

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Tereza Friede

Expres a vazebné vlastnosti lidského galektinu-4
Expression and binding properties of human galectin-4

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Konzultantka: Ing. Kristýna Slámová, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

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

V Praze dne 20. 11. 2023

Abstrakt

Galektin-4, člen rodiny galektinů typický svou afinitou k β -galaktosidům, patří mezi tandemové galektiny a skládá se ze dvou odlišných podjednotek spojených peptidovým linkerem.

Galektiny hrají klíčovou roli v různých biologických procesech a jsou zapojeny do patogeneze mnoha onemocnění. Tkáň s kolorektálním karcinomem (CRC) vykazuje nižší expresi galektinu-4 ve srovnání se zdravými tkáněmi tlustého střeva a právě nižší exprese galektinu-4 podporuje progresi nádoru a metastáz. Bylo zjištěno, že galektin-4 inhibuje tumorigenezi buněk CRC prostřednictvím signálních drah Wnt/ β -katenin a IL-6/NF- κ B/STAT3, které hrají klíčovou roli ve vývoji CRC. V zánětlivých střevních onemocněních, jako je Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida, interaguje galektin-4 s CD4⁺ T lymfocyty, což ovlivňuje jejich chování v imunologické synapsi.

Dále se galektin-4, primárně exprimovaný v gastrointestinálním traktu, podílí na apikálním transportu v epiteliálních buňkách, podporuje hojení epiteliálních ran střeva, účastní se adaptivní imunitní odpovědi a hraje několik rolí v centrálním nervovém systému. Studium inhibitorů galektinu-4 pomáhá porozumět jeho specifickým rolím v těchto procesech, a identifikovat tak nové potenciální terapeutické cíle.

V této práci byl heterologně exprimován lidský galektin-4 v bakterii *Escherichia coli*, následně byl purifikován pomocí afinitní chromatografie a bylo optimalizováno imunochemické stanovení ELISA pro měření vazebné afinity galektinu-4 k různým sacharidovým ligandům. Dále byly exprimovány příslušné podjednotky galektinu-4: N-terminální podjednotka a C-terminální podjednotka. Nejvyšší vazebná afinita, vyjádřená nejnižší hodnotou IC₅₀, byla pozorována u antigenů krevních skupin, přičemž antigen krevní skupiny A vykazoval vyšší afinitu než antigen krevní skupiny B typu 6. Tato práce přispívá k odhalení složitých rolí galektinu-4 a zdůrazňuje jeho potenciál jako terapeutického cíle.

Klíčová slova

Galektin-4, sacharid, inhibice, ELISA

Abstract

Galectin-4, a member of the galectin family known for its affinity to β -galactosides, belongs to tandem-repeat galectins and consists of two distinct subunits connected with a peptide linker.

Galectins play a key role in various biological processes and are involved in the pathogenesis of many diseases. Colorectal cancer (CRC) tissue shows a lower expression of galectin-4 compared to healthy colon tissues, and the lower expression of galectin-4 promotes tumor progression and transport. Galectin-4 was found to inhibit tumorigenesis of CRC cells via Wnt/ β -catenin and IL-6/NF- κ B/STAT3 signaling pathways, which play a key role in CRC development. In inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis, galectin-4 interacts with CD4⁺ T lymphocytes, influencing their behavior in the immunological synapsis.

Furthermore, galectin-4, primarily expressed in the gastrointestinal tract, participates in the apical transport in epithelial cells, promotes the healing of intestinal epithelial wounds, participates in the adaptive immune response and has multiple roles in the central nervous system. Studying inhibitors of galectin-4 helps to understand its specific roles in these processes, and thus to identify new potential therapeutic targets.

In this work human galectin-4 was heterologously expressed in *Escherichia coli* bacteria, then it was purified using affinity chromatography and the immunochemical ELISA assay was optimized for measuring the binding affinity of galectin-4 to various carbohydrate ligands. Furthermore, the respective subunits of galectin-4 were expressed: the N-terminal subunit and the C-terminal subunit. The highest binding affinity, expressed as the lowest IC₅₀ value, was observed for blood group antigens; blood group A antigen showed higher affinity than blood group B antigen type 6. This work helps to reveal the complex roles of galectin-4 and its potential as a therapeutic target.

Keywords

Galectin-4, carbohydrate, inhibition, ELISA

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své práce doc. RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D., a konzultantce své bakalářské práce Ing. Kristýně Slámové, Ph.D., za odborné rady, konzultaci výsledků a trpělivost při zpracování této práce. Současně bych chtěla vyjádřit díky Ing. Zuzaně Mészáros, Mgr. Michaele Hovorkové a Mgr. Jakubovi Červenému za jejich rady při experimentální části a konzultace při zpracování výsledků.

Obsah

1.	Teoretický úvod.....	9
1.1.	Galektiny	9
1.1.1.	Charakteristika galektinů	9
1.1.2.	Struktura galektinů.....	11
1.1.3.	Funkce galektinů v organismech	12
1.1.4.	Role galektinů u lidí s různými chorobami.....	13
1.2.	Galektin-4	14
1.2.1.	Struktura galektinu-4	14
1.2.2.	Funkce galektinu-4 v organismech	16
1.2.3.	Galektin-4 u lidí s nádorovým onemocněním a idiopatickými střevními záněty	18
1.3.	Přirozené a syntetické inhibitory galektinů	21
1.4.	Metody stanovení vazby galektinu a ligandu	22
2.	Cíle práce.....	28
3.	Experimentální část	29
3.1.	Použité přístroje a materiál	29
3.1.1.	Seznam použitých chemikálií	29
3.1.2.	Seznam použitých roztoků a médií	30
3.1.3.	Seznam použitých přístrojů.....	31
3.2.	Heterologní exprese a purifikace galektinů	32
3.2.1.	Transformace <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS plasmidem	32
3.2.2.	Exprese galektinu-4 a jeho podjednotek v <i>E. coli</i>	33
3.2.3.	Purifikace galektinu-4 a jeho podjednotek afinitní chromatografií	34
3.2.4.	Ověření čistoty galektinu-4 a jeho podjednotek	35
3.3.	Stanovení afinity sacharidových ligandů pomocí kompetitivní metody ELISA	36
4.	Výsledky.....	37
4.1.	Produkce a purifikace galektinu-4 a jeho podjednotek v <i>E. coli</i>	37
4.2.	Ověření čistoty galektinu-4 a jeho podjednotek	38

4.3.	Vazebná afinita galektinu-4 a jeho podjednotek k asialofetuinu.....	39
4.4.	Vazebná afinita ligandů ke galektinu-4	40
5.	Diskuze.....	44
6.	Závěr.....	47
7.	Zdroje	48
8.	Přílohy	57

Seznam použitých zkratk

2'FL	2'-fukosyllaktosa; α -L-fukopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukosa
ASF	asialofetuin
aa	aminokyselinové zbytky
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumin</i>)
CRD	doména rozpoznávající sacharidy (<i>carbohydrate recognition domain</i>)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	z angl. <i>Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay</i>
Gal-4	galektin-4
HisTrap	purifikační kolona HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie)
HRP	křenuv peroxidasa (<i>horseradish peroxidase</i>)
IC ₅₀	poloviční maximální inhibiční koncentrace
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
K _D	rovnovážná konstanta
LB	medium Luria-Bertani
LBA	medium Luria-Bertani s agarem
LMW	nízkomolekulární hmotnostní pravítko (z angl. <i>low molecular weight</i>)
LNnT	lakto- <i>N</i> -neotetraosa
LNT	lakto- <i>N</i> -tetraosa
PBS	fosfátový pufr
PBST	fosfátový pufr s 0,05 % v/v Tween [®] 20
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíránu sodného (z angl. <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
TB	médium (z angl. <i>Terrific Broth</i>)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TMB	substrát TMB One; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin

1. Teoretický úvod

1.1. Galektiny

1.1.1. Charakteristika galektinů

Lektiny jsou proteiny nebo glykoproteiny, které mají schopnost vázat se na určité sacharidové struktury. Nevykazují žádnou enzymovou aktivitu a na rozdíl od protilátek nejsou produkty imunitní odpovědi. Pomocí vazebného místa, tzv. CRD („*carbohydrate recognition/binding domain*“), rozeznávají sacharidové ligandy, ať už volné v roztoku, nebo vázané ve formě glykoproteinů a glykolipidů na povrchu buněk nebo buněčných organel [1].

Většina živočišných lektinů může být rozdělena do čtyř skupin: lektiny typu C (zahrnující selektiny), lektiny typu P, pentraxiny a galektiny [2]. Galektiny se mohou označovat také jako lektiny typu S, jelikož u prvního objeveného zástupce byla aktivita vazby sacharidů závislá na sulfhydrylových činidlech. Tato závislost se nutně netýká všech galektinů. Dále se mohou označovat jako S-lac lektiny, protože jsou všechny schopné vázat laktosu a jí podobné sacharidy [3]. Aby se protein řadil mezi galektiny, musí splňovat dvě kritéria: musí specificky vázat β -galaktosidy a musí se výrazně podobat v aminokyselinové sekvenci v místě vazajícím sacharidy. Příslušné aminokyselinové zbytky této sekvence byly stanoveny rentgenovou krystalografií [4,5]. Jako první byly popsány galektiny-1, -2, -3 a -4 [2]; nyní jich známe již 16 [6]. Číselná označení jsou stejná i pro jejich geny v databázi genomu. Obecné označení genů kódujících galektiny je *LGALS* (lektin, vazající galaktosid, rozpustný) takže například *LGALS1* kóduje galektin-1 [4].

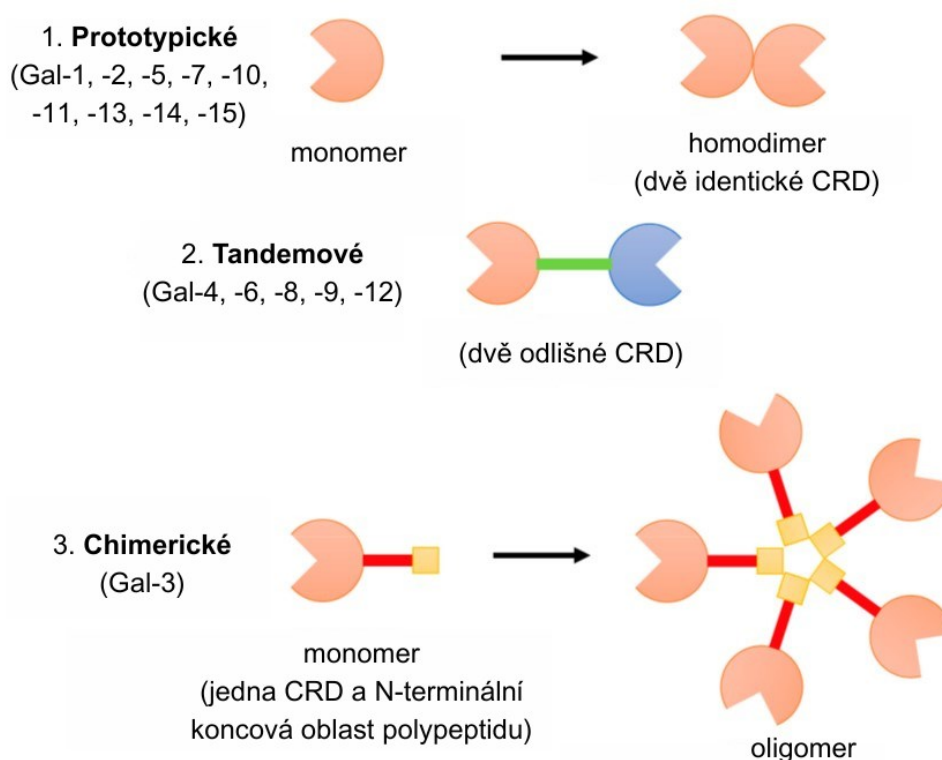
Galektiny jsou syntetizovány jako cytosolické proteiny. Po většinu svého života se nachází v cytosolu nebo v jádru buňky. Postrádají signální peptid, jsou proto sekretovány do extracelulárního prostoru neklasickou cestou, jejíž mechanismus není plně znám [4,7]. Nacházejí se v tkáních mnoha živočichů, od nižších bezobratlých, jako jsou houbovci a hlístice, až po savce včetně člověka [8]. Pro lepší přehlednost shrnuje tabulka 1 distribuci galektinů napříč tkáněmi u lidí a hlodavců, dále ukazuje hlavní druh savců u galektinů s omezenou mezidruhovou distribucí [9].

Tabulka 1. Distribuce galektinů (převzato a upraveno z [9]).

Galektin	Distribuce v lidských tkáních a tkáních hlodavců	Organismy
Galektin-1	Hladké a kosterní svalstvo	Obratlovci
Galektin-2	Gastrointestinální trakt, placenta	Ptáci a savci, žáby, ještěrky
Galektin-3	Především makrofágy a epitelové buňky	Obratlovci
Galektin-4	Střevo a žaludek, děložní epiteliální buňky, stěny krevních cév, hipokampální a kortikální neurony	Obratlovci, kromě většiny ptáků
Galektin-5	Plíce, ledviny, retikulocyty, kostní dřev, erytrocyty	Krasy
Galektin-6	Gastrointestinální trakt, játra, ledviny, slezina, srdce	Některé kmeny myší
Galektin-7	Gastrointestinální trakt, stratifikovaný epitel, kůže, srdce plodu	Savci
Galektin-8	Játra, ledviny, srdeční sval, plíce a mozek	Obratlovci
Galektin-9	T-lymfocyty, tenké střevo, játra, děloha, buňky epitelu, kůže a jícnový epitel	Obratlovci
Galektin-10	Eosinofilní granulocyty	Primáti, netopýři
Galektin-11	Žaludeční sliznice (přežvýkavci), epiteliální buňky žlučodů	Přežvýkavci
Galektin-12	Tuková tkáň	Obratlovci
Galektin-14	Eosinofilní granulocyty	Přežvýkavci
Galektin-15	Děloha	Přežvýkavci

1.1.2. Struktura galektinů

Savčí galektiny můžeme rozdělit na základě počtu a struktury jejich CRD do tří skupin. Do první, **prototypické** skupiny patří galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15 a -16 [6]. Mohou tvořit homodimery jako v případě galektinu-1 s CRD doménami spojenými prostřednictvím hydrofobních interakcí [10]. Tvoří také monomery, jako například galektin-5 izolovaný z krysích erytrocytů, nebo jako v případě mořské houby (lat. *Geodia cydonium*) mohou tvořit multimery [11–13]. Druhou, **tandemovou** skupinu tvoří galektin-4, -6, -9 a -12. Tyto galektiny obsahují dvě odlišné CRD propojené peptidovým linkerem [14]. Isoformy galektinu-8 se mohou řadit do prototypické nebo tandemové skupiny v závislosti na variantách sestřihu aminokyselinové sekvence. Do prototypické skupiny se například řadí takové varianty sestřihu, které sestávají pouze z N-terminální CRD a různých prodloužení bez druhé CRD [10]. Do třetí, **chimerické** skupiny spadá pouze galektin-3. Struktura galektinu-3 je tvořena třemi odlišnými motivy: globulární C-terminální doménou obsahující CRD, N-terminální doménou, která umožňuje oligomeraci na pentamery, a sekvencí bohatou na prolin podobnou kolagenu, která obě domény spojuje [14].



Obrázek 1. Strukturní typy galektinů (převzato a upraveno z [15]). Galektiny jsou rozděleny do tří typů na základě organizace domény rozpoznávající sacharidy (CRD): 1. Prototypické (mohou tvořit monomery i dimery s identickými CRD), 2. Tandemové (mají dvě odlišné CRD), 3. Chimerické (mohou tvořit monomery i oligomery asociací přes své N-terminální domény).

Doména rozpoznávající sacharidy je složená přibližně ze 135 aminokyselinových zbytků a její strukturu tvoří β -sandwich složený z 11 β -vláken (β 1 až β 11). Tento β -sandwich tvoří dva antiparalelní mírně ohnuté β -listy. Konvexní strana domény je označovaná F a je tvořena 5 aminokyselinovými řetězci (β 11, β 2, β 7, β 8, β 9), zatímco strana konkávní, označovaná S, je tvořena 6 aminokyselinovými řetězci (β 1, β 10, β 3, β 4, β 5, β 6). Konkávní strana vytváří žlábek, do kterého se může vázat sacharidový ligand, a který je dostatečně dlouhý i pro vazbu lineárních tetrasacharidů [3,16].

Na vazbě sacharidů se přímo podílejí konzervované aminokyseliny buď tvorbou vodíkových můstků, nebo van der Waalsovými interakcemi s cukerným ligandem. Důležitým sekvenčním motivem je His-Asn-Arg; tyto tři aminokyseliny tvoří vodíkové vazby s navázaným zbytkem galaktosy, například v galektinu-1,-3 a v N-terminální doméně galektinu-8 [10].

Základním sacharidovým ligandem galektinů je laktosa, jejíž vazebná afinita ke galektinům se pohybuje v mikromolárním až milimolárním rozmezí. Například hodnota K_D pro Gal-1 je 64×10^{-6} M, 85×10^{-6} M pro Gal-2, u Gal-3 je uváděné rozmezí širší, např. 26×10^{-6} M, 1×10^{-3} M, a $0,6 \times 10^{-3}$ M. Tyto hodnoty K_D ukazují na relativně slabou vazbu laktosy ke galektinům. Vazebnou afinitu k laktose lze zvýšit strukturální modifikací. Takovou modifikaci nese například *N*-acetylaktosamin (Gal β 4GlcNAc, LacNAc), který je také základním ligandem a rozeznávají ho všechny galektiny. Ke Gal-3 se váže přibližně pětikrát silněji než laktosa [16].

1.1.3. Funkce galektinů v organismech

Galektiny mají díky své relativně široké specifitě rozsáhlou škálu funkcí v organismu. Zprostředkovávají mezibuněčné interakce, transmembránovou signalizaci, apoptózu, sestřih pre-mRNA, buněčnou adhezi, imunitní odpověď, migraci a diferenciaci buněk [2,17]. Galektiny mohou aktivovat nebo inhibovat buněčnou adhezi v závislosti na buněčném typu a dalších faktorech. Zvyšují adhezi zesíťováním glykosylovaných struktur na jedné buňce s glykany na jiných buňkách nebo extracelulární matrix. Mohou naopak snižovat buněčnou adhezi blokováním receptorů pro další vazebné interakce. Zásadní význam má oligomerní stav galektinů, protože mohou blokovat receptory nebo zesíťovat molekuly v závislosti na jejich valenci [10]. Galektin-1 se váže v kosterním svalstvu na laminin, a inhibuje tak interakci buňka-matrix, která může hrát roli v růstu svalové hmoty [2]. Galektin-1 také hraje důležitou roli při

adhezi a proliferaci nervových kmenových buněk a nervových progenitorových buněk. Adheze je zprostředkována interakcí CRD domény s podjednotkou integrinu $\beta 1$ [10].

Další z vlastností galektinů je jejich schopnost intracelulárně i extracelulárně regulovat buněčnou smrt. Při extracelulární apoptóze zesilují glykany na vnější straně buněk a přenášejí signály přes membránu, čímž přímo způsobí buněčnou smrt nebo aktivují signalizaci, která apoptózu spouští [18]. Galektiny ovlivňují apoptózu v různých typech tkání a buněk. Například galektin-1 způsobuje smrt T-lymfocytů, B-lymfocytů a buněčných linií rakoviny prostaty a prsu. Galektin-1 a Galektin-9 jsou exprimovány v kůře brzlíku epiteliálními buňkami, kde ovlivňují pozitivní a negativní selekci T-lymfocytů. Brání v produkci nefunkčních a auto-reaktivních T-lymfocytů a také usmrcují T-lymfocyty, které se staly aktivovanými po imunitní odpovědi. Galektin-3 je jediným galektinem, který působí antiapopticky, chrání buňky rakoviny prsu před smrtí indukovanou chemoterapeutickými látkami nebo oxidem dusnatým [19]. Expres Gal-3 v Jurkat T-lymfocytech inhibuje apoptózu indukovanou Fas, staurosporinem a chemoterapeutickými látkami. Gal-3 obsahuje motiv Asn-Trp-Gly-Arg charakteristický pro antiapoptické proteiny Bcl. Předpokládá se, že motiv usnadňuje interakci mezi Gal-3 a Bcl-2 proteinem, která má za následek únik buňky před buněčnou smrtí [20].

1.1.4. Role galektinů u lidí s různými chorobami

Galektiny se podílejí na celé řadě chorob, jako je rakovina, HIV, autoimunitní onemocnění, chronický zánět a alergické reakce [17,21]. Zvýšená exprese galektinů v nádorech obvykle koreluje s klinickou agresivitou nádorů a jejich progresí do metastatického fenotypu [17]. Na základě klinických dat lze přítomnost např. Gal-1 korelovat se zvýšeným výskytem metastáz a s malou pravděpodobností přežití pacienta [22]. Galektin-1 je nejvíce sekretován u rakoviny prsu, plic, pankreatu, jater a štítné žlázy. Jeho koncentrace v krvi je měřitelná u nádoru plic, štítné žlázy a gliomů [23]. Galektin-1 exprimovaný nádorovými nebo stromálními buňkami reguluje buněčnou migraci, adhezi, angiogenezi a snižuje imunitní odpověď, čímž podporuje růst nádorů a ovlivňuje jejich vývoj a tvorbu metastáz. Galektin-1 pomáhá ukotvit onkogenní H-RAS do plasmatické membrány, což má za následek trvalou aktivaci RAF-1 a MAPK1, které přispívají k nádorové transformaci. Významně přispívá k imunosupresivní aktivitě melanomových buněk, jelikož indukuje apoptózu cytolytických T buněk nasměrovaných na nádor, nebo moduluje rovnováhu cytokinů Th1 – Th2 [24].

Galektin-1, nacházející se ve spodních vrstvách epitelu, zvyšuje infekčnost HIV-1 urychlením jeho vazby na cílové buňky. Sexuálně přenosný virus HIV-1 se adsorbuje na

cílovou buňku, typicky CD4+ T-lymfocyt, který se nachází ve slizničním vazivu (lat. *lamina propria mucosae*) pod epitelem [25]. HIV-1 má obal složený z fosfolipidové dvojvrstvy obsahující glykoproteiny gp41 a gp120. Glykoprotein gp120 obsahuje řetězce N-acetyllaktosaminu na jádru trimanózy, které jsou ligandy galektinu-1 [21,26]. U neinfikovaného organismu se galektin-1 váže na glykany na receptoru CD4, a brání tak v autoreaktivitě T-lymfocytů. U organismu infikovaného HIV-1 tvoří galektin-1 můstky mezi ligandem gp120 a CD4 receptorem, čímž urychluje infekci T-lymfocytů virem HIV-1 [27].

Nejvíce prozkoumaným galektinem, co se týče nádorových onemocnění, je galektin-3. Vyskytuje se u nádorů různých orgánů, například jater, žaludku, štítné žlázy, nervové soustavy, vaječníků a varlat [28]. Galektin-3 má různé potenciální mechanismy působení, které se zdají být závislé na typu rakoviny. Může podporovat tvorbu metastáz aktivací signálních drah Ras, tak je tomu v případě pankreatického karcinomu. Zatímco u leukémie stabilizací antiapoptotických proteinů Bcl-2 inhibuje buněčnou smrt leukemických buněk [29].

1.2. Galektin-4

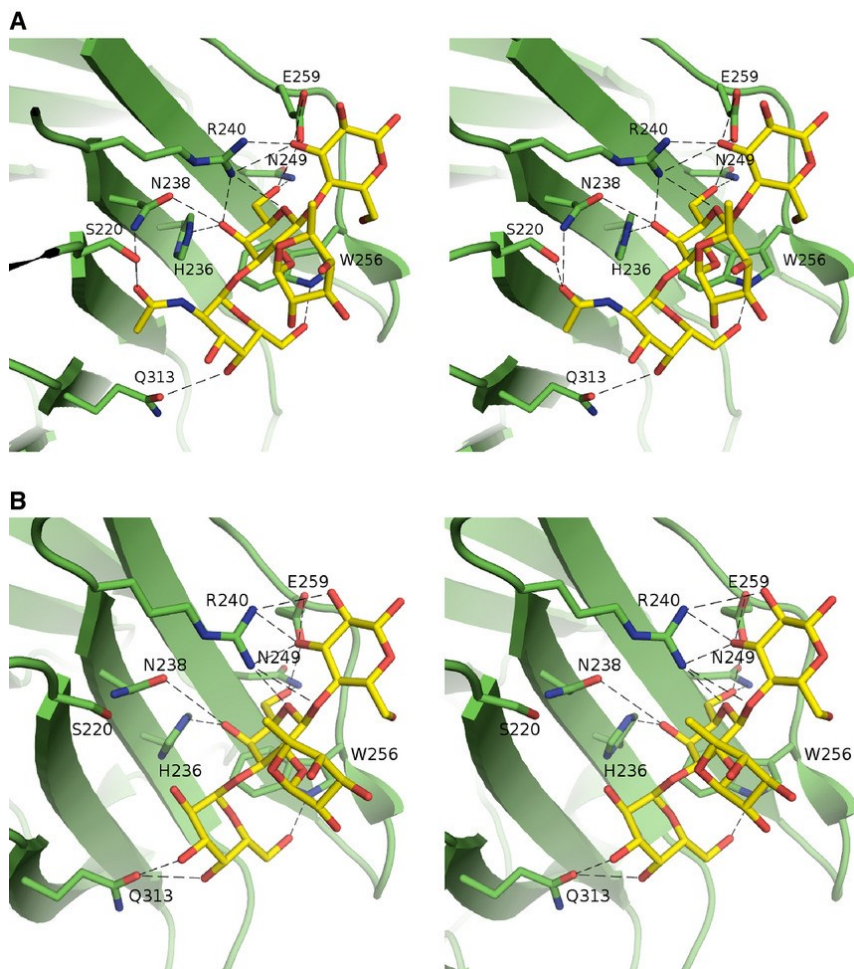
1.2.1. Struktura galektinu-4

Galektin-4 patří do skupiny tandemových galektinů. Obsahuje dvě odlišné homologní CRD domény: CRD1 (N-terminální, galektin-4N) a CRD2 (C-terminální, galektin-4C), které mají molekulovou hmotnost 16–17 kDa. CRD domény jsou složeny ze 150 (Gal-4N) a 145 (Gal-4C) aminokyselinových zbytků, které sdílejí 40% sekvenční identitu. Domény jsou spojeny peptidovým linkerem, který je složen z 29 zbytků a je bohatý na prolin a glycin [30].

Obě podjednotky se vážou s velkou afinitou na sulfatované oligosacharidy. Umístění sulfátové skupiny na molekule ligandu je klíčové pro rozpoznání galektinem-4. Obě CRD například upřednostňují 3'-O- a 6-O-sulfataci laktosy a N-acetyllaktosaminu (LacNAc). S galaktosou ztrácí vazebnou afinitu, pokud sulfát blokuje hydroxylovou skupinu na uhlíku C6', jako je tomu v případě Gal(6-SO₃⁻)β4GlcNAc(6-SO₃⁻). Afinita Gal-4C ($K_D = 2,0 \times 10^{-6}$ mol/l) k disacharidu Gal(3-SO₃⁻)β3GalNAcα1-O-benzyl byla vyšší než afinita Gal-4N ($K_D = 2,3 \times 10^{-5}$ mol/l), galektin-4C také vykazoval vyšší afinitu k 3-O-sulfatovaným glykosfingolipidům než galektin-4N. Prostřednictvím cílené mutagenese bylo zjištěno, že arginin (Arg45) N-terminální podjednotky je zodpovědný za rozpoznávání sulfátu, zatímco u C-terminální podjednotky ještě nebyla identifikována aminokyselina, která přímo interaguje se sulfátovými skupinami ligandů [31]. Strukturní charakterizace galektinu-4C vázaného na

laktosu-3'-sulfát ukázala, že vzniká přechodná interakce mezi sulfátovou skupinou a konzervovaným zbytkem Trp256, která by mohla vzniklý komplex stabilizovat, ale žádná další přímá interakce mezi galektinem-4C a sulfátovou skupinou nebyla pozorována [32].

Kromě sulfatovaných oligosacharidů má galektin-4 vysokou afinitu k sacharidovým antigenům krevních skupin A a B, přičemž lidský galektin-4C vykazuje vyšší vazebnou afinitu k sacharidům typu A, B a H než galektin-4N [33]. Pomocí mutagenese bylo odhaleno, že za sníženou schopnost vázat antigeny krevních skupin A a B může být zodpovědný nekonzervovaný zbytek fenylalaninu Phe47. Konkrétně by za to mohla jeho objemnost - když byl mutací nahrazen za Ala47 (čímž se stal podobnější galektinu-4C), jeho afinita vůči tetrasacharidu A vzrostla, zatímco u mutace Phe47Gln nevzrostla [34,35]. Studie molekulové dynamiky a měření afinity se shodují v tom, že mezi galektinem-4C a lineární částí tetrasacharidu A (Gal α 3Gal β 4Glc) dochází k těsným interakcím, protože byla pozorována řada vodíkových vazeb zahrnujících zbytky Trp256, Ser220 a Asn238. Simulace molekulární dynamiky naznačují, že galektin-4C by měl mít vyšší afinitu k sacharidům typu A ve srovnání se sacharidy typu B v důsledku dodatečných interakcí mezi zbytkem Ser220 a *N*-acetylovou skupinou *N*-acetylgalaktosaminu tetrasacharidu A [32].



Obrázek 2. Analýza molekulové dynamiky (MD) interakcí mezi galektinem-4C a sacharidy krevních skupin A a B (převzato z [32]). (A) Interakce galektinu-4C s tetrasacharidem A, (B) interakce galektinu-4C s tetrasacharidem B. Galektin-4C je vyobrazen zeleně, atomy uhlíku jsou vyobrazeny jako žluté tyčinky, atomy dusíku jako modré tyčinky, atomy kyslíku jako červené tyčinky, zbytky aminokyselin jako zelené tyčinky a vodíkové můstky jako přerušovaná černá čára.

Nejvýraznějším rozdílem mezi vazebnými vlastnostmi podjednotek galektinu-4 je schopnost Gal-4N vázat cholesterol-3-sulfát, zatímco Gal-4C této vazby schopen není. Za tuto interakci je u Gal-4N opět zodpovědný Arg45 [36].

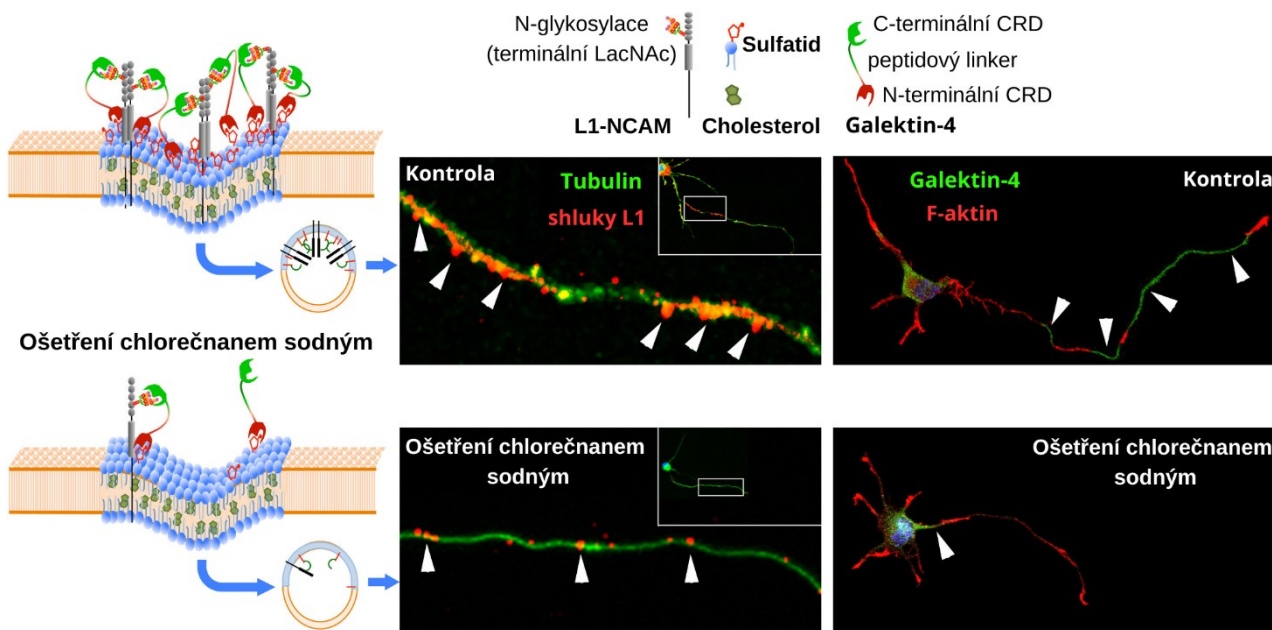
1.2.2. Funkce galektinu-4 v organismech

Galektin-4 je primárně exprimován v gastrointestinálním traktu a bylo prokázáno, že zde hraje několik fyziologických rolí. Účastní se apikálního transportu v epitelálních buňkách nebo podporuje hojení ran ve střevním epitelu. Dále je součástí adaptivní imunitní odpovědi a hraje několik rolí i v centrálním nervovém systému.

Apikální transport je proces, při kterém jsou nově syntetizované proteiny transportovány z Golgiho aparátu na apikální povrch epiteliálních buněk, kde jsou uvolňovány do lumen střeva. Umlčení exprese galektinu-4 v buňkách HT-29 ukázalo, že nedochází k transportu glykoproteinů na apikální membránu a místo toho se abnormálně akumulují uvnitř těchto buněk. Příkladem těchto glykoproteinů jsou dipeptidylpeptidáza IV (DPP-IV), karcinoembryonální antigen (CEA) a mucin-1 (MUC1) [37]. Správné třídění proteinů je klíčové pro efektivní apikální přenos a existuje několik třídících mechanismů, které směřují proteiny na apikální povrch. Jeden takový třídící mechanismus zprostředkovávají komplexní N-glykany, které zajišťují apikální přenos MUC1 v buňkách HT-29 závislý na galektinu-4 [38].

Bakterie mohou vytvářet na svém povrchu řadu antigenních struktur na bázi glykanů a některé z nich mohou mít vlastnosti antigenů krevních skupin. Antigen O86, který je vystaven na povrchu některých kmenů *E. coli*, dokáže indukovat tvorbu významných protilátek krevní skupiny B u dříve neexponovaných jedinců. Galektin-4 má baktericidní aktivitu proti kmenům *E. coli*, které exprimují antigen O86. Tato aktivita není nijak závislá na tvorbě komplementu a považuje se za složku adaptivní imunity. Galektin-4 se může specificky vázat pomocí své C-terminální domény na antigen O86 na povrchu *E. coli*, a tím drasticky změnit integritu membrány a motilitu bakterií, což následně vede k buněčné smrti [39].

V centrálním nervovém systému (CNS) se galektin-4 podílí na několika procesech. Myelinizace axonů v centrálním nervovém systému je proces, při kterém specializované buňky zvané oligodendrocyty (OLG) obalují vrstvy myelinu kolem axonů neuronů. Myelin je membrána s vysokým obsahem lipidů, která tvoří kolem axonu izolační obal, jenž pomáhá urychlit přenos elektrických signálů podél axonu. Galektin-4 podporuje shlukování axonálních glykoproteinů NCAM L1, které vede k růstu axonu [40]. Shlukování je zprostředkované vazbou C-terminální podjednotky na *N*-acetyllaktosamin na větvích N-glykanů glykoproteinu NCAM L1 a současnou vazbou N-terminální podjednotky na sulfatid (3-*O*-sulfogalactosylceramid, SM4) zakotvený v membráně. Blokování syntézy sulfatidu působením chlorečnanu sodného snižuje celkový výskyt NCAM L1 a jeho shluků. To vede ke snížené expresi galektinu-4 a nakonec ke zpomalení růstu axonu [41]. Galektin-4 je exprimován a uvolňován nemyelinizovanými neurony; navázáním na povrchové receptory premyelinizačních OLG by mohl galektin-4 částečně podporovat dediferenciaci a proliferaci OLG [42].



Obrázek 3. Role galektinu-4 v hipokampálním neuronu znázorněna na schématech (vlevo) a mikrofotografiích (vpravo). Gal-4 může strukturně organizovat mikrodomény pro polarizovaný transport glykoproteinů vazbou na dva různé typy receptorů, sulfatid a N-glykany NCAM L1. Blokování syntézy sulfatidu chlorečnanem sodným zhoršuje směřování glykoproteinu a také růst axonů (upraveno a převzato [41]).

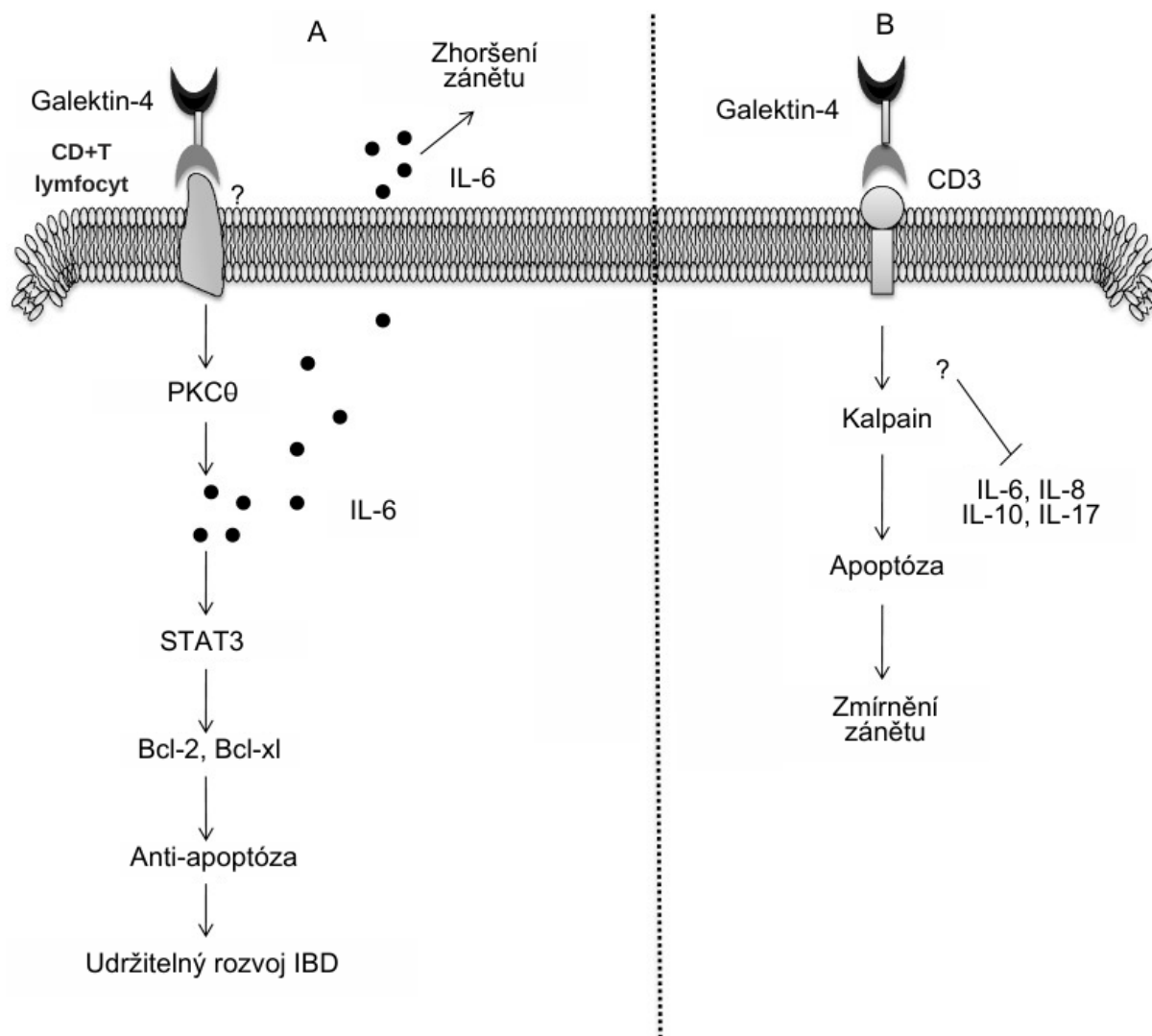
1.2.3. Galektin-4 u lidí s nádorovým onemocněním a idiopatickými střevními záněty

Tkáně kolorektální rakoviny (CRC, z angl. *colorectal cancer*) exprimují méně galektinu-4 v porovnání se zdravými tkáněmi tlustého střeva a právě nižší exprese galektinu-4 podporuje progresi nádoru a metastáz. Bylo zjištěno, že galektin-4 inhibuje tumorigenezi buněk CRC prostřednictvím signální dráhy Wnt/ β -katenin a signální dráhy IL-6/NF- κ B/STAT3. Dráha Wnt/ β -kateninu je klíčovou signální dráhou, která hraje klíčovou roli ve vývoji CRC. Bylo prokázáno, že aktivace této dráhy podporuje růst a proliferaci buněk CRC. Ukázalo se, že galektin-4 inhibuje Wnt/ β -katenin dráhu vazbou na β -katenin a indukci jeho degradace, což zabraňuje jeho translokaci do jádra a následné aktivaci cílových genů Wnt. Zabráněním aktivace Wnt genů dojde ke snížení exprese cyklinu D1, zvýšení exprese p21 a p15 a inhibici proliferace, migrace a motility buněk CRC [43]. Dráha IL-6/NF- κ B/STAT3 je další důležitou signální dráhou CRC, u které je často narušena regulace. Galektin-4 inhibuje tuto dráhu potlačením exprese IL-6, což současně inhibuje aktivaci nukleárního faktoru-kappa B (NF- κ B) a signálního převodníku a aktivátoru transkripce 3 (STAT3) v CRC. Potlačením signální dráhy IL-6/NF- κ B/STAT3 by byla snížena míra exprese vaskulárního endoteliálního růstového

faktoru (VEGF), cyklooxygenázy-2 (COX-2) a dalších genů podílejících se na tumorigenezi, čímž by se inhibovala progresse nádoru [44].

Idiopatické střevní záněty (IBD, z angl. *inflammatory bowel disease*) je skupina chronických onemocnění, která způsobují zánět v trávicím traktu. Dva hlavní typy IBD jsou Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, které sdílejí některé podobné příznaky, jako je průjem, bolest břicha a ztráta hmotnosti. Přesná příčina IBD není zcela objasněna, ale předpokládá se, že jde o komplexní souhru genetických, environmentálních a imunologických faktorů a že IBD je výsledkem abnormální imunitní reakce na tělu přirozené bakterie a jiné mikroorganismy, které obývají trávicí trakt, což vede k chronickému zánětu a poškození tkáně [45,46].

Crohnova nemoc i ulcerózní kolitida souvisí s aktivací zánětlivých paměťových CD4+ T-lymfocytů v zaníceném gastrointestinálním traktu. Galektin-4 může mít dvojí efekt na průběh střevního zánětu. Galektin-4 může přímo interagovat s CD4+ T-lymfocyty vazbou na imunologickou synapsi, která je nespecifickým aktivátorem signalizační kaskády lipidového raftu asociovaného s proteinkinázou C izoformy θ (PKC θ). Aktivací dráhy spojené s PKC θ stimuluje galektin-4 produkci interleukinu 6 (IL-6). IL-6 je zánětlivý cytokin, který může zhoršovat střevní zánět v přítomnosti narušené slizniční bariéry nebo při poranění sliznice. Nebylo však dosud zjištěno, který receptor střevních CD4+ T-lymfocytů se specificky váže s galektinem-4. Bylo potvrzeno, že IL-6 zvyšuje expresi B-buněčného lymfomu-2 (Bcl-2) a B-buněčného lymfomu Bcl-xl prostřednictvím aktivace signální dráhy STAT3, čímž inhibuje apoptózu CD4+ T-lymfocytů, která následně vede k rozvoji IBD. V jiném případě bylo ale prokázáno, že by galektin-4 mohl indukovat apoptózu T-lymfocytů vazbou na CD3 epitop na povrchu T-lymfocytů. Navázání galektinu-4 na tento epitop podporuje apoptózu T-lymfocytů způsobem závislým na kalpainu a snižuje sekreci cytokinů včetně IL-6, IL-8, IL-10 a IL-17, což naopak zánět zmírňuje. Na základě existujících dat můžeme dojít k závěru, že galektin-4 může zhoršit střevní zánět, nebo ho může i zmírnit. Pro zjištění ultimátní role galektinu-4 při střevních zánětech jsou tedy zapotřebí další studie [30].



Obrázek 4. Odlišný molekulární mechanismus galektinu-4 při idiopatických střevních zánětech (převzato a upraveno z [30]).

(A) Zhoršení zánětu

(B) Zmírnění zánětu

Adheze šířících se nádorových buněk na endotel krevních cév je klíčovým krokem v tvorbě metastáz. Měřením hladiny galektinu-4 v séru pacientů s rakovinou a následným porovnáním se sérem zdravých lidí můžeme pochopit vliv galektinu-4 na adhezi rakovinných buněk na endotel. U pacientů s rakovinou tlustého střeva a rakovinou prsu, především u těch s metastázami, byly hladiny galektinu-4 v séru až 31-krát vyšší oproti séru zdravých pacientů. [47] V jiné studii autoři naměřili vyšší koncentraci (648 pg/ml) u pacientek s rakovinou dělohy než v séru žen s normální cytologií (382 pg/ml). Tyto údaje naznačují, že by galektin-4 mohl být potencionální biomarker určitých typů rakoviny [48].

1.3. Přírodní a syntetické inhibitory galektinů

Galektiny hrají důležitou roli v mnoha biologických procesech a jsou zapojeny do patogeneze mnoha onemocnění. Studium galektinových inhibitorů můžeme lépe porozumět specifickým rolím, které galektiny hrají v těchto procesech, a identifikovat je jako potenciální terapeutické cíle. Nejvíce informací máme o inhibitech galektinu-3, jelikož byl zatím nejrozsáhleji studován.

Oblíbeným polysacharidovým inhibitorem přírodního původu, zvláště pro galektin-3, je například modifikovaný citrusový pektin (MCP, z angl. *modified citrus pectin*). MCP se vyrábí z citrusového pektinu úpravami pH a teploty, které jej štěpí na kratší, nerozvětvené sacharidové řetězce bohaté na galaktosu. MCP se pevně váže na CRD doménu galektinu-3 a tím moduluje jeho biologickou aktivitu. Ve studii zabývající se účinky MCP na iniciaci aterosklerózy bylo prokázáno, že MCP může snížit velikost aterosklerotické léze inhibicí adheze leukocytů na endoteliální buňky [49].

Častým strukturním a biosyntetickým cílem pro vývoj léků proti tuberkulóze je arabinogalaktan. Jedná se o polysacharid vyskytující se mnoha rostlinách, ale nejčastěji je získáván extrakcí z odštěpků modřínu západního. Arabinogalaktan je u mykobakterií virulentním faktorem. Vazba galektinu-9 na mykobakteriální arabinogalaktan spouští matrixové metaloproteinázy prostřednictvím signalizace TAK1-ERK (transformující růstový faktor β -aktivovaná kináza 1 - kináza regulovaná extracelulárním signálem), která podporuje mykobakteriální infekci a zvyšuje poškození plic [50].

Byly také vyvinuty syntetické inhibitory galektinů. Patří mezi ně malé molekuly, jako jsou TD139 a GR-MD-02, které inhibují galektin-3, nebo OTX008 a SB1578, které inhibují galektin-1. TD139, thiodigalaktosidový inhibitor vyvinutý společností Galecto Biotech jako potenciální léčivo pro idiopatickou plicní fibrózu, je nejpokročilejším nízkomolekulárním inhibitorem galektinu-3 v klinických studiích. Galektin-3 hraje významnou roli ve vývoji a progresi plicní fibrózy [51]. Aktivace makrofágů a myofibroblastů, dvou základních typů buněk při orgánové fibróze, je závislá na galektinu-3. Zrušení exprese galektinu-3 u zvířecích modelů nebo jeho farmakologická blokáda pomocí inhibitorů vede k dramatickému snížení nebo dokonce prevenci fibrózy. TD139 je aplikován inhalačně, což umožňuje přímé zacílení na fibrotickou tkáň v plicích a zároveň minimalizuje systémovou expozici [52].

Nealkoholická steatohepatitida (NASH, z angl. *non-alcoholic steatohepatitis*) a následná fibróza jater je závažným zdravotním problémem bez schválené farmakoterapie. Galektin-3 se podílí na progresi onemocnění NASH a ačkoli jeho role není přesně známa, jeho

inhibice zabraňuje progresi fibrózy. Belapektin (GR-MD-02) je galaktoarabino-rhamnogalakturonanový polysacharid obsahující kyselinu galakturonovou, galaktosu, arabinosu, rhamnos a menší množství jiných cukrů. Strukturální studie ukázaly, že belapektin se váže na galektin-1 a galektin-3, ale má větší vazebnou afinitu ke galektinu-3. Výsledky 2. fáze klinické studie ukázaly statisticky a klinicky významné účinky u pacientů s cirhózou NASH bez jícnových varixů léčených belapektinem. Zároveň má belapektin nízkou míru toxicity, protože sacharidy jsou metabolizovány na netoxické sloučeniny na rozdíl od jiných léků, které mají toxické metabolity [53].

Galektin-1 je nadměrně exprimován v nádorových buňkách a endoteliálních buňkách spojených s nádorem a je široce zapojen do angiogeneze, motility a invaze rakovinných buněk a jejich úniku imunitnímu systému. OTX008 je derivát kalixarenu navržený tak, aby vázal galektin-1 amfipatickou konformací β -listu. OTX008 prokázal antiproliferativní a antiinvazivní vlastnosti u několika rakovinných buněčných linií včetně linií rakoviny tlustého střeva, prsu, hlavy a krku a prostaty. Zároveň vykazoval významné protirakovinné účinky *in vitro* i *in vivo* u linií karcinomu štítné žlázy exprimujících galektin-1 [54].

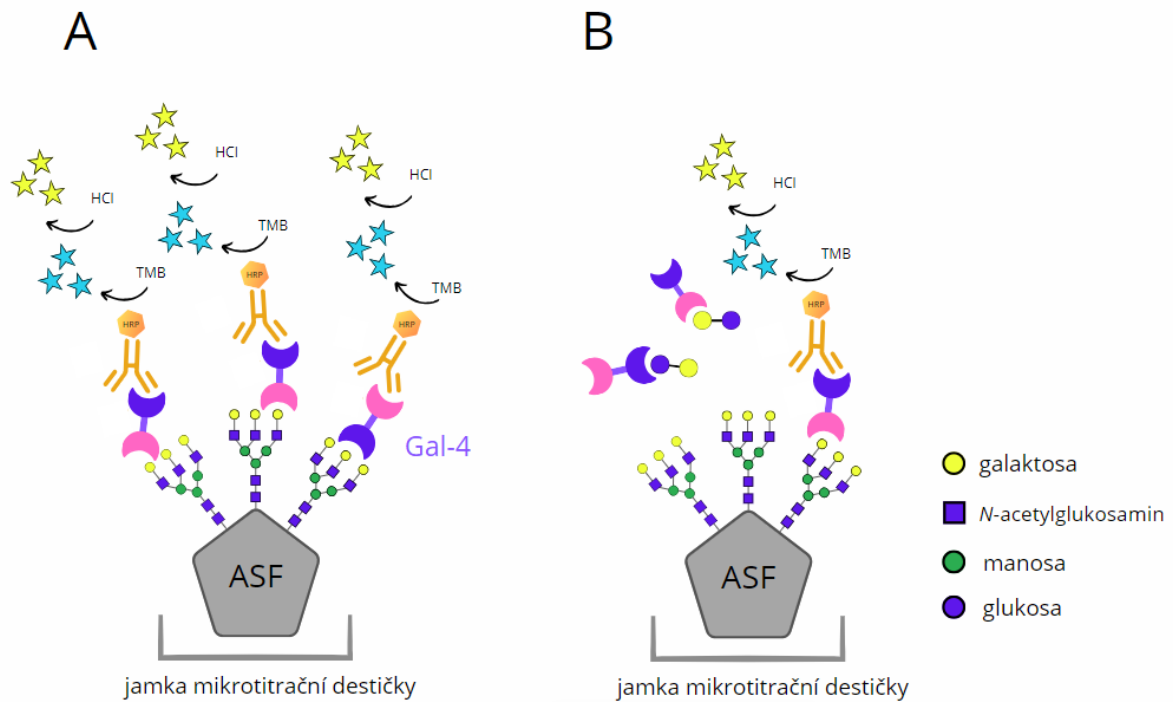
1.4. Metody stanovení vazby galektinu a ligandu

Metody stanovení vazby galektinu a ligandu je možné rozdělit do tří kategorií: metody, kde je jeden z vazebných partnerů imobilizovaný (ELISA, povrchová plasmonová resonance SPR, interferometrie na biovrstvě BLI), metody, kdy jsou galektin i ligand v roztoku (fluorescenční polarizace FP, izotermální titrační kalorimetrie ITC), nebo metody založené na zkoumání struktury komplexu galektin-ligand (nukleární magnetická rezonance NMR, rentgenová krystalografie) [55].

Kompetitivní ELISA (cELISA, z angl. *Competitive Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) je jednou z řady variant imunochemické metody ELISA, všechny jsou však založeny na podobném principu reakce antigenu s protilátkou. Povrch jamek mikrotitrační destičky je nejprve potažen kompetitivním ligandem (např. asialofetuinem; ASF na obrázku 5). Ligand v roztoku (např. testovaný sacharidový inhibitor) soutěží s imobilizovaným kompetitivním ligandem o vazbu na antigen v roztoku (např. galektin-4; Gal-4 na obrázku 5). Antigen navázaný na imobilizovaný ligand detekujeme spektrofotometricky pomocí protilátky, např. konjugované s křenovou peroxidasou (HRP, z angl. *horseradish peroxidase*), která reaguje se substrátem TMB za vzniku modrého produktu. Tato enzymová reakce je zastavena přidáním

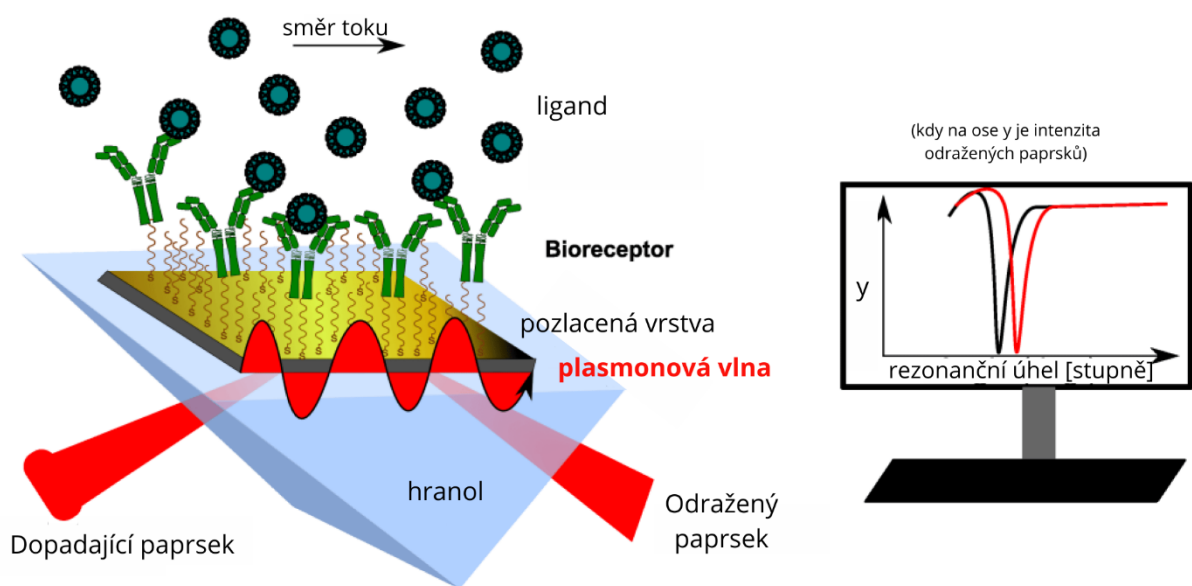
kyseliny chlorovodíkové za vzniku žlutého produktu. U metody ELISA je nutné po každém kroku promývat jamky mikrotitrační destičky, aby byly detekovány pouze antigeny navázané do jamky a antigeny inhibované ligandy byly odmyty. Měření je analyzováno spektrofotometricky, čím více bude tedy antigen inhibován ligandem, tím méně bude vznikat žlutého zabarvení a tím menší bude naměřená hodnota absorbance. Vyhodnotíme-li naměřené hodnoty nelineární regresí, získáme závislost absorbance na logaritmu koncentrace testovaných ligandů a tím i hodnotu IC_{50} , kde hodnota IC_{50} značí koncentraci ligandu, při které je inhibováno právě 50 % antigenu (Gal-4) [66].

Přímá ELISA (dELISA, z angl. *Direct Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) je tou nejjednodušší variantou imunochemických metod ELISA. Postup je obdobný jako u kompetitivní metody ELISA, avšak do roztoku nepřidáváme ligand (např. testovaný sacharidový inhibitor); všechen antigen (např. galektin-4; Gal-4 na obrázku 5) se tedy váže na imobilizovaný kompetitivní ligand. Analogicky jako u kompetitivní metody detekujeme antigen na imobilizovaný ligand spektrofotometricky pomocí protilátky, např. konjugované s křenuvou peroxidasou (HRP, z angl. *horseradish peroxidase*), která reaguje se substrátem TMB za vzniku modrého produktu. Enzymovou reakci zastavujeme přidáním kyseliny chlorovodíkové za vzniku žlutého produktu. Měření je analyzováno spektrofotometricky: čím více antigenu je navázano na imobilizovaný ligand, tím intenzivnější je žluté zabarvení, což odpovídá vyšším hodnotám absorbance. Výsledné hodnoty jsou vyhodnoceny pomocí nelineární regrese, což nám poskytuje závislost absorbance na logaritmu koncentrace antigenu. Tím získáme hodnotu K_D , tedy zdánlivou disociační konstantu, která charakterizuje afinitu antigenu k imobilizovanému ligand [56].



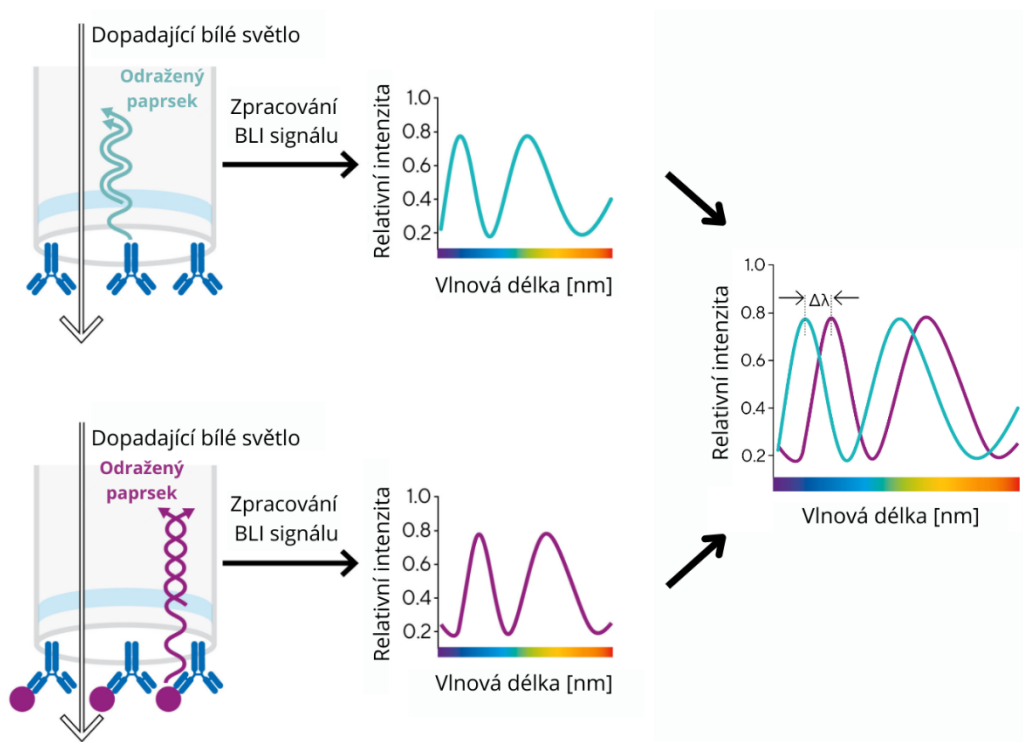
Obrázek 5. Schéma metody ELISA (převzato a překresleno z [57]). **(A)** schéma přímé metody ELISA, **(B)** schéma kompetitivní metody ELISA.

Povrchová plasmonová resonance (SPR, z angl. *surface plasmon resonance*) je optická analytická metoda, kterou lze monitorovat biomolekulární interakce mezi mobilním ligandem a molekulou imobilizovanou na biosenzoru (např. galektinem) v reálném čase. Mobilní ligand nepřetržitě proudí přes povrch biosenzoru, kde se váže na imobilizovaný galektin. Polarizované světlo dopadající na elektricky vodivý povrch na rozhraní mezi dvěma médii generuje evanescentní vlny excitovaných elektronů zvané plasmony. Tyto plasmony snižují intenzitu odraženého světla pod specifickým úhlem známým jako rezonanční úhel. Vazba mezi ligandem a galektinem se měří jako změna v rezonančních jednotkách (RU) na povrchu biosenzoru. Měřením nárůstu vazby v čase pro danou koncentraci ligandu se získá asociační rychlost, přerušení toku mobilního ligandu a změna na samotný pufr pak umožňuje interakci ligandu zrušit. Měřením poklesu množství navázaného ligandu v průběhu času získáme rychlost disociace ligandu. Afinita ligandu ke galektinu se vypočítá z kinetických asociačních a disociačních rychlostí pro několik různých koncentrací ligandu [58–60].



Obrázek 6. Schéma metody SPR (převzato a upraveno z [61]).

Pomocí opticko-analytické metody interferometrie na biovrstvě BLI (z angl. *biolayer interferometry*) můžeme měřit biomolekulární interakce v reálném čase. BLI spočívá v interferenci bílého světla odraženého od dvou povrchů, vrstvy imobilizovaného proteinu na povrchu senzoru a vnitřní referenční vrstvy. Ponoříme-li senzor do roztoku analytu, vazba mezi analytem a imobilizovaným proteinem zvýší tloušťku optické vrstvy, což způsobí posun vlnové délky. Hlavní výhodou této metody je, že interakce jsou taktéž měřeny v reálném čase, díky čemuž můžeme monitorovat vazebnou specifitu a rychlost asociace a disociace [62].



Obrázek 7. Schéma metody BLI (převzato a upraveno z [62]).

Další z metod, kterou lze také využít pro studium vazebné afinity galektinů k ligandům, je fluorescenční polarizace (FP, z angl. *fluorescence polarization*). Principem metody je excitace fluorescenčně značeného sacharidu polarizovaným světlem a měření míry polarizace zbývající v emitovaném světle. Tato zbývající polarizace klesá ve vztahu k pohybu fluorescenční sondy (fluorescenčně značeného sacharidu), jinak řečeno touto metodou měříme rychlost rotace fluorescenční sondy. Rychlost rotace samotné fluorescenční sondy je vysoká a vede k depolarizaci emitovaného světla, tedy míra polarizace zbývající v emitovaném světle je nízká. Navázáním fluorescenční sondy na protein, jako je galektin, snižujeme rychlost rotace a emitované světlo zůstává polarizované, tedy míra polarizace zbývající v emitovaném světle je vyšší [63].

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC, z angl. *isothermal titration calorimetry*) zaznamenává uvolněné nebo spotřebované teplo během bimolekulární interakce ligandu s proteinem za konstantní teploty. Tato metoda funguje na základním principu termodynamiky, kde se při kontaktu dvou molekul buď teplo absorbuje, nebo tvoří v závislosti na typu vazby; reakce je tedy buď exotermická, nebo endotermická. Umožňuje stanovení termodynamických parametrů (ΔG , ΔS , ΔH), afinitních konstant (K_D) a stechiometrických hodnot souvisejících s

vazbou (n). Přístroj obsahuje dvě měřicí cely, jedna obsahuje protein, zatímco druhá je referenční a obsahuje pouze rozpouštědlo. Do první cely obsahující protein je postupně vstřikován ligand o známé koncentraci, což má za následek buď uvolnění nebo spotřebu tepla a zvýšení nebo snížení teploty v okolní kapalině. Přístroj však udržuje stejnou teplotu obou cel a měří energii potřebnou k udržení tohoto stavu. Termogramy jsou tvořeny vynesením energie [J] potřebné k udržení teploty proti času [s] [64].

Základním principem nukleární magnetické rezonance (NMR, z angl. *nuclear magnetic resonance*) je, že konkrétní atomová jádra mají spin a jsou energeticky nabitá. Pokud je aplikováno vnější magnetické pole, je možný přenos energie mezi základní energií na vyšší energetickou hladinu. Přenos energie probíhá na vlnové délce, která odpovídá rádiovým frekvencím, a když se spin vrátí na svou základní úroveň, je energie emitována na stejné frekvenci. Signál, který odpovídá tomuto přenosu, je měřen mnoha způsoby a zpracováván za účelem získání NMR spektra pro příslušné jádro [65]. Pomocí NMR lze detekovat interakci atomů, které jsou blízko sebe nebo sdílejí jednu vazbu, a lze tak určit i interakci mezi lektiny a ligandy. Aby bylo možné zkoumat komplexy galektin-ligand a vliv vazby na proteinovou strukturu, je nutné rekombinantní galektiny značené ^{13}C a nebo ^{15}N produkovat v izotopově obohaceném médiu. Lze tak odhalit specifické interagující atomy a také informace o sekundární struktuře galektinu jako jsou α -helixy, β -vlákna a další strukturní motivy. Díky této metodě by mohlo být možné objasnit, jestli se lektiny objevují v monomerní nebo oligomerní formě nebo v jaké koncentraci se oligomerní forma vyskytuje [55].

Pomocí rentgenové krystalografie lze stanovit atomovou a molekulární strukturu krystalu. Krystalové atomy způsobují difrakci paprsku rentgenového záření do mnoha specifických směrů, měřením úhlů a intenzit těchto difraktovaných paprsků lze vytvořit 3D obraz hustoty elektronů v krystalu. Faktorů ovlivňujících krystalizaci proteinů je mnoho, např. koncentrace proteinu, teplota, pH a čistota proteinu. Mezi výhody rentgenové krystalografie patří její vysoké rozlišení, které umožňuje detailní analýzu molekulární struktury, a její schopnost poskytnout velké množství informací o chemických vazbách v molekule. Mezi nevýhody patří samotná krystalizace, která může být pro některé molekuly velmi obtížná. Dále je rentgenová krystalografie omezena na studium statických struktur a nemůže zachytit dynamické pohyby molekul v roztoku [66].

2. Cíle práce

- exprese lidského galektinu-4 z plasmidu připraveného v laboratoři v *Escherichia coli* a jeho purifikace afinitní chromatografií
- optimalizace imunochemického stanovení ELISA pro měření vazebné afinity galektinu-4 k sacharidovým ligandům
- stanovení afinity galektinu-4 k vybraným sacharidovým ligandům a diskuze získaných výsledků

3. Experimentální část

3.1. Použité přístroje a materiál

3.1.1. Seznam použitých chemikálií

- akrylamid (VWR Chemicals, Česká republika)
- asialofetuin; ASF (Sigma Aldrich, USA)
- Bradfordovo činidlo – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
- bromfenolová modř (Serva, Německo)
- *Coomasie Brilliant Blue* (USB Corporation, USA)
- destilovaná a ultračistá voda (filtrační zařízení WATREX)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- dihydrogenfosforečnan sodný mohohydrát (Carl Roth, Německo)
- dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- dodecylsulfát sodný; SDS (Serva, Německo)
- *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen, USA)
- ethanol (VWR Chemicals, Česká republika)
- fenylmethylsulfonylfluorid; PMSF (Roche, Švýcarsko)
- glycerol dvakrát destilovaný 99,5% (VWR Chemicals, Česká republika)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, Česká republika)
- hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid; IPTG (Sigma Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová; EDTA (Carl Roth, Německo)
- Myší monoklonální protilátka anti-His₆-peroxidasa, ředění 1:1000 v PBS pufru,

- (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- nízkomolekulární proteinový standard– Amersham *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Velká Británie)
- plasmidy pET28a-Gal4, pET28a-Gal4NL, pET28a-Gal4CL s rezistencí na kanamycin nesoucí gen lidského galektinu-4 nebo jeho samostatných podjednotek (k dispozici na školicím pracovišti)
- substrát TMB One; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (Kem-En-Tec, Dánsko)
- tetramethylenethylendiamin; TEMED (Sigma-Aldrich, USA)
- tris-Cl (Sigma-Aldrich, USA)
- trypton (Oxoid, Česká republika)
- Tween[®] 20 (ITW Reagents, Španělsko)

3.1.2. Seznam použitých roztoků a médií

- Polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE; 12% gel)
 - Separáční gel: 1,6 ml H₂O; 2,0 ml 30% akrylamid mix (29% akrylamid, 1% *N,N'*-metylenbisakrylamid); 1,3 ml Tris-Cl (1,5 M, pH 8,8); 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% (NH₄)₂S₂O₅; 0,002 ml TEMED
 - Zaostr vac  gel: 3,4 ml H₂O; 0,83 ml 30% akrylamid mix (29% akrylamid, 1% *N,N'*-metylenbisakrylamid); 0,63 ml Tris-Cl (1,0 M, pH 6,8); 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% (NH₄)₂S₂O₅; 0,005 ml TEMED
 - 5× koncentrovan  vzorkov  pufr (5 ml): 0,151 g Tris-Cl; 0,3855 g DTT; 0,5 g SDS; 0,025 g bromfenolov  modř; 1,25 ml glycerol
 - 5× elektrodov  pufr (1 l): 5 g SDS; 15 g Tris-Cl; 94 g glycin
- 3 mol/l HCl: 66 ml HCl; 186 ml ultra ist  H₂O
- Blokovac  roztok: 2% BSA v PBS pufru (Sigma-Aldrich, USA)

- Bradfordovo činidlo: 0,01% *Coomassie Brilliant Blue G-250*; 4,7% ethanol; 8,5% kyselina fosforečná v destilované vodě
- Barvicí roztok na gely (100 ml): 0,25 g *Coomassie Brilliant Blue R250*; 45 ml methanol; 45 ml H₂O; 10 ml 99% kyselina octová
- Ekvilibrační pufr pro purifikaci Gal-4: 20 mM Na₂HPO₄; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol (pH 7,4)
- Eluční pufr pro purifikaci Gal-4: 20 mM Na₂HPO₄; 500 mM NaCl; 500 mM imidazol (pH 7,4)
- Fosforečnanový pufr - 16 ml 0,2 M NaH₂PO₄, 84 ml 0,2 M Na₂HPO₄, 100 ml ultračisté vody (pH 7,5)
- LB médium (Luria-Bertani; 100 ml): 1 g trypton; 0,5 g kvasničný extrakt; 1 g NaCl
- LBA médium (Luria-Bertani agar; 100 ml): 1 g trypton; 0,5 g kvasničný extrakt; 1 g NaCl; 2 g agarosa
- Odbarvovací roztok na gely (1 l): 350 ml ethanol; 100 ml kyselina octová; 550 ml H₂O
- PBS (fosfátový pufr; pH 7,5): 8,76 g 0,15 M NaCl; 6,9 g 0,05 M NaH₂PO₄·H₂O v 1000 ml ultračisté H₂O
- Promývací roztok PBST: 0,05% Tween[®] 20 v PBS
- TB médium (angl. *Terrific Broth*, 1000 ml): 24 g kvasničný extrakt; 20 g trypton; 4 ml glycerol; 17 mM KH₂PO₄; 72 mM K₂HPO₄

3.1.3. Seznam použitých přístrojů

- NGC Chromatography Systems (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Aparatura na SDS polyakrylamidovou elektroforézu (BioRad, USA)

- Centrifugy: Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, USA), Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA), Sorvall RC 6 Plus Centrifuge (Thermo Scientific, USA), Universal 320 R (Hettich, Německo)
- Destičky na ELISA – F16 Maxisorp NUNC-Immunomodules (Fisher ThermoScientific, Dánsko)
- Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)
- pH metr pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, ČR)
- Purifikační kolona HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie)
- Sonikátor UP50 H Ultra Sonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie)
- Spektrofotometr UV1700 Pharma SPec UVViS (Shimadzu, Německo)
- Termomixér Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, USA)
- Třepačka IKA KS 4000 ic control (Schoeller, Česká republika)
- UV lampa, UV 240 (A. Krüss Optronik, Německo)
- Váhy Precisa 80A200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- Váha SECURA1241S Secura 1241S (Sartorius AG, Německo)
- Vakuová filtrace (Milford, MA 01757, USA)
- Vortex Grantbio (Grant Instruments, Velká Británie)

3.2. *Heterologní exprese a purifikace galektinů*

3.2.1. *Transformace E. coli Rosetta 2 (DE3) pLysS plasmidem*

Nejprve byly připraveny misky, práce probíhala sterilně v laminárním boxu. Roztok LBA byl roztaven zahříváním, byla přidána antibiotika: 100 μ l kanamycinu (50 mg/ml) a 100 μ l chloramfenikolu (34 μ g/ml), a agar byl následně rozlit do Petriho misek ve vrstvě přibližně 1 cm. Misky byly ponechány v laminárním boxu ke ztuhnutí.

Kryokonzervovaná kultura kompetentních buněk *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (100 μ l) byla pomalu rozmrazována na ledu společně se zásobním roztokem plasmidu. Roztok plasmidu

obsahoval v případě produkce galektinu-4 gen pro expresi galektinu-4 s N-terminální histidinovou kotvou, v případě podjednotek s linkerem gen pro expresi galektinu-4CL a galektinu-4NL s N-terminální histidinovou kotvou. Genové konstrukty pro expresi podjednotek byly připraveny Ing. Kristýnou Slámovou, Ph.D. z původního plasmidu obsahujícího gen pro Gal-4 pomocí metody PCR. N-terminální podjednotka byla identifikována jako aminokyseliny (aa) 1-150 v rámci původního genu kódující celý galektin-4, konstrukt pro expresi zahrnoval sekvenci dalších 10 aa zbytků z linkeru, který propojuje C-terminální doménu s N-terminální doménou na jejím C-konci. C-terminální podjednotka byla identifikována jako aminokyseliny (aa) 179-323 v rámci původního genu kódujícího celý galektin-4, konstrukt pro expresi zahrnoval sekvenci dalších 10 aa zbytků z linkeru který propojuje N-terminální doménu s C-terminální doménou na jejím N-konci [56].

Po rozmražení buněčné suspenze byl sterilně odebrán 1 ng DNA a přenesen do 100 μ l buněčné suspenze, obsah zkumavky byl jemně promíchán poklepáním. Tato směs byla inkubována 20 minut na ledu. Poté byla směs vložena do termomixéru na 75 sekund při 42 °C, což způsobilo tepelný šok. Následně byly buňky zchlazeny na ledu a regenerovány, do směsi byl přidán 1 ml LB média a směs byla inkubována při 37 °C v termomixéru při 300 ot./min. po dobu 1 hodiny. Po regeneraci byly buňky zakoncentrovány: směs byla centrifugována 10 sekund na 17 200 \times g v mikrocentrifuze, bylo odebráno 800 μ l vrchní části supernatantu, ve zbylém mediu byla resuspendována buněčná peleta. Nakonec bylo 50 μ l resuspendovaných buněk naneseno na připravenou Petriho misku a důkladně rozetřeno. Miska byla inkubována při 37 °C do druhého dne.

3.2.2. *Expese galektinu-4 a jeho podjednotek v E. coli*

Druhý den ráno byly připraveny čtyři 500 ml Erlenmayerovy baňky s 60 ml LB média a čtyři 3 l Erlenmayerovy baňky s 600 ml TB média a sterilizovány. Do každé baňky s LB médiem bylo přidáno 60 μ l kanamycinu (50 mg/ml) a 60 μ l chloramfenikolu (34 μ g/ml), dále byla postupně do každé baňky zaočkována právě jedna transformovaná kolonie a tyto prekultury byly následně inkubovány 15-17 hodin při 37°C a 220 ot./min.

Třetí den bylo sterilně přidáno 600 μ l kanamycinu (50 mg/ml) a 600 μ l chloramfenikolu (34 μ g/ml) do baněk s TB médiem a postupně byla do každé baňky přelita jedna prekultura. Hlavní kultura byla opět inkubována při 37 °C a 110 ot./min., dokud optická densita kultury nenabyla při 600 nm hodnoty mezi 0,6 a 0,8. Poté byla indukována exprese galektinů přidáním 660 μ l IPTG (0,5 mol/l) do každé baňky. Kultury *E. coli* byly inkubovány při 37 °C a 140 ot./min. po dobu 24 hodin.

Buněčné kultury byly centrifugovány při $4500 \times g$ a $8 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Buněčný pelet byl zvážen a zmražen na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Zmražení napomohlo lýzi buněk. Práce s buňkami pokračovala další den, kdy byla buněčná peleta resuspendována ve 20 ml vychlazeného ekvilibračního pufru. Do falkony bylo přidáno 200 μl PMSF k inhibici proteas. Resuspendovaný pelet byl sonikován šesti cykly po 1 minutě s 2minutovou pauzou s 52% amplitudou. Mezi každým cyklem byla buněčná směs promíchána. Po sonikaci byl buněčný lyzát centrifugován při $15\,000 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Supernatant byl doplněn na 50 ml a filtrován přes 0,8 μm filtr, než byl v dalším kroku nanesen na kolonu.

3.2.3. Purifikace galektinu-4 a jeho podjednotek afinitní chromatografií

Purifikace galektinu-4 a jeho podjednotek nesoucích histidinovou kotvu probíhala pomocí metalochelatační chromatografie na koloně HisTrap obsahující navázané nikelnaté ionty na bázi Sepharosy.

Po připojení kolony byla kolona promyta nejprve 150 ml filtrované ultračisté vody a následně 150 ml ekvilibračního pufru ($5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Po promytí kolony byl nanesen přefiltrovaný lyzát obsahující galektin-4 ($1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) a kolona byla promyta 150 ml ekvilibračního pufru ($3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), čímž byly vymyty všechny nespecificky vázané proteiny.

Eluce probíhala formou gradientu a to 120 minut od 0 do 100 % elučního pufru při rychlosti $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ u celého galektinu-4. U Gal-4NL a Gal-4CL byl nastaven stejný gradient jako u Gal-4 pouze do 45 % elučního pufru. Od 45 % byl nastaven nový gradient a to od 45 do 100% elučního pufru za 25 minut rychlostí $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Frakce byly sbírány do mikrozkušavek (2 ml). Průběh eluce byl analyzován pomocí UV detektoru při 280 nm. Frakce, které absorbovaly při 280 nm, byly poté analyzovány pomocí SDS elektroforézy (stejný postup jako v 3.2.4.). Frakce, ve kterých byl požadovaný galektin zřetelně vidět na SDS, byly spojeny, čímž byla zajištěna maximální čistota získaných galektinů. Takto spojené frakce byly dialyzovány 17 hodin v 7 litrech dialyzačního pufru EPBS a poté 6 hodin v 7 litrech dialyzačního PBS pufru. Po dialýze byly roztoky proteinů přefiltrovány přes 0,22 μm filtr.

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Bradfordova činidla. Principem této metody je interakce barviva *Coomassie Brilliant Blue G-250* s aminokyselinami proteinu (nejvíce Arg, His, Lys a Tyr), přičemž se mění barva roztoku z hnědé na modrou [67]. Měření probíhalo následovně: ke 100 μl vhodně naředěného roztoku proteinu byl přidán 1 ml Bradfordova činidla. Tato směs byla promíchána a inkubována po dobu 15 minut při pokojové

teplotě. Následně byla změřena absorbance při 595 nm. Kalibrace Bradfordova činidla byla provedena pomocí hovězího sérového albuminu (BSA, z angl. *bovine serum albumin*), kalibraci prováděl jiný pracovník laboratoře. Koncentrace proteinů byla vypočtena pomocí vzorce kalibrační přímky závislosti absorbance vzorku při 595 nm na koncentraci BSA. Roztoky proteinů byly skladovány byly při 4°C.

3.2.4. Ověření čistoty galektinu-4 a jeho podjednotek

Čistota galektinu-4 a jeho podjednotek byla stanovena pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, z angl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS-PAGE slouží k separaci proteinů na základně jejich molekulové hmotnosti. Záporně nabitě proteiny migrují ke kladné elektrodě (anodě). Proteiny s menší molekulovou hmotností migrují rychleji (putují větší vzdálenost na gelu) než proteiny s větší molekulovou hmotností. Po následné vizualizaci separovaných proteinů je možné určit molekulovou hmotnost vzorků srovnáním se směsí standardů o známé molekulové hmotnosti. Zesíťování gelu zajišťuje *N,N'*-methylenbisakrylamid (BIS, bisakrylamid), jehož koncentrace se volí podle velikosti proteinů, nízká koncentrace je vhodná pro separaci proteinů o velké molekulové hmotnosti, zatímco vysoká koncentrace je vhodná pro separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti [68].

Separační gel (12%) byl nalit mezi sklička očištěná ethanolem upevněná v aparatuře, poté byl převrstven až po okraj sklíček destilovanou vodou a ponechán ztuhnout v termostatu při 35 °C. Po zatuhnutí separačního gelu byla destilovaná voda slita a na ztuhlý separační gel byl nalit 5% zaostřovací gel a do něj vložen hřebínek. Zaostřovací gel byl ponechán ztuhnout při laboratorní teplotě. Díky nižšímu pH zaostřovacího gelu je glycin kladně nabitý, a tlačí tak na molekuly proteinu v dráze gelu. Všechny molekuly proteinu tak mají stejnou výchozí pozici na startu [68].

Prvním krokem je denaturace vzorku proteinu, včetně odstranění disulfidových můstků, které zajišťuje dithiotreitol (DTT), a jejich obalení molekulami dodecylsírany sodného (SDS), které jim udělí záporný náboj [68]. Vzorky byly připraveny smícháním proteinu se vzorkovým pufrům v poměru 1 : 4, byly vloženy do termomixéru, kde byly inkubovány 5 minut při 99 °C a 350 otáčkách za minutu. Vzorky byly centrifugovány při 5500 × g po dobu 30 sekund a teplotě 25°C. Vzorky a nízkomolekulový proteinový standard (angl. *low molecular weight*, LMW)

byly nanášeny do drah gelu, do aparatury byl nalit elektrodový pufr a aparatura byla připojena ke zdroji napětí. Separace probíhala při napětí 130 V.

3.3. Stanovení afinity sacharidových ligandů pomocí kompetitivní metody ELISA

Mikrotitrační destička s 96 jamkami byla připravena den před experimentem. Na destičku bylo nanášeno multikanálovou pipetou 50 μl (20 $\mu\text{mol/l}$) roztoku glykoproteinu asialofetuinu (ASF) do každé jamky, destička byla přikryta plastovým krytem a ponechána inkubovat při laboratorní teplotě do dalšího dne. Druhý den byla destička třikrát promyta 250 μl roztoku PBS Tween, čímž byl odstraněn nenavázaný ASF. Zbytek tekutiny v jamkách byl vyklepán do buničiny. Do každé jamky bylo napipetováno 250 μl blokovacího roztoku a destička byla ponechána inkubovat po dobu jedné hodiny. Blokovací roztok znemožnil nespecifické navázání dalších proteinů v jamce mikrotitrační destičky. Po jedné hodině byla destička znovu třikrát promyta 250 μl roztokem PBS Tween. Následně byly nanášeny předem připravené vzorky. V případě kompetitivní metody ELISA bylo nejprve pipetováno 25 μl roztoků inhibitorů o různé koncentraci a poté 25 μl galektinu-4 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). V případě přímé metody ELISA byl napipetován pouze Gal-4, Gal-4NL nebo Gal-4CL a to 50 μl v rostoucí koncentraci. Destička s nanášenými vzorky byla přikryta a inkubována po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě. Po dvou hodinách byla destička znovu třikrát promyta 250 μl roztokem PBS Tween. Na destičku bylo nanášeno do každé jamky 50 μl myší protilátky, čímž byl označen navázaný galektin-4 nebo jeho podjednotky vazbou protilátky na histidinovou kotvu. Destička byla ponechána inkubovat po dobu jedné hodiny. Destička byla naposledy třikrát promyta 250 μl roztoku PBS Tween a odnesena do temné místnosti pro nanášení 50 μl fotosensitivního substrátu TMB One do každé jamky. Substrát reagoval s peroxidasou a vytvořilo se modré zbarvení. Reakce byla ukončena nanášením 50 μl 3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl do každé jamky, což zapříčinilo žluté zbarvení. Byla měřena absorbance barevného produktu reakce na přístroji Magellan Sunrise při 450 nm. Maximální naměřená absorbance nepřesáhla hodnotu 1,000. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny nelineární regresí pomocí programu GraphPad Prism, kde byla vynášena závislost absorbance na logaritmu koncentrace testovaných ligandů, a tím byla získána hodnota IC_{50} jako koncentrace ligandu, při níž je dosaženo 50% maximální inhibice vazby galektinu na imobilizovaný ligand.

4. Výsledky

4.1. *Produkce a purifikace galektinu-4 a jeho podjednotek v E. coli*

Pro produkci galektinových konstruktů obsahujících N-terminální histidinovou kotvu (Gal-4, Gal-4NL, Gal-4CL) byly využity bakteriální buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3), které byly transformovány příslušným plasmidem. Obě podjednotky Gal-4 (N-terminální i C-terminální) obsahovaly navíc 10-aminokyselinový linker na svých příslušných koncích (tento linker označuje písmeno L v použité zkratce), který v nativním proteinu propojuje obě podjednotky. Přítomnost linkeru se ukázala být nezbytnou pro zachování lektinové aktivity obou galektinových podjednotek [56].

Kultivace transformovaných buněk proběhla nejprve přes noc v LB médiu, poté byla tato noční prekultura naočkována do TB média. Následně byla hlavní kultura kultivována po dobu 2 hodin pro dosažení dostatečné optické density a byla provedena indukce exprese proteinu pomocí IPTG. Po rozbití buněk sonikací následovala purifikace galektinů afinitní chromatografií na nosiči s imobilizovanými nikelnatými ionty (viz kapitola 3.2.3.). Bylo nutné provést eluci pomocí gradientu, aby bylo dosaženo maximální čistoty proteinů. Zároveň jsme tím dosáhli minimálního nutného množství imidazolu v roztocích proteinů, což nám usnadnilo následnou dialýzu, která měla za cíl imidazol odstranit. Eluce probíhala formou gradientu a to 120 minut od 0 do 100 % elučního pufru při rychlosti $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ u celého galektinu-4. U Gal-4NL a Gal-4CL byl nastaven stejný gradient jako u Gal-4 (120 minut od 0 do 100% elučního pufru při rychlosti $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), který probíhal pouze do hodnoty 45 % elučního pufru. V této části gradientu se nejlépe vymyly nechtěné proteiny. Pro eluci čistého proteinu byl následně nastaven nový gradient, a to od 45 do 100% elučního pufru (25 minut) rychlostí $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Tahle změna byla nutná, aby došlo k eluci co nejkonzentrovanejších Gal-4CL a Gal-4NL, abych se vyhla jejich zakoncentrování centrifugací a dosáhla vysokých koncentrací pro stanovení zdánlivé disociační konstanty K_D metodou ELISA. Jednotlivé galektiny se uvolňovaly v podobném podílu elučního pufru: Gal-4 v rozmezí přibližně 40-80 %, Gal-4NL 55-75 % a Gal-4CL 50-80 % gradientu. Dále byla provedena dialýza k odstranění imidazolu použitého při eluci galektinu z kolony a sterilní filtrace získaných galektinů. Sterilní roztoky galektinů byly poté skladovány při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$, přičemž celý Gal-4 vydržel stabilní a aktivní až 3 týdny, zatímco podjednotky Gal-4NL a Gal-4CL vydržely stabilní a aktivní pouze 1 týden. Výtěžky produkce jednotlivých podjednotek galektinu-4, vyjádřené jako mg proteinu získaného z jednoho gramu buněk *E. coli*, byly přibližně poloviční oproti výtěžkům získaným

pro celý konstrukt Gal-4. Tento fakt naznačuje, že molární výtěžky těchto proteinů byly velmi podobné [56].

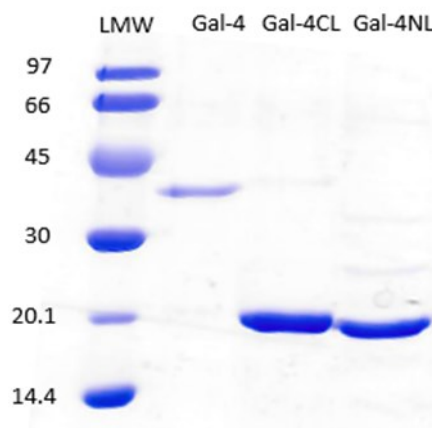
Výsledkem produkce a purifikace byly tři proteiny: Gal-4, Gal-4NL a Gal-4CL. Výtěžky produkce a purifikace galektinů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Výtěžky produkce a purifikace galektinů [56].

Galektin	Množství buněk na 1 l média [g·l⁻¹]	Množství proteinu na 1 g buněk [mg·g⁻¹]
Gal-4	1,8	4,2
Gal-4NL	2,2	2,1
Gal-4CL	3,1	2,4

4.2. *Ověření čistoty galektinu-4 a jeho podjednotek*

Čistota produkovaných galektinů Gal-4 a jeho podjednotek Gal-4NL a Gal-4CL byla ověřena prostřednictvím SDS elektroforézy (viz kapitola 3.2.4.). Na gel byly naneseny vzorky finálních proteinů po dialýze. Molekulová hmotnost byla porovnána s hmotnostním standardem obsahujícím nízkomolekulární proteiny (LMW, z angl. *low molecular weight*) (viz obrázek 8). Z gelu je patrné, že vyprodukované galektiny dosahují poměrně vysoké čistoty (odhadem cca 95%), která odpovídá tabelovaným velikostem (Gal-4 35,9 kDa; Gal-4NL 17,9 kDa, Gal-4CL 17,1 kDa).



Obrázek 8. 12% SDS-PAGE gel zobrazující čistotu produkovaných rekombinantních galektinů [56]. Zleva: 1. LWM; 2. Gal-4 (35,9 kDa); 3. Gal-4CL (17,1 kDa); 4. Gal-4NL (17,9 kDa).

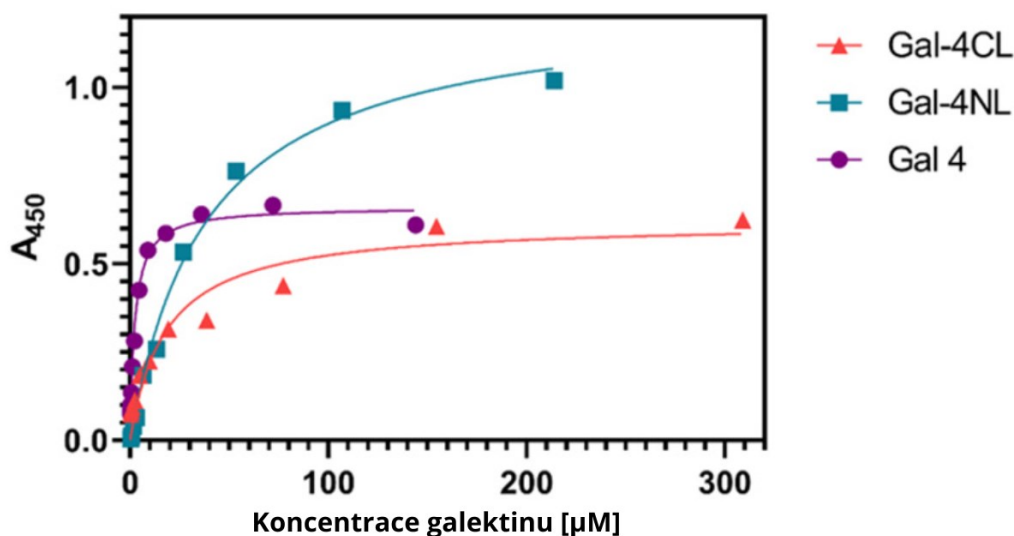
4.3. Vazebná afinita galektinu-4 a jeho podjednotek k asialofetuinu

Jako první byla zkoumána přímá vazba Gal-4, Gal-4CL a Gal-4NL na glykoprotein asialofetuin (ASF). Nejprve byl asialofetuin imobilizován prostřednictvím hydrofobní interakce v jamkách mikrotitrační destičky. Vazba galektinů na asialofetuin byla kvantifikována kolorimetrickou imunodetekcí s použitím křenové peroxidázy konjugované s protilátkou pomocí histidinové kotvy. Křenová peroxidáza katalyzovala přeměnu fotosenzitivního substrátu TMB One na modrý produkt. Enzymová reakce byla zastavena přidáním $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl za vzniku žlutého produktu, který byl spektrofotometricky měřen při 450 nm. Zdánlivé disociační konstanty (K_D) byly vypočteny z nelineární regrese vazebných křivek v programu GraphPad Prism (obrázek 9).

Zdánlivé disociační konstanty celého Gal-4 a jeho podjednotek Gal-4CL a Gal-4NL vykazovaly značné rozdíly. Podjednotky Gal-4CL a Gal-4NL vykazovaly hodnoty K_D přibližně o jeden řád vyšší, tedy mnohem nižší afinitu k imobilizovanému asialofetuinu (ASF) (viz tabulka 3) než galektin-4 [56]. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem minimálně ze tří měření.

Tabulka 3. Zdánlivé disociační konstanty (K_D) celého Gal-4 a jeho podjednotek Gal-4NL a Gal-4CL k ASF [56].

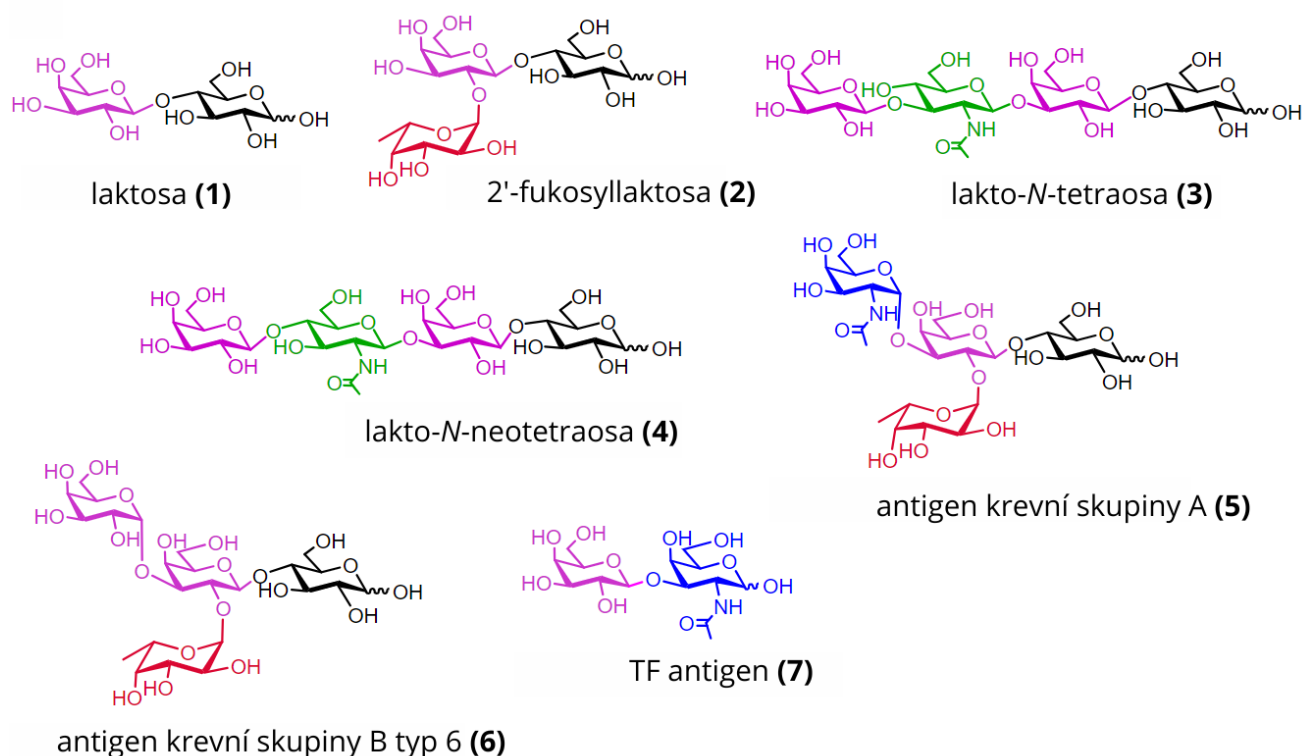
Galektin	Zdánlivá disociační konstanta K_D [μM]
Gal-4	$3,3 \pm 1,1$
Gal-4NL	38 ± 3
Gal-4CL	19 ± 2



Obrázek 9. Graf závislosti absorpance při 450 nm na koncentraci přidávaného galektinu v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [56].

4.4. Vazebná afinita ligandů ke galektinu-4

Byla zkoumána vazebná afinita vybraných sacharidových ligandů k připraveným galektinovým konstruktům Gal-4, Gal-4CL a Gal-4NL pomocí kompetitivní metody ELISA (z angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Bylo vybráno celkem sedm ligandů, u kterých byla měřena afinita ke galektinu-4, jejichž struktury jsou vyobrazeny na obrázku číslo 10.



Obrázek 10. Struktura ligandů, u kterých byla měřena afinita ke galektinu-4. (1) laktosa (Gal β Glc; β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), (2) 2-fukosyllaktosa (Fuc α 2Gal β 4Glc; α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), (3) lakto-*N*-tetraosa (Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc; β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), (4) lakto-*N*-neotetraosa (Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc; β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), (5) antigen krevní skupiny A (GalNAc α 3[Fuca2]Gal β 4Glc; α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)]- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), (6) antigen krevní skupiny B (Gala3[Fuca2]Gal β 4Glc; β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)]- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), (7) TF antigen (Gal β 3GalNAc; β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc). Fialově je vyznačena Gal (β -D-galaktopyranosyl), modře GalNAc (*N*-acetyl- β -D-glukosamin), černě Glc (D-glukopyranosa), červeně fukosa (6-deoxy- α -L-galaktopyranosyl).

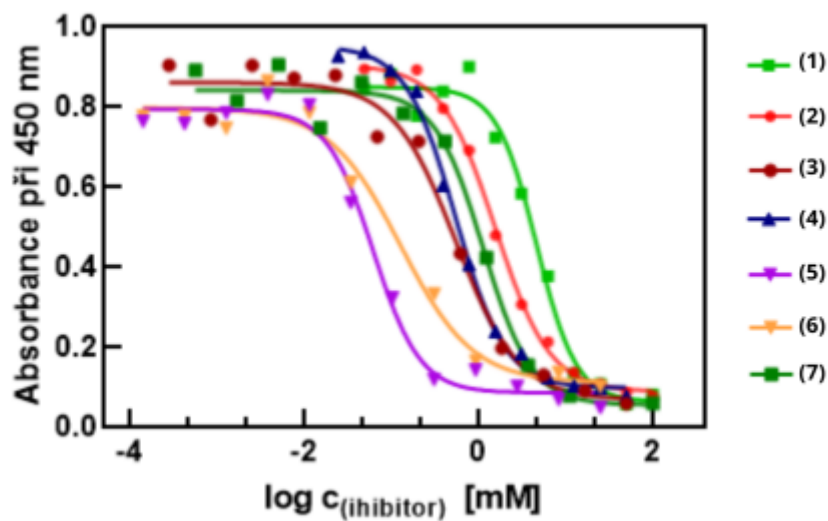
Ligandy 1-6 byly získány komerčně, zatímco TF antigen (7) byl připraven Mgr. Jakubem Červeným enzymovou syntézou. V jednom kroku pomocí rekombinantního enzymu β -galaktosidázy BgaC z *Bacillus circulans* byla galaktosa přenesena z donoru (*p*NP-Gal) na akceptor (GalNAc) [56].

Vazebná afinita představuje schopnost ligandu inhibovat vazbu galektinu k asialofetuinu (ASF), který je imobilizován na dně jamky mikrotitrační destičky. Stanovením vazebné afinity získáme hodnotu IC₅₀, tedy koncentraci ligandu, při které je dosaženo 50% inhibice vazby galektinu na imobilizovaný standardní ligand asialofetuin (ASF). Galektin, který není inhibován a naváže se na ASF, je stanovován pomocí komerční protilátky konjugované

s peroxidázou (HRP, z angl. *horseradish peroxidase*), která se substrátem TMB One vytvoří modrý produkt, reakce je potom ukončena pomocí $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl. Výsledné žluté zabarvení bylo detekováno pomocí spektrofotometru Sunrise Tecan měřením absorbance při 450 nm. Měření proběhlo ve třech nezávislých stanoveních ze tří různých produkcí galektinu-4. Získaná data byla vypočtena metodou nelineární regrese v programu GraphPad Prism. Nejvyšší vazebná afinita, tzn. nejnižší hodnota IC_{50} , byla naměřena u antigenů krevních skupin, kdy antigen krevní skupiny A měl vyšší afinitu ke galektinu-4 než antigen krevní skupiny B (Tabulka 4, obr. 12).

Tabulka 4. Stanovené hodnoty IC_{50} vybraných ligandů ke galektinu-4 [56].

	Ligand	IC_{50} [mM]
(1)	laktosa	$2,5 \pm 0,2$
(2)	2'-fukosyllaktosa	$1,5 \pm 0,2$
(3)	lakto- <i>N</i> -tetraosa	$0,43 \pm 0,07$
(4)	lakto- <i>N</i> -neotetraosa	$0,6 \pm 0,1$
(5)	antigen krevní skupiny A	$0,05 \pm 0,02$
(6)	antigen krevní skupiny B	$0,08 \pm 0,03$
(7)	TF antigen	$1,18 \pm 0,05$



Obrázek 12. Graf závislosti absorbance při 450 nm na dekadickému logaritmu koncentrace inhibitoru. (1) laktosa, (2) 2'-fukosyllaktosa, (3) lakto-*N*-tetraosa, (4) lakto-*N*-neotetraosa, (5) antigen krevní skupiny A, (6) antigen krevní skupiny B, (7) TF antigen.

5. Diskuze

Tato práce je součástí většího projektu, jehož výsledky byly v roce 2023 publikovány v časopise *Molecules* [56]. Na této publikaci jsem spoluautorkou – viz příloha 1.

Galektin-4 se řadí mezi galektiny, skupinu proteinů známých pro svou afinitu k β -galaktosidům. Galektiny hrají důležitou roli ve velkém množství biologických procesů a jsou zapojeny do patogeneze mnoha onemocnění. Galektin-4 je primárně exprimován v gastrointestinálním traktu a bylo prokázáno, že v této tkáni hraje několik fyziologických rolí. Účastní se apikálního transportu v epiteliálních buňkách nebo podporuje hojení epiteliálních ran střeva, je také součástí adaptivní imunitní odpovědi a má svou úlohu i v centrálním nervovém systému. Studium inhibitorů galektinu-4 můžeme tak lépe porozumět specifickým rolím, které galektin-4 hraje v těchto procesech, a identifikovat tak cíle pro potenciální terapii.

Cílem této práce bylo heterologně exprimovat lidský galektin-4 v bakterii *Escherichia coli* a následně jej purifikovat pomocí afinitní chromatografie. Dále jsem se zaměřili na optimalizaci imunochemického stanovení ELISA, které slouží k měření vazebné afinity galektinu-4 k různým sacharidovým ligandům. Podařilo se exprimovat i jednotlivé podjednotky tandemového galektinu-4: N-terminální podjednotku a C-terminální podjednotku. Genové konstrukty podjednotek byly navrženy a připraveny Ing. Kristýnou Slámovou, Ph.D. a obsahovaly 10 aa linker na příslušných koncích, bez kterého podjednotky nebyly aktivní, nevázaly se na imobilizovaný ASF při přímé metodě ELISA. Z této informace můžeme usuzovat, že je linker stěžejní pro správné sbalení podjednotek a hraje významnou roli při jejich stabilizaci. Stanovili jsme jejich zdánlivé disociační konstantu K_D pomocí přímé imunologické metody ELISA, kdy se ukázalo, že K_D podjednotek je řádově vyšší než K_D celého galektinu-4: $K_D(\text{Gal-4NL}) = 38 \pm 3 \mu\text{M}$, $K_D(\text{Gal-4CL}) = 19 \pm 2 \mu\text{M}$, $K_D(\text{Gal-4}) = 3,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$. Disociační konstanta Gal-4 s ASF (viz tabulka 3.) vykazovala hodnoty K_D srovnatelné s hodnotami prototypického Gal-1 (4,4 μM) a chimerního Gal-3 (3,2 μM) stanovenými stejnou metodou. Naproti tomu K_D tandemových galektinů Gal-8 (0,37 μM) a Gal-9 (0,30 μM) byly ve stejné studii nižší než K_D našeho tandemového Gal-4 (3,3 \pm 1,1 μM) [69]. To vypovídá o zhoršené lektinové aktivitě samostatných podjednotek v porovnání s celým galektinem, což není překvapivé vzhledem k tomu, že podjednotky se v biologických systémech samostatně nevyskytují.

V této práci jsme využili snadno implementovatelnou a reprodukovatelnou kompetitivní metodu ELISA ke stanovení vazebné afinity neboli inhibiční schopnosti ligandů. Bylo vybráno

sedm sacharidů: laktosa, 2'-fukosyllaktosa, lakto-*N*-tetraosa, lakto-*N*-neotetraosa, antigen krevní skupiny A, antigen krevní skupiny B a TF antigen.

Galektin-4 patří mezi tandemové galektiny společně s galektinem-6, -8, -9 a -12. Ve studii Müllerová, Bojarová et al. 2023 *Biomacromolecules* byla použita stejná metoda jako v naší práci, kompetitivní metoda ELISA ke stanovení IC₅₀, což nám dovoluje věrohodné srovnání výsledků. Podle této studie mají tandemové galektiny-8 a -9 vyšší afinitu k laktose než se nám podařilo naměřit u galektinu-4. Nejvyšší afinitu k laktose jevil Gal-9 (1,35 ± 0,44 mM) poté Gal-8 (1,68 ± 0,42 mM) a nejnižší Gal-4 (2,5 ± 0,2 mM). V této studii byla změřena i afinita prototypického Gal-1 a chimerního Gal-3 k laktose. Jako nejefektivnější inhibitor laktózy se ukázal být Gal-3 (0,116 ± 0,026 mM), s mírně vyšší afinitou než Gal-1 (0,310 ± 0,038 mM). Nižší afinita tandemových galektinů k laktose by mohla být zapříčiněna přítomností dvou podjednotek, pokud jedna z nich má výrazně nižší aktivitu k laktose [69].

Nejvyšší vazebnou afinitu, tzn. nejnižší hodnotu IC₅₀, jsme naměřili u antigenů krevních skupin, kdy antigen krevní skupiny A byl lepším inhibitorem galektinu-4 než antigen krevní skupiny B, přestože jako terminální cukernou jednotku obsahuje *N*-acetylgalaktosamin místo obvyklé galaktosy. Získané výsledky měření bylo možné seřadit takto od nejvyšší afinity ke galektinu-4 po nejnižší: antigen krevní skupiny A > antigen krevní skupiny B > lakto-*N*-tetraosa > lakto-*N*-neotetraosa > 2'-fukosyllaktosa > TF antigen > laktosa. Ve studiích Khuchtumur Bum-Erdene et al. byla namísto kompetitivní metody ELISA využita metoda fluorescenční anizotropie. Podobný trend byl naměřen pro Gal-4C, jako lepší inhibitor ovšem vyšla lakto-*N*-neotetraosa: antigen krevní skupiny A (0,075 mM) > lakto-*N*-neotetraosa (0,270 mM) > lakto-*N*-tetraosa (0,510 mM) > 2'-fukosyllaktosa (0,580 mM) > laktosa (1,9 mM). A z údajů pro Gal-4N: antigen krevní skupiny A (0,164 mM), 2'-fukosyllaktosa (0,380 mM), laktosa (1,9 mM). Pro Gal-4N byl naměřen stejný trend, ale pro méně ligandů: antigen krevní skupiny A (0,164 mM) > 2'-fukosyllaktosa (0,380 mM) > laktosa (1,9 mM). [32,35]. Že je lepším inhibitorem lakto-*N*-tetraosa než lakto-*N*-neotetraosa vyhodnotili také např. ve studii Vokhmyanina et al., kdy použili k naměření afinit prútokovou cytometrii [33].

Ve studii K. Slámová et al. *Molecules* (2023), navazující na tuto práci, byla doměřena vazebná afinita stejné série ligandů i k jednotlivým podjednotkám, které se podařilo exprimovat v rámci této bakalářské práce. Pro jednotlivé podjednotky byl naměřen velmi podobný trend jako pro celý galektin-4. Nejlepšími inhibitory byly jednoznačně antigeny krevních skupin, kdy lepším inhibitorem byl antigen krevní skupiny A. I u podjednotek měla lakto-*N*-tetraosa lepší inhibiční schopnost než lakto-*N*-neotetraosa. Největší rozdíl v trendu by mohl být, že u Gal-

4NL byla nejmenší naměřená vazebná afinita u TF antigenu, zatímco u celého galektinu-4 a Gal-4CL byla nejmenší afinita stanovena u laktosy. Afinita Gal-4NL k TF antigenu byla o 21 % nižší než k laktose, kdežto u Gal-4CL byla afinita o 33 % vyšší k TF antigenu než k laktose. Největší rozdíl mezi afinitou k TF antigenu a k laktose byl naměřen u Gal-4, kdy afinita k TF antigenu byla o 53 % vyšší než k laktose.

Studie K. Slámová et al. *Molecules* (2023), navíc obsahuje naměřená data vazebných afinit galektinu-4 i jeho podjednotek k multivalentnímu syntetickému ligandu. Studovaný neo-glykoprotein s navázanými laktosyly měl vazebnou afinitu o dva řády vyšší než monovalentní antigen krevní skupiny A jak u galektinu-4 tak jeho podjednotek: IC_{50} neo-glykoproteinu naměřené pro Gal-4 ($0,19 \pm 0,02 \mu\text{M}$), Gal-4NL ($0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$) a Gal-4CL ($1,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$), IC_{50} antigenu krevní skupiny A pro Gal-4 ($50 \pm 20 \mu\text{M}$), Gal-4NL ($22 \pm 1 \mu\text{M}$), Gal-4CL ($27 \pm 5 \mu\text{M}$). Zde bylo značné zvýšení avidity připsáno právě multivalentnímu efektu. Na základě velmi vysoké afinity neo-glykoproteinu ke galektinu-4 a jeho podjednotkám oproti ostatním sacharidům měřeným v této práci se lze domnívat, že multivalentní ligandy jsou velmi slibné jako nástroje pro biomedicínský výzkum galektinu-4.

6. Závěr

Tato práce si kladla za cíl provést rekombinantní expresi lidského galektinu-4 v bakterii *Escherichia coli*. Po úspěšné expresi byl protein purifikován pomocí afinitní chromatografie. Dalším krokem byla optimalizace imunochemického stanovení metodou ELISA s cílem dosáhnout optimálních podmínek pro stanovení afinity galektinu-4 k různým sacharidovým ligandům. Následně byla provedena daná měření vazebné afinity galektinu-4 k vybraným sacharidovým ligandům. Tato fáze výzkumu umožnila získat kvantitativní informace o síle vazby mezi galektinem-4 a specifickými sacharidovými ligandy. V závěrečné části práce byly získané výsledky detailně diskutovány. Celkovým cílem této práce bylo získat konkrétní informace o interakcích galektinu-4 s vybranými sacharidovými strukturami, což bylo splněno.

7. Zdroje

1. Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B. (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem.* **113**, 236–47.
2. Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **269**, 20807–10.
3. Lobsanov, Y.D., Gitt, M.A., Leffler, H., Barondes, S.H., Rini, J.M. (1993) X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **268**, 27034–38.
4. Barondes, S., Castronovo, V., Cooper, D., Cummings, R., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., Leffler, H., Liu, F., Lotan, R., Mercurio, A., Monsigny, M., Pillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P., Rini, J., Wang, J. (1994) Galectins - a Family of Animal Beta-Galactoside-Binding Lectins. *Cell* **76**, 597–98.
5. Cooper, D.N.W., Barondes, S.H. (1999) God must love galectins; He made so many of them. *Glycobiology* **9**, 979–84.
6. Bertuzzi, S., Quintana, J., Arda, A., Gimeno, A., Jimenez-Barbero, J. (2020) Targeting Galectins With Glycomimetics. *Front. Chem.* **8**, 593.
7. Hughes, R.C. (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **1473**, 172–85.
8. Hirabayashi, J., Kasai, K. (1993) The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* **3**, 297–304.
9. Johannes, L., Jacob, R., Leffler, H. (2018) Galectins at a glance. *J. Cell Sci.* **131**, jcs208884.
10. Römer, C.E., Elling, L. (2011) in *Biomaterials - Physics and Chemistry* (IntechOpen).

11. Cooper, D.N.W. (2002) Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1572**, 209–31.
12. Diehl-Seifert, B., Uhlenbruck, G., Geisert, M., Zahn, R.K., Müller, W.E.G. (1985) Physicochemical and functional characterization of the polymerization process of the *Geodia cydonium* lectin. *Eur. J. Biochem.* **147**, 517–23.
13. Gitt, M.A., Wisner, M.F., Leffler, H., Herrmann, J., Xia, Y.-R., Massa, S.M., Cooper, D.N.W., Lusic, A.J., Barondes, S.H. (1995) Sequence and Mapping of Galectin-5, a β -Galactoside-binding Lectin, Found in Rat Erythrocytes (*). *J. Biol. Chem.* **270**, 5032–38.
14. Storti, P., Marchica, V., Giuliani, N. (2017) Role of Galectins in Multiple Myeloma. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2740.
15. Hara, A., Niwa, M., Noguchi, K., Kanayama, T., Niwa, A., Matsuo, M., Hatano, Y., Tomita, H. (2020) Galectin-3 as a Next-Generation Biomarker for Detecting Early Stage of Various Diseases. *Biomolecules* **10**, 389.
16. Dings, R.P.M., Miller, M.C., Griffin, R.J., Mayo, K.H. (2018) Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 905.
17. Cummings, R.D., Liu, F.-T., Vasta, G.R. (2015) in *Essentials of Glycobiology*, Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY)). 3rd Vyd.
18. Blaser, C., Kaufmann, M., Müller, C., Zimmermann, C., Wells, V., Mallucci, L., Pircher, H. (1998) Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2311–19.
19. Hernandez, J.D., Baum, L.G. (2002) Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology* **12**, 127R-36R.

20. Yang, R.Y., Hsu, D.K., Liu, F.T. (1996) Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6737–42.
21. St-Pierre, C., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Sato, S. (2010) in *Methods in Enzymology* (Elsevier), s 267–94.
22. Zhang, P.-F., Li, K.-S., Shen, Y.-H., Gao, P.-T., Dong, Z.-R., Cai, J.-B., Zhang, C., Huang, X.-Y., Tian, M.-X., Hu, Z.-Q., Gao, D.-M., Fan, J., Ke, A.-W., Shi, G.-M. (2016) Galectin-1 induces hepatocellular carcinoma EMT and sorafenib resistance by activating FAK/PI3K/AKT signaling. *Cell Death Dis.* **7**, e2201.
23. Wdowiak, K., Francuz, T., Gallego-Colon, E., Ruiz-Agamez, N., Kubeczko, M., Grochola, I., Wojnar, J. (2018) Galectin Targeted Therapy in Oncology: Current Knowledge and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 210.
24. Yang, R.-Y., Rabinovich, G., Liu, F.-T. (2008) Galectins: Structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, e17.
25. St-Pierre, C., Manya, H., Ouellet, M., Clark, G.F., Endo, T., Tremblay, M.J., Sato, S. (2011) Host-soluble galectin-1 promotes HIV-1 replication through a direct interaction with glycans of viral gp120 and host CD4. *J. Virol.* **85**, 11742–51.
26. Sato, S., Ouellet, M., St-Pierre, C., Tremblay, M.J. (2012) Glycans, galectins, and HIV-1 infection: Galectins and HIV-1 infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1253**, 133–48.
27. St-Pierre, C., Ouellet, M., Giguère, D., Ohtake, R., Roy, R., Sato, S., Tremblay, M.J. (2012) Galectin-1-specific inhibitors as a new class of compounds to treat HIV-1 infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 154–62.
28. Trimboli, P., Virili, C., Romanelli, F., Crescenzi, A., Giovannella, L. (2017) Galectin-3 Performance in Histologic and Cytologic Assessment of Thyroid Nodules: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.

29. Song, L., Tang, J., Owusu, L., Sun, M.-Z., Wu, J., Zhang, J. (2014) Galectin-3 in cancer. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **431**, 185–91.
30. Cao, Z.-Q., Guo, X.-L. (2016) The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein Cell* **7**, 314–24.
31. Ideo, H., Seko, A., Yamashita, K. (2005) Galectin-4 Binds to Sulfated Glycosphingolipids and Carcinoembryonic Antigen in Patches on the Cell Surface of Human Colon Adenocarcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 4730–37.
32. Bum-Erdene, K., Leffler, H., Nilsson, U.J., Blanchard, H. (2015) Structural characterization of human galectin-4 C-terminal domain: elucidating the molecular basis for recognition of glycosphingolipids, sulfated saccharides and blood group antigens. *FEBS J.* **282**, 3348–67.
33. Vokhmyanina, O.A., Rapoport, E.M., André, S., Severov, V.V., Ryzhov, I., Pazynina, G.V., Korchagina, E., Gabius, H.-J., Bovin, N.V. (2012) Comparative study of the glycan specificities of cell-bound human tandem-repeat-type galectin-4, -8 and -9. *Glycobiology* **22**, 1207–17.
34. Ideo, H., Matsuzaka, T., Nonaka, T., Seko, A., Yamashita, K. (2011) Galectin-8-N-domain recognition mechanism for sialylated and sulfated glycans. *J. Biol. Chem.* **286**, 11346–55.
35. Bum-Erdene, K., Leffler, H., Nilsson, U.J., Blanchard, H. (2016) Structural characterisation of human galectin-4 N-terminal carbohydrate recognition domain in complex with glycerol, lactose, 3'-sulfo-lactose and 2'-fucosyllactose. *Sci. Rep.* **6**, 20289.
36. Ideo, H., Seko, A., Yamashita, K. (2007) Recognition mechanism of galectin-4 for cholesterol 3-sulfate. *J. Biol. Chem.* **282**, 21081–89.
37. Stechly, L., Morelle, W., Dessein, A.-F., André, S., Grard, G., Trinel, D., Dejonghe, M.-J., Leteurtre, E., Drobecq, H., Trugnan, G., Gabius, H.J., Huet, G. (2009) Galectin-4-

- regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic Cph. Den.* **10**, 438–50.
38. Morelle, W., Stechly, L., André, S., Van Seuning, I., Porchet, N., Gabius, H.-J., Michalski, J.-C., Huet, G. (2009) Glycosylation pattern of brush border-associated glycoproteins in enterocyte-like cells: involvement of complex-type N-glycans in apical trafficking. *Biol. Chem.* **390**, 529–44.
39. Stowell, S.R., Arthur, C.M., Dias-Baruffi, M., Rodrigues, L.C., Gourdine, J.-P., Heimbürg-Molinari, J., Ju, T., Molinari, R.J., Rivera-Marrero, C., Xia, B., Smith, D.F., Cummings, R.D. (2010) Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nat. Med.* **16**, 295–301.
40. Velasco, S., Díez-Revuelta, N., Hernández-Iglesias, T., Kaltner, H., André, S., Gabius, H.-J., Abad-Rodríguez, J. (2013) Neuronal Galectin-4 is required for axon growth and for the organization of axonal membrane L1 delivery and clustering. *J. Neurochem.* **125**, 49–62.
41. Ledeen, R.W., Kopitz, J., Abad-Rodríguez, J., Gabius, H.-J. (2018) in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Gangliosides in Health and Disease., Schnaar, R.L., Lopez, P.H.H. (Academic Press), s 289–324.
42. Stancic, M., Slijepcevic, D., Nomden, A., Vos, M.J., de Jonge, J.C., Sikkema, A.H., Gabius, H.-J., Hoekstra, D., Baron, W. (2012) Galectin-4, a novel neuronal regulator of myelination. *Glia* **60**, 919–35.
43. Satelli, A., Rao, P.S., Thirumala, S., Rao, U.S. (2011) Galectin-4 functions as a tumor suppressor of human colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **129**, 799–809.
44. Kim, S.W., Park, K.C., Jeon, S.M., Ohn, T.B., Kim, T.I., Kim, W.H., Cheon, J.H. (2013) Abrogation of galectin-4 expression promotes tumorigenesis in colorectal cancer. *Cell. Oncol. Dordr.* **36**, 169–78.

45. The Causes Of Crohn's Disease URL: <https://www.crohnsandcolitis.com/crohns/causes> [Viděno duben 3, 2023].
46. What Is Crohn's Disease? URL: <https://www.crohnsandcolitis.com/crohns> [Viděno duben 3, 2023].
47. Barrow, H., Guo, X., Wandall, H.H., Pedersen, J.W., Fu, B., Zhao, Q., Chen, C., Rhodes, J.M., Yu, L.-G. (2011) Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 7035–46.
48. Conde-Rodríguez, I., Delgado-López, G., Armenta-Castro, E., Ramírez-Díaz, I., Anaya-Ruiz, M., Gutiérrez-Quiroz, C.T., Flores-Alonso, J.C., Reyes-Salinas, S., Vazquez-Zamora, V.J., Ceja-Utrera, F.J., López-Colombo, A., Reyes-Leyva, J., López-López, G., Vallejo-Ruiz, V. (2020) Evaluation of Serum Levels and Expression of Galectin-4 in Cervical Cancer. *BioMed Res. Int.* **2020**, e6756723.
49. Lu, Y., Zhang, M., Zhao, P., Jia, M., Liu, B., Jia, Q., Guo, J., Dou, L., Li, J. (2017) Modified citrus pectin inhibits galectin-3 function to reduce atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Mol. Med. Rep.* **16**, 647–53.
50. Wu, X., Wu, Y., Zheng, R., Tang, F., Qin, L., Lai, D., Zhang, L., Chen, L., Yan, B., Yang, H., Wang, Y., Li, F., Zhang, J., Wang, F., Wang, L., Cao, Y., Ma, M., Liu, Z., Chen, J., Huang, X., Wang, J., Jin, R., Wang, P., Sun, Q., Sha, W., Lyu, L., Moura-Alves, P., Dorhoi, A., Pei, G., Zhang, P., et al. (2021) Sensing of mycobacterial arabinogalactan by galectin-9 exacerbates mycobacterial infection. *EMBO Rep.* **22**, e51678.
51. Ho, J.E., Gao, W., Levy, D., Santhanakrishnan, R., Araki, T., Rosas, I.O., Hatabu, H., Latourelle, J.C., Nishino, M., Dupuis, J., Washko, G.R., O'Connor, G.T., Hunninghake, G.M. (2016) Galectin-3 Is Associated with Restrictive Lung Disease and Interstitial Lung Abnormalities. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 77–83.

52. Olověná molekula TD139 společnosti Galecto Biotech je bezpečná, dobře tolerovaná, s přímým zapojením cíle a účinky biomarkerů v klinické fázi Ib/IIa studie u pacientů s IPF – Galecto, Inc. (2017) URL: <https://galecto.com/galecto-biotechs-lead-molecule-td139-is-safe-well-tolerated-with-direct-target-engagement-and-biomarker-effects-in-a-clinical-phase-ibiia-trial-in-ipf-patients/> [Viděno březem 31, 2023].
53. Proprietary galectin inhibitors to treat disease URL: <https://galectintherapeutics.com/develop-proprietary-compounds/> [Viděno dubem 1, 2023].
54. Astorgues-Xerri, L., Riveiro, M.E., Tijeras-Raballand, A., Serova, M., Rabinovich, G.A., Bieche, I., Vidaud, M., de Gramont, A., Martinet, M., Cvitkovic, E., Faivre, S., Raymond, E. (2014) OTX008, a selective small-molecule inhibitor of galectin-1, downregulates cancer cell proliferation, invasion and tumour angiogenesis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **50**, 2463–77.
55. Heine, V., Dey, C., Bojarová, P., Křen, V., Elling, L. (2022) Methods of in vitro study of galectin-glycomaterial interaction. *Biotechnol. Adv.* **58**, 107928.
56. Slamova, K., Cervený, J., Meszaros, Z., Friede, T., Vrbata, D., Kren, V., Bojarova, P. (2023) Oligosaccharide Ligands of Galectin-4 and Its Subunits: Multivalency Scores Highly. *MOLECULES* **28**, 4039.
57. Bumba, L., Laaf, D., Spiwok, V., Elling, L., Křen, V., Bojarová, P. (2018) Poly-N-Acetyllactosamine Neo-Glycoproteins as Nanomolar Ligands of Human Galectin-3: Binding Kinetics and Modeling. *Int. J. Mol. Sci.* **19**.
58. SPR (Biacore) Assay Services URL: <https://www.giffordbioscience.com/spr-biacore-services/> [Viděno únorem 25, 2023].
59. Nguyen, H., Park, J., Kang, S., Kim, M. (2015) Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors* **15**, 10481–510.

60. Marchiori, M.F., Pires Souto, D.E., Oliveira Bortot, L., Francisco Pereira, J., Kubota, L.T., Cummings, R.D., Dias-Baruffi, M., Carvalho, I., Campo, V.L. (2015) Synthetic 1,2,3-triazole-linked glycoconjugates bind with high affinity to human galectin-3. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 3414–25.
61. Topor, C.-V., Puiu, M., Bala, C. (2023) Strategies for Surface Design in Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensing. *Biosensors* **13**, 465.
62. BLI Technology URL: <https://www.sartorius.com/en/applications/life-science-research/label-free-detection/bli-technology> [Viděno listopad 20, 2023].
63. Sörme, P., Kahl-Knutsson, B., Huflejt, M., Nilsson, U.J., Leffler, H. (2004) Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions. *Anal. Biochem.* **334**, 36–47.
64. Srivastava, V.K., Yadav, R. (2019) in *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, Misra, G. (Academic Press), s 125–37.
65. Singh, M.K., Singh, A. (2022) in *Characterization of Polymers and Fibres*, The Textile Institute Book Series., Singh, M.K., Singh, A. (Woodhead Publishing), s 321–39.
66. Maveyraud, L., Mourey, L. (2020) Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery. *Molecules* **25**, 1030.
67. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–54.
68. The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) | MBL Life Science -JAPAN- URL: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html> [Viděno říjen 22, 2022].
69. Müllerová, M., Hovorková, M., Závodná, T., Červenková Štátná, L., Krupková, A., Hamala, V., Nováková, K., Topinka, J., Bojarová, P., Strašák, T. (2023) Lactose-

Functionalized Carbosilane Glycodendrimers Are Highly Potent Multivalent Ligands for Galectin-9 Binding: Increased Glycan Affinity to Galectins Correlates with Aggregation Behavior. *Biomacromolecules* **24**, 4705–17.

8. Přílohy

Příloha 1: Studie K. Slámová et al. *Molecules* (2023)



Article

Oligosaccharide Ligands of Galectin-4 and Its Subunits: Multivalency Scores Highly

Kristýna Slámová ¹, Jakub Červený ^{1,2}, Zuzana Mészáros ^{1,3}, Tereza Friede ^{1,4}, David Vrbata ¹, Vladimír Křen ¹ and Pavla Bojarová ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Biotransformation, Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Viděfská 1083, 142 00 Prague 4, Czech Republic; slamova@biomed.cas.cz (K.S.); cervenjaku@seznam.cz (J.Č.); kren@biomed.cas.cz (V.K.); david.vrbata@biomed.cas.cz (D.V.); zuzana.meszaros@biomed.cas.cz (Z.M.); tereza.friedova@gmail.com (T.F.)
 - ² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic
 - ³ Department of Biochemistry, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 6, 160 00 Prague 6, Czech Republic
 - ⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic
- * Correspondence: bojarova@biomed.cas.cz; Tel.: +420-296-442-360

Abstract: Galectins are carbohydrate-binding lectins that modulate the proliferation, apoptosis, adhesion, or migration of cells by cross-linking glycans on cell membranes or extracellular matrix components. Galectin-4 (Gal-4) is a tandem-repeat-type galectin expressed mainly in the epithelial cells of the gastrointestinal tract. It consists of an N- and a C-terminal carbohydrate-binding domain (CRD), each with distinct binding affinities, interconnected with a peptide linker. Compared to other more abundant galectins, the knowledge of the pathophysiology of Gal-4 is sparse. Its altered expression in tumor tissue is associated with, for example, colon, colorectal, and liver cancers, and it increases in tumor progression, and metastasis. There is also very limited information on the preferences of Gal-4 for its carbohydrate ligands, particularly with respect to Gal-4 subunits. Similarly, there is virtually no information on the interaction of Gal-4 with multivalent ligands. This work shows the expression and purification of Gal-4 and its subunits and presents a structure–affinity relationship study with a library of oligosaccharide ligands. Furthermore, the influence of multivalency is demonstrated in the interaction with a model lactosyl-decorated synthetic glycoconjugate. The present data may be used in biomedical research for the design of efficient ligands of Gal-4 with diagnostic or therapeutic potential.

Keywords: blood-group antigen; inhibitor; galectin-4; multivalency; oligosaccharide; transglycosylation



Citation: Slámová, K.; Červený, J.; Mészáros, Z.; Friede, T.; Vrbata, D.; Křen, V.; Bojarová, P. Oligosaccharide Ligands of Galectin-4 and Its Subunits: Multivalency Scores Highly. *Molecules* 2023, 28, 4039. <https://doi.org/10.3390/molecules28104039>

Academic Editor: Els Van Damme

Received: 8 March 2023

Revised: 26 April 2023

Accepted: 9 May 2023

Published: 11 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Galectins (Gal-) form a small group of β -galactoside-binding lectins comprising fifteen members in humans. Their functions include the modulation of vital cellular processes, such as cell proliferation, apoptosis, adhesion, or migration by cross-linking glycans on cell membranes and/or extracellular matrix components [1]. Compared to Gal-1 and Gal-3, which have been widely shown to play significant roles especially in cancer progression, inflammation, fibrosis, heart disease, and stroke, as well as some metabolic disorders [2,3], there are few studies on the pathophysiology and the binding preferences of galectin-4 (Gal-4) [4]. Gal-4 is a tandem-repeat galectin consisting of two different carbohydrate-recognition domains (CRDs) at the N- and C-terminus (Gal-4N, and Gal-4C, respectively), each with distinct binding specificities, which are covalently linked with a specific peptide [5]. The crystal structures of native Gal-4 and its individual CRDs show that both CRDs contain a concave binding site with five subsites (A–E) and preferentially bind lactose in the D/E subsites. These extended subsites can further accommodate various glycan epitopes, depending on subtle interactions with specific amino acids [6–8].