

219

Výzkum změn povrchové nádorové
glykosylace u nádorů opracovaných
sacharidovými dendriméry



Jiří Vondráček

Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška,
DSc.

Přírodovědecká fakulta
University Karlovy v Praze
2007

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

V Praze dne 12. srpna 2007

.....
Jiří Vondráček

Poděkování

Chtěl bych tímto poděkovat za odborný dohled i pomoc mého školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky DSc., jakožto i celému osazenstvu Laboratoře architektury proteinů sektoru imunologie a gnotobiologie MBÚ AV ČR v Krči.

| | |
|---|---------------|
| 1. TEORETICKÝ ÚVOD | - 5 - |
| 1.1. POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE | - 5 - |
| 1.2. GLYKOSYLACE | - 5 - |
| 1.3. POVRCHOVÁ NÁDOROVÁ GLYKOSYLACE | - 6 - |
| 1.4. DENDRIMERY | - 7 - |
| 1.4.1. SACHARIDOVÉ DENDRIMERY | - 9 - |
| 1.5. NK BUŇKY | - 9 - |
| 2. CÍLE PRÁCE | - 11 - |
| 3. MATERIÁL A METODY | - 12 - |
| 3.1. MATERIÁL | - 12 - |
| 3.1.1. CHEMIKÁLIE | - 12 - |
| 3.1.2. PUFRY | - 12 - |
| 3.1.3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY | - 12 - |
| 3.2. METODY | - 12 - |
| 3.2.1. PŘÍPRAVA VZORKŮ, ODŠTĚPENÍ N-VÁZANÝCH OLIGOSACHARIDŮ | - 12 - |
| 3.2.2. PŘEČIŠTĚNÍ OLIGOSACHARIDŮ NA OBRÁCENÉ FÁZI | - 13 - |
| 3.2.3. ODSOLENÍ OLIGOSACHARIDŮ NA G-10 | - 14 - |
| 3.2.4. MALDI HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM | - 14 - |
| 3.2.5. ODSOLENÍ OLIGOSACHARIDŮ NA G-15 | - 14 - |
| 4. VÝSLEDKY | - 16 - |
| 4.1. EXPERIMENTÁLNÍ STRATEGIE | - 16 - |
| 4.1.1. ODŠTĚPENÍ N-VÁZANÝCH OLIGOSACHARIDŮ | - 17 - |
| 4.1.2. PŘEČIŠTĚNÍ OLIGOSACHARIDŮ NA OBRÁCENÉ FÁZI | - 17 - |
| 4.1.3. ODSOLENÍ OLIGOSACHARIDŮ NA G-10 | - 18 - |
| 4.1.4. MALDI HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM | - 19 - |
| 4.1.5. ODSOLENÍ OLIGOSACHARIDŮ NA G-15 | - 21 - |
| 4.1.6. MALDI HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM II | - 21 - |
| 5. DISKUZE | - 24 - |
| 6. SOUHRN VÝSLEDKŮ | - 26 - |
| 7. LITERATURA | - 27 - |

1. Teoretický úvod

1.1. Posttranslační modifikace

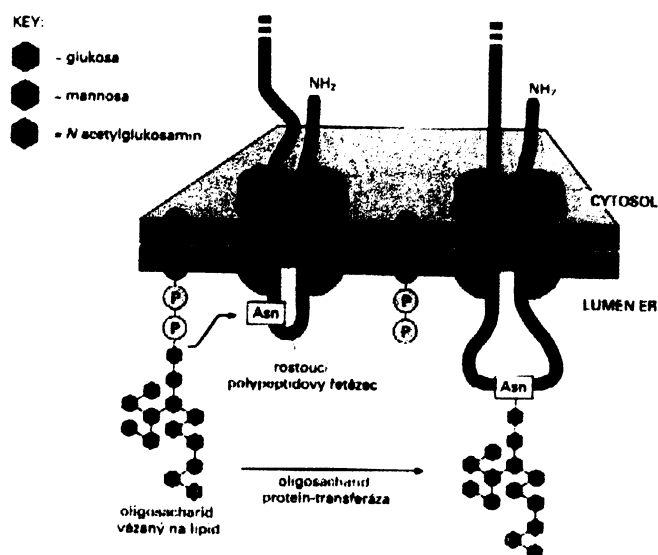
Po biosyntéze proteinu proteosyntézou máme danou bílkovinu v tzv. nascentním formě. V některých případech je však nezbytné, aby proběhly další významné procesy, na nichž se nepodílejí nukleonové kyseliny, a které se souhrnně nazývají posttranslační modifikace¹. Mezi tyto procesy patří i glykosylace.

1.2. Glykosylace

Glykosylace je jednou z nejvýznamnějších modifikací biologicky aktivních látek. Umožňuje konverzi lipofilních látek na hydrofilní, mění nejen jejich farmakokinetické vlastnosti (rozpustnost, transport), ale též i farmakodynamické účinky. Jedná se o kovalentní připojení krátkých postranních řetězců oligosacharidů.

Tyto cukry mohou následně plnit rozličné funkce, mohou chránit protein před odbouráváním, zadržovat ho v endoplazmatickém retikulu (dále pouze jen ER), dokud není správně složen, nebo pomáhá při jeho nasměrování do správné organely tak, že slouží jako transportní signál pro zabalení proteinu do správného transportního váčku. Při vystavení na povrchu buňky tvoří oligosacharidy část glykokalyxu a mohou se uplatnit při vzájemném rozpoznávání buněk².

K tomuto procesu dochází v ER a Golgiho aparátu (Golgi), a to za pomoci účinn-



ku vysoce specifických enzymů, jenž se nazývají glykotransferázy. Tyto enzymy rozlišují nejen substrát, ale i strukturu, na níž má být substrát vázán. K připojení cukrů dochází ve dvou fázích.

V první fázi vzniká v řadě dílčích reakcí aktivované oligosacharidové jádro, které je připojeno na vysokomolekulární

Obrázek 1: Glykosylace proteinu v ER téměř ihned po svém vstupu do lumen ER je polypeptidový řetězec glykosylován přidáním oligosacharidového postranního řetězce k určitým asparaginům²

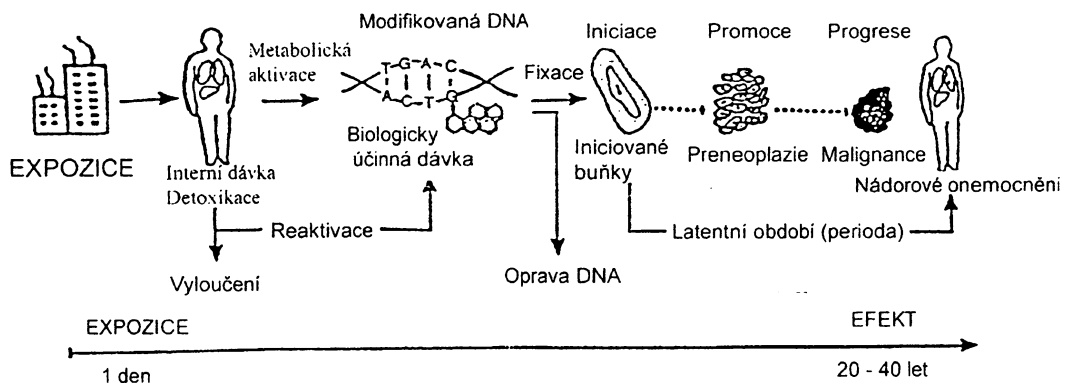
lipidový přenašeč – dolichol (viz Obrázek 1, str. 3).

V druhé fázi je toto oligosacharidové jádro přenášeno na protein. A to přesně na aminoskupinu (-NH₂) asparaginového postranního řetězce. K této vazbě dochází již v membránové části ER, kdy část proteinu je ještě syntetizována. Po dokončení proteosyntézy je nascentním glykoprotein transportován do Golgi, kde je sacharidová část dokončována, především odštěpením glukosových zbytků (účinkem glukosidas) a různého počtu mannosových zbytků (mannosidasami)¹.

Oligosacharidové postranní řetězce připojené v proteinu k aminoskupině asparaginu se označují jako N-vázané (vázáno N-glykosidovou vazbou), pakliže se váží tzv. O-glykosidovou vazbou je připojení na hydroxyskupinu threoninu či serinu. N-vázané představují zdaleka nejběžnější způsob spojení ve známých glykoproteinech.

1.3. Povrchová nádorová glykosylace

Během poslední fáze kancerogeneze, tedy ve fázi progresu (viz Obrázek 2) , kdy nastává konečná přeměna, do té doby částečně kontrolovaného růstu benigního nádoru na růst nekontrolovaný, vzniká tedy maligní nádor, který prochází i do sousedních tkání a ničí je³, dochází k pozměnění glykosylace.



Obrázek 2: Schéma víceetapového procesu kancerogeneze³

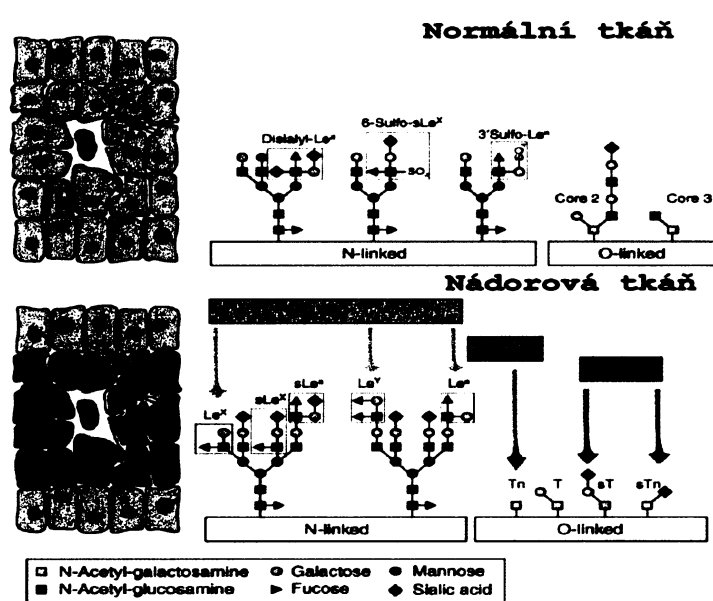
Nejčastější změnou v glykosylaci je zvýšení rozvětvení u N-glykosidicky vázaných glykoproteinů (viz Obrázek 3, str. 5)⁴, což má za následek zvýšení apoptózy buňky. Tato změna je indukována různými druhy nádorů.

Další často pozorovatelnou změnou je zvýšená exprese antigenů Lewis-typu, jako je sialyl-Lewis^X, sialyl-Lewis^a a Lewis^X, přičemž epitopy sialyl-Lewis^X a sialyl-Lewis^a jsou běžně používány jakožto indikátory v histologických diagnostikách různých

typů rakovin. Toto zvýšená syntéza těchto látek utlumuje naopak exprese normálních epiteliálních glykanů. Projevuje se převážně u nádoru epitelů⁴.

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 mucínech plic a střeva jako MUC1, nesoucí strukturu O-vázaného N-Acetyl galaktosaminu s buď β -1,3-galaktosou a β -1,6-N-Acetyl glukosaminem (core 2), či β -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)⁴.



Obrázek 3: Změny v glykosylaci během maligní transformace⁴ (a) Normální epitelové buňky plic a střeva, (b) Buňky po maligní transformaci

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

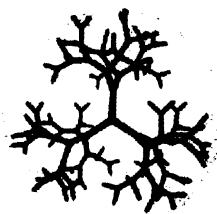
buňky zdravé.

S takto získanou selektivitou lze zaměřit účinek léčiva na cílovou (poškozenou) tkáň, buňku a co nejvíce tak omezit nežádoucí účinky léčiva na zdravé tkáně. Jakožto nosiče těchto léčiv byla vyvinuta celá řada typů založených na rozpustných polymezech, nanočásticích a liposomech. Získaný komplex léku a nosiče se zcela mění vlastností 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 nádorům, jsou jimi např. dendrimery.

1.4. Dendrimery

Dendrimery jsou jednou ze skupin materiálů užívaných ve výzkumu systémů transportu léčiv. Stále přibývá možností jejich využití ve farmaceutickém, lékařském a biomedicínckém inženýrství.

Dendritické struktury byly objeveny jako nová třída polymerů. Prvně se o nich zmínil Vögtle⁵ 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. Slovo dendrimer bylo přijato jako název těchto struktur.

Obrázek 4: Grafické znázornění možné dendrimerní struktury

Dendrimery jsou pravidelně se větvící sloučeniny s variabilním složením, strukturou, molekulovou vahou, povrchovými skupinami, mocenstvím, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a biologickou aktivitou. Na rozdíl od polymerů se jedná o přesně definované molekuly s unikátní stavbou a přesnou molekulovou hmotností (viz Obrázek 4).

Význam dendrimerů tkví zejména v unikátních strukturních vlastnostech. Výhody, které dendrimery nabízejí jako základní stavební jednotky lze shrnout v několika bodech:

- 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 strukturou,
- 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 "řídít" 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)

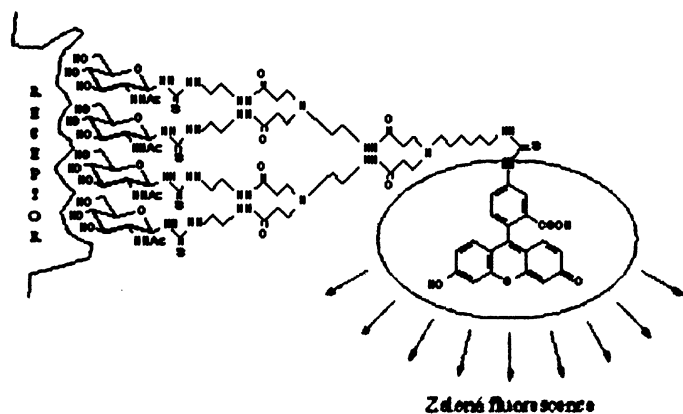
Jedním z druhů dendrimerů jsou sacharidové dendrimery.

1.4.1. Sacharidové dendrimery

Nové epitopy, které jsou exprimovány v ER v důsledku nádorového bujení (viz nádorové změny glykosylace) jsou přenášeny glykoproteiny s vysoce multivalentními sacharidovými strukturami, ty se dají účinně nahradit sacharidovými dendrimery⁶.

Po inkubaci nádorových buněk s dendrimery dochází k jejich přenosu do Golgi a ovlivní se tak povrchová nádorová glykosylace.

Dalším možným využitím je označení nádorových buněk fluorescenční značkou a zaměření tak nádoru k další léčbě (viz Obrázek 5 a 6)⁷.



Obrázek 5: Sacharidový dendrimer s fluorescenční značkou



Obrázek 6: Nádorová tkáň pod mikroskopem po inkubaci sacharidových dendrimerů s fluorescenční značkou

1.5. NK buňky

Tyto buňky byly objeveny roku 1975 a definovány jako neadherentní, nefagocytující buňky a jsou součástí nespecifické imunity, jelikož nemají antigenně specifické receptory.

O vývojové blízkosti T lymfocytů a NK buněk svědčí exprese společných membránových antigenů (CD34, CD16) zejména v časných vývojových stádiích. NK buňky se oddělují od T lymfocytární linie.

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

NK buňky jsou klíčové při ochraně před cizorodými prvky. Zabíjejí buňky, které se snaží uniknout cytotoxickým T buňkám tím, že potlačují expresi MHC glykoproteinů I. třídy na svém povrchu⁸. 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 dozoru a kontrole rozvoje metastáz. 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 dřene.

Pokud však NK buňka narazí na normální buňku, přechodně se na ni naváže pomocí řady nescifických adhesivních 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. Tím se NK buňky stávají velmi důležitým nástrojem imunitního systému zejména z hlediska, že mohou rozpoznávat a eliminovat nádorově, či virově infikované buňky se změněnou povrchovou expresí MHC glykoproteinů, které zpravidla nejsou dobře rozpoznávány cytotoxickými CD8⁺ 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 adhezní molekula v homotypických adhezních interakcích. Mimo hematopoetickou tkáň je bohatě obsažena v nervové tkáni a je označována jako NCAM-1 (neural cellular adhesion molecule-1).

2. Cíle práce

- Odštěpení N-glykosidicky vázané oligosacharidy z plasmatických membrán a jejich přečištění
- Získání profilů N-glykanů sledované hmotnostní spektrometrií MALDI

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

| | |
|--|------------------------|
| SDS (10%, Denat.) | Jersey Lab Supply, USA |
| 2-merkaptoethanol (10%) | |
| Roztok NP40 | |
| Acetonitril (5%, 20%, 10%, hypergrade) | Merck, Německo |
| LiChoprep RP-18 (20 µm) | Merck, Německo |
| Sephadex G-10 | Merck, Německo |
| Sephadex G-15 | Merck, Německo |

3.1.2. Pufry

| | |
|----------------|--|
| Fosfátový pufr | NaCl, KCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O, pH = 7,4 |
|----------------|--|

3.1.3. Přístroje a pomůcky

| | |
|--|----------------|
| Centrifuga Spectrofuge 16M | Edison, USA |
| Analytické váhy | AND, USA |
| Automatické pipety | Gilson, USA |
| Chladnička | Whirpool, USA |
| Vysokotlaká skleněná kolona | Merck, Německo |
| HPLC Beckman BioSys 510 Protein Purification | Beckman, USA |

3.2. Metody

3.2.1. Příprava vzorků, odštěpení N-vázaných oligosacharidů

K dispozici byly 4 vzorky buněčných membránových frakcí sestávající se ze 2 typů nádorových buněk. Jednalo se YAC-1 buňky, které jsou sensitivní na NK zabíjení a P815 buňky, které jsou naopak resistantní na NK zabíjení. Oba druhy byly dále roz-

členěny do dvou vzorků (tedy dohromady do 4) a to membránové frakce buněk, které nebyly opracovány dendrimery a posloužily tedy jakožto kontrola a membránové frakce buněk, které byly inkubovány s dendrimery typu GlcNAc octaPAMAM (v koncentraci 10^{-6} mol/l) po dobu jednoho týdne a byly jimi tedy opracovány.

K odštěpení N-vázaných oligosacharidů bylo použito následujícího postupu (viz tab.1, str. 11). Ke každému vzorku po 400 μ l (resuspendováno v dest. H₂O) bylo přidáno 400 μ l vodného roztoku obsahující 10% SDS pufr a 10% 2-merkptoethanol, v poměru 1:1. Tato směs se ponořila na dobu 10 minut. do vařící vody a po ochlazení se k ní přidalo 20 μ l roztoku NP40 a 20 μ l fosfátového pufru (pH 7,5).

Po přidání štěpícího enzymu N-glykanasa (EC 3.2.2.18, peptid-N4-(N-acetyl- β -glucosaminy) asparagin amidasa) (2 μ l) byla směs inkubována v 37°C přes noc. Následující den po proběhnutí enzymové reakce se směs opět vložila na dobu 10 minut do vařící vody a poté centrifugována 5000 x g po 10 minut. Supernatant byl sesbírán a vysušen k dalšímu použití⁹. Tento postup byl uplatněn u každého vzorku.

Takto získané vzorky je nutno dále přečistit.

| Membr. frakce (400 μ l) | Denat. 10% SDS, 10% 2-SH-EtOH | Var (10 min.) | NP40 | Fosf. pufr | N-glyc. | 37°C, (noc) | Var (10 min.) |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------|------------|------------|-----------|-------------|---------------|
| YAC-1 control | 200 μ l | ✓ | 20 μ l | 20 μ l | 2 μ l | ✓ | ✓ |
| YAC-1 dendrimer | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| P815 control | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| P815 dendrimer | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

Tabulka 1: Odštěpení N-vázaných oligosacharidů; membr. frakce – membránové frakce, con. - neopracované dendrimerem, pre. – opracované dendrimerem; Fosf. pufr – fosfátový pufr (pH 7,5); N-glyc. – enzym N-glykanasa

3.2.2. Přečištění oligosacharidů na obrácené fázi

Vysušené vzorky byli resuspendováni ve 150 μ l 5% acetonitrilu ve vodě, stočeny na Spectrafuge 16M Labnet. Separace látek probíhala na koloně Superformance (Merck) o rozměrech 1x9 cm, o objemu 7,1 ml, naplněná látkou LiChoprep RP-18 (5-20 μ m) Merck. Detekce probíhala při vlnové délce 210 nm s rozlišením 0,2 AUFS a s průtokem 1 ml/min. Sbíráno manuálně. Solventem A pro obrácenou fázi byl 5% acetonitril (hypergrade Merck) ve vodě a solventem B 90% acetonitril (hypergrade Merck) ve vodě.

Nástřik byl v množství 100 μ l a program separace byl 10 minut 0% solventu B, posléze 10 minut 0 \rightarrow 100% solventu B, 10 minut 100% solventu B a 0,1 minuty 100 \rightarrow 0% solventu B.

Vše bylo prováděno na přístroji HPLC Beckman BioSys 510 Protein Purification, vybaveného dvěma hlavami pump (Biopreparative Liquid Head) a UV lampou.

Takto získané vzorky byli opět usušeny a volné k dalšímu použití.

3.2.3. Odsolení oligosacharidů na G-10

Vysušené vzorky byli opět resuspendovány ve 100 μ l 10% acetonitrilu ve vodě, stočeny na Spectrafuge 16M Labnet. Separace látek probíhala na koloně Superformance (Merck) o rozměrech 1x29,5 cm, o objemu 23 ml, naplněná látkou Sephadex G-10 Merck. Detekce probíhala při vlnové délce 210 nm s rozlišením 0,1 AUFS a s průtokem 0,4 ml/min. Sbíráno manuálně. Solventem byl 10% acetonitril (hypergrade Merck) ve vodě. Byla měřena i konduktivita.

Nástřik byl v množství 100 μ l a program separace byl 60 minut 50% solventu.

Vše bylo prováděno na přístroji HPLC Beckman BioSys 510 Protein Purification, vybaveného dvěma hlavami pump (Biopreparative Liquid Head) a UV lampou.

Takto získané vzorky byli opět usušeny a dány k použití na hmotnostní spektrometrii.

3.2.4. MALDI Hmotnostní spektrum

Vzorky byli předány k MALDI hmotnostní spektrometrii, která byla provedena zkušeným operátorem Mgr. Petrem Pompachem PhD. Pozitivní detekcí.

3.2.5. Odsolení oligosacharidů na G-15

Vysušené vzorky byli opět resuspendovány ve 100 μ l 5% acetonitrilu ve vodě, stočeny na Spectrafuge 16M Labnet. Separace látek probíhala na koloně Superformance (Merck) o rozměrech 1,6x60 cm, o objemu 120 ml, naplněná látkou Sephadex G-15 Merck. Detekce probíhala při vlnové délce 210 nm s rozlišením 0,1 AUFS a s průtokem 2 ml/min, s úpravou na 1 ml/min pro vzorek 3. Sbíráno manuálně. Solventem byl 5% acetonitril (hypergrade Merck) ve vodě. Byla měřena i konduktivita.

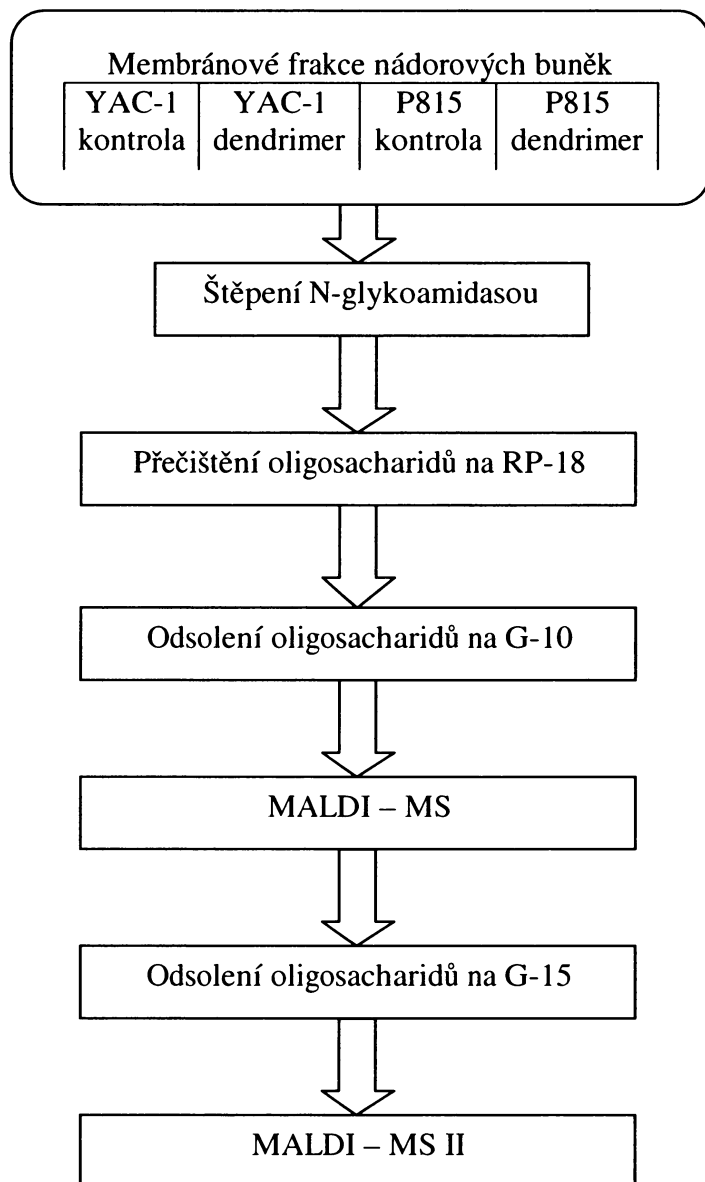
Nástřik byl v množství 100 μ l a program separace byl 60 minut 50% solventu.

Vše bylo prováděno na přístroji HPLC Beckman BioSys 510 Protein Purification, vybaveného dvěma hlavami pump (Biopreparative Liquid Head) a UV lampou.

Takto získané vzorky byli opět usušeny a dány k použití na MALDI hmotnostní spektrometrii II.

4. Výsledky

4.1. Experimentální strategie



Obrázek 7: Experimentální strategie bakalářské práce

Analýza všech povrchových nádorových oligosacharidů je velmi složitá a vyžaduje jak velká množství výchozího materiálu, tak také použití velmi specifických experimentálních technik¹⁰. Většinou proto nelze sledovat všechny formy těchto sacharidů, ale je třeba se soustředit pouze na některé.

Ve své práci jsem se soustředil pouze na získání N-glykosidicky vázaných oligosacharidů, protože jsou k dispozici zkušenosti z literatury od různých autorů.

Mnou navržená experimentální strategie (obrázek 7, str. 13) vycházela jednak z publikovaných postupů⁹ a jednak z experimentálních možností laboratoře. Celý postup zahrnuje odštěpení oligosacharidů z již připravených buněčných membrán, jejich přečištění a odsolení pomocí HPLC a konečná MALDI analýza.

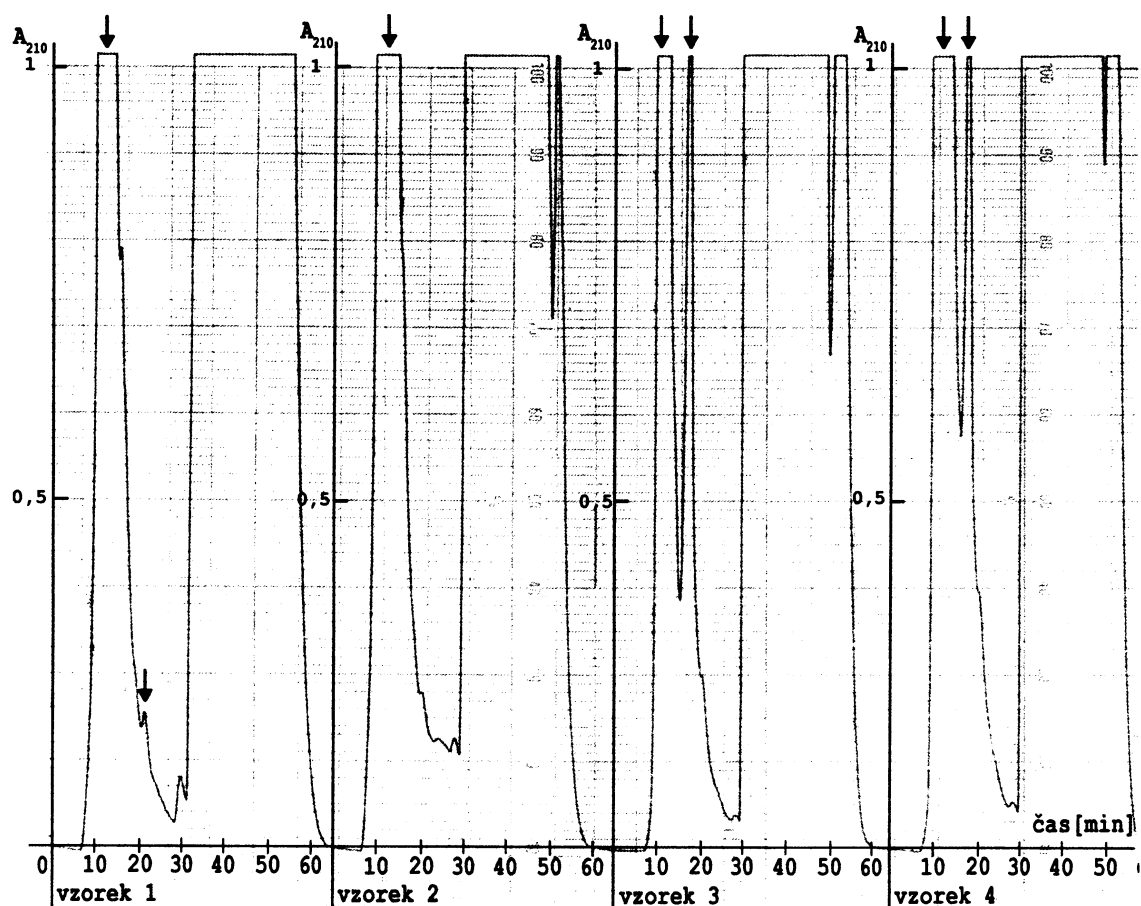
4.1.1. Odštěpení N-vázaných oligosacharidů

Po odštěpení N-glykoamidasy získáváme velmi znečištěné vzorky obsahující odštěpené oligosacharidy, reakční pufr, přídavné detergenty, zbytky plasmatických membrán atd. Získání kvalitních analytických dat z takto komplexních vzorků je kriticky závislé na jeho správném přečištění, které je většinou mnohostupňové.

4.1.2. Přečištění oligosacharidů na obrácené fázi

Začíná chromatografií na obrácené fázi se silikagelem C18 (oktadeyl), na němž se hydrofilní látky (oligosacharidy, soli) nevážou, ale detergenty a lipidy ano.

Jednotlivé vzorky byly sbírány ručně (viz metodika) a na chromatogramu jsou jejich píky znázorněny černou šipkou (viz obrázek 8, strana 16).

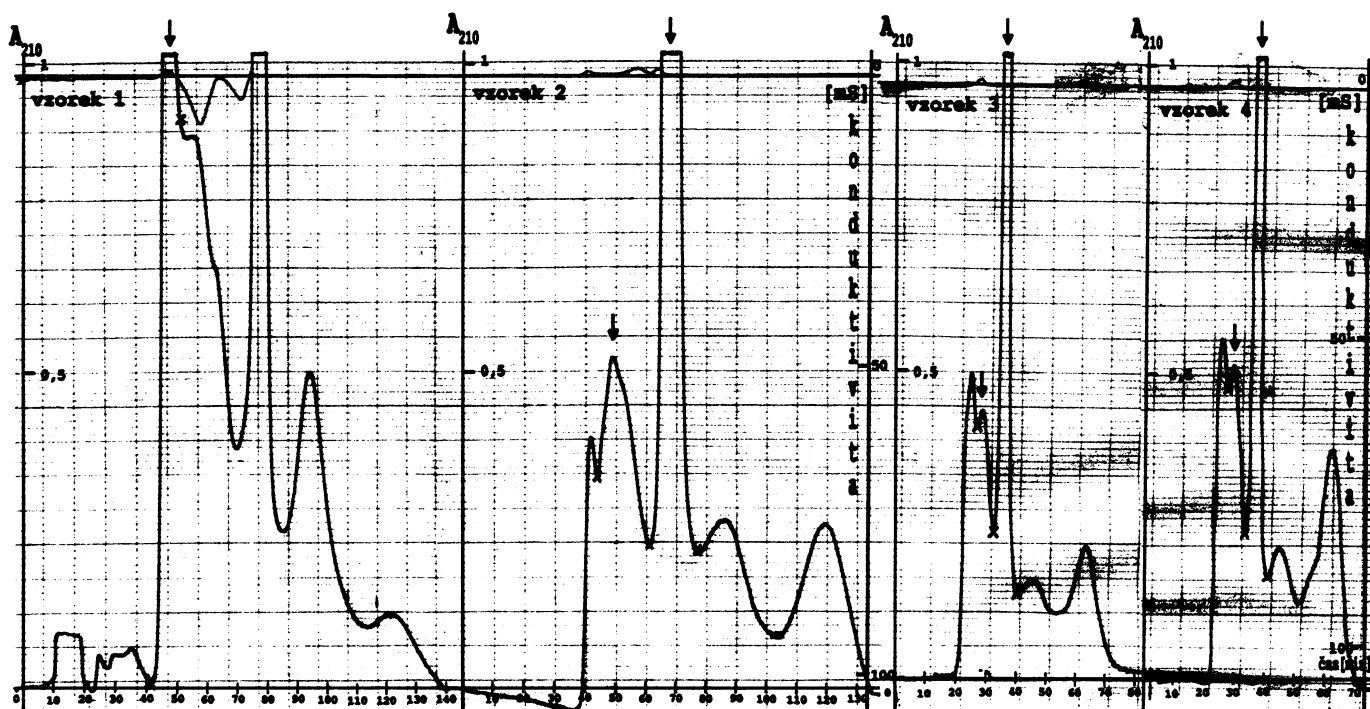


Obrázek 8: Přechištění extrahovaných oligosacharidů chromatografií na obrácené fázi. Kolona Li-ChoPrep RP-18 (1x9 cm) byla ekvilibrována v 5% acetonitrilu a po nanesení a vymytí nezachycených látek byla kolona regenerována 90% acetonitrem. Černá šipka ukazuje píky sbíraných vymytých oligosacharidů.

4.1.3. Odsolení oligosacharidů na G-10

Takto získané vzorky však jsou sice částečně přechištěny, avšak stále obsahují námi nechtěné soli, proto bylo nutné přistoupit k dalšímu odsolení tentokrát na koloně Sephadexu G-10, kde byla kromě měření absorbance změřena i konduktivita, jejíž vysoké hodnoty ukazují na vylučování solí. Proto při zvýšení konduktivity (červená linie, v horní části grafu, viz obrázek 9, strana 17) byl ruční sběr přerušen (viz červené křížky). Černé šipky opět ukazují píky na chromatogramu ty frakce které byly brány.

Získané frakce byly usušeny a dále použity pro identifikaci oligosacharidů hmotnostní spektrometrií MALDI.



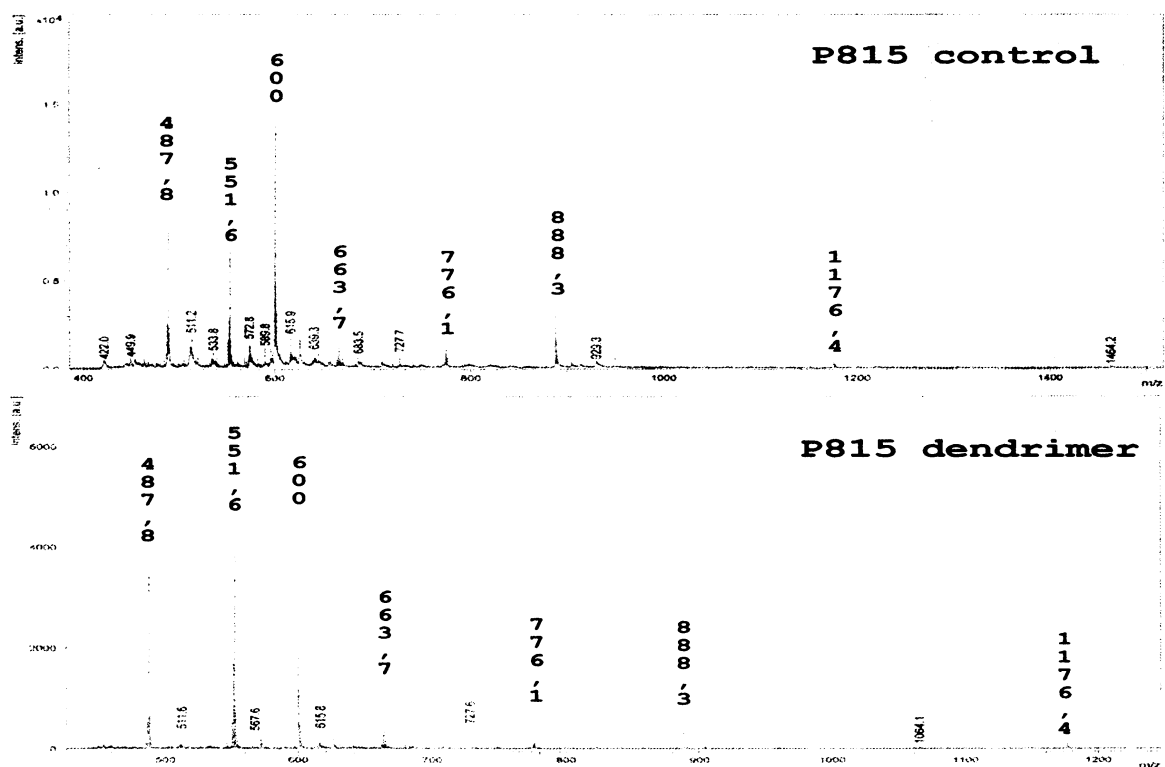
Obrázek 9: Odsolení směsi oligosacharidů na koloně Sephadex G-10 (1x29,5 cm) Frakce odsolených oligosacharidů (nízká konduktivita, značená červeně v horní části grafu) je označena u každého vzorku černou šipkou a byla brána od místa označeného červeným křížkem do místa označeného stejně.

4.1.4. MALDI Hmotnostní spektrum

Identifikací hmotnostního spektra MALDI, v pozitivním módu, jsme dostali kvantitativní vyhodnocení N-glykosidicky vázaných oligosacharidů v plasmatických membránách kontrolních a experimentálních buněk line P815 (tabulka 2, strana 18), která vycházela ze získaných spekter (obrázek 10, strana 18).

Jednotlivé molekuly oligosacharidů o daných molekulových hmotnostech jsou vyznačeny tmavě a jejich kvantitativní vyhodnocení vychází z velikosti největšího píku (molekulová hmotnost 600), jehož velikost byla vzata jako velikost 1.

Procentuální zastoupení úbytku, či přibytku jednotlivých oligosacharidů byla brána velikost píku line P815 control jako 100% a její změna značí daný rozdíl.



Obrázek 10: MALDI spektrum odsolených oligosacharidů připravených z kontrolní nádorové linie P815 (horní část) a z těžce nádorové linie opracované dendrimery (spodní část).

| Skupina | Struktura | Molek. hmotnost | P815 control | P815 dendrimer | úbytek/příbytek |
|---------|---|-----------------|--------------|----------------|-----------------|
| Jádro 1 | NeuAc α 2-6GalNAc | 551,7 | 0,45 | 0,98 | +117% |
| | Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc | 727,6 | 0,06 | 0,03 | -50% |
| Jádro 2 | Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6) GalNAc | 600 | 1 | 1 | 0% |
| | Gal β 1-3(NeuAc α 2-6GlcNAc β 1-6)GalNAc | 888,2 | 0,26 | 0,04 | -75% |
| | NeuAc α 2-6Gal β 1-3(NeuAc α 2-6GlcNAc β 1-6)GalNAc | 1176,4 | 0,03 | 0,01 | -67% |
| | | | | | |
| Jádro 3 | GlcNAc β 2-6GalNAc | 487,8 | 0,6 | 0,85 | +42% |
| | NeuAc α 2-6GlcNAc β 1-6 GalNAc | 776,1 | 0,13 | 0,05 | -62% |

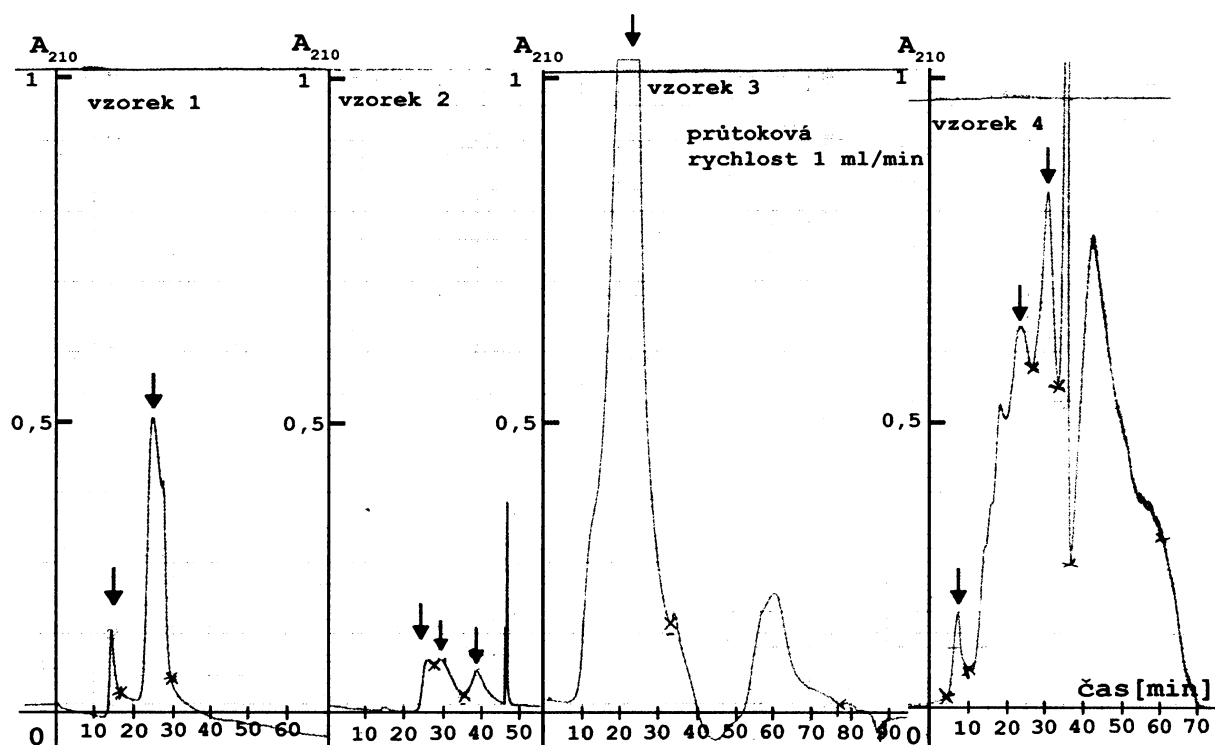
Tabulka 2: Kvantitativní vyhodnocení N-glykosidicky vázaných oligosacharidů v plazmatických membránách kontrolních a experimentálních buněk linie P815

4.1.5. Odsolení oligosacharidů na G-15

Identifikace oligosacharidů hmotnostní spektrometrií MALDI nám ukázala, že se nám podařilo vyextrahovat oligosacharidy pouze o nízkých molekulových hmotnostech, zatímco všechny ostatní, vysokomolekulární, nám zůstali skryty, proto bylo nutno dále přistoupit ještě k jednomu přečištění a odsolení, tentokrát na koloně Sephadex G-15.

Jednotlivé frakce byly sbírány opět ručně a jejich píky jsou označeny na chromatogramu černou šipkou (viz obrázek 11, strana 19), červené křížky značí počátek a konec sběru frakce.

Takto získané směsi byly podstoupeny k identifikaci na hmotnostní spektrometrii MALDI II.



Obrázek 11: Odsolené směsi oligosacharidů na koloně Sephadexu G-15 (1,6x60 cm) Frakce odsolených oligosacharidů (nízká konduktivita v horní části grafu) je označena u každého vzorku černou šipkou, červené křížky značí přerušení a počátek či konec další frakce sběru. Po odpaření byly tyto frakce použity pro identifikaci oligosacharidů hmotnostní spektrometrií MALDI II

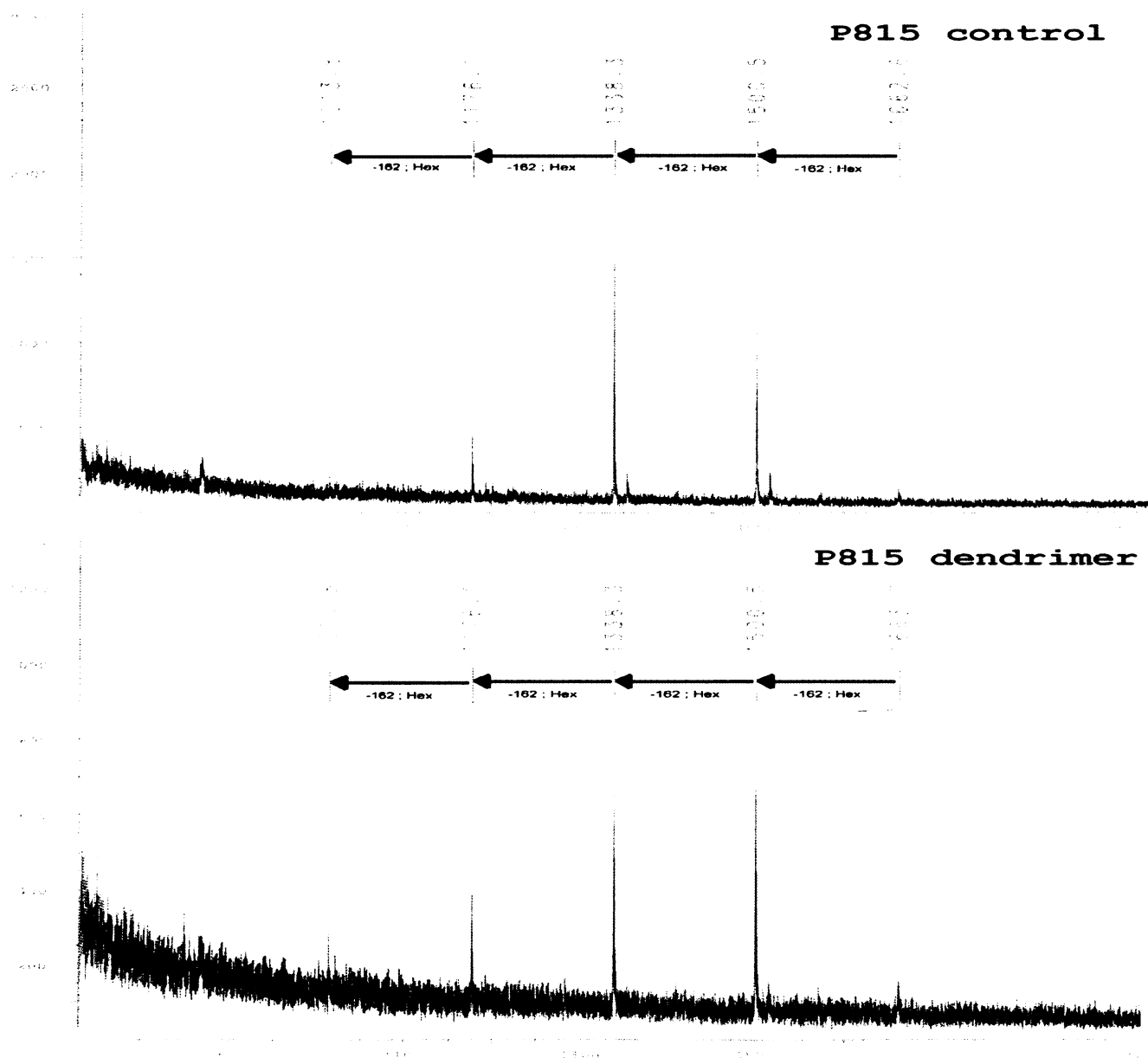
4.1.6. MALDI Hmotnostní spektrum II

Identifikací hmotnostního spektra MALDI, v pozitivním módu, jsme dostali opět kvantitativní vyhodnocení N-glykosidicky vázaných oligosacharidů

v plasmatických membránách kontrolních a experimentálních buněk line P815 (tabulka 3, strana 21), která vycházela ze získaných spekter (obrázek 12, strana 20).

Jednotlivé molekuly oligosacharidů o daných molekulových hmotnostech jsou vyznačeny tmavě a jejich kvantitativní vyhodnocení vychází z velikosti největšího píku (molekulová hmotnost 1338,3), jehož velikost byla vzata jako velikost 1.

Procentuální zastoupení úbytku, či příbytku jednotlivých oligosacharidů byla brána velikost píku linie P815 control jako 100% a její změna značí daný rozdíl.



Obrázek 12: MALDI spektrum II odsolených oligosacharidů připravených z kontrolní nádorové linie P815 (horní část) a z téže nádorové linie opracované dendrimery (dolní část).

Jak je vidět na příslušném spektru (obrázek 12, strana 19) jednotlivé oligosacharidy se od sebe liší vždy o změnu molekulové hmotnosti 162, což přísluší odštěpenému zbytku hexosy.

| Struktura | Molek. hmotnost | P815 control | P815 dendri-mer | úbytek/ příbytek |
|---|------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|
| Hex-HexNAC ₄ | 1013,8 | 0,19 | 0,48 | +152 % |
| Hex ₂ -HexNAC ₄ | 1176,1 | 0,32 | 0,59 | +84 % |
| Hex ₃ -HexNAC ₄ | 1339,4 | 1 | 1 | 0 % |
| Hex ₄ -HexNAC ₄ | 1501 | 0,82 | 1,02 | +24 % |
| Hex ₃ -Fuc ₁ -HexNAC ₄ -Sul ₁ | 1662,4 | 0,1 | 0,25 | +150 % |

Tabulka 3: Kvantitativní vyhodnocení N-glykosidicky vázaných oligosacharidů v plazmatických membránách kontrolních a experimentálních buněk line P815 pro MALDI spektrum II

5. Diskuze

Klasickou chemoterapii většiny nádorových onemocnění pomocí dostupných a v klinické praxi používaných léčiv doprovází řada nežádoucích toxických účinků. To omezuje možnosti účinné léčby použitím vysokých dávek cytotoxického léčiva, jež by bylo potřeba pro dosažení úplného terapeutického účinku.

V moderní léčbě nádorových onemocnění se dnešní věda snaží nalézt cesty jak dosáhnout u jednotlivých léčiv, jednak vysoké farmakologické inaktivity, nebo-li o ochranu celého systému léčiv před rychlou eliminací z organismu, jednak nízké cytotoxicity pro zdravé buňky (tkáň) a především o co nejvyšší specifičnost a selektivitu daného léčiva pro danou nádorovou tkáň.

Mnohé výzkumné skupiny se, po poznání patologických mechanismů nádorového bujení, věnují vývoji léčiv s cílem zaměřit cytotoxický účinek kancerostatika především na nádorovou tkáň a to způsobem navázání nosičů léčiv, které dokáží rozpoznat právě infikovanou buňku nádoru. Tyto systémy transportu léčiv jsou obvykle makromolekulární nebo superamolekulární struktury (dendrimery, polymerní micely nebo lipozomy) a váží různým způsobem léčivo, které tak získává zcela jiné vlastnosti než má volná forma léku.

K rozpoznání nádorové buňky od zdravé dochází za pomoci mechanismů, které byly popsány výše (viz teoretický úvod) a jsou založeny na rozdílech a změnách exprese jednotlivých látek pro nádorové a zdravé buňky. V mé bakalářské práci jsem se zaměřil právě na identifikaci těchto změn pro nádorové linie P815 a YAC-1, a optimalizaci protokolu postupu extrakce nádorových oligosacharidů jednotlivých linií z povrchových membrán, vycházející z konceptu práce pánů Naky, Kamody, Ishizuky a kol.⁹ notně upravenému podmínkám Laboratoře architektury proteinů prof. Bezoušky na MBÚ AV ČR.

Takto daný postup (viz experimentální strategie) nebyl ještě plně optimalizován a dosud prováděn. Ačkoliv odštěpení N-vázaných oligosacharidů z již připravených buněčných membrán bylo úspěšné, bylo nutné přečištění a odsolení získaných vzorků oligosacharidů na HPLC, v konečné fázi byly vzorky podstoupeny k identifikaci na MADLI hmotnostním spektru, avšak znečištění bylo ještě natolik patrné a množství vzorku natolik malé, že hmotností spektrum linie YAC-1 se nám nepodařilo vůbec získat. Jak ukázalo hmotnostní spektrum linie P815 podařilo se identifikovat pouze nízké

komolekulární oligosacharidy, které jsou pro danou linii jedinečné. K identifikaci vysokomolekulárních oligosacharidů bylo nutno přistoupit k dalšímu odsolení a přečištění vzorků, poté jsme teprve získali žádaná spektra, která opět ukazují specifické N-vázané oligosacharidy pro nádorovou linii povrchových membrán P815.

Závěrem lze shrnout, že daná analýza vyžaduje co největší přesnost a pečlivost, jelikož naše experimentální strategie vyžaduje jak velká množství výchozích vzorků, tak následné znečištění a zasolení je bohužel natolik kritické, že je nutno přistoupit k mnohastupňovým krokům odsolování a přečišťování, což nakonec vede k dalším námi nechtěným ztrátám zkoumaných vzorků.

6. Souhrn výsledků

- V práci byl optimalizován postup k odštěpení N-glykosidicky vázaných oligosacharidů z povrchových membrán linie P815 a YAC-1 a následné přečištění a odsolení na HPLC.
- Byly připraveny vzorky nádorových oligosacharidů k identifikaci na MALDI hmotnostním spektru.
- Byly získány informace o nízkomolekulárních i vysokomolekulárních oligosacharidech specifických pro povrchovou nádorovou membránu linie P815.

7. Literatura

- ¹ Kolektiv autorů: Biochemie, Základní kurz, Karolinum Praha (2001)
- ² Bray, A., Lewis, J., Walter, R.R.: Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky
- ³ Stiborová, M.: Mechanismus chemické kancerogeneze, Přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2007)
- ⁴ Aarnoudse, C.A., Vallejo, J.J.G., Saeland, E., Kooyk, Y. van: Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells, *Curr. Opin. Immunol.* 18:105-111 (2006)
- ⁵ Buhleier, E., Wehner, W., Vögtle, F.: Synthesis 155-158 (1978)
- ⁶ L. Vannucci, A. Fišerová, K. Sadalpure, T.K. Lindhorst, M. Kuldová, P. Rossmann, O. Horváth, V. Křen, P. Krist, K. Bezouška, M. Luptovcová, F. Mosca, M. Pospíšil: Effects of N-acetyl-glucosamine-coated glycodendrimers as biological modulators in the B16F10 melanoma model in vivo. *Int. J. Oncol.* 23, 285-296 (2003)
- ⁷ P. Krist, L. Vannucci, K. Sadalpure, A. Patel, K. Bezouška, M. Pospíšil, M. Kuzma, T.K. Lindhorst, L. Petruš, V. Křen: Fluorescent Labelled Thiourea-bridged Glycodendrons. *ChemBioChem* (2004)
- ⁸ Bezouška, K.: Carbohydrate and non-carbohydrate ligands for the C-type lectine-like receptors of natural killer cells a review, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 69 535-563 (2004)
- ⁹ Naka, R., Kamoda, S., Ishizuka, A., Kinoshita, M., Kakehi, K.: Analysis of total N-glycans in cell membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography, *J. Proteom. Res.*, Vol 5., No. 1, 88-97 (2006)
- ¹⁰ Man, P., Bezouška, K.: Současné trendy v analýze eukaryotických proteomů, glykomů a lipodomů, *Chem. Listy* 100 (2006)