

# Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Studium změn povrchové nádorové glykosylace při podávání protinádorových léčiv

Bakalářská práce 2008

Vypracovala: Martina Libigerová  
Vedoucí práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.  
Škola: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Studijní obor: Biochemie

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOUNA CHEMIE



3233218482

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 4. 6. 2008

Podpis:

Děkuji Prof.RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za cenné rady, připomínky a ochotu kdykoliv poradit.

Dále děkuji všem členům Laboratoře architektury proteinů Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky za cenné rady a pomoc při provádění experimentů.

## **Obsah**

SEZNAM ZKRATEK.....	5
<b>1. TEORETICKÝ ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
1.1. POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE .....	6
1.2. GLYKOSYLACE.....	6
1.3. POVRCHOVÁ NÁDOROVÁ GLYKOSYLACE .....	7
1.4. TRANSPORT LÉČIVA K POŠKOZENÉ BUŇCE.....	8
1.4.1. DENDRIMERY.....	9
1.4.1.1. SACHARIDOVÉ DENDRIMERY .....	11
1.5. NK BUŇKY .....	12
<b>2. CÍLE.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>15</b>
3.1. MATERIÁL.....	15
3.1.1. CHEMIKÁLIE .....	15
3.1.2. ROZTOKY A PUFRY .....	15
3.1.3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	16
3.2. DALŠÍ MATERIÁLY .....	17
3.3. METODY .....	17
3.3.1. SLEDOVÁNÍ VAZBY POMOCÍ LIGANDOVÉHO BLOTU.....	17
3.3.2. UVOLNĚNÍ POVRCHOVÝCH N-GLYKOSIDICKY VÁZANÝCH OLIGOSACHARIDŮ, JEJICH ANALÝZA, SEPARACE A ZNAČENÍ .....	18
3.3.3. OLIGOSACHARIDOVÉ ARRAYE, VAZBA LEKTINOVÝCH RECEPTORŮ NA NÁDOROVÉ OLIGOSACHARIDY .....	19
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>21</b>
4.1. STANOVENÍ EXPERIMENTÁLNÍ STRATEGIE.....	21
4.2. SLEDOVÁNÍ REAKTIVITY POVRCHOVÝCH GLYKOPROTEINŮ NÁDOROVÝCH BUNĚK S LEKTINOVÝMI RECEPTORY ZABÍJEČSKÝCH BUNĚK POMOCÍ LIGANDOVÉHO BLOTTINGU .....	21
4.3. IDENTIFIKACE PROTEINOVÝCH NOSIČŮ REAKTIVNÍCH OLIGOSACHARIDOVÝCH STRUKTUR.....	23
4.4. UVOLNĚNÍ FRAKČÍ OLIGOSACHARIDŮ, JEJICH VAZBA NA POLYSTYRENOVÉ DESTIČKY, A PROVEDENÍ LEKTINOVÝCH ARRAYŮ.....	24
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>28</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>30</b>
<b>7. SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>31</b>

## Seznam zkratek:

AA	Akrylamid
APS	Amoniumpersulfát
BSA	Hovězí sérový albumin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemiluminiscence
ER	Endoplasmatické retikulum
GlcNAc	N-acetyl- $\beta$ -D-glukosamin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
MALDI MS	Hmotnostní spektrometrie s použitím ionizace laserem za přítomnosti matrice
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MUC glykoproteiny	Mucinové glykoproteiny
NK buňky	„natural killers“ – přirozené zabíječské buňky
PAMAM	Polyamidoamin
PVDF	Polyvinyliden fluorid
RPMI 1640 médium	Médium objevené v Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecylsulfát sodný
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroctová kyselina
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WGA	Pšeničný bakteriální aglutinin
YAC	Velké buňky kvasinek jako umělé chromozomy (YAC, yeast cells as artificial chromosomes)

# 1. TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1. Posttranslační modifikace

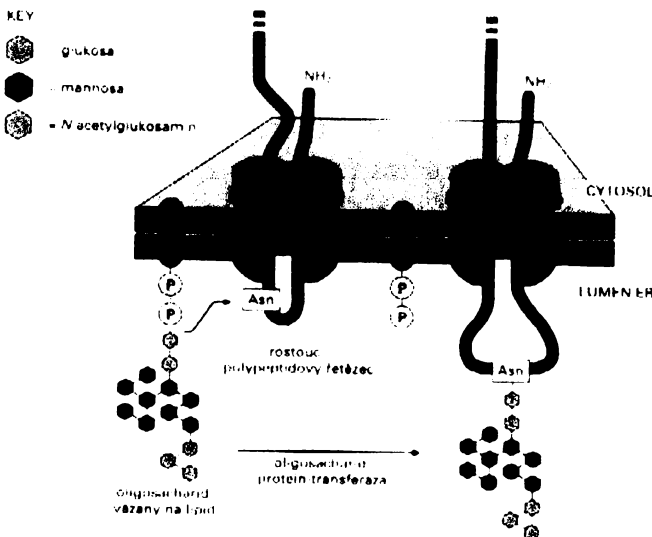
Po biosyntéze proteinu je daná bílkovina v tzv. nascentní podobě. V určitých případech je však nezbytné, aby proběhly další významné procesy, na nichž se nepodílejí nukleové kyseliny, a které se souhrnně nazývají posttranslační modifikace<sup>1</sup>. Do těchto úprav patří i glykosylace.

## 1.2. Glykosylace

Glykosylace je jednou z nejvýznamnějších modifikací biologicky aktivních látek. Podléjí jí řada proteinů. Jedná se o kovalentní připojování krátkých postranních řetězců oligosacharidů. Umožňuje přeměnu lipofilních látek na hydrofilní, mění jednak jejich farmakokinetické vlastnosti, jako je transport a rozpustnost, ale i farmakodynamické vlastnosti.

Tyto sacharidy mohou následně plnit nejrůznější funkce, chránit protein před degradací, zadržovat ho v endoplasmatickém retikulu (dále jen ER), dokud není správně složen, nebo pomáhají při jeho orientaci do náležité organely tak, že fungují jako

transportní signál pro zabalení proteinu do správného transportního váčku. Ovlivňují i jeho stabilitu. Oligosacharidy vystavené na povrchu buněk jsou součástí glykokalyxu, ochranného pláště, který slouží jako obrana před mechanickým i chemickým poškozením a uplatňuje se i při vzájemné identifikaci buněk<sup>2</sup>.



**Obr. 1:** Glykosylace proteinu v ER - téměř ihned po svém vstupu do lumen ER je polypeptidový řetězec glykosylován přidáním oligosacharidového postranního řetězce k určitým asparaginům<sup>2</sup>

K tomuto procesu dochází v ER a Golgiho aparátu (Golgi), a to vlivem vysoce specifických enzymů, glykosyltransferas.

Tyto enzymy rozlišují nejen substrát, ale i strukturu, na níž má být substrát vázán. Připojování sacharidů probíhá ve dvou fázích.

V první fázi vzniká v řadě dílčích reakcí aktivované oligosacharidové jádro, které je připojeno na vysokomolekulární lipidový přenašeč – dolichol (Obr. 1, str. 6)

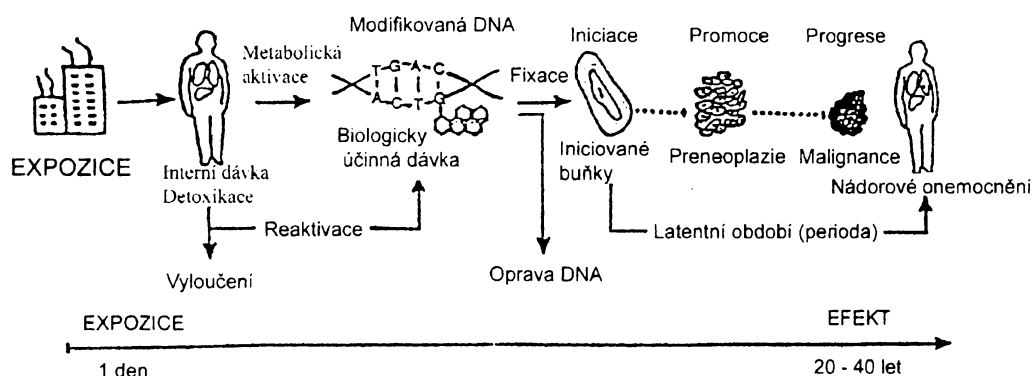
V druhé fázi je toto oligosacharidové jádro přenášeno na protein, přesněji na aminoskupinu (-NH<sub>2</sub>) asparaginového řetězce. K této vazbě dochází již v membránové části ER, kdy část proteinu je ještě syntetizována. Po dokončení proteosyntézy je nascentní glykoproteid transportován do Golgi, kde je sacharidová část dokončována, především odštěpením glukosových zbytků (účinkem glukosidas) a různého počtu mannosových zbytků (mannosidasami).

Oligosacharidy připojené k polypeptidovému řetězci na -NH<sub>2</sub> asparaginu se označují jako N-vázané (napojené N-glykosidovou vazbou), jestliže se váží na hydroxylovou skupinu threoninu či serinu jedná se o O-glykosidovou vazbu. U známých proteinů se však N-vázané vyskytují běžněji<sup>1</sup>.

### 1.3. Povrchová nádorová glykosylace

Změna glykosylace nastává v poslední fázi kancerogeneze. Během ní, tedy ve fázi progresu (Obr. 2), kdy nastává razantní a finální přeměna, do té doby částečně kontrolovaného růstu benigního nádoru na růst nekontrolovaný, vzniká maligní nádor, který vstupuje i do vedlejších tkání a ničí je<sup>3</sup>.

Maligní transformace buňky často vede k dramatickým změnám množství a struktury jejich povrchových sacharidů<sup>4</sup>.



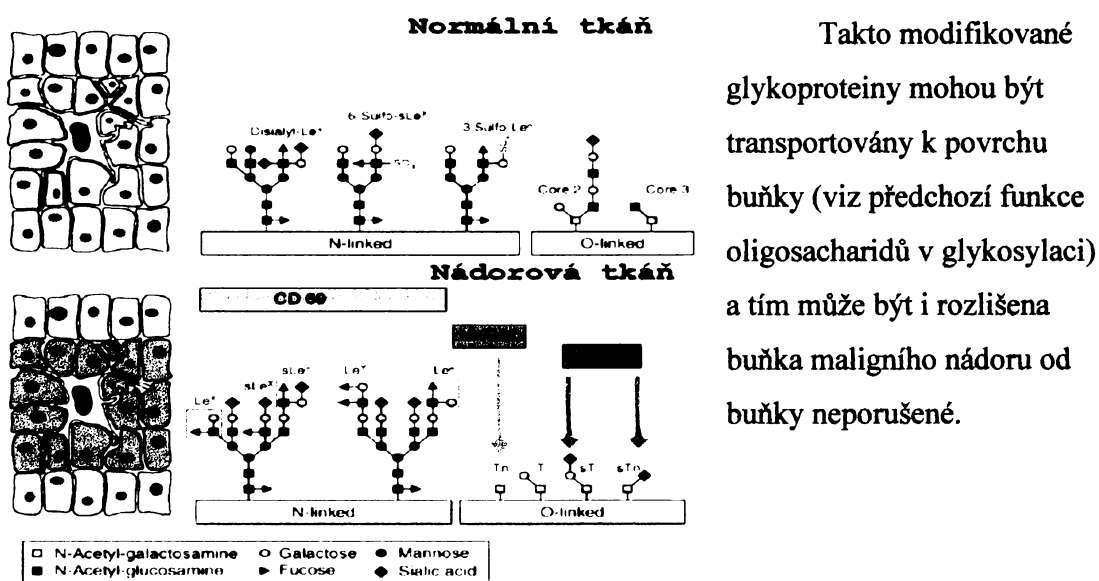
**Obr. 2:** Schéma víceetapového procesu kancerogeneze<sup>5</sup>

Nejběžnější změnou v glykosylaci je zvýšení rozvětvení u N-glykosidicky vázaných glykoproteinů (Obr. 3, str. 8), což vede ke zvýšení apoptózy buňky.

Další často pozorovatelnou změnou je zvýšená exprese antigenů Lewis-typu, jako je sialyl-Lewis<sup>X</sup>, sialyl-Lewis<sup>a</sup> a Lewis<sup>X</sup>, přičemž epitopy sialyl-Lewis<sup>X</sup> a sialyl-Lewis<sup>a</sup> jsou běžně používány jakožto indikátory v histologických diagnosách různých typů rakovin. Zvýšená syntéza těchto látek utlumuje naopak expresi normálních epiteliálních glykanů. Projevuje se převážně u nádoru epitelů<sup>6</sup>.

Tyto Lewis-struktury nejsou nesené pouze glykoproteiny, ale také glykolipidy, které jsou také přeměňovány během maligní transformace.

U O-glykanů jsou změny pozorovány v epiteliálních mucinech plic a střeva jako MUC1, nesoucí strukturu O-vázaného N-Acetyl galaktosaminu s buď  $\beta$ -1,3-galaktosou a  $\beta$ -1,6-N-Acetyl glukosaminem (core 2), či  $\beta$ -1,3-N-Acetyl glukosaminem (core 3) u normálních zdravých tkání. Zatímco u transformovaných epitelů jsou pozorovatelné struktury na bázi O-vázaného N-Acetyl galaktosaminu s galaktosou (core 1)<sup>4</sup>.



Takto modifikované glykoproteiny mohou být transportovány k povrchu buňky (viz předchozí funkce oligosacharidů v glykosylaci) a tím může být i rozlišena buňka maligního nádoru od buňky neporušené.

**Obr. 3:** Změny v glykosylaci během maligní transformace<sup>6</sup>  
 (a) Normální epitelové buňky plic a střeva, (b) Buňky po maligní transformaci

#### 1.4. Transport léčiva k poškozené buňce

Myšlenka cíleného transportu léčiva k postižené buňce se poprvé objevila v roce 1906 formulovaná německým lékařem Paulem Ehrlichem. Hlavním problémem bylo najít



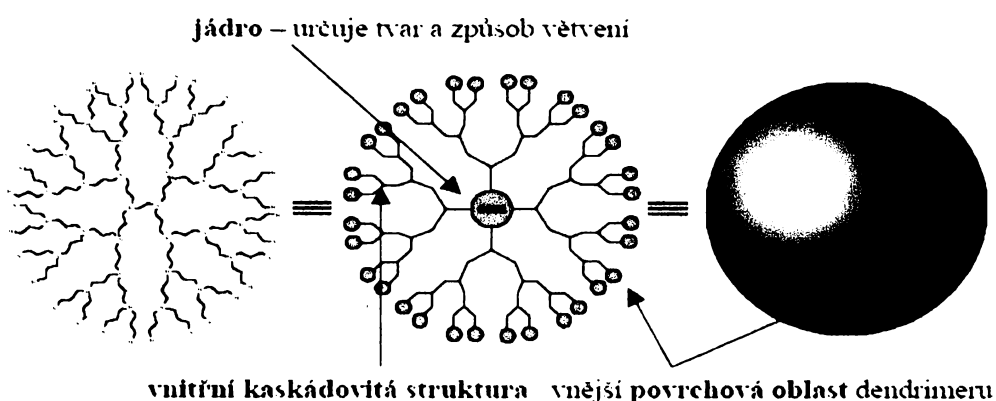
správný nosič, který by dané léčivo selektivně a specificky dopravil na cílovou (poškozenou) tkáň.

V roce 1975 vyjádřil německý polymerní chemik Helmuth Ringsdorf představu o tom, jak by se k směřování daly využít vodorozpustné polymery. Pozdější experimenty prokázaly, že dosažení nejideálnějšího způsobu transportu je použití směřovaného polymerního léčiva. Jeho základem je polymerní nosič s určitým počtem známých reaktivních chemických skupin, na které lze vybranou chemickou reakcí navázat jak léčivo, tak směřující molekulu. Dnes víme, že směřující molekulou nemusí být jen protilátky, posloužit mohou také cukry, lektiny (bílkoviny vázající cukry) či růstové hormony, prostě molekuly, pro které má cílová buňka specifický znak – receptor<sup>7</sup>.

Komplex farmaka a nosiče zásadně mění vlastnosti než by měla volná forma léku (obvykle je rozpustnější, zvýší se stabilita, cílení). V dnešní době je kladen převážně důraz na systémy umožňující co nejselektivnější dopravu chemoterapeutik a radiofarmak k nádoru, jsou jimi např. dendrimery.

#### **1.4.1. Dendrimery**

V souvislosti s nástupem a rozvojem nanotechnologií se v oblasti syntetické chemie dostává do popředí otázka syntézy nanomolekul s přesně definovanou strukturou a velikostí, které by sloužily jako stavební bloky nanotechnologických procesů. Polymery, coby představitelé makromolekulárních sloučenin, obvykle vykazují příliš vysokou polydisperzitu, bránící jejich využití v konkrétních technologických aplikacích s přesnými požadavky na definovanou velikost molekul. Oproti tomu tzv. dendrimery, z nichž některé jsou v posledních letech již komerčně dostupné, představují první syntetické makromolekuly s přesně definovanou velikostí (polydisperzita  $\approx 1,00$ ), a to i v oblasti nejvyšších molekulových hmotností<sup>8</sup>.



**Obr. 4:** Struktura dendrimery (schématicky)<sup>8</sup>

Základním stavebním komponentem dendritické struktury (z řeckého slova *dendros* = strom) je monomer, *větvicí se jednotka*, jejímž postupným spojováním do stromovité struktury dospíváme k *dendronu*. Ten může být kovalentně vázán k polyvalentnímu *jádru*, takže vzniká molekulární struktura s jádrem a pravidelně se opakujícími větvicími jednotkami, pro kterou se vžil název dendrimer. Důležitou součástí každého dendrimery je jeho povrchová část, ve které jsou znásobené příslušné funkční skupiny (Obr. 4).

Stále přibývá možností jejich využití ve farmaceutickém, lékařském a biomedicínckém inženýrství.

Dendritické struktury byly objeveny jako nová třída polymerů. Prvně se o nich zmínil Vögtle<sup>9</sup> roku 1978 a představil je jako kaskádní molekuly (cascade molecules). Vývoj v této oblasti vedl ke vzniku větších dendrimerních struktur. Roku 1985, kdy Newkome a Tomalia nezávisle publikovali své výsledky o skupině větvených molekul, přejmenovali tyto struktury jako stromové (arborols) nebo dendrimery. Označení dendrimer bylo stanoveno jako název těchto struktur.

Na rozdíl od polymerů se jedná o přesně definované molekuly s unikátní stavbou a přesnou molekulovou hmotností<sup>10</sup>.

Díky tomu, je lze přirovnat k vysoce uspořádaným biomolekulám typu DNA nebo proteinů, jejichž architektonické uspořádání je v biologickém prostředí schopno velmi přesně zachovávat velikost, tvar, topologii, flexibilitu i vlastnosti povrchu makromolekuly<sup>8</sup>.

Smysl dendrimerů spočívá zejména v jedinečných strukturních vlastnostech.

Klady, které nabízejí jako základní stavební jednotky lze shrnout do těchto bodů:

- levné a dostupné výchozí látky,
- snadná příprava a izolace, uskutečnitelná i ve velkém měřítku,
- dobře definované silně větvené makromolekuly, které mají v ideálním případě kulovitou strukturu,
- supramolekuly mající tvar stromu, kontrolovanou strukturu a velký počet specifických koncových funkčních skupin,
- nanostruktury umožňující multivalentní interakce,
- snadná chemická opracovatelnost základního skeletu molekuly,
- mono-dispersní,
- možnost "řídit" rozpustnost jak v organických rozpouštědlech, tak i ve vodě.

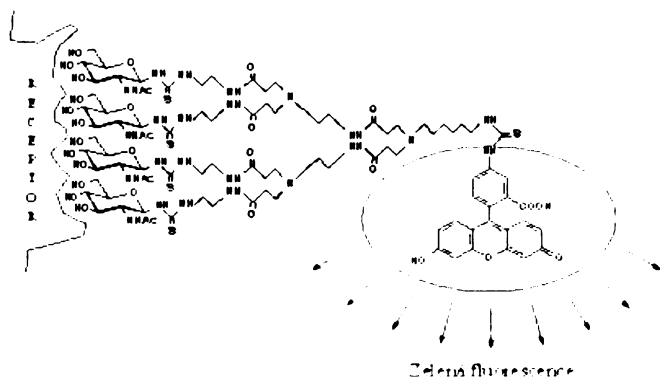
Základní biologické vlastnosti dendrimerů jsou:

- stabilita
- rozpustnost ve vodě
- biokompatibilita
- neimunogenita
- biodegradabilita
- farmakologická inaktivita - chránit celý systém transportu léčiv před rychlou eliminací z organismu (ledviny, játra)

Příkladem jednoho z druhů dendrimerů jsou sacharidové dendrimery.

#### 1.4.1.1. Sacharidové dendrimery

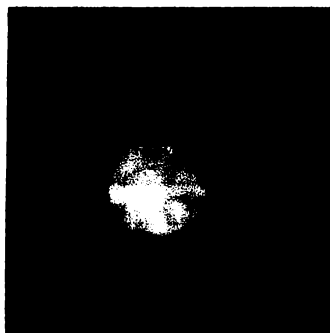
Vlivem nádorového bujení jsou v ER exprimovány nové epitopy, které jsou následně přenášeny glykoproteiny s vysoce multivalentními sacharidovými strukturami. Ty se dají účinně nahradit sacharidovými dendrimery<sup>11</sup>.



Po inkubaci nádorových buněk s dendrimery dochází k jejich přenosu do Golgi a to má za následek ovlivnění povrchové nádorové glykosylace.

**Obr. 5:** Sacharidový dendrimer s fluorescenční značkou<sup>12</sup>

Jedna z dalších možností je označení nádorových buněk fluorescenční značkou a zefektivnění identifikace a další možné léčby karcinomu (Obr. 5, str. 11 a obr. 6)<sup>12</sup>.



**Obr. 6:** Nádorová tkáň pod mikroskopem po inkubaci sacharidových dendrimerů s fluorescenční značkou<sup>12</sup>

### 1.5.NK buňky

V roce 1975 byly NK buňky (natural killers – „přirození zabíječi“) objeveny a definovány jako neadherentní, nefagocytující buňky. Byly původně popsány jako lymfocyty, které jsou schopny rychle (bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci, jako je tomu u cytotoxických T lymfocytů) zabít některé nádorové a virově infikované buňky. Jsou součástí nespecifické imunity, jelikož nemají antigenně specifické receptory<sup>13</sup>.

Evoluční podobnost T lymfocytů a NK buněk ukazuje exprese společných membránových antigenů (CD34, CD16) zejména v časných vývojových stádiích. NK buňky se oddělují od T lymfocytární linie.

Liší se membránovými antigeny, prepisem některých genů, působí absolutně samostatně a na svoji činnost nepotřebují dostávat signály od jiných imunitních buněk. Syntetizují se v kostní dřeni a vykazují charakteristickou orgánovou distribuci. Aktivita je nejvyšší v periferní krvi a pak postupně klesá. Nejsou obsaženy v thymu.

NK buňky fungují jako obrana před cizorodými prvky. Usmrcují buňky, které se snaží uniknout cytotoxickým T buňkám tím, že potlačují expresi MHC glykoproteinů I. třídy na svém povrchu<sup>14</sup> (Obr. 7, str. 13). Spolu s interferonovým systémem se účastní obrany organismu proti virům (rozpoznávají a zabíjejí buňky nakažené viry) i dalším mikrobiálním škůdcům.

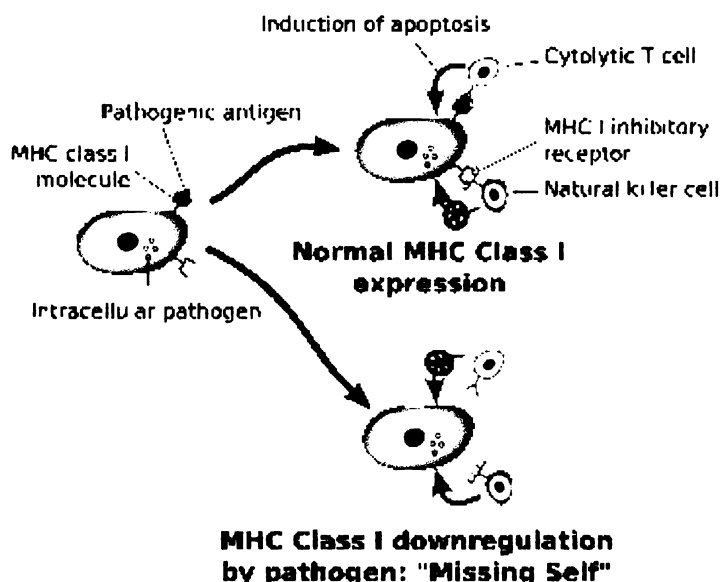
Významně se uplatňují v protinádorovém monitorování a kontrole rozvoje metastáz<sup>16</sup>. Na zásah NK buněk se ukázaly citlivé leukemické buňky, buňky

lymfoblastových linií a také určité typy normálních buněk (například embryonální buňky a kmenové buňky). NK buňky se účastní také reakce odmítnutí štěpu při transplantaci kostní dřeně<sup>17</sup>.

Jestliže se však NK buňka střetne s normální buňkou přechodně se na ni naváže pomocí řady nescifických adhezivních molekul a když po chvíli NK receptory najdou MHC molekuly, je to signál k odpoutání. Pokud se však toto nestane, aktivují se cytotoxické mechanismy a podezřelá buňka je zabita<sup>15,17</sup>. Výjimečnými buňkami, které na povrchu nemají téměř žádné MHC-glykoproteiny, jsou červené krvinky. Ty nejsou NK-buňkami napadány zřejmě proto, že jim chybí některé důležité adhezivní molekuly<sup>17</sup> (Obr. 7).

Tím se NK buňky stávají velmi významným nástrojem imunitního systému zejména z hlediska, že mohou rozpoznávat a eliminovat nádorově, či virově infikované buňky se změněnou povrchovou expresí MUC glykoproteinů, které zpravidla nejsou dobře rozpoznávány cytotoxickými CD8<sup>+</sup> lymfocyty.

Nejpřesnější identifikaci NK buněk umožňuje průkaz jejich specifických membránových molekul. Z nich zřejmě nejdůležitější je molekula CD56, která je exprimována na NK buňkách a částečně také na T lymfocytech. Molekula CD56 slouží jako adhezivní molekula v homotypických adhezivních interakcích. Mimo hematopoetickou tkáň je bohatě obsažena v nervové tkáni a je označována jako NCAM-1 (neural cellular adhesion molecule-1)<sup>17</sup>.



**Obr. 7:** Schématický diagram prokazující komplementární aktivity cytotoxických T – buněk a NK buněk<sup>18</sup>

## **2. CÍLE**

- Sledování změn v profilech povrchových nádorových glykoproteinů pomocí ECL systému a lektinových blotů
- Sledování interakce rozpustných lektinových receptorů s povrchovými sacharidy nádorových buněk metodou oligosacharidových arrayí

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1. Materiál

#### 3.1.1. Chemikálie

Tab. 1

Akrylamid	Serva, Německo
APS	Serva, Německo
Azid sodný	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Německo
Dihydrogenfosforečnan draselný	Penta, ČR
DTT	Fluka, Švýcarsko
ECL™ systém	Amersham, USA
Ethanol	Lachema, ČR
Ethidiumbromid	Sigma, USA
Fenol	Sigma, USA
HEPES	Serva, Německo
Hydrogenfosforečnan sodný	Lach-ner, ČR
Hydroxid draselný	Lachema, ČR
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Chlorid draselný	Lach-ner, ČR
Chlorid sodný	Lach-ner, ČR
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Kyselina octová	Lachema, ČR
Methanol	Lachema, ČR
Odtučněné sušené mléko	Laktos, ČR
PVDF membrána (BioTrace™) (0,45μm)	Pall Corporation, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Síran hořečnatý	Lachema
TEMED	Serva, USA
Tris	Jersey Lab Supply, USA
Triton X-100	Sigma, USA
Tween-20	Loba Feinchemie, Německo
Ustalovač	Kodak, USA
Vývojka	Kodak, USA
Ostatní chemikálie p.a.	Lachema, ČR

#### 3.1.2. Roztoky a pufry

- *Fixační a odbarvovací roztok pro AA SDS elektroforézu:*  
35% EtOH, 10% HAc

- *Fixační a odbarvovací roztok pro PVDF membránu:*  
50% MeOH, 10% HAc
- *Barvicí roztok pro SDS elektroforézu:*  
45% MeOH, 10% HAc, 0,25% CBB R-250
- *PBS pufr:* 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4
- *Transformační pufr (TB):*  
10 mM HEPES, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl  
pH upraveno pomocí KOH na 6,7 a přidáno 1,1% MnCl<sub>2</sub>
- *Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu:*  
250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH = 8,3
- *Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu:*  
50 mM Tris-Cl pH = 6,8  
100 mM DTT  
2% SDS  
0,01% bromfenolová modř  
10% glycerol
- *Pufr pro elektropřenos:*  
25 mM Tris pH = 8,3; 150 mM glycin, 20% methanol

### 3.1.3. Přístroje a pomůcky

Tab. 2

384-jamkové destičky	Pierce, USA
Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety	Gilson, USA
Centrifuga Hermle Z233 MK-2	Hermle, Německo
Chladnička	Whirlpool, USA
Chladnička	Calex, SR
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
pH metr Φ200	Beckman, USA
Předvážky HF-1200G	AND, USA
<u>Ultrazvuková sonda</u> Ultrasonic Homogenizer 4710 Series	Cole-Parmer Instrument Co., USA
Souprava pro elektroforézu	Sigma, USA
Souprava pro elektropřenos	Scientific Co., USA
Spektrofotometr SAFIRE <sup>2</sup>	Tecan-Schoeller Instruments, Rakousko
Třepačka Grand Boeckel VSR 23	VELP Scientifica, Itálie
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore, USA
Zdroj napětí EPS 500/400	Pharmacia, USA



## 3.2. Další materiály

Pro experiment byly použity myší nádorové linie – myší lymfom YAC-1 byl vybrán jako příklad buněk citlivých na zabíjení cytotoxickými lymfocyty, a myší mastocytom P815 byl vybrán jako příklad buněk rezistentních. Obě buněčné linie byly inkubovány za standardních podmínek při buněčné hustotě  $5 \times 10^6$  buněk / ml v celkovém objemu 200 ml po dobu jednoho týdne, a to v médiu RPMI 1640 s přidavkem 10 % fetálního telecího séra, glutaminu, a antibiotik (kontrolní pokus) nebo s přidavkem uvedených látek a  $10^{-9}$  mol/l GlcNAc PAMAM dendrimerů<sup>11</sup> (experimentální pokus). Poté byly buňky sklizeny z kultivačních nádob, promyty 5 x PBS, a byly použity k přípravě plasmatických membrán podle publikovaného protokolu<sup>20</sup>. Rekombinantní rozpustné receptory lektinového typu potkana, rNKR-P1A a rCD69, byly připraveny na základě publikovaných protokolů<sup>21, 22</sup>. Rostlinný lektin WGA (wheat germ agglutinin) byl získán z Laboratoře pro přípravu a kontrolu lektinových preparátů (Lectinola) na katedře biochemie UK-PřF. Všechny tyto lektiny byly značeny buď radioaktivně do specifické aktivity  $10^6$  Bq /  $\mu$ g proteinu<sup>21</sup>, nebo fluorescenčně pomocí NHS-fluoresceinu nebo NHS-rhodaminu dle dříve popsané metodiky<sup>23</sup>.

## 3.3. Metody

### 3.3.1. Sledování vazby pomocí ligandového blotu

Vzorky vyšetřovaných plasmatických membrán ze čtyř různých typů sledovaných buněk odpovídající asi 10  $\mu$ g na dráhu byly separovány pomocí SDS elektroforesy ve 12 % polyakrylamidovém gelu, a poté přeneseny ve čtyřech kopiích na PVDF membránu (0.45  $\mu$ m, BioTrace PVDF Transfer membrane, Pall Corporation, USA) elektropřenosem prováděným v Tris-glycinovém elektrodozvěku s obsahem 20 % methanolu. Po přenosu byla jedna membrána krátce promyta v destilované vodě, a přenesené proteiny jsou vizualizované Coomassie Brilliant Blue R-250, a odbarvovány krátce v 50 % methanolu a 10 % kyselině octové. Membrána je několikrát promyta v PBS pufru, a přenesené vizualizované proteiny dokumentovány s použitím běžného scanneru. Na druhé membráně byly detekovány povrchové glykoproteiny, postupovalo se přitom přesně podle návodu dodaného firmou GE Healthcare ke kitu Glycoprotein detection kit<sup>23</sup>. Třetí a čtvrtá membrána byla po elektropřenosu blokována nejméně 2 hodiny v PBS pufru s přidavkem

2 % BSA, přenesena do chladové místnosti, a inkubována s radioaktivně značenými vzorky lektinů (rNKR-P1A a WGA, cca 100 kBq na pokus) v chladové místnosti přes noc. Následovalo opláchnutí chladným PBS puferem 4 x 1 min, osušení membrány, a proměření intenzity radioaktivního signálu laboratorním monitorem s Geigerovou trubicí series 900 mini-monitor (Mini-Instruments Ltd., Velká Británie). Podle intenzity změřené fluorescence poté byla stanovena expozice autoradiografickou technikou v kazetě z použitím filmu Agfa CP-VB (Agfa-Gevaert N.V., Belgie) v expoziční kazetě s intenzifikační obrazovkou Wolf L-Plus (Sigma Laboratory Supplies). Po exponování je film vyvolán 5 min v ochranném červeném světle vytvářeném filtrem Kodak GBX-2 (Sigma Laboratory Supplies) s použitím vývojky Kodak Polymax RT developer, a poté promyt a 5 min ustálen v ustalovači Kodak Polymax RT fixer. Vyvolaný film je skenován na standardním scanneru, a zobrazen bez jakékoliv další elektronické manipulace. Pro identifikaci proteinových nosičů nesoucích oligosacharidové skupiny byl použit původní gel vizualizovaný na proteiny, z něhož byla odpovídající část vyříznuta, a přítomné proteiny identifikovány technikou peptidového mapování<sup>21</sup>. Vyříznuté pruhy z SDS gelu byly nejprve odbarveny (100mM ethylmorfoline-acetátový pufr : acetonitril v poměru 1:1). Poté bylo ke vzorkům přidáno redukční činidlo TCEP (50mM) a vzorky byly zahřívány na 95°C po dobu 15minut. Poté byl ke vzorkům přidán roztok 50mM iodoacetamidu (1h, ve tmě, laboratorní teplota) kvůli alkylaci zredukovaných cysteinů. Kousky gelu byly poté inkubovány přes noc při 37°C v 50mM ethylmorfoline-acetátovém pufru s trypsinem (0.5µg). Vzniklé peptidy byly extrahovány z gelu roztokem 80% acetonitrilem, 0.1%TFA. Vzorky byly vysušeny na zařízení SpeedVac, rozpuštěny ve 100uL 0.1%TFA ve vodě. Pomocí MicroTrap kolony byly vzorky odsoleny a zkoncentrovány na objem 10µL. Tyto vzorky byly nastříknuty na mikrokapilární kolonu (Michrom, C18AQ, 5u, 200A, 0.2x150mm) spojenou přímo s hmotnostním spektrometrem LCQ DECA (Thermo Finnigan). Naměřená fragmentační spektra byla analyzována pomocí softwaru SEQUEST a prohledávána proti databázi vytvořenou ze všech známých savčích proteinů.

### **3.3.2. Uvolnění povrchových N-glykosidicky vázaných oligosacharidů, jejich analýza, separace a značení**

Pro uvolnění N-glykosidicky vázaných oligosacharidů z plasmatických membrán čtyř různých typů nádorových buněk byl použit publikovaný protokol založený na použití

enzymu N-glykanasy (asparagin amidasy) za denaturujících podmínek<sup>25</sup>. Po uvolnění byla celková oligosacharidová frakce podrobena několikastupňovému čištění, a to nejprve na koloně s obrácenou fází C18, a poté byly oligosacharidy odsoleny na Sephadexu G-15 a na aktivním uhlí. Přítomnost a kvalita přečištěných oligosacharidů byla kontrolována hmotnostní spektrometrií MALDI. Takto připravená oligosacharidová frakce byla poté podrobena dvojrozměrné frakcionaci na základě náboje a velikosti oligosacharidů, a to na základě protokolu, v němž byla původní serotoninová chromatografie<sup>25</sup> nahrazena ionexovou chromatografií na koloně MonoQ. Během této separace bylo získáno celkem 8 frakcí, a to frakce neutrálních oligosacharidů, dále frakce mono- až pentasialovaných oligosacharidů, a konečně dvě frakce vysoce nabitých, zejména sulfatovaných oligosacharidů. Poté byly oligosacharidy separovány v druhém rozměru na koloně s normální fází Merck Diol (4 x 250 mm) pomocí gradientu vytvářeného 50 mM mravenčanem amonným pH 5.0 a acetonitrilem při eluční rychlosti 1 ml / min. Kolona byla nejprve ekvilibrována směsí 75 % acetonitrilu a 25 % pufru, a poté byl obsah acetonitrilu snižován o 0.5 % za minutu až do 50 % acetonitrilu, a při tomto složení byla kolona eluována ještě 10 min před následnou reekvilibrací ve výchozím rozpouštědle. Frakce byly jímány po 5 minutách od výtoku počátku gradientu z kolony, celkem z každé chromatografie jímáno 12 frakcí. Tyto frakce byly odpařeny, oligosacharidy byly převedeny na aminoderiváty inkubací v 1 M 1,6-diaminohexanu v přítomnosti 0.5 M NaBH<sub>3</sub>CN. Poté byly amino oligosacharidy podrobeny hydrazinolýze<sup>26</sup> následované re-N-acetylací volných aminoskupin na zbytcích glukosaminů pomocí <sup>3</sup>H-acetanhydridu (GE Healthcare, specifická aktivita 70 TBq / mg) a repurifikací na gelové koloně Sephadex G-15.

### **3.3.3. Oligosacharidové arraye, vazba lektinových receptorů na nádorové oligosacharidy**

Pro experiment se používá 384 jamková (formát 24 x 16 jamek) mikrotitrační destička CovaLink plate firmy Pierce (USA) obsahující kovalentně vázané aktivní N-hydroxysukcinimidové skupiny. Do čtvercových jamek této destičky o objemu cca 100 µl pipetujeme ve formátu 12 x 8 jednotlivé frakce separovaných a značených sacharidů, které necháme reagovat s aktivovanými skupinami 4 hodiny při pokojové teplotě. Poté desky promýváme nejméně pětkrát destilovanou vodou, vysušíme, a uchováváme do okamžiku pokusu v zatavené folii při -20 °C. Pro vlastní vazebný pokus použijeme dvě připravené

desky. Do jedné desky se přidá 100  $\mu$ l roztoku pro kapalinovou scintilaci, a měřením radioaktivity v jednotlivých jamkách se určí množství navázaného oligosacharidu. Do jamek druhé destičky pipetujeme fluorescenčně značených proteinů (0.1 mg/ml) ve formě dvojic rozpustných receptorů, z nichž jeden je značen pomocí fluoresceinu (rNKR-P1A) a druhý pomocí rhodaminu (rCD69). Deska je inkubována se značenými receptory v lednici (4°C) nejméně dvě hodiny, poté je pětkrát promyta pufrům PBS, a navázané molekuly receptoru jsou disociovány a převedeny do roztoku přidávkem 100  $\mu$ l 0.1 M sodnoacetátového pufru pH 3.5 po dobu nejméně dvou hodin. Poté je intenzita fluorescence v jednotlivých jamkách měřena pomocí zařízení Safire 2 (Tecan) na základě níže uvedených parametrů. Pro fluoresceinem značené proteiny byla měřena fluorescence na dně jamky („fluorescence bottom“), excitační vlnová délka byla 496 nm, emisní vlnová délka 519 nm, šířka excitační štěrby 5 nm, šířka emisní štěrby 20 nm, citlivost měření (gain) 50, měření bylo čtyřikrát opakováno, čas integrace signálu byl 40  $\mu$ s, a měření probíhalo při laboratorní teplotě (27.5°C). Pro rhodaminem značené proteiny byla též měřena fluorescence na dně jamky („fluorescence bottom“) při excitační vlnové délce 546 nm, emisní vlnová délka byla 577 nm, šířka excitační štěrby 5 nm, šířka emisní štěrby 20 nm, citlivost měření (gain) 55, měření bylo opakováno čtyřikrát, čas integrace signálu byl 40  $\mu$ s, měření probíhalo při laboratorní teplotě (26.5°C). Hodnoty fluorescence v jednotlivých jamkách úměrné množství navázaného proteinu byly poté přepočítány na množství navázaných oligosacharidů zjištěné radioaktivním měřením.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Stanovení experimentální strategie

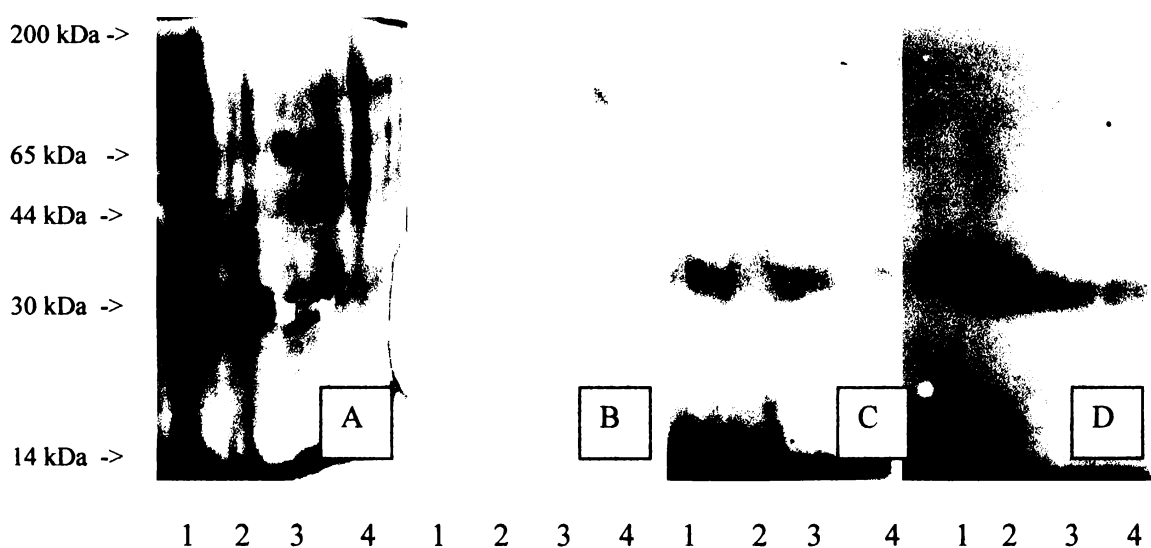
Cílem bakalářské práce bylo sledovat změny v povrchové nádorové glykosylaci u nádorových buněk v průběhu léčby nádoru sacharidovými dendrimery obsahujícími koncové zbytky N-acetylglukosaminu. O těchto látkách bylo v předcházejících pokusech prováděných ve spolupráci s Laboratoří přirozené buněčné imunity MBÚ AV ČR prokázáno, že významně prodlužují dobu života myši s B16 melanomem, a že tento účinek je závislý na zabíječských buňkách imunitního systému<sup>11, 12</sup>. Dalším výzkumem tohoto jevu se zjistilo, že sacharidové dendrimery velmi významně ovlivňují aktivitu klíčových buněčných glykosyltransferas, konkrétně zvyšují aktivitu protinádorové N-acetylglukosaminyltransferasy III, a snižují aktivitu protinádorové N-acetylglukosaminyltransferasy V<sup>19</sup>. V souvislosti s těmito poznatky bylo mým úkolem sledovat změny v povrchové nádorové glykosylaci u nádorových buněčných linií, a to jednak kontrolních linií, a jednak linií inkubovaných v přítomnosti sacharidových dendrimerů. Přitom byly sledovány jednak buněčné linie citlivé na zabíjení lymfocytárními buňkami, a jednak linie na takové zabíjení necitlivé. Oba typy buněčných linií byly používány proto, že v předcházejícím výzkumu bylo ukázáno, že právě citlivost nádorů na buněčné zabíjení může mít vztah k povrchové nádorové glykosylaci, kdy citlivé buněčné linie exprimují nádorové sacharidové neoantigeny, a necitlivé linie je naopak neexprimují<sup>27</sup>.

### 4.2 Sledování reaktivity povrchových glykoproteinů nádorových buněk s lektinovými receptory zabíječských buněk pomocí ligandového blottingu

Jako první metoda pro sledování interakce povrchových glykoproteinů nádorových buněk s lektinovými receptory NK buněk byla vybrána metoda tzv. ligandového blotu s převrstvením elektroforeogramů značenými receptory. Tato metoda využívá elektropřenosu sledovaných membránových glykoproteinů na PVDF membránu po jejich separaci SDS elektroforesou. Elektropřenos se provede v několika kopiích, jedna membrána je poté vizualizována proteinovými barvivami, zatímco druhá je použita pro detekci celkových membránových glykoproteinů, a poslední dvě membrány jsou

blokovány pomocí BSA, a poté převrstveny roztokem sledovaného lektinu značeného radioaktivně. Po krátké inkubaci v chladové místnosti při 4 °C se provede promytí nezreagovaných lektinových receptorů, poté je membrána vysušena, zabalena do ochranné fólie, a vazba lektinů zviditelněna pomocí přímé autoradiografie.

Výsledek experimentu je uveden na obr. 8. V experimentu byly použity plasmatické membrány ze čtyř různých vzorků nádorových buněk, a to nádorových buněk citlivých na působení zabíječských lymfocytů YAC-1, týchž nádorových buněk opracovaných sacharidovými GlcNAc dendrimery, a dále nádorových buněk necitlivých na působení zabíječských lymfocytů P815 kontrolních, a konečně necitlivých P815 buněk opracovaných sacharidovými dendrimery. Panel obsahující tyto čtyři vzorky byl analyzován ve čtyřech kopiích, z nichž prvá byla použita pro celkovou proteinovou vizualizaci (panel 8A), druhá pro specifickou detekci sacharidových komponent (panel 8B), na třetí kopii (replice) byla zkoumána reaktivita s NKR-P1A receptorem potkana, klasickým lektinovým receptorem přirozených zabíječských buněk u tohoto živočišného druhu, a na čtvrté replice byly specificky detekovány sacharidové struktury s koncovými  $\beta$ -N-acetylhexosaminy interakcí s rostlinným lektinem WGA.



**Obr.8:** Glykoproteiny plasmatických membrán buněk YAC-1 (opracovaných dendrimery v dráze 1 a kontrolních v dráze 2) a buněk P815 (opracovaných dendrimery v dráze 3 a kontrolních v dráze 4) byly separovány SDS elektroforesou v 12 % polyakrylamidovém gelu, a poté ve čtyřech kopiích vizualizovány pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (*panel A*), nebo pomocí glykoproteinového vizualizačního systému ... (Amersham) (*panel B*), nebo pomocí sledování reaktivity s lektinovým receptorem potkana NKR-P1A (*panel C*) a s rostlinným lektinem WGA (*panel D*). Velikosti glykoproteinů byly odečteny pomocí markeru molekulových hmotností, a jsou uvedeny na *levé straně* obrázku.. Část proteinového gelu vyřiznutá pro hmotnostně spektrometrickou identifikaci je znázorněna šipkou.

Výsledky tohoto experimentu ukazují především na poměrně nízkou úroveň povrchové nádorové glykosylace s poměrně malým počtem identifikovaných povrchových nádorových glykoproteinů (Obr. 8B, str. 22). I přes nízkou úroveň glykoproteinového signálu je nicméně patrné, že celková úroveň povrchové glykosylace je výrazně nižší u buněčné linie YAC-1 citlivé na činnost zabíječských buněk oproti buňkám P815, které nejsou na takové zabíjení citlivé. Ještě zajímavější je ovšem vizualizace některých povrchových buněčných komponent interakcí se specifickými lektinovými receptory odpovědnými za citlivost k buněčnému zabíjení. Například při sledování reaktivity s lektinem NKR-P1A, který je jedním z nejdůležitějších aktivačních receptorů tohoto druhu, pozorujeme u buněk opracovaných sacharidovými dendrimery jasné zvýšení reaktivity s tímto lektinem oproti kontrole, a to jak u buněk citlivých na zabíječské lymfocyty, tak také u buněk na toto zabíjení necitlivých (Obr. 8C, str. 22). Pro potvrzení, že se jedná opravdu o interakci závislou na sacharidových komponentách byla ještě sledována na čtvrté replice reaktivita s rostlinným lektinem WGA, který by měl reagovat s volnými koncovými zbytky N-acetylglukosaminu (Obr. 8D, str. 22). Tento kontrolní pokus opravdu potvrdil, že tento rostlinný lektin reaguje s molekulární komponentou o stejné velikosti, a reaktivita je zvýšená po opracování sacharidovými dendrimery.

### **4.3 Identifikace proteinových nosičů reaktivních oligosacharidových struktur**

Vzhledem k tomu, že extrakcí plasmatických membrán a jejich separací SDS elektroforesou lze získat zejména frakci membránových glykoproteinů, jeví se jako zajímavé identifikovat povahu proteinových nosičů, na nichž jsou potom navázané oligosacharidové komponenty reaktivní se zkoumanými lektiny. Tato identifikace je významná proto, že se může jednat o některé funkčně významné komponenty plasmatických membrán jejichž aktivita může být regulována právě pomocí připojených oligosacharidových komponent a interagujících receptorů. Proto byla zóna odpovídající glykoproteinu reaktivnímu s lektinovým receptorem NKR-P1A potkana vyříznuta, jak je ukázáno v obr. 8A (str. 22), a přítomné proteinové komponenty analyzovány hmotnostní spektrometrií využívající trypsinového štěpení přítomných komponent, jejich separaci na kapilárních kolonách s obrácenou fází s následnou identifikací komponent v iontové pasti.

**Tab. 3**

<b>Proteiny identifikované v zóně reagující s NKR-P1A receptorem potkana s použitím hmotnostně spektrometrických technik</b>		
<i>Komponenta</i>	<i>Identifikovaný protein</i>	<i>Identifikované peptidy(sekvence)</i>
1	Ribosomální protein L7	IALTDNSLIAR VPPAINQFTQALDR LKVPPAINQFTQALDR EANNFLWPFK
2	Histon	ASGPPVSELITK
3	VDAC, iontový kanál pro transport anionů	LTFDITTFSPNTGK VNNSSLIGLGYTQTLKPGIK LTLSALIDGK

Seznam identifikovaných proteinů je uveden v tabulce 3. Dva ze tří proteinů nalezených ve zkoumaném vzorku byly identifikovány jako ribosomální protein L7 a histonový protein, tyto proteiny evidentně pocházejí z kontaminujících organel přítomných v důsledku nedokonalé separace během přípravy plasmatických membrán. Zajímavější je třetí nalezený protein identifikovaný jako iontový kanál pro transport anionů. Tyto transportní kanály jsou v nádorových buňkách velmi významné, podílejí se mj. na eliminaci molekul nádorových léčiv a tudíž nízkém účinku chemoterapií v případě některých nádorů. Detailní charakterizace tohoto iontového transportéru je v současné době předmětem dalšího výzkumu.

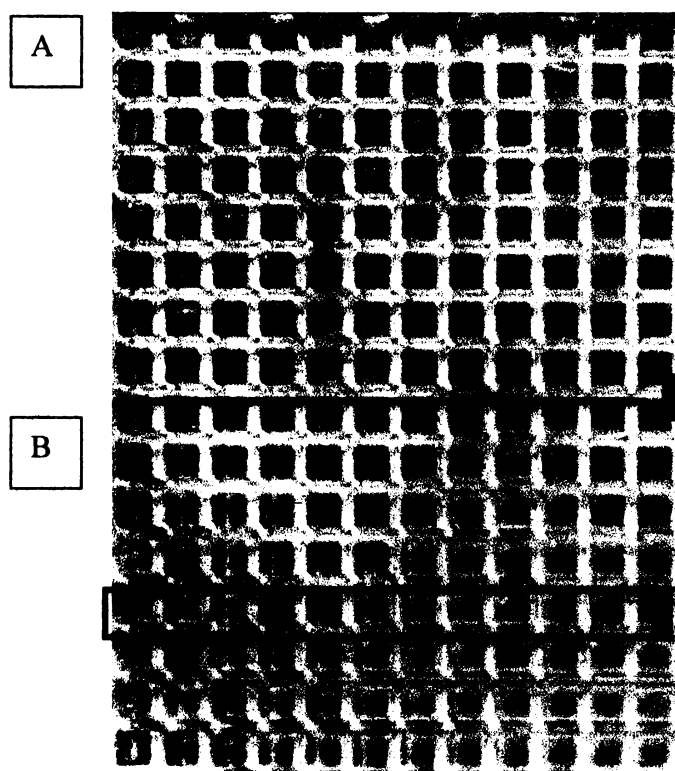
#### **4.4 Uvolnění frakcí oligosacharidů, jejich vazba na polystyrenové destičky, a provedení lektinových arrayů**

Strategie identifikace povrchových glykoproteinů interagujících s receptory zabíječských buněk pomocí metody ligandového blottingu je sice systematická, ale naráží na některé problémy charakteristické pro mnohastupňové biochemické frakcionace. Během nich dochází k postupné ztrátě biologického materiálu a tudíž nízké citlivosti použitých analytických postupů, které se tak dostávají na samu hranici svých detekčních možností. Řešení tohoto problému v poslední době přichází ze strany moderních proteomických a glykomických technologií, zejména techniky sacharidových a lektinových arrayů. Technika sacharidových arrayů je moderní a rychlá technika měření protein – sacharidových interakcí, která je velmi reprodukovatelná, vyžaduje pouze minimální



množství interagujících sloučenin, a lze ji do značné míry automatizovat. Proto se tato technika stává stále populárnější v současném glykobiologickém výzkumu. Aby bylo možno výsledky vazby lektinů na imobilizované sacharidy správně vyhodnotit, je však nejprve třeba jednotlivé oligosacharidové ligandy uvolnit z molekul glykokonjugátů buněčného povrchu, frakcionovat, a dále je imobilizovat ve vysoké hustotě na pevné fázi (plastikový povrch destičky, jiné modifikované materiály, ligandový čip).

Příklad jednoho z řady výsledků získaným pomocí technologie sacharidových arrayů je



**Obr. 9:** Výsledek vazby lektinových receptorů rNKR-P1 (žlutě) a rCD69 (červeně) na array získanou ze vzorku plasmatických membrán buněk P815, kontrolních (panel A) a preinkubovaných s dendrimery (panel B). Jeden řádek této sacharidové arraye vybraný pro podrobnou analýzu (viz. text níže) je vyznačen černým obdélníkem. Sacharidy dávkovány podle vzrůstající velikosti (zleva doprava) a vzrůstajícího náboje (shora dolů).

uveden na obr. 9. Je zde ukázán výsledek interakce dvojice lektinů rNKR-P1A (značený fluoresceinem, žlutá barva) a rCD69 (značený rhodaminem, červená barva) na oligosacharidy extrahované jednak z kontrolních P815 buněk, jednak z P815 buněk opracovaných sacharidovými dendrimery.

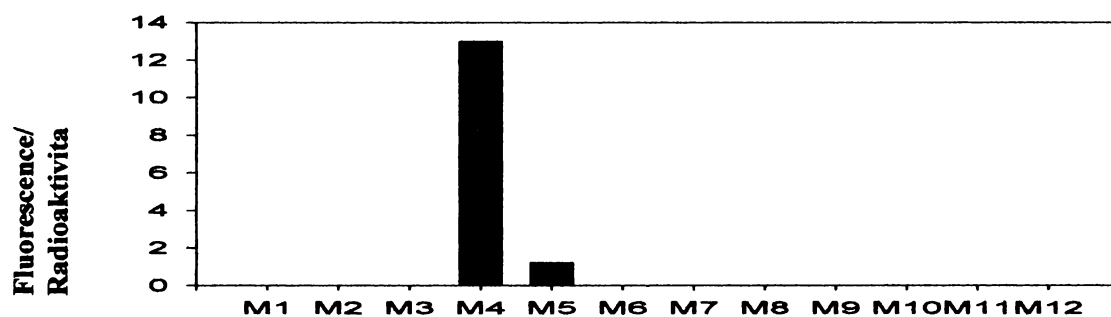
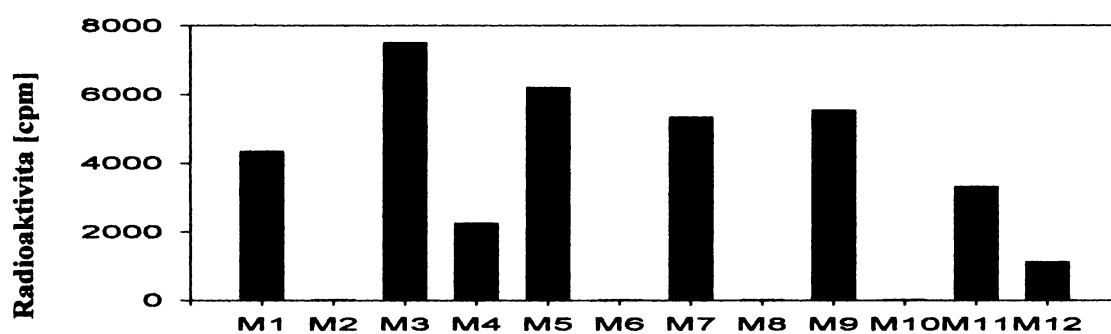
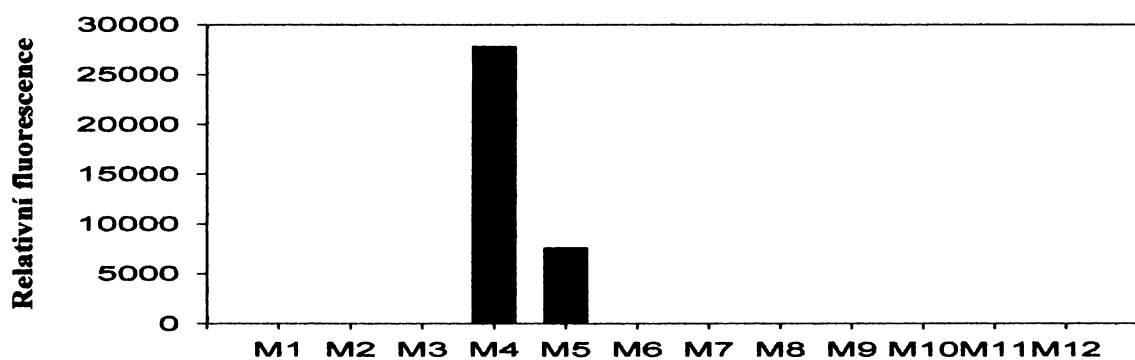
V mém případě sestával celý protokol z několika kroků:

1. Uvolnění všech oligosacharidových komponent z plasmatických membrán nádorových buněk,
2. Jejich frakcionace v závislosti na náboji, velikosti, popřípadě dalších vlastnostech,

3. Radioaktivní značení jednotlivých oligosacharidových frakcí chemickou deacetylací a re-N-acetylací pomocí značeného anhydridu,
4. Navázání na povrch polystyrenové destičky pokryté neglykosylovaným nosičem,
5. Změření účinnosti vazby na destičku,
6. Vyhodnocení interakce lektinových receptorů se sacharidovou arrayí,
7. Přepočítání vazebných výsledků na množství imobilizovaného oligosacharidu.

Jak je z obr. 9 (str. 25) patrné, u kontrolních buněk docházelo k velmi nízké vazbě obou sledovaných lektinů, tato vazba se však zvýšila po inkubaci nádorových buněk v přítomnosti sacharidového dendrimeru. Jednotlivé řádky sacharidové arraye je poté možno podrobit detailní molekulární analýze na základě obou typů výše uvedených měření. Příklad takového vyhodnocení je uveden na obr. 10 (str. 27) a to pro jeden řádek sacharidové arraye jak je vyznačeno na obr. 9. (str. 25). Na obr. 10 (str. 27) je uvedeno nahoře odpovídající měření intenzity fluorescence, v prostředním panelu je potom uvedeno měření radioaktivity odpovídající množství navázaných oligosacharidů, a ve spodním panelu jsou potom uvedeny korigované hodnoty.

Podle těchto výsledků docházelo k nejvyšší vazbě v jamce označené jako M4, což je patrné i na fotografii (str.25) celé destičky. Následnou molekulární analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI bylo poté možno identifikovat i strukturu příslušného interagujícího oligosacharidu o molekulové hmotnosti 2358,9, jednalo se o sialovaný a sulfatovaný oligosacharid o celkovém sumárním vzorci  $(\text{NeuAc})_1(\text{Sulf})_1(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ .



**Obr.10:** Podrobné vyhodnocení sacharidových arrayů – jedná se o výsledek měření na vyznačeném řádku na obr. 9 (str. 25). V horním panelu jsou znázorněné číselné hodnoty měření fluorescence rhodaminu, uprostřed měření množství navázaného oligosacharidu, ve spodním řádku jsou potom korigované hodnoty vazby vztahované na množství sacharidu.

## 5. DISKUSE

Protinádorová chemoterapie používá cytotoxické (pro buňku jedovaté) nebo cytostatické (růst a dělení buněk zastavující) látky. Většina těchto látek má vliv pouze na buňky, které rostou a dělí se, což však nejsou jen buňky nádoru, ale i buňky zdravých tkání. Protinádorová chemoterapie má proto řadu nežádoucích (vedlejších) účinků. Ty omezují možnosti účinné léčby použitím vysokých dávek cytotoxického léčiva, jež by bylo potřeba pro dosažení úplného terapeutického účinku.

V souvislosti s tímto problémem se v moderní léčbě nádorových onemocnění snaží současná věda docílit u jednotlivých léčiv, jak vysoké farmakologické inaktivity, tj. protekci léčiv před rychlou eliminací z organismu, tak i snížení cytotoxicity pro zdravé buňky (tkáně). Hlavními požadavky na farmaka, je zajištění co nejvyšší specifičnosti a selektivnosti pro danou nádorovou tkáň.

Vývojem nových protinádorových léčiv se v dnešní době zabývají velké počty výzkumných skupin. Zaměřují se na poznání patologických mechanismů nádorového bujení s jasným účelem zacílit cytotoxický účinek kancerostatika především na nádorovou tkáň. Tuto podmínku splňují tzv. nosiče léčiv, které právě dokáží identifikovat infikovanou buňku. Systémy transportu léčiv jsou obvykle makromolekulární nebo supermolekulární struktury (dendrimery, polymerní micely nebo lipozomy), vážící různým způsobem léčivo, které tak získává zcela odlišné vlastnosti než má volná forma léku.

Mechanismy, které slouží k odlišení nádorové buňky od zdravé (viz teoretický úvod), jsou založeny na rozdílech a transformacích exprese jednotlivých látek pro nádorové a zdravé buňky.

V mé bakalářské práci jsem se zaměřila právě na sledování těchto změn v profilech povrchových nádorových glykoproteinů pro nádorové linie P815 a YAC-1. Bylo prokázáno, že celková míra povrchové glykosylace je výrazně nižší u buněčné linie YAC-1 citlivé na činnost zabíječských buněk oproti buňkám P815, které nejsou na takové zabíjení citlivé.

Velmi zajímavého výsledku bylo docíleno vizualizací některých povrchových buněčných komponent interakcí se specifickými lektinovými receptory odpovědnými za citlivost k buněčnému zabíjení. Sledováním reaktivity s lektinem NKR-P1A, nejdůležitějšího aktivačního receptoru tohoto druhu, jsme pozorovali, že u buněk opracovaných sacharidovými dendrimery byla velice zřejmá zvýšení reaktivita s tímto

lektinem oproti kontrole, a to jak u buněk citlivých na zabíječské lymfocyty, tak také u buněk na toto zabíjení necitlivých. Abychom se ujistili, že se opravdu jednalo o interakci závislou na sacharidových složkách byla ještě sledována reaktivita s rostlinným lektinem WGA, který měl reagovat s volnými koncovými zbytky N-acetylglukosaminu. Kontrolní pokus se potvrdil a reaktivita byla opět zvýšená po opracování sacharidovými dendrimery.

V získané frakci membránových glykoproteinů, jsme považovali za účelné identifikovat povahu proteinových nosičů, na nichž byly navázané oligosacharidové komponenty reaktivní se zkoumanými lektiny. Významnost spočívala v tom, že se mohlo jednat o některé funkčně významné komponenty plasmatických membrán, jejichž aktivita může být regulována právě pomocí připojených oligosacharidových komponent a interagujících receptorů. Analýzou vzorku na MALDI MS byly identifikovány tři proteiny, z nichž měl prioritní význam VDAC protein, iontový kanál pro transport anionů. Tento protein je zodpovědný za eliminaci farmaka z buňky a tím značně ovlivňuje efektivnost jeho účinku na nádorové buňky.

Při použití techniky sacharidových arrayů docházelo u kontrolních buněk P815 k velmi nízké vazbě sledovaných lektinů a to jak rNKR-P1A, tak i rCD69. Nicméně po inkubaci nádorových buněk v přítomnosti sacharidového dendrimeru se výrazně zvýšila. Detailní molekulární analýza vybrané jamky (inkubace s rCD69 značeným rhodaminem) umožnila, pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI, identifikovat strukturu příslušného interagujícího oligosacharidu o molekulové hmotnosti 2358,9 o celkovém sumárním vzorci  $(\text{NeuAc})_1(\text{Sulf})_1(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ .

## 6. ZÁVĚR

- Bylo prokázáno, že povrchová nádorová glykosylace buněčné linie YAC-1 je výrazně nižší než u buněčné linie P815.
- Byla dokázána zvýšená reaktivita YAC-1 i P815 buněk s lektinem NKR-P1A u buněk opracovaných dendrimery.
- Podařilo se identifikovat významný protein VDAC, iontového kanálu pro aniony.
- Podařilo se identifikovat interagující oligosacharid o sumárním vzorci  $(\text{NeuAc})_1(\text{Sulf})_1(\text{Hex})_4(\text{HexNAc})_2(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ .

## 7. SEZNAM LITERATURY

- <sup>1</sup> Kolektiv autorů: Biochemie: Základní kurz, Karolinum Praha (2001).
- <sup>2</sup> Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.: Základy buněčné biologie Úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing Ústí nad Labem (1998).
- <sup>3</sup> Klener, P.: Protinádorová chemoterapie, Galén Praha (1996).
- <sup>4</sup> Vepřek, P., Hajdúch, M., Džubák, P., Kuklík, R., Poláková, J., Bezouška, K.: *J. Med. Chem* **49**, 6400-6407 (2006). Comblike dendrimers containing Tn antigen modulate natural killing and induce the production of Tn specific antibodies.
- <sup>5</sup> Stiborová, M.: Mechanismus chemické kancerogeneze, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie (2008).
- <sup>6</sup> Aarnoudse, C.A., Vallejo, J.J.G., Saeland, E., Kooyk, Y. van: *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 105-111 (2006). Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells.
- <sup>7</sup> Říhová, B.: *Vesmír* **82**, 498 (2003). Polymerní cytostatika.
- <sup>8</sup> [http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/2\\_Lhotak.pdf](http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/2_Lhotak.pdf), staženo dne 27.4.2008
- <sup>9</sup> Buhleier, E., Wehner, W., Vögtle, F.: *Synthesis* **1978**, 155-158 (1978). „Cascade“ – and „nonskid-chain-like“ synthese of molecular cavity topologies.
- <sup>10</sup> Newkome, G.R., Yao, Z., Baker, G.R., Gupta, V.K.: *J. Org. Chem.* **50**, 2003-04 (1985)  
Newkome, G.R., Moorefield, C.N., Vögtle, F.: *Dendrimers and dendrons: Concepts syntheses, applications*, Wiley-VCH, Weinheim Germany (2001).
- <sup>11</sup> Vannucci, L., Fišerová, A., Sadalpure, K., Lindhorst, T.K., Kuldová, M., Rossmann, P., Horváth, O., Křen, V., Krist, P., Bezouška, K., Luptovcová, M., Mosca, F., Pospíšil, M.: *Int. J. Oncol.* **23**, 285-296 (2003). Effects of N-acetyl-glucosamine-coated glycodendrimers as biological modulators in the B16F10 melanoma model in vivo.
- <sup>12</sup> Krist, P., Vannucci, L., Sadalpure, K., Patel, A., Bezouška, K., Pospíšil, M., Kuzma, M., Lindhorst, T.K., Petruš, L., Křen, V.: *ChembioChem.* **5**(4), 445-452 (2004). Fluorescent labelled thiourea-bridged glycodendrons.
- <sup>13</sup> Bartůňková, J., Hořejší, V.: *Základy imunologie*, Triton Praha (1998).
- <sup>14</sup> Bezouška, K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69**, 535-563 (2004). Carbohydrate and non-carbohydrate ligands for the C-type lectine-like receptors of natural killer cells a review
- <sup>15</sup> Bezouška, K.: Proteomika – nejdůležitější projekty a perspektivy, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra Biochemie (2008).
- <sup>16</sup> <http://www.er.xf.cz/view.php?cislocianku=2006020004>, staženo dne 27.4.2008
- <sup>17</sup> [http://www.img.cas.cz/mi/prednasky/Molekularni\\_Imunologie\\_3\\_NKR.pdf](http://www.img.cas.cz/mi/prednasky/Molekularni_Imunologie_3_NKR.pdf), staženo dne 27.4.2008

<sup>18</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Natural\\_killer\\_cell#History\\_and\\_discovery](http://en.wikipedia.org/wiki/Natural_killer_cell#History_and_discovery), staženo dne 27.4.2008

<sup>19</sup> Benson, V., Fišerová A., osobní sdělení.

<sup>20</sup> Jin, Y.L., Albers, M.W., Lane, W.S., Bierer, B.E., Schreiber, S.L., Burakoff, S.J.: Proc. Natl. Acad. Sci USA **88**, 6677-6681 (1991). Molecular cloning of a membrane-associated human FK506- and rapamycin-binding protein, FKBP-13.

<sup>21</sup> Krist, P., Herkommerová-Rajnochová, E., Rauvolfová E., Semeňuk, T., Vavrušková, P., Pavlíček, J., Bezouška, K., Petruš, L., Křen V.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **287**, 11-20. Towards an optima oligosaccharide ligand for rat natural killer cell activation receptor NKR-P1A.

<sup>22</sup> Pavlíček, J., Kavan, D., Pompach, P., Novák, P., Lukšan, O., Bezouška, K.: Biochem. Soc. Trans. **32**, 1124-1126 (2004). Lymphocyte activation receptors: new structural paradigms in group V of C-type animal lectins.

<sup>23</sup> Christoffi, G.: Fluorescence labeling of NK cell receptors for binding studies. Bakalářská práce, UK PŘF Praha, katedra biochemie (2006).

<sup>24</sup> Glycoprotein Detection Kit, User's manual. Firemní literatura GE Healthcare.

<sup>25</sup> Naka, R., Kamoda, S., Ishizuka, A., Kinoshita M., Kakehi K.: J. Proteome Res. **5**, 88-97 (2006). Analysis of total *N*-glycans in cell membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography.

<sup>26</sup> Yoshima, H., Takasaki, S., Kobata, A.: J. Biochem. **88**, 241-246 (1980). Asparagine-linked sugar chains of glycoproteins in calf thymocyte plasma membrane, Isolation and fractionation of oligosaccharides liberated by hydrazinolysis.

<sup>27</sup> Bezouška, K., Yuen, C.-T., O'Brien, J., Childs, R.A., Chai, W., Lawson, A.M., Drbal, K., Fišerová, A., Pospíšil, M., Feizi, T: Nature **372**, 150-157 (1994). Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cell and cytotoxicity.



Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

<b>Jméno a příjmení Adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>