



Akademie věd České republiky

Teze doktorské disertační práce  
k získání vědeckého titulu "doktor věd"  
ve skupině věd molekulárně-biologických a lékařských

**Vývoj sacharidových konjugátů a dendrimerů  
vhodných  
pro použití v nádorových terapiích**  
.....  
název disertace

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru ..... imunologie .....

Jméno uchazeče ..... Karel Bezouška .....

Pracoviště uchazeče ..... MBÚ AV ČR .....

Místo a datum ..... Praha 29.6.2006 .....

Sacharidové struktury kovalentně vázané na buněčném povrchu plní řadu nezastupitelných fyziologických funkcí od naprosto obecných (definice polarity plasmatické membrány, příspěvek ke struktuře membránových mikrodomén) až po některé specializované. V imunologii a klinické onkologii je již delší dobu udělována pozornost změnám povrchové buněčné glykosylace v průběhu nádorové transformace a přeměny normální buňky na buňku proliferující a posléze maligně transformovanou. Po mnoha letech detailních imunochemických, analytických a biochemických výzkumů je evidentní, že v průběhu nádorové transformace dochází k zásadním změnám všech základních tříd povrchových glykokonjugátů, přičemž nejvíce dramatických změn pozorujeme u N- a O-glykosidicky vázaných oligosacharidů a u sialovaných glykolipidů – gangliosidů. Posledně jmenované látky jsou často exprimované na povrchu nádorových buněk v tak vysokých koncentracích, že dochází k jejich uvolňování do krevního séra, v němž představují důležité diagnostické markery.

Z poznatků o biologii povrchové nádorové glykosylace vycházejí strategie nádorových imunoterapií. Unikátní a masivně nádory produkované sacharidové antigeny se stávají důležitými komponentami různých protinádorových vakcín, z nichž některé dospěly do pozdních fází klinických zkoušek a začínají být klinicky aplikovány. Molekulární mechanismus působení těchto látek v organismu pacientů s nádory je většinou založený na vyvolání masivní produkce protilátek proti sacharidovým strukturám obsaženým ve vakcínách, které potom mohou za určitých příznivých podmínek přispět k likvidaci nádorové buňky. V posledních letech je však zvýšená pozornost udělována též mechanismům zahrnujícím přímou aktivaci cytotoxických buněk, zejména přirozených zabíječských buněk, NK T-lymfocytů a posléze i specifických cytotoxických lymfocytů. Právě k tomuto tématu současné imunologie se snaží přispět i předkládaná doktorská práce.

V úvodu své práce bych rád poděkoval velkému počtu svých spolupracovníků, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout. Vážím se zejména dlouhodobé spolupráce s Laboratoří přirozené buněčné imunity MBÚ AV ČR (Prof. RNDr. Miloslav Pospíšil DrSc., MUDr. Anna Fišerová CSc., Dr. Luca Vannucci), která odpovídala za provedení většiny imunologických testů. Na druhé straně si příprava látek typu sacharidových dendrimerů vyžadovala těsné spolupráce s chemiky jednak v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR (Prof. Ing. Vladimír Křen DrSc., Mgr. Pavel Krist PhD., Ing. Karel Křenek, Ing. Radek Gažák) jednak na zahraničních pracovištích na Univerzitách v Hamburgu a Kielu (SRN) a Ottawě (Kanada). V neposlední řadě musím poděkovat všem studentům a doktorandům naší laboratoře za jejich pomoc při provádění jednotlivých experimentů, a své rodině, zejména manželce Radce, za její velkou trpělivost a vynikající zázemí.

## SEZNAM ZKRATEK

**BSA**, bovinní sérový albumin;

**BCG**, Bacillus Calmet-Guerin, vakcína z *Mycobacterium bovis*;

**CD**, (angl. cluster of differentiation), povrchový diferenciační znak leukocytů;

**CSK**, kinasa důležitá při modulaci aktivace T-lymfocytů;

**DCL-1**, (angl. dendritic cell lectin), lektin na povrchu dendritických buněk;

**DTT**, dithiothreitol, redukční činidlo;

**FT-ICR**, (angl. Fourier transform ion - cyclotron resonance), hmotnostní spektrometrie s iontově cyklotronovou rezonancí;

**GM**, monosialogangliosid;

**IT**, (angl. ion trap), hmotnostně spektrometrický analyzátor s iontovou pastí;

**ITAM**, (ang. immunoreceptor tyrosine activation motif), peptidový aktivační motif imunoreceptorů;

**ITIM**, (ang. immunoreceptor tyrosine inhibition motif), peptidový inhibiční motif imunoreceptorů;

**MALDI**, (angl. matrix assisted laser desorption and ionization), laserová ionizace v hmotnostní spektrometrii;

**LAT**, (angl. linker for activation of T cell), adaptorový protein důležitý pro aktivaci T lymfocytů;

**LCK**, proteinová tyrosinová kinasa důležitá pro aktivaci T lymfocytů;

**MS**, (angl. mass spectrometry), hmotnostní spektrometrie;

**NK**, (angl. natural killer), přirození zabíječi, přirozené zabíječské buňky;

**NKG2D**, hlavní aktivační receptor přirozených zabíječských buněk člověka a hlodavců;

**NKR-P1**, hlavní aktivační receptor přirozených zabíječských buněk potkana;

**NMR**, nukleární magnetická resonance;

**PAG**, adaptorový protein T-lymfocytů;

**PAMAM**, polyamidoaminové dendrimerické kostry;

**PBS**, (angl. phosphate buffered saline), isotonický roztok NaCl pufrovaný fosfátem;

**SB2**, dvakrát sulfatovaný glykolipid;

**SLP-76**, adaptorový protein T-lymfocytů;

**TCR**, (angl. T-cell receptor), receptor pro antigen T-lymfocytů;

**TLC**, (angl. thin layer chromatography), chromatografie na tenkých vrstvách;

**T<sub>m</sub>**, (angl. melting temperature), teplota „tání“ (denaturace) biopolymeru;

**TOF**, (angl. time-of-flight), hmotnostně spektrometrický analyzátor založený na době letu;

**ZAP70**, kinasa důležitá pro aktivaci T-lymfocytů.

Pro názvy aminokyselin a sacharidů jsou používány standardní zkratky dle doporučení IUPAC.

## 1. LITERÁRNÍ ÚVOD

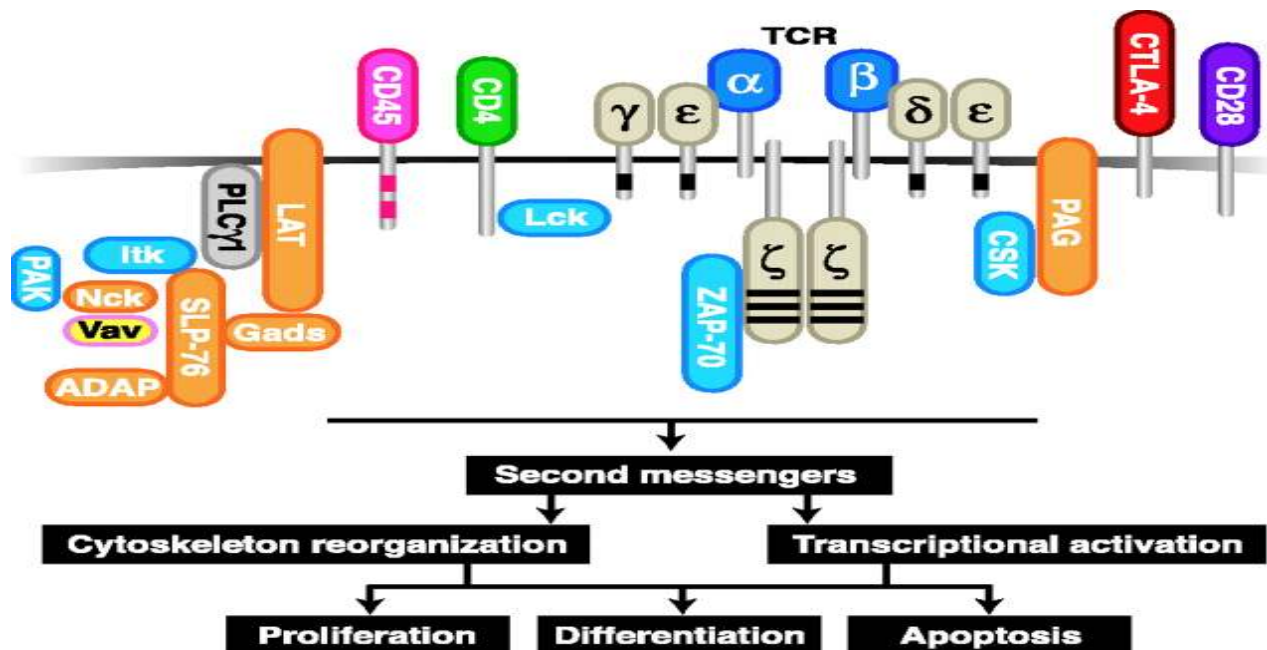
### 1.1 Úloha sacharidů v živých systémech

Sacharidy představují po proteinech a nukleových kyselinách asi třetí nejdůležitější třídu biologických polymerů. Tři nejdůležitější funkce sacharidů, o nichž se ve vztahu k živým systémům nejčastěji diskutuje, je funkce metabolická, funkce strukturní, a konečně funkce informační (Varki 1993). Prvá funkce je dána kritickou úlohou jednoduchých cukrů, převážně jejich fosforylovaných derivátů, v reakcích intermediárního metabolismu u většiny samostatně žijících organismů. Stavební funkce sacharidů je nejvýrazněji patrná jednak u mikroorganismů, jejichž povrch je zcela pokryt polysacharidovými (manan, glukany) a lipopolysacharidovými buněčnými stěnami, a dále u rostlin, jejichž buňky jsou chráněné buněčnou stěnou vyztuženou celulosou a jinými polysacharidy. Ovšem i na povrchu některých eukaryotických buněk jsou sacharidy hojně zastoupené zejména ve formě různých přirozených glykokonjugátů – glykolipidů, oligosacharidických a polysacharidických glykoproteinů. Glykolipidy pomáhají definovat polaritu plasmatické membrány a jsou důležitou stavební součástí membránových mikrodomén (Hořejší et al. 1999). Oligosacharidické a polysacharidické glykoproteiny jsou hojné zejména na povrchu epiteliálních buněk, ale důležité jsou třeba i u buněk imunitního systému na jejichž povrchu tvoří tzv. glykokalix regulující mezibuněčný kontakt a adhezivní interakce imunocytů. U rozpustných, sekretovaných glykoproteinů ovlivňuje glykosylace zejména jejich poskládání, rozpustnost, a chrání je před proteolýzou a jinými agresivními vlivy zevního prostředí.

Možná informační úloha sacharidů je diskutována v posledních letech. Předpokládá se, že by složité sacharidové struktury mohly v sobě mít uloženou biologickou informaci, a představovat tak třetí informační kód po kódu založeném na struktuře nukleových kyselin a proteinů. Podobně jako u jiných informačních kódů je i sacharidový kód daný v podstatě pořadím jednotlivých monosacharidových jednotek v určité sekvenci. Na rozdíl od nukleových kyselin a proteinů mají ovšem oligosacharidové sekvence několik unikátních rysů, a informace kódovaná určitým počtem monosacharidových jednotek pak může být ještě složitější. Oproti nukleovým kyselinám nebo proteinům se totiž mohou sacharidy vzájemně spojovat pomocí několika různých typů vazeb, a mohou kromě lineárních sekvencí tvořit i sekvence větvené. Také diverzita monosacharidových stavebních jednotek je značná v důsledku jejich možných chemických modifikací, například fosforylací, sulfatací, karboxylací nebo acetylací. Nejdůležitější příklady uplatnění sacharidového informačního kódu zahrnují mezibuněčné interakce v časně embryogenezi, molekulární procesy spojené s tvorbou tkání a orgánů, pohyb buněk imunitního systému v cirkulaci a jejich vycestování do lymfatických tkání, interakce spermií s vajíčkem apod. Sacharidové sekvence však jistě sehrávají svou úlohu i v procesu stárnutí biologických makromolekul a celých buněk, při nádorové transformaci (viz. podrobněji v kapitole 1.6).

### 1.2 Receptory imunitního systému. Lektinové receptory C-typu a jejich fyziologické funkce. Endogenní ligandy a ligandové mimikry.

Koncepce receptoru jako proteinu odpovědného za monitorování a vzájemnou integraci signálů zpracovávaných v rámci informační sítě každé buňky je dnes široce přijímanou v přírodních vědách. Detailní molekulární znalosti jednotlivých receptorových systémů se stala se základem pro pochopení mechanismu účinku mnoha široce používaných léčiv, stejně jako pro racionální návrh mnoha nových léčebných preparátů. Základem této koncepce jsou unikátní vlastnosti samotného receptorového proteinu, zpravidla umístěného buďto na povrchu buňky v plasmatické membráně, popřípadě v cytosolu cílových tkání. Po interakci receptoru s ligandem dochází ke konformační změně, popřípadě oligomerizaci receptoru, což je spojeno s aktivací primárních (tzv. „upstream“) efektorů, a posléze spuštěním celé kaskády aktivačních procesů spojených s fyziologickou odpovědí dané buňky na určitý signál. **Obr. 1** ukazuje tyto procesy na



**Obr. 1** Signalizace zahájená aktivací T-buněčného receptoru. Vytvoření nadmolekulárního komplexu usnadněné adaptorovými proteiny SLP-76 a LAT koordinuje několik signalizačních kaskád závislých na druhých poslech. Podle Singera a Koretzkeho 2002.

příkladu intenzivně studovaného receptoru T-lymfocytů (TCR, T-cell receptor). I tento receptor je membránovým proteinem asociovaným s řadou dalších proteinů nezbytných pro přenos signálu ( $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$  řetězce). Kritický pro signalizaci prostřednictvím tohoto receptoru je  $\zeta$  řetězec, který může být fosforylován proteinovou tyrosinovou kinasou *lck* popřípadě defosforylován proteinovou tyrosinovou fosfatasou CD45. Fosforylace vlastního  $\zeta$  řetězce je poté spojena s aktivací sekundárních efektorů (klíčovou je kinasa ZAP-70), což vede ke spuštění mnoha dalších efektorových drah v závislosti na koncentraci druhých poslů (second messengers). Dochází k zásadní reorganizaci cytoskeletonu a aktivaci transkripce, která může být nakonec spojena s proliferací, diferenciací nebo dokonce programovanou buněčnou smrtí (apoptosou). Důležité pro signalizaci jsou také adaptorové proteiny, na němž dochází k integraci procesů deaktivace (PAG/CSK/CD45) nebo aktivace (LAT komplex) kaskád nitrobuněčné fosforylace.

Koncem 60. let došlo zásluhou Ashwella, Morella a spolupracovníků k rozpracování koncepce receptorového proteinu také na receptory lektinového typu, které jako své ligandy rozpoznávají látky sacharidové povahy (Ashwell a Harford, 1982). V té době byla již řadu desetiletí studována zajímavá skupina proteinů označovaných jako lektiny, které zpravidla vymezujeme jako proteiny nebo glykoproteiny neenzymové a neprotilátkové (neimunoglobulinové) povahy schopné nekovalentně a reverzibilně vázat různé sacharidy. I přes dlouhodobý zájem o lektiny bylo v 60. letech stále ještě známo velmi málo o fyziologické úloze těchto zajímavých proteinů v organismu. Ashwellovy studie jaterního membránového lektinu byly pionýrské právě proto, že si položily studium fyziologických zákonitostí do svého základu. V té době byla zevrubně studována skupina glykoproteinů krevního séra, které tvoří kvantitativně asi polovinu hmotnosti proteinů v této biologické tekutině. Zájem se soustřeďoval zejména na studium transportních a obranných funkcí sérových glykoproteinů zahrnujících takové důležité látky jako sérové imunoglobuliny, transferrin (protein transportující železo), ceruloplasmin (protein transportující měď), haptoglobin (protein transportující hemoglobin), sérové lipoproteiny různých tříd a podobně.

Trvalo zhruba deset let než vědci dospěli k závěru, že celá skupina živočišných lektinů je nesrovnatelně širší, a zahrnuje několik proteinových rodin zajišťujících v organismu řadu dalších

důležitých fyziologických funkcí, Období od druhé poloviny 80. let bylo charakterizováno rychlým nástupem metod molekulární biologie a genetiky do biomedicínského výzkumu, a jinak tomu nebylo ani v oblasti živočišných lektinových receptorů. Základním koncepčním průlomem v polovině 80. let bylo zejména pozorování Drickamera a Barondese ukazující, že za schopnost lektinových receptorů rozpoznávat sacharidové ligandy je v řadě případů odpovědná pouze malá část celého receptoru, globulární proteinový modul o délce asi 100 aminokyselin, který začal být označován termínem sacharidová vazabná doména (angl. carbohydrate-recognition domain), Na základě klonování a sekvenování těchto charakteristických proteinových modulů mohly být poté definovány jednotlivé rodiny živočišných lektinů a bylo možné systematicky přistoupit ke studiu struktury a funkce. Postupně se ukázalo se, že zdaleka nejrozšířenější rodinou lektinů u obratlovců i bezobratlých jsou živočišné lektiny C-typu (Bezouška 2002). Tento fakt dobře dokumentuje **Tab. 1** ukazující počet lektinových modulů patřících různým lektinovým rodinám u jednotlivých modelových organismů. U člověka tak existuje celkem 76 lektinových domén patřících do rodiny lektinů C-typu, zatímco ostatní lektinové rodiny jsou zastoupené méně (celkem 26 domén).

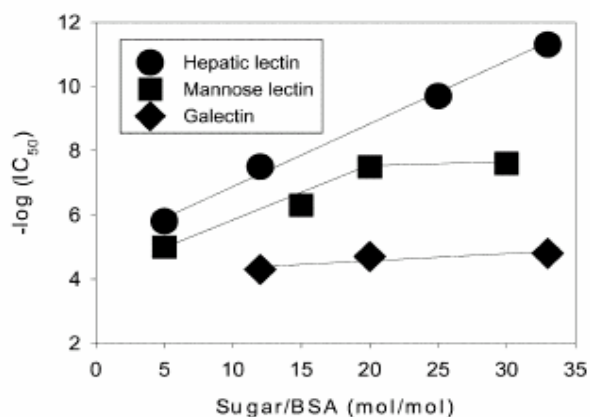
Table 1  
Distribution of lectin modules among different organisms

Class	Motif	E <sup>a</sup>	Y <sup>a</sup>	A <sup>a</sup>	C <sup>a</sup>	D <sup>a</sup>	H <sup>a</sup>
C-type	Unique $\alpha/\beta$	0	0	0	132	24	76
Galectin	$\beta$ -sandwich	0	0	0	22	5	12
Legume	$\beta$ -sandwich	0	1	y	2	2	2
R-type	$\beta$ -trefoil	y	y	y	y	y	y
P-type	Unique $\beta$ -rich	0	2	2	1	3	2
I-type	Immunoglobulin	0	0	0	0	0	10

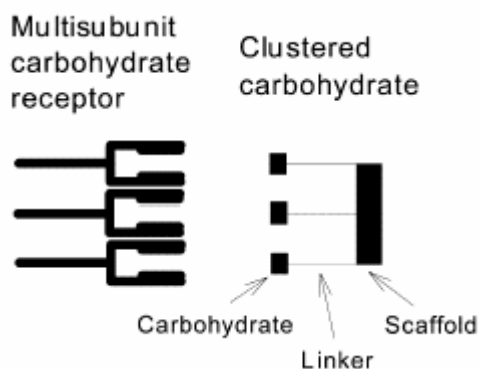
The total number of the specified protein modules in the given organism is given.

<sup>a</sup>The following organism have been analyzed: *Escherichia coli* (E); the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Y); the plant *Arabidopsis thaliana* (A); the worm *Caenorhabditis elegans* (C); the fruit fly *Drosophila melanogaster* (D); and the human *Homo sapiens* (H). y indicates the possible occurrence of the described protein modules in the given organism.

S rozvojem detailního strukturního studia lektinů C-typu v průběhu 80. a 90. let minulého století začalo být zřejmé, že izolované domény lektinu C-typu se vyznačují poměrně širokou sacharidovou specifitou, a zároveň nízkou afinitou vůči svým monosacharidovým ligandům s disociačními konstantami řádu mM. Postupně začalo být zřejmé, že interakce živočišných lektinů C-typu s jejich sacharidovými ligandy patří k jedněm z nejsložitějších v biochemii, a vyžadují značný stupeň kooperativity při interakci specificky uspořádaných sacharidy rozpoznávajících domén s komplexními oligosacharidovými ligandy jaká není běžná u jiných lektinů (**Obr.2**). Sou-



**Obr.2** Kooperativita při vazbě různě substituovaných sacharidových derivátů BSA.



**Obr.3 Způsob prezentace sacharidových ligandů multivalentním lektinovým receptorům**

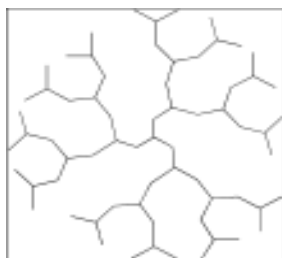
časně s tímto zjištěním začala být zřejmá kritická úloha způsobu prezentace sacharidových ligandů lektinům C-typu ať již se jedná o složité fyziologické ligandy s nimiž tyto molekuly interagují nebo uměle vytvořené sacharidové sondy (sacharidové mimikry) připravované v laboratořích syntetické organické chemie. Jak je schematicky znázorněno na **obr. 3**, jednotlivé sacharid rozpoznávající domény, ale i jim nabízené sacharidové ligandy, se mohou nacházet v různém strukturálním uspořádání. Z těchto strukturálních úvah (i když zatím často velmi nedokonalých) se potom odvíjejí možné strategie prezentace sacharidového antigenu multivalentním lektinovým receptorům. Jakmile začaly být k dispozici detailní trojrozměrné struktury multimerních lektinů C-typu, docházelo k upřesnění i pokud jde o způsob prezentace sacharidových ligandů.

V počátečních experimentech se předpokládalo, že jednotlivé lektinové domény jsou v maximální možné míře flexibilní, a tudíž si „najdou“ jednotlivé sacharidové ligandy téměř v jakékoliv prostorové orientaci za předpokladu, že tyto mají dostatečný stupeň zesílení (angl. „clustering effect“). Pro „clustering effect“ hovořily zejména klasické pokusy prováděné během 80. let minulého století profesorem Y. C. Lee na Johns Hopkins University v americkém Baltimore. Profesor Lee sledoval interakce membránové formy Ashwelova jaterního lektinu s různě větvenými přirozenými desialovanými oligosacharidy připravenými z glykoproteinů krevního séra, a přitom si povšimnul řádového rozdílu v interakčních konstantách pro monogalaktosylované ( $K_d = 10^{-3}$  M), bigalaktosylované (biantennární,  $K_d = 10^{-6}$  M), popřípadě trigalaktosylované (triantennární,  $K_d = 10^{-9}$  M) oligosacharidy (Lee a Lee 2000). Pozdější strukturální výzkum však ukázal (Weis a Drickamer, 1999), že v některých případech nejsou jednotlivé ligand vázající domény lektinových receptorů C-typu vůbec flexibilní, ale tvoří poměrně rigidní oligomery, nejčastěji dimery nebo trimery. V takovém případě se považuje za vhodnější takový způsob prezentace sacharidového ligandu při němž jsou jednotlivé sacharidy navázány na dostatečně dlouhém a hydrofilním (flexibilním) linkeru, který se může dobře přizpůsobit pozici sacharidových vazebných míst na jednotlivých doménách. Předpokládá se, že právě k takovému uspořádání dochází u glykosylovaných molekul BSA, které jsou vysokoafinitními ligandy pro mnohé živočišné lektiny C-typu (viz. **Obr. 2**).

Na závěr úvah o ideálních způsobech prezentace sacharidových ligandů pro multivalentní lektinové receptory C-typu ještě zbývá připomenout dva důležité faktory, kterými je způsob vazby sacharidu na linker a chemická povaha linkeru. Glykosidická vazba sacharidu na linker může být hydrolyzovatelná (O-glykosidická) nebo nehydrolyzovatelná (většinou S-glykosidická, N-glykosidická nebo C-glykosidická) v závislosti na požadavcích experimentu. Linkery připojující sacharidový ligand na molekulární lešení bývají alifatické nebo aromatické, dle své chemické povahy buďto hydrofobní nebo hydrofilní. Obecně bývají při stejné délce alifatické linkery flexibilnější kvůli inherentně větším stupni volnosti na  $-CH_2-$  skupinách. Hydrofobní aromatické linkery mohou v některých případech zvyšovat afinitu interakce, protože může dojít k nespecifickým interakcím s hydrofobními oblastmi proteinů poblíž vazebného místa pro sacharid.

### 1.3 Dendrimery, jejich syntéza a využití v biomedicinském výzkumu

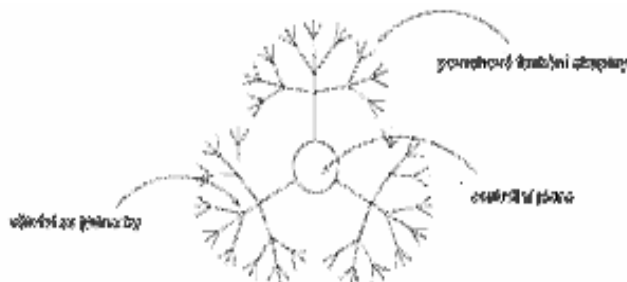
Dendrimery jsou jednou ze skupin materiálů užívaných ve výzkumu systémů transportu léčiv. Tyto sloučeniny mají některé zajímavé vlastnosti glykoklastrů, jako je monodisperzní povaha (jde o definované molekuly) i když svoji velikostí již dostihují glykopolymer (viz. následující kapitola 1.4). Stále přibývá možností jejich využití ve farmaceutickém, lékařském a biomedicínckém inženýrství. Dendritické struktury byly objeveny jako nová třída polymerů. Prvně se o nich zmínili Buhleier se spolupracovníky roku 1978 a představili je jako *kaskádní molekuly* (cascade molecules, Buhleier et al. 1978). Vývoj v této oblasti dále vedl k syntéze větších dendrimerních struktur. Roku 1985, kdy Newkome a Tomalia nezávisle publikovali své výsledky o skupině větvených molekul, přejmenovali tyto struktury na *stromové sloučeniny* (arborols) nebo *dendrimery* (Newkome et al. 1985, Tomalia et al. 1985). Slovo dendrimer bylo nakonec přijato jako název těchto struktur. Termín „dendrimer“ pochází z řeckého slova *dendron*, znamenající strom nebo větev, a *meros*, znamenající část. Dendrimery jsou pravidelně se větící sloučeniny s variabilním složením, molekulovou vahou, povrchovými skupinami, mocenstvím, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a biologickou aktivitou (**Obr. 4**).



**Obr. 4: Schématický obrázek dendrimerní struktury.**

Výhody, které dendrimery nabízejí jako základní stavební jednotky lze shrnout v několika bodech: jsou připraveny z levných a dostupných výchozích látek, přípravu i přečištění lze snadno uskutečnit i ve velkém měřítku, v důsledku své molekulární stavby mohou obsahovat vysoký počet koncových funkčních skupin vhodných k připojení ligandu. Mezi základní vlastnosti těchto sloučenin kritické pro biologické aplikace patří zejména jejich dobrá chemická a biologická stabilita, rozpustnost ve vodných systémech, kterou lze regulovat chemickou povahou jádra a linkerů, biokompatibilita, neimunogenita a dlouhodobé přežívání v organismu (Bezouška 2002).

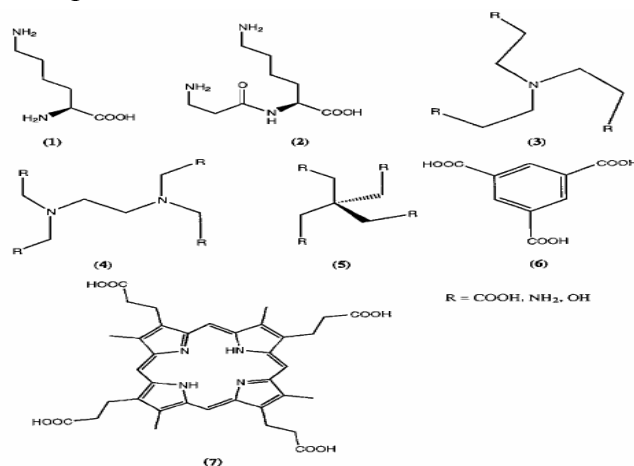
V závislosti na složení a struktuře jádra, větví a povrchových funkčních skupin a jejich substituci, můžeme rozlišovat několik typů dendrimerů. První kompletní dendrimerní rodina, která byla připravena, charakterizována a komercializována jsou poly(aminoamidové) dendrimery (PAMAM) někdy také zvané *Starburst* dendrimery. Tyto dendrimery představil Tomalia se spolupracovníky roku 1985 (Tomalia et al. 1985) a byly připraveny divergentní metodou (viz níže). PAMAM dendrimery jsou biokompatibilní, tolerované imunitním systémem, ve vodě rozpustné a na svých koncích mají rozšiřitelné funkční amino nebo esterové skupiny vhodné pro navázání dalších funkčních skupin nebo molekul (Tomalia et al. 1985). Další typy dendrimerů se skládají z opakujících se jednotek: aminů, amidů, karbosilanů, siloxanů, esterů, etherů, acetylenů, aminoky-



**Obr.5 Tři základní stavební elementy při konstrukci dendrimerů**

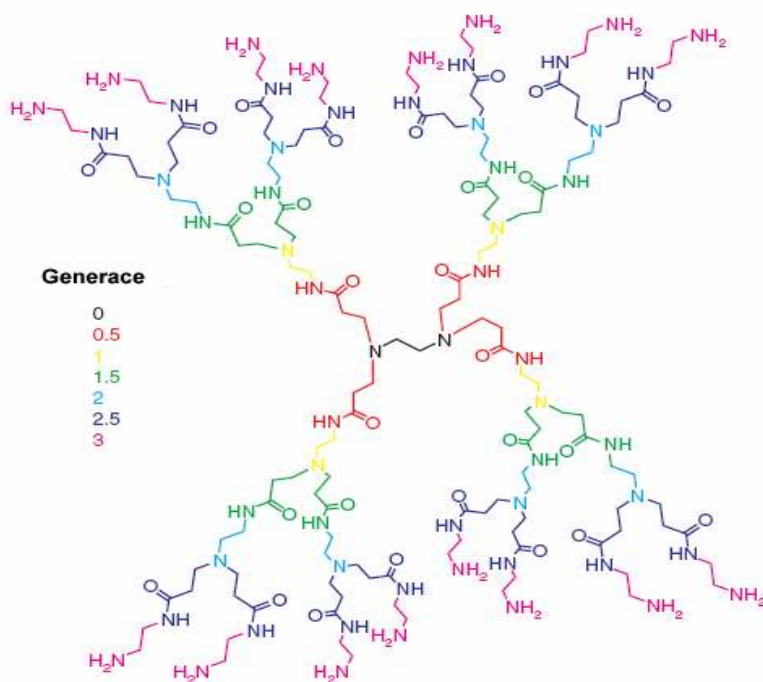


selin a nukleových kyselin a dalších. Do dendrimerů mohou být začleněny další funkční jednotky (kupříkladu porfyriny nebo chromofory). Tři základní části tvořící strukturu dendrimeru jsou jádro, větvíci se jednotky a povrchové funkční skupiny (**Obr. 5**). Jádro je centrální jednotka, ve většině případů symetrická. Nese zpravidla 2 – 4 funkční skupiny (nejčastěji amino-, hydroxy- nebo karboxy-) na které jsou vázány jednotlivé větve. Příklady jader nejčastěji používaných v syntézách dendrimerů jsou uvedeny na **obr. 6**. Větve jsou složeny ze stavebních bloků s nejméně třemi funkčními skupinami. První je vázána na jádro nebo větve předcházející generace, druhá a třetí slouží pro větvení do dalších generací. Opakováním reakce ve větvích dochází k vytvoření periodic-



**Obr.6 Příklady jader nejčastěji používaných při konstrukci dendrimerů**

ky větvené struktury dendrimeru. Každé opakování sekvence vytváří další vrstvu větvení, zvanou „generace“. Přesné počítání generací může být zdrojem nedorozumnění. Dendrimerní generace je

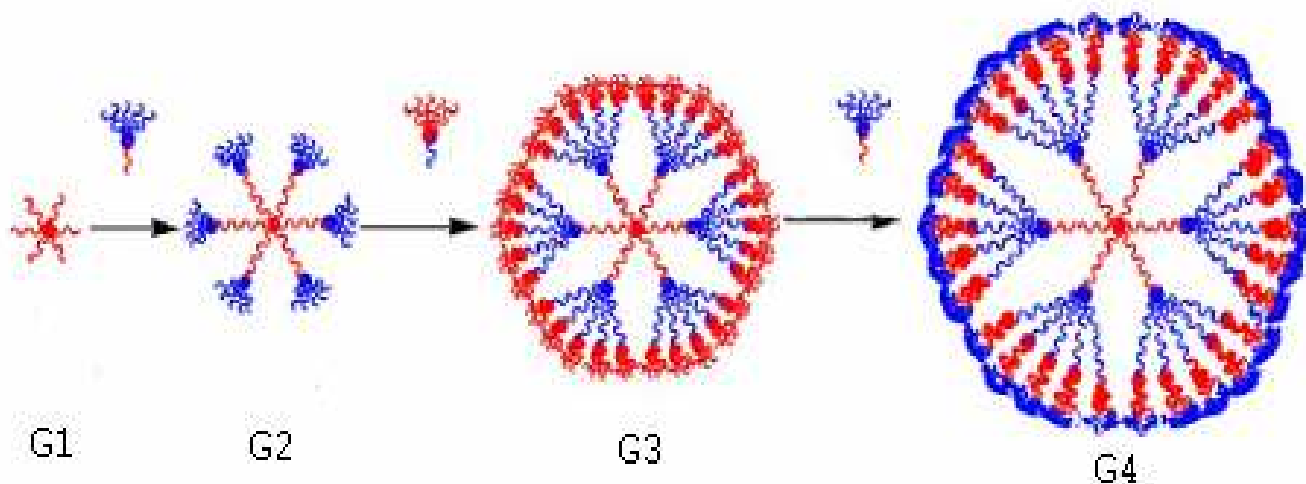


**Obr. 7. Definice generace u poly(aminoamindového) dendrimeru generace 3**

tzpřavidla definováno jako počet ohniskových bodů (kaskádních bodů), směrem od jádra k povrchu: například generace 5 dendrimery má pět kaskádních bodů mezi jádrem a povrchem. Jádro je někdy označováno jako generace „nula“, nemá kaskádní body (**Obr. 7**).

Dendrimery jsou budovány vícekrokovým způsobem. Obecně dendrimery vycházejí od jádra a jako strom se rozvětvují s každou následující generací. Existují dva hlavní přístupy k syntéze dendrimerů:

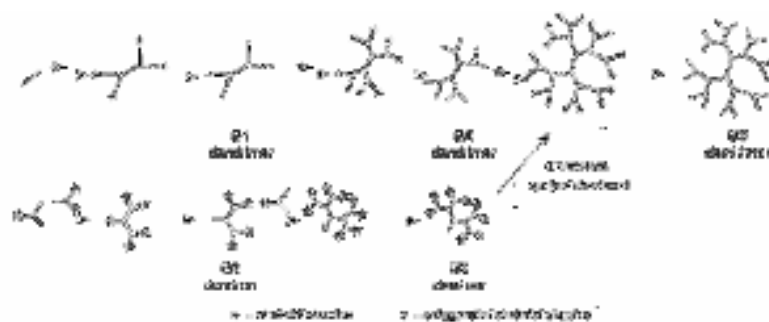
**1 ) divergentní (rozbíhavá) metoda** – start růstu je uvnitř (od jádra) a směřuje směrem ven. Jak už název napovídá, divergentní strategie zahrnuje připevňování opakujících se jednotek okolo jádra během po sobě jdoucích chemických reakcí na okraji rostoucí makromolekuly. Jedná se o



**Obr. 8: Divergentní metoda syntézy dendrimery**

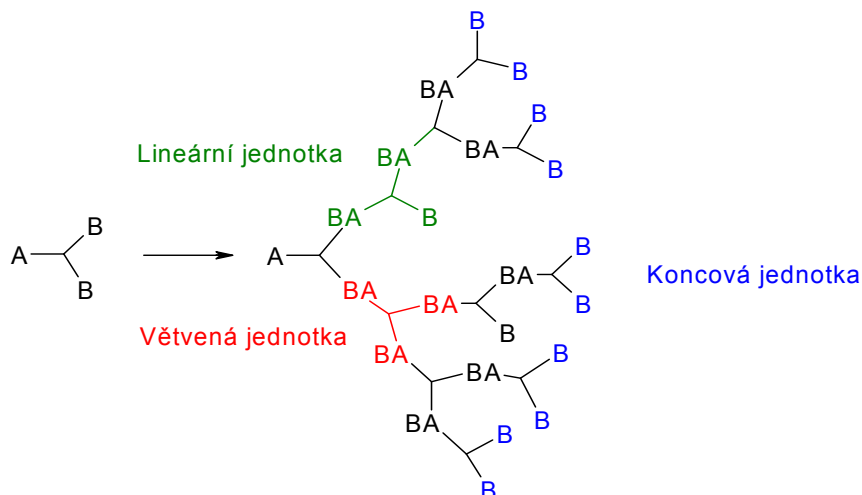
dendrimer s jádrem, kde struktura roste do více směrů, závisí to na mocenství jádra a stavebních jednotkách větvi (**Obr. 8**). Monomerní jednotka s nejméně dvěma chráněnými koncovými skupinami je přidána k základnímu jádru, poté jsou koncové skupiny odchráněny (nebo aktivovány), druhá vrstva chráněných monomerních jednotek je přidána a vznikne další generace dendrimery. Za použití divergentního přístupu mohou být rychle připraveny poměrně velké dendrimery. Nevýhodou tohoto postupu jsou časté problémy s purifikací a mono-dispersitou

**2 ) konvergentní (sbíhavá) metoda** má opačný průběh než metoda divergentní (**Obr. 9**). Molekula je stavěna postupně, začíná se od koncových skupin směrem k vnitřní části a v koncovém kroku je připevněna k jádru.



**Obr. 9 Konvergentní metoda syntézy dendrimerů**

Dendrimery bez jádra rostou pouze v jednom směru a jsou označovány jako *dendrony* AB<sub>2</sub> typu: monomer obsahuje jednu A a dvě B skupiny, které za polymerizačních podmínek spolu reagují, za vzniku vysoce větvených polymerních klínů. V ideálním případě zbývá pouze skupina A, která je držena ve středu, zatímco klín je tvořen počtem rozdílně pospojovaných B skupin, včetně lineárních, větvených a koncových jednotek (**Obr. 10**)

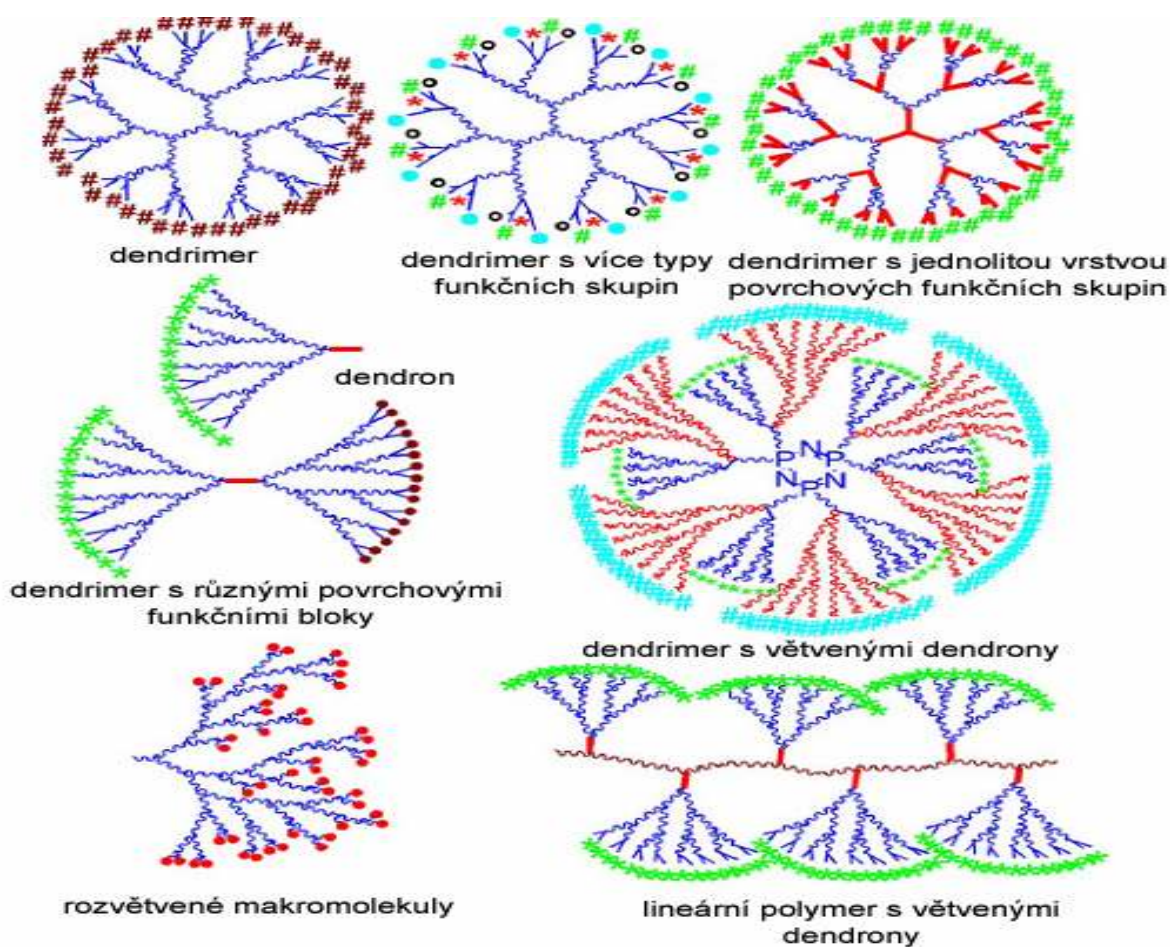


**Obrázek 10: Schématické znázornění AB<sub>2</sub> polymeru.**

Tento proces zahrnuje připevnění dvou koncových částí k jedné koncové skupině, která má chránicí funkční skupinu, vzniká dendron první generace. Odchráněním a reakcí s polovičním ekvivalentem monomeru vzniká další generace. U divergentní metody problém nastává při neúplných reakcích koncových funkčních skupin, protože tyto strukturální chyby jsou nahromaděny s dalšími vzniklými generacemi. Protože meziproducty vykazují stejné fyzikální vlastnosti, chromatografická separace není často možná, či dostatečně účinná. Proto vyšší generace divergentně stavěných dendrimerů často obsahuje nějaké strukturální chyby. U konvergentní metody je segment rostoucí s každým reakčním krokem spojen pouze s jednou větvičí se jednotkou, tento přístup napomáhá odstranění nežádoucích meziproductů. Tato metoda je často omezena jen na dendrimery nižších generací.

Další přístupy přípravy dendrimerů jsou založeny na změnách nebo kombinacích těchto dvou metod. Příkladem je dvoustupňová konvergentní metoda - monodendrony obsahující jednu reaktivní skupinu ve svém středu jsou spojeny divergentním způsobem s okrajem dalšího monodendronu nebo dendrimeru. Různé metody přípravy, rozdílná reaktivita na povrchu, vnitřní části větví nebo v jádře nám dovolují získat sloučeniny mající různorodé topologie (**Obr. 11**). Dobře definovaná struktura těchto třírozměrných polymerů napomáhá ke kontrole jejich tvaru, velikosti, molekulové váhy a topologie. Proto je výzkum dendrimerů tak zajímavý a oblast bádání se rychle rozšiřuje.

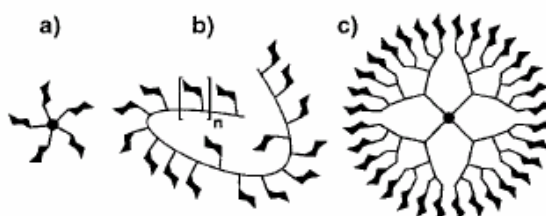
Dendrimery byly použity například pro (chirální) katalýzu, jako povrchově aktivní činidla, jako materiály pro „host-guest“ (studium interakcí) chemii,<sup>1</sup> při chemoterapii, v rakovinové imunitní terapii, pro transport léčebných oligonukleotidů nebo léků do nádorů, pro dodávání kódujících oligonukleotidů, jako modelové sloučeniny pro komplexaci DNA, jako zobrazovací kontrastní činidlo při magnetické rezonanci, pro napodobování membrán, virů a micel, v imunodiagnostice, vakcínových technologiích nebo jako nosiče pro léky a geny.



**Obr. 11: Schématické znázornění různých dendrimerních struktur**

#### 1.4 Přírozené a syntetické glykokonjugáty, jejich příprava a použití v glykobiologii

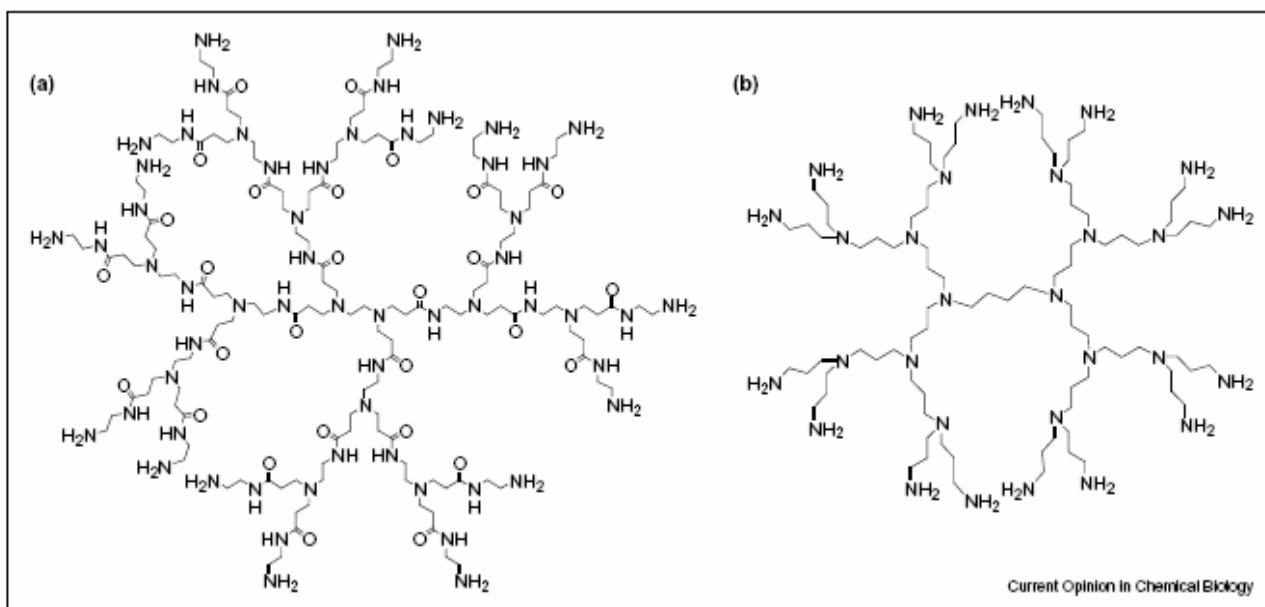
Vzhledem k tomu, že je již dlouhou dobu známo, že pro aktivaci efektorových funkcí buněk imunitního systému je nezbytné dosáhnout přemostění nebo shluknutí několika molekul povrchových membránových receptorů, byla hledána různá molekulární uspořádání sacharidových ligandů vhodná pro zahájení buněčné aktivace. Je evidentní, že pro velkou skupinu receptorů postačuje již dimerizace specifického ligandu, nejčastěji prostřednictvím hydrofilní chemické spojky. Pokud je vyžadován vyšší stupeň valence, jak tomu často je právě u multivalentních receptorů lektinového typu, je možno připravovat sloučeniny obsahující multivalentní ligandy, které mohou být několika typů. Definici multivalentních glykokonjugátů přitom vyhovují jak poměrně malé látky typu glykoklastrů (**Obr. 12a**), tak velmi rozsáhlé glykopolyмеры (**Obr. 12b**), jejichž mo-



**Obr.12 Multival. glykokonjugáty: glykoklastry (a), glykopolyмеры (b) glykodendrimery (c)**

lekulová hmotnost může přesáhnout  $10^5$  Daltonů. Kromě vlastní molekuly sacharidu jako ligandu a molekuly kostry může biologickou aktivitu těchto sloučenin ovlivnit i chemická povaha linkeru.

Sacharidové dendrimery (**Obr. 12c**) spojují některé výhody menších glykoklasterů s velkými glykopolymerem. Ačkoliv nacházejí takové dendrimery stále vzrůstající uplatnění v mnoha oblastech chemie a biochemie, pro použití v biomedicinských aplikacích jsou důležité zejména dendrimery pokryté ligandy sacharidové nebo peptidové povahy. Pro konstrukci sacharidových dendrimerů většinou využíváme komerčně dostupných poly(amidoaminových) (**Obr. 13a**) nebo poly(propyleniminových) (**Obr. 13b**) koster, které lze zakoupit v různých větvených variantách (gene

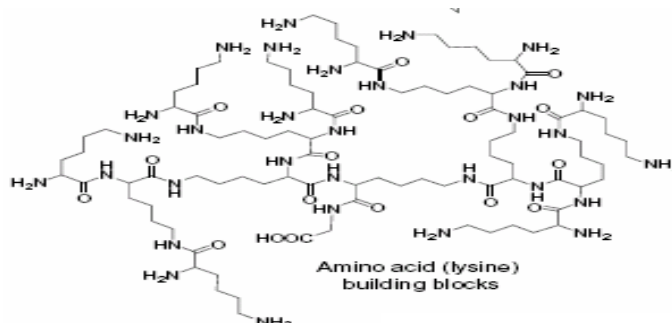


**Obr. 13. Komerčně dostupné poly(amidoaminové) (a) a poly(propyleniminové) kostry**

racích) například u firmy Aldrich. Obě tyto kostry obsahují koncové aminové funkční skupiny, takže se pro napojení příslušných ligandů nejčastěji používají isothiokyanátové deriváty vlastních sacharidů (v takovém případě je sacharid napojený na dendrimer N-glykosidickou vazbou pomocí thiomocovinové spojky, nebo se používají isothiokyanátové deriváty fenylových glykosidů. V tom případě je součástí spojky ještě aromatický kruh, ale anomerní konfigurace sacharidu je na rozdíl od předcházejícího případu přesně definována. Při využití isothiokyanátové chemie je stupeň substituce jednotlivých aminoskupin velmi vysoký, a je možno připravovat vysoce větvené sacharidové deriváty čtvrté až šesté generace. V těchto generacích již ovšem není stupeň substituce sacharidem příliš vysoký, a látky začínají nabývat dalších nevýhodných vlastností (imunogenicita, vysoká molekulová hmotnost). Příkladem možností současné dendrimerní chemie jsou dendrimery substituované  $\alpha$ -D-manosou až do šesté generace. Při použití poly(amidoaminových) jader mají oktadendrimery jádro o molekulové hmotnosti 1430 Da, které může dosáhnout plné substituce sacharidem za vzniku látky o molekulové hmotnosti asi 4 – 5 tisíc Da v závislosti na charakteru použitého sacharidového derivátu. Takové látky jsou také zpravidla nejúčinnější v biologických aplikacích, neboť dosahují vysokých afinit při interakci se sacharidovými receptory, rychle se distribuují v organismu, a jsou neimunogenní. V případě šestnáctinásobných dendrimerů generace 2 je stále ještě možné dosáhnout maximální substituce sacharidem, ale molekulová hmotnost se již blíží 10 kDa, což je z hlediska biologických aplikací méně výhodné. Jestliže pokračujeme do dalších generací, je stupeň substituce sacharidem neúplný, a vznikají ohromné dendrimery o molekulových hmotnostech větších než 100 kDa (256 mer šesté generace). Stupeň substituce sacharidem, kterého lze u takovýchto ohromných dendrimerů dosáhnout je 30 navázaných sacharidů pro 32 mer (substituce 92 %), 54 navázaných sacharidů pro 64 mer (stupeň substituce 84

%), 92 navázaných sacharidů pro 128 mer (substituce 73 %) a konečně 173 navázaných sacharidových residuí pro finální 256 mer šesté generace (Woller a Cloninger 2002).

Pokud jde o peptidové dendrimery, bývají často založené na dendronech vycházejících z vetvřeného lysinu, který je substituovaný na  $\alpha$  i  $\epsilon$ -aminoskupinách do následných generací (Obr. 14). Takováto „polylysinová“ jádra se již stala základem dnes hojně rozšířených sloučenin připra-



**Obr. 14: Polylysinové jádro jako základ peptidových dendrimerů**

vovaných pro imunizaci produkčních zvířat peptidovými antigeny (Niederhafner et al. 2005). Tato technologie tzv. MAP (multiple antigenic peptides) dendrimerů je již hojně využívána v sérodiagnostických metodách v diagnostice hepatitidy, alergie, HIV, a při stanovení erythropoietinu v krvi. Podobné sloučeniny jsou však také používány pro přípravu terapeutických antisér používaných pro léčbu parazitárních onemocnění a přípravu protinádorových a antivirových vakcín. Konečně je potřeba zmínit, že vzhledem k jejich vynikajícím schopnostem při presentaci sacharidových a peptidových epitopů nacházejí ligandové dendrimery vzrůstající uplatnění v moderní glykomice a proteomice, a to při konstrukci současných generací sacharidových a protilátkových arrayů (Xia et al. 2005).

### 1.5 Imunoterapie nádorů

I přes nesporné úspěchy současné medicíny při léčbě a eradikaci některých typů vzácnějších nádorových onemocnění zůstává bohužel dosažený pokrok stále nedostatečný. Jde nejen o to, že nebylo zatím dosaženo kritického průlomu v léčbě klinicky nejvýznamnějších nádorů (v české populaci jsou nádory druhou nejčastější příčinou úmrtí (26 %) po kardiovaskulárních chorobách (53 %), přičemž nejčastějšími nádory jsou melanom, kolorektální a plicní karcinom), ale kvalita života u zachráněných pacientů je navíc často velmi nízká. Příčinou bývá zejména narušený imunitní systém pacientů s nádory: pacienti přicházejí s nádorem k lékaři zpravidla pozdě v době, kdy je již imunitní systém vyčerpán dlouhým bojem s nádorem, a dnes používané přístupy k léčbě nádorů jako jsou chirurgie, radioterapie a chemoterapie nejsou vůči imunitnímu systému rozhodně šetrné. Proto má v dnešní době tak ohromný význam hledání alternativních přístupů k léčbě nádorů, a to jak v rámci přístupů personalizované medicíny (Science, Special Issue 26 May 2006), tak také zejména v rámci nádorových imunoterapií.

Prvé postupy mobilizace imunitního systému v rámci posledně jmenovaného přístupu vycházely z čistě empirických pozorování v době samotného zrodu imunologie a onkologie na konci 19. a počátku minulého století. V roce 1888 si například povšimnul prominentní newyorský chirurg William B. Coley (1862-1936), že klinický průběh nádorového onemocnění se často zlepšil u pacientů, kteří současně prodělávali streptokokové infekce (Coley, 1926). Podání příslušných oslabených mikroorganismů ve formě nazvané Coleyův toxin, které jistě nebylo bez nebezpečí pro nádorové pacienty, a které je dodnes praktikované například v čínské medicíně, poté zůstávalo na dlouhou dobu jedinou známou formou vakcinace proti nádorům. Jeden z prvních nositelů Nobelovy ceny za imunologii v roce 1908, Paul Ehrlich, jasnozřivě předpověděl koncepci takzvané magické

střely, i když tato se původně týkala ne léčby rakoviny ale léčby syphilis, magickou strelou bylo tehdy (1910) nově objevené léčivo Salvarsan (arsphenamine) schopné selektivně hubit spirochety aniž poškozovalo okolní lidské tkáň. Je nutno přiznat, že celá dosavadní historie nádorových imunoterapií je vlastně hledáním takové magické střely, přičemž její konkrétní molekulární forma taková, aby účinkovala prot všem typům nádorů samozřejmě stále nalezena není.

V moderní době medicinského a imunologického výzkumu posledního půlstoletí byly střídavě propagovány v nádorových imunoterapiích různé principy. 60. a 70. léta minulého století byla například obdobím propagace silných nespecifických imunostimulačních činidel, jako byla BCG vakcína (Tishler and Shoenfeld, 2006), popřípadě imunostimulace interferony, interleukinem-2 a jejich kombinací jak *in vivo* tak také *ex vivo* (Rosenberg, 1992). Objev a masivní zavedení technologie monoklonálních protilátek Kohlerem a Milsteinem v polovině 80. let otevřely možnost k úplně novému přístupu v nádorových terapiích, i když nalezení účinných monoklonálních protilátek pro použití v klinice trvalo ještě nejméně dalších dvacet let. Monoklonálních protilátek proti různým buněčným antigenům jsou dnes k dispozici tisíce, avšak pouhých 12 z nich se ukázalo vhodných pro použití v nádorových terapiích (Iannello and Ahmad, 2005). Tak je například protilátka proti CD52 antigenu pod komerčním názvem Alemtuzumab používána k léčbě B-buněčné chronické lymfocytární leukemie, protilátka proti diferenciacímu antigenu HER-2 dodávaná jako Herceptin je používána proti metastazujícím karcinomům prsu a žaludku, popřípadě protilátka proti epidermálnímu růstovému faktoru dostupná jako Bevacizumab je používána proti kolorektálnímu karcinomu, renálnímu karcinomu a karcinomu prsu. Používány jsou též tzv. bispecifické protilátky (dvojí specifity), popřípadě protilátky konjugované se zářiči jako je <sup>131</sup>I.

Z dalších faktorů, které jsou v současné době v protinádorových terapiích intenzivně přetřásány je třeba zmínit alespoň letmo otázku použití blokujících protilátek proti antigenu CTLA4 (Peggs et al. 2006), buněčných imunitních terapií při léčbě nádorů zvláště odolných vůči jiným terapiím (Ballen et al. 2005), úlohu složitých způsobů prezentace antigenu v nádorových terapiích (van der Bruggen et al. 2006), popřípadě úlohu regulačních T buněk při nastolení permanentní imunity proti nádorům (Wang et al. 2006, Orentas et al. 2006) stejně jako negativní účinek makrofágů asociovaných s tumory (Sica et al. 2006).

V neposlední řadě nelze opominout v souboru nástrojů současných nádorových imunoterapií použití směrovaných nádorových léčiv konjugovaných na hydrofilní hydroxypropylmethacrylamidové polymery, při jejichž vývoji a aplikaci dosáhly světových výsledků česká pracoviště Prof. Říhové a Prof. Ulbricha na ústavech Akademie věd. Tyto výsledky jsou tak významné zejména proto, že kolektiv Prof. Říhové ukázal, že nízké koncentrace dlouhocirkulujících polymerních léčiv vyvolávají mobilizaci vlastní imunologické obrany u nádorových experimentálních zvířat, která je spojená s přežitím myši, u nichž byly retransplantovány letální dávky nádorových buněk, zvýšením aktivity NK buněk a tvorbou protinádorových protilátek (Říhová et al. 2002). Podobné pozitivní znaky posílení a stimulace imunitního systému byly pozorovány též u prvých nádorových pacientů (Říhová et al. 2003). Směřovaná léčiva jsou dále zdokonalována s využitím řady inovativních molekulárních rysů, a jsou v současné době již zkoušena též v klinických použitích s pozitivními účinky na kvalitu života příslušných nádorových pacientů (Říhová and Kubačková, 2003; Říhová et al. 2005).

## 1.6 Využití glykokonjugátů a glykodendrimerů pro imunomodulace a nádorové terapie

V průběhu nádorové transformace dochází na povrchu nádorové buňky k řadě změn její povrchové glykosylace. Ta je závislá na přesné a složité koordinaci chemických reakcí katalyzovaných řadou glykosyltransferas a glykosidas, a je tudíž jedním z citlivých markerů buněčné fyziologie za normálních podmínek, při buněčném stresu, i za různých patologických stavů. U nádorových buněk jsou potom v důsledku celkového metabolického rozvratu změny v povrchové glykosylaci velmi výrazné, a týkají se všech základních tříd glykokonjugátů. U **oligosacharidických glykoproteinů** pozorujeme nápadné změny v N-glykosylaci i O-glykosylaci.



Změny v N-glykosylaci se projevují zejména povrchovou expresí vysoce větvených a přitom neúplně dosyntetizovaných oligosacharidových řetězců, které často obsahují v terminálních pozicích zbytky manosy nebo N-acetylglukosaminu místo očekávaných kyselin sialových a galaktosy. U buněk produkujících povrchové O-glykosylované sialomuciny, což jsou zejména buňky epiteliální a endoteliální, pozorujeme zvýšenou biosynézu a sekreci sialomucinů, jejichž vysoká povrchová koncentrace je jedním z charakteristických znaků například u karcinomů. V případě **polysacharidických glykoproteinů** se objevují zejména specifické varianty heparinu a heparan sulfátu, které jsou pro některé nádory velmi charakteristické. Změny v **glykolipidech** spočívají opět zejména ve zvýšené a neregulované biosyntéze krátkých, vysoce sialovaných gangliosidů GM<sub>2</sub> a GM<sub>3</sub>, které jsou například charakteristickými povrchovými znaky u melanomů.

Vzhledem k tomu, že změny povrchová glykosylace jsou pro mnohé nádorové buňky charakteristické a vyskytují se dokonce častěji než deregulovaná exprese onkogenů, stávají se tumorové sacharidové neoantigeny logicky předmětem zájmu biomedicinské a imunologické komunity z hlediska jejich možného využití jako specifických tumorových markerů vhodných v diagnostice nádorového onemocnění a nádorových terapiích. Z celkového počtu 6 klinicky zkoušených protinádorových vakcín byly v roce 1993 tři sacharidové povahy: konkrétně se jednalo o gangliosid GM<sub>2</sub> konjugovaný s makromolekulárním nosičem a podávaný v přítomnosti adjuvans (Fáze 3 klinických zkoušek léčby melanomu, Dr. P. H. Livingston na Memorial Sloan-Kettering Cancer Center v New Yorku), dvě antiidiotypové protilátky proti proteoglykanovým antigenům (Fáze 3 klinických zkoušek léčby melanomu, Idec Pharmaceuticals Corp., USA) a SialylTn sacharidový antigen (Fáze 2 a fáze 3 léčby karcinomu prsu, ovárií, pankreatu a tlustého střeva, Biomira Inc., Kanada) (Cohen 1993). Při dalším vyhodnocení v roce 2001 bylo již zřejmé, že všechny výše uvedené preparáty byly v klinických zkouškách úspěšné, a jsou již nyní aplikovány u pacientů. Významný je zejména fakt, že sacharidové protinádorové vakcíny zastavují metastatický rozsev u řady nejobtížněji zvládnutelných nádorů (melanom, karcinomy) a zároveň mobilizují vlastní obranný systém organismu k boji proti nádoru (Alper 2001).

Současně se zkouškami a klinickým používáním již zavedených sacharidových protinádorových vakcín však dochází neustále ke zdokonalování a vývoji dalších glykokonjugátů vhodných pro tyto aplikace. Mezi takto používané sacharidové konjugáty a sacharidové denrimery patří zejména sacharidový dendrimer obsahující strukturu glykolipidu globoH, která je charakteristická pro nádory prsu, a fukosylGM<sub>1</sub> dendrimer, který je charakteristicky exprimovaný na povrchu buněk plicního nádoru. Oba výše uvedené denrimery jsou produkovány v laboratoři Dr. S. Danishefského na Columbia University v New Yorku, a jsou klinicky zkoušeny zejména P.H.Livingstonem na Memorial Sloan-Kettering Cancer Centru v New Yorku (Alper 2001). Pokračují experimenty směřující ke konstrukci sloučenin prezentujících optimálním způsobem sialylTn antigeny. Jedním z aktivně zkoušených schemat je připojení disacharidických nebo trisacharidických sialovaných sekvencí na peptidovou kostru v rámci konstrukce tzv. hřebenových glykodendrimerů (Sames et al. 1997). V naší laboratoři jsme zkoušeli obdobné, ale jednodušší hřebenové dendrimery obsahující Tn antigen,  $\alpha$  glykosidicky vázaný GalNAc, a prokázali jsme dobrou reaktivitu nejen s relevantními rostlinnými lektiny, ale i s NKR-P1A receptory. Navíc se ukázalo, že je takový dendrimer mimořádně účinným aktivátorem přirozeného zabíjení NK buňkami (Vepřek et al. 2006). Několik prací z posledního období se zabývalo ideálním způsobem presentace sialylTn nádorových antigenů na různých chemických kostrách. Ragupathi a spol. zjistili, že zatímco monomerní sialylTn antigen konjugovaný na proteinový nosič je vysoce účinný při experimentálních terapiích nádorů, obdobný trimerní sialylTn antigen dosahuje v tomto ohledu ještě výhodnějších výsledků (Ragupathi et al. 1999). Způsob presentace sialylTn antigenu je též kritický pro účinnost tvorby protilátek proti tomuto nádorovému antigenu (Kircheis et al. 2005).



## 2. POZNÁMKY K POUŽITÝM METODIKÁM

### 2.1 Syntéza a analýza glykokonjugátů

Přestože jsou mnohé glykokonjugáty nezbytné pro použití ve výzkumu sacharidové specifity lektinových receptorů látky komerčně dostupné, v řadě případů se nevyhneme nezbytnosti jejich laboratorní syntézy. Tuto musíme provádět například z důvodu omezené dostupnosti některých komerčních produktů u určitých dodavatelů, zhoršení kvality komerčního produktu, jejich vysoké ceny, popřípadě nezbytností určité chemické modifikace, kterou nelze komerčně zajistit. Ačkoliv existuje nezměrné množství syntetických schémat použitelných pro přípravu sacharidových konjugátů, koncepčně jsou si všechny tyto strategie do velké míry podobné. Základem je příprava přirozeného nebo syntetického jádra s dostatečným počtem chemicky modifikovatelných skupin jako jednoho z interakčních partnerů, a dále sacharidového derivátu v reaktivní podobě schopné spolehlivě a pokud možno kvantitativně substituovat chemické skupiny jádra. Vlastním jádrem mohou být například jednoduché organické oligoaminy v případě glykoklastrů, polyaminoamidové dendrimery komerčně dostupné pod názvem Starburst<sup>®</sup> v případě glykodendrimerů, popřípadě proteinové nebo jiné polymerní nosiče v případě glykopolymerů. Aktivace sacharidových derivátů je většinou mnohastupňový proces, který s výhodou využívá nejběžnějších anomericky definovaných sacharidů dostupných komerčně ve formě 4-nitrofenylových derivátů příslušných  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -glykosidicky vázaných cukrů. Nitroskupina je poměrně stabilní, a tudíž vhodná pro transport a skladování výše uvedených sacharidových derivátů. Není však dostatečně reaktivní pro vlastní konjugaci – před konjugací se tudíž musí aktivovat nejprve redukcí na aminoskupinu (redukce vodíkem na paladiovém katalyzátoru) a následným převedením na isothiokyanátovou funkci reakcí s thiofosgenem. Isothiokyanátové deriváty sacharidů poté účinně reagují s aminovými skupinami na jádre glykokonjugáty: pokud pro to nejsou speciální důvody (například sterická omezení bránící přístupnosti reagující aminoskupiny) probíhá konjugační reakce do vysokého stupně konverze i při mírném molárním nadbytku aktivovaného sacharidu (Semeňuk et al. 2001).

Alternativní metodou pro získání aminoderivátů sacharidů je inkubace redukujících cukrů v nasycených roztocích hydrogen uhličitanu amonného při pH mezi 7 a 8. Tato metoda je vhodná zejména v případě N-acetylhexosaminů, a funguje stejně účinně pro monosacharidy i oligosacharidy obsahující tento cukr na redukujícím konci. Po několikadenní inkubaci za výše uvedených podmínek izolujeme odpovídající  $\beta$ -glykosylaminy pomocí iontoměníčů, a ihned je převádíme na odpovídající isothiokyanátové deriváty. Alternativou k převedení sacharidových aminoderivátů na isothiokyanáty je jejich přímé použití v konjugační reakci. Přitom používáme chemické reakce probíhající s vysokou účinností ve vodných roztocích za laboratorní teploty. Námi bylo úspěšně odzkoušeno použití N-hydroxysukcinimidového reakčního schématu známého z proteinové chemie (zesítnění bifunkčními činidly N-hydroxysukcinimidového typu). Reakční schéma je zejména vhodné pro přípravu dimerních sacharidových konjugátů, pro značení sacharidů s použitím komerčně dostupného Bolton-Hunterova činidla, a pro imobilizaci sacharidů na N-hydroxysukcinimidově aktivované Sepharose (Bezouška et al. 1991).

Použití symetrických dendrimerických jader není vhodné v případě, že chceme finální molekulu glykodendrimeru značit například pomocí fluorescenčních značek. V tom případě syntéza sacharidových dendrimerů vychází z molekuly zpola chráněného aminu (například hexamethylendiamin chráněný na jedné straně Boc skupinou – **Schema 1** v **Publikaci 45**), který je následně modifikován dvakrát ve dvou následných reakcích vždy methyl akrylátem a ethylen diaminem. Tímto postupem získáme čtyřikrát aminosubstituovaný dendrimer s Boc chráněným koncem, který je po pokrytí sacharidem odchráněný a vzniklou aminoskupinu je možné využít pro konjugaci specifické značky (Krist et al. 2004).

Po syntéze popřípadě purifikaci glykokonjugátů je kritické provedení detailních analýz zaručujících odpovídající kvalitu syntetických produktů. Přitom je vhodné kombinovat kvantitativní chemické analýzy s molekulární analýzou z hlediska velikosti, monodisperzity a molekulární

struktury. Kvantitativní sacharidové analýzy nás mohou upozornit jednak na nedokonale proběhlou syntézu, jednak na případné problémy vzniklé v průběhu purifikace; tyto problémy přitom bývají zřídka zachyceny z výsledků jiných analýz. Vzhledem k časté purifikaci glykokonjugátů na silikagelových kolonách může silikagel uvolňovaný z purifikačních kolon pronikat do přečišťované látky, a tvořit významnou část hmotnosti výsledného preparátu. Proto je třeba pomocí metod kvantitativní sacharidové analýzy vždy prověřovat zejména preparáty komerční a preparáty, u nichž není znám jejich přesný způsob syntézy a purifikace.

Pokud jde o strukturní analýzu glykokonjugátů, zůstává u nízkomolekulárních sloučenin NMR stále základní a často jedinou vhodnou metodou jejich analýzy (Krist et al. 2004). Vzhledem k tomu, že glykodendrimery jsou sloučeniny naprosto symetrické, nelze pomocí NMR spektroskopie příliš zkoumat jejich trojrozměrné uspořádání, a k jeho odhadu musíme používat nepřímé metody popřípadě matematické modelování a molekulární dynamiku (Dykes 2001). Na druhé straně se pro analýzu glykokonjugátů, a to zejména glykokonjugátů typu glykodendrimerů, ukázala jako velmi vhodná hmotnostní spektrometrie (Havlíček et al. 1998). Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF zůstává základní experimentální technikou pro analýzu širokého spektra glykokonjugátů od nízkomolekulárních glykoklastrů až po glykopolymery. Glykokonjugáty lze při laserovou ionizací účinně ionizovat s použitím maticí vhodných pro analýzu sacharidů (například kyseliny diaminobenzoové), a s hmotnostních spekter lze s dostatečnou přesností ověřit zejména očekávaný stupeň substituce glykokonjugátu sacharidem. Určité unikátní možnosti poté poskytují fragmentační hmotnostně spektrometrické techniky jako je například PSD (post-source decay) MALDI, pomocí nichž je možno u jednodušších glykodendrimerů dobře dokumentovat postup syntézy na jednotlivých větvích (Havlíček et al. 1998).

## 2.2 Příprava lektinových receptorů a jejich charakterizace

Přestože má studium lektinových receptorů zabíječských lymfocytů v naší laboratoři dlouhou tradici, soubor doposud námi produkováných proteinů je poněkud omezený. Naše základní experimentální strategie je založená na produkci rozpustných forem těchto receptorů obsahujících jejich extracelulární segmenty ve formě rozpustných proteinů vhodných pro vazebné experimenty a identifikace ligandů. Upřesnění detailů této strategie si ovšem vyžádalo zhruba 15 let intenzivní experimentální práce v naší laboratoři. Již záhy po identifikaci prvního receptoru lektinového typu na povrchu přirozených zabíječských buněk počátkem 90. let minulého století (Giorda et al. 1991) bylo zřejmé, že se na proteinové úrovni jedná o naprosto specifické zástupce rodiny živočišných lektinů C-typu obsahující extracelulárně exponované domény obdobné sacharid vázajícím doménám klasických živočišných lektinů. Tyto sacharidové domény jsou vázané na membránu spojovacími proteinovými segmenty označovanými jako „stonek“ (angl. stalk). Receptory tvoří na buněčném povrchu homodimery, přičemž na tvorbě dimerů se podílejí zejména meziřetězcové disulfidové můstky nacházející se jednak v oblasti stonku a jednak v C-terminálním segmentu.

Pro design rozpustných forem NK receptorů tak vyplývají v podstatě dvě základní možnosti: exprese asi 100 aminokyselin dlouhé „minimální“ lektinové domény a exprese celé extracelulární domény. Oba tyto přístupy nabízející se jako evidentní řešení na základě molekulárně biologických dat se ovšem v průběhu let našeho výzkumu ukázaly jako prakticky velmi obtížně realizovatelné. Produkce tzv. „minimální“ lektinové domény narazila zejména na problémy spojené s omezenou rozpustností a stabilitou proteinů produkováných bakteriální expresí ve formě nativních proteinů sekretovaných do periplasmatického prostoru bakterií nebo proteinů denaturovaných v inkluzních tělískách a skládaných *in vitro*. Tímto postupem se tedy podařilo připravit pouze malé množství omezeně stabilních receptorových proteinů (tj. receptorů divokého typu a některých mutantních forem) vhodných pro ligandové vazebné studie (**Publikace 41**).

Expresí lektinových receptorů NK buněk obsahujících celou extracelulární část se ukázala jako perspektivnější, i když i zde bylo třeba překonávat řadu problémů. Ty byly spojené zejména s vypracováním takových protokolů pro poskládání (refolding) těchto proteinů *in vitro* při němž by

došlo ke správnému poskládání všech intra- i interřetězcových disulfidových můstků. Částečné řešení přinesla aplikace některých protokolů poskládání proteinů přímo na afinitní niklové koloně (Childs et al. 1999). S využitím tohoto přístupu jsme zaznamenali určitý úspěch v případě CD69 antigenu produkovaného ve formě kovalentního disulfidem vázaného dimeru. U ostatních proteinů jsme nebyli schopni získat dobře poskládané proteiny, a byli jsme tudíž nuceni naši experimentální strategii znovu přehodnotit. Optimální řešení nakonec spočívalo v expresi extracelulárních částí lektinových receptorů NK buněk v takovém rozsahu, aby protein neobsahoval žádné nadbytečné cysteinové zbytky s výjimkou těch, které jsou nezbytné pro tvorbu tří disulfidových můstků definujících tzv. dlouhou doménu lektinů C-typu (Kogelberg et al. 2000). Po expresi odpovídajících segmentů lektinových receptorů v bakteriích a izolaci inkluzních tělísek byly produkovány vysoce stabilní a velmi dobře rozpustné proteiny ve formě nekovalentních dimerů. Refoldingové a purifikační protokoly byly dosud zvládnuty pro tři receptory: lidský CD69 antigen a receptory NKR-P1A a NKR-P1B potkana. Rozpustné formy těchto receptorů jsou získávány ve formě vysoce homogenních proteinů po purifikaci trojstupňovým postupem iontoměnič – kolona s obrácenou fází – gelově filtrační kolona. Takto získané proteiny jsou velmi stabilní ještě při koncentraci 30 mg/ml.

Dlouhodobá stabilita sledovaná například měřením vícerozměrných NMR spekter je velmi dobrá, proteiny nejsou degradovány ani po inkubaci při 37 °C po dobu několika měsíců. Překvapivě vysoká je krátkodobá teplotní stabilita sledovaná měřením termálních denaturačních křivek ve spektrofotometru s termostatovanou kyvetou. V nativním stavu mohou být proteiny zahřívány krátkodobě až na 70 °C aniž dochází k viditelné denaturaci, po redukci disulfidových můstků DTT je však stabilita významně snížena ( $T_m$  asi 40 °C). Dimerní status produkovaných receptorů byl sledován dalšími experimentálními technikami například měřením rychlosti pohybu molekuly v sacharosovém gradientu v ultracentrifuze, popřípadě zesilováním dimerního receptoru kovalentními činidly. Takto produkováné proteiny velmi dobře a reprodukovatelně krystalují, čehož lze využít i ke sledování interakcí s ligandy například vápníkem. Konečně jsou v současné době produkovány receptory na minimálním M9 médiu obsahujícím  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  popřípadě jeho kombinaci s  $^{13}\text{C}$ -značenou glukosou (v koncentraci 2 g/l M9 média). Takto jsou produkovány proteiny v neznačené,  $^{15}\text{N}$ -značené a  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -značené podobě a používány pro měření vícerozměrných NMR spekter a spektrometrické titrace jednotlivými ligandy. Výše uvedené experimentální techniky jsou konečně kombinovány s počítačovým modelováním a molekulární dynamikou sledovaných molekul, popřípadě mohou být metodou „docking“ předpovídány teoretické možnosti pro interakce s již známými ligandy, a navrhovány některé nové třídy ligandů (**Publikace 50**).

Nakonec je třeba se zmínit o přípravě rozpustných forem NK receptorů v eukaryotických expresních systémech. Použití savčích buněk pro velkoobjemové produkce těchto proteinů zatím není považováno za vhodné vzhledem k nízké úrovni produkce, vysoké ceně produkčních médií, a nehomologní glykosylaci proteinů produkovaných v produkčních savčích buňkách (většinou jde o fibroblasty) oproti buňkám lymfoidním (NK buňky). Naproti tomu mohou expresní systémy založené na nižších eukaryotech přinášet určité výhody. V naší laboratoři se nyní pokoušíme připravovat některé NK receptory obtížně exprimovatelné v bakteriích s použitím proteinového expresního systému v kvasince *Pichia pastoris*. Návrh expresních vektorů je založený na sekreci proteinů do kultivačního média ve formě plně poskládaných dimerních proteinů obohacených navíc o N-glykosidicky vázané oligosacharidové řetězce. Předpokládáme, že tyto krátké oligosacharidy by mohly dále zlepšovat stabilitu a rozpustnost námi produkovaných proteinů.

### **2.3 Sledování interakcí lektinových receptorů se sacharidovými ligandy pomocí klasických biochemických technik a moderních metod současné glykomiky**

Pro vlastní identifikaci ligandů používáme v počáteční fázi různých technik založených na principu ligandového blottingu. Rozpustné rekombinantní NK receptory získané výše uvedenými postupy (viz. předchozí kapitola 2.2) jsou nejprve značeny pomocí různých značek nezbytných pro jejich citlivou a specifickou identifikaci (**Publikace 15**). V našich experimentech jsme zatím

používají zejména značení proteinů radioaktivním jodem  $^{125}\text{I}$  Iodogenovou metodou, které je velmi spolehlivé, citlivé, a navíc je možné přesně nastavit specifickou aktivitu preparátu dle potřeby experimentu. Vzhledem k narůstajícím legislativním problémům i vysoké ceně radioaktivních preparátů, a též vzhledem k ohromnému pokroku ve vývoji fluorescenčních značek se v současné době pokoušíme o fluorescenční značení rozpustných lektinových receptorů.

Varianty ligandového blottingu používané pro počáteční identifikaci sacharidových ligandů jsou založené zejména na metodě převrstvování elektroforeogramů, proteinových blotů a TLC chromatogramů. Jako ligandy jsou pro počáteční odhad sacharidové specifity používány zejména neoglykoproteiny, přirozené glykoproteiny, neoglykolipidy a přirozené glykolipidy. Neoglykoproteiny jsou zejména založené na BSA, neglykosylovaném proteinu krevního séra, jehož lysinové zbytky jsou substituované sacharidy zejména ve formě 4-aminofenylových derivátů (viz. kapitola 2.1). Používané jsou zejména monosacharidové deriváty se specifickou anomerní konfigurací, ale i definované oligosacharidy a fragmenty polysacharidů (například heparin-BSA). Při použití přirozených glykoproteinů je celý postup velmi obdobný, při experimentu je však třeba provést identifikaci vazebného glykoproteinu, a to jak jeho proteinové části tak i oligosacharidových komponent. Tato analýza je dnes již rutinně zvládnutá, využívá se různých identifikací založených štěpení celého glykoproteinu proteinasami (trypsin, chymotrypsin, Asp-N proteinasa) a endoglykosidasami (N-glykanasa, Endo H<sub>f</sub> endoglykosidasa), extrakci uvolněných peptidů a oligosacharidů, a jejich citlivou identifikaci hmotnostně spektrometrickými technikami (MALDI TOF MS, IT MS, FT-ICR MS). Vazba lektinu na oligosacharidové komponenty glykoproteinů je obtížně interpretovatelná vzhledem k známé mikroheterogenitě těchto sloučenin. Proto je třeba analýzu celkového glykosylačního profilu ještě doplnit detailním vyšetřením vazby na jednotlivé izolované oligosacharidové řetězce. Pro tyto účely byla vyvinuta v laboratoři Prof. Feizi metoda neoglykolipidových blotů (**Publikace 16**) založená na odštěpení veškerých oligosacharidových komponent cílového glykoproteinu a jejich konjugaci se syntetickým fosfolipidem fosfatidylethanolaminem. Získaná směs tzv. neoglykolipidů se separuje pomocí TLC, a fixované chromatogramy jsou opět převrstveny roztokem značeného lektinu (mohou se ovšem použít i celé buňky obsahující na svém povrchu transfekovaný lektinový receptor – Yuen et al. 1994). Po identifikaci vazby pak provedeme analýzu cílové oligosacharidové skupiny opět hmotnostní spektrometrií. Postup je naprosto analogický v případě použití přirozených glykolipidů, důležité jsou zejména sialované gangliosidy (**Publikace 16**).

#### 2.4 Imunologické metody hodnocení účinku sacharidových konjugátů

Při hodnocení imunologických účinků sacharidových konjugátů je třeba rozlišovat stanovení prováděná *in vitro* a *in vivo*. V prvé skupině se jedná zejména o sledování účinku testovaných glykodendrimerů na určité buněčné populace izolované dnes gradientovou centrifugací a průtokovou cytometrií. Jako standardních testů používáme testu buněčné proliferace (inkorporace  $^3\text{H}$  thymidinu), dále testu buněčné cytotoxicity, popřípadě biochemických stanovení obsahu intracelulárního vápníku a inositolfosfátů (**Publikace 16**). Pro sledování dlouhodobých účinků glykokonjugátů *in vivo* jsme v naší laboratoři ve spolupráci s Laboratoří přirozené buněčné imunity MBÚ AV ČR používali zejména dvou experimentálních nádorových modelů: kolorektálního karcinomu potkanů a myšího melanomu. V experimentech *in vivo* se sledovalo zejména přežívání zvířat po podání sacharidových konjugátů, procento výskytu nádorů u jednotlivých zvířat v experimentálních skupinách, a byly sledovány imunologické parametry v průběhu léčby. S použitím značených glykokonjugátů byl dále sledován osud těchto sloučenin na úrovni cílových tkání a jednotlivých buněk, a byla prováděna detailní histologická analýza přestupu cytotoxických buněk do místa nádoru. Moderními mikroskopickými technikami byla též sledována buněčná lokalizace a redistribuce podávaných sacharidových konjugátů.

### 3. KOMENTÁŘ K SOUBORU PUBLIKACÍ

#### 3.1 Studium hlavního aktivačního antigenu potkaních NK buněk, molekuly NKR-P1

Lektiny, v rané literatuře nazývané též aglutininy nebo hemaglutininy, představují velmi důležitou třídu proteinů, které plní v organismu řadu důležitých funkcí. Unikátní biologické aktivity některých lektinů upoutaly pozornost badatelů již před mnoha lety. V úplných počátcích historie lektinového výzkumu, která se počala psát ke konci 19. století na některých univerzitách v německé kulturní sféře, se jednalo zejména o nápadnou toxicitu lektinových preparátů (ricin, abrin), a dále o jejich schopnost srážet (aglutinovat) specificky červené krvinky různých krevních skupin (Kocourek 1986). Fyziologický význam lektinových molekul přímo v produkčních organismech začal být důkladně studován poměrně pozdě v celé historii lektinového bádání, a to nejprve u lektinů živočišných, zejména u jaterního lektinu objeveného Morellem a Ashwellem ke konci 70. let minulého století. Tito autoři si všimli nápadně zkráceného biologického poločasu oběhu některých glykoproteinů krevního séra po odstranění koncových kyselin sialových v cukerných řetězcích těchto molekul. Tento efekt byl správně interpretován na základě interakce subterminálních  $\beta$ -D-galaktosylových zbytků se specifickým receptorem, který byl v průběhu 80. let lokalizován na povrchu jaterních hepatocytů u několika živočišných druhů (králík, potkan, skot, prase, a posléze člověk), a nakonec izolován biochemicky a charakterizován jako galaktosově specifický jaterní lektin (Ashwell and Harford 1982). Ještě během 80. let minulého století pak docházelo k objevu dalších živočišných lektinů, jejich biochemické charakterizaci, sekvenování a nakonec klonování. Jakmile začal být k dispozici dostatečný počet aminokyselinových sekvencí těchto molekul, docházelo k prvním pokusům o srovnání těchto sekvencí s cílem pochopit molekulární evoluci těchto molekul, popřípadě jejich společný sekvenční a strukturní motif. Práce Drickamera objasnily existenci konzervovaného sekvenčního motivu charakterizující celou rodinu živočišných lektinů C-typu, který je dnes používán ve většině proteinových databázích (Drickamer 1995). Metodicky se jednalo o obtížný úkol zejména proto, že aminokyselinový motiv není kontinuální, ale spíše se jedná o často přerušovanou sekvenci několika aminokyselinových zbytků vyskytujících se v určitých konzervovaných pozicích. Na základě námi prováděných počítačových analýz s využitím algoritmů pro současnou analýzu mnoha aminokyselinových sekvencí (angl. *multiple sequence alignment*) se nám podařilo nejen takový aminokyselinový motif charakterizovat, ale byl současně formulován první evoluční strom celé lektinové rodiny (**publikace 7**). Příslušný dendrogram rodiny lektinů C-typu (**obr.4 v publikaci 7**) poskytuje rámec pro pochopení molekulární evoluce celé lektinové rodiny. Je evidentní, že vznik jednotlivých podrodin živočišných C-lektinů předcházela v průběhu evoluce vzniku jednotlivých živočišných druhů, u nichž se tyto receptory vyskytují. Vznik jednotlivých podrodin, které byly definovány v původní práci čtyři, souvisel s určitými detaily molekulární stavby těchto proteinů, která byla naopak důsledkem vzniku určitých kombinací jednotlivých exonů kodujících základní proteinové domény k nimž došlo mechanismem tzv. míchání exonů (angl. exon shuffling). Základem přitom byla vždy sacharid vázající doména (angl. carbohydrate recognition domain) kódovaná jedním až třemi exony, která v průběhu evoluce asociovala s jinými proteinovými doménami. V případě rozpustných molekul lektinové podrodiny III se jednalo o domény kódující nefibrilární kolagen, což vedlo ke vzniku oligomerních receptorů důležitých v imunitním rozpoznávání. V případě membránových molekul je lektinová doména vždy situována extracelulárně, i když došlo podle typu asociace se segmenty kodujícími transmembránovou doménu ke vzniku molekul jak I. tak II. typu: receptory II. typu jsou jaterní lektiny a podobné receptory odpovědné za endocytosu glykoproteinů krevního séra, mezi receptory I. typu patří selektiny, důležité molekuly mezibuněčné adheze.

V dalším období docházelo k publikaci několika zdokonalených verzí evolučního stromu živočišných lektinů C-typu. Významnou novinkou bylo zejména zařazení receptorů přirozených zabíječských (NK, z angl. **natural killer cell**) buněk objevených a klonovaných poprvé počátkem 90. let (skupina V evolučního stromu – viz. **obr. 2 v publikaci 8**). O této skupině proteinů dnes

víme, že se evolučně nejvíce vzdálila klasickým lektinům C-typu, a právě v této podskupině došlo k vývoji řady unikátních biochemických a funkčních vlastností. Tyto neobvyklé vlastnosti byly pak postupně v průběhu 90. let v naší laboratoři a řadě dalších imunologických laboratořích objevovány. Ačkoliv jsou z hlediska své molekulární stavby molekuly ve skupině V podobné klasickým jaterním lektinům ve skupině II, existuje u těchto molekul řada důležitých specifíků. Z funkčního hlediska je důležité, že intracelulární peptidové sekvence u NK receptorů ve skupině V mají významnou úlohu v signalizaci prostřednictvím těchto receptorů. Tyto sekvence obsahují peptidové motivy charakteristické pro aktivační popřípadě inhibiční receptory buněk imunitního systému (tzv. ITAM a ITIM motivy), popřípadě motivy odpovědné za asociaci s proteinovými tyrosinovými kinasami. Z hlediska oligomerního uspořádání je pro NK receptory V. skupiny charakteristické jejich uspořádání na membráně ve formě homo- nebo heterodimerů. Dnešní strukturní znalosti nám zároveň umožňují popsat celkovou trojrozměrnou strukturu těchto proteinů, kdy spolu interagují dvě globulární ligand vázající domény.

Studium klíčového aktivačního antigenu NK buněk potkana, molekuly NKR-P1, bylo v naší laboratoři zahájeno brzy po klonování a sekvenování této molekuly v roce 1991 (Giorda et al. 1991) (**publikace 15**). Rekombinantní eukaryotickou i prokaryotickou expresí se podařilo získat několik variant tohoto proteinu zahrnující jednak celou extracelulární část a jednak samotnou lektinovou doménu. Proteiny exprimované v eukaryotických buňkách COS přitom měly velmi podobné funkční vlastnosti jako bakteriální proteiny. Získání malých množství eukaryotických proteinů umožnilo analyzovat způsob jejich glykosylace N-glykosidicky vázanými oligosacharidy. Protože však N-glykosylace neměla žádný vliv na biochemické vazebné vlastnosti, a protože bakteriální proteiny mohly být produkovány ve vysokých množstvích, byly bakteriální proteiny používány pro většinu experimentů. Vazebné pokusy na afinitních nosičích s navázanými sacharidy a ligandový blotting využívající sacharidových derivátů BSA prokázaly vazbu na zbytky  $\beta$ -N-acetylhexosaminů (GlcNAc, GalNAc) a dále slabší vazbu vůči L-fukose (**obr. 3 a 5 v publikaci 15**). Jako velmi zajímavé se jeví pokusy s vazbou vápníku na NKR-P1, který vykazoval v rámci rodiny lektinů C-typu určité unikátní vlastnosti. Přítomnost vápníku se jevila jako nezbytná při skládání (refoldingu) plně denaturovaných preparátů NKR-P1 *in vitro*. Po poskládání byl vápník ve struktuře tohoto proteinu velmi silně zabudován, takže ho nebylo možné odstranit ani chelatačními činidly typu EDTA (**tab. I v publikaci 15**). Vápník bylo možné z proteinu odstranit pouze v kyselém (pH 4) nebo alkalickém (pH 10) prostředí, po jeho odstranění však již docházelo k denuraci celého proteinu.

Po získání stabilních rekombinantních preparátů rozpustného NKR-P1 receptoru ve formě dimerního proteinu připomínajícího nativní formu tohoto receptoru bylo možné provést jednak detailní charakterizaci vazebné specifity tohoto proteinu a jednak funkční experimenty motivované snahou objasnit úlohu tohoto proteinu v procesu přirozeném zabíjení. Z toho důvodu byly jako potencionální ligandy pro NKR-P1 protein sledovány neutrální i nabitě („kyselé“) sacharidy nesoucí sekvence náležící do skupiny sacharidů krevních skupin, ganglio a glykosaminoglykanové série (**publikace 16, tab. 1**). Celkem bylo s použitím přímých vazebných a inhibičních testů zkoušeno asi kolem 70 různých sacharidových struktur. Z nich jeví vůči NKR-P1 proteinu nejvyšší afinitu sialovaný gangliosid GM<sub>2</sub>, sulfátovaný glykolipid SB<sub>2</sub>, které byly testovány na úrovni 64 pmolu ligandu na jamku (**publikace 16, obr. 1c**). Ještě vyšších afinit ovšem dosahovaly několikanásobně nabitě sacharidy izolované z glykosaminoglykanu heparinu, které musely být z důvodu vysoké afinity testovány na úrovni 8 pmolů na jamku (**publikace 16, obr. 1d**). Důkaz o tom, že výše popisované vazby představovali specifickou biologickou vazbu poskytly následné inhibiční experimenty, a zejména pak výborná korelace mezi hierarchií sacharidových struktur zjištěnou v inhibičních a vazebných experimentech (**publikace 16, obr. 2**). Další experimenty umožnily rychle nalézt překvapující korelaci mezi schopností jednotlivých vysokoafinitních oligosacharidových ligandů inhibovat vazbu rozpustného proteinu na cílové linie citlivé na NK zabíjení a jejich schopností inhibovat NK zabíjení (**publikace 16, obr. 3**). Ačkoliv dodnes není

zcela pochopena komplexita povrchové glykosylace nádorových buněčných linií a její vztah k přirozenému zabíjení, umožnily nám výše uvedené poznatky vzápětí konstrukci jakési „mimikry“ cílové buňky ve formě malých částic – liposomů – pokrytých vysokoafinitními sacharidovými ligandy ve formě svých glykolipidových nebo neoglykolipidových derivátů. Takové liposomy pokryté sacharidovými sekvencemi jako cílovými strukturami jevíly zejména vysokou schopnost aktivovat potkaní NK buňky prostřednictvím receptoru NKR-P1, která byla dokonce ještě vyšší než aktivace způsobená zesíťováním tohoto receptoru protilátkou (**publikace 16, obr.4**). Aktivace přirozeného zabíjení NK buňkami prostřednictvím vysokoafinitních sacharidových ligandů pro NKR-P1 receptor se ukázala schůdnou pouze v případě NK senzitivních buněčných linií YAC-1, B16S a 1C21 obsahujících na svém povrchu dostatek sacharidových ligandů pro NKR-P1 receptor (**publikace 16, obr. 5d a 5e**). NK rezistentní buněčná linie P815 má těchto sacharidových ligandů na svém povrchu nedostatečné množství, a není tudíž schopná vyvolat účinné NK zabíjení. K odstranění tohoto problému je nicméně možné použít preinkubaci s liposomy s vysokou povrchovou hustotou sacharidových ligandů NKR-P1. Takové liposomy jsou schopny splýnout s membránou NK rezistentních buněk, a přenést sacharidové ligandy na jejich povrch. Takto upravené buňky jsou již poté schopny vyvolat NK zabíjení (**publikace 16, obr. 5a**) což ukazuje na možné terapeutické odstranění nádorových nebo virově infikovaných buněk po jejich označení vysokoafinitními sacharidovými ligandy pro NKR-P1 též za podmínek *in vivo*.

Důkazy pro to, že je takový postup opravdu možný přinesly naše pozdější experimenty prováděné zejména na experimentálním modelu kolorektálního karcinomu potkana. Při aplikaci liposomových technologií na podmínky *in vivo* pokusu bylo nutné překonat řadu problémů. Snad nejobtížnější byla úprava vlastních liposomových částic tak, aby byly získány jako dlouhocirkulující liposomy. Jednoduché liposomy připravované pro předešlou sérii *in vitro* pokusů jsou založené na jednoduché sonikaci směsi fosfatidylcholinu a cholesterolu s příslušnými (neo)glykolipidy nesoucími sacharidový ligand. Takové preparáty nejsou ovšem pro aplikace *in vivo* vůbec vhodné zejména pro jejich rychlé vychytání a katabolismus buňkami retikuloendoteliálního systému. Dlouhocirkulující liposomy se připravují pomalým odpařováním směsi výše uvedených lipidů s lipidem, na nějž jsou kovalentně vázané řetězce polyethylenglykolu o molekulové hmotnosti minimálně 3000 Da. Po odpaření je celá směs opět sonikována ve vodném prostředí PBS pufru, a poté protlačována polykarbonátovými filtry s postupně klesající velikostí pórů až do konečných 0.1  $\mu\text{m}$ . Takto připravené dlouhocirkulující mikroparticulární liposomy byly poté standardizovány změřením obsahu cholesterolu, a resuspendováním na optimální koncentraci (0.2  $\mu\text{mol/ml}$ ) po ultracentrifugaci a promytí PBS. Před vlastním léčením nádorových potkanů byla aktivita nových preparátů liposomů ještě ověřena v cytotoxickém testu (**publikace 30, obr. 4**). Poté bylo přikročeno k vlastní léčbě potkanů, u nichž byl kolorektální karcinom vyvolán chemicky azoxymethanem jako induktorem a propagován lidskou žlučí jako promotorem. Potkani byli rozděleni do několika experimentálních skupin. Tři kontrolní skupiny nedostávaly žádné liposomy: jednalo se o neléčenou skupinu, které byl podáván pouze PBS, dále o normální zvířata bez indukce nádoru, která byla operována identickým způsobem, a dále o skupinu s indukovaným nádorem léčenou standardním cytostatikem 5-fluorouracilem. Skupiny potkanů léčené liposomy zahrnovaly jednak negativní pokus, kdy byly podávány buďto nemodifikované („prázdné“) liposomy nebo liposomy obsahující neaktivní disacharid laktosu, a dále čtyři skupiny experimentální, jimž byly podávány liposomy nesoucí vysokoafinitní ligandy GM2 a IS, a to vždy buď intravenosně nebo intraperitoneálně (celkové podání případně podání do místa nádorů). U neléčených kontrol došlo k rozvoji nádorů u 90 % zvířat, zatímco u zvířat pouze operovaných k vývoji nádorů nedošlo. Po vyhodnocení léčebných režimů bylo zjištěno, že výsledky jsou výrazně závislé jednak na způsobu podání liposomů, a jednak na typu sacharidového ligandu. V případě intravenosního podání liposomů obsahujících NKR-P1 reaktivní ligandy došlo pouze k nevýraznému snížení výskytu nádorů v závislosti na afinitě příslušného sacharidu. Léčebný vliv samotných liposomů nebo liposomů nesoucích neaktivní sacharidový ligand byl patrný, došlo ke snížení incidence nádorů z 90

% pozorovaných u neléčených zvířat asi na 60 %. Nejvýraznější terapeutický efekt byl ovšem zaznamenán u liposomů obsahujících aktivní NKR-P1 ligandy podaných intraperitoneálně, kdy došlo ke snížení incidence na cca 50 % u GM2 gangliosidu a na zhruba 40 % v případě optimálního ligandu IS. Tato aktivita zhruba odpovídala účinku standardního protinádorového léčiva 5-fluorouracilu (**publikace 30**). I přes tyto zajímavé výsledky ukázala studie uveřejněná v **publikaci 30** na řadu problémů spojených s použitím liposomových technologií v terapiích experimentálních a popřípadě humánních nádorů. Nejvýznamnějším problémem kromě již zmiňovaných těžkostí spojených s přípravou dostatečných dávek kompaktních dlouhocirkulujících liposomů se jevila být zejména omezená dostupnost, vysoká cena a nízká stabilita používaných vysokoafinitních sacharidových ligandů. Z těchto problémů se zejména posledně zmiňovaný problém ukázal být jako obtížně překonatelný: bylo velmi obtížné garantovat stabilitu kyselých oligosacharidových sekvencí v liposomech za podmínek *in vitro*, a takřka nemožné odhadnout tuto stabilitu za podmínek *in vivo* experimentu.

### 3.2 Sacharidové konjugáty a sacharidové dendrimery jako vhodná mimetika vysokoafinitních receptorů pro receptor NKR-P1

Nejschůdnějším řešením problémů spojených s nízkou stabilitou komplexních ligandů pro NKR-P1 receptor založených na sialovaných nebo sulfatovaných ligandech se zdálo být použití nové generace ligandů. Vzhledem k široké sacharidové specifičnosti tohoto receptoru bylo možné vybrat velké množství alternativních ligandů. V důsledku naší mezinárodní spolupráce s Univerzitami v Hamburku a Kielu v SRN však nakonec volba padla na látky typu sacharidových dendrimerů, přičemž jako experimentální ligand byl v prvním kole pro NKR-P1 receptor vybrán  $\beta$ -*N*-glykosidicky vázaný *N*-acetyl-D-glukosamin, a jako kontrolní ligand pak byla vybrána  $\alpha$ -*N*-glykosidicky vázaná D-mannosa. Syntéza příslušných sacharidových dendrimerů založených na poly (amidoaminových) kostrách (viz. Kapitola 1.3) byla zvládnuta v partnerské laboratoři vedené Prof. Thisbe K. Lindhorst, která připravila třikrát, čtyřikrát, šestkrát a osmkrát větvené dendrimery obou sacharidů v množstvích dostatečných pro veškeré *in vitro* i *in vivo* experimenty (cca 200 mg čistých sloučenin – **publikace 23, obr. 1**). Po vstupní kvantitativní sacharidové analýze těchto sloučenin, a dalším potvrzení jejich intaktnosti hmotnostní spektrometrií (Havlíček et al. 1998) mohlo být zahájeno biologické testování ve vazebných a inhibičních experimentech s rekombinantním NKR-P1 receptorem. Přitom se ukázalo, že v závislosti na stupni zesíťování cílového sacharidu jsou zkoumané sloučeniny velmi dobrými inhibitory vazby rekombinantního NKR-P1 proteinu na vysokoafinitní ligand, GlcNAc-BSA neoglykoprotein (**publikace 23, obr. 2**). Při smíchání roztoků NKR-P1 receptoru o koncentraci nejméně 1 mg/ml docházelo ke tvorbě zákalu a posléze sraženiny. Tento jev nazvaný „glykoprecipitace“ je jakousi analogií imunoprecipitace, a je námi široce používán pro identifikaci cílových receptorů pro různé glykodenrimerické ligandy (**publikace 23, obr. 3 a 4**).

Genetickou analýzou bylo mezitím zjištěno (Ryan et al. 1995), že receptor NKR-P1 se vyskytuje u potkanů ve třech různých isoformách. Isoforma NKR-P1A je na úrovni transkripce i proteinové produkce majoritní, a představuje kvantitativně asi 80 % celkové povrchové exprese všech NKR-P1 proteinů. Tento receptorem je jedním z nejdůležitějších buněčných markerů NK buněk u hlodavců, a představuje pro NK buňku jeden ze základních aktivačních receptorů (Giorda et al., 1991). Zbýlých 20 % povrchově exprimovaných NKR-P1 proteinů přináleží isoformám NKR-P1B (cca 15 %) a NKR-P1D (cca 5 %), NKR-P1C je pseudogen jehož exprese vede k tvorbě pouze krátkého, nefunkčního proteinu, který se na buněčný povrch vůbec nedostává (Ryan et al. 1995). V naší další práci bylo proto kritické zjistit, jakým způsobem sacharidové dendrimery reagují zejména s NKR-P1B isoformou, který je inhibujícím receptorem a mohl by proto potencionálně působit proti aktivaci NK buněk GlcNAc dendrimery (Kung et al. 1999, Carlyle et al. 1999, Li et al. 2003). V oblasti isoform NKR-P1 receptoru navíc způsobily některé laboratoře faktické i nomenklaturní zmatky, které bylo potřeba uvést na pravou míru před započítím přípravy



proteinových konstrukcí a vlastní proteinovou expresí. V průběhu historie studia isoform NK receptorů byly totiž dvěma různými laboratořemi postupně popsány dva různé proteiny označované jako NKR-P1B (Dissen et al. 1996,

Appasamy et al. 1996). Tento nomenklaturní problém byl vyřešen následnou dohodou, kdy protein s vysokým stupněm (cca 95 %) aminokyselinových identit vůči NKR-P1A byl označen jako NKR-P1B, a protein s nižším stupněm (cca 60 %) identit jako NKR-P1D. Dalším problémem v naší práci byla dostupnost cDNA klonů pro obě minoritní isoformy, které nám obě výše zmíněné laboratoře v rozporu s veškerými zásadami vědecké etiky odmítly zaslat. Toto nekolegiální chování se ovšem ukázalo nakonec výhodné: poté co byla námi amplifikována NKR-P1B isoforma pomocí NKR-P1B a sekvenována, ukázalo se, že sekvence NKR-P1B publikovaná Dissenem a spol. obsahuje chyby vzniklé v důsledku nesprávného DNA sekvenování. Naopak námi získaná sekvence byla v dokonalé shodě s daty pocházejícími ze sekvenování genomu potkana. Klonováním takto získaných sekvencí do bakteriálních expresních vektorů byly získány rozpustné NKR-P1B a NKR-P1D proteiny v množství dostačujícím pro provedení počátečních vazebných testů (**publikace 43, obr. 2 a 3**). Tyto testy jednoznačně prokázaly, že zatímco isoforma NKR-P1D váže monosacharidy v důsledku evoluční diversifikace mnohem slaběji oproti NKR-P1A, vazba monosacharidů na NKR-P1A a NKR-P1B isoformy byla naprosto identická, *N*-acetyl-D-hexosaminy se vázaly s vysokou afinitou ( $IC_{50}$  řádu  $10^{-7}$  M). Naprosto odlišným způsobem však probíhala vazba komplexních sacharidových ligandů, ať již oligosacharidů nebo dendrimerních sacharidů. Zatímco u NKR-P1A proteinu byl potvrzen takřka exponenciální nárůst inhibičních konstant, u lineárních oligosacharidů popřípadě sacharidových dendrimerů s vysokým stupněm větvení, NKR-P1B receptor vázal všechny tyto glykokonjugáty s nízkou afinitou odpovídající monosacharidům (**publikace 43, obr. 4**). Molekulární model NKR-P1A ligandové domény NKR-P1A receptoru umožnil vyslovit hypotézu vysvětlující výše uvedené výsledky. Ačkoliv se NKR-P1B isoforma liší od NKR-P1A isoformy pouze v několika málo aminokyselinách, dochází záměnou Ser<sup>179</sup> v NKR-P1A za Asn<sup>179</sup> v NKR-P1B k zablokování vazebné rýhy pro lineární chitooligomerní strukturu, a zároveň vede záměna Val<sup>177</sup> v NKR-P1A za Ala<sup>177</sup> v NKR-P1B ke ztrátě důležité hydrofobní interakce s acetylovou skupinou oligosacharidu (**publikace 43, obr. 5**).

Výše uvedené výsledky dále prohloubili náš zájem o sacharidové dendrimery jako potencionální stimulatory NK buněk a NKT cytotoxických lymfocytů. Ukázaly, že NKR-P1A receptor projevující vysokou afinitu vůči GlcNAc dendrimerům je nejen kvantitativně dominantním aktivačním receptorem, ale k interakci dendrimerů s inhibičním NKR-P1B receptorem navíc ani nedochází. Před použitím sacharidových dendrimerů pro aktivaci cytotoxických lymfocytů při experimentálních nádorových terapiích bylo ovšem ještě nutno zodpovědět minimálně dvě otázky: jaká je cílová struktura pro GlcNAc dendrimery v komplexním buněčném prostředí imunitního systému a v nádorovém mikroprostředí, a dále otázku, zda jsou GlcNAc dendrimery opravdu schopné způsobovat účinnou aktivaci NK a NKT buněk. Pro řešení první otázky bylo použito několik experimentálních technik, z nichž nejperspektivnější se ukázalo použití fluorescenčně značených GlcNAc dendrimerů nesoucích fluoresceinovou nebo rhodaminovou značku. Syntéza těchto sloučenin, která je podrobně popsána v **publikaci 45** byla provedena Pavlem Kristem v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR. Připravené sloučeniny poté byly použity k ověření specifity vazby na NK buňky, a pomohly odhalit tkáňovou distribuci GlcNAc dendrimerů po jejich intravenosním podání. Prvá série experimentů jednoznačně odhalila, že i ve velmi složitých buněčných směsích se GlcNAc dendrimer opravdu specificky váže na NK buňky prostřednictvím jejich povrchových NKR-P1A proteinů, a je tak jedním z nejvíce specifických funkčních markerů této buněčné populace (**publikace 45, obr. 1**). Zajímavé poznatky byly ovšem získány i při sledování tkáňové distribuce fluorescenčně značených GlcNAc dendrimerů po jejich intravenosním podání. Překvapivě nedocházelo k akumulaci fluorescence v buňkách retikuloendotheliálního systému, jak by bylo možné očekávat z jejich povrchové exprese mannosového receptoru makrofágů křížově reagujícího s GlcNAc, a fluorescenční značka opět specificky zobrazila zejména lymfatické

tkáně (slezina) bohaté na přítomnost NK buněk (**publikace 45, obr. 2**). U experimentálních zvířat s nádory navíc docházelo k akumulaci fluorescence nikoliv uvnitř nádorů (u nichž nebyly receptory pro GlcNAc dendrimery identifikovány), ale docházelo k interakci s endotheliálními buňkami nádorové neovaskularizace, a to prostřednictvím zatím neznámého receptoru. Pokud jde o průkaz signalizace a aktivace zabíječských lymfocytů prostřednictvím NKR-P1A receptoru, byly podány důkazy jak *in vitro* tak *ex vivo* experimentů potvrzující, že NKR-P1A receptor je schopen samostatně, popřípadě v kooperaci s jinými aktivačními receptory NK buněk jako je NKG-2D, aktivovat NK buňky s účinností, která se blíží účinnosti aktivace prostřednictvím protilátkového zesíťování popřípadě zesíťování účinkem liposomů nesoucích vysokoafinitní NKR-P1A ligandy. Přesný mechanismus aktivace zabíječských lymfocytů prostřednictvím NKR-P1A zůstává předmětem intenzivního studia řady laboratoří. Předpokládá se, že tento receptor je příkladem slabšího, multifunkčního receptoru, který může signalizovat jednak prostřednictvím G proteinů (Al-Aoukaty et al. 1997), jednak, na což poukazují výsledky našich experimentů, prostřednictvím své asociace s proteinovými tyrosinovými kinasami (**publikace 27, obr. 1 až 4**). Další propagace signálu do nitra buňky zůstává ještě nedokonale probádaná, je však pravděpodobně přenášena standardními aktivačními kaskádami podobnými pro ostatní lymfoidní buňky (Obr.1 v Úvodu) a probíhající prostřednictvím fosforylace intracelulárních řetězců a adaptorových proteinů asociovaných s NKR-P1A receptorem. Detekce dočasně fosforylovaného proteinu o molekulové hmotnosti 32 kDa s maximem fosforylace kolem 5 minut (**publikace 27, obr. 5**) podporuje tuto možnost. Po 5 minutách již dochází k další propagaci signálu prostřednictvím standardních aktivačních drah: aktivuje se membránová fosfolipasa C, jejíž úloha při aktivaci NK buněk je opakovaně prokazována (Leibson 1997), a dochází ke tvorbě inositolfosfátů a zvýšení intracelulární koncentrace vápníku (**publikace 16, obr. 4**), který je posléze klíčovým signálem pro degranulaci a lýzu cílové nádorové buňky.

Na základě rozsáhlého studia experimentálního modelu popsaného v předcházejících odstavcích mohla být vyzkoušena vlastní terapeutická účinnost na experimentálním modelu myšičí B16F10 melanomu (**publikace 40**). Ve vlastním experimentálním protokolu byla nejprve optimalizována dávka GlcNAc dendrimerů, která se ukázala jako naprosto kritická pro úspěch terapie. Nejvyšších terapeutických účinků bylo dosaženo při podávání maximální dávky ve výši 0.15 mg/zvíře, zatímco velmi dobrých účinků dosahovaly ještě dávky desetitisíckrát nižší, tj. 0.15 ug/zvíře. Použití střední dávky ve výši 1,5 ug/zvíře mělo překvapivě nejhorší účinky, kdy docházelo naopak ke zrychlenému úhynu myši s melanomem. Celkově bylo možno signifikantně prodloužit dobu života myši ze 27.3 na 41.7 dní při použití minimálních dávek GlcNAc dendrimerů (**publikace 40, obr. 3 a tab. 2**). Bohužel, ani při použití nejvyšších dávek GlcNAc dendrimerů se nepodařilo dosáhnout dlouhodobého vyléčení ani trvalé imunizace proti nádoru. Právě nedostatek imunologické paměti a malé procento specifických CD8<sup>+</sup> lymfocytů u myši léčených GlcNAc dendrimery ukazovaly na omezené možnosti dané aktivací pouze NKR-P1<sup>+</sup> NK a NKT lymfocytů v nepřítomnosti výrazné aktivace cytotoxických T lymfocytů. Detailní sledování imunologických parametrů v průběhu nádorové terapie potvrdilo výše uvedený celkový pohled. Cytotoxická aktivita NK buněk ve slezině se krátce (do 2 dní) po podání GlcNAc dendrimeru signifikantně zvýšila v případě obou terapeuticky účinných dávek, avšak toto zvýšení nebylo permanentní a v průběhu dalších 2 – 3 dní již nebyly rozdíly v cytotoxické aktivitě měřitelné (**publikace 40, obr. 4**). Výsledky sledování dalších imunologických parametrů byly obdobné: například v případě CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů byl pozorován jejich krátkodobý, avšak dočasný nárůst krátce po podání dendrimeru. Povzbudivá byla naopak schopnost GlcNAc dendrimerů přitáhnout CD69<sup>+</sup> aktivované T-lymfocyty do místa nádoru, která byla na histologických řezech dobře patrná (**publikace 40, obr. 9**). Celkově lze tedy shrnout, že rozpustné dendrimery obsahující GlcNAc jako ligand pro aktivační receptor NK buněk potkana, NKR-P1A, jsou schopné se specificky vázat na povrch NK buněk, a tyto buňky účinně aktivovat. Této vlastnosti GlcNAc dendrimerů lze využít v experimentálních nádorových terapiích, dendrimery zlepšují přežívání experimentálních zvířat i v případě velmi obtížně

odstranitelných nádorů, jako jsou melanomy. GlcNAc dendrimery bez použití jakýkoliv liposomů a již ve velmi nízkých koncentracích (0.15 ug/zvíře) aktivují některé populace cytotoxických lymfocytů, zejména NK buňky, a usnadňují přestup těchto buněk do nádorů. Z důvodu nízké aktivity specifických cytotoxických T lymfocytů a paměťových T lymfocytů však nedochází k trvalému odhojení nádorů ani není produkována imunitní reakce proti nádorům. Dalším zvyšováním terapeutické dávky již nelze dosáhnout lepšího léčebného výsledku, naopak v některých koncentracích mohou dendrimery působit nežádoucím (opačným) způsobem.

Vzhledem k výše uvedeným výsledkům se otvírá další prostor pro chemický a biochemický výzkum nové generace dendrimerů s potenciálně výraznějšími účinky. Jedním z možných výzkumných směrů je použít dendrimery pokryté složitými typy sacharidů než pouhým  $\beta$ -glykosidicky vázaným N-acetyl-D-glukosaminem. Dvě následné studie ukazují na možné oligosacharidové kandidáty takovéto nové generace dendrimerických ligandů. V první studii (**publikace 33**) došlo k další optimalizaci neutrálního sacharidového ligandu na základě předchozích poznatků ukazujících, že lineární chitooligomerní sekvence jsou dobrými ligandy NKR-P1A receptoru (Bezouška et al., 1997). Systematickou modifikací chitobiosy na jejím neredukujícím i redukujícím konci byl připraven disacharid o sekvenci GalNAc $\beta$ 1-4ManNAc, jehož IC<sub>50</sub> se po této modifikaci zvýšilo téměř tisícinásobně (**publikace 33, obr. 5**). Dalším dotazením této struktury až na úroveň optimální délky sacharid vázající rýhy byl posléze získán tetrasacharid GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4ManNAc, jehož IC<sub>50</sub> je téměř 10<sup>-11</sup> M, a opět tak dosahuje afinity vysokoafinitních neoglykoproteinových ligandů. Další možnost nastínila **publikace 54**, která je určitým návratem k sacharidovým ligandům obsahujícím kyselé nabitě funkční skupiny. S použitím chemoenzymatických přístupů byl připraven stabilní disacharid obsahující N-acetyl-D-galaktosaminyuronovou kyselinu vázanou  $\beta$ 1-4 vazbou na N-acetyl-D-glukosamin. Zavedením karboxylové skupiny do terminálního neredukujícího N-acetyl-D-galaktosaminu došlo téměř ke stonásobnému zvýšení IC<sub>50</sub> oproti mateřskému disacharidu. Metodiky pro přípravu dendrimerních forem výše popisovaných sacharidů jsou v současné době předmětem aktivního výzkumu v naší laboratoři.

### 3.3 Vývoj sacharidových konjugátů aktivujících zabíječské lymfocyty prostřednictvím časného aktivačního antigenu CD69

Časný lymfocytární aktivační antigen, receptor CD69, je druhou nejvíce studovanou molekulou v naší laboratoři. Naše počáteční studie (**publikace 19**) pojednává o přípravě tří různých expresních konstruktů zahrnujících jednak samotnou lektinovou doménu, a jednak oblast „stonek“, který je u tohoto antigenu poměrně krátký a souvisle se rozšiřuje do vlastní lektinové domény. Dva konstrukty obsahující „stonek“ se ještě lišily tím, zda v nich byl nebo nebyl přítomen zbytek Cys<sup>68</sup>. Počáteční experimenty ukázaly, že zatímco proteiny obsahující zbytek Cys<sup>68</sup> se chovají jako kovalentní dimery, proteiny, u nichž nebyl tento aminokyselinový zbytek obsažen jsou monomerní. Naše počáteční výsledky uveřejněné v **publikaci 19** také prokázaly, že CD69 antigen má sacharidovou specifitu podobnou NKR-P1 receptoru, přičemž preferuje zbytky N-acetyl-D-hexosaminů na úkor jiných typů sacharidů. Podobně jako v případě NKR-P1 receptoru se vápník jevil jako zásadní pro sacharidovou vazebnou aktivitu. Na rozdíl od NKR-P1 se však atom vápníku u CD69 proteinu snadno uvolňuje v kyselém i mírně alkalickém prostředí. Kromě toho není jeho přítomnost nezbytná v průběhu skládání proteinu. Skládání CD69 je možno provádět třeba i v přítomnosti chelatačních činidel, které lze v průběhu purifikace odstranit, a nakonec vápník přidat k finálnímu preparátu za vzniku plně funkčního aktivního proteinu.

I přes evidentní příbuznost CD69 antigenu k NKR-P1 receptoru je charakter specifického vazebného místa pro sacharid u obou receptorů diametrálně odlišný. Zatímco v případě NKR-P1A receptoru má vazebné místo pro sacharid charakter protažené rýhy (groove) do níž zapadnou jednotlivé sacharidové jednotky lineárního chitooligomerního ligandu, je sacharidové vazebné místo v molekule CD69 mnohem složitější. Vzhledem k tomu, že je na rozdíl od NKR-P1A pro

tento protein již k dispozici několik rozřešených trojrozměrných struktur (Natarajan et al. 2000, Llera et al. 2001) včetně struktury naměřené s vysokým stupněm rozlišení (1.8 Å) z námi připravených proteinových krystalů, bylo možné s využitím metod homologního modelování a počítačového dockingu sestavit poměrně přesný počítačový model jednak antigenu CD69, a jednak jeho interakcí s vápníkem a GlcNAc. Podle predikce molekulárního modelu dochází k navázání atomu vápníku v distální části molekuly (nejvzdálenější od plasmatické membrány buňky), a to prostřednictvím tří kyselých karboxylových skupin kyseliny asparagové Asp<sup>171</sup>, a dvou kyselin glutamových, Glu<sup>185</sup> a Glu<sup>187</sup>. Podle predikce molekulárního modelu (**publikace 41, obr. 3**) je navázání vápníku prostřednictvím těchto aminokyselin spojené s lokální konformační změnou v molekule CD69, při níž se mění též prostorové uspořádání threoninu Thr<sup>107</sup> a Lys<sup>172</sup>. Právě přeuspořádání aminokyselin v okolí shluku kysele nabitých aminokyselin na povrchu molekuly vyvolané vazbou vápníku CD69 je potom kritické pro vznik sacharidového vazebného místa. Toto vazebné místo bylo predikováno též v jedné z publikovaných trojrozměrných struktur (Natarajan et al. 2000). V rozsáhlé studii byly využity techniky molekulární mutagenese, a vazebné testy využívající jak <sup>45</sup>Ca, tak <sup>3</sup>H značených monosacharidů k prověření detailů navrženého experimentálního modelu. Kritická úloha kyselých aminokyselin pro vazbu vápníku byla potvrzena pomocí mutantních proteinů v nichž byly tyto aminokyseliny jednotlivě zaměňovány za alanin. Ve všech případech došlo k významnému snížení vazby vápníku (**publikace 41, obr. 5**). Detailní analýza vazebných míst pro jednotlivé zbytky GlcNAc prováděná u proteinů v přítomnosti vápníku ukázala na přítomnost celkem tří vazebných míst, dvou vysokoafinitních nalézajících se poblíž atomu vápníku, a jednoho nízkoafinitního, uzavírajícího celý vazebný povrch ve tvaru trojúhelníku o délce stran asi 2 nm (**publikace 41, obr.6**). Nezvykle rozsáhlý interakční povrch pro vazbu sacharidových ligandů též předpovídal, že optimálními ligandy pro CD69 receptor budou některé větvené sacharidy omomukoidového typu. Tato predikce byla potvrzena v následných studiích s receptorem CD69 potkana (**publikace 50**), kdy se jako nejlepší ligandy pro tento receptor jeví být vysoce větvené (tri- až pentaantenární) přirozené i syntetické (Rohlenová et al. 2004) sacharidy obsahující terminální GlcNAc. V současné době však v naší laboratoři intenzivně experimentujeme i s dvěma dalšími generacemi ligandů pro CD69, totiž sialovanými oligosacharidy nesoucími sialylTn sekvence, a kysele nabitými peptidovými ligandy o sekvenci LELTE a LELLE. Pokusy o přípravu dendrimerních forem těchto ligandů s použitím tradičních i netradičních (calixareny) koster právě probíhají.

### 3.4 Ligandy pro další lektinové receptory NK buněk

V návaznosti na mezinárodní spolupráci v oblasti výzkumu lektinových receptorů NK buněk a dalších povrchových leukocytárních molekul je potřeba se zmínit o našem výzkumu dalších zástupců superrodiny lektinů C-typu důležitých pro fungování buněk imunitního systému. Zajímavé výsledky byly získány při studiu sacharidové specifity lidského NKG2D receptoru, který je dnes považován za jeden z nejdůležitějších receptorů aktivujících NK buňky při jejich zabíjení nádorových a viry infikovaných buněk (Strong 2001). V našich studiích jsme prokázali vazbu rekombinantní formy tohoto receptoru na neoglykoproteiny modifikované zejména *N*-acetyl-D-hexosaminy a D-manosou (**publikace 42, obr. 9**). Tato sacharidová specifita stejně jako schopnost specificky vázat vysoce mannosové oligosacharidy (**Publikace 42, obr. 10**) mohou být velmi zajímavé ve vztahu k fyziologické funkci tohoto receptoru, kterou je rozpoznání stresem indukovaných proteinů, které často obsahují nedosyntetizované N-glykosidicky vázané sacharidové řetězce. Zajímavá je též sacharidová specifita lektinového receptoru dendritických buněk DCL-1, který se váže na β-glukosu a β-glukany, a pravděpodobně participuje jednak v prezentaci antigenu dendritickými buňkami, jednak je též β-glukanovým receptorem aktivujícím tyto buňky (**publikace 42, Obr. 9 a 10**). Mezi další receptory s vazebnými místy pro sacharid studované v naší laboratoři patří například CD45 antigen, u něhož se sacharidy vážou na fibronektinové domény (Kavan 2004).

## 5. SOUHRN VÝSLEDKU

- Rodina živočišných lektinů C-typu představuje nejrozšířenější lektinovou rodinu obratlovců odpovídající za většinu sacharid - proteinových interakcí pozorovaných u těchto živočichů. Tato rodina si udržela významnou úlohu v imunitním rozpoznávání, a to i přes svou nižší specifitu oproti protilátkám a T-buněčnému receptoru
- Evoluční větev V rodiny živočišných lektinů C-typu se v průběhu evoluce nejvíce vzdálila od ostatních větví této rodiny. Divergence aminokyselinových sekvencí u této rodiny měla za následek též remodelování vazebného interakčního povrchu tak, aby byl schopen rozpoznat i jiné ligandy než sacharidové
- Další významné rozdíly existují u lymfocytárních lektin-like receptorů ve vazbě vápníku a sacharidových ligandů. U některých z těchto receptorů dochází k velmi silné vazbě vápníku, který se na rozdíl od jiných C-lektinů účastní tvorby správné trojrozměrné struktury, do níž se velmi pevně inkorporuje již v průběhu jejího sbalování. Také k vazbě monosacharidů dochází u NKR-P1 receptoru s nebývale vysokou afinitou dosahující až uM hodnot disociačních konstant
- NKR-P1 váže s vysokou afinitou zejména kyselé nabitě oligosacharidové sekvence v nichž jsou sacharidové jednotky vázané na kostrách sacharidů krevních skupin, ganglio a glykosaminoglykanových sekvencích specificky substituované skupinami karboxylovými skupinami kyselin sialových, sulfátovými nebo fosfátovými skupinami
- Byla prokázána korelace mezi schopností rozpustného NKR-P1 receptoru vázat se na sacharidové ligandy výše uvedeného chemického složení a schopností rozpustných oligosacharidů inhibovat tuto vazbu
- Byla prokázána výborná korelace mezi schopností některých oligosacharidů výše uvedeného chemického složení inhibovat vazbu rozpustného NKR-P1 receptoru na NK sensitivní buněčné nádorové linie, a jejich schopností inhibovat přirozené zabíjení
- Jestliže jsou vysokoafinitní sacharidové ligandy výše diskutovaného chemického složení inkorporovány do liposomů ve formě svých lipidových derivátů, vznikají částice schopné specificky aktivovat čisté potkaní přirozené zabíječské buňky a NK buněčné linie v míře srovnatelné s aktivací prostřednictvím zesíťování NKR-P1 receptorů protilátkou.
- Jestliže preinkubujeme liposomy výše popsaného složení s NK rezistentními cílovými buňkami, dojde k přenosu vysokoafinitních sacharidových ligandů do plasmatických membrán těchto buněk, což má za následek jejich zvýšenou vnímavost na NK zabíjení
- Výše popsané liposomy mohou být ve své mikrokorpuskulární a dlouhocirkulující variantě úspěšně použity v nádorových imunoterapiích na experimentálních nádorových modelech. Většímu rozšíření těchto liposomových terapií však brání technické problémy s přípravou liposomů, a zejména omezená dostupnost, vysoká cena a nízká stabilita inkorporovaných komplexních neoglykolipidových sekvencí. Proto byly hledány rozpustné aktivátory přirozených zabíječských buněk jako alternativa k liposomovým partikulám

- Sacharidové dendrimery založených na poly(amidoaminových) nebo polylysinových kostrách se ukázaly být vhodnými rozpustnými aktivátory NK buněk prostřednictvím jejich povrchového receptoru NKR-P1, specifického markeru přítomného na povrchu všech NK buněk hlodavců
- Dendrimery pokryté N-acetyl-D-glukosaminem se specificky vážou pouze na aktivační isoformu potkaního receptoru NKR-P1 označovanou jako NKR-P1A, a nevážou se na odpovídající inhibiční receptor NKR-P1B
- GlcNAc dendrimery jsou jedním z nejspecifičtějších funkčních markerů NKR-P1<sup>+</sup> lymfocytů potkana a myši
- Po navázání GlcNAc dendrimerů na NK buňky prostřednictvím NKR-P1(A) receptorů dochází k jejich zesíťování, předání intracelulárního signálu, a následné aktivaci NK buněk
- GlcNAc dendrimery jsou účinné v experimentálních nádorových imunoterapiích. Tyto sloučeniny účinně aktivují NK buňky *in vivo*, vážou se ne endoteliální buňky tumorové neovaskulatury, a přitahují aktivované CD69<sup>+</sup> lymfocyty do místa nádoru. Nejsou však schopné vyvolat trvalou odolnost vůči nádorům ani působit jako nádorové vakcíny
- Druhá generace sacharidových dendrimerů aktivujících NK buňky prostřednictvím povrchového NKR-P1 receptoru bude založená na stabilních, vysokoafinitních oligosacharidových sekvencích typu chitooligomerů nebo N-acetylgalaktosaminouronových kyselin.
- Sacharidové vazebné místo dalšího aktivačního antigenu lymfocytů, receptoru CD69, se významně liší svou stavbou od vazebného místa na povrchu NKR-P1 antigenu
- CD69 antigeny rozpoznávají jako svůj vysokoafinitní ligand vysoce větvené oligosacharidy ovomukoidového typu, sialylTn sekvence, a kysele nabitě peptidové antigeny typu LELTE.
- Předběžné výsledky ukazují, že zatímco dendrimerní formy vysokoafinitních ligandů receptoru CD69 vyvolávají apoptosu CD69<sup>+</sup> lymfocytárních buněk (zejména NK buněk), monovalentní formy těchto sacharidů naopak před apoptosou účinně ochraňují
- Studium důležitého aktivačního receptoru NK buněk, molekuly NKG2D, je zatím v počátečních stádiích výzkumu. Zatím byla prokázána velmi zajímavá specifická vazba oligosacharidů vysoce mannosového typu, což může být zajímavé pro biologii NKG2D receptoru participujícího na rozpoznání stresem indukovaných proteinů buněčného povrchu
- Lektinový receptor dendritických buněk DCL-1 má unikátní sacharidovou specifitu založenou na rozpoznání  $\beta$ -glukosylovaných struktur a  $\beta$ -glukanů.
- **Prezentace sacharidových ligandů pro lektinové receptory zabíječských lymfocytů prostřednictvím dendrimerických nosičů ovlivňuje výrazně jejich selektivitu, biologickou dostupnost a imunologické účinky. Proto se jeví sacharidové a jiné ligandové dendrimery jako perspektivní imunomodulační a protinádorové sloučeniny**

## 6. VLASTNÍ PUBLIKACE DISERTANTA

1. Karásková H., Bezouška K., Stárka L., Hampl R., Táborský O. 1985. *Acta Univ. Carol. Med.* **31**, 333-346. Transport and intracellular metabolism of the complex of cortisol – asialotranscortin in the liver.
2. Bezouška K., Táborský O., Kubrycht J., Pospíšil M., Kocourek J. 1985. Carbohydrate-structure-dependent recognition of desialylated serum glycoproteins in the liver and leucocytes. *Biochem. J.* **227**, 345 – 354. **IF 4.28**
3. Karásková H., Bezouška K., Stárka L., Hampl R., Pikulev A.T., Sholukh M.V., Táborský O. 1986. Transport and intracellular localization of cortisol – asialotranscortin complexes in rat liver. *J. Steroid Biochem.* **24**, 725 – 729. **IF 2.72**
4. Pospíšil M., Kubrycht J., Bezouška K., Táborský O., Novák M., Kocourek J. 1986. Lactosamine type asialooligosaccharide recognition in NK cytotoxicity. *Immunol. Lett.* **12**, 83 – 90. **IF 2.14**
5. Karásková H., Bezouška K., Stárka L., Hampl R., Táborský O. 1987. [Transport and intracellular distribution of components of the cortisol – asialotranscortin complex in the liver.] *Biokhimiya* **52**, 1677 – 1682. (in Russian). **IF 1.06**
6. Piskarev V.E., Navrátil J., Karásková H., Bezouška K., Kocourek J. 1990. Interaction of egg-white glycoproteins and their oligosaccharides with the monomer and the hexamer of chicken liver lectin. *Biochem. J.* **270**, 755 – 760. **IF 4.28**
7. Bezouška K., Crichlow G.V., Rose J.M., Taylor M.E., Drickamer K. 1991. Evolutionary conservation of intron position in a subfamily of genes encoding carbohydrate – recognition domains. *J. Biol. Chem.* **266**, 11604 - 11609. **IF 6.36**
8. Weis W.I., Quesenberry M.S., Taylor M.E., Bezouška K., Hendrickson W.A., Drickamer K. 1992. Molecular mechanisms of complex carbohydrate recognition at the cell surface. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **57**, 281 - 289. **IF 0.88**
9. Taylor M.E., Bezouška K., Drickamer K. 1992. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate – recognition domains in the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 1719 – 1726. **IF 6.36**
10. Kim S.J., Ruiz N., Bezouška K., Drickamer K. 1992. Organization of the gene encoding the human macrophage mannose receptor (MRC1). *Genomics* **14**, 721 – 727. **IF 3.84**
11. Bezouška K., Piskarev V.E., van Dam G.J., Pospíšil M., Kubrycht J., Kocourek J. 1992. Localization and characterization of the carbohydrate-binding site of the porcine lymphocyte mannan – binding protein. *Mol. Immunol.* **29**, 1437 – 1446. **IF 3.20**
12. Kubrycht J., Malíková P., Huan N.H., Fišerová A., Bezouška K., Kružík P., Štajner K., Moravec V., Pospíšil M. 1993. Peripheral membrane molecules of leukocytes and NK cytotoxicity. *Folia Microbiol (Praha)* **38**, 421-431. **IF 1.03**

13. Bezouška K., Krajhanzl A., Pospíšil M., Kubrycht J., Stajner K., Felsberg J., Kocourek J. 1993. Characterization of the high-affinity oligosaccharide-binding site of the 205-kDa porcine large granular lymphocyte lectin, a member of the leukocyte common antigen family. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1303-1313. **IF 3.26**
14. Yuen C.-T., Bezouška K., O'Brien J., Stoll M., Lemoine R., Lubineau A., Kiso M., Hasegawa A., Bockovich N.J., Nicolaou K.C., Feizi T. 1994. Sulfated blood group Lewis<sup>a</sup>. A superior oligosaccharide ligand for human E-selectin. *J. Biol. Chem.* **269**, 1595 – 1598. (Communication). **IF 6.36**
15. Bezouška K., Vlahas G., Horváth O., Jinochová G., Fišerová A., Giorda R., Chambers W.H., Feizi T., Pospíšil M. 1994. Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C – type animal lectins, is a carbohydrate-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 16945 – 16952. **IF 6.36**
16. Bezouška K., Yuen C.-T., O'Brien J., Childs R.A., Chai W., Lawson A.M., Drbal K., Fišerová A., Pospíšil M., Feizi T. 1994. Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cell and cytotoxicity. *Nature* **372**, 150 – 157. (Article). **IF 32.18**
17. Fišerová A., Trinchieri G., Chan S., Bezouška K., Flieger M., Pospíšil M. 1995. Ergot alkaloid – induced cell proliferation, cytotoxicity, and lymphokine production. *Adv. Exp. Med. Biol.* **371A**, 163 – 166. **IF 0.64**
18. Pospíšil M., Bezouška K., Campa M., Fišerová A., Kubrycht J., Huan N., Chan S., Trinchieri G. 1995. Mechanisms of NK recognition and activation based on lectin – saccharide interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* **371A**, 307-311. **IF 0.64**
19. Bezouška K., Nepovím A., Horváth O., Pospíšil M., Hamann J., Feizi T. 1995. CD69 antigen of human lymphocytes is a calcium – dependent carbohydrate – binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 68 – 74. **IF 2.90**
20. Bezouška K. 1996. C – type lectins of natural killer cells: carbohydrate ligands and role in tumour cell lysis. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 156-161. **IF 2.27**
21. Černý J., Fišerová A., Horváth O., Bezouška K., Pospíšil M., Hořejší V. 1997. Association of human NK cell surface receptors NKR-P1 and CD94 with Src-family protein kinases. *Immunogenetics* **46**, 231 – 236. **IF 2.88**
22. Bezouška K., Sklenář J., Dvořáková J., Havlíček V., Pospíšil M., Thiem J., Křen V. 1997. NKR-P1A protein, an activating receptor of rat natural killer cells, binds to the chitobiose core of incompletely glycosylated N-linked glycans, and to linear chitoooligomers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 149-153. **IF 2.90**
23. Bezouška K., Křen V., Kieburg C., Lindhorst T.K. 1998. GlcNAc-terminated glycodendrimers form defined precipitates with the soluble dimeric receptor of rat natural killer cells, sNKR-P1A. *FEBS Lett.* **426**, 243 – 247. **IF 3.84**
24. Křen V., Dvořáková J., Gambert U., Sedmera P., Havlíček V., Thiem J., Bezouška K. 1998.  $\beta$ -glucosylation of chitoooligomers by galactosyltransferase. *Carbohydr. Res.* **305**, 517 – 523. **IF 1.45**



25. Havlíček V., Kieburg C., Novák P., Bezouška K., Lindhorst T.K. 1998. Structure analysis of trivalent glycoclusters by post - source decay matrix – assisted laser desorption / ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **33**, 591 – 598. **IF 3.06**
26. Jonáková V., Kraus M., Veselský L., Čechová D., Bezouška K., Tichá M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin – binding fraction of boar seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.* **114**, 25 – 34. **IF 2.73**
27. Sedmera P., Prikrylová V., Bezouška K., Rajnochová E., Thiem J., Křen V. 1998. *J. Carbohydr. Chem.* **17**, 1351 – 1357. Preparation of ManNAc containing chitoooligomers by isomerization and their binding to NKR-P1 protein. **IF 1.02**
28. Hanušová R., Tučková L., Halada P., Bezouška K., Bilej M. 1999. Peptide fragments induce a more rapid immune response than intact proteins in earthworms. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 113 – 121. **IF 2.65**
29. Bezouška K., Sklenář J., Novák P., Halada P., Havlíček V., Kraus M., Tichá M., Jonáková V. 1999. Determination of the complete covalent structure of the major glycoform of DQH sperm surface protein, a novel trypsin – resistant boar seminal plasma O – glycoprotein related to pB1 protein. *Protein Sci.* **8**, 1551 – 1556. (For the record). **IF 4.12**
30. Pospíšil M., Vannucci L., Horváth O., Fišerová A., Krausová K., Bezouška K., Mosca F. 2000. Cancer immunomodulation by carbohydrate ligands for the lymphocyte receptor NKR-P1. *Int. J. Oncol.* **16**, 267 – 276. **IF 3.06**
31. Kmoch S., Brynda J., Asfaw B., Bezouška K., Novák P., Řezáčová P., Ondrová L., Filipец M., Sedláček J., Elleder M. 2000. Link between a novel human  $\gamma$ D-crystallin allele and a unique cataract phenotype explained by protein crystallography. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1779 – 1786. **IF 7.80**
32. Přepechalová I., Martínková L., Stolz A., Ovesná M., Bezouška K., Kopecký J., Křen V. 2001. Purification and characterization of the enantioselective nitrile hydratase from *Rhodococcus equi* A4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 150 – 156. **IF 2.36**
33. Krist P., Herkommerová – Rajnochová E., Rauvolfová J., Semeňuk T., Vavrušková P., Pavlíček J., Bezouška K., Petruš L., Křen V. 2001. Toward an optimal oligosaccharide ligand for rat natural killer cell activation receptor NKR-P1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 11 – 20. **IF 2.90**
34. Semeňuk T., Krist P., Pavlíček J., Bezouška K., Kuzma M., Novák P., Křen V. 2001. Synthesis of chitoooligomer-based glycoconjugates and their binding to rat natural killer cell activation receptor NKR-P1. *Glycoconj. J.* **18**, 817-826. **IF 0.74**
35. Pospíšil M., Vannucci L., Fišerová A., Krausová K., Horváth O., Křen V., Mosca F., Lindhorst T.K., Sadalapure K., Bezouška K. 2001. Glycodendrimeric ligands of C-type lectin receptors as therapeutic agents in experimental cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **495**, 343 – 347. **IF 0.64**
36. Bezouška K. 2002. Design, functional evaluation and biomedical applications of carbohydrate dendrimers (glycodendrimers). *J. Biotechnol.* **90**, 269-290. **IF 2.32**

37. Novák P., Man P., Tučková L., Tlaskalová-Hogenová H., Bezouška K., Havlíček V. 2002. Monitoring of *in vitro* deamination of gliadin peptic fragments by mass spectrometry may reflect one of the molecular mechanisms taking place in celiac disease development. *J. Mass Spectrom.* **37**, 507 - 511. **IF 3.06**
38. Hogg T., Kutá-Smatanová I., Bezouška K., Ulbrich N., Hilgenfeld R. 2002. Sugar-mediated lattice contacts in crystals of a plant glycoprotein. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1734 - 1739. **IF 1.69**
39. Hušáková L., Herkommerová-Rajnochová E., Semeňuk T., Kuzma M., Rauvolfová J., Přikrylová V., Ettrich R., Plíhal O., Bezouška K., Křen V. 2003. Enzymatic discrimination of 2-acetamido-2-deoxy-D-mannopyranose-containing disaccharides using  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases. *Adv. Synth. Catal.* **345**, 735-742. **IF 4.48**
40. 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. 2003. Effects of N-acetyl-D-glucosamine-coated glycodendrimers as biological modulators in the B16F10 melanoma model *in vivo*. *Int. J. Oncol.* **23**, 285-296. **IF 3.06**
41. Pavlíček J., Sopko B., Ettrich R., Kopecký V.Jr., Baumruk V., Man P., Havlíček V., Vrbacký M., Martínková L., Křen V., Pospíšil M., Bezouška K. 2003. Molecular characterization of binding of calcium and carbohydrates by an early activation antigen of lymphocytes CD69. *Biochemistry* **42**, 9295-9306. **IF 4.01**
42. Bezouška K. 2004. . *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69**, 535-563. Carbohydrate and non-carbohydrate ligands for the C-type lectin-like receptors of natural killer cells. A review. **IF 1.06**
43. Plíhal O., Byrtusová P., Pavlíček J., Mihok L., Ettrich R., Man P., Pompach P., Havlíček V., Hušáková L., Bezouška K. 2004. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69**, 631-644. The isoforms of rat natural killer cell receptor NKR-P1 have a distinct affinity to complex saccharide ligands. **IF 1.06**
44. Kavan D., Vančurová M., Ulbrichová D., Hladíková I., Pospíšil M., Bezouška K. 2004. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69**, 645-658. Identification of heparin-binding sites in the fibronectin type III domains of the leukocyte common antigen (CD45). **IF 1.06**
45. Krist P., Vannucci L., Kuzma M., Man P., Sadalpure K., Patel A., Bezouška K., Pospíšil M., Petruš L., Lindhorst T.K., Křen V. 2004. *ChemBioChem.* **5**, 445-452. Fluorescent labelled thiourea-bridged glycodendrons. **IF 3.47**
46. Bařínka C., Šácha P., Sklenář J., Man P., Bezouška K., Slusher B.S., Konvalinka J. 2004. *Protein Sci.* **13**, 1627-1635. Identification of N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity. **IF 4.12**
47. Šnajdrová R., Kristová-Mylerová V., Crestia D., Nikolaou K., Kuzma M., Lemaire M., Gallienne E., Bolte J., Bezouška K., Křen V., Martínková L. 2004. *J.Mol.Catal.B:Enzymol.* **29**, 227-232. Nitrile biotransformation by *Aspergillus niger*. **IF 1.55**

48. Plíhal O., Sklenář J., Kmoníčková J., Man P., Pompach P., Havlíček V., Křen V., Bezouška K. 2004. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 764-765. *N*-glycosylated catalytic unit meets *O*-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase. **IF 2.27**
49. Pompach P., Man P., Novák P., Havlíček V., Fišerová A., Bezouška K. 2004. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 777-779. Mass spectrometry is a powerful tool for identification of proteins associated with the lipid rafts of Jurkat T-cell line. **IF 2.27**
50. Pavlíček J., Kavan D., Pompach P., Novák P., Lukšan O., Bezouška K. 2004. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 1124-1126. Lymphocyte activation receptors: new structural paradigms in the group V of C-type animal lectins. **IF 2.27**
51. Rohlenová A., Ledvina M., Šaman D., Bezouška K. 2004. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69**, 1781-1804. Synthesis of linear and branched regioisomeric chitooligosaccharides as potential mimetics of natural oligosaccharide ligands of natural killer cells NKR-P1 and CD69 lectin receptors. **IF 1.06**
52. Kristová V., Martínková L., Hušáková L., Kuzma M., Rauvolfová J., Kavan D., Pompach P., Bezouška K., Křen V. 2005. *J. Biotechnol.* **115**, 157-166. A chemoenzymatic route to mannosamine derivatives bearing different *N*-acyl groups. **IF 2.32**
53. Man P., Novák P., Cebecauer M., Horváth O., Fišerová A., Havlíček V., Bezouška K. 2005. *Proteomics* **5**, 113-122. Mass spectrometric analysis of the glycosphingolipid-enriched microdomain of rat natural killer cells. **IF 5.48**
54. Fialová P., Namdjou D.-J., Ettrich R., Přikrylová V., Rauvolfová J., Křenek K., Kuzma M., Elling L., Bezouška K., Křen V. 2005. *Adv. Synth. Catal.* **347**, 997-1006. Combined application of galactose oxidase and  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase in the synthesis of complex immunoactive *N*-acetyl-D-galactosaminides. **IF 4.48**
55. Vejvoda V., Kaplan O., Bezouška K., Martínková L. *J. Mol. Catal. B. Enz.* **39**, 55-58. Mild hydrolysis of nitriles by the immobilized nitrilase from *Aspergillus niger* K10. **IF 1.54**
56. Kaplan O., Vejvoda V., Plíhal O., Pompach P., Kavan D., Fialová P., Bezouška K., Macková M., Cantarella M., Jirků V., Křen V., Martínková L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v tisku. Purification and characterization of nitrilase from *Aspergillus niger* K10. **IF 2.358**
57. Man P., Bezouška K. 2005 *Chem. Listy*, v tisku. Současné trendy v analýze eukaryotických proteomů, glykomů a lipidomů. **IF 0.35**
58. Vepřek P., Hajdúch M., Džurbák P., Kuklík R., Poláková J., Bezouška K. 2005 *J. Med. Chem.*, v tisku. Synthetic comb-like dendrimers containing monomer, dimer or trimer of Tn-antigen are efficient activators of natural killing; dinitrophenol haptenization or influenza virus hemagglutinin T-cell epitope conjugation increases their immunogenicity. **IF 5.08**

## 7. DALŠÍ LITERATURA K PRÁCI

- Al-Aoukaty A., Rolstad B., Maghazachi A.A.: *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 31604.
- Alper J.: *Science* **2001**, 291, 2339.
- Appasamy P. M., Kenniston T. W., Brissette-Storkus C. S., Chambers W. H.: *Nat Immun* **1996**, 15, 259.
- Ashwell G., Harford J.: *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, 51, 531.
- Ballen K. K., Colvin G., Dey B. R., Porter D., Westervelt P., Spitzer T. R., Quesenberry P. J.: *Exp. Hematol.* **2005**, 33, 1427.
- Buhleier E., Wehner W., Vogtle F.: *Synthesis* **1978** 155, 105.
- Carlyle J. R., Martin A., Mehra A., Attisano L., Tsui F. W., Zaniga-Pflucker J. C.: *J. Immunol.* **1999**, 162, 5917.
- Cohen J.: *Science* **1993**, 262, 841.
- Coley, W. B.: *Am. J. Surg.* **1926**, 1, 222.
- Childs R. A., Galustian C., Lawson A. M., Dougan G., Benwell K., Frankel G., Feizi T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 266, 19.
- Dissen E., Ryan J. C., Seaman W. E., Fossum S.: *J. Exp. Med.* **1996**, 183, 1911.
- Drickamer K.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 612.
- Dykes G. M.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2001**, 76, 903.
- Giorda R., Rudert W. A., Vavassori C., Chambers W. H., Hiserodt J. C., Trucco, M.: *Science* **1990**, 249, 1298.
- Havlíček V., Kieburg C., Novák P., Bezouška K., Lindhorst T.K.: *J. Mass Spectrom.* **1998**, 33, 591.
- Hořejší V., Drbal K., Cebecauer M., Černý J., Brdička T., Angelisová P., Stockinger H.: *Immunol. Today* **1999**, 20, 356.
- Iannello A., Ahmad A.: *Cancer Metast. Rev.* **2005**, 24, 487.
- Kircheis R., Vondru P., Nachansky A., Ohler R., Loibner H., Himmler G., Mudde G.C.: *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, 1519.
- Kocourek J. in: *The Lectins, Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (I. E. Liener, N. Sharon, I. J. Goldstein, Eds.) p.14, Academic Press, Orlando, 1986.
- Kogelberg H., Lawson A. M., Muskett F. W., Carruthers R. A., Feizi T.: *Protein Expression Purif.* **2000**, 20, 10.
- Krist P., Vannucci L., Kuzma M., Man P., Sadalapure K., Patel A., Bezouška K., Pospíšil M., Petruš L., Lindhorst T. K., Křen V.: *ChemBioChem* **2004**, 5, 445.
- Kung S. K. P., Su R. C., Shannon J., Miller R. G.: *J. Immunol.* **1999**, 162, 5876.
- Lee R. T., Lee Y. C.: *Glycoconj. J.* **2000**, 17, 543.
- Leibson P. J.: *Immunity* **1997**, 6, 655.
- Li J., Rabinovich B. A., Hurren R., Shannon J., Miller R. G.: *Int. Immunol.* **2003**, 15, 411.
- Llera A. S., Viedma F., Sanchez-Madrid F., Tormo J.: *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 7312.

- Natarajan S., Sawicki M. W., Margulies D. H., Mariuzza R. A.: *Biochemistry* **2000**, *39*, 14779.
- Newkome, G.R., Yao, Z., Baker, G.R., Gupta, V.K.: *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003.
- Orentas R. J., Kohler M. E., Johnson B. D.: *Sem. Cancer Biol*, **2006**, *16*, 137.
- Pavlíček J., Sopko B., Ettrich R., Kopecký V., Baumruk V., Man P., Havlíček V., Vrbacký M., Martínková L., Křen V., Pospíšil M., Bezouška K.: *Biochemistry* **2003**, *42*, 9295.
- Peggs K. S., Quezada S. A., Korman A. J., Allison J. P.: *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 206.
- Plíhal O., Byrtusová P., Pavlíček J., Mihók L., Ettrich R., Man P., Pompach P., Havlíček V., Hušáková L., Bezouška K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, *69*, 631.
- Ragupathi G., Howard L., Cappello S., Koganty R. R., Qui D., Longenecker B. M., Reddish M. A., Lloyd K. O., Livingston P. O.: *Cancer Immunol. Immunother.* **1999**, *48*, 1.
- Říhová B., Strohalm J., Kubáčková K., Jelínková M., Hovorka O., Kovář M., Plocová D., Šírová M., Šťastný M., Rozprimová L., Ulbrich K.: *J. Contr. Rel.* **2002**, *78*, 97.
- Říhová B., Strohalm J., Prausová J., Kubáčková K., Jelínková M., Rozprimová L., Šírová M., Plocová D., Ettrych T., Šubr V., Mrkvan T., Kovář M., Ulbrich K.: *J. Contr. Rel.* **2003**, *91*, 1.
- Říhová B., Kubáčková K.: *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2003**, *4*, 311.
- Říhová B., Strohalm J., Kovář M., Mrkvan T., Šubr V., Hovorka O., Šírová M., Rozprimová L., Kubáčková K., Ulbrich K.: *Scand. J. Immunol.* **2005**, *62*, 100.
- Rosenberg S. A.: *J. Clin. Oncol.* **1992**, *10*, 180.
- Ryan J. C., Niemi E. C., Nakamura M. C., Seaman W. E.: *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 1911.
- Sames D., Chen X. T., Danishefsky S. J.: *Nature* **1997**, *389*, 587.
- Semeňuk T., Krist P., Pavlíček J., Bezouška K., Kuzma M., Novák P., Křen V.: *Glycoconjug. J.* **2001**, *18*, 817.
- Sica A., Schioppa T., Mantovani A., Allavena P.: *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 717.
- Singera F., Koretzki G. A.: *Science* **2002**, *269*, 1639.
- Strong R. K.: *Mol. Immunol.* **2001**, *38*, 1029.
- Tishler M., Shoenfeld Y.: *Expert Opin. Drug Saf.* **2006**, *5*, 225.
- Tomalia D. A., Baker H., Dewald J. R., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P.: *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- Van der Bruggen P., van den Eynde B. J.: *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 98.
- Varki A.: *Glycobiology* **1993**, *3*, 97.
- Vepřek P., Hajdúch M., Džurbák P., Kuklík R., Poláková J., Bezouška K.: *J. Med. Chem.* v tisku.
- Wang R. F., Peng G., Wang H. Y.: *Sem. Immunol.* **2006**, *18*, 136.
- Weiss W. I., Drickamer K.: *Structure* **1999**, *2*, 1227.
- Woller E. K., Cloninger M. C.: *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1052.
- Xia J., Li C., Hong Y., Yang L., Huang Y., Cheng B.: *J. Oral Pathol. Med.* **2006**, *35*, 327.

## Summary in English

- C-type lectin family represents the most widely distributed family of proteins responsible for the vast majority of protein – carbohydrate interactions observed in various vertebrates. This protein superfamily maintains important role in the reactions of immune recognition even if the specificity of protein – carbohydrate interactions remains lower when compared with protein – protein interactions governing the recognition of antigens by antibodies and T-cell receptors
- Evolutionary subfamily V of C-type animal lectins contains a group of proteins that has most evolutionarily diverged from most common C-type lectins. The evolutionary divergence of this protein family is most typical in amino acid sequences of the flexible ligand-binding loops that diverged in order to remodel the binding surface of the corresponding receptors resulting in the ability to recognize a wider spectrum of ligands in addition to the traditional carbohydrates.
- Lymphocyte lectin-like receptors belonging to subfamily V bear unique characteristics with regard to the binding of calcium and carbohydrate ligands. In some of these receptors the binding of calcium is very strong, and calcium atom is incorporated into the structure of these lectins very early during their refolding. Similarly, monosaccharides display unusually high affinities for some of these receptors such as NKR-P1 with the values of the dissociation constants reaching the lower  $\mu\text{M}$  range.
- NKR-P1 receptor has a particularly high affinity for oligosaccharide sequences in which the charged groups attached to carbohydrates are integral components of blood group, ganglio, and glycosaminoglycan carbohydrate sequences, the acidic substituting group being most often represented by carboxyle groups of sialic acid, and phosphorylated or sulfated carbohydrates
- An important correlation has been proved between the ability of the soluble NKR-P1 receptor to bind to carbohydrate ligands having the above composition, and the ability of the corresponding soluble oligosaccharide sequences to inhibit this binding.
- An excellent correlation has been observed between the ability of many oligosaccharide sequences specified above to inhibit the binding of soluble NKR-P1 receptor to bind to NK sensitive leukemic cell lines, and their ability to inhibit the process of natural killing of these sensitive tumor target cells
- If we incorporate the high affinity carbohydrate ligands of the above described composition into liposomes in the form of their neoglycolipid synthetic derivatives, particles able to activate freshly isolated rat natural killer cell and natural killer cell lines into the extent comparable with the crosslinking by antibodies against NKR-P1 receptor may be created
- If the liposomes created as described above are preincubated with NK resistant tumor target cells, high affinity ligands for NKR-P1 may be transferred to the surface of these cells resulting in significantly increased sensitivity towards natural killing

- The liposomes described above may be reformulated in order to modify their surface with polyethylene lipid derivatives. These long circulating liposomes are suitable for experimental tumor therapies as proved using the rat colorectal carcinoma model. However, significant technical difficulties connected with the preparation of small (< 100 um) long circulating liposomes have together with high prices, limited availability, and low stability of high affinity carbohydrate ligands led to attempts to develop soluble activators of natural killing as an alternative to liposome particles
- Carbohydrate dendrimers based on the coating of polyamidoamine or polylysine cores with  $\beta$ -linked GlcNAc or  $\alpha$ -linked Man turned to be suitable soluble activators of natural killer cells due to their cell surface receptor NKR-P1, the most specific marker antigen present at the surface of all rodent natural killer cells
- Binding and inhibition studies using the recombinant isoforms of NKR-P1, namely NKR-P1A and NKR-P1B, revealed that while the GlcNAc coated dendrimers described above interacted very strongly with NKR-P1A isoform (activating receptor of rodent natural killer cells), there has been essentially no binding with the respective NKR-P1B isoform (inhibitory receptor of rodent natural killer cells)
- GlcNAc coated dendrimers represent one of the most specific functional markers of NKR-P1<sup>+</sup> natural killer cells of rats and mice identified so far
- Interaction of GlcNAc coated dendrimers with NKR-P1(A) receptors at the surface of rodent NK cells results in receptor crosslinking, intracellular signaling, and the subsequent activation of natural killer cells and natural killing
- GlcNAc coated dendrimers have been shown efficient in experimental tumor therapies using the rat colorectal carcinoma and mouse melanoma models. It has been shown that these compounds activate natural killer cells both in periphery and in the lymphoid organs, interact with the endothelial cells of the tumor neovascularization, and attract CD69<sup>+</sup> cells into the sites of tumors. However, the potency of these compounds to induce a permanent protection against tumors or tumor vaccination is limited.
- The subsequent generation of saccharide coated dendrimers will be based on the attachment of highly stable, high affinity oligosaccharide ligands for NKR-P1 receptor based on linear chitooligomeric sequences or sequences bearing uronic acids
- The way how carbohydrates are recognized by another important activation antigen of leukocytes, CD69, differs fundamentally from the recognition of carbohydrates by NKR-P1.
- CD69 is a typical multivalent lectin-like receptor recognizing branched ovomucoid type oligosaccharide sequences, sialylTn antigen and its derivatives, and peptide antigens bearing the LELTE binding motif
- Our preliminary results clearly indicate that while the dendrimeric ligands bearing the high affinity epitopes for CD69 may induce apoptosis in lymphoid cells (especially natural killer cells) bearing this antigen, the corresponding monovalent ligands are able to protect efficiently against apoptosis induced by tumor associated surface mucins

- Our studies of the principal activation receptor of natural killer cells, NKG2D, indicate that these receptors are able to bind mannose and high mannose oligosaccharides. This fact may be interesting from the standpoint of the biology of this receptor during its recognition of stressed induced glycoproteins at the cell surface

**Presentation of carbohydrate ligands for lectin-like receptors of killer lymphocytes involving the dendrimeric carriers influence considerably the specificity, bioavailability and immune recognition. From this point of view the carbohydrate ligand dendrimers appear to be promising compounds with immunomodulatory and antitumor properties.**