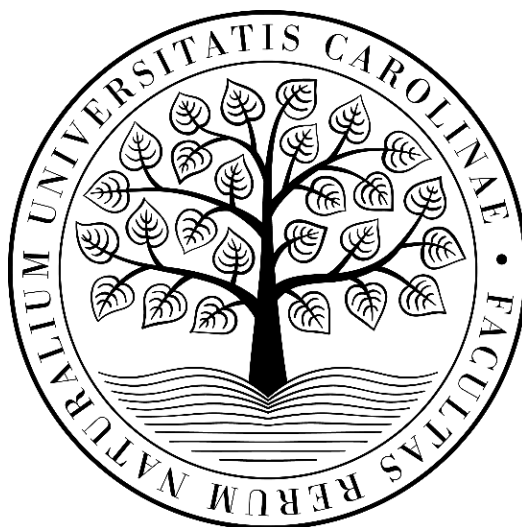


**UNIVERZITA KARLOVA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Marek Šimeček

**Nízkomolekulární glykomimetika s afinitou k lidským galektinům**

**Small-molecule glycomimetics with affinity to human galectins**

Bakalářská práce

Školitel: prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.

Konzultantka: doc. RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Praha 2022

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc., a konzultantce doc. RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D., za odborné vedení bakalářské práce a poskytnutí rad a informací při jejím zpracovávání. Děkuji členům Laboratoře biotransformací za pomoc a konzultace během práce v laboratoři. Dále děkuji doktorce Lucii Petráskové za HPLC analýzu a doktorce Heleně Pelantové za NMR analýzu syntetizovaných ligandů.

## **Abstrakt:**

Galektiny jsou živočišné lektiny schopné vázat  $\beta$ -galaktosidy. Dosud bylo objeveno šestnáct lidských galektinů, které jsou děleny do tří typů. Chimerický galektin-3 (Gal-3) o hmotnosti 28 kDa je monomer se schopností oligomerizace. Prototypický galektin-1 (Gal-1) o hmotnosti 15 kDa se skládá ze dvou stejných podjednotek spojených elektrostatickou interakcí. Galektiny zprostředkovávají *in vivo* buněčné děje jako je adheze a mezibuněčná komunikace. Kromě toho se účastní patogenních procesů, jako je vývoj nádoru, fibrotizace a karcinogeneze. Při těchto patogenních stavech bývají nadměru exprimovány, a proto mohou sloužit jako biomarkery. Galektiny mohou též sloužit jako terapeutické cíle při léčbě onemocnění spojených s jejich nadprodukcí.

V této práci byly exprimovány rekombinantní galektiny-1 a -3 v buňkách *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS jako konstrukty nesoucí histidinovou kotvu na N-konci ve vektoru pETDuet-1 a purifikovány chelatační afinitní chromatografií s  $\text{Ni}^{2+}$  ionty. Dále byly připraveny dva deriváty thiodigalaktosidu metodou azid-alkynové Huisgenovy cykloadice katalyzované Cu(I), které nesou aromatické substituenty na C-3 galaktosylových jednotek (fenyl, acetofenyl). Připravené ligandy byly purifikovány sloupcovou chromatografií na silikagelu. Struktura ligandů byla ověřena pomocí NMR spektroskopie a čistota ligandů byla ověřena pomocí HPLC. Stanovení afinity ligandů k oběma galektinům bylo provedeno metodou ELISA v kompetitivním uspořádání.

## **Klíčová slova:**

azid-alkynová Huisgenova cykloadice; galektin; glykomimetikum; inhibitor; thiodigalaktosid

## **Abstract:**

Galectins are animal lectins capable of binding  $\beta$ -galactosides. To date, sixteen human galectins have been discovered and are divided into three groups. The 28 kDa chimeric galectin-3 (Gal-3) is a monomer with the ability to oligomerize. The 15 kDa prototypical galectin-1 (Gal-1) consists of two identical subunits joined by an electrostatic interaction. Galectins mediate cellular processes such as adhesion and intercellular communication *in vivo*. In addition, they are involved in pathogenic processes such as tumor development, fibrotization, and carcinogenesis. In these pathogenic conditions, they are overexpressed and therefore can serve as biomarkers. Galectins may also serve as therapeutic targets in the treatment of diseases associated with their overexpression. In this work, recombinant galectins-1 and -3 were expressed in *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS cells as constructs carrying an N-terminal histidine anchor in the pETDuet-1 vector and were purified by chelation affinity chromatography with  $\text{Ni}^{2+}$  ions. Furthermore, two thiodigalactoside derivatives were prepared by the Cu(I)-catalyzed azido-alkyne Huisgen cycloaddition method, which carry aromatic substituents on the C-3 galactosyl moieties (phenyl, acetophenyl). The prepared ligands were purified by silica gel column chromatography. The structure of the ligands was verified by NMR spectroscopy and the purity of the ligands was verified by HPLC. The affinity of the ligands for both galectins was determined by ELISA in a competitive setup.

## **Keywords:**

azide-alkyne    Huisgen    cycloaddition;    galectin;    glycomimetic;    inhibitor;  
thiodigalactoside

## Teoretická část

### Seznam použitých zkratk

|                |                                                                                                              |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A549           | buněčná linie adenokarcinomu lidských plic                                                                   |
| AEC2           | alveolární epiteliální buňky typu 2 ( <i>alveolar epithelial cells 2</i> )                                   |
| AMI            | akutní infarkt myokardu ( <i>acute myocardial infarction</i> )                                               |
| ASF            | asialofetuin                                                                                                 |
| BAL            | bronchoalveolární laváž ( <i>bronchoalveolar lavage</i> )                                                    |
| BSA            | hovězí sérový albumin ( <i>bovine serum albumine</i> )                                                       |
| CD4+           | diferenciační skupina 4 ( <i>cluster of differentiation 4</i> )                                              |
| CD8+           | diferenciační skupina 8 ( <i>cluster of differentiation 8</i> )                                              |
| CRD            | doména rozpoznávající sacharidy ( <i>carbohydrate recognition domain</i> )                                   |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                                                                      |
| EDTA           | kyselina ethylendiamintetraoctová                                                                            |
| EGFR           | receptor pro epidermální růstový faktor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )                          |
| EPBS           | fosfátový pufr s přídavkem EDTA                                                                              |
| ERK            | kináza regulovaná extracelulárním signálem ( <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )                  |
| FAK1           | fokální adhezní kináza ( <i>focal adhesion kinase 1</i> )                                                    |
| F-MLP          | <i>N</i> -formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-fenylalanin ( <i>N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine</i> ) |
| 5-FU           | 5-fluoruracil                                                                                                |
| HF             | srdeční selhání ( <i>heart failure</i> )                                                                     |

|                       |                                                                                                                                              |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HIF-1 $\alpha$        | faktor 1 $\alpha$ indukovatelný hypoxií ( <i>hypoxia-inducible factor-1<math>\alpha</math></i> )                                             |
| HIF-1 $\beta$         | faktor 1 $\beta$ indukovatelný hypoxií ( <i>hypoxia-inducible factor-1<math>\beta</math></i> )                                               |
| His <sub>6</sub> -tag | polyhistidinová kotva His <sub>6</sub>                                                                                                       |
| HRAS                  | H izoforma RAS (kryší sarkom), kterou poprvé popsal Harvey ( <i>V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i> )                     |
| HRE                   | prvek regulovaný hormony ( <i>hormone response element</i> )                                                                                 |
| IgE                   | imunoglobulin E                                                                                                                              |
| IL-1, -2, -5          | interleukin-1, -2, -5                                                                                                                        |
| IMAC                  | chelatační afinitní chromatografie ( <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> )                                                  |
| IPF                   | idiopatická pulmonární fibróza                                                                                                               |
| IPTG                  | isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid                                                                                                |
| JNK                   | c-Jun N-terminální kinasa ( <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )                                                                                 |
| KRAS                  | K izoforma RAS, popsána Kirstenem ( <i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> )                                                      |
| LacdiNAc              | <i>N, N'</i> -diacetylaktosamin                                                                                                              |
| LacNAc                | <i>N</i> -acetylaktosamin                                                                                                                    |
| LB                    | médium Luria-Bertani                                                                                                                         |
| LBA                   | médium Luria-Bertani s agarem                                                                                                                |
| LPS                   | lipopolysacharid                                                                                                                             |
| MCP                   | modifikovaný citrusový pektin ( <i>modified citrus pectin</i> )                                                                              |
| NRAS                  | homolog RAS, který byl pojmenován podle lidských buněk neuroblastomu, kde byl poprvé nalezen ( <i>neuroblastoma v-ras oncogene homolog</i> ) |

|                |                                                                                                   |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ot./min.       | otáčky za minutu                                                                                  |
| PBS            | fosfátový pufr s přidavkem NaCl ( <i>phosphate-buffered saline</i> )                              |
| PC3            | buněčná linie odvozená z karcinomu prostaty                                                       |
| PDGF           | růstový faktor odvozený od krevních destiček ( <i>platelet-derived growth factor</i> )            |
| pFAK1          | fosforylovaná fokální adhezní kináza                                                              |
| PI3K           | fosfatidylinositol-3-kináza ( <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )                              |
| PMSF           | fenylmethylsulfonyl-fluorid                                                                       |
| RAF1           | karcinom štítné žlázy                                                                             |
| RAS            | krysí sarkom ( <i>rat sarcoma</i> )                                                               |
| SDS            | dodecylsírán sodný ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )                                              |
| TB             | terrific broth medium                                                                             |
| TCR            | receptor T buněk ( <i>T-cell receptor</i> )                                                       |
| TDG            | thiodigalaktosid                                                                                  |
| TGF- $\beta$ 1 | transformující růstový faktor $\beta$ 1 ( <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i> ) |
| TLC            | tenkovrstvá chromatografie ( <i>thin-layer chromatography</i> )                                   |
| TMB ONE        | substrát pro ELISA (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin)                                                |
| TNF- $\alpha$  | faktor nádorové nekrózy $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )             |
| Tris           | 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol                                                          |
| Tris-Cl        | pufr Tris s přidavkem NaCl ( <i>Tris-buffered saline</i> )                                        |
| U937           | buněčná linie izolovaná z histiocytického lymfomu v roce 1976                                     |
| VEGF           | vaskulární endoteliální růstový faktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )              |

|        |                                                                                                                      |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VEGFR  | receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru<br>( <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> )     |
| VEGFR2 | receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 2<br>( <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> ) |
| Wnt    | signalizační cesta Wnt ( <i>wingless/integrated signalling pathway</i> )                                             |

# Obsah

|       |                                                                                                                |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Úvod .....                                                                                                     | 12 |
| 1.1   | Galektiny .....                                                                                                | 12 |
| 1.1.1 | Charakteristika galektinů .....                                                                                | 12 |
| 1.1.2 | Galektin-1 a -3 .....                                                                                          | 15 |
| 1.2   | Ligandy galektinu-1 a -3 .....                                                                                 | 17 |
| 1.2.1 | Monovalentní ligandy galektinu-1 a -3 .....                                                                    | 17 |
| 1.2.2 | Glykomimetika jako ligandy galektinu-1 a -3 .....                                                              | 20 |
| 1.2.3 | Multivalentní ligandy galektinu-1 a -3 .....                                                                   | 21 |
| 1.3   | Inhibice galektinu-1 a -3 v biomedicíně .....                                                                  | 23 |
| 1.3.1 | Galektin-1 a -3 při idiopatické pulmonární fibróze .....                                                       | 23 |
| 1.3.2 | Galektin-1 a -3 při kardiovaskulárním onemocnění .....                                                         | 25 |
| 1.3.3 | Galektin-1 a -3 při rakovině .....                                                                             | 27 |
| 2     | Cíl práce .....                                                                                                | 30 |
| 3     | Experimentální část .....                                                                                      | 31 |
| 3.1   | Použité vybavení a chemikálie .....                                                                            | 31 |
| 3.1.1 | Seznam přístrojů a vybavení .....                                                                              | 31 |
| 3.1.2 | Seznam chemikálií .....                                                                                        | 32 |
| 3.1.3 | Seznam roztoků .....                                                                                           | 35 |
| 3.2   | Produkce galektinů .....                                                                                       | 37 |
| 3.2.1 | Transformace <i>E. coli</i> .....                                                                              | 37 |
| 3.2.2 | Kultivace média .....                                                                                          | 37 |
| 3.2.3 | Purifikace galektinu-1 a galektinu-3 .....                                                                     | 38 |
| 3.2.4 | Charakterizace proteinů SDS-PAGE .....                                                                         | 39 |
| 3.2.5 | Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou .....                                                      | 40 |
| 3.3   | Syntéza 3,3'-O-disubstituovaných thiodigalaktosidů .....                                                       | 42 |
| 3.3.1 | Příprava prekursoru <i>bis</i> -{3-O-[(propynyl)methyl]-β-D-galaktopyranosyl}sulfanu (1) .....                 | 42 |
| 3.3.2 | Příprava <i>bis</i> -{3-O-[fenyl-1H-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]-β-D-galaktopyranosyl}sulfanu (2) .....          | 44 |
| 3.3.3 | Příprava <i>bis</i> -{3-O-[(4-acetofenyl)-1H-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]-β-D-galaktopyranosyl}sulfanu (3) ..... | 45 |
| 3.3.4 | Detekce průběhu organické syntézy metodou TLC .....                                                            | 46 |
| 3.4   | Metoda ELISA v kompetitivním uspořádání .....                                                                  | 47 |
| 4     | Výsledky .....                                                                                                 | 49 |

|     |                                                                           |    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 | Produkce a purifikace galektinů.....                                      | 49 |
| 4.2 | Syntéza a purifikace glykomimetik.....                                    | 51 |
| 4.3 | Stanovení vazebné afinity syntetizovaných glykomimetik ke galektinům..... | 55 |
| 5   | Diskuse .....                                                             | 58 |
| 6   | Závěr.....                                                                | 63 |
| 7   | Zdroje .....                                                              | 64 |
| 8   | Přílohy .....                                                             | 69 |

# 1 Úvod

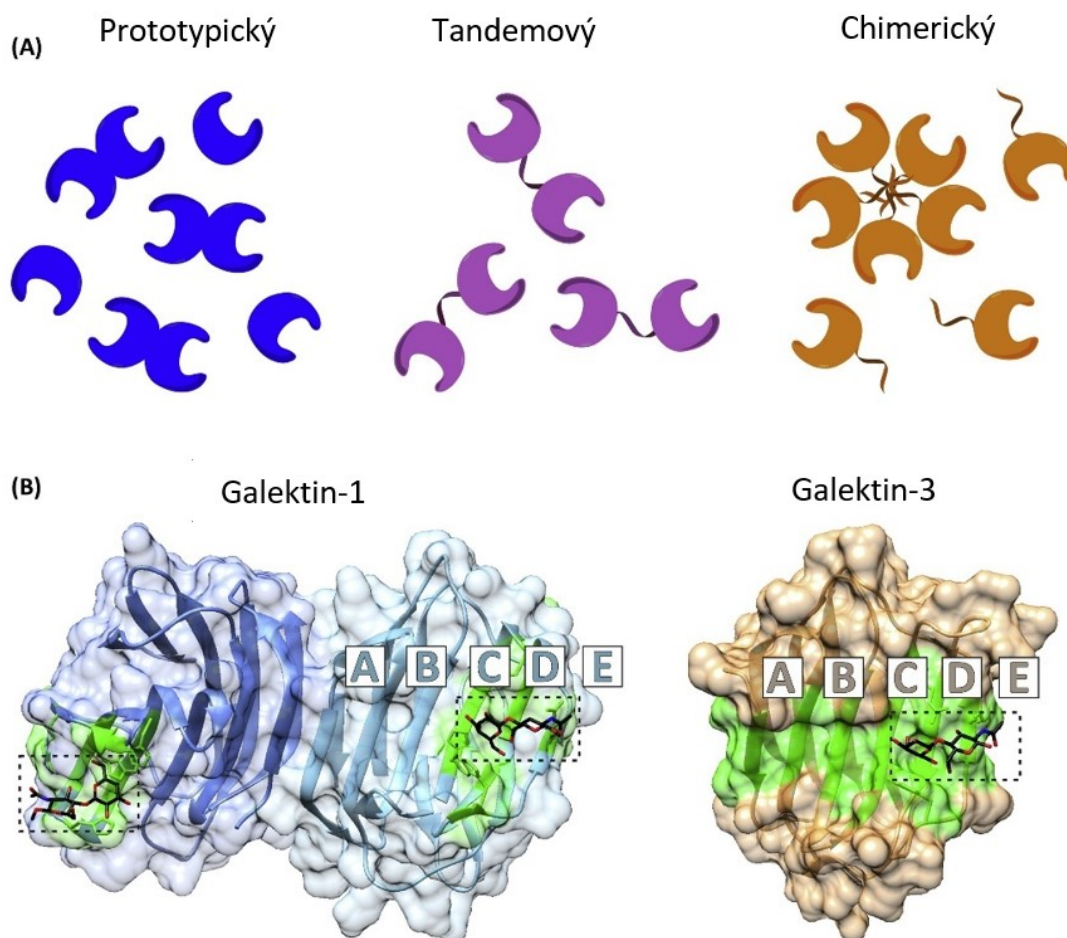
## 1.1 Galektiny

### 1.1.1 Charakteristika galektinů

Lektiny jsou proteiny vázající sacharidy, které mohou rozpoznat různé sacharidy jak volné, tak navázané na proteiny, lipidy i glykokonjugáty, a to jak na povrchu buněk, tak v extracelulární matrix. Na rozdíl od enzymů zpracovávajících sacharidy nedochází při vazbě sacharidu na lektin k přeměně sacharidové molekuly. Lektiny zprostředkovávají buněčnou adhezi, podporují mezibuněčné interakce nebo dokážou rozpoznat patogeny [1]. Většina živočišných lektinů se řadí do čtyř rodin: C-typ, P-typ, pentraxiny a S-typ (galektiny) [2]. Členové rodiny galektinů jsou přítomni ve všech organismech od nematod po savce [1]. Galektiny jsou definované dvěma základními vlastnostmi. První je charakteristická aminokyselinová sekvence, druhá je jejich afinita pro  $\beta$ -galaktosidy [2]. Dodnes bylo objeveno šestnáct savčích galektinů, které mají vysokou sekvenční homologii ve své doméně rozpoznávající sacharidy (CRD, *carbohydrate recognition domain*), dlouhé 135 aminokyselin [3,4]. Jsou to rozpustné proteiny syntetizované na volných ribozomech v cytosolu [5]. Rodina galektinů je rozdělena do tří rozdílných typů: prototypické, tandemové a chimerické. Prototypické galektiny zahrnující galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 a -15 mají dvě identické CRD spojené elektrostatickými interakcemi. Tandemová rodina zahrnuje galektin-4, -6, -8, -9 a -12, které mají dvě neidentické CRD spojené peptidovým můstkem. Jediný chimerický galektin je galektin-3 [6]. Galektiny jsou díky svému dimernímu nebo multimernímu charakteru schopny zprostředkovat buněčnou komunikaci zesílením („*cross-linking*“) [7]. Na CRD galektinů se nachází vždy jedno vazebné místo pro sacharidový ligand. Dimerní galektiny mají tak dvě vazebná místa pro sacharidové ligandy, buď s identickou (u prototypických galektinů) nebo rozdílnou (u tandemových galektinů) specifitou. Různé galektiny jsou specifické pro různé oligosacharidy, jelikož se liší ve své schopnosti rozpoznávat další sacharidové jednotky připojené ke galaktóze. Galektiny mohou utvářet uspořádané komplexy až mřížky s multivalentními glykokonjugáty, podobně jako komplexy tvořené protilátkami a multivalentními antigeny [1].

Z galektinů jsou nejlépe prozkoumané a nejčtenější galektin-1 (Gal-1) a galektin-3 (Gal-3) [8]. Některé galektiny se vyskytují v mnoha různorodých tkáních, jiné jsou více specifické [1]; například Gal-3 se nachází v aktivovaných makrofázích,

eozynefilech, neutrofilech, žirných buňkách nebo v epitelu gastrointestinálního a dýchacího traktu, zatímco Gal-7 se nachází hlavně v keratinocytech [9]. Galektiny mohou působit autokrinně i parakrinně [6], jsou přítomny vně i uvnitř buněk a jejich účinek se liší v závislosti na extracelulární nebo intracelulární lokalizaci. Extracelulární galektiny se mohou vázat ke glykokonjugátům na povrchu buňky, které mají vhodné oligosacharidy zakončené  $\beta$ -galaktosidem. Také se vážou k některým glykoproteinům, jako je laminin, fibronectin, hensin a elastin [1]. Intracelulární funkce Gal-1 a Gal-3 zahrnují změnu buněčné proliferace přes nezávislé cesty [6]. Jejich schopnost oligomerizovat spojuje glykoproteiny nebo glykolipidy nacházející se na povrchu buněk. Takto galektiny regulují například adhezi buněk, migraci, buněčný transport, molekulární interakce jako buněčná signalizace, apoptóza, či pre-mRNA štěpení. Změny nebo poruchy galektinové exprese jsou běžně spojované s nemocemi, jako je rakovina [10]. Galektiny jsou sekretovány extracelulárně pomocí neklasické (tzv. „non-ER-Golgi“) cesty [11], protože nemají signální sekvenci pro sekreci proteinů klasickou sekreční cestou. U rakovinného bujení je pozorováno, že galektiny jsou více exprimovány v rakovinných buňkách, zvláště v těch, které obvykle daný galektin neexprimují. Naopak v některých případech dochází ke snížení exprese galektinu u buněk, které za normálních podmínek exprimují velké množství daného galektinu, pokud se z nich stanou buňky rakovinné [1]. Galektiny ovlivňují buněčnou signalizaci interakcí s určitými proteiny v cytosolu, jako jsou například RAS (*rat sarcoma*) proteiny nebo  $\beta$ -katenin. Dále mohou ovlivňovat sestřih RNA vazbou komponentů spliceozomového komplexu v jádře. Mnoho galektinů (zvláště Gal-3 a -8) se shlukují v okolí narušených vezikul a vážou se na nechráněné glykanové struktury. Takto zahajují proces selektivní autofágie, která odstraní poškozené organely [5]. Vně buňky propojují galektiny různé proteiny na buněčném povrchu, jako jsou receptory cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR), integriny a receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR), což jsou proteiny, které jsou součástí signalizace růstu a buněčné adheze [6].



**Obrázek 1: Struktura galektinů** (převzato z [9]). A) Prototypické galektiny jsou homodimery, jejichž dvě identické CRD jsou spojeny elektrostatickými silami. Nekovalentní spojení obou CRD je závislé na koncentraci galektinu a není ovlivněno ligandy. Tandemové galektiny mají dvě rozdílné domény (N-terminální a C-terminální), které jsou spojeny polypeptidovým řetězcem. Gal-3 je jediný chimerický galektin, který je složen z C-terminální a kolagenové N-terminální domény. B) Krystaly CRD lidského Gal-1 (vlevo) a Gal-3 (vpravo) navázané na *N*-acetylaktosamin. Uhlíky jsou znázorněny černě, kyslíky červeně a dusíky modře. Struktura *N*-acetylaktosaminu (LacNAc) je znázorněna v čárkovaném obdélníku. Příslušná vazebná místa jsou vyznačena zeleně.

### 1.1.2 Galektin-1 a -3

Gal-3 je protein o velikosti 28 kDa, který se skládá ze dvou domén: C-terminální a N-terminální domény [12,13]. Vazbu k sacharidům zprostředkovává C-terminální doména, zatímco vazbu k neglykosylovaným molekulám zajišťuje N-terminální doména [14]. Jeho aminokyselinová sekvence se sestává z 243-286 aminokyselin a jeho CRD je velice podobná ostatním galektinům [15]. CRD je zodpovědná za rozpoznávání  $\beta$ -galaktózových oligosacharidů a N-terminální doména, skládající se z opakující se sekvence PGAYPG [16], se podílí na uspořádání galektinových podjednotek za vzniku oligomerů [17] v přítomnosti multivalentních oligosacharidů [18]. N-terminální doména obsahuje 100-150 aminokyselinových zbytků. Podle druhu a původu je složena ze sekvencí bohatých na prolin, glycin, tyrosin a glutamin [19]. Obě domény jsou pro kompletní aktivitu Gal-3 nezbytné. C-terminální fragment Gal-3, tzv. Gal-3C, který obsahuje CRD, ale postrádá N-terminální doménu, váže glykokonjugáty na buněčném povrchu, ale nevyvolává mezibuněčnou interakci, jelikož nedochází k nezbytnému zesílení, které zprostředkovává N-terminální doména [11]. Struktura Gal-3 se skládá ze dvou antiparalelních  $\beta$ -listů obsahujících sedm a pět vláken. Vazebné místo pro sacharidy je tvořeno mělkým žlábkem, který se skládá ze sedmivláknového  $\beta$ -listu a okolních smyček [20]. Gal-1 obsahuje dvě podjednotky o hmotnosti 15 kDa, které tvoří elektrostatický homodimer v závislosti na koncentraci v roztoku [21]. Dimerní forma Gal-1 je převládající a přispívá k celkově vyšší afinitě ke glykanům v porovnání s monomerní formou. Tvorba dimerů Gal-1 umožňuje bivalentní interakce s glykany na buněčném povrchu, což vede k celkovému zvýšení avidity a umožňuje tvorbu sítě složené z glykanů a Gal-1 [22]. Gal-1 se vyskytuje v oxidované a redukované formě [23]. Proapoptické a imunomodulační funkce jsou spojeny s redukovanou formou Gal-1, zatímco proliferální účinky jsou spojovány s oxidovanou formou [22]. Každý monomer Gal-1 obsahuje šest cysteinových zbytků, což má za následek velkou citlivost k oxidaci. Cysteinové zbytky musí být v redukovaném stavu, aby si Gal-1 zachoval lektinovou aktivitu, protože oxidovaný Gal-1 lektinovou aktivitu postrádá. Intramolekulární disulfidové můstky tvoří při oxidaci na struktuře Gal-1 konformační změny, které zabraňují jeho dimerizaci. Přítomnost ligandů Gal-1 posouvá rovnováhu mezi monomerním a dimerem k dimerizaci a chrání Gal-1 před oxidací [24]. Gal-1 je tvořen z  $\beta$ -sendvičů, které tvoří dva antiparalelní  $\beta$ -skládané listy a šest  $\beta$ -vláken.  $\beta$ -Vlákna pak tvoří CRD. Při navázání laktózy se pyranózový kruh galaktózy orientuje proti tryptofanovému zbytku (Trp68) a hydroxylové skupiny na uhlících C-4 a C-6

galaktózy a C-2 a C-3 glukózy tvoří vodíkové vazby se zbytky His44, Arg,48, Asn61 a Glu71. Zbytek His52, specifický pro Gal-1, je umístěn v blízkosti laktóзовé molekuly [22]. Lidský Gal-3 je kódován genem LGALS3 lokalizovaným na chromozomu 14 s centrem q21-q22 [25], zatímco lidský Gal-1 je kódován genem LGALS1, který se nachází v chromozomu 22 s centrem q12 [26]. Gal-3 je exprimován v epiteliálních buňkách, trávicím a respiračním traktu [27] a je syntetizován a sekretován myeloidními buňkami, mezi něž patří makrofágy a mnoho dalších typů buněk [16]. Gal-3 je nadměrně exprimován při mnoha typech rakovin, jako jsou žaludeční, hepatocelulární, pankreatické karcinomy nebo melanomy, glioblastomy a nádory prsu [28]. Gal-3 se hlavně nachází v cytoplazmě nereplikujících se buněk, v jádře replikujících se buněk [12] a ve velkém množství tkání [29]. Míra exprese Gal-1 a jeho lokalizace závisí na biologickém kontextu. V endoteliálních buňkách normální tkáně se Gal-1 nachází hlavně v jádře a do extracelulárního prostoru je sekretován minimálně. Při aktivaci buňky je pak Gal-1 transportován do extracelulárního prostoru [24]. Stejně jako ostatní galektiny postrádají Gal-1 i Gal-3 sekreční signální peptid pro klasickou exocytózu zprostředkovanou vezikuly, tudíž jsou lokalizovány primárně v cytoplazmě a někdy v jádře. Když jsou sekretovány do extracelulárního prostoru neklasickou sekreční cestou, mohou interagovat s receptory a glykoproteiny na buněčném povrchu, a tím se zahájí transmembránová signální dráha k různým buněčným funkcím [14,22]. Gal-1 i Gal-3 mají schopnost interagovat s podobnými glykokonjugáty. Gal-3 interaguje například s IgE, lamininem, mucinem nebo s RNA v jádře a cytosolu [17] a Gal-1 se váže ke komponentům extracelulární matrix, jako je laminin, fibronectin, trombospondin, vitronectin a osteospondin [24]. Gal-3 se účastní mnoha fyziologických a patologických procesů. Při zánětu má Gal-3 důležitou roli jako regulační prvek, který podporuje buněčnou adhezi a napomáhá fagocytóze [11]. Lidský Gal-3 stimuluje proliferaci preadipocytů a DNA syntézu [12] a je jediný člen galektinové rodiny s proapoptickou i protiapoptickou aktivitou v závislosti na buněčné lokalizaci [27]. Při imunitní odpovědi také může reagovat s jadrovými komponenty bakteriálních lipopolysacharidů [18]. Gal-3 je pro- i protizánětlivá molekula (viz Obr. 5), zatímco Gal-1 je zapojen do homeostázy utlumením imunity T buněk. Gal-1 je všudypřítomně exprimován v celém těle a je zapojen do regulace buněčného růstu, adheze, signalizace, diferenciace, regulace imunitního systému a interakce mezi hostitelem a patogenem [22]. Dále aktivuje apoptotické programy pro T buňky, podporuje expanzi T regulačních buněk a deaktivuje buňky prezentující antigen [21]. Extracelulární Gal-1

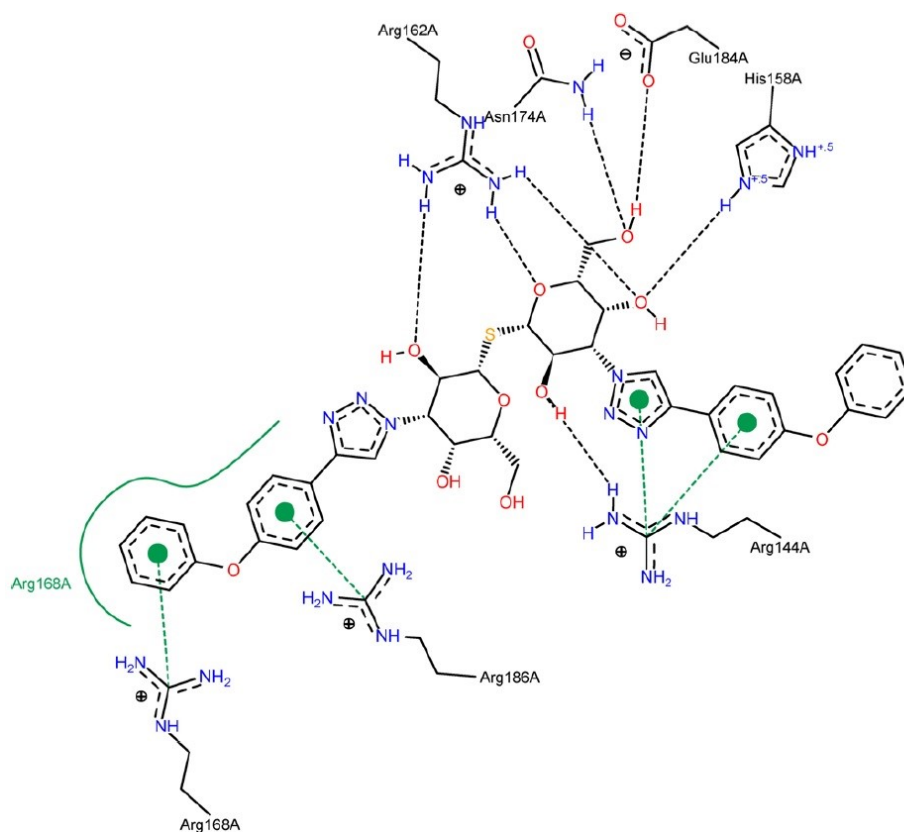
řídí mezibuněčnou interakci, interakce mezi buňkou a extracelulárním matrixem, imunitní odpověď, apoptózu a neoplastickou transformaci. Intracelulární Gal-1 řídí buněčný cyklus, sestřih RNA a transkripci [30]. Gal-1 podporuje neovaskularizaci signalizací přes receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 2 (VEGFR2) [21].

## **1.2 Ligandy galektinu-1 a -3**

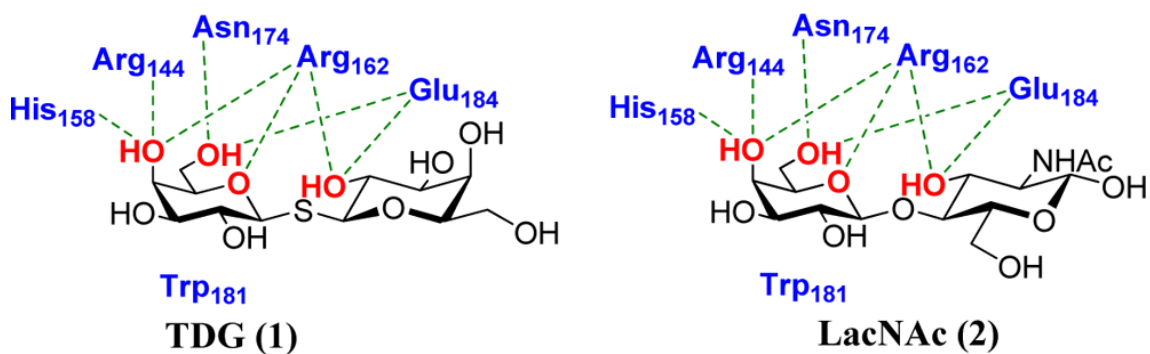
### **1.2.1 Monovalentní ligandy galektinu-1 a -3**

Inhibitory galektinů mohou být několika typů. Jednak se jedná o přirozené glykany, jednak o tzv. glykomimetika a v neposlední řadě též o nesacharidové inhibitory, zvláště peptid anginex a jeho mimetika. Nejúspěšnější peptidový inhibitor Gal-1 je právě anginex. Je to peptid, který vykazuje protiangiogenní a protinádorovou aktivitu. Monovalentní a multivalentní inhibitory Gal-1 a galektinů obecně postrádají často výraznou selektivitu vzhledem k sekvenční podobnosti galektinových CRD [22]. Většina přirozených galektinových ligandů a syntetických nízkomolekulárních inhibitorů obsahuje terminální galaktózový zbytek, který poskytuje klíčovou interakci s konzervovanou aminokyselinovou sekvencí [31]. U početné skupiny přirozeně se vyskytujících sacharidů a jejich analogů bylo zjištěno, že vážou galektiny s vysokou afinitou [8]. LacNAc je běžný disacharidový ligand pro Gal-1, Gal-3 [32] i další galektiny. LacNAc motiv je esenciální část savčích N- a O- glykanů [33], přítomný při mnoha biologických rozpoznávacích procesech. Vyskytuje se ve dvou regioizomerních formách: jako typ 1 ( $\text{Gal}\beta(1-3)\text{GlcNAc}$ ) a typ 2 ( $\text{Gal}\beta(1-4)\text{GlcNAc}$ ). LacNAc typu 1 je dobře známý prekurzor mnoha důležitých epitopů krevních skupin, jako je Lewis A, Lewis B nebo sialyl Lewis A, které jsou součástí mnoha procesů, jako je fertilizace nebo adheze patogenů. Glykosylační motivy LacNAc typu 1 jako součást struktur Lewisových epitopů nebo v repetitivních sekvencích byly často nalezeny v gastrointestinální tkáni plic nebo uroteliu, též v mateřském mléce. Tento motiv hraje důležitou roli i v tumorigenezi, a proto může plnit funkci tumorového markeru. Repetitivní sekvence struktury dimerního LacNAc typu 1 (di-LacNAc typ 1) byly nalezeny na laktosylceramidech adenokarcinomu tlustého střeva a na rakovinných buňkách nádorů tlustého střeva [7]. Opakující se LacNAc jednotky typu 2 utváří lineární poly-LacNAc oligomery, což jsou důležité strukturní složky glykoproteinů

nesoucí N- a O- glykany a glykolipidy [34]. Rozdíl v prezentaci LacNAc motivu na multivalentním nosiči může silně ovlivnit afinitu k jednotlivým galektinům [32]. Vyšší afinity, zvláště ke Gal-3, jsou docíleny s komplexnějšími sloučeninami typu poly-LacNAc (poly-Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc) [8]. poly-LacNAc je lineární oligosacharid z opakujících se disacharidových jednotek LacNAc. Je běžnou součástí struktury glykoproteinů nebo glykolipidů, které jsou umístěny na buněčném povrchu a jsou součástí glykoproteinů extracelulární matrix, jako je laminin nebo fibronectin [35]. Oligosacharidy poly-LacNAc jsou silnějšími ligandy Gal-3 než Gal-1 [36], protože Gal-3 přirozeně rozeznává poly-LacNAc strukturu na rozdíl od Gal-1, který u toho typu ligandu váže jen terminální disacharidový motiv LacNAc [32]. Jedním z disacharidů, který má strukturu podobnou LacNAc, je *N,N'*-diacetylaktosamin (GalNAc $\beta$ (1-4)GlcNAc, LacdiNAc), specifický glykanový epitop nacházející se zvláště u parazitických nematod a trematod [37]. Epitop LacdiNAc je zvýšeně exprimován v určitých parazitech, ale v savčích buňkách se vyskytuje velmi omezeně [36]. Tyto epitopy jsou schopny se specificky vázat ke Gal-3 na rozdíl od Gal-1 [15]. LacdiNAc se vyskytuje v některých savčích O- a N-glykoproteinech a má speciální funkce. Tento disacharid lze též považovat za biomarker v několika typech rakovin [28], při nichž se ve zvýšené míře vyskytuje [38]. Glykany obsahující LacdiNAc spouští v lidském organismu buněčnou imunitní odpověď přirozených zabíječských buněk [37]. Disacharidové ligandy jsou ale méně účinné pro vazbu Gal-3 než komplexnější oligosacharidové ligandy [38].



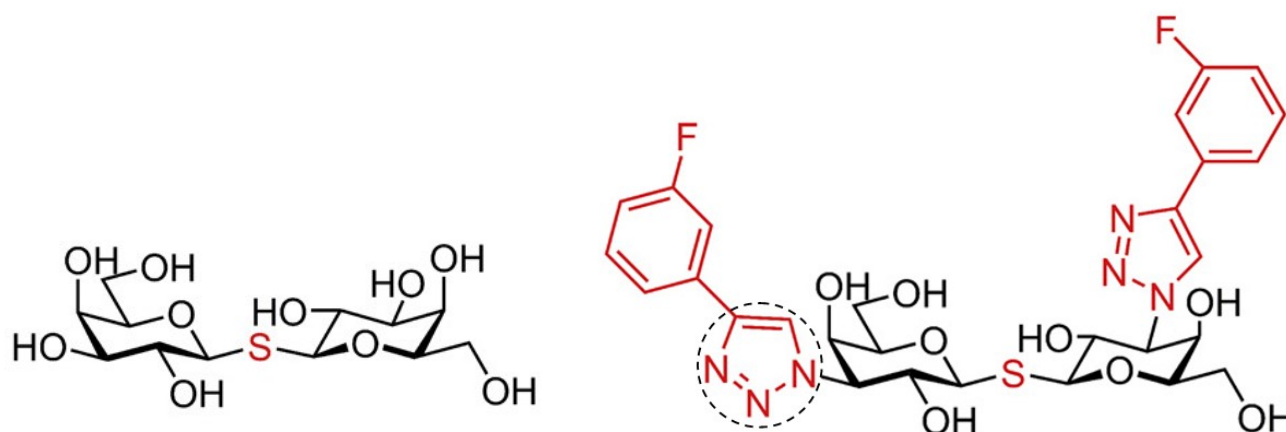
**Obrázek 2: Interakce vazebného místa Gal-3 s ligandem s triazolovou skupinou a aromatickými jádry (převzato z [39]). Interakce probíhá s Arg168, Arg186 a Arg144.**



**Obrázek 3: Komplex lidského galektinu-3 s ligandy TDG (1) a LacNAc (2) (převzato z [39]). Vodíkové můstky jsou znázorněny zeleně.**

### 1.2.2 Glykomimetika jako ligandy galektinu-1 a -3

Existuje pestré množství galektinových inhibitorů založených na různých strukturách od substituované laktózy (viz Obr. 3) přes thiodigalaktosidy ( $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid, TDG), až ke skeletům založených na monosacharidech [6]. Jedná se o skupinu tzv. glykomimetik, tj. sloučenin, které svou strukturou a typem interakce s galektinem napodobují přirozené ligandy. Jsou navržena tak, aby byla odolnější vůči enzymatickému rozkladu, biologicky dostupnější nebo měla větší afinitu a selektivitu vůči cílenému proteinu, než mají přirozené ligandy [39]. Většina glykomimetických inhibitorů byla navržena tak, aby soutěžila o vazebné místo s přirozenými ligandy a tak inhibovala účinek, který má galektin na buňky, jako je například regulace apoptózy, buněčná signalizace, adheze a migrace či angiogeneze [31]. Vhodná syntetická sloučenina pro vývoj disacharidů založených na galektinové inhibici je TDG (viz Obr. 4), který je polární [8], stabilnější než LacNAc vůči hydrolýze [40] a interaguje s galektiny s přibližně stejnou afinitou a podobným způsobem jako LacNAc nebo laktóza, jak bylo prokázáno i rentgenostrukturní analýzou [41]. TDG vykazuje vyšší afinitu ke Gal-1 než laktóza z důvodu uspořádání vazebné kapsy, kde His52, unikátní pro Gal-1, může interagovat s větším atomem síry [22]. Rovněž byl popsán účinek nesubstituovaného TDG na protinádorovou imunitní odpověď a na růst nádoru *in vivo* [22]. Předpokládá se, že O-glykosidy mají omezený poločas rozpadu v biologickém médiu, protože podléhají hydrolýze glykosidasami. Thioglykosidy jsou naopak odolnější vůči enzymové hydrolýze, a proto je u nich očekávána lepší biologická dostupnost za fyziologických podmínek [41]. Syntetické monovalentní inhibitory založené na  $\beta$ -galaktosidech s modifikovaným hydroxylem v poloze C-3 vykazují zvýšenou afinitu pro Gal-1 i Gal-3 (viz Obr. 2) oproti nemodifikovaným galaktosidům [31]. Zejména zavedení substituce aromatickými skupinami v poloze C-3 galaktózy vedlo k vývoji vysokoafinitních monovalentních inhibitorů galektinů. Multivalentní TDG konjugáty vykazovaly vynikající inhibiční účinnost i přes nízký nebo střední počet připojených ligandů [42]. Asymetrické deriváty TDG s jedním trifluorofenyltriazolovým a jedním kumarylovým zbytkem měly silnou afinitu a selektivitu pro Gal-3 oproti Gal-1, protože interagovaly se skupinami, které jsou specifické pro vazebnou kapsu Gal-3 [43]. Nízkomolekulární deriváty často zahrnují galaktózu substituovanou na C-1 a C-3 nebo 3,3'-disubstituovaný TDG [44].

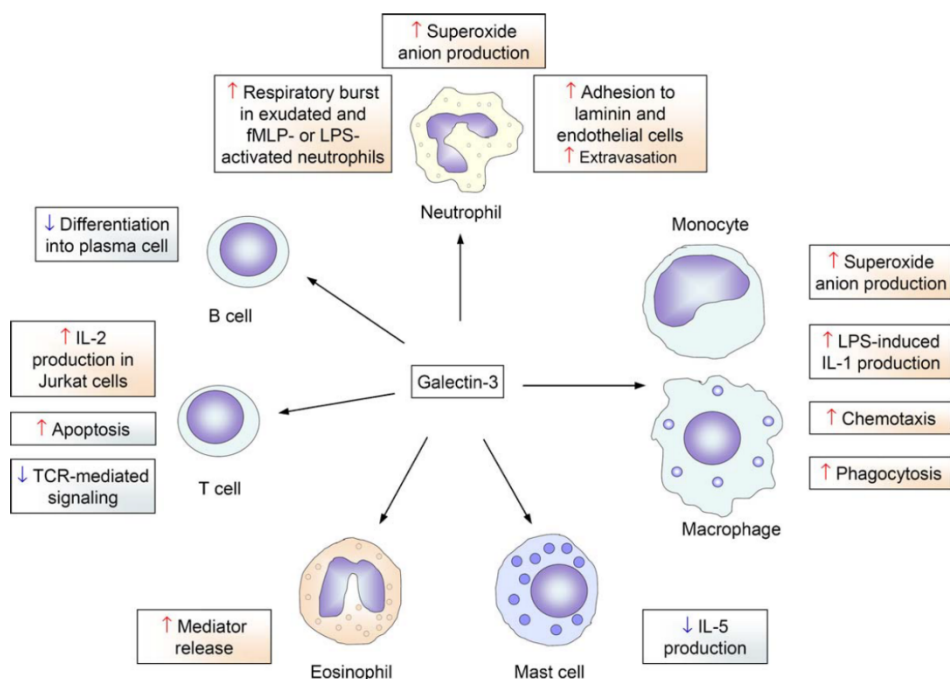


**Obrázek 4: Glykomimetika TDG (vlevo) a TD139 (vpravo) (převzato z [10]).**  
Triazolový kruh je zakroužkovaný.

### 1.2.3 Multivalentní ligandy galektinu-1 a -3

Interakce mezi galektinem a monosacharidovým ligandem jsou poměrně slabé. Typicky se utvoří 2 až 5 vodíkových vazeb mezi Gal-3 a jeho sacharidovým ligandem. Vazbu dodatečně posilují van der Waalsovy interakce [20]. Vazebné místo pro sacharidový ligand je schopno pojmout až lineární tetrasacharid [6]. Pokud se glykany pro vazbu ligandů prezentují v multivalentním provedení, jsou relativně slabé monovalentní interakce mezi lektinem a glykanem zesíleny takzvaným multivalentním efektem („*multivalency effect*“; „*cluster glycoside effect*“) a výsledkem je vysoká avidita, tj. kumulativní afinita, která je vyšší než součet afinit jednotlivých glykanů [38]. Důležitost multivalentního konceptu je v glykobiologii způsobena faktem, že multivalentní interakce *in vivo* zprostředkovávají biologické procesy s mnohem větší aviditou než ty, které jsou dosažitelné samostatnými monovalentními interakcemi [15]. Kromě inhibitorů s nízkou molekulovou hmotností byla publikována i řada multivalentních inhibitorů, které se silně vážou na galektiny. Tento způsob více napodobuje přirozené interakce galektinů s glykoproteiny [42] a zesiluje přirozeně slabou monovalentní interakci lektinů se sacharidy. Například asialoglykoproteiny působí jako účinné inhibitory schopné účinně blokovat napojení Gal-3 k rakovinným buňkám včetně buněčných linií rakoviny PC3 a A549 [45]. Ve výzkumu léčiv

a protirakovinné terapii jsou navrhovány syntetické multivalentní glykanové ligandy k posílení vazebné afinity a inhibiční účinnosti k cílovým galektinům [36]. Přírodní multivalentní ligandy pro Gal-3 jsou například glykoproteiny, jako laminin nebo fibronectin s O- a N-vázanými glykany [46]. Komplexní polysacharidové extrakty a modifikované formy přírodních zdrojů, jako jablko nebo citrusy, jsou též relativně úspěšné v inhibici galektinů [22]. Mezi syntetické napodobeniny přírodních glykokonjugátů patří glykopeptidy, glykopolyмеры, glykodendrimery, glykolipozomy, syntetické glykolipidy nebo cyklofany [47]. Cyklofany jsou uhlovodíky, které jsou složeny z aromatických kruhů a alifatických řetězců, jež tyto aromatické kruhy propojují. Jsou známy i složitější tvary, které vytvářejí klecové struktury [48]. Dále například glykokalixareny, tj. kalixareny s připojenými sacharidy na horním nebo dolním okraji, jsou účinné multivalentní ligandy pro řadu lektinů vyskytujících se při různých patologiích [49]. Multivalentní prezentace sacharidů je dosažena chemickou modifikací různých skeletů, která definuje jejich uspořádání a orientaci [36].



**Obrázek 5: Účinek Gal-3 na buňky imunitního systému** (převzato z [29]). Červené šipky směřující nahoru znázorňují zvýšení, modré šipky směřující dolů znázorňují snížení exprese. Prozánětlivý účinek Gal-3 je zapsán v červených boxech a protizánětlivý účinek je zapsán v tmavě modrých boxech. F-MLP (*N*-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-fenylalanin), IL-1, -2, -5 (interleukin-1, -2, -5), LPS (lipopolysacharid), TCR (receptor T buněk).

## 1.3 Inhibice galektinu-1 a -3 v biomedicíně

### 1.3.1 Galektin-1 a -3 při idiopatické pulmonární fibróze

Oprava poškozených tkání je základní biologický proces, který umožňuje náhradu mrtvých nebo poškozených buněk během odpovědi na zánět. Je to zásadní mechanismus pro přežití. Poškození tkáně může vyplývat z několika akutních nebo chronických podnětů, včetně infekce, autoimunitní reakce a mechanického zranění. Proces opravy zahrnuje dvě fáze: regenerační fázi, ve které jsou poškozené buňky nahrazeny buňkami stejného typu, a fázi známou jako fibroplazie nebo fibróza, ve které pojivová tkáň nahrazuje normální parenchymální tkáň. Ve většině případů jsou třeba obě fáze, aby bylo zpomaleno nebo odvráceno způsobené poškození. Proces hojení se může stát patogenním, pokud nebude kontrolován, což pak může vést k remodelaci tkáně a tvorbě trvalé jizvy. V některých případech by mohlo nakonec dojít k selhání orgánů a smrti. Fibrotické jizvy jsou často způsobeny nevhodným uzdravovacím procesem [50]. Idiopatická pulmonární fibróza (IPF) je ireverzibilní a v konečném důsledku fatální plicní onemocnění charakterizované postupným ochabováním funkce plic. Základní patogeneze IPF není známa, nicméně je pravděpodobně, že je výsledkem opakovaného poškození alveolárních epiteliálních buněk probíhajícího v rámci nestandardního procesu hojení [51]. Současné konvenční terapie kortikosteroidy a imunosupresivními látkami mají obvykle malý účinek na přirozený průběh IPF [52]. Plice pacientů s IPF jsou často typické přítomností fibroblastických ohnisek, které jsou obklopeny hyperplastickými alveolárními epiteliálními buňkami typu 2 (*alveolar epithelial cells, AEC2s*), které se stanou hypoxickými a exprimují ve vysoké míře faktor  $1\alpha$  indukovatelný hypoxií (*hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$* , HIF-1 $\alpha$ ). Trvalá signalizace hypoxie v AEC2s napomáhá růstu exprese profibrotických genů indukovatelných hypoxií, jako je transformující růstový faktor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). Jelikož procesy spojené s hojením rány jsou silně regulovány přítomností kyslíku, může hypoxické mikroprostředí vzhledem k narušené mikrocirkulaci způsobit deregulaci opravy rány v AEC2s. Hypoxie může spouštět profibrotické děje aberantní regulací cytoskeletální remodelace v AEC2s. Proto je důležité definovat roli signalizace hypoxie a jejích efektorů v AEC2s v patogenezi IPF. Faktory profibrotické signalizace, jako je Wnt/ $\beta$ -katenin a TGF- $\beta$ , ovlivňují cytoskeletální remodelaci, zvyšují buněčnou plasticitu v AEC2s a tím napomáhají léčbě fibrotických plic. Mnohé z těchto dějů jsou zprostředkovány fokální adhezni kinázou (*focal adhesion kinase 1*, FAK1), což je

nereceptorová tyrosinkináza a hlavní regulátor cytoskeletální remodelace. Ačkoliv zvýšená exprese aktivovaných/ fosforylovaných FAK1 (pFAK1) je často pozorována v plicích pacientů s IPF, tak molekulární mechanismus aktivace FAK1 v pulmonární hypoxii zůstává neznámý. Gal-1 je regulátor FAK1 v plicních epiteliálních buňkách při hypoxii. Interaguje s FAK1 a podporuje nárůst jeho fosforylace v plicních epiteliálních buňkách. Na myších modelech bylo pozorováno, že hypoxie přispívá k nárůstu plicní fibrózy díky Gal-1 a k útlumu apoptózy v plicním parenchymu. Naopak inhibice Gal-1 zesiluje průběh apoptózy v plicích s fibrózou. Dále byl také nalezen vysoký počet transkriptů Gal-1 v hyperplastických regionech plic pacientů s IPF, což ukazuje, že Gal-1 může napomáhat hyperplazii plicního epitelu. Gal-1 a FAK1 vzájemně posilují své aktivity při hypoxických zraněních, které vedou k pulmonární fibróze. Dále Gal-1 interaguje s integrinem  $\beta 1$ , který aktivuje FAK1. Exprese integrinu  $\beta 1$  roste na povrchu epiteliálních buněk dýchacích cest jako odpověď na poškození plic zahrnující hypoxii, aby byla urychlena buněčná proliferace. Jakmile je Gal-1 sekretován z hyperplastických AEC2s, může také interagovat s integrinem  $\beta 1$  na povrchu sousedících mezenchymálních buněk ve fibroblastickém ohnisku, což zvyšuje jejich pohyblivost. Tím pádem je pravděpodobné, že v hypoxickém prostředí může zvýšená exprese Gal-1 aktivovat signální dráhu integrin  $\beta 1$ /FAK1, a tím podněcovat AEC2 k proliferaci. Z toho důvodu je Gal-1 důležitý zprostředkovatel profibrotických událostí v plicích a vhodný terapeutický cíl u pacientů trpících fibrotickými plicními poruchami, včetně IPF [53]. Profibrotická funkce Gal-3 je multifaktoriální, jelikož má schopnost propojovat a podporovat signalizaci přes mnoho receptorů na buněčném povrchu, což zahrnuje integriny a receptory růstových faktorů, jako je transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a receptor růstového faktoru odvozený od krevních destiček (*platelet-derived growth factor*, PDGF). Gal-3 je ústřední regulátor fibrózy v plicích a je nadměrně exprimován v BALF (*bronchoalveolar lavage fluid*) tekutině a v séru pacientů s IPF [51]. Zvýšený výskyt Gal-3 v BALF při fibrotickém plicním onemocnění je pravděpodobně spuštěn prozánětlivými cytokiny, protože jeho exprese je zahájena *in vitro* v buněčných liniích U937 monocytů/makrofágů stimulací TNF- $\alpha$  [52]. Neutralizace TNF- $\alpha$  pomocí protilátek proti TNF- $\alpha$  nebo rozpustných TNF- $\alpha$  receptorů narušuje odpověď plicní fibrózy u myší. Některé fibrózy mají společné zánětlivé stimuly, které zachovávají produkci růstových faktorů, proteolytických enzymů a fibrogenních cytokinů a ty společně napomáhají ukládání prvků pojivové tkáně, což postupně přetváří a ničí

normální tkáňovou stavbu [50]. Inhibice zánětlivých mechanismů zprostředkovaných lymfocyty, makrofágy nebo fibroblasty utlumuje fibrózu [54]. Většina léčebných strategií pro fibrotické poruchy je založena na potlačení nebo eliminaci zánětlivých faktorů. Mezi další možnosti léčby se řadí obecné imunosupresivní léky, jako jsou kortikosteroidy, imunosupresivní nebo cytotoxické látky a antifibrotika, podávaná samostatně nebo v kombinaci. Tyto léky snižují zánětlivou kaskádu blokováním množení buněk a aktivací zánětlivých leukocytů nebo usmrcením aktivovaných buněk. Tyto léky tedy nemusí nutně cílit na základní fibrotickou odpověď, která obvykle zahrnuje jak lokální buňky (stromální buňky), tak aktivované buňky (zánětlivé leukocyty) [50]. Molekulou, která má inhibiční vlastnosti vůči Gal-3, je TD139. Preklinické práce s nízkomolekulárním inhibitorem TD139 prokázaly jeho antifibrotický potenciál při cílení na Gal-3 u plicní fibrózy. TD139 je inhibitor s vysokou afinitou pro Gal-3. Antifibrotický potenciál TD139 spočívá v inhibici makrofágů, které uvolňují Gal-3 a také řídí aktivaci blízkých myofibroblastů. TD139 je podáván inhalačně ve formě suchého prášku. Tento inhibitor je schopný potlačit expresi Gal-3 v makrofázích BAL a snížit množství biomarkerů v plazmě, které jsou spojované s IPF [51].

### **1.3.2 Galektin-1 a -3 při kardiovaskulárním onemocnění**

V lidském srdci je exprese Gal-3 nízká. Jakmile se ale začne srdeční onemocnění rozvíjet, Gal-3 se začne rychle a významně nadměru exprimovat [14]. Srdeční fibroblasty a makrofágy jsou hlavními zdroji Gal-3 [55]; dále mohou tento protein exprimovat kardiomyocyty [56], spolu s Gal-1. Úroveň exprese Gal-1 v kardiomyocytech patří mezi nejvyšší ve srovnání s ostatními orgány [30]. Nekontrolovaná exprese Gal-3 má za následek soustavnou aktivaci myofibroblastů a makrofágů, což vede k fibróze tkáně [56]. Gal-3 pochází ze srdeční tkáně, ale je následně vylučován do oběhu a zvýšené hladiny Gal-3 v plazmě silně předpovídají riziko rozvoje srdečního selhání v populaci [57]. Nadměru exprimovaný Gal-3 hraje zásadní roli v počátečních fázích opravy tkáně, nicméně soustavná zvýšená exprese vyúsťuje v srdeční fibrózu. Zvýšená exprese Gal-3 může být také vyvolána v jiných orgánech po zranění, což je spojováno s orgánovou fibrózou. Transmembránové proteoglykany, jako jsou syndekany, se také podílejí na srdeční fibróze. Syndekany mají mnoho glykosaminoglykanových řetězců složených z heparansulfátu, které mohou

interagovat s Gal-3, a ovlivnit tak syndekanovou signalizaci v srdeční fibróze [56]. Gal-3 ovlivňuje nejenom syntézu nových matrixových komponentů jako kolagen typu I, ale také ovlivňuje degradaci extracelulárních matrixových komponentů [14]. Srdeční fibroblasty, které byly vystaveny rekombinantnímu Gal-3, vykazovaly vyšší proliferaci, diferenciaci a produkovaly ve velké míře kolagen [56]. Infuze Gal-3 do perikardiálního vaku kryš vedla k rozvoji dysfunkční srdeční remodelace a zvýšení exprese kolagenů [55]. I když M2 makrofágy nejsou přímo zapojeny do produkce kolagenu, mají důležitou roli při kolagenovém obratu, což ovlivňuje remodelaci poškozené tkáně a zvyšuje expresi Gal-3 v aktivovaných makrofázích *in vitro*. Je mnoho mechanismů, kterými extracelulární Gal-3 přispívá k fibróze tkáně. Gal-3, který je exprimován mnoha buňkami, jako jsou monocyty a makrofágy, může aktivovat klidové fibroblasty na myofibroblasty, což je charakteristický znak tkáňové fibrózy. Extracelulární Gal-3 je zodpovědný za soustavnou aktivaci M2 makrofágů. Gal-3 může také podporovat fibrózu řízením imunožánělivé odpovědi a angiogeneze [56]. Škodlivé účinky Gal-3 jsou způsobeny jeho schopností vázat matrixové proteiny, jako je laminin, fibronektin a kolageny [57].

Exprese Gal-1 je zvýšena v srdcích pacientů při akutním infarktu myokardu (*acute myocardial infarction*, AMI), srdečním selhání (*heart failure*, HF) a Chagasově kardiomyopatii. Gal-1 může vazbou k ligandům na buněčném povrchu ovládat vrozenou a adaptivní imunitu, což vede k žánělivé odpovědi. Dále může řídit přežití kardiomyocytů, a proto je potenciálním terapeutickým cílem při léčbě AMI nebo dalších kardiovaskulárních poruch. V souladu s tím je Gal-1 spojován s pulmonární arteriální hypertenzí nebo ischemickou mozkovou příhodou [21]. Kromě ischemické mozkové příhody existuje také ischemie myokardu. HIF-1 $\alpha$  je transkripční faktor zprostředkovávající odpověď na tuto ischemii myokardu. Za normoxických podmínek má HIF-1 $\alpha$  krátký poločas rozpadu a nepřetržitě podstupuje proteazomální degradaci. HIF-1 $\alpha$  je exprimován jádrem kardiomyocytů a endoteliálními buňkami. Gen Gal-1 je přímý cíl transkripčního faktoru HIF-1 $\alpha$ . Při hypoxii uniká HIF-1 $\alpha$  proteozomální degradaci, přemístí se do jádra a dimerizuje s HIF-1 $\beta$ . Tento komplex se poté váže na prvek regulovaný hormony (HRE) v promotorové nebo zesilovací sekvenci cílených genů, což vede k transkripci daných genů. HIF-1 $\alpha$  je ochranný faktor, který napomáhá přežití poškozených kardiomyocytů v ischemickém prostředí tím, že přepisuje různé kardioprotektivní geny, jako například pro erytropoetin, VEGF, hemeoxygenáza 1 a kardiotropin. Transkripce genu Gal-1 pomocí HIF-1 $\alpha$  vede ke zvýšení hladiny exprese Gal-1 v kardiomyocytech, což může mít kardioprotektivní funkci z důvodu

protizánětlivého účinku Gal-1 [30]. Díky svým protizánětlivým a proangiogenním aktivitám je Gal-1 klíčovým zprostředkovatelem kardiovaskulární homeostázy. Akutní infarkt myokardu (AMI) je způsoben náhlým přerušением dodávky kyslíku krví, často kvůli aterotrombóze. Tento efekt je doprovázený expresí prozánětlivých cytokinů, disregulací efektorů a regulačních mechanismů imunitních buněk. AMI je celosvětově hlavní příčinou úmrtí a ti pacienti, kteří přežijí, jsou vystaveni vyššímu riziku srdečního selhání [21]. Gal-1 je přítomen v srdeční tkáni ve velkém množství. AMI a následného poškození buněčné membrány a nekróza napomáhají jeho úniku ven z buňky do krve [30]. Kardiomyocyty nadměru exprimují Gal-1 při hypoxii a jako odpověď na prozánětlivé cytokiny. Jelikož Gal-1 podporuje diferenciaci tolerogenních dendritických buněk a M2 makrofágů, což jsou buňky s ochrannou funkcí při AMI, mohou interakce mezi glykany a Gal-1 přispět k opravným funkcím, které jsou zprostředkované těmito buňkami. Ateroskleróza je základní patologický stav při AMI. Prasklina v aterosklerotickém plaku vede ke koronární trombóze a nekróze myokardu [21]. V selhávajících srdcích bylo prokázáno, že aktivované makrofágy sekretují Gal-3. Zvýšená exprese Gal-3 je spojována s rozvojem dekompenzovaného srdečního selhání. Proto může Gal-3 sloužit jako biomarker nebo terapeutický cíl při HF. Gal-3 je více exprimován v dekompenzovaném srdečním selhání v porovnání s kompenzovaným srdečním selháním. [55]. Pacienti, kteří prodělali škodlivou remodelaci srdeční komory při AMI, jsou náchylnější k rozvoji HF [21].

### **1.3.3 Galektin-1 a -3 při rakovině**

Galektiny jsou nadměrně exprimovány v mnoha typech rakovin, extracelulárně i intracelulárně. Změny v expresi galektinů v lidských buňkách jsou spojovány s rozvojem rakoviny [32]. Abnormální nádorová vaskulatura snižuje tok krve a omezuje dodávku kyslíku k nádoru. To způsobuje hypoxii, při které je Gal-1 nadměru exprimován [30], a stabilizuje HIF-1 $\alpha$ . V souvislosti s tím se zvyšuje exprese Gal-1 při hypoxii v Kaposiho sarkomu, melanomu a rakovinných buněčných liniích prsu a prostaty [24]. Gal-3 se účastní tvorby metastáz, angiogeneze v nádorové tkáni, proliferace a růstu rakovinných buněk a také napomáhá úniku od hostitelského imunitního systému. Během vývoje nádoru se některé rakovinné buňky stanou schopnými napadnout okolní tkáň. Tento jev se nazývá metastáza [58]. Při metastáze opustí buňky primární nádor, vstoupí do krevního oběhu, následně interagují s cílovým

místem nebo orgánem a proliferují za vzniku sekundárního nádoru [59]. Rozvoj rakoviny je zahájen, když obyčejná buňka podstoupí neoplastickou transformaci jako kumulativní výsledek disregulace buněčného růstového mechanismu, který zahrnuje poškození mechanismu apoptózy a změnu buněčného cyklu. Řada galektinů je spjata s těmito procesy. Mechanismy, kterými se galektiny účastní buněčné transformace, nejsou zatím zcela známy, ale Gal-1 i Gal-3 mohou interagovat s onkogenním RAS. Lidské nádory často exprimují RAS (*rat sarcoma*) proteiny s bodovými mutacemi a nejčastěji ovlivněné RAS proteiny jsou HRAS, KRAS (také známý jako KRAS2) a NRAS. Onkogenní RAS proteiny přispívají různými aspekty k malignímu fenotypu a jejich činnost je závislá na ukotvení k plazmatické membráně. Toto membránové ukotvení nutí Gal-1, aby fungoval jako interakční partner onkogenního HRAS. Nadměrná exprese Gal-1 v nádorových buňkách má za následek zvýšení jak membránové asociace onkogenního RAS, tak buněčné transformace. Exprese Gal-1 soustavně aktivuje karcinom štítné žlázy (RAF1) a extracelulárním signálem regulovanou kinázu (ERK). Tyto signalizační molekuly aktivují transkripční faktory a podporují transformaci indukci exprese aberantního genu. Inhibice exprese Gal-1 pomocí aRNA, která je komplementární k určité mRNA a blokuje její translaci tím, že s ní utvoří duplex, uvolní membránové ukotvení onkogenního HRAS a inhibuje transformaci, která byla spuštěna tímto proteinem. Gal-3 se váže k onkogenním RAS proteinům, ale preferuje vazbu ke KRAS. Tak Gal-3 podporuje aktivaci RAF1 a fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) a přispívá k selektivní aktivaci signální kaskády a regulaci genové exprese na transkripční úrovni. Proto má galektinová rodina důležitou roli v membránovém ukotvení RAS a v RAS zprostředkované buněčné transformaci [1]. Různé typy nádorových buněk exprimují galektiny na svůj povrch, kde se vzájemně propojí pomocí exogenních glykoproteinových ligandů a tím dojde k homotypické agregaci nádorových buněk [59]. Gal-1 se účastní rozvoje rakoviny inhibicí imunitní odpovědi. Nadměrná exprese Gal-1 při rakovině může posílit odolnost nádoru proti T buňkám. U melanomu, Lewisova karcinomu plic a prsu řídí Gal-1 růst nádoru svým účinkem na apoptózu T buněk CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>. Gal-1 má pozitivní i negativní účinky na proliferaci nádoru. Tento proces je vysoce závislý na typu buňky, stavu buněčné aktivace, poměru mezi monomerní a dimerní formou a na galektinové interakci se specifickými glykoproteiny buněčného povrchu nebo intracelulárními proteiny. Angiogeneze nádoru je patologický stav, který je výsledkem nepřírozeného rozmístění cévních struktur, které jsou remodelovány růstem nových kapilár z již existujících cév.

Tento stav vyvolávají faktory sekretované nádorovou buňkou, jako je VEGF. Gal-1 řídí nádorovou angiogenezi posílením klíčových proangiogenních drah, jako je signalizace VEGF nebo působení na proliferaci a aktivaci endoteliálních buněk. Sloučením VEGF a Gal-1 se posílí proliferace endoteliálních buněk a migrace vazbou na protein neuropilin 1. Tato selektivní vazba vytváří ternární komplex, který podporuje fosforylaci VEGFR2 a aktivuje dráhu JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) [24]. Účast Gal-1 ve vývoji rakoviny, metastáz a angiogenezi staví Gal-1 do pozice tumorového markeru a cíle vývoje jeho inhibitorů jako potenciálních terapeutik [22]. Gal-3 je zapojen v nádorovém bujení a angiogenezi propojením receptorů na buněčném povrchu přes jejich glykany. Proto narušení vazby mezi galektinem a glykanem vhodnými vysokoafinitními ligandy přímo ovlivňuje nádorový růst a vaskularizaci [15]. Většina znalostí o farmakologických přístupech ohledně inhibice Gal-3 je díky zkušenosti s rakovinou. Konkrétně polysacharidy jako pektiny, dostupné jako různé druhy vlákniny (například ovoce, zelenina, cukrová řepa), slouží jako inhibitory Gal-3. Analýza složení sacharidu a jeho korelace s inhibičními vlastnostmi galektinů ukázala, že pektinové polysacharidy s vyšším obsahem arabinózy a galaktózy významně inhibovaly hemaglutinaci. Byly vyvinuty dva polysacharidy, které měly velký úspěch při klinických testech. První je GM-CT-01 (Davanat) a druhý GR-MD-02. GM-CT-01 byl objeven jako první a byl patentován jako protirakovinné terapeutikum, které tlumí negativní vedlejší účinky cytostatik, jako je 5-fluoruracil (5-FU) a adriamycin. GR-MD-02 je známý jako inhibitor Gal-3 a GM-CT-01 je naopak inhibitor Gal-1. Obě molekuly jsou schopny se navázat na Gal-1 i Gal-3 a teoreticky i na další lektiny. GR-MD-02 má protifibrotické, protirakovinné a protizánětlivé účinky a používá se na léčbu kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob. GR-MD-02 je velmi podobný jinému galektinovému inhibitoru, který je známý jako modifikovaný citrusový pektin (*modified citrus pectin*, MCP) nebo jako jeho novější patentovaná formulace GCS-100. GCS-100 se používá při imunitních, neurodegenerativních nebo hyperproliferativních onemocněních [22]. Pektiny a MCP se vážou k CRD Gal-3 a neutralizují jeho aktivitu. Při studii na myších, potkanech a buněčných kulturách byla úspěšně provedena inhibice nádorového růstu a vývoje metastáz pomocí MCP [57].

## 2 Cíl práce

- Exprese rekombinantního Gal-1 a Gal-3 v *E. coli* a jejich purifikace afinitní chromatografií.
- Syntéza derivátů thiodigalaktosidu metodou azid-alkynové Huisgenovy cykloadice s vybranými substituenty na C-3 konci
- Purifikace ligandů sloupcovou chromatografií na silikagelu a jejich charakterizace NMR a HPLC
- Stanovení afinity syntetizovaných ligandů ke Gal-1 a Gal-3 metodou ELISA v kompetitivním uspořádání.

### **3 Experimentální část**

#### **3.1 Použité vybavení a chemikálie**

##### **3.1.1 Seznam přístrojů a vybavení**

Analytické váhy Adventurer-Pro (OHAUS, USA)

Bruker Avance III spektrometr pro NMR analýzu (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Německo)

Centrifuga High-Speed Refrigerated Centrifuge CR 22N (Himac, Japonsko)

Centrifuga Universal 320R (Hettich, Německo)

Destičky pro ELISA - F16 maxisorp loose nunc-immuno module (Thermo Fisher Scientific, Dánsko)

Destičky TLC Silica gel 60 F254 (Sigma-Aldrich, Německo)

Dialyzační střevo na bázi celulózy o průměru 10 mm (Sigma-Aldrich, USA)

Elektroforetická aparatura pro SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)

Kolona Chromolith RP-18e (100 × 3 mm) (Merck, Německo)

Laminární box MSC9 (Jouan, Velká Británie)

Lyofilizátor Lyovac GT2 (Leybold, Německo)

Mikrovlnný syntetizér Biotage Initiator+ (Biotage, Švédsko)

Minicentrifuga miniSpin F-45-12-11 (Eppendorf, USA)

Míchačka IKA RH basic 2 (IKA, Německo)

pH metr pH 211 Microprocessor (Hanna Instruments, Česká republika)

Plastová kolona (Bio-Rad, USA)

Předvážky KERN EMB (KERN, Německo)

Shimadzu Prominence LC analytical system pro HPLC analýzu (Shimadzu, Japonsko)

Sonikátor UP50H Ultrasonic Processor (Hielscher Ultrasound Technology, Velká Británie)

Spektrofotometr UV-VIS spectrophotometer UVmini-1240 (Shimadzu, Japonsko)

Sunrise Tecan Spektrofotometr (Tecan, Švýcarsko)  
Termomixér Thermomixer comfort (Eppendorf, USA)  
Třepačka IKA KS 4000 ic control (Schöller, Česká republika)  
UV lampa UV240 (Krüss, Německo)  
Vakuová odparka Laborota 4001 efficient (Heidolph, Německo)  
Vortex PV-1 Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)  
Zařízení pro vakuovou filtraci (Milford MA 01757, USA)

### **3.1.2 Seznam chemikálií**

Akrylamid (VWR, USA)  
Ampicilin (Serva electrophoresis, Německo)  
Anti-His<sub>6</sub>-peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, USA)  
Agarosa (Koch-Light Laboratories, Velká Británie)  
Asialofetuin (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, USA)  
Askorbát sodný (Sigma-Aldrich, USA)  
Azid sodný (VWR, USA)  
1,4-Azidoacetofenon (Sigma-Aldrich, USA)  
0,5M Roztok azidobenzenu o čistotě 95 % (Sigma-Aldrich, USA)  
Bakterie *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS  
Bradfordovo činidlo 5 × ředěné (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) (Bio-Rad, USA)  
Bromfenolová modř (Serva Electrophoresis, Německo)  
Chlorid sodný (Carl Roth, Německo)  
Chloramfenikol (Fluka, Švýcarsko)  
*Coomasie Brilliant Blue* (USB Corporation, USA)

$\beta$ -D-Galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid (Carbosynth, Velká Británie)

Dibutylcín-oxid (Fluka, Švýcarsko)

Dichlormethan (VWR, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner, Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan sodný, monohydrát (Carl Roth, Německo)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (VWR, USA)

Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)

Dodecylsíran sodný (SDS) (Serva Electrophoresis, Německo)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (Carl Roth, Německo)

Ethanol (VWR, USA)

Extrakt z kvasnic (Oxoid, Česká republika)

Fenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, USA)

Glycerol (Lachner, Česká republika)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)

Hydroxid amonný (Lachner, Česká republika)

Hydrogenfosforečnan sodný (Carl Roth, Německo)

Hydroxid sodný (Carl Roth, Německo)

Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid (IPTG) (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina octová (Lachner, Česká republika)

Kyselina sírová (VWR, USA)

Methanol (VWR, USA)

Myší monoklonální protilátka proti histidinové kotvě konjugovaná s křenovou peroxidasou (anti-His6-peroxidasa) ředěná v PBS pufru 1:1000 (Roche Diagnostics, Švýcarsko)

Náplň do kolony Ni-NTA Agarose (MCLAB, USA)

Nízkomolekulární standard pro SDS elektroforézu – Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, Velká Británie)

*N,N'*-Methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Peroxodisíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, USA)

Plasmid nesoucí gen pro Gal-1 nebo Gal-3 s N-terminální histidinovou kotvou (k dispozici v Laboratoři biotransformací)

Propargylbromid (Sigma-Aldrich, USA)

Silikagel (Lachner, Česká republika)

Síran měďnatý (Lachema, Česká republika)

1,4-dioxan bezvodý (Acros Organics, Belgie)

TEMED (Sigma-Aldrich, USA)

Tetra-*n*-butylamoniumbromid (Merck, Německo)

TMB ONE (Kementec, Dánsko)

Triethylamin (Fluka, Švýcarsko)

Tris (Sigma-Aldrich, USA)

Trypton (Oxoid, Česká republika)

Ultračistá a destilovaná voda (filtrační aparatura WATREX)

Zkapalněný dusík (Maneko, Česká republika)

### 3.1.3 Seznam roztoků

Asialofetuín (0,1  $\mu$ M): 4975  $\mu$ l PBS pufru, 25  $\mu$ l 20 $\mu$ M asialofetuínu

Barvicí roztok pro SDS gel: 0,5 g Coomassie Brilliant Blue, 90 ml ethanolu, 10 ml kyseliny octové, 90 ml destilované vody

Blokovací pufr: 2% BSA v PBS pufru (Sigma-Aldrich, USA)

Barva pro vzorky na SDS elektroforézu: 0,01% *Coomassie Brilliant Blue*, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná v destilované vodě

Ekvilibrační pufr: 20mM hydrogenfosforečnan sodný, 500mM chlorid sodný, 20mM imidazol, pH 7,4

Elektrodový pufr (5  $\times$  koncentrovaný): 15,1 g Tris, 94 g glycinu, 5 g dodecylsíranu sodného, 1000 ml destilované vody

Eluční pufr: 20mM hydrogenfosforečnan sodný, 500mM chlorid sodný, 500mM imidazol, pH 7,4

EPBS pufr pro dialýzu: 61,32 g chloridu sodného, 48,3 g dihydrogenfosforečnanu sodného, 5,2 g kyseliny ethylendiamintetraoctové, 7000 ml destilované vody, pH 7,5

EPBS pufr pro ELISA: 2mM kyselina ethylendiamintetraoctová v PBS pufru, pH 7,5

3M kyselina chlorovodíková: 66 ml kyseliny chlorovodíkové, 186 ml destilované vody

LB médium: 5 g tryptonu, 2,5 g extraktu z kvasnic, 2,5 g chloridu sodného, 500 ml destilované vody

LBA médium: 10 g/l tryptonu, 0,5 g/l chloridu sodného, 5 g/l extraktu z kvasnic, 15 g/l agaru

Mobilní fáze pro chromatografii pro látky prekurzor **1** a ligand **3**: dichlormethan/ methanol/ hydroxid amonný v poměru 80/ 20/ 2,5

Mobilní fáze pro chromatografii pro látku ligand **2**: dichlormethan/ methanol/ hydroxid amonný v poměru 92/ 8/ 2

Odbarvovací roztok pro SDS gel: ethanol/ voda/ kyselina octová v poměru 35/ 55/ 10

PBS pufr pro dialýzu: 61,32 g chloridu sodného, 48,3 g dihydrogenfosforečnanu sodného, 7000 ml destilované vody, pH 7,5

PBS pufr pro ELISA: 50mM dihydrogenfosforečnan sodný, 150mM chlorid sodný, pH 7,5

PBS pufr s obsahem 0,05 % Tween 20 (PBS-Tween)

Roztok pro vyhodnocování TLC: 5% kyselina sírová v ethanolu

Separační gel (12%, 5 ml): 1,6 ml destilované vody, 2 ml 30% akrylamid mix, 1,3 ml 1,5M Tris-Cl (solný roztok pufrovaný Tris), pH 8,8, 0,05 ml 10% dodecylsíranu sodného, 0,05 ml 10% peroxodisíranu amonného, 0,002 ml tetramethylethyldiaminu (TEMED)

Separační gel (15%, 5 ml): 1,1 ml destilované vody, 2,5 ml 30% akrylamid mix, 1,3 ml 1,5M Tris-Cl, pH 8,8, 0,05 ml 10% dodecylsíranu sodného, 0,05 ml 10% peroxodisíranu amonného, 0,002 ml tetramethylethyldiaminu

TB médium: 28,8 g tryptonu, 57,6 g extraktu z kvasnic, 9,6 ml glycerolu, 5,56 g dihydrogensíranu draselného, 30,1 g hydrogensíranu draselného, 2400 ml destilované vody, pH 7

Vyvíjecí roztok na TLC pro syntézu látek ligand **2** a ligand **3**: dichlormethan/ methanol/ hydroxid amonný v poměru 92/ 8/ 2

Vyvíjecí roztok na TLC pro analýzu prekurzoru **1**: isopropanol/ amoniak/ voda v poměru 7/ 1/ 2

Vzorkový pufr (5 × koncentrovaný, 5 ml): 0,151 g Tris, 0,3855 g dithiotreitolu, 0,5 g dodecylsíranu sodného, 0,025 g bromfenolové modři, 1,25 ml glycerolu

Zaostřovací gel (5 ml): 3,4 ml destilované vody, 0,83 ml 30% akrylamidu mix, 0,63 ml 1,5M Tris-Cl, pH 6,8, 0,05 ml 10% dodecylsíranu sodného, 0,05 ml 10% peroxodisíranu amonného, 0,005 ml tetramethylethyldiaminu

## 3.2 Produkce galektinů

### 3.2.1 Transformace *E. coli*

Baňka s médiem Luria-Bertani a agarem (LBA médium) byla zahřívána do doby, než byl agar rozpuštěn. Do roztoku LBA bylo přidáno 67  $\mu$ l ampicilinu o koncentraci 150 mg/ml a 100  $\mu$ l chloramfenikolu o koncentraci 35 mg/ml. Poté byl roztok rozlit do Petriho misek a ponechán inkubovat v laminárním boxu do doby, než ztuhl. Kryokonzervované kompetentní buňky *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS (100  $\mu$ l) byly rozmrazovány na ledu po dobu 15 minut. Současně byl rozmrazován plasmid obsahující gen pro expresi Gal-1 nebo Gal-3. Oba galektiny byly exprimovány jako konstrukty nesoucí histidinovou kotvu (*His<sub>6</sub>-tag*) na N-konci ve vektoru pETDuet-1. V laminárním boxu byly buňky smíchány s 1  $\mu$ l plasmidu o koncentraci 1201 ug/ml (1,201  $\mu$ g DNA) pro Gal-1 nebo 1235 ug/ml (1,235  $\mu$ g DNA) pro Gal-3 a směs byla jemně promíchána. Tato směs byla inkubována na ledu po dobu 2 min, kdy proběhla adheze DNA k buněčné stěně bakterií. Po inkubaci byla směs buněk a plasmidu přenesena do termomixéru o teplotě 42 °C na 30 s, kdy došlo k tepelnému šoku a DNA pronikla do buněk přes buněčnou membránu. Poté byly bakterie opět chlazeny po dobu dvou minut na ledu. Následně bylo ke směsi přidáno 100  $\mu$ l LB média a směs byla inkubována v termomixéru po dobu jedné hodiny při 37 °C a 300 ot./min. Po 1 h byla směs centrifugována při 21000  $\times$  g a 4 °C po dobu 10 s. Polovina supernatantu byla odebrána. Zbytek byl resuspendován, naočkován na již připravenou misku s antibiotiky ampicilinem o koncentraci 150 mg/ml a chloramfenikolem o koncentraci 35 mg/ml a miska byla inkubována přes noc při 37 °C. Dále byla miska uchovávána při 4 °C.

### 3.2.2 Kultivace média

Byly připraveny čtyři baňky o objemu 500 ml. Aby byl zajištěn dostatečný přístup kyslíku během kultivace, byla do každé baňky přidána jen asi 1/10 jejího celkového objemu, 60 ml LB média, a následně byl obsah všech baněk sterilizován. Do roztoku bylo přidáno 40  $\mu$ l ampicilinu o koncentraci 150 mg/ml a 60  $\mu$ l chloramfenikolu o koncentraci 35 mg/ml. Do každé baňky byla přidána jedna kolonie buněk *E. coli* a ponechána kultivovat při 37 °C a 220 ot./min. do druhého dne. Druhý den bylo do každé ze čtyř třilitrových baněk přidáno 600 ml *Terrific broth* (TB) média a následně byly všechny baňky sterilizovány. Po sterilizaci bylo do baněk přidáno 400  $\mu$ l ampicilinu o koncentraci 150 mg/ml a 600  $\mu$ l chloramfenikolu o koncentraci 35 mg/ml

a poté byla do každé baňky sterilně přidána noční prekultura roztoku LB média z předchozího dne. Po přelití byl roztok inkubován při 37 °C a 150 ot./min. Inkubace probíhala do doby, než optická denzita, měřená při 600 nm, dosáhla hodnoty zhruba 0,6 - 0,8. Poté byl přidán do každé baňky 0,5M isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid (IPTG) o objemu 600  $\mu$ l a roztoky byly inkubovány při 25 °C a 150 ot./min. po dobu 22 h. Následně byly kultury přelity do plastových kyvet a centrifugovány při teplotě 8 °C a 12 500  $\times$  g po dobu 15 min. Supernatant byl odstraněn a buňky se přenesly do sterilních plastových zkumavek a poté byly zmrazeny.

### **3.2.3 Purifikace galektinu-1 a galektinu-3**

Plastové zkumavky se zmraženou buněčnou kulturou byly rozmrazeny na ledu. Pro Gal-1 bylo použito 7,3 g buněk a pro Gal-3 bylo použito 7,7 g buněk. Po rozmražení byla peleta na ledu resuspendována ve 20 ml ekvilibračního pufru. Do buněčné suspenze bylo následně přidáno 500  $\mu$ l fenylmethylsulfonyl-fluoridu (PMSF), inhibitoru proteáz, a následně byla směs sonikována pomocí ultrazvuku. Sonikace se skládala z 6 cyklů, přičemž každý cyklus probíhal 1 min a mezi cykly byla pauza 2 min (amplituda 52 %). Po sonikaci byl buněčný lyzát přesunut do jednotlivých mikrozkušavek a centrifugován při 4 °C a 21 000  $\times$  g po dobu 15 min, čímž byly odstraněny buněčné zbytky. Po centrifugaci byl z mikrozkušavek odebrán supernatant do plastové zkumavky. Ta byla následně doplněna na objem 50 ml ekvilibračním pufrem. Tento roztok byl filtrován pomocí 0,8  $\mu$ m filtru a separován chelatační afinitní chromatografií s  $\text{Ni}^{2+}$  ionty (IMAC). Kolona HisTrap na bázi Sepharosy byla promyta 50 ml destilované vody a následně 50 ml ekvilibračního pufru průtokovou rychlostí 5 ml/min. Supernatant smíchaný s ekvilibračním pufrem byl nanesen na kolonu a kolona byla následně promyta 50 ml ekvilibračního pufru, obsahujícího malé množství imidazolu (20 mM). Tím se odstranily proteiny, které nespecificky ulpěly na koloně. Následně byl aplikován eluční pufr s vysokým množstvím imidazolu (500 mM). Imidazol vytěsnil vázaný protein, který byl eluován do plastových mikrozkušavek. Bylo odebráno 12 frakcí po 2 ml. Obsah proteinu v jednotlivých frakcích byl měřen Bradfordovou metodou a frakce s nejvyššími koncentracemi galektinu byly slity do dialyzačního střeva a dialyzovány přes noc v 7 l pufru EPBS. Ten odstranil zbylý imidazol, který se mohl ještě nacházet v roztoku po purifikaci. Druhý den bylo

dialyzační střevo dialyzováno ještě v 7 l PBS pufru po dobu asi 6 hodin. Po dialýze byl purifikovaný protein přefiltrován 0,22 µm filtrem a uskladněn v chladu.

### 3.2.4 Charakterizace proteinů SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je metoda, která se využívá pro separaci proteinů podle velikosti na základě jejich migrace v elektrickém poli. SDS se naváže na proteiny, které tak získají tyčinkovitý tvar a jednotnou hustotu povrchového náboje. Předpokládá se vznik micelární struktury, uvnitř které dochází k nekovalentním interakcím mezi uhlovodíkovými řetězci SDS a hydrofobními částmi proteinu. Nabité skupiny na povrchu micely jsou v kontaktu s pufrem a celkový náboj částice je záporný. Pro vznik těchto komplexů je nutné rozštěpit intra- a intermolekulární disulfidové můstky mezi řetězci proteinů redukčními činidly, jako je merkaptoethanol nebo dithiotreitol (DTT). Dále je bílkovina třeba ještě denaturovat zahřátím po dobu několika minut při 60-100 °C. Pro porovnání molekulových hmotností byl použit nízkomolekulární standard *Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Velká Británie). Ten se skládá ze směsi šesti lyofilizovaných a purifikovaných proteinů o známé molekulové hmotnosti. Používá se pro odhad molekulové hmotnosti proteinů v přítomnosti SDS. Tyto standardní proteiny jsou v rozsahu molekulových hmotností od 14,4 kDa do 97,0 kDa. Galektiny byly charakterizovány pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Nejprve byl připraven 12% separační gel pro Gal-3 nebo 15% separační gel pro Gal-1 se zaostřovacím gelem. Pro Gal-1 byl použit 15% SDS gel, jelikož je menší než Gal-3, a proto je pro dobrou separaci nutno zvolit gel s větším zesílením. Gal-3 má přibližně dvojnásobnou hmotnost, a proto byl pro něj připraven 12% SDS gel. Skla pro přípravu gelu byla omyta destilovanou vodou a ethanolem. Byla sestavena aparatura pro nalévání gelu a do ní byla upevněna připravená skla. Na dolní část těsnění aparatury byl vložen parafilm pro lepší udržení kapaliny mezi skly. Těsnost aparatury byla otestována nalitím destilované vody do prostoru mezi skly. Voda byla poté z tohoto prostoru odsáta filtračním papírem. Připravený gel byl nalit mezi skla do přibližně 3/4 celkového objemu a následně byl převrstven 1 ml destilované vody, aby se vyrovnala horní linie gelu a ponechal se ztuhnout. Po ztuhnutí gelu byla voda vylita a místo ní byl na separační gel nalit zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřebínek, což vytvořilo jamky

pro pipetování vzorků. Gel se poté ponechal ztuhnout. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vytažen a skla s gelem byla vložena do aparatury pro elektroforézu. Do mikrozkušavek byly připraveny vzorky analyzovaných proteinů (4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ l proteinu, 2  $\mu$ l barvy *Coomassie Brilliant Blue*). Vzorky byly inkubovány v termomixéru při 99 °C po dobu 5 min, aby došlo k denaturaci proteinů. Poté byl do aparatury přidán elektrodový pufr, vzorky byly napipetovány do jamek a byla zahájena elektroforéza. Zdroj elektroforézy byl nastaven na 130 V, 90 mA a 15 W. Po ukončení elektroforézy byla aparatura rozebrána a ze skel byl vyjmut gel, který byl následně barven pomocí barvicího roztoku obsahujícího modrou barvu *Coomassie Brilliant Blue*. Po nabarvení byl gel odbarvován v odbarvovacím roztoku, dokud nebyl zcela průhledný s modrými proužky, odpovídajícími proteinům, které se nacházely v připravených vzorcích.

### 3.2.5 Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

Stanovení koncentrace proteinů (galektinů) bylo provedeno Bradfordovou metodou. Metoda je založena na tvorbě komplexu mezi proteiny a barvivem *Coomassie Brilliant Blue* v kyselém prostředí. Po vazbě na protein má *Coomassie Brilliant Blue* absorpční maximum 595 nm a při této hodnotě je měřena absorbance.

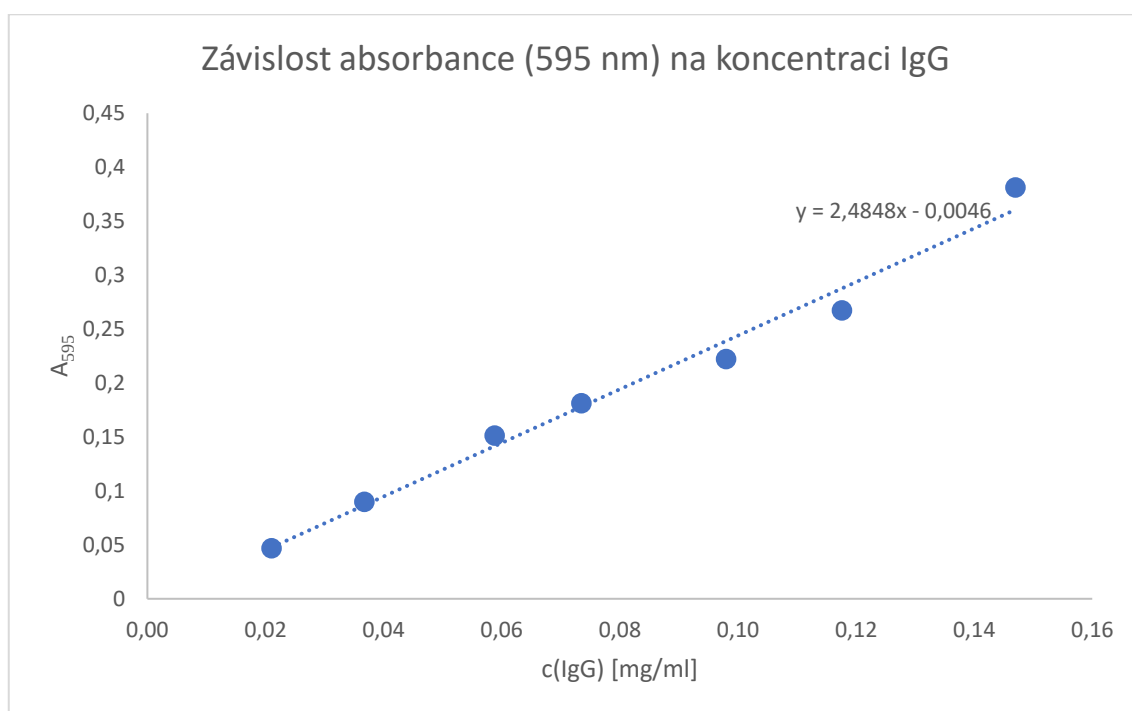
Do mikrozkušavek bylo připraveno 95  $\mu$ l destilované vody s 5  $\mu$ l vzorku proteinu (ředění 20  $\times$ ). Jako standard bylo použito 100  $\mu$ l destilované vody. K těmto roztokům byl následně přidán 1 ml Bradfordova činidla. Obsah mikrozkušavek byl důkladně promíchán a ponechán 15 min inkubovat při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Následně byl obsah mikrozkušavek přelit do plastových kyvet a na spektrofotometru byla proměřena absorbance vzorků při 595 nm. Pro výpočet kalibrační křivky byl použit jako standard roztok  $\gamma$ -globulinu (viz Tab. 1 a Obr. 6).

$$K = \frac{1}{\text{směrnice}} \quad (1)$$

$$c = \text{Absorbance} \cdot K \cdot \text{ředění [mg/ml]} \quad (2)$$

**Tabulka 1: Ředící řada kalibrační křivky pro měření koncentrace proteinu Bradfordovou metodou.**

| Koncentrace<br>[μg/ml] | Absorbance |        |        | Průměr |
|------------------------|------------|--------|--------|--------|
| 21,0                   | 0,0286     | 0,0704 | 0,0419 | 0,0460 |
| 36,8                   | 0,0898     | 0,0916 | 0,0881 | 0,0898 |
| 588,0                  | 0,1344     | 0,1405 | 0,1792 | 0,1514 |
| 73,5                   | 0,1976     | 0,1769 | 0,1699 | 0,1815 |
| 98,0                   | 0,2448     | 0,2250 | 0,1974 | 0,2224 |
| 117,6                  | 0,2770     | 0,2772 | 0,2482 | 0,2675 |
| 147,0                  | 0,3798     | 0,3536 | 0,4109 | 0,3813 |

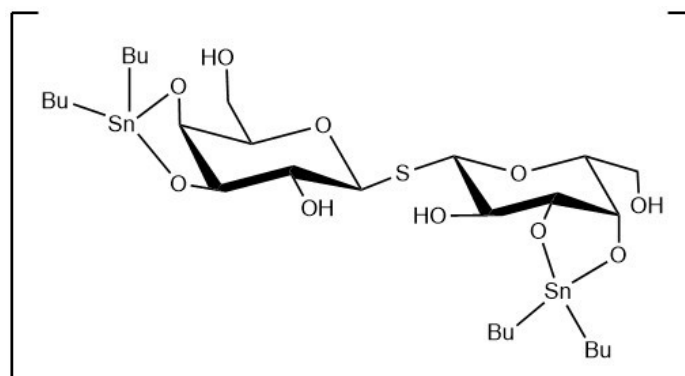


**Obrázek 6: Kalibrační křivka pro měření koncentrace proteinu Bradfordovou metodou.**

### 3.3 Syntéza 3,3'-O-disubstituovaných thiodigalaktosidů

#### 3.3.1 Příprava prekurzoru *bis*-{3-O-[(propynyl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl}sulfanu (1)

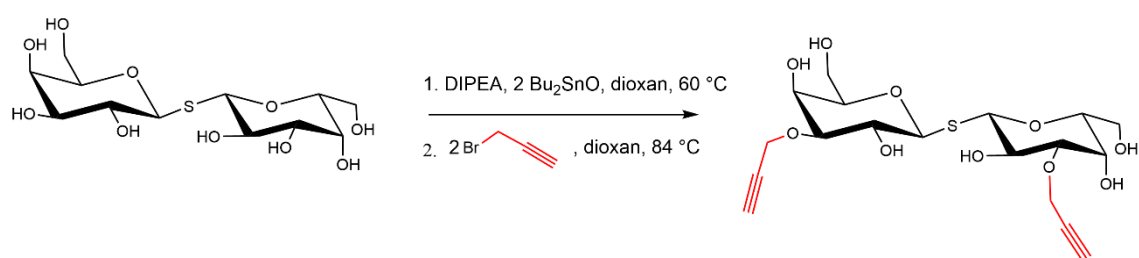
Do skleněné reakční ampule byl přidán thiodigalaktosid (1 ekv., 0,279 mmol, 0,1 g), dibutylcín-oxid (3 ekv., 0,838 mmol, 0,209 g) a tetra-*n*-butylamoniumbromid (1 ekv., 0,279 mmol, 0,09 g). Ampule s reakční směsí byla uzavřena víčkem s gumovým septem a byla udržována pod inertní atmosférou argonu. Následně bylo ke směsi přidáno 6 ml suchého dioxanu za stálého míchání a za vzniku bílé suspenze. Ampule se suspenzí byla pomalu za stálého míchání na míchačce zahřívána až na teplotu 60 °C. Poté byl přidán *N,N*-diisopropylethylamin (5 ekv., 1,397 mmol, 0,242 ml), teplota reakce byla zvýšena na 88 °C a suspenze byla dále při této teplotě míchána po dobu 90 min, aby byla zajištěna dostatečná konverze (analyzováno TLC ve fázi isopropanol/ amoniak/ voda v poměru 7/ 1/ 2). Po skončení reakce byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu. Následně byla zmrazena kapalným dusíkem a lyofilizována do druhého dne, aby se z připravené látky odstranilo co nejvíce vody. Tato reakce poskytla cínový



**Obrázek 7:** Cínový intermediát pro syntézu dipropargylovaného prekurzoru.

intermediát (viz Obr. 7), který byl následně použit pro syntézu dipropargylovaného prekurzoru. Následující den byla ampule s vysušeným cínovým intermediátem promyta argonem a bylo do ní přidáno 6 ml suchého dioxanu, až vznikla suspenze. Poté byla reakční směs opět promyta argonem. Reakční směs byla za stálého míchání a pod inertní atmosférou argonu postupně zahřívána na 82 °C. Následně byl přidán propargylbromid (4 ekv., 1,117 mmol, 0,1 ml), který byl za těchto podmínek ponechán reagovat 3 h. Reakční konverze byla během reakce monitorována TLC. Reakční směs byla z ampule přelita do baňky s kulatým dnem a kapalná fáze byla odpařena na vakuové odparce. Pevný zbytek byl znovu rozpuštěn v methanolu, do baňky byl přidán

silikagel, na který se látky z reakční směsi adsorbovaly, a směs byla odpařena na vakuové odparce do sucha. Vznikl bílý prášek, obsahující směs látek, který byl nanesen na kolonu silikagelu ( $362 \times 14$  mm, s fází dichlormethan/ methanol/ hydroxid amonný v poměru 80/ 20/ 2,5) a poté byl výsledný produkt separován od ostatních látek sloupcovou chromatografií. Roztok, který byl z kolony eluován, byl zachytáván do zkumavek. Zkumavky s nejvyšší koncentrací produktů (analyzováno TLC ve fázi isopropanol/ amoniak/ voda v poměru 7/ 1/ 2) byly slity do baňky s kulatým dnem a odpařeny na vakuové odparce. Po odpaření kapalného obsahu zkumavky na vakuové odparce byl produkt rozpuštěn ve vodě a lyofilizován do druhého dne za vzniku produktu *bis*-{3-*O*-[(propynyl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl}sulfanu (**1**) jako bílého hygroskopického prášku. Čistota produktu byla ověřena pomocí HPLC (Dr. Petrásková z Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR, viz Obr. 14) a produkt byl charakterizován pomocí NMR (Dr. Pelantová z MBÚ AV ČR, viz příloha 1). Sloupcová chromatografie na silikagelu poskytla čistý produkt. Výtěžek reakce byl 73 mg (60 %).

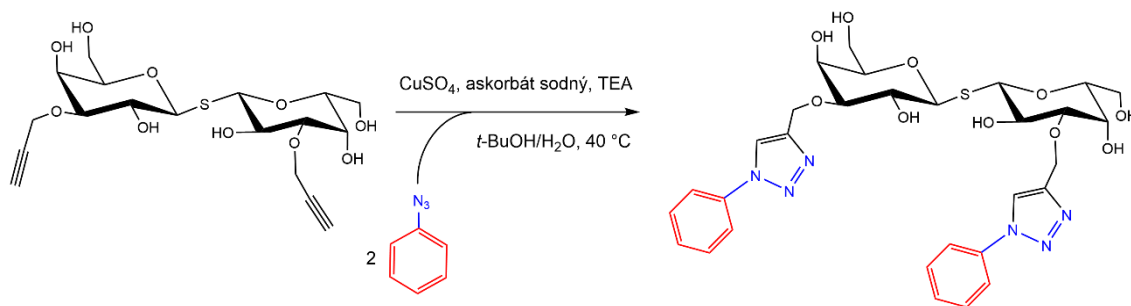


**Obrázek 8:** Schéma syntézy *bis*-{3-*O*-[(propynyl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl}sulfanu (**1**).

### 3.3.2 Příprava

#### *bis*-{3-*O*-[fenyl-1*H*-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl}sulfanu (**2**)

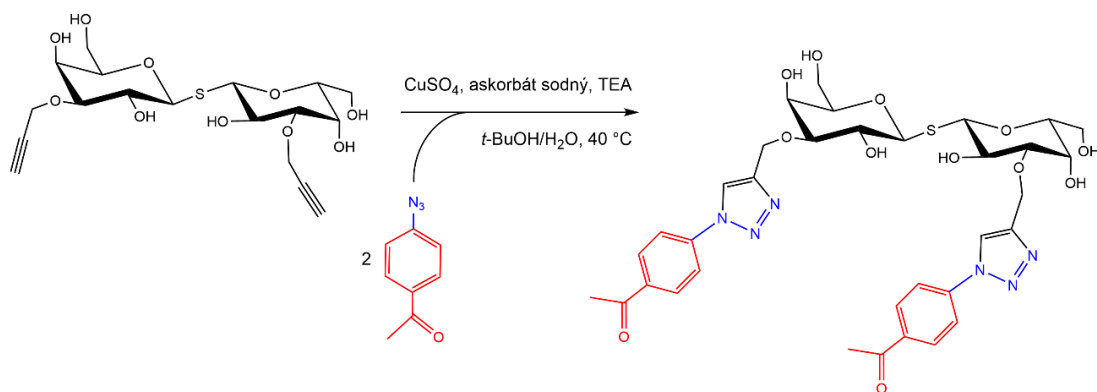
Příprava ligandu **2** proběhla azid-alkynovou Huisgenovou cykloadicí s katalyzátorem na bázi měďných iontů (CuAAC). Produktem samotné Huisgenovy reakce je směs 1,4- a 1,5-disubstituovaných produktů, kdežto CuAAC reakce terminálních alkynů je plně stereoselektivní a vzniká pouze 1,4-disubstituovaný triazol. Jako katalyzátor je používán Cu(I), nebo jeho prekurzory. CuAAC metoda je známá jako tzv. „click chemie“, která je technicky poměrně snadno proveditelná a široce aplikovatelná. Změnou mechanismu reakce překoná Cu(I) katalyzátor snadno aktivační bariéru, která je u nekatalyzované Huisgenovy reakce vysoká, a proto ji lze provádět i za nižších teplot. Podobnou metodou katalyzovanou rutheniem, RuAAC, vzniká naopak 1,5-disubstituovaný triazol. Pro CuAAC reakci lze použít širokou paletu prekurzorů katalyzátoru, který generuje ionty Cu(I), jako například sůl CuSO<sub>4</sub> [60]. Do skleněné reakční ampule byl přidán prekurzor **1** (1 ekv., 0,058 mmol, 25 mg) a 2 ml *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O v poměru 1:1. Následně byl přidán askorbát sodný (0,25 ekv., 0,014 mmol, 2,85 mg) a 2M roztok síranu měďnatého (0,25 ekv., 0,014 mmol, 7,2  $\mu$ l). Ke směsi bylo za stálého míchání přidáno 50  $\mu$ l triethylaminu a vznikla světle žlutá suspenze. Dále byl přidán 0,5M azidobenzen (2 ekv., 0,115 mmol, 240  $\mu$ l), ampule byla uzavřena víčkem s gumovým septem a zahřívána po dobu 1 h při 40 °C v mikrovlnném syntetizéru Biotage Initiator+ (Biotage, Švédsko). Pro odhad reakční konverze byla opět použita TLC (analyzováno ve fázi dichlormethan/ methanol/ hydroxid amonný v poměru 92/ 8/ 2). Poté byl do ampule přidán 1 ml *t*-butanolu a roztok byl znovu zahříván 1 h při 40 °C. Kapalná fáze byla odpařena na vakuové odparce. Po odpaření kapalné fáze byl zbytek pevné fáze resuspendován v methanolu. K tomuto roztoku byl přidán silikagel, na který se syntetizovaná látka adsorbovala. Kapalná fáze byla opět odpařena na vakuové odparce za vzniku bílého prášku se směsí látek a silikagelem. Následně byl produkt purifikován sloupcovou chromatografií na silikagelu (362  $\times$  14 mm, s mobilní fází dichlormethan/ methanol/ hydroxid amonný v poměru 92/ 8/ 2), frakce s čistým ligandem **2** (dle analýzy TLC) byly spojeny, odpařeny na vakuové odparce a lyofilizovány do sucha za vzniku *bis*-{3-*O*-[fenyl-1*H*-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl}sulfanu (**2**) jako bílého prášku. Minoritně vznikal i monosubstituovaný produkt. Čistota látky **2** byla ověřena metodou HPLC (Dr. Petrásková, viz Obr. 15) a produkt byl charakterizován pomocí NMR (Dr. Pelantová, viz příloha 2). Výtěžek reakce byl 16,0 mg (40 %).



**Obrázek 9:** Schéma syntézy *bis*-{3-*O*-[fenyl-1*H*-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]-β-*D*-galaktopyranosyl}sulfanu (**2**).

### 3.3.3 Příprava *bis*-{3-*O*-[(4-acetofenyl)-1*H*-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]-β-*D*-galaktopyranosyl}sulfanu (**3**)

Do skleněné reakční ampule byl přidán prekurzor **1** (1 ekv., 0,230 mmol, 100 mg) a 2 ml *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O v poměru 1:1. Následně byl přidán askorbát sodný (0,25 ekv., 0,058 mmol, 11,4 mg), 2M roztok síranu měďnatého (0,25 ekv., 0,058 mmol, 29 μl) a 50 μl triethylaminu (TEA). Roztok změnil barvu na žlutou. Dále byl přidán 1,4-azidoacetofenon (0,9 ekv., 0,207 mmol, 34 mg) a ampule byla uzavřena víčkem s gumovým septem. Vzniklá suspenze byla zahřívána 1 h při 40 °C v mikrovlnném syntetizéru. Po 1 h se roztok zbarvil do oranžova. K reakční směsi byl přidán 1 ml *t*-butanolu a směs byla ponechána reagovat další hodinu za stejných podmínek, kdy proběhla konverze reakční směsi do vyššího stupně a roztok se zbarvil do hnědé barvy. Reakční konverze byla opět monitorována pomocí TLC (analyzováno ve stejné fázi jako ligand **2**). Kapalná fáze byla odpařena na vakuové odparce. Zbytek pevné fáze byl resuspendován v methanolu a k roztoku byl přidán silikagel, na který se produkt adsorboval. Kapalná fáze byla opět odpařena a výsledná směs látek se silikagelem byla purifikována pomocí sloupcové chromatografie (362 × 14 mm, s mobilní fází dichlormethan/ methanol/ hydroxid amonný v poměru 80/ 20/ 2,5). Frakce obsahující čistý produkt **3** dle analýzy TLC byly spojeny, odpařeny na vakuové odparce a lyofilizovány za vzniku *bis*-{3-*O*-[(4-acetofenyl)-1*H*-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]-β-*D*-galaktopyranosyl}sulfanu (**3**) za vzniku žlutého prášku. V malém množství také vznikl monosubstituovaný produkt. Čistota byla ověřena metodou HPLC (Dr. Petrásková, viz Obr. 16) a produkt byl charakterizován pomocí NMR (Dr. Pelantová, viz příloha 3). Výtěžek reakce byl 28 mg (16 %).



**Obrázek 10:** Schéma syntézy *bis*-{3-*O*-[(4-acetofenyl)-1*H*-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]-β-*D*-galaktopyranosyl}sulfanu (**3**).

### 3.3.4 Detekce průběhu organické syntézy metodou TLC

Chromatografie na tenké vrstvě je separační metoda, která odděluje látky ve směsi na základě jejich rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. U tenkovrstvé chromatografie na silikagelu je hliníková destička pokryta tenkou vrstvou silikagelu. Silikagel je forma oxidu křemičitého, kde jsou mezi sebou atomy křemíku zesíťovány molekulami kyslíku. Na křemík je navázána ještě hydroxylová skupina, která tvoří vodíkové můstky a další nekovalentní interakce s analyzovanými látkami a udává povrchu destičky její polární charakter. Mobilní fáze je směs rozpouštědel, většinou organických, která s sebou nese vzhůru k čelu destičky analyzované vzorky. Rychlost, kterou vzorek migruje, je dána jeho rozpustností v mobilní fázi a stupněm jeho interakce se stacionární fází (silikagelem). Čím vyšší má vzorek afinitu k silikagelu, tím je jeho migrace pomalejší. Mobilní fáze se ponechává vystoupat do asi 4/5 délky destičky a místo, kam dostoupala, se nazývá čelo eluce. Jako start se značí místo, kam se na destičku nanáší analyzovaný vzorek. Produkty reakcí byly naneseny skleněnou kapilárou na TLC destičku (Silikagel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Německo) a následně byly ponechány v uzavřené nádobě s mobilní fází. Po ukončení vyvíjení byly skvrny odpovídající separovaným látkám vizualizovány pod UV světlem a následně namočením TLC destičky do 5% kyseliny sírové v ethanolu a zahřátím horkovzdušnou pistolí. Pro charakterizaci látek se využívá tzv. retenční faktor,  $R_f$  (viz Obr. 17), který lze použít jako orientační hodnotu charakteristickou pro danou látku. Hodnota retenčního faktoru je závislá na vyvíjecí soustavě, povaze látky, teplotě i množství

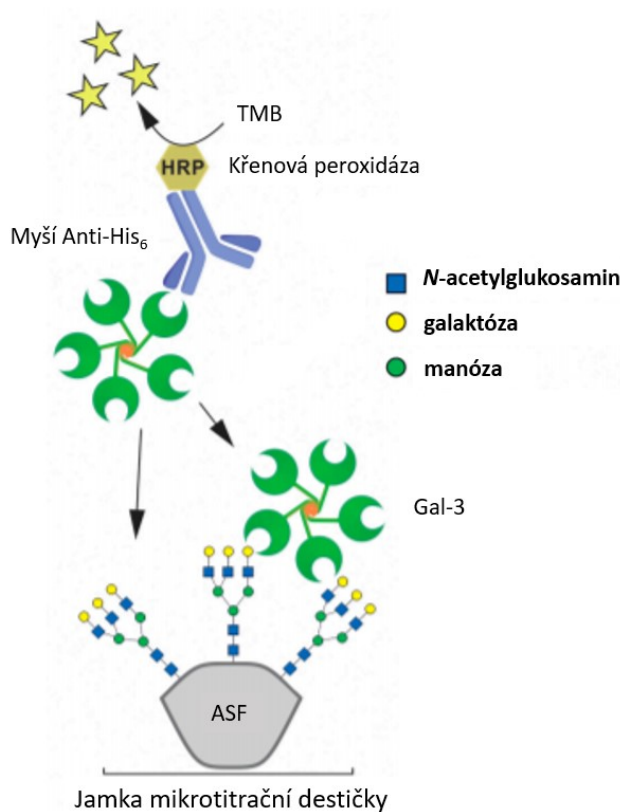
nanesené látky. Vzhledem k tomu, že je retenční faktor závislý na tolika vlivech, používá se většinou ještě další látka jako standard, například pro porovnání retenčních faktorů.

$$R_f = \frac{\text{vzdálenost středu skvrny od startu}}{\text{vzdálenost startu od čela}} \quad (3)$$

### 3.4 Metoda ELISA v kompetitivním uspořádání

Pro zjištění inhibičního potenciálu glykomimetik ke galektinům bylo použito kompetitivní imunochemické stanovení ELISA (viz Obr. 11). Do 96-jamkové mikrotitrační destičky byl navázán asialofetuin (ASF, 50  $\mu$ l, 0,1  $\mu$ M), který v tomto uspořádání soutěží s příslušnými glykomimetiky v roztoku o vazbu galektinu. ASF je glykoprotein, který má tři větve N-glykanů zakončené LacNAc. Tyto glykany poté interagují s Gal-1 nebo Gal-3. Destička byla inkubována přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla destička promyta 3  $\times$  250  $\mu$ l fosfátového pufru PBS-Tween, aby se vymyl zbytek asialofetuinu, který se nenavázal. Dále byly jamky blokovány po dobu 1 h s 250  $\mu$ l blokovacího pufru (2% BSA v PBS) při laboratorní teplotě, aby se zabránilo následné nespecifické adhezi proteinů. Pak byla deska znovu promyta 3  $\times$  250  $\mu$ l pufru PBS-Tween. Následně byly připraveny roztoky galektinů a jejich ligandů. Tyto roztoky byly připraveny metodou tzv. dvojkového ředění v EPBS pufru, kdy následující jamka měla vždy poloviční koncentraci ligandu než ta předchozí. Jelikož byly některé sloučeniny špatně rozpustné v EPBS, byl jako kosolvent použit DMSO (10 obj. %). Do jamek bylo naneseno 25  $\mu$ l roztoku s galektinovými ligandy a 25  $\mu$ l Gal-1 (10  $\mu$ M) nebo Gal-3 (10  $\mu$ M) v EPBS pufru. Po nanesení připravených roztoků do jamek byla mikrotitrační destička ponechána inkubovat 2 h při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla destička znovu promyta 3  $\times$  250  $\mu$ l pufru PBS-Tween, což odstranilo nenavázané galektiny. Dále bylo přidáno 50  $\mu$ l monoklonální myší protilátky proti histidinové kotvě konjugované s křenovou peroxidasou (Anti-His<sub>6</sub>-peroxidasa) v PBS, která označila navázaný galektin. Po 1 h inkubaci při laboratorní teplotě byla deska znovu promyta 3  $\times$  250  $\mu$ l PBS-Tween, aby se odstranila nenavázaná protilátka. Dále bylo do každé jamky přidáno 50  $\mu$ l roztoku chromogenního substrátu pro křenovou peroxidasu TMB

ONE. Reakce proběhla za tmy. Asi po 20 min, kdy absorbance dosáhla hodnoty přibližně 0,9 - 1,0, byla reakce zastavena přidáním 50  $\mu$ l 3M HCl. Absorbance výsledných žlutých roztoků byly měřeny při 450 nm spektrofotometrem Sunrise Tecan. Absorbance naměřené spektrofotometrem byly vyhodnoceny nelineární regresí v programu Magellan a GraphPad Prism 9 dle modelu „*inhibitor vs. response (variable slope)*“.

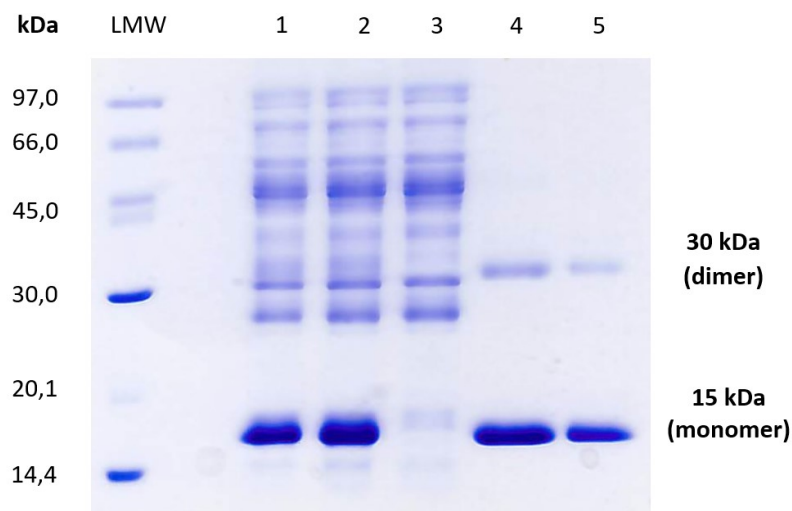


**Obrázek 11: Schéma kompetitivní imunochemické metody ELISA.** Galektinové ligandy soutěží s imobilizovaným asialofetuinem o vazbu na galektin. Pro detekci navázaného galektinu byla použita myší monoklonální protilátka proti histidinové kotvě konjugovaná s křenovou peroxidasou (HRP, *horseradish peroxidase*). Křenová peroxidáza oxidovala TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), který poté poskytl fotometrický signál.

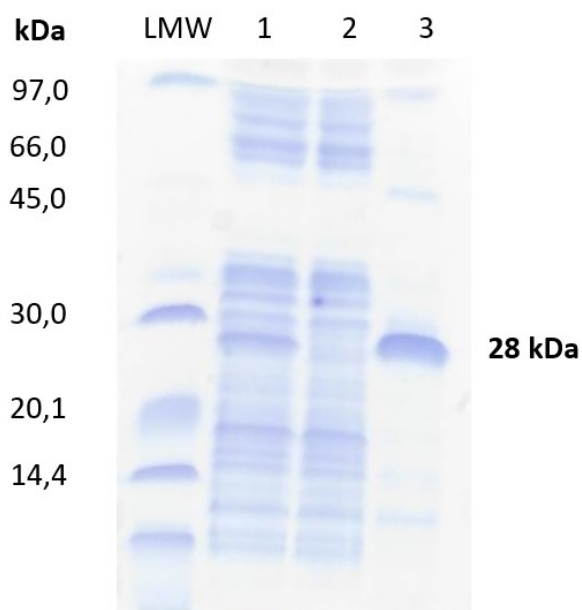
## 4 Výsledky

### 4.1 Produkce a purifikace galektinů

Pro rekombinantní expresi Gal-1 nebo Gal-3 byly kultivovány kompetentní buňky *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS, transformované vektorem pETDuet-1 nesoucím příslušný galektinový konstrukt s histidinovou kotvou na N-konci. Expres galektinů byla indukována přidavkem IPTG. Pro purifikaci galektinů byla buněčná biomasa sonikována na ledu, kdy proběhlo narušení buněčné stěny *E. coli*, a supernatant obsahující rekombinantní galektiny byl nanesen na kolonu HisTrap. Galektiny byly purifikovány chelatační afinitní chromatografií s  $\text{Ni}^{2+}$  ionty, kdy došlo k jejich zachycení pomocí histidinové kotvy. Poté byly galektiny eluovány elučním pufrům s vysokou koncentrací imidazolu. Po dialýze za účelem odstranění imidazolu byla Bradfordovou metodou stanovena koncentrace galektinů. Průběh purifikace a čistota galektinů byly postupně během purifikace analyzovány pomocí SDS elektroforézy odběrem vzorků z jednotlivých fází purifikace (viz Obr. 12, 13). Roztok galektinu v PBS pufru byl uložen do chladu, kde byl stabilní po dobu několika měsíců. Pro produkci Gal-1 bylo použito 7,3 g buněk a pro produkci Gal-3 bylo použito 7,7 g buněk, vždy z 2,4 l média. Výtěžek purifikace byl 153 mg Gal-1 a 160 mg Gal-3. Čistota proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Pro Gal-1 byl připraven 15% SDS gel a pro Gal-3 12% SDS gel z důvodu jejich různé velikosti. Pro srovnání hmotností byl použit nízkomolekulární (LMW) standard. U Gal-1 byl na SDS-PAGE gelu proužek velikosti 14,4 kDa, což odpovídá hmotnosti monomerní formy Gal-1. V oblasti 30 kDa se nachází ještě dimerní forma Gal-1. Výsledná koncentrace purifikovaného proteinu byla poměrně vysoká, což vedlo k jeho koncentračně závislé dimerizaci, která je evidentně stabilní i za podmínek SDS-PAGE [61]. U SDS-PAGE gelu pro Gal-3 se proužek purifikovaného proteinu nacházel v oblasti okolo 30 kDa, přibližně odpovídající hmotnosti Gal-3 28 kDa. Čistota purifikovaného proteinu byla v obou případech vyšší než 90 %.



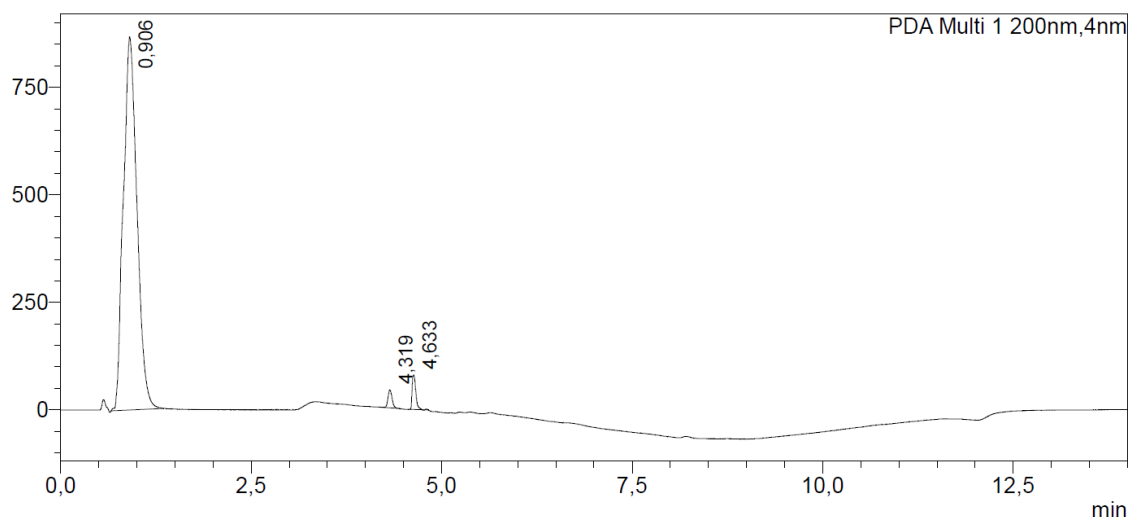
**Obrázek 12: 15% SDS-PAGE gel z purifikace Gal-1.** LMW - nízkomolekulární standard: fosforylase b (97,0 kDa), albumin (66,0 kDa), ovalbumin (45,0 kDa), karbonanhydrasa (30,0 kDa), inhibitor trypsinu (20,1 kDa),  $\alpha$ -laktalbumin (14,4 kDa). 1 - supernatant po sonikaci a centrifugaci. 2 - supernatant po filtraci. 3 - pufr proteklý kolonou po nanesení supernatantu. 4 - Gal-1 po dialýze. 5 - Gal-1 po filtraci. Monomerní Gal-1 se nachází v oblasti s hmotností 15 kDa. Dále se zde vyskytuje dimerní forma Gal-1 o hmotnosti přibližně 30 kDa.



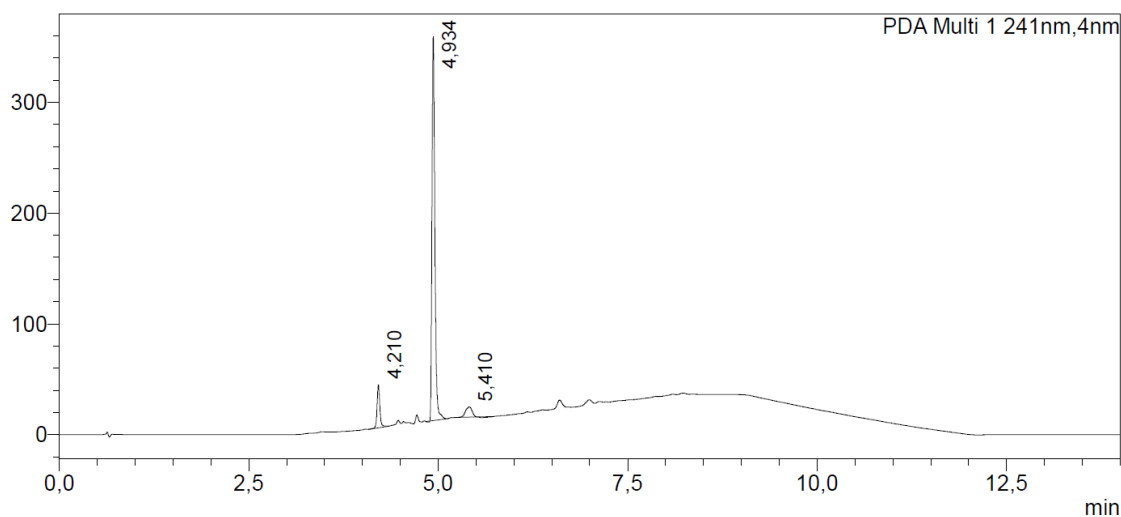
**Obrázek 13: 12% SDS-PAGE gel z purifikace Gal-3.** LMW - nízkomolekulární standard: fosforylase b (97,0 kDa), albumin (66,0 kDa), ovalbumin (45,0 kDa), karbonanhydrasa (30,0 kDa), inhibitor trypsinu (20,1 kDa),  $\alpha$ -laktalbumin (14,4 kDa). 1 - supernatant po sonikaci a centrifugaci. 2 - pufr proteklý kolonou po nanesení supernatantu. 3 - Gal-3 po dialýze a filtraci. Gal-3 se zde nachází v oblasti 30 kDa, což přibližně odpovídá jeho hmotnosti 28 kDa.

## 4.2 Syntéza a purifikace glykomimetik

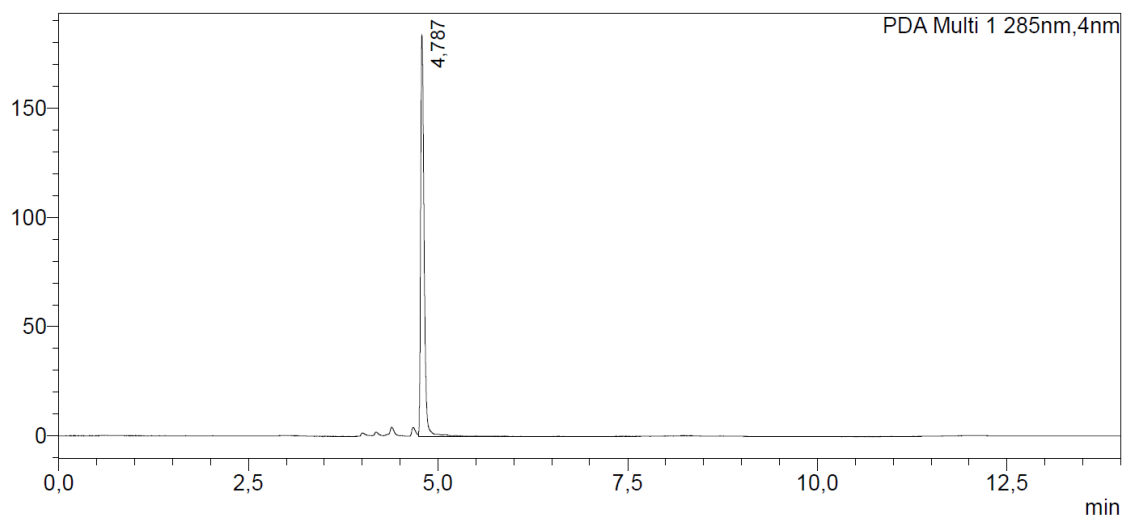
Sacharidová glykomimetika **2** a **3** byla syntetizována metodou azid-alkynové Huisgenovy cykloadice za katalýzy Cu(I) ionty. Nejprve byl připraven prekurzor **1**, který byl použit pro syntézu ligandu **2** a ligandu **3**, jež byly testovány na vazbu s galektiny. Jako výchozí látka byl použit samotný TDG bez substituentů, jenž je komerčně dostupný. Syntéza prekurzoru **1** probíhala pod inertní atmosférou argonu, aby se zamezilo přístupu kyslíku a vlhkosti do reakční směsi. Pro sledování reakční konverze byla použita TLC (analyzováno ve fázi isopropanol/ amoniak/ voda v poměru 7/ 1/ 2) a migrace prekurzoru **1** byla porovnána s výchozí látkou TDG. Prvním krokem byla syntéza cínového intermediátu, ze kterého byl poté prekurzor **1** připraven a purifikován sloupcovou chromatografií na silikagelu ve výtěžku 73 mg (60 %). Syntéza ligandů **2** a **3** pak vycházela z prekurzoru **1** a probíhala v mikrovlnném syntetizéru, který reakci významně urychlil oproti konvenčnímu zahřívání. Pro sledování reakční konverze byla opět použita TLC (analyzováno ve fázi dichlormethan/ methanol/ hydroxid amonný v poměru 92/ 8/ 2), jako standard byl použit prekurzor **1**. Reakční směsi ligandů byly opět purifikovány metodou sloupcové chromatografie na silikagelu (362 × 14 mm). Čisté ligandy **2** a **3** byly pak získány odpařením frakcí pomocí vakuové odparky a následnou lyofilizací ve výtěžku 16 mg (40 %) a 28 mg (16 %). Struktura všech produktů byla ověřena pomocí NMR (Dr. Pelantová z MBÚ AV ČR, viz příloha 1, 2, 3) a čistota pomocí HPLC (Dr. Petrásková z MBÚ AV ČR, viz Obr. 14, 15, 16). Největší ztráty byly způsobeny purifikační metodou sloupcové chromatografie na silikagelu, kde syntetizované produkty ulpěly ve velkém množství na stacionární silikagelové fázi z důvodu své poměrně vysoké polaritě. Modely TLC destiček byly vytvořeny v programu ChemDraw dle autentických destiček z analýz TLC, aby odpovídaly tvarům a retenčním faktorům na původních TLC destičkách.



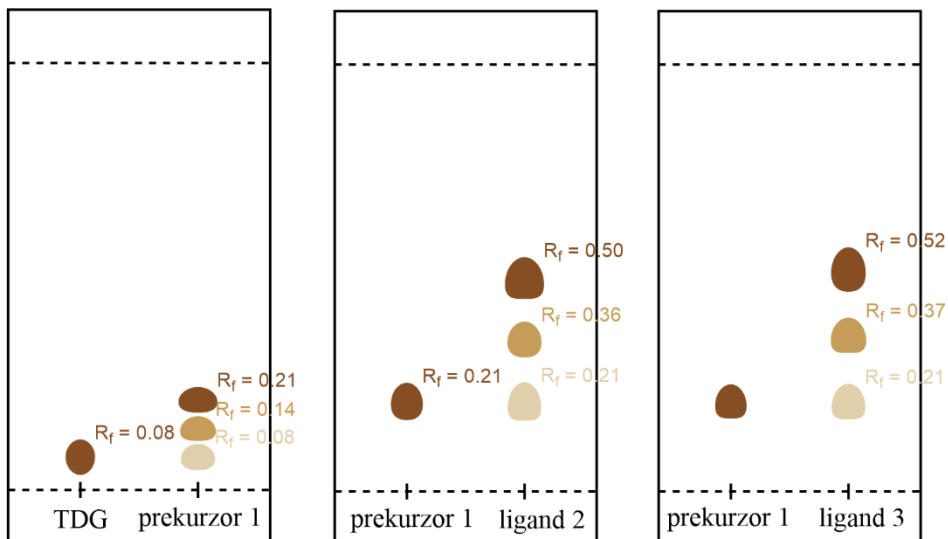
**Obrázek 14: Chromatogram HPLC prekurzoru 1.** Čistota 96 % (použitá kolona: Chromolith RP-18e (100 × 3 mm), průtok 1 ml/min, detekováno při 241 nm, retenční čas 0,906 min, acetonitril/kyselina mravenčí).



**Obrázek 15: Chromatogram HPLC ligandu 2.** Čistota 86 % (použitá kolona: Chromolith RP-18e (100 × 3 mm), průtok 1 ml/min, detekováno při 241 nm, retenční čas 4,934 min, acetonitril/kyselina mravenčí).



**Obrázek 16: Chromatogram HPLC ligandu 3.** Čistota 99 % (použitá kolona: Chromolith RP-18e (100 × 3 mm), průtok 1 ml/min, detekováno při 241 nm, retenční čas 4,787 min, acetonitril/kyselina mravenčí).



**Obrázek 17: TLC destička s reakčními směsmi syntézy ligandů 2 a 3.** Vlevo jsou vyobrazeny skvrny použitých standardů. Vpravo je znázorněna reakční směs. Nejtmavší skvrna, která má nejvyšší  $R_f$ , je požadovaný produkt. Prostřední světlejší skvrna je monosubstituovaný intermediát (zreagovala jen jedna propargylová skupina na TDG). Nejsvětlejší spodní skvrna je nezreagovaná výchozí látka **1**. Větší sytost horní skvrny ukazuje, že reakční konverze proběhla s vysokou konverzí směrem k požadovanému produktu. TDG - thiodigalaktosid, použitý jako standard pro prekursor **1**. Prekursor **1** - dipropargylovaný TDG, použitý jako výchozí látka pro syntézu ligandů **2** a **3**.

### 4.3 Stanovení vazebné afinity syntetizovaných glykomimetik ke galektinům

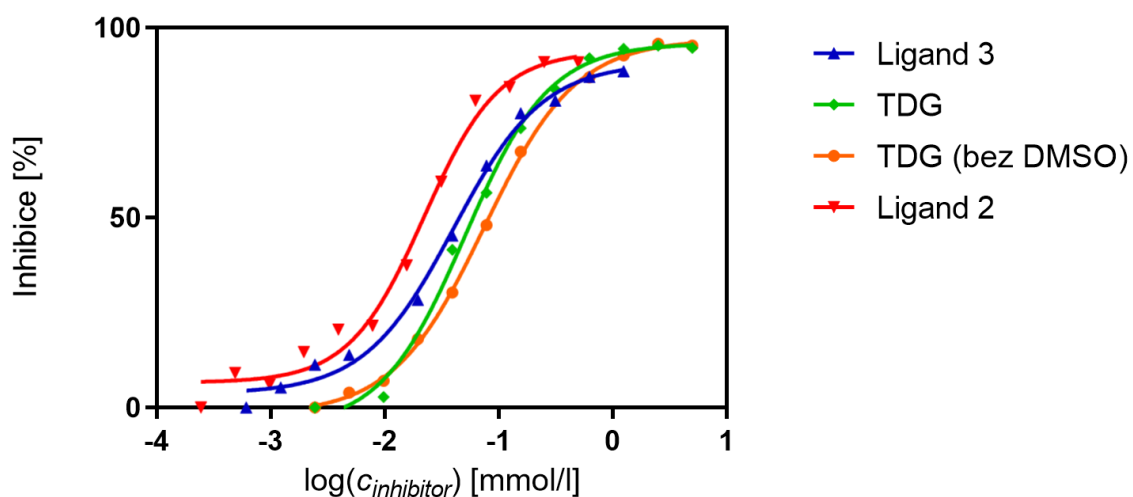
Imunochemickou metodou ELISA v kompetitivním uspořádání byla určena vazebná afinita syntetizovaných glykomimetických ligandů a standardu TDG ke galektinům (viz Tab. 2, 3). Tato metoda využívá imobilizovaný kompetitivní ligand ASF, který soutěží o vazbu na rekombinantní galektin s testovaným inhibitorem v roztoku. Množství zbylého galektinu, který zůstane navázaný v jamce (pokud je koncentrace inhibitoru v roztoku příliš nízká nebo je inhibitor málo účinný), bylo stanoveno protilátkou proti histidinové kotvě, která byla konjugována s křenovou peroxidázou. Po přidání substrátu křenové peroxidasy TMB byly připraveny roztoky, jejichž výsledné absorbance byly měřeny spektrofotometricky při 450 nm přístrojem Sunrise Tecan a za použití programu Magellan. Z naměřených hodnot byla sestrojena sigmoida (viz Obr. 18, 19) a v programu GraphPad Prism byla stanovena hodnota poloviční maximální inhibiční koncentrace ligandu  $IC_{50}$ , při níž je inhibována vazba právě 50 % galektinu na imobilizovaný ASF. Stanovení poloviční maximální inhibiční koncentrace ligandů **2** a **3** bylo provedeno ve třech nezávislých měřeních. Byla porovnána inhibiční koncentrace ligandů vůči Gal-1 a Gal-3. Vzhledem ke špatné rozpustnosti ligandů **2** a **3** v PBS pufru bylo stanovení ELISA prováděno v 10% DMSO. Pro zjištění vlivu DMSO na inhibici galektinů byla ještě měřena inhibiční koncentrace TDG bez přidaného DMSO jako kontrola. Ligandy **2** a **3** byly lepší inhibitory Gal-3 než Gal-1. Nesubstituovaný TDG v DMSO prakticky nerozlišoval mezi oběma galektiny (vykazuje srovnatelnou hodnotu  $IC_{50}$ ). Je patrné, že přítomnost 10% DMSO snižuje hodnotu  $IC_{50}$  o asi 33 % u Gal-1 a asi o 53 % u Gal-3 oproti hodnotě bez DMSO. Ze zjištěných hodnot je patrné, že TDG bez DMSO je asi 1,5× selektivnější inhibitor Gal-1 než Gal-3. Hodnota  $IC_{50}$  pro TDG s Gal-1 je  $83,6 \pm 6,9 \mu\text{mol/l}$  a pro TDG s Gal-3 je  $115,3 \pm 10,7 \mu\text{mol/l}$ . TDG s přídavkem DMSO má srovnatelnou hodnotu  $IC_{50}$  pro Gal-1 ( $IC_{50} = 56,0 \pm 8,6 \mu\text{mol/l}$ ) i Gal-3 ( $IC_{50} = 54,4 \pm 3,5 \mu\text{mol/l}$ ). Ligand **2** (fenyl) je 4× selektivnější ke Gal-3 než Gal-1. Jeho hodnota  $IC_{50}$  je pro Gal-1  $23,7 \pm 1,4 \mu\text{mol/l}$  a pro Gal-3 je  $6,0 \pm 0,7 \mu\text{mol/l}$ . Ligand **3** má 8× vyšší selektivitu ke Gal-3 oproti Gal-1. Pro Gal-1 je hodnota  $IC_{50}$   $38,8 \pm 3,3 \mu\text{mol/l}$  a pro Gal-3  $4,7 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$ .

**Tabulka 2: Hodnoty poloviční maximální inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) syntetizovaných ligandů pro Gal-1 (hodnoty byly stanoveny v přítomnosti 10% DMSO, pokud není uvedeno jinak).**

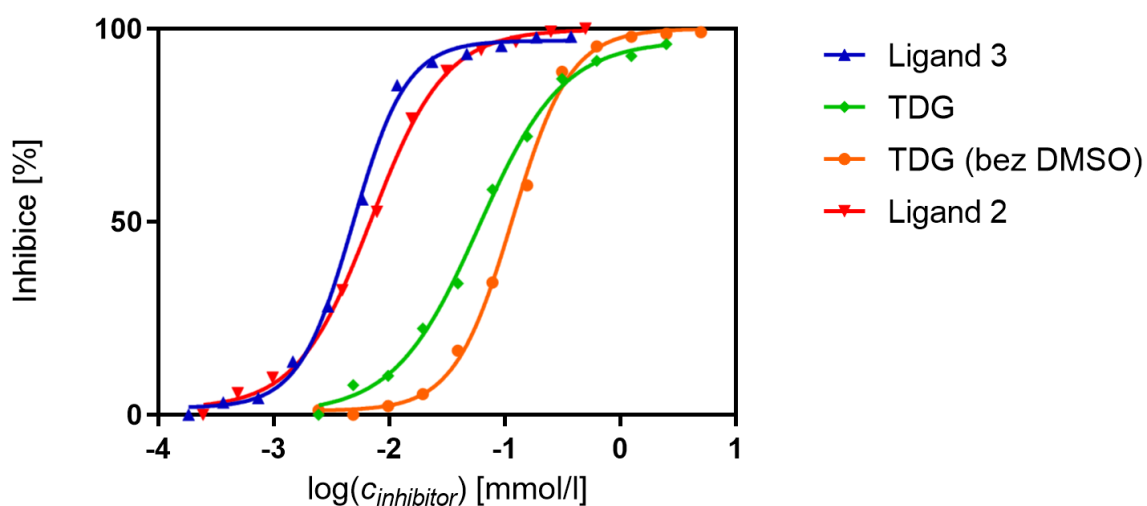
| Inhibitor             | IC <sub>50</sub> [μmol/l] |      |      |            |
|-----------------------|---------------------------|------|------|------------|
|                       | 1                         | 2    | 3    | Průměr     |
| TDG (bez DMSO)        | 91,7                      | 74,8 | 84,3 | 83,6 ± 6,9 |
| TDG                   | 68,1                      | 50,7 | 49,3 | 56,0 ± 8,6 |
| Ligand 2 (fenyl)      | 22,1                      | 23,5 | 25,5 | 23,7 ± 1,4 |
| Ligand 3 (acetofenyl) | 34,3                      | 40,3 | 41,8 | 38,8 ± 3,3 |

**Tabulka 3: Hodnoty poloviční maximální inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) syntetizovaných ligandů pro Gal-3 (hodnoty byly stanoveny v přítomnosti 10% DMSO, pokud není uvedeno jinak).**

| Inhibitor             | IC <sub>50</sub> [μmol/l] |       |       |              |
|-----------------------|---------------------------|-------|-------|--------------|
|                       | 1                         | 2     | 3     | Průměr       |
| TDG (bez DMSO)        | 128,0                     | 116,0 | 101,8 | 115,3 ± 10,7 |
| TDG                   | 51,2                      | 52,9  | 59,3  | 54,4 ± 3,5   |
| Ligand 2 (fenyl)      | 5,2                       | 6,0   | 7,0   | 6,0 ± 0,7    |
| Ligand 3 (acetofenyl) | 4,6                       | 4,6   | 4,8   | 4,7 ± 0,1    |



Obrázek 18: Graf závislosti procentuální inhibice vazby Gal-1 na ASF na koncentraci ligandů (GraphPad Prism 9).



Obrázek 19: Graf závislosti procentuální inhibice vazby Gal-3 na ASF na koncentraci ligandů (GraphPad Prism 9).

## 5 Diskuse

Gal-1 a Gal-3 jsou nejhojnějšími a zároveň nejvíce studovanými zástupci z rodiny galektinů. V některých tkáních se vyskytuje pouze Gal-1, naopak v jiných pouze Gal-3. Gal-1 je exprimován v kosterních a srdečních myocytech, hepatocytech a prostatických stromálních buňkách, zatímco Gal-3 převážně v epiteliálních buňkách zažívacího a dýchacího traktu. V mnoha buňkách a tkáních imunitního systému jsou exprimovány oba galektiny, jako například v T a B buňkách, NK buňkách, makrofázích, endoteliálních buňkách a fibroblastech [27]. To klade velké nároky na vývoj selektivních inhibitorů, zejména z toho důvodu, že biologické funkce obou galektinů mohou být v některých případech protichůdné. Gal-1 reguluje buněčný růst, adhezi, signalizaci, dělení, vývoj, funkce imunitního systému a interakce mezi hostitelem a patogenem. Vzhledem k tomu, že se účastní nádorových procesů, může sloužit také jako nádorový marker [22]. Gal-3, stejně jako Gal-1, reguluje jak fyziologické, tak patologické procesy. Při zánětu podporuje buněčnou adhezi a fagocytózu [11]. Dále stimuluje proliferaci preadipocitů a DNA syntézu [12], a jako jediný člen galektinové rodiny má proapoptickou i protiapoptickou aktivitu, která je závislá na buněčné lokalizaci [27]. Je zřejmé, že zvláště u procesů spojených s imunitní reakcí organismu či metabolismem buněk je třeba pečlivě stanovit selektivitu připravených terapeutických inhibitorů. Syntetické inhibitory cílící na galektinovou CRD mají schopnost účinně blokovat negativní dopady galektinů při patologických stavech [31]. Glykomimetické inhibitory jsou navrhovány tak, aby soutěžily o vazebné místo s přirozenými ligandy, a tím inhibovaly účinky, které má galektin na organismus [31]. Vývoj inhibitorů často směřoval k modifikaci přirozených ligandů Gal-1 a Gal-3, jako je laktóza nebo LacNAc, ale TDG prokazuje vyšší inhibiční účinnost než tyto přirozené ligandy, zvláště díky přítomnosti atomu síry. Na rozdíl od inhibitorů, které jsou založeny na modifikované laktóze nebo LacNAc, je TDG odolnější vůči degradaci a s triazolovým substituentem na uhlíku C-3 má i vyšší afinitu ke galektinům. Nízkomolekulární inhibitory založené na struktuře TDG s modifikací na uhlíku C-3 vykazují obecně zvýšenou selektivitu a účinnost oproti nesubstituovanému TDG [42]. Naproti tomu jistou nevýhodou je horší možnost selektivní substituce pro konjugaci k multivalentním nosičům, jak ukazuje recentní práce z Laboratoře biotransformací [62]. Publikovaná glykomimetika s derivatizací na C-3 jsou většinou založena na substituci C-3 přímým azidem (viz Obr. 4). Existují i metody připojení aromatického substituentu k TDG přes

amidovou nebo esterovou vazbu. Takové syntetické metody ale často zahrnují pokročilé víceetapové postupy a komplexní strategie s použitím chránicích skupin a jejich následného odstranění. Kvůli velkému množství reakčních kroků dochází i k značným ztrátám na výtěžku. Proto byla vyvinuta jednoduchá dvouetapová syntéza zprostředkovaná cínovým intermediátem pro připojení aromatických substituentů přes triazolový kruh. Tato metoda nevyžaduje použití chránicích skupin, má pouze dva syntetické kroky a její výtěžky jsou oproti konvenčním syntetickým metodám vyšší [63]. Tato metoda, která umožňuje selektivní substituci C-3 u nechráněného TDG propargylem za využití dibutylcínoxidu, byla použita pro vnesení aromatické substituce na TDG v této práci. Velmi zajímavý je mechanismus této reakce, neboť ji lze provádět za mírných reakčních podmínek se snadno dostupnými výchozími látkami. Její mechanismus zahrnuje cykloadici terminálního acetylenu na azid katalyzovanou Cu(I) ionty. Katalyzátor na bázi Cu(I) iontů napomáhá orientaci substituce do požadované polohy *para*. V této práci vycházela dvoustupňová syntéza vycházela z prekursoru *bis*-{3-*O*-[(propynyl)methyl]-β-D-galaktopyranosyl}sulfanu **1**, který byl připraven výše popsanou metodou z komerčně dostupného nechráněného TDG. Pro syntézu ligandů **2** a **3** byla použita azid-alkynová Huisgenova cykloadice. Přestože je tato reakce, tzv. „click chemie“, obecně považována za velmi jednoduchou, probíhající prakticky okamžitě za podmínek kompatibilních s *in vivo* systémy, syntéza prekursoru **1** a ligandů **2** a **3** probíhala až za zvýšené teploty a po dobu několika hodin, než proběhla požadovaná konverze na disubstituované deriváty. V průběhu reakce se v reakčních směsích při syntéze ligandu **2** a ligandu **3** ustanovila rovnováha mezi třemi látkami. První látka, výchozí, byla dipropargylovaný TDG. Tento produkt se v reakční směsi nacházel v minimálním množství. Dále vznikal monosubstituovaný derivát, kdy bylo dané činidlo navázané pouze na jeden propargyl TDG. Tento produkt však nebyl součástí práce a jeho izolace byla poměrně obtížná. Syntéza monosubstituovaných derivátů je složitější, pro nutnost optimalizace času reakce a množství přidávaných reaktantů, jak bylo ukázáno v předchozí studii [62]. Proto byly v rámci této práce reakční směsi ponechány reagovat na disubstituovaný derivát, kdy bylo zvolené činidlo navázáno na oba propargylované konce TDG. Produkty byly odděleny od zbytku směsi pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Jako stacionární fáze byl použit polární silikagel a jako mobilní fáze byla použita směs CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH/ NH<sub>4</sub>OH v různých poměrech. Z důvodu vysoké polaritativy připravovaných látek byla i zvolená eluční soustava silně polární, což způsobilo značné ztráty produktu, a právě zde došlo

k největší ztrátám na výtěžku. Ačkoliv je substituce propargylem prakticky kvantitativní, po izolaci bylo získáno jen 60 % prekursoru **1**. Odlišné výtěžky ligandu **2** (40 %) a **3** (16 %) mohly být způsobeny sterickými důvody. Stanovení afinity připravených ligandů bylo provedeno imunochemickou metodou ELISA. Pro tento účel byly purifikovány rekombinantní Gal-1 a Gal-3 v *E. coli*. Pro purifikaci rekombinantních proteinů může být aplikováno mnoho klasických separačních metod, které jsou založeny na fyzikálně-chemických vlastnostech proteinu, jako je náboj, velikost a hydrofobnost. Tyto metody ovšem nemusí být zcela selektivní a mohou vést k nízkým výtěžkům. V důsledku toho byly vyvinuty jednoduché a rychlé alternativy pro purifikaci [64]. V současnosti jsou proteiny obvykle exprimovány s histidinovou afinitní kotvou připojenou k N- nebo C-konci, která usnadňuje jejich purifikaci. Chelatační afinitní chromatografie je považována za jednu z nejúčinnějších metod při separaci a purifikaci rekombinantních proteinů od proteinů přirozeně se vyskytujících v *E. coli*. Proces je založený na interakci mezi přechodným kovem, v tomto případě  $\text{Ni}^{2+}$ , a histidinem na povrchu proteinu. Přestože je tato metoda snadno přizpůsobitelná mnoha systémům exprimujícím proteiny, má některá omezení, jako je například nutnost odstranění buněčných zbytků a koloidních kontaminantů. Výhodou oproti většině jiných postupů je, že histidinová kotva může být použita i za denaturujících podmínek [65]. Oba galektiny byly charakterizovány pomocí SDS elektroforézy. Pro každý galektin byl připraven SDS gel s jinou hustotou, jelikož z důvodu své rozdílné velikosti putují v gelovém prostředí o stejné hustotě jinou rychlostí. Na SDS-PAGE se nacházel Gal-1 i v dimerní formě z důvodu vysoké koncentrace proteinu po purifikaci. Gal-1 v roztoku existuje v rovnováze mezi dimerní a monomerní formou. Dimerizace je založena na hydrofobních interakcích mezi podjednotkami a vytvoření hydrofobní kapsy mezi podjednotkami, čímž je protein stabilizován. Tyto hydrofobní interakce zprostředkovávají vedlejší řetězce aminokyselin na prvním  $\beta$ -vlákně na N-konci (zbytky 4-7) a vedlejší řetězce aminokyselin na posledním  $\beta$ -vlákně C-konce (zbytky 126-132) [61]. Gal-3 se nacházel na gelu SDS-PAGE pouze ve své monomerní formě, jelikož oligomerizace je v jeho případě evokována především přítomností multivalentních ligandů. Při vazbě ligandu do vazebného místa jeden z galaktózových kruhů symetrické TDG molekuly obsazuje v Gal-3 vazebné místo C (viz Obr. 1) a utváří charakteristickou interakci mezi galektinem a galaktosidem. Hlavní interakce jsou vodíkové vazby zapojující hydroxylovou skupinu galaktózy na uhlících C-4 a C-6 a interakce pyranózového kruhu s tryptofanem Trp181, ekvivalentnímu s Trp68 v Gal-1. V Gal-1 i

Gal-3 se druhý galaktózový kruh TDG orientuje do vazebného místa D (viz Obr. 1) a tvoří méně interakcí s proteinem (podobně jako glukóza v laktóze při vazbě na galektin), přičemž hlavní interakce zahrnuje vodíkovou vazbu s hydroxylem na uhlíku C-2. Existuje však důležitý rozdíl mezi těmito galektiny v jejich interakci s TDG. Atom síry, který pojí galaktózové zbytky v TDG, tvoří van der Waalsovy interakce s His52, který se nachází ve vazebné kapse Gal-1. Tento kontakt není pozorován při vazbě nativních  $\beta$ -galaktosidů, jelikož kyslík tvoří kratší vazbu mezi galaktózovými zbytky než síra. Gal-3 postrádá aminokyselinový zbytek ekvivalentní zbytku His52, a proto nevykazuje srovnatelné interakce. Tento dodatečný kontakt mezi His52 a sírou by mohl být důvodem vyšší afinity TDG ke Gal-1 proti Gal-3 [66]. Podle publikované studie [40] může C-3 modifikace TDG zlepšit jeho afinitu vůči Gal-3 a zvýšit selektivitu oproti Gal-1. Hypotézou je, že modifikace C-3 na galaktózovém kruhu vzdálenějším od vazebné kapsy umožňuje interakce typu kation- $\pi$  s Arg186 a vzdáleněji umístěným Arg168 u Gal-3, zatímco modifikace na bližší galaktóze má za následek interakce kation- $\pi$  s Arg144 [67]. Další studie s inhibitory s triazolovým kruhem a aromatickým jádrem, ale jiným substituentem, vykazovaly podobně vysokou afinitu ke Gal-1, ale nižší v porovnání s Gal-3 [5]. Navíc triazolový kruh přispívá k biologické aktivitě, jak bylo prokázáno v předchozí studii [41] a výhody triazolové skupiny oproti esteru a amidu zahrnují stabilitu vůči chemické hydrolyze, redukci, oxidaci a proteázám [68]. Ligandy **2** a **3** byly účinnější inhibitory Gal-3 než Gal-1, což odpovídá předpokladům z literatury. Podle publikovaného článku [67] *p*-acetylový substituent zvýšil celkovou afinitu glykomimetik na bázi LacNAc v porovnání s fenylovým substituentem. Tyto závěry ovšem nejsou plně přenositelné na triazolové sloučeniny v této práci z důvodu použití amidové vazby mezi sacharidem a zvoleným substituentem. Methylenový můstek vložený mezi sacharidovou skupinu a triazolový kruh u sloučenin v této práci prodlužuje vazbu o dva další atomy, což přináší vyšší flexibilitu ve vazebném místě galektinu. Očekává se, že fenylová skupina bude zatlačena tak daleko do vazebného místa, jak jen to bude možné, a s přidaným stupněm rotační volnosti vznikne jiná interakce [62]. Gal-3 zprostředkovává tři (Arg186, Arg168, Arg144) kation- $\pi$  interakce mezi triazolovou skupinou, aromatickým jádrem a argininem oproti Gal-1, který zprostředkovává pouze jednu interakci s Arg73, což může odpovídat za velké rozdíly v afinitě ve srovnání s TDG. Objemnější aromatické skupiny se lépe vážou ke Gal-3 oproti Gal-1, pravděpodobně pro větší počet interakcí mezi aromatickým jádrem a argininem a možnému sterickému bránění u Gal-1 [40]. Z výsledků této práce

vyplývá, že ligandy **2** a zvláště **3** lze použít jako výchozí bod pro další optimalizace s cílem dosáhnout selektivní inhibice Gal-3.

## 6 Závěr

V rámci teoretické práce části byly shrnuty poznatky o rodině galektinů a jejich funkci v organismu. Podrobněji byl probrán význam nejčtenějších galektinů Gal-1 a Gal-3 a byly shrnuty současné poznatky o jejich vazbě jak na přirozené ligandy, tak na syntetické. Byla definována glykomimetika, včetně jejich syntézy a potenciálního využití z hlediska inhibičních účinků na galektiny. Dále zde byly popsány účinky galektinů a jejich inhibice při vybraných patologických stavech, zejména idiopatické pulmonární fibróze, kardiovaskulárních onemocnění a rakovině. Experimentální část práce zahrnovala produkci rekombinantních galektinů Gal-1 a Gal-3 v *E. coli* jako konstruktů s histidinovou kotvou. Tyto proteiny byly purifikovány chelatační afinitní chromatografií na koloně HisTrap s navázanými  $\text{Ni}^{2+}$  ionty. Ze 7,3 g buněk bylo produkováno 153 mg Gal-1 a ze 7,7 g buněk bylo produkováno 160 mg Gal-3. Čistota obou galektinů dle SDS-PAGE byla větší než 90 %. Z komerčního TDG byl syntetizován prekurzor **1** (73 mg, 60 % výtěžek) jako výchozí látka pro přípravu dvou inhibitorů galektinů na bázi glykomimetik. Tyto dva inhibitory, ligand **2** a **3**, byly syntetizovány azid-alkynovou Huisgenovou cykloadicí. Syntéza ligandu **2** měla výtěžek 16 mg (40 %). Syntéza ligandu **3** měla výtěžek 28 mg (16 %). Čistota glykomimetik byla stanovena pomocí HPLC a jejich struktura byla ověřena metodou NMR (prováděli jiní pracovníci). Metodou ELISA byla pozorována inhibiční účinnost a selektivita syntetizovaných ligandů ke Gal-1 a Gal-3. Bylo zjištěno, že TDG bez DMSO byl 1,5× selektivnější inhibitor Gal-1 ( $\text{IC}_{50} = 83,6 \pm 6,9 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ), oproti Gal-3 ( $\text{IC}_{50} = 115,3 \pm 10,7 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ). Naopak s přídavkem DMSO byl TDG přibližně stejně účinný pro Gal-3 ( $\text{IC}_{50} = 54,4 \pm 3,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) i pro Gal-1 ( $\text{IC}_{50} = 56,0 \pm 8,6 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ). Ligand **2** (fenyl) měl 4× vyšší selektivitu ke Gal-3 ( $\text{IC}_{50} = 6,0 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ), než ke Gal-1 ( $\text{IC}_{50} = 23,7 \pm 1,4 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) a ligand **3** byl 8× selektivnější vůči Gal-3 ( $\text{IC}_{50} = 4,7 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ) oproti Gal-1 ( $\text{IC}_{50} = 38,8 \pm 3,3 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ). Ligandy **2** a **3** se ukázaly jako selektivnější a silnější inhibitory Gal-3 než nesubstituovaný TDG. Strukturní motiv ligandů **2** a **3** by se mohl po další optimalizaci využít například při cílené inhibici Gal-3 bez výraznějšího ovlivnění Gal-1.

## 7 Zdroje

- [1] Liu, F.-T. and Rabinovich, G. A. (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 29–41.
- [2] Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A. and Leffler, H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **269**, 20807–20810.
- [3] Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. and Poirier, F. (2002) Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* **19**, 433–440.
- [4] Bertuzzi, S., Quintana, J. I., Ardá, A., Gimeno, A. and Jiménez-Barbero, J. (2020) Targeting Galectins With Glycomimetics. *Front. Chem.* **8**, 593.
- [5] Stegmayr, J., Zetterberg, F., Carlsson, M. C., Huang, X., Sharma, G., Kahl-Knutson, B., Schambye, H., Nilsson, U. J., Oredsson, S. and Leffler, H. (2019) Extracellular and intracellular small-molecule galectin-3 inhibitors. *Sci. Rep.* **9**, 2186.
- [6] Dahlqvist, A., Leffler, H. and Nilsson, U. J. (2019) C1-Galactopyranosyl Heterocycle Structure Guides Selectivity: Triazoles Prefer Galectin-1 and Oxazoles Prefer Galectin-3. *ACS Omega* **4**, 7047–7053.
- [7] Fischöder, T., Laaf, D., Dey, C. and Elling, L. (2017) Enzymatic Synthesis of N-Acetylactosamine (LacNAc) Type 1 Oligomers and Characterization as Multivalent Galectin Ligands. *Molecules* **22**, 1320.
- [8] Vašíček, T., Spiwok, V., Červený, J., Petrásková, L., Bumba, L., Vrbata, D., Pelantová, H., Křen, V. and Bojarová, P. (2020) Regioselective 3- *O* -Substitution of Unprotected Thiodigalactosides: Direct Route to Galectin Inhibitors. *Chem. – Eur. J.* **26**, 9620–9631.
- [9] Hughes, R. (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1473**, 172–185.
- [10] Laaf, D., Bojarová, P., Elling, L. and Křen, V. (2019) Galectin–Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology. *Trends Biotechnol.* **37**, 402–415.
- [11] Sundqvist, M., Welin, A., Elmwall, J., Osla, V., Nilsson, U. J., Leffler, H., Bylund, J. and Karlsson, A. (2018) Galectin-3 type-C self-association on neutrophil surfaces; The carbohydrate recognition domain regulates cell function. *J. Leukoc. Biol.* **103**, 341–353.
- [12] Menini, S., Iacobini, C., Blasetti Fantauzzi, C., Pesce, C. M. and Pugliese, G. (2016) Role of Galectin-3 in Obesity and Impaired Glucose Homeostasis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–7.
- [13] Krześlak, A. and Lipińska, A. (2004) Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **9**, 305–328.
- [14] de Boer, R. A., Voors, A. A., Muntendam, P., van Gilst, W. H. and van Veldhuisen, D. J. (2009) Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur. J. Heart Fail.* **11**, 811–817.
- [15] Šimonová, A., Kupper, C. E., Böcker, S., Müller, A., Hofbauerová, K., Pelantová, H., Elling, L., Křen, V. and Bojarová, P. (2014) Chemo-enzymatic synthesis of LacdiNAc dimers of varying length as novel galectin ligands. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **101**, 47–55.
- [16] van den Berg, T. K., Honing, H., Franke, N., van Remoortere, A., Schiphorst, W. E. C. M., Liu, F.-T., Deelder, A. M., Cummings, R. D., Hokke, C. H. and van Die, I. (2004) LacdiNAc-Glycans Constitute a Parasite Pattern for Galectin-3-Mediated Immune Recognition. *J. Immunol.* **173**, 1902–1907.

- [17] Moriki, T., Kuwabara, I., Liu, F.-T. and Maruyama, I. N. (1999) Protein Domain Mapping by  $\lambda$  Phage Display: The Minimal Lactose-Binding Domain of Galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 291–296.
- [18] Miller, M. C., Ippel, H., Suylen, D., Klyosov, A. A., Traber, P. G., Hackeng, T. and Mayo, K. H. (2016) Binding of polysaccharides to human galectin-3 at a noncanonical site in its carbohydrate recognition domain. *Glycobiology* **26**, 88–99.
- [19] Menon, R. P. and Hughes, R. C. (1999) Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur. J. Biochem.* **264**, 569–576.
- [20] Diehl, C., Genheden, S., Modig, K., Ryde, U. and Akke, M. (2009) Conformational entropy changes upon lactose binding to the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *J. Biomol. NMR* **45**, 157–169.
- [21] Seropian, I. M., González, G. E., Maller, S. M., Berrocal, D. H., Abbate, A. and Rabinovich, G. A. (2018) Galectin-1 as an Emerging Mediator of Cardiovascular Inflammation: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Mediators Inflamm.* **2018**, 1–11.
- [22] Blanchard, H., Bum-Erdene, K., Bohari, M. H. and Yu, X. (2016) Galectin-1 inhibitors and their potential therapeutic applications: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **26**, 537–554.
- [23] Horie, H. (2004) Oxidized Galectin-1 Stimulates Macrophages to Promote Axonal Regeneration in Peripheral Nerves after Axotomy. *J. Neurosci.* **24**, 1873–1880.
- [24] Astorgues-Xerri, L., Riveiro, M. E., Tijeras-Raballand, A., Serova, M., Neuzillet, C., Albert, S., Raymond, E. and Faivre, S. (2014) Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 307–319.
- [25] Arifuzzaman, Md., Hamza, A., Zannat, S. S., Fahad, R., Rahman, A., Hosen, S. M. Z., Dash, R. and Hossain, Md. K. (2020) Targeting galectin-3 by natural glycosides: a computational approach. *Netw. Model. Anal. Health Inform. Bioinforma.* **9**, 14.
- [26] Chiariotti, L., Salvatore, P., Frunzio, R. and Bruni, C. B. (2002) Galectin genes: Regulation of expression. *Glycoconj. J.* **19**, 441–449.
- [27] Stillman, B. N., Hsu, D. K., Pang, M., Brewer, C. F., Johnson, P., Liu, F.-T. and Baum, L. G. (2006) Galectin-3 and Galectin-1 Bind Distinct Cell Surface Glycoprotein Receptors to Induce T Cell Death. *J. Immunol.* **176**, 778–789.
- [28] Bumba, L., Laaf, D., Spiwok, V., Elling, L., Křen, V. and Bojarová, P. (2018) Poly-N-Acetylglucosamine Neo-Glycoproteins as Nanomolar Ligands of Human Galectin-3: Binding Kinetics and Modeling. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 372.
- [29] Dumić, J., Dabelić, S. and Flögel, M. (2006) Galectin-3: An open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1760**, 616–635.
- [30] Al-Salam, S. and Hashmi, S. (2014) Galectin-1 in Early Acute Myocardial Infarction. *PLoS ONE* (Lionetti, V., ed.) **9**, e86994.
- [31] Collins, P. M., Öberg, C. T., Leffler, H., Nilsson, U. J. and Blanchard, H. (2012) Taloside Inhibitors of Galectin-1 and Galectin-3: Taloside Inhibitors of Galectins. *Chem. Biol. Drug Des.* **79**, 339–346.
- [32] Tavares, M. R., Bláhová, M., Sedláková, L., Elling, L., Pelantová, H., Konefał, R., Etrych, T., Křen, V., Bojarová, P. and Chytil, P. (2020) High-Affinity *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers with Tailored *N*-Acetylglucosamine Presentation Discriminate between Galectins. *Biomacromolecules* **21**, 641–652.
- [33] Laaf, D., Bojarová, P., Mikulová, B., Pelantová, H., Křen, V. and Elling, L. (2017) Two-Step Enzymatic Synthesis of  $\beta$ -D-N-Acetylgalactosamine-(1 $\rightarrow$ 4)-D-

- N*-acetylglucosamine (LacdiNAc) Chitooligomers for Deciphering Galectin Binding Behavior. *Adv. Synth. Catal.* **359**, 2101–2108.
- [34] Henze, M., Schmidtke, S., Hoffmann, N., Steffens, H., Pietruszka, J. and Elling, L. (2015) Combination of Glycosyltransferases and a Glycosynthase in Sequential and One-Pot Reactions for the Synthesis of Type 1 and Type 2 *N*-Acetylglucosamine Oligomers. *ChemCatChem* **7**, 3131–3139.
- [35] Rech, C., Rosencrantz, R. R., Křenek, K., Pelantová, H., Bojarová, P., Römer, C. E., Hanisch, F.-G., Křen, V. and Elling, L. (2011) Combinatorial One-Pot Synthesis of Poly-*N*-acetylglucosamine Oligosaccharides with Leloir-Glycosyltransferases. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2492–2500.
- [36] Böcker, S., Laaf, D. and Elling, L. (2015) Galectin Binding to Neo-Glycoproteins: LacDiNAc Conjugated BSA as Ligand for Human Galectin-3. *Biomolecules* **5**, 1671–1696.
- [37] Kupper, C. E., Rosencrantz, R. R., Henßen, B., Pelantová, H., Thönes, S., Drozdová, A., Křen, V. and Elling, L. (2012) Chemo-enzymatic modification of poly- *N*-acetylglucosamine (LacNAc) oligomers and *N,N*-diacetylglucosamine (LacDiNAc) based on galactose oxidase treatment. *Beilstein J. Org. Chem.* **8**, 712–725.
- [38] Bojarová, P., Tavares, M. R., Laaf, D., Bumba, L., Petrásková, L., Konefał, R., Bláhová, M., Pelantová, H., Elling, L., Etrych, T., et al. (2018) Biocompatible glyconanomaterials based on HPMA-copolymer for specific targeting of galectin-3. *J. Nanobiotechnology* **16**, 73.
- [39] Tamburrini, A., Colombo, C. and Bernardi, A. (2020) Design and synthesis of glycomimetics: Recent advances. *Med. Res. Rev.* **40**, 495–531.
- [40] van Hattum, H., Branderhorst, H. M., Moret, E. E., Nilsson, U. J., Leffler, H. and Pieters, R. J. (2013) Tuning the Preference of Thiodigalactoside- and Lactosamine-Based Ligands to Galectin-3 over Galectin-1. *J. Med. Chem.* **56**, 1350–1354.
- [41] Cagnoni, A. J., Kovensky, J. and Uhrig, M. L. (2014) Design and Synthesis of Hydrolytically Stable Multivalent Ligands Bearing Thiodigalactoside Analogues for Peanut Lectin and Human Galectin-3 Binding. *J. Org. Chem.* **79**, 6456–6467.
- [42] Zhang, H., Laaf, D., Elling, L. and Pieters, R. J. (2018) Thiodigalactoside–Bovine Serum Albumin Conjugates as High-Potency Inhibitors of Galectin-3: An Outstanding Example of Multivalent Presentation of Small Molecule Inhibitors. *Bioconjug. Chem.* **29**, 1266–1275.
- [43] Restuccia, A., Fettis, M. M., Farhadi, S. A., Molinaro, M. D., Kane, B. and Hudalla, G. A. (2018) Evaluation of Self-Assembled Glycopeptide Nanofibers Modified with *N,N'*-Diacetylglucosamine for Selective Galectin-3 Recognition and Inhibition. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **4**, 3451–3459.
- [44] Peterson, K., Kumar, R., Stenström, O., Verma, P., Verma, P. R., Håkansson, M., Kahl-Knutsson, B., Zetterberg, F., Leffler, H., Akke, M., et al. (2018) Systematic Tuning of Fluoro-galectin-3 Interactions Provides Thiodigalactoside Derivatives with Single-Digit nM Affinity and High Selectivity. *J. Med. Chem.* **61**, 1164–1175.
- [45] Wang, H., Huang, W., Orwenyo, J., Banerjee, A., Vasta, G. R. and Wang, L.-X. (2013) Design and synthesis of glycoprotein-based multivalent glyco-ligands for influenza hemagglutinin and human galectin-3. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 2037–2044.
- [46] Freichel, T., Laaf, D., Hoffmann, M., Konietzny, P. B., Heine, V., Wawrzinek, R., Rademacher, C., Snyder, N. L., Elling, L. and Hartmann, L. (2019) Effects of linker and liposome anchoring on lactose-functionalized glycomacromolecules as multivalent ligands for binding galectin-3. *RSC Adv.* **9**, 23484–23497.

- [47] Percec, V., Leowanawat, P., Sun, H.-J., Kulikov, O., Nusbaum, C. D., Tran, T. M., Bertin, A., Wilson, D. A., Peterca, M., Zhang, S., et al. (2013) Modular Synthesis of Amphiphilic Janus Glycodendrimers and Their Self-Assembly into Glycodendrimersomes and Other Complex Architectures with Bioactivity to Biomedically Relevant Lectins. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 9055–9077.
- [48] Keehn, P. M. and Rosenfeld, S. M. (Eds.). (1983) *Cyclophanes*, Academic Press, New York.
- [49] Bernardi, S., Fezzardi, P., Rispoli, G., Sestito, S. E., Peri, F., Sansone, F. and Casnati, A. (2014) Clicked and long spaced galactosyl- and lactosylcalix[4]arenes: new multivalent galectin-3 ligands. *Beilstein J. Org. Chem.* **10**, 1672–1680.
- [50] Wynn, T. A. (2004) Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 583–594.
- [51] Hirani, N., MacKinnon, A. C., Nicol, L., Ford, P., Schambye, H., Pedersen, A., Nilsson, U. J., Leffler, H., Sethi, T., Tantawi, S., et al. (2020) Target-inhibition of Galectin-3 by Inhaled TD139 in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2002559.
- [52] Nishi, Y., Sano, H., Kawashima, T., Okada, T., Kuroda, T., Kikkawa, K., Kawashima, S., Tanabe, M., Goto, T., Matsuzawa, Y., et al. (2007) Role of Galectin-3 in Human Pulmonary Fibrosis. *Allergol. Int.* **56**, 57–65.
- [53] Kathiriya, J. J., Nakra, N., Nixon, J., Patel, P. S., Vaghasiya, V., Alhassani, A., Tian, Z., Allen-Gipson, D. and Davé, V. (2017) Galectin-1 inhibition attenuates profibrotic signaling in hypoxia-induced pulmonary fibrosis. *Cell Death Discov.* **3**, 17010.
- [54] Smith, R. E., Strieter, R. M., Phan, S. H. and Kunkel, S. L. (1996) C-C chemokines: novel mediators of the profibrotic inflammatory response to bleomycin challenge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 693–702.
- [55] de Boer, R. A., Yu, L. and van Veldhuisen, D. J. (2010) Galectin-3 in Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* **7**, 1–8.
- [56] Suthahar, N., Meijers, W. C., Silljé, H. H. W., Ho, J. E., Liu, F.-T. and de Boer, R. A. (2018) Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. *Theranostics* **8**, 593–609.
- [57] de Boer, R. A., van der Velde, A. R., Mueller, C., van Veldhuisen, D. J., Anker, S. D., Peacock, W. F., Adams, K. F. and Maisel, A. (2014) Galectin-3: A Modifiable Risk Factor in Heart Failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **28**, 237–246.
- [58] Fortuna-Costa, A., Gomes, A. M., Kozłowski, E. O., Stelling, M. P. and Pavão, M. S. G. (2014) Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis. *Front. Oncol.* **4**.
- [59] John, C. M., Leffler, H., Kahl-Knutsson, B., Svensson, I. and Jarvis, G. A. (2003) Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 2374–2383.
- [60] Liang, L. and Astruc, D. (2011) The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **255**, 2933–2945.
- [61] Cho, M. and Cummings, R. D. (1996) Characterization of Monomeric Forms of Galectin-1 Generated by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* **35**, 13081–13088.
- [62] Vrbata, D., Filipová, M., Tavares, M. R., Červený, J., Vlachová, M., Šírová, M., Pelantová, H., Petrásková, L., Bumba, L., Konefał, R., et al. (2022) Glycopolymers Decorated with 3- *O* -Substituted Thiodigalactosides as Potent Multivalent Inhibitors of Galectin-3. *J. Med. Chem.* **65**, 3866–3878.

- [63] Noresson, A.-L., Aurelius, O., Öberg, C. T., Engström, O., Sundin, A. P., Håkansson, M., Stenström, O., Akke, M., Logan, D. T., Leffler, H., et al. (2018) Designing interactions by control of protein–ligand complex conformation: tuning arginine–arene interaction geometry for enhanced electrostatic protein–ligand interactions. *Chem. Sci.* **9**, 1014–1021.
- [64] Franken, K. L. M. C., Hiemstra, H. S., van Meijgaarden, K. E., Subronto, Y., den Hartigh, J., Ottenhoff, T. H. M. and Drijfhout, J. W. (2000) Purification of His-Tagged Proteins by Immobilized Chelate Affinity Chromatography: The Benefits from the Use of Organic Solvent. *Protein Expr. Purif.* **18**, 95–99.
- [65] Rashid, Z., Naeimi, H., Zarnani, A.-H., Mohammadi, F. and Ghahremanzadeh, R. (2017) Facile fabrication of nickel immobilized on magnetic nanoparticles as an efficient affinity adsorbent for purification of his-tagged protein. *Mater. Sci. Eng. C* **80**, 670–676.
- [66] Bum-Erdene, K., Gagarinov, I. A., Collins, P. M., Winger, M., Pearson, A. G., Wilson, J. C., Leffler, H., Nilsson, U. J., Grice, I. D. and Blanchard, H. (2013) Investigation into the Feasibility of Thioditaloside as a Novel Scaffold for Galectin-3-Specific Inhibitors. *ChemBioChem* **14**, 1331–1342.
- [67] Sörme, P., Arnoux, P., Kahl-Knutsson, B., Leffler, H., Rini, J. M. and Nilsson, U. J. (2005) Structural and Thermodynamic Studies on Cation– $\Pi$  Interactions in Lectin–Ligand Complexes: High-Affinity Galectin-3 Inhibitors through Fine-Tuning of an Arginine–Arene Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1737–1743.
- [68] van Scherpenzeel, M., Moret, E. E., Ballell, L., Liskamp, R. M. J., Nilsson, U. J., Leffler, H. and Pieters, R. J. (2009) Synthesis and Evaluation of New Thiodigalactoside-Based Chemical Probes to Label Galectin-3. *ChemBioChem* **10**, 1724–1733.

## 8 Přílohy

### Příloha 1

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR data (399,87 MHz pro  $^1\text{H}$ , 100,55 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 30 °C) pro *bis*-{3-*O*-[(propynyl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl}sulfan (1).

| Atom | $\delta_{\text{C}}$ | m. | $\delta_{\text{H}}$ | $n_{\text{H}}$ | m.  | $J[\text{Hz}]$ | HMBC |
|------|---------------------|----|---------------------|----------------|-----|----------------|------|
| 1    | 85.23               | D  | 4.684               | 1              | d   | 9.9            |      |
| 2    | 70.89               | D  | 3.709               | 1              | dd  | 9.9, 9.2       |      |
| 3    | 82.88               | D  | 3.535               | 1              | dd  | 9.2, 3.2       | 1'   |
| 4    | 67.95               | D  | 4.089               | 1              | dd  | 3.2, 1.0       |      |
| 5    | 80.79               | D  | 3.559               | 1              | ddd | 7.3, 4.7, 1.0  |      |
| 6    | 62.86               | T  | 3.773               | 1              | dd  | 11.5, 7.3      |      |
|      |                     |    | 3.668               | 1              | dd  | 11.5, 4.7      |      |
| 1'   | 58.06               | T  | 4.416               | 1              | dd  | 15.9, 2.4      | 3    |
|      |                     |    | 4.368               | 1              | dd  | 15.9, 2.4      |      |
| 2'   | 80.98               | S  | -                   | 0              | -   |                | 1'   |
| 3'   | 76.08               | D  | 2.846               | 1              | dd  | 2.4, 2.4       | 1'   |

### Příloha 2

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR data (600,23 MHz pro  $^1\text{H}$ , 150,93 MHz pro  $^{13}\text{C}$ , MeOD, 30 °C) pro *bis*-{3-*O*-[fenyl-1*H*-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]- $\beta$ -D-galaktopyranosyl}sulfan (2).

| Atom | $\delta_{\text{C}}$ | m. | $\delta_{\text{H}}$ | $n_{\text{H}}$ | m.  | $J[\text{Hz}]$ | HMBC   |
|------|---------------------|----|---------------------|----------------|-----|----------------|--------|
| 1    | 85.28               | D  | 4.685               | 1              | d   | 9.8            | 1      |
| 2    | 71.02               | D  | 3.776               | 1              | dd  | 9.8, 9.2       |        |
| 3    | 84.10               | D  | 3.484               | 1              | dd  | 9.2, 3.2       | 1'     |
| 4    | 67.76               | D  | 4.127               | 1              | dd  | 3.2, 1.1       |        |
| 5    | 80.82               | D  | 3.566               | 1              | ddd | 7.2, 4.8, 1.1  |        |
| 6    | 62.94               | T  | 3.789               | 1              | dd  | 11.5, 7.2      |        |
|      |                     |    | 3.689               | 1              | dd  | 11.5, 4.8      |        |
| 1'   | 63.80               | T  | 4.920               | 1              | dd  | 12.6, 0.6      | 3      |
|      |                     |    | 4.876               | 1              | dd  | 12.6, 0.5      |        |
| 2'   | 146.95              | S  | -                   | 0              | -   |                | 1', 3' |
| 3'   | 123.63              | D  | 8.452               | 1              | dd  | 0.6, 0.5       | 1'     |
| 1''  | 137.18              | S  | -                   | 0              | -   |                |        |
| 2''  | 115.85              | D  | 7.819               | 1              | dd  | 3.2, 1.4       |        |
| 4''  | 128.84              | D  | 7.634               | 1              | dd  | 5.3, 3.2       |        |
| 5''  | 121.81              | D  | 7.558               | 1              | dd  | 5.3, 1.4       |        |

### Příloha 3

<sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR data (399,87 MHz pro <sup>1</sup>H, 100,55 MHz pro <sup>13</sup>C, MeOD, 30 °C) pro *bis*-{3-*O*-[(4-acetofenyl)-1*H*-(1,2,3-triazo-4-yl)methyl]-β-D-galaktopyranosyl}sulfan (3).

| Atom       | δ <sub>c</sub> | m. | δ <sub>H</sub> | n <sub>H</sub> | m.  | J[Hz]         | HMBC   |
|------------|----------------|----|----------------|----------------|-----|---------------|--------|
| <b>1</b>   | 85.19          | D  | 4.702          | 1              | d   | 9.8           | 1      |
| <b>2</b>   | 70.98          | D  | 3.776          | 1              | dd  | 9.8, 9.2      |        |
| <b>3</b>   | 84.09          | D  | 3.492          | 1              | dd  | 9.2, 3.2      | 1'     |
| <b>4</b>   | 67.63          | D  | 4.141          | 1              | dd  | 3.2, 1.0      |        |
| <b>5</b>   | 80.77          | D  | 3.571          | 1              | ddd | 7.2, 4.8, 1.0 |        |
| <b>6</b>   | 62.91          | T  | 3.794          | 1              | dd  | 11.5, 7.2     |        |
|            |                |    | 3.688          | 1              | dd  | 11.5, 4.78    |        |
| <b>1'</b>  | 63.80          | T  | 4.939          | 1              | dd  | 12.6, 0.4     | 3      |
|            |                |    | 4.885          | 1              | dd  | 12.6, 0.4     |        |
| <b>2'</b>  | 147.38         | S  | -              | 0              | -   |               | 1', 3' |
| <b>3'</b>  | 123.29         | D  | 8.538          | 1              | dd  | 0.4, 0.4      | 1'     |
| <i>i</i> - | 138.48         | S  | -              | 0              | -   |               | 3'     |
| <i>o</i> - | 121.62         | D  | 7.830          | 2              | m   |               |        |
| <i>m</i> - | 131.01         | D  | 7.575          | 2              | m   |               |        |
| <i>p</i> - | 130.15         | D  | 7.488          | 1              | m   |               |        |