

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Michaela Hovorková

**Multivalentní sacharidové ligandy galektinů**

**Multivalent carbohydrate ligands of galectins**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.

Konzultant: RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Praha 2018

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů prof. Ing. Vladimíra Křena, DrSc. a RNDr. Pavly Bojarové, Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, dne

Podpis:

## **Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu práce prof. Ing. Vladimírovi Křenovi, DrSc. a zejména pak konzultantce RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D., za cenné rady při sepisování této práce, za trpělivost, ochotu a hlavně čas, který mi věnovala během celé naší spolupráce.

## Abstrakt

Galektiny jsou proteiny patřící do skupiny lektinů, které jsou schopné vázat sacharidové jednotky a dokážou specificky rozeznat glykany vystavené na povrchu buněk. Galektiny se *in vivo* účastní např. kancerogeneze, angiogeneze či fibrózy. Jejich výskyt signifikantně stoupá v souvislosti s řadou patogenních procesů, a proto je lze využít jako markery u některých typů rakovin nebo kardiopatologií a též pro cílenou vazbu terapeutik a/ nebo zobrazovacích činidel v diagnostice a terapii. Galektin-3 má specifickou strukturu označovanou jako chimerická a je schopný tvořit multivalentní oligomery.

Přirozenými ligandy galektinů jsou glykany obsahující terminální  $\beta$ -galaktosidy, zvláště *N*-acetylglukosamin, avšak vazba monovalentních glykanů je velmi slabá. Glykokonjugáty s vysokou afinitou ke galektinovým receptorům jsou optimálně multivalentní, biokompatibilní a stabilní *in vivo*. Tato kritéria splňují sacharidové ligandy konjugované na rozpustné a strukturně flexibilní *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidové (HPMA) kopolymery.

V rámci této práce byly pomocí enzymové syntézy připraveny dva druhy funkcionalizovaných disacharidů, založené na *N*-acetylglukosaminu ( $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$ ) a jeho strukturním analogu *N,N'*-diacetylglukosaminu ( $\text{GalNAc}\beta 4\text{GlcNAc}$ ). Pro syntézu byl použit komerční enzym  $\beta$ -galaktosidasa z *Bacillus circulans* a mutantní  $\beta$ -*N*-acetylglukosaminidasa Tyr470Phe rekombinantně exprimovaná v *Pichia pastoris*. Tyto disacharidy byly ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie připojeny na HPMA kopolymery. Nakonec byl stanoven inhibiční potenciál připravených multivalentních ligandů ke galektinu-3 *in vitro*. Galektin-3 byl rekombinantně exprimován v *E. coli*.

Připravený glykopolymer prezentující *N*-acetylglukosamin se jevil jako účinnější inhibitor než glykopolymer o stejném obsahu *N,N'*-diacetylglukosaminu.

### Klíčová slova:

Galektiny,  $\beta$ -*N*-acetylglukosaminidasy, multivalentní ligandy, HPMA kopolymery, rekombinantní exprese, enzymová syntéza, inhibiční potenciál

## Abstract

Galectins are proteins, which belong to a group of lectins that are able to bind to saccharide units and they specifically recognize glycans exposed to the surface of the cells. Galectins participate *in vivo*, for example, in carcinogenesis, angiogenesis or fibrosis. Their occurrence increases significantly in connection with a number of pathogenic processes, therefore they can be used as markers for some types of cancer or cardiopathology and also for the targeted binding of therapeutics and/ or imaging agents in diagnosis and therapy. Galectin-3 has a specific structure known as chimeric and it is capable of forming multivalent oligomers.

The natural ligands of galectins are glycans containing terminal  $\beta$ -galactosides, especially *N*-acetylglucosamine, but the binding of monovalent glycans is very weak. Glycoconjugates with high affinity to galectin receptors are optimally multivalent, biocompatible and stable *in vivo*. These criteria are accomplished by carbohydrate ligands conjugated to soluble and structurally flexible *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymers.

In this work two types of functionalized disaccharides based on *N*-acetylglucosamine (Gal $\beta$ 4GlcNAc) and its structural analogue of *N,N'*-diacetylglucosamine (GalNAc $\beta$ 4GlcNAc) were prepared by enzymatic synthesis. For the synthesis were used commercial enzyme  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* and the mutant  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase Tyr470Phe recombinant expressed in *Pichia pastoris*. These disaccharides, in cooperation with the Institute of Macromolecular Chemistry, were attached to HPMA copolymers. Finally, the inhibitory potential of the prepared multivalent ligands to galectin-3 was determined *in vitro*. Galectin-3 was recombinantly expressed in *E. coli*.

Prepared glycopolymer presenting *N*-acetylglucosamine appeared to be a more efficient inhibitor than glycopolymer having the same *N,N'*-diacetylglucosamine content.

(In Czech)

## Keywords:

Galectins,  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidases, multivalent ligands, HPMA copolymers, recombinant expression, enzymatic synthesis, inhibitory potential

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ad5	adenovirus sérotypu 5
<i>AoHex</i>	hexosaminidasa z <i>Aspergillus oryzae</i>
ASF	Asialofetuin
CRD	doména rozpoznávající sacharidy ( <i>Carbohydrates recognition domain</i> )
DMF	Dimethylformamid
ECM	extracelulární matrix
EPR	zvýšená permeabilita a retence ( <i>Enhanced permeability and retention</i> )
GlcNAc- <i>tBoc</i>	( <i>tert</i> -butoxykarbonylamido)ethylthioureidyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosid
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
LacdiNAc	<i>N,N'</i> -diacetylaktosamin
LacNAc	<i>N</i> -acetylaktosamin
LB	medium LB (Luria-Bertani)
MCP	modifikovaný citrusový pektin ( <i>Modified citrus pectin</i> )
MUC-1	mucin 1 (transmembránový protein)
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
<i>pNPGalNAc</i>	<i>p</i> -nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galaktopyranosid
<i>pNPGlcNAc</i>	<i>p</i> -nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosid
<i>PoHex</i>	hexosaminidasa z <i>Penicillium oxalicium</i>
QDs	kvantové body ( <i>Quantum dots</i> )
TB	medium TB (Terrific Broth)
TCR	receptory T-buněk ( <i>T-cell receptors</i> )
TDG	Thiodigalaktosid
<i>TfHex</i>	hexosaminidasa z <i>Talaromyces flavus</i>
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
YNB	medium YNB ( <i>yeast nitrogen base</i> )
YPD	medium YPD ( <i>yeast extract peptone dextrose</i> )

## OBSAH

1. ÚVOD.....	9
1.1 Galektiny .....	9
1.1.1 Charakteristika galektinů.....	9
1.1.2 Doména rozpoznávající sacharidy (CRD) a vazba ligandů.....	10
1.1.3 Funkce galektinů v lidském organismu.....	11
1.1.4 Galektin-3 v alergiích a autoimunitních onemocněních.....	12
1.1.5 Galektin-3 v nádorových onemocněních.....	13
1.1.6 Galektin-3 v patogenní fibrotizaci tkání <i>in vivo</i> .....	15
1.2 Biomateriály .....	17
1.2.1 Biomateriály se sacharidovými ligandy .....	17
1.2.2 HPMA kopolymery a jejich využití .....	18
1.2.3 Interakce glykokonjugátů s galektinem-3 .....	20
1.3 Enzymy.....	22
1.3.1 Enzymy používané na syntézu sacharidů.....	22
1.3.2 $\beta$ -N-Acetylhexosaminidasy a jejich cílená mutagenese.....	23
2. CÍL PRÁCE .....	26
3. MATERIÁL A METODY.....	27
3.1 Použité přístroje a materiál.....	27
3.1.1 Přístrojové vybavení.....	27
3.1.2 Použitý materiál.....	28
3.2 Produkce galektinu-3.....	30
3.2.1 Transformace do <i>E. coli</i> a rekombinantní exprese galektinu-3.....	30
3.2.2 Zpracování narostlých bakterií.....	31
3.2.3 Purifikace galektinu-3 afinitní chromatografií.....	31
3.2.4 Čistota a koncentrace galektinu-3 .....	31
3.3 Produkce rekombinantních mutantních $\beta$ -N-acetylhexosaminidas.....	32
3.3.1 Exprese enzymu v buňkách <i>Pichia pastoris</i> .....	32
3.3.2 Zpracování narostlých bakterií a purifikace.....	32
3.4 Optimalizace enzymové syntézy disacharidů .....	33
3.4.1 Stanovení aktivity enzymů .....	33
3.4.2 Analytické transglykosylační reakce.....	34
3.5 Enzymová syntéza.....	34
3.5.1 Preparativní enzymové reakce.....	34
3.5.2 Zpracování reakční směsi a izolace produktů .....	36
3.6 Konjugace sacharidového ligandu na HPMA kopolymer.....	36

3.7	Imunochemické stanovení afinity ligandů ke galektinu 3.....	37
4.	VÝSLEDKY.....	39
4.1	Produkce a purifikace galektinu-3.....	39
4.2	Produkce rekombinantních mutantů hexosaminidas.....	41
4.3	Optimalizace enzymové syntézy disacharidů .....	42
4.3.1	Stanovení enzymové aktivity .....	42
4.3.2	Analytické transglykosylační reakce .....	45
4.4	Syntéza a purifikace disacharidů.....	46
4.5	Odstranění chránicí skupiny z připravených sacharidů.....	48
4.6	Vazebná afinita připravených ligandů ke galektinu-3.....	48
5.	DISKUZE .....	51
6.	ZÁVĚR.....	53
7.	LITERATURA .....	54

# 1. ÚVOD

## 1.1 Galektiny

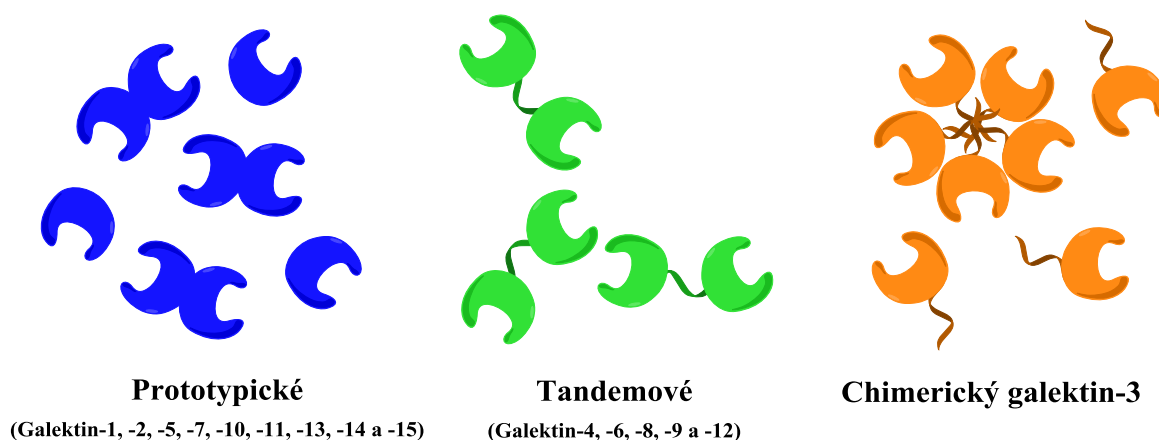
### 1.1.1 Charakteristika galektinů

Galektiny patří mezi velkou skupinu proteinů lektinů, které jsou schopné specificky vázat sacharidové jednotky a dokážou rozeznat glykokonjugáty, které jsou ve velkém množství exprimovány ve zvířecích tkáních [1]. Při vazbě sacharidu nemění jeho strukturu, čímž se liší od enzymů. Existují i rostlinné lektiny, které se podílí především na klíčení a růstu rostliny. Rostlinné lektiny rozpoznávají i nesacharidové ligandy, jako jsou adeniny, auxiny, cytokininy a porfyriny. Je pravděpodobné, že tyto interakce jsou fyziologicky relevantní, jelikož některé z těchto molekul plní funkci fytohormonů [2].

Galektiny jsou proteiny vázající terminální  $\beta$ -galaktosidy (odtud název galektiny - galaktosa). Jsou charakteristické evolučně a strukturně konzervovanou doménou rozpoznávající sacharidy (CRD – *carbohydrate recognition domain*) [3]. Běžným přirozeným substrátem je např. terminální *N*-acetyllaktosamin ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc), který je součástí sacharidových řetězců glykoproteinů. Galektiny jsou někdy nazývány lektiny S-typu, jelikož ke stabilitě a vazbě sacharidových ligandů potřebují disulfidické můstky. Galektiny mohou být lokalizovány v cytosolu, jádře, v extracelulární matrix nebo jsou sekretovány do extracelulárního prostoru. I když mnoho galektinů je sekretováno, nemají typickou signální dráhu nutnou ke klasické sekreci. Mechanismus a důvod této neobvyklé sekreční signalizační dráhy není znám [1].

Galektiny tvoří rodinu asi 15 proteinů. Můžeme najít tři strukturní formy galektinů – prototypické, tandemové nebo chimerické. Prototypické galektiny (někdy také dimerní) jsou homodimery skládající se ze dvou identických kovalentně spojených podjednotek. Do této skupiny patří galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 a -15. Tandemové galektiny obsahují alespoň dvě odlišné CRD v jednom polypeptidu, jsou tedy považovány jako divalentní. CRD je připojena přes malou peptidovou doménu. Do této skupiny řadíme galektin-4, -6, -8, -9 a -12 [4]. Jediný galektin-3 má specifickou strukturu označovanou jako chimerická. Struktura galektinu-3 se skládá ze tří motivů – krátká *N*-terminální doména zahrnující serinovou fosforylaci; opakující se prolin bohatá kolagenu podobná sekvenci (Pro-Gly-Ala-Tyr) a globulární *C*-terminální doména zahrnující CRD

[3]. Galektin-3 existuje v roztoku jako monomer, ale za určitých podmínek tvoří oligomery. Strukturální typy jsou znázorněny na obr. 1.

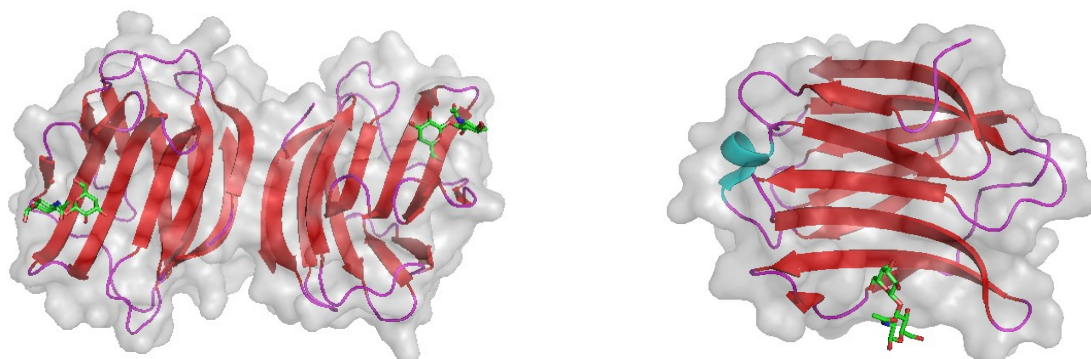


**Obr. 1. Strukturální typy galektinů** (vytvořeno v programu ChemDraw Prime). Zleva: prototypické galektiny s dvěma stejnými podjednotkami (homodimery), tandemové galektiny s dvěma různými podjednotkami a chimerický galektin-3 schopný tvořit oligomery (monomery asociují přes své N-terminální domény).

### 1.1.2 Doména rozpoznávající sacharidy (CRD) a vazba ligandů

Strukturálním motivem domény rozpoznávající sacharidy jsou převážně  $\beta$ -listy složené z přibližně 135 aminokyselin. Vazba sacharidů je zprostředkována interakcí s aminokyselinami vazebného místa lektinu prostřednictvím vodíkových vazeb nebo Van der Waalsových interakcí. Důležitá sekvence pro tuto vazbu je His-Asn-Arg; bylo prokázáno, že tyto tři aminokyseliny se výrazně podílejí na tvorbě vodíkových vazeb s galaktosovými zbytky [5]. Dva  $\beta$ -listy jsou mírně ohnuté, přičemž 6 řetězců tvoří konkávní stranu a 5 řetězců tvoří konvexní stranu. Konkávní strana vytváří žlábek, do kterého se může vázat sacharidový ligand, a který je dostatečně dlouhý i pro vazbu lineárních tetrasacharidů [7]. Vazba monosacharidových zbytků je velmi slabá, vazba disacharidových jednotek má výrazně vyšší afinitu. Obecně se dá říct, že čím delší disacharid, tím silnější interakce. Např. galektin-3 se váže na poly-laktosaminový řetězec s vyšší afinitou než k monomeru *N*-acetyl-laktosaminu (struktura galektinu-3 a galektinu-1 je zobrazena na obr. 2, str. 11). Vyšší afinita je dána vznikem většího množství van der Waalsových interakcí mezi sacharidem a proteinem. Síla vazby ligandů je ovlivněna různými faktory, jako je multivalence ligandu i galektinu, délka sacharidového zbytku a

způsob jakým CRD rozpoznává daný ligand. Vzhledem k povaze vazebného místa mohou galektiny vázat sacharidy buď pouze na konci (terminální), nebo i uvnitř glykanu [7].



**Obr. 2. Struktura dimeru galektinu-1 (vlevo) a strukturu galektinu-3 (vpravo), oba s navázaným *N*-acetylaktosaminem.** Obrázek byl vytvořen v programu PyMol za použití krystalové struktury 4XBL pro galektin-1 a 4XBN pro galektin-3 z PDB databáze. Krystalová struktura dimeru lidského galektinu-1 s N-koncovou CRD v komplexu s dimerem *N*-acetylaktosaminu. Z obrázku jsou patrné dvě různé CRD (vlevo). Krystalová struktura lidského galektinu-3 s N-terminální CRD v komplexu s *N*-acetylaktosaminem (vpravo). Červeně  $\beta$ -list, modře šroubovice, fialově ohyb, zeleně tyčinkový model *N*-acetylaktosaminu.

### 1.1.3 Funkce galektinů v lidském organismu

Díky své rozmanité struktuře a specifické vazbě glykanů plní galektiny širokou škálu funkcí. Podle místa lokalizace se jejich funkce dělí na extracelulární a intracelulární.

Jedna z nejdůležitějších funkcí extracelulárních galektinů je buněčná adheze. Díky schopnosti tvořit multivalentní komplexy mohou galektiny vázat různé typy glykanů a tvořit tak adhezivní síť mezi buňkami. Bylo prokázáno, že galektin-1 může aktivovat nebo inhibovat buněčnou adhezi. V kosterním svalu se váže na laminin, inhibuje tak interakci buňka-matrix, a může tedy hrát roli v růstu svalové hmoty [1]. Dále se na buněčné adhezi podílí galektin-3, který při vysoké koncentraci agreguje do velkých heterogenních komplexů, napomáhá buněčné adhezi vazbou různých ligandů a tvoří adhezivní síť [5]. Pokud je koncentrace galektinu-3 nízká, vyskytuje se ve formě monomeru a inhibuje adhezi, váže se na integriny a blokuje vazbu k ostatním buňkám nebo k extracelulární matrix. Galektin-8 je specifický pro glykosidickou vazbu k integrinům a aktivuje integrin-specifickou signální kaskádu [8].

Další důležitou funkci plní galektiny při regulaci apoptózy, kterou ovlivňují buď extracelulárně, nebo intracelulárně. Extracelulárně transportují glykany na povrch buňky a vyšlou signály, které přímo způsobí smrt buňky, nebo aktivují signalizační dráhu, která spouští apoptózu. Intracelulární galektiny regulují proteiny, které řídí osud buňky. Galektiny ovlivňují zejména pozitivní a negativní selekci T-buněk v thymu [9]. Tento proces zabraňuje cirkulaci T-buněk, které rozpoznávají vlastní antigeny. Galektin-1 a galektin-9 jsou sekretovány epitelovými buňkami v thymu a zprostředkovávají apoptózu T-buněk, která je nutná také k usmrcení infikovaných T-buněk po imunitní odpovědi. Exprese galektinu-7 je vyvolána tumorovým supresorem p53 a může mít hlavní roli v regulaci apoptózy keratocytů po poškození DNA například UV zářením [10]. Jediný galektin-3 má i antiapoptické účinky, když asociuje s antiapoptickými proteiny Bcl-2, a zvyšuje tak jejich vazbu k cílové buňce, která získá schopnost vyhýbat se apoptóze a spolu s dalšími faktory se může nekontrolovatelně dělit. Na druhé straně galektin-3 může být také pro-apoptický a způsobuje smrt T-buněk a neutrofilů [11].

Mezi další intracelulární funkce galektinů patří regulace pre-mRNA sestřihu, na kterém se galektin-1 a galektin-3 podílejí tak, že asociují s jaderným ribonukleovým proteinovým komplexem zahrnující spliceosome [12]. Studie ukázaly, že funkce pre-mRNA sestřihu galektinů může být nezávislá na jejich afinitě k sacharidovým ligandům. Asociaci se spliceozomem se tedy nezabrání ani po disociaci sacharidového ligandu z CRD [13].

#### **1.1.4 Galektin-3 v alergiích a autoimunitních onemocněních**

Galektin-3 je schopný negativně regulovat aktivaci receptorů T-buněk (TCR). Přenos TCR a dalších glykoproteinů na povrch membrány T-buněk zabrání tvorbě shluků a to potlačí aktivaci receptorů. Při experimentu s transgenními myšmi s nedostatkem *N*-acetylglukosamintransferasy V, která je nutná k syntéze polylaktosaminových řetězců jako ligandů galektinu-3, stoupla náchylnost myši k autoimunitním onemocněním [7]. Intracelulární galektin-3 působí jako chemoatraktant na imunitní buňky a aktivuje sekreci zánětlivých cytokinů.

Galektin-3 je exprimován mnoha tkáněmi, mezi které patří i plíce, všechny typy epitelů a zánětlivé buňky (žírné buňky, neutrofilů, monocytů, eosinofilů a T-buňky). Studie na myších s deficitem galektinu-3 poskytly silný důkaz prozánětlivé role galektinu-3 v různých akutních modelech zánětu, zahrnujících alergické potíže jako astma a atopický

ekzém. Myši s deficitem galektinu-3 vystavené alergenu vykazovaly signifikantní pokles eosinofilů přijímaných z dýchacích cest a celkovou redukcí zánětů dýchacích cest. Bylo prokázáno, že lidské zánětlivé endotelové buňky ve vyšší míře exprimují galektin-3 spolu se specifickými protilátkami inhibující transport eosinofilů a buněčnou adhezi. Nyní zatím nejsou v klinické praxi žádné terapeutické inhibitory endogenního galektinu-3, které by byly komerčně dostupné. Avšak selektivní inhibitory galektinu-3 účinné pro zmírnění projevů plicní fibrózy byly vyvinuty a jsou nyní v preklinické fázi testování [14].

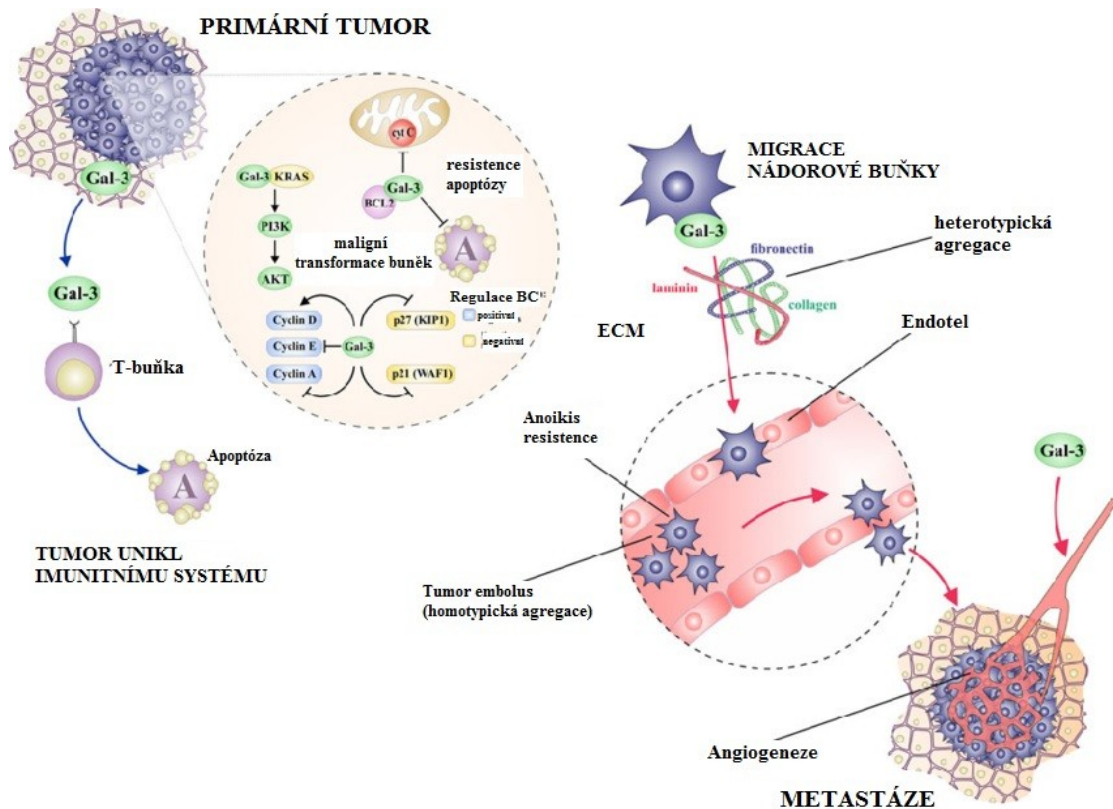
Dále bylo zjištěno, že se galektin-3 účastní řady autoimunitních onemocnění. Mezi tyto onemocnění patří systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida, systémová skleróza, polymyozitida (zánět svalů) a dermatomyozitida, atopická dermatitida, roztroušená skleróza, psoriáza a další [15].

### **1.1.5 Galektin-3 v nádorových onemocněních**

Co se týče nádorových onemocnění, je galektin-3 ze všech galektinů nejvíce prozkoumaný. Bylo prokázáno, že se díky svým specifickým vlastnostem účastní mnoho dějů při tvorbě rakoviny, jako např. angiogeneze, tumorogeneze, tvorba metastáz a zvýšení invazivních vlastností nádoru [3, 16].

Koncentrace galektinu-3 je zvýšena v krevním oběhu pacientů s některými typy rakoviny, jako je např. rakovina prsu, kdy se také váže na glykoproteiny na povrchu nádorových buněk. Na buněčných kulturách bylo demonstrováno, že lidské nádorové buňky karcinomu prsu ztrácejí svou malignitu po inhibici exprese galektinu-3. Inhibice galektinu-3 také zpomaluje růst tumoru *in vivo* [17]. Je pravděpodobné, že galektin-3 hraje důležitou roli při iniciaci transformace nádorových buněk díky interakci s onkogenními Ras proteiny. Zejména preferuje interakci s onkogenem K-Ras, způsobuje aktivaci fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) a Raf1, a moduluje tak genovou expresi na transkripční úrovni [18]. Experimentální studie na lidském karcinomu prsu *in vitro* ukázaly, že galektin-3 může mít vliv na tumorogenezi přes regulaci buněčného cyklu. Galektin-3 snižuje expresi cyklinu A a cyklinu E a zvyšuje expresi inhibitorů buněčného cyklu p21 a p27 [19]. Extracelulární galektin-3 přispívá ke tvorbě tumorového embolu, adhezi tumorových buněk na endotel a úniku imunitnímu systému způsobením apoptózy T-buněk. Intracelulární galektin-3 chrání metastastatické buňky proti apoptóze způsobené ztrátou kotviště (anoikis). Galektin-3 má také angiogenetickou aktivitu a podporuje tvorbu nových kapilár. Vliv galektinu-3 na tumorogenezi je znázorněn na obr. 3, str. 15.

Extracelulární galektin-3 se chová jako adhezní molekula a předpokládá se, že galektin-3 asociovaný s nádorovými buňkami se podílí na tvorbě tumorového embolu a zachycení nádorových buněk na endotel při tvorbě metastáz [16, 20]. Navíc volně cirkulující galektin-3 interaguje s MUC-1 (velký transmembránový mucin), čímž se také podporuje tvorba embolu a přežívání šířících se nádorových buněk v cirkulaci [21]. MUC-1 v nádorových buňkách mění expresi z dlouhého jádra typu 2 na krátké jádro typu 1. Glykoproteiny jádra typu 2 mají navázanou galaktosu nebo sialovou kyselinu, kdežto jádra typu 1 se větví a mají potenciál pro velké prodloužení uhlovodíkového řetězce [22]. V normálních buňkách je MUC-1 značně polarizován a tvoří ochrannou bariéru okolo buňky, redukuje mezibuněčnou interakci. Je možné, že v buňkách rakoviny prsu má galektin-3 vysokou afinitu s MUC-1, vyvolává depolarizaci a narušuje tak ochrannou bariéru buňky. Bylo dokázáno, že samostatná hyperexprese MUC-1 není dostatečná pro zvýšení metastatického potenciálu, ale je vyžadována přítomnost galektinu-3 [23].



**Obr. 3. Role galektinu-3 při tumorogenezi** (převzato a upraveno z [17]). Galektin-3 přispívá tumorogenezi různými mechanismy. Interakci s onkogenem K-Ras a aktivaci fosfatidylinositol-3-kinasy (vlevo nahoře). Snížení tvorby cyklinu A a cyklinu E zvyšuje tvorbu inhibitorů p21 a p27 (vlevo nahoře). Extracelulární galektin-3 - formace tumorového embolu a přichycení tumorových buněk na endotel (vpravo dole) a únik imunitnímu systému vyvoláním apoptózy T-buněk (vlevo nahoře). Intracelulární galektin-3 - ochrana metastatické buňky proti apoptóze způsobené ztrátou kotviště (anoikis; vpravo dole). Tvorba nových kapilár (vpravo dole).

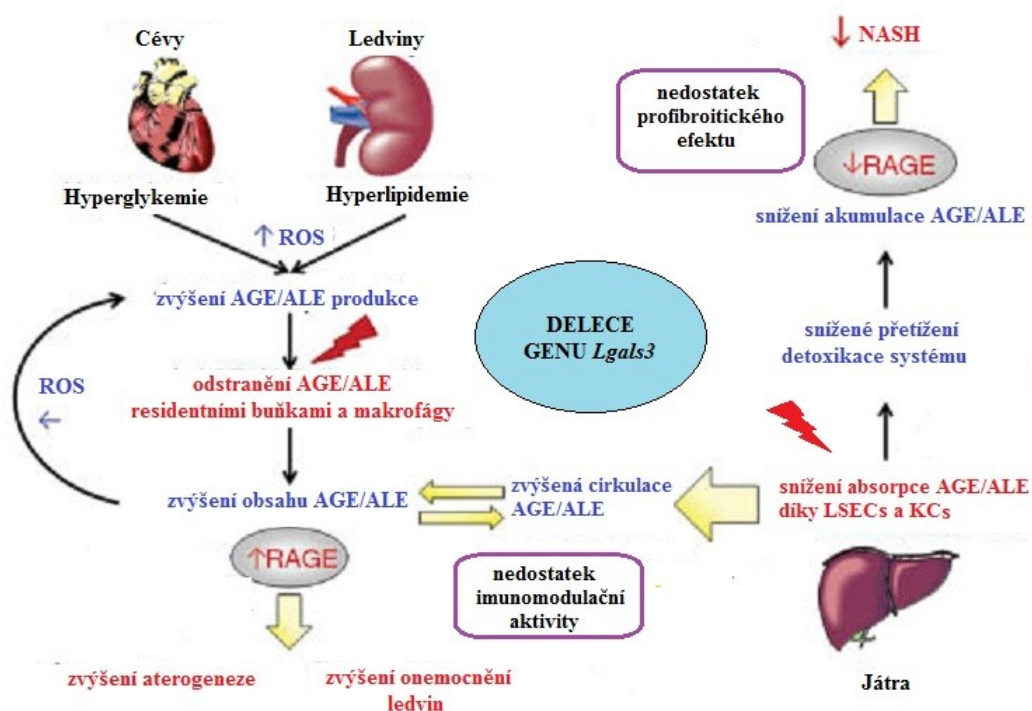
### 1.1.6 Galektin-3 v patogenní fibrotizaci tkání *in vivo*

Galektin-3 je zahrnut do vývoje různých onemocnění, jako je nefropatie, retinopatie, ateroskleróza, srdeční selhání, diabetes a obezita. Pokud se naruší gen galektinu-3, je možné redukovat nebo odstranit rozvoj patogenní fibrózy orgánů. I když je možné studovat profibrotické účinky na myších modelech, není možné určit, zda jde o extracelulární nebo intracelulární blokádu (nebo obojí). Galektin-3 přispívá k tvorbě fibrózy různými mechanismy, například aktivuje klidové fibroblasty na myofibroblasty, což je hlavním mechanismem při fibrotizaci tkání [24]. Také díky této funkci se galektin-3 podílí na vývoji srdeční fibrózy vedoucí k selhání srdce. Fúze galektinu-3 do perikardu

vedla k zánětlivé remodelaci komor a srdeční dysfunkci u dospělé myši. To bylo zmírněno použitím *N*-acetyllaktosaminu (LacNAc) jako inhibitoru galektinu-3. Na druhé straně, galektin-3 je i potencionálním cílem působícím proti patologické srdeční remodelaci. Díky studii na lidech bylo zjištěno, že galektin-3 zvyšuje riziko případů srdečního selhání. U pacientů trpících dyspnoí (dušnost), kteří leželi na akutním oddělení, byla hladina galektinu-3 znatelně zvýšena u subjektů se srdečním selháním než u těch bez něj. Navíc zvýšená koncentrace galektinu-3 byla nejlepším nezávislým ukazatelem mortality nebo srdečního selhání během 60 dnů po infarktu [25]. I když je evidentní, že galektin-3 hraje zásadní roli v srdeční fibróze a selhání srdce, má velký význam v udržení integrity srdeční tkáně po nekróze. Galektin-3 je nezbytný pro normální hojení ran, zejména během počáteční fáze obnovy srdeční tkáně [26].

Dále bylo zjištěno, že galektin-3 se účastní patogeneze diabetických komplikací díky své schopnosti interagovat s konečnými produkty pokročilé glykace (AGEs – *advanced glykosylation end-products*) a konečnými produkty pokročilé lipoxidace (ALEs – *advanced lipoxidation end-products*) [27]. Při nedostatku intracelulárního galektinu-3 není možné v ledvinách a cévách AGEs/ALEs odstranit, avšak v játrech má nedostatek opačný efekt tedy redukcí akumulace těchto produktů. Tyto efekty mohou být vysvětleny změnami v expresi receptorů pro AGEs (RAGE), které asociují s galektinem-3 [28]. Navíc extracelulární galektin-3 může mít účinky nezávislé na AGE/ALE a RAGE, které jsou způsobovány interakcemi s *N*-glykany na povrchu buňky a tvorbou síťové struktury. Tyto účinky se mohou dále zkoumat jako potencionální cíl terapeutického zásahu [27]. Efekty delece genu pro galektin-3 jsou znázorněny na obr. 4 na str. 17.

Galektin-3 způsobuje nefrogenezi a je ve vysoké míře exprimován v močových cestách. Zvýšená hladina galektinu-3 způsobuje fibrózu ledvin, slábnutí funkce ledvin a chronické ledvinové onemocnění [29]. Použitím LacNAc k inhibici galektinu-3 se zlepší funkce ledvin a je sníženo jejich poškození signifikantní redukcí infiltrace makrofágů. Na myších s akutním onemocněním ledvin byly testovány změny v expresi galektinu-3 pomocí modifikovaného citrusového pektinu (MCP), což je derivát, který se může vázat na CRD galektinu-3. MCP bylo využito jako ochrana před nefropatií modulací nejdříve proliferace a později exprese galektinu-3, apoptózy a fibrózy. Proto by MCP mohl být novým cílem ke snížení dlouhotrvajících ledvinových onemocnění [30].



**Obr. 4. Efekt delece galektinu-3 na srdeční, ledvinová a jaterní onemocnění** (převzato a upraveno z [27]). Při nedostatku galektinu-3 v ledvinách a cévách není možné AGEs/ALEs odstranit, což vede ke zhoršení a urychlení renálního onemocnění a aterosklerózy. Naopak v játrech je výsledkem nedostatku galektinu-3 vychytávání a akumulace těchto produktů s následnou cirkulací a redukcí jaterních AGEs/ALEs a zmírnění NASH. Nedostatek imunomodulační aktivity a pro-fibroitického efektu galektinu-3 může hrát také významnou roli. ROS, reaktivní kyslíkové radikály; NASH, nealkoholová steatohepatitida (jaterní onemocnění); LSECs, endotelové buňky jaterní sinusoidy; KCs, Kupfferovy buňky.

## 1.2 Biomateriály

### 1.2.1 Biomateriály se sacharidovými ligandy

Možnost detailního studia lektinů, zejména jejich schopnosti vázat sacharidy, se velmi rozšířily díky rapidnímu vývoji biomateriálů v posledním desetiletí. Rozsáhlé znalosti všech aspektů interakce lektin-glykan *in vitro* i *in vivo* se dají využít v zobrazovacích metodách biologických tkání, v cílené distribuci léků v organismu, v diagnostických a analytických metodách. Mezi aplikace například patří fotoluminiscenční a optické biosensory, matrice pro zobrazování pomocí magnetické rezonance, cílená

hypertermální léčba tkání postižených rakovinou, selektivní inhibitory bakteriálních toxinů, patogeny rozpoznávající lektinové receptory a mnoho dalších [31].

Mezi významné biomateriály se sacharidovými ligandy patří glykany na pevném nosiči – glykonanočástice, glykoarraye a „kvantové body“ (z angl. *quantum dots*). Nanočástice jsou částice o velikosti mezi 1-100 nm obklopené interfaciální vrstvou. Tato vrstva je integrální částí hmoty a ovlivňuje všechny vlastnosti nanočástice. Glykonanočástice obsahují kovové jádro, které může být funkcionalizováno různými typy glykopolymerů s navázanými glykany. Konjugace sacharidu na tyto kovové nanoklastry přináší zajímavé vlastnosti a díky své snadné modifikovatelnosti mají široké využití v nanotechnologiích. Interakce glykonanočástic s vhodnými funkcionalizovanými biologickými ligandy mohou být inovativním zdrojem diagnóz a terapií [32].

Termín „*quantum dots*“ (QDs) poprvé použit profesorem Markem A. Reedem (1988) popisuje polovodivé nanokrystaly typicky zahrnující binární nebo třímolekulové sloučeniny těžkých kovů jako kadmium a olovo s charakteristickými fluorescenčními vlastnostmi [31]. V myším modelu roztroušené sklerózy bylo zjištěno, že QDs o různé hustotě antigenů mohou být využity k vytvoření imunologické tolerance. Tyto sestavy jsou schopné zobrazit husté uspořádání myelinového peptidu, které je spojené s roztroušenou sklerózou. Umožňují přímý přístup vizualizace v imunitních tkáních. Na zlepšení tolerance při vizualizaci QD terapeutiky se QDs konjugují s antigeny [33].

### 1.2.2 HPMA kopolymery a jejich využití

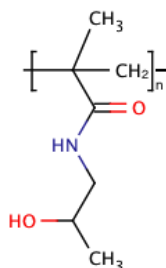
Ve vodě rozpustné polymery mají široké klinické využití. Jsou využívány k modifikaci proteinů, liposomů a jako nosiče léků, genů a oligonukleotidů [34]. Kopolymery *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) jsou dobře charakterizované biokompatibilní polymerní nosiče, původně vyvinuté jako náhrada krevní plazmy (strukturní vzorec HPMA je na obr. 5, str. 19). Využívají se v různých studiích transportu léčiv/ chemoterapeutik působících proti rakovině [35]. Konjugáty HPMA kopolymeru s léčivem o velikosti 5-20 nm jsou ve vodě rozpustné konstrukty. Jejich unikátní strukturní, fyzikálně chemické a biologické vlastnosti jsou velkou výhodou v porovnání s nízkomolekulárními léčivy, které mají nedostatečnou specifitu k rakovinovým buňkám a mnohem kratší poločas života *in vivo*. Účinný konjugát musí být během transportu na cílové místo stabilní a musí být schopný uvolnit léčivo v lysozomu cílové buňky. Výhody léků navázaných na polymer jsou: aktivní absorpce pinocytózou nebo receptorem

zprostředkovaná endocytóza, zvýšení akumulace léčiva v místě nádoru (aktivně pomocí zacílení a pasivně působením efektu zvýšené permeability a retence, tzv. EPR efekt), dlouhodobá cirkulace v krvi, snížení nespecifické toxicity a imunitní resistance a modulace buněčné signalizace a apoptózy [36].

EPR efekt je dominantní mechanismus, kterým makromolekulární konjugáty vstupují do nádorů. Jev je přičítán vysoké vaskularizaci tumoru, zvýšené permeabilitě nádorových cév a nefunkční nebo potlačené lymfatické drenáži v nádorovém intersticiu. Mnoho studií ukázalo, že oproti normálním tkáním je v tumorech zvýšená akumulace makromolekul [36, 37]. Míra akumulace je závislá na molekulové hmotnosti, velikosti náboje a hydrofobním-hydrofilním charakteru. Po proniknutí makromolekuly do nádorové buňky dochází v lysozomu k uvolnění léčiva do buňky.

HPMA kopolymery byly využity v mnoha studiích, které jsou potenciálně přenositelné do *in vivo* aplikací. Jednou z aplikací HPMA kopolymerů je transport terapeutických genů do centrálního nervového systému s potenciálním využitím při léčbě nervových onemocnění. Možností zvýšení efektivity genových vektorů je konjugace cílového ligandu na polymerní vektor, čímž se zvýší absorpce neurony [38].

Používané léky na rakovinu s konvenčními cytostatiky mají často nízkou účinnost a vedlejší účinky. Díky HPMA kopolymerům konjugovaných s antracykliny, doxorubicinem nebo pirarubicinem získává protinádorové léčivo vysokou aktivitu a sníží se vedlejší účinky [39]. Navázání cytostatik na HPMA kopolymer prodlouží jejich cirkulaci v krevním řečišti a díky EPR efektu se konjugáty polymer-léčivo akumulují převážně v pevném tumoru. Stupeň akumulace a cirkulace polymerního nosiče v nádoru se zvyšuje s rostoucí molekulovou hmotností. Polymer musí být připraven tak, aby byl veškerý obsah léčiva uvolněn do pevného nádoru, tedy jeho molekulová hmotnost odpovídala prahové hodnotě při vylučování ledvinami (cca 70 000 g.mol<sup>-1</sup>). Očekává se, že takovéto polymery budou vysoce účinné při léčbě nádorů, aniž by docházelo k nežádoucímu přetrvání polymeru v tělních částech [40].



**Obr. 5. Strukturní vzorec poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu – HPMA.**

### 1.2.3 Interakce glykokonjugátů s galektinem-3

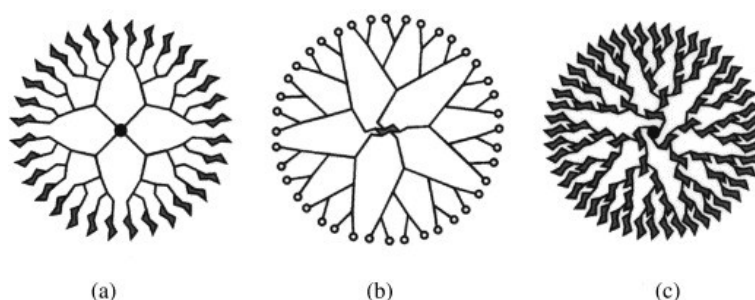
Jak už bylo zmíněno, galektin-3 hraje významnou roli v různých vážných onemocněních. Jednou z cest k terapii těchto onemocnění je syntéza efektivních a selektivních inhibitorů galektinu-3 jako potenciálních terapeutik. Jelikož galektin-3 je schopný tvořit pentamery i vyšší oligomery, multivalentní prezentace sacharidových ligandů umožňuje významně zvýšit vazebnou afinitu inhibitoru díky multivalentnímu efektu (avidita multivalentního systému je vyšší než prostý součet afinit jednotlivých monovalentních složek). Bylo potvrzeno, že *N,N'*-diacetyllaktosamin (GalNAc $\beta$ 4GlcNAc; LacdiNAc) se chová jako selektivní ligand pro galektin-3 [41]. Pro multivalentní prezentaci komplexních oligosacharidových ligandů lze využít jako nosič např. sérový albumin. U vzniklých neo-glykoproteinů lze řídit množství prezentovaných glykanů, a tím i afinitu konjugátu [42]. Chemo-enzymovou syntézou za použití rekombinantních glykosyltransferas byly připraveny vysoce afinitní ligandy galektinu-3 – tetrasacharidy založené na poly-*N*-acetyllaktosaminu [43]. Tyto oligosacharidy mohou být biotinylovány na uhlíku C6 galaktosové jednotky na neredukujícím konci bez ztráty afinity. Takto připravené biotinylované ligandy ukázaly vysokou afinitu a inhibiční potenciál dokonce i při nízké glykosylaci (hodnoty  $K_d$  a  $IC_{50}$  okolo 50nM). Pomocí glykosyltransferas lze připravit i složitější oligosacharidy až o sedmi jednotkách [44]. Takovéto neo-glykoproteiny jsou slibnými kandidáty pro cílení galektinu-3 v biomedicinském výzkumu rakoviny [45].

Mezi další účinné multivalentní ligandy galektinu-3 patří například glykokalixareny, glykodendrimery a nízkomolekulární inhibitory. Mezi významné nízkomolekulární inhibitory se řadí zejména thiodigalaktosidy (TDG). U aromatických thiodigalaktosidů substituovaných na C3 a C3' byla zjištěna vysoká afinita galektinům -1, -3, -7 a -9 (nanomolární  $IC_{50}$ ). Vysoce selektivní pro galektin-3 jsou *bis*-3-*O*-kumarylové thiodigalaktosidy a derivatizací aryltriazolem na C3 vznikají inhibitory galektinu-3 s nejvyšší afinitou a specifitou [46].

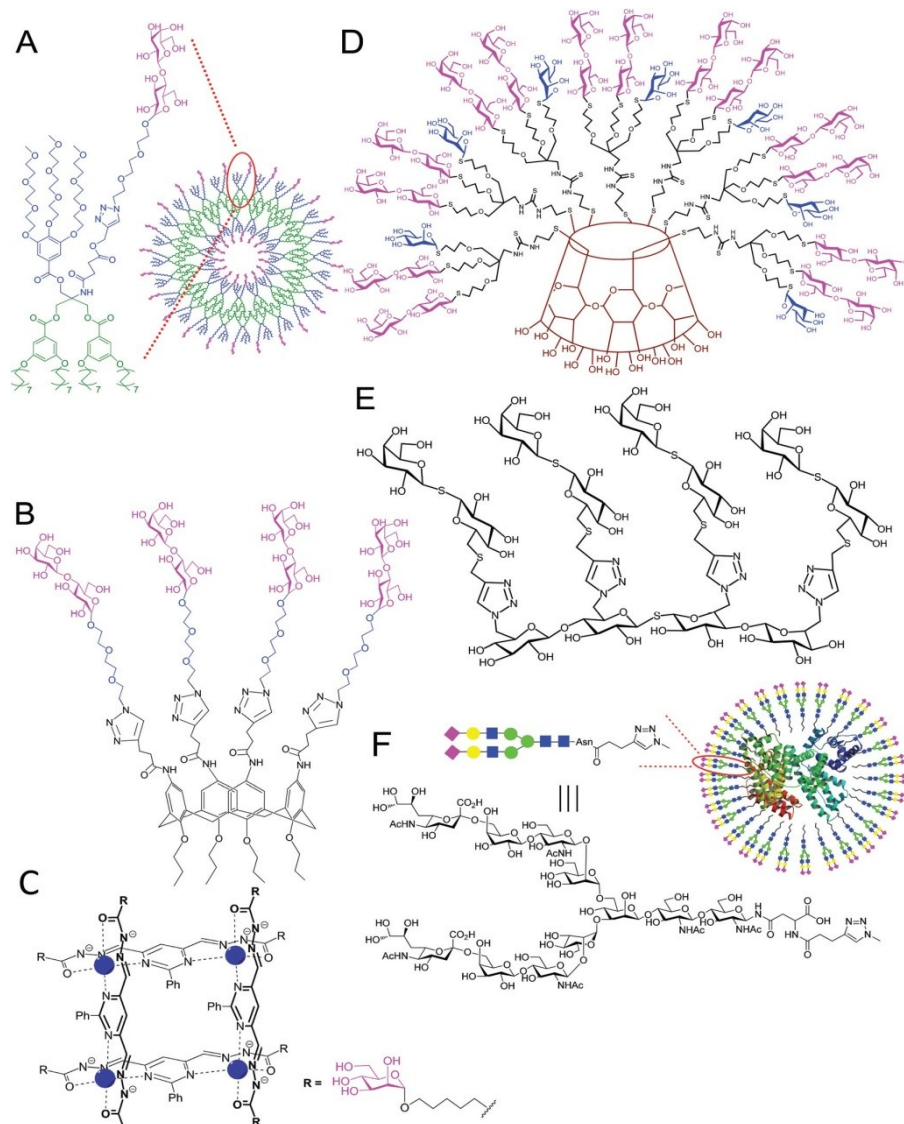
Glykokalixareny jsou glykany navázané na kalixareny, oligomery vzniklé kondenzací fenolů a aldehydů, cenné zejména díky jejich schopnosti pojmout cizí molekulu do intermolekulární kavity a transportovat ji na určité místo. Glykokalixareny jsou silnými ligandy různých lektinů, některých přirozeně patogenních. Například kalix[4]arenové a kalix[5]arenové deriváty se chovají jako dobré inhibitory toxinu cholery

[47]. Ke galektinu-3 vykazuje vysokou afinitu např. laktosylovaný kalixaren, připravený metodou „click chemie“ [48]. Příklady glykokonjugátů jsou znázorněny na obr. 7, str. 22.

Glykodendrimery jsou skupina neglykokonjugátů založená na dendrimerech. Dendrimery jsou opakovaně větvené molekuly, typicky symetrické okolo jádra, často zaujímají třídimensionální morfologii. Glykodendrimery jsou tedy dendrimery, které inkorporují sacharidy do své struktury. Můžeme je dělit na glykokodendrimery s povrchovými glykany, centrálními glykany nebo na glykanech založené dendrimery (viz obr. 6). Glykodendrimery mohou být užitečné při výrobě biologicky kompatibilních povrchových povlaků nebo jako ve vodě rozpustných „hostitelů“ pro malé molekuly [49].



**Obr. 6. Strukturní typy glykodendrimerů** (převzato z [49]). (A) glykodendrimery s povrchovými glykany, (B) glykodendrimery s centrálními glykany, (C) glykodendrimery založené na glykanech.



**Obr. 7. Příklady glykokonjugátů používaných na vazbu lektinů** (převzato z [31]). (A) glykodendrimersom; (B) laktosyl-kalix[4]aren; (C)  $\alpha$ -mannosylovaný oligomer se čtyřmi jádry s  $Zn^{2+}$  kationty (modře); (D)  $\alpha$ -mannosyl- $\beta$ -laktosyl- $\beta$ -cyclodextrin glykoklastr; (E) tetravalentní thiogalaktosid mimikující sacharidy a (F) neoglykokonjugát s lidským sérovým albuminem.

## 1.3 Enzymy

### 1.3.1 Enzymy používané na syntézu sacharidů

Enzymy katalyzující glykosylace můžeme rozdělit do 4 skupin: glykosyltransferasy, glykosidasy (glykosylhydrolasy), transglykosidasy a glykosidfosforylasy. Glykosyltransferasy (EC 2.4) slouží na přenos sacharidového zbytku, kdy jako donor využívají cukerné nukleotidy („leloirovské“ glykosyltransferasy, dle argentinského lékaře a biochemika L.F. Lelaira, který r. 1948 objevil cukerné nukleotidy).

Jsou striktně stereoselektivní a regioselektivní. Drahé cukerné nukleotidy lze efektivně recyklovat *in situ* pomocí multienzymových regeneračních systémů. Mezi akceptory glykosyltransferas patří sacharidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a další přírodní látky [50]. Glykosidasy (EC 3.2.1) jsou hydrolasy, které přirozeně štěpí glykosidovou vazbu, avšak modifikací reakčních podmínek jsou schopny glykosidickou vazbu i syntetizovat. Mezi synteticky hojně využívané glykosidasy patří např.  $\beta$ -galaktosidasa z *Bacillus circulans*, která je účinným biokatalyzátorem při komerční výrobě galaktooligosacharidů např. do kojenecké stravy [51]. Transglykosidasy (EC 3.2.1) jsou formálně řazeny mezi glykosidasy, ale jejich hydrolytická aktivita je velmi nízká. Využívají se zejména průmyslově na přenos  $\alpha$ -glukopyranosylu a  $\beta$ -fruktofuranosylu. Transglykosylace je reakce, kdy se přenáší jeden sacharidový zbytek jednoho glykosidu na jiný. Glykosidfosforylasy jsou „neleioirovské“ glykosyltransferasy, jelikož jako donory nevyužívají cukerné nukleotidy, ale fosfáty. Fyziologicky tedy probíhá fosforolytické štěpení, donorem glykosylu je většinou glukosa-1-fosfát a akceptorová specifita je velmi široká [52].

### 1.3.2 $\beta$ -N-Acetylhexosaminidasy a jejich cílená mutageneze

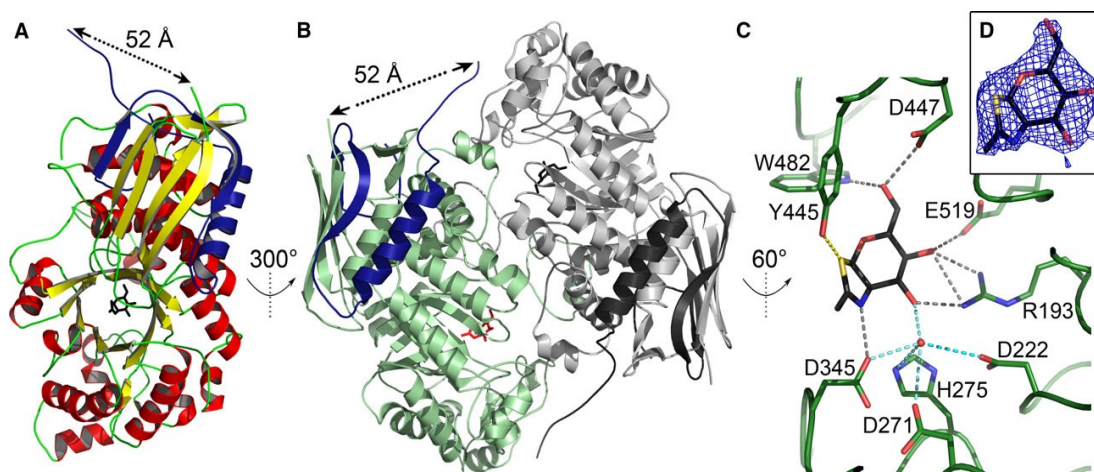
Pro manipulaci syntetické aktivity a substrátové specifity enzymů modifikujících sacharidy lze s výhodou využít cílenou mutagenezi. Pro biotechnologické aplikace se tyto enzymy s výhodou rekombinantně exprimují v různých heterologních systémech, nejběžněji v *E. coli* nebo *P. pastoris*. Při úspěšné expresi lze dosáhnout výtěžků v řádu až 10 mg proteinu na 100 ml média. V rámci této práce byla enzymová syntéza jednoho z disacharidů prováděna pomocí  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas (systematickým názvem 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-hexopyranosid-acetamidodeoxyhexohydrolasy, CAZy rodina GH 20), patřících do skupiny glykosidhydrolas (EC 3.2.1.52). Tyto enzymy se chovají jako typické exohydrolasy, neboť katalyzují štěpení koncových  $\beta$ -D-GlcNAc a  $\beta$ -D-GalNAc zbytků v oligosacharidových řetězcích [53]. Nejsou striktně specifické, používají substráty v gluko- i galakto- konfiguraci. Obecně jsou preferované GlcNAc substráty; poměr aktivit GlcNAc/GalNAc se většinou pohybuje v rozmezí 1,5 - 4,0 [54].

$\beta$ -N-Acetylhexosaminidasy se vyskytují v řadě eukaryotických i prokaryotických organismů (výjimkou je skupina bakterií *Archea*). Enzymy plní širokou škálu funkcí v závislosti na typu organismu a lokalizaci v těle nebo uvnitř buňky. V živočišné říši se například podílejí na oplodnění, kdy zprostředkovávají iniciační interakci gamet.

$\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidasa obsažená ve spermích se chová jako lektinový receptor a účastní se tak primární vazby spermií na vaječný obal [55].

$\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidasy obsažené v houbách plní funkci v chitinolytickém systému při růstu hub a jsou zahrnuty do degradace buněčné stěny při autolýze stárnoucích houbových kultur v procesu fermentace. Struktura houbových  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas zahrnuje dvě katalytické podjednotky a dva propeptidy. Nedávno byla publikována první krystalová struktura fungální  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (struktura je zobrazena na obr. 8, str. 25). Díky dostatečné homologii mezi houbovými  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasami lze využít molekulárního modelování pro predikci strukturních parametrů a katalytického chování těchto enzymů. Byly publikovány homologní modely  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas z *Aspergillus oryzae* (AoHex) [56] a *Penicillium oxalicum* (PoHex) [57].

Navzdory vysokému stupni podobnosti s AoHex a PoHex má  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa z extrémofilní vláknité houby *Talaromyces flavus* (TfHex) mnohem širší substrátovou specifitu a syntetické schopnosti, zejména při použití funkcionalizovaných substrátů [58, 59]. Pro zvýšení výtěžku transglykolytických reakcí a potlačení hydrolytické aktivity byla použita cílená mutagenese. Podobně jako při mutagenesi endo- $\beta$ -*N*-acetylglukosaminidas, kde byl vodu stabilizující tyrosin přeměněn za fenylalanin, byl u TfHex zaměněn Tyr470 za fenylalanin, v dalších případech za histidin a asparagin. Bodové mutace byly navrženy na základě molekulárního modelování [60]. Mutantní enzym byl heterologně exprimován v *Pichia pastoris* za indukce methanolem, jelikož *P. pastoris* je methylotrofní kvasinka využívající methanol jako zdroj uhlíku (podrobný postup bude popsán v Metodách, kapitola 3.3) [61].



**Obr. 8. Krystalová struktura  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (převzato z [56]).**

A) Struktura monomeru *AoHex*. Propeptid je znázorněn modře, místo aktivace peptidasou je zobrazeno šipkami, které rovněž ukazují vzdálenost mezi C-koncem propeptidu a N-koncem katalytického jádra. B) Struktura dimeru *AoHex*. Monomer A je znázorněn zeleně s modrým propeptidem a červeným ligandem NGT (thiazolin odvozený od *N*-acetylglukosaminu), monomer B je znázorněn šedě s černým propeptidem i NGT. C) Detail NGT navázaného polárními interakcemi (přerušované čáry) na aktivní centrum. Přímé vodíkové vazby šedě, vodou zprostředkované vodíkové vazby tyrkysově a vodíkové vazby vázané přes síru žlutě. Dále jsou rozlišeny interagující aminokyselinové zbytky. D) Mapa elektronové hustoty NGT.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem práce byla chemoenzymová syntéza oligosacharidových epitopů za použití mutantních a nativních glykosidas, připojení sacharidů na (dříve připravené) HPMA kopolymery a stanovení inhibičního a případně i vazebného účinku připravených multivalentních glykopolymerů vůči galektinu-3 *in vitro*.

Dílčí cíle práce byly:

- Literární rešerše na téma galektiny (detailněji zaměřeno na galektin-3), biomateriály a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy.
- Rekombinantní exprese galektinu-3 v *E. coli* a purifikace afinitní chromatografií
- Rekombinantní exprese mutantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy v *P. pastoris* a purifikace iontově výměnou chromatografií
- Stanovení optimálních podmínek chemoenzymové syntézy funkcionalizovaných disacharidů GalNAc $\beta$ 4GlcNAc a Gal $\beta$ 4GlcNAc
- Chemoenzymová syntéza těchto disacharidů, purifikace, deprotektce a konjugace na funkcionalizovaný HPMA kopolymer (provedeno ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie)
- Imunochemické stanovení inhibičního účinku připravených ligandů pomocí metody ELISA

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1 Použité přístroje a materiál**

##### **3.1.1 Přístrojové vybavení**

- Termomixér Eppendorf thermomixer comfort (Eppendorf, USA)
- Centrifugy - Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin, Eppendorf Centrifuge 5804 R, (Eppendorf, USA); Sorvall centrifuge RC G+ (Thermo Scientific, USA)
- Gelová chromatografie – sběrač Pump P-1 (Pharmacia Biotech, USA)
- HPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko)
- UV lampa, UV 240 (A. Krüss Optronik, Německo)
- Magnetická míchačka AREX, VELP SCIENTIFICA
- Lyofilizátor Lyovac GT2 (Leybold GmbH, Německo)
- Spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)
- Spektrofotometr Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko)
- Äkta prime plus (Amersham biosciences, Velká Británie)
- Kolony na purifikaci (Äkta prime plus) – Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Merck Německo), HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie)
- pH metr - pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Česká republika)
- 3D Blot Mixer (Clever Scientific Ltd, Velká Británie)
- Aparatura na SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)
- Destičky na ELISA – F16 Maxisorp NUNC-Imunno modules (Fisher ThermoScientific, Dánsko)
- Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)
- Váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- Třepačka IKA KS 4000 ic control (Scholler, Česká republika)
- Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)
- Sonikátor UP50 H UltraSonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie)

### 3.1.2 Použitý materiál

- *p*NPGalNAc (*p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galaktopyranosid), (Gold Biotechnology, USA)
- GlcNAc-*t*Boc (*tert*-butoxykarbonylamido)ethylthioureidyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosid)
- *p*NPGal (*p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid), (Senn Chemicals, Švýcarsko)
- McIlvaine pufr – 0,1M kyselina citrónová / 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 5,0
- Acetátový pufr – 0,1M CH<sub>3</sub>COOH / 0,2M CH<sub>3</sub>COONa; pH 5,0
- Bradfordovo činidlo (ředěno 1:4 s destilovanou vodou) – Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA)
- Rekombinantní enzym  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa, mutant Tyr470Phe a Tyr470His – produkováno v laboratoři
- $\beta$ -Galaktosidasa z *Bacillus circulans*; 26,5 U/ml (Daiwa Kasei, Japonsko)
- Polyakrylamidový gel na gelovou chromatografii – Bio-gel P2 (Bio-Rad, USA)
- PBS pufr – 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 150mM NaCl; pH 7,5 (Carl-Roth, Německo)
- PBST pufr – PBS / 0,05% Tween 20 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- EPBS pufr - 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 150mM NaCl / 2mM EDTA; pH 7,5 (Carl-Roth, Německo)
- 2% BSA v PBS pufru (Sigma-Aldrich, USA)
- Substrát „TMB One“ – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (Kem-en-Tec Diagnostics, Dánsko)
- Asialofetuin, 10 mg/ml, ředění 1:200 v PBS pufru (Sigma-Aldrich, USA)
- Myší monoklonální protilátka Anti-His<sub>6</sub>-Peroxidasa, ředění 1:1000 v PBS pufru, (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- Rekombinantní galektin-3 – produkováno v laboratoři
- Ekvilibrační pufr – 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 500mM NaCl / 20mM imidazol, pH 7,4
- Eluční pufr – 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 500mM NaCl / 500mM imidazol, pH 7,4
- 12% separační gel na SDS-PAGE – H<sub>2</sub>O / 30% akrylamid / 1,5M Tris-Cl pH 8,8 / 10% SDS / 10% amonumpersulfát / TEMED
- 5% zaostřovací gel na SDS-PAGE - H<sub>2</sub>O / 30% akrylamid / 1,0M Tris-Cl pH 6,8 / 10% amonumpersulfát / TEMED
- Elektrodový pufr – 25mM Tris / 150mM glycin / 10% SDS

- Obarvovací roztok – 0,5 g Coomassie Blue Brilliant, CH<sub>3</sub>OH / CH<sub>3</sub>COOH / H<sub>2</sub>O; 9 / 1 / 9
- Vzorkový pufr – 250mM Tris / 500mM DTT / 10% SDS / 0,5% bromfenolová modř / 50% glycerol
- Molekulový marker – Amersham LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, Velká Británie)
- Odbarvovací lázeň – EtOH / H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>COOH; 7 / 11 / 2
- Vyvíjecí fáze na TLC „Prager“ – isopropylalkohol / voda / amoniak; 7 / 2 / 1
- 1M draselno-fosfátový pufr (CP pufr) - 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6,0
- Biotin (Fkua BioChemika, Švýcarsko)
- Metanol (ISOLAB, Německo)
- Glycerol (Lach:ner, Česká republika)
- Kyselina octová (Lach:ner, Česká republika)
- Extrakt z kvasnic (OXOID, Velká Británie)
- YPD médium (*yeast extract peptone dextrose*) – 1% extrakt z kvasnic / 2% pepton / 2% glukosa (Sigma-Aldrich, USA)
- YNB (*yeast nitrogen base*), (Carl-Roth, Německo)
- Minimální glycerolové medium – 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,0 / 1.34% YNB / 4×10<sup>-5</sup> % biotin / 1% glycerol
- Minimální methanolové medium – 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,0 / 1.34% YNB / 4×10<sup>-5</sup> % biotin / 0.5% methanol
- Pevné LB medium (Luria-Bertani) – 10 g/l trypton / 0,5 g/l NaCl / 5 g/l extrakt z kvasnic / agar 15 g/l (Sigma-Aldrich, USA)
- TB medium (Terrific Broth) – 1,2% (w/v) trypton / 2,4% (w/v) extrakt z kvasnic / 0,4% (v/v) glycerin / 17mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 72mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, USA)
- Ampicilin – Ampicilin Na-salt (Serva Electrophoresis GmbH)
- Chloramfenikol (Fluka BioChemika, Švýcarsko)
- Buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS
- Plasmid galektinu-3 (vektor pETDuet-1), (Merck Německo)
- IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid), (Sigma-Alrich, USA)
- PMSF (fenylmethansulfonylfluorid), (Sigma-Alrich, USA)
- Další běžné chemikálie

## 3.2 Produkce galektinu-3

### 3.2.1 Transformace do *E. coli* a rekombinantní exprese galektinu-3

Nejprve byly připraveny Petriho misky s agarem s Luria-Bertani mediem (LB medium, 100 ml), do kterého bylo po rozehrání přidáno 67  $\mu$ l ampicilinu (150 mg/ml) a 100  $\mu$ l chloramfenikolu. Po ztuhnutí byly misky uloženy do lednice.

Pro produkci byl použit genový konstrukt galektinu-3 s histidinovou kotvou ve vektoru pETDuet-1 (Sgsl, EcoR1) [45]. Pro transformaci plasmidu byla na ledu rozmrazena kryokonzerva kompetentní buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (100  $\mu$ l, cca 10 min) a jemně promíchána. Dále byl rozmražen plasmid galektinu-3 a také promíchán. V laminárním boxu byl sterilně odebrán 1  $\mu$ l plasmidu a přenesen do buněk. Vzniklá směs byla lehce promíchána a ponechána asi 2 min na ledu. Poté byla mikrozkuhavka s obsahem směsi přenesena do termomixéru, kde byla 30 s zahřívána bez míchání na 42 °C (teplotní šok) a byla přenesena zpět na led (2 min). Do buněčné suspenze bylo přidáno 1 ml LB media a ponecháno v termomixéru inkubovat 1 h při 300  $\times$  g. Poté byla provedena centrifugace při maximálních otáčkách (13 500  $\times$  g), horní polovina supernatantu byla odstraněna, buňky byly resuspendovány ve spodní polovině supernatantu, naočkovány na misku (50  $\mu$ l, 150  $\mu$ l) a ponechány přes noc inkubovat při 37 °C.

Druhý den byly misky s narostlými buňkami přeneseny do lednice, aby byl zastaven další růst. V odpoledních hodinách bylo do tří Erlenmayerových baněk (500 ml) s 60 ml sterilního TB media (tzv. prekultury) přidána antibiotika ampicilin (100  $\mu$ g/ml) a chloramfenikol (34  $\mu$ g/ml). Médium v baňkách bylo zaočkováno kolonami z misky (párátkem, do každé baňky jedna kolonie) a ponecháno inkubovat přes noc při 37 °C a 220  $\times$  g (tak, aby roztok při míchání nepěnil).

Následující den (po 15-17 hodinách) byl obsah každé prekultury přelit do tří baněk se 600 ml připraveného sterilního TB media s obsahem ampicilinu (100  $\mu$ g/ml) a chloramfenikolu (34  $\mu$ g/ml). Poté byly kultury dále inkubovány při 37 °C a 220  $\times$  g, než byly bakterie dostatečně narostlé a jejich absorbance při 600 nm byla v rozmezí 0,6 a 0,8. Poté bylo do každé baňky přidáno 600  $\mu$ l IPTG na indukci proteinové exprese a kultury byly inkubovány při 25 °C a 150  $\times$  g, cca 22-24 hod.

### 3.2.2 Zpracování narostlých bakterií

Bakterie byly stočeny na centrifuze 20 min při  $5000 \times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Buněčný pelet byl resuspendován ve vychlazeném ekvilibračním pufru (50 ml), přelit do centrifugační zkumavky a byl k němu přidán PMSF (inhibitor proteas, 400  $\mu\text{l}$ ). Poté bylo provedeno 6 cyklů sonikace na ledu (1 min sonikace a 2 min pauza) s 52% amplitudou. Po sonikaci byla suspenze zcentrifugována na 15 min při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $13\,500 \times g$ . Supernatant byl přelit do čisté centrifugační zkumavky a přefiltrován (0,8  $\mu\text{m}$ ) pro nanesení na kolonu.

### 3.2.3 Purifikace galektinu-3 afinitní chromatografií

Galektin-3 nesoucí histidinovou kotvu, vyprodukovaný výše popsáním postupem, byl purifikován pomocí chelatační afinitní chromatografie (IMAC) na koloně na bázi sepharosy HisTrap HP (5 ml) za použití nízkotlaké chromatografické sestavy Äkta Prime plus. Před nanesením vzorku byla kolona promyta 150 ml přefiltrované ultradestilované vody a 150 ml ekvilibračního pufru (průtok 5 ml/min). Poté byl nanesen vzorek (v 50 ml ekvilibračního pufru) a nastaven průtok na 1 ml/min. Po nanesení vzorku (cca 1 hod) byla kolona znovu promyta minimálně 150 ml ekvilibračního pufru (2 ml/min), aby se odstranily nespecificky navázané proteiny (promýváno, dokud nebyla absorbance při stanovení proteinů dle Bradforda nižší než 0,02). Čistý galektin-3 byl izokraticky eluován elučním pufrem s obsahem 200mM imidazolu a byly sbírány frakce (1 ml), (2 ml/min). Eluce byla monitorována paralelně pomocí UV detektoru. Po dokončení eluce byla kolona promyta 150 ml elučního pufru, 150 ml filtrované ultradestilované vody a 150 ml 20% etanolu (5 ml/min) a uložena. Proteinové frakce byly analyzovány Bradfordovou metodou, frakce s vysokým obsahem proteinu byly spojeny a dialyzovány ve  $2 \times 7$  litrech dialyzačního pufru (EPBS) celkem 24 hod.

### 3.2.4 Čistota a koncentrace galektinu-3

Po dialýze byl obsah střeva zfiltrován přes sterilní filtr a pomocí Bradfordovy metody byla stanovena koncentrace vyprodukovaného galektinu-3.

Dále byla provedena SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu k určení čistoty galektinu-3. Byl připraven 12% separační (malopórový) SDS gel, který byl nalit mezi etanolem očištěná skla, převrstven 1 ml butanolem a ponechán ztuhnout. Poté byl slit butanol a na ztuhlý spodní gel byl nalit 5% zaostřovací SDS gel (složení obou gelů viz

sekce Materiál, kapitola 3.3.2., str. 28), byl nasazen hřebínek a gel tuhl při laboratorní teplotě. Dále byly připraveny vzorky (vzorek, barva, voda) tak, aby celkový objem vzorku byl asi 5-10  $\mu\text{l}$ . Vzorky byly denaturovány při 100 °C po dobu 5 min. Po úplném ztuhnutí gelu, byly vzorky napipetovány do jednotlivých drah, aparatura byla naplněna elektrodoým pufrem a připojena na zdroj napětí. Elektroforéza probíhala nejdříve při 90 V (prvních 20 min) a poté při 120 V, celkem přibližně hodinu. Po proběhnutí elektroforézy byla aparatura opatrně rozebrána a gel byl barven v Coomasie blue (cca 5 min) a poté odbarven v odbarvovací lázni. Gel byl uchován v roztoku 1% kyseliny octové.

### **3.3 Produkce rekombinantních mutantních $\beta$ -N-acetylhexosaminidas**

#### **3.3.1 Exprese enzymu v buňkách *Pichia pastoris***

Pro preparativní produkci mutantních  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas byly použity kryokonzervy buněk *Pichia pastoris* KM71H s transformovaným plasmidem nesoucím příslušný gen. Tyto kryokonzervy byly zaočkovány do 15 ml YPD media, čímž byla vytvořena prekultura, která byla kultivována 4 h při 28 °C a 220  $\times$  g. Poté byla prekultura zaočkována do 1 l připraveného sterilního kultivačního media (minimální glycerolové medium, složení viz kap. 3.2.2.) v 3 l Erlenmayerově baňce a kultivována 24 h za stejných podmínek.

Druhý den byly buněčné kultury zcentrifugovány při 5000  $\times$  g a 12 °C. Pelet byl sterilně resuspendován ve 200 ml připraveného media (minimální methanolové medium, složení viz kap. 3.2.2.) v 1 l baňce a inkubován při 28 °C a 220  $\times$  g. Produkce rekombinantních  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas byla indukována methanolem, jelikož *P. pastoris* je methylotrofní kvasinka využívající methanol jako zdroj uhlíku. Po dobu tří dnů byl denně přidáván 1 ml metanolu do 200 ml media (0,5 % v/v).

#### **3.3.2 Zpracování narostlých bakterií a purifikace**

Po kultivaci byly narostlé buňky zcentrifugovány 15 minut při 5000  $\times$  g a 20 °C. Supernatant obsahující extracelulární  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasu byl zředěn destilovanou vodou asi 1:3, bylo upraveno pH na 3,5 a roztok byl zfiltrován přes papírový filtr na Büchnerově nálevce.

Rekombinantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa byla purifikována pomocí iontově výměnné chromatografie na Fractogelu  $\text{SO}_3^-$  (silný katex) v 10mM citrát-fosfátovém pufru při pH 3,5 a eluována gradientem soli (60 ml, 2 ml/min, 0-1M NaCl) za použití chromatografické sestavy Äkta prime plus. Po nastavení kolony a daných podmínek bylo dále postupováno jako při purifikaci galektinu-3 (viz kap. 3.2.3.).

### 3.4 Optimalizace enzymové syntézy disacharidů

#### 3.4.1 Stanovení aktivity enzymů

Aktivita glykosidas byla stanovena spektrofotometricky při 420 nm (absorbance *p*-nitrofenolu odštěpeného z příslušného substrátu, který výrazně absorbuje v bazickém prostředí). U  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas byla stanovena aktivita se dvěma substráty, *p*NPGlcNAc a *p*NPGalNAc (schéma hydrolytické reakce, viz obr. 9, str. 35). U  $\beta$ -galaktosidas z *Bacillus circulans* byl jako substrát použit *p*NPGal. Měření aktivity bylo prováděno paralelně alespoň ve třech stanoveních proti referenčnímu vzorku (blank) obsahující pouze substrát a pufr. Celkový objem reakční směsi je vždy 50  $\mu$ l.

Do mikrozkušavky v termomixéru byl napipetován substrát (*p*NPGlcNAc nebo *p*NPGalNAc o finální koncentraci 2 mM) v McIlvaine pufru pH 5,0. Reakční směs byla vytemperována na 35 °C. Poté byla reakce zahájena přidávkem enzymu (10  $\mu$ l) a reakce běžela 10 minut (čas je možné upravit dle hodnoty absorbance, tak aby ještě platil Lambertův-Beerův zákon a lineární závislost rychlosti enzymové reakce na čase). Reakce byla ukončena přidávkem 1 ml 0,1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a byla změřena absorbance při 420 nm (spektrofotometr UVmini-1240, Shimadzu Japonsko). Stanovení enzymové aktivity bylo prováděno při teplotě 35 °C, 850  $\times$  g, v pufru McIlvaine pH 5,0. Stanovení  $\beta$ -galaktosidasové aktivity bylo provedeno analogicky v 50mM acetátovém pufru pH 5,0.

Pokud bylo potřeba stanovit aktivitu enzymu v rozpouštědle, postupovalo se stejně, avšak příslušná část pufru v reakční směsi byla nahrazena daným rozpouštědlem. U mutantů Tyr470Phe a Tyr470His  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas z *T. flavus* byla proměřena aktivita v přítomnosti acetonitrilu jako kosolventu. Reakční směs byla stejná jako u klasického stanovení aktivit, s tím rozdílem, že se postupně zvyšoval obsah acetonitrilu od 0 % až do 60 %.

Z průměrných hodnot absorbancí se aktivita spočte dle vztahu:

$$AKT \text{ (U/ml)} = \frac{\overline{ABS} \cdot V_{\text{celk}} \cdot \text{řed}}{k \cdot t \cdot V_{\text{enz}}}$$

kde *AKT* je aktivita enzymu v jednotkách U/ml,  $\overline{ABS}$  je průměr absorbancí,  $V_{\text{celk}}$  je celkový objem reakční směsi (50 ul), *řed* je ředění zásobního roztoku použitého enzymu, *k* je konstanta lineární závislosti absorbance na koncentraci *p*-nitrofenolu při 420 nm, *t* je reakční čas a  $V_{\text{enz}}$  je objem enzymu přidaného do reakce.

### 3.4.2 Analytické transglykosylační reakce

Při syntéze disacharidu **3** (Schéma 1) byly pro výběr vhodných podmínek pro enzymovou syntézu provedeny analytické transglykosylační reakce s různou koncentrací reaktantů a acetonitrilu s dvěma mutantními  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasami (Tyr470Phe *TfHex* a Tyr470His *TfHex*) a při různých teplotách. Z důvodu nízké rozpustnosti *p*NPGalNAc bylo nutno použít acetonitril jako kosolvent. Byly provedeny reakce s 50mM *p*NPGalNAc, 100mM nebo 150mM GlcNAc-*t*Boc a oběma enzymy. Po počátečních optimalizačních experimentech byly porovnány výtěžky reakcí (a) s Tyr470Phe *TfHex* při 35 °C ve 40% acetonitrilu a (b) s Tyr470His *TfHex* při 45 °C v 10% acetonitrilu, množství enzymu v obou reakcích bylo 0,09 U/ml. Celkový objem reakční směsi byl vždy 200  $\mu$ l.

Pomocí analýzy na TLC a HPLC byla z hlediska výtěžnosti jako nejvhodnější zvolena koncentrace akceptoru (GlcNAc-*t*Boc) 150 mM, koncentrace donoru (*p*NPGalNAc) 50 mM, enzym  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa mutant Tyr470Phe (0,1 U/ml), 40% acetonitril v pufru McIlvaine pH 5,0, teplota 35 °C a 850 x g.

Příprava disacharidu **5** byla provedena úpravou syntetického postupu z literatury s optimalizací množství použité komerční  $\beta$ -galaktosidasy z *Bacillus circulans* [62].

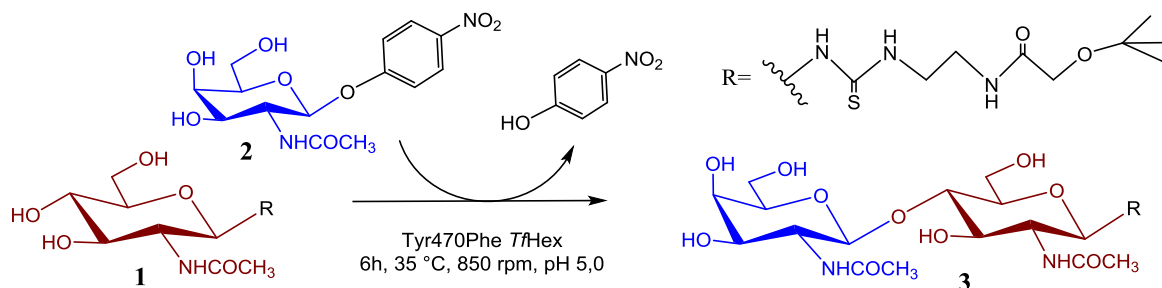
## 3.5 Enzymová syntéza

### 3.5.1 Preparativní enzymové reakce

Pro přípravu funkcionalizovaného disacharidu  $\beta$ -D-GalNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcNAc-linker-*t*Boc (**3**) dle reakčního schématu 1 (obr. 9, str. 35) byl použit donor *p*NPGalNAc (50 mM), akceptor GlcNAc-*t*Boc (150 mM) ve 40% acetonitrilu v McIlvaine pufru pH 5,0 a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa Tyr470Phe *TfHex*. Reakce probíhala při 35 °C, pH 5,0 a

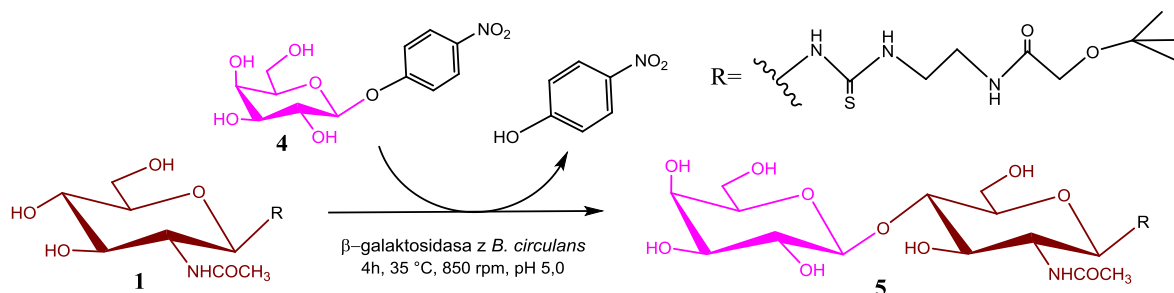
850 × g. Do tří mikrozkušavek byl navážen *p*NPGalNAc (3 × 13,7 mg) a GlcNAc-*t*Boc, (3 × 50,7 mg) byl přidán pufr (3 × 437 μl), acetonitril (3 × 320 μl), reakční směs byla promíchána a ponechána vytemperovat. Poté bylo přidáno po 43 μl enzymu (0,4 U), čímž byla zahájena reakce. Průběh reakce byl analyzován pomocí TLC každých 30-60 minut, díky čemuž bylo možné vidět přibývajícím produkt a ubývající donor (*p*NPGalNAc). Po spotřebování cca 90 % donoru v reakci byla reakce ukončena varem (99°C, 2 min) po 6 hodinách a 45 minutách.

Funkcionalizovaný disacharid β-D-Gal-(1→4)-β-D-GlcNAc-linker-*t*Boc (5), (reakční schéma 2, obr. 10, str. 36), byl připraven dle následujícího postupu. Do pěti mikrozkušavek byl navážen *p*-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid (5 × 10 mg; 30 mM) a GlcNAc-*t*Boc (5 × 63,5 mg; 150 mM). Mikrozkušavky byly umístěny do termomixéru, bylo do nich přidáno po 998 μl acetátového pufru pH 5,0. Po promíchání a vytemperování (35 °C, 850 × g) bylo přidáno po 2,25 μl β-galaktosidasy (0,06 U/ml v reakční směsi) z *Bacillus circulans*. Reakce byla analyzována pomocí TLC a HPLC a ukončena po spotřebování donoru varem po 5 hodinách.



**Obr. 9. Reakční schéma 1** (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

Enzymová syntéza disacharidu (*tert*-butoxykarbonylamido)ethylthioureidyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosidu (3) z akceptoru (*tert*-butoxykarbonylamido)ethylthioureidyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosidu (1) a donoru *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-galaktopyranosidu (2) za katalýzy β-*N*-acetylhexosaminidasy z *T. flavus* mutantu Tyr470Phe.



**Obr. 10. Reakční schéma 2** (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

Enzymová syntéza disacharidu (*tert*-butoxykarbonylamido)ethylthioureidyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glukopyranosid (5) z akceptoru (*tert*-butoxykarbonylamido)ethylthioureidyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosid (1) a donoru *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (4), za katalýzy  $\beta$ -galaktosidasy z *B. circulans*

### 3.5.2 Zpracování reakční směsi a izolace produktů

Po ukončení reakce byla reakční směs zcentrifugována 10 minut při  $13\,500 \times g$ , supernatant byl odebrán do skleněné baňky. Pelet byl suspendován v destilované vodě (120  $\mu$ l), směs byla znovu zcentrifugována (10 min,  $13\,500 \times g$ ) a supernatant byl přidán do baňky. Takto připravený vzorek byl nanesen na kolonu gelové chromatografie (Biogel P-2), ve vodě. Po zasáknutí byl vzorek převrstven asi 2 cm destilované vody a po jejím zasáknutí byla kolona převrstvena vodou, uzavřena a byl zapnut sběrač frakcí. Rychlost eluce byla 7-8 ml/hod. Byly sbírány frakce o objemu 2 ml.

Frakce byly analyzovány pomocí TLC a porovnány se standardem (vzorek reakční směsi). Frakce obsahující požadovaný produkt a zbytek akceptoru (donor byl zcela spotřebován v reakci) byly spojeny a lyofilizovány. Čistota produktů byla stanovena pomocí HPLC a NMR, které provedli spolupracovníci v laboratoři.

## 3.6 Konjugace sacharidového ligandu na HPMA kopolymer

Enzymovou syntézou připravené disacharidy bylo nutné deprotektovat, tedy odstranit ochranní skupinu *t*Boc tak, aby na atomu C1 byl linker s volnou aminoskupinou pro konjugaci s funkcionalizovaným HPMA kopolymerem. Deprotekce byla provedena rozpuštěním lyofilizovaného disacharidu 3 nebo 5 (20mM) v 1M kyselině chlorovodíkové a vzniklý roztok byl míchán 48 hod při 4 °C. Po ověření úspěšné deprotekce pomocí TLC

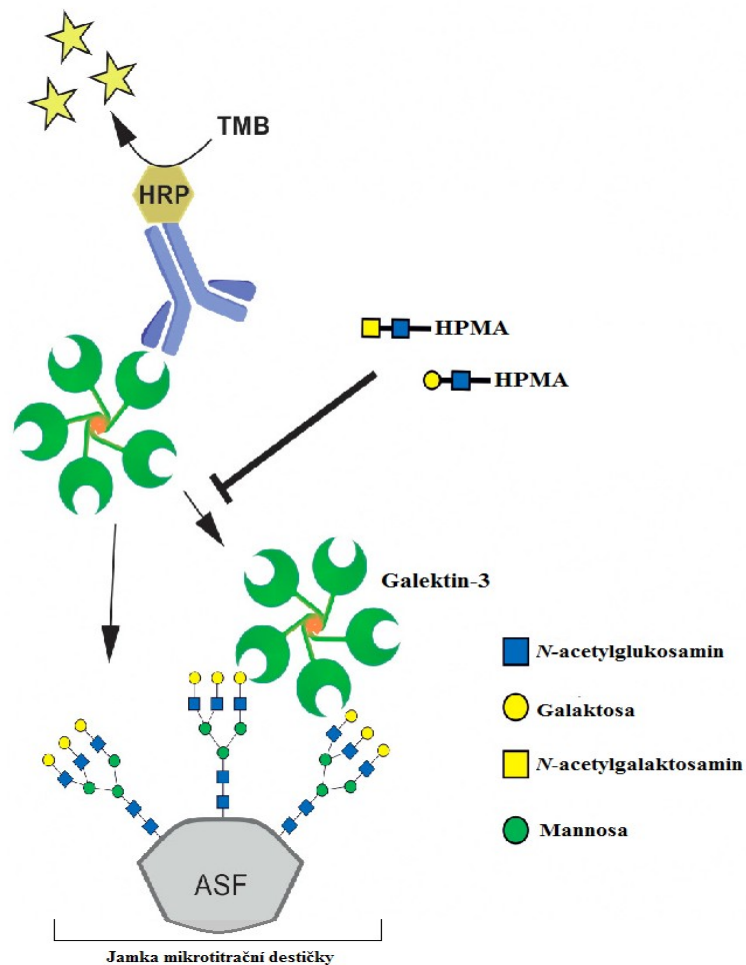
byl roztok zneutralizován přidáním iontoměniče (anexu v OH<sup>-</sup> cyklu), přefiltrován a zlyofilizován.

Dále byla v Ústavu makromolekulární chemie (skupina Biomedicínálních polymerů, Dr. P. Chytil) provedena konjugace sacharidového ligandu k funkcionalizovanému HPMa kopolymeru.

### **3.7 Imunochemické stanovení afinity ligandů ke galektinu 3**

Vazebná afinita připravených ligandů ke galektinu-3 byla stanovena pomocí imunochemická metody, ELISA.

Do jamek mikrotitračních destiček vhodných pro adsorpci proteinů (viz Materiály, kap. 3.1.1) byl nejprve navázán standardní kompetiční ligand asialofetuin (ASF, 0,1 μM; 50 μl) přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byly destičky promyty 3 × 250 μl PBST pufru pro odstranění nenavázaného ASF. Dále byl povrch jamek nespecificky vyblokován 2% BSA v PBS (250 μl) po dobu 1 hod a laboratorní teploty, čímž bylo předejito nespecifické adhezi proteinu. Po dalším promytí (3 × 250 μl PBST) byly přidány připravené roztoky ligandů (inhibitory galektinu-3) o různých koncentracích spolu s galektinem-3 a ponechány po dobu 2 h inkubovat (pro ustavení rovnováhy a distribuce galektinu-3 mezi testovaný ligand v roztoku a imobilizovaný standardní kompetiční ligand ASF). Do každé jamky bylo pipetováno vždy 25 μl ligandu o příslušné koncentraci a 25 μl galektinu-3. Poté byly destičky znovu promyty 3 × 250 μl PBST, byla přidána myší monoklonální protilátka (Anti-His<sub>6</sub>-peroxidasa, 50 μl) na specifickou detekci galektinu-3 a destička byla inkubována 1 hod při LT. Nenavázaná protilátka byla odstraněna dalším promytím (3 × 250 μl PBST). Přidáním substrátu TMB One (předem inkubovaného za laboratorní teploty, 50 μl) byla iniciována detekční reakce, která byla po 10-30 minách (absorbance při 450 nm do 1,0) ukončena přidáním 3M HCl (50 μl). Detekce byla provedena pomocí spektrofotometru Sunrise Tecan měřením absorbance při 450 nm. Schéma metody je znázorněno na obr. 11, str. 38.



**Obr. 11. Schéma metody ELISA** (převzato a upraveno z [45]). Kompetitivní ELISA s využitím glykanů nebo glykopolymerů jako kompetitivních ligandů na inhibici vazby galektinu-3 na imobilizovaný asialofetuin (ASF). Křenová peroxidasa (HRP – *horseradish peroxidase*), konjugovaná protilátka, byla použita na detekci navázaného galektinu-3. Protilátka přeměnila substrát TMB za vzniku barevného produktu pro spektrofotometrickou detekci.

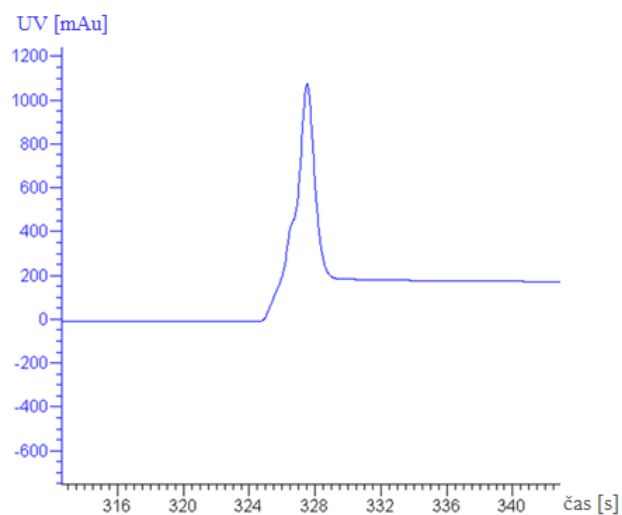
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Produkce a purifikace galektinu-3

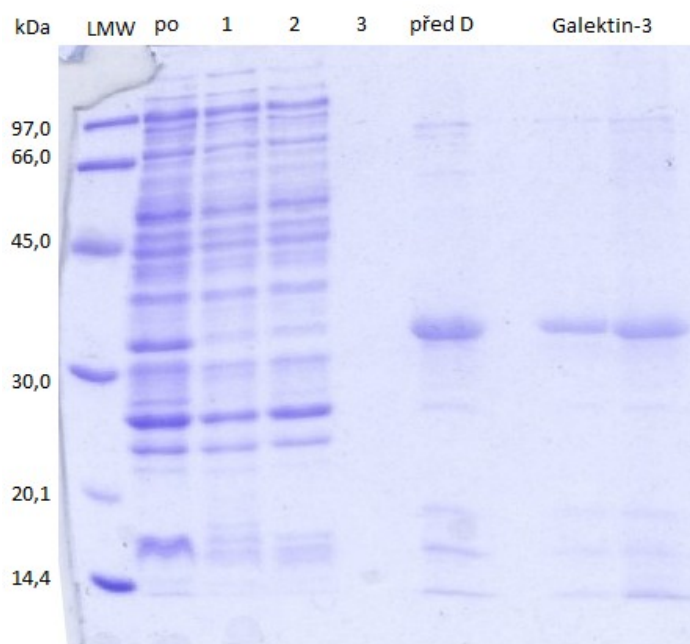
Pro stanovení vazebné afinity připravených glykanů a glykopolymerů byl použit rekombinantní galektin-3, který byl v rámci této práce vyprodukován a purifikován. Pro rekombinantní expresi galektinu-3 byly použity kompetentní buňky *E. coli* Rosetta, do kterých byl transformován vektor pETDuet-1 nesoucí genový konstrukt galektinu-3 s histidinovou kotvou (viz [45]). Po indukované expresi galektinu-3 v TB médiu bylo provedeno rozbití buněk a purifikace galektinu-3 afinitní chromatografií, přičemž byla využita histidinová kotva (detaily viz kap. 3.2, str. 30). Průběh purifikace za použití purifikačního systému Äkta prime je zobrazen na chromatogramu (viz obr. 12, str. 40). Dále byla provedena dialýza pro převedení galektinu-3 do EPBS pufru pH 7,5, v němž je po sterilní filtraci stabilní po dobu až 2 měsíců.

Z množství použitých buněk, byl vypočten výtěžek vyprodukovaného galektinu-3. Na produkci bylo použito 16 g buněk ze 1,8 l media. Bylo získáno 15 mg galektinu-3. Koncentrace proteinu byla stanovena dle Bradforda na 2,1 mg/ml, což je přepočteno na molární koncentraci  $76 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Čistota vyprodukovaného galektinu-3 byla zjištěna pomocí SDS elektroforézy. Na gel byly nanесeny i vzorky před purifikací, odebrané vzorky během purifikace a před provedením dialýzy. Molekulová hmotnost galektinu-3 je 28 kDa. Proteinový proužek galektinu-3 migruje trochu výše než by dle molekulového markeru měl, což je pravděpodobně způsobeno vysokým obsahem polárních aminokyselin v N-terminální části galektinu-3, které mohou ovlivňovat separaci na SDS gelu (viz obr. 13, str. 40).



**Obr. 12. Chromatogram – purifikace galektinu-3.** Průběh purifikace systémem Äkta prime. Na chromatogramu je vidět eluční křivka vypurifikovaného galektinu-3. Raménko na počátku eluční křivky bylo odděleno od hlavního ramena eluční křivky.

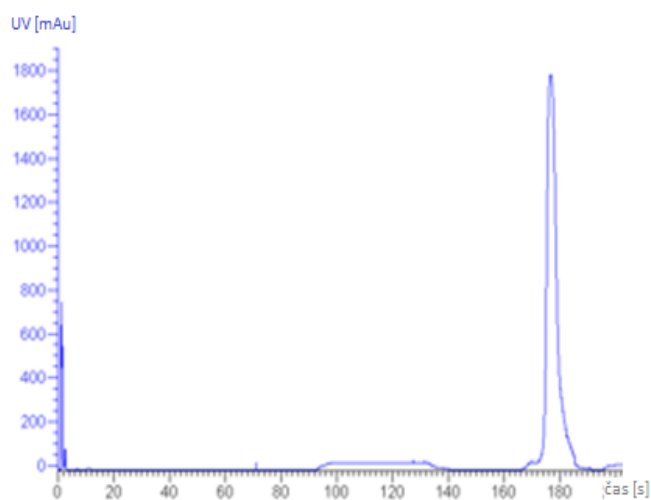


**Obr. 13. SDS gel po purifikaci galektinu-3.** Zleva, LMW (*low molecular weight*) marker, po - vzorek po filtraci, dráhy 1 a 2 vzorky odebrané během purifikace, dráha 3 konec purifikace, před D – vzorek před dialýzou, Galektin-3 – produkovaný galektin-3 ve dvou koncentracích.

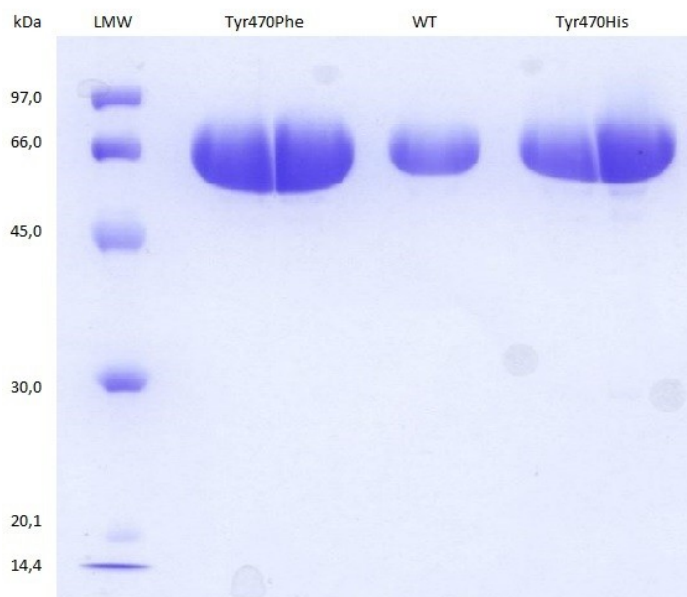
## 4.2 Produkce rekombinantních mutantů hexosaminidas

Pro enzymovou syntézu funkcionalizovaného disacharidu **3** bylo třeba rekombinantně exprimovat mutantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy, které jsou v portfoliu laboratoře. Pro produkci těchto enzymů byly využity kryokonzervy buněk *Pichia pastoris* KM71H s transformovaným plasmidem nesoucím gen mutantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus* (s mutací Tyr470Phe a Tyr470His). Exprese proteinu byla indukována methanolem, který *P. pastoris* využívá jako zdroj uhlíku.

Exprimované extracelulární  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy byly purifikovány pomocí iontové výměnné chromatografie (silný katex při pH 3,5) na systému Äkta prime plus. Průběh purifikace je zaznamenán na chromatogramu (viz obr. 14). Čistota enzymů byla ověřena SDS elektroforézou (viz obr. 15, str. 42), pro porovnání byl na gel nanesen i vzorek nativní rekombinantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus*. Podařilo se vyprodukovat 16 mg/100 ml média mutantu Tyr470His *TfHex* (1,4 U/100 ml média) a 23 mg/100 ml média Tyr470Phe *TfHex* (6,7 U/100 ml média).



**Obr. 14. Chromatogram – purifikace rekombinantních  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas.** Průběh purifikace systémem Äkta prime. Na chromatogramu je vidět eluční křivka vypurifikovaného mutantu Tyr470Phe *TfHex*.

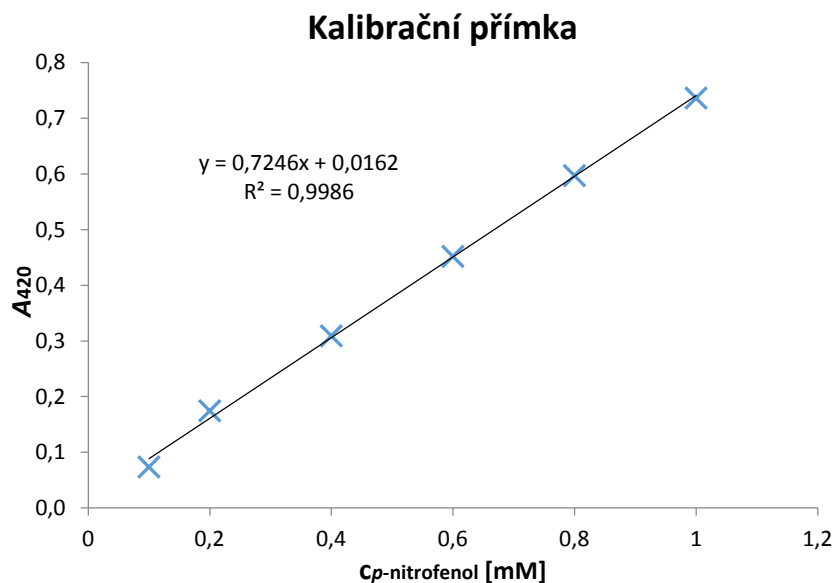


**Obr. 15. SDS gel po purifikaci  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas.** Zleva, LMW (*low molecular weight*) marker, vypurifikovaná mutantní Tyr470Phe *TfHex* (dvě koncentrace), WT – nativní *TfHex* (kontrola), vypurifikovaná mutantní Tyr470His *TfHex* (dvě koncentrace). Dle gelu je zřejmé, že se podařilo vyprodukovat čisté enzymy odpovídající svou molekulovou hmotností 66 kDa (Hmotnost jedné katalytické podjednotky; aktivní enzymy jsou dimery tvořené dvěma katalytickými podjednotkami a dvěma propeptidy o velikosti cca 15 kDa, které na tomto gelu nejsou dobře patrné).

### 4.3 Optimalizace enzymové syntézy disacharidů

#### 4.3.1 Stanovení enzymové aktivity

Po vyprodukování potřebných enzymů bylo nutné stanovit jejich aktivitu k daným substrátům. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 420 nm. Nejprve byla provedena kalibrace na *p*-nitrofenol (viz kalibrační přímka, obr. 16, str. 43), z níž byla vypočtena konstanta úměrnosti *k*, pro výpočet koncentrace vzniklého *p*-nitrofenolu v reakci (a tedy reakční konverze). Ke stanovení aktivity byla provedena reakce enzymu s příslušným substrátem a pufrem, tak aby byl celkový objem vždy 50  $\mu$ l. Reakce probíhala 10 min a byla ukončena přidáním 1 ml 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Stanovené aktivity jsou uvedeny v tabulce 1, str. 43.



**Obr. 16. Kalibrační přímka.** Kalibrace na *p*-nitrofenol pro stanovení enzymové aktivity. Experimentálními hodnotami byla lineární regresí proložena přímka, s rovnicí:  
 $A_{420} = 0,7246 \times C(pNP)$  Stanovená konstanta úměrnosti,  $k = 0,7246$ .

**Ukázka výpočtu enzymové aktivity**

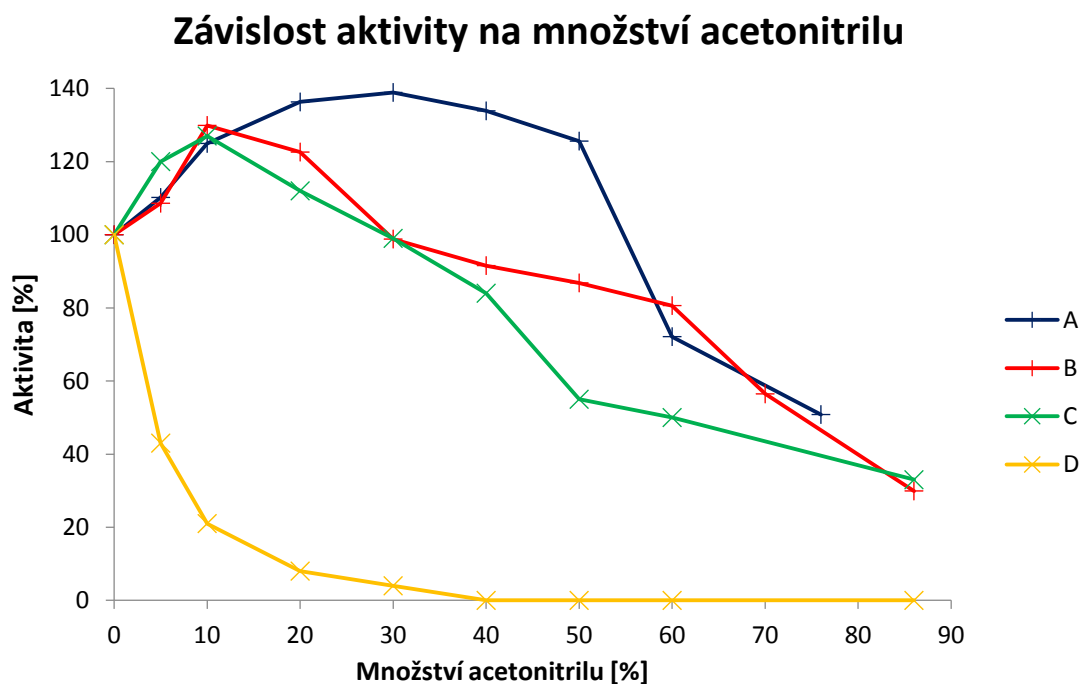
$$AKT \text{ (U/ml)} = \frac{\overline{ABS} \cdot V_{\text{celk}} \cdot \text{řed}}{k \cdot t \cdot V_{\text{enz}}} = \frac{0,1341 \cdot 50 \cdot 100}{0,7246 \cdot 10 \cdot 10} = 9,2 \text{ U/ml}$$

**Tab. 1: Stanovené aktivity enzymů**

Enzym	Hydrolytická aktivita [U/ml]	
	<i>p</i> NPGlcNAc	<i>p</i> NPGalNAc
Tyr470Phe <i>Tf</i> Hex	10,7	9,3
Tyr470His <i>Tf</i> Hex	16,6	2,2

Ze stanovených hodnot enzymové aktivity byl určen poměr aktivit k jednotlivým substrátům - GlcNAc-asa/GalNAc-asa. Pro mutant Tyr470Phe *Tf*Hex byl tento poměr stanoven jako 1,16/1 a pro mutant Tyr470His *Tf*Hex 3,9/1. GalNAc-asová aktivita mutantu Tyr470Phe *Tf*Hex byla tedy relativně vyšší, i proto byl tento enzym vhodnější na syntézu disacharidu **3**.

Další důležitou vlastností je aktivita enzymů v rozpouštědle. Pro tento případ byl jako rozpouštědlo zvolen acetonitril, který byl dříve identifikován jako optimální s vodou mísitelné rozpouštědlo dobře tolerované fungálními  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasami [63]. Stanovení enzymové aktivity bylo provedeno výše popsáním postupem, s tím rozdílem, že byl do reakční směsi přidán acetonitril o různé koncentraci. Z naměřených hodnot aktivit byl sestrojen graf závislosti zbytkové aktivity na množství acetonitrilu v % (viz graf na obr. 17). Bylo zjištěno, že GalNAc-asová aktivita mutantu Tyr470His *Tf*Hex znatelně klesla již ve 20% acetonitrilu, kdežto aktivita mutantu Tyr470Phe *Tf*Hex byla i ve 40% acetonitrilu vyšší než 90 %. Z tohoto důvodu byl pro enzymovou syntézu disacharidu **3** vybrán mutant Tyr470Phe *Tf*Hex v 40% acetonitrilu, jelikož je v této koncentraci acetonitrilu donor mnohem lépe rozpuštěn.



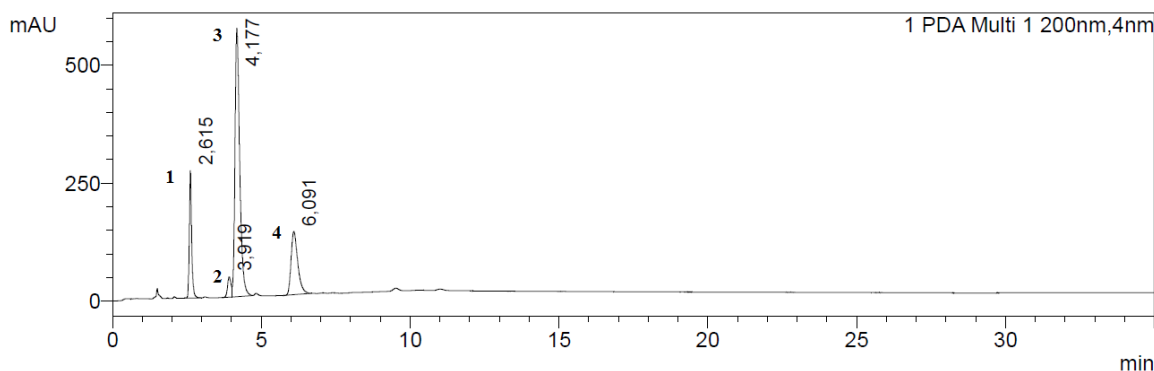
**Obr. 17. Graf závislosti enzymové aktivity na množství acetonitrilu.** **A** – Tyr470Phe *Tf*Hex GlcNAc-asa, **B** – Tyr470Phe *Tf*Hex GalNAc-asa, **C** – Tyr470His *Tf*Hex GlcNAc-asa, **D** – Tyr470His *Tf*Hex GalNAc-asa. Z grafu je patrné, že GalNAc-asová aktivita mutantu Tyr470Phe pro oba substráty příliš neklesá ani ve vysokých koncentracích acetonitrilu, oproti tomu GalNAc-asová aktivita mutantu Tyr470His klesla téměř na nulu již při 30% acetonitrilu.

### 4.3.2 Analytické transglykosylační reakce

Pro zvolení optimálních podmínek na enzymovou syntézu disacharidu **3** a složení reakční směsi byly provedeny analytické reakce s různou koncentrací reaktantů a acetonitrilu s oběma mutantními  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasami (Tyr470Phe *TfHex* a Tyr470His *TfHex*) a při různých teplotách.

Průběh reakcí byl analyzován pomocí TLC a HPLC. Z analýzy bylo zřejmé, že dvojnásobný molární nadbytek akceptoru (100mM GlcNAc-*tBoc*) není dostačující pro vyšší výtěžnost reakce, vzniká velké množství hydrolytického produktu. Za použití mutantu Tyr470Phe byl dokonce všechn produkt rozštěpen již po 6 hodinách reakce. Trojnásobný nadbytek akceptoru (150mM GlcNAc-*tBoc*) již byl optimální pro maximalizaci výtěžku transglykosylačního produktu. Produkt se neštěpí ani po 24 hodinách, optimální doba pro zastavení reakce je 4-6 hodin, po delší době přibývá hydrolyza a ubývá produkt. Ukázka chromatogramu z analýzy na HPLC je na obr. 18. Oba mutantní enzymy (Tyr470Phe *TfHex* i Tyr470His *TfHex*) jsou ve výtěžku produktu srovnatelné. Mutant Tyr470Phe *TfHex* se podařilo vyprodukovat ve větším množství, má lepší poměr GlcNAc-asa/GalNAc-asa (1,16/1; viz kap. 4.3.1) a je aktivní i při vyšších koncentracích acetonitrilu (umožnění reakce v roztoku, nikoliv v suspenzi).

Jako nejvhodnější byla tedy zvolena koncentrace akceptoru (GlcNAc-*tBoc*) 150 mM, koncentrace donoru (*p*NPGalNAc) 50 mM, enzym  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa z *T. flavus* mutant Tyr470Phe (0,1 U/ml), 40% acetonitril (kvůli lepší rozpustnosti *p*NPGalNAc), teplota 35 °C a 850 × g.



**Obr. 18. Chromatogram z HPLC – analytická transglykosylační reakce.** Vzorek z 6 h reakce, píky: **1** – *p*-nitrofenol, **2** – *p*NPGalNAc, **3** – GlcNAc-*tBoc*, **4** – produkt.

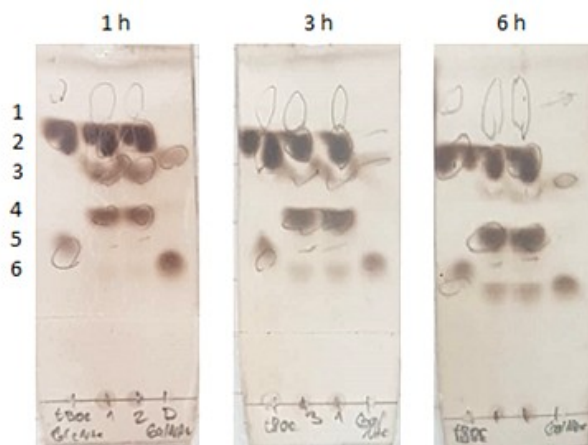
Enzymová syntéza disacharidu **5** byla provedena dle ověřeného postupu za použití  $\beta$ -galaktosidasy z *B. circulans* [62]. Optimální složení reaktantů je 30mM donor (*p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid), 150mM akceptor (GlcNAc-*t*Boc), pufr acetát sodný o pH 5,0 a  $\beta$ -galaktosidasa (aktivita v reakci 0,06 U/ml). Optimální reakční podmínky jsou 35 °C a 850 x g.

#### 4.4 Syntéza a purifikace disacharidů

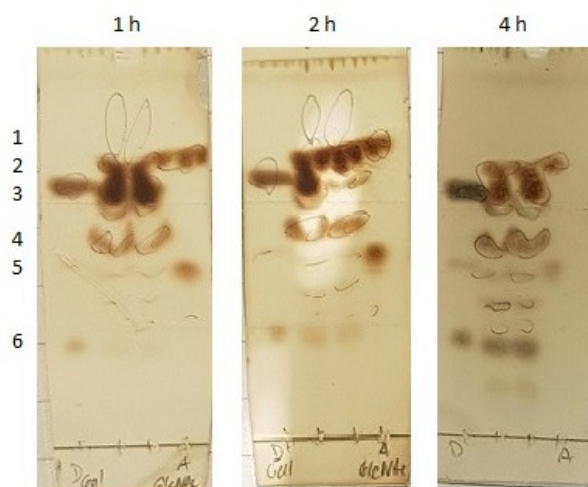
Enzymovou reakcí (reakční schémata viz obr. 9, str. 35 a obr. 10, str. 36) byly syntetizovány funkcionalizované disacharidy **3** a **5**. Průběh reakcí byl analyzován pomocí tenkovrstvé chromatografie (viz obr. 19, str. 47 a obr. 20, str. 47). Na základě této analýzy byl určen čas ukončení reakce. Reakce disacharidu **3** byla ukončena varem ve chvíli, kdy byl spotřebován téměř veškerý donor, tedy v čase 6 h a 20 min, reakce disacharidu **5** v čase 4 h a 45 min.

Po ukončení reakce byla reakční směs stočena na stolní minicentrifuze a purifikována pomocí gelové chromatografie. Vzniklé produkty byly zlyofilizovány a ve spolupráci s kolegy z laboratoře byla stanovena jejich čistota na HPLC (chromatogramy viz obr. 21, str. 48).

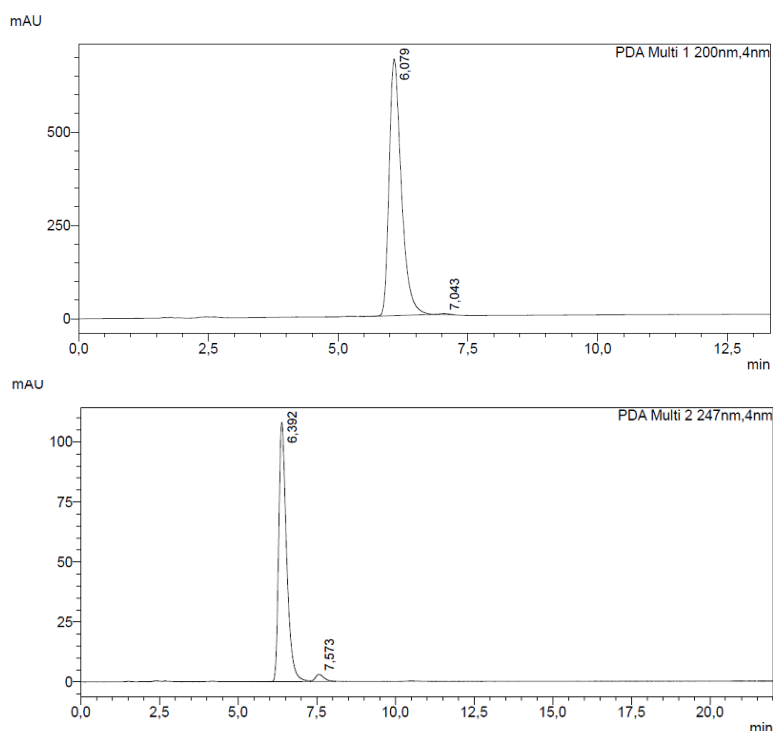
Enzymovou syntézou bylo připraveno 35 mg disacharidu **3** (výtěžek 52 %) a 82 mg nezreagovaného GlcNAc-*t*Boc (akceptoru) bylo získáno zpět. Disacharidu **5** bylo připraveno 30 mg (výtěžek 31 %), a 258 mg akceptoru GlcNAc-*t*Boc bylo získáno zpět. Je vidět, že transglykosylace s mutantním enzymem s potlačenou hydrolytickou aktivitou poskytuje znatelně vyšší výtěžek než v případě nativní  $\beta$ -galaktosidasy.



**Obr. 19. Analýza průběhu enzymové syntézy disacharidu 3 pomocí TLC.** Destičky TLC se vzorky z reakční směsi v 1 h, 3 h a 6 h. Na každé destičce vždy 4 dráhy – (zleva) GlcNAc-*t*Boc + GlcNAc, 2 × reakční směs, *p*NPGalNAc + GalNAc. Skvrny: 1 – *p*-nitrofenol, 2 – GlcNAc-*t*Boc, 3 – *p*NPGalNAc, 4 – produkt, 5 – GlcNAc, 6 – GalNAc.



**Obr. 20. Analýza průběhu enzymové syntézy disacharidu 5 pomocí TLC.** Silikagelové TLC destičky s odebranými vzorky z reakční směsi přibližně každou hodinu po zahájení reakce. Na každé destičce vždy 4 dráhy – (zleva) GlcNAc-*t*Boc + GlcNAc, 2x reakční směs, *p*NPβGal + βGal.



**Obr. 21. Chromatogramy z HPLC po purifikaci disacharidů.** Nahoře disacharid **3** - čistota 100 % a dole disacharid **5** - čistota 98 %.

#### 4.5 Odstranění chránicí skupiny z připravených sacharidů

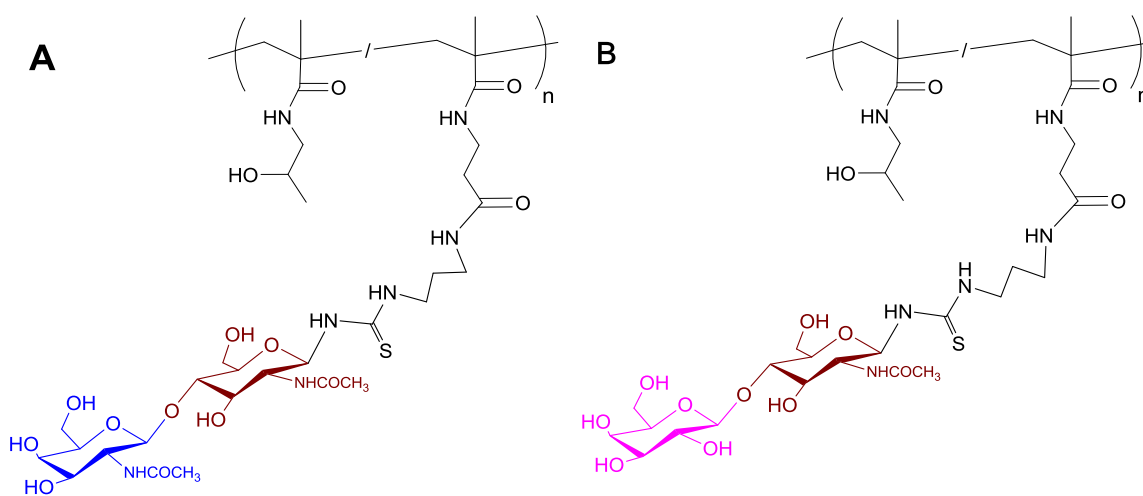
Před provedením konjugace připravených sacharidů na HPMA kopolymery bylo třeba odstranit chránicí skupinu, tak aby na sacharidu zůstala volná aminoskupina. Deprotekce byla provedena pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové. Touto metodou vznikly velké ztráty produktu, z 35 mg disacharidu **3** bylo získáno 17 mg odchráněného disacharidu (výtěžek 58 %) a z 31 mg disacharidu **5** bylo získáno 13,6 mg odchráněného disacharidu (výtěžek 54 %).

#### 4.6 Vazebná afinita připravených ligandů ke galektinu-3

Po syntéze disacharidů a odstranění chránicí skupiny byla na Ústavu makromolekulární chemie pod vedením dr. Petra Chytila provedena konjugace sacharidů na HPMA kopolymery a charakterizace výsledných multivalentních glykopolymerů (viz tab. 2, str. 49). Struktura připravených konjugátů je znázorněna na obr. 22, str. 49.

Takto byly připraveny dva multivalentní ligandy galektinu-3, prezentující dva různé disacharidové epitopy o stejném molárním obsahu na totožném polymerním nosiči. Poté byla pomocí kompetitivní metody ELISA stanovena vazebná afinita připravených

glykopolymerů ke galektinu-3, a to jako  $IC_{50}$  – koncentrace ligandů, při níž je dosaženo 50% inhibice vazby galektinu-3 na imobilizovaný kompetiční ligand ASF za daných podmínek. Stanovení bylo detekováno spektrofotometricky měřením absorbance při 450 nm. Byly proměřeny monovalentní funkcionalizované disacharidy a 2 glykopolymery o stejném molárním obsahu obou disacharidů (viz tab. 3, str. 49) ve třech nezávislých měřeních. Z naměřených hodnot byl sestaven graf v programu Graphpad Prism, experimentální body byly proloženy sigmoidální křivkou a bylo spočteno  $IC_{50}$  (grafy viz obr. 23, str. 50).



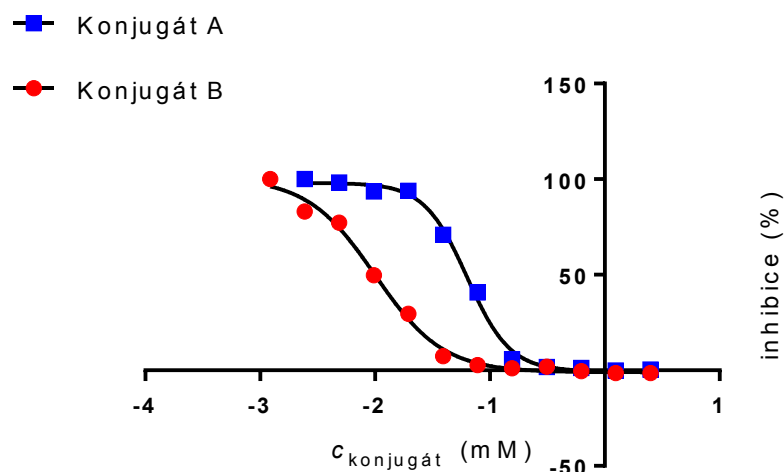
**Obr. 22. Strukturní vzorce připravených konjugátů.** **A** – konjugát HPMA kopolymeru s navázaným disacharidem LacdiNAc, **B** – konjugát HPMA kopolymeru s navázaným disacharidem LacNAc.

**Tab. 2: Charakterizace připravených glykopolymerů**

Glykopolymer	Sacharid	Hmotnost připraveného polymeru [g]	Mol% sacharidu	$M_n$ [kg/mol]	Dispersita
A	LacdiNAc	19	8	27	1,07
B	LacNAc	20	7	21,5	1,05

**Tab. 3: Stanovené inhibiční koncentrace připravených ligandů galektinu-3**

Inhibitor	$IC_{50}$ na glykan [ $\mu M$ ]	Odchylka	Počet glykanů	$IC_{50}$ na konjugát [ $\mu M$ ]
LacdiNAc	54,7	10,1	–	–
LacNAc	42,4	12,1	–	–
Konjugát A	57,1	8,7	12,1	<b>4,7</b>
Konjugát B	8,8	3,8	8,4	<b>1,0</b>



**Obr. 23. Graf stanoveného inhibičního potenciálu ke galektinu-3 pro konjugát A a B.** Z grafu je vidět, že glykopolymer obsahující LacNAc (B) vykazuje vyšší afinitu ke galektinu-3, čemuž odpovídá i nižší  $IC_{50}$  (viz tab. 3, str. 49).

Glykopolymer s LacNAc disacharidem vykazuje v kompetitivním ELISA stanovení vyšší afinitu (nižší  $IC_{50}$ ) ke galektinu-3 než analogický glykopolymer s disacharidem LacdiNAc. Z hodnoty  $IC_{50}$  na glykan a porovnáním s příslušným monovalentním standardem je vidět, že LacNAc navázaný na polymeru je přibližně pětikrát účinnější než volný LacNAc, zatímco u LacdiNAc vykazuje navázaný a volný disacharid stejnou afinitu (nedochází k aviditnímu zesílení). Konjugát HPMa kopolymeru a LacNAc disacharidu (7 mol. %) má  $IC_{50}$  1,0  $\mu\text{M}$ .

## 5. DISKUZE

Galektiny jsou proteiny plnicí mnoho signalizačních, komunikačních a dalších funkcí *in vivo*. Zejména důležitá je tvorba adhezivní sítě mezi buňkami a regulace apoptózy. Nejstudovanější galektin-3 se účastní mnoha patogenních procesů, podílí se na vzniku nádorových, kardiovaskulárních, metabolických a autoimunitních onemocněních. Zatím nejsou dostupné terapeutické inhibitory proti endogennímu galektinu-3; v klinických testech je zařazen první definovaný inhibitor galektinu-3 účinný proti plicní fibróze [14].

Příprava účinných inhibitorů galektinu-3 je tedy jednoznačně zajímavá pro své potenciální terapeutické využití. Multivalentní charakter inhibitorů pak zvyšuje afinitu ke galektinu-3 díky multivalentnímu efektu, kdy avidita výsledného systému je vyšší než prostý součet afinit jednotlivých komponent. V rámci této práce je demonstrována příprava biokompatibilních inhibitorů galektinu-3 se dvěma typy sacharidových epitopů na multivalentním polymerním nosiči (HPMA).

K přípravě disacharidových epitopů byla využita selektivní jednokroková enzymová syntéza za katalýzy glykosidasami. S výhodou je zde využito především mutantních  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas s potlačenou hydrolytickou aktivitou, které umožňují dosahovat velice dobrých výtěžků enzymové syntézy (přes 50 %). Tyto enzymy jsou produkovány v *P. pastoris* jednokrokovou purifikací s velice vysokými výtěžky (např. mutant Tyr470Phe *TfHex* 23 mg/100 ml média). Z důvodu nízké rozpustnosti donoru glykosylu (*p*NPGalNAc) ve vodě byla testována aktivita dvou mutantních  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas v závislosti na množství acetonitrilu jako kosolventu (viz graf na obr. 17, str. 44). Bylo zjištěno, že GalNAc-asová aktivita mutantu Tyr70His *TfHex* klesá již v nízké koncentraci acetonitrilu, kdežto mutant Tyr470Phe *TfHex* byl i ve vysokých koncentracích acetonitrilu stále aktivní. Z tohoto důvodu byl pro enzymovou syntézu disacharidu LacdiNAc-*t*Boc vybrán mutant Tyr470Phe *TfHex*. Jedná se zároveň o názorný příklad, jak je možno diskriminovat duální aktivitu  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas vůči jejich dvěma substrátům (*p*NPGlcNAc a *p*NPGalNAc).

Byla provedena enzymová syntéza dvou disacharidů – LacdiNAc-*t*Boc (**3**) a LacNAc-*t*Boc (**5**). Disacharid **3** byl připraven za použití mutantní Tyr470Phe *TfHex* v množství 35 mg, což odpovídá výtěžku 52 %. Oproti tomu syntéza disacharidu **5** byla provedena za použití komerční  $\beta$ -galaktosidasy a i přes stejnou koncentraci akceptoru v reakci (150mM) se podařilo připravit produkt pouze o výtěžku 31 %. V obou případech

se ale jedná o výtěžek, který by byl poměrně těžko dosažitelný pomocí klasických metod organické syntézy, která by zahrnovala řadu (de)protekcí kroků.

Po syntéze těchto disacharidů bylo provedeno odstranění chránicí skupiny *tert*-butoxykarbonylu za účelem následné konjugace na polymer. I když bylo postupováno dle publikovaného postupu [44], za použití 1M kyseliny chlorovodíkové a následné neutralizaci anexem, vznikly relativně velké ztráty produktu. Výtěžek po odchránění byl přibližně 58 % u disacharidu **3** a 54 % u disacharidu **5**. Lze tedy zvažovat optimalizaci odchránění aminoskupiny. Experimenty prováděné paralelně na Ústavu makromolekulární chemie s odchráněním *in situ* v rámci tohoto projektu (např. pomocí kyseliny trifluoroctové) se neukázaly jako optimální z důvodů nereprodukovatelnosti výtěžku konjugace, nedokonalé neutralizaci reakční směsi a následného obsahu sacharidu na polymeru.

Pro stanovení vazebné afinity ligandů ke galektinu-3 bylo využito kompetitivní stanovení ELISA vyvinuté a optimalizované v rámci celého projektu. Rekombinantní lidský galektin-3 byl dle SDS gelu (viz obr. 13, str. 40) čistý a jeho biologická aktivita byla ověřena stanovením afinity s monovalentními disacharidy. Získané výsledky byly v dobré shodě s dříve publikovanými hodnotami [45].

Po navázání na polymer se jako účinnější jeví disacharid LacNAc, který vykazuje i vyšší multivalentní efekt (viz tab. 3, str. 49). Ovšem když porovnáme selektivitu těchto disacharidů, LacdiNAc vykazuje vysokou selektivitu pro galektin-3 v porovnání s galektinem-1, zatímco LacNAc je ligandem pro oba tyto galektiny [64]. Další výhodou je, že enzymová syntéza disacharidu LacdiNAc poskytuje vyšší výtěžky. Syntetické reakce lze navíc v případě potřeby dále optimalizovat, např. přidáním dalšího donoru v průběhu reakce pro doglykosylování nadbytku akceptoru, čímž dojde ke zvýšení výtěžku transglykosylačního produktu. Z těchto důvodů jsou oba modelové glykopolymeru výhodné pro další studium a přípravu pokročilejších glykopolymerů, které budou mít ideálně potenciál stát se terapeutiky pro cílenou inhibici galektinu-3 *in vivo*.

## 6. ZÁVĚR

V rámci této práce byly shrnuty současné poznatky o galektinech, o známých ligandech galektinů a o enzimech  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasach využitelných pro syntézu oligosacharidů.

V experimentální části práce byl vyprodukován rekombinantní galektin-3 s histidinovou kotvou v *E. coli* o výtěžku 15 mg.

Dále byly produkovány rekombinantní mutantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus*, konkrétně Tyr470Phe *TfHex* (23 mg/100 ml média, GalNAc-asová aktivita 6,7 U/100 ml média) a Tyr470His *TfHex* v *Pichia pastoris* (16 mg/100 ml média, GalNAc-asová aktivita 1,4 U/100 ml média).

Poté byla provedena optimalizace podmínek pro enzymovou syntézu disacharidů **3** a **5**. Byla stanovena aktivita produkovaných mutantů a byly provedeny analytické transglykosylační reakce.

Enzymovou syntézou byl za použití produkovaného mutantu Tyr470Phe *TfHex* připraven disacharid LacdiNAc-*tBoc* o výtěžku 35 mg (52 %). Dále byl za použití komerční  $\beta$ -galaktosidasy z *B. circulans* syntetizován disacharid LacNAc-*tBoc* o výtěžku 30 mg (31 %).

Po odstranění chránící skupiny *tert*-butoxykarbonylu byla provedena konjugace připravených disacharidů na funkcionalizované HPMA kopolymery ve spolupráci s Ústavem Makromolekulární chemie. Pomocí metody ELISA byl stanoven inhibiční potenciál těchto glykopolymerů ke galektinu-3. Jako nejúčinnější se jevil glykopolymer s obsahem 7 mol. % LacNAc ( $IC_{50}$  1,0 $\mu$ M). Takto připravované ligandy mohou být využitelné jako biokompatibilní inhibitory galektinu-3 a jsou součástí dalšího výzkumu.

## 7. LITERATURA

- [1] S. H. Barondes, D. N. Cooper, M. A. Gitt, a H. Leffler, „Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins.", *J. Biol. Chem.*, **269**, 20807–20810, 1994.
- [2] S. S. Komath, M. Kavitha, a M. J. Swamy, „Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research", *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 973–988, 2006.
- [3] F. Tatsuyoshu a R. Avraham, „Galectin-3 in angiogenesis and metastasis", *Glycobiology.*, **24**, 2014.
- [4] S. Morris, N. Ahmad, S. André, H. Kaltner, „Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7.", *Glycobiology.*, **14**, 293-300, 2004.
- [5] C. E. Römer a L. Elling, „Galectins: Structures, Binding Properties and Function in Cell Adhesion", *Biomaterials - Physics and Chemistry*, 2011.
- [6] Y. D. Lobsanov, M. A. Gitt, H. Leffler, S. H. Barondes, a J. M. Rini, „X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution.", *J. Biol. Chem.*, **268**, 27034–27038, 1993.
- [7] T. Maureen a K. Drickamer, „Chapter 9: Carbohydrate recognition in cell adhesion and signaling", in *Introduction to glycobiology*, Oxford University Press, 2011.
- [8] Y. Zick, M. Eisenstein, R. A. Goren, Y. R. Hadari, Y. Levy, D. Ronen, „Role of Galectin-8 as a Mediator of cell adhesion and cell growth", *Glycoconj J.*, **19**, 517-26, 2002.
- [9] C. Blaser, M. Kaufmann, C. Zimmermann, V. Wells, L. Mallucci, a H. Pircher, „Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells", *Eur. J. Immunol.*, **28**, 2311–2319, 1998.
- [10] J. D. Hernandez, L. G. Baum, „Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate", *Glycobiology*, **12**, 127R-36R, 2002
- [11] R. Y. Yang, G. A. Rabinovich, F. T. Liu „Galectins: Structure, function and therapeutic potential", *Expert Rev Mol Med.*, **10**, 2008
- [12] K. C. Haudek, R. J. Patterson, a J. L. Wang, „SR proteins and galectins: what's in a name?", *Glycobiology*, **20**, 1199–1207, 2010.
- [13] P. G. Voss *et al.*, „Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1", *Arch. Biochem. Biophys.*, **478**, 18–25, 2008.

- [14] S. P. Rao, X. N. Ge, a P. Sriramarao, „Regulation of Eosinophil Recruitment and Activation by Galectins in Allergic Asthma", *Front. Med.*, **4**, 2017.
- [15] F. L. de Oliveira *et al.*, „Galectin-3 in autoimmunity and autoimmune diseases", *Exp. Biol. Med.*, **240**, 1019–1028, 2015.
- [16] F.-T. Liu a G. A. Rabinovich, „Galectins as modulators of tumour progression", *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 2005.
- [17] G. Radosavljevic *et al.*, „The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression", *Immunol. Res.*, **52**, 100–110, 2012.
- [18] G. Elad-Sfadia, R. Haklai, E. Balan, a Y. Kloog, „Galectin-3 Augments K-Ras Activation and Triggers a Ras Signal That Attenuates ERK but Not Phosphoinositide 3-Kinase Activity", *J. Biol. Chem.*, **279**, 34922–34930, 2004.
- [19] H.-R. C. Kim, H.-M. Lin, H. Biliran, a A. Raz, „Cell Cycle Arrest and Inhibition of Anoikis by Galectin-3 in Human Breast Epithelial Cells", *Cancer Res.*, **59**, 4148–4154, 1999.
- [20] V. V. Glinsky *et al.*, „The Role of Thomsen-Friedenreich Antigen in Adhesion of Human Breast and Prostate Cancer Cells to the Endothelium", *Cancer Res.*, **61**, 4851–4857, 2001.
- [21] Q. Zhao *et al.*, „Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis", *Mol. Cancer*, **9**, 2010.
- [22] J. Hilkens, M. Ligtenberg, H. Vos, a S. Litvinov, „Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property", *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 359–363, 1992.
- [23] Q. Zhao *et al.*, „Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface", *Cancer Res.*, **69**, 6799–6806, 2009.
- [24] N. C. Henderson *et al.*, „Galectin-3 Expression and Secretion Links Macrophages to the Promotion of Renal Fibrosis", *Am. J. Pathol.*, **172**, 288–298, 2008.
- [25] G. Pugliese, C. Iacobini, C. Ricci, C. B. Fantauzzi, a S. Menini, „Galectin-3 in diabetic patients", *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM*, **52**, 1413–1423, 2014.
- [26] N. Suthahar, W. C. Meijers, H. H. W. Silljé, J. E. Ho, F.-T. Liu, a R. A. de Boer, „Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update", *Theranostics*, **8**, 593–609, 2018.
- [27] G. Pugliese, C. Iacobini, C. M. Pesce, a S. Menini, „Galectin-3: An emerging all-out player in metabolic disorders and their complications", *Glycobiology*, **25**, 2014.

- [28] G. Vistoli, D. De Maddis, A. Cipak, N. Zarkovic, M. Carini, G. Aldini, „Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation.", *47*, 3-27, 2013
- [29] S.-C. Chen a P.-L. Kuo, „The Role of Galectin-3 in the Kidneys", *Int. J. Mol. Sci.*, **17** 2016.
- [30] M. Kolatsi-Joannou, K. L. Price, P. J. Winyard, a D. A. Long, „Modified Citrus Pectin Reduces Galectin-3 Expression and Disease Severity in Experimental Acute Kidney Injury", *PLoS ONE*, **6**, 2011.
- [31] P. Bojarová a V. Křen, „Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives", *Biomater. Sci.*, **4**, 2016.
- [32] G. Yilmaz, R. Becer, „Glyconanoparticles and Their Interactions with Lectins", *Polym. Chem.*, **6**, 2015.
- [33] K. L. Hess *et al.*, „Engineering Immunological Tolerance Using Quantum Dots to Tune the Density of Self-Antigen Display", *Adv. Funct. Mater.*, **27**, 2017.
- [34] J. Kopecek a P. Kopeckova, „HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 2010.
- [35] T. Lammers, „Drug targeting to tumors using HPMA copolymers", 2009
- [36] J. Shiah, M. Dvorak, P. Kopeckova, a J. Kopecek, „Biodistribution and antitumor efficacy of long-circulating *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer–doxorubicin conjugates in nude mice", *Eur. J. Cancer*, **37**, 2001.
- [37] Y. Noguchi, J. Wu, R. Duncan, a H. Maeda, „Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues", *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1998.
- [38] E. J. Kwon, J. M. Bergen, I. K. Park, a S. H. Pun, „Peptide-modified vectors for nucleic acid delivery to neurons", *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, **132**, 230–235, 2008.
- [39] H. Dozono *et al.*, „HPMA Copolymer-Conjugated Pirarubicin in Multimodal Treatment of a Patient with Stage IV Prostate Cancer and Extensive Lung and Bone Metastases", *Target. Oncol.*, **11**, 101–106, 2016.
- [40] E. Koziolová *et al.*, „A tumor-targeted polymer theranostics platform for positron emission tomography and fluorescence imaging", *Nanoscale*, **9**, 10906–10918, 2017.

- [41] H. Wang, W. Huang, J. Orwenyo, A. Banerjee, G. R. Vasta, a L.-X. Wang, „Design and synthesis of glycoprotein-based multivalent glyco-ligands for influenza hemagglutinin and human galectin-3", *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 2037–2044, 2013.
- [42] K. Saraboji *et al.*, „The Carbohydrate-Binding Site in Galectin-3 Is Preorganized To Recognize a Sugarlike Framework of Oxygens: Ultra-High-Resolution Structures and Water Dynamics", *Biochemistry (Mosc.)*, **51**, 296–306, 2012.
- [43] S. Böcker, D. Laaf, a L. Elling, „Galectin Binding to Neo-Glycoproteins: LacDiNAc Conjugated BSA as Ligand for Human Galectin-3", *Biomolecules*, **5**, 1671–1696, 2015.
- [44] D. Laaf, P. Bojarová, H. Pelantová, V. Křen, a L. Elling, „Tailored Multivalent Neo-Glycoproteins: Synthesis, Evaluation, and Application of a Library of Galectin-3-Binding Glycan Ligands", *Bioconjug. Chem.*, **28**, 2832–2840, 2017.
- [45] L. Bumba, D. Laaf, V. Spiwok, L. Elling, V. Křen, a P. Bojarová, „Poly-*N*-Acetyllactosamine Neo-Glycoproteins as Nanomolar Ligands of Human Galectin-3: Binding Kinetics and Modeling", *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 372, 2018.
- [46] K. Peterson *et al.*, „Systematic Tuning of Fluoro-galectin-3 Interactions Provides Thiodigalactoside Derivatives with Single-Digit nM Affinity and High Selectivity", *J. Med. Chem.*, **61**, 1164–1175, 2018.
- [47] J. Garcia-Hartjes *et al.*, „Picomolar inhibition of cholera toxin by a pentavalent ganglioside GM1os-calix[5]arene", *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 4340–4349, 2013.
- [48] S. Bernardi *et al.*, „Clicked and long spaced galactosyl- and lactosylcalix[4]arenes: new multivalent galectin-3 ligands", *Beilstein J. Org. Chem.*, **10**, 1672–1680, 2014.
- [49] W. B. Turnbull a J. F. Stoddart, „Design and synthesis of glycodendrimers", *Rev. Mol. Biotechnol.*, **90**, 231–255, 2002.
- [50] P. Bojarová, „Glykosyltransferasy". Biochemie a biomedicína sacharidů, 2017.
- [51] C. Fischer a T. Kleinschmidt, „Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review", *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2018.
- [52] P. Bojarová, „Glykosidhydrolasy". Biochemie a biomedicína sacharidů, 2017.
- [53] K. Slámová, P. Bojarová, L. Petrásková, a V. Křen, „ $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase: What's in a name...?", *Biotechnol. Adv.*, **28**, 682–693, 2010.
- [54] M. Horsch, C. Mayer, U. Sennhauser, a D. Rast, „ $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents", *Pharmacol Ther*, **76**, 187–218, 1997.

- [55] K. Zitta, E. V. Wertheimer, a P. V. Miranda, „Sperm *N*-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida", *MHR Basic Sci. Reprod. Med.*, **12**, 557–563, 2006.
- [56] J. Škerlová *et al.*, „Crystal structure of native  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase isolated from *Aspergillus oryzae* sheds light onto its substrate specificity, high stability, and regulation by propeptide", *Febs J.*, **285**, 2017.
- [57] H. Ryšlavá *et al.*, „Enzymatic characterization and molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase", *FEBS J*, **278**, 2469–84, 2011.
- [58] P. Fialová, D.-J. Namdjou, R. Ettrich, a V. Přikrylová, „Combined Application of Galactose Oxidase and  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase in the Synthesis of Complex Immunoactive *N*-Acetyl-D-galactosaminides", *Adv. Synth. Catal.*, **347**, 997–1006, 2005.
- [59] N. Kulik, K. Slámová, R. Ettrich, a V. Křen, „Computational study of  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase from *Talaromyces flavus*, a glycosidase with high substrate flexibility", *BMC Bioinformatics*, **16**, 2015.
- [60] K. Slámová *et al.*, „Synthesis of Derivatized Chitooligomers using Transglycosidases Engineered from the Fungal GH20  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase", *Adv. Synth. Catal.*, **350**, 2015.
- [61] K. Slámová *et al.*, „Sequencing, cloning and high-yield expression of a fungal  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase in *Pichia pastoris*", *Protein Expr. Purif.*, **82**, 212–217, 2012.
- [62] A. Vetere, L. Novelli, a S. Paoletti, „On the Effect of the Aglycon Structure of Three Aryl  $\beta$ -D-Galactosides on the Yield and the Regioselectivity of the Transglycolytic Synthesis of *N*-Acetyllactosamine", *J. Carbohydr. Chem.*, **18**, 1999.
- [63] P. Fialová *et al.*, „Hydrolytic and transglycosylation reactions of *N*-acyl modified substrates catalysed by  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidases", *Tetrahedron*, **60**, 693–701, 2004.
- [64] S. Böcker a L. Elling, „Biotinylated *N*-Acetyllactosamine- and *N,N*-Diacetyllactosamine-Based Oligosaccharides as Novel Ligands for Human Galectin-3", *Bioengineering*, **4**, 31, 2017.

