



PREOBLIKOVANI PROTEIN KOT MOŽNO CEPIVO PROTI RAKU

► Tim Prezelj

Imunske celice napadajo premikajočo rakasto celico. (Vir: <http://restoreimmunehealth.wordpress.com/>)

V sodobnem svetu predstavlja rak (ŽIT 2004/1, str. 42), za katerega še vedno ni povsem učinkovitega načina zdravljenja, vedno večji problem, ker za njim zboleva vse več ljudi. Nove možnosti zdravljenja se kažejo v preoblikovanih proteinih, ki izhajajo iz receptorja TLR4 in bi lahko bili morebitno cepivo proti raku in drugim boleznim.

NAŠEMU TELESU JE V DOLGEM OBDOBJU EVOLUCIJSKEGA RAZVOJA USPELO RAZVITI zapleteno mrežo sistemov za obrambo organizma – od povsem anatomskih ovir do najbolj zapletenih fizioloških funkcij imunskega sistema. Slednjega sestavljata zapletena mreža več kot 100 milijonov imunskih celic ter sestav organov, celic in molekul. Glavna naloga imunskega sistema je, da varuje naše telo pred vdorom tujkov vanj in pred podtalno dejavnostjo znotraj samega telesa. Kljub zapletenemu delovanju je njegova strategija preprosta: sovražnika mora najprej prepoznati, nato sprožiti obrambne celice in ga končno napasti.

Poznamo dve obliki imunskega odziva. Prva je naravni ali nespecifični imunski odziv. Ta se na tujek odzove takoj, ne glede na to, ali je organizem že kdaj prišel v stik z njim ali ne. Pri tem imunskem odzivu sodelujejo predvsem bele krvne celice; teh je več vrst in imajo različne vloge. Mednje sodijo npr. fagociti, ki s fagocitozo požirajo tujke, mikrobe

in druge snovi, bazofilci, ki izločajo posebne vnetne snovi, in eozinofilci, katerih naloga je uničevanje zajedavcev. Druga oblika imunskega odziva pa je specifični ali pridobljeni imunski odziv. Od naravnega se razlikuje predvsem po tem, da je značilen samo za vretenčarje, pri katerih se je razvil zaradi večje kompleksnosti, medtem ko je prvi značilen za vse organizme. Zelo pomembne celice imunskega sistema so limfociti. Njihov odziv se pojavi z zakasnitvijo, ker limfociti po začetni fazi prepoznavanja tujkov vstopijo v fazo intenzivnega podvojevanja (na začetku je limfocitov, ki so značilni oz. specifični za določen antigen, zelo malo, nato pa se v približno enem tednu zelo namnožijo). Limfociti s pomočjo specifičnih (značilnih) receptorjev v membrani prepoznavajo antigene (telesu tuje snovi).

Pridobljena in nespecifična imunost sta med seboj povezana odziva. Sodelovanje obeh sistemov je ključno, saj celice nespecifične imunosti ne samo, da uničujejo patogene, am-

Slovarček pojmov

Antigen – Telesu tuja snov, ki lahko sproži imunski odziv in s tem tvorbo protiteles. Običajno se nahajajo na površini mikroorganizmov in so za vsak mikroorganizem specifični.

Adjuvansi – Farmakološki ali imunski agenti, ki spremenijo učinek nekega cepiva ali zdravila, medtem ko imajo sami po sebi majhen ali celo nikakršen učinek. Pogosto so sestavni del cepiv, ker povečajo prejemnikov imunski odziv na značilni (specifični) antigen.

Ligand – V biokemiji s tem izrazom označujemo navadno manjšo molekulo, ki tvori kompleks z navadno večjo molekulo (npr. protitelo na antigen).

DNK (angl. DNA) ali dezoksiribonukleinska kislina – V njej je zapisana naša dedna informacija.

Proteini – Organske molekule, ki jih sestavljajo v verigo povezane aminokislinske. Aminokislinsko zaporedje enega proteina praviloma kodira en gen.

Endosom – V biologiji z membrano obdan prostor znotraj evkariontske celice (mehurček, obdan z membrano).

Plazemska membrana oz. plazmalema – Opna (membrana), ki obdaja celico.

Patogen je klica (mikroorganizem), ki lahko pri gostitelju povzroči bolezni.

Receptor – Mesto na neki spojini ali površini (npr. celici), na katero se vežejo različne snovi (ligandi).

pak jih tudi predstavljajo celicam pridobljenega imunskega odziva.

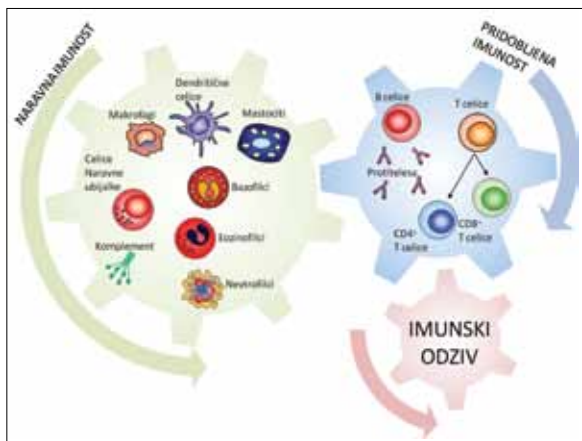
Prepoznavna molekul, značilnih za mikroorganizme, s strani celic naravne imunosti poteka prek Tollu podobnih receptorjev (TLR, angl. Toll-like receptors). Sprožitve teh receptorjev sproži celice naravne imunosti in jim omogoči, da antige-

ne učinkovito predstavijo celicam pridobljenega imunskega odziva. Prepoznavna antigenov in s tem sproženje receptorjev TLR pripomore k sposobnosti celic naravnega imunskega sistema, da lažje in učinkoviteje predstavijo antigene celicam pridobljene imunosti, zato so receptorji TLR ključni na začetni stopnji imunskega odziva. Pozneje postanejo pomembne tudi celice pridobljene imunosti (limfociti), ki s pomočjo T-celičnih receptorjev oz. protiteles prepoznajo specifične antigene in sprožijo ustrezen imunski odziv.

Zdaj, ko poznamo osnovne principe delovanja imunskega sistema, si lahko nekoliko podrobneje ogledamo receptorje TLR in kako jih je mogoče preoblikovati, da 'postanejo' možno cepivo proti raznovrstnim rakavim in tudi drugim obolenjem.

Že prej omenjeni Tollu podobni receptorji so dobili takšno ime po

🔗 Shematski prikaz 'zgradbe' in delovanja imunskega sistema (Avtor: Tim Prezelj)



receptorju Toll, ki so mu sorodni. Receptor Toll je leta 1985 odkrila Christiane Nüsslein-Volhard pri vinski mušici vrste *Drosophila melanogaster*, kjer je prisoten pri razvoju zarodka in pri imunskem odzivu mušice na patogene bakterije in glive.

Pri človeku so doslej odkrili 10 Tollu podobnih receptorjev, ki se med seboj razlikujejo po tem, kje v celici se nahajajo, in tudi po tem, da ima vsak receptor TLR svoj specifični (značilen i) ligand, ki ga sproži. Običajno so ligandi specifične (značilne) molekule različnih patogenih organizmov.

Receptor TLR je na splošno sestavljen iz zunajceličnega dela, ki je povezan z medmembranskim delom, ta pa je usidran v plazemsko membrano ali membrano endosomov (mehurčkov, obdanih z membrano) ter je vezni člen med zunaj- in notrajceličnim delom.

Kot lahko vidimo, je naš imunski sistem zelo pomemben pri obrambi našega telesa pred različnimi patogenimi organizmi. Varuje pa nas tudi pred podtalno dejavnostjo znotraj našega telesa, posledica katere je lahko razvoj raka.

Rak sodi v skupino bolezni, za katere je značilna nenadzorovana celična delitev in sposobnost teh ce-

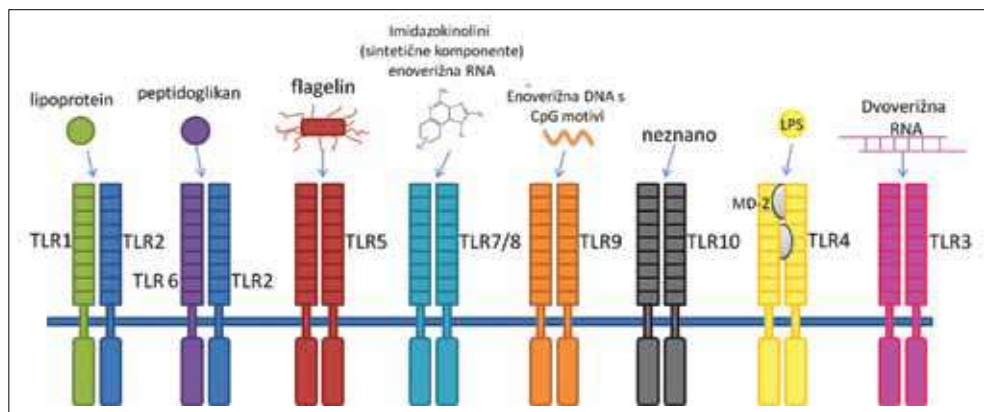
lic, da napadajo druga tkiva. Napad lahko poteka kot 'invazija' (neposredno vrašcanje v sosednje tkivo) ali pa kot migracija (premik) rakastih celic (metastaze) na oddaljena mesta. Nenadzorovana delitev celic je posledica poškodbe DNK oz. mutacij nekaterih življenjsko pomembnih genov, ki med drugim nadzorujejo delitev celice. Take mutacije privedejo do nenadzorovane delitve celic in tvorbe tumorja, ki za imunski sistem pomeni še posebno velik 'zalogaj', saj so tumorske celice v številnih značilnostih kljub nenormalnim težnjam k razmnoževanju, razširjanju po vsem telesu in spreminjanju normalnih funkcij organov podobne normalnim celicam. Značilnost nekaterih tumorskih celic, po katerih se razlikujejo od običajnih, je ta, da izražajo antigene, ki omogočajo imunološko razločevanje rakavih (malignih) in normalnih celic.

Z raziskovalnim delom smo želeli receptor TLR4 (eden od desetih receptorjev TLR, ki so jih doslej odkrili pri človeku) preoblikovati tako, da bi lahko služil kot možno cepivo proti melanomu. Ta najnevarnejša oblika kožnega raka je v zadnjem času v velikem porastu zaradi povečanega UV-sevanja. Kot smo že

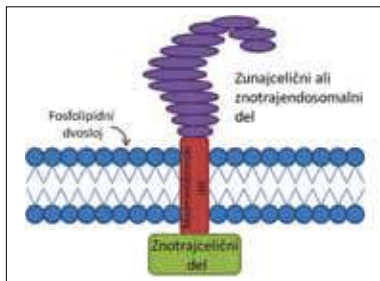


Dr. Christiane Nüsslein-Volhard je leta 1985 pri vinski mušici vrste *Drosophila melanogaster* odkrila receptor Toll. Za svoje delo na področju genetike nadzora razvoja zarodka je leta 1995 prejela tudi Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino. (Vir: Wikipedia)

Shematski prikaz receptorjev TLR pri človeku in njihovih ligandov (Avtor: Tim Prezelj)

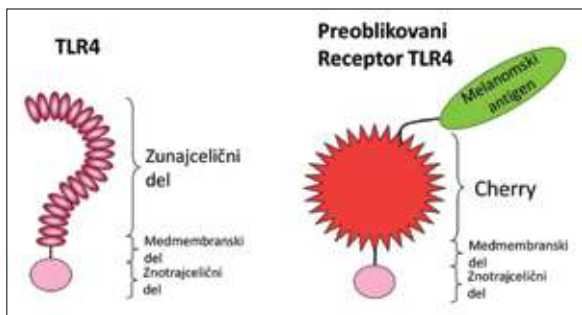


⇒ Shematski prikaz zgradbe receptorja TLR (Avtor: Tim Prezelj)



spoznali, je za sprožitev imunskega sistema nujna aktivacija receptorjev TLR, ki se aktivirajo z vezavo liganda na zunajcelični del receptorja. Dr. Gabriela Panter in prof. dr. Roman Jerala s Kemijskega inštituta Slovenije sta ugotovila, da z odstranitvijo zunajcelične domene receptorja TLR4 le-ta postane aktiven brez vezave liganda, kar označujemo kot konstitutivno aktivnost receptorja. S tem je imunski sistem sprožen tudi ob odsotnosti telesu tujih in nevarnih snovi oz. organizmov. Tako je bila naša zamisel, da bi namesto zunajceličnega dela receptorja TLR4 na njegovo mesto pripeli tumorski (melanomski) antigen, pri čemer smo sklepali, da se konstitutivna aktivnost receptorja ne bo spremenila. S tem bi sprožili imunski sistem in mu hkrati dostavili tudi tumorski (melanomski) antigen, še preden bi bil melanom prisoten v telesu. To pomeni, da bi naš imunski sistem že vnaprej vedel, katere so tiste sno-

⇒ Shematski prikaz receptorja TLR4 (levo) in preoblikovanega receptorja TLR4 (desno); *cherry* je fluorescirajoči protein, ki smo ga pripeli na preoblikovani protein zaradi lažjega spremljanja izražanja le-tega. (Avtor: Tim Prezelj)



vi, ki pomenijo nevarnost, in bi se lahko odzval takoj, ko bi zaznal prisotnost oz. spremembe v izražanju tumorskega antigena, proti kateremu želimo sprožiti imunski odziv.

Konstruiranje našega preoblikovanega receptorja (proteina) smo začeli tako, da smo s pomočjo metod molekularne biologije najprej pripravili DNK z zapisom za naš preoblikovani protein, ga vstavili v človeške embrionalne ledvične celice ter nato spremljali njegovo aktivacijo in izražanje. Ugotovili smo, da naš preoblikovani receptor ni konstitutivno aktiven, zato smo preverili še njegovo izražanje v celicah. Ugotovili smo, da se izraža. Možnosti za neaktivnost preoblikovanega receptorja je več in jih v tem prispevku ne bom navajal posebej in podrobneje.

Glede na dejstvo, da naš preoblikovani receptor ni bil konstitutivno aktiven, vendar se v celicah izraža, bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno pripraviti preoblikovane proteine, ki bi imeli melanomski antigen zamenjan s kakšnim drugim antigenom.

Naš preoblikovani receptor bi v primeru aktivacije deloval kot gensko cepivo, kar pomeni, da bi v celice vnašali DNK z zapisom za želeni protein. Prednost genskih cepiv pred proteinskimi je predvsem ta, da omogočajo ciljno zdravljenje, vnesena DNK pa se ne razširi po vsem telesu. To pomeni, da je manjša možnost za sprožitev pretiranega imunskega odziva in s tem hudega vnetja, kot se to dogaja pri proteinskih cepivih, kjer se adjuvans razširi po vsem telesu in zato lahko aktivira celice imunskega sistema celega telesa, kar vodi do sprožitve pretiranega imunskega odziva. Naslednja prednost naše metode pa je v tem, da lahko ob zamenjavi me-

lanomskega antigena s katerim koli značilnim (specifičnim) proteinom za poljubno rakavo obolenje pridobimo cepivo proti tej obliki raka.

Zunajcelični del receptorja TLR4 bi lahko zamenjali tudi z antigeni poljubnega patogenega organizma (bakterija, virus, gliva) in s tem dobili gensko cepivo proti temu patogenemu organizmu. S tem bi lahko zmanjšali pogostost nekaterih bakterijskih, virusnih in glivičnih obolenj, ki so danes velik problem.

Prednost genskih cepiv je še v tem, da so mnogo bolj stabilna od proteinskih, njihova izdelava pa je cenejša in preprostejša (čiščenje DNK je lažje od čiščenja proteinov). Genska cepiva so lahko celo tako stabilna, da jih ni več treba shranjevati v hladilnih posodah, kar močno poveča možnosti zdravljenja v državah tretjega sveta, kjer bi bila prav zato tudi dostopnejša. Čeprav v 'tretjem svetu' ljudje pogosteje umirajo za nalezljivimi boleznimi (malarija, kolera, sifilis ...) kot za rakom, je zaradi možnosti razširitve uporabe konstitutivno aktivne oblike receptorja TLR v povezavi z antigenom tudi na patogene mikrobe to možna rešitev za preprečevanje zdravstvenih težav v revnejših krajih.

VIRI IN LITERATURA

- ▶ S. Akira, K. Takeda: Toll-like receptor signaling; *Nature Reviews (Immunology)*, 4: 499–511; 2004.
- ▶ A. Iwasaki, R. Medzhitov: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses; *Nature Immunology*, 5: 987–995; 2004.
- ▶ D. Chaplin: Overview of the human immune response; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 2: 430–435; 2006.
- ▶ M. Vozelj: *Imunologija – enciklopedijski priročnik*, 1. izd.; Ljubljana: DZS, 1996.

O avtorju

Tim Prezelj je dijak 4. letnika Škofijske klasične gimnazije Ljubljana, kot raziskovalec pa deluje tudi na Kemijskem inštitutu Slovenije. V 2. letniku gimnazije je na oddelku za biotehnologijo pod mentorstvom mlade raziskovalke Alje Oblak pripravil raziskovalno nalogo, s katero je nato zmagal na Srečanju mladih raziskovalcev Slovenije (v organizaciji ZOTKS). Tudi na lanskem septembrskem evropskem srečanju mladih znanstvenikov in inovatorjev (EUCYS) v Bratislavi na Slovaškem je bilo njegovo raziskovalno delo dobro sprejeto. Na začetku maja odhaja na enotedensko prakso v Evropski laboratorij za molekularno biologijo (EMBL) v Heidelbergu v Nemčiji.

- ▶ B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, J. A. Hoffman: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults; *Cell*, 86: 973–983; 1996.
- ▶ T. Kawai, S. Akira: TLR signaling; *Cell Death and Differentiation*; 13: 816–825; 2006.
- ▶ S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi: Pathogen recognition and innate immunity; *Cell*, 124, 4: 783–801; 2006.
- ▶ D. Hanahan, R. A. Weinberg: The hallmarks of cancer; *Cell*, 7, 100 (1): 57–70; 2000.
- ▶ G. Panter, R. Jerala Jr. : The Ectodomain of the Toll-like Receptor 4 Prevents Constitutive Receptor Activation; *The Journal of Biological Chemistry*, 26 (286): 23334–23344; 2011.

SPLETNI NASLOVI

- ▶ http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/brosura_melanom.pdf
splošne informacije o melanomu
- ▶ http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Tollu_podobni_receptorji
Tollu podobni receptorji
- ▶ <http://chrtowsky.wordpress.com/cepiva/>
cepiva in cepljenje
- ▶ <http://www.xvivo.net/>
animacije molekularnih procesov