu (Hsp), (Little et al., 1994). Zvýšená exprese molekulárních chaperonů může potlačit agregaci proteinů a toxicitu v mnoha modelech neurodegenerativních onemocnění Hsp peptidově specifické T_C účinně lyzují buňky myelomu HLA-I (zavedené buněčné linie a primární plazmatické buňky). Myelomové buňky přirozeně exprimují Hsp peptidy v kontextu hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy. Ještě důležitější je, že Hsp peptidově specifické T_C účinně snižují zátěž nádorů v myelomu [39, 41, 42].

Chaperony jsou velké proteinové multipodjednotkové komplexy s hydrofobní dutinou. Vyvinuly se pro zvýšení přístupu v konformačním prostoru buněk. Nebo také lineární polymery, které jsou syntetizovány ribozomy aktivovaných aminokyselin (polypeptidový řetězec složený do trojrozměrného komplexu), které pomáhají velkému množství skládacích reakcí v průběhu celého života proteinů. Chaperony kontrolují skládání proteinů do své počáteční struktury, udržují špatně složené bílkoviny a jsou schopny rozpouštět agregované proteiny a vždy je spojeno se spotřebou energie [36, 43, 44, 45].

Hydrofobní interakce nejen přispívají ke stabilitě složené struktury proteinu, ale jsou také důležité pro stabilitu oligomerních proteinů a proteinových komplexů. Kontaktní oblasti často obsahují hydrofobní zbytky, které se při sdružování mizí. Protein se tak může vázat na rozvinutý polypeptid nebo potlačit jeho agregaci, aniž by to byl nutně chaperon. Co stanovuje molekulární chaperony odděleně od těchto hydrofobních plazmidů, je jejich schopnost vytvářet definované komplexy s nenasyčenými bílkovinami, a co je důležitější, uvolňovat navázaný polypeptid řízeným způsobem. To se obvykle provádí přepnutím na alternativní

stav chaperonu se sníženou afinitou k hydrofobním polypeptidům (obrázek 3). Podle zákonů termodynamiky bude vazebný proteinový substrát stabilizovat vysoko afinitní stav chaperonu. Proto je nutný určitý zdroj energie pro přepnutí do stavu s nízkou afinitou za přítomnosti vázaného substrátu. Obvykle tato energie pochází z hydrolýzy ATP nebo z interakce s jinými proteinovými složkami tzv. chaperonových strojů [43].



Obrázek 3: Chaperon -asistované skládání proteinů.

Biosyntéza proteinů, stejně jako buněčný stres, vede k tvorbě rozvinutých polypeptidů (U). Tyto molekuly se skládají prostřednictvím několika meziproduktů (I_C, I_C) se stoupající strukturou složitosti, dokud nedosáhnou přirozeného funkčního stavu (N). Některé meziprodukty (I_{UC}) mohou vystavit hydrofobní povrchy, které je činí náchylnými k agregaci. Tato reakce byla považována za nevratnou, ale poslední výsledky naznačují, že některé chaperony mohou resolubilizovat agregáty. Molekulární chaperony interferují se škodlivým procesem agregace vazbou na druhy I_{UC} a U. Toto spojení nejen blokuje hydrofobní spoje na vázaných polypeptidech, ale také snižuje koncentraci molekul náchylných k agregaci, čímž zpomaluje agregaci. V mnoha případech dochází ke změně konformace zprostředkované ATP v chaperonu, což vyvolává disociaci vázaného polypeptidu. Část uvolněných molekul se může přeložit do stavu, v němž je spáchán (I_C), který již nevyžaduje pomoc chaperonu, zatímco zbývající nevyužitá (uc) molekuly se znovu objeví a účastní se dalšího chaperonového cyklu. V závislosti na typu chaperonu se mohou změny konformace v polypeptidu vyskytnout během jeho spojení s chaperonem.[43]

Základní funkcí molekulárních chaperonů je tedy spojování přechodně s jedním nebo několika „partnery“, čímž se zabrání předčasným nebo nesprávným, intra- nebo intermolekulárním interakcím, ke kterým by došlo v případě neexistujícího spojení. Chaperony se

však nepodílejí na konečné funkci jejich substrátů. Např. chaperonu gp96 je přičítána jeho schopnost aktivovat vrozené i adaptivní imunitní odpovědi [46, 47].

Viskózní prostředí je jedním evolučním důvodem molekulárních chaperonů, jejichž činnost vyžaduje časovou sekvenci na "dráze" skládání, které nemá soupeře v monodisperzních *in-vitro* systémech [48].

Chaperony tedy v endoplazmatickém retikulu hrají životně důležitou úlohu při skládání, sestavování a posttranslační modifikaci sekrečních proteinů a také recyklují, opakují nebo iniciují degradaci nesprávně přeložených proteinů. Rychlost procesu skládání a výtěžek řádně složeného proteinu, se liší v závislosti na proteinu. Proteiny s velmi malou molekulovou hmotností se rozkládají obvykle nezávisle na své nativní struktuře. Větší proteiny, které se skládají z více domén, ale mají často problémy, jsou často v pasti náchylných konformací, jako je např. non-nativní agregace. Tyto proteiny jsou substráty chaperonů např. Hsp70 (DnaK) nebo Hsp60 (GroEL) uznané proteinové rodiny a za doprovodu cyklů vazby a odtržení od příslušného doprovodu na cestě do nativní struktury [39, 49, 50, 51].

3.1 Základní rozdělení, úloha a funkce chaperonu

Existují tři hlavní třídy nízké molekulové hmotnosti chemických chaperonů (LWCC): sacharidy (glycerol, sorbitol), aminokyseliny a deriváty (glycin, prolin), a methylaminy (betain, trimethylamin N-oxid). Jak název napovídá, LWCC jsou malé sloučeniny, které napomáhají při správném skládání a snižují agregaci proteinů. Většina LWCC může procházet hematoencefalickou bariérou [52, 53, 54].

Mnoho chaperonů spolupracuje s protein-kinázami ATP-dependentním způsobem, aby vykonával své role. Chronologická terminologie a klasifikace mohou na první pohled vypadat zmateně, protože se používají jak terminologie Hsp, tak další terminologie, což odráží kontext, ve kterém byl každý chaperon objeven. Systém chaperonů v savčích buňkách obsahuje více než 200 proteinů (Koren et al., 2009) a v roce 2010 (Stetler et al., 2010) byly uvedeny 23 Hsps (chaperony), které se nacházejí v CNS. Tyto chaperony mohou být vhodně zařazeny do tří tříd molekulové hmotnosti: rodiny Hsp70 (a.i. HSPA), rodiny Hsp90 (také jako HspC) a rodiny malých proteinů tepelného šoku. Tyto kategorie nepředstavují buď společnou subcelulární polohu, nebo funkční podobnosti v rámci rodiny, neboť každá rodina obsahuje velmi různorodé členy [39].


Produkce T_C specifických pro HSP a "kvalita" T_C jsou rozhodující vůči vysoké kvalitě aktivovaných T_C demonstrováných fenotypem a silné anti-myelomové cytotoxicity stejně jako exprimované cytokiny, především IFN- γ . [55]




Mini-chaperony (pocházejících z oblasti chaperonu α -krystalinu) vykazují potenciální přínosy proti chorobám spojujícím protein. Mini-chaperony potlačují agregaci bílkovin, blokují tvorbu amyloidních fibril, stabilizují mutantní proteiny, sekvestrují kovové ionty a vykazují antiapoptotické vlastnosti. Bylo prokázáno, že krystalin (nebo jeho podjednotky) potlačuje agregaci bílkovin částečně rozvinutých oxidací, teplem a jinými stresory. Aktivita α -krystalinového chaperonu je modulována sloučeninami s nízkou molekulovou hmotností, jako je ATP a glutathion, jejichž koncentrace je známá změnou v čočce se stárnutím. Tepelné zpracování α -krystalinových podjednotek vede ke zvýšené expozici hydrofobních míst a že tepelně zpracovaný krystalin vykazuje zvýšenou chaperonovou aktivitu [51, 56, 57].





Chaperony se nacházejí ve velmi vysokých koncentracích ve všech buňkách, od bakterií po člověka. Jsou vysoce evolučně konzervativní, slouží ke kontrole v čase a prostoru. Chaperony jsou zvláště důležité pro přežití buněk za stresových podmínek. Různé stresové podmínky, jako je např. tepelný šok, indukuje syntézu chaperonu, a proto jsou také označovány jako "proteiny tepelného šoku (Hsp)" [36].

Chaperony jsou tedy skupina proteinů s podobnou funkcí, dělí se do několika rodin a jejich tříd. (tabulka 1)

Tabulka 1: Přehled chaperonů [převzato a upraveno z 36]

CHAPERON. RODINA	STRUKTURA	ATP	ZÁSTUPCE PROK. EUKAR	Co -CHAPERON	FUNKCE
Hsp100	6-7 mer 	+	ClpB ClpA Hsp104		- Členění s Hsp70 - Proteolýza spolu s proteázou ClpP - Termoresistence - Společné členění s Hsp70
Hsp90	Dimer	+	HtpG		- odolnost vůči extrémním

			Hsp90	Hop,p23,CDC37	<p>tepelným šokům</p> <ul style="list-style-type: none"> - Odolnost vůči stresu; - ovládání aktivity skládání steroidních receptorů; - proteinkinasa
Hsp70	Monomer 	+	DnaK	DnaJ, GrpE	<ul style="list-style-type: none"> - <i>De-novo</i>-skládací protein - Prevence agregace denaturovaných proteinů - rozpuštění proteinových agregátů s ClpB - regulace odezvy tepelného šoku
			Hsp70	Hsp40 Bag1	<ul style="list-style-type: none"> - <i>De-novo</i>-skládací protein - Prevence agregace denaturovaných proteinů
			Hsc70	Hip Chip	<ul style="list-style-type: none"> - rozpuštění proteinových agregátů s Hsp40 - regulace odezvy tepelného šoku
				Hop HspBP1	<ul style="list-style-type: none"> - regulace aktivity skládaných regulačních proteinů (např., transkripční faktory a kináza)
Hsp60	14 – mer  16 - mer	+	GroEL	GroES	<ul style="list-style-type: none"> - <i>De-novo</i>-skládací protein - Prevence agregace denaturovaných proteinů
			CCT/TRiC	Prefoldin	<ul style="list-style-type: none"> - <i>De-novo</i> – Skládání aktinu a tubulinu
sHsp	8-24 – mer		IbpA IbpB Hsp25		<ul style="list-style-type: none"> - Prevence agregace denaturovaných proteinů - Vazba na inkluze - Prevence agregace

			Crystallin		denaturovaných proteinů - Součást oční čočky obratlovců
Spouštěcí faktor	Monomer 		Spouštěcí f. - /		- Ribosom-spojené chaperony s funkcí <i>De-novo</i> – skládání proteinů
NAC	Heterodimer 		- / NAC		- Ribosom-spojené chaperony s potenciální funkcí <i>De-novo</i> – skládání proteinů
SecB	Tetramer 		SecB		- Sekrece proteinu

Různé chaperony jako DnaK (Hsp70) GroEL (Hsp60) a malé proteiny tepelného šoku (IbpAB typů sHsp), slouží jako ochranný pufro a zabraňují vazbě rozložených proteinů, k jejich agregaci [36].

3.2 Druhy chaperonů

Podle evoluční konzervace jsou chaperony rozděleny do rodin, jejichž název je odvozen od molekulové hmotnosti příslušných hlavních představitelů (například Hsp70 - proteinu o 70 kDa). Tabulka 1 ukazuje strukturu a funkci hlavní Chaperonové rodiny, s některými prokaryotickými a eukaryotickými zástupci a jejich spolupráce s chaperony, regulačními proteiny (tabulka 1) [36].

3.2.1 gp96

gp96 je aminopeptidáza, která může zkrátit NH₂-terminálně prodloužené peptidy, jako jsou např. komplex MHC I. Třídy zodpovědných za rozpoznávání T_C. Je to bohatý peptid vázající chaperon z lumen endoplazmatického retikula, která sdružuje s širokou řadou antigenních peptidů vytvořených v cytosolu nebo v sekreční dráze. Je to také akceptor peptidů

dopravovaných do endoplasmatického retikula prostřednictvím transportéru spojeného se zpracováním antigenu. Internalizovaný gp96 může účinně prezentovat asociované peptidy na molekuly MHC třídy I a třídy II a tak aktivovat specifické odpovědi CD8 + a CD4 + T buněk. gp96 se váže na APC a působí jako hlavní chaperon pro Toll-like receptory (TLR), (např. TLR2, TLR4 a TLR9) [28,58].

A konečně, pozorování, že gp96 skrývá ATPázové a aminopeptidázové činnosti je překvapující, ale není v rozporu s více enzymatickými aktivitami jiných Hsp. Jako jsou např. protein disulfid izomeráza, to je další chaperon z lumen ER. A Lon - mitochondriální chaperon, je ATPáza, stejně jako serinová proteáza [28].

3.2.2 Mini chaperony

Peptidové chaperony mini- α A a mini- α B jsou účinné při prevenci agregace a vysrážení rozkládajících se proteinů, podobně jako na full-length nativní krystalické podjednotce α . Sekvence mini-chaperonů je vysoce konzervovaná u mnoha malých proteinů tepelného šoku (tabulka 1) a srovnává se s oblastmi β 3 a β 4 ve trojrozměrné (3D) krystalové struktuře zkráceného α -krystalinu. Substituce Lys s Asp v mini- α A-peptidu zvyšuje rozpustnost peptidu a chaperonovou aktivitu [57, 59, 60, 61, 62].

α -krystalin funguje jako antiapoptotická látka a zabraňuje buněčné smrti zprostředkované apoptózou. Jak peptidy mini- α A, tak amin- α B zabraňují oxidaci indukované buněčné smrti inhibicí aktivace kaspázy-3. Přirozený ochranný účinek proteinů α -krystalinových chaperonů je zapouzdřen v peptidových chaperonech a může poskytnout příležitost k použití mini-chaperonů jako farmakologických činidel [57, 63, 64].

Kvartérní struktura tvořená dvěma α A-krystalinovými a dvěma α B-krystalinovými podjednotkami je funkční jednotka, protože jednotlivé podjednotky nemají žádnou chaperonovou aktivitu a funkce sHsps závisí na komplexní velikosti (Lambert et al., 1999, Rogalla a kol., 1999) [39].

3.2.3 Hsp100

Třída chaperonů Hsp100 patří k nadřazené skupině ATPáz a je definována přítomností bazického jádra. Mají schopnost přemodelovat proteinové substráty způsobem ATP-dependentním [11, 65].

Chaperony Hsp100 jsou rozděleny do dvou tříd; Proteiny třídy I s dvěma moduly, včetně kvasinkového proteinu Hsp104, bakteriálního ClpB a jejich vzdálených příbuzných ClpA, ClpC, zatímco chaperony třídy II zahrnují ClpX a HsIU [98]. Jejich úloha v onemocnění agregace proteinů je rozhodující, protože může rychle rozložit různé amyloidy a prefibrilární oligomery a reaktivovat proteiny z agregátů. Hsp100 vykazují ATP-aktivovanou závitovou aktivitu a translokují proteinové substráty prostřednictvím svého centrálního kanálu a tvoří proteolytické komplexy s peptidázami [65, 66, 100].

3.2.4 Hsp 90

Hsp90 jsou členy rodiny vysoce konzervativní mezi druhy, tvořící 1-2% celkových cytosolických proteinů v nestresujících buňkách (Csermely et al., 1998). Na rozdíl od HSP70, které váží vznikající a nově syntetizované proteiny, většina členů rodiny Hsp90 jsou v partnerství s jinými chaperony a pracují po "proudu" Hsp70 a podílí se na strukturálním zrání a obchodování cytoplazmy proteinů zapojených do signální transdukce (Taipale et al., 2010). Exprese Hsp90 je transkripčně regulována tepelným a jiným napětím pomocí faktoru tepelného šoku 1 a NF- κ B). Chaperony Hsp90 podléhají konformačním změnám vázání a hydrolýze ATP, které jsou důležité pro regulaci vzájemných interakcí a pro podporu zrání klientů. Komplexy Hsp90 / co-chaperone spadají převážně do třídy s vysokou afinitou a charakterizují interakce mezi diskretními doménami a sekvenčními motivy interagujících partnerů [39, 67].

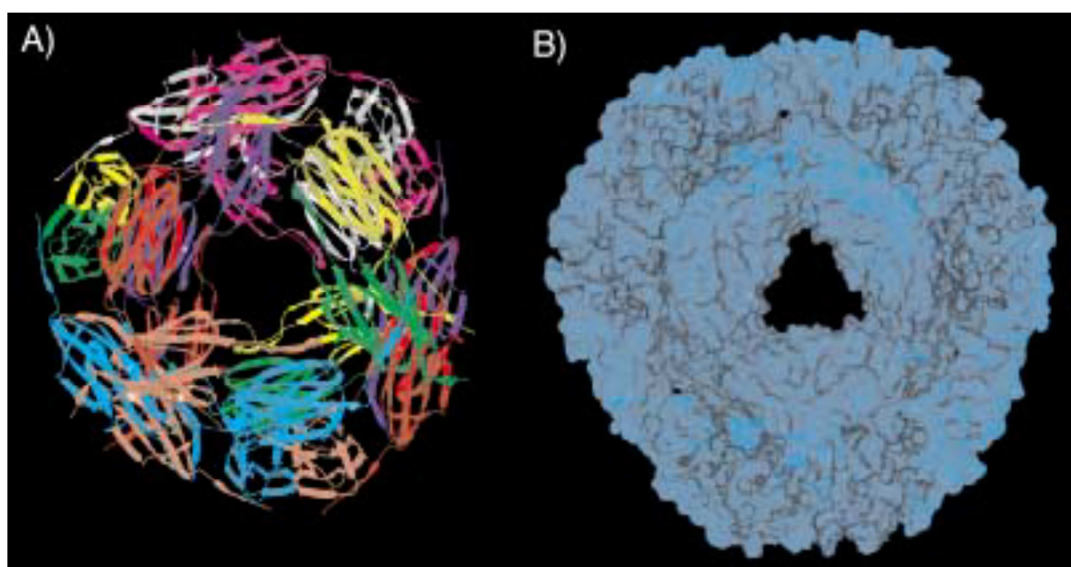
Hsp90 je ATP-dependentní chaperon, který funguje při aktivaci a stabilizaci proteinů; Včetně proteinkináz, regulátorů buněčného cyklu, receptorů buněčného povrchu a transkripčních faktorů. Proto hraje rozhodující roli v buněčných procesech, včetně přenosu signálu, progresu buněčného cyklu, apoptózy a degradaci proteinů. Aktivace klientů Hsp90 je řízena cyklem vazby a uvolňování substrátu zprostředkovaným řadou konformačních změn v chaperonu a ATP-indukovaným přechodem mezi otevřenou a uzavřenou konformací. Hsp90 existuje jako homodimer, přičemž každá podjednotka sestává ze dvou aminokyselin; N-terminální ATP-vazebná doména (doména N), střední doména doména, která váže substrát (M-doména) a C-terminální dimerizační doména (C-doména). Při absenci nukleotidu Hsp90 přijímá, otevřenou konformaci ve tvaru písmene V. Vazba ATP na N-doménu indukuje konformační změnu, která uzavře "kapsu" vazby nukleotidu. Po uzavření "víčka" se N-domény dimerují a vytvářejí kompaktní konstrukci s uzavřenou konformací. Tvorba uzavřeného dimeru indukuje

ATP hydrolyzu, následně podporuje N-domény k disociaci a návrat Hsp90 k otevřené konformaci s uvolněním substrátu [68].

Hsp90 se lokalizuje na obou stranách lysosomální membrány, ale luminální forma je pevně vázána na lysosomální membránu. Tato luminální varianta stabilizuje LAMP 2A při přechodu z monomerního na multimerický stav [69].

Hsp90 je považován za důležitý cíl pro léčbu rakoviny, protože rozpoznává metastabilní a téměř nativní domény. Také Hsp90 stabilizuje onkogenní proteiny a je up-regulován v maligních nádorech a buňkách. Ačkoli komplex Hsp90-p23 je také spojen s progresí rakoviny regulací některých cest, p23 může také regulovat expresi některých genů sám o sobě nezávisle na Hsp90, a proto interakce mezi Hsp90 a p23 nastává v součinnosti [48, 70].

Fragmentace studie naznačují, že Hsp90 obsahuje dvě vazebná místa pro nepůvodní proteiny, které se liší v jejich specifičnosti. To znamená, že Hsp90 cyklus je řízen a regulován hydrolyzou ATP [43, 71, 72].



Obrázek 4: Struktura malého proteinu tepelného šoku z archaea *Methanococcus jannaschii*.

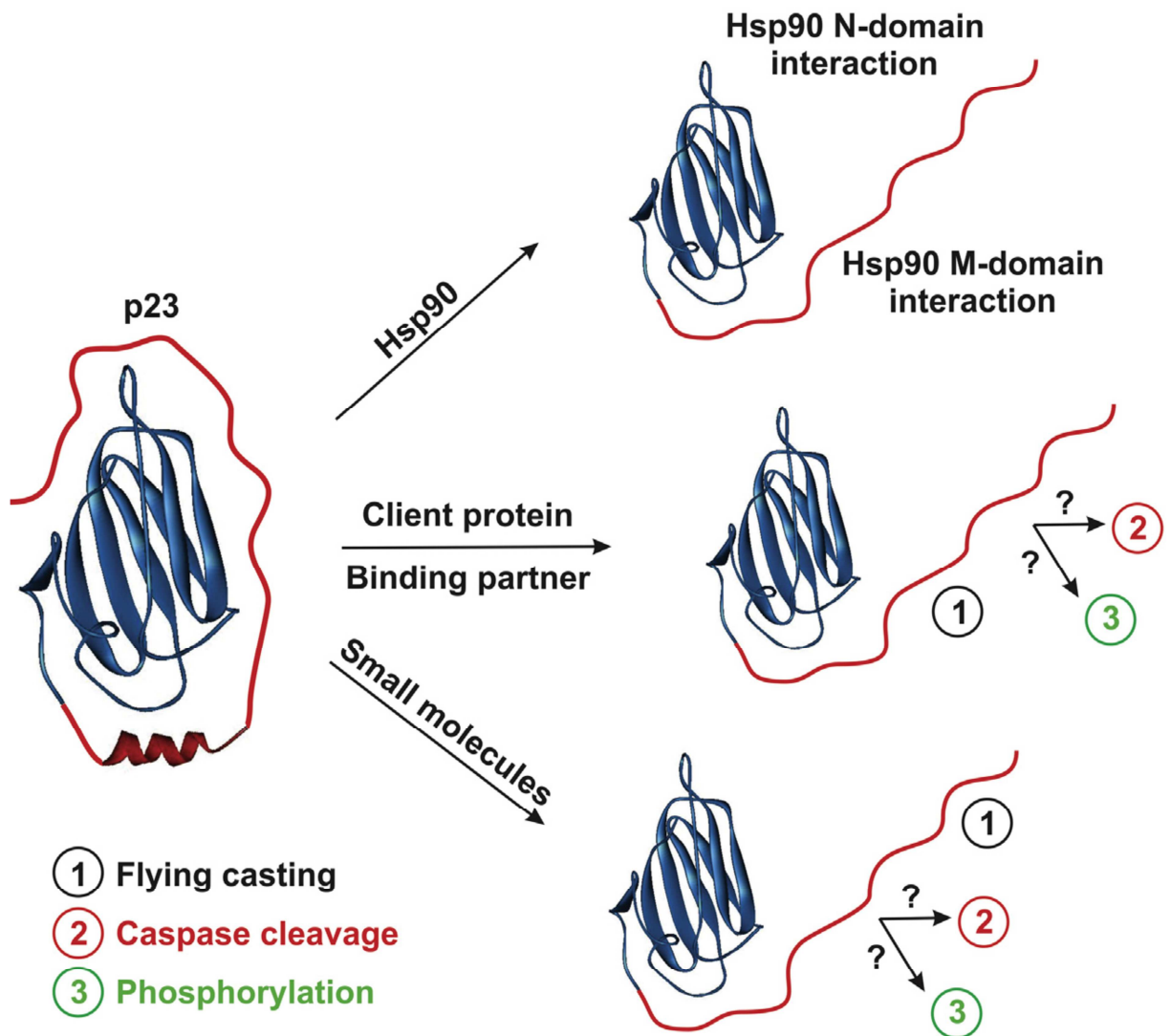
A) proteinové formy heat shock velké porézní duté koule, které jsou složeny z 24 identických podjednotek. Podjednotky mají strukturu převážně listů.

B) příčný řez sHsp od *M. jannaschii*. Vnější průměr částic je asi 120 jako, vnitřní průměr asi 65 a a objemu cca 140 000 Å³. Vzhledem ke složení aminokyselin vnitřního povrchu je podstatně více hydrofobní, než je vnější [43].

3.2.4.1 p23

Protein p23 je chaperon široce zapojený do proteinové homeostázy. A také většina těchto proteinů obsahují ve svých sekvencích 5 tryptofanů, 2 tyrosiny a 7 fenylalaninových zbytků (s výjimkou p231-117, které mají 5 fenylalaninů). Je také dobře známý jako Hsp90 co-chaperon, protože řídí Hsp90 chaperonový cyklus. Je fyzicky a funkčně napojen na systémy pracující v transportu bílkovin, biogenezi ribosomů, signalizaci, aktivaci transkripce a remodelování chromatinu. Lidský p23 je protein s N-koncovým jádrem obsahující strukturní doménu β -listu a C-koncový kyselý ocas. Je to také CK2 kinázový substrát, který reguluje aktivitu prostaglandinu [70, 73, 74].

Štěpení p23 za vzniku p19 nastává během buněčné smrti indukované endoplazmatickým retikulovým stresem. Ačkoli oba p23 a p19 jsou schopny interagovat s Hsp90, dělají to různými způsoby [70, 75, 76, 77, 78].



Obrázek 5: Model pro režim p23.

Jádro β -listu p23 interaguje s amfipatickou α -helixem a s C-koncem pomocí jemných kontaktů. Spojení p23 β -listového jádra s Hsp90, klientskými proteiny / interakčními partnery nebo malými molekulami, jako je gedunin, by mělo narušit měkkou interakci p23 C-koncového ocasu na jádru β -listu. Jakmile se uvolní p23 C-koncový konec, může to dovést další interakce s M-doménou Hsp90 nebo může působit jako odlévání (1), získávat interakční partnery nebo dokonce sloužit jako substrát pro kaspázové štěpení (2) Generováním produktu štěpení p19 nebo sloužit jako substrát pro fosforylaci [70]

3.2.4.2 GRP94

GRP94 je makromolekulární chaperon patřící do rodiny Hsp90 a je nejčastější glykoprotein v endoplazmatickém retikulu (ER) savců, je silně indukován poruchami v homeostáze ER (Chen a kol., 2006). Hsp90 má širokou škálu klientských proteinů ve více cestách signální transdukce, včetně kontroly kvality proteinů přes proteasom a autofagními lysosomy (Taipale et al., 2010). Jeden z klientských proteinů je tau protein, který je hyperfosforylován a

nachází se v neuritických placích a neurofibrilárních spletech v AD mozku. Kromě toho inhibitory funkce HSP90 (např. 17-AAG, netoxický inhibitor HSP90) brání agregaci nejen tau proteinu, ale také asynukleinu v PD, stejně jako huntingtinových a polyglutaminových opakování u Huntingtonovy choroby (Falsone a kol. 2009, Salminen a kol., 2011) [79].

Další velký chaperon ER je GRP94, je to homolog rodiny HSP90. GRP94 se účastní komplexů chaperonů obsahujících GRP78 pro sekreci thyreoglobulinu buňkami štítné žlázy a zrání apolipoproteinu B (ApoB) a těžkých řetězců imunoglobulinů (Kleizen a Braakman, 2004). GRP94 je také vyvolán porucou v homeostáze Cu u astrocytů a proto byl navržen jako potenciálně relevantní etiologický faktor v neurodegeneraci u AD a PD (Qian et al., 2005a, Seifert et al., 2006) [39].

3.2.5 Kalnexin a kalretikulin

Další dvě důležité ER chaperony jsou kalnexin a kalretikulin, také nazývané calregulin. Calnexin a kalretikulin jsou chaperony glykanové vazby, o kterých je známo, že se podílejí na skládání proteinů s MHC imunoglobuliny. Calnexin se váže pouze na N-vázané glykoproteiny, které obsahují oligosacharidy GlcNAc2-Man9Glc1. Calreticulin váže hydrofobní C-konec Ab42 přes vazebné místo polypeptidu chaperonu (Duus a kol., 2008). Tyto dva chaperony spolupracují a vytvářejí strukturu proteinu podobnou „kleci“ s ERp57, thiol oxidoreduktázou ER chaperonu, která katalyzuje tvorbu disulfidu v těžkých řetězcích molekul MHC třídy I, což poskytuje ERp57 přístup k jeho substrátu. Exprese mRNA kalnexinu a kalretikulinu, stejně jako exprese mRNA GRP78, jsou v primárních kulturách astrocytů (Aremu et al., 2011) regulovány glycinátem hlinitým [39].

3.2.6 Hsp70 a Hsc70

Hsp70 chaperony jsou vysoce konzervované, bohaté proteiny, které ve dvou eukaryotických buňkách mají dvě formy: konstitutivně exprimované cytosolové homology Hsp70 (HSC70) a stresem indukovatelné formy (Hsp70). Hsp70 je v této skupině nejsilněji studovaným chaperonem. Na rozdíl od GroEL DnaK nezahrnuje jeho substrát kompletní jeden, ale pouze se váže jeden, krátký peptidový segment asi z pěti aminokyselin. Hsp70 se skládá ze dvou funkčních jednotek: N-koncovou doménou ATPázy a menší peptid vázající C-terminální domény [20]. DnaK ATPáza se skládá z vázání substrátu domény. Vlastní vazba a uvolnění substrátu je řízena hydrolýzou ATP a ADP a také ATP výměnou regulací dvěma co-chaperony DnaJ a GrpE[36, 39, 80].

Tyto chaperony udržují vznikající a nově syntetizované peptidové řetězce v ohebném stavu pro rychlé skládání po uvolnění z ribozomů, aby podporovaly skládání vícedoménových proteinů zabráněním intramolekulárního chybného skládání (Hartl a Hayer-Hartl, 2002). Tato funkce vyžaduje co-chaperone HSP40 (Terada et al., 1997). Vazba hydrofobních sekvencí pomocí chaperonů HSP70 slouží k ochraně vznikajících řetězců a sklápěcích meziproductů před agregací tím, že tyto rozpoznávací oblasti chrání před intermolekulárními hydrofobními interakcemi. Dalším důsledkem vazby Hsp70 může být zpomalení kolapsu těchto hydrofobních oblastí do jádra formujícího proteinu. Například, ER Hsp70 chaperon, BiP, se váže na imunoglobulin (Ig) lehký řetězec (LC) hlavně přes dva peptidy na LC variabilní doméně. Jeden z těchto dvou peptidů se přímo podílí na tvorbě amyloidních vláken variabilní doménou [48, 81, 82, 83].

Hsp70 působí v širokém spektru buněčných procesů včetně skládání nově syntetizovaných bílkovin, opětovného složení nesprávně složených a agregovaných proteinů, transportu proteinů přes membrány a degradaci proteinů (3). Tyto funkce se opírají o schopnost Hsp70 interagovat s hydrofobními úseky exponovanými v klientských proteinech a následně podléhají cyklu závislému na ATP vázání a uvolňování substrátů. Hsp70 je složen z N-terminální ATPázové domény (NBD) a C-terminální vazebné domény substrátu (SBD), rozdělených na subdomény, které tvoří hydrofobní vazebnou "kapsu a víčko" (2). NBD a SBD jsou propojeny flexibilním spojovacím zařízením, které NBD umožňuje alosteorně řídit přizpůsobení SBD. Ve stavu vázaném na ATP má vazací kapsa a lídr v otevřené konformaci. SBD má nízkou afinitu k substrátu a rychlý výměnný podklad substrátu. Hydrolyza ATP k ADP vede SBD do stavu s vysokou afinitou pro vazbu substrátu uzavřením "víčka", což umožňuje stabilní vazbu klienta na protein. Uvolnění ADP a opětovného navázání ATP vyvolá otevření víka a následné vyložení mezivrstvy. Reakční cyklus Hsp70 obsahuje dva stupně omezující rychlost, ATP hydrolyzu, kvůli nízké bazální ATPázové aktivitě a disociaci ADP, kvůli vysokým hladinám cytoplazmatického ATP za fyziologických podmínek. Proto Hsp70 vyžaduje působení co-chaperonů pro usnadnění reakčního cyklu mezi ATP a ADP vázanými stavy. Aktivita ATPázy Hsp70 je stimulována členy rodiny DnaJ (Hsp40) prostřednictvím jejich konzervované J domény (5)]. Disociace ADP vyžaduje otevření vazací štěrby pro nukleotidy, která je katalyzována řadou nukleotidových výměnných faktorů (NEFs), včetně Hsp70-podobných proteinů Hsp110, HspBP1, SIL1 a rodiny BAG ([6] mezivrstvy [68].

Hsp70s se podílejí na vývoji nebo patologii neurodegenerativních onemocnění včetně AD, PD, Huntingtonova choroba a prionových onemocnění (Cummings et al., 1998, Duan a Mattson, 1999, Hamos et al., 1991, Jin et al., Newnam a kol., 1999). A také se podílí na regulaci transkripce HSP90 (Ammirante et al., 2008, Nadeau a kol., 1993) [39].

3.2.6.1 Hsc70

Hsc70 je multifunkční chaperon, který se účastní mnoha dalších buněčných funkcí (tj. Znovuzískávání proteinů, demontáže komplexů s více proteiny, jako je clathrin, zaměřování proteinů na jiné organely). Pro mnoho z těchto funkcí interaguje hsc70 s proteiny na základě jejich hydrofobicity nebo jiných aminokyselinových motivů [69].

Hsc70 se také asociuje s cytosolovou stranou lysosomální membrány, kde může přispět k rozvinutí substrátových proteinů a aktivní demontáž translokačního komplexu LAMP-2A [69, 84, 85].

3.2.6.2 GRP78

GRP78 je protein, který je vysoce druhově konzervativní a je nezbytný pro život (Quinones et al., 2008). Chaperonové funkce GRP78 byly poprvé popsány ve své roli vazebného proteinu zapojeného do posttranslačního zpracování těžkých imunoglobulinových řetězců v lymfoidních buňkách (Hendershot a Kearney, 1988), proto je protein také známý jako BiP. GRP78 pomáhá přenášet vznikající proteiny do endoplazmatického retikula a pomáhá při jejich skládání a sestavování (Hendershot et al., 1996, Laitusis a kol., 1999). GRP78 byl nazván "hlavním regulátorem" ER (Hendershot, 2004) kvůli jeho rozmanitým rolím ve stresové reakci ER. Když se GRP78 izoluje špatně složenými peptidy, spouští se tři signalizační cesty UPR (ATF6, IRE1 a PERK), aby se udržely normální ER funkce a kontrola kvality produkce proteinu (Rao et al., 2004). Funkční GRP78 je nezbytná pro sekreci IL-6 astrocytů v kultuře a jeho dva proteiny jsou lokalizovány intracelulárně (Qian et al., 2007). Proto IL-6 může být klientským proteinem pro sekreci GRP78 chaperonu. [39].

GRP78 je také pozorován na buněčném povrchu několika buněčných typů včetně neurálních buněk (Shin et al., 2003; Xiao et al., 1999; Zhang et al., 2010b). Pozoruhodné je, že GRP78 má mimo buňku také zátěžové odezvy, které zahrnují protizánětlivé a imunomodulační vlastnosti (Panayi a kol., 2004, Panayi a Corrigan, 2006, Vollmer et al., 2010) [79].

Funkce GRP78 je také spojena s ochranou proti jiným onemocněním charakterizovaným depozicí amyloidu, jako je diabetes typu II. DM II obsahuje lidský amylin, což je i polypeptid amyloidního ostrůvku, cytotoxické agregáty v β buněk pankreatických ostrůvků [79].

3.2.7 Hsp60

Hsp60, také nazývaný chaperoniny, jsou velké duplexní kroužky, které obklopují centrální dutinu. Substrátové proteiny, typicky složené meziprodukty, jsou zapouzdřeny do centrální dutiny, čímž se chrání exponované hydrofobní zbytky před agregací a umožňují, aby se substrát foldoval v chráněném prostředí. Chaperoniny mohou být rozděleny do dvou podskupin. Skupina I (HSPD) chaperoniny jsou přítomny v bakteriích (GroEL) a mitochondriální matrici (Hsp60). Obsahují 7 podjednotek v kruhu a vyžadují chaperony (HSPE), které působí jako víčka nad komplexem. Chaperoniny skupiny II se nacházejí v archea (termosom) a v cytosolu eukaryot (CCT nebo TRiC). Obyčejně mají 8 podjednotek na jeden prstenec a nevyžadují společné chaperony [68].

3.2.7.1 GroE(L)

GroEL patří do rodiny Hsp60, která se také nazývá chaperoniny. Z hlediska své funkce a vztahu s členy této třídy mohou být rozděleny do dvou skupin. Skupina chaperoninů I, to je GroEL skládající se ze sedmi podjednotek v každém kruhu, které potřebují co-chaperon podobně jako GroES. Nacházejí se v *Eubacteria*, mitochondriích a chloroplastech eukaryotické buňky. Skupina chaperoninů II se skládá z osmi nebo devíti podjednotek v každém kruhu a nevyžadují co-chaperon. Ty se nacházejí v cytosolu *Archeí* a eukaryot [86, 87].

Hlavně tvar GroEL-Chaperonu se skládá ze dvou kruhů nad sebou, sedmi identických podjednotek, přičemž skládací cyklus prstence trvá asi 15 sekund [36, 49, 88].

Pozoruhodné u GroEL je kvartérní struktura, která se podobá barelu. 14 podjednotek uspořádaných ve dvou prstencích ze sedmi molekul, které tvoří dvě samostatné dutiny o průměru 45° (obrázek 4 A, B). Každý z 14 podjednotek GroEL se skládá ze tří domén. Rovníkové domény tvoří centrální část sudu. Jsou zodpovědné za vazbu a hydrolýzu ATP a zprostředkovávají všechny kontakty mezi těmito dvěma kruhy a většiny kontaktů mezi podjednotkami ve stejném kruhu. Apikální domény jsou umístěny na koncích válce. Zde dochází k vázání proteinových substrátů a co-chaperonu GroES. Ekvatoriální a apikální

domény jsou spojeny prostřednictvím mezilehlé domény společně, která slouží jako molekulární závěs a umožňuje strukturální změny v průběhu funkčního cyklu GroEL [43, 89, 90].

V konečném důsledku neposkytuje GroEL žádné nároky na strukturu navázaného proteinu, pokud má dostatečně velký povrch pro hydrofobní interakci. Zde se liší od Hsp70, ve kterém je tunel podobné struktury vazebného místa vyžadující lokálně natažené konformace polypeptidu [43, 91].

GroEL chaperon a jeho ko-chaperon GroES, jsou esenciální pro buněčný růst, protože pomáhají při skládání buněčných proteinů. Tento chaperon a Co-chaperon při své aktivaci hydrolyzují ATP a v neaktivní formě ji tedy snižují [92].

3.2.8 sHsp

SHSP jsou rodiny nebo více rodin stresových proteinů s molekulovou hmotností do 40 kDa. Jedenáct členů této rodiny je charakterizováno jádrovou doménou 80-100 aminokyselin známou jako α -krystalin, hlavním proteinem čočky, na C-konci (Kim et al., 1998). N-konec ukazuje rozmanitost v sekvenci a délce mezi členy rodiny sHsp. α -krystalinová doména je tvořena dvěma podobnými podjednotkami, α A-krystalinem a α B-krystalinem, které tvoří velké komplexy s proměnlivým počtem podjednotek v různých sHSPs (např. MjHsp16.5 sestávající z 24 podjednotek) a fungují jako molekulární chaperony (Clark a Muchowski, 2000; Haslbeck a kol., 2005; Kim et al., 1998) [69].

Všechny dříve zkoumané typy sHsp tvoří oligomerní komplexy obvykle od 12 do 42 podjednotek. Základní jednotka této oligomerní struktury je dimer, dále spojený za vzniku struktury s "míčem". Doména C-terminálního monomeru se zahrnuje především jako listová struktura, strukturu N-terminální domény lze určit pouze částečně. Elektronová mikroskopická rekonstrukce struktury α -krystalin potvrdila sférickou strukturu. Typy sHsp byly zahrnuty do rodiny molekulárních chaperonů, protože specificky interagují s rozloženými proteiny a zabraňují jejich agregaci. Typy sHsp mají úžasnou vazebnou kapacitu. Jsou tedy schopné vázat velký počet non-nativních proteinů, pravděpodobně až na non-nativní protein na podjednotce komplexu oligomerní skupiny sHsp [43, 93, 94, 95, 96].

Překvapivá vlastnost typů sHsp je vznik velkých pravidelných komplexů s jeho substrátových proteinů. Konzervovaných ve všech Hsp40 o 75 aminokyselinách. V přítomnosti Hsp40 ATP

hydrolyza probíhá rychleji, a tedy pravděpodobně není reakční rychlost v cyklu. Není proto překvapující, že je to druhý potenciálně pomalý krok výměny nukleotidů, kterými mohou být stimulovány. Tento úkol se provádí, na co-chaperonové GrpE [43, 97].

3.2.8.1 Hsp27

Hsp27 je nejrozšířeněji studovaným chaperonem v rodině sHsps a přispívá k sestavení mnoha cytoskeletálních proteinů (např. Aktin, gliální fibrilární kyselý protein, neurofilamenty a akrystalin) a enzymy včetně superoxiddismutázy (SOD) v savčích buňkách (Arrigo et al., 2007). Sestavení funkčních sHsp komplexů je regulováno ATP-dependentní fosforylací a defosforylací (Hayes et al., 2009; Lambert a kol., 1999; Muchowski a Clark, 1998). sHsps mohou ovlivňovat progresi onemocnění, včetně katarakt a neurodegenerativních poruch, u kterých jsou agregovány nesprávně přeložené proteiny. Předpokládá se, že agregace je inhibována, když jsou sHsp upregulovány a tvoří přechodné interakce s exponovanými hydrofobními povrchy na rozvinutých proteinech (Clark a Muchowski, 2000). Takže Hsp27 a α B-krystalin byly navrženy jako terapeutické cíle pro různé nemoci včetně neurodegenerativních onemocnění, myopatií, astmatu, katarakty a rakoviny (Arrigo et al., 2007) [79].

3.2.9 Spouštěcí faktor

Spouštěcí faktor (TF) je klíčovou složkou prokaryontní chaperonové sítě, která zahrnuje různé základní buněčné procesy, jako je rozvíjející se peptidové skládání, přenos proteinů, sestavení ribozomů. TF je první chaperon, který narazí vznikající řetězce v prokaryotě. Přes vazbu k ribozomálnímu proteinu L23 je TF těsně umístěn na místě výstupu peptidu z ribozomu a pomáhá nasazeným řetězcům skládat se do nativní konformace (Ferbitz et al., 2004; Hoffmann et al., 2010; Mashaghi a kol., 2013). Interakce TF se vzniklým řetězcem a ribozomem je cyklus dynamického vazebného uvolňování, který je řízen identitou a délkou vznikajícího polypeptidu vystupujícího z ribozomu (Kaiser et al., 2006; Oh et al., 2011). TF dimer, se stabilně spojí s celou řadou proteinů s plnou délkou a podílí se na sestavování ribozomů a zabraňuje agregaci proteinů (Liu et al., 2005; Martinez-Hackert a Hendrickson, 2009; Saio et al., 2014) [98].

TF a DnaK mohou postupně interagovat s velkými multidoménoými proteiny a aktivně spolupracovat na podpoře jejich skládání [99,100].

TF má modulární a flexibilní strukturu, která se skládá ze tří odlišných domén. N-koncová doména se nachází na konci molekuly, která je zodpovědná za zakotvení TF na ribosom (Merz et al., 2008). C-terminální doména je umístěna ve středu molekuly a buduje štěrbinu společně s N-terminální doménou. Štěrbina je považována za hlavní chaperonové místo TF [Martinez-Hackert a Hendrickson, 2009; Hoffmann a kol., 2010]. Avšak delece TF by narušila fyziologický stav buňky [98].

3.2.10 NAC chaperon

NAC je první kotranslační faktor, který se váže na polypeptidy a pomáhá s jejich správným sklápěním. Dále skupina proteinů, které existují ve všech mnohobuněčných organismech [101].

Tento komplex v souvislosti s nascentním polypeptidem (NAC) je cytosolický chaperon, který rozpozná vznikající řetězce na translačně aktivních ribosomech a hraje roli při dovozu nukleárně kódovaných mitochondriálních proteinů. Tento heterodimerický komplex je složen z jedné α a jedné podjednotky β . Tento komplex se podílí na několika procesech, jako je ochrana nascentních polypeptidů před agregací a zaměřením na organely jako je endoplasmatické retikulum [102, 103, 104].

3.2.11 SecB

SecB stabilizují nesložené proteiny a udržují je ve stavu exportovatelnosti [105].

SecB používá dlouhé hydrofobní drážky, které běží kolem svého diskovitého tvaru, aby rozpoznaly a vázaly se na několik hydrofobních segmentů po celé délce proteinů. Tato jedinečná komplexní architektura mění kinetiku vázání proteinů na SecB a poskytuje chaperonu silnou antifoldingovou aktivitu. Tento chaperon je však pouze prokaryontního typu (Tab. 1) [106].

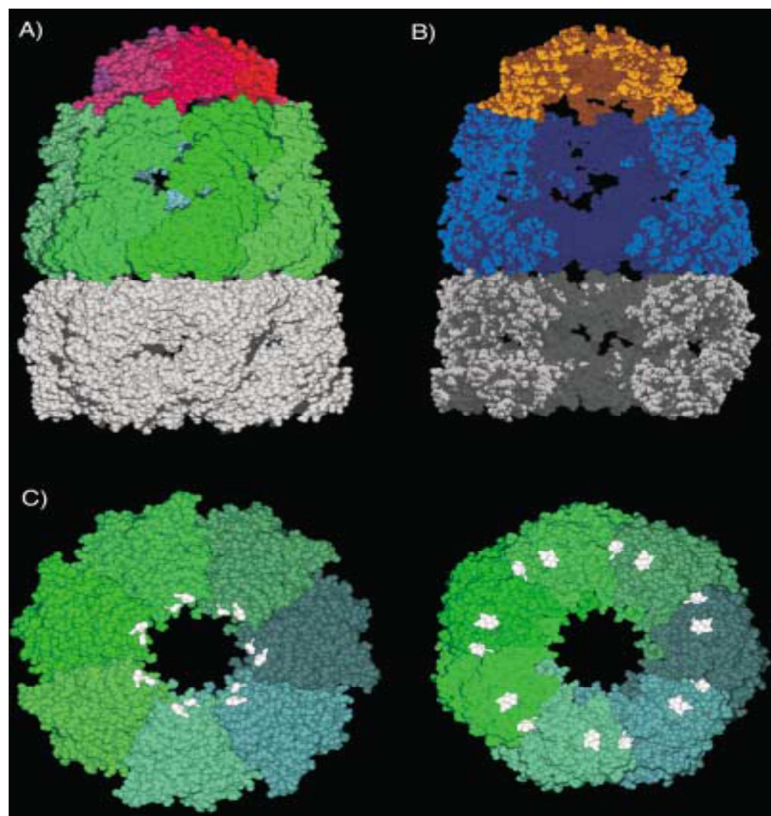
3.3 Co - chaperon

Reakční cyklus chaperonu je regulován různými Co-chaperony. Co-chaperony vykazují specifické vazebné přednosti pro různé konformace chaperonu a ovlivňují různé fáze cyklu, jako je vazba na "klienta" a hydrolýza ATP. Co-chaperony proto obvykle spolupracují v sekvenčním cyklu, aby usnadnili zrání "klienta" chaperonu. [68]

3.3.1 GroE(S)

GroES je Co-chaperon rodiny Hsp60, vede k významným strukturálním změnám v GroEL - částicích. Za prvé, působí jako kryt. To znamená, že blokuje otevření GroELRings, ke kterému se váže, a tak obsahuje polypeptid vázaný v dutině. Za druhé, vazba GroES má za následek otáčení apikální domény, v jejímž průběhu, se mění v podstatě vlastnosti středové dutiny. Tyto hydrofobní skupiny, které jsou zodpovědné za vazbu polypeptidu, jsou přesunuty a nahrazeny polárními zbytky (Obrázek 2C). Tím se snižuje afinita k hydrofobním polypeptidům, dochází k uvolnění navázaného proteinu v uzavřené dutině. Za třetí zvyšuje modifikaci objemu dutiny. Tyto vazby proto působí jako molekulární spínače [43, 90, 107, 108, 109].

Tyto Co-chaperony GroES se skládají ze sedmi podjednotek a mají tvar kopule. Zvláštností GroES je "mobilní smyčka", úsek 16 aminokyselin, který je zodpovědný za vazbu na GroEL [110, 111, 112].



Obrázek 6: *Struktura GroE chaperonu z E. coli, určená rentgenovou krystalografií.* [26, 27]

A) Boční pohled na asymetrický komplex kuliček GroE, který se skládá z dvojitého prstence GroEL a jediného prstence GroES. Distální kroužek GroEL je zobrazen šedě, sedm podjednotek proximálního

prstence GroEL je zobrazeno v odstínech zelené. GroES (červená) se váže na horní část proximálního kroužku.

B) Průřez kroužků GroE. Každý kroužek GroEL obklopuje dutinu, která slouží jako skládací oddíl pro polypeptidový substrát. Některé zbytky ekvatoriálních domén nebyly v krystalické struktuře vyřešeny, což dalo (špatný) dojem, že obě dutiny jsou sousedící. Vazba GroES na horní prsteneček GroEL blokuje přístup do horní dutiny a současně vyvolává pohyb apikálních domén. Průměr proximální dutiny se zvyšuje z 44° na 80° a jeho výška se pohybuje od 73° do 85°.

C) Změny struktury GroEL při vázání GroES. Vlevo: Sedm dílčích jednotek, které tvoří jeden prsteneček, jsou zobrazeny v odstínech zelené a modré. Hydrofobní aminokyseliny v apikálních doménách, které byly identifikovány jako důležité pro vazbu polypeptidů a GroES, jsou uvedeny v bílé barvě. V nepřítomnosti GroES tyto zbytky potahují vnitřek centrální dutiny a představují vysokou afinitu k rozvinutým polypeptidům tohoto stavu. Vpravo: při vázání GroES se apikální domény otáčejí směrem ven o $\approx 90^\circ$. Hydrofobní náplasti jsou zakryty v podjednotkových rozhraních, čímž je vnitřní povrch dutiny hlavně hydrofilní a způsobuje uvolňování vázaného polypeptidu [96].

3.3.2 Hsp40 a Hsc70

Co-chaperone HSP40 (Terada et al., 1997) a savčí HSC70 také váže širokou škálu vznikajících a nově syntetizovaných peptidových řetězců za nepříznivých podmínek (Thulasiraman et al., 1999). GRP78 (a i HSP5A a imunoglobulinový protein vázající BiP) je homolog HSP70 umístěný v ER, který váže vznikající a nově syntetizované peptidy způsobem nezávislým od exponovaných hydrofobních sekvencí (Misselwitz et al., 1998). Takže chaperony v rodině HSP70 mají různou dynamiku vazeb peptidu [79].

Členové rodiny DnaJ (také označované jako Hsp40) jsou důležitými regulátory aktivity Hsp70 stimulací hydrolýzy ATP. Všechny proteiny DnaJ obsahují J doménu, konzervovanou oblast 70 aminokyselin, která se skládá do čtyř α -helixů. Helix II a šroubovice III tvoří antiparalelní dvojsvazkový svazek se smyčkou, která spojuje dvě spirály obsahující motiv histidin-prolin-aspartát (HPD). Motto HPD je kritické pro snížení aktivační energie hydrolýzy ATP [68,113].

Lidský genom kóduje 49 DnaJ proteinů, které mohou být rozděleny do tří tříd podle jejich doménové kompozice [8]. Proteiny třídy I (DNAJA) sdílejí všechny domény přítomné v proteinu *Escherichia coli* DnaJ s N-koncovou J doménou, oblastí bohatou na aglycin-fenylalanin (GF), zinkem vázající doménou a C-terminální doménou. Proteiny třídy II (DNAJB) obsahují doménu N-terminálu a oblast bohatou na GF, zatímco protein třídy III (DNAJC) obsahuje pouze J doménu. Diverzifikace domén mimo J doménu umožnila proteinům DnaJ přijmout specializované funkce. Například domény, které cíleně zaměřují proteiny DnaJ na přesné vnitrobuněčné lokality pro podporu interakce Hsp70 s specifickými pacienty. Klientské vazebné domény navíc umožňují některým DnaJ proteinům poskytovat klientům SBD Hsp70. Specializované domény také usnadňují cílení klientů na degradaci,

čímž vytvářejí důležitou vazbu mezi Hsp70, nesprávně přeloženými bílkovinami a degradací [68,113, 114].

4 Laboratorní detekce cytotoxických T lymfocytů a vyšetřování jejich funkcí

Nejpoužívanější metoda ve zdravotnictví pro detekci cytotoxických T lymfocytů, je průtoková cytometrie, která je založená na expresi povrchových znaků buněk (T lymfocytů). Její jedinečnou vlastností průtokové cytometrie je, veliké využití pro typ buňky, tak její vlastnosti.

4.1 Obecný princip průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie se používá ke zkoumání buněk a částic při průtoku velmi úzkou průtokovou komůrkou. Nejprve se vzorek nasaje a rozdělí, poté se zředí v předem definovaném poměru a označí patentovaným barvivem (např. fluorescenčním nejčastěji), které se váže specificky na nukleové kyseliny. Poté se vzorek přesouvá do průtokové komůrky. Osvítí se polovodičovým laserovým paprskem, díky čemuž je možné buňky oddělit pomocí tří různých signálů: Přední rozptýlené světlo (přední rozptyl neboli FSC), Boční rozptýlené světlo (boční rozptyl neboli SSC), Boční fluorescenční světlo (boční fluorescence neboli SFL). Dle intenzity předního rozptylu se určí objem krvinky. Boční rozptyl poskytuje informace o obsahu buňky, jako jsou jádro a granule. Boční fluorescence potom identifikuje množství DNA a RNA v buňce [115].

4.2 Vlastní detekce cytotoxických T lymfocytů

Významný posun v charakterizaci subpopulací leukocytů nastal právě díky možnostem laboratorních technik prokazovat expresi více CD znaků na povrchu buňky. Kvalitativní posun spočívá v možnosti lépe definovat diferenciační stadium buňky resp. funkční stav (aktivace). V současnosti je rutinně využíváno dvojí značení pro stanovení aktivačních a diferenciačních znaků především lymfocytárních populací [116].

Aktivace především cytotoxických T lymfocytů má velký význam při IO a tedy i u vzniku nádorového bujení. Aktivované T lymfocyty jsou prokazovány kombinací znaků CD3/CD25, CD3/CD69 nebo CD3/HLADR. Průkaz exprese znaků CD28 a CD38 umožňuje lépe charakterizovat populaci CD8⁺ lymfocytů (Ts/Tc). V klinických aplikacích dosud platí, že populace CD8⁺CD28⁻ zahrnuje Ts buňky, fenotyp CD8⁺CD28⁺ buňky Tc. Exprese znaku CD38 na CD8⁺ je výrazem aktivace, jeho sledování má význam především u virových infekcí

(EBV – důvodem infekční mononukleózy, CMV - zánětlivé onemocnění různých orgánů, jako jsou játra, plíce, tlusté střevo, mozkové tkáně a sítnice) [116].

Pro podrobnější charakteristiku lymfocytárních populací využíváme trojího, v některých případech i čtyřnásobného, značení. V těchto případech jsou kromě základních fluorochromů (fluorescein izothiokyanátu – FITC a phycoerythrinu – PE) využívány i peridinin chlorophyll proteinse stejnou excitační vlnovou délkou jako předchozí. Dostupnost druhého laseru (diodový laser s excitační vlnovou délkou 635 nm) otevírá možnosti pro použití další skupiny fluorochromů nebo jejich tandemů (např. Allophycocyanin – APC, APC v tandemu s CY7). Pro průkaz paměťových pomahačských T lymfocytů (CD45RO+CD27+CD4+) a pro tzv. paměťový „T_H1 like“ a „T_H2 like“ fenotyp (CD45RO+CD62L-CD4+ resp. CD45RO+CD62L+CD4+) je sledována exprese CD45RO/CD27/CD4 a CD45RO/CD62/CD4. Při použití vhodného stimulans lze paralelně detekovat i produkci IFN α [116].

Samostatnou problematikou je diagnostika krevních malignit, kde možnosti průtokové cytometrie spolu s využitím diagnostických monitorů typu MP přinesly značný pokrok. V současnosti je možno provádět diagnostiku leukemií podle protokolů, které odpovídají doporučeným panelům diagnostických MP (např. protokol ALL-BFM 95) včetně stanovení cytoplazmatické exprese některých znaků (cIgM, cCD22, cCD3, cMPO, cTdT, cCD79a aj.). V diagnostice krevních malignit musí ale imunologické pracoviště vždy úzce spolupracovat s oddělením klinické Hematologie [116].

Ze širokého spektra funkčních testů T lymfocytů, kdy je obvykle po několikadenní stimulaci sledována proliferační schopnost lymfocytů detekcí nově syntetizované DNA, je zde prezentován screeningový test aktivace *in vitro* [116].

V testu je sledován jeden z prvních kroků, který může směřovat k proliferaci lymfocytů. Není možné, jej považovat za alternativní test blastické transformace lymfocytů, kde je sledováno množství *de novo* syntetizované DNA. Po 4h stimulaci lymfocytů polyhydroxialkoholátem (PHA) nebo komitogenní monoklonální protilátkou CD2/CD2R je sledována exprese časného aktivačního znaku CD69. Snížené hodnoty lze očekávat u některých primárních a sekundárních imunodeficiencí. V případě diferenciální diagnostiky primárních imunodeficiencí (geneticky podmíněné choroby vznikající genetickou mutací) je s výhodou využíváno suboptimální koncentrace mitogenu (2,5 ug/ml) [116].

5 Závěr

Cílem této práce, bylo seznámení s literárními zdroji CD znaků cytotoxických T lymfocytů. Literární zdroje těchto znaků jsou od časopisů až po různé typy učebnic. Některé informace se liší, ale je to spíše díky tomu, že jsou vydány v linearity času a tedy i s linearitou vývoje různých typů analyzátorů a jejich principu měření a tedy i zjištění nových poznatků. V literatuře se dozvíme vše potřebné o vývoji lymfocytů a celé vývojové řadě jejich typů jako jsou zmíněné cytotoxické T lymfocyty.

Vývoj cytotoxických T lymfocytů jak je známo probíhá v lymfatických orgánech. Co však není úplně i pro všechny známé, jsou jejich povrchové znaky. Tyto znaky nebyly úplně neznámé, avšak některé typy ano. Jejich proteinové složení není opět úplně prozkoumaná záležitost a není divu, že se jimi mnoho vědců zabývá. Totiž každá jiná sekvence aminokyselin s peptidovými znaky znamená nový CD znak v některých literárních dílech i jen gp (glykoproteiny) a to hlavně podle zjištění jejich funkcí. Ty jsou též různorodé. Pro tuto práci byly nejdůležitější hlavně ke vztahu k imunitní odpovědi. Tyto poznatky mě též obohatily. A to zejména při dovídání předkládaného peptidu a jeho propojení a vývoj v chaperon komplex.

Chaperon komplexy byly pro tuto práci stěžejní a to díky tomu, že to byla celkem nová informace. Jak bylo v této práci napsáno, chaperony jsou tzv. „pomocné“ proteinové komplexy, které pomáhají při reakci antigen protilátka s TCR a HLA znaky tř. I a tř. II. Zjištěno bylo, že jsou zejména důležité při zamezení rakovinového bujení a špatné funkce v IO. Jak bylo zřejmě porozumět je to tzv. „sendvič“, který je spolu celiství a každá část zvlášť, je buď neaktivní anebo tvoří „zlo“ v našem organismu.

Na závěr tato práce shrnuje informace o průtokovém cytometru a v laboratorním vyšetření. I v této kapitole ovšem tato práce narazila na novinky ve vyznačování povrchových znaků pro stanovení a i na to že lze vyšetřit i různé fáze aktivních cytotoxických T lymfocytů.

6 Použitá literatura

1. TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie.*, Grada Publishing, a. s., 2003., 771 stran., ISBN: 80 – 247 – 0512 – 5. Str. 163 – 164, 126, 170
2. TORSTEN Haferlach, Ulrike BACHER, Harald TEMPL, Heinz DIEM, s přispěním Mariane ENGELS: *Tachenatlas Hämatologie*, 6. vydání; ISBN978-3-13-631606-1 ISBN 978-80-247-4787-3 str.16
3. BARTUŇKOVÁ Jiřina, Anna ŠEDIVÁ, *Imunologie – minimum pro praxi*, Triton, 1999, Vydání 2, stran 95, ISBN 80 – 7254 – 045 – 9, str. 36, 13.
4. FERENČÍK, Miroslav, Jozef ROVENSKÝ, Štefan NYULASSY., *Imunológia – Základné termíny a definície.*, Slovart Academic Press s. r. o., 1999., Tlač Faber Bratislava., stran.283, ISBN: 80 – 88908 – 38 – 8., str. 36, 40 – 42, 236
5. HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ., *Základy Imunologie.*, 3. Vydání., Triton, 2005., stran 279., ISBN: 80 – 7254 – 686 – 4, strany 128 – 131,129,126, 2, 25
6. NAKAGAWAYohko, NEGISHIYasuyuki, SHIMIZUMasumi, a další., *Effects of extracellular pH and hypoxia on the function and development of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.* Immunology letters, October 2015, volume 167, str. 72 - 86
7. PHILIP PJ., BAUDOUIN F., SUDAKA I., BAYLE J., *Positive CD17 myeloid antigen in acute leukemia expressing lymphoid antigens: abnormal genomic processes in multiphenotypic leukemia or new subtypes within lymphoid leukemia?*. Leuk Lymphoma.1993 Nov;11(5-6): str. 473-6. Dostupný z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907249> (23.10.2016 19:51)
8. VIOLA A., SCHROEDER S., SAKAKIBARA Y. and LANZAVECCHIA A., *Science*1999; str. 680–682
9. K. OKKENHAUG, A. BILANCIO, J. L. EMERY and B. VANHAESEBROECK., *Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival;* Biochemical Society Transactions 2004; Volume 32, part 2., str. 332 - 335
10. ELGUETA Raul, Micah J. BENSON, Victor C. de VRIES, Anna WASIUK, Yanxia GUO, and Randolph J. NOELLE., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system.*, Immunol Rev. 2009 May; 229(1): 10.1111/j.Dostupné z:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826168/>(24.10.2016 20:57)
11. CARBONEEnnio, Giuseppina RUGGIERO, Giuseppe TERRAZZANO, Carmen PALOMBA, Ciro MANZO, Silvia FONTANA, Hergen SPITS, Klas KÄRRE and Serafino ZAPPACOSTA., *A New Mechanism of NK Cell Cytotoxicity Activation: The CD40–CD40*

- Ligand Interaction.*, J Exp Med. 1997 Jun 16; 185(12): 2053–2060. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2196353/> 14.3.2017 17:35
12. DANESE S., M. SANS and C. FIOCCHI., *The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease.*, Gut. 2004 Jul; 53(7): 1035–1043. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1774101/> 14.3.2017 19:00
 13. SOMANCHI Srinivas S., Kelsey J. MCCULLEY, Anitha SOMANCHI, Leo L. CHAN and Dean A. LEE., *A Novel Method for Assessment of Natural Killer Cell Cytotoxicity Using Image Cytometry.* PLoS One. 2015; 10(10): e0141074. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2196353/> 14.3.2017 17:35
 14. JACQUES Deguine, Be´atrice BREART, Fabrice LEMAITRE, James P. Di SANTO and Philippe BOUSSO; *Intravital Imaging Reveals Distinct Dynamics for Natural Killer and CD8+ T Cells during Tumor Regression*; DOI 10.1016/j.immuni.2010.09.016 dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761310003596#>
 15. JOSEPH LIN and Arthur WEISS., *T cell receptor signalling.* Department of Medicine and The Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Francisco, CA 94143-0795, USA, str. 243
 16. MARK M. DAVIS., *A New Trigger for T Cells.*, Cell press, Volume 110, Issue 3, 9, August 2002, str. 285–287
 17. OKKENHAUG and Bart VANHAESEBROECK; *Pi3k In Lymphocyte Development, Differentiation And Activation.*, Immunology., volume 3, april 2003, str. 317 - 330
 18. EDDY BRUYNS, Anne MARIE-CARDINE, Henning KIRCHGESSNER, Karin SAGOLLA, Andrej SHEVCHENKO, Matthias MANN, Frank AUTSCHBACH, Armand BENSUSSAN, Stefan MEUER and Burkhardt SCHRAVEN; *T Cell Receptor (TCR) Interacting Molecule (TRIM), A Novel Disulfide-linked Dimer Associated with the TCR CD3 – ζ Complex, Recruits Intracellular Signaling Proteins to the Plasma Membrane.* J Exp Med. 1998 Aug 3; 188(3): str. 561–575. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212462/> 15.04.2017 v 16:51
 19. ITANO A.A. and JENKINS M.K., *Immunol* 4, 2003, str. 733–739
 20. HIROMITSU HARA, Teiji WADA, Chris BAKAL, a další., *The Maguk Family Protein CARD11 is Essential for Lymphocyte Activation.*, Immunity., Cell Press 2003., Volume 18, str. 763–775

21. TAKASHI FUJITA, Institute for Virus RESEARCH, Kyoto University; *Autoimmunity due to constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors*, Japan; sborník Cytokine 2015, ID 255. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.08.011>
22. CAUX By Christoph, Catherine MASSACRIER, Beatrice VANBERVLIET, Bertr and Dubois Cees Van KOOTENand Jacques BANCHEREAU., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking.*, JEM the journal of experimental medicine1994 Oct 1; 180(4): str. 1263–1272. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2191669/>
23. GELBMANN C. M., S. N. LEEB, D. VOGL, M. MAENDEL, H. HERFARTH, J. SCHÖLMERICH, W. FALK and G. ROGLER., *Inducible CD40 expression mediates NFκB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts.*, Gut. Octobr 2003, str. 1448–1456. Dostupné z:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1774101/>
24. SANNA M. MÄKELÄ, Pamela ÖSTERLUND, Veera WESTENIUS, Michael S. DIAMOND, Michael Gale JR., Ilkka JULKUNEN., *Influenza B virus entry induces RIG-I-dependent rapid interferon gene expression.*, sborník cytokine, volume 76, Novembr 2015, ID. 28, str 63.Dostupnéz:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.08.058>
25. MIROSLAV PENKA, Eva TESAŘOVÁ a kolektiv; *Hematologie a transfuzní lékařství II*; Grada Publishing, a.s., 2012; ISBN 978-80-247-3460-6; str.17
26. GELBMANN CM, LEEB SN, VOGEL D, et al.,*Inducible CD40 expression mediates NFB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts.*,Gut,Octobr 2003, str. 1448–56. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1773835/>
27. KARMANN K., C. C. HUGHES, J. SCHECHNER, W. C. FANSLOW and J. S. POBER., *CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression.*, PNASUSA 1995 May 9; str. 4342–4346. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41940/?page=1>
28. ANTOINE ME´NORET, Zihai LI, Maria L. NISWONGER, Anne ALTMAYER and Pramod K.; *An Endoplasmic Reticulum Protein Implicated in Chaperoning Peptides to Major Histocompatibility of Class I Is an Aminopeptidase.*, The journal of biological chemistry 2001. Volume 276, No. 36, Issue of September 7, str. 33313–33318
29. YOHIKO NAKAGAWA, Yasuyuki NEGISHI, Masumi SHIMIZU, a další., *Effects of extracellular pH and hypoxia on the function and development of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.*, Immunology later, Volume 167, Issue 2, October 2015, str. 72-86

30. HURT Sun., *Molecular mechanism for viral RNA detection: RIG-I-like receptors.*, sborník, Cytokine, Volume 76, Issue 1, November 2015, str. 59, ID 252. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.08.014>
31. MAROUI Mohamed Ali, JacquesDUTRIEUX, SébastienNISOLE, Mounira K.Chelbi-ALIX., *Reduction by SUMO of interferon gamma, but not alpha, transcriptional response.*, sborník, Cytokine, Volume 76, Issue 1, November 2015, str. 67, ID 22. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.08.052>
32. KAUSHIK Susmita and Ana Maria CUERVO., *Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome Word.*, Trends in Cell Biology August 2012, Vol. 22, str.407 - 417
33. SAEME ASGARI, Azadeh EBRAHIM-HABIBI,Mehdi MAHDAVI,Mohammad CHOOPANI and Hasan MIRZAHOSEIN; *Therapeutic protein deimmunization by T-cell epitope removal: antigen-specific immune responses in vitro and in vivo*; 2017 APMIS. Published by John Wiley& Sons Ltd, str. 544 - 552
34. COURANT Thomas, Emilie BAYON, Hei Lanne REYNAUD-DOUGIER, Christian VILLIERS, Mathilde MENNETEAU, Patrice N. MARCHE, Fabrice P. NAVARRO., *Tailoring nanostructured lipid carriers for the delivery of protein antigens: Physicochemical properties versus immunogenicity studies.*, *BIOMATERIALS 136 (2017) srt. 30*
35. CHANDAK Upagupta, Rachel E. CARLISLE, Jeffrey G. DICKHOUT.,*Analysis of the potency of variol low molecular weight chemici chaperones to prevent protein aggregation.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 486, Issue 1, 22 April 2017, str. 163–170. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1730476X>
36. Axel MOGK, matthias P. MAYER, elke DEUERLING; *Mechanismen der Proteinfaltung., Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential*; Biologie in unserer Zeit; 31. Jahr 200, str. 182 - 191
37. SCHIENE C., *Enzymes that catalyse the restructuring of proteins*, Curr. Opin. Struct. Biol. 2000, str. 40-45
38. THOMAS COURANT,EmilieBAYON, Hei Lanne REYNAUD-DOUGIER, Christian, Mathilde MENNETEAU, Patrice N. MARCHE, Fabrice P. NAVARRO., *Tailoring nanostructured lipid carriers for the delivery of protein antigens: Physicochemical*

- properties versus immunogenicity studies.*, *Biomaterials*, Volume 136, August 2017, str. 29–42, srt. 30
39. SUSMITA Kaushik and Ana Maria CUERVO; *ER chaperone–metal interactions: Links to protein folding disorders.*, *NeuroToxicologi*, Volume 33, Issue 3, June 2012, str. 545–557
40. QUAN S., J.C.A. BARDWELL., *Chaperone discovery.*, Wiley Online Library, First published: 12 September 2012. Dostupné z: <http://doi.org/10.1002/bies.201200059>
41. SMITH Heather L., Wenwen LI, Michael E. CHEETHAM., *Molecular chaperones and neuronal proteostasis.*, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2015, volume 40, str. 142–152;
42. RONG LI, Jianfei QIAN, Wenhao ZHANG, Weijun FU, Juan DU, Hua JIANG, Hui ZHANG, Chunyang ZHANG, Hao XI, Qing YI and Jian HOU., *Human heat shock protein-specific cytotoxic T lymphocytes display potent antitumour immunity in multiple myeloma.*, *British Journal of Hematology* 15 January 2014, str. 670 - 690
43. WALTER Stefan and Johannes BUCHNER; *Molecular Chaperones–Cellular Machines for Protein Folding*; WILEY-VCH Verlag GmbH, 69451 Weinheim, Germany 2002, str. 1098 - 1113
44. GETTING M. J., J. F. SAMBROOK, *Nature.*, 1992, str. 355, str. 33 - 45.
45. BUCHNER J., *FASEB Journal* 1996, volume 10, str. 10 –19
46. PAGE Anne-Laure and Claude PARSOT; *Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades*; *Molecular Microbiology* 2002, str. 1–11
47. WEIWEI LIU, Mi CHEN, Xinghui LI, Bao ZHAO, Junwei HOU, Huaguo ZHENG, Lipeng QIU, Zihai LI, Songdong MENG; *Interaction of Toll Like Receptors with the Molecular Chaperone Gp96 is Essential for Its Activation of Cytotoxic T Lymphocyte Response.*, *Plos One*. May 2016, str. 11- 26
48. TALI GIDALEVITZ, Fred STEVENS, Yair ARGON; *Orchestration of secretory protein folding by ER chaperonem.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, str. 2410–2424
49. HARTL F. U., *Molecular chaperones in cellular protein folding.*, *Nature* 1996, str. 381, str 571-580.
50. BUKAU B. et al., *Getting newly synthesized proteins into shape*; *Cell* 2000, str. 101, str. 119-122.
51. DEUERLING E. et al., *Trigger-factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins.*, *Nature* 1999, str. 400, str. 693-696.

52. ENGIN F., G.S.HOTAMISLIGIL., *Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases*, Diabetes, Obes. Metabol. 12 (Suppl 2), 2010. Dostupné z <http://doi.org10.1111/j.1463-1326.2010.01282.x>
53. PERLMUTTER D.H., *Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking*, Pediatr. Res. 52, 2002. Dostupné z:<http://doi.org/10.1203/00006450-200212000-00004>
54. UPAGUPTA Chandak, Rachel E. CARLISLE, Jeffrey G. DICKHOUT; *Analysis of the potency of variol low molecular weight chemici chaperones to prevent protein aggregation*; Biochemical and Biophysical Research Communications 2017, str. 486. Dostupné z:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1730476X> (11.42017)
55. LI Rong, Jianfei QIAN, Wenhao ZHANG, Weijun FU, Juan DU, Hua JIANG, Hui ZHANG, Chunyang ZHANG, Hao XI, Qing YI and Jian HOU., *Human heat shock protein-specific cytotoxic T lymphocytes display potent antitumour immunity in multiple myeloma*; British journal of hematology 2014, str. 690 - 701
56. PAGE Anne-Laure and Claude PARSOT; *Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trans*; Molecular Microbiology 2002, str. 1–11
57. MURUGESAN Raju, PUTTUR Santhoshkumar, K. Krishna Sharma; *Biochimica et Biophysica Acta;Alpha-crystallin-derived peptides as therapeutic chaperones*; Biochimica et Biophysica Acta 1860 (2016) 246–251
58. WEIWEI LIU, Mi CHEN, Xinghui LI, Bao Zhao, Junwei Hou, Huaguo Zheng, Lipeng Qiu, Zihai Li, Songdong Meng: *Interaction of Toll Like Receptors with the Molecular Chaperone Gp96 Is Essential for Its Activation of Cytotoxic T Lymphocyte Response*
59. J. BHATTACHARYYA, E.G. Padmanabha UDUPA, J. WANG, K.K.SHARMA.,*Mini-alpha Bcrystallin: a functional element of alphaB-crystallin with chaperone-like activity*, Biochemistry 2006, volume 40, str. 3069–3076.
60. A. LAGANOWSKY, J.L.BENESCH, M. LANDAU, L. DING, M.R.SAWAYA, D. CASCIO, Q. HUANG, C.V. ROBINSON, J. HORWITZ, D. EISENBER., *Crystal structures of truncated αA and αB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function*, Protein; Sci. 2010, volume 19, str. 1031–1043
61. REHNAE.A., S.K.SINGH, K. DHARMALINGAM., *Functional insights by comparison of modeled structures of 18 kDa small heat shock protein and its mutant in Mycobacterium leprae*; Bioinformation 2008, volume 3, str. 230–234.

62. ANDLEY U.P., H.C. PATEL, J.H. Xi., *The R116C mutation in alpha α -crystallin diminishes its protective ability against stress-induced lens epithelial cell apoptosis.*, J. Biol. Chem. 2002, str. 10178–10186.
63. PASUPULETI N., S.MATSUYAMA, O. VOSS, A.I. DOSEFF, K. SONG, D. DANIELPOUR, R.H. NAGARAJ., *The anti-apoptotic function of human alphaA-crystallin is directly related to its chaperone activity*; Cell Death Dis 2010, volume 1, str. 31
64. RAJU M., P. SANTHOSHKUMAR, L. Xie, K.K. SHARMA., *Addition of alphaA-crystallin semente to a mini-chaperone: alters the conformation but not the chaperone-like activity.*, Biochemistry 2014, str. 2615–2623
65. SANDEEP K., Sharma Smriti PRIYA., *Expanding role of molecular chaperones in regulating a synuclein misfolding; implications in Parkinson's disease*; Cell. Mol. Life Sci. 2017, str. 617–629
66. KEEFER Kathryn M., Heather L. TRUE., *Prion-Associated Toxicity is Rescued by Elimination of Cotranslational Chaperones.*, PLOS Genetics, November 9, 2016, str. 1 -23
67. SEIDLER PAUL M., Stephen A. SHINSKY, Feng HONG, Zihai LI, Michael S. COSGROVE AND, Daniel T. GEWIRTH., *Characterization of the Grp94/OS-9 Chaperone–Lectin Complex.*, JMB Journal of Molecular Biology, 23 October 2014, Volume 426, str. 3590-3605. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.024>
68. HEATHER L. Smith, WENWEN Li, Michael E. CHEETHAM., *Molecular chaperones and neuronal proteostasis*; Seminars in Cell & Developmental Biology 2015, volume 40, str. 142–152
69. SUSMITA Kaushik and Ana Maria CUERVO., *Chaperone mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome* Word., Cell Biology, August 2012, Volume 22, str. 407 - 417
70. THIAGO V. SERAPHIM, Lisandra M. GAVA, David Z. MOKRY, Thiago C. CAGLIARI, Leandro R. S. BARBOSA, Carlos H.I. Ramos, Júlio C. BORGES., *The C-terminal region of the human p23 chaperone modulates its structure and function*; Archives of Biochemistry and Biophysics 2015, volume 565, str. 57–67
71. SCHEIBEL T., T. Weikl, J. BUCHNER, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1998, str. 1495 - 1499.
72. YOUNG J. C., C. SCHNEIDER, F. U. HARTL., *FEBS Lett.*, 1997, str. 139 - 143.
73. WEAVER A.J., W.P. SULLIVAN, S.J. FELTS, B.A.L. OWEN, D.O. TOFT., *Crystal Structure and Activity of Human p23, a Heat Shock Protein 90 Co-chaperone.*, Journal of Biological Chemistry 2000, str. 275

74. WEIKL T., K. ABELMANN, J. BUCHNER., *An unstructured C-terminal region of the hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function.*, JMB Journal of Molecular Biology 29 October 1999, Volume 293, str. 685-691
75. POKSAY K., S. BANWAIT, D. CRIPPEN, X. MAO, D. BREDESEN, R.RAO., *No title available.*, Journal of Molecular Neuroscience 2011, Str. 1–12.
76. GAUSDAL G., B.T.GJERTSEN, K.E. FLADMARK, H. DEMOL, J. VANDEKERCKHOVE, S.O.DOSKELAND., *Leukemia* 18., 2004, str. 1989–1996.
77. MOLLERUP J., M.W.BERCHTOLD., *The co-chaperone p23 is degraded by caspases and the proteasome during apoptosis.*, FEBS Letters, 6 July 2005, str. 579
78. WOO S. H., S. AN, H.C. LEE, H.O. JIN, S.K.SEO, D.H. YOO, K.H. LEE, C.H. RHEE, E.J. CHOI, S.I. HONG, I.C. PARK., *A Truncated Form of p23 Down-regulates Telomerase Activity via Disruption of Hsp90 Function.*, Journal Biological Chemistry, 5 August 2000, str. 284
79. TIFFANY-CASTIGLIONI Evelyn, Yongchang QIAN., *ER chaperone–metal interactions: Links to protein folding disorders.*, NeuroToxicology., NeuroToxicology 33, 2012, str. 545–557
80. BUKAUB. und A. L. HORWICH., *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machina.*, Cell 1998, str. 351-366.
81. FINK A. L., *Chaperone-mediated protein folding.*, Physiology Rev. 79, 1999, str. 425–449.
82. MELNICK J., J.L.DUL, Y. ARGON., *Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum.*, Nature 1994, volume 370, str. 373–375.
83. DAVIS D. P., R. KHURANA, S. MEREDITH, F.J.STEVENS, Y. ARGON., *Mapping the major interaction between BiP and immunoglobulin light chains to sites within the variable domain.*, The Journal of Immunology 1999, volume 163, str. 3842–3850.
84. BANDYOPADHYAYU., et.al., *The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane.*, Molecular and cellular biology 2008, volume 28, str. 5747–5763
85. AGARRABERESF. and J.F. DICE., *A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation.* Journal Cell 2001, Src. 114, str. 2491–2499
86. WILLISON K., A. L. HORWICH., *Philos. Trans. R. Soc., London Ser. A* 1993, str. 313 - 325.

87. GUTSCHE I., L. O. ESSEN, W. BAUMEISTER., *Journal Molecular Biology*1999, volume 293, str. 295 - 312.
88. BUKAUB. und A. L. HORWICH., *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machina.*, Cell 1998, volume 92, str. 351-366.
89. BRAIG K., Z. OTWINOWSKI, R. HEDGE, D. C. BOISVERT, A. JOACHIMIAK, A. L. HORWICH, P. B. SIGLER, *Nature* 1994, volume 371, str. 578 - 586.
90. XU Z., A. L. HORWICH, P. B. SIGLER., *Nature* 1997, volume 388, str. 741 - 750.
91. BUKAU B., A. L. HORWICH, *Cell* 1998, volume 92, str. 351 - 366.
92. ILLINGWORTHMelissa, Jared SALISBURY, Wenqian LI, a další., *Effective ATPase activity and moderate chaperonine- cochaperonin interaction are important for the functional single ring chaperonin system.*, Biochemical and Biophysical Research volume 466,9 Octobr 2015, str. 15 - 20
93. LEE G. J., A. M. ROSEMAN, H. R. SAIBIL, E. VIERLING., *EMBO Journal*1997, volume 16, str. 659 - 671
94. HALEY D. A., J. HORWITZ, P. L. STEWART., *Journal Molekulare Biologycal*1998, volume 277, str. 27 - 35
95. HORWITZ J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, volume 89, 10, str. 449 - 10453.
96. JAKOB U., J. BUCHNER., *Trends Biochem. Sci.* 1994, volume. 19, str. 205 - 211.
97. LIBEREK K., J. MARSZALEK, D. ANG, C. GEORGOPOULOS, M. ZYLICZ., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, volume. 88, str. 2874 - 2878.
98. DONGJIE Fan, LushanLIU, Lingxiang ZHU, Fang PENG, Qiming ZHOU and Chuanpeng LIU., *Global Analysis of the Impact of Deleting Trigger Factor on the Transcriptome Profile of Escherichia coli.*,Journal of Cellular Biochemistry 2017, volume 118, str. 141–153
99. ANGLÈSFrédéric, Marie-Pierre CASTANIÉ-CORNET, Nawel SLAMA, Mickael DINCLAUX, Anne-Marie CIRINESI, Jean-Charles PORTAIS, Fabien LÉTISSE and Pierre GENEVAUX., *Multilevel interaction of the DnaK/DnaJ(HSP70/HSP40) stress-responsive chaperone machine with the central metabolism:* Scientific Report 27 January 2017, volume 7, str. 41341
100. AGASHE V. R. et al.,*Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed.* Cell 16 April 2004, volume 117, str.199–209

101. KEEFER Kathryn M., Heather L. TRUE., *Prion-Associated Toxicity is Rescued by Elimination of Cotranslational Chaperones.*, PLoS genetics 9 November 2016, str. 1 - 23
102. PONCE-ROJAS Jos E. Carlos, Maria Clara AVENDA~NO-MONSALVE, Armando Roberto YA~NEZ-FALCON et. all., *α -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import*; The febs jornaal 18 January 2017, volume 284, str 813 - 830
103. MOLLER I., M. JUNG, B. BEATRIX, R. LEVY, G. KREIBICH, R. ZIMMERMANN, M. WIEDMANN and B. LAURING., *A general mechanism for regulation of access to the translocon: competition for a membrane attachment site on ribosomes.* National Academy of Science, November 1998, volume 95, str. 13425–13430.
104. GAMERDINGER M., M. A. HANE BUTH, T. FRICKEY and E. DEUERLING., *The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum.* Science 2015, volume 348, str. 201–207
105. ZUOKUN Lu, Han WANG and TingTing YU., *The SecB-like chaperone Rv1957 from Mycobacterium tuberculosis: crystallization and X-ray crystallographic analysis.*, Acta crystallographica. Section F, June 2016, volume 72, str. 457 – 461
106. HUANG Chengdong, Paolo ROSSI, Tomohide SAIO and Charalampos G. KALODIMOS., *Structural basis for the antifolding activity of a molecular chaperone.*, Nature, 9 September 2016, volume 537, str. 202–206. Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v537/n7619/full/nature18965.html> 25.05.2017 ve 21:40
107. ROSEMAN A. M., S. CHEN, H. WHITE, K. BRAIG, H. R. SAIBIL., *Cell* 1996, volume 87, str. 241 - 251.
108. WEISSMAN J. S., C. M. HOHL, O. KOVALENKO, Y. KASHI, S. CHEN, K. BRAIG, H. R. SAIBIL, W. A. FENTON, A. L. HORWICH., *Cell* 1995, volume 83, str. 577 - 587.
109. MAYHEW M., A. C. R. da SILVA, J. MARTIN, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST, F. U. HARTL, *Nature* 1996, volume 379, str. 420 - 426.
110. LANDRY S. J., O. ZEILSTRA-RYALLS, O. FAYET, C. GEORGOPOULOS, L. GIERASCH, *Nature* 1993, volume 364, str. 255 - 258
111. RICHARDSON A., F. SCHWAGER, S. J. LANDRY, C. GEORGOPOULOS, *Journal Biology Chemistry* 2001, volume 276, str. 4981 – 4987
112. HUNTJ. F., A. J. WEAVER, S. J. LANDRY, L. GIERASCH, J. DEISENHOFER, *Nature* 1996, volume 379, st. 37

113. KAMPINGA H. H., E. A. CRAIG., *The Hsp70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity.*, Molecular Cell Biology 2010, volume 11, str. 579–92.
114. CHEETHAM M. E., *Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function.*, Cell Stress Chap 1998, volume 3, str. 28–36
115. Dodavatel analyzátoru sysmex., *Princip fluorescenční cytometrie.*, dostupné z: <https://www.sysmex.cz/vzdelavani/technologie/technologie-mereni/fluorescence-flow-cytometry.html> staženo 30.06.2017
116. Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem., *Některé diferenciační a aktivační CD znaky lymfocytů (subpopulace T a B lymfocytů).*, Dostupné z: <http://www.zuusti.cz/bunecna-imunita/> 10. 06. 2017 18:53pm