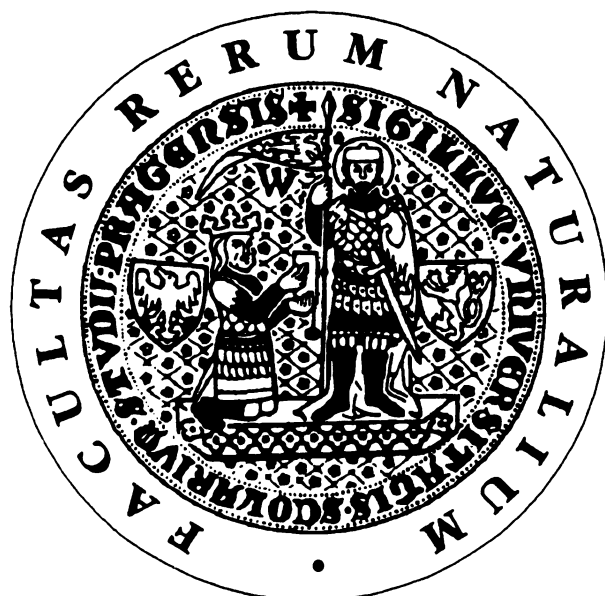


**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra buněčné biologie**

Úloha lektinových receptorů v protinádorové imunitě

Bakalářská práce



Markéta Pražanová

Vedoucí bakalářské práce:

MUDr. A. Fišerová, CSc.

PRAHA 2008

Zde bych chtěla poděkovat své školitelce MUDr. A. Fišerové, CSc. za cenné připomínky a rady při zpracování mé bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky MUDr. A. Fišerové, CSc. za použití uvedených literárních pramenů.

V Praze dne 20.4.2008



.....
Markéta Pražanová

OBSAH:

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	5
KLÍČOVÁ SLOVA	6
KEY WORDS	6
CÍL PRÁCE:.....	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	10
1.1. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ A PROTINÁDOROVÁ IMUNITA.....	10
1.2. TŘI FÁZE NÁDOROVĚ-IMUNITNÍHO USPOŘÁDÁNÍ	10
2. PROTINÁDOROVÁ IMUNITA	11
2.1. BUŇKY PŘIROZENÉ IMUNITY A JEJICH VÝKONNÉ MECHANIZMY	11
2.1.1. NK BUŇKY	12
2.1.2. ANTIGEN PREZENTUJÍCÍ BUŇKY	16
2.2. BUŇKY ADAPTIVNÍ IMUNITY	16
2.3. SYNAPSE JAKO ZÁKLADNÍ PRVEK INTERAKCE IMUNITNÍ A NÁDOROVÉ BUŇKY.....	17
3. NÁDOROVÉ ANTIGENY.....	18
3.1. TYPY NÁDOROVÝCH ANTIGENŮ	18
4. ROZPOZNÁVÁNÍ SACHARIDŮ NA ÚROVNI PŘIROZENÉ IMUNITY.....	21
4.1. RECEPTORY C-TYPŮ LEKTINŮ.....	21
4.2. LEKTINOVÁ DRÁHA KOMPLEMENTU	25
5. PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY ZALOŽENÉ NA SACHARIDECH.....	25
6. ZÁVĚR	28
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	29

ABSTRAKT

Lektinové a lektin-like receptory jsou přítomné na různých typech imunitních buněk, kde vykonávají funkci adhezivních molekul (selektiny) a rozpoznávajících receptorů (MR, NKR-P1, NKG2). Lektin-like molekuly jsou důležitou součástí imunologické synapse (ICAM-1/LFA-1, ICAM-3/DC-SIGN). Jednou z hlavních skupin těchto receptorů je rodina C-typu lektinů. Ligandy lektinových receptorů jsou hlavně terminální oligosacharidy glykoproteinů a glykolipidů na cílových nádorových buňkách. Odlišné zastoupení povrchových glykanů na nádorové tkáni, závislé na aktivitě glykozytransferáz, může být rozpoznáváno imunitním systémem jako cizorodé a společně s peptidovými fragmenty vystaveno na povrchu APC. Následně by měly být spuštěny výkonné mechanismy CTL a NK buněk, které příslušnou nádorovou buňku zabijí. Často však dochází k tomu, že imunitní systém tyto sacharidy považuje za vlastní a nastoluje imunologickou toleranci. V současnosti jsou vyvíjeny různé typy protinádorových vakcín založených na syntetických sacharidech v kombinaci s antigenním peptidem, které tuto toleranci překleňují a jsou schopny vyvolat protilátkovou a buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám.

ABSTRACT

Lectin and lectin-like receptors are present on different types of immune cells. Their function lies in the cell-cell adhesion (selectins) and target cell recognition (MR, NKR-P1, NKG2). The lectin-like molecules form an important part of immunological synapse (ICAM-1/LFA-1, ICAM-3/DC-SIGN). One of the most important groups of receptors belongs to the C-type lectin family. Primary ligands of lectin receptors comprise terminal oligosaccharides of glycoproteins and glycolipids on the surface of target – tumor cells. The surface glycan synthesis and diversity on malignant tissue is determined by the activity of numerous enzymes such as glycosyltransferases. Glycans can be distinguished by the immune system as foreign, and together with peptide fragments displayed on the MHC molecules of the APC, triggering the effector function of CTL and NK cells against the tumor targets. However, it often happens that the immune system recognizes those saccharides as “self”, and the immunological tolerance is established. Recently, various antitumor vaccines based on synthetic saccharides combined with peptide antigens are being developed. They are able to overcome this tolerance and evoke antibody- and cell-mediated immune response to tumor cells.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lektinové receptory, protinádorová imunita, vakcína, povrchová glykozylace, sacharidy

KEY WORDS

Lectin receptors, antitumor immunity, vaccine, surface glycosylation, saccharides

CÍL PRÁCE:

Jedním z mechanismů úspěšného spuštění výkonných funkcí imunitních buněk je rozpoznání pozměněných koncových struktur povrchových glykoproteinů a glykolipidů nádorových buněk. V této práci bych se chtěla zaměřit na problematiku zapojení lektinových receptorů buněk přirozené imunity v rozpoznávání a lyzi nádorových buněk a dále na směřování léčiv na glykanové struktury nádorových buněk, což je v současné době jednou z rychle se rozvíjejících oblastí ve vývoji protinádorových vakcín a terapeutických preparátů.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADCC	protilátkou zprostředkovaná buněčná cytotoxicita (z angl. Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
Ag	Antigen
AIRM-1	(z angl. Adhesion Inhibitory Receptor Molecule-1)
APC	antigen prezentující buňka (z angl. Antigene Presenting Cell)
BDCA	(z angl. Blood DC Antigen)
Ca²⁺	kation vápenatý
CD	diferenční znak (z angl. Cluster of Differentiation)
CEA	karcino-embryonální antigen (z angl. Carcinoma Embryonic Antigen)
CEACAM	(z angl. Carcinoma Embryonic-Antigen-related Cell Adhesion Molecule)
CLR	C-typ lektinového receptoru (z angl. C-type Lectin Receptor)
Clr	(z angl. C-type lectin-related)
CRD	sacharid rozpoznávající doména (z angl. Carbohydrate-Recognition Domain)
CTL	Cytotoxický T lymfocyt
CTLD	(z angl. C-Type Lectin-like Domains)
DCAR	(z angl. DC immuno-Activating Receptor)
DCIR	(z angl. DC ImmunoReceptor)
DC-SIGN	(z angl. Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3 Grabbing Nonintegrin)
DEC-205	(z angl. Dendritic Cell receptor for Endocytosis 205)
Dectin1	(z angl. Dendritic cell associated C-type lectin-1)
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
GnT-V	<i>N</i> -acetylglukosamin transferáza V
Gp49B1	glykoprotein 49B1
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
HLA	Lidský leukocytární antigen (z angl. Human Leukocyte Antigen)
ICAM	mezibuněčná adhezivní molekula (z angl. InterCellular Adhesion Molecule)
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulin G
IL	Interleukin
ILT2	(z angl. Ig-Like Transcript 2)
ITAM	(z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)

ITIM	(z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif)
ITSM	(z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif)
KIR	(z angl. Killer cell Immunoglobulin-like Receptor)
KLH	Keyhole Limpet Haemocyanin
LAIR-1	(z angl. Leukocyte-Associated Ig-like Receptor-1)
Le^y	Lewis ^y
LFA-1	(z angl. Lymphocyte Function-associated Antigen-1)
LLT1	(z angl. Lectin-Like Transcript)
MAC	membránu atakující komplex (z angl. Membrane Attack Complex)
MASP	(z angl. Mannose-binding lectin-Associated Serine Protease)
MBL	manózu vážící lektin (z angl. Mannose-Binding Lectin)
MBP	manózu vážící protein (z angl. Mannose-Binding Protein)
MGL	(z angl. Macrophage-Galactose-type Lectin)
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (z angl. Major Histocompatibility Complex)
MICA	(z angl. MHC class I Chain-related gene A)
MICB	(z angl. MHC class I Chain-related gene B)
MR	manózový receptor (z angl. Mannose Receptor)
MUC1	Mucin 1
NK	přírozený zabíječ (z angl. Natural Killer)
NKR-P1	(z angl. Natural Killer Receptor Protein-1)
PAMP	(z angl. Pathogen-Associated Molecular Pattern)
pDC	(z angl. plasmacytoid DC)
PSA	polysialová kyselina (z angl. Polysialic Acid)
Rae	(z angl. Retinoic acid early inducible)
SIGLEC7	(z angl. Sialic acid-binding Ig-like lectin 7)
sLe^a	sialyl Lewis ^a
sLe^x	sialyl Lewis ^x
sTn	sialylovaný Tn
TCR	T buněčný receptor (z angl. T Cell Receptor)
TF	Thomsen-Friedenreich
TLR	(z angl. Toll-Like Receptor)
TNF	faktor nekrotizující nádor (z angl. Tumor Necrosis Factor)
ULBP	(z angl. UL-16 Binding Protein)

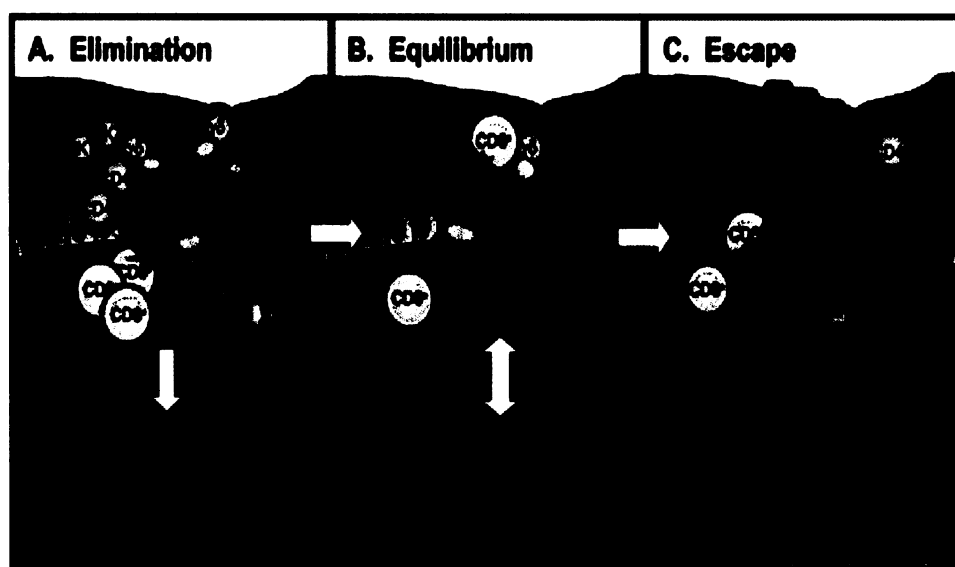
1. Úvod do problematiky

1.1. Nádorová onemocnění a protinádorová imunita

Nádorová onemocnění jsou majoritním světově rozšířeným problémem a jsou jednou z významných příčin nemoci a úmrtnosti dětí a dospělých. Vznikají nekontrolovanou proliferací klonů transformovaných buněk. Nádory rozlišujeme na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní nádor roste pomalu a má tendenci vytlačovat zdravou tkáň, ale nevrůstá do ní. Jeho okolí je ohraničené a léčba spočívá v jeho chirurgickém odstranění. Buňky maligního nádoru prorůstají do svého okolí. Tento proces lze nazvat invazí. Šíření nádorových buněk lymfatickým a krevním oběhem umožňuje vznik sekundárních ložisek, metastáz. Nádor může vzniknout v jakékoliv tkáni, ale nejčastěji vzniká v místech, kde se nejvíce množí buňky nebo kde jsou buňky stimulovány hormony. Růst zhoubného nádoru je dán z velké části proliferací kapacitou nádorových buněk a schopností těchto buněk narušit tkáň hostitele a metastazovat do vzdálených míst. Koncept imunitního dozoru, který navrhl Macfarlane Burnet v roce 1950 uvádí, že fyziologická funkce imunitního systému je rozpoznat a zabít klony transformovaných buněk předtím, než narostou v nádor anebo zlikvidovat nádor poté co se zformuje. K tomuto účelu vyvinuly buňky přirozené i adaptivní imunity různé mechanismy.

1.2. Tři fáze nádorově-imunitního uspořádání

Rozlišujeme 3 základní fáze v interakci hostitele s nádorovou buňkou. Jsou jimi eliminace, rovnováha a únik (Obr. 1). Tento proces se nazývá imunitní uspořádání – „immunoediting“. Imunitní systém může odstranit nádor pouze ve fázi eliminační a fázi rovnovážné a následně vrátit tkáň opět do původního stavu.



OBR. 1: Tři fáze nádorově-imunitního uspořádání: eliminace, rovnováha a únik [podle 1]

V eliminační fázi dochází nejprve k iniciaci odpovědi, kdy buňky přirozené imunity rozpoznávají vznikající nádor a produkci interferonu γ (IFN γ), který odstartuje kaskádu dějů přirozené a adaptivní imunity. To vyvolá smrt některých nádorových buněk imunologickými i neimunologickými mechanismy. Nádorové buňky jsou zabíjeny cytotoxickou aktivitou NK (z angl. natural killer) buněk a aktivovaných makrofágů a jsou pohlcovány dendritickými buňkami, které migrují do lymfatických uzlin. Zde prezentují antigeny (Ag) naivním CD4 a CD8 T lymfocytům, které dozrávají ve specifické CD4 a CD8 T buňky a putují po směru chemokinového gradientu do místa nádoru, kde likvidují nádorové buňky nesoucí příslušné antigeny [shrnutí 2].

2. Protinádorová imunita

2.1. Buňky přirozené imunity a jejich výkonné mechanismy

Jako první se do obranných reakcí obvykle zapojí nespecifické mechanismy. Ty jsou zásadně důležité pro celkový výsledek imunitní reakce. Jsou založeny především na rozpoznání cizorodých chemických struktur, které aktivují výkonné mechanismy buněk nespecifické složky imunitního systému, zejména různé druhy fagocytů, ale i

humorální faktory (komplement). Principiálně důležitou roli zde hrají glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), pomocí kterých jsou na povrchu buněk prezentujících antigen (APC) vystavovány peptidové fragmenty proteinů jimi pohlcených a zpracovaných. Mezi profesionální fagocyty patří zejména neutrofilní granulocyty a monocyty se svojí tkáňovou formou – makrofágy. Zvláštním druhem fagocytujících buněk jsou dendritické buňky, které mají hlavní úlohu ve zpracování a prezentaci antigenu. Zatímco granulocyty jsou schopny vykonávat své efektorové funkce ihned, makrofágy se stávají plně funkčními až po aktivaci signály, které jim poskytují T lymfocyty ve formě cytokinů (IFN γ , TNF) (z angl. tumor necrosis factor). Neutrofile a monocyty cirkulují v krevním oběhu, do poškozených tkání se dostávají tím, že se zachytí na povrchu endoteliálních buněk cév těchto tkání a prostoupí mezi endoteliálními buňkami do tkáně (diapedéza, extravazace). Jejich pohyb je řízen chemotakticky látkami uvolňovanými v místě poškození. Po pohlcení poškozené částice do fagosomu, splyne fagosom s lysosomy, které obsahují hydrolytické enzymy a dojde k rozštěpení a likvidaci agens. Dalšími výkonnými mechanismy fagocytů je oxidační vzplanutí (tvorba superoxidového radikálu) nebo tvorba oxidu dusnatého.

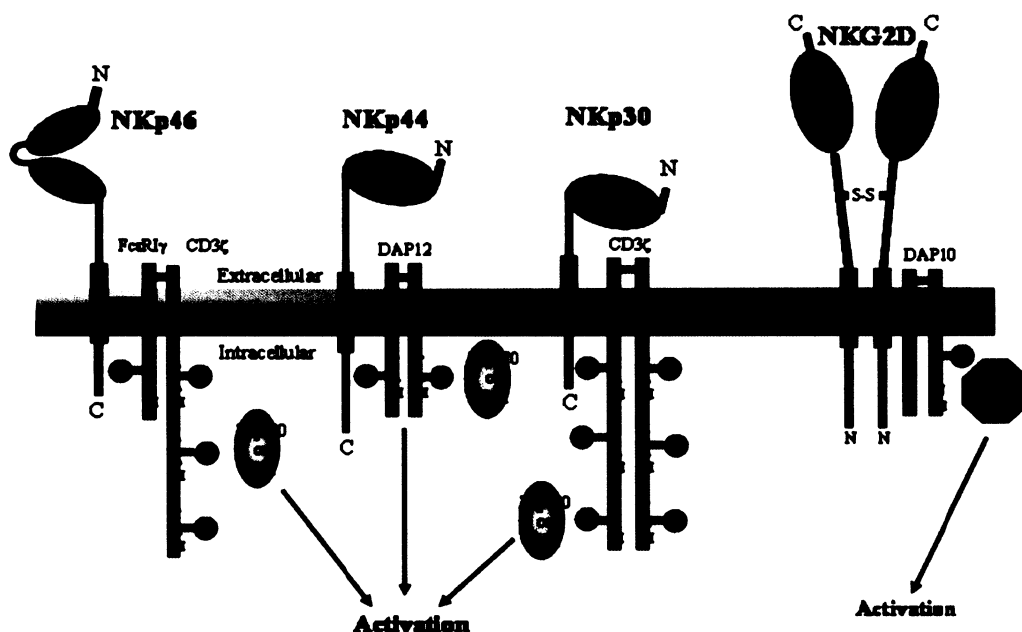
2.1.1. NK buňky

NK buňky jsou lymfocyty přirozené imunity, které se také podílejí na zahájení a vývoji adaptivní imunitní odpovědi. Zabíjejí mnoho typů nádorů, zejména buňky, které mají potlačenou expresi MHC molekul I. třídy a nesou ligandy aktivačních receptorů NK buněk. Výkonná funkce NK buněk je spouštěna absencí MHC I molekul, protože jejich rozpoznáním jsou vysílány do NK buňky inhibiční signály. Některé nádory také exprimují neklasické MHC molekuly MICA, MICB (z angl. MHC class I chain-related gene A resp. B) a ULBP (z angl. UL-16 binding protein), které jsou ligandy NKG2D, aktivačního receptoru NK buněk. Protinádorová kapacita NK buněk se zvyšuje působením interferonů a interleukinů (IL-2 a IL-12).

Většina NK buněk exprimuje nízkoafinitní (Fc γ) receptor typu IIIA (CD16), který rozpoznává cílové buňky opsonizované imunoglobulinem G (IgG), a vyvolá jejich lyzi cytotoxicitou závislou na protilátkách (ADCC). NK buňky exprimují dva typy receptorů – – aktivační, asociované s polypeptidovým řetězcem nesoucím ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif), a inhibiční s inhibičními motivy (ITIM). Aktivační receptory signalizují podobně jako T buněčné receptory (TCR) spuštěním

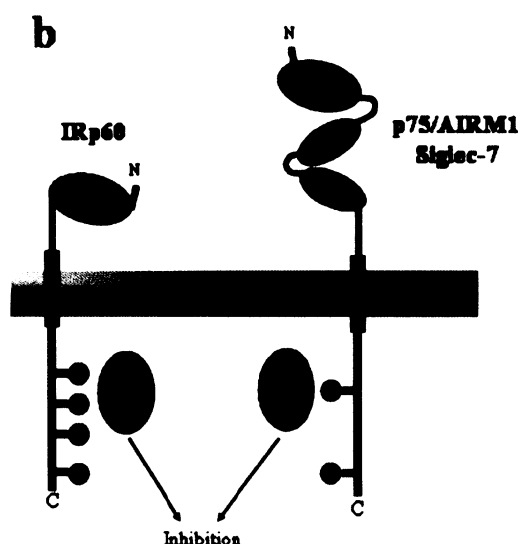
protein tyrozin kinázové kaskády. Proti těmto aktivačním receptorům působí inhibiční receptory, které zapojují SHP-1 doprovázející fosforylaci ITIMů kinázami z rodiny Src. V imunologické synapsi jsou přítomny aktivační i inhibiční receptory a jejich zapojení závisí na rozpoznání ligandů. V zásadě můžeme receptory NK buněk rozdělit na MHC nespecifické a MHC specifické.

Mezi **MHC nespecifické receptory** se řadí mnoho adhezních a kostimulačních molekul, které přispívají k zabíjení NK buňkami (LFA-1, CD2, 2B4) (z angl. lymphocyte function-associated antigen-1). Schopnost adhezivních molekul spustit lyzi nádorové buňky závisí na distribuci ligandů. Dalšími MHC nespecifickými receptory jsou receptory přirozené cytotoxicity zahrnující NKp46, NKp30 a NKp44. Všechny klidové lidské NK buňky exprimují NKp46, NKp30. IL-2 aktivované buňky exprimují navíc NKp44 [3] (Obr. 2a).



OBR. 2a: Aktivační receptory na NK buňce [podle 4]

Inhibičními receptory jsou IRp60, p75/AIRM-1 (z angl. adhesion inhibitory receptor molecule-1) a LAIR-1 (z angl. leukocyte-associated Ig-like receptor-1). Sialoadhesin p75/AIRM1 váže zbytky kyseliny sialové, zatímco IRp60 a LAIR-1 jsou dva inhibiční receptory podílející se na regulaci NK buněčné aktivity, jejich přirozené ligandy zatím nejsou známy (Obr. 2b).



OBR. 2b: Inhibiční receptory na NK buňce [podle 4]

MHC specifické receptory zahrnují dvě skupiny aktivačních receptorů, které váží specificky MHC molekuly I. třídy. Spouštěcí KIR-S receptory (z angl. killer cell immunoglobulin-like receptors) jsou glykoproteiny typu I s Ig doménou. Různé NK buněčné klony exprimují rozmanité KIR-S receptory. Jeden klon může mít na svém povrchu jeden až pět KIR-S molekul.

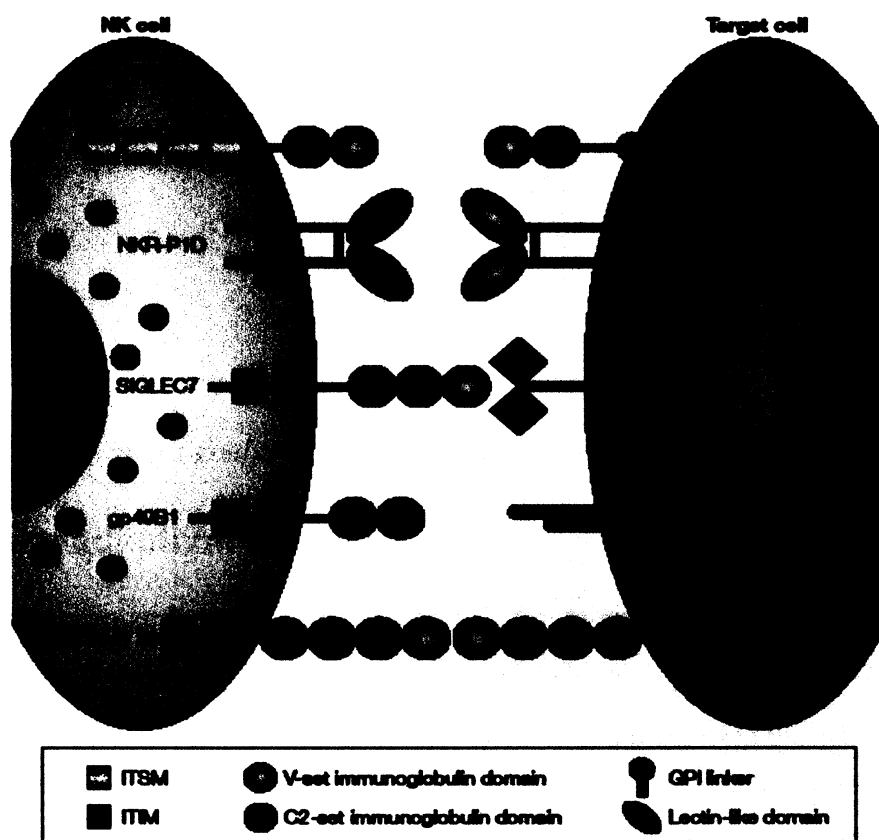
Další skupinou aktivačních receptorů jsou dimerní membránové proteiny typu II s C-lectinovou doménou. NKG2D je receptor pro stresem indukované MHC I molekuly MICA, MICB a buněčné povrchové proteiny ULBP1-4. MICA a MICB se běžně vyskytují na gastrointestinálním epitelu, ale mohou být také na povrchu nádorových buněk epitelu plic, prsu, ledviny, vaječníků, prostaty, tlustého střeva a na melanomech. ULBP-1, -2 a -3 jsou glykozylofosfatidylozitol (GPI)-vázané povrchové molekuly, zatímco ULBP-4 je transmembránový protein.

U myší jsou ligandy NKG2D proteiny H60 a Rae1 (z angl. retinoic acid early inducible) genová rodina. CD94/NKG2C je receptor pro HLA-E (z angl. human leukocyte antigen). U hlodavců plní roli MHC antigeny rozpoznávajících receptorů rodina Ly49 (C-lectiny).

Většina MHC specifických aktivačních receptorů má také inhibiční protějšek se stejnou specifitou. Inhibiční receptory tvoří tři základní skupiny. KIR-L receptory z Ig rodiny s rozdílnými specifitami a ILT2 (z angl. Ig-like transcript) z Ig rodiny a

NKG2A/CD94 z lektinové rodiny. Tyto molekuly mají cytoplasmatické ITIMy [shrnuto 5]. Krystalová struktura KIR-MHC I komplexu ukazuje, že KIR a TCR otisky jsou různé a rozpoznávání KIRem je také méně alelicky specifické a méně závislé na peptidu, než TCR-MHC I rozpoznávání [6]. Vzdálenost mezi KIR-MHC I je podobná TCR-MHC interakci. Proto tedy topologie NK inhibiční interakce je shodná s interakcí v centru supramolekulárního aktivačního shluku pomocné T buňky v imunologické synapsi.

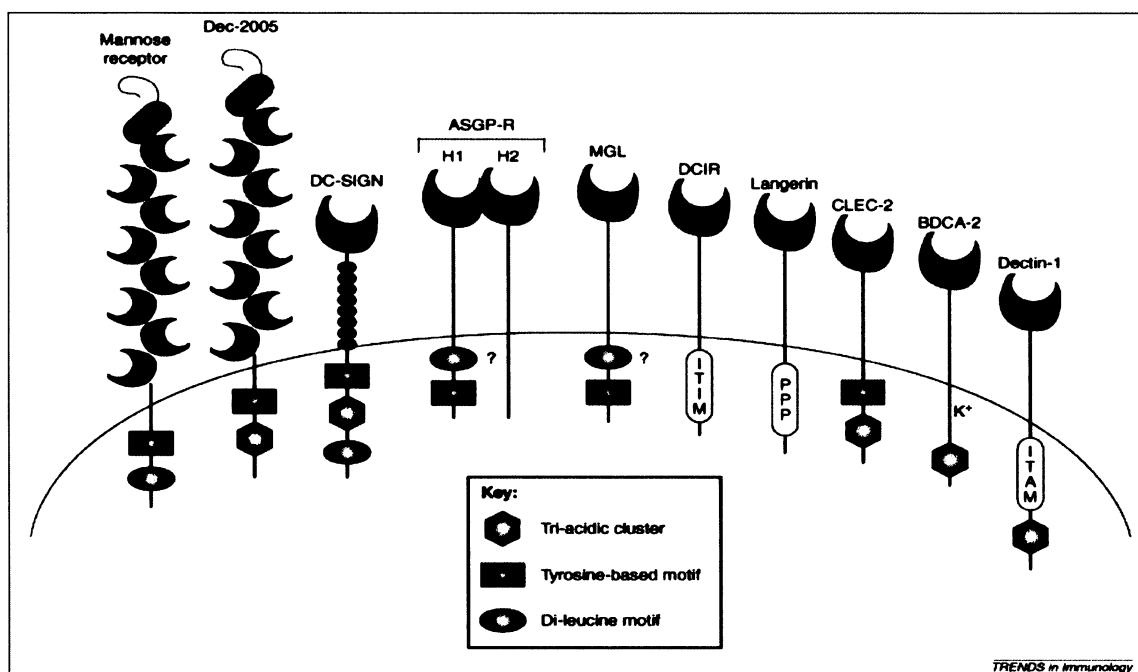
Receptor NK buněk 2B4 vázající molekulu CD48, který se u myši vyskytuje jako krátká izoforma se dvěma ITSM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based switch motifs). Inhibiční NKR-P1D (z angl. natural killer receptor-protein 1D) a jeho ligand – Clr-B jsou homodimery s lektinovými extracelulárními doménami. SIGLEC7 (z angl. sialic acid-binding Ig-like lectin 7) váže části kyseliny sialové. Glykoprotein 49B1 (gp49B1) u myši je receptor strukturně podobný KIR molekulám a váže $\alpha V\beta 3$ -integriny. CEACAM1 (z angl. carcinoembryonic-antigen-related cell adhesion molecule1) má mnoho izoform, které jsou tvořeny alternativním sestřihem (Obr. 3).



Obr. 3: Inhibiční a lektinové receptory NK buněk [podle 7]

2.1.2. Antigen prezentující buňky

Antigen prezentující (dendritické) buňky a jejich receptory se uplatňují jak v přirozené, tak i v adaptivní imunitě a působí jako jejich propojovatel. Důležitou třídou receptorů APC rozpoznávajících glykanové struktury je rodina C-typu lektinů. Patří mezi ně DC-SIGN (z angl. dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin), manózový receptor a MGL (z angl. macrophage-galactose-type lectin). Lewisovy struktury rozpoznává DC-SIGN [8], Tn antigeny jsou ligandy pro MGL [9]. Dalším příkladem vysoce glykosylovaného nádorového antigenu, který interaguje s C-lektinovými receptory je mucin 1 (MUC1). MGL je exprimován na nezralých dendritických buňkách a makrofázích.

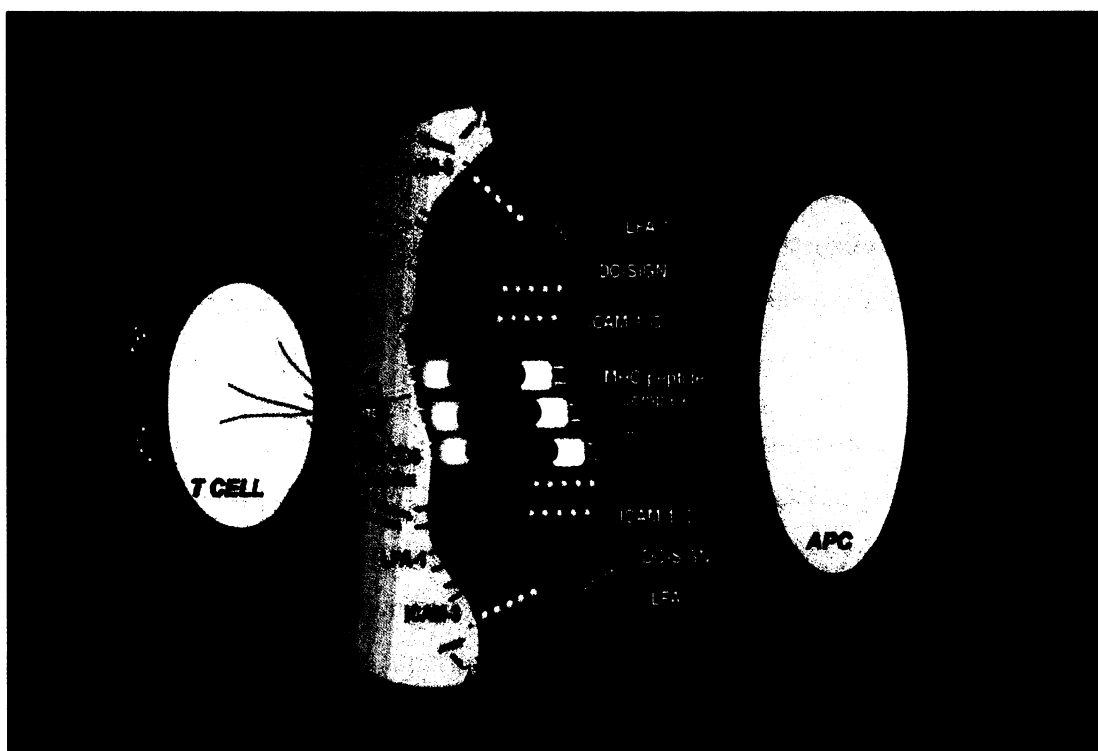


OBR. 4: internalizační a signální motivy C-typů lektinů [podle 10]

2.2. Buňky adaptivní imunity

Jedním z mechanismů protinádorové imunity **T lymfocytů** je zabíjení nádorových buněk $CD8^+$ cytotoxickými T lymfocyty (CTL). CTL mohou vykonávat imunitní dohled rozpoznáním a zabitím potenciální zhoubné buňky, která exprimuje peptidy, odvozené z mutantních buněčných proteinů či onkogenních virových proteinů a prezentované MHC molekulami I. třídy. $CD8^+$ T buněčná odpověď specifická pro nádorové antigeny vyžaduje křížovou prezentaci nádorových antigenů profesionálními APC. Většina nádorů neexprimuje kostimulační molekuly potřebné pro iniciaci $CD4^+$ pomocných T buněk

MHC II drahou, které následně podporují diferenciaci $CD8^+$ T buněk. Nádorové antigeny jsou zpracovány v APC a peptidy z nich jsou navázány a vystaveny na MHC molekulách I. třídy. APC exprimují kostimulační molekuly, a tím poskytují signály potřebné pro diferenciaci $CD8^+$ T buněk (Obr. 5). Funkce cytotoxických lymfocytů je významně zesilována cytokiny a růstovými faktory, které jsou produkovány antigenně specifickými $CD4^+$ pomocnými T buňkami. Naivní $CD4^+$ T buňka se stane výkonnou pomocnou buňkou po rozpoznání antigenu vystaveného na povrchových molekulách profesionálních antigen prezentujících buněk.



OBR. 5: Interakce T lymfocytu a APC [podle 11]

2.3. Synapse jako základní prvek interakce imunitní a nádorové buňky

T lymfocyty a antigen prezentující buňky (makrofágy, dendritické buňky a B lymfocyty) kooperují v rozpoznávání antigenu v průběhu indukce imunitní odpovědi. Koordinace této odpovědi vyžaduje vysoce specializovaný systém buněčné komunikace založený na přímém kontaktu buněk. Imunologická synapse je adhezivní spojení mezi polarizovanou imunitní efektorovou buňkou a buňkou nesoucí vystupující shluk antigenních receptorů, obklopených koncentrickými kruhy adhezivních molekul a

aktinových výběžků. Vyskytuje se buď ve stabilní nebo pohyblivé formě. Porušení symetrie imunologické synapse vytváří pohyblivé adhezivní spojení. Imunitní interakci dvou buněk zprostředkovávají membránové proteiny rozpoznávající antigen, kostimulační molekuly a proteiny buněčné adheze. Synapse slouží k propojení povrchových a transmembránových receptorů, které spouštějí signalizační kaskády fosforylací tyrosinových kináz a přenosu informace do jádra. Integrace signálů přicházejících přes mnoho receptorů je klíčová vlastnost imunologické synapse. Molekuly s velkými extracelulárními doménami jsou vyloučeny z interakce TCR-peptid MHC kvůli malým vzdálenostem mezi membránami buněk tvořících synapsi (~15 nm) [12].

Plazmatická membrána není homogenní, skládá se z několika různých typů fosfolipidů, které se nemohou volně mísit, kde laterálně oddělené domény tvoří relativně stálé oblasti (rafty). Tyto oblasti obsahují také gangliosidy např. GM1 a GPI kotvy glykolipidů. Proteiny se selektivně spojují s různými lipidovými strukturami, a tím ovlivňují tvorbu synapse v místě těchto raftů. Na adhezi buněk se významnou měrou podílí také lektinové receptory.

Další důležitou funkcí synapse je vytvoření uzavřeného prostoru mezi výkonnou cytotoxickou a cílovou (nádorovou) buňkou pro vstup cytolytických granulí obsahujících granzymy a perforin. Po rozpoznání MHC I molekul s vystaveným peptidovým Ag na nádorové buňce vytvoří $CD8^+$ cytotoxické buňky s nádorovou buňkou spojení. CTL sekretují granzymy a perforin, které přecházejí v prostoru imunologické synapse do napadené buňky a vyvolají její lyzi [13]. Aby byly ochráněny zdravé buňky, musí být cytotoxická aktivita směřována jen do místa úzkého kontaktu s cílovou buňkou. Váčky obsahující granzymy jsou lokalizovány u povrchu výkonné cytotoxické buňky, dochází k polarizaci granulí a jejich přesunu do místa synapse [14].

3. Nádorové antigeny

3.1. Typy nádorových antigenů

Základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je existence nádorově specifických povrchových antigenů, které by umožnily jejich rozpoznání. Jsou to proteiny, které se na zdravých buňkách nevyskytují, např. **produkty**

mutovaných genů. Některé nádorové antigeny vznikají onkogeními mutacemi normálních buněčných genů. Mnoho nádorů exprimuje geny, jejichž produkty jsou požadovány pro nádorovou transformaci a zachování nádorového fenotypu. Imunitní odpověď mohou vyvolávat **abnormálně exprimované buněčné proteiny**, mezi ně patří i proteiny, které jsou přítomny na gametách a trofoblastu, na některých typech rakoviny, ale ne na zdravých buňkách somatické tkáně. Další skupinou nádorových Ag jsou **produkty onkogenních virů.** **Onkofetální antigeny** jsou exprimovány ve velkém množství na nádorové buňce a na zdravě se vyvíjejícím plodu, ale ne na tkáni dospělého. **Nádorově specifické diferenciační antigeny** jsou molekuly, které jsou přítomné na zdravých buňkách, ze kterých pocházejí. Tyto antigeny jsou nazývány diferenciační, protože jsou specifické pro jednotlivé rody nebo diferenciační stádia původních tkání. Slouží jako možné cíle imunoterapie.

Velmi důležitou skupinu tvoří **změněné glykolipidové a glykoproteinové antigeny a aberantní glykozylace.** Většina lidských a experimentálních nádorů exprimuje zvýšené množství nebo abnormální formy povrchových glykoproteinů a glykolipidů. Tyto změněné molekuly zahrnují gangliosidy, antigeny krevních skupin a muciny. Změna glykosylace je známkou nádorového fenotypu. Zahrnuje zvýšení nebo snížení exprese přirozeně se vyskytujících glykanů. Tyto struktury nejčastěji vznikají změnou hladiny exprese buněčných enzymů zapojených do transportu sacharidů – glykozylntransferáz v Golgiho aparátu nádorových buněk. Změny hladiny glykozylntransferáz mohou vést k modifikaci jádra struktury *N*-vázaných a *O*-vázaných glykanů. Jedna z nejběžnějších změn je nárůst větvení *N*-vázaného glykanu. Tento nárůst větvení je často připisován zvýšené aktivitě *N*-acetylglukosamin transferázy V (GnT-V), která zprostředkuje větvení β -1,6-*N*-acetylglukosamin (GlcNAc). Přibývající větvení vytváří další místa pro napojení zbytků kyseliny sialové, které ve spojení s korespondující zvýšenou expresí sialyltransferáz vede k celkovému zvýšení sialylace. Se zhoubností nádoru jsou spojeny jak změny v jádře struktur glykanů, tak i změny koncových struktur. Glykozylntransferázy (např. sialyltransferázy a fukozylntransferázy) spojené s vázáním zbytků glykanů jsou v nádorové tkáni více exprimovány. Terminální glykanové epitopy jsou obvykle nacházeny na transformovaných buňkách zahrnující sialyl Lewis^x (sLe^x), sialyl Tn (sTn), Globo H, Lewis^y (Le^y) a polysialové kyseliny (PSA). Mnoho z těchto epitopů je pozorováno na maligních tkáních pocházejících z různých orgánů, včetně mozku, prsu, tlustého střeva a prostaty.

Další vlastností nádorů je nadprodukce určitých glykoproteinů a glykolipidů. Například epiteliální karcinomy často nadprodukují mucinové glykoproteiny, které jsou charakterizovány denzními shluky *O*-vázaných glykanů. Muciny slouží jako diagnostický znak nádoru a může být použit jako základ pro většinu s nádory asociovaných epitopů [shrnuto 15]. Nádorová tkáň může vykazovat také zvýšenou expresi gangliosidů. Komplexní gangliosidy (GD2, GD3 a fukosyl GM1) se nacházejí ve zvýšeném množství v buňkách plicních karcinomů, neuroblastomů a melanomů [shrnuto 16]. Změny v expresi glykanů charakteristické pro různé typy nádorových tkání jsou shrnuty v tab. 1.

nádorový glykan	nádorová tkáň								
	vaječník	slinivka břišní	krev	prso	tlusté střevo	mozek	prostata	kůže	plíce
sLe ^x		x		x	x				x
sLe ^a		x		x	x				x
sTn	X	x		x	x		x		x
TF	X			x	x		x		
Le ^y	X	x		x	x		x		x
Globo H	X	x		x	x		x		x
PSA		x	x	x		x			x
GD2			x			x		x	
GD3						x		x	
fukosyl GM1									x
GM2	X	x	x	x	x	x	x	x	x
MUC1	X	x		x	x		x		

TAB. 1: Různé typy glykanů a jejich zastoupení na nádorové tkáni [podle 17]

Dále je zde několik příkladů specifických proteinů, které prodělaly změny v glykozylaci během nádorové transformace. Jsou to např. mucin 1 (MUC1), MUC16, prostatický specifický antigen a karcino-embryonální antigen (CEA). MUC1, obsahující četné *O*-vázané glykany, se nachází také na zdravých buňkách, avšak na nádorových buňkách je odlišně glykosylován. Zkrácení *O*-glykanů vedlo k objevení nových sacharidových epitopů, jako Thomsen-Friedenreich (TF) a sTn antigenů. Na těchto málo glykosylovaných MUC1 jsou založené vakcíny. Tento mucin je vysoce exprimován na nádorových buňkách prsu a jeho glykosylace se mění z 2-*O*-glykanu na zkrácené jádro 1-*O*-glykan a Tn antigen během maligní transformace.

4. Rozpoznávání sacharidů na úrovni přirozené imunity

4.1. Receptory C-typů lektinů

Receptory rozpoznávající sacharidy – lektiny jsou exprimované na buňkách imunitního systému. Obsahují jednu nebo více sacharidy rozpoznávacích domén (CRD), které určují jejich specifitu. Kromě buněčné adheze hrají lektiny důležitou roli v rozpoznávání patogenů. V závislosti na jejich struktuře a mechanismu účinků se rozdělují do několika skupin. Klasický C-typ lektinu obsahuje CRD, která váže sacharidové struktury a je závislá na Ca^{2+} . Ca^{2+} ionty jsou přímo zapojeny do vazby ligandu i do údržby strukturální integrity CRD, která je nutná pro aktivitu lektinu. C-typy lektinů se skládají z C-lektinové části, dvou antiparalelních β -skládaných listů a dvou α -šroubovic. Některé CLR obsahující specifickou triádu aminokyselin na C-konci (DEC-205) (z angl. DC receptor for endocytosis) putují přímo do pozdních endozómů, které jsou bohaté na MHC molekuly II. třídy. Jiné CLR (manóзовý receptor MR) mají tyrozinový motiv a rychle se obnovují v časných endozómech. Tato rozdílnost ve vnitrobuněčných drahách může mít významný dopad na zpracování a prezentaci antigenu. C-typ CRD tvoří podskupinu větší rodiny proteinových domén nazývaných C-typ lektin-like domény (CTLD). Některé CTLD mohou vázat proteiny nebo části lipidů místo sacharidů. Často jsou Ca^{2+} nezávislé. C-typy lektinů jsou produkovány buď jako transmembránové proteiny nebo jsou sekretovány jako rozpustné proteiny. Příklady rozpustných C-typů lektinů jsou členové rodiny kolektinů, jako např. plicní povrchové aktivní proteiny A a D, které jsou sekretovány na lumenálním povrchu plicních epitelových buněk, a manózu vážící protein (MBP), kolektin přítomný v plazmě. V imunitním systému zprostředkovávají adhezi a rozpoznání patogenů jak C-lektinové, tak C-lektin-like receptory [18]. Zatímco kontakt buňka-buňka je primární funkcí selektinů, jiné C-lektiny, jako např. kolektiny, jsou specializované na rozpoznání patogenů.

Transmembránové C-typy lektinů mohou být rozděleny do dvou skupin, v závislosti na orientaci amino (*N*)-konce. Jsou to C-lektiny typu I, kdy *N*-konec směřuje ven a typu II s *N*-konce směřujícím dovnitř buňky. Příklady transmembránových C-lektinů jsou selektiny, rodina MR [19] a pro dendritické buňky specifický DC-SIGN [20]. Rodina manóзовých receptorů s endocytickou aktivitou zahrnuje MR, DEC-205, Endo 180 a receptor fosfolipázy A2. MR a DEC-205 jsou z nich nejlépe prostudovány ve spojení

s cílením na APC. Extracelulární doména rodiny manózových receptorů se skládá z několika motivů vázících ligand: *N*-koncové oblasti bohaté na cystein, které rozpoznávají sulfatované sacharidy, domény fibronektinového typu II. vázící kolagen a 8 za sebou uspořádaných CRD, z nichž pouze čtvrtá má lektinovou aktivitu a váže manózu, fukózu nebo *N*-acytylglukosamin.

MR nesou makrofágy, dále nezralé dendritické buňky a některé endoteliální buňky. U myši je MR hojný na dendritických buňkách (DC) odvozených z kostní dřeně, u lidí se nachází také na DC odvozených z monocytů a intersticiálních buněk (kožní DC). MR není přítomen na Langerhansových buňkách v epidermis a pDC (z angl. plasmacytoid DC). MR jsou zapojeny v endocytóze a odstranění mikroorganismů a sérových glykoproteinů, stejně tak jako do prezentace Ag z nich odvozených. Samotný endocytický MR není schopný sám iniciovat fagocytózu, ale hraje důležitou úlohu v pohlcení a prezentaci rozpustných Ag, které nejsou asociovány s buňkou [21]. Ligandy obsahující manan či manózu směřují Ag na APC.

DEC-205 obsahující 10 CRD je receptor C-typu lektinů patřící do rodiny MR. Specifický ligand zatím nebyl identifikován. DEC-205 je exprimován na DC a epiteliálních buňkách thymu, u lidí byl nalezen také na periferních T a B lymfocytech [22]. Charakteristickým znakem DEC-205 je zvýšená exprese na DC v oblasti výskytu T buněk v lymfoidních orgánech. DEC-205 je internalizován prostřednictvím obalených váčků a je směřován do endozomálních kompartmentů obsahujících velké množství MHC molekul II. třídy, narozdíl od MR, jehož exprese na DC je omezena hlavně na intersticiální DC (kožní DC) a putujícího do časného endozómu, který MHC molekuly II. třídy neobsahuje.

DC-SIGN je exprimován DC a makrofágy. Zajímavé je, že DC-SIGN funguje zároveň jako adhezivní receptor i jako receptor rozpoznávající patogeny. Jako adhezivní receptor DC-SIGN zprostředkovává kontakt mezi dendritickými buňkami a T lymfocyty vazbou mezibuněčné adhezivní molekuly (ICAM)-3 a valivý pohyb dendritických buněk po endotelu interakcí s ICAM-2. Podobně jako MR, DC-SIGN je endocytický receptor zprostředkovávající prezentaci Ag různých ligandů. DC-SIGN rozpoznává různé mikroorganismy, včetně virů, bakterií, hub a některých parazitů. Obrana proti mikrobům je založena na schopnosti přirozeného imunitního systému rozpoznat konzervované Ag specifické pro mikroorganismy. Tyto vysoce konzervované struktury jsou označovány jako PAMP (z angl. pathogen-associated molecular pattern). Jsou to například

lipopolysacharid gramnegativních bakterií, peptidoglykany grampozitivních bakterií a polysacharidy buněčných stěn hub [shrnutu 23]. Jsou rozpoznávány receptory z rodiny TLR (z angl. toll-like receptor). Na dendritických buňkách a makrofázích TLR indukuje uvolnění cytokinů jako jsou IFN, IL-2, a tím efektivně stimuluje T buňky [shrnutu 24].

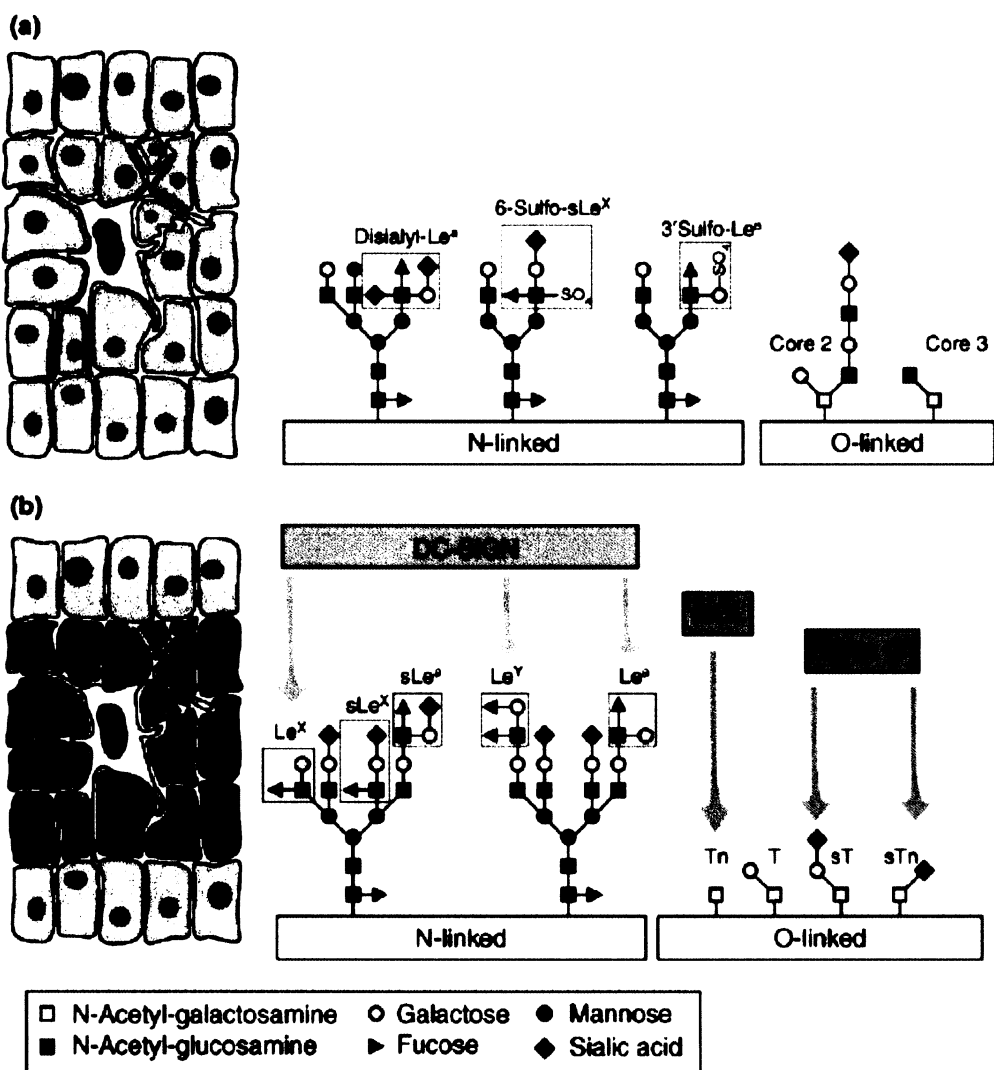
skupina a molekulární struktura	C-tyt lektinu	ligandová specifita
MR rodina	MR	manóza, fukóza, sLex(b), N-acetylglukosamin
	DEC-205	neznámá
	Endo-180	kolagen, manóza, fukóza, GlcNAc
Kolektiny	MBL	GlcNAc, ManNAc, fukóza, glukóza
	SP-A	ManNAc, fukóza, glukóza, GlcNAc
	SP-D	malóza, manóza, glukóza, laktóza, galaktóza, GlcNAc
Receptory II. typu	DC-SIGN	manan, Le ^x , Le ^a , Le ^y , Le ^b , Sle ^a , ManLam
	L-SIGN	Manan, Le ^a , Le ^y , Le ^b ,
	DCIR	neznámá
	Langerin	manóza, GlcNAc, fukóza, 6SLe ^x
	DCAL-1	neznámá
	BDCA-2	neznámá
NK receptory	β-GR(Dectin-1)	β-glukan
	CLEC-1	neznámá
	CLEC-2	neznámá
	NKG2D	MICA
	CD94-NKG2C	HLA-E
	Ly49	Qa-1
	NKG2A	HLA-E
	NKR-P1	Clr, LLT1, oligosacharidy

Tab. 2: Přehled skupin C-tytu lektinů a jejich ligandů [podle 4, 25]

Dalšími lektinovými receptory C-tytu dendritických buněk jsou Dectin-1 (z angl. Dendritic cell associated C-type lectin-1), Dectin-2, BDCA-2 (z angl. blood DC antigen), DCIR (z angl. DC immunoreceptor), DCAR (z angl. DC immuno-activating receptor), Langerin a MGL (z angl. macrophage galactose-type lectin). Tyto receptory signalizují přímo nebo v kooperaci s jinými aktivačními receptory jako například TLR nebo Fc receptory. Dectin-1 je NK buněčný receptor exprimovaný na APC a některých ostatních myeloidních buňkách, které nemají CRD, ale jsou hlavním receptorem pro β-glukany (rozpoznání hub). Dectin-1 podporuje protilátkovou a CD4⁺ T buněčnou odpověď, zatímco DEC-205 je stimulatorem CD8⁺ T buněk.

NK buňky, některé T buňky (25% krevních T buněk) a NKT buňky exprimují C-tyt lektinového receptoru CD161 (NKR-P1A). Velké množství CD161⁺ T buněk se také nachází v játrech a střevním epitelu. CD161 je také exprimován na monocytech a dendritických buňkách. Myší rodina NKR-P1 receptorů interaguje s Clr (z angl. C-type

lectin-related) molekulami. U lidí je ligandem CD161 receptoru LLT1 (z angl. lectin-like transcript) [26]. Interakce LLT1 s CD161 inhibuje NK buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu a sekreci IFN- γ . Naopak LLT1-CD161 interakce v přítomnosti TCR signálu zesiluje produkci IFN- γ T buňkami. To znamená, že vazba CD161 na LLT1 reguluje odlišně výkonné funkce NK a T buněk. Naivní T buňky sekretující IL-2 jsou převážně CD4⁺CD161⁻ a CD8⁺CD161⁻ fenotypu. Efektorové buňky a centrální paměťové buňky sekretující IFN- γ a TNF- α jsou CD4⁺CD161⁺ a CD8⁺CD161⁺ fenotypu. Tyto buňky nemají NK lytickou aktivitu [27].



OBR. 6: Změny v glykosylaci během nádorové transformace; a) zdravá epiteliální buňka bohatá na N-vázané glykany nesoucí epitopy disialyl- Le^a , 6-sulfo- sLe^x a 3'sulfo- Le^a b) buňka po nádorové transformaci má změněnou glykosylaci a jsou na ní ligandy pro DC-SIGN (Le^x , Le^y , Le^a), MGL (Tn) a Siglec (sT , sTn) [podle 28]

4.2. Lektinová dráha komplementu

Existují tři různé způsoby, jak aktivovat komplement: komplexy protilátek s antigenem a určité negativně nabitě struktury iniciují klasickou dráhu; alternativní dráha je spuštěna interferencí regulačních komponent se strukturami na mikrobiálním povrchu; a dráha vázající lektin manan (MBL) je zprostředkována vazbou MBL k sacharidům. MBL je asociovaný se serinovými proteázami MASP (z angl. mannose-binding lectin-associated serine protease). MBL váže řadu sacharidových struktur, které se nacházejí na povrchu mikroorganismů, a tím zprostředkovává antibakteriální účinek buď přímým zničením komplementem (lyzačním membránu atakujícím komplexem MAC) nebo podpořením fagocytózy. Rozlišení mezi vlastními a cizími strukturami rozpoznávanými MBL spočívá ve specifitě CRD a prostorovém uspořádání mnoha CRDs na molekule. MBL přednostně rozpoznává glukany, lipofosfoglykany a glykoinositol-fosfolipidy s manózou, glukózou, fukózou nebo *N*-acetylglukosaminem jako terminálními hexózami. Charakteristický znak těchto hexóz je ekvatoriální orientace 3- a 4-hydroxylových skupin, které musí být prezentovány konečnými neredukujícími jednotkami.

5. Protinádorové vakcíny založené na sacharidech

Sacharidové antigeny přítomné na nádorových buňkách mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin. Jednou z nich jsou komplexní gangliozydy jako GM2, GD2, GD3, fukosyl GM1 (gangliozyd), Le^y a globo H (neutrální glykolipidy). Druhou skupinou jsou glykoproteiny s mucinovými epitopy Tn (GalNAc α -O-Ser/Thr), Thomsen-Friedenreich (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α -O-Ser/Thr) a sTn (NeuAc α 2 \rightarrow 6GalNAc α -O-Ser/Thr) [29].

Protože glykany nádorových buněk se liší od těch, které se nacházejí zdravých buňkách, je zde možnost, že je imunitní systém rozpozná na základě jejich změněné glykosylace. Přestože atypické glykany mohou být mírně antigenní (schopné vyvolat tvorbu protilátek), jsou zřídka imunogenní (protilátky nejsou schopné vyvolat imunitní odpověď). Mnoho sacharidů asociovaných s nádory má embryonální původ, nebo je exprimováno na zdravých tkáních v nízkých hladinách. Toto je příčinou, že sacharidy jsou zaznamenány imunitním systémem jako vlastní, protože B buňky tvořící protilátky s vysokou afinitou pro tyto struktury jsou během svého vývoje eliminovány. Kvůli tomu,

mnoho pokusů tvorby protinádorových vakcín je soustředěno na prolomení imunitní tolerance sacharidů asociovaných s nádory [30]. Vakcíny založené na cílení protilátek využívají těch samých vlastností jako protilátky, ale jsou směřovány na zdravé buňky imunitního systému. Protilátky jsou použity k dopravení antigenů profesionálním antigen prezentujícím buňkám s cílem indukovat nebo zesílit imunitní odpověď na daný antigen. Úspěšně se protilátky dají zamířit proti receptorům integrinové rodiny, imunoglobulinové rodiny, TNF receptory, komplementové receptory a receptory C-typu lektinů. Danishefsky, Livingston a spolupracovníci připravili protinádorovou vakcínu založenou na sacharidech spojením mnoha kopií syntetických sacharidů asociovaných s nádory do imunogeního komplexu s nosičovým proteinem KLH (keyhole limpet haemocyanin) [31]. Tento cizí protein poskytuje peptidodové antigeny, které jsou požadovány pro T buněčnou pomoc a plnohodnotnou imunitní odpověď. Když byly podány myším nebo lidem, mnoho z těchto glykokonjugátních vakcín vyvolalo protilátkovou a buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď proti glykanům [32].

Úspěšná nádorová imunoterapie vyžaduje kromě tvorby protilátek také indukci cytotoxických T lymfocytů. Některé vakcíny jsou založeny na vystavení chemicky změněných glykanů, které jsou pro imunitní systém cizí a navozují aktivní T buněčnou pomoc s využitím přirozeně se vyskytujících protilátek (proti galaktóze). Každý typ nádorové buňky je charakteristický rozdílnou expresí sacharidů. Vakcína, která zacílí více sacharidů asociovaných s nádorem, vede v principu k silnější a více specifické imunitní odpovědi, než vakcína, která zacílí jeden nádorový sacharid. Proto byla připravena více-antigenní vakcína obsahující několik různých sacharidových struktur [33]. Např. sedmivalentní vakcína obsahující 3 antigeny: Globo H, Le^y a Tn vyvolala imunitní odpověď proti všem těmto oligosacharidovým antigenům. Vakcína obsahující globo-H, GM2, Le^y, MUC1, sTn(c), TF(c) a Tn(c) konjugáty s KLH indukuje produkci IgG a IgM protilátek a ADCC proti nádorům exprimujícím tyto antigeny. Chemicky modifikované zbytky kyseliny sialové s *N*-acyl řetězci (*N*-propanoyl, *N*-butanoyl, ...) včleněny do KLH konjugátů jsou více imunogenní, než korespondující přirozené vakcíny kyseliny sialové [34]. Vyvolávají produkci protilátek IgG, která aktivuje T pomocné buňky. Naopak, přirozený konjugát *N*-acetyl sialové kyseliny s KLH je v zásadě neimunogenní [35].

Indukce antigenně specifické imunity DEC-205 protilátkově cílenou vakcínou je závislá na současném obdržení aktivačních signálů od DC. V nepřítomnosti těchto aktivačních stimulů, může být navozena tolerance periferních T buněk.

V současné době máme indukované konzistentní protilátky proti GM2, fucosyl GM1, Tn(c) a sTn(c). Konjugované vakcíny proti GD3, GD2, globo H, Le^y a TF indukují protilátkovou odpověď u 60 a více procent pacientů. Tyto protilátky reagují silně s buněčným povrchem antigen-pozitivních nádorových buněk a ve většině případů zprostředkují komplementovou lýzi.

Látky zvyšující účinek antigenu (adjuvancia) jsou velmi důležité pro vyvolání plnohodnotné imunitní odovědi. Z toho důvodu bude nutné kombinovat protinádorové vakcíny s látkami vyvolávajícími komplementární aktivační signály.

6. Závěr

Změny v povrchové glykozylaci nádorových buněk, stejně jako lektin-sacharidové interakce, jsou předmětem výzkumu v nádorové biologii již dlouhou dobu. Zatím však zůstává mnoho oblastí, které nejsou úplně probádány a další studium v tomto směru nabízí nové možnosti pro vývoj cílených protinádorových léčiv. Široké využití vakcíny, která by spouštěla imunitní odpověď proti nádorově specifické sacharidové struktuře, je nesporné. Nádorové glykany nejsou příliš imunogenní a nejsou schopny spouštět protinádorovou imunitu tak jako vakcíny. Výzkum interakcí mezi nádorově specifickými glykany a lektinovými receptory může objasnit, proč je tak obtížné, aby imunitní odpověď potlačila nádorové bujení.

Prozatím se tomuto výzkumu nevěnuje mnoho laboratoří, proto bych se chtěla ve své další práci zaměřit jednak na ovlivnění aktivity *N*-acetylglukosamin transferáz nádorových buněk, jednak na modulaci funkce buněk přirozené imunity přes lektinové receptory pomocí sacharidových glykokonjugátů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

1. Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22, 329-360.
2. Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90, 1-50.
3. Bottino, C., Biassoni, R., Millo, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2000). The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Hum Immunol* 61, 1-6.
4. Biassoni, R., Cantoni, C., Marras, D., Giron-Michel, J., Falco, M., Moretta, L., and Dimasi, N. (2003). Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med* 7, 376-387.
5. Tomasello, E., Blery, M., Vely, F., and Vivier, E. (2000). Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol* 12, 139-147.
6. Boyington, J.C., Motyka, S.A., Schuck, P., Brooks, A.G., and Sun, P.D. (2000). Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405, 537-543.
7. Kumar, V., and McNerney, M.E. (2005). A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 5, 363-374.
8. Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2003). Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 170, 1635-1639.
9. van Vliet, S.J., van Liempt, E., Saeland, E., Aarnoudse, C.A., Appelmelk, B., Irimura, T., Geijtenbeek, T.B., Blixt, O., Alvarez, R., van Die, I., and van Kooyk, Y. (2005). Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *Int Immunol* 17, 661-669.
10. van Vliet, S.J., Saeland, E., and van Kooyk, Y. (2008). Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends Immunol* 29, 83-90.
11. Montoya, M.C., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186, 68-82.
12. Anton van der Merwe, P., Davis, S.J., Shaw, A.S., and Dustin, M.L. (2000). Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 12, 5-21.
13. Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401-409.
14. Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G.M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev* 189, 152-160.
15. Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4, 45-60.
16. Hakomori, S. (2000). Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj J* 17, 627-647.
17. Dube, D.H., and Bertozzi, C.R. (2005). Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 4, 477-488.

18. Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* *33*, 532-538.
19. East, L., and Isacke, C.M. (2002). The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* *1572*, 364-386.
20. Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* *1*, 353-357.
21. Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* *176*, 6770-6776.
22. Kato, M., McDonald, K.J., Khan, S., Ross, I.L., Vuckovic, S., Chen, K., Munster, D., MacDonald, K.P., and Hart, D.N. (2006). Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int Immunol* *18*, 857-869.
23. Teixeira, M.M., Almeida, I.C., and Gazzinelli, R.T. (2002). Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect* *4*, 883-886.
24. Majewska, M., and Szczepanik, M. (2006). [The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* *60*, 52-63.
25. Cambi, A., Koopman, M., and Figdor, C.G. (2005). How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* *7*, 481-488.
26. Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M.J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., and Braud, V.M. (2005). Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol* *175*, 7791-7795.
27. Takahashi, T., Dejbakhsh-Jones, S., and Strober, S. (2006). Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol* *176*, 211-216.
28. Aarnoudse, C.A., Garcia Vallejo, J.J., Saeland, E., and van Kooyk, Y. (2006). Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* *18*, 105-111.
29. Krug, L.M., Ragupathi, G., Hood, C., Kris, M.G., Miller, V.A., Allen, J.R., Keding, S.J., Danishefsky, S.J., Gomez, J., Tyson, L., Pizzo, B., Baez, V., and Livingston, P.O. (2004). Vaccination of patients with small-cell lung cancer with synthetic fucosyl GM-1 conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin Cancer Res* *10*, 6094-6100.
30. Ragupathi, G., Livingston, P.O., Hood, C., Gathuru, J., Krown, S.E., Chapman, P.B., Wolchok, J.D., Williams, L.J., Oldfield, R.C., and Hwu, W.J. (2003). Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* *9*, 5214-5220.
31. Gilewski, T.A., Ragupathi, G., Dickler, M., Powell, S., Bhuta, S., Panageas, K., Koganty, R.R., Chin-Eng, J., Hudis, C., Norton, L., Houghton, A.N., and Livingston, P.O. (2007). Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* *13*, 2977-2985.
32. Krug, L.M., Ragupathi, G., Ng, K.K., Hood, C., Jennings, H.J., Guo, Z., Kris, M.G., Miller, V., Pizzo, B., Tyson, L., Baez, V., and Livingston, P.O. (2004). Vaccination of small cell lung cancer patients with polysialic acid or N-propionylated polysialic acid conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin Cancer Res* *10*, 916-923.
33. Slovin, S.F., Ragupathi, G., Musselli, C., Olkiewicz, K., Verbel, D., Kuduk, S.D., Schwarz, J.B., Sames, D., Danishefsky, S., Livingston, P.O., and Scher, H.I. (2003).

Fully synthetic carbohydrate-based vaccines in biochemically relapsed prostate cancer: clinical trial results with alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine conjugate vaccine. *J Clin Oncol* 21, 4292-4298.

34. Chefalo, P., Pan, Y., Nagy, N., Harding, C., and Guo, Z. (2004). Preparation and immunological studies of protein conjugates of N -acylneuraminic acids. *Glycoconj J* 20, 407-414.
35. Pan, Y., Chefalo, P., Nagy, N., Harding, C., and Guo, Z. (2005). Synthesis and immunological properties of N-modified GM3 antigens as therapeutic cancer vaccines. *J Med Chem* 48, 875-883.