

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Yurii Dubanych

Produkce a charakterizace mutované formy galektinu-3

Production and characterization of galectin-3 mutant

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

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

V Praze dne

.....
Yurii Dubanych

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za vedení práce, trpělivost a čas věnovaný při konzultacích. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Ondřeji Skořepovi, Ph.D. a Bc. Matouši Tulpovi za ochotu učit mě novým metodám, četné cenné rady, připomínky a poskytnutí potřebných materiálů. Také bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře 204, kteří mi při práci pomáhali.

Abstrakt

Přirozeně zabíjäcké buňky (NK buňky, z *angl. natural killer*) jsou velké granulární lymfocyty vrozené imunity, které jsou charakterizovány schopností zabít rakovinné a virem poškozené buňky bez předchozí aktivace. Cytotoxické funkce NK buněk jsou regulovány jednak prostřednictvím povrchových receptorů rozpoznávajících molekuly MHC-I, jednak přítomností sady aktivačních a inhibičních receptorů, které jsou mezi sebou za normálních podmínek v rovnováze. Osud cílové buňky proto záleží nejen na expresi MHC-I, ale i na expresi ligandů aktivujících receptory NK buněk. Jedním z aktivačních receptorů NK buněk je NKp30. Pro NKp30 byly objeveny tři specifické buněčné ligandy: lidský athanogen 6 asociovaný s BCL-2 (BAG-6, také známý jako BAT3), nádorový antigen B7-H6 a nově objevený ligand galektin-3. Všechny tyto ligandy jsou často exprimovány rakovinnými buňkami, přičemž BAG-6 a Gal-3 působí na funkce NK buněk inhibičně, což může být mechanismem úniku nádoru před imunitním systémem. Proto je Gal-3 novým potenciálním cílem léků, které inhibicí Gal-3 mohou napomáhat imunitnímu systému bránit se proti maligně transformovaným buňkám.

Tato bakalářská práce zahrnuje ověření vlivu mutace Cys¹⁷³ – Ser¹⁷³ v sacharid vazebné doméně galektinu-3 na vazbu receptoru NKp30 pomocí gelové permeační chromatografie. Dále se zabývá přípravou galektinu-3 s C-koncovou polyhistidinovou kotvou, která bude dále použita při studiu interakce galektinu-3 s nově syntetizovanými organickými inhibitory Gal-3 pomocí termoforézy. Využití výsledků této práce může přispět k odhalení struktury vazby Gal-3 na receptor NKp30 a k návrhu nových účinných léků s terapeutickým potenciálem.

Klíčová slova

Galektin-3, NKp30, NK buňky, rekombinantní exprese proteinů, *E. coli*, kapalinová chromatografie

Abstract

Natural killer cells are large granular lymphocytes of innate immunity that are characterized by the ability to kill cancer and virus-damaged cells without prior activation. Cytotoxic functions of NK cells are regulated on the one hand through surface receptors recognizing MHC-I molecules, on the other hand by the presence of a set of activating and inhibitory receptors that are under normal conditions in balance with each other. Therefore, the fate of the target cell depends not only on the expression of MHC-I, but also on the expression of ligands that activate NK cell receptors. One of the activating receptors of NK cells is NKp30. Three specific cellular ligands have been discovered for NKp30: human BCL-2-associated athanogen 6 (BAG-6, also known as BAT3), tumour antigen B7-H6, and the newly discovered ligand galectin-3. All these ligands are often expressed by cancer cells, where BAG-6 and Gal-3 inhibit NK cell functions, which may be a mechanism for tumour escape from the immune system. Therefore, Gal-3 is a new potential drug target that, by inhibiting Gal-3, can help the immune system defend itself against malignantly transformed cells.

This bachelor's thesis includes the verification of the effect of the Cys¹⁷³ – Ser¹⁷³ mutation in the carbohydrate recognition domain of galectin-3 on the binding of the NKp30 receptor using gel permeation chromatography. It also deals with the preparation of galectin-3 with a C-terminal polyhistidine tag, which will be further used in the study of the interaction of galectin-3 with newly synthesized organic Gal-3 inhibitors using microscale thermophoresis. The exploitation of the results of this work may contribute to the unravelling of the structure of Gal-3 binding to the NKp30 receptor and the design of new effective drugs with therapeutic potential.

Key words

Galectin-3, NKp30, NK cells, recombinant protein expression, *E. coli*, liquid chromatography

Seznam použitých zkratek

(v/v)	objem/objem, z <i>angl. volume/volume</i>
(w/v)	hmotnost/objem, z <i>angl. weight/volume</i>
AA	akrylamid
bp	počet párů bází, z <i>angl. base pairs</i>
CBB R-250	barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250
CD	komplex antigenní diferenciační skupiny, z <i>angl. cluster of differentiation</i>
CRD	doména rozpoznávající sacharid, z <i>angl. carbohydrate recognition domain</i>
Da	dalton, jednotka molekulové hmotnosti
dH ₂ O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z <i>angl. deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	deoxyribonukleosidtrifosfáty, z <i>angl. deoxyribonucleoside triphosphates</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová, z <i>angl. ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Gal-3-CRD	doména rozpoznávající sacharid galektinu-3, z <i>angl. galectin-3 carbohydrate recognition domain</i>
Gal-3-CRD-C173S	doména rozpoznávající sacharid galektinu-3 s mutací C173S
Gal-3-CRD-C173S-His	doména rozpoznávající sacharid galektinu-3 s mutací C173S a His-kotvou na C-konci
GPC	gelová permeační chromatografie, z <i>angl. gel permeation chromatography</i>
HEK293T	linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293, které exprimují mutovanou variantu velkého T antigenu SV40, z <i>angl. human embryonic kidney 293 cells, expressing a mutant version of the SV40 large T antigen</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z <i>angl. high performance liquid chromatography</i>
IFN γ	interferon gama
Ig	označení imunoglobulinů, z <i>angl. immunoglobulin</i>
IgSF	imunoglobulinová superrodina, z <i>angl. immunoglobulin superfamily</i>
IL	interleukin

ILC	přirozené lymfoidní buňky, z <i>angl. innate lymphoid cells</i>
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
ITAM	aktivační imunoreceptorový motiv na bázi tyrosinu, z <i>angl. immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
ITIM	inhibiční imunoreceptorový motiv na bázi tyrosinu, z <i>angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
LB	kultivační médium, z <i>angl. lysogeny broth</i>
LBD	doména vázající ligand, z <i>angl. ligand binding domain</i>
LFC	klonování bez ligace, z <i>angl. ligation-free cloning</i>
MHC	hlavní histokompatibilní komplex, z <i>angl. major histocompatibility complex</i>
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, z <i>angl. messenger ribonucleic acid</i>
MWCO	maximální hodnota molekulové hmotnosti, kterou daná membrána propustí, z <i>angl. molecular weight cut-off</i>
NCR	receptor přirozené cytotoxicity, z <i>angl. natural cytotoxicity receptor</i>
NK buňky	přirozeně zabijácké buňky, z <i>angl. natural killer cells</i>
NKp	přirozeně zabijácký protein, z <i>angl. natural killer protein</i>
NKp30_LBD T	doména vázající ligand receptoru NKp30 produkované v buněčné linii HEK293T
NKp30_Stalk T	varianta receptoru NKp30 produkovaná v buněčné linii HEK293T
OD ₆₀₀	optická hustota při 600 nm, z <i>angl. optical density</i>
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfátem, z <i>angl. phosphate buffered saline</i>
PCR	polymerasová řetězová reakce, z <i>angl. polymerase chain reaction</i>
PDB	proteinová databanka
SDS	dodecylsírán sodný, z <i>angl. sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným, z <i>angl. sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOB	kultivační médium, z <i>angl. super optimal broth</i>
TNF- α	faktor nádorové nekrózy alfa, z <i>angl. tumour necrosis factor</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

WT

přirozený typ, z *angl. wild-type*

Obsah

1	Teoretický úvod	11
1.1	<i>Lektiny</i>	11
1.2	<i>Rozdělení lektinů</i>	11
1.3	<i>Biologické funkce lektinů</i>	12
1.4	<i>Galektiny</i>	13
1.5	<i>Organizace CRD u galektinů</i>	14
1.6	<i>Funkce galektinů</i>	16
1.7	<i>Galektin-3</i>	16
1.8	<i>Funkce galektinu-3</i>	18
1.9	<i>NK buňky</i>	18
1.10	<i>Receptory přirozené cytotoxicity</i>	20
1.11	<i>Receptor NKp30</i>	22
2	Cíle práce	24
3	Materiál	25
3.1	<i>Přístroje a pomůcky</i>	25
3.2	<i>Chemikálie</i>	26
3.3	<i>Enzymy</i>	28
3.4	<i>Komerční pufry a roztoky</i>	28
3.5	<i>Bakteriální kmeny</i>	28
3.6	<i>Vektory</i>	28
3.7	<i>Oligonukleotidy a jejich sekvence</i>	29
3.8	<i>Kultivační média</i>	29
3.9	<i>Pufry a roztoky</i>	29
4	Metody	31
4.1	<i>Polymerasová řetězová reakce</i>	31
4.1.1	<i>PCR – amplifikace dvou úseků DNA pro gen Gal-3-CRD-C173S</i>	31
4.1.2	<i>Spojovací PCR</i>	31
4.2	<i>Příprava genu kódujícího mutovanou formu CRD galektinu-3 s histidinovou kotvou na C-konci</i>	32
4.3	<i>Štěpení plazmidu pOPINE restričními endonukleasami</i>	32
4.4	<i>Agarosová gelová elektroforéza</i>	32
4.5	<i>Izolace DNA z agarosového gelu</i>	33

4.6	<i>Klonování nezávislé na ligáze</i>	33
4.7	<i>Transformace kompetentních buněk E. coli TOP 10</i>	34
4.8	<i>PCR z bakteriálních kolonií</i>	34
4.9	<i>Nízkoobjemová produkce plazmidu</i>	34
4.9.1	Nízkoobjemová kultivace bakterií	34
4.9.2	Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA	34
4.10	<i>Příprava vzorků pro sekvenaci DNA</i>	35
4.11	<i>Velkoobjemová produkce plazmidu</i>	35
4.11.1	Transformace kompetentních buněk E. coli DH5α	35
4.11.2	Velkoobjemová kultivace bakterií	36
4.11.3	Velkoobjemová izolace plazmidové DNA	36
4.12	<i>Rekombinantní exprese a purifikace variant galektinu-3</i>	37
4.12.1	Transformace kompetentních buněk E. coli T7 a produkce proteinů	37
4.12.2	Sonikace bakterií	37
4.12.3	Afinitní chromatografie	37
4.12.4	Dialýza Gal-3-CRD-C173S	38
4.12.5	Zkoncentrování proteinů	38
4.12.6	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	38
4.13	<i>Charakterizace proteinů</i>	39
4.13.1	Analytická gelová permeační chromatografie	39
5	Výsledky	40
5.1	<i>Příprava plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD-C173S</i>	40
5.1.1	Příprava genu kódujícího Gal-3-CRD-C173S	40
5.1.2	Štěpení plazmidu pOPINE restričními endonukleasami	42
5.1.3	Vnesení genu Gal-3-CRD-C173S do linearizovaného plazmidu	42
5.2	<i>Příprava plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD-C173S-His</i>	44
5.2.1	Příprava genu pro Gal-3-CRD-C173S-His	44
5.2.2	Vnesení genu Gal-3-CRD-C173S-His do linearizovaného plazmidu	45
5.3	<i>Produkce a purifikace Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His</i>	47
5.4	<i>Charakterizace proteinů</i>	48
5.4.1	Analytická gelová permeační chromatografie	48
6	Diskuze	51
7	Závěr	54
8	Seznam literatury	55

1 Teoretický úvod

1.1 Lektiny

Lektiny jsou proteiny, které specificky rozpoznávají a reverzibilně vážou sacharidy různého původu. K lektinům však nepatří protilátky a proteiny s katalytickou aktivitou [1]. Pojem „lektin“ je odvozen od latinského slova „*legere*“, které znamená „vybrat si“. Tento termín vznikl díky schopnosti některých lektinů rozlišovat červené krvinky různých krevních skupin [2]. Lektiny jsou přítomny ve virech, mikroorganismech, rostlinách a živočiších [3,4], přičemž lektiny z různých říší postrádají homologickou primární strukturu, ale mají podobnou terciární strukturu [3]. Lektiny obsahují jednu nebo několik domén rozpoznávajících sacharidy (CRD, z *angl. carbohydrate recognition domain*), které jsou zodpovědné za navázání ligandu. Substrátem mohou být nejen volné sacharidy, ale i glykolipidy či glykoproteiny. Lektiny obvykle vážou oligosacharidy na povrchu buněk a membrán, ale i volné monosacharidy [3]. Vazba lektinů na monosacharidy je slabá, ovšem vysoce selektivní [4]. Je tvořena dvěma až pěti vodíkovými můstky, které jsou doplněny slabými hydrofobními interakcemi a van der Waalsovými silami. Disociační konstanta této vazby se pohybuje kolem $\sim 10^{-4}$ M [5]. K vytvoření sacharidové specifity lektinů přispívají vodíkové můstky, posttranslační modifikace a oligomerizace [6].

1.2 Rozdělení lektinů

Všechny lektiny je možné rozdělit do pěti skupin podle specifity CRD vůči monosacharidům, k nimž mají nejvyšší afinitu: D-manose, *N*-acetylglukosaminu, L-fukose, kyselině *N*-acetylneuraminové, D-galaktose / *N*-acetylgalaktosaminu [4]. Ligandová specifita jednotlivých skupin je dána vysoce konservativní aminokyselinovou sekvencí CRD [3]. Pro biochemii mají největší význam živočišné lektiny, které se dělí do rodin podle struktury CRD, respektive jejich specifity (Tab. 1, str. 12) [7].

Domény rozpoznávajících sacharidy mohou existovat buď jako volné proteiny, nebo jako domény ve struktuře větších vícedoménových proteinů. Existují čtyři základní typy organizace domén rozpoznávajících sacharidy: pouze CRD, CRD s transmembránovou kotvou, CRD s jiným typem domén a CRD s oligomerní doménou [8]. Na obrázku 1, str. 13 jsou příklady běžných živočišných lektinů, které představují různé organizace CRD.

Tabulka 1. Klasifikace vybraných živočišných lektinů a jejich funkce. Upraveno dle [7].

Lektin	Typické sacharidové ligandy	Lokalizace v buňce
S-tyt (galektiny)	β -galaktosidy	extracelulární prostor, cytoplazma
C-tyt	různé	extracelulární prostor, buněčná membrána
P-tyt	manosa-6-fosfát, jiné	buněčná membrána, endosomy
I-tyt (sigleky)	kyselina sialová, různé	buněčná membrána
L-tyt	různé	endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát
M-tyt	Man ₈	endoplazmatické retikulum
F-tyt	L-fukosa	extracelulární prostor
F-box lektiny	GlcNAc ₂	cytoplazma
R-tyt	různé	extracelulární prostor, buněčná membrána
Kalnexiny	Glc ₁ Man ₉	endoplazmatické retikulum
Intelektiny	galaktosa, pentosy, galaktofuranosa	extracelulární prostor, buněčná membrána
Lektiny podobné chitinase	chitooligosacharidy	extracelulární prostor

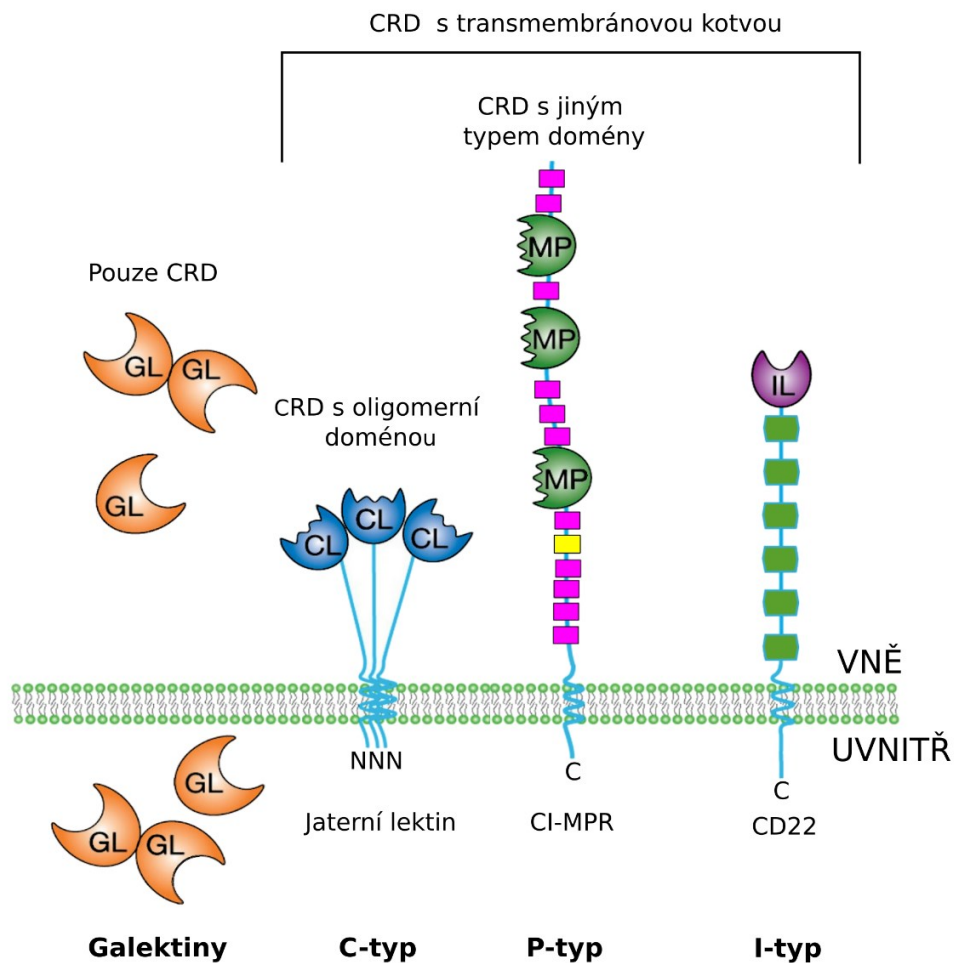
1.3 Biologické funkce lektinů

Lektiny se účastní mnoha procesů, jsou hojně zastoupeny ve všech živých organismech. Hlavní funkcí lektinů je buněčné rozpoznávání. Virové a mikrobiální lektiny zprostředkovávají adhezi patogenu k hostitelské buňce a následné zahájení infekce. Některé povrchové bakteriální lektiny se specificky vážou na lidské makrofágy, což vede k aktivaci fagocytózy a zabití bakterie, tento druh fagocytózy získal název „lektinofagocytóza“ [4].

Funkce lektinů u rostlin nejsou zcela objasněny. Předpokládá se, že rostlinné lektiny jsou obranným mechanismem proti predátorům a fytopatogenním houbám. U bobovitých rostlin se lektiny také podílejí na vytváření symbiózy s bakteriemi fixujícími molekulární dusík, hlavně s rodem *Rhizobium* [4].

Endogenní lektiny u obratlovců zprostředkovávají mezibuněčné rozpoznávání, signalizaci, adhezi a apoptózu. Ovlivňují embryonální vývoj, oplození gamet, buněčný růst a diferenciaci. Účastní se imunomodulace a zánětlivých reakcí. Hrají roli v biosyntéze glykoproteinů. Ve vrozeném imunitním systému jsou endogenní lektiny schopné přímo zabít mikroorganismy nebo usnadňují fagocytózu patogenů makrofágy a dendritickými buňkami. Pohlcené bakterie jsou neutralizovány a jejich proteiny jsou štěpeny na malé peptidy, které jsou následně prezentovány T-lymfocytům jako hlavní

histokompatibilní komplex (MHC, z angl. *major histocompatibility complex*), což naznačuje roli endogenních lektinů i v adaptivní imunitě [3].



Obrázek 1. Organizace domén rozpoznávajících sacharidy na vybraných zástupcích živočišných lektinů. Volná CRD je zastoupena u galektinů (GL), CRD s oligomerní transmembránovou doménou se vyskytuje například u jaterního lektinu (rodina C-lektinů, CL). Receptor manosa-6-fosfátu nezávislý na kationtu (CI-MPR) a lektin CD22 (rodina I-lektinů, IL) jsou zástupci vícedoménových lektinů, které kromě CRD obsahují další domény: transmembránové domény, regulační domény (označeny zeleně a fialově) či doménu inzulinu podobnému růstového faktoru (IGF-II) u CI-MPR (vyznačen žlutě) [9]. Převzato a upraveno z [8].

1.4 Galektiny

Galektiny jsou rodina lektinů vykazující afinitu k β -galaktosidům, které jsou přítomny v *N*- a *O*-vázaných glykoproteinech. Galektiny mají významnou podobnost v aminokyselinové sekvenci CRD [10,11]. Pojem „galektin“ vznikl jako náhrada staršího termínu „lektiny S-typu“, který ukazoval na závislost aktivity lektinů na přítomnosti thiolu, což platí pouze pro některé zástupce galektinů (např. pro Gal-1 a Gal-2) [10,12].

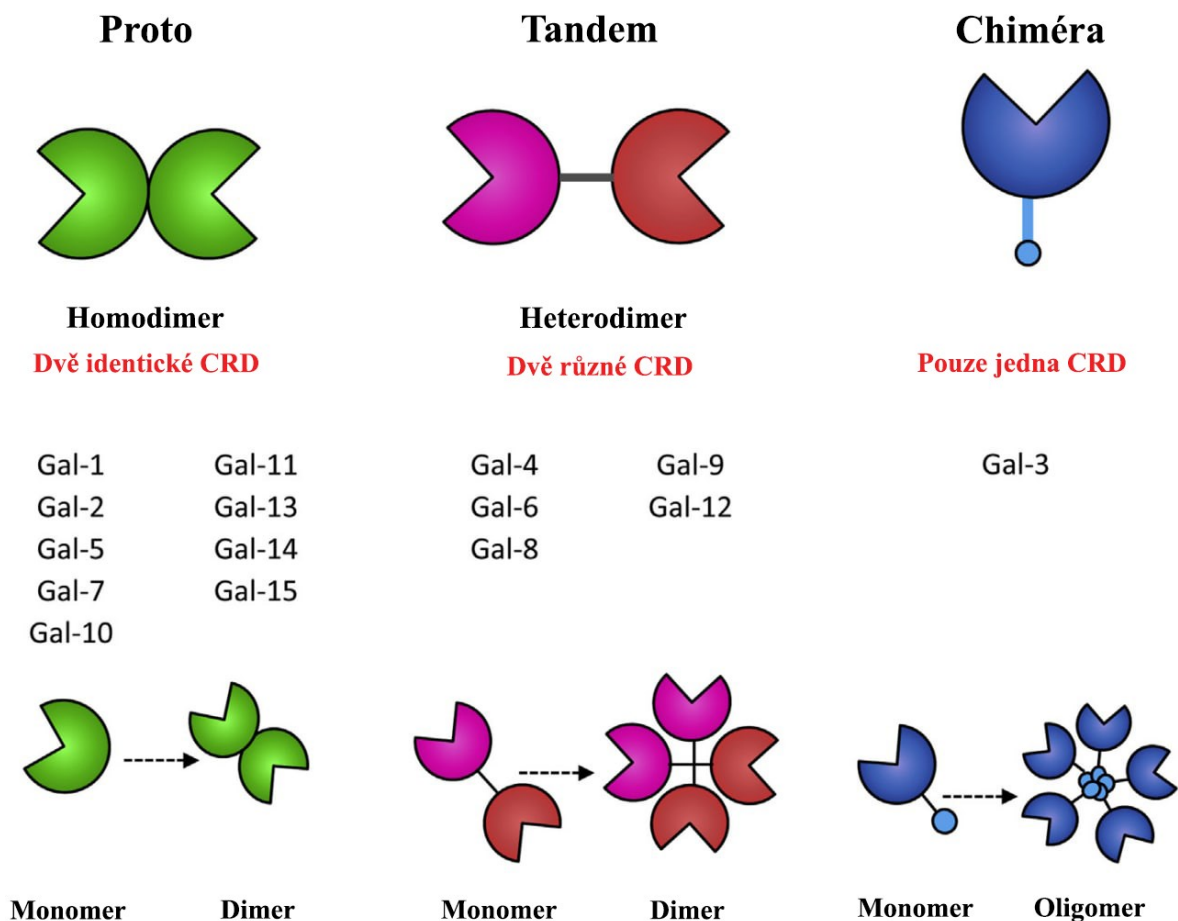
Galektiny se vyskytují v cytoplazmě, jádře, plazmatické membráně a v extracelulárním prostoru [13]. Syntéza galektinů probíhá na ribozomech v cytosolu, odkud mohou být galektiny transportovány do jádra nebo jiných míst potřeby jak klasickými, tak i neklasickými cestami (tedy mimo endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát). Nově tvořené galektiny nemají signální peptid (neprobíhá kotranslační translokace) [10,14], ale mají acetylované N-konce [10]. Žádné jiné posttranslační úpravy až na několik výjimek (např. fosforylace u Gal-3) pozorovány nebyly [10].

U savců bylo objeveno patnáct galektinů a pět proteinů podobných galektinům, avšak u lidí bylo objeveno pouze dvanáct galektinů [10,11,14]. Sekvenční identita v CRD mezi lidskými galektiny se pohybuje v rozmezí 20-50 %, výjimkou je Gal-12 s identitou menší než 20 % [12].

1.5 Organizace CRD u galektinů

Všechny známé galektiny mají jednu nebo dvě CRD (~130 aminokyselinových zbytků [11]) vázané na jeden polypeptidový řetězec (Obr. 2, str. 15) [10]. Domény rozpoznávající sacharid nejsou přímo spojeny s jinými dobře definovanými proteinovými doménami, ale přes krátké nebo dlouhé (galektin-3) peptidové řetězce. Proto, na rozdíl od jiných lektinů, CRD galektinů působí samostatně nebo tvoří multidoménové komplexy s jinými CRD [10].

Na základě organizace domén rozpoznávajících sacharidy lze galektiny rozdělit na tři typy (Obr. 2, str. 15). Prototypické galektiny jsou složeny z jedné CRD (~15 kDa [14]), tandemové galektiny mají dvě různé CRD spojené krátkým (do 70 aminokyselin [12]) peptidovým úsekem. Prototypové a tandemové galektiny mohou tvořit dimery a vyšší oligomery v závislosti na přítomnosti ligandu a na koncentraci galektinu [10]. Chimérické galektiny (Gal-3) jsou složeny z jedné CRD (~30 kDa [14]) na C-konci, která je asociována s N-koncovou nelektinovou doménou. Tato doména se skládá z 18 konzervovaných aminokyselin, po nich následuje úsek obsahující 8 – 11 aminokyselin, který se opakuje 7 – 14 krát a zahrnuje jednu aromatickou aminokyselinu a několik zbytků prolinu a glycinu [10,14]. Galektin-3 po navázání na multivalentní sacharidy může tvořit až pentamery [14].



Obrázek 2. Organizace CRD u galektinů. Prototypické galektiny obsahují jednu CRD a mohou tvořit homodimery. Tandemové galektiny jsou složeny ze dvou různých CRD spojených peptidovým úsekem, mohou tvořit heterodimerní struktury. Chimérické galektiny (Gal-3) obsahují jednu CRD na C-konci a nelektinovou doménu na N-konci; tvoří až pentamery [10,14]. Převzato a upraveno z [11].

Doména rozpoznávající sacharid u galektinů je tvořena β -sendvičem, který se skládá z přibližně 135 aminokyselinových zbytků. Dva mírně ohnuté β -listy tvoří žlábk na konkávní straně, který je dostatečně dlouhý, aby mohl držet lineární tetrasacharid. Proto vazebné místo bylo schematicky rozděleno na čtyři části (A-D), které spolu určují sacharidovou specifitu galektinů. Vazebné místo C je definováno pro vazbu β -galaktosidů a je konzervativní rysem všech galektinů. Ligandovou specifitu určuje hlavně místo B, které má různou schopnost přizpůsobovat se sacharidům (GlcNAc, Gal, GalNAc, NeuAc) a jiným skupinám (např. sulfát) na 3-OH skupině galaktosy nebo na 2-OH konci fukosy. Tyto modifikace ovlivňují afinitu jednotlivých galektinů k ligandům [10].

Doména rozpoznávající sacharid u některých galektinů a za určitých podmínek může zaujmout alternativní prostorové uspořádání, které se projevuje jinými funkcemi, například může fungovat jako membránový transportér [10].

1.6 Funkce galektinů

Galektiny se podílejí na mnoha buněčných procesech (Tab. 2, str. 17) a působí jak intracelulárně, tak i extracelulárně. Tento dvojitý účinek je umožněn mimo jiné díky neklasické sekreci galektinů [10]. Galektiny se účastní sestřihu pre-mRNA, regulace buněčného cyklu, buněčné adheze, embryogeneze a zánětlivých reakcí [3]. Galektiny mají uplatnění při studiu rakoviny, hrají roli při metastázování, angiogenezi, obraně proti nádoru, proliferaci, apoptóze a adhezi rakovinných buněk [13]. Podílejí se také na různých patologických procesech, včetně neurální degenerace, aterosklerózy, diabetu, hojení ran, revmatoidní artritidy, astmatu a jaterní cirhózy [12,13]. Důležité jsou také funkce galektinů v imunitním systému. Galektiny ovlivňují reakce vrozeného imunitního systému prostřednictvím velkého množství mechanismů, včetně kontroly adheze a migrace přes povrchy endoteliálních buněk, schopnosti produkovat pro- a protizánětlivé cytokiny, reaktivní formy kyslíku a reagovat na chemotaktické gradienty [14].

Galektiny jsou biomarkery některých virových (např. zvýšená hladina Gal-9 ukazuje na virus chřipky a HIV-1 [11]) a nádorových onemocnění [13]. Vzhledem k tomu, že galektiny hrají roli v nádorovém bujení a zánětlivých reakcích, inhibitory galektinů nebo samotné galektiny mohou mít terapeutický účinek [10,14].

1.7 Galektin-3

Galektin-3 (Gal-3) je jediný známý chimérický galektin. Je to lektin o molekulové hmotnosti 31 kDa, který je kódovaný genem *LGALS3*. Gal-3 je složen z N-terminální domény a domény rozpoznávající sacharid (CRD) na C-konci. N-terminální doména (~120 aminokyselinových zbytků) obsahuje opakující se tandemové krátké úseky bohaté na prolin [11]. Tato doména usnadňuje multimerizaci a tvorbu pentameru galektinu-3, který je například nezbytný pro extracelulární sekreci a translokaci do jádra [13]. N-terminální doména je citlivá vůči proteázám (např. kolagenase a metaloproteasám), proto jsou *in vivo* biologické funkce Gal-3 regulovány těmito enzymy [12].

Doména rozpoznávající sacharid obsahuje 110-130 aminokyselinových zbytků s motivy NWGR, které jsou důležité pro interakci s antiapoptickými proteiny rodiny Bcl-2. Galektin-3 vykazuje vysokou afinitu k *N*-acetylglukosaminu (LacNAc) a laktóze [13]. V přítomnosti multivalentních sacharidových ligandů je galektin-3 schopen síťovat glykany na buněčném povrchu, čímž zahájí transmembránové signalizační události a ovlivňuje různé buněčné funkce. Prostorová struktura CRD u Gal-3 je složena

z pěti- a šestivláknového β -listu v β -sendvičovém uspořádání [12].

Gal-3 obsahuje dvě fosforylační místa na Ser6 a Ser12, která jsou důležitá pro jeho aktivitu, například antiapoptotická aktivita Gal-3 je závislá na fosforylaci Ser6. Fosforylace je také nutná pro export Gal-3 z jádra, když je buňka vystavena apoptickým stimulům [12].

Tabulka 2. Nejrozšířenější funkce vybraných galektinů. Informace byly převzaty hlavně z [12] s doplněními ze zdrojů [11,14].

Galektin	Funkce
Gal-1	<ul style="list-style-type: none"> • Indukuje apoptózu v aktivovaných T buňkách • Podporuje toleranci mezi plodem a matkou • Přispívá k alternativní aktivaci makrofágů • Podporuje růst a migraci nádorů • Podporuje proliferaci nervových kmenových buněk • Přispívá k sestřihu pre-mRNA • Potlačuje proliferaci B-buněk • Řídí funkce krevních destiček • Inhibuje adhezi neutrofilů [14] • Blokuje degranulaci žírných buněk [14] • Působí protizánětlivě na monocyty a makrofágy [14]
Gal-2	<ul style="list-style-type: none"> • Indukuje apoptózu T buněk
Gal-3	<ul style="list-style-type: none"> • Přispívá k sestřihu pre-mRNA v jádře • Extracelulárně indukuje apoptózu T buněk, monocytů a neutrofilů • Intracelulárně má antiapoptotický účinek • Podílí se na buněčné adhezi a agregaci • Indukuje migraci monocytů a makrofágů • Podporuje růst nádorů, metastázování a angiogenezi • Urychluje reepitalizaci • Přispívá k růstu a diferenciaci B a T buněk • Vykazuje protizánětlivé vlastnosti při astmatu • Účastní se fibrózy [11]
Gal-4	<ul style="list-style-type: none"> • Podílí se na tvorbě lipidových raftů • Indukuje syntézu IL-6 CD4⁺ T buňkami
Gal-7	<ul style="list-style-type: none"> • Podílí se na diferenciaci keratinocytů • Zprostředkovává proapoptotické účinky p53 v keratinocytech
Gal-8	<ul style="list-style-type: none"> • Ovlivňuje interakci integrinů s extracelulární matrix • Zlepšuje adhezivní vlastnosti neutrofilů • Potlačuje migraci rakovinných buněk
Gal-9	<ul style="list-style-type: none"> • Indukuje apoptózu Th1 buněk, monocytů a T buněk [14] • Indukuje zrání [14] a migraci dendritických buněk a sekreci IL-12 • Reguluje stabilitu glukosového transportéru • Chemoatraktant eozinofilů • Reguluje replikaci viru HIV-1 [11]
Gal-10	<ul style="list-style-type: none"> • Role ve funkci T regulačních buněk
Gal-12	<ul style="list-style-type: none"> • Indukuje apoptózu adipocytů • Podílí se na řízení buněčného cyklu • Účastní se diferenciaci adipocytů

1.8 Funkce galektinu-3

Gal-3 je exprimován hlavně v cytoplasmě, ale může být transportován do jádra či vylučován na buněčný povrch [11]. Kromě výše zmíněných funkcí Gal-3 (Tab. 2, str. 17) jsou důležité i jeho další funkce. V závislosti na intracelulární lokalizaci Gal-3 může mít pro- nebo antiapoptotické účinky. V jádře je Gal-3 zodpovědný za regulaci genové exprese prostřednictvím transkripčních faktorů, jako je SP1 a β -katenin. Gal-3 hraje roli v expresi a sestřihu mikro-RNA, v transportu jaderných proteinů. V cytoplasmě Gal-3 ovlivňuje signální dráhy zapojené do rakoviny (např. RAS, BCL-2 a MYC). Gal-3 je také zodpovědný za tlumení imunitní reakce prostřednictvím suprese T-buněk a přirozeně zabíječských (NK) buněk [13].

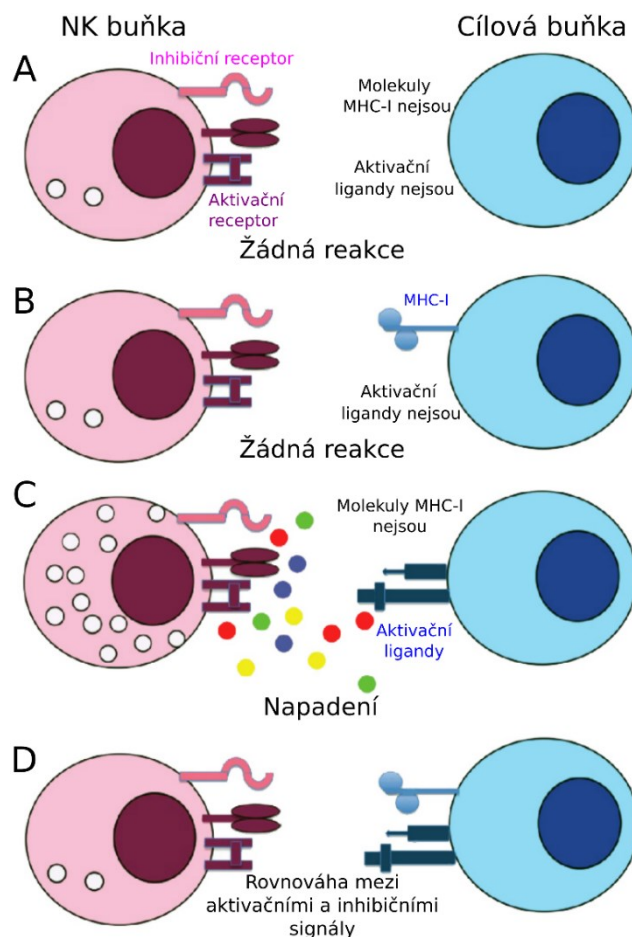
Galektin-3 je biomarkerem pro včasnou detekci či průběh některých virových onemocnění jako je herpesvirus Kaposiho sarkomu, chronická hepatitida B a C. Galektin-3 také usnadňuje vstup do buňky viru herpes simplex [11]. Velký význam má Gal-3 při onkologických onemocněních. Byla prokázána souvislost mezi mírou exprese Gal-3 a rakovinou štítné žlázy, žaludku, tlustého střeva, ledvin, plic, prostaty, prsu a slinivky břišní [13].

1.9 NK buňky

Přirozeně zabíječké buňky (NK, z *angl. natural killer cells*) jsou velké granulární lymfocyty vrozené imunity, které jsou řazeny do skupiny ILC 1 (ILC, z *angl. innate lymphoid cells*) rodiny přirozených lymfoidních buněk [15,16]. Buňky ILC 1 jsou definovány produkcí $\text{IFN}\gamma$ (jako odpověď na IL-12 a IL-18) a neschopností produkovat cytokiny asociované s $\text{T}_\text{H}2$ a $\text{T}_\text{H}17$ buňkami [15].

NK buňky tvoří 5 – 20 % všech mononukleárních buněk periferní krve [16]. Lidské NK buňky jsou na základě povrchové hustoty proteinu CD56 (CD, z *angl. cluster of differentiation*) děleny do dvou funkčních podskupin. Přibližně 90 % všech NK buněk jsou CD56^{dim} buňky, které jsou charakterizovány cytotoxickými vlastnostmi a nízkou produkcí cytokinů [17]. Podskupina $\text{CD56}^{\text{bright}}$ buněk v reakci na stimulaci monokiny produkuje cytokiny: interferon γ ($\text{IFN}\gamma$), interleukiny IL-10 a IL-13, faktory stimulující kolonie (CSF, z *angl. colony-stimulating factors*) a faktor nádorové nekrózy alfa ($\text{TNF-}\alpha$, z *angl. tumour necrosis factor*) [16,17]. Předpokládá se, že tyto dvě podskupiny představují různá stádia zrání NK buněk, přičemž CD56^{dim} buňky jsou více diferenciované [17].

Na rozdíl od T a B lymfocytů NK buňky neexprimují klonálně distribuované receptory pro antigeny a lyzují cílové buňky bez předchozí aktivace [18]. NK buňky rozpoznávají hlavní histokompatibilní komplex I. třídy (MHC-I, z *angl. major histocompatibility complex*) prostřednictvím povrchových receptorů, které přenáší signály a regulují funkce NK buněk. Buňky, jež postrádají nebo exprimují málo MHC I. třídy, jsou zabíjeny NK buňkami. Mezi cíli NK buněk proto patří rakovinné buňky a buňky napadené některými viry [18]. NK buňky exprimují na buněčný povrch také sadu aktivačních a inhibičních receptorů, které jsou mezi sebou za normálních podmínek v rovnováze. Osud cílové buňky proto záleží nejen na expresi MHC-I, ale i na expresi ligandů aktivujících receptory NK buněk (Obr. 3) [16].



Obrázek 3. Mechanismy rozpoznávání cílových buněk NK buňkami. (A) Odpověď NK buněk není zahájena, když cílová buňka neexprimuje MHC-I ani ligandy pro aktivační receptory NK buňky. (B) Cytotoxicita také nebyla pozorována, pokud molekuly MHC-I reagují s inhibičními receptory, ale nejsou přítomny aktivační ligandy. (C) V opačném případě, když nejsou exprimovány MHC-I, ale jsou rozpoznány aktivační ligandy, NK buňka napadá cílovou buňku. (D) Odpověď cílové buňky závisí na rovnováze mezi aktivačními a inhibičními signály. Zdravé buňky exprimují molekuly MHC-I a žádnou nebo nízkou hladinu aktivačních ligandů, proto jsou chráněny před cytotoxickým účinkem NK buněk. Převzato a upraveno z [16].

1.10 Receptory přirozené cytotoxicity

Mezi aktivační receptory exprimované na povrchu NK buněk hrají velkou roli receptory přirozené cytotoxicity (NCR, z *angl. natural cytotoxicity receptor*). Doposud byly objeveny tři molekuly patřící k této skupině: NKp30, NKp44 a NKp46 (Obr. 4, str. 21) [19–21]. Jsou to transmembránové glykoproteiny I. typu, které patří do imunoglobulinové superrodiny (IgSF, z *angl. immunoglobulin superfamily*) a vykazují omezenou sekvenční homologii jak mezi sebou, tak i mezi známými lidskými molekulami [19,22–24]. Receptory přirozené cytotoxicity zprostředkovávají přenos signálu přes různé adaptorové proteiny včetně CD3 ζ , Fc ϵ RI γ a KARAP/DAP12 [19,21,22].

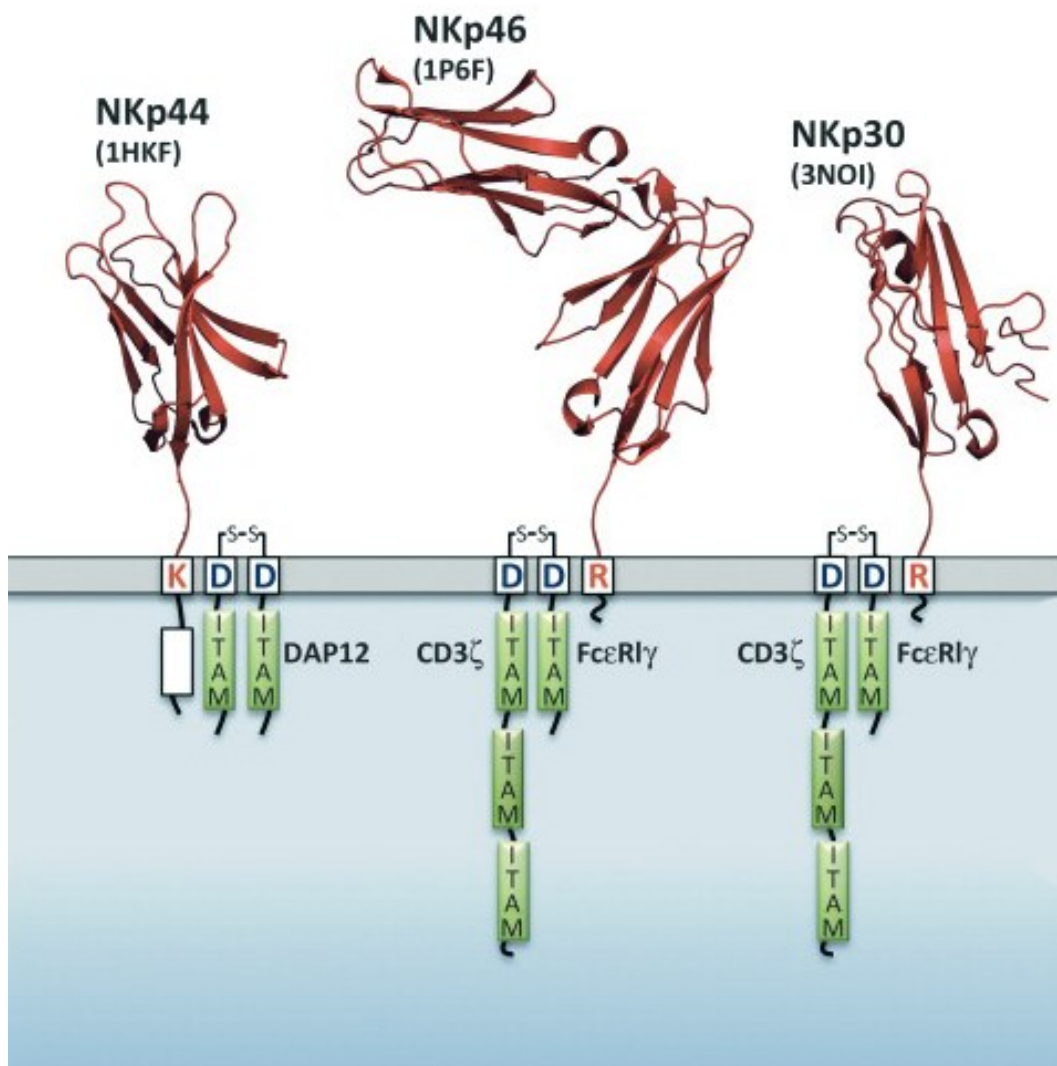
Receptor NKp44 je charakterizován jedinou extracelulární doménou podobnou imunoglobulinu (Ig, z *angl. immunoglobulin*) V-typu, jeho transmembránová doména obsahuje zbytek lysinu, který je asociován s adaptorovým proteinem KARAP/DAP12. Zajímavé je, že cytoplazmatická doména NKp44 obsahuje kromě ITAM motivu, také i ITIM motiv, který přenáší inhibiční signály. Gen kódující NKp44 je umístěn na lidském chromozomu 6 [21,23,24].

Extracelulární doména receptoru NKp46 obsahuje dvě domény podobné imunoglobulinu C2-typu. Transmembránový α -helix obsahuje zbytek argininu, který je asociován s CD3 ζ a Fc ϵ RI γ receptorovými proteiny, které dále zprostředkovávají přenos signálu přes ITAM motiv. Na rozdíl od NKp44, gen kódující NKp46 je umístěn na lidském chromozomu 19 [21,22].

Receptor NKp30 vykazuje společné rysy jak s NKp44, tak i s NKp46. Obdobně jako NKp44 obsahuje jedinou extracelulární doménu V-typu a je kódován genem umístěným na chromozomu 6. A stejně jako NKp46 obsahuje v transmembránové doméně arginin a zprostředkovává přenos signálu přes CD3 ζ a Fc ϵ RI γ adaptorové proteiny [19]. Podrobněji o receptoru NKp30 bude zmíněno v dalším oddílu.

Receptory NKp30 a NKp46 jsou exprimovány na všech NK buňkách bez ohledu, jestli jsou v klidovém nebo aktivovaném stavu, kdežto receptor NKp44 je selektivně exprimován pouze aktivovanými NK buňkami [19–21,24]. Mezi všemi NCR byla pozorována synergická spolupráce v přenosu signálu a jeho násobení [19].

Pro NCR bylo identifikováno velké množství ligandů různého původu, mezi které například patří buněčný heparin a heparansulfát, virový hemaglutinin a neuraminidasa, bakterie *Fusobacterium nucleatum* či tumorem exprimovaný jaderný antigen proliferující buňky (PCNA, z *angl. proliferating cell nuclear antigen*) [25].



Obrázek 4. Znázornění organizace domén receptorů přirozené cytotoxicity: NKp44, NKp46 a NKp30. Všechny NCR jsou membránové proteiny I typu složené z jedné (NKp30 a NKp44) či dvou (NKp46) extracelulárních domén podobných imunoglobulinu, které jsou připojené k transmembránovému α -helixu přes krátkou tzv. „stalk“ doménu. Transmembránová doména NCR obsahuje kladně nabitou aminokyselinu (Arg u NKp46 a NKp30; Lys u NKp44), která zprostředkovává přenos signálu na adaptorové proteiny (DAP12, CD3 ζ a Fc ϵ RI γ), jejichž transmembránové domény jsou propojeny disulfidickým můstkem. Intracelulární část adaptorových proteinů je složena z aktivačních imunoreceptorových motivů na bázi tyrosinu (ITAM, z *angl. immunoreceptor tyrosine-based activating motif*). Je zajímavé, že NKp44 obsahuje jeden inhibiční imunoreceptorový motiv na bázi tyrosinu (ITIM, z *angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), který však nemusí být funkční (je označen jako bílý obdélník na cytosolovém konci NKp44). Navázání aktivačního ligandu na NCR způsobí konformační změnu receptoru a umožní jeho interakci s adaptorovým proteinem, který následně změní svou konformaci, čímž je umožněna fosforylace ITAM, jež dále spouští signalizační kaskádu. Převzato a upraveno z [25].

1.11 Receptor NKp30

Glykoprotein NKp30 (NCR3; CD337) je hlavní aktivační receptor NK buněk o molekulové hmotnosti ~30 kDa a délce 190 aminokyselin, který se účastní procesů rozpoznání a zabíjení některých nádorů a virem poškozených buněk [19,26]. Podobně jako ostatní zástupci rodiny NCR, i receptor NKp30 je složen z extracelulární části, která obsahuje jednu N-koncovou Ig doménu V-typu (LBD, z *angl.* *ligand-binding domain*), po níž následuje krátká flexibilní „stalk“ doména o délce 15 aminokyselin, která je spojená s transmembránovou doménou [27–29]. Imunoglobulinová doména je bohatá na hydrofobní aminokyseliny a je důležitá zejména pro protein-proteinové interakce [19]. Extracelulární část NKp30 obsahuje tři místa *N*-glykosylace (Asn-42, Asn-68 a Asn-121) a žádné konvenční sekvence pro *O*-vázanou glykosylaci [19,29].

„Stalk“ doména a Ig doména jsou funkční jednotky, které zprostředkovávají signalizaci přes CD3 ζ . A to tak, že buď v základním stavu existuje nefunkční komplex NKp30-CD3 ζ , který se aktivuje až po navázání ligandu nebo vazba ligandu způsobuje konformační změnu NKp30, což vede k ponoření Arg-143 hlouběji do membrány a následnou interakci s CD3 ζ [26].

„Stalk“ doména ($^{129}\text{KEHPQLGAGTVLLLR}^{143}$) NKp30 přispívá k vazbě receptoru na ligand a je důležitá pro účinnou intracelulární signalizaci [26,29]. Tyto funkce jsou modulovány *N*-glykosylací LBD a „stalk“ domény. Na příkladě vazby NKp30 na B7-H6 a BAG-6 bylo ukázáno, že glykosylace na zbytcích Asn-42 a Asn-68 jsou kritické pro signalizaci NKp30, zatímco glykosylace na Asn-121 má malý vliv na funkci NKp30. Zajímavé je, že zánik glykosylačního místa Asn-42 vedl ke zrušení vazby NKp30 na B7-H6, ale neměl vliv na vazbu BAG-6 [29]. Glykoprotein NKp30 může vytvářet nekovalentní dimery a oligomery, pro jejichž tvorbu je nezbytná přítomnost „stalk“ domény a její *N*-glykosylace [30].

Transmembránová doména se skládá z 19 aminokyselin a obsahuje jednu kladně nabitou aminokyselinu arginin, která je zodpovědná za asociaci se záporně nabitými aminokyselinami adaptorových proteinů [19]. Bylo prokázáno, že mutace v transmembránové doméně R143K vedla k zachování nebo dokonce ke zvýšení signální kapacity ve srovnání s NKp30 WT, když mutace R143A vedla naopak ke ztrátě signalizace, což dokazuje, že kladný náboj na pozici 143 je nezbytný a dostatečný pro funkci NKp30 [26].

NKp30 váže několik virových ligandů, včetně proteinu pp65 lidského cytomegaloviru a hemaglutininu některých virů čeledi *Poxviridae*, které inhibují funkce

NK buněk. Další známé ligandy NKp30 jsou například membránový protein *PfEMP1* prvoka *Plasmodium falciparum* a heparin/heparansulfát [25].

Pro NKp30 byly také identifikovány tři specifické buněčné ligandy, které jsou často exprimované rakovinnými buňkami. Receptor NKp30 se váže na lidský athanogen 6 asociovaný s BCL-2 (BAG-6), který se účastní regulace genové exprese, reparace DNA, apoptózy a imunoregulace. Bylo zjištěno, že vazba BAG-6 na NKp30 inhibuje uvolnění interferonu γ a degranulaci NK buněk v přítomnosti maligně transformovaných cílových buněk [31]. Dalším selektivním ligandem NKp30 je nádorový antigen B7-H6 z rodiny B7 proteinů, který je selektivně exprimován na povrchu rakovinných buněk a indukuje cytotoxicitu NK buněk [32]. Posledním objeveným ligandem NKp30 je multifunkční protein galektin-3, který je exprimován některými druhy nádorů [33]. Předpokládá se, že inhibiční působení BAG-6 a Gal-3 na funkce NK buněk může být novým mechanismem úniku nádoru před imunitním systémem [19,31].

2 Cíle práce

- Příprava plazmidů pro expresi mutované formy CRD galektinu-3 (Gal-3-CRD-C173S) a téhož proteinu s histidinovou kotvou (Gal-3-CRD-C173S-His)
- Exprese Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His v bakteriálním expresním systému *E. coli* T7 a jejich následná purifikace
- Ověření vlivu mutace na vznik dimeru Gal-3-CRD-C173S
- Ověření vazby Gal-3-CRD-C173S na varianty receptoru NKp30 (NKp30_LBD T a NKp30_Stalk T) pomocí analytické GPC
- Studium interakce Gal-3-CRD-C173S-His s nově syntetizovanými organickými inhibitory Gal-3 pomocí termoфорézy (ve spolupráci s Dr. Karbanem, ÚCHP AV ČR)

3 Materiál

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety	Discovery HTL, Polsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Automatický sběrač frakcí	GE Healthcare, USA
Blokový termostat LS1	VLM, Německo
Centrifuga Avanti JXN-26	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Allegra X-30R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Centrifugační kyvety 85 ml	Nalgene, USA
Centrifugační kyvety 250 ml PPCO	Nalgene, USA
Centrifugační zkumavky Oak Ridge 50 ml	Sigma-Aldrich, USA
Dialyzační kazeta Slide-A-Lyzer G2 – MWCO 10000	Thermo Fisher, USA
Erlenmeyerovy baňky 2l	Simax, ČSR
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor IB-01E	JeioTech, Korea
Kahan Fuego SCS	Verkon, ČR
Kolona Biozen 3 µm dSEC-2	Phenomenex, USA
Kolona s náplní laktosa-sepharosa	Galab Technologies, Německo
Koncentrátory Amicon Ultra – MWCO 10000	Millipore, USA
Kónické zkumavky 50 ml 15 ml	VWR, USA
Lahve 1 l, 500 ml, 100 ml	P-Lab, ČR
Mikrocentrifuga miniStar silverline	VWR, USA
Mikroštríkačka HAMILTON	Hamilton, USA
Mikrovládná trouba	Moulinex, Francie
Mikrozkumavky 1,5 ml	Corning, USA
Mikrozkumavky pro PCR 500 µl	Sigma-Aldrich, USA
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko

Petriho misky	Corning, Německo
pH metr Φ 200	Beckman Coulter, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Souprava pro agarosovou elektroforézu Liberty 120	Biokeystone, USA
Souprava pro izolaci DNA NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel, Německo
Souprava pro izolaci DNA NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Německo
Souprava pro izolaci DNA NucleoBond Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel, Německo
Souprava pro klonování Ligation-Free Cloning Kit	ABM, Kanada
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Spektrofotometr METASH V-5000	Metash Instruments, Čína
Stříkačkový mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 μm	Carl Roth, Německo
Termocykler T100	Bio-Rad, Německo
Transiluminátor Dark Reader	Clare Chemical Research, USA
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Mini Shaking Incubator	MIULAB, Čína
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Orbit 1000	Labnet, USA
Ultrazvuková sonda Sonoplus	Bandelin, Německo
Vaříč	ETA, ČR
Vodní lázeň	Memmert, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí PS 251-2	Sigma-Aldrich, USA
Zobrazovací zařízení Alliance Q9	UVItec, UK

3.2 Chemikálie

1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA

Agar	Carl Roth, Německo
Agarosa	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Biotika, SR
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
Chlorid draselný	Lach-Ner, ČR
Chlorid hořečnatý	Lach-Ner, ČR
Chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
dNTPs	Top-Bio, ČR
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Lach-Ner, ČR
Ethanol denaturovaný	Lach-Ner, ČR
Fenylmethylsulfonylfluorid	Serva, Německo
Glycerol	Lach-Ner, ČR
Good View II	Ecoli, SR
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
Hydroxid sodný	Penta, ČR
Imidazol	Carl Roth, Německo
IPTG	Sigma-Aldrich, USA
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
Kvasničný extrakt	Duchefa, Nizozemsko
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner, ČR
Kyselina octová	Lach-Ner, ČR
L-glycin	Lach-Ner, ČR
Laktosa monohydrát	Carl Roth, Německo
Leupeptin	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	P-Lab, ČR

<i>N,N'</i> -methylenbisakrylamid	Serva, USA
Octan sodný	Sigma-Aldrich, ČR
PCR voda	Top-Bio, ČR
Pepstatin	Thermo Fisher, USA
Peroxodisíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
Proteinový standard Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Síran hořečnatý	Penta, ČR
Tetramethylethylendiamin	Serva, USA
Tris	Carl Roth, Německo
Trypton	Duchefa, Nizozemsko

3.3 Enzymy

Q5 DNA polymerasa	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleasa NcoI-HF	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleasa PmeI	New England Biolabs, USA
RNAsa A	Lach-Ner, ČR

3.4 Komerční pufry a roztoky

CutSmart buffer pro restrikční endonukleasy	New England Biolabs, USA
Q5 enhancer	New England Biolabs, USA
Q5 reakční pufr	New England Biolabs, USA

3.5 Bakteriální kmeny

<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen, USA
<i>E. coli</i> T7	New England Biolabs, USA
<i>E. coli</i> TOP 10	Thermo Fisher, USA

3.6 Vektory

pOPINE_Gal-3-CRD	Bc. Matouš Tulpa, PřF UK, ČR
------------------	------------------------------

3.7 Oligonukleotidy a jejich sekvence

pOPINE_Gal-3-CRD_FW

5'- AGGAGATATACCATGCCGCTGATTGTTCCGTATAATCTG - 3'

pOPINE_Gal-3-CRD_REV

5'- GTGATGGTGATGTTTTAGATCATGGTATAGCTTGCG - 3'

FW_Gal-3-CRD-C173S

5'-TGTTATTGTGAGCAATACCAAAC-3'

REV_Gal-3-CRD-C173S

5'-GTTTGGTATTGCTCACAATAACA-3'

Gal-3-CRD-C173S-His_REV

5'-GTGATGGTGATGTTTGATCATGGTATAGCTTGCG-3'

opinEF_FW

5'- GGACCGAAATTAATACGACTC - 3'

pTT_REV

5'- TATGTCCTTCCGAGTGAGAG - 3'

3.8 Kultivační média

LB médium:	1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH 7,4
LB Amp:	LB médium + ampicilin o koncentraci 100 µg/ml
SOB médium:	2 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , pH 7,0
SOB Amp:	SOB médium + ampicilin o koncentraci 100 µg/ml

3.9 Pufry a roztoky

Barvicí roztok pro SDS-PAGE:	45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 % CBB R-250
Elektrokový pufr pro SDS-PAGE:	25 mM Tris, 0,19 M glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:	35 % ethanol, 10 % kyselina octová
Pufr TAE pro agarosovou elektroforézu:	40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA
Roztok AA pro SDS-PAGE:	29 % AA, 1 %, N,N'-methylenbisakrylamid
Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu: Gel loading dye, purple (6×)	New England Biolabs, USA
Vzorkový pufr pro SDS-PAGE, 5× koncentrovaný, neredukující:	150 mM Tris, 50 % (v/v) glycerol, 5 % (w/v) SDS, 0,025 % (w/v) bromfenolová modř, 50 mM NaN ₃ , pH 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE, 5× koncentrovaný, redukující:	150 mM Tris, 50 % (v/v) glycerol, 5 % (w/v) SDS, 0,025 % (w/v) bromfenolová modř, 50 mM NaN ₃ , 10 % (v/v) 2-merkптоethanol, pH 6,8
Dialyzační roztok:	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , pH 7,5
Eluční pufr pro kolonu laktosa-sepharosa:	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , 200 mM laktosa, pH 7,5
Mobilní fáze pro GPC:	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , pH 6,8
Octanový pufr:	20 mM octan sodný, 150 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , pH 4,0
PBS:	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , pH 7,0
TES:	10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , pH 8,0

4 Metody

4.1 Polymerasová řetězová reakce

4.1.1 PCR – amplifikace dvou úseků DNA pro gen Gal-3-CRD-C173S

Do dvou mikrokumavek pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR, z *angl. polymerase chain reaction*) byly připraveny reakční směsi podle tabulky 3. Objem roztoků byl doplněn vodou pro PCR na celkový objem 50 μ l.

Tabulka 3. Složení reakčních směsí pro PCR dvou úseků DNA. Gal-3-CRD značí doménu rozpoznávající sacharid galektinu-3, Gal_3_CRD_C173S je doména rozpoznávající sacharid galektinu-3 s mutací cysteinu na pozici 173 na serin.

	Mikrozkumavka „1“	Mikrozkumavka „2“
Templátová DNA	100 ng pOPINE_Gal-3-CRD	
Přímý primer	500 nM pOPINE_Gal-3-CRD_FW	500 nM FW_Gal_3_CRD_C173S
Zpětný primer	500 nM REV_Gal_3_CRD_C173S	500 nM pOPINE_Gal_3_CRD_REV
Q5 reakční pufr	10 μ l	
Q5 enhancer	10 μ l	
Směs dNTPs	1 mM	
Q5 DNA polymerasa	0,5 U	

Poté byly mikrokumavky vloženy do termocykléru, kde byly naprogramovány teploty a čas pro jednotlivé kroky PCR. Nejdříve byla směs zahřívána 4 min při 95 °C, načež proběhlo 30 cyklů: 30 s při 95 °C, 30 s při 55 °C, 1 min při 72 °C. Poté byla směs inkubována při 72 °C po dobu 10 min a následně byla až do vyjmutí z termocykléru udržována teplota 4 °C.

4.1.2 Spojovací PCR

Provedení bylo analogické předchozímu postupu, ale reakční směs byla připravena podle tabulky 4. Objem roztoku byl doplněn vodou pro PCR na celkový objem 50 μ l. Jako templátová DNA byla použita ekvimolární směs DNA z PCR produktů vzorku „1“ a vzorku „2“.

Tabulka 4. Složení směsi pro spojovací PCR.

	Množství
Templátová DNA	100 ng ekvimolární směsi DNA produktů vzorku „1“ a vzorku „2“
Přímý primer	500 nM pOPINE_Gal_3_CRD_FW
Zpětný primer	500 nM pOPINE_Gal_3_CRD_REV
Q5 reakční pufr	10 µl
Q5 enhancer	10 µl
Směs dNTPs	1 mM
Q5 DNA polymerasa	0,5 U

4.2 Příprava genu kódujícího mutovanou formu CRD galektinu-3 s histidinovou kotvou na C-konci

Do zkumavky pro PCR byla připravena reakční směs podle tabulky 5. Objem roztoku byl doplněn vodou pro PCR na celkový objem 50 µl. Podmínky provedení PCR byly stejné jako v předchozím postupu.

Tabulka 5. Složení směsi pro PCR Gal-3-CRD-C173S-His. Gal_3_CRD_C173S značí doménu rozpoznávající sacharid galektinu-3 s mutací cysteinu na serin na pozici 173, Gal-3-CRD_C173S_His_REV je primer pro tentýž protein s histidinovou kotvou na C-konci.

	Množství
Templátová DNA	50 ng pOPINE_Gal-3-CRD_C173S
Přímý primer	500 nM pOPINE_Gal_3_CRD_FW
Zpětný primer	500 nM Gal-3-CRD_C173S_His_REV
Q5 reakční pufr	10 µl
Q5 enhancer	10 µl
Směs dNTPs	1 mM
Q5 DNA polymerasa	0,5 U

4.3 Štěpení plazmidu pOPINE restrikčními endonukleasami

Do mikrozkuavky byl připraven roztok o celkovém objemu 20 µl, který obsahoval 3 µg plazmidu pOPINE, 2 µl reakčního pufru CutSmart a restrikční endonukleasy NcoI-HF a PmeI, vždy po 10 U. Roztok byl doplněn sterilní deionizovanou vodou. Směs byla inkubována 90 min při 37 °C.

4.4 Agarosová gelová elektroforéza

Pro agarosovou elektroforézu byly připraveny dva 0,8 % (w/v) gely přidáním navážky agarosy do příslušného objemu TAE pufru s následným zahřátím směsi

v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarosy. Pro menší variantu gelu bylo použito 0,58 g agarosy a 70 ml TAE pufru, pro větší variantu bylo použito 0,74 g agarosy a 95 ml TAE pufru. Do ještě teplého roztoku byly přidány 3 μ l barviva Good View II pro menší variantu gelu a 4,4 μ l pro větší variantu. Vzniklá směs byla následně nalita do elektroforetické vany a do roztoku byl vložen plastový hřeben k vytvoření jamek. Po ztuhnutí gelu byl hřeben vyjmut, gel byl převrstven deionizovanou vodou a elektrodové prostory byly naplněny TAE pufrem. Vzorky pro elektroforézu byly připraveny smícháním vzorku DNA s příslušným objemem vzorkového pufru (6 \times koncentrovaný). Do prvních dvou jamek bylo také pipetováno po 10 μ l standardů s úseky DNA v násobcích 1 kb nebo 100 bp. Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 180 V. DNA byla vizualizována pod UV nebo v modrém světle.

4.5 Izolace DNA z agarosového gelu

Po vizualizaci v modrém světle byla vyříznuta oblast agarosového gelu, která obsahovala cílový úsek DNA. Následná izolace DNA byla provedena pomocí komerční soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. K vyříznutému gelu v mikrozkuhavce bylo přidáno 650 μ l roztoku „NTI binding buffer“, načež byla směs zahřívána v blokovém termostatu 10 min při 50 °C. Po rozpuštění gelu byl roztok nanesen na kolonku vloženou do mikrozkuhavky a odstředěn 1 min při 11000 \times g a 20 °C. Eluát byl vylit a kolonka promyta 700 μ l roztoku NT3. Následovala centrifugace 1 min při 11000 \times g a 20 °C a eluát byl znovu odstraněn. Celkově byla provedena dvě promytí. Poté následovalo vysušení kolonky centrifugací 3 min při 11000 \times g a 20 °C, načež byla mikrozkuhavka vyměněna za čistou. V dalším kroku byla provedena eluce DNA tak, že na kolonku bylo pipetováno 40 μ l PCR vody předeřáté na 50 °C. Eluce byla provedena odstředěním 1 min při 11000 \times g a 20 °C.

4.6 Klonování nezávislé na ligáze

Reakce pro vložení genu do štěpeného plazmidu byla připravena tak, že do mikrozkuhavky bylo přidáno 20 ng PCR produktu kódujícího cílový gen a 100 ng štěpeného plazmidu pOPINE (molární poměr insert : plazmid byl 3:1). Směs byla doplněna 10 μ l komerčního roztoku Ligation-Free Cloning Kit a roztok byl doplněn PCR vodou na celkový objem 20 μ l. Poté směs byla inkubována 30 min v ledové lázni.

4.7 Transformace kompetentních buněk *E. coli* TOP 10

Do roztoku pro LFC (viz kapitolu 4.6) bylo přidáno 50 μ l suspenze rozmražených bakterií *E. coli* TOP 10 a směs byla nechána na ledu 20 minut. Následně byl proveden teplotní šok inkubací mikrozkuřavky v blokovém termostatu 1 min při 42 °C a poté opět na ledové lázni 20 minut. Poté bylo do směsi přidáno 150 μ l SOB média (SOB, z *angl. super optimal broth*) a mikrozkuřavka byla inkubována 1 hod při 37 °C. Nakonec byla buněčná suspenze pod kahanem rozetřena na agarovou misku připravenou z SOB Amp média a inkubována přes noc při 37 °C.

4.8 PCR z bakteriálních kolonií

Nejprve bylo do mikrozkuřavky pro PCR pipetováno 10 μ l roztoku Combi PPP Master Mix, 2 μ l přímého primeru pOPINE_Gal-3-CRD_FW o 5 μ M koncentraci, 2 μ l zpětného primeru pOPINE_Gal-3-CRD_REV (příp. Gal-3-CRD_C173S_His_REV) o 5 μ M koncentraci a 6 μ l PCR vody. V roztoku pro PCR byly následně pomocí pipetovací špičky resuspendovány bakterie z testované z kolonie. Špičky byly uchovány v chladu pro další použití při nízkoobjemové kultivaci bakterií (viz kapitolu 4.9.1). Mikrozkuřavky byly vloženy do termocykléru, teplotní program byl nastaven následovně: 3 min při 95 °C, následně 20 cyklů: 30 s při 95 °C, 30 s při 55 °C, 1 min při 72 °C, po cyklech následovala elongace 5 min při 72 °C a následně byla až do vyjmutí zkuřavek z termocykléru teplota udržována na 4 °C. Výsledek PCR byl vizualizován agarosovou elektroforézou (viz kapitolu 4.4). Pozitivně testované kolonie byly dále kultivovány pro nízkoobjemovou extrakci plazmidu a následnou sekvenaci plazmidové DNA.

4.9 Nízkoobjemová produkce plazmidu

4.9.1 Nízkoobjemová kultivace bakterií

Nejprve byl v 50 ml kónické zkuřavce připraven kultivační roztok, který obsahoval 5 ml SOB Amp média. Médium bylo zaočkováno špičkou s pozitivní kolonií *E. coli* TOP 10 (viz kapitolu 4.8) a bakterie byly inkubovány při 37 °C a 200 ot./min přes noc.

4.9.2 Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA

Nejdříve byla buněčná suspenze odstředěna 15 min při 4000 \times g a 20 °C (nastavená teplota byla konstantní pro všechny centrifugace), supernatant byl odlit a k bakteriální

peletě bylo přidáno 15 ml pufru TES pro omytí bakterií od zbytků kultivačního média. Poté byla zkumavka opět odstředěna 15 min při $4000 \times g$. Supernatant byl odstraněn. K bakteriím byly postupně přidávány roztoky z komerční soupravy NucleoSpin Plasmid Mini. Nejprve byla provedena alkalická lýze buněk tak, že bakteriální peleta byla resuspendována v 250 μ l pufru A1 a vzniklá suspenze byla v mikrozkuhavce smíchána s 250 μ l pufru A2 obsahujícího acidobazický indikátor s modrým zbarvením v alkalické oblasti pH. Obsah mikrozkuhavky byl jemně, ale důkladně promíchán a inkubován 5 min při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 300 μ l pufru A3 a mikrozkuhavka byla jemně promíchána do úplného odbarvení suspenze. Poté byl lyzát odstředován 10 min při $20000 \times g$. Následně byl na kolonku vloženou do mikrozkuhavky nanesen supernatant a roztok byl odstředován 1 min při $11000 \times g$. Filtrát byl odstraněn a kolonka byla promyta 500 μ l pufru AW. Kolonka byla opět odstředována za stejných podmínek. Dále následovalo promytí 600 μ l pufru A4 a odstředování 1 min při $11000 \times g$. Poté byla kolonka odstředována 2 min při $11000 \times g$ pro vysušení. Nakonec byla kolonka vložena do čisté mikrozkuhavky a eluce DNA byla provedena 50 μ l PCR vody předehřáté na blokovém termostatu na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ s následnou centrifugací 1 min při $11000 \times g$.

4.10 Příprava vzorků pro sekvenaci DNA

Sekvenační analýza DNA byla provedena s přímým primerem opinEF_FW a zpětným primerem pTT_REV. Pro sekvenaci jednoho vzorku byly připraveny dvě mikrozkuhavky, které obsahovaly po 200 ng plazmidové DNA. Do první zkumavky byl přidán přímý primer a do druhé zkumavky zpětný primer, vždy po 1 μ l z 5 μ M zásobního roztoku. Směs v každé mikrozkuhavce byla doplněna PCR vodou na celkový objem 8 μ l. Sekvenační analýza DNA byla provedena Dr. Štěpánkou Hrdou v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK. Výsledky sekvenace byly vyhodnoceny v programu SnapGene a pro další zpracování byly vybrány vzorky DNA, které neobsahovaly žádné mutace.

4.11 Velkoobjemová produkce plazmidu

4.11.1 Transformace kompetentních buněk *E. coli* DH5 α

V mikrozkuhavce bylo smícháno 50 μ l suspenze bakterií *E. coli* DH5 α rozmražených na ledu s 1 μ g plazmidové DNA. Směs byla inkubována 30 min na ledu, následně byl proveden teplotní šok inkubací mikrozkuhavky na blokovém termostatu 1 min při $40 \text{ }^\circ\text{C}$ a poté opět na ledové lázni 20 minut. Poté bylo do směsi přidáno 150 μ l LB média a mikrozkuhavka byla inkubována 1 hod při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakonec byla buněčná

suspenze pod kahanem přenesena na agarovou miskou připravenou ze LB Amp média a inkubována přes noc při 37 °C.

4.11.2 Velkoobjemová kultivace bakterií

Kolonie *E. coli* DH5 α narostlé na misce byly resuspendovány v LB médiu a vzniklá suspenze byla přenesena do 2l Erlenmeyerovy baňky s 500 ml LB Amp média. Poté byla buněčná suspenze inkubována na třepačce při 37 °C a 200 ot./min přes noc.

4.11.3 Velkoobjemová izolace plazmidové DNA

Živné médium s narostlými bakteriemi bylo rozděleno přibližně po 250 ml do dvou centrifugačních kyvet, načež byla buněčná suspenze odstředěna 30 min při 4000 \times g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a každá peleta byla resuspendována v 22,5 ml TES pufru. Poté byly obě suspenze spojeny a odstředovány 10 min při 4000 \times g a 4 °C. Supernatant byl odlit. Dále byly k bakteriím postupně přidávány roztoky z komerční soupravy NucleoBond Xtra Maxi. Nejprve byla bakteriální peleta resuspendována v 12 ml pufru RES s přísádkem RNasy A o výsledné koncentraci 60 μ g/ml. Následně byla provedena alkalická lýze buněk tak, že suspenze byla ve zkumavce smíchána s 12 ml pufru LYS obsahujícího acidobazický indikátor s modrým zbarvením v alkalické oblasti pH. Následně byla zkumavka několikrát jemně promíchána a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Dále ke směsi bylo přidáno 12 ml neutralizačního pufru NEU a zkumavka byla několikrát jemně promíchána do odbarvení směsi. Následně na papírový filtr vložený do kolonky bylo nanášeno 25 ml ekvilibračního pufru EQU. Následně byla na filtr nanášena bakteriální lyzát. Filtrát byl odlit a filtr promyt 15 ml ekvilibračního pufru EQU. Papírový filtr byl odstraněn. Kolonka byla následně promyta 25 ml promývacího pufru WASH. DNA byla eluována 15 ml elučního pufru ELU do 30 ml centrifugační kyvety typu Oak Ridge. Dále byla DNA vysrážena přidáním 10,5 ml isopropanolu vychlazeného na -20 °C a zkumavka byla promíchána na vortexovém mixéru. Poté byla zkumavka odstředována 1 hod při 20000 \times g a 1 °C, načež byl supernatant odstraněn a peleta byla resuspendována v 4 ml 70 % ethanolu vychlazeného na -20 °C. Poté suspenze byla odstředována 10 min při 15000 \times g a 1 °C, načež byl supernatant odlit. Peleta DNA byla nechána vyschnout na vzduchu 20 min za laboratorní teploty. Následně byla DNA rozpuštěna v 1,0 ml sterilní deionizované vody.

4.12 Rekombinantní exprese a purifikace variant galektinu-3

4.12.1 Transformace kompetentních buněk *E. coli* T7 a produkce proteinů

Produkce Gal-3-CRD-C173S (příp. Gal-3-CRD-C173S-His) byla provedena s využitím kompetentních bakterií kmenu *E. coli* T7. Bakterie byly transformovány příslušným plazmidem nesoucím cílový gen (viz kapitolu 4.11.3). Kolonie vyrostlé na misce byly následně resuspendovány v LB médiu a vzniklá suspenze byla přenesena do 2l Erlenmeyerovy baňky s 500 ml LB Amp média. Poté byla směs inkubována na třepačce při 37 °C a 200 ot./min a průběžně byla měřena optická hustota při 600 nm (OD₆₀₀). Po dosažení hodnoty OD₆₀₀ v rozmezí 0,4 – 0,6 byla produkce proteinů zahájena přidáním isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyra-nosidu (IPTG) na výslednou 0,5 mM koncentraci. Dále byly bakterie inkubovány na třepačce 4 hod při 37 °C a 200 ot./min. Poté byla buněčná suspenze rozdělena do dvou 250 ml centrifugačních kyvet, načež byla směs odstředěna 30 min při 4200 × g a 4 °C. Supernatant byl odlit a každá peleta byla pomocí vortexového mixéru resuspendována v 15 ml TES pufru. Vzniklé suspenze byly poté smíchány v 50 ml kónické zkumavce, načež byly odstředovány 15 min při 4200 × g a 4 °C, supernatant byl slit a bakteriální peleta dále zpracována.

4.12.2 Sonikace bakterií

Nejprve byla bakteriální peleta resuspendována ve 40 ml vychlazeného HEPES pufru, následně bylo do roztoku přidáno 400 µl 100 mM fenylmethylsulfonylfluoridu, 40 µl pepstatinu o koncentraci 1 µg/ml, 40 µl leupeptinu o koncentraci 1 µg/ml, 40 µl RNasy o koncentraci 1 µg/ml a 2 µl 100 mM chloridu hořečnatého. Následně byly provedeny tři sonikace po dobu 30 sekund pomocí 20 W ultrazvukové sondy. Mezi jednotlivými sonikacemi byl vzorek 1 min chlazen na ledové lázni. Poté byla buněčná suspenze odstředována 15 min při 4200 × g a 4 °C. Vzniklá peleta byla vyhozena a supernatant byl smíchán se 100 ml pufru HEPES a následně přefiltrován přes 0,22 µm filtr do čisté lahve.

4.12.3 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His byla provedena na koloně s nosičem laktosa-sepharosa, která byla připojena k systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, z *angl. high performance liquid chromatography*) ÄKTA. Nejprve byla pufrům HEPES promyta nástřiková smyčka a

kolona byla ekvilibrována pěti objemy kolony pufrům HEPES při průtoku 4 ml/min. Poté byl na kolonu nanášen filtrát (viz kapitulu 4.12.2) obsahující cílový protein při průtoku 4 ml/min. Izokratická eluce proteinu byla provedena pufrům HEPES s přidavkem laktosy o výsledné koncentraci 200 mM.

4.12.4 Dialýza Gal-3-CRD-C173S

Roztok proteinu (viz kapitulu 4.12.3) byl smíchán s pufrům HEPES na celkový objem 10 ml. Dialýza byla provedena s využitím dialyzační kazety, kam byl pipetován roztok proteinu. Dialyzační kazeta byla poté vložena do kádinky s pufrům HEPES a roztok proteinu byl dialyzován za stálého míchání magnetickým míchadlem podle schématu: 1 hod proti 1 l pufru HEPES, 1 hod proti 2 l pufru HEPES a poté přes noc proti 2 l pufru HEPES při 4 °C.

4.12.5 Zkoncentrování proteinů

Zkoncentrování proteinů bylo provedeno pomocí koncentrátoru Amicon Ultra – MWCO 10000, který selektivně nepropouští látky s relativní molekulovou hmotností větší než 10 kDa. Nejprve byl vzorek proteinu pipetován do koncentrátoru, následně byl odstředován 3 min při $4200 \times g$ a 4 °C. Roztok byl doplňován a vzorek byl znovu odstředován za stejných podmínek. Doplnění roztoku a odstředování bylo opakováno tolikrát, až se objem vzorku snížil na asi 500 μ l. Po ukončení centrifugace byl tento roztok pipetován do mikrozkušavky, kde byl uchován pro další využití. Koncentrátor byl následně promyt pufrům HEPES a deionizovanou vodou, poté byl naplněn pufrům HEPES a uskladněn při 4 °C.

4.12.6 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, z *angl. sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*) byla provedena v redukujícím i neredukujícím prostředí. Pro SDS-PAGE byly připraveny dva 12,5 % gely: zaostřovací a rozdělovací. Nejprve byl připraven spodní rozdělovací gel smícháním 1,6 ml destilované vody, 1,25 ml 1,5 M Tris pufru o pH 8,8, 2,1 ml roztoku AA, 50 μ l 10 % SDS a 2,5 μ l tetramethylethylendiaminu. Na závěr bylo přidáno 50 μ l 10 % peroxidisírany amonného, který vyvolal polymeraci akrylamidového gelu. Vzniklý roztok byl ihned pipetován mezi elektroforetická skla umístěná do držáku pro přípravu gelu. Poté byla na povrch gelu rychle pipetována voda tak, aby pokryla povrch gelu.

Po ztuhnutí gelu byla voda odlita a mezi elektroforetická skla byl pipetován horní

zaostřovací gel, který byl připraven smícháním 1,4 ml destilované vody, 0,25 ml 1 M Tris pufru o pH 6,8, 0,5 ml AA, 20 µl 10 % SDS, 3 µl tetramethylethyldiaminu a 20 µl 10 % peroxidisíranu amonného. Dále byl mezi skla vložen plastový hřeben pro vytvoření jamek. Jakmile gel ztuhl, hřeben byl vyjmut a skla byla vložena do elektroforetické aparatury, která byla následně naplněna elektrodoým pufrem.

Poté byl do dvou mikrozkušavek pipetován vzorek proteinu o maximálním objemu 10 µl. Do jedné mikrozkušavky byl přidán 5× koncentrovaný neredukující vzorkový pufr, do druhé mikrozkušavky byl přidán 5× koncentrovaný redukující vzorkový pufr. Vzniklé roztoky byly dále inkubovány v blokovém termostatu 5 min při 95 °C, následně byly odstředovány 1 min při 20000 × g a 20 °C. Takto připravené vzorky byly pipetovány do jamek gelu, přičemž do jedné z jamek bylo pipetováno 5 µl proteinového standardu. Elektroforéza probíhala 45 – 60 min při napětí 200 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut z elektroforetických skel a přemístěn do barvicího roztoku. Barvení bylo provedeno na třepačce 30 – 40 min při 60 ot./min. Poté byl gel inkubován v odbarvovacím roztoku na třepačce 40 min při 60 ot./min třikrát za sebou. Gel byl vizualizován a vyhodnocen pomocí zobrazovacího zařízení Alliance Q9.

4.13 Charakterizace proteinů

4.13.1 Analytická gelová permeační chromatografie

Analytická gelová permeační chromatografie (GPC, z *angl. gel permeation chromatography*) byla provedena izokraticky s použitím vysokotlaké silikagelové kolony Biozen dSEC-2 (3 µm) připojené k HPLC systému ÄKTA. Nejprve byla smyčka promyta pěti objemy pufru HEPES o pH 6,8 a následně kolona byla ekvilibrována 30 ml pufru HEPES o pH 6,8 při průtoku 1 ml/min. Poté na kolonu byly aplikovány vzorky o maximálním objemu 300 µl, které byly připraveny smícháním dvou proteinů v molárním poměru 1:1. Během GPC byla sledována vodivost protékajícího roztoku a jeho absorbance při 280 nm. Po ukončení chromatografie byla kolona promyta 30 ml pufru HEPES a 30 ml 20 % ethanolu.

5 Výsledky

5.1 Příprava plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD-C173S

5.1.1 Příprava genu kódujícího Gal-3-CRD-C173S

Prvním krokem práce byla příprava DNA, která kóduje CRD galektinu-3 s jednobodovou mutací C173S (viz kapitolu 4.1). Návrh aminokyselinové sekvence pro gen Gal-3-CRD-C173S o velikosti 417 bp (Obr. 5) vycházel z úspěšné produkce Gal-3-CRD provedené Bc. Matoušem Tulpou [34].

Gal-3-WT:

```
MADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPGAWGNQPAGAGGYPGASYPGAYPGQAPPGAYPG
QAPPGAYPGAPGAYPGAPAPGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPATGPYGAPAG
PLIVPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENNR
RVIV*NTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHR
VKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMI *
```

Gal-3-CRD:

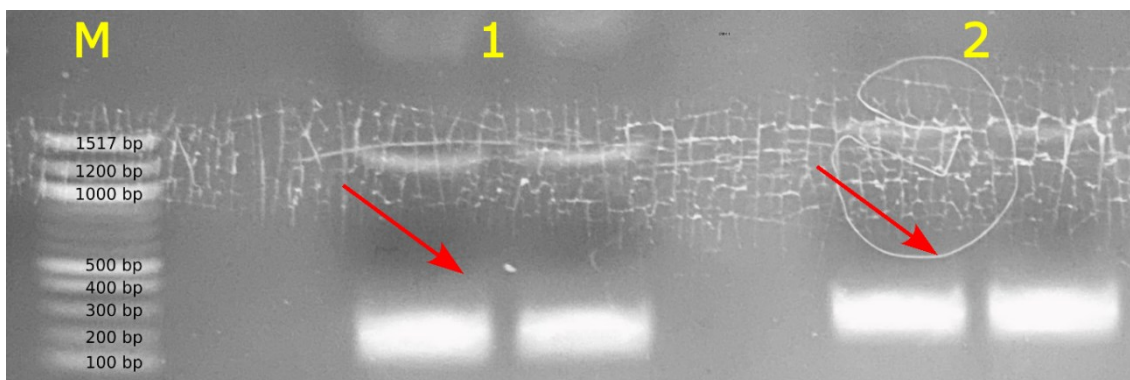
```
MPLIVPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENN
RRVIV*NTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNH
RVKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMI *
```

Gal-3-CRD-C173S:

```
MPLIVPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENN
RRVIVSNTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNH
RVKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMI *
```

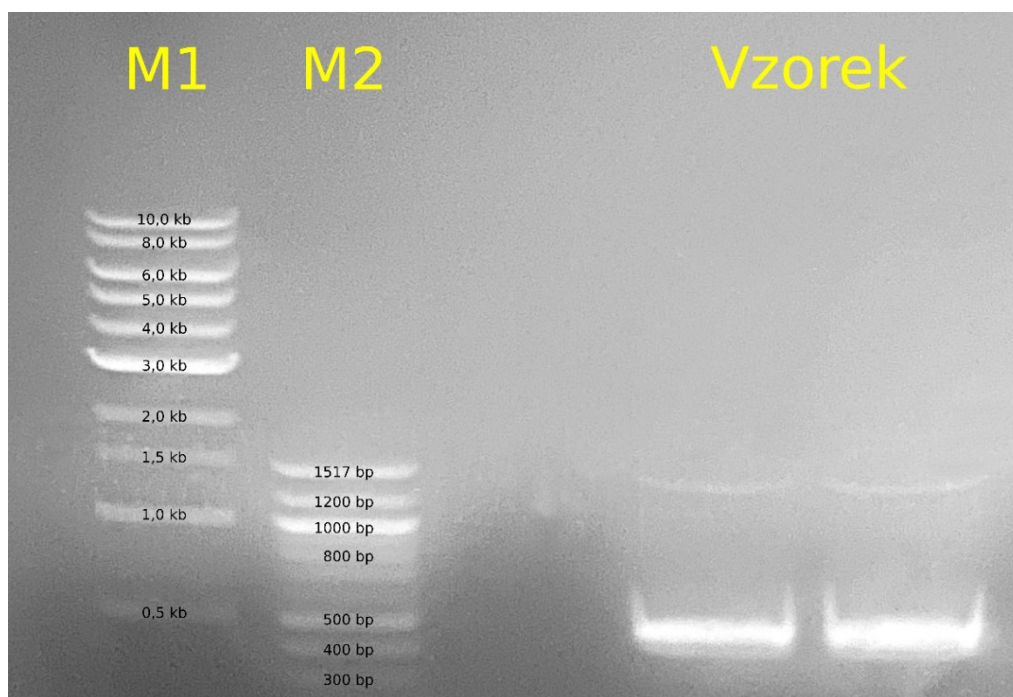
Obrázek 5. Aminokyselinové sekvence Gal-3-WT, Gal-3-CRD a Gal-3-CRD-C173S. Zeleně (P₁₁₃ – I₂₅₀) je vyznačena sekvence pro doménu rozpoznávající sacharid galektinu-3. Žlutě je vyznačeno místo mutace, hvězdičkou je označen stop kodon. Původní forma CRD galektinu-3 obsahuje jediný cystein, zatímco mutovaná forma obsahuje aminokyselinu serin, která je velmi podobná Cys. Velikost genů je 417 bp, které kódují 139 aminokyselin. Molární absorpční koeficient ϵ_{280} predikovaný ze sekvence pro Gal-3-CRD a Gal-3-CRD-C173S je $9970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [35].

Pro vytvoření jednobodové mutace byla zvolena metoda dvoukrokové PCR, kdy byly nejprve amplifikovány dva úseky DNA s překryvem v místě mutace. Poté pomocí druhé PCR byl amplifikován cílový gen pro Gal-3-CRD-C173S. Jako templát pro první PCR byl použit plazmid pOPINE_Gal-3-CRD [34], přičemž pro přípravu prvního úseku s délkou 208 bp byly použity oligonukleotidy pOPINE_Gal-3-CRD_FW a REV_Gal-3-CRD-C173S, pro amplifikaci druhého úseku o délce 262 bp byly použity oligonukleotidy FW_Gal-3-CRD-C173S a pOPINE_Gal-3-CRD_REV. PCR reakce byly vyhodnoceny pomocí agarosové elektroforézy (viz kapitolu 4.4 a Obr. 6, str. 41) a z gelu byly poté izolovány (viz kapitolu 4.5) kýžené PCR produkty.



Obrázek 6. Výsledek agarosové elektroforézy po první amplifikaci dvoukrokové PCR. Jamka označená písmenkem M obsahovala 100 bp DNA standard. Jamka označená číslicí 1 obsahovala vzorek amplifikovaného úseku DNA o délce 208 bp a jamka 2 úsek DNA o délce 262 bp. Oba vzorky byly identifikovány kolem hodnoty 200 bp, přičemž na gelu je vidět, že druhý úsek DNA je o něco větší, což se shoduje s předpokládanou délkou obou úseků.

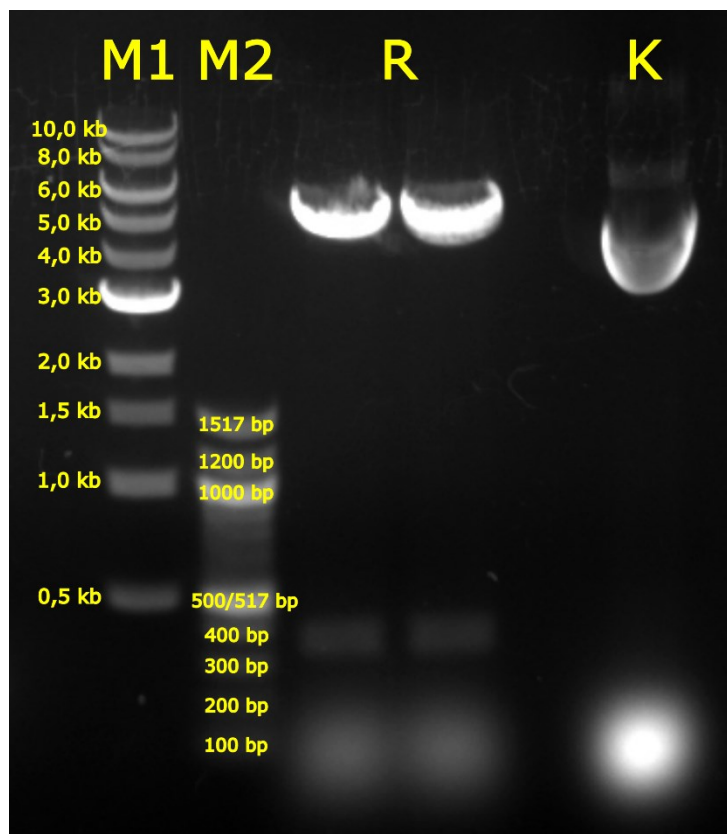
Pro druhou amplifikaci byla jako předloha použita ekvimolární směs PCR produktů po první amplifikaci a jako primery byly použity pOPINE_Gal-3-CRD_FW a pOPINE_Gal-3-CRD_REV. Předpokládaná délka genu pro Gal-3-CRD-C173S je 417 bp. Amplifikace byla vyhodnocena pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 7, str. 42) a následně byla z gelu izolována DNA.



Obrázek 7. Výsledek agarosové elektroforézy amplifikace genu pro Gal-3-CRD-C173S. Jamka označená písmenkem M1 obsahovala 1 kb DNA standard, M2 obsahovala 100 bp DNA standard. Jamka označená jako „Vzorek“ obsahovala amplifikovaný gen pro Gal-3-CRD-C173S o délce 417 bp. Pruh DNA byl identifikován kolem hodnot 400 – 500 bp.

5.1.2 Štěpení plazmidu pOPINE restričními endonukleasami

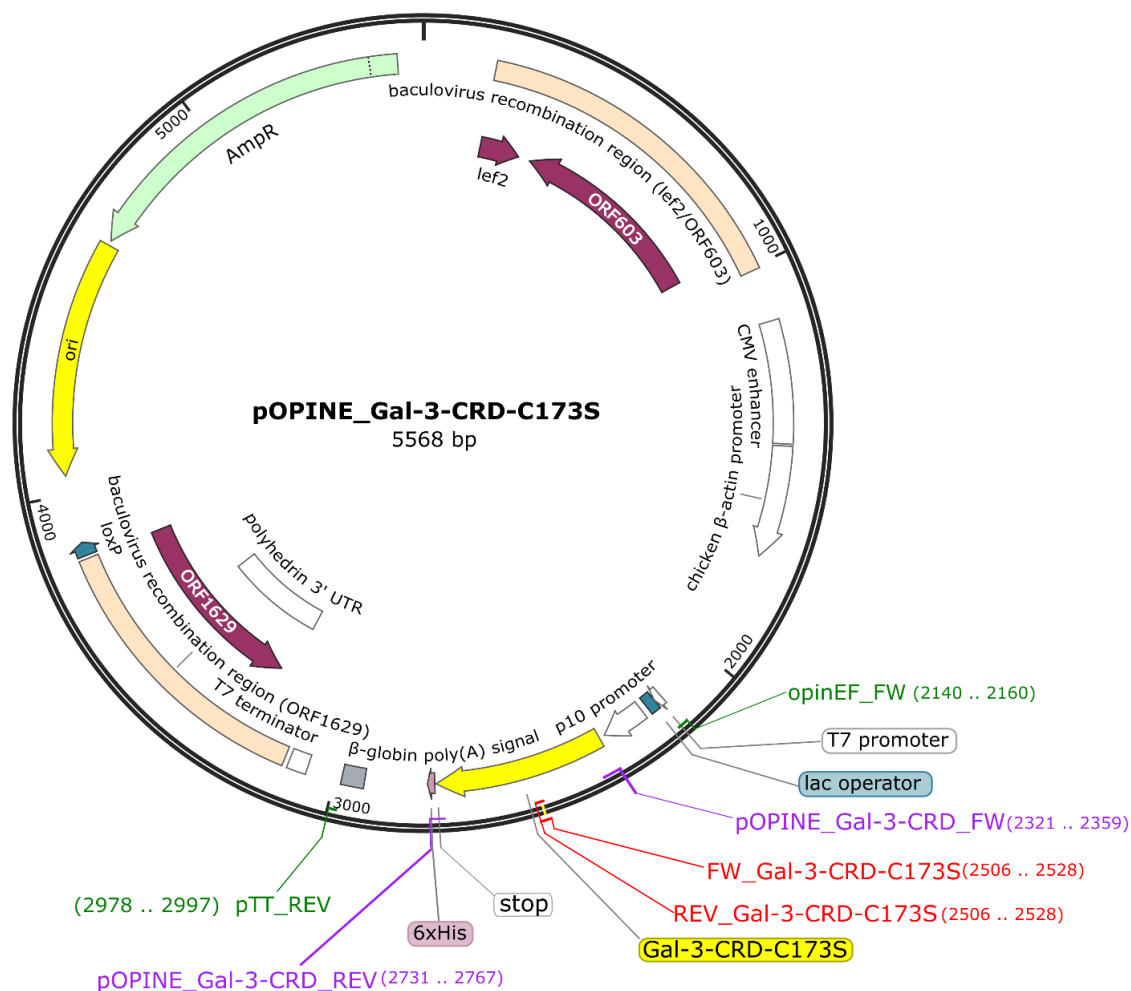
Jako vektor pro gen Gal-3-CRD-C173S (a následně i pro Gal-3-CRD-C173S-His) byl použit plazmid pOPINE. Ten byl linearizován pomocí restričních endonukleas NcoI-HF a PmeI (viz kapitolu 4.3). Úspěšnost štěpení plazmidu byla potvrzena agarosovou elektroforézou (Obr. 8) a štěpený plazmid byl následně izolován z gelu.



Obrázek 8. Výsledek agarosové elektroforézy po štěpení plazmidu pOPINE. Jamka označená písmenkem M1 obsahovala 1 kb DNA standard, M2 obsahovala 100 bp DNA standard. Jamky označené písmenkem R obsahovaly štěpený plazmid pOPINE, v jamce K byl kontrolní neštěpený plazmid pOPINE. Vyštěpený úsek měl očekávanou velikost 387 bp. Na obou dráhách jsou také vidět výrazné pruhy kolem 100 bp, které pravděpodobně přísluší kontaminující RNA z bakterií po produkci plazmidu.

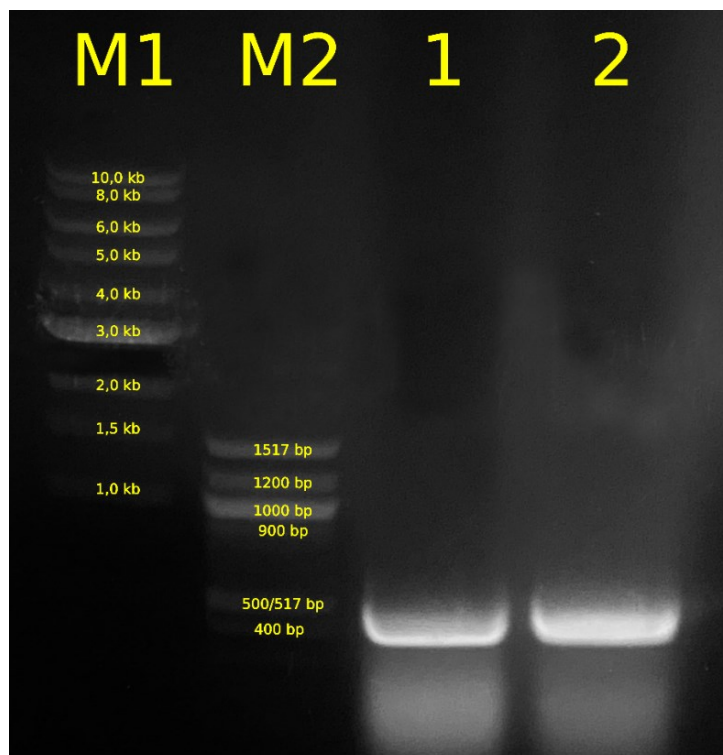
5.1.3 Vnesení genu Gal-3-CRD-C173S do linearizovaného plazmidu

Gen pro Gal-3-CRD-C173S byl metodou LFC (viz kapitolu 4.6) vložen do linearizovaného plazmidu pOPINE. Připravený plazmid pOPINE_Gal-3-CRD-C173S (Obr. 9, str. 43) obsahoval kromě cílového genu i selekční marker – gen zajišťující rezistenci na ampicilin.



Obrázek 9. Mapa plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD-C173S. Plazmid pOPINE_Gal-3-CRD-C173S o velikosti 5568 bp obsahuje gen pro protein Gal-3-CRD-C173S (vyznačen žlutou šipkou dole) a gen zajišťující rezistenci na ampicilin (vyznačen světle zelenou šipkou). Červeně jsou označeny oligonukleotidy, které byly využity pro vytvoření mutace C173S a fialově jsou označeny přímý a zpětný primer pro gen Gal-3-CRD-C173S. Zeleně jsou označeny sekvenační primery.

Poté byly tímto plazmidem transformovány bakterie *E. coli* TOP 10 (viz kapitolu 4.7), které byly následně inkubovány na agarové plotně s ampicilinem. Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí PCR z bakteriálních kolonií (viz kapitolu 4.8) s následnou agarosovou elektroforézou (Obr. 10, str. 44). Poté byla provedena nízkoobjemová kultivace bakterií *E. coli* TOP 10 (viz kapitolu 4.9.1) následovaná nízkoobjemovou izolací plazmidu (viz kapitolu 4.9.2) pOPINE_Gal-3-CRD-C173S. Získané vzorky DNA byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK (viz kapitolu 4.10) pro ověření správnosti nukleotidové sekvence vneseného genu. Pozitivní vzorek byl použit pro výrobu zásobního množství plazmidu v bakteriích *E. coli* DH5 α (viz kapitolu 4.11).



Obrázek 10. Výsledek agarosové elektroforézy po PCR z bakteriálních kolonií *E. coli* TOP 10 transformovaných plazmidem pOPINE_Gal-3-CRD-C173S. Jamka označená písmenkem M1 obsahovala 1 kb DNA standard, M2 obsahovala 100 bp DNA standard. Jamky označené číslicemi 1 a 2 obsahovaly PCR produkty ze dvou vybraných kolonií. Pruhy DNA byly detekovány kolem hodnot 400 – 500 bp, což odpovídá teoretické velikosti 417 bp genu pro Gal-3-CRD-C173S a naznačuje úspěšné vložení požadovaného genu do plazmidu.

5.2 Příprava plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD-C173S-His

5.2.1 Příprava genu pro Gal-3-CRD-C173S-His

Další částí práce byla příprava CRD galektinu 3 s histidinovou kotvou na C-konci. Histidinová kotva v tomto případě neslouží k afinitní chromatografii pro purifikaci proteinu, ale tvoří funkční skupinu pro další experimenty, konkrétně v pokračování této práce jimi bude studium interakce Gal-3 s nově syntetizovanými organickými inhibitory pomocí termoforézy. Aminokyselinová sekvence pro gen Gal-3-CRD-C173S-His o délce 438 bp (Obr. 11, str. 45) byla navržnuta z aminokyselinové sekvence pro Gal-3-CRD-C173S (Obr. 5, str. 40), kde na C-konci byla přidána histidinová kotva o délce šesti aminokyselin.

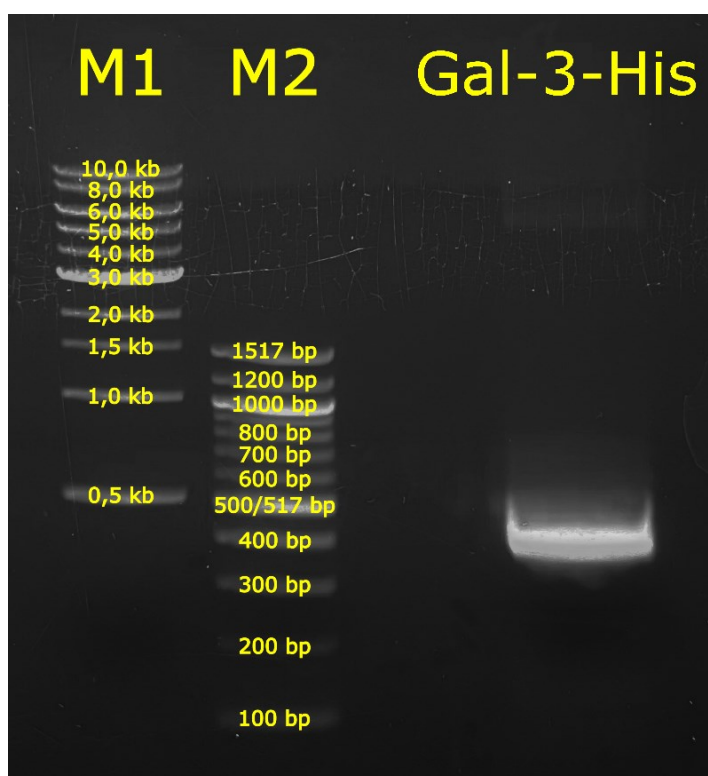
Konstrukt pro Gal-3-CRD-C173S-His byl amplifikován z plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD-C173S pomocí PCR za použití oligonukleotidů pOPINE_Gal-3-CRD_FW a Gal-3-CRD-C173S-His_REV (viz kapitolu 4.2). Amplifikace byla vyhodnocena pomocí

agarosové elektroforézy (Obr. 12) a DNA byla následně izolována z gelu.

Gal-3-CRD-C173S-His:

```
MPLIVPYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENN  
RRVIVSNTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVND AHL LQYNH  
RVKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMIKHHHHHH
```

Obrázek 11. Aminokyselinová sekvence Gal-3-CRD-C173S-His. Zeleně (P₁₁₃ – I₂₅₀) je vyznačena sekvence pro Gal-3-CRD-C173S. Žlutě je vyznačeno místo mutace, tyrkysově je vyznačena histidinová kotva na C-konci. Velikost genu je 438 bp, které kódují 146 aminokyselin. Molární absorpční koeficient ϵ_{280} predikovaný ze sekvence činí $9970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [35].

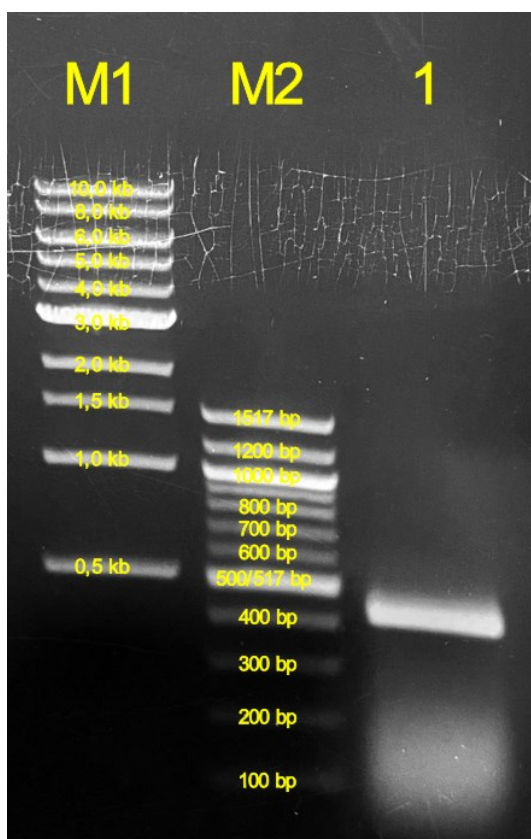


Obrázek 12. Výsledek agarosové elektroforézy amplifikace genu pro Gal-3-CRD-C173S-His. Jamka označená písmenkem M1 obsahovala 1 kb DNA standard, M2 obsahovala 100 bp DNA standard. Jamka označená Gal-3-His obsahovala amplifikovaný gen pro Gal-3-CRD-C173S-His o délce 438 bp. Pruh DNA byl identifikován kolem hodnot 400 – 500 bp.

5.2.2 Vnesení genu Gal-3-CRD-C173S-His do linearizovaného plazmidu

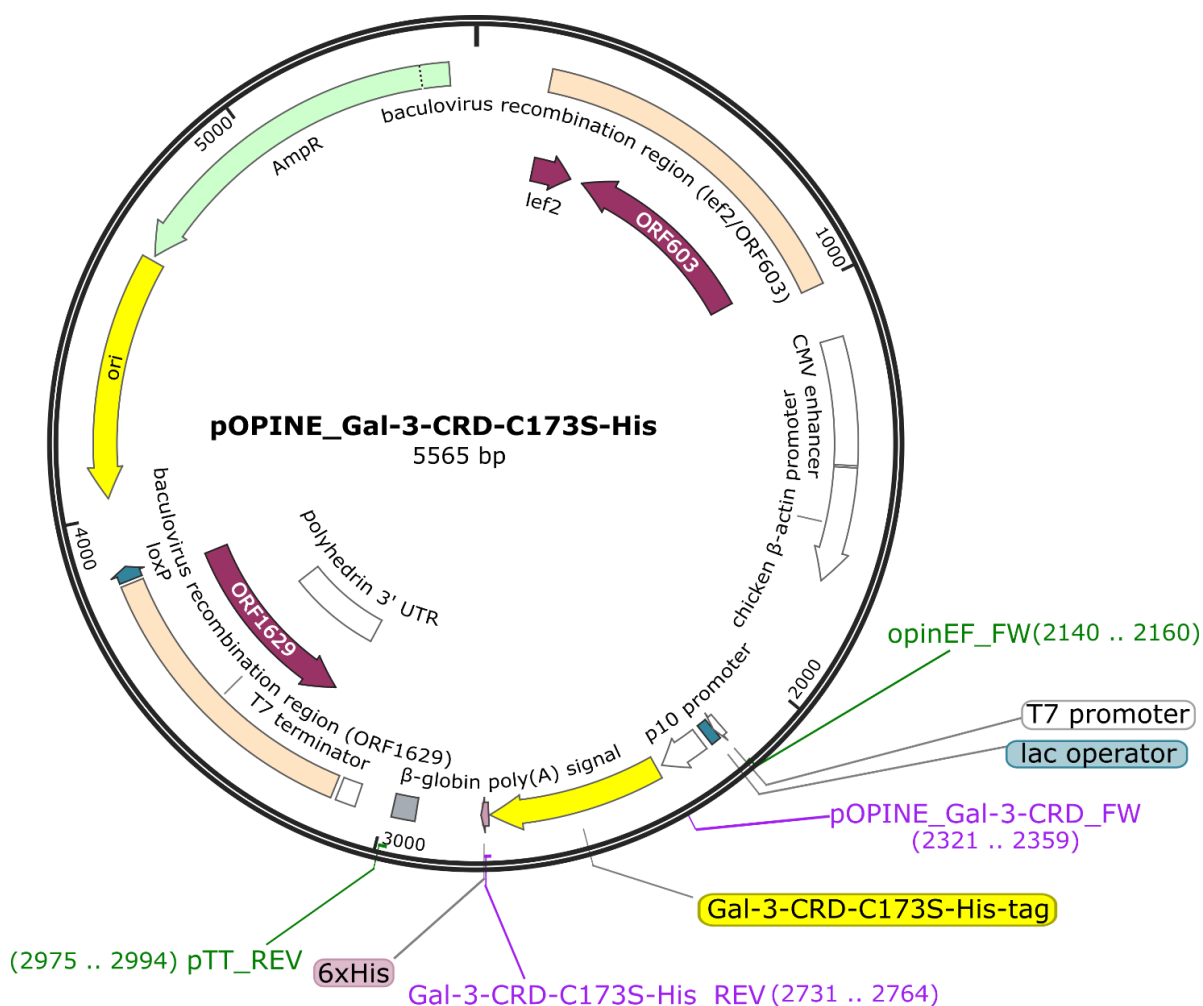
Vložení genu pro Gal-3-CRD-C173S-His do linearizovaného plazmidu metodou LFC proběhlo analogicky jako v případě genu Gal-3-CRD-C173S (viz kapitolu 4.6). Úspěšnost vnesení genu do plazmidu byla ověřena pomocí PCR z bakteriálních kolonií

E. coli TOP 10 (viz kapitolu 4.8) s následnou agarosovou elektroforézou (Obr. 13).



Obrázek 13. Výsledek agarosové elektroforézy po PCR z bakteriální kolonie *E. coli* TOP 10 transformované plazmidem pOPINE_Gal-3-CRD-C173S-His. Jamka označená písmenkem M1 obsahovala 1 kb DNA standard, M2 obsahovala 100 bp DNA standard. Jamka označená číslicí 1 obsahovala PCR produkt z vyrostlé kolonie. Pruh DNA kolem hodnoty 400 bp odpovídá očekávané velikosti 438 bp a naznačuje úspěšné vložení genu do plazmidu.

Připravený plazmid pOPINE_Gal-3-CRD-C173S-His (Obr. 14, str. 47) byl dále zpracován stejně jako plazmid pOPINE_Gal-3-CRD-C173S až po velkoobjemovou produkci plazmidové DNA. Získané vzorky DNA byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK (viz kapitolu 4.10) pro ověření správnosti nukleotidové sekvence vneseného genu.

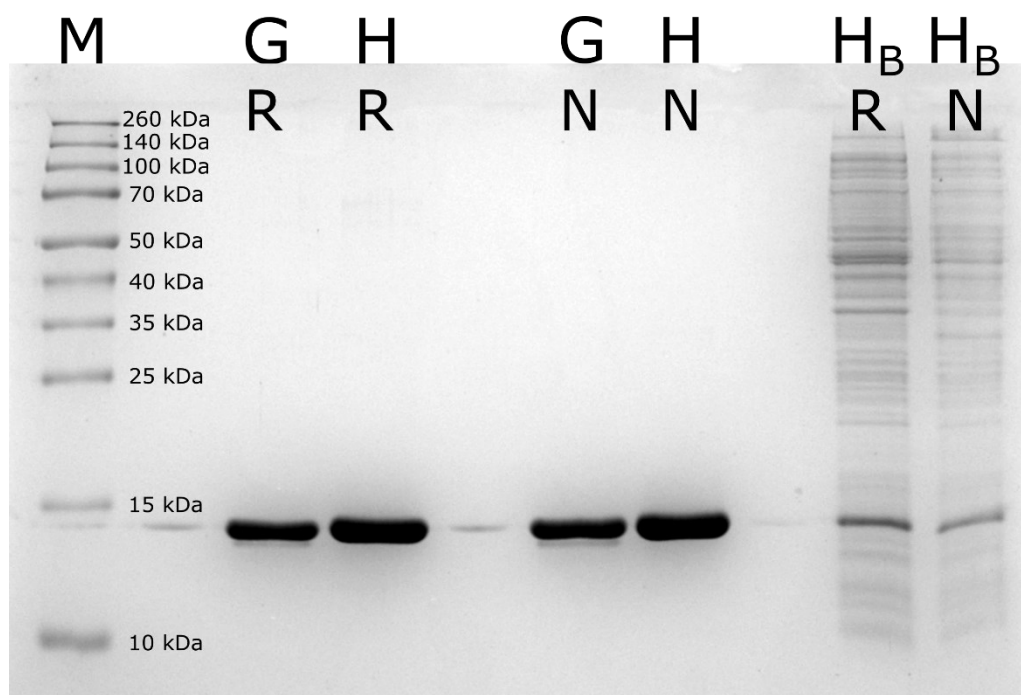


Obrázek 14. Mapa plazmidu pOPINE_Gal-3-CRD-C173S-His. Plazmid pOPINE_Gal-3-CRD-C173S-His obsahuje gen pro protein Gal-3-CRD-C173S-His (vyznačen žlutou šipkou dole) a gen zajišťující rezistenci na ampicilin (vyznačen světle zelenou šipkou). Fialově jsou označeny přímý a zpětný primery pro gen Gal-3-CRD-C173S-His. Zeleně jsou označeny sekvenční primery.

5.3 Produkce a purifikace Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His

Rekombinantní exprese Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His byla provedena s využitím kmenu *E. coli* T7 v LB médiu o celkovém objemu 1 l (viz kapitolu 4.12). Exprese proteinu byla indukována IPTG. Po ukončení produkce byly bakterie sklizeny, následně sonikovány (viz kapitolu 4.12.2) a odstředěny. Cílové proteiny byly ze supernatantu dále purifikovány na koloně s náplní laktosa-sepharosa díky jejich vlastnosti vázat laktosu (k purifikaci nebyla použita histidinová kotva na konstruktu Gal-3-CRD-C173S-His) (viz kapitolu 4.12.3). Poté byla provedena dialýza (viz kapitolu 4.12.4) pro odstranění navázané laktosy. Pro další použití byly proteiny zkoncentrovány

(viz kapitolu 4.12.5). Čistota a molekulová hmotnost proteinových preparátů byly ověřeny pomocí SDS-PAGE (viz kapitolu 4.12.6 a Obr. 15), která ukázala, že Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His byly získány v čisté formě. Také nebyl pozorován žádný rozdíl v drahách v redukujícím a neredukujícím prostředí, či vznik kovalentních dimerů, což odpovídá úspěšné mutaci cysteinu 173 na serin. Předpokládaná molekulová hmotnost byla 15,8 kDa pro Gal-3-CRD-C173S a 16,7 kDa pro Gal-3-CRD-C173S-His. Celkový výtěžek přípravy Gal-3-CRD-C173S činil 9 mg a Gal-3-CRD-C173S-His 4 mg na litr buněčné suspenze.



Obrázek 15. Výsledek SDS-PAGE po purifikaci Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His. Jamka označená písmenkem M obsahovala proteinový standard. Jamky označené písmenkem R obsahovaly vzorky v redukujícím prostředí, N v neredukujícím prostředí. V jamkách G se nacházel vzorek Gal-3-CRD-C173S, v jamkách H byl Gal-3-CRD-C173S-His. Oba proteinové vzorky byly použity po purifikaci a dialýze. V jamkách označené H_B se nacházel resuspendovaný vzorek bakteriální pelety po sonikaci při produkci Gal-3-CRD-C173S-His. Předpokládaná molekulová hmotnost Gal-3-CRD-C173S je 15,8 kDa, pro Gal-3-CRD-C173S-His 16,7 kDa.

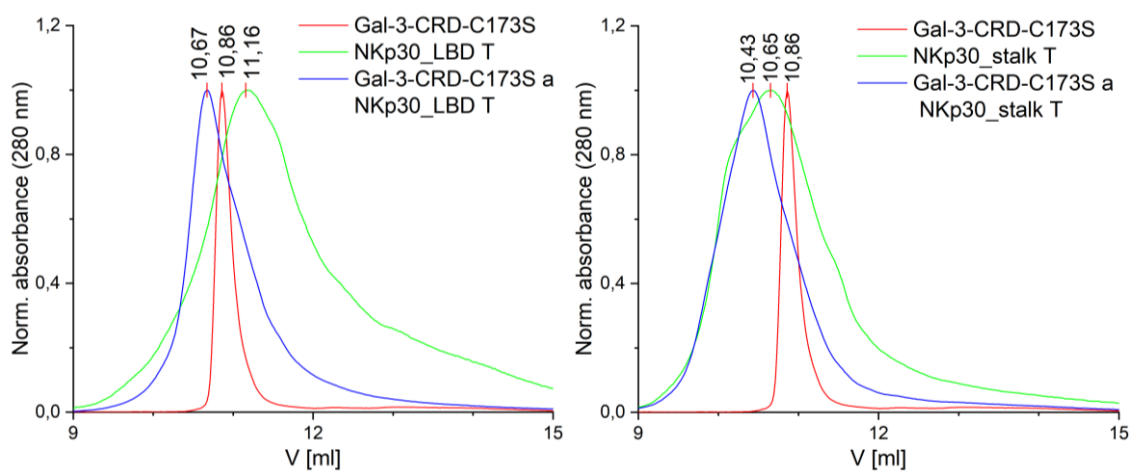
5.4 Charakterizace proteinů

5.4.1 Analytická gelová permeační chromatografie

Za účelem charakterizace interakce galektinu-3 se dvěma variantami receptoru NKp30 (NKp30_Stalk a NKp30_LBD) byla provedena chromatografie na silikagelové

koloně Biozen dSEC-2 (3 μm) (viz kapitolu 4.13.1). Zmíněné konstrukty NKp30 byly připraveny Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D. v lidské embryonální ledvinné linii HEK293, která exprimuje mutovanou formu velkého T antigenu SV40 (HEK293T, z *angl. human embryonic kidney 293, expressing a mutant version of the SV40 large T antigen*). Proteiny produkované v této linii mají komplexní přirozenou *N*-glykosylaci, proto jsou dále označeny jako NKp30_LBD T a NKp30_Stalk T. Předpokládaná molekulová hmotnost činila 13,9 kDa (+ až 3 *N*-vázané oligosacharidy) pro NKp30_LBD T a 15,2 kDa (+ až 3 *N*-vázané oligosacharidy) pro NKp30_Stalk T.

Nejprve byly provedeny GPC samotných proteinů: Gal-3-CRD-C173S, NKp30_Stalk T a NKp30_LBD T, přičemž bylo na kolonu vždy aplikováno po 100 – 150 μg vzorku proteinu. Poté byly na kolonu aplikovány vzorky ekvimolární směsi Gal-3-CRD-C173S a jedné formy receptoru NKp30 o celkové hmotnosti směsi přibližně 300 μg . Ze získaných dat byly sestrojeny normalizované grafy závislosti absorbance na elučním objemu obsahující přes sebe proložené křivky samotných proteinů a jejich směsi (Obr. 16).



Obrázek 16. Chromatogramy z analytické gelové permeační chromatografie. Červeně je vyznačena křivka pro Gal-3-CRD-C173S, zeleně jsou vyznačeny křivky pro samotné proteiny NKp30_Stalk T nebo NKp30_LBD T, modře jsou vyznačeny směsné vzorky. Na obou chromatogramech jsou zřejmé posuny píků a hodnot elučních objemů modrých křivek, což naznačuje interakci Gal-3-CRD-C173S se studovanými konstrukty receptoru NKp30.

Na chromatogramech jsou patrné posuny píků elučních objemů směsných vzorků vůči vrcholu samotného Gal-3-CRD-C173S či použitým konstruktům receptoru NKp30. Posun elučních objemů píků ve směsném vzorku oproti samotným výchozím proteinům

naznačuje interakci mezi glykosylovanými konstrukty receptoru NKp30 a připraveným galektinem-3.

6 Diskuze

Tato práce vznikla v návaznosti na bakalářskou práci Bc. Matouše Tulpy pojednávající o expresi vazebné domény galektinu-3 a její interakci s NK-buněčným aktivačním receptorem NKp30 [34]. Vzhledem k tomu, že ve zmíněné práci byla pozorována tvorba disulfidického dimeru galektinu-3, byla navržena mutovaná varianta, kde je lichý cystein zodpovědný za částečnou dimerizaci zaměněn za serin. Za předpokladu, že si mutovaná forma dostatečně zachová biofyzikální vlastnosti nativního proteinu, mohla by představovat homogennější materiál a lépe interpretovatelné výsledky vazebných studií s NKp30. Prvním úkolem mojí práce tak bylo připravit mutovanou formu sacharid rozpoznávající domény Gal-3 C173S a variantu tohoto proteinu s histidinovou kotvou, která může být použita jako funkční skupina pro budoucí vazebné experimenty s inhibitory Gal-3. Nejprve bylo zapotřebí připravit příslušné geny pomocí jednokrokové (v případě Gal-3-CRD-C173S-His) nebo dvoukrokové (Gal-3-CRD-C173S) PCR reakce a připravit plazmidy s použitím vektoru pOPINE. Úspěšnost přípravy cílových plazmidů byla potvrzena sekvenací. Proteiny byly připraveny rekombinantní expresí v bakteriích *E. coli* T7, po níž následovala afinitní chromatografie na koloně s náplní laktosa-sepharosa selektivní pro galektiny. Po dialýze purifikovaných proteinů, která měla za cíl odstranění navázané laktosy, byla provedena SDS-elektroforéza v 15 % polyakrylamidovém gelu. Na záznamu gelu (Obr. 15, str. 48) lze pozorovat proužky proteinů kolem 15 kDa a nejsou zřetelné žádné kontaminanty. Na gelu se také pro srovnání nachází vzorek resuspendované bakteriální pelety po sonikaci při produkci Gal-3-CRD-C173S-His. Z toho lze usoudit, že laktosa-sepharosa je vysoce selektivní pro CRD Gal-3 a není nutno provádět další purifikační kroky. Na gelu také nejsou náznaky dimerů studovaných proteinů, což potvrzuje předpoklad, že pozorované dimery na SDS-PAGE v případě přirozené formy CRD Gal-3 [34] jsou pravděpodobně způsobeny vznikem disulfidického můstku mezi cysteiny dvou molekul Gal-3. Je zajímavé, že připravené proteiny vykazují anomální pohyblivost v elektrickém poli a proužky na gelu se nacházejí pod hodnotou 15 kDa, přestože předpokládaná molekulová hmotnost Gal-3-CRD-C173S je 15,8 kDa a Gal-3-CRD-C173S-His je 16,7 kDa. Pro ověření molekulové hmotnosti získaných proteinů je potřeba proto provést dodatečné měření například pomocí hmotnostní spektrometrie.

Dalším úkolem práce bylo ověřit vazbu mutované formy Gal-3 na dvě varianty receptoru NKp30 (NKp30_LBD T a NKp30_Stalk T) pomocí analytické gelové

permeační chromatografie. Rozdíl mezi dvěma variantami je, jak naznačuje název, pouze v přítomnosti krátké „stalk“ domény v případě NKp30_Stalk T. Předchozí měření bylo Bc. Matoušem Tulpou prováděno na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL, kde však může docházet k nespecifické vazbě Gal-3 na matici kolony. Proto byla v této práci GPC provedena na silikagelové koloně Biozen dSEC-2 (3 µm). Nejprve byly proměřeny vzorky samotných proteinů, poté jejich ekvimolární směsi, vždy Gal-3-CRD-C173S a jedna z forem receptoru. Získané křivky jedné varianty NKp30, Gal-3-CRD-C173S a jejich směsi byly proloženy přes sebe, a tak byly vytvořeny dva přehledové grafy (Obr. 16, str. 49). Křivka pro samotný Gal-3-CRD-C173S obsahuje pouze jeden ostrý pík o elučním objemu 10,86 ml a ukazuje tak na nepřítomnost kontaminujících proteinů či vznik dimerních struktur, což naznačuje na vysokou účinnost a selektivitu laktosa-sepharosa kolony, tedy na čistotu připraveného proteinu. Obě studované formy receptoru NKp30 mají molekulovou hmotnost podobnou Gal-3-CRD-C173S (NKp30_LBD – 13,9 kDa; NKp30_Stalk – 15,2 kDa), ale díky glykosylaci je jejich skutečná molekulová hmotnost vyšší a heterogenní, konstrukt NKp30_Stalk navíc tvoří i nekovalentní oligomery. Pro analytickou GPC platí, že nekovalentní interakce dvou proteinů je doprovázena změnou píků elučních objemů do nižších hodnot. Na chromatogramu pro Gal-3-CRD-C173S/NKp30_LBD T je pozorován posun elučního objemu směšného vzorku oproti samotnému Gal-3-CRD-C173S v hodnotě 0,19 ml a v případě Gal-3-CRD-C173S/NKp30_Stalk T je tentýž posun 0,43 ml. Pro ověření této informace by bylo potřeba provést měření pomocí přesnější metody, jako je například analytická ultracentrifugace.

Polyhistidinová kotva na C-konci proteinu Gal-3-CRD-C173S-His může plnit několik účelů. Lze ji využít například k purifikaci proteinu afinitní chromatografií, kde má ale tato metoda nižší selektivitu ve srovnání s přirozenou vlastností galektinu-3 vázat β-galaktosidy. Zároveň použití laktosa-sepharosa kolony zaručuje zachycení správně sbalených proteinů se zachováním jejich vazebných funkcí. Dále je možné histidinovou kotvu využít pro navázání fluorescenční značky pro termoforézu (značka je spojena s Ni-NTA skupinou, tj. s kyselinou nitrilotrioctovou (NTA) chelatující Ni²⁺ ionty). Studium interakce Gal-3-CRD-C173S-His s nově syntetizovanými organickými inhibitory Gal-3 pomocí termoforézy však z časových důvodů nebylo provedeno a bude pokračováním této práce.

Předmětem dalšího výzkumu by mohla být, kromě již zmíněné hmotnostní spektrometrie a analytické ultracentrifugace, také krystalizace komplexu Gal-3-CRD-

C173S s receptorem NKp30. Objasnění struktury tohoto komplexu by mohlo pomoci odhalit vazebné místo Gal-3 na receptoru NKp30. Dále je důležité ověřit vliv glykosylace tří vazebných míst NKp30 na vazbu Gal-3 a zjistit tak, jestli se vazby účastní pouze sacharidy nebo i proteinová část receptoru NKp30.

7 Závěr

- Byly připraveny expresní vektory pro proteiny Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His
- Byla provedena transformace buněk *E. coli* T7 připravenými plazmidy a následná produkce Gal-3-CRD-C173S a Gal-3-CRD-C173S-His
- Bylo ověřeno, že mutant CRD Gal-3 netvoří kovalentní dimery
- Při měření pomocí analytické GPC bylo zaznamenáno, že Gal-3-CRD-C173S se váže na NKp30_LBD T a NKp30_Stalk T

8 Seznam literatury

1. Barondes, S.H. (1988) Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences* **13**, 480–482.
2. Boyd, W.C., Shapleigh, E. (1954) Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* **119**, 419.
3. Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B. (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* **113**, 236–247.
4. Lis, H., Sharon, N. (1998) Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews* **98**, 637–674.
5. Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson, S.S., Vasta, G.R. (2007) Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 513–520.
6. Vijayan, M., Chandra, N. (1999) Lectins. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 707–714.
7. Liu, Y., Liu, J., Pang, X., Liu, T., Ning, Z., Cheng, G. (2015) The Roles of Direct Recognition by Animal Lectins in Antiviral Immunity and Viral Pathogenesis. *Molecules* **20**, 2272–2295.
8. Taylor, M. E., Drickamer, K., Schnaar, R. L., Etzler, M. E., Varki, A. (2015): Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. vydání, kapitola 28.
9. Bohnsack, R.N., Song, X., Olson, L.J., Kudo, M., Gotschall, R.R., Canfield, W.M., Cummings, R.D., Smith, D.F., Dahms, N.M. (2009) Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 35215–35226.
10. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., Poirier, F. (2002) Introduction to

- galectins. *Glycoconjugate Journal* **19**, 433–440.
11. Wang, W.-H., Lin, C.-Y., Chang Ishcol, M.R., Urbina, A., Assavalapsakul, W., Thitithanyanont, A., Chen, Y.-H., Liu, F.-T., Wang, S.-F. (2019) The Role of Galectins in Virus Infection - A Systemic Literature Review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **53**, 925–935.
 12. Yang, R.-Y., Rabinovich, G.A., Liu, F.-T. (2008) Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **10**, e17.
 13. Wdowiak, K., Francuz, T., Gallego-Colon, E., Ruiz-Agamez, N., Kubeczko, M., Grochoła, I., Wojnar, J. (2018) Galectin Targeted Therapy in Oncology: Current Knowledge and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 210.
 14. Liu, F.-T., Rabinovich, G.A. (2010) Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1183**, 158–182.
 15. Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E. (2013) Innate lymphoid cells - a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology* **13**, 145–149.
 16. Langers, I., Renoux, V.M., Thiry, M., Delvenne, P., Jacobs, N. (2012) Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Bilogics: Targets and Therapy* **6**, 73–82.
 17. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., Caligiuri, M.A. (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* **97**, 3146–3151.
 18. Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, A. (2002) Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *European Journal of Immunology* **32**, 1205–1211.

19. Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. (1999) Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 1505–1516.
20. Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. (1997) p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 1129–1136.
21. Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A. (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 2065–2072.
22. Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., Moretta, A. (1998) Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 953–960.
23. Campbell, K.S., Yusa, S., Kikuchi-Maki, A., Catina, T.L. (2004) NKp44 Triggers NK Cell Activation through DAP12 Association That Is Not Influenced by a Putative Cytoplasmic Inhibitory Sequence. *Journal of Immunology* **172**, 899–906.
24. Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., Biassoni, R. (1999) NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Experimental*

- Medicine* **189**, 787–796.
25. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., Mandelboim, O. (2013) Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in Immunology* **34**, 182–191.
 26. Memmer, S., Weil, S., Beyer, S., Zöller, T., Peters, E., Hartmann, J., Steinle, A., Koch, J. (2016) The Stalk Domain of NKp30 Contributes to Ligand Binding and Signaling of a Preassembled NKp30-CD3 ζ Complex. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 25427–25438.
 27. Joyce, M.G., Tran, P., Zhuravleva, M.A., Jaw, J., Colonna, M., Sun, P.D. (2011) Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor NKp30 and identification of its ligand binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 6223–6228.
 28. Li, Y., Wang, Q., Mariuzza, R. (2011) Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *Journal of Experimental Medicine* **4**, 703–714.
 29. Hartmann, J., Tran, T.-V., Kaudeer, J., Oberle, K., Herrmann, J., Quagliano, I., Abel, T., Cohnen, A., Gatterdam, V., Jacobs, A., Wollscheid, B., Tampé, R., Watzl, C., Diefenbach, A., Koch, J. (2012) The stalk domain and the glycosylation status of the activating natural killer cell receptor NKp30 are important for ligand binding. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31527–31539.
 30. Skořepa, O., Pazicky, S., Kalousková, B., Bláha, J., Abreu, C., Ječmen, T., Rosůlek, M., Fish, A., Sedivy, A., Harlos, K., Dohnálek, J., Skálová, T., Vaněk, O. (2020) Natural Killer Cell Activation Receptor NKp30 Oligomerization Depends on Its N-Glycosylation. *Cancers* **12**, 1998.
 31. Binici, J., Hartmann, J., Herrmann, J., Schreiber, C., Beyer, S., Güler, G., Vogel, V.,

- Tumulka, F., Abele, R., Mäntele, W., Koch, J. (2013) A Soluble Fragment of the Tumor Antigen BCL2-associated Athanogene 6 (BAG-6) Is Essential and Sufficient for Inhibition of NKp30 Receptor-dependent Cytotoxicity of Natural Killer Cells. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 34295–34303.
32. Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S.D. (2009) The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1495–1503.
33. Wang, W., Guo, H., Geng, J., Zheng, X., Wei, H., Sun, R., Tian, Z. (2014) Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 33311–33319.
34. Tulpa, M. (2021) Galektin-3 a jeho interakce s receptorem přirozené cytotoxicity NKp30. *Bakalářská práce, PřF UK, Katedra biochemie*.
35. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker, J.M. (eds). *The Proteomics Protocols Handbook*, Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ, 571–607.