

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Targetovaná terapie melanomu B16-F10.

Bakalářská práce

Magdalena Folkmanová

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice 2014

Folkmanová M.: Targetovaná terapie melanomu B16-F10. [Targeted therapy of melanoma B16-F10. Bc. Thesis, in Czech.] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to improve the use of fMLF in cancer immunotherapy. We applied intravenously fMLF coupled with tumor-cell-membrane-specific-binding sequence and examined the therapeutic effect on murine melanoma B16-F10. Moreover we examined the cytotoxicity of the used compound.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 12. 4. 2014

Magdalena Folkmanová

.....

Poděkování:

Toto jsou ti, kterým pokorně a ze srdce věnuji svůj dík:

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho ochotu, trpělivost i důvěru při vedení této práce, ale též za jeho věčně dobrou náladu.

Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za poskytnutí pracovního zázemí a cenných rad.

Mé spolužačce Mgr. Veronice Caisové, které vděčím hlavně za pomoc s průtokovým cytometrem.

Svým spolužákům, zejména Tereze Kolínské, Pavlíně Kočové, Barboře Jonášové a Anně Humlové, za příjemnou společnost a rady během celého studia.

Jaroslavu Sukovi za vše co pro mě dělá, můj dík patří i jeho rodině.

Mé rodině za podporu nejen při studiu.

Micku Jaggerovi a Petrovi Fialovi za jejich hudební počiny.

Obsah:

1	Úvod.....	1
1.1	Nádorová onemocnění	1
1.2	Melanom	1
1.2.1	Melanom B16-F10	2
1.3	Léčba nádorových onemocnění	2
1.4	Nádorová onemocnění a imunitní systém.....	3
1.4.1	Nespecifická (vrozená) imunita	3
1.4.2	Specifická (získaná) imunita	3
1.5	Nádorový únik imunitnímu systému.....	4
1.6	Imunoterapie nádorů založená na nespecifické imunitě	5
1.6.1	Komplement (komplementový systém).....	5
1.6.2	Fagocytóza	6
1.6.2.1	Pathogen associated molecular patterns (PAMPs).....	6
1.7	Pattern recognition receptors (PRRs)	6
1.7.1	Formyl-peptidové receptory (FPRs)	7
1.7.2	Lidské FPRs	7
1.7.3	Myší FPRs.....	7
1.7.4	Využití agonistů (ligandů) FPRs.....	8
1.8	Specifická imunoterapie nádorových onemocnění	8
1.8.1	Fosfatidylserin (PS).....	8
1.8.1.1	Anexin V	11
1.9	Využití virů pro hledání nových peptidických agonistů	12
1.9.1	Filamentární bakteriofágy	12
1.9.2	Phage display	13
1.9.3	M13 filamentous phage display	13
1.9.4	Biopanning	13

1.9.5	Aplikace Phage display	13
1.10	Peptidy vázající se na fosfatidylserin	14
1.11	Další peptidy vázající se na povrch nádorových buněk	15
2	Cíle práce.....	17
3	Materiály a metody.....	18
3.1	Chemikálie	18
3.2	Laboratorní zvířata.....	18
3.3	Buněčná linie	18
3.4	Transplantace	18
3.5	Měření velikosti nádorů	19
3.6	Počítání plicních metastáz.....	19
3.7	Analýza dat	19
3.8	Příprava terapeutických látek.....	19
3.9	Intravenosní aplikace fMLFG ₅ FNFRLKAGAKIRFG	19
3.10	Intravenosní aplikace fMLF(GP) ₄ FNFRLKAGAKIRFG	20
3.11	Cytotoxický test CD45+/PI	20
4	Výsledky.....	24
4.1	Intravenosní aplikace fMLFG ₅ FNFRLKAGAKIRFG	24
4.2	Intravenosní aplikace fMLF(GP) ₄ FNFRLKAGAKIRFG	27
4.3	Cytotoxický test CD45+/PI.....	29
5	Diskuze.....	34
6	Závěr.....	36
7	Seznam použité literatury	37

1 Úvod

1.1 Nádorová onemocnění

Nádorové onemocnění je soubor více než 100 různorodých chorob charakterizovaných nekontrolovatelným a neobvyklým růstem buněk. Množinu takto vzniklých buněk nazýváme nádor, dělíme ho na benigní a maligní. Benigní nádory jsou ohraničené, nezakládají metastázy a utlačují okolní tkáň. Maligní nádory rostou rychleji, tvoří metastázy, prorůstají do okolní tkáň a jsou neohraničené. Metastázy jsou blízká (např. ve spádových mízních uzlinách) či vzdálená (v různých orgánech těla) ložiska šířící se od zdroje krevní či mízní cestou. Proces vzniku metastáz nazýváme generalizace nádoru a představuje mnohdy větší riziko, než nádor samotný.

V roce 2012 nádorová onemocnění způsobila 8,2 milionů úmrtí na celém světě (Globocan 2012). V posledních letech jsme zaznamenali výrazný pokrok v diagnóze i léčbě nádorových onemocnění. Přesto moderní chemoterapie a radioterapie není mnohdy účinná. Možnou toxicitu a mnoho vedlejších účinků můžeme přisuzovat nízké specifitě této léčby. Proto je důležité hledat léčbu co nejpřesněji cílenou na nádorové buňky a vyhnout se tak nežádoucím účinkům. Touto problematikou se zabývá imunoterapie, či cílená chemoterapie.

1.2 Melanom

Melanom je označení pro maligní nádorové onemocnění pigmentových buněk-melanocytů. Melanocyty jsou buňky neuroektodermu a vyskytují se např. v pokožce, oku a vlasových folikulech. Produkují pigment melanin, který chrání buňky především před ultrafialovým zářením, které poškozuje DNA. Množství pigmentu v pokožce udává barvu kůže a liší se jak mezi rasami, tak i u lidí v rámci jedné rasy. Nejčastější výskyt melanomu je pozorován u jedinců s nízkým množstvím melaninu – u blondýnů a albínů.

Melanom může vznikat z benigních pigmentových névů (hnědočerné ploché bradavičnaté útvary) nebo nezávisle na nich (Swerdlow a kol. 1986).

Melanom můžeme klasifikovat např. dle stádia, lokalizace a výskytu metastáz.

1.2.1 Melanom B16-F10

Buněčná linie B16-F10 je jednou z experimentálně nejpoužívanějších nádorových linií. Byla odvozena od melanomu inbredního kmene laboratorních myší C57BL/6. Tyto nádorové buňky při kultivaci adherují na povrch nádoby. Aplikují se subkutánně a v místě injikace se objeví nádor, který metastazuje především do plic (Fidler 1975, Overwijk a Restifo 2001).

1.3 Léčba nádorových onemocnění

V současné době prodělává terapie a hlavně diagnostika nádorových onemocnění obrovský pokrok, nejčastěji se však pořád využívá chirurgické odstranění nádoru, radioterapie a chemoterapie, popřípadě jejich kombinace.

Chirurgické odstranění nádoru je nejstarším a nejjednodušším léčebným postupem. Výhoda spočívá v rychlém odstranění primárního nádoru. Nevýhodou může být pro chirurga špatně dostupná lokalizace nádoru a fakt, že nádor již mohl metastazovat. Metastázy bývají pro pacienta nebezpečnější než samotný nádor.

Radioterapie využívá ionizačního záření. Proud elektronů, protonů či fotonů je mířen na nádor, ale může docházet i k poškozování okolní tkáně. Radioterapie se kombinuje s chirurgickým odstraněním, kdy redukuje nádorovou masu před chirurgickým zákrokem či brání následné recidivě nádoru, i s chemoterapií. Nevýhodou je poškozování okolní zdravé tkáně, které může v budoucnosti vyústit ve vznik sekundárního zhoubného nádoru (Richie 2006).

Chemoterapie využívá takzvaných cytostatik. Jsou to látky působící antiproliferačně. Zabraňují dělení rychle se množících buněk-nádorových i zdravých, což má za následek vedlejší účinky jako např. vypadávání vlasů, poškození gastrointestinálního traktu a narušení krevetvorby.

Další možností je imunoterapie, což je typ léčby, který k boji nádorovými buňkami využívá funkce imunitního systému pacienta. Pomáhá imunitním buňkám zneškodnit nádorové buňky, nebo využívá imunitních mechanismů k cílené distribuci léčiva k nádoru.

1.4 Nádorová onemocnění a imunitní systém

Funkcí imunitního systému je rozpoznávat vlastní tkáň a udržovat k nim autotoleranci, rozpoznat a chránit organismus před mikroorganismy a jejich produkty a rozpoznat vlastní poškozené, staré nebo zmutované buňky a odstranit je (Krejsek a Kopecký 2004).

Imunitu můžeme dělit na nespecifickou a specifickou, tyto dvě hlavní složky spolu těsně spolupracují (Krejsek a Kopecký 2004).

1.4.1 Nespecifická (vrozená) imunita

Nespecifická imunita je starší a vyskytuje se u všech mnohobuněčných organismů (Medzhitov a Janeway 1997). Zahrnuje buněčné, humorální a bariérové obranné mechanismy.

Anatomické a fyziologické bariéry hrají zásadní roli při prvotní obraně proti patogenům. Mezi tyto bariéry řadíme neporušený povrch kůže, kyselé pH žaludku, pohyb řasinek v dýchacím traktu, produkce bakteriolytického lysozymu v slzách, slinách a dalších sekretech.

Humorální složky nespecifické imunity zastupuje komplementový systém, lipopolysacharid-vázající protein, C-reaktivní protein, antimikrobiální peptidy a manósu-vázající lektin (Turvey a Broide 2010).

Do buněčné nespecifické imunity řadíme dendritické buňky, monocyty/makrofágy, granulocyty a přirozené zabíječe (NK buňky). Tyto buňky jsou, díky svým receptorům (pattern-recognition receptors (PRRs)), schopny rozpoznat struktury nacházející se na patogenech. Tyto konzervativní struktury označujeme jako pathogen associated molecular patterns (PAMPs) (Medzhitov a Janeway 1997). Rozpoznání patogenu má za následek jeho fagocytózu, aktivaci komplementové kaskády a prezentaci antigenu pro buňky specifické imunity (Medzhitov a Janeway 1997).

1.4.2 Specifická (získaná) imunita

Specifická imunita je evolučně mladší než nespecifická. Na rozdíl od nespecifických receptorů vrozené imunity, které jsou pevně zakódovány v genetické informaci, využívá receptory vznikající rekombinací celé řady genových segmentů. Vzniká obrovské množství různých receptorů schopných velmi přesně rozpoznávat specifické antigeny. Hlavními efektorovými buňkami jsou B-lymfocyty a T-lymfocyty.

B-lymfocyty vznikají i dozrávají v kostní dřeni. Po setkání s příhodným antigenem se, za pomoci cytokinů a interferonu gama produkovaných Th lymfocyty, rozrůžňují na dvě

populace: buňky plasmatické a paměťové. Plasmatické buňky produkují protilátky vázající se na tentýž antigen. Protilátky mohou antigen neutralizovat, opsonizovat (zvýraznit pro fagocytující buňky) nebo zahájit komplementovou kaskádu, případně iniciovat ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity). Paměťové buňky jsou součástí tzv. imunologické paměti. Přetrvávají v organismu a v případě opakovaného setkání s antigenem urychlují sekundární imunitní odpověď (Bonilla a Oettgen 2010).

T-lymfocyty vznikají v kostní dřeni. Dozrávají v brzlíku, kde dochází též k selekci. Na rozdíl od B-lymfocytů, které rozpoznávají antigen přímo svým receptorem, T-lymfocyty rozpoznávají antigeny v komplexu s hlavním histokompatibilním komplexem (MHC). Rozpoznání antigenu vede k proliferaci a diferenciaci na efektorové a paměťové buňky. T-lymfocyty dělíme na dvě základní subpopulace: (1) Cytotoxické T-lymfocyty (Tc) CD8+ rozpoznávají antigen ve spojení s MHC I (glykoproteiny na všech jaderných buňkách) a za pomoci cytokinů, produkovaných druhou subpopulací lymfocytů, se diferencují na aktivované cytotoxické T-lymfocyty (CTL). CTL likvidují transplantované, virem napadené nebo nádorové buňky. (2) Pomocné lymfocyty (Th) CD4+ rozpoznávají antigen ve spojení s MHC II a produkují cytokiny. MHC II jsou glykoproteiny exprimované na antigen prezentujících buňkách (APC). Mezi APC řadíme makrofágy, dendritické buňky a B-lymfocyty (Bonilla a Oettgen 2010).

Specifickou imunitní odpověď můžeme taktéž dělit na buněčnou a humorální. Buněčnou zajišťují T-lymfocyty, humorální odpověď zajišťují protilátky produkované plasmatickými buňkami.

1.5 Nádorový únik imunitnímu systému

Dendritické buňky a makrofágy, díky prezentaci antigenu na MHC II, umožňují propojení specifické a nespecifické imunity. Protilátky a cytokiny produkované buňkami specifické imunity na druhou stranu ovlivňují fagocyty nespecifické imunity. Vzniká tak důmyslný systém, který však vždy nedokáže zasáhnout proti nádorovému bujení. Nádorové buňky si vytvořily řadu mechanismů, jak imunitnímu systému unikají. Zde je uvedeno jen několik příkladů:

Nádorové buňky snižují expresi MHC I (Ferrone a Marincola 1995), tím se vyhýbají detekci Tc lymfocytů. Na druhou stranu, buňky bez MHC I jsou zabity NK. Nádorové buňky ale exprimují MHC Ib (u lidí HLA-G), které atak NK dokáží odvrátit (Algarra a kol. 2004, Rouas-Freiss a kol. 2003).

Vysokou expresí Fas ligandu nádorové buňky spouští programovanou buněčnou smrt (apoptózu) infiltrujících T-lymfocytů. Fas ligand je transmembránový protein interagující s Fas receptorem. Obě tyto struktury se běžně vyskytující na membráně T-lymfocytů, a slouží k regulaci jejich počtu. Reakce Fas ligandu nádorové buňky s Fas receptorem T-lymfocytu vyústí v apoptózu T-lymfocytu. Nádorové buňky navíc potlačují expresi Fas receptoru, a tak tímto mechanismem unikají ataku T-lymfocyty v této rovině (O'Connell 2002).

Produkcí tumor growth faktoru (TGF- β) nádorové buňky mohou spustit diferenciaci pomocných Th lymfocytů na regulační lymfocyty-Treg (Liu a kol. 2007). Regulační lymfocyty potlačují funkci a proliferaci cytotoxických lymfocytů (Piccirillo a Shevach 2001). Treg navíc produkují další TGF- β a dochází tak k autokrinní stimulaci (Groux a kol. 1997).

1.6 Imunoterapie nádorů založená na nespecifické imunitě

Léčba pomocí nespecifické imunity je založena na několika mechanismech. Jedním z nich je fagocytóza, která je následkem rozpoznání pathogen associated molecular patterns (PAMPs) prostřednictvím pattern recognition receptors (PRRs). Dalším mechanismem je cytotoxické působení komplementu a indukce apoptózy.

1.6.1 Komplement (komplementový systém)

Komplement řadíme mezi humorální složky nespecifické imunity. Je to soubor membránových a sérových proteinů, které podléhají kaskádovité reakci. Výsledný proteinový komplex je schopen perforovat membránu patogenních bakterií a způsobit jejich lýzu. Meziprodukty této reakce mají opsonizační a chemotaktický účinek. Opsonizace, způsobená navázáním molekuly komplementu na povrch patogenní buňky, činí tuto buňku viditelnější pro fagocyty, které ji zahubí. Jiné proteiny komplementu působí na fagocyty jako chemoatraktanty. Fagocyty se, díky koncentračnímu spádu atraktantů, pohybují k místu vniknutí patogenů (Krejsek a Kopecký 2004).

1.6.2 Fagocytóza

Fagocytóza je schopnost buněk pohlcovat a degradovat vnější částice. Je to starobylý děj, který využívají např. prvoci k získávání potravy. U vyšších organismů se vyvinula skupina buněk schopných fagocytózy-fagocyty. Zastupují je granulocyty, dendritické buňky a makrofágy. Tyto buňky slouží k obraně organismu, likvidují extracelulární patogeny a vlastní poškozené buňky. Inicivace fagocytózy je zajišťována detekcí PAMPs nebo opsonizací patogenu protilátkami či složkami komplementu.

1.6.2.1 Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)

Buňky nespecifické imunity rozeznávají molekuly patogenních mikroorganismů, které souhrnně nazýváme pathogen associated molecular patterns. Jsou to konzervované struktury vyskytující se v bakteriích, virech, houbách. Příkladem PAMPs může být lipopolysacharid, flagelin, β -glukany, virové a bakteriální nukleové kyseliny (Dempsey a kol. 2003).

Původně se předpokládalo, že tyto molekuly se vyskytují jen v patogenních mikroorganismech. Dnes víme, že se vyskytují téměř ve všech mikroorganismech a postupně se přechází na označení MAMPs - mikrobe associated molecular patterns (Mackey a McFall 2006).

Imunitní odpověď nevyvolávají jen PAMPs/MAMPs, ale i tzv. damage associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs jsou molekuly endogenního původu. Při poškození buňky se dostávají do mezibuněčného prostoru. Příkladem jsou heat-shock proteins, ATP a kyselina močová (Rubartelli a Lotze 2007).

PAMPs/MAMPs a DAMPs jsou rozpoznávány receptory buněk nespecifické imunity (PRRs).

1.7 Pattern recognition receptors (PRRs)

PRRs jsou rozsáhlou skupinu receptorů, které jsou exprimovány na buňkách nespecifické imunity. Rozpoznávají nejrůznější PAMPs a DAMPs. Můžeme je rozdělit na: (1) **sekretované** (C-reaktivní protein, Lektin vázající manózu), (2) **cytoplasmatické** (NOD-like receptory, RIG-like receptors), (3) **membránové** (Toll-like receptory, Manózový receptor, Scavenger receptor, Formyl-peptidový receptor) (Elfeil a kol. 2013).

1.7.1 Formyl-peptidové receptory (FPRs)

FPRs jsou membránové receptory převážně monocytů a neutrofilů. Vážou N-formylové peptidy (i některé neformylové peptidy). Tato vazba vyústí v migraci neutrofilů k místu zánětu (Schiffmann a kol. 1975). N-formyl peptidy jsou produkovány pouze bakteriálními buňkami a mitochondriemi. Syntéza prokaryotického peptidu vždy začíná N-formyl-methioninem, lidského jen metioninem (Adams a Capecchi 1966). Proto jsou FPRs důležitým nástrojem při obraně proti bakteriální infekci a při odstraňování poškozených buněk.

1.7.2 Lidské FPRs

FPR má vysokou afinitu k fMLF (formyl-methionin-leucin-fenylalanin, $K_d < 1\text{nM}$) a je aktivován i při velmi nízké koncentraci fMLF (Le a kol. 2002).

FPR-like 1 má v porovnání s FPR nižší afinitu k fMLF (Durstin a kol. 1994). Je však považován za promiskuitní receptor, protože váže širokou škálu ligandů např: lipoxin A_4 (Fiore a kol. 1994), sérum amyloid A (Wang a kol. 1999), F-peptid (Deng a kol. 1999).

FPR-like 2 se vyskytuje pouze na monocytech a neváže fMLF (Durstin a kol. 1994). Může být ale aktivován ne-formylovými agonisty jako například peptidem z *Helicobacter pylori* –Hp(2-20), který se však silněji váže na FPR-like 1 (Betten a kol. 2001).

1.7.3 Myší FPRs

Zatímco lidská FPR genová rodina má tři členy, ta myší zahrnuje nejméně osm příbuzných genů (Tiffany a kol. 2011). Geny kodující myší receptory mFpr1, mFPR2 a mFpr-rs1 jsou podobné genům pro lidské FPRs (Gao a kol. 1998).

mFpr1 vykazuje nízkou afinitu k fMLF. Naopak vysokou afinitu má k tetrapeptidu fMIFL (N-formyl-Met-Ile-Phe-Leu) izolovaného z *Staphylococcus aureus* a k pentapeptidu fMIVIL (N-formyl-Met-Ile-Val-Ile-Leu) izolovaného z *Listeria monocytogenes* (Southgate a kol. 2008).

mFpr2 sdílí některé ligandy s lidským FPR-like 1- např. peptid získaný z fágové knihovny WKYMMv a lipoxin A_4 . MFpr2 nereaguje na samotný fMLF. Má ale afinitu k delším peptidům (navážou-li se na N-terminální konec fMLF další aminokyseliny) (He a kol. 2013).

mFpr-rs1 je receptorem pro lipoxin A_4 . Předcházející dva receptory jsou zabudovány v buněčné membráně a vazebné místo pro ligand směřuje ven z buňky. MFpr-rs1 se však stejně jako FPR-like 2 se vyskytuje uvnitř buňky (He a kol. 2013).

1.7.4 Využití agonistů (ligandů) FPRs

Aktivace PPRs vyvolá aktivaci signálních drah, které vedou k řadě buněčných imunitních odpovědí: Leukocyty migrují k místu vniknutí patogenu (chemotaxe). Neutrofilové uvolňují granula (degranulace), produkují superoxidy, fagocytují patogeny a produkují prozánětlivé cytokiny (Bae a kol. 2003, McDonald a kol. 1997). Makrofágy se podílejí výrazně na produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, vedoucí k buněčné infiltraci, tak na likvidaci patogenů jejich fagocytózou a vnitrobuněčnou likvidací (Krejsek a Kopecký 2004).

Tato práce se zabývá ukotvením agonisty FPRs na povrch nádorové buňky. Takto označená buňka se pro vrozenou část imunitního systému jeví jako nežádoucí mikroorganismus, který je třeba odstranit.

Leukocyty některých jedinců mají zřejmě schopnost nádorové buňky rozpoznat a zlikvidovat. Profesor Cui pozoroval spontánní regresi nádorů u myši, kterým byl injikován sarkom S-180. Zabíjení nádorových buněk bylo nezávislé na získané imunitě (Cui a kol. 2003). Tato schopnost byla však spojena s dosud neobjasněnou mutací SR/CR. U lidí byla schopnost buněk vrozené imunity rozpoznat a likvidovat nádorové buňky rovněž pozorována, nedosahuje však větších rozměrů (Blanks a kol. 2011, Riedlinger a kol. 2010).

1.8 Specifická imunoterapie nádorových onemocnění

Hlavním cílem nádorové terapie je zneškodnit nádorové buňky a zároveň nepoškodit buňky zdravé. Pro dosažení specifické léčby, je důležité rozeznat rozdíly mezi zdravými buňkami a buňkami nádorovými.

Jak již bylo zmíněno, nádorové buňky unikají imunitnímu systému. Pro dosažení účinné terapie je třeba tyto mechanismy obejít. Jednou ze strategií může být hledání struktur vyskytujících se na nádorových buňkách a následně na ně specificky vázat molekuly, které by imunitní systém mohl bez problémů rozpoznat a nádorovou buňku zneškodnit. Dobře prozkoumanou strukturou nacházející se na nádorových buňkách je fosfatidylserin, který byl použit k cílené imunoterapii myšího melanomu v praktické části této práce.

1.8.1 Fosfatidylserin (PS)

Je negativně nabitý fosfolipid. Běžně se nachází na vnitřní vrstvě plasmatické membrány (PS) eukaryotických i prokaryotických buněk. Byl objeven v roce 1941 J. Folchem. V roce 1955 byla odvozena jeho struktura (Baer a Maurukas 1955), která byla pozdější syntézou potvrzena. V plasmatické membráně savčích buněk zastupuje 2 - 10 % všech fosfolipidů (Vance a Steenbergen 2005).

Plasmatická membrána za normálních podmínek obsahuje na vnitřní vrstvě záporně nabitě fosfolipidy fosfatidylserin (PS) a fosfatidyletanolanin (PE). Na vnější vrstvě se nachází fosfatidylcholin (PC) a sfingomyelin – oba neutrálně nabitě (Verkleij a kol. 1973). Tato asymetrie je způsobena ATP-dependentní aminofosfolipidovou translokázou, která specificky transportuje PS a PE skrz fosfolipidovou dvojvrstvu plasmatické membrány (Seigneuret a Devaux 1984). K narušení asymetrie fosfolipidů dochází inhibicí translokázy či aktivací scramblázy – Ca^{2+} -dependentní enzym transportující fosfolipidy oběma směry (Zhou a kol. 1997).

PS na vnější straně plasmatické membrány můžeme vizualizovat díky anti-PS protilátce nebo anexinu V, který se na PS váže. Exprese PS na vnější straně byla pozorována při patologických i fyziologických procesech jako např. apoptóza, buněčné stárnutí, aktivace trombocytů. Spontánní exprese byla prokázána na endoteliálních buňkách vaskularizace nádorů-nejvíce u myšího melanomu B16. Endotel však nevykazoval známky apoptózy (Ran a Thorpe 2002). Zvýšení exprese PS na vnější straně plasmatické membrány bylo u zdravých endoteliálních buněk bylo pozorováno za určitých podmínek, které se nápadně podobají těm v mikroprostředí tumoru. Jsou to:

- Zánětlivé cytokiny: IL-1 a $\text{TNF}\alpha$
- Kyselé prostředí: medium bez hydrogenuhličitanu sodného s přidanou kyselinou chlorovodíkovou o pH 6.2 – 7.3.
- Hypoxie: inkubace v prostředí s 1 % O_2
- Peroxid vodíku: roztok o koncentraci 100 mM (Ran a Thorpe 2002).

Podmínky, za kterých bylo zkoumáno zvýšení exprese PS na vnější straně buněčné membrány, jsou uvedeny v Tabulce I. Výskyt PS v procentech byl spočten dle následujícího vzorce: (Anexin V navázaný na buňky (pmol)/maximální navázání Anexinu V)*100. Maximální navázání Anexinu bylo stanoveno u buněk ovlivňovaných aktinomycinem D a Tumor necrosis faktorem α (TNF α). ABAE= adult bovine aortic endothelial cells, bEnd.3 = mouse brain endothelioma cells. Zánětlivé cytokiny způsobily nízký, kyselý prostředí a hypoxie vyšší a peroxid vodíku nejvyšší nárůst externalizace PS (Ran a Thorpe 2002).

Tabulka I: Efekt cytokinů, růstových faktorů a stresu na externalizaci PS na endoteliálních buňkách *in vitro* (Ran a Thorpe 2002).

Treatment	Concentration	¹²⁵ I-Annexin V (% of max binding)*	
		ABAE cells	bEnd.3 cells
Medium with 10% serum	N/A	0	0
Actinomycin D + TNF α	50 ng/mL each	100	100
VEGF	20 ng/mL	0	0
bFGF	20 ng/mL	0	0
Scatter factor	40 ng/mL	0	0
TGF β_1	20 ng/mL	0	0
PDGF-BB	20 ng/mL	0	0
IL-10	20 ng/mL	0	0
IL-8	20 ng/mL	0	0
IL-6	20 ng/mL	0	0
IL-1 α	10 ng/mL	6.4	7.5
IL-1 β	10 ng/mL	5.8	5.5
Interferon	40 ng/mL	8.6	2.8
TNF α	20 ng/mL	7.4	13.7
Thrombin	50 nM	8.8	17.4
Hypoxia	1% O ₂	15.0	22.5
Hypoxia + IL-1 α	Same as above	26.0	31.0
Hypoxia + TNF α	Same as above	33.0	36.0
pH 6.6	N/A	20.2	18.9
Hydrogen peroxide	100 μ M	95.5	98.4

Fosfatidyserin endoteliálních buněk může být zajímavým cílem pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění z těchto důvodů: (1) Umístění na vnější membráně endotelu přímo vybízí k intravenózní aplikaci léčiva. (2) Hojný výskyt: 3×10^6 PS na buňku. (3) Výskyt u různých druhů tumorů: myší melanom B16, myší karcinom plic 3LL, myší karcinom tlustého střeva Colo26, lidský karcinom plic NCI H358, lidský karcinom tlustého střeva HT39, lidský Hodgkinův lymfom L540. (4) Absence PS na vnější straně plasmatické membrány u zdravého endotelu (Ran a Thorpe 2002).

Později bylo objeveno, že PS na vnější vrstvě plasmatické membrány se nevyskytuje jen na nádorovém endotelu, nýbrž je obecným znakem PM rakovinných buněk nezávisle na typu rakoviny. Totéž platí i pro metastázy. Nádorové buňky se zvýšenou vnější expresí PS však nevykazovaly známky apoptózy a PS vizualizovaný Anexinem V byl hojně lokalizován v shlucích (Riedl a kol. 2011).

Fosfatidylserin je tedy významným markerem rakovinných buněk a může být využit pro diagnostiku i léčbu onemocnění, zvláště pro TDD (Targeted Drug Delivery). TDD je léčebná strategie, kdy léčba je vysoce specifická a bez vedlejších účinků (Schutters a Reutelingsperger 2010).

1.8.1.1 Anexin V

Anexin V je členem multigenní rodiny anexinů. Anexiny jsou převážně cytoplasmatické proteiny vázající se na negativně nabitě fosfolipidy. Vazba je závislá na koncentraci Ca^{2+} (Peng a kol. 2014). Anexin V byl objeven v cévní tkáni jako antikoagulační protein (Reutelingsperger a kol. 1985). Anexin V je jednořetězcový protein (Huber a kol. 1990) o molekulové hmotnosti 35 kDa a váže se na PS ($K_d \sim 0,1\text{-}2\text{nM}$) (Andree a kol. 1990, Tait a kol. 1989). V roztoku se vyskytuje jako monomer, ale po vazbě na PS tři monomery Anexinu V vytvoří trimer. Trimery se spojují a vzniká tak síť pokrývající povrch exprimující PS (Concha a kol. 1992, Oling a kol. 2001).

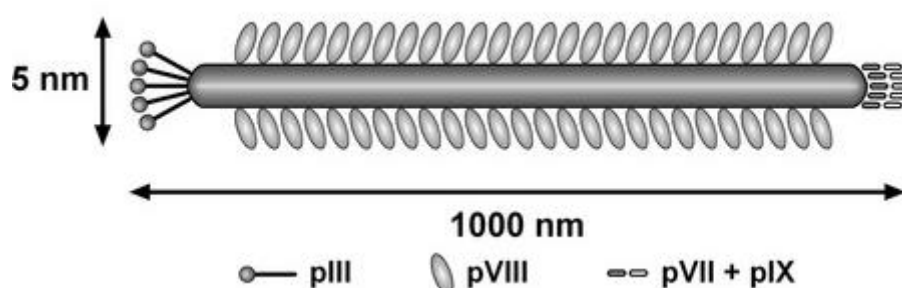
Rekombinantně připravený lidský Anexin V prokázal stejné vazebné vlastnosti jako ten, který byl purifikován z lidské tkáně (Maurer-Fogy a kol. 1988). Tento objev vedl k celé řadě značení Anexinu V například radionuklidy (De Saint-Hubert a kol. 2010) nebo fluorochromy (Schellenberger a kol. 2003). V poslední době se Anexin V využívá především k vizualizaci apoptózy (Schellenberger a kol. 2003). Dále Anexin V může pomoci při diagnostice a lokalizaci onemocnění nebo při hodnocení účinnosti léčby všude tam, kde dochází k úmrtí buněk.

Anexin V má relativně velkou molekulovou hmotnost, a proto špatně prostupuje do nádorové masy (Song a kol. 2013). Z tohoto důvodu se zájem ubírá k peptidům vázajícím se na PS a dalším tumor specifickým peptidům objevených pomocí phage display.

1.9 Využití virů pro hledání nových peptidických agonistů

1.9.1 Filamentární bakteriofágy

Filamentární bakteriofág je virus vláknitého či tyčinkovitého tvaru. Dosahuje délky cca 900 nm a šířky 6 – 9 nm. Obvykle obsahuje jedno-řetězcovou kruhovou DNA (ssDNA) a napadá gramnegativní bakterie (Rasched a Oberer 1986). DNA je chráněna proteinovým obalem, který se skládá z cca 2700 α -helikálních proteinů pVIII po obvodu viru a minoritních proteinů na koncích. Na jednom konci je pět kopií proteinu pIII i pVI, kódované geny III a VI. Proteiny pVII a pIX (geny VII a IX) jsou na konci druhém (Smith a Petrenko 1997). Umístění proteinů je vyobrazeno na následujícím obrázku:



Obrázek 1: Obalové proteiny filamentárního bakteriofága (Krumpe a Mori 2006).

Molekula DNA obsahuje v závislosti na druhu 5000 – 8000 nukleotidů, ale může do ní být vloženo až 12 000 nukleotidů cizí DNA, což z filamentárních bakteriofágů dělá silný nástroj pro biotechnologii. Nejlépe prozkoumané jsou F-specifické filamentární bakteriofágy (M13, fd, f1), které napadají *E. coli* nesoucí F-faktor (Marvin 1998). Infekce buňky začíná navázáním N-konce proteinu pIII na F-faktor. Tento konec virionu vstupuje do buňky jako první. Obalové proteiny splynou s obaly buňky a samotná ssDNA vstupuje do cytoplasmy. Syntézou komplementárního řetězce vzniká dsDNA označovaná jako replikační forma, která je templátem pro transkripci fágových genů i pro syntézu nových ssDNA. Obalové proteiny, které vznikly translací na ribozomech buňky, obklopí nově nasyntetizované ssDNA = komplementace virionu. Nové viriony opouští buňku, aniž by ji usmrtily (Smith a Petrenko 1997). Je nutno dodat, že bakteriofág plně využívá opravných, replikačních, transkripčních a translačních mechanismů buňky.

1.9.2 Phage display

Technologie phage display umožňuje expresi (poly)peptidu na obalu bakteriofága. Nejčastěji se pro tuto metodu používají filamentární bakteriofágy M13, fd a f1. Peptid se pak v roztoku chová, jako kdyby nebyl zabudovaný v obalu fága. Pokud je ligandem pro některý receptor ponechává si svou afinitu i specifitu, i když je součástí bakteriofága. Díky fágovým knihovnám, které obsahují miliardy různých peptidů inkorporovaných do genetické informace fágů, můžeme hledat nové peptidy vázající se na požadovaný receptor (Smith a Petrenko 1997).

1.9.3 M13 filamentous phage display

DNA kódující požadovaný peptid je sfúzována s genem obalového proteinu fága. Pokud takto upravený fág infikuje buňku, požadovaný peptid se na nově zkompletovaných virionech objeví v tolika kopiích, kolik kopií tohoto obalového proteinu obsahuje obal virionu. Například při fúzi s genem VIII jich bude několik tisíc, zatímco při fúzi s genem III jen pět (Smith a Petrenko 1997).

1.9.4 Biopanning

Metoda, která umožňuje prohledávání fágových knihoven za účelem nalezení peptidu s afinitou k námi zvolené molekule, se nazývá biopanning. Zahrnuje následující kroky: (1) Přichycení zvolené molekuly k titrační destičce. (2) Přidání fágové peptidové knihovny. Fágy, které nesou peptidy mající afinitu ke zvolené molekule, se na ni navážou. (3) Vymytí nenavázaných fágů. (4) Získání afinitních fágů – docílíme např. přidáním kompetitivního ligandu, nebo díky stabilitě filamentárního fága extrémním pH, denaturací, částečnou proteolýzou. Tento proces se obvykle opakuje nejméně třikrát (Pande a kol. 2010).

1.9.5 Aplikace Phage display

Phage display prodělala v posledních letech značný vývoj. Využívá se k hledání specifických agonistů a antagonistů pro receptory, zkoumání reakcí protein-protein. Díky protilátkám exprimovaným na fágu můžeme zkoumat epitopy (Pande a kol. 2010). Peptidy získané z fágové knihovny mohou přispět k syntéze nových léčiv či vakcín.

1.10 Peptidy vázající se na fosfatidylserin

PSBP-0 a PBS-6

Metoda Phage display přispěla k objevení peptidu s vysokou afinitou k PS. Chiyi Xiong a jeho tým vycházel ze sekvence, kterou sdílí PS dekarboxyláza a protein kináza C, tedy enzymy se schopností vázat PS (Xiong a kol. 2011). Sekvence dostala název PSBP-0 (phosphatidylserine binding peptide). Tato sekvence (FNFRLKAGQKIRFG) byla postupně modifikována. Jednotlivé aminokyseliny byly substituovány alaninem. Afinita byla následně měřena za pomoci povrchové plasmonové resonance. Ve srovnání s původní sekvencí byla nejvyšší afinita k PS naměřena u motivu se sekvencí FNFRLKAGAKIRFG. Protože alanin v tomto případě nahradil glycin na šesté pozici, peptid nese název PSBP-6 (Xiong a kol. 2011). PSBP-6 má molekulovou hmotnost 1623 Da a afinitu k PS desetkrát větší než PSBP-0 ($K_d \sim 100\text{nM}$). Aby bylo možné peptid vizualizovat, připojil k němu Xiong se svým týmem jedno-aminokyselinový chelátor SAAC (Lys[di(2-pyridinemethyl)]-CO₂H), který tvoří komplex s ^{99m}Tc nebo Re. Hydrofobní a kladně nabitý SAAC navázaný na PSBP-6 ještě zvýšil afinitu k PS (Xiong a kol. 2011). Později byl SAAC(^{99m}Tc)-PSBP-6 úspěšně použit jako zobrazovací prostředek pro stanovení apoptotické odpovědi na chemoterapeutickou léčbu nádorů. Navíc SAAC(^{99m}Tc)-PSBP-6 má nižší molekulovou hmotnost (2045 Da) než Annexin V (35 800 Da) a poločas rozpadu v krvi 6 hodin (Song a kol. 2013).

CLSYYPSTYC

Thapa a jeho tým hledali peptid vázající se na PS. Fágovou knihovnu nejdříve inkubovali s fosfatidylcholinem (PC), aby vyloučili vazbu peptidu právě na PC. Fágy, které se nenavázaly na PC poté inkubovali s PS. Následně volné fágy odstranili důkladným promytím. Fágy navázané na PS byly získány a namnoženy v bakteriální buňce. Tento proces, výše popsáný jako biopanning, byl čtyřikrát opakován. Získané fágy byly sekvenovány a výsledná sekvence translatována do odpovídajícího peptidu (CLSYYPSTYC). Peptid byl syntetizován v lineární i cyklické formě. Cyklická forma vykazala vyšší specifitu k apoptotickým buňkám (Thapa a kol. 2008).

Fluorescenčně značený cyklický peptid se sekvencí CLSYYPSTYC byl intravenózně injikován do myši nesoucí lidský plicní karcinom. Peptid se specificky vázal na nádorové a endotelové buňky karcinomu. Léčba camptothecinem (chemoterapeutikum) ještě zvýšila tuto specifickou vazbu (Thapa a kol. 2008).

TLVSSL

Laumonier a jeho tým též hledali protein vázající se na PS. Provedli biopanning *ex vivo* na játrech. Fágová knihovna byla nejdříve propuštěna zdravými játry, aby se vyloučily fágy vázající se na zdravou tkáň. Fágy, které prošly zdravými játry, byly namnoženy a následně propuštěny játry apoptotickými (s vyšší externalizací PS). Apoptóza byla navozena protilátkou proti FAS-receptoru, která byla myši aplikována intravenosně. Fágy zájmu zůstaly navázány v játrech a byly izolovány. Následně byla *in vitro* testována vazba fágů zájmu na PS. Fágy s afinitou k PS byly sekvenovány. Nejvyšší afinitu k PS vykazoval fág s peptidem o sekvenci TLVSSL. Avšak samotný peptid měl nižší afinitu k PS, než když byl součástí fágového obalu. Navíc disociační konstanta byla odvozena na cca 400 nM (Laumonier a kol. 2006), což v porovnání s PSBP-6 (FNFRLKAGAKIRFG, $K_d \sim 100\text{nM}$) činí tento peptid jako relativně málo afinní.

1.11 Další peptidy vázající se na povrch nádorových buněk

Peptid P6.1 (sekvence **KCCYSL**) se váže na receptor epidermálního růstového faktoru typu II (ErbB-2). Tento receptor patří do rodiny ErbB, která spadá do početné skupiny tyrosin-kinázových receptorů (Karasseva a kol. 2002). ErbB-2 se vyskytuje na zdravých buňkách. Zvýšená exprese ErbB-2 byla zaznamenána např. u karcinomu prsu, tlustého střeva, jater, slinivky, vaječnicků, prostaty, plic (Überall a kol. 2008). Peptid P6.1 byl radioaktivně označen a intravenózně aplikován myši nesoucí lidský karcinom prsu MDA-MB-435. Peptid P6.1 se navázal a označil ErbB-2 vyskytující se ve zvýšeném počtu na prsních nádorových buňkách (Kumar a kol. 2007). Obdobný pokus byl proveden na myši nesoucí lidský karcinom vaječnicků HIO-80. Peptid P6.1 se též úspěšně navázal na nádorové buňky ovaríí (Deutscher a kol. 2009). V obou pokusech bylo zaznamenáno zadržování radioaktivního značení v ledvinách. Je proto třeba dalšího výzkumu, který by tento problém minimalizoval. P6.1 by mohl být slibným prostředníkem pro vizualizaci a Targeted Drug Delivery u nádorů exprimujících ErbB-2.

Peptid LTVSPWY se specificky váže na buněčnou linii karcinomu prsu SKBR3. Navíc je schopen dopravit malé molekuly (např. oligonukleotidy) na nádorové buňky (Shadidi a Sioud 2003). Později byl peptid LTVSPWY propojen s lytickým KLA peptidem. Tento fúzní peptid dokázal perforovat plasmatickou membránu nádorových buněk, zatímco zdravé buňky nebyly postiženy. Poškození membrány vyústilo v nekrózu nádorových buněk. Připojením oligonukleotidu na KLA část fúzního peptidu byla indukována apoptóza nádorových buněk (Sioud a Mobergslien 2012).

Existuje řada dalších peptidů vázajících se na povrch nádorových buněk. Příklady jsou uvedeny v Tabulce II, šipkou jsou označeny výše zmíněné peptidy.

Tabulka II: Tumor specifické peptidy objevené pomocí Phage display (Shadidi a Sioud 2003).

Peptide ligand	Cellular target
Surface immunoglobulin	
KPW(W/Y)(V/A)XRV, (D/N)W(A/G)(V/M)WXX/RR, YXXEDLRRR, XXPVDHGL	SUP-B8 human B-cell lymphoma surface idiotype
FXDXRL, XIHYIF	Human multiple myeloma M-protein
IELLQAR	E-Selectin
LVRSTGQFV, LVSPSGSWT, ALRPSGEWL, AIMASGQWL, QILASGRWL, RRP SHAMAR, NRPANSM, LQDRLRFAT, PLSGDKSST	Human chronic lymphocytic leukaemia (CLL) surface idiotypes
FHEPENSISVNQLDC, ETLPAPLAPQVQYDA, MGSIMVDPLVDGALS, MTPYPRDPHDDIP	Human multiple myeloma M-protein
Cancer cell surface	
SPL(W/F)(R/K)(N/H)S(V/H)L	ECV304 endothelial cell line
CVFXXXYXXC, CVAYCXXXXCYVC, TSPLNIHNGQKL	Prostate specific antigen (PSA) Human head and neck squamous cell cancer
MYWGDShwLQYWYE	Her-2 tyrosine kinase type 1 receptor
MCPKHPLGC	Malignant glioma cell lines
HLQIQPWYPQIS	WAC-2 human neuroblastoma
HEWSYLAPYPWF	WiDr human colorectal cell line
▶ KCCYSL	Her-2 tyrosine kinase type 1 receptor
▶ CESLWGGGLMWTIGLSDC, CNIWGVVLSWIGVFPEC	Vascular smooth muscle cells (VSMC)
▶ LTVXPWX	Human breast cancer cells
Vasculature of various tumors	
▶ CDRGDCFC (RGD-4C) ACDCRGDCFCG	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ Integrins
CNGRCVSGCAGRC, CVCNGRMEC, NGRAHA CGSLVRC, CGLSDSC, TAASGVRSMH, LTLRWVGLMS CTTHWGFTLC	Aminopeptidase N Tumor vasculature NG2 proteoglycan MMP-2 and MMP-9 (gelatinase A and B)
NRSLKRISNKRIRRK, LRIKRKRKRKRKTRK, NRSTHI RRKRRR	Rat tumor model VEGF
ATWLPPR	VEGFRII/KDR
CPGPEGAGC	Aminopeptidase P
SMSIARL, VSFLEYR	Prostate tumor in mice
PRPGAPLAGSWPGTS, DRWRPALPVVLFPLH, ASSSYPLIHWRPWAR	VEGF-C
HTMYHHYQHHL	VEGFRII/KDR
CGNKRTGCG	Tumor lymphatics and tumor cells
A(A/Q)(N/A)(L/Y)(T/V/M/R)(R/K), G(G/A)ELR	MMP-11
NGYEIEWYSWVTHGMY	VEGFRI/Flt-1

2 Cíle práce

Hledání nejvhodnějšího způsobu specifického nádorového targetingu s použitím peptidů vázajících se na povrch nádorových buněk.

Nádorová a protimetastázová terapie s použitím intravenosní aplikace targetovaných f-MLF motivů.

3 Materiály a metody

3.1 Chemikálie

- **Anti-Mouse CD45 APC; clone 30-F11** (eBioscience, USA)
- **PBS** - fosfátový pufr s chloridem sodným (pH 7,3-7,4)
- **PI** - propidium jodid (Invitrogen, USA)
- **Trypanová modř** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsin** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Trypsinizační směs** (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS)
- Peptid **fMLFG₅FNFR₁LKAGAKIRFG** (Schafer-N, Dánsko)
- Peptid **fMLF(GP)₄FNFR₁LKAGAKIRFG** (Schafer-N, Dánsko)
- **Beta glukán** (beta 1,3 D glukán Zdroj: Transfer Point, USA, Původ: *Saccharomyces cerevisiae*)
- **RPMI 1640** (L-glutamin (2mM), Merkaptoetanol (0,05mM), Penicilin (100 units /ml), Streptomycin sulfate (0,1 mg/ml), Amfotericin B (0,25 µg/ml) Sigma- Aldrich, USA)
- **LPS** z *E. coli* 0111.B4 (Sigma-Aldrich, USA)
- **Fetal Calf Serum (FCS)** (Sigma-Aldrich, USA)

3.2 Laboratorní zvířata

V pokusech byly použity samice myšího kmene C57BL/6 z chovu Charles River Laboratories. Do laboratoře přišly ve stáří 4 týdnů a po dosažení 8 týdnů (váha cca 20 g) byly použity k pokusům. Všechny myši byly chovány za stejných podmínek: samostatně v plastických boxech, měly neomezený přístup ke sterilní vodě i potravě (suché pelety). V místnosti se udržovala fotoperioda 12/12 hodin.

3.3 Buněčná linie

Buněčná linie myšího melanomu B16-F10 byla darována prof. Říhovou z Mikrobiologického ústavu AV ČR, Praha. Kultivace byla prováděna v RPMI 1640 s 10 % FCS (fetal calf serum), při teplotě 37° C v termostatu s 5 % CO₂.

3.4 Transplantace

Do předem oholeného pravého boku bylo subkutánně transplantováno 4×10^5 buněk B16-F10 v 100 µl RPMI 1640.

3.5 Měření velikosti nádorů

Velikost nádorů byla od počátku terapie měřena pomocí kaliperu každých 48 hodin. Měřena byla délka (A) a výška nádoru (B). Následně byl spočten objem nádoru dle vzorce $V = \pi / (A \times B^2)$.

3.6 Počítání plicních metastáz

Myši byly usmrceny zlomením vazů. Poté jim byly vyjmuty plíce, které byly fixovány v 4 % formaldehydu po dobu nejméně jednoho týdne. Plicní tkáň za tuto dobu zesvětlala a metastázy se staly více viditelné. Díky tomuto kontrastu byly metastázy ve všech plicních lalocích spočteny pod binokulární lupou.

3.7 Analýza dat

Získané hodnoty byly zpracovány do grafů pomocí programu Microsoft Excel. Statistická významnost byla spočtena pomocí Analýzy kovariancí (Anova) pro opakovaná měření v programu Statistica 12, předpoklady pro počítání Anovy (Normalita dat a Homogenita variancí) byly spočteny v programu R i386 3.0.3.

3.8 Příprava terapeutických látek

Roztoky aplikované myším byly ředěny v PBS a sterilizovány filtrací přes filtr s póry 0,22 mikrometrů.

3.9 Intravenosní aplikace fMLFG₅FNFRLKAGAKIRFG

V experimentu bylo použito 16 myší C57BL/6, které byly náhodně rozděleny do dvou skupin. Terapie byla zahájena 12. den od transplantace melanomových buněk B16-F10, tento den byl označen jako den 0. Měření nádorů probíhalo ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14. Myši byly usmrceny 14. den od zahájení terapie, kdy jim byly vyjmuty plíce pro pozdější analýzu výskytu metastáz.

Terapeutika a způsob aplikace dle skupin

Skupina F: Intravenosní aplikace 50 μ l fMLFG₅FNFRLKAGAKIRFG o koncentraci 2,5 mM v PBS byla provedena ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10.

Skupina K: Intravenosní aplikace 50 μ l sterilního PBS byla u kontrolní skupiny provedena ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10.

3.10 Intravenosní aplikace fMLF(GP)₄FNFRKAGAKIRFG

V experimentu bylo použito 18 myši C57BL/6, které byly náhodně rozděleny do 3 skupin po 6 jedincích. Terapie byla zahájena 12. den od transplantace melanomových buněk B16-F10, tento den byl označen jako den 0. Měření nádorů probíhalo ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14. Myši byly usmrceny 14. den od zahájení terapie, kdy jim byly vyjmuty plíce pro pozdější analýzu výskytu metastáz.

Terapeutika a způsob aplikace dle skupin

Skupina A: Intravenosní aplikace 50 μ l fMLF(GP)₄FNFRKAGAKIRFG o koncentraci 1 mM v PBS byla provedena ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10.

Skupina B: Intravenosní aplikace 50 μ l fMLF(GP)₄FNFRKAGAKIRFG o koncentraci 1 mM v PBS byla provedena ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10. Navíc bylo této skupině perorálně podáváno 3 mg beta-glukanu rozsuspendovaného v 50 μ l vody ve dnech: 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10.

Skupina K: Intravenosní aplikace 50 μ l sterilního PBS byla u kontrolní skupiny provedena ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10.

3.11 Cytotoxický test CD45+/PI

Den 1:

Aktivace PMJ2R pomocí LPS

Buňky makrofágové myši linie PMJ2R byly přeneseny do centrifugační zkumavky a centrifugovány 10 min/4 °C/1000 RPM. Následně byly buňky rozděleny do dvou menších kultivačních nádob. Do první nádoby byly za účelem aktivace PMJ2R přidány 2 ml LPS o koncentraci 1 μ l/ml. Obě nádoby byly doplněny do 20 ml RPMI s 10 % FCS a kultivovány 24 hodin v termostatu při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

Den 2:

Navázání ligandu na B16-F10 a následná inkubace s PMJ2R

Narostlé melanomové buňky B16-F10 byly zbaveny kultivačního media. Třikrát promyty sterilním fyziologickým roztokem PBS. Do kultivační nádoby byla přidána trypsinizační směs (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS) za účelem uvolnění adheovaných buněk z povrchu nádoby. Uvolňování buněk probíhalo 5 minut v termostatu při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Po uplynutí pěti minut byla trypsinizace zastavena přidáním kultivačního media RPMI 1640 s 10% FCS. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min/4 °C /1000 RPM. Buněčný pelet byl naředěn přidáním v RPMI 1640 s 10 % FCS na koncentraci $2,5 \times 10^5$ buněk/ml. Následně byly buňky B16-F10 nasazeny do

96-U jamkového panelu do 30 jamek v počtu 50 000 buněk na jamku v celkovém objemu 200 µl RPMI 1640 s 10 % FCS.

Buňky byly promyty centrifugací (2 min/4 °C/1800 RPM) a supernatant byl slit. K 15 peletám bylo přidáno 20 µl ligandu fMLFG₅FNFRLKAGAKIRFG o koncentraci 0,5 mM a doplněno na objem 200 µl. Výsledná koncentrace ligandu činila 0,05 mM v celkovém objemu 200 µl RPMI 1640 s 10 % FCS. Do jamek bez ligandu bylo přidáno 200 µl RPMI 1640 s 10 % FCS.

Buňky byly s ligandem inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Po inkubaci byly buňky promyty centrifugací (2 min/4 °C/1800 RPM) a supernatant slit.

K nádorovým buňkám bylo přidáno 100 000 efektorových buněk (makrofágů PMJ2R) v celkovém objemu 200 µl RPMI 1640 s 10 % FCS. Do 10 jamek byly přidány neaktivované PMJ2R a do dalších 10 aktivované PMJ2R (aktPMJ2R) připravené z předešlého dne. Poměr mezi nádorovými buňkami a makrofágy byl 1:2 (50 000 B16-F10 : 100 000 PMJ2R). Do zbylých 10 jamek bylo přidáno 200 µl RPMI 1640 s 10 % FCS. Připravené směsi buněk byly inkubovány 4 hodiny při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Rozložení buněk a ligandu je znázorněno v Tabulce III.

Tabulka III: Demonstrace rozložení buněk a ligandu na 96-U jamkovém panelu. B16-F10 – nádorové buňky, PMJ2R – neaktivované makrofágy, aktPMJ2R – aktivované makrofágy.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	B16-F10					B16-F10 + ligand					
B	B16-F10 + PMJ2R					B16-F10 + ligand + PMJ2R					
C	B16-F10 + aktPMJ2R					B16-F10 + ligand + aktPMJ2R					
D											
E											
F											
G											
H											

V provedeném pokusu byl použit fagocytární ligand s motivem fMLF jako agonista pro FPRs spojený přes glycinový spacer s 14-ti aminokyselinovou sekvencí, která se váže na fosfatidylserin (fMLFG₅FNFRLKAGAKIRFG).

Příprava buněk pro FACS analýzu

Po čtyřhodinové inkubaci byla směs buněk 2× promyta RPMI 1640 bez séra centrifugací (2 min/4 °C/1800 RPM). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl trypsinizační směsi (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS) z důvodu možné adheze nádorových buněk B16-F10. Trypsinizace probíhala 5 minut v termostatu při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Trypsinizace byla zastavena přidáním 150 µl RPMI 1640 s 10 % FCS do každé jamky a důkladným promícháním směsi. Následovalo promytí centrifugací (2 min/4 °C/1800 RPM), supernatant byl slit.

Jamky, které obsahovaly PMJ2R (B1-B10 a C1-C10), byly barveny anti- CD45-APC o koncentraci 2 µg/ml RPMI 1640 s 10 % FCS v celkovém objemu 10 µl na jamku. Barvení probíhalo 20 minut při 4 °C ve tmě. Do jamek, které neobsahovaly PMJ2R (A1-A10), bylo přidáno 10 µl 1640 s 10 % FCS. Po barvení byly směsi buněk 2× důkladně promyty 150 µl RPMI 1640 s 10 % FCS na jamku, centrifugace (2 min/4 °C/1800 RPM). Následně byly buňky barveny PI (propidium jodid) ve výsledné koncentraci 5 µl/ml v objemu 150 µl RPMI (s CFS) na jamku. Pro vyloučení cytotoxicity samotného PI bylo do prvních jamek skupin (A1, B1, C1, A6, B6, C6) přidáno pouze 150 µl RPMI (s CFS) na jamku a žádný PI. Tyto jamky sloužily jako kontrola. Barvení probíhalo po dobu 5 minut 4 °C ve tmě. Následně byly buňky promyty centrifugací (2 min/4 °C/1800 RPM), supernatant slit a jamky doplněny 150 µl 1640 s 10 % FCS.

FACS analýza

Vzorky připravené dle výše zmíněného postupu byly promíchány, přeneseny do zkumavky a měřeny na průtokovém cytometru (BD FACSCantoII flowcytometer, BD Biosciences, USA). Přístroj byl nastaven na střední rychlost nasávání vzorku (medium flow rate~60 µl/min) a na dobu nasávání 30 vteřin. Dále aby zaznamenal 1×10^6 událostí. Tento počet byl dostačující pro zaznamenání všech buněk v nastaveném objemu vzorku 30 µl. Pro kvantifikaci počtu buněk v původním objemu (150 µl) byl počet buněk naměřených v 30 µl vynásoben pěti.

Výsledky byly zpracovány programem BD FACSDiva verze 6.1.3. Průtokový cytometr byl nastaven dle Tabulky IV.

Tabulka IV: Nastavení průtokového cytometru.

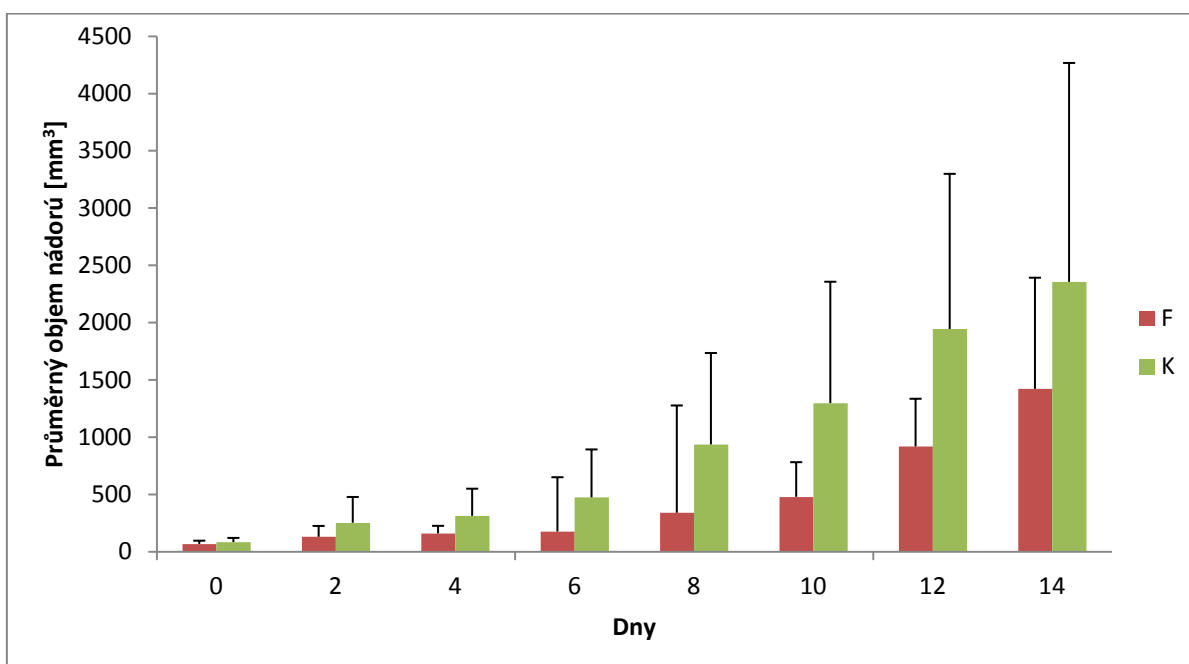
Nastavení laserů		Nastavení nasávání vzorku	
Window Extension	2,0	Sample flow rate	medium
FSC Area Scaling	0,3	Sampling time	30 s
Laser Delay Blue	0,0	Number of events	1×10^6
Laser Delay Red	30,0		
Area Scaling Blue	0,7		
Area Scaling Red	1,3		

Na průtokovém cytometru byla nastavena kompenzace APC k PE Texas Red 10,0.

4 Výsledky

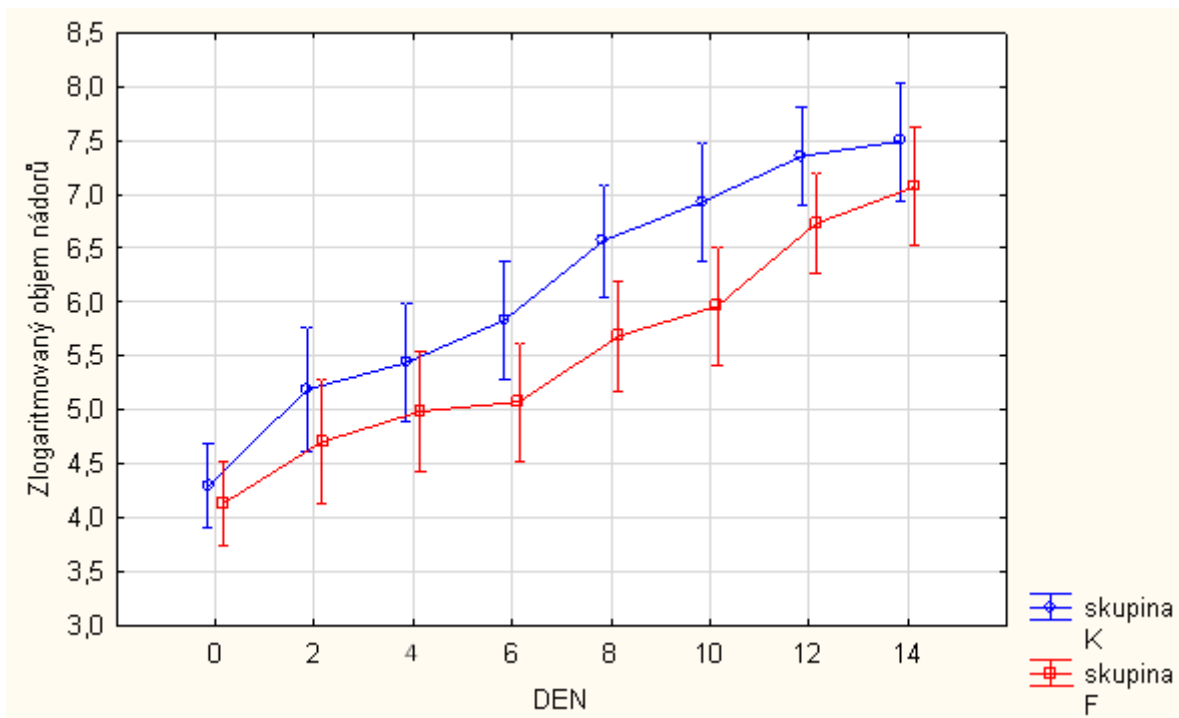
4.1 Intravenosní aplikace fMLF₅FNRLKAGAKIRFG

Látka fMLFGGGGGFNRLKAGAKIRFG, která byla použita v tomto experimentu, obsahuje ligand pro formyl-peptidový receptor (fMLF), spacer (GGGGG) a sekvenci vázající se na fosfatidylserin (FNRLKAGAKIRFG). Tato sekvence byla použita ve všech experimentech této práce a pro přehlednost bude dále označována jako 14AK. Výsledky vlivu terapie na velikost nádorů jsou uvedeny na Obrázku 2.



Obrázek 2: Vliv intravenosní aplikace fMLF-G₅-14AK na velikost nádorů. Skupině F bylo ve dnech 0,2, 4, 6, 8, 10 intravenosně aplikováno 50 μ l 0,5 mM fMLF-G₅-14AK. Skupině K ve stejných dnech intravenosně PBS.

Léčená skupina F vykazovala výrazně menší objem nádorů po celou dobu léčby a měření. Proto byl proveden test Analýzy kovariancí pro opakovaná měření (Obrázek 3). Pro splnění podmínek pro tento test (Normalita dat a Homogenita variancí) byla data transformována.

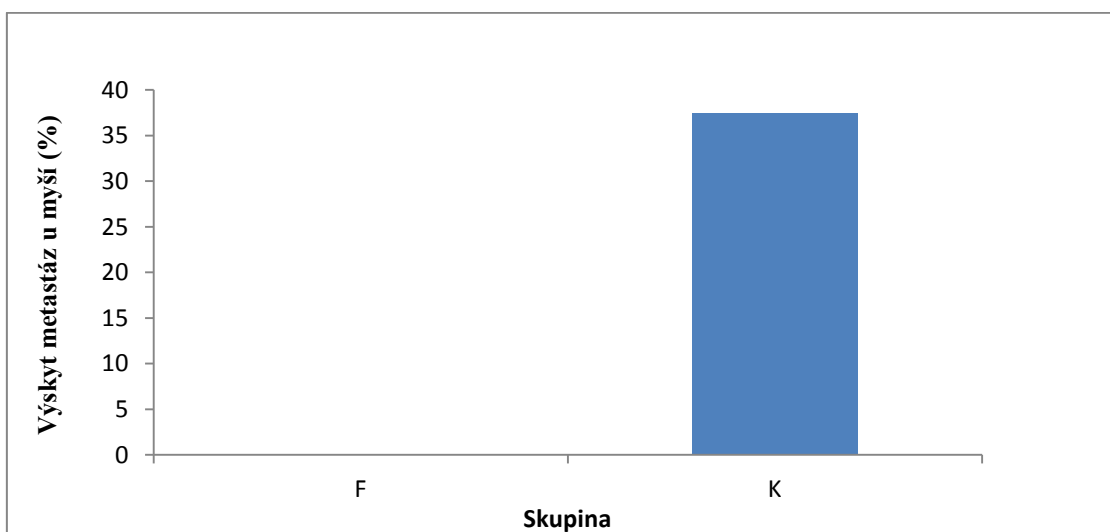


Obrázek 3: Grafický výstup Analýzy kovariancí pro opakovaná měření. Skupině F bylo ve dnech 0,2, 4, 6, 8, 10 intravenosně aplikováno 50 μ l 0,5 mM fMLF-G₅-14AK. Skupině K ve stejných dnech intravenosně PBS.

V porovnání s kontrolní skupinou K je patrná redukce nádorů u skupiny F. U léčené skupiny F můžeme pozorovat trend ve snížení velikosti nádorů po celou dobu léčby a měření, ač nebylo dosaženo statistické významnosti ($F=3,935$ $p=0,067$).

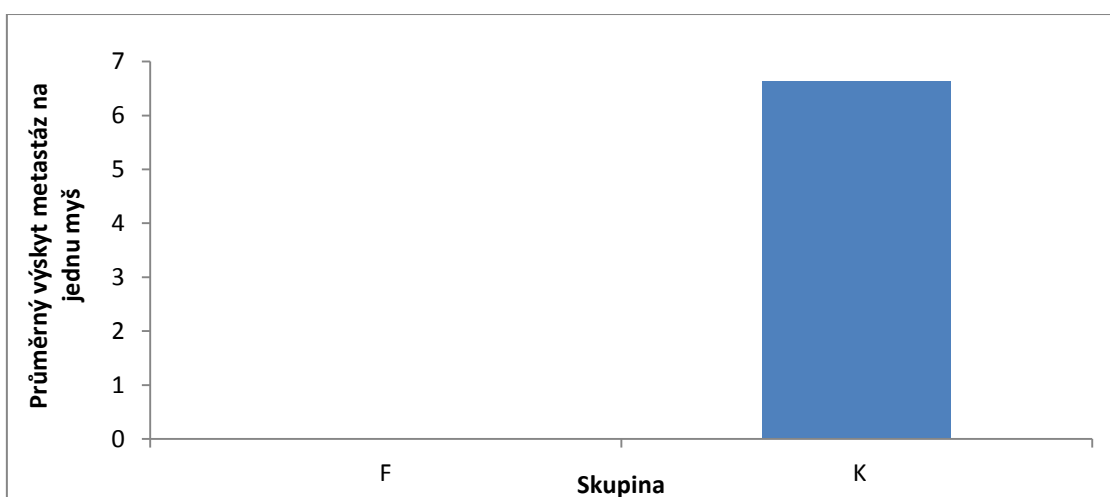
Po ukončení terapie byl vyhodnocen vliv intravenosní aplikace f-MLFG₅-14AK na výskyt metastáz a intenzitu metastazování. Výsledky jsou uvedeny na Obrázcích 4 a 5.

Z Obrázku 4 je patrné, že fMLF-G₅-14AK způsobuje potlačení výskytu metastáz. U skupiny F se nevyskytovaly žádné metastázy.



Obrázek 4: Vliv intravenosní aplikace fMLF-G₅-14AK na výskyt metastáz. Skupině F bylo ve dnech 0,2, 4, 6, 8, 10 intravenosně aplikováno 50 μ l 0,5 mM f-MLFG₅-14AK. Skupině K ve stejných dnech intravenosně PBS. U skupiny ovlivňované fMLF-G₅-14AK nebyly metastázy zaznamenány.

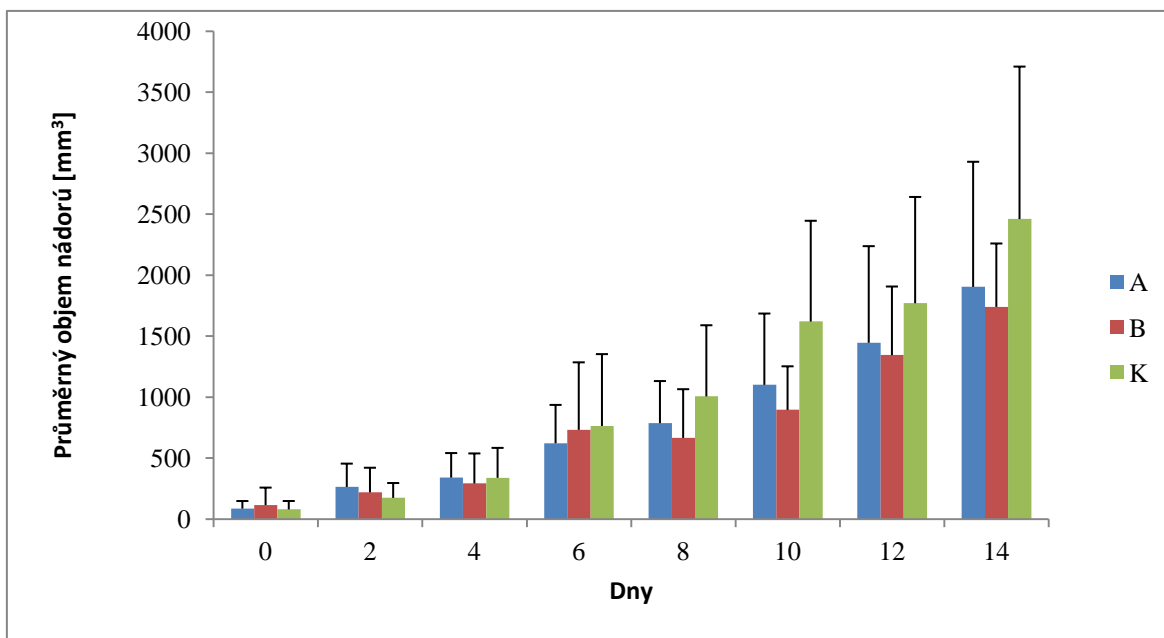
Na Obrázku 5 je znázorněna intenzita metastazování vyjádřená jako průměrný počet metastáz na jednu myš ve skupině.



Obrázek 5: Vliv intravenosní aplikace fMLF-G₅-14AK na intenzitu metastazování. Skupině F bylo ve dnech 0,2, 4, 6, 8, 10 intravenosně aplikováno 50 μ l 0,5 mM fMLF-G₅-14AK. Skupině K ve stejných dnech intravenosně PBS.

4.2 Intravenosní aplikace fMLF(GP)₄FNFR_LKAGAKIRFG

V tomto experimentu byl zkoumán vliv intravenosní aplikace fMLF-(GP)₄-14AK na redukci nádorové masy. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 6.



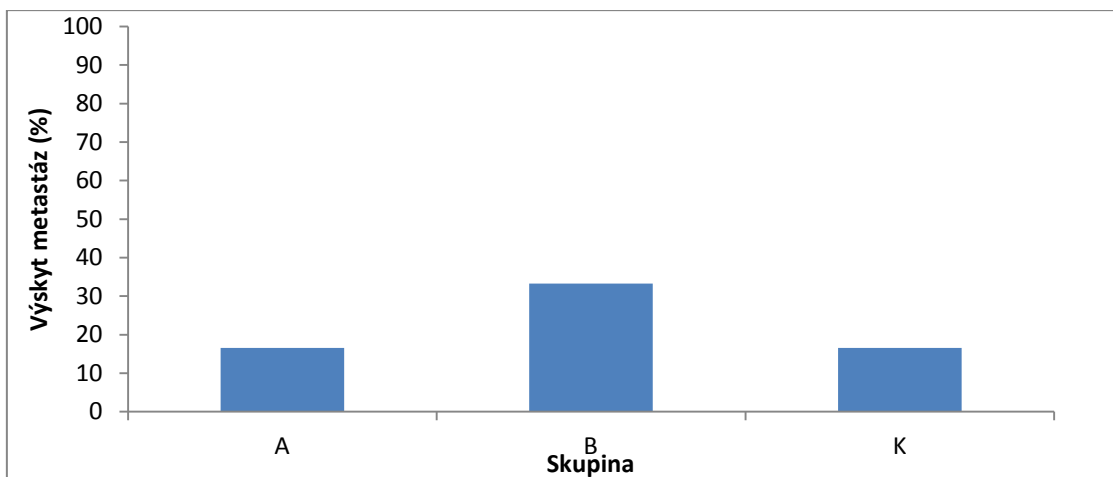
Obrázek 6: Vliv intravenosní aplikace fMLF-(GP)₄-14AK na velikost nádorů. Skupinám A a B bylo ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10 intravenosně aplikováno 50 μ l fMLF-(GP)₄-14AK o koncentraci 1 mM. Ve stejných dnech bylo kontrolní skupině K intravenosně aplikováno 50 μ l sterilního PBS. Skupině B bylo navíc ve dnech 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 perorálně podáno 3 mg beta-glukanu rozsuspendovaného v 50 μ l vody.

Ani v tomto pokusu se nepodařilo dosáhnout statistické významnosti ve snížení objemu nádorů u léčených skupin A a B v porovnání s kontrolní skupinou K.

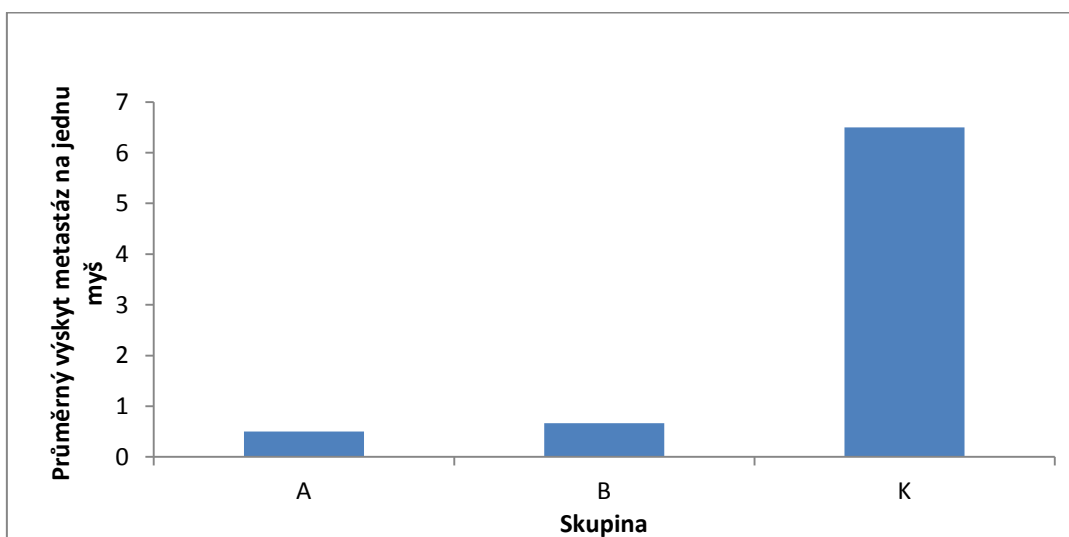
Kromě velikosti nádorů, tento experiment zkoumal i vliv intravenosní aplikace fMLF-(GP)₄-14AK na výskyt metastáz a intenzitu metastazování. Výsledky jsou uvedeny na Obrázcích 7 a 8.

Léčba samotným fMLF-(GP)₄-14AK (skupina A) neměla v porovnání s kontrolní skupinou vliv na výskyt metastáz. U skupiny B, kde byl navíc perorálně podáván beta-glukan, byl výskyt metastáz dokonce vyšší.

Léčba ovlivnila intenzitu metastazování, u kontrolní skupiny se vyskytl vyšší počet metastáz.



Obrázek 7: Vliv intravenosní aplikace fMLF-(GP)₄-14AK na výskyt metastáz. Skupinám A a B bylo ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10 intravenosně aplikováno 50 μ l fMLF-(GP)₄-14AK o koncentraci 1 mM. Ve stejných dnech bylo kontrolní skupině K intravenosně aplikováno 50 μ l sterilního PBS. Skupině B bylo navíc ve dnech 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 perorálně podáno 3 mg beta-glukanu rozsuspendovaného v 50 μ l vody.



Obrázek 8: Vliv intravenosní aplikace fMLF-(GP)₄-14AK na intenzitu metastazování. Skupinám A a B bylo ve dnech 0, 2, 4, 6, 8, 10 intravenosně aplikováno 50 μ l fMLF-(GP)₄-14AK o koncentraci 1 mM. Ve stejných dnech bylo kontrolní skupině K intravenosně aplikováno 50 μ l sterilního PBS. Skupině B bylo navíc ve dnech 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 perorálně podáno 3 mg beta-glukanu rozsuspendovaného v 50 μ l vody.

4.3 Cytotoxický test CD45+/PI

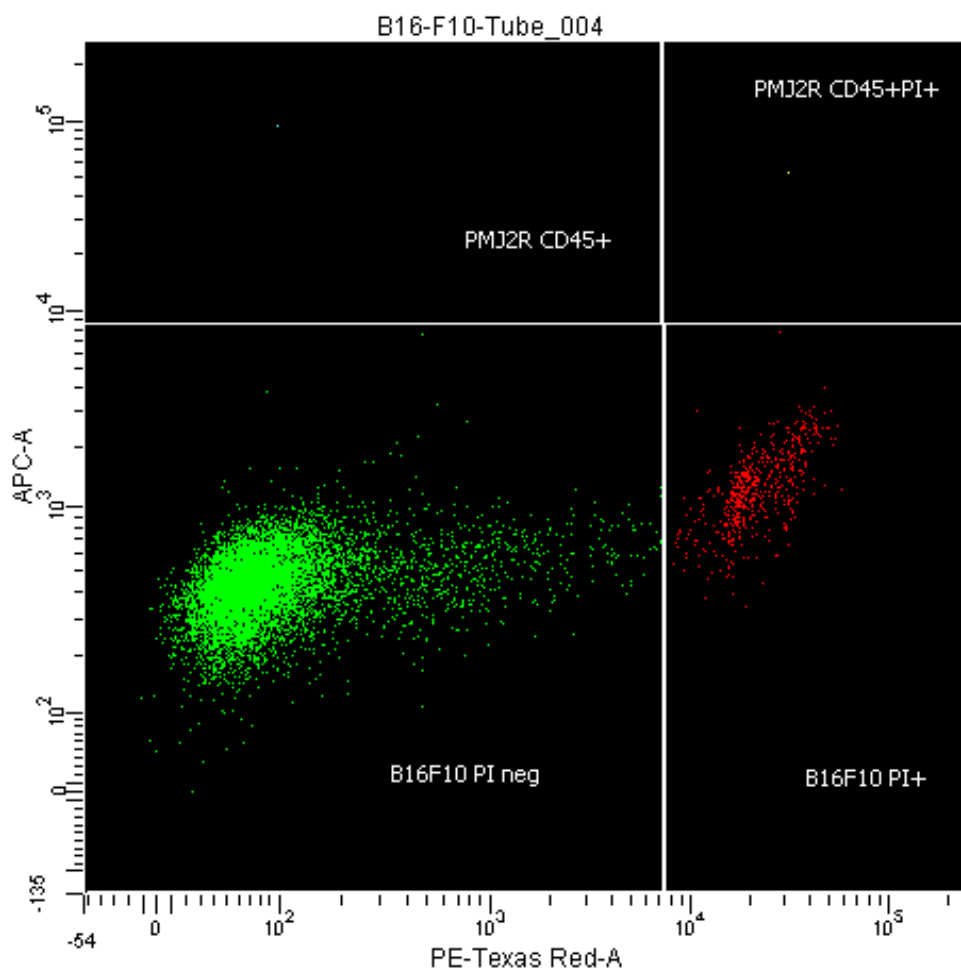
Byl studován vliv LPS aktivovaných i neaktivovaných makrofágů linie PMJ2R na melanomové buňky B16-F10, na které jsme se pokoušeli navázat f-MLF motiv pomocí 14AK vazebného motivu, interagujícího s fosfatidylserinem. Jednalo se tedy opět o látku fMLF-G₅-14AK, použitou v prvním experimentu. Tento vliv byl studován pomocí cytotoxického testu CD45+/PI prostřednictvím průtokového cytometru. Výsledkem nám byla dvoubarevná analýza. Efektorové buňky PMJ2R byly označeny protilátkou proti znaku CD45. Pomocí PI byly rozlišeny mrtvé a živé buňky. Díky těmto dvou znakům byly buňky rozděleny do čtyř skupin, které jsou zobrazené v Tabulce V.

Tabulka V: Rozdělení buněk pomocí PI a anti-CD45 APC.

anti-CD45	PI	Buňka	Barva na obrázku
+	+	mrtvá PMJ2R	žlutá
+	-	živá PMJ2R	modrá
-	+	mrtvá B16-F10	červená
-	-	živá B16-F10	zelená

Zásadní hodnotu představovaly živé nádorové buňky B16-F10, tedy PI negativní, anti-CD45 APC negativní, zeleně označená populace.

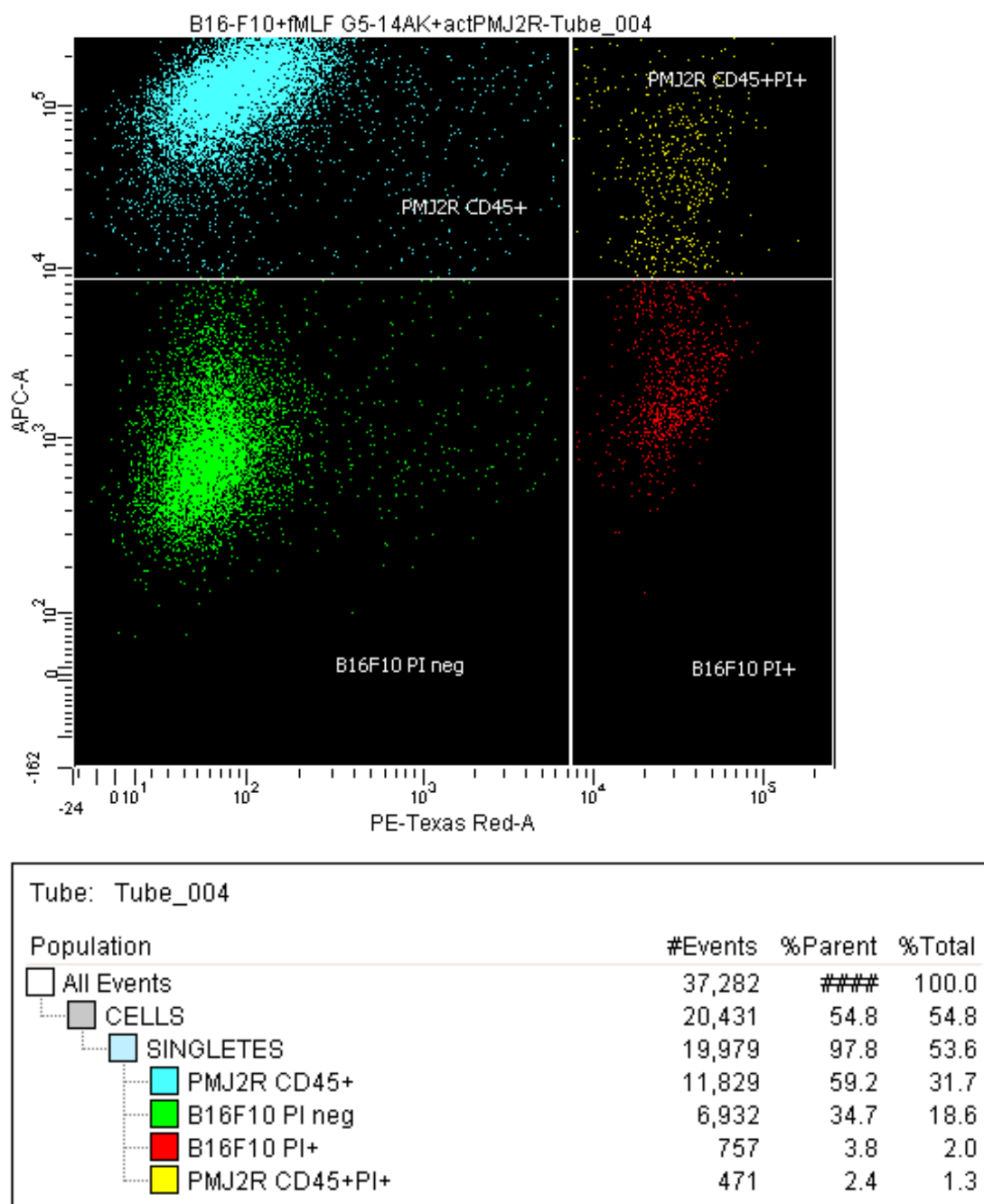
Na Obrázku 9 je jako příklad uveden výstup z FACS analýzy vzorku B16-F10.



Tube: Tube_004			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	13,062	###	100.0
CELLS	8,978	68.7	68.7
SINGLETES	8,802	98.0	67.4
PMJ2R CD45+	1	0.0	0.0
B16F10 PI neg	8,260	93.8	63.2
B16F10 PI+	540	6.1	4.1
PMJ2R CD45+PI+	1	0.0	0.0

Obrázek 9: Výstup z FACS analýzy B16-F10.

Na Obrázku 10 je uveden příklad z výstupu FASC analýzy vzorku B16-F10 + fMLF-G₅-14AK+ aktPMJ2R.



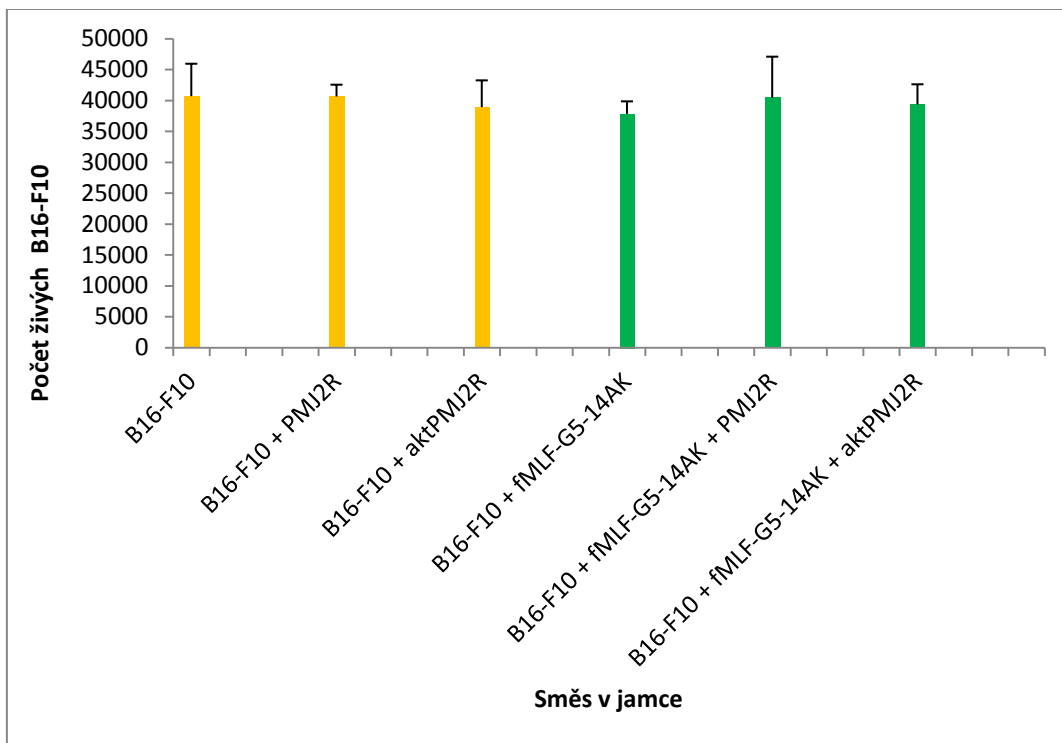
Obrázek 10: Výstup z FASC analýzy B16-F10 + fMLF-G₅-14AK + aktPMJ2R.

Naměřené hodnoty živých B16-F10 v 30 μ l vzorku byly přepočteny na hodnoty živých nádorových buněk v celkovém objemu jamky (150 μ l). U jednotlivých skupin byl z počtů nádorových buněk v 150 μ l vypočten průměr viz Tabulka VI.

Tabulka VI: Počet živých nádorových buněk v 150 μ l vzorku.

	Počet B16-F10 v 30 μ l	Počet B16-F10 v 150 μ l	Průměr	Sd
B16-F10	9030	45150	40686	5252
	8625	43125		
	8260	41300		
	6634	33170		
B16-F10 + PMJ2R	8487	42435	40640	1909
	7757	38785		
	7842	39210		
	8426	42130		
B16-F10 + aktPMJ2R	8437	42185	38911	4336
	8427	42135		
	7665	38325		
	6600	33000		
B16-F10 + fMLF-G5-14AK	7399	36995	37820	2032
	7761	38805		
	8011	40055		
	7085	35425		
B16-F10 + fMLF-G5-14AK + PMJ2R	8889	44445	40445	6634
	6428	32140		
	9389	46945		
	7650	38250		
B16-F10 + fMLF-G5-14AK + aktPMJ2R	7913	39565	39335	3277
	8404	42020		
	6932	34660		
	8219	41095		

Následující Obr 11 znázorňuje hodnoty z Tabulky VI: počet živých nádorových buněk v jednotlivých jamkách. Žluté hodnoty představují jamky bez fagocytárního ligandu, zeleně jsou znázorněny jamky s fagocytárním ligandem fMLF-G5-14AK.



Obrázek 11: Počty živých nádorových buněk v jamkách, v závislosti na přítomnosti makrofágů (PMJ2R), aktivovaných makrofágů (aktPMJ2R) a fagocytárním ligandu vázajícím se na povrch nádorových buněk fMLF-G5-14AK.

Z grafu vyplývá, že fagocytární ligand fMLF-G5-14AK není významně cytotoxický a nemá vliv na redukci nádorových buněk ani neaktivovanými makrofágy ani LPS aktivovanými makrofágy.

5 Diskuze

Cílem této práce bylo nalézt nádorově specifické kotvení fagocytárního motivu na povrch nádorových buněk pro účely imunoterapie. Nеспецифické kotvení ligandů fagocytárních receptorů bylo ověřeno na laminarinu (Auerová 2012), mananu (Bruzlová 2012, Maierová 2013) a fMLF (Caisová 2013, Vácová 2012). Mechanismy této imunoterapie byly uvedeny v práci Terezy Janotové a kolektivu (Janotová a kol. 2014).

V prvním pokusu jsme při použití intravenosní aplikace fMLF-G5-14AK nedosáhli statisticky významné redukce nádorů, což může být způsobeno omezeným souborem dat. Redukce však byla znatelná a můžeme pozorovat trend zpomalení nádorového růstu. Zajímavým bylo též potlačení metastázování do plic. Při intratumorální a intraperitoneální aplikaci fMLF-G5-14AK (Pačes 2013) bylo dosaženo opakované statisticky významné redukce nádorů pouze však v kombinaci s LPS respektive s beta-glukanem. Proto si myslíme, že samotný fMLF-G5-14AK nedokáže do místa nádoru nalákat dostatečný počet efektorových buněk. Zánětlivou reakci je třeba podpořit. Proto byla do druhého pokusu zařazena další skupina s β -glukanem, který je schopen podpořit imunitní systém a stimuluje zejména aktivitu makrofágů.

V druhém pokusu byl oproti pokusu prvnímu u léčebné látky nahrazen spacer G_5 za spacer $(GP)_4$. Tato záměna doporučená výrobcem se zdá být hlavní příčinou selhání druhého pokusu. Ukazuje se, že samotný spacer může ovlivnit (v našem případě negativně) prezentaci ligandu. Současná aplikace beta-glukanu měla sice pozitivní, nicméně statisticky nevýznamný vliv na účinnost terapie.

V rámci třetího pokusu *in vitro* studia působení makrofágů na nádorové buňky B16-F10, na jejichž povrch jsme se pokusili instalovat fMLF-G5-14AK, bylo zjištěno, že tento ligand nestimuluje makrofágy k redukci nádorových buněk (experiment byl třikrát opakován se srovnatelnými výsledky). Důvodů může být několik:

(1) Použitá buněčná linie B16-F10 může exprimovat fosfatidylserin (PS) v malé hustotě. Expresi PS, na který se měla vázat aminokyselinová sekvence FNFRLKAGAKIRFG (14AK) (Xiong a kol. 2011), je možné ověřit prostřednictvím Annexinu V pomocí průtokové cytometrie nebo fluorescenční mikroskopie. Tuto analýzu později provedla RNDr. Jalovecká: „Expresi fosfatidylserinu (měřená pomocí značeného Annexinu V na průtokovém cytometru) na buňkách B16-F10 v kultuře byla slabá.” (RNDr. Jalovecká, ústní sdělení). Následně by bylo možné zkusit expresi PS zvýšit peroxidem vodíku, hypoxií nebo kyselým prostředím (Ran a Thorpe 2002). Tyto podmínky totiž

výrazně indukují expresi PS na buněčném povrchu. Rozpor mezi působením terapie pomocí fMLF-G₅-14AK za podmínek *in vivo* a nulový efekt *in vitro* může být tedy dán rozdílnou expresí PS na povrchu melanomových buněk v nádoru a v kultuře.

(2) Sekvence 14AK se nedokáže dostatečně navázat na PS. Protože v prvním pokusu *in vivo* bylo dosaženo značné redukce nádorů, příčinou může být krátká inkubace s ligandem (30 min), či nevytvoření příznivých podmínek pro vazbu *in vitro*.

(3) Makrofágy nemusejí být hlavními efektorovými buňkami. Při dalším zkoumání se naše laboratoř zaměří na roli neutrofilů v boji proti nádorovým buňkám. Nejdříve bude nutné ověřit hypotézu, že neutrofilové migrují k cílové buňce označené fagocytárním ligandem. Neutrofil je mnohem menší než nádorová buňka, a tak by migrace neutrofilů, izolovaných z kostní dřeně myši, mohla být sledována pod optickým mikroskopem bez dalšího barvení. Popřípadě by mohl být pořízen záznam z mikroskopu digitálního. Posléze se nabízí zkoumání principu, jakým neutrofilové nádorové buňky zabíjí. Pozornost je třeba zaměřit na otázku oxidativního vzplanutí a na studium exocytózy primárních granul neutrofilů, což je možno měřit pomocí aktivity myeloperoxidázy (Hampton a kol. 1998).

Protilátky používané pro Targeted Drug Delivery jsou stabilní a vysoce specifické. Jejich nevýhodou je nutnost humanizace a velikost, kvůli které neprostupují tkáněmi (Thurber a kol. 2008a, b). Krátké peptidy mají oproti protilátkám řadu výhod. Lépe prostupují tkáněmi, jsou neimunogenní, snadno značitelné (Thundimadathil 2012). Jejich příprava je relativně levná. Nevýhodou je štěpení krátkých peptidů enzymy (peptidázami), které jsou v organismu všudypřítomné. Řešením tohoto problému by mohla být syntéza peptidů složených z D-aminokyselin, které nejsou rozpoznávány peptidázami. Pro návrh specificky se vázajících peptidů složených z D-aminokyselin se používá technika Mirror Image Phage Display (Funke a Willbold 2009).

Budoucí výzkum se, dle mého názoru, bude upínat na vývoj aptamerů. Aptamer je souhrnný název pro krátké peptidy nebo nukleové kyseliny vázající se na určité molekulové motivy, v našem případě specifické pro nádory. Tyto aptamery budou využívány pro specifickou vizualizaci a Targeted Drug Delivery.

6 Závěr

Intravenosní aplikace fMLFG₅FNFRLKAGAKIRFG způsobuje zřetelnou redukci nádorového růstu, která se blíží statistické významnosti ($p=0,067$).

Intravenosní aplikace fMLFG₅FNFRLKAGAKIRFG má velmi příznivý vliv na potlačení výskytu metastáz a intenzitu metastazování. U léčené skupiny se nevyskytly žádné metastázy.

Intravenosní aplikace fMLF(GP)₄FNFRLKAGAKIRFG nemá významný vliv na redukci nádorového růstu a neovlivňuje výskyt metastáz a intenzitu metastazování.

fMLFG₅FNFRLKAGAKIRFG nepůsobí za *in vitro* podmínek na melanomové buňky cytotoxicky, ale nevyvolává ani protinádorový atak makrofágů (PMJ2R buňky).

7 Seznam použité literatury

Adams JM, Capecchi MR. 1966. N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 55:147-155.

Algarra I, García-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. 2004. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 53:904-910.

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. 1990. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry* 265:4923-4928.

Auerová M. 2012. Terapie nádorových onemocnění založená na ukotvení laminarinu na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 42p.

Bae Y-S, Song JY, Kim Y, He R, Ye RD, Kwak J-Y, Suh P-G, Ryu SH. 2003. Differential activation of formyl peptide receptor signaling by peptide ligands. *Molecular Pharmacology* 64:841-847.

Baer E, Maurukas J. 1955. Phosphatidyl serine. *Journal of Biological Chemistry* 212:25-38.

Betten Å, Bylund J, Cristophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, Dahlgren C. 2001. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation* 108:1221-1228.

Blanks M, Stehle J, Du W, Adams J, Willingham M, Allen G, Hu J, Lovato J, Molnar I, Cui Z. 2011. Novel innate cancer killing activity in humans. *Cancer Cell International* 11:26.

Bonilla FA, Oettgen HC. 2010. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125:S33-40.

Bruzlová P. 2012. Ověření možnosti terapie nádorových onemocnění pomocí instalace mananu na povrch nádorových buněk. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 38p.

Caisová V. 2013. Použití agonistů FPR receptorů pro terapii nádorových onemocnění. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 74p.

Concha NO, Head JF, Kaetzel MA, Dedman JR, Seaton BA. 1992. Annexin V forms calcium-dependent trimeric units on phospholipid vesicles. *FEBS Lett* 314:159-162.

Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W, DeLong CJ. 2003. Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:6682-6687.

De Saint-Hubert M, Mottaghy FM, Vunckx K, Nuyts J, Fonge H, Prinsen K, Stroobants S, Mortelmans L, Deckers N, Hofstra L, Reutelingsperger CPM, Verbruggen A, Ratta D. 2010. Site-specific labeling of 'second generation' annexin V with $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ for improved imaging of apoptosis *in vivo*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18:1356-1363.

Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G. 2003. The Art of War: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 60:2604-2621.

Deng X, Ueda H, Su SB, Gong W, Dunlop NM, Gao J-L, Murphy PM, Wang JM. 1999. A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. *Blood* 94:1165-1173.

Deutscher SL, Figueroa SD, Kumar SR. 2009. ^{111}In -labeled KCCYSL peptide as an imaging probe for ErbB-2-expressing ovarian carcinomas. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 52:583-590.

Durstin M, Gao JL, Tiffany HL, McDermott D, Murphy PM. 1994. Differential expression of members of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201:174-179.

Elfeil W, Abouelmaatti RR, Liu S, Wang Y. 2013. Pattern recognition receptors *Global Animal Science Journal* 1:1118-1127.

Ferrone S, Marincola FM. 1995. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16:487-494.
Fidler IJ. 1975. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. *Cancer Research* 35:218-224.

Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN. 1994. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 180:253-260.

Funke SA, Willbold D. 2009. Mirror image phage display-a method to generate d-peptideligands for use in diagnostic or therapeutical applications. *Molecular BioSystems* 5:783-786.

Gao JL, Chen H, Filie JD, Kozak CA, Murphy PM. 1998. Differential expansion of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics* 51:270-276.

Globocan, 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (18.2. 2014)

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92:3007-3017.

He H-Q, Liao D, Wang Z-G, Wang Z-L, Zhou H-C, Wang M-W, Ye RD. 2013. Functional characterization of three mouse formyl peptide receptors. *Molecular Pharmacology* 83:389-398.

Huber R, Romisch J, Paques EP. 1990. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *Embo j* 9:3867-3874.

Janotová T, Jalovecká M, Auerová M, Švecová I, Bruzlová P, Maierová V, Kumžáková Z, Čunátová Š, Vlčková Z, Caisová V, Rozsypalová P, Lukáčová K, Vácová N, Ženka J. 2014. The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PLoS ONE* 9:e85222.

Karasseva N, Glinsky V, Chen N, Komatireddy R, Quinn T. 2002. Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected from a bacteriophage display library. *Journal of Protein Chemistry* 21:287-296.

Krejsek J, Kopecký O. 2004. *Klinická imunologie*. Nukleus, HK. 941p.

Kumar SR, Quinn TP, Deutscher SL. 2007. Evaluation of an ¹¹¹In-radiolabeled peptide as a targeting and imaging agent for ErbB-2 receptor-expressing breast carcinomas. *Clinical Cancer Research* 13:6070-6079.

Laumonier C, Segers J, Laurent S, Michel A, Coppée F, Belayew A, Elst LV, Muller RN. 2006. A new peptidic vector for molecular imaging of apoptosis, identified by phage display technology. *Journal of Biomolecular Screening* 11:537-545.

Le Y, Murphy PM, Wang JM. 2002. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in Immunology* 23:541-548.

Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, Lee C. 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4⁺CD25⁻ T cells into CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- β . *The Journal of Immunology* 178:2883-2892.

Mackey D, McFall AJ. 2006. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology* 61:1365-1371.

Maierová V. 2013. Protinádorová imunoterapie založená na instalaci manózy na povrch nádorových buněk. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 71p.

Marvin DA. 1998. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current Opinion in Structural Biology* 8:150-158.

Maurer-Fogy I, Reutelingsperger CPM, Pieters J, Bodo G, Stratowa C, Hauptmann R. 1988. Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca²⁺-dependent phospholipid-binding protein. *European Journal of Biochemistry* 174:585-592.

McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. 1997. Activation of the NF- κ B pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 89:3421-3433.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Structural Biology* 9:4-9.

O'Connell J. 2002. Fas ligand and the fate of antitumour cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 105:263-266.

Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. 2001. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *Journal of Structural Biology* 133:55-63.

Overwijk WW, Restifo NP. 2001. B16 as a mouse model for human melanoma. *Journal of Immunological Methods Chapter 20:Unit 20.21*.

Pačes J. 2013. Nádorová imunoterapie založená na použití ligandů fagocytárních receptorů vzájemných se specificky na nádory. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 46p.

Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. 2010. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances* 28:849-858.

Peng BY, Guo CM, Guan HW, Liu SQ, Sun MZ. 2014. Annexin A5 as a potential marker in tumors. *Clinica Chimica Acta* 427:42-48.

Piccirillo CA, Shevach EM. 2001. Cutting edge: Control of CD8(+) T cell activation by CD4(+)CD25(+) immunoregulatory cells. *Journal of Immunology* 167:1137-1140.

Ran S, Thorpe PE. 2002. Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 54:1479-1484.

Rasched I, Oberer E. 1986. FF Coliphages-structural and functional relationship *Microbiological Reviews* 50:401-427.

Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker HC. 1985. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *European Journal of Biochemistry* 151:625-629.

Riedl S, Rinner B, Asslaber M, Schaidler H, Walzer S, Novak A, Lohner K, Zwegytick D. 2011. In search of a novel target — Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808:2638-2645.

- Riedlinger G, Adams J, Stehle J, Blanks M, Sanders A, Hicks A, Willingham M, Cui Z. 2010. The spectrum of resistance in SR/CR mice: the critical role of chemoattraction in the cancer/leukocyte interaction. *BMC Cancer* 10:179.
- Richie JP. 2006. Second cancers among 40,576 testicular cancer patients: focus on long-term survivors: Travis LB, Fossa SD, Schonfeld SJ, McMaster ML, Lynch CF, Storm H, Hall P, Holowaty E, Andersen A, Pukkala E, Andersson M, Kaijser M, Gospodarowicz M, Joensuu T, Cohen RJ, Boice JD Jr, Dores GM, Gilbert ES, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 24:171-172.
- Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. 2003. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Seminars in Cancer Biology* 13:325-336.
- Rubartelli A, Lotze MT. 2007. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology* 28:429-436.
- Seigneuret M, Devaux PF. 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:3751-3755.
- Shadidi M, Sioud M. 2003. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. *Drug Resistance Updates* 6:363-371.
- Schellenberger EA, Josephson L, Ntziachristos V. 2003. Optical imaging of apoptosis. *Medical Laser Application* 18:191-197.
- Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM. 1975. N-formylmethionyl peptides as chemoattractant for leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72:1059-1062.
- Schutters K, Reutelingsperger C. 2010. Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases. *Apoptosis* 15:1072-1082.
- Sioud M, Mobergslien A. 2012. Selective killing of cancer cells by peptide-targeted delivery of an anti-microbial peptide. *Biochemical Pharmacology* 84:1123-1132.
- Smith GP, Petrenko VA. 1997. Phage Display. *Chemical Reviews* 97:391-410.
- Song S, Xiong C, Lu W, Ku G, Huang G, Li C. 2013. Apoptosis imaging probe predicts early chemotherapy response in preclinical models: a comparative study with 18F-FDG PET. *Journal of Nuclear Medicine* 54:104-110.
- Southgate EL, He RL, Gao J-L, Murphy PM, Nanamori M, Ye RD. 2008. Identification of formyl peptides from *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* as potent chemoattractants for mouse neutrophils. *The Journal of Immunology* 181:1429-1437.
- Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O'Doherty CJ, Hunter JA, Clark J, Hole DJ. 1986. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *British Medical Journal* 292:1555-1559.

Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. 1989. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *Journal of Biological Chemistry* 264:7944-7949.

Thapa N, Kim S, So I-S, Lee B-H, Kwon I-C, Choi K, Kim I-S. 2008. Discovery of a phosphatidylserine-recognizing peptide and its utility in molecular imaging of tumour apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12:1649-1660.

Thundimadathil J. 2012. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *Journal of Amino Acids* 2012:967347.

Thurber GM, Schmidt MM, Wittrup KD. 2008a. Antibody tumor penetration: transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1421-1434.
---. 2008b. Factors determining antibody distribution in tumors. *Trends in Pharmacological Sciences* 29:57-61.

Tiffany HL, Gao JL, Roffe E, Sechler JM, Murphy PM. 2011. Characterization of Fpr-rs8, an atypical member of the mouse formyl peptide receptor gene family. *Journal of Innate Immunity* 3:519-529.

Turvey SE, Broide DH. 2010. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125:S24-S32.

Überall I, Kolář Z, Trojanec R, Berkovcová J, Hajdúch M. 2008. The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 84:79-89.

Vácová N. 2012. Studium možnosti použití formylmethioninových peptidů v protinádorové terapii. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 54p.

Vance JE, Steenbergen R. 2005. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research* 44:207-234.

Verkleij AJ, Zwaal RFA, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LLM. 1973. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 323:178-193.

Wang JM, Su SB, Gong W, Gao JL, Shen W, Murphy PW, Oppenheim JJ. 1999. A seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid a for human phagocytic cells. *Faseb Journal* 13:A656-A656.

Xiong C, Brewer K, Song S, Zhang R, Lu W, Wen X, Li C. 2011. Peptide-based imaging agents targeting phosphatidylserine for the detection of apoptosis. *Journal of Medicinal Chemistry* 54:1825-1835.

Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ. 1997. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase: a protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 272:18240-18244.