UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Anna Kozlova

Galektiny a jejich vazba na nádorové buňky

Galectins and their binding to tumor cells

Bakalářská práce

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

Konzultantka práce: Ing. Miluše Zimolová (Vlachová), Ph.D.

Praha 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením školitelky doc. RNDr. Pavly Bojarové, Ph.D., a konzultantky Ing. Miluše Zimolové, Ph.D., a všechny použité informační zdroje a literaturu řádně citovala. Tato práce ani její podstatní část nebyla předložena k získaní jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze, dne Podpis:

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí práce doc. RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D., konzultantce Ing. Miluši Zimolové (Vlachové), Ph.D., Mgr. Jakubu Červenému, a MSc. Anně Loginové, PhD. za odborné vedení bakalářské práce a poskytnutí rad a informací při jejím zpracovávání. Děkuji členům Laboratoře biotransformací za pomoc a konzultace během práce v laboratoři.

Abstrakt

Galektiny jsou skupinou rozpustných proteinů, které patří do rodiny lektinů. Tyto proteiny hrají klíčovou roli ve vazbě β-galaktosidů, modulují interakce „buňka–buňka“ a „buňka–matrix“ a účastní se různých protein-proteinových interakcí. Galektiny vykazují specifitu pro *N*-acetyllaktosamin (LacNAc), což je glykosylovaný ligand přítomný v N- a O-glykanech na povrchu buněk a v extracelulární matrix. Tyto proteiny obsahují vysoce konzervovanou doménu vázající sacharidy (CRD), která zprostředkovává interakci s glykokonjugáty. Specifická struktura CRD domény umožňuje galektinům rozpoznávat různé modifikace LacNAc, což jim dává schopnost vykazovat jemnou specifitu vůči ligandům v závislosti na typu tkáně a vývojové fázi organismu.

Galektin-1 (Gal-1) je protein, který může existovat jako monomer nebo stabilní homodimer. Dimer je stabilizován nekovalentními interakcemi mezi monomerními jednotkami a vykazuje vysokou afinitu k sacharidům. Monomerní forma si i nadále zachovává schopnost vázat sacharidy, ale s nižší afinitou. Galektin-3 (Gal-3) je chimerický galektin, který kromě kanonické CRD obsahuje také N-terminální doménu. Oba galektiny vykazují odlišné biologické funkce; např. Gal-1 indukuje apoptózu, zatímco Gal-3 vykazuje antiapoptotickou aktivitu.

Abnormální exprese galektinů, jako jsou Gal-1 a Gal-3, je silně spojena s onkogenními procesy, jako je růst nádorů, jejich metastatické šíření a vývoj rezistence vůči terapii. V nádorovém mikroprostředí mohou galektiny působit dvojím způsobem – buď podporují zánět a proliferaci nádorových buněk, nebo inhibují protinádorovou imunitní odpověď, což hraje klíčovou roli v rozvoji metastáz a terapeutické rezistenci.

V rámci této práce byly produkovány fluorescenční proteinové konstrukty DsRedMGal-1 a eYFPGal-3. Tyto proteiny byly následně použity k testování vazby galektinů na povrch nádorových buněk DLD1 v přítomnosti inhibitoru – laktózy, která vykazuje afinitu ke galektinům. Vazba galektinů na buněčný povrch byla následně ověřena metodou průtokové cytometrie.

Klíčová slova

DLD1; fluorescenční protein; galektin-1; galektin-3; laktóza; průtoková cytometrie

Abstrakt

Galectins are a group of soluble proteins that belong to the lectin family. These proteins play a crucial role in the binding of β-galactosides, modulating "cell–cell" and "cell–matrix" interactions, and participating in various protein–protein interactions. Galectins exhibit specificity for *N*-acetyllactosamine (LacNAc), a glycosylated ligand present in N- and O-glycans on the cell surface and in the extracellular matrix. These proteins contain highly conserved carbohydrate-binding domains (CRD), which allow them to interact with glyconjugates. The specific structure of CRD enables galectins to recognize various modifications of LacNAc, granting them the ability to exhibit subtle specificity for ligands depending on the tissue type and developmental stage of the organism.

Galectin-1 (Gal-1) is a protein that exists either as a monomer or as a stable homodimer. The dimer is stabilized by non-covalent interactions between the monomeric units and shows a high affinity to carbohydrates. The monomeric form also retains the ability to bind carbohydrates, but with a lower affinity. Galectin-3 (Gal-3) is a chimeric galectin that, in addition to the canonical carbohydrate-binding domain (CRD), also contains an N-terminal domain. Both galectins exhibit different biological functions: Gal-1 induces apoptosis while Gal-3 exhibits anti-apoptotic activity.

Abnormal expression of galectins, such as Gal-1 and Gal-3, is strongly associated with oncogenic processes, including tumor growth, metastatic spread, and the development of therapy resistance. In the tumor microenvironment, galectins can act in two ways – either promoting inflammation and proliferation of tumor cells or inhibiting the anti-tumor immune response, which plays a key role in metastatic development and therapeutic resistance.

In this study, fluorescent protein constructs DsRedMGal-1 and eYFPGal-3 were produced. These proteins were then used to test the binding of galectins to the surface of DLD1 tumor cells in the presence of the inhibitor – lactose, which shows affinity to galectins. The binding of galectins to the cell surface was subsequently verified using flow cytometry.

Keywords

DLD1; flow cytometry; fluorescent protein; galectin-1; galectin-3; lactose

Obsah

Obsah 6
1. Teoretický úvod 9
1.1 Galektiny 9
1.1.1 Charakteristika galektinů 9
1.1.2 Galektin-1 11
1.1.3 Galektin-3 12
1.1.4 Funkce Gal-1 a Gal-3 14
1.1.5 Gal-1 a Gal-3 v kolorektálním karcinomu 17
1.2 Fluorescenční proteiny 19
1.2.1 Obecné vlastnosti fluorescenčních proteinů 19
1.2.2 Barevné varianty fluorescenčních proteinů 23
1.2.3 Červený fluorescenční protein DsRed 24
1.2.4 Žlutý fluorescenční protein YFP 26
1.2.5 Využití fluorescenčních proteinů 27
1.3 Průtoková cytometrie 28
1.3.1 Obecný přehled metody 28
1.3.2 Fluidní systém 30
1.3.3 Optický systém 31
1.3.4 Elektronický systém 31
2. CÍLE PRÁCE 34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 35
3.1 Použité přístroje a materiály 35
3.1.1 Seznam použitých chemikálii 35
3.1.2 Seznam roztoků a médií 36
3.1.3 Seznam komerčních setů 37
3.1.4 Seznam použitých přístrojů 37
3.2 Produkce rekombinantních galektinů 39
3.2.1 Transformace bakterií *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS 39
3.2.2 Kultivace bakterií 39
3.3 Purifikace a charakterizace rekombinantních galektinů 40
3.3.1 Purifikace galektinů afinitní chromatografií 40
3.3.2 Stanovení koncentrace 41
3.3.3 Ověření čistoty proteinu 41
3.4 Vazba galektinů na povrch rakovinných buněk a inhibice této vazby laktózou 42
3.4.1 Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii 42

3.4.2 Průtoková cytometrie 43
3.5 Kontrola toxicity 44
4. Výsledky 46
4.1 Produkce a purifikace galektinů 46
4.2 Vazba galektinů na povrch rakovinných buněk a inhibice této vazby laktózou 48
4.2.1 Vazba DsRedMGal-1 na buněčný povrch a její inhibice laktózou 49
4.2.2 Vazba eYFPGal-3 na buněčný povrch a její inhibice laktózou 53
4.3 Kontrola toxicity galektinových konstruktů na buňky DLD1 57
5. Diskuze 61
6. Závěr 66
Bibliografie 68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Bcl-2	B-buněčný lymfom 2
BSA	hovězí sérový albumin *(bovine serum albumin)*
CD4+	diferenciační skupina 4 (*cluster of differentiation 4*)
CD8+	diferenciační skupina 8 (*cluster of differentiation 8*)
CRC	kolorektální karcinom
CRD	doména rozpoznávající sacharidy (*carbohydrate recognition domain*)
DLD1	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
DTT	dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPBS	fosfátový pufr s přídavkem EDTA
ERK	kinázy regulované extracelulárním signálem (e*xtracellular signal-regulated kinase*)
FACS	*fluorescence activated cell sorter*
FP	fluorescenční protein
FSC	*forward scatter*
Gal-	galektin
Gal-1	galektin-1
Gal-3	galektin-3
GTP	guanosintrifosfát (*guanosine triphosphate*)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LacdiNAc	*N,N′*-diacetyllaktosamin
LacNAc	*N*-acetylaktosamin
LB	medium Luria-Bertani
LM	laminin
MEK	kináza aktivovaná proteinem Rase (*Mitogen Activated Protein Kinase*)
MFI	střední intenzita fluorescence (*Mean Fluorescence Intensity*)
NT	N-koncová doména
OSP	osteopontin

PBS	fosfátový pufr s přídavkem NaCl (*phosphate-buffered saline*)
p-hodnota	pravděpodobnostní hodnota
PKC	proteinkináza C
PMSF	fenylmethylsulfonyl-fluorid
Ras	GTPáza regulující buněčný růst a přežití
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsulfát sodný (*sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přídavkem dodecylsulfátu sodného (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SSC	*side scatter*
TB	kultivační médium *Terrific Broth*
Tris-Cl	pufr Tris s přídavkem NaCl (*Tris-buffered saline*)

1. Teoretický úvod

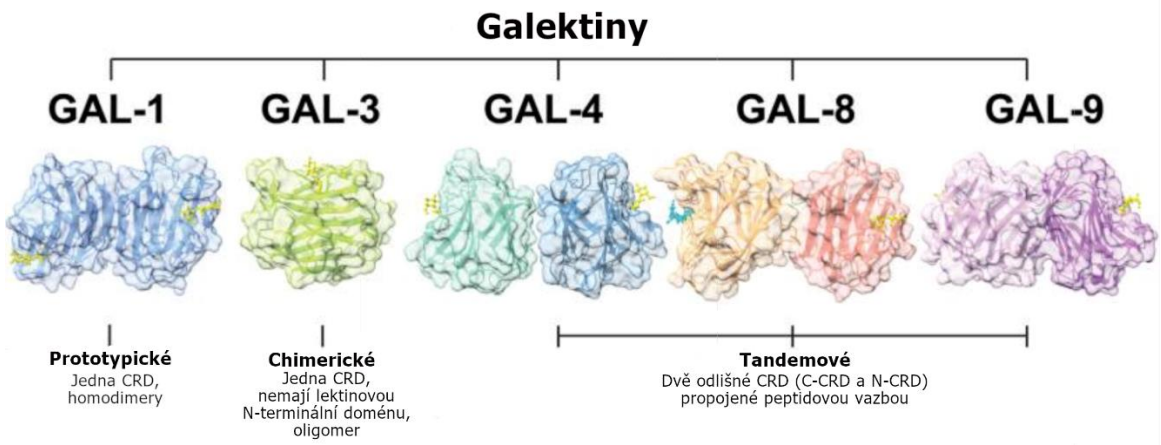
1.1 Galektiny

1.1.1 Charakteristika galektinů

Galektiny jsou skupinou rozpustných proteinů patřících do rodiny lektinů, které se podílejí na vazbě β-galaktosidů a hrají roli v modulaci interakcí „buňka–buňka“ a „buňka–matrix“ ve všech organismech. Tyto proteiny obsahují konzervované sekvenční motivy a mohou se také účastnit protein-proteinových interakcí. K vazbě na glykosylované receptory dochází při rozpoznání ligandu *N*-acetyllaktosaminu (LacNAc, Galβ1,4GlcNAc) nebo jiných ligandů s koncovým β-galaktosylem přítomných v N- a O-glykanech na buněčných povrchových glykostrukturách. Jednotlivé galektiny jsou schopny rozpoznávat různé modifikace těchto ligandů, což jim umožňuje vykazovat jemnou specifitu vůči ligandům specifickým pro určité tkáně nebo fáze vývoje. Každý člen galektinové rodiny obsahuje alespoň jednu vysoce kondenzovanou globulární strukturní doménu CRD (*carbohydrate recognition domain*) o přibližně 130 aminokyselinách [1,2].

Galektiny byly poprvé pojmenovány v roce 1994 a od té doby se staly předmětem intenzivního výzkumu i díky své rolí v široké škále biologických procesů, včetně modulace imunitní odpovědi, buněčné adheze, apoptózy a nádorových mechanismů.

Momentálně je známo 15 typů savčích galektinů (mezi nimi 12 galektinů se nachází u lidí), Lze je rozdělit do tří podskupin, které se liší strukturně, funkčně a podle počtu CRD: prototypické, tandemové a chimerické. Prototypické galektiny (Gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 a -15) jsou monomery obsahující pouze jednu CRD, ale s možností tvořit nekovalentní homodimery. Tandemové galektiny (Gal-4, -6, 8, -9 a -12) mají dvě odlišné CRD propojené peptidovým linkerem. Mezi chimerické galektiny je řazen pouze Gal-3, obsahující jednu CRD a N-koncovou polypeptidovou N-terminální doménu [1,3].



Obrázek 1. Struktury vybraných členů rodiny galektinů a jejich strukturní klasifikace. Obrázek je převzat z [3] a upraveno pomocí aplikaci GIMP [4].

Studie zaměřené na expresi galektinů zdůrazňují několik klíčových bodů: a) každý organismus obvykle exprimuje více galektinů; b) různé typy buněk v organismu mají odlišné sady galektinů; c) většina buněk obsahuje alespoň jeden typ galektinu.

Výzkum zaměřený na Gal-1 a Gal-3 během embryonálního vývoje myší ukazuje, že jednotlivé galektiny jsou exprimovány specificky v závislosti na tkáni nebo fázi vývoje. U dospělých myší je Gal-1 hojně zastoupen v různých tkáních, zejména v tkáních mezodermálního původu. Gal-3 se nachází v epiteliálních buňkách, chrupavce a zánětlivých buňkách, jako jsou makrofágy. Naproti tomu Gal-4 je převážně omezen na epiteliální buňky gastrointestinálního traktu, zatímco Gal-7 se nachází především ve vrstvených epitelech, jako je epidermis [5].

Tato rozmanitá exprese galektinů naznačuje jejich specifickou úlohu v různých tkáních a biologických procesech, což podporuje jejich důležitost v regulaci buněčných funkcí jak v normálním, tak patologickém stavu [5].

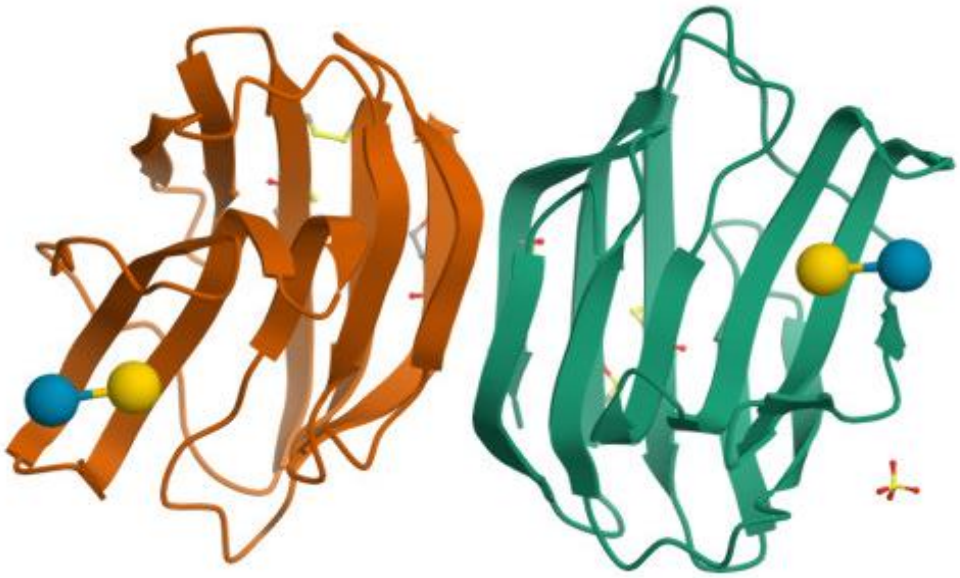
Galektiny jsou syntetizovány na volných ribozomech v cytosolu buněk, což jim umožňuje interakci s buněčným jádrem a dalšími intracelulárními kompartmenty [6]. Jejich exprese může být během vývoje orgánů, tvorby tkání a diferenciace buněk specificky regulována. Koncentrace galektinů v buňkách tak může poskytovat prognostické a diagnostické informace o různých závažných stavech. Galektiny vykazují duální lokalizaci: nacházejí se jak v extracelulárním, tak v intracelulárním prostoru. Jelikož jim chybí klasická signální sekvence na N-konci nezbytná pro konvenční sekreci, jsou vylučovány nekonvenční

sekreční cestou, tedy mimo ER-Golgiho komplex. V extracelulárním prostoru se galektiny vážou na glykokonjugáty na buněčných površích, v extracelulární matrix a na površích patogenů. Naopak intracelulární galektiny se podílejí na různých buněčných procesech, jako je sestřih pre-mRNA, regulace buněčného cyklu, růst buněk a apoptóza [6–8].

Galektiny nemají signální sekvenci a pronikají do buněk pomocí exocytické dráhy, která je zprostředkována exozómy. Exozómy jsou schopné vázat glykosylované ligandy galektinů a vytvářet dynamickou mřížku, která se podílí na regulaci mnoha funkcí (např. difuze, prostorové uspořádaní do membránových oblastí, aktivace a apoptóza T buněk, transportní procesy). Některé funkce jsou zprostředkovány interakcí galektinů s proteiny spíše než vazbou na sacharidy [9].

1.1.2 Galektin-1

Galektin-1 (Gal-1) je protein o velikosti 14 kDa, obsahující 135 aminokyselin a kódovaný genem *LGALS1* na chromozomu 22q13.1 [10]. Gal-1 je rozpustný a vyskytuje ve formě monomeru i jako nekovalentní homodimer sestávající z podjednotek s jedním typem CRD, který je stabilizován nekovalentními vazbami mezi monomery na rozhraní a přítomností vysoce konzervovaného hydrofobního jádra. Každá forma je spojená s odlišnými biologickými funkcemi [2]. Jednou z klíčových vlastností homodimerního proteinu Gal-1 je jeho tendence se při nízkých koncentracích (K_d ~ 7 μM) spontánně disociovat na monomery. Tyto monomerní formy si i nadále zachovávají schopnost vázat sacharidy, avšak s nižší afinitou ve srovnání s dimerem [2]. Každý monomer Gal-1 má šest cysteinových zbytků (Cys-2, Cys-16, Cys-42, Cys60, Cys-88 a Cys-130), jejichž redoxní stav výrazně ovlivňuje funkci proteinu.



Obrázek 2. Struktura homodimerního lidského Gal-1 proteinu. Je tvořen β-sendvičem složeným ze dvou antiparalelních β-listů, z nichž jeden obsahuje pět vláken (F1–F5) a druhý šest vláken (S1–S6a/b). N- a C-konce každého monomeru jsou umístěny na rozhraní dimeru, přičemž CRD jsou lokalizovány na opačných koncích téže strany, čímž se vytváří záporně nabité vazebné místo ve vazebné drážce [2]. Obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMol [11]. Soubor PDB byl převzat z databáze RCSB Protein Data Bank [12].

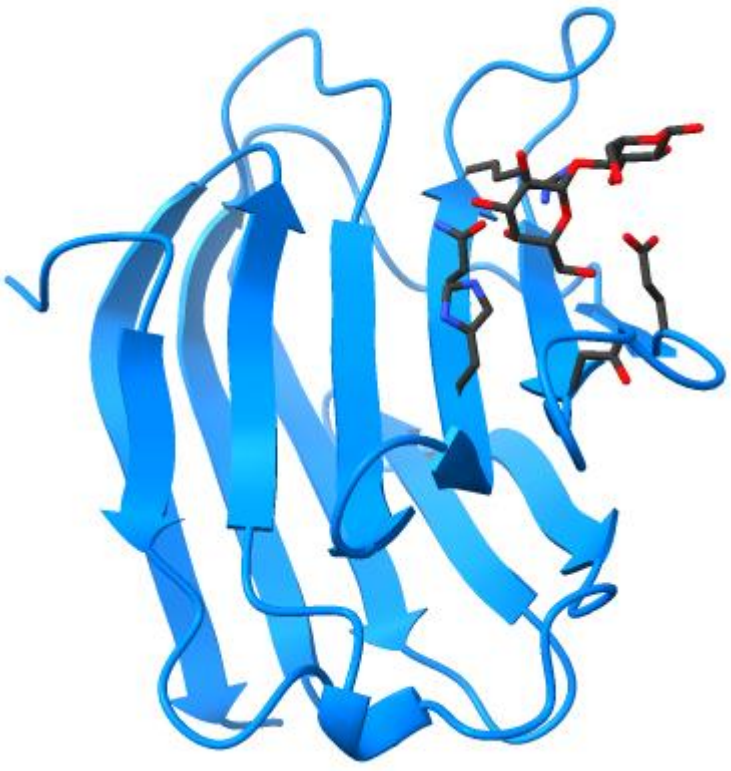
1.1.3 Galektin-3

Galektin-3 (Gal-3) je chimerický typ galektinu s přibližnou molekulovou hmotností 29 až 35kDa. Obsahuje 14 kDa CRD a je kódován genem *LGALS3* lokalizovaným na chromozomu 14, lokus q21-q22 [13]. Původně byl objeven v peritoneálních makrofázích myší a dostal název MAC-2 [9].

Gal-3 se vyznačuje tím, že kromě kanonické CRD umístěné na C-konci, která je hlavním nositelem lektinové aktivity Gal-3 [14], obsahuje také N-terminální doménu, která se neváže na sacharidy a skládá se ze 110-166 aminokyselin, v závislosti na druhu (120 aminokyselin u člověka a až 166 aminokyselin u psa) [9]. Tato N-terminální doména se skládá z opakujících se sekvencí devíti aminokyselinových zbytků bohatých na prolin, glycin, tyrosin a glutamin, přičemž postrádá nabité nebo velké hydrofobní postranní řetězce [9]. Specifická sekvence Pro–Gly–Ala–Tyr–Pro–Gly umožňuje autooligomerizaci Gal-3, což dále podtrhuje jedinečné postavení Gal-3 v rodině galektinů [15]. N-terminální doména rovněž nese fosforylační místa a další prvky důležité pro intracelulární lokalizaci a sekreci Gal-3 [16].

Globulární C-terminální doména Gal-3, složená z přibližně 130-135 aminokyselin, zahrnuje celé místo pro vazbu na sacharidy, a je tak hlavním nositelem lektinové aktivity Gal-3 [14].

Gal-3 má afinitu k laktóze (Lac, K_d = 1 mM) a LacNAc (K_d = 0,2 mM), jak bylo stanoveno pomocí vazebného testu [17], což je srovnatelné s jinými galektiny, ale odlišuje se vyšší afinitou ke komplexnějším oligosacharidům. Tato vlastnost vychází z rozšířeného vazebného místa Gal-3, které umožňuje vazbu delších oligosacharidových struktur [14]. K takovým ligandům patří polyLacNAc - polymer *N*-acetyllaktosaminu složený z LacNAc jednotek spojených vazbou β(1,3), který se vyskytuje na různých molekulách extracelulární matrix a buněčných površích. Gal-3 se váže preferenčně na vnitřní a koncové zbytky LacNAc v oligosacharidu [18]. Gal-3 má též, na rozdíl od jiných galektinů, afinitu k *N,N′*-diacetyllaktosaminu (LacdiNAc). Vazba oligosacharidů je spojena s konformačními změnami a tendencí Gal-3 vytvářet vyšší struktury [6,14]. Kromě toho může Gal-3 interagovat s buněčnými povrchovými proteiny, včetně mucinů, integrinů a Mac-2-vazebného proteinu [19].



Obrázek 3. Struktura Gal-3 v komplexu s laktózou. Gal-3 je protein obsahující C-koncovou (CRD) a N-koncovou doménu, která nese několik opakování motivu prolin-tyrosin-glycin. Rentgenostrukturní analýza odhalila konzervativní motiv (dva antiparalelní β-listy složené z pěti a šesti β-řetězců) typický pro CRD galektinů [14]. Obrázek převzat z [20].

Gal-3 se nachází ve většině tkání dospělého organismu, přičemž během embryonálního vývoje jeho exprese závisí na typu tkáně a fázi vývoje. Gal-3 je exprimován v různých buněčných kompartmentech včetně jádra, cytoplazmy a mitochondrií, na buněčném povrchu a v extracelulárním prostoru. Exprese Gal-3 je nejčastější v epiteliálních a myeloidních buňkách, ale jeho přítomnost byla zaznamenána v široké škále dalších buněčných typů [9,17]. Mezi tyto buňky patří epiteliální a endoteliální buňky trávicího a dýchacího systému, dendrické buňky, buňky rohovky, spojivky, slinivky, štítné žlázy, ledvin a jater. K nejvyšší expresi Gal-3 dochází v plicích, slezině, žaludku, střevu, vaječnících a děloze. V určitých tkáních je exprese Gal-3 indukovatelná; například v nepoškozeném myokardu je exprese velmi nízká, ale při poškození tkáně dochází k jejímu rychlému zvýšení, což naznačuje roli Gal-3 v procesu opravy tkání [6]. Kromě toho je Gal-3 detekován v buňkách imunitní odpovědi, jako jsou neutrofily, eosinofily, dendritické buňky a různé typy makrofágů. Ačkoli lymfocyty běžně Gal-3 neexprimují, může být jeho exprese vyvolána specifickými stimuly. Patologická exprese Gal-3 se rovněž objevuje v různých nádorových tkáních, například ve slinivce, játrech, tlustém střevě, prsou, plicích, prostatě a štítné žláze, což naznačuje jeho roli signálního proteinu v progresi rakoviny [9].

1.1.4 Funkce Gal-1 a Gal-3

Gal-1 a Gal-3 představuji dva z nejvíce studovaných členů rodiny galektinů díky jejich hojnému výskytu a významným funkcím. Zatímco Gal-1 indukuje apoptózu v různých typech buněk včetně nezralých T buněk, Gal-3 je známý svou antiapoptotickou aktivitou. Zajímavé je, že Gal-3 dokáže blokovat inhibiční vliv Gal-1 na růst neuroblastomových buněk v kultuře. Tato různorodost funkcí galektinů je zvláště významná v kontextu nádorového bujení [18].

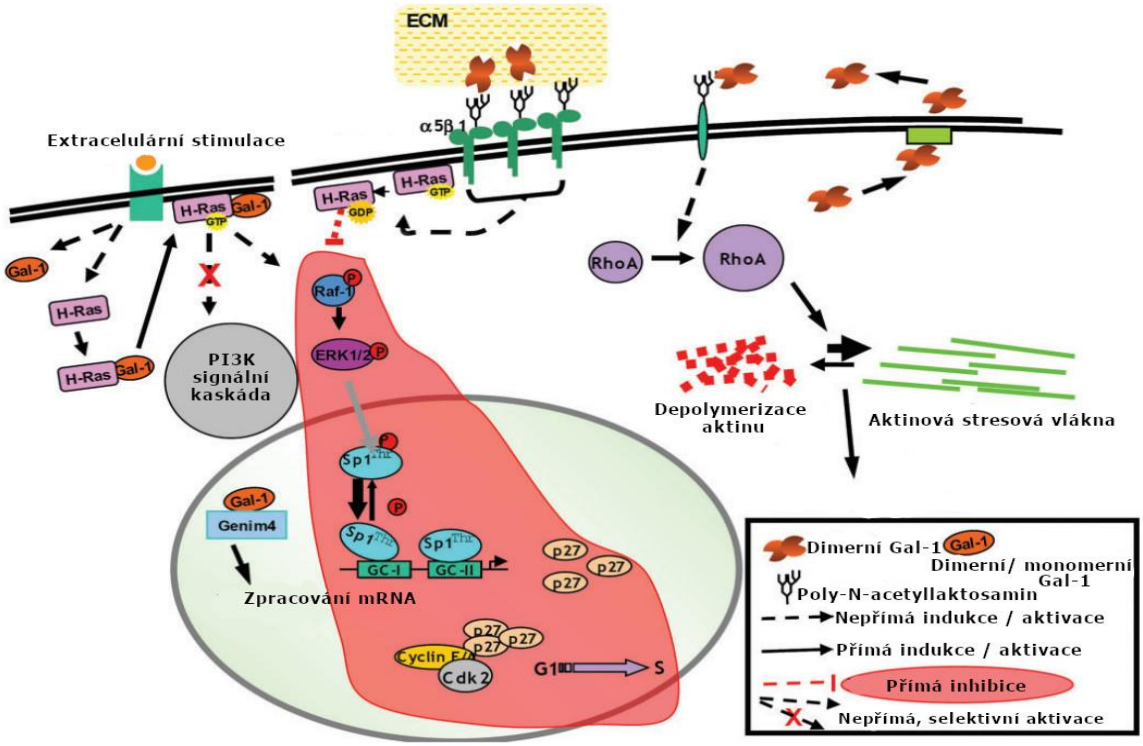
Abnormální exprese galektinů, jako jsou Gal-1 a Gal-3, je často spojena s rozvojem nádorů, jejich progresí a klinickou agresivitou. Nádorové buňky produkují galektiny, které mají protichůdné účinky na imunitní buňky: mohou buď podporovat zánět, nebo tlumit imunitní odpověď, v závislosti na podmínkách mikroprostředí nádoru. Tento jev je důležitý pro vznik metastáz a rezistenci vůči terapii [18].

Gal-1 vykazuje protizánětlivé účinky, přispívá k úniku nádorových buněk před imunitním dohledem a reguluje funkci T buněk – od jejich přežívání až po homeostázu – včetně indukce imunologické tolerance v raných fázích těhotenství [2,7,10]. Dále Gal-1 ovlivňuje jak vrozenou, tak adaptivní imunitní odpověď – potlačuje autoimunitní záněty,

tlumí alergické a antibakteriální reakce, reguluje funkci B lymfocytů a moduluje angiogenezi i činnost mikroglií [21].

Gal-1 je exprimován v širokém spektru tkání a buněčných typů a jeho účinky se projevují jak intracelulárně, tak extracelulárně. Uvnitř buňky působí jako sestřihový faktor a zapojuje se do buněčné signalizace, zatímco v extracelulárním prostoru se vyskytuje především v redukované formě, která váže sacharidové struktury na buněčném povrchu. Díky tomu hraje zásadní roli v mezibuněčné adhezi a interakci s extracelulární matrix, například zesíťováním integrinů, lamininu nebo fibronektinu [2].

Kromě apoptózy ovlivňuje Gal-1 i další biologické procesy, včetně buněčné transformace, růstu a migrace, vývoje nervového systému a svalové diferenciace. Zvýšená exprese Gal-1 v nádorech nebo jejich okolí je často spojena s pokročilou malignitou a horší prognózou, neboť podporuje nádorovou invazivitu a tvorbu metastáz. Oxidovaná forma Gal-1, která postrádá lektinovou aktivitu, hraje významnou roli v regeneraci nervové tkáně, zejména stimulací migrace Schwannových buněk a podporou regenerace axonů v periferní nervové soustavě [2].



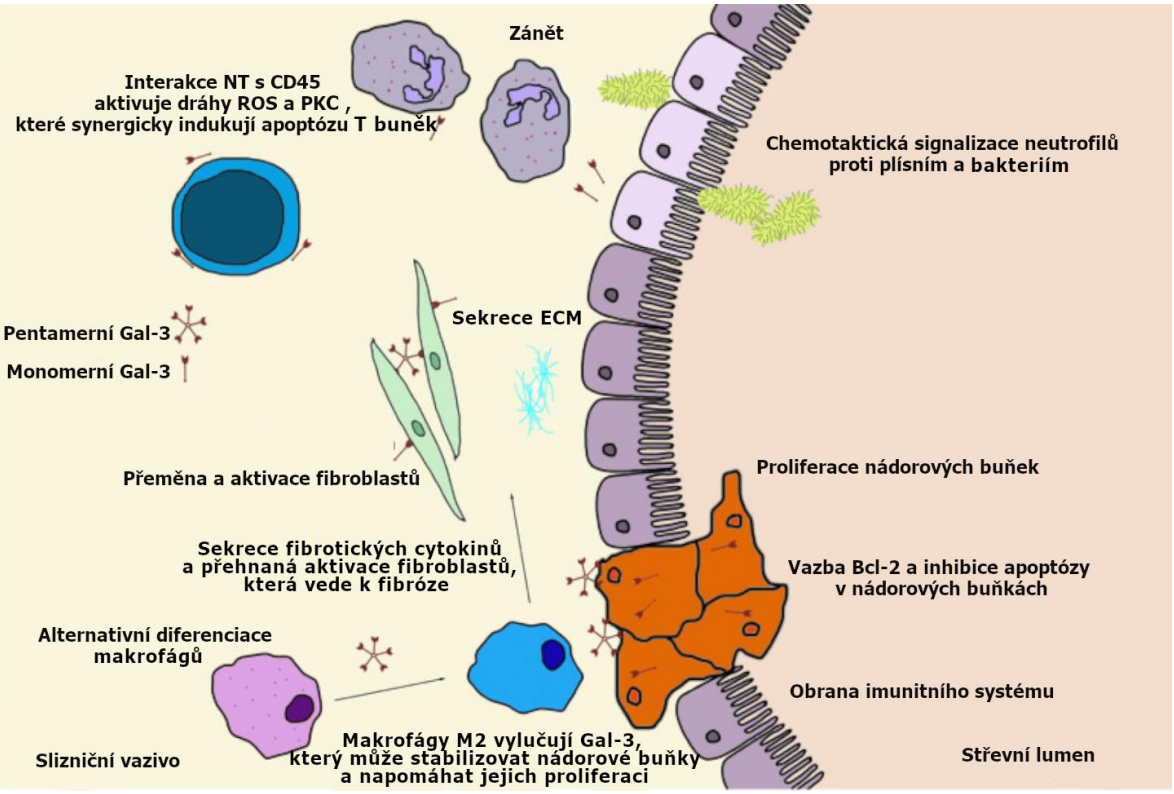
Obrázek 4. Extracelulární funkce Gal-1 jsou založeny na jeho schopnosti vázat sacharidy, zatímco intracelulární interakce se odehrávají nezávisle na sacharidech a zahrnují Gal-1 a další proteiny. Pro růstovou inhibici způsobenou Gal-1 jsou klíčové funkční interakce s integrinem α5β1. Antiproliferativní účinky vycházejí z inhibice dráhy Ras-MEK-ERK a následné aktivace transkripce p27; dvě místa vazby pro faktor Sp1 v promotorové oblasti genu *CDKN1B* (kódující p27) hrají

zásadní roli v odpovědi na Gal-1. Inhibice kaskády Ras-MEK-ERK zprostředkovaná Gal-1 zvyšuje transaktivaci Sp1, přičemž vazba na DNA je spojena se sníženou fosforylací threoninu Sp1. Kromě toho Gal-1 podporuje transkripci p21 a selektivně zvyšuje stabilitu proteinu p27. Tato akumulace p27 a p21 zprostředkovaná Gal-1 inhibuje aktivitu Cdk2 a nakonec vede k zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 a k potlačení růstu. Zvětšení buněčné motility vyvolané Gal-1 je spojeno se zvýšenou expresí rhoA a změnami v polymerizaci aktinového cytoskeletu. Gal-1 je transportován z cytosolu na buněčnou membránu H-Ras-GTP nezávisle na laktóze, což vede ke stabilizaci H-Ras-GTP a shlukování H-RAS-GTP s Gal-1 v mikrodoménách bez raftů. Následně dochází k vazbě na Raf-1 (nikoli na PI3Kinázu) a k aktivaci signální dráhy ERK. Jaderný Gal-1 interaguje s Gemin4 a je ko-imunoprecipitován s jadernými SMN komplexy, které se podílejí na splicingové dráze [2]. Obrázek je převzat z [2] a upraven pomocí aplikace GIMP [4].

Gal-3 se účastní mnoha patologických procesů, mezi nimiž je zánět, buněčná proliferace a kontakty mezi buňkami nebo buňkami a matrix. Gal-3 může být detekován u mnoha patogenních stavů od chronických zánětů přes kardiovaskulární a metabolické poruchy až po nádory –a je perspektivní i pro využití jako diagnostický či prognostický biomarker, například při srdečním selhání, fibróze, gliomech nebo myokardiální dysfunkci [8].

Gal-3 hraje významnou roli v široké škále biologických funkcí a je klíčový jak v extracelulárním, tak v intracelulárním prostředí. Extracelulární Gal-3 podporuje adhezi, migraci a invazi nádorových buněk, stejně jako apoptózu některých imunitních buněk, což umožňuje nádoru unikat imunitní odpovědi. Intracelulární Gal-3 pak přispívá k přežití nádorových buněk a zvyšuje jejich rezistenci vůči chemoterapii. Gal-3 moduluje komunikaci mezi jádrem, mitochondriemi a dalšími cytoplazmatickými strukturami. Působí také v komunikaci mezi buňkami (například při jejich aktivaci a chemoatrakci) a mezi buňkami a extracelulární matrix. Tím reguluje buněčný růst, proliferaci, diferenciaci a také prozánětlivé a profibrotické procesy, které jsou úzce spjaty s patologickými stavy, jako je fibróza, zánět a nádorová onemocnění. Mimo jiné Gal-3 řídí buněčný cyklus tím, že může zastavit buňky v G1 nebo G2/M fázi, podporuje růst buněk a vykazuje antiapoptotické účinky, čímž chrání buňky před smrtí způsobenou ztrátou ukotvení nebo aktivací Fas receptoru. Dále se podílí na procesu sestřihu pre-mRNA, podporuje interakce mezi buňkami a adhezi k extracelulární matrix, čímž zajišťuje stabilitu buněčného prostředí [8,19].

Pro svou schopnost přetvářet nádorové mikroprostředí a podporovat přežití buněk je Gal-3 označován jako „strážce nádorového mikroprostředí“ [15]. Studie ukazují, že účinek Gal-3 může být specifický pro daný typ nádoru – zatímco u některých nádorů je jeho exprese spojena s horší prognózou, u jiných může mít opačný efekt. Gal-3 tak nelze považovat za univerzální biomarker, ale spíše za funkční marker, který by měl být kombinován s dalšími ukazateli při hodnocení progrese nádoru [8,9].



Obrázek 5. Schematické znázornění (pato)fyziologických účinků galektinu-3 ukazuje, že fyziologické procesy jsou odděleny tenkou čarou od patologických scénářů, jako jsou podněty k sekreci extracelulární matrix (ECM) nebo chemotaktická signalizace pro infiltraci imunitních buněk. Bcl-2 označuje B-buněčný lymfom 2; ERK představuje kinázy regulované extracelulárním signálem; NT se vztahuje k N-koncovému konci/doméně; PKC je zkratka pro protein kinázu C; a ROS označuje reaktivní formy kyslíku. Obrázek je převzat z [15] a upraven pomocí aplikaci GIMP [4].

Tento přehled o roli galektinů, zejména Gal-1 a Gal-3, v nádorovém mikroprostředí zdůrazňuje jejich potenciál jako cíle pro nové terapeutické strategie zaměřené na modifikaci imunitní odpovědi a zpomalení progrese nádoru.

1.1.5 Gal-1 a Gal-3 v kolorektálním karcinomu

Nádory trávicího traktu zahrnují nádorová onemocnění postihující různé části trávicího systému, jako jsou žaludek, játra, tlusté střevo a slinivka břišní. Tyto typy rakoviny jsou známé svou agresivitou a tendencí rychle vytvářet metastázy, což zdůrazňuje potřebu nalézt efektivní terapeutické cíle pro jejich úspěšnou léčbu.

Kolorektální karcinom (CRC) je třetí nejčastější maligní onemocnění a zároveň druhý typ rakoviny po celém světě, s 1,9 milionu nových případů a 900 000 úmrtí v roce 2020. Postihuje může i ženy téměř stejně, s přibližně 400 000 případy u mužů a 381 000 u žen ročně. V rozvinutých zemích screening a včasná diagnostika přispěly ke zlepšení pětiletého

přežití pacientů s CRC, přesto však u přibližně 25 % pacientů stále dochází k rozvoji onemocnění do 4. stadia, zatímco dalších 25 až 50 % pacientů s časnými stádii onemocnění později čelí rozvoji metastáz. Budoucí prognózy zůstávají nepříznivé; odhadem do roku 2040 počet nově diagnostikovaných případů rakoviny přesáhne 28 milionů a počet úmrtí způsobených rakovinou dosáhne 16 milionů. Proto je klíčové zaměřit se na identifikaci nových molekulárních cílů, které mohou výrazně přispět k vývoji účinnějších terapeutických přístupů [13,22,23].

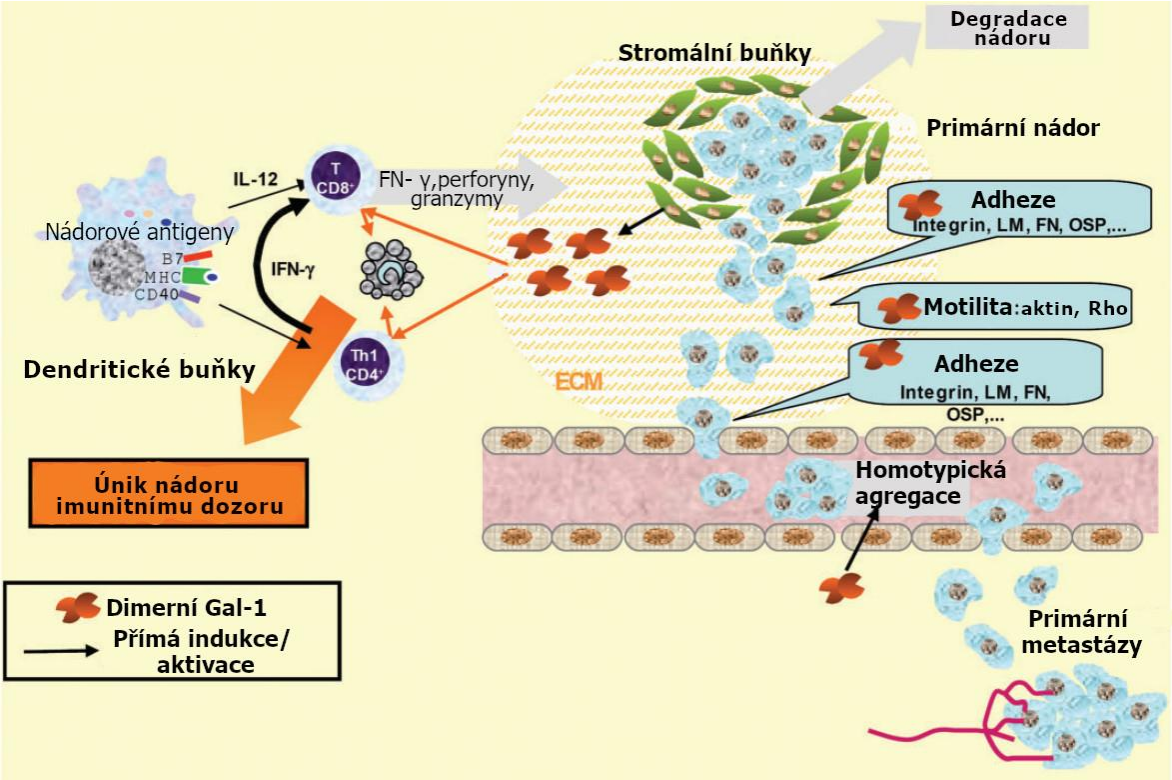
Gal-3 je spojen s rozvojem a malignitou celé řady nádorů, včetně karcinomu pankreatu, hepatocelulárního karcinomu, kolorektálního karcinomu, renálního karcinomu, žaludečního karcinomu, spinocelulárního karcinomu jícnu, karcinomu nosohltanu, plic, melanomu, glioblastomu a lymfomu. Naopak u některých typů rakoviny, jako jsou karcinom prsu, nemelanomová rakovina kůže, rakovina prostaty, endometriální karcinom a leukémie, vykazuje Gal-3 funkci supresoru kancerogeneze [24].

Nadprodukce Gal-3 je spojena s horší prognózou u kolorektálního karcinomu (CRC). Přibližně 80 % bioptických vzorků CRC vykazovalo výrazně zvýšené množství Gal-3 ve srovnání s normální tkání, zejména u pacientů s přítomností vzdálených metastáz. Zvýšená exprese Gal-3 byla pozorována i u karcinomu žaludku, kde navíc exprese Gal-3 a jeho translokace do jádra korelovaly s peritoneálními metastázami, lymfatickou invazí a patologickým stadiem. U karcinomu žaludku byla snížená exprese Gal-3 spojena s horší prognózou, zatímco nadměrná exprese Gal-3 u melanomu byla v pozitivní korelaci s výskytem metastáz [22,24].

Gal-1 se zaměřuje na struktury LacNAc na povrchu různých buněk, které fungují jako ligandy Gal, k úniku před imunitní reakcí, zejména inhibicí produkce IFN-γ. Přestože tento mechanismus je částečně znám, přesná úloha Gal-1 při imunosupresi CRC zůstává neobjasněna [2,25]. Studie ukazuje, že Gal-1 má přímý vliv na růst nádorů u CRC prostřednictvím modulace protinádorové imunity, konkrétně regulací CD8+ CD122+ PD-1+ Treg buněk. Experimenty odhalily, že Gal-1 produkovaný jak nádorovými buňkami, tak buňkami stromatu ovlivňuje růst nádoru regulací frekvence a aktivity CD8+ Treg buněk [25].

Bioinformatická analýza dat pacientů s kolorektálním adenokarcinomem (COAD) z databáze *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) odhalila „prognosticky nepříznivý podpis“ fenotypických a funkčních markerů charakterizovaný vysokou expresí Gal-1 a zvýšeným skóre CD8+ Treg. Zaměření na interakce mezi Gal-1 a sacharidovými ligandy by proto

mohlo představovat slibnou imunoterapeutickou strategii pro léčbu CRC prostřednictvím modulace populace CD8+ Treg buněk [25,26].



Obrázek 6. Progrese maligních nádorů zahrnuje nejen lokální invazi nádorových buněk do okolních zdravých tkání, ale také jejich šíření do vzdálených orgánů prostřednictvím metastáz. Tento proces probíhá v několika fázích, včetně adheze buňka–buňka a buňka–ECM, invaze, migrace a angiogeneze. Gal-1 hraje roli v několika krocích této maligní progrese. Společně s integriny podporuje adhezi nádorových buněk, včetně jejich přichycení k ECM proteinům. Zároveň však Gal-1 může také inhibovat adhezi, což může vést k uvolnění a migraci nádorových buněk. Navíc se Gal-1 podílí na mechanismech, které umožňují nádoru unikat imunitnímu systému. T buňky využívají dva hlavní způsoby likvidace nádorových buněk: aktivaci appoptických receptorů a vznik exocytózových granulí, která zahrnuje sekreci perforinu a granzymů. Nádory se mohou vyhýbat imunitním reakcím produkcí imunosupresivních cytokinů a rozpustných inhibičních faktorů, jako je Gal-1.Gal-1 přispívá k úniku nádoru před imunitním systémem tím, že indukuje apoptózu efektorových T buněk [2]. Obrázek byl převzat z [2] a upraven pomocí aplikaci GIMP [4].

1.2 Fluorescenční proteiny

1.2.1 Obecné vlastnosti fluorescenčních proteinů

Fluorescenční proteiny (FP) byly původně izolovány z mořských organismů, jako jsou medúzy, korály a sasanky. Jsou dostupné v barvách pokrývajících viditelné spektrum (450–655 nm) a mají jedinečné vlastnosti, které lze použít při sledování biologických molekul prostřednictvím značení a monitorování dynamických procesů v živých buňkách. Zkoumání různých FP probíhá již více než šedesát let od chvíle, kdy Osamu Shimomura v roce 1962

izoloval zelený fluorescenční protein (GFP) z medúzy *Aequorea victoria*. Tyto proteiny umožnily vývoj řady inovativních metod založených na fluorescenci, které pomáhají objasnit základní biologické mechanismy a řešit výzkumné problémy v oblasti biotechnologie a biomedicíny. Objevy různých barevných variant a homologů GFP u různých druhů rozšířily fluorescenční paletu dostupných FP, pokrývající spektrum od modré po červenou, čímž se otevřely možnosti pro vícebarevné zobrazování [27].

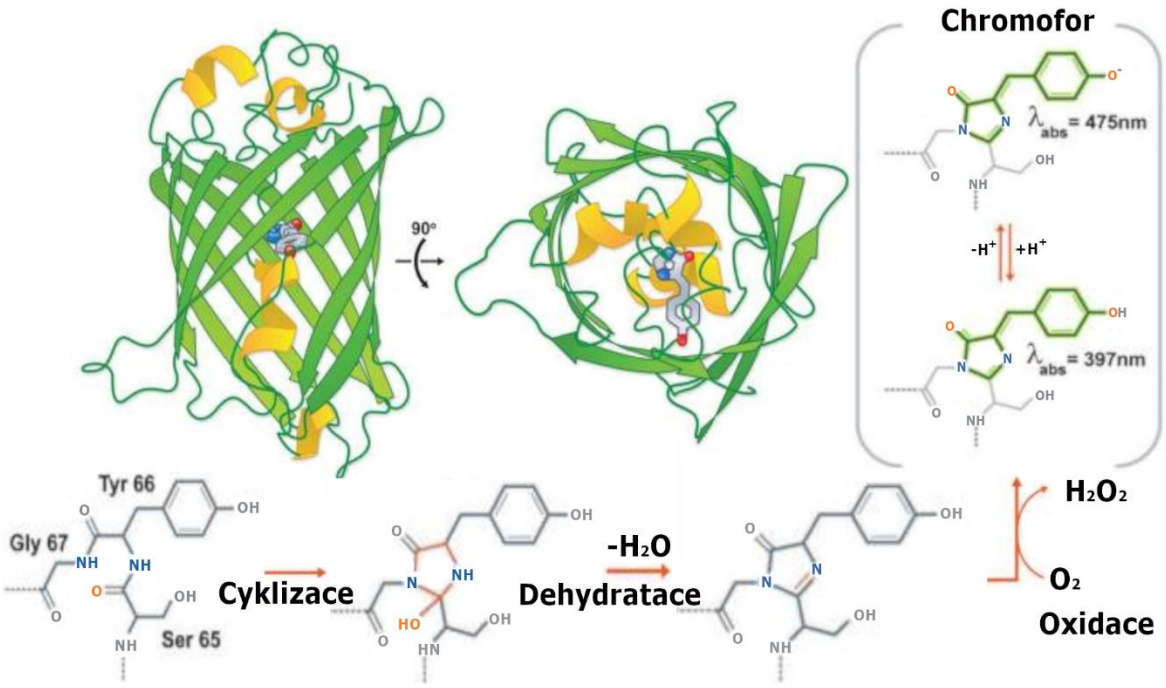
Tabulka 1. Přehled vybraných fluorescenčních proteinů, jejich spektrálních vlastností a původu.

Název proteinů	Původ	Barva	Excitační max [nm]	Emisní max [nm]	Reference
DsRed	*Discosoma sp*. (korál)	červená	558	583	[27,28]
YFP	Mutantní GFP (*Aequorea victoria*)	žlutá	514	529	[29]
Sirius	*Aequorea victoria*	fialová	355	424	[27]
mOrange	*Anthozoa* tetramerní FP	oranžová	548	562	[27]
mCherry	Mutantní DsRed	červená	587	610	[27,30]
mWasabi	*Clavularia sp.* (korál)	zelená	493	509	[27,31]

FP a chromoproteiny z rodiny GFP jsou složeny z přibližně 220-240 aminokyselinových zbytků, které jsou tvořeny jedenácti β-listy a vnitřní deformovanou šroubovicí. Tento barel má téměř dokonale válcovitý tvar s délkou 42 Å a průměrem 24 Å. N-terminální polovina polypeptidového řetězce je uspořádána do tří antiparalelních β-listů, za nimiž následuje centrálně uložená α-helixová doména. Za touto doménou se nachází další trojice β-listů, z nichž první dva jsou orientovány antiparalelně vůči sousedním vláknům. Třetí β-list této druhé trojice, odpovídající aminokyselinám 118 až 123, je výjimečně orientován paralelně vzhledem k prvnímu β-listu na N-terminálním konci řetězce. Poté páteř polypeptidu přechází do druhé části molekuly a tvoří druhou polovinu barelové struktury ve tvaru řeckého klíče s pěti vlákny. Jedna část válce je zakončena třemi krátkými deformovanými helikálními segmenty, zatímco druhá část válce je uzavřena jedním krátkým

a silně deformovaným helikálním segmentem. Vodíkové vazby na povrchu válce pravděpodobně zajišťují výjimečnou stabilitu proteinu vůči denaturaci a proteolýze [32].

Chromoforová skupina u proteinů podobných GFP vzniká posttranslační modifikací – autokatalytickou cyklizací polypeptidového řetězce mezi zbytky Ser-65 a Gly-67 za vzniku imidazolidin-5-onového meziproduktu a následnou limitující oxidací Cα-Cβ-vazby Tyr-66 molekulárním kyslíkem (viz obr. č. 7) [32]. Tyto reakce vedou ke vzniku dvojjaderné struktury, která tvoří konjugovaný π-systém schopný absorbovat a emitovat světlo ve viditelném spektru. Postranní řetězce aminokyselin uvnitř barelu FP jsou klíčové pro tvorbu chromoforů a ovlivnění jejich spektrálních vlastností. Nejvýznamnější zbytky se nacházejí uprostřed β-řetězců poblíž chromoforu a každý řetězec ovlivňuje chromofor z určitého směru. Tato architektura výrazně přispívá k odolnosti proteinu vůči tepelné či chemické denaturaci a zároveň zvyšuje jeho odolnost vůči proteolytickému štěpení. Arg-96 z vlákna 4 je nejdůležitější katalytický zbytek, který je v přímém kontaktu s chromoforem a napomáhá cyklizaci během maturace FP. Katalytickou aktivitu ovlivňuje i Glu-222 z vlákna 11, přestože jeho substituce často nemá výrazný vliv na maturaci chromoforu. Zbytky z řetězců 7, 8 a 10 ovlivňují spektra FP jinak. Postranní řetězce zbytků 148, 165, 167 a 203 jsou v kontaktu s Tyr-66 chromoforu a hrají klíčovou roli v jeho protonačním stavu, polarizaci, konformaci a rotační volnosti. Kombinatorní mutageneze ukazuje, že aminokyselina Gly-67 je klíčová pro vznik fluoroforu, a proto je striktně zachována u všech přirozených proteinů podobných GFP [33,34].



Obrázek 7. GFP je protein o velikosti 27 kDa s β-barelovou strukturou, obsahující centrální chromofor. V horním panelu je znázorněna schematická struktura GFP, zobrazující dva různé pohledy. Je zde také uveden proces tvorby chromoforu. Tvorba chromoforu probíhá ve třech krocích, které se autokatalyticky uskutečňují za účasti tří blízkých aminokyselin (Ser-65, Tyr-66, Gly-67). Absorpční vlastnosti GFP závisejí na protonačních stavech chromoforu, což vede ke dvěma absorpčním maximům ve spektru excitace. Obrázek byl převzat a upraven z [34].

U původního divokého kmene GFP z medúzy *Aequorea victoria* existuje chromofor ve dvou formách: protonované (neutrální) a deprotonované (aniontové). Protonovaná forma absorbuje světlo kolem 400 nm a teoreticky by mohla emitovat modré světlo (~460 nm). Intenzity těchto maxim se mění v závislosti na podmínkách prostředí, což naznačuje přítomnost více základních stavů proteinu [32,33,36]. Ve většině případů však dochází k přenosu protonu v excitovaném stavu (ESPT- *exited state proton transfer*), kdy chromofor po excitaci ztrácí proton a část energie se uvolňuje. Následně chromofor emituje zelenou fluorescenci, která má emisní spektrum stejné jako u aniontové formy. Tento efekt byl využit k vytvoření proteinů s velkým Stokesovým posunem, které mají excitační vrchol kolem 400 nm a fluorescenční emisi v zelené oblasti nad 500 nm [34].

Chromofor podobný GFP může vykazovat odlišné spektrální vlastnosti v závislosti na svém molekulárním prostředí; jeho emise obvykle nedosahuje červeného posunu nad 540 nm (žluté světlo). Pro dosažení výraznějšího červeného posunu musí projít dalšími

kovalentními úpravami. Tyto změny vedly ke vzniku několika dalších přirozeně se vyskytujících struktur, z nichž nejběžnější jsou chromofory DsRed a Kaede, emitující světlo v červené oblasti spektra.

1.2.2 Barevné varianty fluorescenčních proteinů

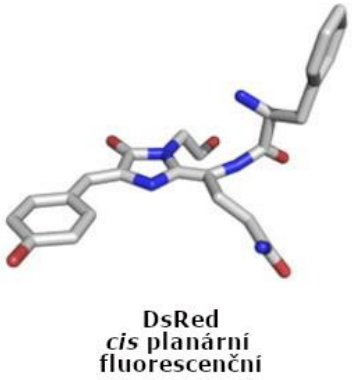
Možnost použití barev jiné než zelené je obzvláště cenná pro sledování různých genů nebo fúzních proteinů současně, případně pro vytvoření párů donorů a akceptorů v procesech přenosu fluorescenční rezonanční energie. K dispozici jsou nyní mutanty GFP, které pokrývají téměř celé spektrum světla od zelené až po infračervenou, avšak žádné nepřekračují emisní maximum 529 nm. Byly vytvořeny mutantní deriváty s upravenými excitačními a emisními vlnovými délkami, různou stabilitou, odolností vůči fotoblednutí (*photobleaching*), citlivostí na environmentální podněty a dále specifické molekuly, které mohou ovlivnit fluorescenční vlastnosti těchto proteinů. Zásadním průlomem v oblasti delších vlnových délek u fluorescenčních proteinů bylo klonování šesti fluorescenčních proteinů z korálů, přičemž tyto proteiny mají pouze 26–30% shodu s *Aequorea* GFP. Přesto bylo zachováno dostatek klíčových prvků, které dokládají, že i korálové proteiny mají strukturu podobnou GFP s 11 vlákny β-helixů. Důležité zbytky Tyr-66 a Gly-67, které přispívají ke vzniku chromoforu v GFP, stejně jako polární zbytky Arg-96 a Glu-222, byly rovněž nalezeny v korálových proteinech. Většina těchto proteinů má emisní maxima v rozsahu GFP nebo jeho mutantních variant. Jeden z těchto proteinů, nazvaný drFP583 nebo komerčně DsRed, pochází z druhu *Discosoma* a má emisní a excitační maxima při 558 a 583 nm, což je nejvyšší hodnota zaznamenaná u přírodního fluorescenčního proteinu. V tomto proteinu odpovídají aminokyseliny Tyr-67, Gly-68, Arg-95 a Glu-215 podobným zbytkům nalezeným v GFP. Široká barevná rozmanitost mezi korálovými proteiny přitahuje značný vědecký zájem, přestože většina současného výzkumu se zaměřuje především na praktické využití těchto proteinů jako markerů v systémech heterologní exprese [37].

Substituce zbytků, které jsou v kontaktu s Tyr-66 chromoforu, mohou výrazně ovlivnit excitační a emisní spektra, a dokonce umožnit fotopřepínání mezi různými stavy. Mutagenezí v těchto pozicích byly vytvořeny užitečné mutantní varianty, jako například žluté varianty GFP s mutací Thr-203-Tyr, které vedly k červenému posunu spekter. Jiná aminokyselina na stejné pozici, např. Ile nebo His, stabilizuje chromofor s modrým posunem, jak je vidět u variant GFP Sapphire nebo PA-GFP. Červený FP DsRed byl změněn na nefluorescenční variantu pomocí mutací Ser-148-Cys, Ile-165-Asn, Lys-167-Met a Ser-

203-Ala. Některé proteiny, jako FP595 nebo Dronpa, přirozeně vykazují reverzibilní fotopřepínání, což je ovlivněno právě těmito pozicemi [34].

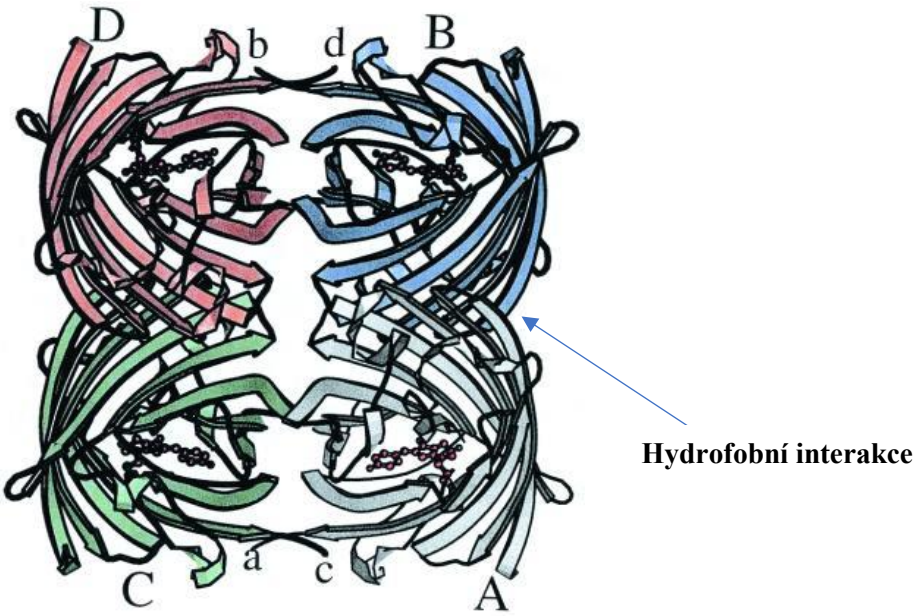
1.2.3 Červený fluorescenční protein DsRed

DsRed je fluorescenční protein izolovaný z nefotosyntetického organismu rodu *Discosoma*, který nachází uplatnění v biotechnologiích, například při průtokové cytometrii, často jako doplněk k zelenému fluorescenčnímu proteinu (GFP). DsRed je tetramerní polypeptid o velikosti 28 kDa, který sdílí téměř identický chromofor s avGFP, autokatalyticky vznikající z tripeptidu Gln-Tyr-Gly (aminokyseliny 66–68 v sekvenci proteinu divokého typu). Chromofor DsRed má *cis*-planární konformaci a vzniká další oxidací (za účasti molekulárního kyslíku) vazby Cα-N u zbytku na pozici 65, což vede ke vzniku acyliminové skupiny. Tato chemická modifikace rozšiřuje konjugovaný π-systém, čímž dochází k posunu excitačního a emisního spektra k delším vlnovým délkám. Přestože celková podobnost aminokyselinové sekvence s avGFP je relativně nízká, asi 23 %, některé klíčové aminokyseliny v okolí chromoforu jsou vysoce konzervované a pravděpodobně nezbytné pro jeho správnou funkci [28,34].



Obrázek 8. Prostorová struktura chromoforu FP DsRed. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy dusíku jsou modré, atomy kyslíku jsou červené. Obrázek je převzat z [34].

Každý monomer DsRed interaguje se dvěma sousedními proteinovými molekulami prostřednictvím dvou různých rozhraní. První je hydrofobní, tvořené těsně uspořádanými hydrofobními zbytky obklopenými polárními postranními řetězci (viz obr. č. 9). Druhé, hydrofilní rozhraní, je charakterizováno mnoha vodíkovými vazbami a solnými můstky mezi polárními zbytky a obsahuje skryté molekuly vody. Toto rozhraní je navíc stabilizováno strukturou vytvořenou C-terminálními zbytky každého monomeru [34].



Obrázek 9. Stužkový model tetrameru DsRed, převzatý z [28]. Monomery jsou označeny velkými písmeny A–D a C-konce jsou označeny malými písmeny a–d. N-konce jsou v tomto pohledu zakryté. Chromofory jsou uspořádány antiparalelně v párech. Chromofory v tetrameru tvoří pravoúhlé pole podobné anténě o rozměru ≈ 2,7 × 3,4 nm, což umožňuje silnou vazbu mezi chromofory. Mezi různými páry tetrameru jsou úhly 21°, 47° a 41°, což umožnuje přenos energie mezi různými podjednotkami [38].

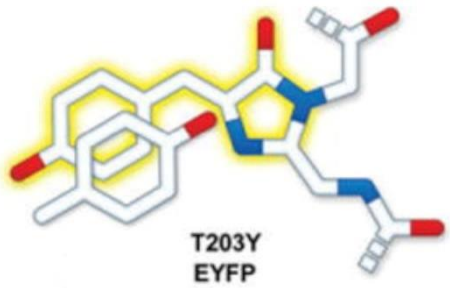
DsRed má několik výhodných vlastností, včetně vysokého extinkčního koeficientu, vysokého kvantového výtěžku, jasně červené barvy a vynikající odolnosti vůči změnám pH a fotoblednutí. Jeho emisní maximum 583 nm lze dále posunout až na 602 nm mutací Lys-83 na Met pomocí bodového mutantu Lys-83-Met, což z něj činí ideálního kandidáta pro použití ve výzkumu, kde jsou potřebné různé fluorescenční značky; je to jedna z nejdelších vlnových emisi dosud hlášených u divokého typu. Absorpční spektrum maturovaného DsRed proteinu vykazuje výrazný vrchol při 558 nm a dva vedlejší vrcholy při 526 a 490 nm [37,38].

Navzdory těmto pozitivním vlastnostem má DsRed tři hlavní nevýhody: obligátní oligomerizaci, tvorbu nekompletních oligomerů a pomalou maturaci. Protein silně oligomerizuje i při nízkých koncentracích, což znamená, že tvoří tetramery, jak bylo prokázáno analytickou ultracentrifugací a testy v živých buňkách a v kvasinkách. Tato oligomerizace může ovlivňovat správnou funkci proteinu tím, že bude docházet k nežádoucí asociaci s proteiny, ke kterým je DsRed kovalentně připojen (např. membránové proteiny). Tato skutečnost může vest k omezení použití DsRed ve vědeckých experimentech [28,37]. Dalším problémem je velmi pomalý a potenciálně neúplný proces maturace DsRed. Maturace, tj. proces, při kterém protein získává schopnost fluoreskovat, může probíhat

několik dní, během nichž se barva fluorescence mění z původní zelené fluoreskujícího meziproduktu na červený produkt. Pomalá maturace je způsobena přítomností bodových mutací např. Lys-70-Met a Lys-83-Arg, které brání dokončení procesu po zelené fázi. Existují taky mutace, jako například Lys-83 na Arg, které mohou proces maturace zcela zastavit, což by mohlo být v určitých aplikacích nevýhodné. Kromě toho maturace vyžaduje molekulární kyslík, jelikož poslední krok tohoto procesu zahrnuje oxidaci vazby mezi dusíkem Gln-66 a α-uhlíkem za vzniku acyliminu, který je nezbytný pro konjugaci chromoforu [28,37].

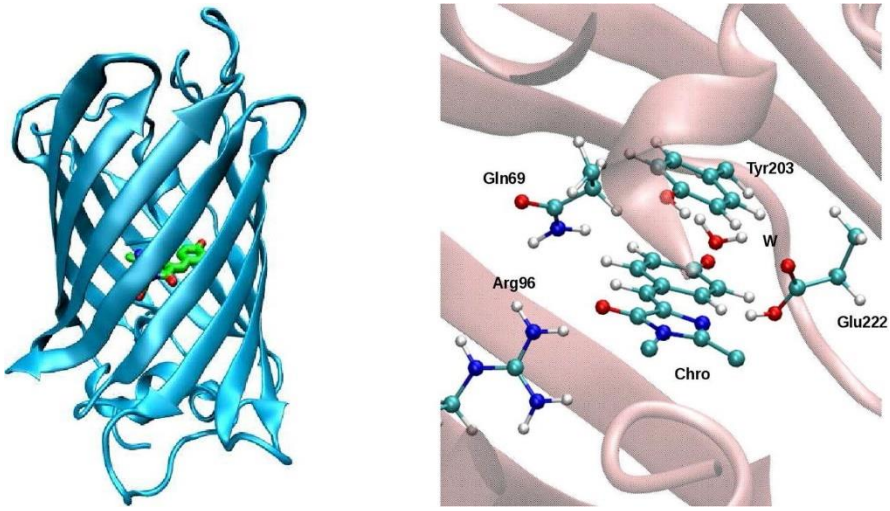
1.2.4 Žlutý fluorescenční protein YFP

YFP je žlutý fluorescenční protein o molekulové hmotnosti 27 kDa, který byl vytvořen mutací druhu *Aequorea victoria*. Obsahuje tyrosin na pozici 203 a 66, které společně interagují prostřednictvím π-π interakce v rámci planárního skeletu chromoforu, čímž je zajištěna charakteristická žlutá fluorescence [34,39].



Obrázek 10. Struktura chromoforu YFP, u kterého dochází k vrstvení (*stacking*) tyrosinů na pozici 203 a 66. Obrázek je převzat a upraven z [27].

Mutace Tyr-203 byla do zavedena cíleně na základě analýzy jeho krystalové struktury. Krystalografické studie potvrdily π-π interakci mezi Tyr-203 a Tyr-66 v chromoforu, což vedlo k výraznému červenému posunu spekter, s excitačním a emisním maximem při 515/528 nm, což je nejdelší emisní vlnová délka ze všech dosud zkoumaných variant GFP. V následujících letech bylo vytvořeno několik vylepšených žlutých variant fluorescenčních proteinů, které jsou dnes široce využívány [34].



Obrázek 11. Vlevo je struktura YFP, vpravo chromofor YFP a postranní řetězce sousedních aminokyselin. Obrázek byl převzat z [40].

1.2.5 Využití fluorescenčních proteinů

FP se staly nezbytnými nástroji pro sledování genové exprese, dynamiky proteinů a chování buněk v tkáních a organismech. Kromě toho posloužily jako základ pro vývoj geneticky kódovaných biosenzorů, které umožňují detekci malých molekul, biochemických sloučenin a změn prostředí v komplikovaných biologických podmínkách. Nicméně tradiční FP, zejména ty s kratšími emisními vlnovými délkami, čelí významným omezením, jako je interference autofluorescence, rozptyl světla, absorpce hemoglobinem a omezená penetrace do tkání. Tato omezení snižují spolehlivost FP jako nástrojů v biologických aplikacích [41].

GFP, jeho barevné varianty a homology jsou dnes široce využívány k výzkumu struktury a funkcí živých systémů. FP kódované společně se studovanými proteiny umožňují sledovat jejich lokalizaci, pohyb, obnovu a stárnutí od doby jejich syntézy. Nukleové kyseliny mohou být značeny pomocí proteinových domén, které se vážou na RNA nebo DNA. FP cílené na organely v buňkách prostřednictvím specifických lokalizačních signálů umožňují vizualizaci struktury organel, jejich dělení, fúze, segregace při buněčném dělení a dalších procesů. FP jsou také klíčovým nástrojem pro označování jednotlivých buněk a tkání, což usnadňuje sledování jejich tvaru, umístění a pohybu, například během embryonálního vývoje, růstu nádorů nebo průběhu mitózy a dalších důležitých buněčných procesů [34].

FP navíc umožňují vizualizovat interakce mezi proteiny v živých buňkách a sledovat aktivaci a deaktivaci cílových promotorů, společnou aktivaci dvou promotorů a historii aktivace promotorů na úrovni celého organismu. Fluorescenční senzory na bázi FP jsou

navrženy tak, aby odrážely změny ve spektrálních vlastnostech v závislosti na prostředí. Geneticky kódované senzory umožňují sledování aktivity specifických enzymů, jako jsou proteinkinázy a proteázy, a měření koncentrace intracelulárních iontů, metabolitů a signálních molekul (např. H^+, Ca^{2+}, Cl^-, H_2O_2, cAMP atd.), spolu s dalšími buněčnými parametry [34,35].

Novou a rychle se rozvíjející oblastí je použití FP k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) indukovaných světlem. To umožňuje lokální inaktivaci cílových proteinů, selektivní ničení buněk a studium intracelulární signalizace prostřednictvím ROS. Tento rozsáhlý soubor FP technologií má uplatnění nejen v základním výzkumu, ale také pro testování potenciálních léků a preklinické studie [34].

1.3 Průtoková cytometrie

1.3.1 Obecný přehled metody

Průtoková cytometrie je bioanalytická metoda, která vychází z imunochemických principů a interakce mezi světlem a fluorochromy značenými částicemi. Využívá kombinaci rozptylu a odrazu světla spolu s detekcí fotonů emitovaných aktivovanými fluorochromy. Průtoková cytometrie je důležitá díky své schopnosti analyzovat nejen průměrné molekulární charakteristiky buněčné populace, ale i individuální parametry jednotlivých buněk [42]. Klinický význam této metody je dnes značný a její neustále se rozšiřující aplikační potenciál sahá daleko za hranice biomedicínského využití [43].

Původně byl průtokový cytometr vyvinut jako jednoparametrový přístroj, který sloužil pouze k detekci velikosti buněk. Tato technika byla poprvé použita v roce 1950 k měření objemu buněk ve vzorku. V současné době je průtoková cytometrie mocným nástrojem s mnoha aplikacemi v oblastech jako imunologie, virologie, molekulární biologie, biologie nádorového bujení, biologie kmenových buněk, metabolické inženýrství a sledování infekčních onemocnění [44]. Jedná se o vysoce účinnou metodu pro analýzu komplexních molekulárních fenotypů v buněčných populacích a pro měření buněčných procesů, jako jsou proliferace, apoptóza a diferenciace buněk. Průtoková cytometrie je obzvlášť užitečná pro studium imunitního systému a jeho reakcí na infekční onemocnění a rakovinu, diagnostiku primárních a sekundárních imunodeficiencí, hematologických malignit a indikaci vhodných biologických terapií. Tato technologie umožňuje současnou charakterizaci smíšených populací buněk z krve, kostní dřeně a pevných tkání, které lze analyzovat po jednotlivých buňkách. Technologie poskytuje rychlé multiparametrické komplexní kvantitativní a

kvalitativní analýzy jednotlivých buněk v suspenzi, přičemž výsledky mohou být extrahovány buď z kinetických měření, nebo z měření v jednom koncovém bodě [45,46].

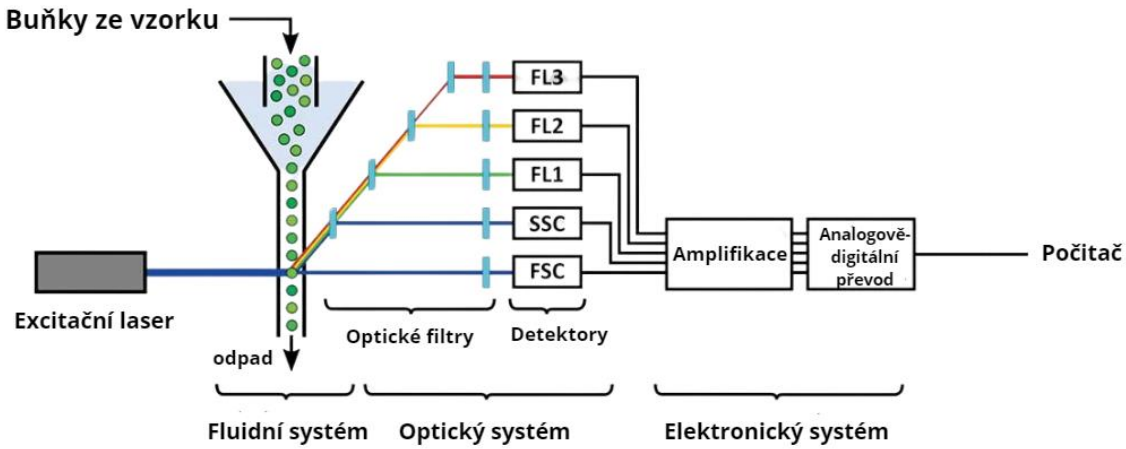
Charakteristické vlastnosti průtokové cytometrie jsou následující: a) vysoká rychlost detekce – během krátké doby dokáže analyzovat desítky tisíc buněk, což poskytuje spolehlivé statistické výsledky; b) schopnost současně měřit více parametrů – může detekovat rozptyl světla a různé fluorescenční signály pro každou buňku, přičemž zvládne analyzovat až 20 parametrů u každé buňky rychlostí až 100 000 buněk za sekundu; c) rychlá analýza a přesné třídění – umožňuje rychlé třídění jednotlivých buněk z různých populací, přičemž většina buněk zůstává životaschopná [5].

Průtoková cytometrie funguje na principu rozptylu světla a emise fluorescence, ke kterým dochází, když excitační světlo (obvykle z laseru) zasáhne částice, které se pohybují v proudu kapaliny. Částice o velikosti v rozmezí 0,5 až 40 μm jsou analyzovány, když procházejí individuálně v proudu kolem jednoho či více laserů. Světlo rozptýlené těmito částicemi je snímáno detektory bočního (SSC – *side scatter*) a dopředního (FSC – *forward scatter*) rozptylu. Fluorescenční světlo emitované značenými částicemi je detekováno dalšími optickými senzory. Zachycené fotony jsou převáděny na elektrické signály, které jsou následně digitalizovány a analyzovány ve formě histogramů nebo bodových grafů (*dot plotů*) [5,43,47].

Rozptyl světla je přitom nezávislý na fluorescenci. Vzorky se připravují na měření fluorescence různými způsoby, jako je transfekce a exprese FP, barvení fluorescenčními barvivy (např. propidiumjodid) nebo pomocí fluorescenčně značených protilátek (např. CD3 FITC) [47,48].

Jedním z typů tradičního průtokového cytometru je tzv. třídění buněk (*cell sorting*). Tento systém umožňuje vybrat buňky nebo částice, které splňují specifikované parametry (buď pozitivní, nebo negativní), a následně je směrovat do sběrné nádoby. Buňky jsou separovány pomocí oscilace proudu vzorku kapaliny při vysoké frekvenci, čímž se vytvářejí kapky. Tyto kapky následně získávají buď kladný, nebo záporný náboj a procházejí kovovými vychylovacími deskami, které je na základě jejich náboje nasměrují do určené sběrné nádoby. Sběrné nádoby mohou být například zkumavky, sklíčka nebo destičky, přičemž běžně se používají 96-jamkové nebo 384-jamkové destičky [47].

Tradiční průtokové cytometry se skládají ze tří hlavních komponent (viz obr. č. 12): fluidiky, optiky a elektroniky (kde dochází k ukládání a analýze získaných dat). Některé průtokové cytometry s třídicími funkcemi navíc mají také třídicí systémy [5].



Obrázek 12. Toto schéma představuje tradiční konstrukci průtokového cytometru včetně typického fluidního systému a osvětlovacího laseru spolu s detektory SSC a FSC a tříkanálovou fluorescenční detekcí. Mnoho moderních průtokových cytometrů používá více osvětlovacích laserů a více než tři kanály pro detekci fluorescence. Obrázek je převzat z [49].

1.3.2 Fluidní systém

Většina měření prováděných na průtokovém cytometru probíhá opticky, což vyžaduje přesné umístění částic vzorku v proudu nosné kapaliny. K dosažení tohoto cíle se využívá princip hydrodynamické fokusace, který zahrnuje zavedení proudu nosné kapaliny do měřicí komory. Tento proud má vyšší rychlost proudění (přibližně 5 ml/min) než vzorek (cca 0,1 ml/min), čímž je vzorek stlačován a udržován v centrální části proudu nosné kapaliny. Za podmínek laminárního proudění se tekutina obsahující vzorek nemísí s nosnou kapalinou, ale vytváří koaxiální proudění. Kombinovaný proud tekutin, tedy vzorku a nosné kapaliny, prochází kónicky zúženou sekcí, kde dochází ke snížení průměru proudu a současnému zvýšení rychlosti proudění obou tekutin před dosažením oblasti senzorů. Uzavření částic do úzkého proudu umožňuje stabilizaci jejich dráhy při průchodu měřicí oblastí, což zajišťuje jednotné osvícení částic laserem a vysokou konzistenci naměřených dat [43].

Rychlost průtoku nosné kapaliny, a tedy i počet analyzovaných částic za jednotku času, lze uživatelsky upravovat. Při zkracování doby analýzy zvýšením rychlosti proudění je však nutné počítat s možným nárůstem nepřesnosti měření. Fluidní systém průtokového cytometru zahrnuje nosnou kapalinu, obvykle pufrovaný fyziologický roztok, který je pod tlakem nesen k laserovému detekčnímu systému – měřicí komoře, kde dochází k samotné analýze. Tento systém zajišťuje, že vzorek je přesně a konzistentně přiváděn do oblasti detekce, což je klíčové pro spolehlivost a přesnost výsledků průtokové cytometrie [43].

1.3.3 Optický systém

Optický systém cytometru zahrnuje excitační a sběrné optické prvky, přičemž excitační optiku tvoří světelný zdroj (typicky laser) a optické komponenty, které koncentrují a směrují paprsek do bodu měření. Většina komerčně dostupných cytometrů je vybavena lasery, nejčastěji vzduchem chlazeným argonovým laserem s výkonem 10–25 W a vlnovou délkou 488 nm, což umožňuje současnou excitaci několika fluorochromů. Pro výzkumné aplikace jsou dostupné i další lasery, jako kryptonový nebo helium-neonový, které rozšiřují možnosti vícebarevného měření díky schopnosti excitovat více fluorochromů [43,47].

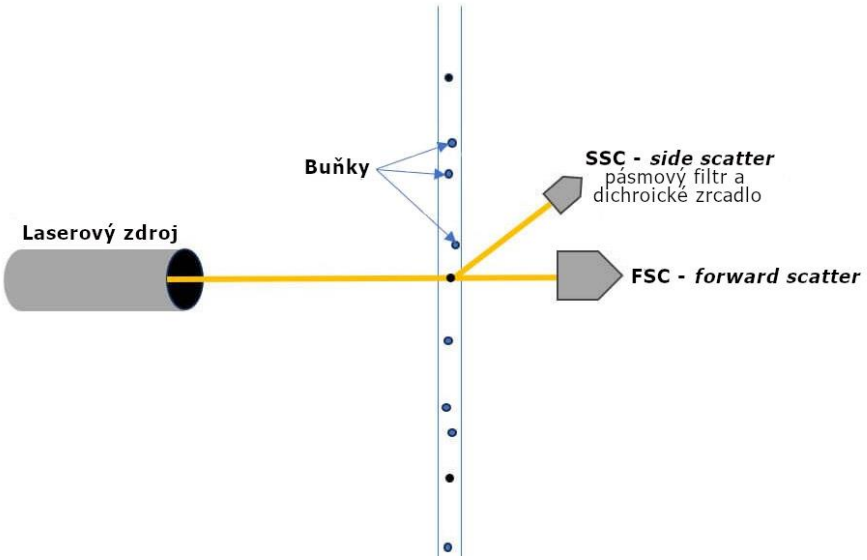
Sběrná optika sestává z čoček, které koncentrují fotony rozptýleného a emisního světla, a ze zrcadel a filtrů, které dělí a směrují světlo různých vlnových délek na specifické detektory, jako jsou fotonásobiče (PMT) a fotodiody. Při vícebarevné analýze je zásadní znalost Stokesova posunu u každého fluorochromu, protože jejich emisní spektra se mohou překrývat, což může vést k detekci emisního světla jednoho fluorochromu více detektory a k chybám měření [43,47].

Optický systém zahrnuje dichroické filtry, které propouštějí specifické vlnové délky světla a odrážejí ostatní pod úhlem, a pásmové filtry, které izolují úzké spektrum vlnových délek. Například pásmový filtr 450/50 propouští světlo s vlnovou délkou 450 nm ± 25 nm, které je pak detekováno. Nejčastěji používané lasery v cytometrech vyzařují světlo o vlnových délkách 488 nm (modrá), 405 nm (fialová), 532 nm (zelená), 552 nm (zelená), 561 nm (žlutozelená), 640 nm (červená) a 355 nm (ultrafialová), přičemž jsou k dispozici i další vlnové délky pro specifické aplikace [47].

1.3.4 Elektronický systém

Elektronický systém průtokového cytometru převádí signály z detektorů do digitálního formátu, čitelného počítačem, což umožňuje paralelní detekci několika parametrů na jedné buňce. Tato vícebarevná technologie dramaticky zvyšuje analytickou hodnotu, jelikož umožňuje měření více znaků najednou [47]. Jednotlivé částice jsou hodnoceny podle rozptylu viditelného světla a jednoho či více fluorescenčních parametrů. Při měření dochází k interakcím mezi analyzovanými částicemi a světelným zářením, konkrétně mezi fluorescenční značkou navázanou na protilátku a dopadajícím zářením, a dále k ohybu, odrazu, rozptylu a absorpci světla (tzv. *light scatter*). V rámci praktické cytometrie má z těchto jevů největší význam fluorescence, díky níž lze přesně identifikovat antigen, proti kterému je značená protilátka namířena. Parametry rozptylu světla pak závisejí na

fyzikálních vlastnostech částice, zejména její velikosti, komplexitě a denzitě obsahu (dané jádrem, membránovými organelami a granulárním materiálem). Rozptyl světla je rozdělen na FSC a SSC (viz obr. č. 13). FSC je měřen fotodiodou v rovině procházejícího světla a indikuje relativní velikost buňky. SSC je měřen pod úhlem 90° vůči směru průchozího světla. SSC odráží komplexitu a granularitu vnitřní struktury buňky [43,47,50].



Obrázek 13. Schéma umístění detektoru pro FSC a SSC. Dichroická zrcadla a pásmové filtry se používají k sériové izolaci specifických rozsahů vlnových délek pro detekci. Obrázek je převzat z [51].

Pokročilé systémy mohou současně analyzovat až 20 parametrů (FSC, SSC a dalších 18 fluorescenčních detektorů), což umožňuje simultánní detekci více fluorescenčních značek současně [47].

Kombinací hodnot FSC a SSC lze částice zobrazit ve dvojrozměrném bodovém grafu (*dot plot*) na osách x (FSC) a y (SSC), což umožňuje rozlišení částic podle jejich velikosti a denzity vnitřního obsahu. Intenzivnější signály FSC jsou měřeny fotodiodami, zatímco méně intenzivní SSC a fluorescenční signály jsou zachycovány fotonásobiči. Fotony dopadající na detektory jsou převedeny na elektronový tok, jehož signál je následně zesílen na měřitelné hodnoty elektrického proudu. Ten je následně převeden na napěťový pulz, jehož amplituda odpovídá počtu detekovaných fotonů [43].

Nárůst dostupných činidel v posledních letech vedl k výraznému zvýšení počtu parametrů, které lze používat v experimentech průtokové cytometrie. Bylo zaznamenáno dramatické rozšíření výběru fluoroforů, které se používají ke konjugaci monoklonálních

protilátek, včetně tandemových a polymerních barviv. Navíc se zvýšil počet fluorescenčních proteinů určených pro transfekci mimo GFP, jako jsou mCherry, mBanana, mOrange, mNeptune a další [47].

2. CÍLE PRÁCE

- rešerše shrnující současné poznatky o galektinech, jejich výskytu a biologických funkcích v lidském organismu
- produkce fluorescenčních galektinů DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 v *E. coli*
- purifikace fluorescenčních galektinů afinitní chromatografií pomocí histidinové kotvy
- testování vazby galektinů na povrch nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie
- studium inhibice vazby galektinů na povrch nádorových buněk za použití sacharidových inhibitorů

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a materiály

V tomto oddíle je uveden seznam zařízení, reagencií a materiálů použitých při experimentech.

3.1.1 Seznam použitých chemikálii

- Akrylamid (VWR Chemicals, Česká republika);
- Ampicilin (Serva Electrophoresis GmbH, Německo);
- 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);
- Dithiothreitol (DTT), (Sigma-Aldrich, USA);
- Dodecylsíran sodný (SDS), (Serva Electrophoresis, Německo);
- *E. coli* Rosseta 2 (DE3) pLysS (Novagen, USA);
- Ethanol (VWR Chemicals, Česká republika);
- Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), (Sigma-Alrich, USA);
- Fluorescenční protein DsRedM (k dispozici na školicím pracovišti);
- Fluorescenční protein eYFP (k dispozici na školicím pracovišti);
- Glycerol dvakrát destilovaný 99,5% (VWR Chemicals, Česká republika);
- Hmotnostní pravítko – *Invitrogen Mass DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, USA);
- HOECHST 33258 (Thermo Fisher Scientific, USA);
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, Česká republika);
- Chloramfenikol (Fluka, Švýcarsko);
- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika);
- Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid (IPTG), (Sigma Aldrich, USA);
- Kvasničný extrakt (VWR, USA);
- Kyselina ethylendiamintetraoctová; EDTA (Carl Roth, Německo);
- Kyselina octová (Lachema, Česká republika);
- Laktóza (Lachema, Česká republika);

- Methanol (VWR, USA);
- Náplň do kolony *Ni-NTA Agarose* (MCLAB, USA);
- Persulfát amonný (Sigma-Aldrich, USA);
- Plazmid Gal-1 (His_6DsRedmGal-1C2S) (k dispozici na školicím pracovišti);
- Plazmid Gal-3 (His_6eYFPGal-3) (k dispozici na školicím pracovišti);
- Rekombinantní protein Gal-3 (k dispozici na školicím pracovišti);
- Tetramethylenethylendiamin (TEMED), (Sigma-Aldrich, USA);
- Tris-Cl (Sigma-Aldrich, USA);
- Trypton (Oxoid, Česká republika).

3.1.2 Seznam roztoků a médií

- 0,1M PMSF v ethanolu;
- 5 × Elektrodový pufr (1 l) - 5 g SDS; 15 g Tris; 94 g glycinu;
- 5 × Vzorkový pufr (5 ml) - 0,151 g Tris; 0,3855 g DTT; 0,5 g SDS; 0,025 g bromfenolové modři; 1,25 ml glycerolu;
- Barvicí roztok- 0,5 g *Coomasie Brilliant Blue*; 90 ml methanolu; 10 ml kyseliny octové; 90 ml H_2O;
- Bradfordovo činidlo – 0,01% *Coomassie Brilliant Blue* G-250; 4,7% ethanol; 8,5% kyselina fosforečná v destilované vodě;
- Bradfordovo činidlo (ředěno 1:4 destilovanou vodou) – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA);
- Ekvilibrační pufr (2 l) – 14,32 g 20mM $Na_2HPO_4.12H_2O$; 58,44 g 500mM NaCl; 2,72 g 20mM imidazolu; pH 7,4;
- Eluční pufr (1 l) – 7,16 g 20mM Na_2HPO_4; 29,22 g 500mM NaCl; 2,72 g 500mM imidazolu; pH 7,4;
- EPBS (7 l) - 5,2 g 20mM EDTA, 61,32 g 0,15M NaCl; 48,3 g 0,05M $NaH_2PO_4.H_2O$; pH 7,5 (Carl-Roth, Německo);
- LB (Luria-Bertani) medium (1 l) – 10 g tryptonu; 5 g kvasničného extraktu; 10 g NaCl;
- LBA médium (100 ml) – 1 g tryptonu; 0,5 g kvasničného extraktu;
- Nízkomolekulární proteinové pravítko – *Amersham LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Velká Británie);
- Odbarvovací roztok – 350 ml ethanolu; 550 ml H_2O; 100 ml kyseliny octové;

- PBS (7 l) – 61,32 g 0,15M NaCl; 48,3 g 0,05M $NaH_2PO_4.H_2O$; pH 7,5 (Carl-Roth, Německo);
- Pufr pro FACS - 1% BSA/PBS;
- Roztok laktózy - 800 mM; 0,2882 g laktózy bylo rozpuštěno v 1 ml 1% BSA/PBS pufru;
- RPMI medium (500 ml) -100 ml 5 × RPMI média, 200 ml vody pro tkáňové kultury; 5 ml 3% L-glutaminu; 5 ml 1% zásobního roztoku penicilin-streptomycinu; 50 ml 10% FBS; 13 ml 7,5% $NaHCO_3$ (přidává se poslední);
- Separační gel (10%) – 4,0 ml H_2O; 3,3 ml 30% akrylamidu; 2,5 ml Tris-Cl pH 8,8; 0,1 ml 10% SDS; 0,1 ml 10% $(NH_4)_2S_2O_5$; 0,004 ml TEMED;
- TB (*Terrific Broth*) medium (2,4 l) – 57,6 g kvasničného extraktu; 28,8 g tryptonu; 9,6 ml glycerolu; 5,6 g KH_2PO_4; 30 g K_2HPO_4;
- Zaostřovací gel (5%) – 1,4 ml H_2O; 0,33 ml 30% akrylamidu mix; 0,25 ml 1,5M Tris-Cl pH 6,8; 0,02 ml 10% SDS; 0,02 ml 10% $(NH_4)_2S_2O_5$; 0,002 ml TEMED;
- Zásobní penicilin-streptomycinový roztok - 10 000 jednotek/ml penicilinu a 10 000 µg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, Česká republika).

3.1.3 Seznam komerčních setů

- *Cell Counting Kit-8* (CCK-8) (Dojindo Laboratories, Japonsko).

3.1.4 Seznam použitých přístrojů

- 0,22µm filtr (Avantor, USA);
- 0,8µm filtr (Avantor, USA);
- 96-jamková mikrotitrační destička (Thermo Scientific, USA);
- Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences, Velká Británie);
- Aparatura na SDS-PAGE (Bio-Rad, USA);
- Bürkerova komůrka (Karl Hecht GmbH & Co KG, Německo);
- Centrifugy – Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin, Eppendorf Centrifuge 5804 R, (Eppendorf, USA); Sorvall RC 6 Plus Centrifuge (Thermo Scientific, USA);
- Dialyzační střeva 10 mm (Sigma-Aldrich, USA);
- Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie);
- Lyofilizátor Lyovac GT2 (Leybold GmbH, Německo);

- Magnetická míchačka AREX (VELP Scientifica, Itálie);
- pH metr pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, ČR);
- Průtokový cytometr BD LSR II (BD Biosciences, USA);
- Purifikační kolona HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie);
- Sonikátor UP50 H Ultra Sonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie);
- Spektrofotometr: Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko);
- Termomixér Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, USA);
- Universal 320 R (Hettich, Německo);
- Váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko);
- Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie).

3.2 Produkce rekombinantních galektinů

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

Pro přípravu rekombinantních proteinů DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 byly použity buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS.

Nejprve byly kryokonzervovaná kultura kompetentních buněk Rosetta 2 *E. coli* (DE3) pLysS, které mají rezistenci na chloramfenikol, a plazmidy DsRedMGal-1 (His_6DsRedMGal-1C2S) a eYFPGal-3 (His_6eYFPGal-3) s rezistenci na ampicilin ponechány rozmrznout na ledu.

Mezitím byla do 100 ml teplého předem připraveného LBA media přidána směs antibiotik obsahující 67 µl ampicilinu (150 mg/ml v dH_2O) a 100 µl chloramfenikolu (37 mg/ml v dH_2O). 100 ml této směsi bylo rozděleno do čtyř Petriho misek a ponecháno ztuhnout.

Do dvou mikrozkumavek s buněčnými kulturami byl přidán vždy 1 ng příslušného plazmidu. Směs byla jemně promíchána a ponechána na ledu po dobu 2 min. Následně byl proveden teplotní šok – mikrozkumavky byly umístěny do termomixeru nastaveného na 42 °C a ponechány bez míchání inkubovat po dobu 30 s. Poté byly mikrozkumavky opět přeneseny na led na 2 min. Po inkubaci na ledu bylo do každé mikrozkumavky sterilně přidáno 100 µl LB media. Směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C při pomalém míchání. Po 1 hodině inkubace byly mikrozkumavky centrifugovány při 12 200 × g po dobu 10 s při 4 °C. Získaný supernatant byl zčásti odebrán pipetou (cca 50 %), zatímco zbytek byl promíchán a následně naočkován na Petriho misku s LBA médiem obsahujícím ampicilin a chloramfenikol. Misky byly ponechány přes noc v inkubátoru na 37 °C.

3.2.2 Kultivace bakterií

Druhý den bylo do čtyř Erlenmayerových baněk s LB mediem (60 ml) přidáno 40 µl ampicilinu a 60 µl chloramfenikolu (tzv. prekultura). Do těchto médií byla sterilně zaočkována jedna kolonie buněk *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS transformovaných plazmidem nesoucím gen eYFPGal-3 nebo DsRedMGal-1. Prekultury byly inkubovány při 37 °C a míchány tak, aby roztok příliš nepěnil, až do dalšího dne.

Následující den bylo do čtyř připravených Erlenmayerových baněk (3 l) s TB mediem pH 7,5 sterilně přidáno 400 µl ampicilinu a 600 µl chloramfenikolu. Pak bylo do každé baňky s TB mediem (600 ml) přidáno po 60 ml noční prekultury. Kultura byla dále

inkubována při 37 °C za pomalého míchání, dokud absorbance při 600 nm nedosáhla rozmezí 0,6 až 0,8. Poté bylo do každé baňky přidáno 600 µl 0,5M roztoku IPTG k indukci exprese proteinů a kultura byla inkubována při 25 °C za pomalého míchání do následujícího dne.

Poslední den byly bakterie centrifugovány po dobu 20 min při 7100 × g a 4 °C. Pelet byl zvážen, převeden do 50ml centrifugační zkumavky a následně zmražen při -20 °C.

3.3 Purifikace a charakterizace rekombinantních galektinů

3.3.1 Purifikace galektinů afinitní chromatografií

Purifikace fúzních konstruktů galektinů s FP a kontrolních FP nesoucích histidinovou kotvu probíhala následovně.

K rozmraženým peletám buněk obsahujícím proteiny DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 bylo přidáno 15 ml ekvilibračního pufru pro afinitní chromatografii a 500 µl 0,1 M PMSF v ethanolu (inhibitor proteas) a pelety byly resuspendovány. Suspenze byla následně sonikována – bylo provedeno 6 cyklů sonikace, přičemž každý cyklus trval 1 minutu s dvouminutovým přerušením a amplitudou 52 %. Po sonikaci byla buněčná suspenze přelita do 1,5 ml mikrozkumavek a centrifugována při 20 000 × g po dobu 25 minut a teplotě 4 °C. Supernatant z mikrozkumavek byl přenesen do 50ml centrifugační zkumavky a doplněn ekvilibračním pufrem na konečný celkový objem 50 ml. Takto zředěný roztok surového proteinu (tzv. *load*) byl následně přefiltrován přes 0,8µm filtr. Z filtrovaného vzorku bylo odebráno 200 µl pro analýzu metodou SDS-PAGE.

Plastová kolona obsahující komerční nosič s imobilizovanými niktelantými ionty (Ni-NTA; 5 ml) byla promyta filtrovanou destilovanou vodou o celkovém objemu 10 ml a následně 30 ml ekvilibračního pufru. Na promytou kolonu byl nanesen roztok surového proteinu a poté byla kolona ještě jednou promyta 30 ml ekvilibračního pufru za účelem vymytí nespecificky navázaných proteinů.

Na kolonu byl následně nanesen eluční pufr (50 ml) obsahující 500mM imidazol, kterým došlo k uvolnění navázaného proteinu. Eluované frakce byly jímány po 1,5 ml do sterilních mikrozkumavek. Po eluci byla kolona promyta 50 ml filtrované destilované vody a dále 50 ml 20% ethanolu pro skladování. V každé eluované frakci byla stanovena koncentrace proteinů dle Bradforda (viz 3.3.2). Frakce s vysokou koncentraci proteinu byly spojeny a dialyzovány 18 hodin v 7 l pufru EPBS přes noc a následně 4 hodiny v 7 l pufru

PBS. Po dialýze byl protein přefiltrován přes 0,22μm filtr a opětovně byla změřena koncentrace metodou dle Bradforda.

3.3.2 Stanovení koncentrace

Pro stanovení koncentrace produkovaného proteinu byla použita metoda dle Bradforda. Tato metoda je založena na interakci proteinů, respektive jejich bazických aminokyselin (histidin, arginin, lysin), s komerčně dostupným barvicím roztokem. Výsledek se měří spektrofotometricky při 595 nm a následně se absorbance porovnává s kalibrační křivkou. Jako kalibrační standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA) a koncentrace proteinu byla stanovena dle rovnice:

$$ABS_{595} = 0{,}16959 \times c_{protein}$$

Pro měření koncentrace byly připraveny vzorky s vhodným ředěním proteinu (20× a 100×, aby výsledná absorbance vykazovala stále lineární závislost na koncentraci proteinu) o celkovém objemu 100 μl, do kterých byl přidán 1 ml barvicího roztoku. Tato směs byla důkladně promíchána a ponechána inkubovat ve tmě za laboratorní teploty po dobu 15 minut. Absorbance byla měřena proti slepému vzorku (100 μl vody, 1 ml barvicího roztoku) při 595 nm.

3.3.3 Ověření čistoty proteinu

Stanovení čistoty galektinu bylo provedeno pomocí SDS-elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, z angl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

Nejprve bylo připraveno 15 ml 10 % separačního gelu, který byl nanesen do sestavené aparatury Bio-Rad do výše přibližně 2 cm od horního okraje. Zbylá část byla převrstvena vodou, aby nedošlo k vyschnutí gelu. Po zpolymerování při teplotě 50 °C po dobu 30 min byla voda opatrně odstraněna a na gel byl nanesen 5% zaostřovací gel (složení obou gelů viz sekce Materiál, kapitola 3.1.2.) až po okraj aparatury.

Do zaostřovacího gelu byl vložen hřebínek a poté byl gel ponechán při pokojové teplotě, aby zpolymeroval.

Vzorky byly připraveny tak, aby měl každý celkový objem 10 μl (8 μl vzorku a 2 μl barvicího roztoku). Následně byly připraveny elektrodový pufr a 5× koncentrovaný vzorkový pufr obsahující denaturační činidla DTT a SDS. SDS byl přidán za účelem

denaturace přítomných ve vzorku proteinu a udělení negativního náboje proteinu. DTT je přidáno pro redukci disulfidických můstků.

Vzorky byly inkubovány při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Do první, sedmé a dvanácté jamky SDS gelu bylo naneseno nízkomolekulární proteinové pravítko (8 µL; LMW, z anglického "*low molecular weight marker*"), zatímco do ostatních jamek vytvořených pomocí hřebínku byly pipetovány připravené vzorky. Gel byl ponořen do elektrodového pufru uvnitř elektroforetické vany. Elektroforéza byla zahájena bezpečným uzavřením vany a jejím připojením ke zdroji proudu nastaveným na hodnotu 10 mA na dobu 20 min. Pak proud byl navýšen na 15 mA a elektroforéza byla ponechána běžet přibližně jednu hodinu, než barevné čelo dosáhlo konce gelu. Po ukončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut z aparatury. Pro obarvení byl použit komerčně dostupný barvicí roztok obsahující *Coomasie Brilliant Blue*. Gel byl barven přibližně 2,5 hodiny a následně umístěn do odbarvovací lázně, aby bylo odstraněno pozadí. Nakonec byl gel vložen do obalu, oskenován a uchován v roztoku 1 % kyseliny octové.

3.4 Vazba galektinů na povrch rakovinných buněk a inhibice této vazby laktózou

3.4.1 Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii

Vazba rekombinantních fúzních konstruktů galektinů na povrch rakovinných buněk byla ověřena pomocí průtokové cytometrie. Buňky DLD1 (buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu), použité pro tento pokus, byly předem připraveny k experimentu konzultantkou Ing. Miluší Vlachovou, Ph.D. Buňky byly kultivovány v mediu RPMI a pak byly centrifugovány při 130 × g po dobu 3 minut při teplotě 25 °C. Následně bylo medium odstraněno a buněčná peleta byla resuspendována ve 2 ml 1% BSA/PBS, tzv. pufru pro FACS.

Poté bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze, aby buňky mohly být spočítány v Bürkerově komůrce. Testovaná suspenze byla nanesena mezi krycí a podložní sklo. Takto připravená počítací komůrka byla vložena do zorného pole světelného mikroskopu. Byly spočteny pouze ty buňky, které se nacházely uvnitř jednoho z devíti čtverců, a buňky, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkaly dvou stanovených stran. Tím bylo zabráněno opakovanému počítání buněk. Následně byla suspenze naředěna na koncentraci buněk

přibližně 2×10^6 buněk/ml. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo přidáno 100 µl buněčné suspenze o této koncentraci.

Byly připraveny zásobní roztoky galektinů o třech různých koncentracích: 20 µM, 10 µM a 4 µM naředěním zásobních roztoků DsRedMGal-1 (127 µM), eYFPGal-3 (23 µM) a kontrolních fúzních proteinů bez galektinové části eYFP (131 µM) a DsRedM (233 µM).

Současně byla připravena 800mM laktóza, kdy bylo 288,2 mg laktózy smícháno s 1 ml pufru pro FACS a ponechána 30 min inkubovat při 55 °C pro rozpuštění.

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo následně přidáno 50 µL suspenze buněk DLD1 (obsahující přibližně 3×10^3 buněk, s cílem dosáhnout po inkubaci výsledného množství 6×10^3 buněk na jamku), 25 µl naředěného roztoku laktózy (konečná koncentrace laktózy 100 mM a 200 mM) a 25 µl zásobního roztoku galektinu tak, aby konečná koncentrace galektinu byla 5 µM, 2,5 µM nebo 1 µM. Všechny varianty byly připraveny v triplikátu. Mikrotitrační destička s připravenými vzorky byla inkubována 1 hodinu na ledě.

Po inkubaci byly buňky centrifugovány při 130 × g po dobu 3 minut a teplotě 4 °C. Poté bylo medium odstraněno a buněčná peleta byla resuspendována v pufru pro FACS.

3.4.2 Průtoková cytometrie

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo přidáno 10 µl barviva HOECHST 33258 (výsledná koncentrace 1 mg/ml), který se váže na DNA v buněčných jádrech. V živých buňkách je struktura membrán i DNA v jádrech zachována, což znamená, že barvivo neprochází do buňky. Naopak v mrtvých buňkách je integrita jádra a membrán narušena, což vede k intenzivnímu zbarvení. Na základě fluorescenčního signálu lze tak rozlišit mrtvé a živé buňky.

Pro měření byl použit laser ve fialové oblasti spektra (405 nm OBIS solid state ,70 mW regulovaně) a filtr s fotodetektorem 450/50 nm. Průtoková cytometrie byla provedena pomocí přístroje BD LSR II a výsledky byly analyzovány pomocí programů FlowJo [52]: nejprve byly vybrány buněčné singlety, poté byly identifikovány živé buňky. Získaná data byla použita pro vytvoření histogramu fluorescence. Výsledky zahrnovaly stanovení podílu fluoreskujících buněk, analýzu oblastí s maximální fluorescencí a porovnání intenzity fluorescence.

3.5 Kontrola toxicity

Buňky DLD1 byly pipetovány do 96jamkové mikrotitrační destičky v množství 3000 buněk na jamku, přičemž počet buněk byl spočítán pomocí Bürkerovy komůrky. Buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO_2 po dobu 24 hodin, aby byl dosažen požadovaný počet 6000 buněk na jamku, což bylo po inkubaci ověřeno.

Pro dosažení vyšší koncentrace galektinů DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 v experimentu byly původní roztoky galektinů v PBS pufru dialyzovány proti RPMI médiu, aby se eliminoval vliv samotného PBS pufru na buňky. Koncentrace galektinu byla stanovena metodou dle Bradforda. Po ukončení dialýzy byly proteiny přefiltrovány přes 0,22μm filtr a koncentrace byla opětovně ověřena metodou dle Bradforda.

Následující den bylo z každé jamky mikrotitrační destičky odstraněno původní médium RPMI a bylo nahrazeno 100 μl roztoku testovaného galektinu v RPMI médiu o příslušném ředění. Použity byly následující koncentrace galektinů: DsRedMGal-1 v koncentracích 28 μl, 21 μl, 14 μl a 7 μl a eYFPGal-3 v koncentracích 36 μl, 27 μl, 18 μl a 9 μl, přičemž každá koncentrace byla testována v triplikátu. Experiment zahrnoval také kontrolní jamky obsahující pouze médium s buňkami DLD1, samotné médium bez buněk a jamky s eYFPGal-3 bez buněk, aby byla eliminována interference žlutého fluorescenčního proteinu při měření při vlnové délce 450 nm. Ze všech připravených roztoků bylo napipetováno 100 μl do buněčných suspenzí v destičce a vzorky byly následně znovu inkubovány po dobu 24 hodin za stejných podmínek (37 °C, 5% CO_2).

Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 10 μl komerčně dostupného barviva ze soupravy Cell Counting Kit-8 (CCK-8), založené na tetrazoliové soli. Tato sůl je redukována v přítomnosti elektronového donoru a vytváří ve vodě rozpustné formazanové barvivo, jehož intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu životaschopných (metabolizujících) buněk. Tento test detekuje aktivitu buněčných hydrogenáz. Po přidání detekčního barviva byla destička inkubována další 2 hodiny za stejných podmínek, poté byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Po změření absorbance jednotlivých vzorků byly získané hodnoty dále analyzovány statistickými metodami. Ke zhodnocení rozdílů v životaschopnosti buněk mezi jednotlivými experimentálními skupinami a negativní kontrolou byl použit dvouvýběrový *t*-test s nerovnými rozptyly (Welchův *t*-test).

Tento test byl zvolen z důvodu pravděpodobně odlišného rozptylu mezi porovnávanými skupinami a nízkého počtu opakování ($n = 3$). Hodnota *p*

(pravděpodobnostní hodnota) vyjadřuje, s jakou pravděpodobností může být pozorovaný rozdíl mezi skupinami výsledkem náhody. Pokud $p < 0{,}05$, rozdíl je považován za statisticky významný. Naopak, hodnota $p \geq 0{,}05$ znamená, že rozdíl není statisticky významný. *t*-Hodnota představuje testovou statistiku vyjadřující poměr mezi rozdílem průměrů dvou skupin a velikostí jejich rozptylu. Kladná *t*-hodnota naznačuje, že průměr testované skupiny je vyšší než u kontrolní. Záporná *t*-hodnota značí, že průměr testované skupiny je nižší než u kontrolní. Veškerá statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Microsoft Excel.

4. Výsledky

4.1 Produkce a purifikace galektinů

Pro produkci galektinových konstruktů DsRedMGal-1 a eYPFGal-3 byly použity buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS a plazmidy pET17b (expresní plazmid určený pro produkci rekombinantních proteinů v *E. coli* pod kontrolou T7 promotoru) nesoucí geny His_6DsRedMGal-1C2S a His_6eYFPGal-3, které byly v dispozici na pracovišti. Kultivace buněk *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS byla provedena v kombinaci LB a TB média; indukce proteinové exprese byla provedena standardně pomocí IPTG, jakmile množství narostlých buněk v médiu odpovídalo hodnotě optické hustoty 0,6-0,8.

Tabulka 2. Množství produkovaných galektinu.

Použitý plazmid	Množství získaných buněk [g]
pET17b:His_6eYFPGal-3	3,72
	3,47
pET17b:His_6DsRedMGal-1C2S	3,91
	4,16

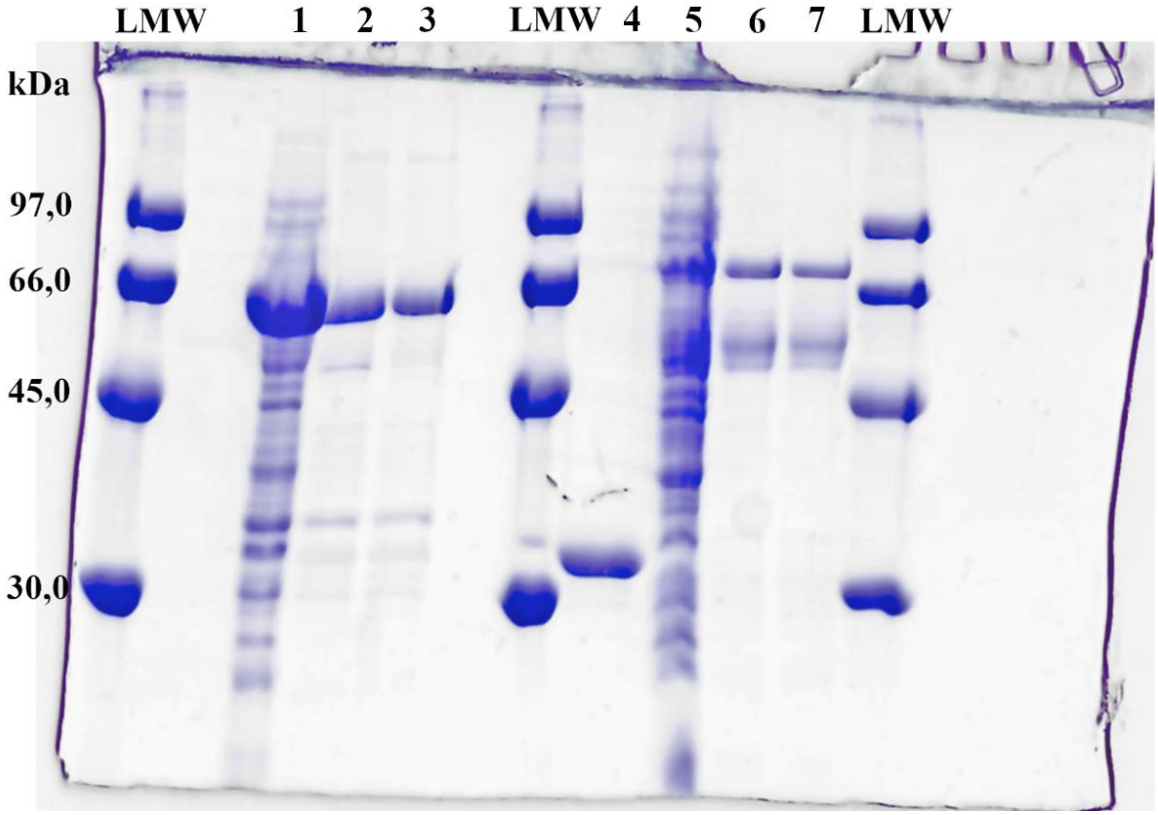
Purifikace byly provedeny s následujícím množstvím buněk: 3,72 g pro DsRedMGal-1 a 4,16 g pro eYPFGal-3. Buňky byly rozbity sonikací a následně byla provedena purifikace pomocí afinitní chromatografie na koloně s imobilizovanými nikelnatými ionty (viz kapitola 3.3.1). Po zachycení proteinů na koloně a následném promytí kolony elučním pufrem byly proteiny nesoucí histidinovou kotvu eluovány pomocí zvýšené koncentrace imidazolu. Získané frakce obsahující příslušný protein byly přelity do dialyzačního střeva a dialyzovány přes noc pro odstranění imidazolu.

Výsledkem purifikace byly proteiny DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 nesoucí histidinovou kotvu (viz tabulka č. 3).

Tabulka 3. Výsledky produkce a purifikace

Produkce			Purifikace		
Použitý plazmid	Objem použitého plazmidu [µl]	Objem TB media [ml]	Objem [ml]	Množství proteinů [mg/ml]	Hmotnost proteinů [mg]
pET17b:His_6DsRedMGal-1	1	600	15	5,5	81,8
pET17b:His_6eYFPGal-3	1	600	7	3,3	23,0

Čistota enzymů byla ověřena SDS elektroforézou. Na gel byly naneseny vzorky před purifikací, vzorky odebrané během purifikace, před provedením dialýzy a kontrolní protein Gal-3 (28 kDa) s histidinovou kotvou bez fluorescenčních proteinů. Proteinový proužek Gal-3 migruje trochu výše, než by odpovídalo molekulovému markeru, což je pravděpodobně způsobeno vysokým obsahem polárních aminokyselin v a neglobulárním charakterem N-terminální části galektinu-3, které mohou ovlivňovat separaci na SDS gelu.



Obrázek 14. SDS-PAGE analýza proteinů DsRedMGal-1 a eYFPGal-3. Na SDS-PAGE gelu je zobrazen výsledek analýzy čistoty proteinů DsRedMGal-1 a eYFPGal-3. Na horní straně gelu je označen LMW marker (*low molecular weight*), přičemž molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů jsou uvedeny vlevo (97,0 kDa, 66,0 kDa, 45,0 kDa, 30,0 kDa). Dráha 1: Vzorek lyzátu obsahující DsRedMGal-1. Dráha 2 a 3: Vzorky DsRedMGal-1 po dialýze, naneseny ve dvou různých objemech (dráha 2: 0,5 µl, dráha 3: 1 µl). Dráha 4: Gal-3 s histidinovou kotvou bez fluorescenčního proteinu.

Dráha 5: Vzorek lyzátu obsahující eYFPGal-3. Dráha 6 a 7: Vzorky eYFPGal-3 po dialýze, naneseny ve dvou různých objemech (dráha 6: 2 µl, dráha 7: 3 µl).

Obrázek č. 14 zachycuje výsledek elektroforetického rozdělení vzorků obsahujících rekombinantní proteiny DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 na polyakrylamidovém gelu v denaturačních podmínkách (SDS-PAGE). Na levé straně gelu jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinového standardu (LMW marker): 97,0 kDa, 66,0 kDa, 45,0 kDa a 30,0 kDa. Molekulová hmotnost konstruktu DsRedMGal-1 činí 54,6 kDa [53] a Gal-3eYFP přibližně 67,2 kDa [53].

Vzorek lyzátu s DsRedMGal-1 vykazuje výrazný pruh přibližně na úrovni 55 kDa, odpovídající očekávané molekulové hmotnosti konstruktu DsRedMGal-1. Zároveň jsou v tomto vzorku patrné i další pruhy, odpovídající přítomnosti kontaminujících buněčných proteinů či jejich degradačních produktů, jež byly eliminovány v následujícím purifikačním kroku. Dráhy 2 a 3 odpovídají vzorkům DsRedMGal-1 po dialýze, nanesené v objemech 0,5 µl a 1 µl. V obou případech je patrný dobře definovaný pruh v oblasti 54,6 kDa, což dokládá zachování integrity a stability proteinu po purifikačním procesu. Přestože je v těchto drahách zaznamenána i přítomnost dalších slabších pruhů, jejich intenzita je výrazně nižší než u vzorku lyzátu, což svědčí o úspěšnosti purifikace. Odhadovaná čistota výsledného proteinu: 90 %.

Dráha 4: Rekombinantní protein Gal-3 (28 kDa) s histidinovou kotvou bez fluorescenčního proteinu, který byl použit jako pozitivní kontrola. Dráha 6: Vzorek lyzátu s eYFPGal-3 vykazuje intenzivní pruh přibližně na úrovni 67,2 kDa, odpovídající očekávané molekulové hmotnosti konstruktu eYFPGal-3. Dráhy 6 a 7: Vzorky eYFPGal-3 po dialýze ukazují dominantní pruh v oblasti 67,2 kDa, což potvrzuje účinnost purifikačního postupu. Současně jsou v těchto drahách patrné slabší proužky v rozmezí 66–45 kDa, které pravděpodobně představují degradační produkty, jako např. N-terminální fragmenty vzniklé částečným proteolytickým štěpením nebo nestabilitou konstruktu během purifikace [54]. Odhadovaná čistota výsledného proteinu: 60 %.

4.2 Vazba galektinů na povrch rakovinných buněk a inhibice této vazby laktózou

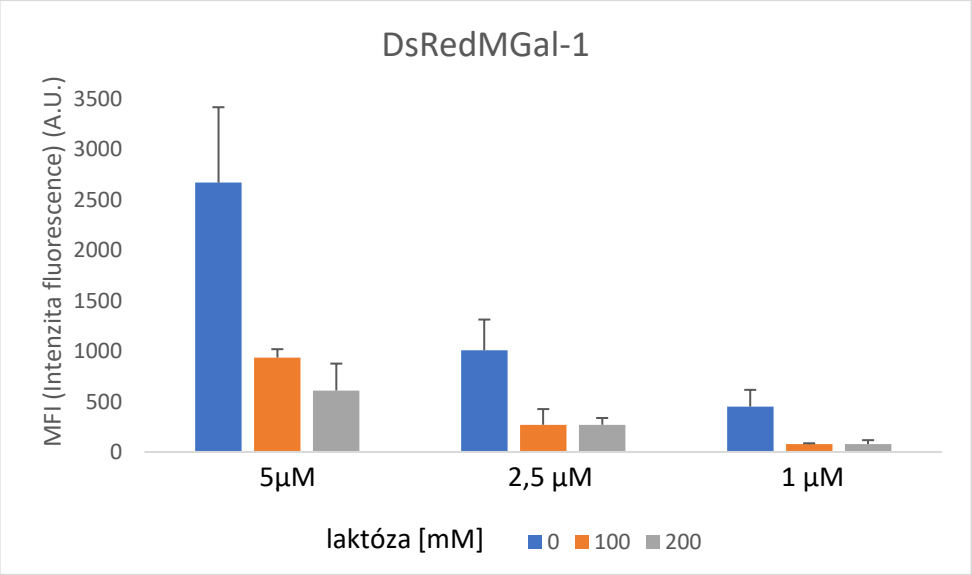
Vazba DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 na povrch buněk lidského kolorektálního karcinomu (DLD1) byla ověřena pomocí metody průtokové cytometrie.

DLD1 buňky narostlé do konfluence byly trypsinizací sejmuty z misek (prováděla konzultantka Dr. Vlachová), centrifugovány, medium bylo odstraněno a buněčná peleta byla resuspendována v pufru pro FACS. Do této buněčné suspenze byly přidány laktóza, galektiny (DsRedMGal-1 a eYFPGal-3) v různých koncentracích, nebo kontrolní fluorescenční proteiny bez galektinů DsRedM a eYFP. Po inkubaci na ledu byly buňky centrifugovány a peleta byla resuspendována v pufru pro FACS.

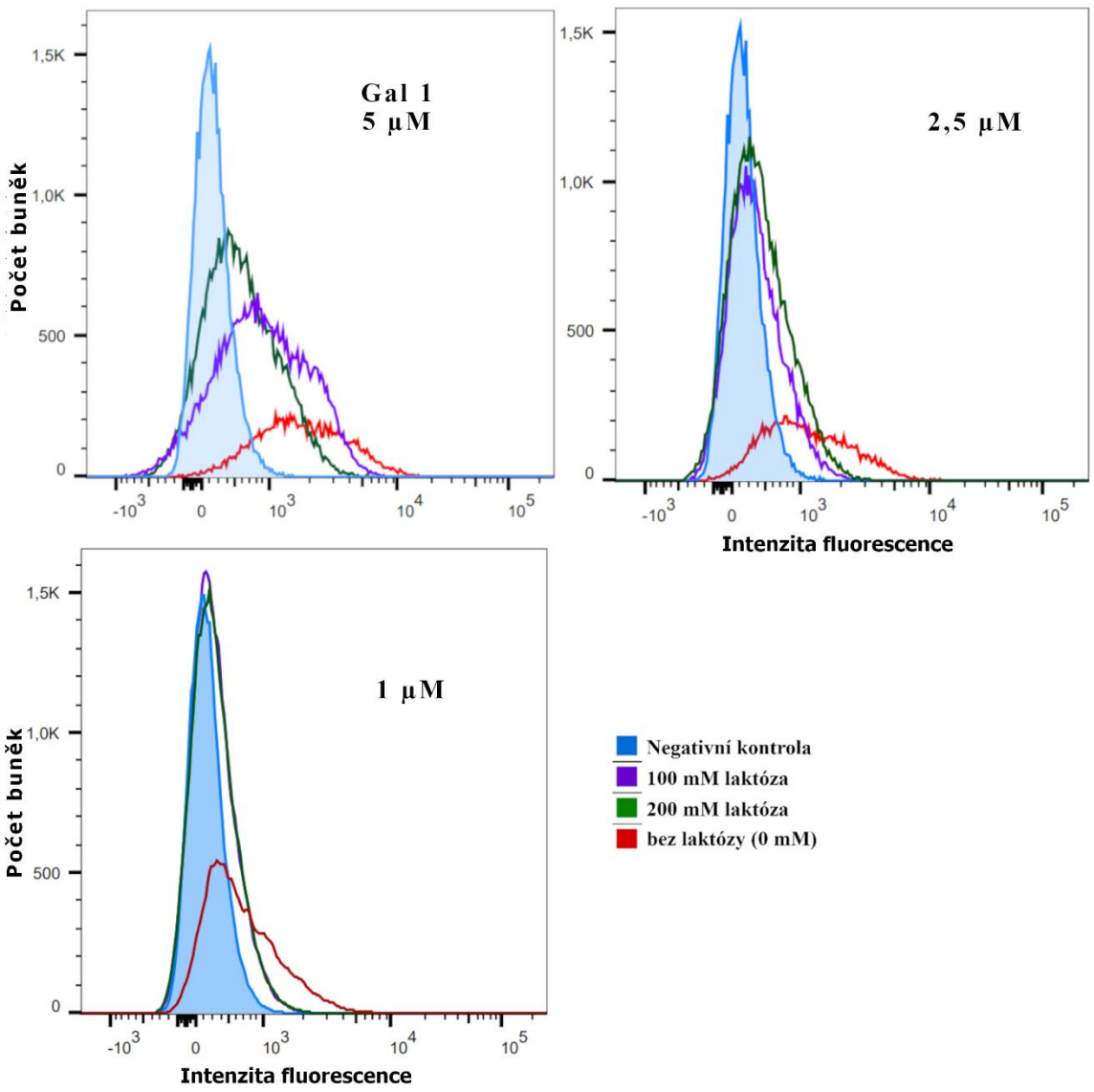
Před měřením průtokové cytometrie do každé jamky mikrotitrační destičky bylo přidáno barvivo HOECHST 33258.

4.2.1 Vazba DsRedMGal-1 na buněčný povrch a její inhibice laktózou

Analýza buněk DLD1 po inkubaci s různými koncentracemi galektinů, případně i v přítomnosti laktózy průtokovou cytometrií, odhalila závislost míry fluorescence buněk, odrážející množství navázaných galektinů, na koncentraci galektinů a koncentraci laktózy, jak ukazují grafy na obr. č. 15-16 pro DsRedMGal-1. Vyšší koncentrace galektinů v médiu vedla k vyšší hodnotě fluorescence (tj. vyššímu množství navázaných galektinů) a naopak vyšší koncentrace laktózy vedla ke snížení množství navázaných galektinů.



Obrázek 15. Graf závislosti intenzity fluorescence DsRedMGal-1 v různých koncentracích (5, 2,5, 1 µM) na koncentrací laktózy. Do grafu vynesena průměrná hodnota fluorescence. Každá koncentrace galektinu byla měřena v duplikátu. Data pro vyhodnocování byla získána pomocí aplikace FlowJo [52].



Obrázek 16. Histogramy průtokové cytometrie ukazující závislost intenzity fluorescence buněk s navázanými DsRedMGal-1 v různých koncentracích (5; 2,5 a 1 µM) na koncentraci laktózy. Údaje představují typické výsledky jednoho reprezentativního pokusu provedeného v triplikátu. Jako negativní kontrola (modrá) byly použity samotné buňky (bez galektinu a bez laktózy), fialové křivky odpovídají pokusům se 100mM laktózou, zelené křivky odpovídají pokusům s 200mM laktózou, červené křivky odpovídají intenzitě fluorescence buněk s navázaným Gal-1 DsRed bez laktózy.

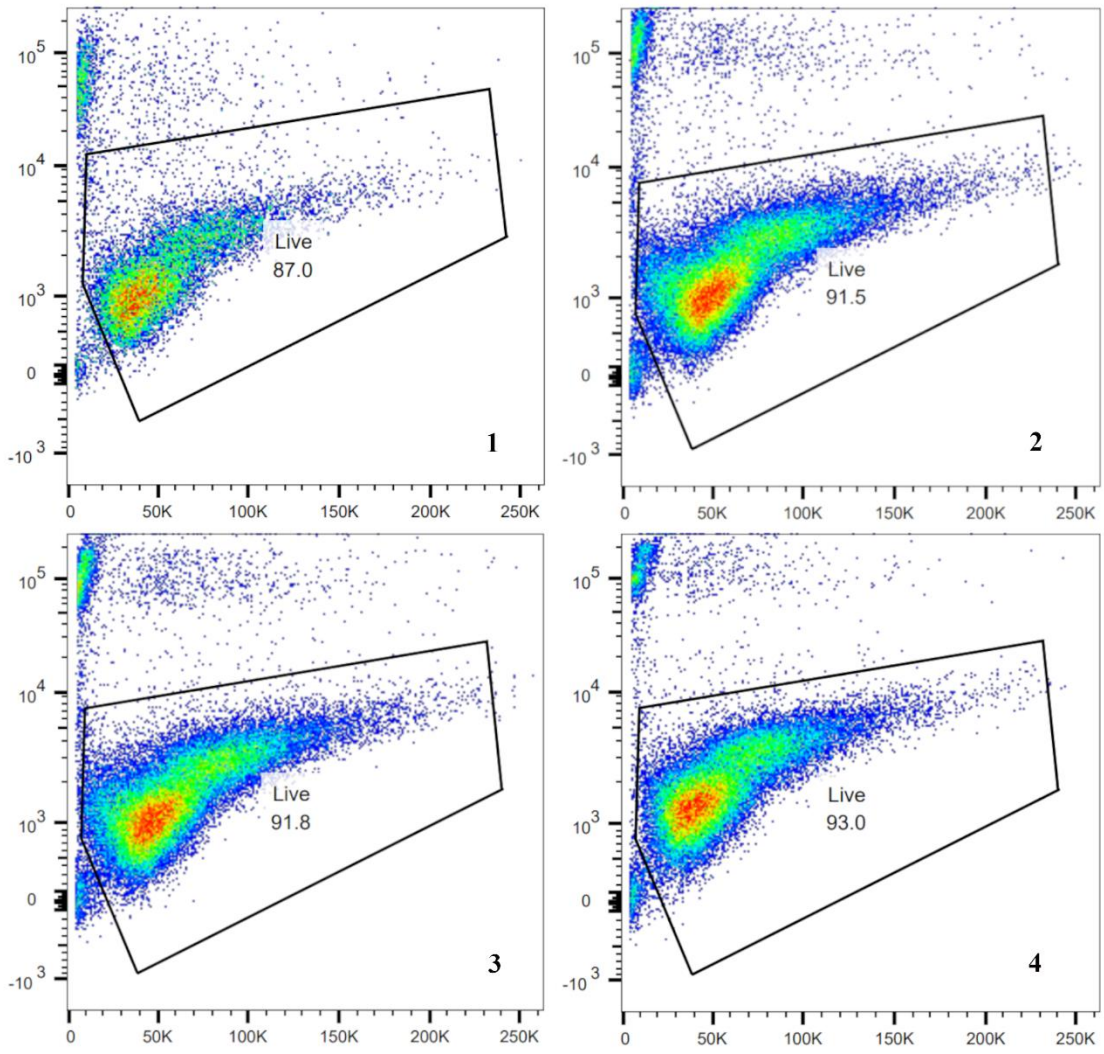
V rámci sledování interakce mezi DsRedMGal-1 a buňkami DLD-1 byla využita průtoková cytometrie. K experimentu byl použit fúzní konstrukt fluorescenčně značeného proteinu DsRedMGal-1 v koncentracích 1 µM, 2,5 µM a 5 µM. Každý vzorek byl testován v přítomnosti 0mM, 100mM a 200mM laktózy. Naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí histogramů intenzity fluorescence (viz obr. č. 16) a výpočtem střední fluorescence (MFI) (viz obr. č. 15), čímž byla ověřena jak vazba Gal-1 na buněčný povrch, tak její inhibice pomocí laktózy.

Při nejvyšší koncentraci DsRedMGal-1 (5 μM) bylo pozorováno nejsilnější navázání na povrch buněk – vzorek bez laktózy vykazoval výrazný nárůst intenzity fluorescence (červená křivka). Se zvyšující se koncentrací laktózy docházelo k posunu histogramů směrem k negativní kontrole (modrá křivka): při koncentraci laktózy 100 mM byl zaznamenán mírný pokles fluorescence a při 200 mM došlo k jejímu výraznému snížení. Tato data indikují kompetitivní inhibici vazby Gal-1 způsobenou přítomností volné laktózy v médiu.

Při střední koncentraci DsRedMGal-1 (2,5 μM) byl pozorován shodný trend. Nejvyšší intenzita fluorescence byla opět zaznamenána u vzorku bez laktózy, ve vzorku se 100mM laktózou byla střední hodnota fluorescence nižší a se 200mM laktózou se intenzita fluorescence výrazně snížila. Tento výsledek potvrzuje, že účinek laktózy jako kompetitivního inhibitoru je zachován i při nižší koncentraci galektinu.

Při nejnižší testované koncentraci DsRedMGal-1 (1 μM) se množství navázaného proteinu na povrch buněk snížilo, což se odrazilo i na celkové nižší úrovni fluorescence. Při dané koncentraci se opakoval pozorovaný inhibiční vzorec – nejsilnější fluorescence u vzorku bez laktózy, mírně slabší fluorescence se 100mM laktózou a nejslabší s 200 mM laktózou, kde histogram prakticky splýval s negativní kontrolou.

Uvedené výsledky potvrzují, že vazba DsRedMGal-1 na povrch buněk DLD-1 je závislá na jeho koncentraci v prostředí a je účinně inhibována přítomností laktózy. Pozorované kompetitivní působení závislé na koncentraci odpovídá známé afinitě galektinů ke β-galaktosidovým strukturám, jako je laktóza, a naznačuje, že Gal-1 značený fluoroforem si zachovává svou biologickou aktivitu. Uvedená data pocházejí z jednoho experimentu provedeného ve třech opakováních.



Obrázek 17. Bodové grafy (tzv. *dot plots*) s procentuálním zastoupením populace živých buněk DLD-1 s navázaným 2,5μM DsRedMGal-1 v různých koncentracích laktózy: vzorek bez laktózy (č. 1), vzorek s 200mM laktózou (č. 2), vzorek se 100mM laktózou (č. 3) a kontrolní vzorek obsahující pouze buňky DLD-1 bez navázaného Gal-1 a bez laktózy (č. 4).

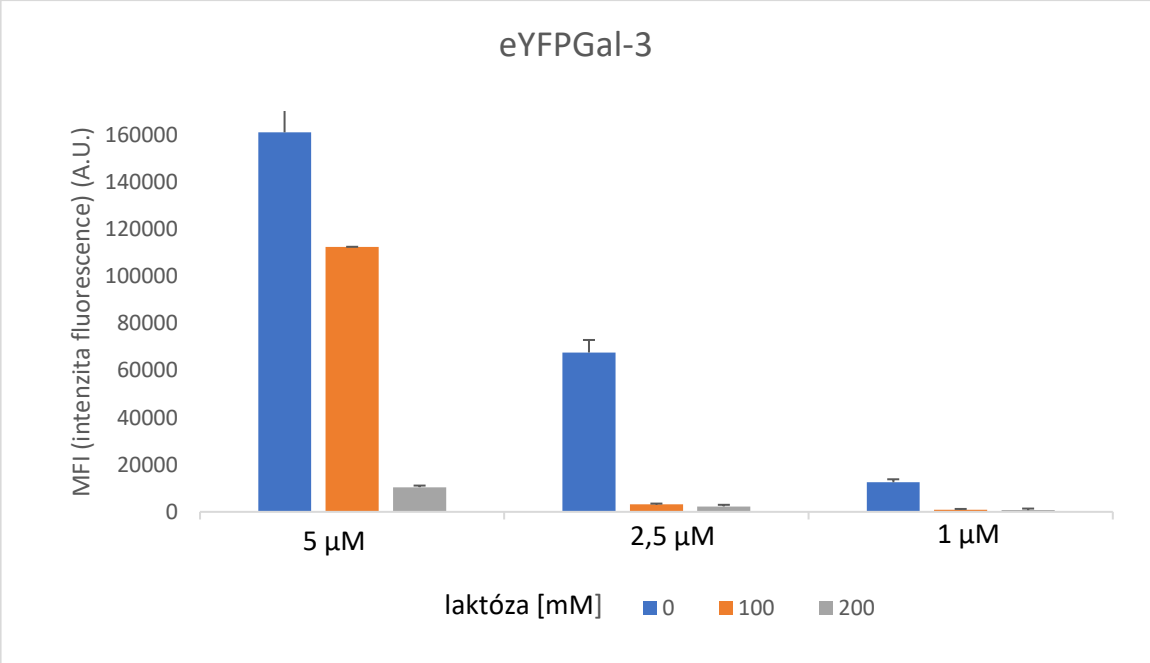
Na obrázku č. 17 jsou zobrazeny bodové grafy, které znázorňují podíl životaschopných buněk linie DLD-1 za různých experimentálních podmínek. Jednotlivé grafy představují čtyři různé experimenty: buňky inkubované s DsRedMGal-1 v koncentraci 2,5 μM bez přídavku laktózy (graf č. 1), se 100mM laktózou (graf č. 3), s 200mM laktózou (graf č. 2) a negativní kontrolu tvořenou buňkami bez přídavku Gal-1 a laktózy (graf č. 4).

Ve vzorku bez přítomnosti laktózy (graf č. 1) bylo zaznamenáno 87,0 % životaschopných buněk. Po přídavku laktózy do kultivačního média došlo k mírnému nárůstu podílu živých buněk: 91,8 % se 100mM (graf č. 3) a 91,5 % s 200mM laktózou (graf č. 2). Nejvyšší životaschopnost byla zaznamenána v kontrolním vzorku (graf č. 4), kde se jednalo o 93,0 % buněk. Tato pozorování mohou naznačovat mírný ochranný účinek laktózy,

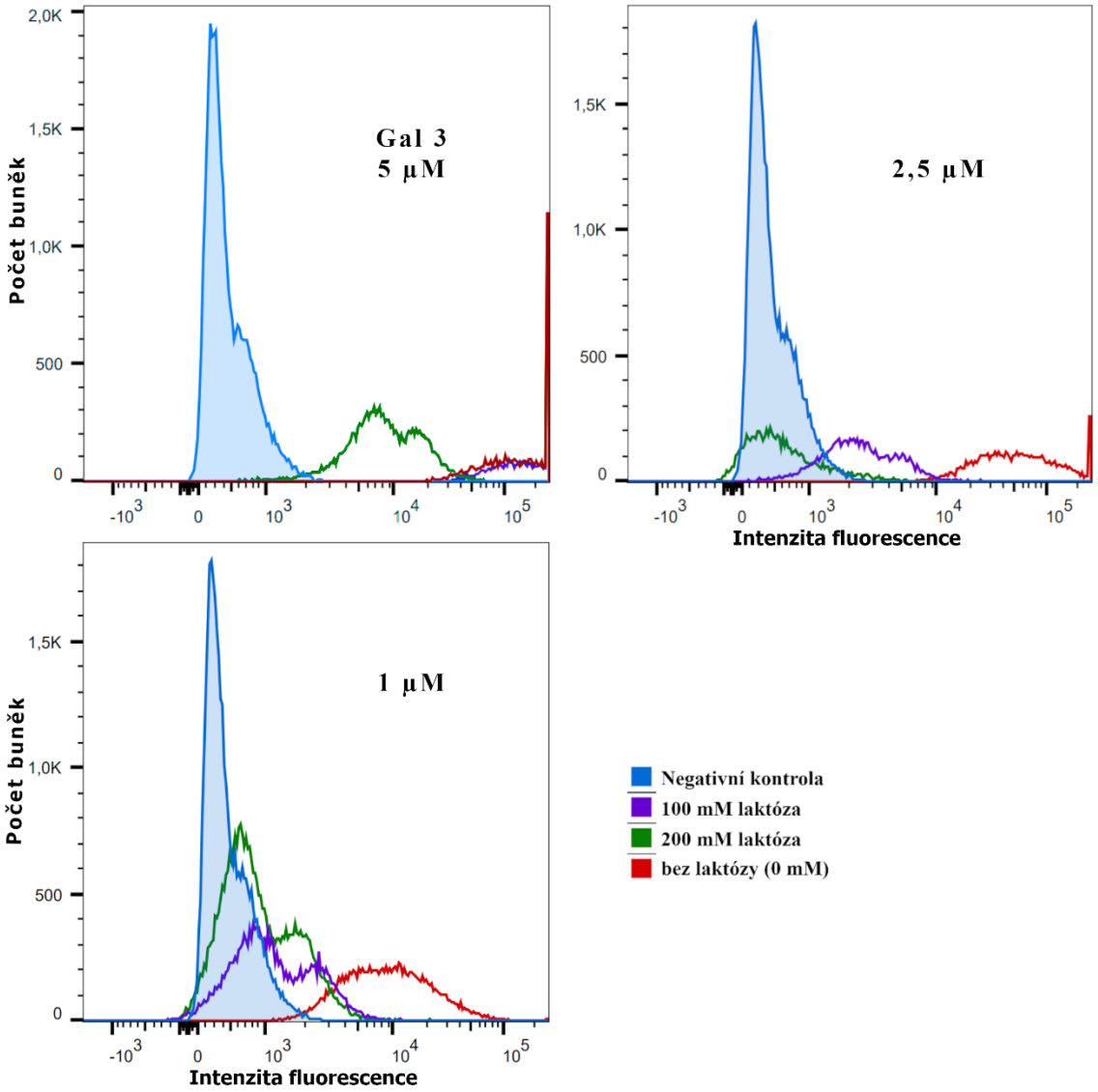
která kompetitivně inhibuje vazbu DsRedMGal-1 na buněčný povrch, a tím snižuje potenciální cytotoxické dopady této interakce. Vzhledem k absenci biologických replikátů však nelze učinit jednoznačné závěry o statistické významnosti zaznamenaných rozdílů. Míra životaschopnosti buněk mohla být rovněž ovlivněna technickými faktory, jako je manipulace se vzorky, doba inkubace, případně spontánní úhyn buněk v důsledku experimentálního zatížení. Pro potvrzení hypotézy o ochranném účinku laktózy by bylo vhodné provést statistickou analýzu na základě více nezávislých experimentálních opakování, která byla časově již mimo rozsah této práce.

4.2.2 Vazba eYFPGal-3 na buněčný povrch a její inhibice laktózou

Podobně jako u Gal-1 byla pomocí průtokové cytometrie analyzována vazba fúzního proteinu eYFPGal-3 na buňky DLD1 při různých koncentracích proteinu a laktózy.



Obrázek 18. Graf závislosti intenzity fluorescence eYFPGal-3 v různých koncentracích (5, 2,5, 1 µM) na koncentrací laktózy. Do grafu vynesena průměrná hodnota fluorescence. Každá koncentrace byla měřena v duplikátu.



Obrázek 19. Histogramy průtokové cytometrie ukazující závislost intenzity fluorescence buněk s navázanými eYFPGal-3 různých koncentracích (5, 2,5 a 1 µM) na koncentraci laktózy. Údaje představují typické výsledky jednoho reprezentativního pokusu provedeného ve třech opakováních. Jako negativní kontrola označená modrou barvou byly použity samotné buňky (bez galektinu a bez laktózy). Křivky označované fialovou barvou odpovídají pokusům se 100mM laktózou, zelený histogram odpovídá pokusům s 200mM laktózou, červená křivka odpovídá intenzitě fluorescence buněk s navázaným eYFPGal-3 bez přítomnosti laktózy.

Analogicky k předchozímu hodnocení vazby DsRedMGal-1 byla i v případě fúzního proteinu eYFPGal-3 využita průtoková cytometrie k posouzení jeho interakce s buněčnou linií DLD-1 a k ověření inhibičního účinku laktózy. Fluorescenčně značený eYFPGal-3 byl aplikován v koncentracích 1 µM, 2,5 µM a 5 µM, přičemž každá koncentrace byla testována v přítomnosti 0 mM, 100 mM a 200 mM laktózy. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí histogramů intenzity fluorescence (viz obr. č. 19) a výpočtem střední intenzity fluorescence (MFI) (viz obr. č. 18).

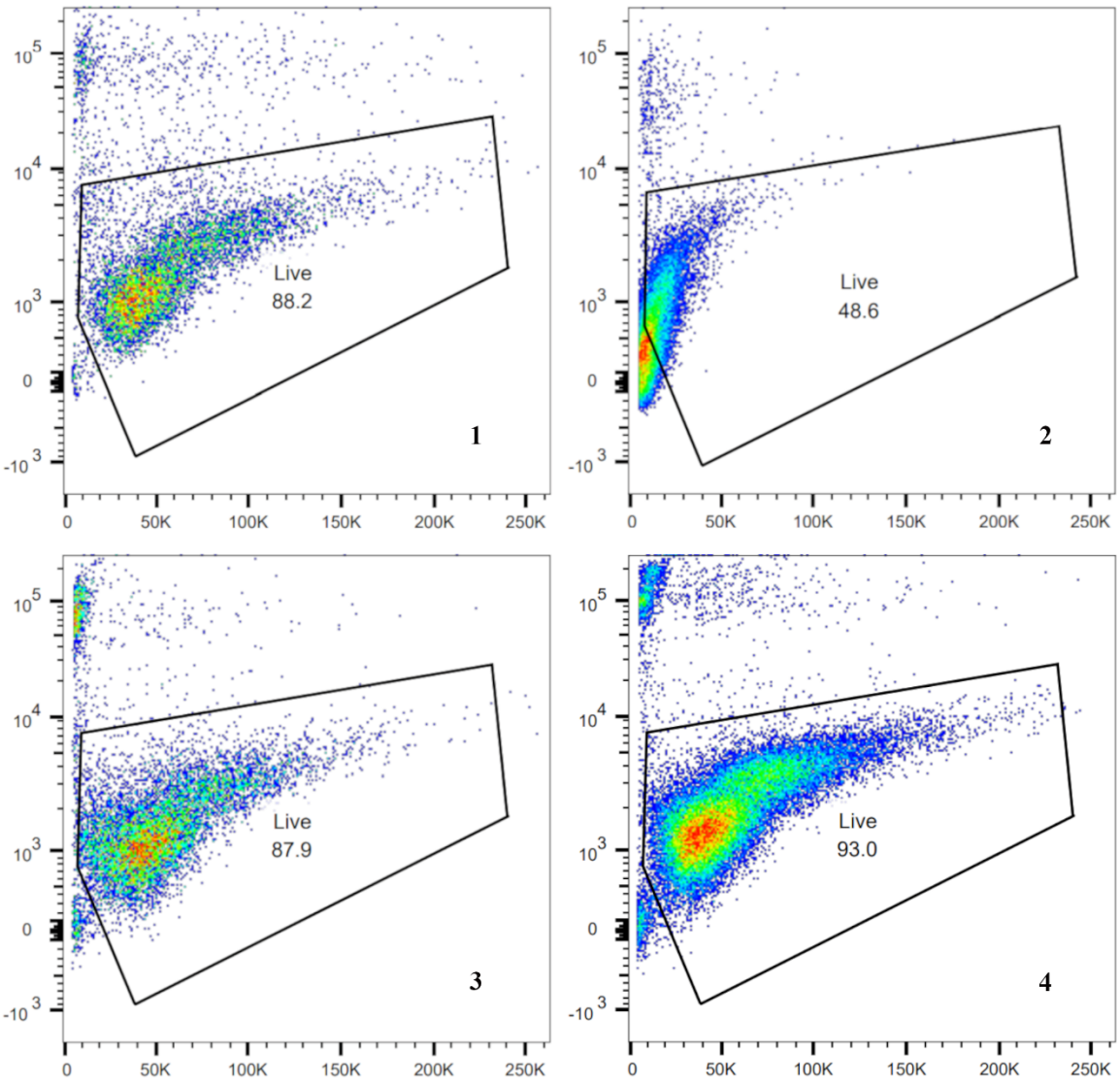
Při nejvyšší testované koncentraci eYFPGal-3 (5 μM) byla zaznamenána extrémně vysoká fluorescence ve vzorcích bez laktózy a se 100mM laktózou. Tento jev naznačuje velmi silnou a rozsáhlou vazbu Gal-3 na buněčný povrch, kterou přístroj již nebyl schopen spolehlivě kvantitativně zachytit. Výrazný pokles fluorescence však byl pozorován při inkubaci s 200mM laktózou, kde došlo k částečnému překrytí histogramu s negativní kontrolou, což ukazuje na efektivní inhibici vazby.

Při koncentraci eYFPGal-3 (2,5 μM) byl pozorován analogický trend – nejvyšší MFI byla naměřena ve vzorku bez laktózy, kde intenzita fluorescence svědčila o robustní vazbě Gal-3 na povrch buněk. Vzorek se 100mM laktózou vykazoval nižší hodnotu fluorescence, zatímco s 200mM laktózou došlo k výrazně sníženému signálu, což potvrzuje kompetitivní inhibici. Histogramy jasně ukazují posun fluorescenčních křivek směrem k negativní kontrole při vyšších koncentracích laktózy.

Při nejnižší testované koncentraci eYFPGal-3 (1 μM) byly hodnoty MFI celkově nižší, což odpovídá menšímu množství navázaného proteinu. Nicméně i zde byl patrný vliv laktózy: nejvyšší fluorescence byla zaznamenána ve vzorku bez laktózy, mírně nižší se 100mM laktózou a nejnižší s 200mM laktózou, kde se intenzita fluorescence téměř blížila negativní kontrole.

Souhrnně lze konstatovat, že množství navázaného eYFPGal-3 na buňky DLD-1 koreluje s jeho koncentrací v pufru a zároveň je významně ovlivňováno přítomností laktózy. Výsledky z obou typů grafů ukazují konzistentní závislosti a potvrzují, že interakce eYFPGal-3 s buněčným povrchem je specifická a kompetitivně inhibovatelná laktózou. Uvedená data pocházejí z jednoho experimentu provedeného ve třech opakováních.

Pozorované výsledky jsou v souladu s daty získanými pro DsRedMGal-1.



Obrázek 20. Bodové grafy (tzv. *dot plots*) s procentuálním zastoupením živé populace buněk DLD-1 s navázaným 2,5µM eYFPGal-3 s různými koncentracemi laktózy: vzorek bez laktózy (č. 1), vzorek s 200mM laktózou (č. 2), vzorek se 100mM laktózou (č. 3) a kontrolní vzorek obsahující pouze buňky DLD-1 bez navázaného Gal-1 a bez laktózy (č. 4).

Bodové grafy (viz obr. č. 20) znázorňují zastoupení živé populace buněk DLD-1 za čtyř různých experimentálních podmínek, při inkubaci s 2,5µM eYFPGal-3 a různými koncentracemi laktózy. Na jednotlivých grafech je vyznačena živá populace buněk a její procentuální zastoupení.

Referenčním vzorkem je graf č. 1, kde byly buňky inkubovány pouze s 2,5µM eYFPGal-3, bez přítomnosti laktózy. Podíl živých buněk zde činil 88,2 %. Tento vzorek slouží jako výchozí pro porovnání účinku různých koncentrací laktózy.

Ve vzorku s eYFPGal-3 a 200mM laktózou (viz graf č. 2) byla naměřena výrazně nižší životaschopnost – živou populaci zde tvořilo 48,6 % buněk. Přestože se zdá, že kombinace

vysoké koncentrace laktózy a eYFPGal-3 má negativní vliv na vitalitu buněk, nelze z jediného experimentu bez podpory statistické analýzy jednoznačně určit, zda je tento rozdíl signifikantní a biologicky relevantní. Je možné, že se na výsledku podílely významnou měrou technické faktory, jako je spontánní úhyn buněk, mechanické poškození nebo variabilita mezi měřeními.

Naopak při inkubaci s 2,5 μM eYFPGal-3 a 100 mM laktózy (viz graf č. 3) činil podíl živé populace 87,9 %, tedy velmi podobně jako ve vzorku bez laktózy. To může naznačovat, že nižší koncentrace laktózy nemá zásadní vliv na buněčnou integritu, avšak i zde je nutné brát v úvahu možnou experimentální variabilitu.

Negativní kontrolu tvoří graf č. 4, kde byly měřeny buňky DLD-1 bez přítomnosti Gal-3 a bez laktózy. Zde byla životaschopnost nejvyšší, 93,0 %, což odpovídá přirozené vitalitě buněk za standardních podmínek bez zásahu vnějších faktorů.

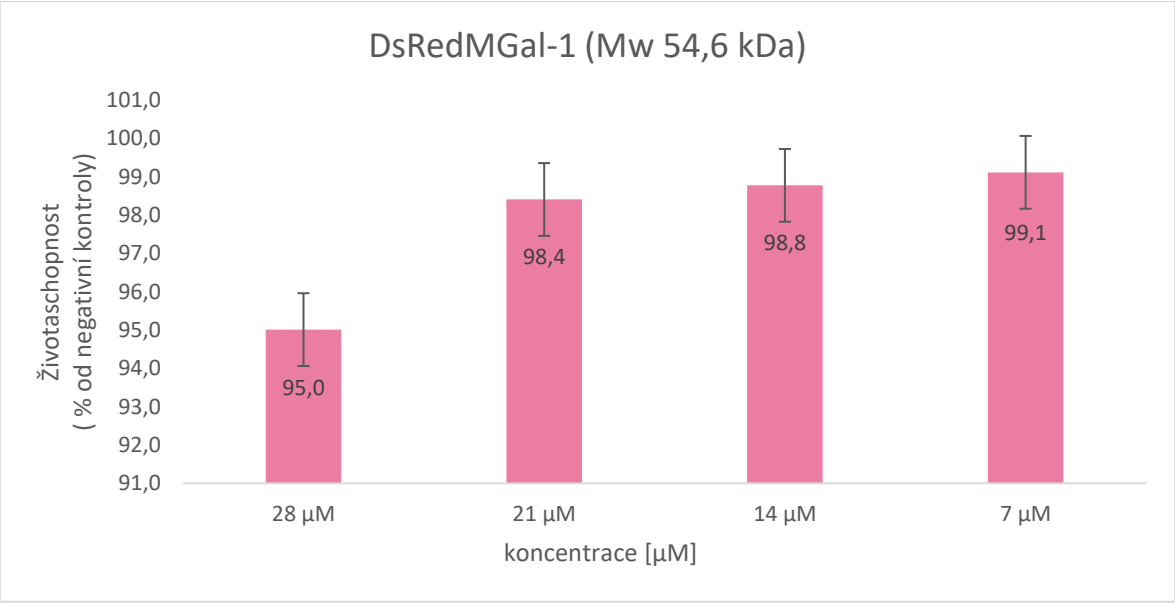
Na základě těchto výsledků lze předběžně uvažovat o tom, že vysoká koncentrace laktózy v přítomnosti eYFPGal-3 může negativně ovlivňovat životaschopnost buněk DLD-1, pravděpodobně v důsledku specifické interakce s buněčným povrchem. Nicméně, vzhledem k absenci statistického vyhodnocení není možné s jistotou posoudit, zda pozorované rozdíly mezi jednotlivými podmínkami (zvláště hodnotu životaschopnosti v přítomnosti 200mM laktózy) nepřesahují spíše odlehlý výsledek.

Uvedená data pocházejí z jednoho reprezentativního experimentu provedeného ve třech opakováních.

4.3 Kontrola toxicity galektinových konstruktů na buňky DLD1

Po měření průtokové cytometrie byla provedena kontrola toxicity použitých galektinových konstruktů, aby vyloučit možnost interference vlivu galektinů či jiných komponent použitých v experimentu na životaschopnost buněk.

Pro statistické porovnání životaschopnosti buněk mezi jednotlivými skupinami bya použit dvouvýběrový *t*-test s nerovnými rozptyly (Welchův *t*-test).



Obrázek 21. Graf životaschopnosti buněk DLD1 v přítomnosti fluorescenčního fúzního konstruktu Gal-1 v % vůči negativní kontrole bez galektinu. K měření byl použit DsRedMGal-1 ve čtyřech různých koncentracích.

Tabulka 4. Výsledky statistické analýzy životaschopnosti buněk DLD1 s různými koncentracemi DsRedMGal-1. Životaschopnost je vyjádřena v % vzhledem k negativní kontrole (0 µM), která byla stanovena jako referenční hodnota (100 %). Tabulka uvádí hodnoty statistické analýzy (*t*-hodnota), která vyjadřuje velikost rozdílu mezi dvěma průměry relativně vůči variabilitě dat, a *p*-hodnoty, které udávají pravděpodobnost, že pozorovaný rozdíl vznikl náhodně. Hodnota $p < 0,05$ je považována za statisticky významnou.

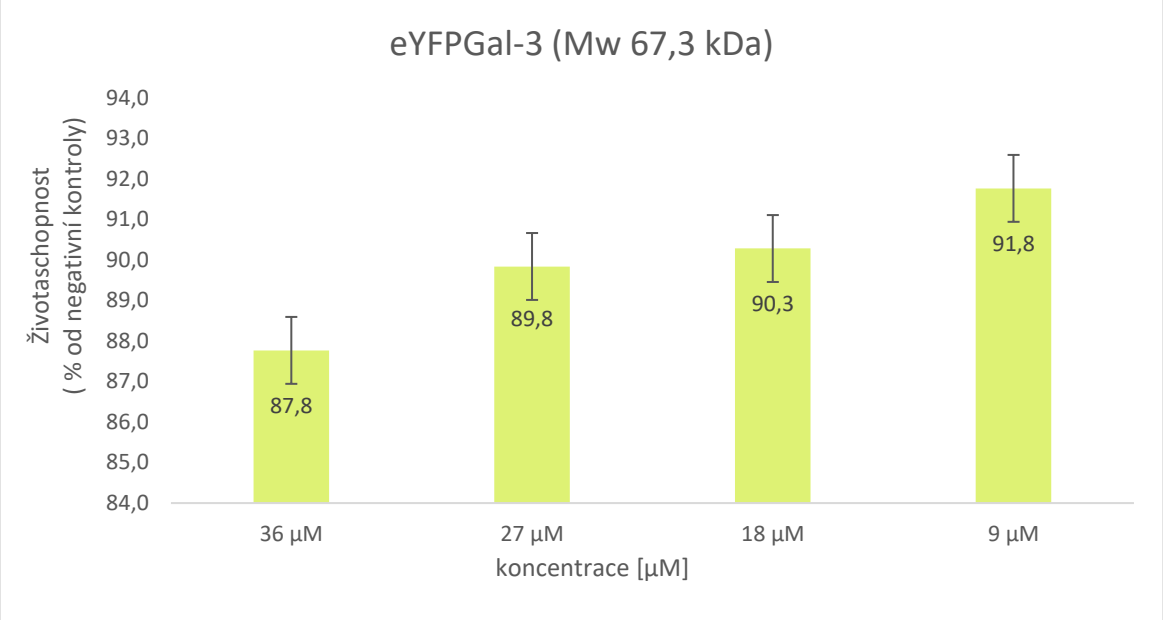
Koncentrace [µM]	*t*-hodnota	*p*-hodnota	Statistická významnost
0	-	-	referenční hodnota (100 %)
28	-0,15	0,892	ne
21	0,37	0,748	ne
14	0,57	0,623	ne
7	1,29	0,313	ne

Životaschopnost buněk DLD1 po 24hodinové inkubaci s různými koncentracemi fúzního proteinu DsRedMGal-1 byla hodnocena pomocí soupravy CCK-8. Výsledky ukázaly mírný pokles metabolické aktivity při vyšších koncentracích, přičemž s 28µM galektinem byla životaschopnost přibližně 95 % ve srovnání s kontrolní skupinou. Nižší koncentrace vykazovaly životaschopnost v rozmezí 98–99 % (viz obr. č. 21).

Statistické zhodnocení těchto dat (Welchův *t*-test) však neprokázalo žádný statisticky významný rozdíl oproti negativní kontrole ($p > 0,05$). Hodnoty *t* se pohybovaly od –0,15 do

1,29, přičemž nejvyšší *t*-hodnota byla zaznamenána při koncentraci 7 µM. Tato koncentrace zároveň vykázala nejnižší *p*-hodnotu ($p = 0{,}313$), která však stále výrazně překračuje hranici statistické významnosti ($\alpha = 0{,}05$). Ostatní koncentrace měly ještě vyšší p-hodnoty, což dále potvrzuje absenci statisticky významného efektu.

Z uvedeného vyplývá, že DsRedMGal-1 nevykazuje měřitelný cytotoxický účinek při koncentracích použitých v experimentu, a jeho přítomnost pravděpodobně neovlivnila výsledky inhibičních nebo funkčních testů uvedených v dalších částech práce.



Obrázek 22. Graf životaschopnosti buněk DLD1 v přítomnosti fluorescenčního fúzního konstruktu Gal-3 v % vůči negativní kontrole bez galektinu. K měření byl použit eYFPGal-3 ve čtyřech různých koncentracích.

Tabulka 5. Výsledky statistické analýzy životaschopnosti buněk DLD1 s různými koncentracemi eYFPGal-3. Životaschopnost je vyjádřena v % vzhledem k negativní kontrole (0 µM), která byla stanovena jako referenční hodnota (100 %).

Koncentrace [µM]	*t*-hodnota	*p*-hodnota	Statistická významnost
0	-	-	referenční hodnota (100 %)
36	-4,17	0,046	ano
27	-3,36	0,071	ne
18	-3,44	0,067	ne
9	-2,86	0,094	ne

Výsledky testu ukázaly pokles životaschopnosti s rostoucí koncentrací eYFPGal-3,. Nejnižší hodnota byla zaznamenána při koncentraci 36 µM, kde životaschopnost činila 87,8 %. Se snižující se koncentrací proteinu (27, 18 a 9 µM) se životaschopnost postupně zvyšovala až na 91,8 % (viz obr. č. 22).

Statistická analýza pomocí Welchova *t*-testu prokázala významný rozdíl pouze pro nejvyšší testovanou koncentraci (36 µM; $p = 0{,}046$), zatímco u nižších koncentrací nebyla hladina statistické významnosti dosažena ($p > 0{,}05$; viz tabulka č. 5). Hodnoty *t* parametru se pohybovaly v rozmezí –2,86 až –4,17, což dokládá trend poklesu životaschopnosti, avšak biologický význam těchto změn lze považovat za omezený.

Vzhledem k tomu, že koncentrace použité v inhibičních experimentech (viz kapitola 4.2) byly výrazně nižší než ty, které vykazovaly pokles životaschopnosti, je velmi nepravděpodobné, že by případná cytotoxicita výrazně ovlivnila výsledek inhibičních experimentů v této práci.

5. Diskuze

Cílem této práce bylo produkovat a purifikovat rekombinantní fúzní konstrukty galektinů s fluorescenčními proteiny – DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 – a analyzovat jejich vazbu na buněčný povrch lidských kolorektálních nádorových buněk DLD1. Dále byla zkoumána schopnost laktózy inhibovat tuto vazbu.

Oba galektiny byly úspěšně exprimovány a purifikovány pomocí afinitní chromatografie následované dialýzou. Kvalita získaných konstruktů byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy, která sloužila k monitorování čistoty galektinů během celého purifikačního procesu. Analýza SDS-PAGE ukázala, že byly produkovány konstrukty DsRedMGal-1 v odhadované čistotě cca 90 % (v množství 23 mg) a eYFPGal-3 v odhadované čistotě cca 60 % (v množství 82 mg) (viz obr. č. 14). U eYFPGal-3 byly na gelu pozorovány další proužky, které odpovídaly N-terminálním proteinovým fragmentům či nespecifickým fragmentům proteinů vzniklých během purifikačního procesu. Podobné proužky byly detekovány i ve studii MSc. Cariny Dey z RWTH Aachen, která pracovala se stejným konstruktem eYFPGal-3 v rámci projektu zaměřeného na fluorescenční proteiny [54]. Tyto kontaminace mohou naznačovat částečnou proteolýzu, ke které mohlo dojít při vyšších teplotách kultivace nebo nedostatečné účinnosti použitých proteázových inhibitorů. Optimalizace podmínek exprese, například snížení teploty nebo rozšíření spektra inhibitorů proteáz, by mohla dále zvýšit čistotu produktu. Další možností by byl následný krok afinitní chromatografie založené na lektinové aktivitě, nicméně fluorescenční proteiny se ukázaly jako relativně málo stabilní (již po 2-3 dnech výrazně ztráceny lektinovou aktivitu), takže další purifikační kroky při pilotních pokusech vedly k neuspokojivým výsledkům. Proto byl nakonec pro účely této práce použit konstrukt Gal-3 o nižší čistotě, což ale nesnižuje validitu pozorovaných trendů v této práci.

Celkově výsledky exprese a purifikace potvrzují, že oba rekombinantní proteiny byly úspěšně získány v množství desítek miligramů proteinu, což bylo třeba pro realizaci všech potřebných experimentů.

Výsledky průtokové cytometrie (viz obr. č. 16 a 19) jasně ukazují podobný trend, že DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 se specificky vážou na povrch buněk DLD1 a jejich vazba je kompetitivně inhibována přítomností laktózy (viz obr. č. 15 a 18). Intenzita fluorescence (MFI) odpovídající množství navázaného galektinu na buněčný povrch se s rostoucí

koncentrací laktózy postupně snižuje, což potvrzuje její kompetitivní inhibiční účinek a skutečnost, že vazba galektinů na buněčný povrch je vedena přes CRD doménu. Nicméně mezi DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 existují významné rozdíly v síle vazby na buňky a ve způsobu, jakým je tato vazba ovlivněna laktózou.

Nejvyšší intenzita fluorescence byla zaznamenána u obou galektinů v koncentraci 5 μM při inkubaci bez laktózy, což naznačuje silnou interakci mezi galektinem a buněčnými receptory. S klesajícími koncentracemi galektinů (2,5 μM a 1 μM) došlo k postupnému poklesu MFI, což odráží nižší množství navázaného galektinu.

Pozoruhodné je, že MFI eYFPGal-3 při 5 μM byla výrazně vyšší než u DsRedMGal-1, což může indikovat nejen vyšší míru vazby na povrch buněk, ale také potenciální vznik nadmolekulárních agregátů. Gal-3 je schopen oligomerizace prostřednictvím své N-terminální domény, což umožňuje tvorbu rozsáhlejších multimerických struktur na povrchu buněk. Tyto struktury mohou vznikat postupným navazováním dalších molekul Gal-3 nejen na glykanové ligandy, ale i na již navázané molekuly galektinu. Tento mechanismus může vést ke zesílení fluorescenčního signálu díky lokální akumulaci značeného proteinu, jak bylo pozorováno i v jiných studiích [6,14,15].

Zároveň je třeba zdůraznit, že s 1μM eYFPGal-3 byla fluorescence téměř na detekčním limitu, což naznačuje nízkou afinitu k povrchovým strukturám buněk při této koncentraci. Tento pokles může být důsledkem nižší pravděpodobnosti interakce eYFPGal-3 s buněčnými receptory při snížené dostupnosti molekul proteinu ve vzorku. Celkově tento efekt je v souladu s očekáváním, protože galektiny jsou známy svou schopností interagovat se sacharidovými strukturami na povrchu buněk prostřednictvím své CRD domény. Tento trend potvrzuje koncentračně závislý charakter vazby DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 na buněčný povrch pozorovaný i v jiných studiích [56–58].

Inhibiční účinek laktózy byl zaznamenán u obou galektinů napříč všemi testovanými koncentracemi. S rostoucími koncentracemi laktózy (0, 100 a 200 mM) docházelo k poklesu intenzity fluorescence, což svědčí o kompetitivní inhibici vazby galektinů na buněčný povrch. Nejvýraznější inhibice byla pozorována s 200mM laktózou, kdy MFI dosáhlo hodnot blízkých negativní kontrole. Tento výsledek podporuje hypotézu, že laktóza soutěží s DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 o vazebná místa na buněčném povrchu, čímž efektivně snižuje množství navázaného proteinu [59]. Podobné výsledky byly popsány i v literatuře, kde byla

laktóza spolu s dalšími β-galaktosidy identifikována jako kompetitivní inhibitor galektinů, schopný blokovat jejich interakce s glykanovými strukturami buněčných receptorů [56,57].

Navzdory těmto společným trendům se však účinnost inhibice mezi oběma galektiny lišila. Inhibiční účinek laktózy byl u eYFPGal-3 méně efektivní než u DsRedMGal-1 (viz obr. č. 16 a 19). U DsRedMGal-1 byla kompetitivní inhibice laktózou velmi silná, což se projevilo prudkým poklesem fluorescence v přítomnosti 200mM laktózy, kdy intenzita fluorescence téměř splývala s negativní kontrolou. To naznačuje, že vazba DsRedMGal-1 na povrch buněk je spíše slabá a snadno kompetitivně blokovaná laktózou. U eYFPGal-3 byla inhibice vazby laktózou méně výrazná. Konstrukt eYFPGal-3 se vázal na buňky DLD1 s vyšší afinitou – i při nejvyšší koncentraci laktózy (200 mM) byla stále patrná zbytková fluorescence. To může naznačovat, že eYFPGal-3 může mít i další mechanismy interakce s buněčným povrchem, které nejsou plně kompetitivně blokovány laktózou. To může souviset s jeho schopností interagovat nejen s glykany, ale také s jinými buněčnými komponentami, například prostřednictvím protein-proteinových interakcí [14], popřípadně s jeho schopností vytvářet na povrchu buněk oligomerní mřížky, nebo s vyšší afinitou ke konkrétním povrchovým glykanům na povrchu buněk.

Dalším důležitým aspektem byla analýza množství živých buněk DLD1 v přítomnosti DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 (viz obr. č 17 a 20). Všechna měření byla porovnána se vzorkem, ve kterém byly přítomny pouze DLD1 buňky. V tomto vzorku negativní kontroly bylo množství živých buněk bylo 93 %, což potvrzuje, že experimentální podmínky samy o sobě nemají cytotoxický efekt a že případné pozorované změny v podílu živých buněk jsou důsledkem přítomnosti galektinů a jejich interakce s laktózou.

Samotná vazba DsRedMGal-1 na buněčný povrch měla mírně negativní vliv na životaschopnost buněk, což bylo patrné z mírného poklesu živé populace ve vzorku bez laktózy (87 %), zatímco u eYFPGal-3 to bylo 88 % (tyto rozdíly nicméně nebyly signifikantní). To naznačuje, že oba galektiny mohou ovlivňovat buněčnou integritu prostřednictvím interakcí se specifickými glykokonjugáty na buněčném povrchu [56,58]. Při přidání 200mM laktózy do vzorků s DsRedMGal-1 se životaschopnost buněk zvýšila na 92 %, což naznačuje protektivní účinek laktózy, která kompetitivně brání vazbě DsRedMGal-1 na buněčné receptory [2,60]. Naopak, u eYFPGal-3 došlo při stejné koncentraci laktózy k prudkému poklesu životaschopnosti na 49 %. Tento rozdíl mezi DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 naznačuje, že eYFPGal-3 může mít v přítomnosti vysoké koncentrace laktózy jiný

mechanismus účinku, což může zahrnovat osmotický stres nebo specifické buněčné signalizační dráhy vyvolané eYFPGal-3 v kombinaci s vysokou koncentrací cukru [59]. Nicméně vzhledem k tomu, že tento trend se nepotvrdil u dalších testovaných kombinací koncentrací, dá se spíše předpokládat, že k tak výraznému snížení podílu živých buněk došlo experimentální chybou, např. nešetrným zacházením s buňkami či jejich mechanickým poškozením při manipulaci s nimi apod. Při přidání 100mM laktózy byla životaschopnost buněk v přítomnosti DsRedMGal-1 92 %, což je hodnota srovnatelná s efektem 200mM laktózy. To ukazuje, že už nižší koncentrace laktózy je schopná efektivně inhibovat vazbu DsRedMGal-1 na buněčný povrch, čímž se minimalizují jeho potenciální negativní účinky na buňky. U eYFPGal-3 byla životaschopnost u 100mM laktózy 88 %, což představuje mnohem menší pokles než u 200mM laktózy, i když stále nižší hodnotu než u DsRedMGal-1. To ukazuje, že mírnější inhibice eYFPGal-3 laktózou může mít ochranný účinek na buňky. Nicméně je třeba vzít v potaz, že výše uvedené hodnoty byly získány z jednoho biologického opakování, takže nelze z těchto hodnot dělat dalekosáhlé závěry. Zvláště neočekávané výsledky jako výrazné snížení viability v přítomnosti 200mM laktózy jen u jednoho galektinu by bylo třeba minimálně dvakrát nezávisle opakovat. Ostatní výsledky se pohybují v hodnotách viability cca 85-93 %, což se jeví jako běžná fluktuace v tomto typu experimentů, která nevykazuje statistickou signifikanci.

Aby byl vyloučen možný negativní vliv fluorescenčních galektinových konstruktů na životaschopnost buněk, byla provedena analýza cytotoxicity (viz kapitola 4.3). U konstruktu DsRedMGal-1 byly ve všech testovaných koncentracích (7–28 μM) zaznamenány pouze mírné poklesy životaschopnosti (95–99 %), přičemž statistická analýza (Welchův *t*-test) neprokázala žádné významné rozdíly ve srovnání s negativní kontrolou ($p > 0{,}05$), což naznačuje, že tento konstrukt nevykazuje měřitelný cytotoxický účinek v použitých podmínkách. V případě konstruktu eYFPGal-3 byl statisticky významný pokles životaschopnosti zaznamenán pouze při nejvyšší testované koncentraci 36 μM ($t = -4{,}17$; $p = 0{,}046$). U nižších koncentrací galektinu (27, 18 a 9 μM) sice došlo k mírnému poklesu životaschopnosti (na 89,8–91,8 %), avšak *p*-hodnoty (0,071; 0,067 a 0,094) nedosáhly hladiny statistické významnosti. Celkově lze tedy říct, že eYFPGal-3 může při vysokých koncentracích ovlivňovat buněčnou vitalitu, ale v rozsahu použitých koncentrací v inhibičních a funkčních testech je tento vliv pravděpodobně zanedbatelný.

Celkově získaná data podporují hypotézu, že galektiny se vážou na povrch buněk DLD1 prostřednictvím specifických glykanových struktur a že tato interakce může do jisté míry ovlivnit morfologii i životaschopnost buněk. Laktóza zde funguje jako kompetitivní inhibitor a její inhibiční účinek roste s její koncentrací, což odpovídá dřívějším studiím o sacharidové inhibici galektinů [57]. Tyto výsledky mohou mít význam pro další výzkum role galektinů v regulaci buněčné adheze, metastázování a možnosti terapeutického využití sacharidových inhibitorů. Značené konstrukty galektinů lze využít pro celou řadu studií, jak ukazuje i recentní publikace z týmu Laboratoře biotransformací.

6. Závěr

Tato práce se zaměřila na studium interakcí fluorescenčně značených galektinových konstruktů DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 s β-galaktosidy a jejich vliv na kolorektální nádorové buňky DLD1. V experimentální části byly úspěšně exprimovány a purifikovány rekombinantní konstrukty DsRedMGal-1 (23 mg) a eYFPGal-3 (82 mg), což umožnilo vizualizaci a kvantifikaci vazby těchto proteinů na buněčný povrch pomocí průtokové cytometrie. Fluorescenční značení poskytlo přesnější data o interakci galektinů s buňkami a umožnilo detailnější analýzu jejich biologických účinků.

Výsledky ukázaly, že fluorescenčně značené proteiny DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 se specificky vážou na povrch buněk DLD1 prostřednictvím interakce se sacharidovými strukturami, přičemž tato vazba je kompetitivně inhibována laktózou. Mezi oběma galektiny však byly pozorovány významné rozdíly. DsRedMGal-1 vykazoval vyšší citlivost na kompetitivní inhibici laktózou, což naznačuje, že jeho interakce s buněčnými receptory je převážně závislá na vazbě na β-galaktosidy a je poměrně slabá. Naopak eYFPGal-3 byl méně citlivý na inhibici laktózou, což naznačuje, že se váže nejen prostřednictvím sacharidových interakcí, ale také prostřednictvím protein-proteinových interakcí nebo multivalentních vazeb, nebo že je jeho vazba na povrchové glykany buněk výrazně silnější. eYFPGal-3 vykazoval vyšší afinitu k buněčnému povrchu než DsRedMGal-1, což se projevilo vyšší intenzitou fluorescence při stejných koncentracích. Tento rozdíl může být opět způsoben větší schopností eYFPGal-3 oligomerizovat nebo (silněji) interagovat s širším spektrem buněčných glykanů či jiných povrchových struktur.

Analýza životaschopnosti buněk po inkubaci s galektinovými konstrukty ukázala odlišný vliv jednotlivých proteinů. U konstruktu DsRedMGal-1 nebyly při žádné testované koncentraci (7–28 μM) zaznamenány statisticky významné změny životaschopnosti ve srovnání s negativní kontrolou. U eYFPGal-3 byl zaznamenán mírný pokles životaschopnosti při vyšších koncentracích, přičemž statisticky významný rozdíl se objevil pouze při koncentraci 36 μM ($p = 0{,}046$). Nižší koncentrace již statistické významnosti nedosáhly ($p > 0{,}05$).

Celkově výsledky potvrzují, že fluorescenčně značené DsRedMGal-1 a eYFPGal-3 vykazují odlišné vazebné vlastnosti a interakce s buněčným povrchem, přičemž eYFPGal-3 se váže na buňky s vyšší afinitou a jeho vazba je méně ovlivněna přítomností laktózy než u

DsRedMGal-1. To naznačuje odlišné mechanismy působení těchto galektinů, které mohou hrát klíčovou roli v jejich biologických funkcích.

Tyto poznatky mohou přispět k lepšímu pochopení biologické role galektinů v nádorovém mikroprostředí a jejich potenciálnímu terapeutickému využití, zejména v oblasti cílené inhibice galektinů v onkologii. Další studie by se měly zaměřit na mechanismy interakce eYFPGal-3 s buňkami DLD1 a jeho možné cytotoxické účinky v přítomnosti vysokých koncentrací laktózy.

Bibliografie

1. NEWLACZYL, Anna U.; YU, Lu-Gang. Galectin-3 – a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Letters*. vol. 313 (2011), s. 123–128.
2. CAMBY, Isabelle; LE MERCIER, Marie; LEFRANC, Florence; KISS, Robert. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. vol. 16 (2006), s. 137R–157R.
3. TRONCOSO, Maria F.; ELOLA, Maria T.; BLIDNER, Ada G.; SARRIAS, Luciana; ESPELT, Maria V.; RABINOVICH, Gabriel A. The universe of galectin-binding partners and their functions in health and disease. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 299 (2023), 105400.
4. GIMP Development Team. GIMP [software]. Verze 2.10.32 [Windows]. (2024). Dostupné z: https://www.gimp.org/tutorials/Advanced_Animations/. [citováno 2025-05-12].
5. LIU, Zhilin; ZHANG, Yuliang; ZHAO, Donghui; CHEN, Yunjiao; MENG, Qinglei; ZHANG, Xin; JIA, Zelin; CUI, Jiayu; WANG, Xueli. Application of flow cytometry in the diagnosis of bovine epidemic disease. *Viruses*. vol. 15 (2023), 1378.
6. FRANEKOVÁ, Janka; JABOR, Antonín. Galektin-3: patofyziologie, analytické charakteristiky, interpretační meze a biologická variabilita. *EBSCOhost.* vol. 30 (2022), s. 68.
7. YU, Xizhi; QIAN, Junjie; DING, Limin; YIN, Shengyong; ZHOU, Lin; ZHENG, Shusen. Galectin-1: a traditionally immunosuppressive protein displays context-dependent capacities. *International Journal of Molecular Sciences*. vol. 24 (2023), 6501.

8. HARA, Akira; NIWA, Masayuki; NOGUCHI, Kei; KANAYAMA, Tomohiro; NIWA, Azumi; MATSUO, Mikiko; HATANO, Yuichiro; TOMITA, Hiroyuki. Galectin-3 as a next-generation biomarker for detecting early stage of various diseases. *Biomolecules*. vol. 10 (2020), 389.
9. SCIACCHITANO, Salvatore; LAVRA, Luca; MORGANTE, Alessandra; ULIVIERI, Alessandra; MAGI, Fiorenza; DE FRANCESCO, Gian Paolo; BELLOTTI, Carlo; SALEHI, Leila B.; RICCI, Alberto. Galectin-3: one molecule for an alphabet of diseases, from A to Z. *International Journal of Molecular Sciences*. vol. 19 (2018), 379.
10. HUANG, Yanyu; WANG, Hsiao-Chi; ZHAO, Junwei; WU, Ming-Heng; SHIH, Tsung-Chieh. Immunosuppressive roles of galectin-1 in the tumor microenvironment. *Biomolecules*. vol. 11 (2021), 1398.
11. Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System [software]. Verze 3.0. (2025).
12. RCSB Protein Data Bank. RCSB Protein Data Bank: Entry 2ZHK [online]. (2025). Dostupné z: https://www.rcsb.org/structure/2ZHK. [citováno 2025-05-12].
13. ARFAOUI-TOUMI, Amira; KRIA-BENMAHMOUD, Lilia; BENHMIDA, Majid; KHALFALLAH, M.-Tahar; REGAYA-MZABI, Sabeh; BOURAOUI, Saadia. Implication of the galectin-3 in colorectal cancer development (about 325 Tunisian patients). *Bulletin du Cancer*. vol. 97 (2010), s. E1–E8.
14. DUMIĆ, Jerka; DABELIĆ, Sanja; FLÖGEL, Mirna. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. vol. 1760 (2006), s. 616–635.

15. PEDROSA, Lucas de Freitas; RAZ, Avraham; FABI, João Paulo. The complex biological effects of pectin: galectin-3 targeting as potential human health improvement? *Biomolecules*. vol. 12 (2022), 289.
16. BIRDSALL, Berry; FEENEY, James; BURDETT, Ian D. J.; BAWUMIA, Sulemana; BARBONI, Elena A. M.; HUGHES, Robert C. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry*. vol. 40 (2001), s. 4859–4866.
17. SEETHARAMAN, J.; KANIGSBERG, Amit; SLAABY, Rita; LEFFLER, Hakon; BARONDES, Samuel H.; RINI, James M. Rentgenová krystalová struktura lidské domény galektinu-3 pro rozpoznávání sacharidů při rozlišení 2,1 Å. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 273 (1998), s. 13047–13052.
18. AHMAD, Nisar; GABIUS, Hans-Jürgen; SABESAN, Subramanian; OSCARSON, Stefan; BREWER, Charles F. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology*. vol. 14 (2004), s. 817–825.
19. HEINE, Viktoria; HOVORKOVÁ, Michaela; VLACHOVÁ, Miluše; FILIPOVÁ, Marcela; BUMBA, Ladislav; JANOUŠKOVÁ, Olga; HUBÁLEK, Martin; CVAČKA, Josef; PETRÁSKOVÁ, Lucie; PELANTOVÁ, Helena; KŘEN, Vladimír; ELLING, Lothar; BOJAROVÁ, Pavla. Immunoprotective neo-glycoproteins: chemoenzymatic synthesis of multivalent glycomimetics for inhibition of cancer-related galectin-3. *European Journal of Medicinal Chemistry*. vol. 220 (2021), 113500.
20. NIH. 3D crystal structure of human galectin-3 CRD in complex with lactose (pH 7.5, PEG6000) [online]. NIH 3D. (2025). Dostupné z: https://doi.org/10.60705/3DPX/15288.2. [citováno 2025-05-12].

21. PASMATZI, Efstathia; PAPADIONYSIOU, Christina; MONASTIRLI, Alexandra; BADAVANIS, George; TSAMBAOS, Dionysios. Galectin 1 in dermatology: current knowledge and perspectives. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica.* vol. 28 (2019), s. 27–31.

22. GOPALAN, Vinod; SAREMI, Nassim; SULLIVAN, Emily; KABIR, Sadiul; LU, Cu-Tai; SALAJEGHEH, Ali; LEUNG, Melissa; SMITH, Robert Anthony; LAM, Alfred King-Yin. The expression profiles of the galectin gene family in colorectal adenocarcinomas. *Human Pathology*. vol. 53 (2016). s. 105–113.

23. GEORVASILI, Vaia K.; MARKOPOULOS, Georgios S.; BATISTATOU, Anna; MITSIS, Michael; MESSINIS, Thomas; LIANOS, Georgios D.; ALEXIOU, George; VARTHOLOMATOS, George; BALI, Christina D. Detection of cancer cells and tumor margins during colorectal cancer surgery by intraoperative flow cytometry. *International Journal of Surgery*. vol. 104 (2022), 106717.

24. SONG, Lingling; TANG, Jiayi; OWUSU, Lawrence; SUN, Min-Zhong; WU, Jie; ZHANG, Jianhong. Galectin-3 in cancer. *Clinica Chimica Acta*. vol. 431 (2014), s. 185–191.

25. BACIGALUPO, María L.; CARABIAS, Pablo; TRONCOSO, María F. Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. *World Journal of Gastroenterology*. vol. 23 (2017), s. 5266–5281.

26. CAGNONI, Alejandro J.; GIRIBALDI, María Laura; BLIDNER, Ada G.; CUTINE, Anabela M.; GATTO, Sabrina G.; MORALES, Rosa M.; SALATINO, Mariana; ABBA, Martín C.; CROCI, Diego O.; MARIÑO, Karina V.; RABINOVICH, Gabriel A. Galectin-1 fosters an immunosuppressive microenvironment in colorectal cancer by reprogramming $CD8^+$ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. vol. 118 (2021), e2102950118.

27. DAY, Richard N.; DAVIDSON, Michael W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*. vol. 38 (2009), s. 2887–2921.

28. YARBROUGH, Daniel; WACHTER, Rebekka M.; KALLIO, Karen; MATZ, Mikhail V.; REMINGTON, S. James. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. vol. 98 (2001), s. 462–467.

29. CAMPBELL, Benjamin C.; PAEZ-SEGALA, Maria G.; LOOGER, Loren L.; PETSKO, Gregory A.; LIU, Ce Feng. Chemically stable fluorescent proteins for advanced microscopy. *Nature Methods*. vol. 19 (2022), s. 1612–1621.

30. SHANER, Nathan C.; CAMPBELL, Robert E.; STEINBACH, Paul A.; GIEPMANS, Ben N. G.; PALMER, Amy E.; TSIEN, Roger Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp*. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. vol. 22 (2004), s. 1567–1572.

31. AI, Hui-wang; OLENYCH, Scott G.; WONG, Peter; DAVIDSON, Michael W.; CAMPBELL, Robert E. Hue-shifted monomeric variants of *Clavulariacyan* fluorescent protein: identification of the molecular determinants of color and applications in fluorescence imaging. *BMC Biology*. vol. 6 (2008), 13.

32. ORMÖ, Mats; CUBITT, Andrew B.; KALLIO, Karen; GROSS, Larry A.; TSIEN, Roger Y.; REMINGTON, S. James. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*. vol. 273 (1996), s. 1392–1395.

33. YANG, Fan; MOSS, Larry G.; PHILLIPS, George N. Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. vol. 14 (1996), s. 1246–1251.

34. CHUDAKOV, Dmitriy M.; MATZ, Mikhail V.; LUKYANOV, Sergey; LUKYANOV, Konstantin A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews*. vol. 90 (2010), s. 1103–1163.

35. FROMMER, Wolf B.; DAVIDSON, Michael W.; CAMPBELL, Robert E. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*. vol. 38 (2009), s. 2833–2841.

36. TELFORD, William G.; HAWLEY, Teresa; SUBACH, Fedor; VERKHUSHA, Vladislav; HAWLEY, Robert G. Flow cytometry of fluorescent proteins. *Methods*. vol. 57 (2012), s. 318–330.

37. BAIRD, Geoffrey S.; ZACHARIAS, David A.; TSIEN, Roger Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. vol. 97 (2000), s. 11984–11989.

38. GARCIA-PARAJO, Maria; KOOPMAN, Marcel; VAN DIJK, Edwin M. H.; SUBRAMANIAM, Venki; VAN HULST, Niek F. The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. vol. 98 (2001), s. 14392–14397.

39. STEPANENKO, Olesya V.; VERKHUSHA, Vladislav V.; KUZNETSOVA, Irina M.; UVERSKY, Vladimir N.; TUROVEROV, Konstantin K. Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Current Protein and Peptide Science*. vol. 9 (2008), s. 338–369.

40. MERABTI, Karim Elhadj; AZIZI, Sihem; RIDARD, Jacqueline; LÉVY, Bernard; DEMACHY, Isabelle. Skládání interakcí v YFP, kvantové mechanice a vyhodnocení silového pole ve stavech S_0 a S_1. *Chemical Physics*. vol. 493 (2017), s. 157–165.

41. CARROLL, Paul; MUWANGUZI-KARUGABA, Julian; PARISH, Tanya. Codon-optimized DsRed fluorescent protein for use in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Research Notes*. vol. 11 (2018), 685.

42. VOLOTOVSKY, Igor D.; PINCHUK, Sergey V. Flow cytometry: fundamentals of the technology and its application in biology [online]. Minsk: Národní akademie věd Běloruska. (2016). Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/360434020_Flow_cytometry_Basics_of_technology_and_its_application_in_biology. [citováno 2025-05-12].
43. CIBIČEK, Norbert; VAČEK, Jan. Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně [online]. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. (2020). Dostupné z: https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2019/07/Cibicek-Vacek-Ol-2014.pdf. [citováno 2025-05-12].
44. GALA DE PABLO, Julia; LINDLEY, Matthew; HIRAMATSU, Kotaro; GODA, Keisuke. High-throughput Raman flow cytometry and beyond. *Accounts of Chemical Research*. vol. 54 (2021), s. 2132–2143.
45. BARTENEVA, Natasha S.; FASLER-KAN, Elizaveta; VOROBJEV, Ivan A. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. vol. 60 (2012), s. 723–735.
46. DIMITRIADIS, Savvas; DOVA, Lefkothea; KOTSIANIDIS, Ioannis; HATZIMICHAEL, Eleftheria; KAPSALI, Eleni; MARKOPOULOS, Georgios S. Imaging flow cytometry: development, present applications, and future challenges. *Methods and Protocols*. vol. 7 (2024), 28.
47. MCKINNON, Katherine M. Flow cytometry: an overview. *Current Protocols in Immunology*. vol. 120 (2018), 5.1.1–5.1.11.
48. BRESTOFF, Jonathan R. Full spectrum flow cytometry in the clinical laboratory. *International Journal of Laboratory Hematology*. vol. 45 (2023), s. 44–49.
49. ERRANTE, Paolo Ruggero; EBBING, Pâmela Carolina Cruz; RODRIGUES, Francisco Sandro Menezes; FERRAZ, Renato Ribeiro Nogueira; DA SILVA, Neusa

Pereira. Flow cytometry: a literature review [online]. (2016). Dostupné z: https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2461.0969. [citováno 2025-05-12].

50. ADAN, Aysun; ALIZADA, Günel; KIRAZ, Yağmur; BARAN, Yusuf; NALBANT, Ayten. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. vol. 37 (2017), s. 163–176.
51. Understanding flow cytometry optics: lasers, filters, detectors, and more [online]. (2024). Dostupné z: https://us.misumi-ec.com/blog/flow-cytometry-optics/. [citováno 2025-05-12].
52. FlowJo, LLC. FlowJo 10.9.0 [software]. Operační systém Windows 8.1; Java 1.8.0_325-b08. Ashland (OR), USA: FlowJo, LLC, (2022).
53. DEY, Carina; SOMMERFELD, Isabel K.; BOJAROVÁ, Pavla; KODRA, Nikol; VRBATA, David; ZIMOLÓVÁ VLACHOVÁ, Miluše; KŘEN, Vladimír; PICH, Andrij; ELLING, Lothar. Color-coded galectin fusion proteins as novel tools in biomaterial science. *Biomaterials Science*. vol. 13 (2025), s. 1482–1500.
54. DEY, Carina; PALM, Philip; ELLING, Lothar. Characterization of galectin fusion proteins with glycoprotein affinity columns and binding assays. *Molecules*. vol. 28 (2023), 1054.