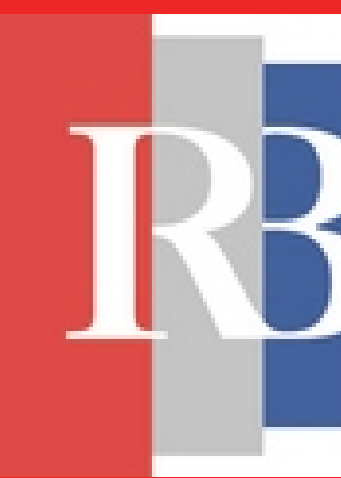


PEPTIDAZE NA STANICAMA IMUNOLOŠKOG SUSTAVA



ČOVJEK

(od stanice do organizma)

B. Čupić, E. Živković

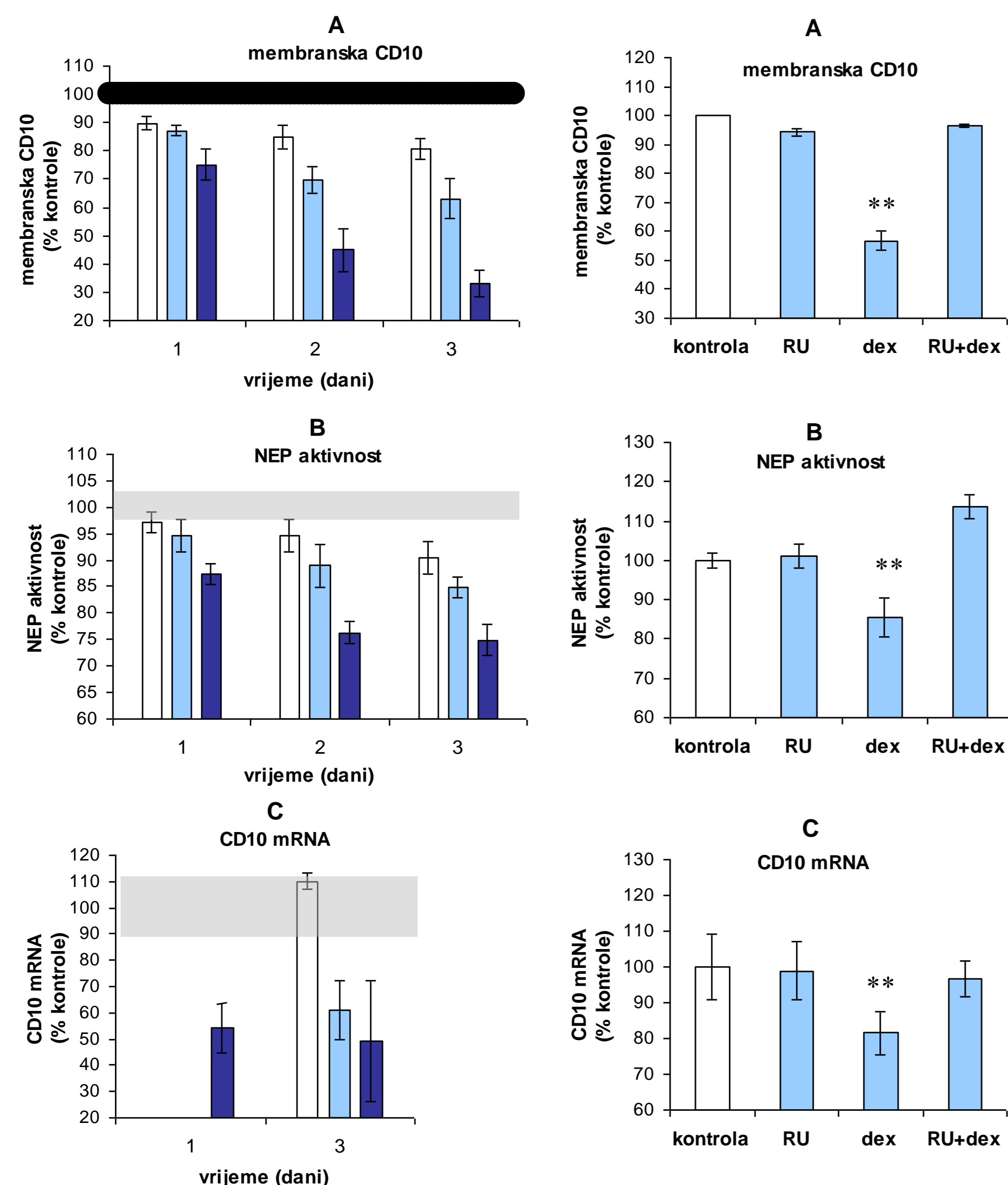
Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za eksperimentalnu hematologiju, imunologiju i onkologiju

UVOD

Peptidaze su enzimi koji svojim djelovanjem utječu na niz procesa u organizmu. Mogu biti smještene na staničnoj membrani (membranske peptidaze) ili u citoplazmi (citoplazmatske peptidaze). Važne predstavnice membranskih peptidaza su neutralna endopeptidaza (NEP; CD10) i aminopeptidaza N (APN; CD13) a citoplazmatskih dipeptidil-peptidaza 9 (DPP9). Svojom enzimatskom aktivnošću peptidaze reguliraju koncentraciju biološki aktivnih molekula u mikrookolišu (npr. neuropeptida i upalnih peptida) te na taj način sudjeluju u modulaciji imunološkog odgovora organizma. Peptidaze imaju svoju ulogu u staničnoj signalizaciji, proliferaciji, migraciji, apoptozi, angiogenezi, ali i fagocitozi posredovanoj Fc γ -receptorima te prezentaciji antigena.

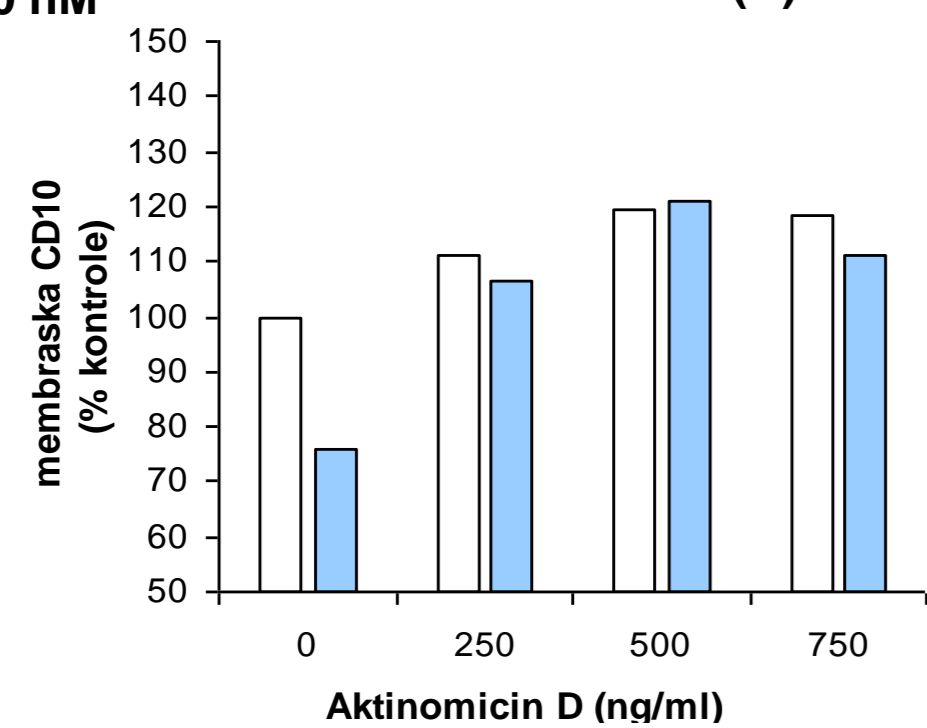
NEP/CD10

Na modelu nezrelih limfocita B, staničnoj liniji NALM-6, pokazano je smanjenje ekspresije NEP/CD10 uslijed djelovanja protuupalnog glukokortikoida deksametazona. Smanjenje ekspresije je pokazano na tri razine: razini proteina, mRNA i enzimatske aktivnosti te je pokazalo vremensku i koncentracijsku ovisnost. Mehanizam djelovanja ostvaruje se putem glukokortikoidnih receptora i zahtijeva *de novo* transkripciju određenih medijatora.



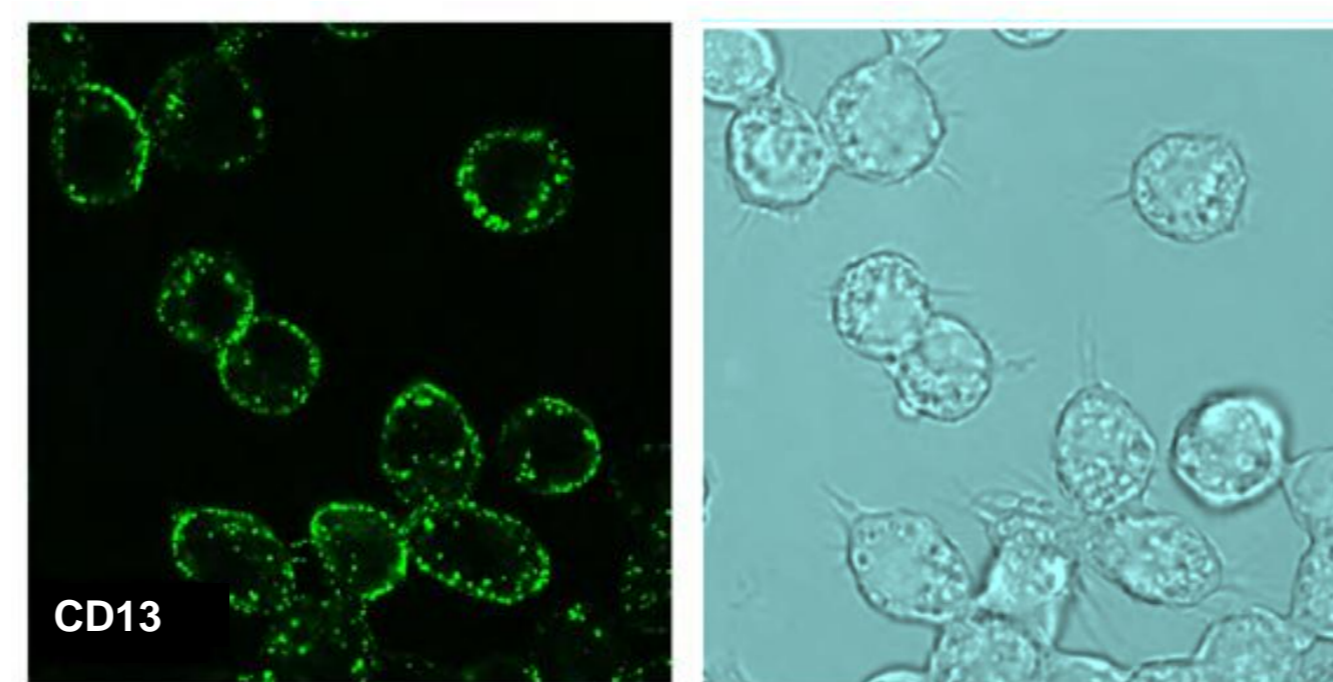
Vremenska i koncentracijska ovisnost smanjene ekspresije NEP/CD10 pod utjecajem deksametazona mjereno na tri razine: membranska ekspresija (A), NEP aktivnost (B), ekspresija mRNA (C). Deksametazon: □ = 5 nM; ■ = 10 nM, ▨ = 50 nM

Učinak antagonista glukokortikoidnih receptora (GR) RU 38486 na ekspresiju NEP/CD10 pod utjecajem deksametazona na razini membranske ekspresije CD10 (A), NEP aktivnosti (B) i CD10 mRNA (C)

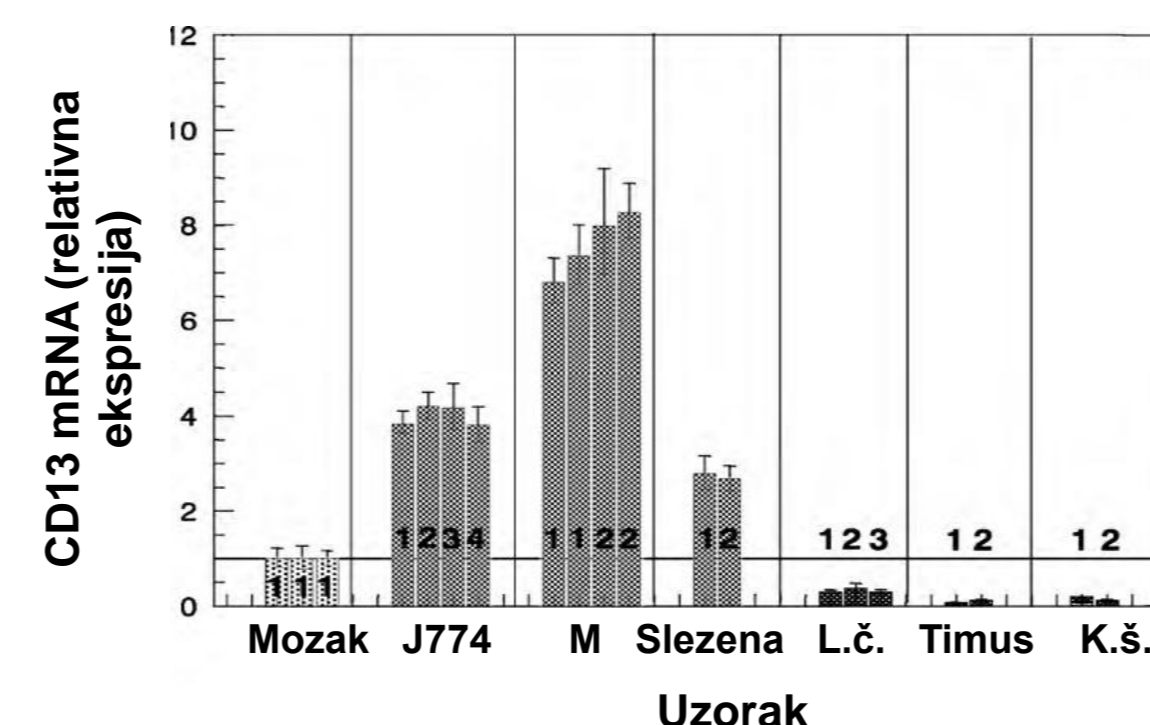


APN/CD13

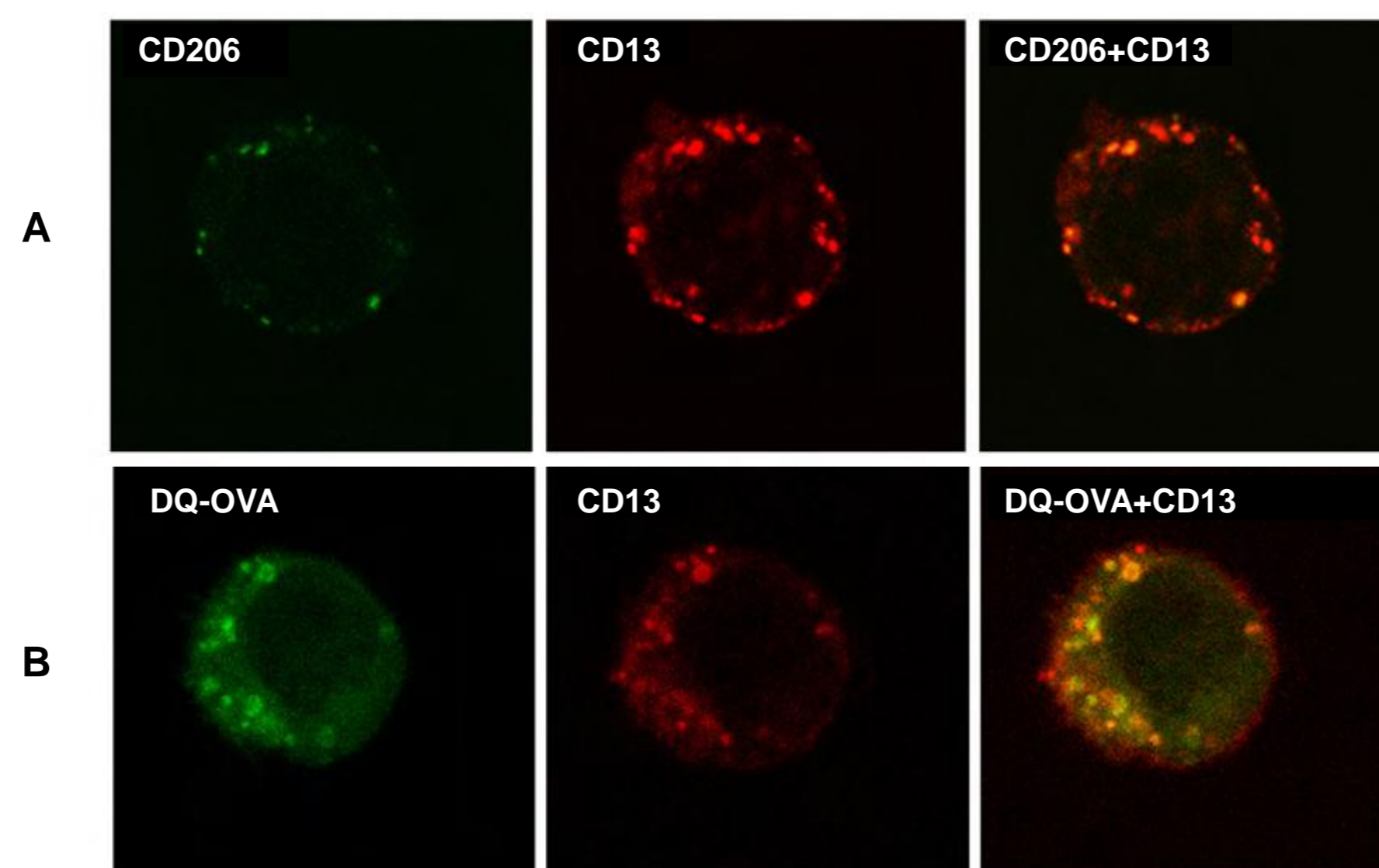
Membranska lokalizacija APN/CD13 pokazana je na makrofagnoj liniji J774. Razina ekspresije APN/CD13 na stanicama imunološkog sustava je različita što je ispitano na nizu mišjih limfatičkih tkiva. Pokazano je sudjelovanje APN/CD13 u fagocitozi posredovanoj manoznim receptorima: na stanicama J774 dobivena je ko-lokalizacija i ko-internalizacija APN/CD13 s manoznim receptorima.



Membranska lokalizacija CD13 na J774 snimljena konfokalnim mikroskopom. Korišteno je kuniće primarno protutijelo na CD13 i sekundarno protutijelo obojeno Alexom- 488.



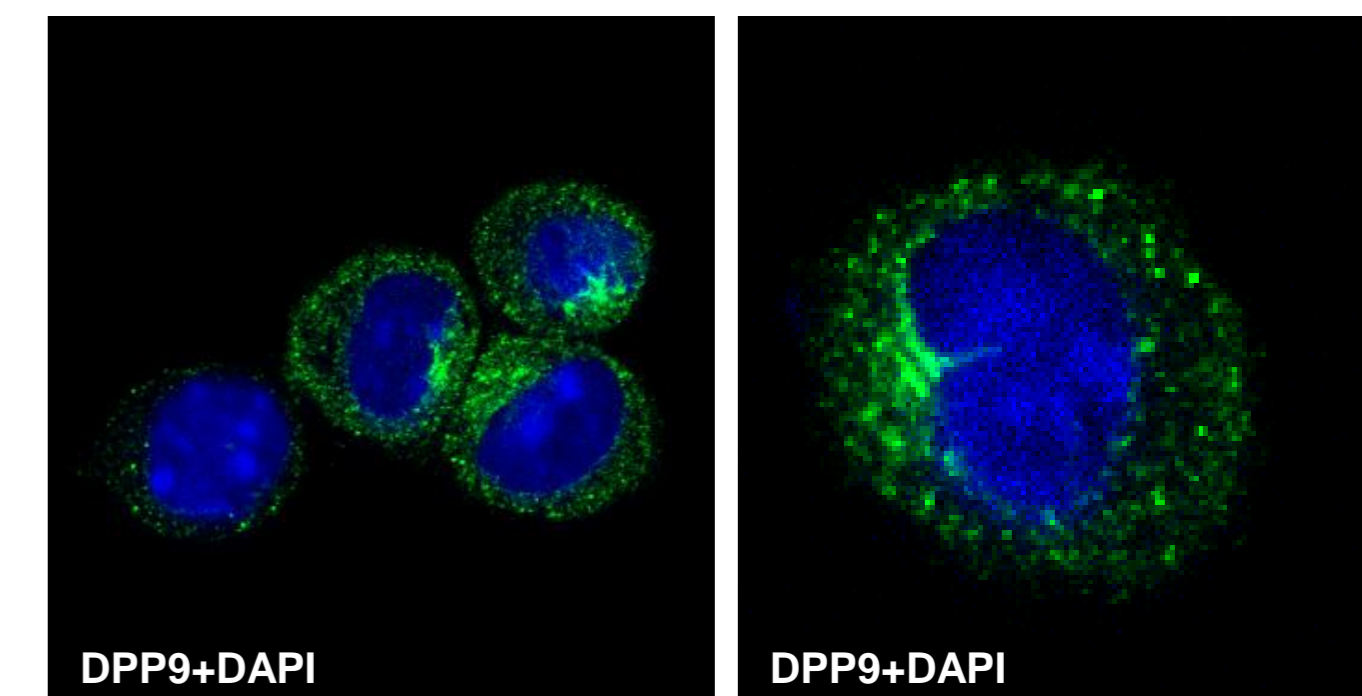
Ekspresija CD13 na stanicama J774 i mišjim limfatičkim tkivima mjerena Q-RT-PCR-om. GAPDH je korišten za normalizaciju uzoraka, a mišji mozak je uzet kao referentni uzorak. M= peritonealni makrofagi, l.č.= limfni čvorovi, k.š.= koštana srž.



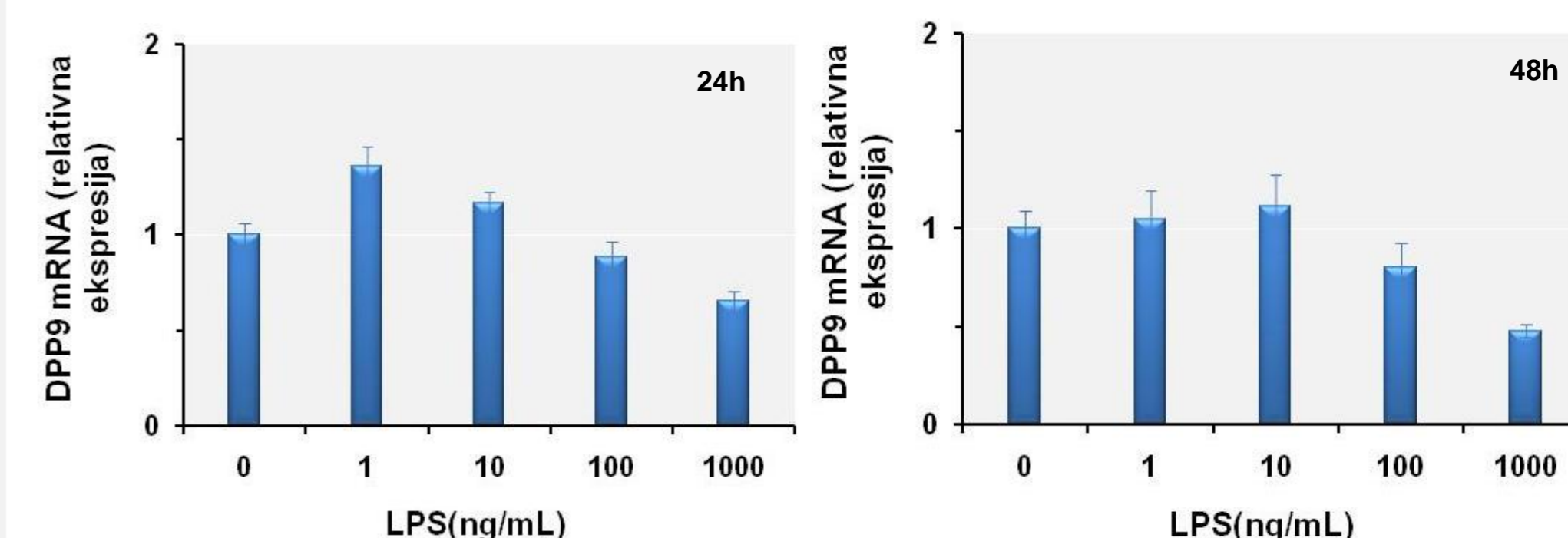
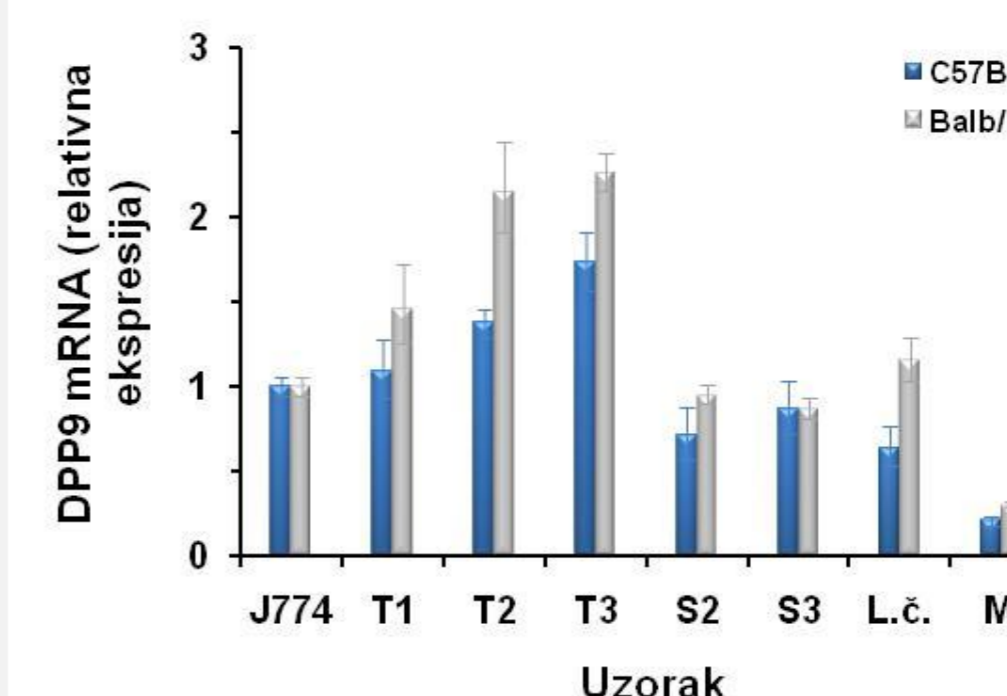
Ko-lokalizacija i ko-internalizacija CD13 i manoznih receptora (CD206) vizualizirana pomoću protutijela na manozne receptora i markera za fagocitozu (DQ-OVA). Za ko-lokalizaciju (A) stanice J774 su istovremeno bojane s CD206-FITC i CD13-Alexa-647, a za ko-internalizaciju (B) su bojane sa DQ-OVA i CD13-Alexa-647.

DPP9

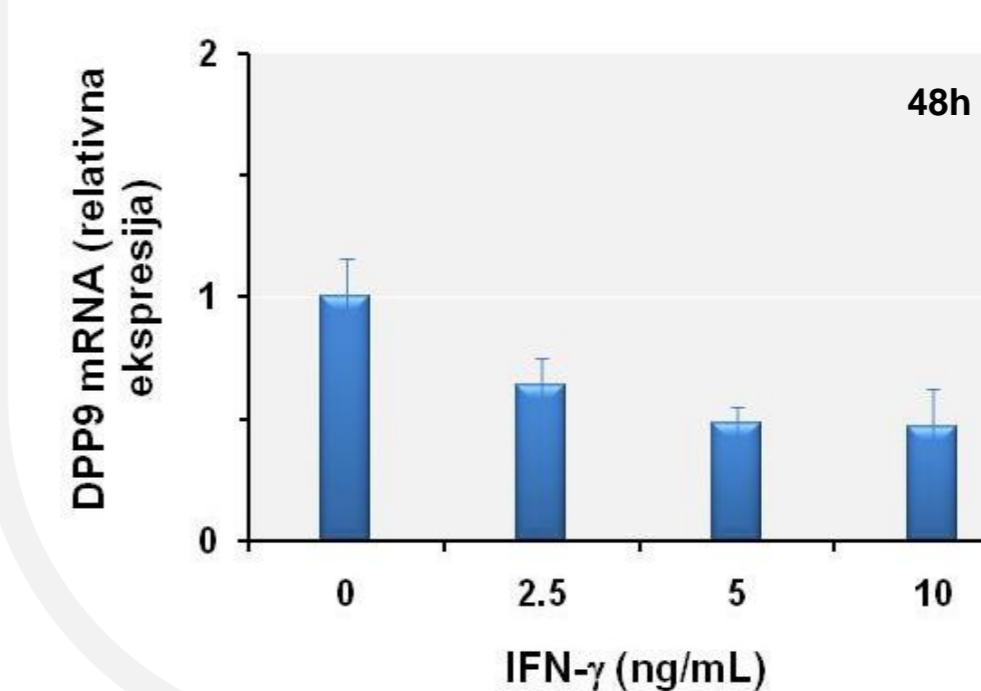
Kao model za proučavanje DPP9 odabrana je makrofagna linija J774 koja ima znatnu količinu DPP9. Imunocitokemijom na DPP9 pokazana je već poznata lokalizacija u citoplazmi, ali i povećana koncentracija DPP9 u području koje odgovara Golgiju. Tretmanom lipopolisaharidom (LPS) i interferonom- γ (IFN- γ) pokazano je da aktivacijom makrofaga dolazi do smanjenja ekspresije DPP9.



Citoplazmatska lokalizacija DPP9 u stanicama J774 snimljena konfokalnim mikroskopom. Korišteno je kuniće primarno protutijelo na DPP9 i sekundarno protutijelo obojeno Alexom- 488; jezgre su obojene s DAPI.



Koncentracijski i vremenski ovisno smanjenje ekspresije DPP9 mRNA na stanicama J774 nakon aktivacije LPS-om.



Koncentracijski ovisno smanjenje ekspresije DPP9 mRNA na stanicama J774 nakon tretmana s IFN- γ .

ZAKLJUČCI

Naši rezultati ukazuju na:

- važnost niskih, fiziološki relevantnih, koncentracija glukokortikoida u sazrijevanju limfocita B
- uključenost APN/CD13 u proces fagocitoze putem manoznih receptora (dodatni mehanizam kojim APN/CD13 utječe na tijek upalnih i imunih procesa)
- moguću ulogu DPP9 u upalnim procesima

ZAHVALA

Prikazani rezultati su napravljeni u sklopu projekata "Regulacija ekspresije ektopeptidaza i opioidnih receptora" i "Uloga membranskih peptidaza na tumorskim i normalnim stanicama" koje je financiralo MZOŠ (šifre projekata 0098094 i 098-0982464-2520), a pod vodstvom mentorice dr. sc. Jelke Gabrilovac.