

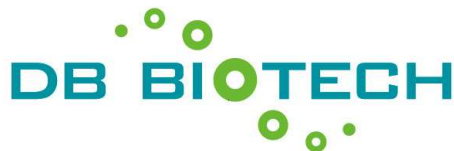
STIMULY PRE VÝSKUM A VÝVOJ

Názov projektu: Fosforylácie CD5, CD10 a CD23 pri chronickej lymfocytickej leukémii

Druh projektu: Základný výskum

Číslo projektu: 3612/2010-11

Logo riešiteľa:



Riešiteľ: DB Biotech, spol. s r.o.
Popradská 80, 040 01 Košice
e-mail: dbbiotech@dbbiotech.com

Spoluriešiteľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Šrobárová 2, 041 80 Košice

Doba riešenia: 09/2010 – 08/2013

**Vytvorenie/udržanie pracovných miest
vo výskume a vývoji:**

3 nové pracovné miesta

Štruktúra novovytvorených pracovných miest:

- 2 vedeckí pracovníci

- 1 laborant

2 udržané pracovné miesta

Štruktúra udržaných pracovných miest:

- 2 laboranti

Etapy riešenia projektu:

1. **Etapa:** Identifikácia fosforylácií markerov CD5, CD10, CD23
2. **Etapa:** Štúdium fosforylácií a korešpondujúcich kináz in vitro
3. **Etapa:** Dizajn špecifických protilátok pre prietokovú cytometriu

Zodpovedný riešiteľ: Prof. Dr. Ing. Tomáš Dobránsky, Ph. D.

Popis predmetu riešenia a súčasného stavu:

Chronická lymfocytická leukémia (CLL) je najrozšírenejšou formou leukémie u dospelých ľudí. Základnými proteínovými markermi ktorých expresia je výrazne modifikovaná pri CLL patológii sú transmembránové proteíny CD5, CD10 a CD23. Úroveň ich expresie pri malígnom procese je používaná pre priamu klinickú diagnostiku leukemických malignancií. Z transformovaných bunkových fenotypov, sú tieto proteíny najviac exprimované B lymfocytmi, pričom T lymfocyty a NK bunky často vykazujú pozitivitu expresie uvedených proteínov. Identifikácia špecifických post-translačných modifikácií CD5, CD10 a CD23 a ich dôkladné štúdium pre prípadne využitie pre presnú a včasnú diagnostiku CLL by posunulo diagnostiku tohto malígneho ochorenia na novú kvalitatívnu úroveň.

Fosforylácia proteínov je veľmi dôležitým regulačným mechanizmom ich fyziologickej aktivity. Pri malígnych procesoch zohráva fosforylácia kľúčovú úlohu regulácie transkripcie génov, a týmto ovplyvňuje signálne dráhy mnohých životne dôležitých proteínových regulačných systémov. Modifikácia serínových a treonínových zbytkov CD5, CD10 aj CD23 fosforyláciou izoformami proteín kinázy C (PKC) a proteín kinázou CKII aktivuje fyziologické funkcie týchto transmembránových proteínov a je regulovaná v súvislosti s rozvojom patológie. Literatúra uvádza fosforyláciu niektorých aminokyselinových zbytkov len PKC izoformami, ale aj hierarchickú fosforyláciu jedného aminokyselinového zbytku viacerými kinázami, vrátane PKC aj CKII. V úvode štúdie by išlo o stimuláciu malígneho procesu v bunkových systémoch exprimujúcich rekombinantné proteíny CD5, CD10, a CD23, pomocou inhibítorov a aktivátorov PKC, CKII, prípadne ďalších identifikovaných kináz. Neskôr by sa získane výsledky aplikovali do štúdií sér pacientov s CLL.

Identifikácia a charakterizácia proteómu choroby, teda všetkých proteínov a ich foriem ktoré sú exprimované v bunkách, orgánoch, celých biologických systémoch, a priamo alebo nepriamo súvisia s patologickým procesom pri jeho vzniku a na rôznej úrovni jeho rozvoja, je veľmi zložitým procesom. Jeden jediný proteín môže mať až do 1000 rôznych foriem, často tranzientne post-translačne modifikovaných len na veľmi krátky čas, pričom daná modifikácia je kľúčová pre život alebo deštrukciu bunky. Post-translačné modifikácie proteínov regulujú ich subcelulárnu distribúciu, interakcie s ďalšími proteínmi buniek, ich fyziologickú aktivitu, degradáciu, a podobne. Jednou z najdynamickejších, regulačných modifikácií proteínov je fosforylácia serínových a treonínových zbytkov serín/treonín kinázami, alebo tyrozinových zbytkov rozmanitou skupinou špecifických tyrozinových kináz. Kinázy ktoré fosforylujú serínové a treonínové zbytky rozpoznávajú príslušné rezidua na základe presne definovaných sekvencií aminokyselín v okolí novej fosforylácie. Samozrejme, prístupnosť potenciálneho fosforylačného miesta je podmienená tiež lokálnou sekundárnou štruktúrou, štruktúrnymi parametrami celého proteínu, ale aj interakčnými doménami, ktoré indukujú interakcie s okolitými proteínmi.

Základnými proteínovými markermi CLL sú transmembránové proteíny CD5, CD10 a CD23. Diskrepancie v expresii a sub-celulárnej distribúcii týchto proteínov hlavne v populácii B a T lymfocytov sú predmetom štúdií vzniku, skorej diagnostiky aj predmetu liečenia CLL.

CD5 je transmembránový proteín typ I, s 372. aminokyselinovými zbytkami extracelulárnej časti, transmembránovou doménou o 30. aminokyselinách, a 93.

aminokyselinovými zbytkami C-terminálnej domény v cytoplazme. Fosforylácia CD5 dvoch treonínov (T410 a T412) v intracelulárnej časti proteínu proteín kinázou C (PKC) zohrávajú kľúčovú úlohu pri regulácii jeho internalizácie (Vila JM et al, *J Immunol*, 2001, 396-402). Regulačná fosforylácia tyrozínových a serínových zbytkov bola diskutovaná v spojitosti s malignaným fenotypom B buniek pri CLL (Gary-Gouy H et al, *J Immunol*, 2006, 4335-4344). Presná identifikácia fosforylovaných aminokyselín zistená nebola. V tomto transmembránovom proteíne sú z hľadiska fosforylácie zaujímavé okrem spomínaných treonínov - T410 a T 412 (T434 a T436 v celkovej sekvencii prekursora proteínu), aj dva serínové zbytky v intracelulárnej časti CD5, a to S460 a S496, ktoré na základe konsekálnej sekvencie v ktorej sa nachádzajú (X-R-X-S-X, pre S460 je to P-R-N-S-R, a pre S496 je to H-R-S-S-M) môžu byť jasným substrátom pre PKC izoformy. Ich špecifická fosforylácia pri CLL je jedným zo zámerov tohto projektu.

CD10, Neprilysin alebo CALLA (Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen) je neutrálna endopeptidáza, membránový proteín typu II s krátkou N-terminálnou doménou (27 aminokyselinových zbytkov), krátkou transmembránovou doménou, a štrukturálne veľmi zložitou entracelulárnou - 699 aminokyselinovou časťou. Serínové reziduum-S5 a threonín-T24, nachádzajúce sa v konsekálnej sekvencii X-S/T-X-X-D/E, boli identifikované ako substráty proteín kinázy CKII pri štúdiách in vitro fosforylácie CD10 (Ganju RK et al, *Blood*, 1996, 4159-4165). Ich význam pri CLL a úroveň ich fosforylácie pri CLL známe nie sú. V extracelulárnej doméne je niekoľko serínových a treonínových zbytkov, ktoré by mohli byť fosforylované PKC aj CKII. Táto alternatíva bude analyzovaná pri štúdiu CD10 fosforylácie v lymfocytoch pacientov s CLL.

Transmembránový proteín typu II, CD23 je reprezentovaný dvoma izoformami, ktoré sa líšia len prvými 7. aminokyselinami N konca molekuly. Pri izoforme I je to: MEEGQYS, pri izoforme II je to: MNPPSQE. Keďže pri oboch izoformách pokračuje sekvencia reziduami EIEELP..., je zrejme že pri konsekálnej sekvencii pre proteín kinázu CK II, X-S/T-X-X-D/E, je potenciálnym substrátom serín S7 len prvej izoformy. Charakterizácia fosforylácie tohto miesta pri CLL a jej využitie pri špecifickej detekcii danej izoformy protilátkou by prinieslo určite progres pri výskume tejto formy leukémie. V extracelulárnej časti molekuly sú na základe štrukturálnej analýzy a analýzy lokálnych sekvencií v okolí serínových a treonínových zbytkov zaujímave reziduá S52, T181, a S265, ako potenciálne substráty pre PKC. Fosforylácia CD23 je jedným z navrhovaných faktorov riadenej produkcie a internalizácie trunkovaných foriem proteínu do cytoplazmy (Rosenwasser LJ a Meng J, *Clin Rev Allergy and Immunol*, 2005, 61-72). Regulácia CD23 pomocou fosforylácie je jedným z možných regulačných mechanizmov aktivácie transkripčného faktoru NF-kappa B (Ten RM et al, *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 376-387), čo môže byť rozhodujúcou fyziologickou úlohou CD23 proteínu v procese regulácie proliferácie lymfocytov pri CLL.

Identifikácia fosforylačných miest v lymfocytoch pacientov s CLL a ich charakterizácia pomocou špecifických protilátok otvorí nové možnosti pri základnom aj klinickom výskume chronických leukémií.

Hlavný cieľ projektu:

Identifikácia a charakterizácia špecifických fosforylačných miest proteínových markerov lymfocytov - CD5, CD10 a CD23 - vo vzťahu k Chronickej Lymfocytickej Leukémii (LCC). Pri vzniku a progresii LCC dochádza k modifikácii postranných

reťazcov uvedených proteínových markerov, pričom sa otvárajú aj nové fosforylačné miesta pre kinázy, ktoré v konečnom dôsledku cestou fosforylácií regulujú základné signálne dráhy v lymfocytoch vo vzťahu k patologickým procesom. Identifikácia a kvantifikácia týchto fosforylácií ktorá veľmi úzko súvisí s patológiou CLL pomocou proteínovej hmotnostnej spektrometrie a identifikácia korešpondujúcich fosfo-kináz, otvorí nové možnosti pre štúdium CLL pomocou špecifickejších protilátok pre skorú diagnostiku tohto ochorenia. Zároveň pomôže objasniť základne patologické signálne dráhy a význam regulačných fosforylácií pri ich utváraní.

Popis čiastkových cieľov projektu:

1. Identifikácia špecifických fosforylácií proteínových markerov lymfocytov-CD5,CD10 a CD23 pri CLL

V prvej etape sa bude v proteínových extraktoch z lymfocytov pacientov s CLL zisťovať úroveň fosforylácie CD5, CD10 a CD23 pomocou proteínovej hmotnostnej spektrometrie. Pre identifikáciu uvedených proteínov sa budú využívať techniky MALDI TOF, MALDI TOF/TOF a Ion trap MS. Pre sekvenovanie vyselektovaných peptidov a určenie presného fosforylačného miesta sa budú používať metódy MALDI MS/MS a Ion Trap tandem MS. Týmto sa vyselektujú vhodné miesta pre ďalšie štúdie fosforylácií a kináz v bunkových modeloch lymfocytárných línií.

2. Štúdium fosforylácií CD5, CD10 a CD23 in vitro a in vivo

Fosforylácie uvedených proteínov budú overené na rekombinantných proteínoch pripravených pomocou baktérii in vitro. V bunkových kultúrach budú paralelne študované korešpondujúce kinázy (PKC a CK II) pomocou špecifických aktivátorov (pre PKC - forbolove estery; pre CK II - spermín) a inhibítorov (pre PKC izoformy sú to deriváty staurosporínu alebo inhibítor H7; pre CK II je to TMCB). Výsledky týchto štúdií napomôžu pochopeniu regulácie fosforylácií CD5, CD10 a CD23 a ich významu pri riadení signálnych dráh lymfocytov v spojitosti hlavne s možnou aktiváciou transkripčných faktorov regulujúcich transkripciu faktorov stimulujúcich proliferáciu buniek.

3. Dizajn fosfo-špecifických protilátok pre základný výskum chronických leukémií a ich potenciálne uplatnenie pri identifikácii hemangioblastómov centrálného nervového systému (CNS)

Etítópálna charakterizácia okolia fosforylovaného zbytku bude prevedená pre všetky dôležité fosforylácie CD5, CD10 a CD23 identifikované pri CLL, a taktiež pre špecifickú fosforyláciu CD10 pri hemangioblastóme CNS. Dizajn špecifických králičích klonálnych protilátok voči presne zadefinovaných a ocharakterizovaným fosforylačným miestam, umožní zachytenie tejto post-translačnej modifikácie v súvislosti s možným vznikom a progresom leukémií. Vývoj takýchto protilátok pre oblasť prietokovej cytometrie je nevyhnutná pre zvýšenie kvality a progresu výskumu a diagnostiky CLL. Pre každý proteín budú pripravené 2-3 špecifické klonálne protilátky a ich použitie pre detekciu fosforylácie v spojitosti s CLL bude testované na sade odpovedajúcich vzoriek.

Výsledky navrhovaného projektu základného výskumu budú publikované vo vedeckých karentovaných časopisoch a prezentované na vedeckých fórach typu vedeckej konferencie, seminára alebo vedeckých pracovných stretnutiach.

Plánovaná výška oprávnených nákladov na projekt: 1.998.860,- €

Vlastné prostriedky: 0,- €

Požadovaná dotácia: 1.998.860,- € (100 %)

Podiel vlastných prostriedkov: 0 %

Plánovaný sumárny rozpočet projektu v €:

	Rok 2010	Rok 2011	Rok 2012	Rok 2013	Celkom
Bežné náklady	111.143,-	225.540,-	228.657,-	163.461,-	728.801,-
Kapitálové výdavky	1.270.059,-	0,-	0,-	0,-	1.270.059,-
Celkové náklady	1.381.202,-	225.540,-	228.657,-	163.461,-	1.998.860,-
Vlastné prostriedky	0,-	0,-	0,-	0,-	0,-
Požadovaná dotácia	1.381.202,-	225.540,-	228.657,-	163.461,-	1.998.860,-

Skutočné čerpanie v €:

	Rok 2010	Rok 2011	Rok 2012	Rok 2013	Celkom
Bežné náklady	111.082,10	223.349,02	217.142,43	0,-	551.573,55
Kapitálové výdavky	1.269.983,33	0,-	0,-	0,-	1.269.983,33
Celkové náklady	1.381.065,43	223.349,02	217.142,43	0,-	1.821.556,88
Vlastné prostriedky	0,-	0,-	0,-	0,-	0,-
Požadovaná dotácia	1.381.065,43	223.349,02	217.142,43	0,-	1.821.556,88

Rozdelenie financií medzi hlavného riešiteľa a spoluriešiteľa v €:

	Rok 2010	Rok 2011	Rok 2012	Rok 2013	Celkom
Riešiteľ	1.374.802,-	213.540,-	218.457,-	159.461,-	1.966.260,-
Spoluriešiteľ	6.400,-	12.000,-	10.200,-	4.000,-	32.600,-
Spolu	1.381.202,-	225.540,-	228.657,-	163.461,-	1.998.860,-

Etapy riešenia projektu s termín začatia a ukončenia

Etapa riešenia projektu	Začiatok	Koniec
1. Identifikácia fosforylácií markerov CD5, CD10, CD23	09/2010	08/2011
2. Štúdium fosforylácií a korešpondujúcich mináž in vitro	09/2011	01/2013
3. Dizajn špecifických protilátok pre prietokovú cytometriu	09/2012	08/2013

Plánované výstupy riešenia

Plánované výstupy riešenia	Rok 2010	Rok 2011	Rok 2012	Rok 2013	Rok 2014
Publikácie	0	0	2	3	1
Pracovné miesta	3	0	0	0	0
Patenty	0	0	0	1	0
Prezentácie	0	1	2	2	1
Partnerstvo s akademický sektorom	1	0	0	0	0

Výsledky práce budú publikované vo vedeckých periodických s impakt faktorom 5-10. Keďže ide o originálny projekt, ktorého štúdie nadväzujú na predchádzajúcu prácu regulácie signálnych dráh lymfocytov pri chronických leukémiách, popis nových regulačných fosforylácií a ich možné využitie pri rýchlej a presnej diagnostike ochorenia posunie oblasť popisu leukemického proteómu na novú kvalitatívnu úroveň.

Dôležitou súčasťou je prezentácia čiastkových výsledkov na medzinárodných vedeckých fórach - seminároch, konferenciách a sympóziách.

Projekt otvára možnosť aktívnej spolupráce laboratória Lekárskej Fakulty UPJŠ v Košiciach so súkromnou firmou, kde sa zakladá systém aktívneho prenosu informácií základného výskumu do prípadnej klinickej praxe.

Predpokladané využitie výsledkov

Výskum leukémií, fosfo-špecifické protilátky sa budú môcť aplikovať aj pri výskume signálnych dráh iných bunkových populácií, prípadne pri štúdií korešpondujúcich kináz. Zdokonaľovanie aplikačných metód proteínovej hmotnostnej spektrometrie otvára nové možnosti pri identifikácii špecifického proteómu chorôb.

Hlavné realizované výstupy za rok 2010

V sledovanom období (rok 2010) sa rozšírilo pracovisko výskumu a vývoja o pracovisko pre projekt základného výskumu. V tejto súvislosti došlo k vytvoreniu nových pracovných miest v plánovanej štruktúre a zároveň aj k ich obsadeniu na požadovanej profesijnej a vzdelanostnej úrovne. Došlo tiež k vytvoreniu partnerstva so spoluriešiteľom. V súčasnej dobe prebieha proces verejného obstarávania na dodávku strojov a prístrojov, materiálu a potrebných služieb.

Formuje sa laboratórium proteínovej hmotnostnej spektrometrie, kde bol v plnej miere aplikovaný „know-how“ hmotnostnej spektrometrie pre identifikáciu proteínov, identifikáciu ich post-translačných zmien a sekvenovanie proteínov/peptidov pomocou jej metodík zo zahraničia, z pracoviska s obrovskou skúsenosťou a kompletnou metodológiou v tejto oblasti. Zodpovedný vedecký pracovník pracoviska sa zúčastní v druhej polovici novembra celosvetovej konferencie Neurovied v San Diegu, USA, kde je niekoľko stovák prezentácií o aplikácii proteínovej hmotnostnej spektrometrie pri identifikácii proteínov, objavovaní a popise ich signálnych dráh a nových proteínových markerov vo vzťahu k patológiám.

Zriadené pracovisko prietokovej cytometrie, vybavené špičkovým zariadením, napomôže rozvoju tejto citlivej a presnej metodológie pri jej aplikácii v základnom výskume.

Hlavné realizované výstupy za rok 2011

Realizácia projektu a s tým spojené plnenie stanovených cieľov v sledovanom období (rok 2011) prebiehalo v súlade so schváleným harmonogramom projektu. Došlo tiež k upevneniu partnerstva so spoluriešiteľom – Lekárskou fakultou Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, ktoré pre realizáciu úloh projektu v uvedenom období zabezpečilo veľmi dôležitý a vzácny klinický materiál, týkajúci sa pacientov s diagnostikovanou leukémiou a ďalšími patológiami ako kontrolnou skupinou pre expresiu a modifikáciu sledovaných proteínových markerov.

Výrazný progres bol dosiahnutý v troch kľúčových oblastiach výskumu:

1. V aplikácii proteínovej hmotnostnej spektrometrie pre identifikáciu malých množstiev proteínových markerov v biologickom materiáli, vrátane kvantifikácie ich post-translačných zmien, so zameraním na fosforyláciu.
2. Vo vývoji a produkcii monošpecifických protilátok s obrovským aplikačným potenciálom.
3. V rozvoji a aplikácii technológie prietokovej cytometrie pre uvedenie originálnych protilátok do dennej praxe vedeckých laboratórií a modernej klinickej diagnostiky. Oblasť klinickej medicíny a presná, rýchla diagnostika je závislá na kvalitných protilátkach, a tieto v oblasti študovaných markerov leukémií na trhu nie sú, alebo len v limitovanej kvalite. Nová technológia DB Biotech a jej aplikácie pre plnenie úloh uvedeného projektu priniesli nové a originálne výsledky, ktoré okrem kvalitnej publikačnej činnosti zaručujú aj kvalitné publikácie a naplnenie výskumných úloh celého projektu.

Výskum sa v ďalšom období bude sústreďovať na objasnenie regulačných signálov modifikácie cieľových markerov leukémií, na skompletovanie potrebného portfólia monošpecifických protilátok zameraných na ich fosforyláciu, a na aplikáciu techník modernej molekulárnej biológie pre produkciu potrebných rekombinantov, pre mutáciu identifikovaných fosforylačných miest, a na transláciu originálnych výstupov riešenia projektu – hlavne originálnych protilátok – do klinickej praxe.

Hlavné realizované výstupy za rok 2012

Pri regulácii prenosu signálov z extracelulárneho prostredia do vnútra bunky zohrávajú primárny signálnu úlohu pri CLL transmembránové proteíny CD5, CD10 a CD23, hlavne ich extracelulárna časť/doména. CD5 predstavuje typ I membránového proteínu, kde majoritná N-terminálna časť proteínu je na povrchu bunky. Fosforylácia tejto časti upravuje jej štruktúru z pohľadu interakcie s inými proteínmi na povrchu bunky, ale aj z hľadiska regulácie prenosu odpovedajúcich signálov do jej vnútra bunky. Tu sme identifikovali pomocou proteínovej hmotnostnej spektrometrie tri nové fosforylačné miesta – Thr-38, Thr-139 a Thr-336. Extracelulárna – C-terminálna doména metallo-endopeptidázového transmembránového proteínu CD10 (nepriylisin; typ II membránový proteín) je štruktúrne nesmierne komplikovaná a dynamická. Identifikácia nových originálnych post-translačných modifikácií (fosforylácií reziduí Thr-697 a Ser-706)

predstavuje tu značne komplikovaný problém, vzhľadom k veľkej aktivite proteínu pri aktivácii odpovedajúcich signálnych dráh, čo súvisí aj s reguláciou fosforylácie. Identifikované nové fosforylačné miesta sa nachádzajú na konci C-terminálnej časti sekvencie CD10, ktorá je aktívnou súčasťou väčšej lokálnej β -štruktúry, prechádzajúcej však pri fosforylácii tranzientne v štruktúru viacmenej α -helikálnu. Tento moment je pre význam fosforylácie v tejto oblasti veľmi dôležitý.

Menší transmembránový proteín CD23 (typ II) má opäť majoritnú časť situovanú extracelulárne, pričom v tejto C-terminálnej sekvencii bohatej na serínové a treonínové zbytky, sme identifikovali tri nové fosforylácie - Ser-89, Ser-104 a Ser-265. Voči v minulom roku riešenia identifikovanému Ser-254 sme vyvinuli monošpecifickú protilátku, klón E12-V. Pre identifikáciu toto istého fosfo-serínu sme v tejto etape vyvinuli s pripravili ešte jeden monošpecifický klón, A13-D. Všetky uvedené protilátky boli úspešne uvedené pre aplikáciu v oblasti prietokovej cytometrie pre výskum chronických leukémií, prípadne jasnú diferenciaciu jej sub-typov.