

UNIVERZITA KARLOVA PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Soňa Balogová

***In vivo* biotinylace jako nová metoda značení galektinů**
***In vivo* biotinylation as a new method of galectin labeling**

Bakalářská práce

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

Praha 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem všechny použité informační zdroje a literaturu řádně citovala. Tato práce ani její podstatní část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze, dne 25.08.2022

Podpis:

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své práce doc. RNDr. Pavla Bojarové, Ph.D. za odborné rady, konzultaci výsledků a trpělivost při zpracování této práce. Děkuji Mgr. Michaele Hovorkové za její rady při práci na praktické části a konzultace při zpracování výsledků i za pomoc při sepisování práce. Dále děkuji Mgr. Jakobovi Červenému za jeho rady při práci na praktické části a za měření interferometrie na biovrstvě s připraveným proteinem.

Abstrakt

Galektiny jsou živočišné lektiny s afinitou k terminálním β -galaktosidům. Tyto lektiny jsou charakteristické evolučně konzervovanou doménou rozpoznávající sacharidy (CRD). Galektiny se *in vivo* účastní mnoha procesů, jako např. buněčné adheze; signalizace; proliferace buněk a kancerogeneze. Lze je využít jako markery u některých typů rakovin a též pro cílenou vazbu terapeutik v diagnostice a terapii rakovinného bujení. Galektiny byly definovány jako proteinová rodina složená z 15 členů (11 z nich známo u lidí). Jsou klasifikovány do tří podskupin, dle své struktury: prototypické; chimerické; tandemové. Galektin-8 patří mezi tandemové galektiny, které jsou tvořeny dvěma různými podjednotkami spojenými peptidovým můstkem; obsahují dvě různé CRD domény, a jsou proto bivalentní.

Interakce galektin-glykan jsou založeny na afinitě CRD galektinů ke glykanům obsahujícím terminální β -galaktosid, přičemž tuto afinitu formuluje právě soubor konzervovaných aminokyselin v rámci každého CRD. Tyto interakce je možno zkoumat mnohými metodami, jako např. rentgenová krystalografie; kompetitivní ELISA; interferometrie na biovrstvě. Díky širokému zapojení galektinů do biologických procesů je známa řada metod značení galektinů pro jejich detekci. Nejpoužívanějšími metodami jsou fluorescenční metody a biotinylace galektinů, u které je výhodné využití tzv. AVI-kotvy (GLNDIFEAQKIEWHEGGSGGS).

V této práci byl připraven genový konstrukt jednoho galektinu (N-podjednotka galektinu-8) nesoucího peptidovou kotvu pro selektivní biotinylací proteinů *in vivo* (AVI-kotva). Tento konstrukt byl spolu s dalšími galektinovými konstrukty (k dispozici na školícím pracovišti) rekombinantně exprimován v *Escherichia coli*. U konstruktu celého galektinu-8 spolu s jeho N-podjednotkou a její formě nesoucí biotinylovanou AVI-kotvu byla stanovena vazebná afinita k vybraným standardním sacharidovým ligandům. U forem galektinů s biotinylovanou AVI-kotvou byla potvrzena přítomnost biotinylace.

Klíčová slova

biotinligasa; značení; ELISA; galektin; sacharid; *Western blot*

Abstract

Galectins are animal lectins with affinity to terminal β -galactosides. These lectins are characterized by an evolutionarily conserved carbohydrate recognition domain (CRD). Galectins are involved in many processes *in vivo*, such as cell adhesion; signaling; cell proliferation and carcinogenesis. They can be used as markers in certain types of cancer and also for the targeted binding of therapeutics in the diagnosis and therapy of cancer. Galectins have been defined as a protein family composed of 15 members (11 of which are known in humans). They are classified into three subgroups, according to their structure: prototypical; chimeric; tandem-repeat type. Galectin-8 belongs to tandem-repeat galectins, which consist of two different subunits connected with a peptide linker; they contain two different CRD domains, and are therefore bivalent.

Galectin-glycan interactions are based on the affinity of galectin CRDs to glycans containing a terminal β -galactoside, and this affinity is formed by the set of conserved amino acids within each CRD. These interactions can be investigated by many methods, such as X-ray crystallography; competitive ELISA; biolayer interferometry. Due to the extensive involvement of galectins in biological processes, there are many methods of labeling galectins for their detection. The most used methods are fluorescence methods and biotinylation of galectins, for which it is advantageous to use the so-called AVI-tag (GLNDIFEAQKIEWHEGSGGS).

In this work, a gene construct of one galectin (N-terminal domain of galectin-8) carrying a peptide tag for selective biotinylation of proteins *in vivo* (AVI-tag) was prepared. This construct, along with other galectin constructs (available in the supervisor's laboratory), was recombinantly expressed in *Escherichia coli*. The galectin binding affinity to selected standard carbohydrate ligands was determined for the construct of the whole galectin-8 together with its N-terminal domain and its respective form carrying a biotinylated AVI-tag. The presence of biotinylation was confirmed in galectin forms with a biotinylated AVI-tag.

Key words

biotin ligase; labeling; ELISA; galectin; carbohydrate; Western blot

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Teoretický úvod	11
1.1 Galektiny	11
1.1.1 Charakteristika galektinů	11
1.1.2 Tandemové galektiny	12
1.1.3 Gal-8	14
1.1.4 Funkce Gal-8	15
1.1.5 Klinický význam	16
1.1.6 Gal-8 v nádorových onemocněních	17
1.2 Ligandy galektinů	18
1.2.1 Interakce galektin-ligand	18
1.2.2 Metody charakterizaci vazebných interakcí galektin-ligand	20
1.2.3 Ligandy a galektin-8	21
1.3. Metody značení galektinů pro detekci	24
1.3.1 Fluorescenční metody značení galektinů	24
1.3.2 Biotinylace	27
1.3.2.1 Chemická biotinylace	27
1.3.2.2 Enzymová biotinylace	28
2. Cíle práce	31
3. Experimentální část	32
3.1 Použité přístroje a materiál	32
3.1.1 Seznam použitých chemikálií	32
3.1.2 Seznam roztoků a médií	33
3.1.3 Seznam komerčních setů	34
3.1.4 Seznam použitých přístrojů	34
3.2 Příprava genových konstruktů galektinů	35
3.2.1 Příprava genového konstruktů	35

3.2.2 Izolace genu v analytickém množství.....	38
3.2.3 Izolace genu v preparativním množství.....	39
3.3 Rekombinantní exprese a purifikace galektinů	40
3.3.1 Transformace E. coli Rosseta 2 (DE3) pLysS a E. coli BL 21 λDE3 (birA) plasmidem..	40
3.3.2 Kultivace bakterií.....	41
3.3.3 Purifikace galektinů afinitní chromatografií.....	42
3.3.4 Ověření čistoty a stanovení koncentrace	42
3.3.5 Ověření biotinylace galektinů metodou Western blot	43
3.3.6 Stanovení aktivity připravených galektinů	44
4. Výsledky	46
4.1. Příprava genových konstruktů galektinů.....	46
4.2 Produkce a purifikace galektinů	47
4.2.1 Produkce a purifikace	47
4.2.2 Western blot.....	49
4.3 Stanovení aktivity galektinů.....	51
5. Diskuze	55
6. Závěr	59
Bibliografie	60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

131I	iobenguan, ¹³¹ I
2'-FL	2'-fukosyllaktosa; α -L-fukopyranosyl-(1→3)- β -D-galaktopyranosyl-(1→4)-D-glukosa
Arg	arginin
AMP	adenosinmonofosfát
ASF	asialofetuin
Asn	asparagin
Asp	aspartát
BLI	interferometrie na biovrstvě (<i>biolayer interferometry</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
pb	pár bazí (<i>base pair</i>)
CD4/CD4+	glykoprotein, který slouží jako koreceptor pro receptor T-buněk (<i>cluster of differentiation 4</i>)
CD44vRA	isoforma CD44 antigenu
CD8/CD8+	glykoprotein, který slouží jako koreceptor pro receptor T-buněk (<i>cluster of differentiation 8</i>)
cDNA	komplementární DNA
CRD	doména rozpoznávající sacharidy (<i>carbohydrate recognition domain</i>)
DC	dendritické buňky (<i>dendritic cells</i>)
DTT	dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	chemiluminiscenční substrát obsahující zesilovač (<i>enhanced chemiluminescence substrate</i>)
EDC	hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl) karbodiimidu
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Fas	Fas ligand
Fc γ -R	receptor Fc γ
FP	fluorescenční polarizace (<i>fluorescence polarization</i>)
Fuc	fukosa
Gal-1	galektin-1
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-D-glukosamin
Gln	glutamin
Glu	glutamát

His	histidin
HRP	křenová peroxidasa (<i>horseradish peroxidase</i>)
IC ₅₀	poloviční maximální inhibiční koncentrace
IL-6	interleukin 6
Ile	isoleucin
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
ITC	izotermální titrační kalorimetrie
IUGR	intrauterinní růstová restrikce (<i>intrauterine growth restriction</i>)
kbp	tisíc párů bází (<i>kilo-base pair</i>)
K_D	rovnovážná konstanta
k_{off}	rychlost disociace
k_{on}	rychlost asociace
LacdiNAc	<i>N,N'</i> -diacetyl-D-laktosamin
LacNAc	<i>N</i> -acetyllaktosamin
LB	medium Luria-Bertani
LBA	medium Luria-Bertani s agarem
LMW	nízkomolekulární hmotnostní pravitko (<i>low molecular weight</i>)
LN _n T	lakto- <i>N</i> -neotetraosa
LNT	lakto- <i>N</i> -tetraosa
MMP-9	matricová metalopeptidasa 9
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Ni-NTA	komerční nosič s imobilizovanými nikelnatými ionty (nickel-charged resin with nitrilotriacetic acid as ligand)
NTA	kyselina nitrilotrioctová (nitrilotriacetic acid)
ot./min	otáčky za minutu
p21	protein tlumící činnost jakéhokoliv komplexu cyklin-dependentních kinas
PBS	fosfátový pufr
PBST	fosfátový pufr s 0,05% Tween® 20
PCR	polymerázová řetězcová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCTA-1	nádorový antigen karcinomu prostaty-1 (<i>prostate carcinoma tumour antigen-1</i>)
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
Po66	myší monoklonální protilátka Po66

RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SLE	systemový <i>lupus erythematoses</i>
TAE pufr	Tris-acetát-EDTA
TB	médium (<i>Terrific Broth</i>)
TDG	thiodigalaktosid; β -D-galaktopyranosyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
Th1	Th-1 lymfocyt
Th17	Th17 lymfocyty
TIM-3	<i>T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3</i>
TMB	substrát <i>TMB One</i> ; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Galektiny

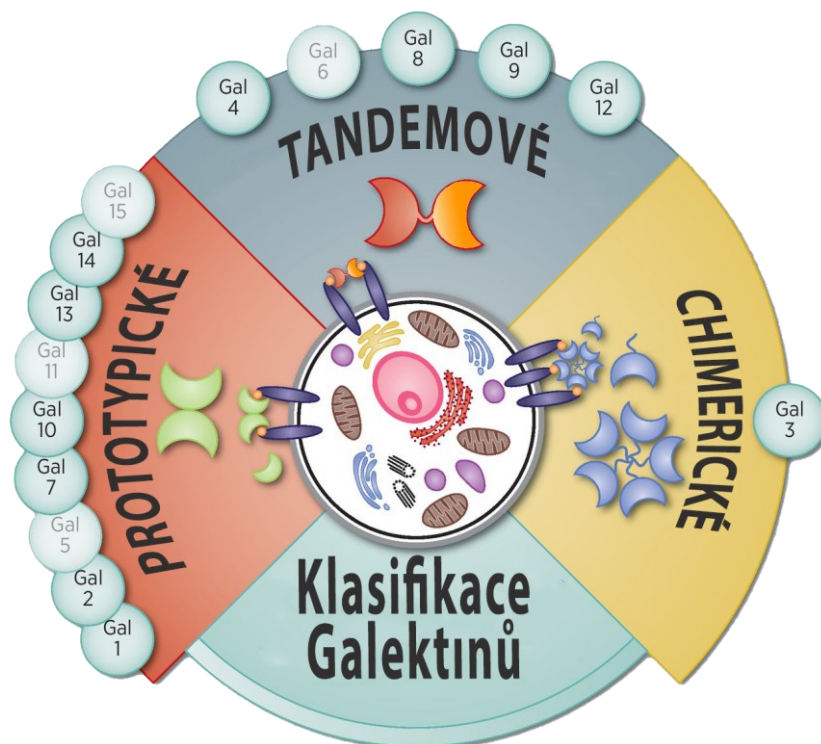
1.1.1 Charakteristika galektinů

Galektiny patří do velké skupiny proteinů nazývaných lektiny. Lektiny se vyznačují schopností specificky se vázat na sacharidové struktury, díky čemuž mohou rozpoznávat konkrétní glykokonjugáty [1]. Právě díky schopnosti specificky reverzibilně rozeznávat sacharidy a jejich deriváty označujeme lektiny jako proteiny vázající sacharidy (na rozdíl od enzymů nebo protilátek) [2]. Živočišné lektiny klasifikujeme do čtyř rodin: lektiny typu C; lektiny typu P; pentraxiny; a galektiny. Kromě živočišné říše byly lektiny identifikovány ve většině organismů; vyskytují se od virů, bakterií a hub po bezobratlé a obratlovce, včetně savců a rostlin [1].

Prvními objevenými proteiny, které dnes nazýváme galektiny, byly elektrolektiny nalezené u elektrických úhořů a dále Gal-1 izolovaný z kuřecí svaloviny. Při jejich objevu hrála velkou úlohu přítomnost cysteinových zbytků, proto byly zpočátku označovány jako lektiny typu S. Právě disulfidické můstky jsou klíčové pro stabilitu a vazbu sacharidových ligandů. Zároveň byla zjištěna jedinečnost galektinů mezi všemi typy živočišných lektinů v tom, že je lze nalézt v jádře, cytoplazmě, vnější plazmatické membráně a extracelulární matrix [3]. Syntéza galektinů probíhá v cytosolu nebo jádře a ke svým galaktosidovým ligandům se dostanou pouze po neklasické sekreční dráze, která obchází Golgiho komplex. Jejich exprese se však liší mezi buněčnými typy a tkáněmi; např. Gal-1 je exprimován ve většině buněčných tkání, na rozdíl od Gal-4, který je typický primárně pro eozinofily [4].

Galektiny jsou proteiny vázající terminální β -galaktosidy. Mají evolučně a strukturně konzervovanou doménu rozpoznávající sacharidy (CRD, z angl. *carbohydrate recognition domain*) [5]. Struktury popsaných galektinů ukazují, že CRD galektinových podjednotek se skládá z pěti- a šesti-vláknových antiparalelních β -listů uspořádaných do β -sendvičové konfigurace, která zcela postrádá α -šroubovici. V dimerních proteinech jsou glykan-vazebná místa v CRD umístěna na opačných koncích dimeru. Kompaktně uspořádaná struktura CRD částečně vysvětluje rezistenci galektinů vůči proteasam. CRD, obsahující 130 aminokyselin, je vysoce evolučně konzervovaná [3].

Galektiny byly definovány jako proteinová rodina složená z 15 členů (11 z nich známo u lidí). Společnými znaky je vysoký stupeň strukturní homologie v jejich sekvenčních motivech pro CRD a také afinita ke glykokonjugátům obsahujícím *N*-acetylglukosamin (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc). Jsou klasifikovány do tří podskupin, dle své struktury (Obr. 1) [6].



Obr. 1: Strukturální typy galektinů.

Zleva: prototypické galektiny (homodimery), tandemové galektiny (heterodimery), a chimerický Gal-3 (monomer). Šedě jsou označeny galektiny nevyskytující se v lidské tkáni (převzato a upraveno z [6]).

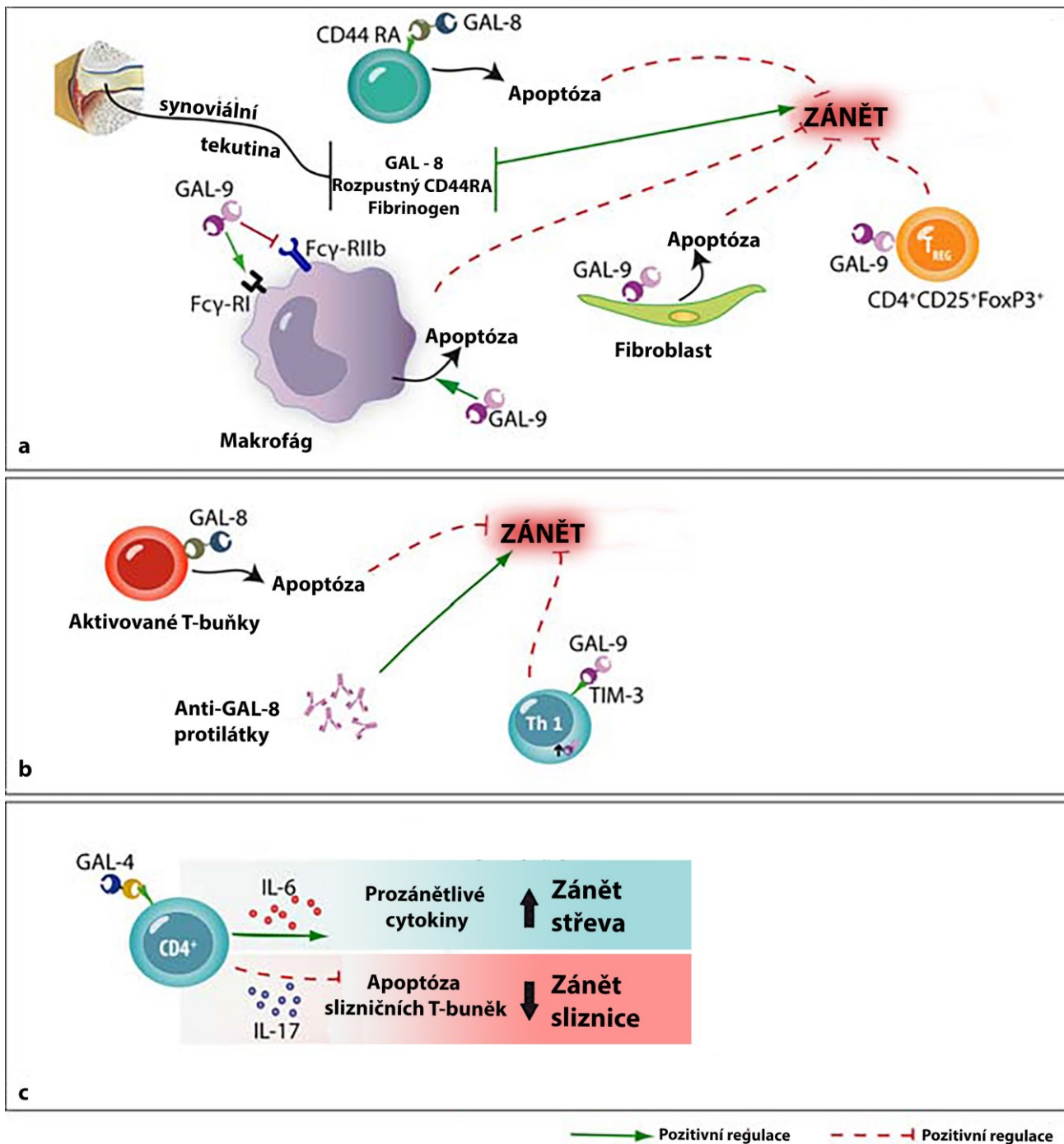
(i) Prototypické galektiny, které zahrnují Gal-1, Gal-2, Gal-5, Gal-7, Gal-10, Gal-11, Gal-13, Gal-14 a Gal-15. Obsahují jednu CRD doménu a tvoří nekovalentní homodimery. **(ii) Chimerické** galektiny, s pouze jedním zástupcem Gal-3. Obsahuje jednu CRD podjednotku a N-terminální sekvenci zapojenou do oligomerizace proteinů [6]. Gal-3 typický tím, že má velkou N-terminální doménu, bohatou na prolinové, glycinové a tyrosinové zbytky, což může přispívat k autoagregaci. Chimerické galektiny jsou běžnější u bezobratlých živočichů [3]. **(iii) Tandemové** galektiny, které mají zástupce Gal-4, Gal-6, Gal-8, Gal-9 a Gal-12. Jsou tvořeny dvěma různými CRD podjednotkami spojenými peptidovým můstkem [6].

1.1.2 Tandemové galektiny

Tandemové galektiny (Gal-4, Gal-6, Gal-8, Gal-9, Gal-12) jsou složeny ze dvou neidentických CRD podjednotek spojených peptidovým můstkem a tvoří celou podrodinu galektinů. Alternativní sestřih vede k vytvoření odlišných sestřihových variant (isoform) Gal-8 a Gal-9, které se liší zvláště délkou peptidového můstku. [7]. Gal-6 je exprimován pouze u hlodavců, ostatní čtyři zástupci se vyskytují i v lidské tkáni [8].

Gal-4 se vyskytuje ve střevě, žaludku, děložních epiteliálních buňkách, cévní stěně, hipokampálních a kortikálních neuronech; pro Gal-8 jsou primární tkáni játra, ledviny, srdeční sval, plíce a mozek; pro Gal-9 pak T-lymfocyty, tenké střevo, játra, děložní epiteliální buňky, kožní *epidermis* a jícnový epitel a pro Gal-12 tuková tkáň [4]. Placentární exprese jednotlivých galektinů je dle výzkumu spojena s pohlavím dítěte. Lidská placenta exprimuje tandemové galektiny ve vilózních a extravilózních trofoblastech, endoteliálních buňkách a deciduálních stromálních buňkách. V intrauterinním růstově restriktivním (IUGR, z angl. *intrauterine growth restriction*) trofoblastu samčích plodů je významně snížena exprese Gal-4, Gal-8 a Gal-9. Naproti tomu u těhotenství IUGR s ženským plodem je zvýšena exprese Gal-9 a Gal-12 v extravilózních trofoblastech a v případě Gal-12 i v endoteliálních buňkách [8].

Tandemové galektiny se účastní procesu autoimunitního zánětu. Revmatoidní artritida, systémový *lupus erythematosus* (SLE, z angl. *systemic lupus erythematosus*), cystická fibróza a zánětlivá střevní onemocnění jsou běžná autoimunitní onemocnění, ve kterých hrají galektiny komplexní roli. U revmatoidní artritidy má Gal-8 protizánětlivý účinek a podporuje apoptózu buněk synoviální tekutiny interakcí s buněčným povrchem CD44vRA. Tento proces může být inhibován fibrinogenem. Gal-9 potlačuje zánět indukci apoptózy synoviocytů podobným fibroblastům, inhibuje prozánětlivé cytokiny, zesiluje indukci T-regulačních buněk, zabraňuje tvorbě buněk Th17 a moduluje expresi Fcγ-R na makrofázích (Obr. 2a). Séra od pacientů s SLE nesou cirkulující autoprotilátky anti-Gal-8 s funkcí blokuje patogenním potenciál. Anti-Gal-8 protilátky inhibují proapoptickou aktivitu Gal-8 na aktivovaných T-buňkách, čímž se podporuje rozvoj zánětu. Na druhou stranu Gal-9 interaguje s regulačním receptorem *T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3* (TIM-3) a tlumí Th1 odpověď (Obr. 2b). Při střevním zánětu stimuluje Gal-4 CD4+ T-buňky k produkci IL-6 a přispívá k exacerbaci chronického střevního zánětu (Obr. 2c) [9].



Obr. 2: Funkce galektinů při autoimunitním zánětu.

Plné zelené šipky označují indukci zánětu, zatímco přerušované červené šipky označují inhibici zánětu (převzato a upraveno z [9]).

1.1.3 Gal-8

Gal-8 sestává ze dvou různých evolučně konzervovaných CRD podjednotek spojených peptidovým můstkem, a proto patří do podtřídy tandemových galektinů. Alternativní sestřih vede k vytvoření odlišných isoform [7]. Dle aminokyselinové sekvence má tento galektin velikost 34 kDa, tj. každá jeho CRD podjednotka má velikost přibližně 140 aminokyselin a spojovací

peptidový můstek má velikost 32 aminokyselin [10]. Tento lektin byl původně klonován z knihovny cDNA kryších jater; izolovaný klon obsahuje otevřený čtecí rámec, který kóduje celkově 316 aminokyselin. U lidí byl objeven jako nádorový antigen-1 karcinomu prostaty (PCTA-1), který je selektivně exprimován v buňkách karcinomu prostaty, ale ne v normální prostatě nebo benigní hypertrofii prostaty [9]. Je též široce exprimován v nádorových tkáních a zdá se, že je zapojen do interakcí buněk podobných integrinu [7].

Lidský gen pro Gal-8 pokrývá 33 kbp genomové DNA. Je lokalizován na chromozomu 1 a obsahuje 11 exonů. Gen produkuje alternativním sestřihem 14 různých transkriptů, které dohromady kódují 6 isoform [10]. Gal-8, stejně jako ostatní galektiny, je rozpustný protein. Při sekreci působí jako fyziologický modulátor buněčné adheze. Studie ukázaly, že gen *GALS8* kóduje různé mRNA alternativními sestřihovými cestami a použitím různých polyadenylačních míst. Zdá se, že jednotlivé isoformy jsou odlišně exprimovány v různých nádorových buňkách. Tato netypická podrodina Gal-8 má komplexní regulaci exprese, která by se mohla podílet na procesech nádorového bujení. Celkově je Gal-8 strukturně příbuzný (34% identita) s Gal-4. Nicméně Gal-4 je omezen na jiné lidské tkáně [7]. Kromě vazby sacharidů vykazují CRD domény Gal-8 i hemaglutinační aktivitu.

Spojovací peptidový můstek Gal-8 je jedinečný a nevykazuje podobnost s žádným známým proteinem. Delece peptidového můstku vede k narušení biologických účinků Gal-8. V souladu s tímto zjištěním vykazují izolované N- nebo C-terminální CRD Gal-8 sníženou schopnost vazby sacharidů, i sníženou schopnost podporovat adhezi, šíření a signalizační funkce Gal-8. Pro správné fungování Gal-8 jsou tedy nutné kooperativní interakce mezi oběma CRD a peptidovým můstkem [7].

1.1.4 Funkce Gal-8

Gal-8 jako modulátor buněčné adheze. Když je Gal-8 imobilizován, funguje jako matricový protein podobně jako fibronectin při podpoře buněčné adheze ligací a shlukováním integrinových receptorů na povrchu buněk. Tvorba komplexu mezi Gal-8 a integriny zahrnuje interakce cukr-protein a spouští integrinem zprostředkované signální kaskády. Naproti tomu, když je Gal-8 přítomen v nadbytku jako rozpustný ligand, tvoří (stejně jako fibronectin) komplex s integriny, které negativně regulují buněčnou adhezi. Díky svým dvojím účinkům na adhezivní vlastnosti buněk a jeho podobnosti s fibronectinem lze Gal-8 považovat za nový typ matricelulárního proteinu [10].

Gal-8 jako modulátor buněčného růstu. Gal-8 funguje jako protein extracelulární matrix, který tvoří vysoce afinitní interakce s integriny. Rozpustný Gal-8 inhiboval progresi buněčného cyklu a vyvolával zástavu růstu. Tyto účinky nesouvisely s buněčnou adhezí, ale byly připisovány

zvýšení obsahu inhibitoru cyklin-dependentní kinasy p21 v buňkách, která souvisela s přítomností rozpustného Gal-8 nebo jeho nadprodukcí v buňkách. Výsledky ukázaly, že Gal-8 je modulátorem buněčného růstu prostřednictvím stimulace nadprodukce p21 [7].

Gal-8 při modulaci funkce T-buněk a homeostázy. Gal-8 sdílí s jinými galektiny schopnost modulovat životaschopnost efektorových T-buněk, čímž přispívá k jejich homeostáze. Tento lektin indukuje apoptózu v T-buňkách Jurkat, podobně jako Gal-1 a Gal-3. Thiodigalaktosid (TDG), komerčně dostupný inhibitor galektinů, který na sebe vázal Gal-8, inhiboval apoptotické účinky Gal-8. Výsledky z výzkumu SLE naznačují, že Gal-8 je novým supresivním faktorem T-buněk, který může být *in vivo* vázán autoprotilátkami blokujícími funkci během rozvoje autoimunitního zánětu. Navzdory určitým podobnostem s ostatními členy galektinové rodiny se tedy proapoptická funkce Gal-8 zdá být jedinečná svým molekulárním mechanismem. Gal-8 také indukuje apoptózu v lidských periferních mononukleárních buňkách aktivovaných anti-CD3 a anti-CD28 stimulačními protilátkami. Je silným induktorem exprese ligandu Fas, což může přispívat k eliminaci aktivovaných T-buněk. Tyto jeho imunopresivní funkce jsou inhibovány autoprotilátkami [9, 11].

1.1.5 Klinický význam

Gal-8 v autoimunitním zánětu. Role Gal-8 v revmatoidní artritidě byla zjištěna na modelu autoimunitního zánětu kloubu. Synoviální tekutina a synoviální buňky pacientů s revmatoidní artritidou obsahovaly značná množství Gal-8 a CD44; zejména isoformu CD44vRA, která působí jako vysokoafinitní ligand Gal-8. V modelu artritidy vykazoval Gal-8 protizánětlivou aktivitu stimulací apoptózy buněk synoviální tekutiny. Vazba Gal-8 na buněčný povrch CD44vRA tedy indukuje apoptózu buněk způsobujících zánět kloubu (tj. buňky synoviální tekutiny, především leukocyty), což vede k potlačení zánětu. V synoviální tekutině se v zaníceném kloubu hromadí fibrinogen, který tvoří komplex s Gal-8 a CD44vRA, a tak jej zachycuje [12]. Autoprotilátka anti-Gal-8 nalezená v SLE séru blokuje proapoptickou aktivitu Gal-8, a tak řídí patologické změny imunitního systému prostřednictvím selektivního blokování funkcí Gal-8 [13].

Galektin-8 a neutrofilů (klíčové mediátory akutního zánětu). Neutrofilů hrají ústřední roli během akutní fáze zánětu, zejména v důsledku bakteriální infekce, expozice životnímu prostředí a vzniku některých typů nádorů. Shlukování těchto buněk je charakteristickým znakem akutního zánětu, protože jde o první buňky, které migrují do míst zánětu. Gal-8 hraje v tomto procesu důležitou roli tím, že indukuje adhezi neutrofilů periferní krve *in vitro*, což naznačuje, že tento lektin může být novým modulátorem funkce neutrofilů. Když byl Gal-8 přidán do média obsahujícího sérum, indukoval vazbu neutrofilů. Imobilizovaný Gal-8 také podporoval adhezi neutrofilů, ale počet adhezních neutrofilů byl menší než 40 % ve srovnání s tím, když byl Gal-8

použit jako rozpustný ligand. Kromě toho se Gal-8 váže na prekurzor matrixové metaloproteinasy-9 (pro-MMP-9) a urychluje její přeměnu na MMP-9, pravděpodobně díky své schopnosti během zánětu štěpit strukturální proteiny, jako jsou kolageny. Gal-8 také reguluje funkci neutrofilů: je stejně účinný jako formyl-Met-Leu-Phe (silný chemotaktický mediátor) při indukci produkce superoxidu neutrofilů periferní krve, což je klíčový faktor jejich mikrobicidní aktivity [9, 14].

1.1.6 Gal-8 v nádorových onemocněních

Studie ukázaly, že Gal-8 je silně exprimován v nádorových tkáních [7], zvláště v nádorech mozku, prsu, tlustého střeva, hlavy a krku, ledvin, slinivky, štítné žlázy, placenty, prostaty, vaječníků a dělohy, plic, žaludku a jícnu [9]. Hladiny exprese Gal-8 pozitivně korelují s výskytem nádorů, přičemž nejlepším příkladem, který byl dosud studován, je rakovina prostaty. Nadměrně exprimovaný Gal-8 může těmto nádorům poskytnout určité výhody související s růstem a tvorbou metastáz díky své schopnosti modulovat buněčnou adhezi a buněčný růst. Gal-8 tedy může modulovat interakce mezi buňkami a matricí a regulovat buněčné funkce za různých fyziologických a patologických stavů [7]. Dále se různé studie pokoušely ověřit souvislost mezi expresí Gal-8 a neoplastickou transformací (přeměna somatické buňky v buňku nádorovou) [9].

V imunohistochemické studii na primárních a sekundárních maligních plicních nádorech různého histologického původu bylo zjištěno, že Gal-8 je hojný u spinocelulárního karcinomu, slabě exprimovaný u adenokarcinomu a nedetekovatelný u malobuněčného karcinomu. Navíc byla zjištěna korelace mezi expresí Gal-8 a stupněm diferenciací spinocelulárních karcinomů a neuroendokrinních nádorů. Studie provedené na myších s transplantovanými buňkami lidského spinocelulárního karcinomu ukázaly, že injekce ¹³¹I radioaktivně značené Po66 protilátky a doxorubicinu způsobuje regresi velikosti nádoru, což dále podporuje potenciální roli Gal-8 v neoplastické transformaci a nádorovém bujení [15, 16].

Naproti tomu u lidského karcinomu tlustého střeva imunohistochemické barvení odhalilo významný pokles exprese Gal-8 v závislosti na nádorové malignitě. Čím agresivnější byl nádor, tím méně se Gal-8 exprimoval. V nádorech tlustého střeva bylo méně Gal-8 než v normálních nebo benigních tkáních tlustého střeva. Bylo zjištěno, že exprese Gal-8 nepřímo koreluje s rychlostí růstu nádoru. Další studie *in vitro* odhalily, že Gal-8 snižoval rychlost migrace nádorových buněk pouze u těch lidských experimentálních modelů, které vykazovaly nejnižší rychlost růstu *in vivo* [17].

Při hledání potenciálních nádorových antigenů u transgenních myší Neu (HER-2/Neu, lidský receptor epidermálního růstového faktoru 2), které jsou modelem pro estrogení receptor-negativní rakovinu prsu, byl Gal-8 identifikován jako jeden z pěti nejčastěji exprimovaných nádorových antigenů a jako potenciální cíl pro terapeutické využití [18].

Expres Gal-8 byla také analyzována v nádorech centrálního nervového systému pomocí imunohistochemie a RT-PCR. Bylo zjištěno, že hladiny exprese Gal-8 jsou velmi vysoké u lidských pilocytických astrocytomů, astrocytomů, anaplastických astrocytomů a glioblastomů a zůstávají nezměněny během progresu malignity. Funkční studie odhalily, že Gal-8 může stimulovat migraci buněk glioblastomu *in vitro*, což naznačuje, že Gal-8 se může podílet na invazi rakovinných buněk do mozkového parenchymu [19]. Expres Gal-8 by mohla být použita jako klinický prognostický faktor i pro spinocelulární karcinom hrtanu [20].

Angiogeneze je klíčová pro růst a přežití nádorových buněk. Zvyšuje též pravděpodobnost, že nádorové buňky vstoupí do oběhu a budou vytvářet metastázy. Bylo zjištěno, že v normálních tkáních byla expres Gal-8 rozšířena na celou tkáň, zatímco v nádorových tkáních byla omezena pouze na jádra [21]. Gal-8 byl také silně exprimován v primárních lidských dermálních, lymfatických a endoteliálních buňkách a podílel se na podpoře jejich adheze a migrace, zejména interakcí s podoplaninem (membránový protein podobný sialomucinu vysoce exprimovaný v lymfatických buňkách) [22]. Byla popsána kritická role Gal-8 při podpoře *in vitro* a *in vivo* angiogeneze. Výsledky ukazují, že tvorba kapilár a migrace endoteliálních buněk *in vitro* jsou stimulovány Gal-8 prostřednictvím interakce s CD166 na buňkách BAEC. Tubulogenezi a migraci indukované Gal-8 významně zabránily specifické disacharidové inhibitory [23]. Tato data naznačují klíčovou funkci endoteliálního Gal-8 v angiogenezi, což lze využít pro terapii rakoviny. Další aspekt progresu a metastázování nádoru představuje interakce krevních destiček s nádorovými buňkami. Gal-8 se váže na specifické glykany na povrchu krevních destiček a spouští mobilizaci vápníku a vazbu fibrinogenu. Podporuje také agregaci buněk, tvorbu tromboxanu, expresi P-selektinu a sekreci α - a ρ - granulí [24]. Tyto účinky mohou přispívat k heterotypickým interakcím mezi krevními destičkami, nádorovými buňkami a endotelem a kriticky ovlivnit metastatické šíření [9].

1.2 Ligandy galektinů

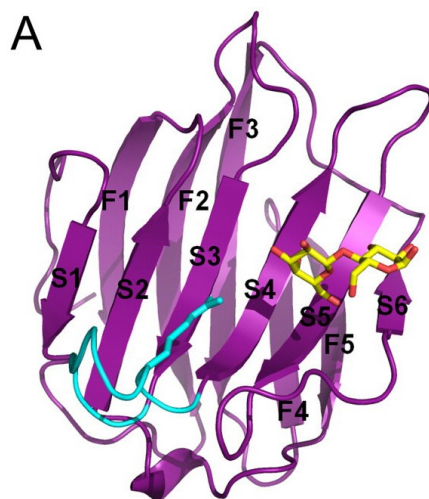
1.2.1 Interakce galektin-ligand

Bez ohledu na celkovou kvarterní a jedinečnou doménovou strukturu galektinů se zdá, že afinita CRD galektinu k sacharidovým ligandům obsahujícím terminální β -galaktosid nakonec odráží soubor klíčových konzervovaných aminokyselin v rámci každé CRD [25]. CRD se skládá ze 140 aminokyselinových zbytků, které se skládají ze šesti (S1–S6) a pěti (F1–F5) vláknových antiparalelních β -listů, které společně tvoří sendvičovou strukturu β -listu s S-listy a F-listy v daném pořadí. β -Vlákna S1–S6 tvoří konkávní povrch, na který jsou navázány specifické glykany. Vazebné místo je dále rozčleněno na místa A-E (obr. 3; konkrétně ukázáno na N-podjednotce), přičemž hlavní vazebné místo C je vysoce konzervované mezi všemi členy rodiny galektinů. Místo C váže

β -galaktosidovou jednotku, zatímco méně konzervované místo D obsahuje cukerný zbytek navázaný na β -galaktosid (např. glukosovou jednotku v laktose). Naproti tomu místa A, B a E jsou variabilnější, a tím i specifitější pro jednotlivé galektiny; nejčastěji pomáhají vazbu s ligandy stabilizovat. Tato místa jsou obsazena cukry nebo funkčními skupinami sousedícími s β -galaktosidem [26]. Krystalografické studie potvrdily, že za specifitu interakce galektin-ligand jsou zodpovědné odlišné vodíkové vazby [25].

Aminokyselinové zbytky, které se nacházejí v těsné blízkosti aminokyselin rozpoznávajících základní disacharid jako laktosu nebo LacNAc, pravděpodobně určují dopad modifikací β -galaktosidu na rozpoznávání výsledného ligandu [27]. Variace v β -galaktosidových modifikacích lze tak využít pro modulaci rozpoznávání sacharidového ligandu jednotlivými galektiny [28].

První studie, které se snažily prozkoumat specifitu galektinů pro sacharidové ligandy, často využívaly relativně jednoduché sacharidové struktury ke zjištění obecných preferencí galektin-ligand. Zvýšená dostupnost složitějších sacharidových struktur prostřednictvím vysoce různorodých a dobře charakterizovaných oligosacharidových knihoven však zcela změnila naše chápání klíčových rysů interakcí galektin–ligand. V důsledku dat generovaných pomocí těchto oligosacharidových knihoven se kromě zjištění preference vazby ligandu pozorované pomocí různých testovacích platform objevily odlišné vzorce interakcí galektinu se sacharidovými ligandy, které nadále poskytují důležitý pohled na funkci galektinu [25].



Obr. 3: Rentgenová krystalová struktura lidského Gal-8N

Struktura komplexu monomeru Gal-8N podjednotky s laktosou. Antiparalelní β -listy (S1–S6) a (F1–F5) jsou označeny příslušným číselným kódem. Smyčka S3 – S4 je zobrazena světle modrou barvou (převzato z 29)].

1.2.2 Metody charakterizaci vazebných interakcí galektin-ligand

Nejmocnějším nástrojem, který poskytuje přesné informace o uspořádání atomů v komplexu protein-ligand v pevném stavu, je rentgenová krystalografie. Nicméně komplexní pochopení interakcí protein-ligand často vyžaduje shromažďování dalších informací o dalších parametrech, jako je dynamický pohyb ligandu a/nebo určité části proteinu a kinetické a termodynamické vlastnosti procesu vazby. Abychom porozuměli vazebnému procesu na molekulární úrovni, musí být rentgenová krystalová strukturní analýza doplněna dalšími metodami [27].

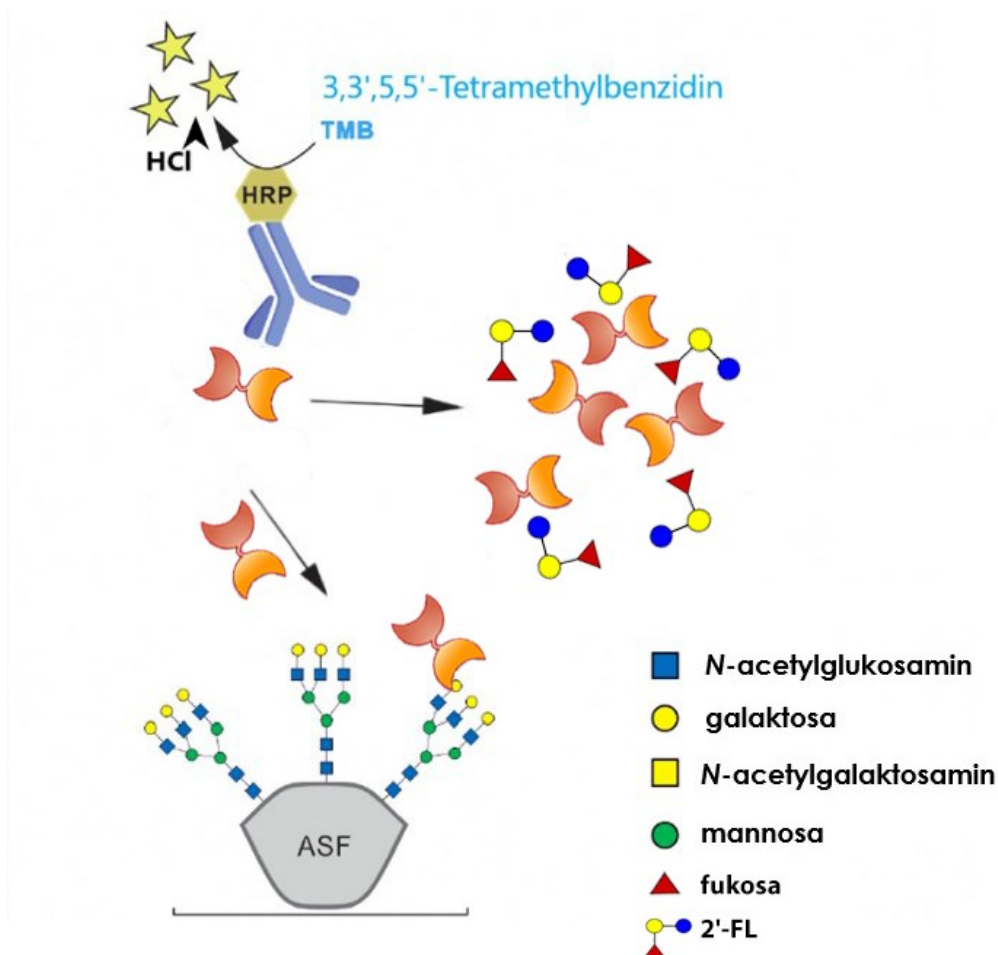
Fluorescenční polarizace (FP, z angl. *fluorescence polarization*) umožňuje kvantitativní analýzu molekulárních interakcí v roztoku měřením rozdílu ve stupni polarizace navázaného a nenavázaného fluoroforu, což souvisí s mobilitou a velikostí proteinu a komplexu s ligandem. Díky své jednoduchosti a rychlosti se FP stala oblíbeným nástrojem pro screening při hledání zajímavých sloučenin prostřednictvím kompetitivních vazebných testů. FP nevyžaduje, aby byl sledovaný protein značen nebo imobilizován [30].

Interferometrie na biovrstvě (BLI, z angl. *biolayer interferometry*) je relativně nová metoda měření biomolekulárních interakcí. Požadované proteiny musí být imobilizovány na špičce biosenzoru. Při vazbě s ligandem se mění tloušťka hrotu biosenzoru. BLI analyzuje optický interferenční obrazec bílého světla odraženého od imobilizovaného povrchu ve srovnání s vnitřním referenčním povrchem, což umožňuje přímé měření vazebné kinetiky v reálném čase, včetně rychlosti asociace (k_{on}), rychlosti disociace (k_{off}) a rovnovážné konstanty (K_D) [31]. BLI se v poslední době stala oblíbenou metodou pro stanovení hodnot K_D . Životnost komplexu ligand-protein souvisí s hodnotou k_{off} [32]. Dva ligandy mohou mít srovnatelnou hodnotu afinity, ale značně odlišnou vazebnou kinetiku.

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC, z angl. *isothermal titration calorimetry*) je metoda, která se opírá o termodynamická měření, z nichž jsou vyvozeny parametry vazebných interakcí [33]. Principem stanovení je kvantifikace tepla uvolněného nebo absorbovaného během biomolekulární vazebné interakce až do nanomolárního rozsahu [34]. Vazebná afinita je určena změnou volné energie (ΔG), která je zase ovlivněna změnou entalpie (ΔH) a entropie (ΔS), (tj. $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Entalpie odráží tepelné rozdíly jako výsledek vazebného procesu, zatímco entropie odpovídá za stupeň neuspořádanosti ve spojení s danou událostí [35]. Řada termodynamických analýz se zaměřuje na vazbu oligosacharidů nesoucích galaktosu s galektiny. Výsledky jsou v souladu se strukturními studiemi [27].

Kompetitivní ELISA (z angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se používá ke screeningu antigenů/protilátek. Při této metodě je povrch jamek potažen protilátkou specifickou k antigenu nebo antigenem specifickým k protilátce. Vzorek, který má být měřen, a enzymaticky označený antigen nebo protilátka se umístí do jamky současně. Označený a neoznačený antigen

(např. antigen pacienta) nebo molekuly protilátky spolu soutěží o vazbu na protilátku nebo antigen v jamkách. Po promytí jamek a přidání enzymového substrátu umožňuje výsledné zbarvení pro kvantifikaci koncentrace navázaného analytu. Mezi koncentrací analytu a intenzitou výsledného zbarvení existuje nepřímá úměra. Když je množství analyzovaného antigenu nebo protilátky v séru nízké, získá se vysoká absorbance, zatímco větší množství způsobí nízkou absorbanci [36] (obr. 4).



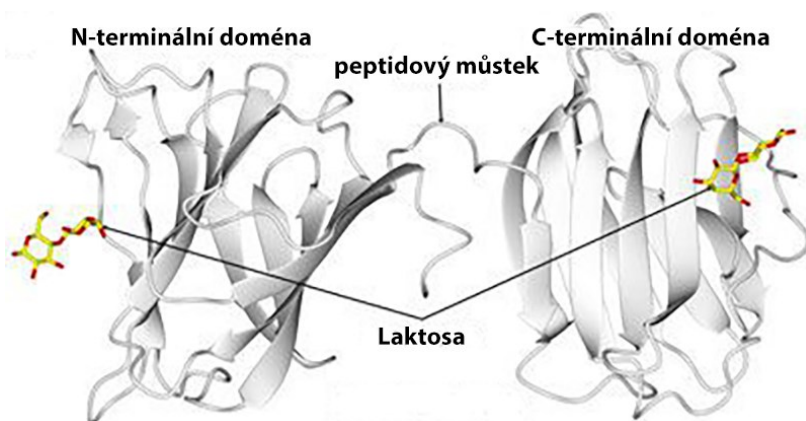
Obr. 4: Schéma kompetitivního měření ELISA

Kompetitivní test ELISA využívající sacharidový standard 2'-FL jako kompetitivní ligand pro inhibici vazby Gal-8 na imobilizovaný asialofetuin (ASF). K detekci navázaného Gal-8 byla použita protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (HRP, z angl. *horseradish peroxidase*). HRP konvertovala přidáný 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) a tato konverze byla zastavena 1M HCl za účelem získání kolorimetrického signálu (převzato a upraveno z [6, 37]).

1.2.3 Ligandy a galektin-8

V dimeru Gal-8 jsou CRD jednotlivých monomerů obráceny k sobě a N- a C-konce každého monomeru jsou umístěny na opačných stranách rozhraní dimeru (Obr. 5) [29].

S laktosou přímo interaguje sedm aminokyselin, z nichž šest (kromě Arg⁴⁵) je konzervováno v Gal-1, Gal-2, Gal-3, Gal-4 a Gal-7 (Obr. 6). Aminokyseliny Arg⁴⁵, His⁶⁵, Asn⁶⁷, Arg⁶⁹, Asn⁷⁹ a Glu⁸⁹ přímo interagují s laktosou prostřednictvím vodíkových vazeb. Trp⁸⁶ se účastní van der Waalsových interakcí s galaktosovým cyklem podobně jako řada dalších lektinů vázajících galaktosu a laktosu (Obr. 7; konkrétně ukázáno na N-podjednotce) [38]. Aminokyseliny Gln⁴⁷, Trp⁸⁶ a Arg⁵⁹ tvoří vodíkovou vazbu zprostředkovanou vodou s laktosou. Aminokyseliny umístěné naproti neredukujícímu konci laktosy jsou však zcela odlišné od ostatních galektinů. Tato oblast Gal-8N je zásaditější a Arg⁴⁵ tvoří vodíkovou vazbu s galaktosovým kyslíkem na C-4; Gln⁴⁷ interaguje s hydroxylem na C-3 galaktosové podjednotky prostřednictvím vodíkových vazeb zprostředkovaných vodou. V jiných galektinech je substituován Ala nebo Val, které s laktosou neinteragují. Arg⁵⁹ leží v oblasti smyčky mezi S3 a S4 a interaguje s hydroxylem na C-3 galaktosové podjednotky prostřednictvím vodíkové vazby zprostředkované vodou (Obr. 3). Tato smyčka S3–S4 má jedinečné vlastnosti; je delší než smyčky jiných galektinů a je umístěna blíže k sacharidovým ligandům. Jiné galektiny nenesou homologní zbytek Arg⁵⁹ (Obr. 6) [29].



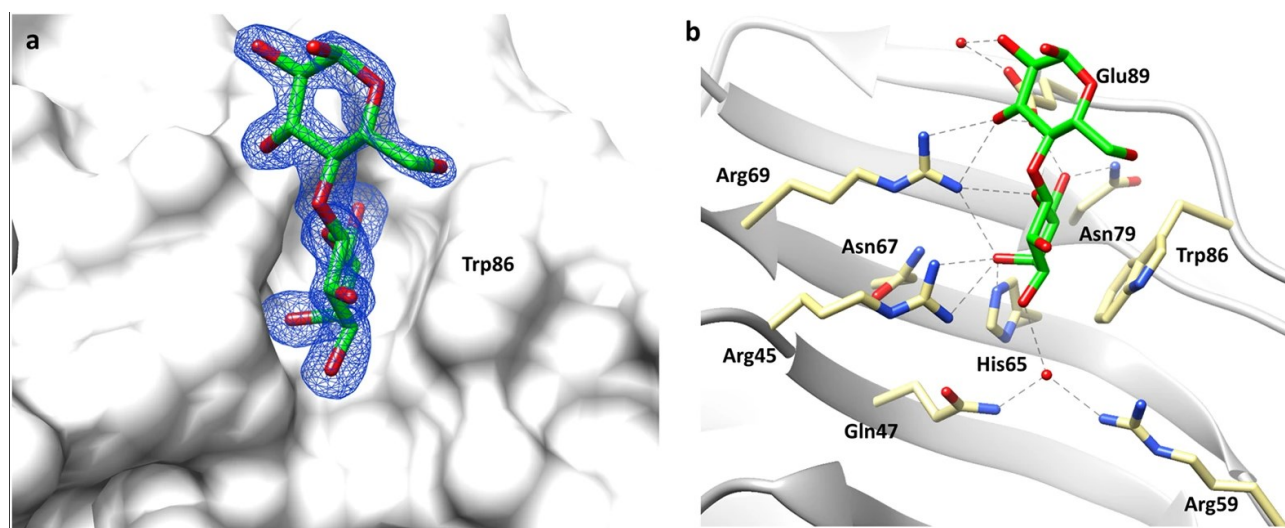
Obr. 5: Rentgenová krystalová struktura lidského Gal-8

Krystalová struktura dimeru Gal-8 obsahující obě jeho N- a C-terminální CRD podjednotky, které jsou spojeny peptidovým můstkem a na jejich koncích je navázaná laktosa (převzato a upraveno z [39]).

	<u>S3</u>	<u>S4</u>	<u>S5</u>	<u>S6</u>	<u>S2</u>
Galectin-1	DAKSFVLNLGKDSN	LCLHFNPRF	TIVCNSKDG	AWGTEQREA	NYMAADGD
Galectin-2	GTDGFVINLQGQTD	LNLHFNPRF	TIVCNSLDG	NWGQEQRED	SYLSVRGG
Galectin-3	NANRIALDFQRGN	VAHFHNPFRF	VIVCNTKLD	NWGREERQS	SKLGISGD
Galectin-4N	HMKRFFVNFVVGQDPGS	VAHFHNPFRF	KVVFNTLGG	KWGSEERKR	THLQVDGD
Galectin-4C	TGKSFAINFKVGSSG	IALHINPRM	TVVRNSLLN	SWGSEEEKIT	DTLEIQGD
Galectin-7	NASRFHVNLLCGEEQGS	AALHFNPRL	EVVFNSKEQ	SWGREERGP	RLVEVGGD
Galectin-8N	DAD ⁴⁵ R ⁴⁷ F ⁴⁹ Q ⁵¹ VDLQNGSSVKP ⁵⁹ R	VAH ⁶⁵ F ⁶⁷ N ⁶⁹ P ⁷¹ R ⁷³ F	C ⁷⁷ I ⁷⁹ V ⁸¹ C ⁸³ N ⁸⁵ T ⁸⁷ L ⁸⁹ I ⁹¹ N	K ⁸⁶ W ⁸⁸ G ⁹⁰ R ⁹² E ⁹⁴ E ⁹⁶ I ⁹⁸ T ¹⁰⁰ Y	DTLGI ¹⁴¹ Y ¹⁴³ GK
Galectin-8C	NAKSFNVDLLAGKSK	IALHLNPRM	AFVRNSFLQ	SWGEEERNI	DTLEINGD
Galectin-9N	SGTRFAVNFQTGFSGN	IAHFHNPFRF	YVVCNTRGN	SWGPEERKT	DTISVNGS
Galectin-9C	SAQRFHINLCSGN	IAFHLNLRM	AVVRNTQID	SWGSEERSL	NRLEVGGD

Obr. 6: Srovnání sekvencí galektinů-1 až -9.

Srovnání oblasti S2-S6 β -listů v galektinových CRD. Aminokyseliny, které jsou společné ve všech sekvencích, jsou zobrazeny tučně, a aminokyseliny, které jsou jedinečné pro Gal-8N, jsou vyznačeny tučně a kurzívou (převzato a upraveno z [29]).



Obr. 7: Struktura monomeru Gal-8N v komplexu s laktosou.

(a) Mapa elektronové hustoty laktosy je vyznačená modrou sítí; uhlík má zelenou barvu; kyslík má červenou barvu; v modelu *ball-and-stick* v komplexu laktosou je Gal-8N je vyznačen šedou plochou.

(b) Vazebné interakce vodíku jsou vyznačené šedými přerušovanými čarami a jsou vytvořené mezi laktosou a vazebným místem Gal-8N: uhlík má žlutou barvu; kyslík má červenou barvu; dusík má modrou barvu; byl použit model *ball-and-stick* (převzato a upraveno z [40]).

Bohari a kol. zmiňuje glykosfingolipidy jako ligandy pro Gal-8N. Glykosfingolipidy jsou molekuly buněčného povrchu provádějící základní buněčné procesy. Lakto-*N*-tetraosa (LNT) a lakto-*N*-neotetraosa (LNnT) jsou tetrasacharidy, které tvoří základní strukturní složku glykosfingolipidů. LNT a LNnT se liší pouze typem glykosidové vazby v rámci neredukujícího koncového disacharidu. Tyto glykolipidy jsou přenašeči antigenu krevní skupiny a lidských přirozených zabíječských antigenů, které se nacházejí hlavně na krevních buňkách, a jsou také hlavními složkami lidského mléka, které přispívají ke zdraví kojenců. Bohari a kol. zdůrazňuje preferenci Gal-8N pro rozpoznání glykosfingolipidů obsahujících LNnT před glykosfingolipidy obsahujícími LNT, což může být potenciálně využito pro složku glykosfingolipidů návrhy specifických ligandů. Jednou za zásadních aminokyselin pro rozpoznávání tohoto typu ligandů jsou aminokyseliny Tyr¹⁴¹ a Arg⁵⁹ (Obr. 6). Další jedinečné aminokyselinové zbytky, jako je Arg⁵⁹, Gln⁴⁷, Ile⁹¹ a Tyr¹⁴¹, jsou též potenciálními významnými místy nejen pro zvýšení afinity, ale také pro prozkoumání specifity [40].

1.3. Metody značení galektinů pro detekci

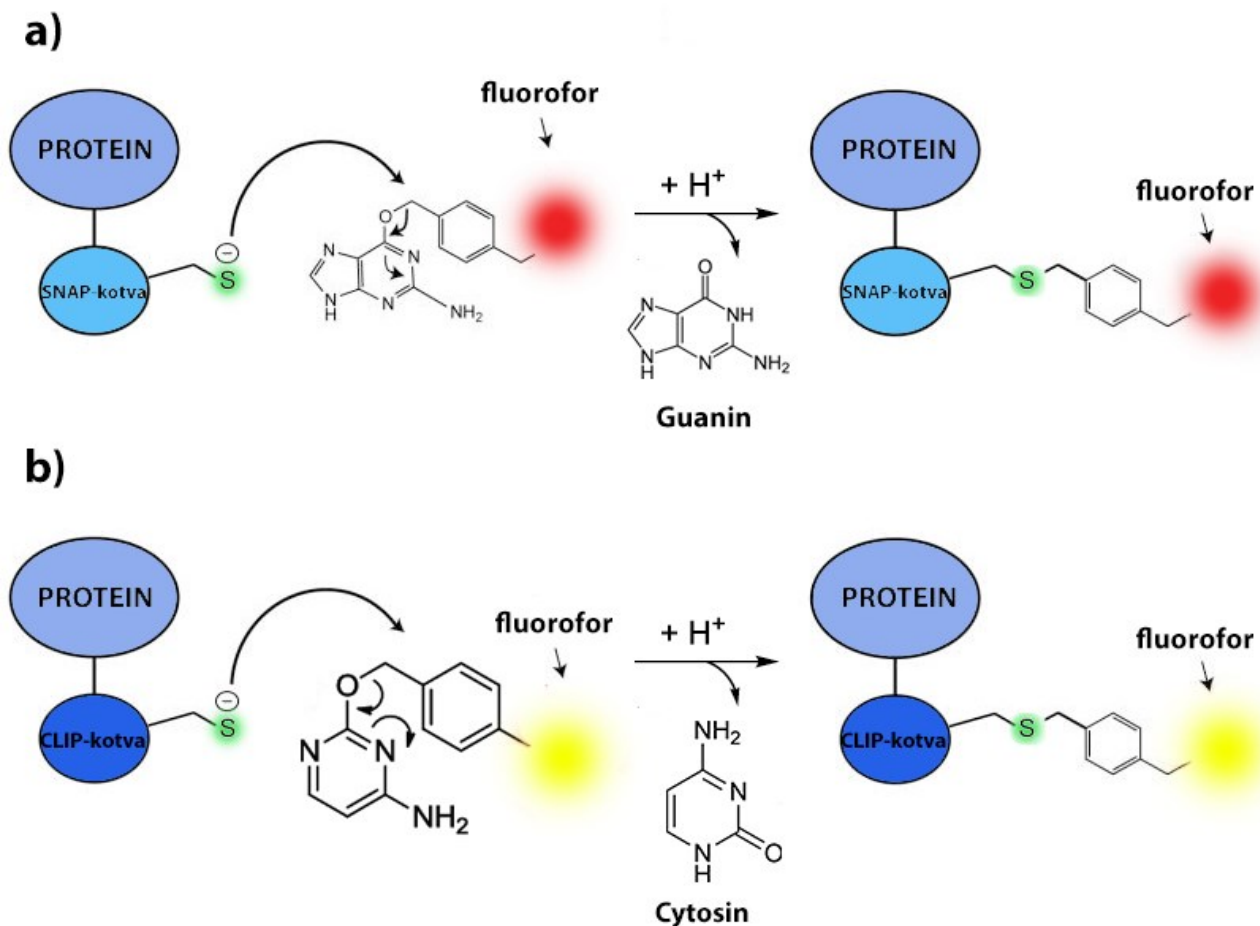
1.3.1 Fluorescenční metody značení galektinů

Fluorescenční metody využíváme, pokud jsou zkoumány proteiny nefluorescenční nebo pokud jejich vlastní fluorescence není pro požadovaný experiment adekvátní. Využívají se k tomu fluorofory – fluorescenční chemické sloučeniny s delší excitační a emisní vlnovou délkou než aromatické aminokyseliny, abychom mohli značený protein studovat v přítomnosti jiných neznačených proteinů. Fluorofory se lze obecně rozdělit do dvou hlavních tříd na vnitřní a vnější. Vnitřní fluorofory jsou ty, které se vyskytují přirozeně (aromatické aminokyseliny; flaviny; chlorofyl). Vnější fluorofory byly uměle vytvořeny a můžeme je rozdělit dle vazby na fluorescenční značky vázící se kovalentní vazbou a fluorescenční sondy vázící se nekovalentní vazbou [41]. Kovalentní vazba fluorescenční značky může být zprostředkována buď přímo samotnou značkou (tzv. samomodifikace) nebo pomocí enzymu, který katalyzuje tvorbu kovalentní vazby mezi fluorescenční značkou a zkoumaným proteinem (tzv. značení zprostředkované enzymem). Ideální chemická značka nebo sonda pro *in vivo* značení proteinů by měla splňovat minimálně následující kritéria: a) značka by měla být co nejmenší, aby nenarušovala vlastnosti sledované molekuly; b) označení musí být co nejkonkrétnější, aby bylo dosaženo optimálního poměru signálu k šumu; a c) reakce značení by měla být rychlá a kvantitativní, aby byla zajištěna dostatečná intenzita značení. Samozřejmě splnit všechna tato kritéria může být problematické [42].

Fluorescenční značky. Mezi rozšířené fluorescenční značky patří: fluorescein (3',6'-dihydroxyspiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-3-on) a jeho deriváty, např. fluorescein-5-isothiokyanát; skupina rhodaminových barviv, do které patří např. chlorid kyseliny

sulforhodamin 101, známý i jako *Texas Red* či rhodamin B. Fluorescein i rhodomaminová barviva mají dlouhá absorpční maxima (480 nm a 600 nm) i emisní vlnové délky (510 nm a 615 nm). Mají široké pole využití nejen díky příznivým rozptylům maxim, ale i protože nejsou citlivá na polaritu rozpouštědla a na přítomnost interferujících sloučenin. Nejčastějšími deriváty jsou sulfonylchloridy pro značení aminů; maleimidy pro značení sulfhydrylových skupin. Jejich nejběžnějším použitím jsou jejich konjugáty s imunoglobuliny, které se používají v imunotestech. Barviva jsou zároveň vhodná pro kvantifikaci asociace malých značených molekul s proteiny prostřednictvím změny polarizace fluorescence [41].

Rozšířenou skupinou kovalentně se vážajících fluorescenčních značek jsou takové, které mají v názvu označení „kotva“ (z angl. *tag*). Jedná se o vysoce selektivní značky, které jsou specificky zaměřeny na určitou funkční skupinu a využívají se pro značení *in vivo* [42]. Příkladem fluorescenční značky připojené přímo na zkoumaný protein je tzv. SNAP-kotva (z angl. *SNAP-tag*). SNAP-kotva je polypeptid o velikosti 19,4 kDa, odvozený od lidské O⁶-alkylguanin-DNA-alkyltransferasy. SNAP-kotva je exprimována na N- nebo C-konci zkoumaného proteinu. Je ukončena cysteinem, který je reakčním místem. SNAP-kotva katalyzuje připojení derivátu guaninu, na kterém je fluorofor. Vzniká tak vazba mezi cysteinem SNAP-kotvy (připojené ke zkoumanému proteinu) a fluoroforem (Obr. 8a) [43]. Toto značení lze použít v kombinaci s tzv. CLIP-kotvou (z angl. *CLIP-tag*), která katalyzuje připojení derivátů cytosinu, na který se připojí jiný fluorofor (Obr. 8b) [44]. Tímto způsobem můžeme zkoumat např. dva různé transmembránové proteiny, které jsou zpočátku syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a poté jsou transportovány přes Golgiho komplex na cestě k plazmatické membráně [43].



Obr. 8: Mechanismus funkce SNAP-kotvy a CLIP-kotvy

a) SNAP-kotva je připojena na zkoumaný protein a reaguje s derivátem benzylguaninu. Touto reakcí, kterou katalyzuje samotná SNAP-kotva, vzniká kovalentní vazba mezi aktivním místem s cysteinem a fluoroforem. Guanin vzniká jako vedlejší produkt.

b) CLIP-kotva je připojena na zkoumaný protein a reaguje s derivátem benzylcytosinu. Touto reakcí, kterou katalyzuje samotná CLIP-kotva, vzniká kovalentní vazba mezi aktivním místem s cysteinem a fluoroforem. Cytosin vzniká jako vedlejší produkt (převzato a upraveno z [43]).

Fluorescenční sondy. Dansylchlorid (amin-reaktivní 5-(dimethylamino)naftalen-1-sufonyl(dansyl)chlorid) je fluorescenční sonda patřící do skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků [41]. Dansylchlorid reaguje kyselou hydrolyzou s volnými aminoskupinami proteinů. Tímto způsobem se odštěpí chlorid a dansylová skupina se naváže na N-koncovou aminokyselinu. Nově vzniklá vazba je odolná vůči kyselé hydrolyze a tento konstrukt je viditelný pod UV světlem [45]. Používá se ke značení proteinů při měření dynamické polaridy prostředí. Dansylchlorid a jeho deriváty mohou být excitovány při 350 nm, kde proteiny neabsorbují; jeho emisní spektrum je vysoce citlivé na polaritu rozpouštědla a emisní maxima jsou typicky blízko 520 nm. Dansylchlorid

byl spolu s dalšími fluorescenčními sondami kyselinou 1-anilinonaftalen-6-sulfonovou a kyselinou 2-(*p*-toluidinyl)naftalen-6-sulfonovou, zavedeny profesorem Weberem [41, 46].

1.3.2 Biotinylace

Biotinylace je biochemický proces, při kterém dochází ke kovalentnímu navázání biotinu na protein, nukleovou kyselinu nebo jinou molekulu. Proteiny lze označovat biotinylací chemickou či enzymovou. Chemická biotinylace využívá různé metody konjugace k nespecifické biotinylaci aminů, karboxylátů, sulfhydrylů a sacharidů. Enzymová biotinylace vede k biotinylaci specifického lysinu v sekvenci označovaného proteinu rozpoznávané bakteriální biotinligasou [47].

Biotin, jinak nazývaný vitamin H (či vitamin B7, koenzym R), je esenciální koenzym pro všechny formy života. Je syntetizovaný rostlinami, většinou bakterií a některými houbami. Biotin je koenzym všech karboxylas; tyto enzymy katalyzují přenos CO₂ v metabolických procesech pomocí biotinového kofaktoru jako mobilního karboxylového nosiče a jsou klíčovými enzymy glukoneogeneze, lipogeneze, degradace aminokyselin a energetické transdukce [48].

Biotin se váže na streptavidin nebo avidin s vysokou afinitou, rychlostí a vysokou specifitou. Tato nekovalentní vazba je také odolná vůči extrémním teplotám, pH a proteolýze, což umožňuje sledování biotinylovaných molekul v různých prostředích. Streptavidin je tetramerní protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*. Vytváří nekovalentní vazbu s velmi nízkou disociační konstantou $K_D = 10^{-14}$ [49]. Avidin je také tetramerní protein vázající biotin produkovaný ve vejcovodech ptáků, plazů a obojživelníků a uložený v bílku jejich vajec. Vazba na biotin má disociační konstantu $K_D = 10^{-15}$ [50].

1.3.2.1 Chemická biotinylace

Jednou z nejčastějších metod chemické biotinylace je biotinylace karboxylových skupin proteinu. Karboxylové skupiny se nacházejí na C-terminálních koncích proteinů a v postranních řetězcích aminokyselin glutamátu (Glu) a aspartátu (Asp). Biotinylační činidla, která cílí na karboxylové skupiny, nemají karboxyl-reaktivní skupinu jako takovou, ale místo toho využívají karbodiimidové zesilující činidlo, jako je EDC (hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)karbodiimidu). Toto činidlo konjuguje primární amin na biotinylačním činidle s karboxylovou skupinou na cílovém proteinu. Küçük a kol. využil tuto metodu pro biotinylací a izolaci povrchových proteinů živých buněk. Toto značení buněčného povrchu umožnilo zkvalitnění proteomické analýzy proteinů buněčného povrchu. Ačkoli se nejedná o běžný cíl pro modifikaci v proteomice, karboxylové skupiny na Asp, Glu a C-koncích jsou schopny účinně a selektivně reagovat s karbodiimidem za vzniku aktivních esterů, které lze derivatizovat pomocí vhodného nukleofilu. Díky poměrně hojnému výskytu zbytků Asp/Glu v proteinech, zejména v extracelulární oblasti transmembránových proteinů, je tato metoda poměrně

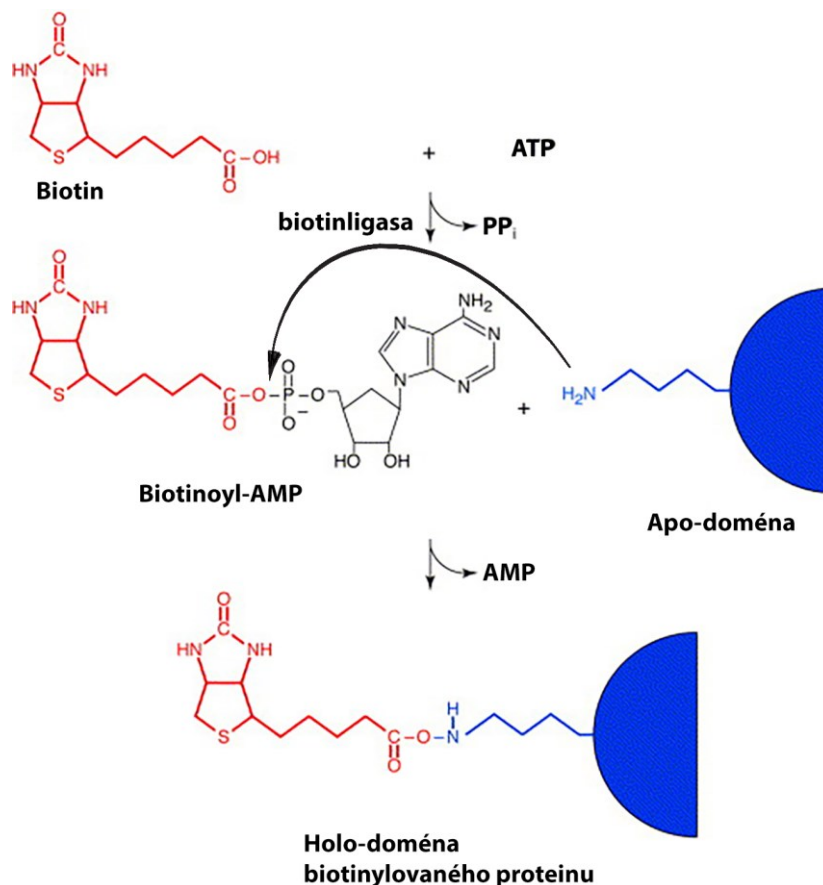
atraktivní. Odhaduje se, že 13 % extracelulárních oblastí těchto transmembránových proteinů má zbytky Asp a Glu. Při ověření izolovaných povrchových proteinů byla zjištěna nepřítomnost aktinu, což naznačuje zmenšení cytoplazmatické kontaminace a úspěšnou optimalizací protokolu pro biotinylation [51]

Další možností je biotinylation sulfhydrylových skupin, která je vhodná v případě, že je požadována nižší úroveň biotinylation. Vhodnými reaktivními skupinami jsou maleimidy, halogenacetyly a pyridyldisulfidy; disulfidové vazby musí být v proteinu nejprve redukovány, aby se uvolnily sulfhydrylové skupiny pro biotinylation. Cho a kol. využil pro biotinylation sulfhydrylových skupin 1-biotinamido-4-(40-[maleimidoethylcyklohexan]-karboxamido)butan (biotin-BMCC). V této práci zkoumali metody pro cílenou biotinylation protilátky v pantové oblasti, vhodném místě pro řízenou imobilizaci. Výsledkem cílené biotinylation imunoglobulinu a následné imobilizace protilátek prostřednictvím vazby streptavidin–biotin bylo nové imunochemické stanovení sendvičového typu s významně zvýšenou citlivostí ve srovnání s konvenční náhodnou biotinylation celé protilátky. Toto stanovení bylo využito pro kvantifikaci srdečního troponinu I, specifického markeru akutního infarktu myokardu [52].

1.3.2.2 Enzymová biotinylation

Na rozdíl od metod chemické biotinylation umožňuje enzymatická biotinylation, aby byl biotin navázán přesně na jeden zbytek přítomný v proteinu, vede tedy k biotinylation specifického lysinu v určité sekvenci bakteriální biotinligasou. Výsledný biotinylovaný produkt je generován s vysokou uniformitou.

Biotinligasa je enzym zodpovědný za připojení biotinu ke specifickému lysinu v biotin-dependentních enzymech. Jedná se o posttranslační modifikaci. Ve většině organismů je biotinylováno až pět různých enzymů (např. acetyl-CoA-karboxylasa, propionyl-CoA-karboxylasa, pyruvátkarboxylasa, β -methyl-krotonyl-CoA-karboxylasa). Připojení biotinu je dvoukroková reakce, jejímž výsledkem je vytvoření amidové vazby mezi karboxylovou skupinou biotinu a ϵ -aminoskupinou modifikovaného lysinu (Obr. 9). Když biotin naváže ATP, dojde k vytvoření biotinoyl-5'-AMP. ϵ -Aminoskupina lysinového zbytku akceptorového proteinu působí jako nukleofil, který atakuje směsnou anhydridovou vazbu biotinoyl-5'-AMP za vzniku kovalentně připojeného biotinu k proteinu a vedlejšího produktu adenosinmonofosfátu. Biotinligasy mnoha organismů interagují vysoce specifickým způsobem s biotinovými nosnými doménami různých akceptorových proteinů [53, 54].



Obr. 9: Proces biotinylace pomocí biotinligasy

Mechanismus reakce biotinligasy. V první kroku reakce biotinligasa katalyzuje připojení ATP za vzniku biotinoyl-AMP a odštěpení difosfátu. ε-Aminoskupina konzervovaného lysinového zbytku proteinového substrátu v apo-formě působí jako nukleofil, který atakuje smíšenou anhydridovou vazbu biotinoyl-AMP. V tomto kroku se vytvoří amidová vazba mezi biotinem a postranním řetězcem lysinu s adenosinmonofosfátem (AMP) jako dalším produktem. Jakmile je vytvořena amidová vazba, biotinová část zůstává připojena po celou dobu života molekuly proteinu (převzato a upraveno z [53, 54]).

BirA je jednou z nejvýznamnějších biotinligas. Jedná se o monomerní enzym o velikosti 35,5 kDa. BirA je asymetrický protein se třemi odlišnými doménami: N-terminální DNA-vazebná doména, centrální katalytická doména a C-terminální doména s neznámou funkcí. U *Escherichia coli* (*E. coli*) BirA rozpoznává a biotinyluje pouze jeden lysinový zbytek v podjednotce *biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase* (BCCP acetyl-CoA karboxylasy). [53] BirA působí jako [acetyl-CoA-karboxylasa]biotinligasa (z angl. *biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] ligase*) a biotin-operonový represor [55].

Pro biotinylací katalyzovanou BirA bylo popsáno několik peptidových sekvencí. Tyto sekvence jsou optimalizované na maximální rychlost biotinylace. Jednou z takových sekvencí je AVI-kotva (z angl. *AVI-tag*) (GLNDIFEAQKIEWHE), kterou lze připojit na N- nebo C-konec značeného proteinu [56].

Bumba a kol. ve své studii popisují vazebnou afinitu a biotinylací Gal-3. Gal-3 je uznáván jako prognostický marker rakoviny (např. žaludečních, prsních nádorů, hepatocelulárních a pankreatických karcinomů). Díky své široké účasti v klíčových procesech souvisejících s rakovinou (neoplazie, angiogeneze, tumorigeneze, adheze buněk, apoptóza) je tento galektin slibným cílem protirakovinné terapie. Gal-3 rozpoznává sacharidové motivy glykoproteinů s vysokou specificitou pro vnitřní epitopy poly-*N*-acetylglukosaminu (LacNAc). Tato studie optimalizuje potíže s imobilizací Gal-3, která je způsobená jeho spontánní oligomerizací, což způsobuje komplikace při použití Gal-3 jako analytu ve studiích pomocí povrchové plasmonové rezonance. Využívá k tomu *in vivo* biotinylace AVI-kotvy vložené na N-konci Gal-3 (konstrukt Gal-3-AVI). Provedená biotinylace AVI-kotvy je specifická a její N-koncová lokalizace poskytuje příznivou orientaci Gal-3-AVI na streptavidinem potaženém povrchu, takže C-koncová CRD Gal-3 je volně přístupná pro vazebné interakce. V této studii jsou popsány vazebné afinity imobilizovaných neo-glykoproteinů s Gal-3 a Gal-3-AVI stanovené povrchovou plasmonovou rezonancí. Zároveň je zde popsán dosud nejsilnější multivalentní ligand Gal-3 a to neo-glykoprotein na bázi BSA nesoucí LacdiNAc-LacNAc tetrasacharidy [37].

Kokotidou a kol. ve své studii navrhli konstrukty adenovirových proteinových vláken s potenciálními aplikacemi jako nosiče pro dopravu proteinů a nanočástic. Jako základní strukturální rámec použili segment adenovirového vláknitého proteinu se specifickým motivem na C-terminálním konci. Čtrnáctiaminokyselinovou biotinylační sekvenci vložili bezprostředně za N-terminální histidinovou kotvu, aby se umožnilo připojení biotinu *in vivo*. Tento biotinylovaný konstrukt se složil do teplotně a enzymově stabilních netoxických nanovláken, které byly internalizovány do buněk. Tento konstrukt se mohl vázat na proteiny a nanočástice prostřednictvím interakce biotin-streptavidin a zprostředkovat jejich transport do buněk. Biotinylace probíhala přímo při heterologní expresi konstruktů. Výhody tohoto postupu jsou jednotná modifikace proteinu bez nutnosti chemických postupů. Není potřeba separovat modifikované produkty od nezreagovaných a není nutné složitě odstraňovat biotinligasu z proteinového vzorku. Díky tomuto proteinovému konstruktu bylo možné přenést do savčích buněk zlaté nanočástice konjugované se streptavidinem s připojeným fluoroforem. [57].

2. CÍLE PRÁCE

- příprava konstruktů jednoho galektinů nesoucího peptidovou kotvu pro selektivní biotinylation proteinů *in vivo*, jeho expresi a charakterizaci
- exprese galektinů v *E. coli* a biotinylation současně produkovanou biotinligasou
- ověření navázání biotinu pomocí metody *Western blot*
- ověření lektinové aktivity připraveného galektinového konstruktů pomocí metody ELISA

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a materiál

3.1.1 Seznam použitých chemikálií

- 6 × *DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 10 × *T4 DNA Ligase Buffer* – pufr pro ligaci DNA (Thermo Scientific, USA)
- 10 × *DreamTaq Buffer* – pufr na PCR (Thermo Scientific, USA)
- akrylamid (VWR Chemicals, Česká republika)
- amoniak, 25% vodný roztok (Lach-Ner, Česká republika)
- ampicilin (Serva Electrophoresis GmbH, Německo)
- asialofetuin (Sigma Aldrich, USA)
- Bradfordovo činidlo – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
- bromfenolová modř (Serva, Německo)
- *Coomassie Brilliant Blue* (USB Corporation, USA)
- D-biotin (Sigma-Aldrich, USA)
- destilovaná a ultračistá voda (filtrační zařízení WATREX)
- dideoxynukleotidy (Thermo Scientific, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- dihydrogenfosforečnan sodný mohohydrát (Carl Roth, Německo)
- dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- DNA primery (Generi Biotech, Česká republika)
- dodecylsulfát sodný; SDS (Serva, Německo)
- *DreamTaq* DNA polymerasa (Thermo Scientific, USA)
- *E. coli* BL21 λDE3 (birA) (BPS Bioscience, USA)
- *E. coli* Rosseta 2 (DE3) pLysS (Novagen, USA)
- *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ethanol (VWR Chemicals, Česká republika)
- fenylmethylsulfonylfluorid; PMSF (Roche, Švýcarsko)
- GelRed (Biotium, USA)
- glycerol dvakrát destilovaný 99,5% (VWR Chemicals, Česká republika)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, Česká republika)
- hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid; IPTG (Sigma Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová; EDTA (Carl Roth, Německo)

- kyselina octová (VWR Chemicals, Česká republika)
- kyselina sírová (VWR Chemicals, Česká republika)
- Ni-NTA Agarosa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- nízkomolekulární proteinové pravítko – *Amersham LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Velká Británie)
- odtučněné mléko (Nutristar, Česká republika)
- plasmid pET-Duet-1-Gal-8-AVI s ampicilinovou rezistencí nesoucí konstrukt genu lidského galektinu-8 (k dispozici na školicím pracovišti)
- polyklonální protilátka proti biotinu konjugovaná s křenovou peroxidasou (Thermo Fisher Scientific, USA)
- *rCut buffer* (New England Biolabs, USA)
- restriční endonukleasy – *NotI*; *AscI* (New England Biolabs, USA)
- substrát *TMB One*; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (Kem-En-Tec, Dánsko)
- TEMED, tetramethylenethyldiamin (Sigma-Aldrich, USA)
- tris-Cl (Sigma-Aldrich, USA)
- trypton (Oxoid, Česká republika)
- Tween® 20 (ITW Reagents, Španělsko)
- uhličitan sodný (Lachema, Česká republika)
- hmotnostní pravítko – *Invitrogen Mass DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.1.2 Seznam roztoků a médií

- 1% agarosový gel (100 mL) – 1 g agarosa; 2 mL 50 × TAE pufr; 98 mL H₂O
- 12% SDS gel
 - separační gel - 1,6 mL H₂O; 2,0 mL 30% akrylamidu; 1,3 mL 1,5M Tris-Cl pH 8,8; 0,05 mL 10% SDS; 0,05 mL 10% (NH₄)₂S₂O₅; 0,002 mL TEMED
 - zaostřovací gel - 3,4 mL H₂O; 0,83 mL 30% akrylamid mix; 0,63 mL 1,0M Tris-Cl pH 6,8; 0,05 mL 10% SDS; 0,05 mL 10% (NH₄)₂S₂O₅; 0,005 mL TEMED
- 3M HCl - 66 mL HCl; 186 mL ultračisté vody
- 5 × elektrodový pufr (1 L) - 5 g SDS; 15 g Tris; 94 g glycinu
- 5 × vzorkový pufr (5 mL) - 0,151 g Tris; 0,3855 g DTT; 0,5 g SDS; 0,025 g bromfenolové modři; 1,25 mL glycerolu
- 50 × TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr (1 L) – 242 g Tris; 57,1 mL kyseliny octové; 14,6 EDTA
- barvicí roztok (100 mL) – 0,25 g *Coomasie Brilliant Blue R250*; 45 mL methanolu; 45 mL H₂O; 10 mL 99% kyseliny octové

- blokovací pufr s 2% obsahem BSA v PBS pufru (Sigma-Aldrich, USA)
- Bradfordovo činidlo – 0,01% *Coomassie Brilliant Blue G-250*; 4,7% ethanol; 8,5% kyselina fosforečná v destilované vodě
- ekvilibrační pufr – 20mM Na₂HPO₄; 500mM NaCl; 25mM imidazol pH 7,4
- elektrodový pufr – 25mM Tris; 150mM glycin; 10% SDS
- eluční pufr – 20mM Na₂HPO₄; 500mM NaCl; 500mM imidazol pH 7,4
- LB (Luria-Bertani) médium (1 L) – 10 g tryptonu; 5 g kvasničného extraktu; 10 g NaCl
- LBA médium (100 mL) – 1 g tryptonu; 0,5 g kvasničného extraktu; 1 g NaCl; 2 g agarosy
- MDO médium (1 L) – 1 g KH₂PO₄; 3 g K₂HPO₄; 2 g NH₄Cl; 2,5 g Na₂SO₄; 20 g kvasničného extraktu; 20 g glycerolu
- odbarvovací roztok (1 L) – 350 mL ethanolu; 100 mL kyseliny octové; 550 mL H₂O
- PBS (pH 7,5) - 8,76 g 0,15M NaCl; 6,9 g 0,05M NaH₂PO₄.H₂O v 1000 mL ultračisté vody
- promývací roztok PBST – 0,05% Tweenu[®] 20 v PBS
- TB médium (angl. *Terrific Broth*, 1000 mL) – 24 g kvasničného extraktu; 20 g tryptonu; 4 mL glycerolu; 17 mM KH₂PO₄; 72 mM K₂HPO₄

3.1.3 Seznam komerčních setů

- *DNA Gel Extraction Kit* (Norgen Biotek Corp., Kanada)
- *Gene Jet PCR Purification Kit* (Thermo Scientific, USA)
- *Genopure Plasmid Midi Kit* (Roche, Švýcarsko)
- *High Pure Plasmid Isolation Mini Kit* (Roche, Švýcarsko)

3.1.4 Seznam použitých přístrojů

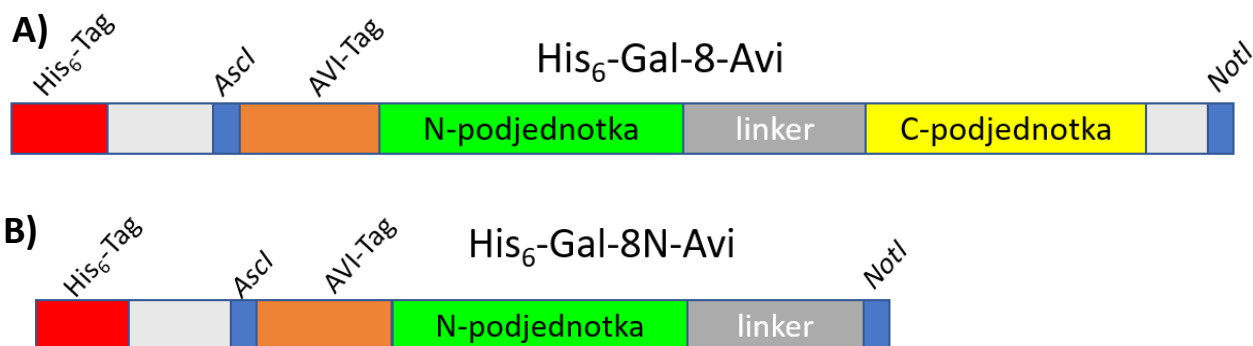
- aparatura na agarosovou elektroforézu (Bio-Rad, USA)
- aparatura na SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)
- aparatura na *Western blot* (Bio-Rad, USA)
- centrifugy: *Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin* (Eppendorf, USA); *Eppendorf Centrifuge 5804 R* (Eppendorf, USA); *Sorvall RC 6 Plus Centrifuge* (Thermo Scientific, USA); *Universal 320 R* (Hettich, Německo)
- destičky na ELISA – *F16 Maxisorp NUNC-ImmunoModules* (Fisher ThermoScientific, Dánsko)
- G: box Chemi XRQ (Trigon plus, Česká republika)
- Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)
- Magnetická míchačka AREX (VELP Scientifica, Itálie)

- PCR termocykler: Termocykler TPersonal 20 (Biometra, Německo)
- pH metr pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, ČR)
- purifikační kolona HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie)
- sonikátor UP50 H Ultra Sonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie)
- spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)
- spektrofotometr: Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko)
- stříkačkové filtry Millipore Millex GP 0,22 μm a 0,8 μm (Merck, Německo)
- termoblok Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, USA)
- třepačka IKA KS 4000 ic control (Schöller, Česká republika)
- vakuová filtrace (Milford, MA 01757, USA)
- váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)
- purifikační kolona HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie)
- sonikátor UP50 H Ultra Sonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie)
- spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)
- spektrofotometr: Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko)
- stříkačkové filtry Millipore Millex GP 0,22 μm a 0,8 μm (Merck, Německo)
- termoblok Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, USA)
- třepačka IKA KS 4000 ic control (Schöller, Česká republika)
- vakuová filtrace (Milford, MA 01757, USA)
- váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

3.2 Příprava genových konstruktů galektinů

3.2.1 Příprava genového konstruktů

Genový konstrukt Gal-8N-AVI byl připraven z již existujícího konstruktů Gal-8-AVI ve vektoru pETDuet-1 (klonovací místa: *AscI*, *NotI*) pomocí namnožení genu podjednotky Gal-8N-AVI metodou polymerázové řetězcové reakce (PCR, z angl. *polymerase chain reaction*) s následnou restrikcí a ligací genového produktu do vektoru. Touto metodou jsme vytvořili genový konstrukt N-terminální podjednotky tandemového galektinu Gal-8 nesoucího AVI-kotvu (GLNDIFEAQKIEWHEGGSGGS, 21 aminokyselin, $M_w = 2,2$ kDa). Pro zachování lektinové aktivity je nutné, aby i samotná podjednotka obsahovala peptidový můstek, který spojuje N- a C-koncovou podjednotku. Proto byla příprava konstruktů Gal-8N-AVI provedena tak, aby též obsahoval peptidový můstek (Obr. 10).



Obr. 10. Konstrukty galektinu-8 a jeho N-podjednotky nesoucí AVI-kotvu (AVI-tag).

A) Konstrukt Gal-8-AVI.

B) Konstrukt Gal-8N-AVI. Podjednotka Gal-8N-AVI obsahuje též spojovací peptidový můstek.

(Vytvořeno v programu PowerPoint)

Prvním krokem bylo namnožení genu kódujícího N-terminální podjednotku Gal-8N pomocí PCR. Byly navrženy primery, forward nasedající na sekvenci restriční místa *Ascl* a reverse nasedající na sekvenci peptidového můstku, který následuje za sekvencí kódující podjednotku Gal-8N).

Použité primery:

- Fw: 5'– AAAACGCGCCCGGGTCTGAACG – 3'
- Re: 5'– AAAAGCGGCCGCTGGCAGCCTAAGC – 3'

Do tenkostěnných mikrozkušavek o objemu 0,05 mL bylo pipetováno 5 µL reakčního pufru (DreamTaq 10 × buffer); 1 µL templátu plasmidu pET-Duet-1-Gal-8-AVI (1 ng, ředění 1:2500); 0,5 µL 1 µM Fw primeru; 0,5 µL 1µM Re primeru; 1 µL 0,2mM směsi deoxynukleotidů (dNTP); a 41,75 µL sterilní vody. Nakonec bylo přidáno 0,25 µL 5 U/µL *DreamTaq* DNA polymerasy. Reakční směs byla následně vložena do PCR cykleru, ten byl nastaven následovně: iniciační denaturace s teplotou 95 °C (600 s); 30 cyklů – denaturace s teplotou 95 °C (30 s), nasednutí primerů (z angl. *annealing*) s teplotou 59 °C (30 s), elongace s teplotou 68 °C (330 s) a finální elongace s teplotou 72 °C (600 s).

Následně byla provedena agarosová elektroforéza a izolace DNA z gelu. Byl připraven vzorek obsahující 45 µL produktu PCR; 5 µL 6 × *DNA Loading Dye* a 1 µL 20 × *GelRed* pro zviditelnění DNA. Na gel byl takto připravený vzorek rozdělen a nanesen do dvou drah. Jako referenční vzorek bylo použito 0,5 µL plasmidu pET-Duet-1-Gal-8-AVI s 4,5 µL vody; 1 µL 6 × *DNA Loading Dye*; 1 µL 20 × *GelRed*; hmotnostní pravítko (*Invitrogen Mass DNA ladder*) o objemu 4 µL s 1 µL 20 × *GelRed*. Vzorky byly separovány v 1% agarosovém gelu v pufru 1 × TAE, napětí zdroje bylo 60 V, po dobu 2 hodin. PCR reakce byla z důvodu většího objemu rozdělena na gelu do dvou drah. Proužky gelu v obou drahách odpovídaly velikosti přibližně 633 bp

(velikost genu Gal-8N-AVI s peptidovým můstkem). Takto byla potvrzena úspěšnost PCR, protože požadovaný produkt (genový konstrukt) migroval rychleji než templát (celý plasmid).

Oba proužky gelu obsahující požadovaný produkt, gen Gal-8N-AVI, byly izolovány pomocí komerčního setu *Gel Extraction kit* vyříznutím z gelu pomocí skalpelu. Bylo odstraněno co nejvíce přebytečné agarosy, přičemž bylo nutno minimalizovat vystavení DNA záření UV. Do sterilní a předem zvážené mikroskopické zkumavky byla vložena extrahovaná DNA. K jednomu dílu extrahované DNA byly přidány tři díly vazebného pufru G (první proužek obsahující gen Gal-8-N-AVI s hmotností 344,6 mg a 1033,6 μL vazebného pufru G; druhý proužek obsahující gen Gal-8N-AVI s hmotností 378,0 mg a 1134,6 μL vazebného pufru G). Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut při teplotě 55 °C a pravidelném promíchávání. Po úplném rozpuštění agarů byl přidán 1 díl isopropanolu (první proužek 344,5 μL ; druhý proužek 378 μL) a vzorky byly promíchány. V dalším kroku byla sestavena kolona, na kterou bylo nanášeno 750 μL připraveného vzorku. Po nanášení vzorku byla kolona centrifugována 1 minutu při 5700 \times g postup byl opakován, dokud nebyl zpracován celý objem vzorku. Poté byla kolona promyta 500 μL promývacího roztoku A a opět byla centrifugována 1 minutu při 19 000 \times g. Aby došlo důkladnému vysušení, byla kolona centrifugována 2 minuty při 19 000 \times g. Pod kolonu byla vložena mikroskopická zkumavka a na kolonu bylo nanášeno 30 μL elučního pufru B. Kolona byla ponechána stát po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Poté byla kolona centrifugována 1 minuty při 19 000 \times g. Touto elucí byl získán izolovaný PCR produkt.

Následně byla provedena restrikce izolovaného PCR produktu pomocí restrikčních endonukleas *NotI* a *AscI*. Byl připraven vzorek o objemu 20 μL obsahující 5 μL izolovaného PCR produktu; 2,5 μL pufru *rCut buffer*; 11,5 μL sterilní vody; 0,5 μL endonukleasy *NotI* (10 U); 0,5 μL endonukleasy *AscI* (10 U). Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Poté byly endonukleasy inaktivovány při teplotě 65 °C po dobu 15 minut.

V dalším kroku byla provedena purifikace produktu restrikce, pomocí komerčního setu *Gene Jet PCR Purification Kit* Thermo. Byly připraveny 2 vzorky obsahující produkt restrikce, gen Gal-8N-AVI, které byly naředěny *Binding* puftrem (ředění 1:1). Po promíchání proběhla změna barvy vzorku na žlutou (indikace optimálního pH pro vazbu DNA). Byla sestavena kolona, na kterou bylo nanášeno 800 μL vzorku, a byla centrifugována po dobu 1 minuty při 5500 \times g. Tento postup byl opakován, dokud nebyl zpracován celý objem vzorku. Na kolonu bylo poté nanášeno 700 μL promývacího pufru a byla centrifugována po dobu 1 minuty při 5500 \times g. Pro odstranění zbytkového pufru byla kolona centrifugována po dobu 1 minuty při 5500 \times g. Pod kolonu byla vložena sterilní mikroskopická zkumavka a na kolonu bylo nanášeno 50 μL elučního pufru. Kolona byla centrifugována po dobu 1 minuty při 5500 \times g.

Posledním krokem před transformací byla ligace, tj. zapojení DNA genového konstruktů připraveného pomocí PCR do plasmidu pET-Duet-1. Byl připraven vzorek o objemu 20 μL obsahující 5 μL izolovaného plasmidu pETDuet-1 naštěpeného v místech *AscI*, *NotI* (k dispozici na školicím pracovišti); 7 μL připraveného PCR produktu – genového konstruktů Gal-8N-AVI; 4 μL 5 \times ligačního pufru (*Rapid Ligation Buffer*); 3 μL sterilní vody a 1 μL T4 DNA-ligasy. Tento vzorek byl jemně promíchán a inkubován při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Následně byl inkubován přes noc při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$. Druhý den byla ligační směs použita k transformaci kompetentních buněk *E. coli* Top10 (viz kapitola 3.2.2).

3.2.2 Izolace genu v analytickém množství

Kompetentní buňky *E. coli* Top10 (100 μL suspenze) byly transformovány 15 μL plasmidu pET-Duet-1-Gal-8N-AVI. Plasmid byl vnesen do buněk tepelným šokem za teploty 42 $^{\circ}\text{C}$. Po hodinové regeneraci při 37 $^{\circ}\text{C}$ byly buňky zakoncentrovány centrifugací (10 minut; 10 $^{\circ}\text{C}$, 20 450 \times g) a naneseny na misku s LBA a ampicilinem (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Misky byly při 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubovány do druhého dne.

Druhý den bylo připraveno osm 50 mL centrifugačních zkumavek s 3 mL LB média s ampicilinem (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (celkově bylo připraveno 24 mL LB média). Takto připravená média byla naočkována jednou izolovanou kolonií (párátkem, do každé zkumavky jedna kolonie). Kultivace proběhla do druhého dne při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ a 250 ot./min. Na druhý den byly kultury zpracovány komerčním setem *High Pure Plasmid Isolation Mini Kit*.

Prvním krokem byla centrifugace osmi kultur po dobu 10 minut při 2400 \times g a při teplotě 12 $^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a k peletu bylo přidáno 250 μL pufru *Suspension Buffer*, v kterém byly buňky resuspendovány. Jednotlivé suspenze byly převedeny do sterilních mikrozkušavek. K suspenzím bylo přidáno 250 μL lyzačního pufru (*Lysis Buffer*) a byly inkubovány za laboratorní teploty po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 350 μL vychlazeného pufru *Binding Buffer* pro navázání DNA na kolonu a inkubováno 5 minut na ledu. Směs byla poté centrifugována po dobu 10 minut za teploty 12 $^{\circ}\text{C}$ a 17 700 \times g. Byly připraveny kolony do mikrozkušavek. Na tyto kolony byl nanesen supernatant, který byl centrifugován 1 minutu při 9700 \times g a laboratorní teplotě. Obsah mikrozkušavky byl odstraněn a na kolonu bylo naneseno 500 μL promývacího pufru I (*Wash Buffer I*) a kolona byla opět centrifugována za stejných podmínek. Obsah mikrozkušavky byl odstraněn, na kolonu bylo naneseno 700 μL promývacího pufru II (*Wash Buffer II*) a kolona byla opět centrifugována za stejných podmínek. Obsah mikrozkušavky jsme odstranili a centrifugovali prázdnou kolonu po dobu 2 minut a 17 700 \times g za laboratorní teploty. Pod kolonu jsme umístili sterilní mikrozkušavku, nanesli 30 μL sterilní vody a centrifugovali 1 minutu při 5500 \times g za laboratorní teploty. Obsah mikrozkušavky jsme nanesli

na kolonu a centrifugovali naposled za stejných podmínek. Každá z osmi mikrozkušavek na konci experimentu měla obsahovat přečištěný plasmid pET-Duet-1-Gal-8N-AVI, který byl uskladněn při teplotě 4 °C před dalším zpracováním.

Byla ověřena čistota izolovaného plasmidu pomocí elektrofororézy na agarosovém gelu (1% agarosový gel, 1 × TAE pufr). Jako referenční vzorek byl použit původní plasmid pET-Duet-1-Gal-8N-AVI před jeho izolací v analytickém množství. Vzorky byly připraveny smícháním 5 µL plasmidu s 1 µL 6 × DNA Loading Dye a 1 µL 20 × GelRed. Sekvence genového konstrukt Gal-8N-AVI v plasmidu pET-Duet-1-Gal-8N-AVI byla ověřena sekvenací Sangerovou metodou (firma SEQme s.r.o.). Sekvence byla vyhodnocena v programu Nucleotide BLAST a bylo zjištěno, které vzorky plasmidů obsahují požadovaný gen.

3.2.3 Izolace genu v preparativním množství

Po vyhodnocení výsledků sekvenace (kapitola 3.2.2), byl zvolen vhodný vzorek plasmidu pET-Duet-1-Gal-8N-AVI na další zpracování. Zvoleným plasmidem (8 µL) byly transformovány buňky *E. coli* Top10 (100 µL) tepelným šokem za teploty 42 °C. Po hodinové regeneraci při 37 °C byly buňky zakoncentrovány (10 minut; 10 °C; 20 450 × g) centrifugací a naneseny na misku s LBA a ampicilinem (100 µg/mL). Misky byly při 37 °C inkubovány do druhého dne.

Druhý den byla připravena Erlenmayerova baňka (500 mL) se 100 mL LB média s ampicilinem (100 µg/mL). Médium bylo zaočkováno jednou izolovanou kolonií (párátkem). Kultivace proběhla do druhého dne při teplotě 37 °C a 250 ot./min. Na druhý den byly kultury zpracovány komerčním setem *Genopure Plasmid Midi Kit*.

Kultura byla centrifugována 20 minut při 2400 × g a 8 °C. Pelet byl poté resuspendován v 8 mL pufru *Suspension Buffer*. Bylo přidáno 8 mL lyzačního pufru (*Lysis Buffer*) a po promíchání byl ponechán 2 minuty inkubovat na ledu. Po inkubaci bylo přidáno 8 mL neutralizačního pufru (*Neutralisation Buffer*) a suspenze byla ponechána inkubovat 5 minut na ledu. Během inkubace se v suspenzi vytvořily bílé vločky. Byla sestavena filtrační aparatura s kolonkou. Kolonka byla promyta 2,5 mL pufrům *Equilibration Buffer* a nad ní byla umístěna nálevka se skládaným filtrem. Do filtru byl převeden lyzát a po jeho zfiltrování byly buněčné zbytky na filtru promyty 2 × 4 ml promývacího pufru (*Wash Buffer*). Eluát byl ponechán vykat a byl odstraněn. Následně byl nanesen eluční pufr (*Elution Buffer*), který byl předehřátý na 50 °C. Byla provedena eluce a plasmid byl jímán do sterilní centrifugační zkumavky. Bylo k němu přidáno 3,6 mL propan-2-olu a směs byla ponechána inkubovat přes noc při 4 °C.

Druhý den byla postupně centrifugována vysrážená DNA do sterilní mikrozkušavky po 1 mL po dobu 30 minut, při 4 °C a při 21 900 × g. Po každé centrifugaci byl supernatant odpipetován a byl přidán další 1 mL roztoku. Po centrifugaci celého objemu roztoku byl vzniklý

pelet promyt 70% ethanolem. Ethanol byl odstraněn centrifugací po dobu 10 minut při teplotě 4 °C a 21 900 × g. Ethanol byl odpipetován a pelet v mikrozkuhavce byl ponechán sušit volně na vzduchu přes noc. K vysušené peletě bylo přidáno 100 µL sterilní vody a DNA byla ponechána se rozpustit.

Z takto připraveného roztoku byla stanovena koncentrace a čistota izolované DNA (plasmid pET-Duet-1-Gal-8N-AVI). Byla změřena absorbance za použití deuteriové lampy při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Koncentrace a čistota izolovaného plasmidu byly vypočteny podle vztahů:

$$\text{koncentrace DNA} = A_{260} \times \text{ředění} \times k \text{ (kde } k = 50, \text{ ředění} = 250)$$

$$\text{čistota DNA} = \frac{A_{260}}{A_{280}}.$$

Vzorek byl sekvenován Sangerovou metodou (firma SEQme s.r.o.), čímž byla potvrzena správná sekvence připraveného konstruktů pET-Duet-1-Gal-8N-AVI.

3.3 Rekombinantní exprese a purifikace galektinů

3.3.1 Transformace *E. coli* Rosseta 2 (DE3) pLysS a *E. coli* BL 21 λDE3 (*birA*) plasmidem

Na přípravu galektinů nesoucích pouze N-terminální histidinovou kotvu (Gal-8, Gal-8N) byly použity buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3) a na přípravu galektinů nesoucích navíc AVI-kotvu (Gal-8-AVI, Gal-8N-AVI) byly použity buňky *E. coli* BL 21 λDE3 (*birA*) pro selektivní biotinylní *in vivo*.

Nejprve byly připraveny misky s médiem. Bylo zahřáto 100 mL sterilního LBA média, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agaru. Dále byla v laminárním boxu do média přidána směs antibiotik: 67 µL ampicilinu (100 µg/mL) a 100 µL chloramfenikolu (34 µg/mL). Tato směs byla nalita do Petriho misek ve vrstvě přibližně 1 cm a ponechána zatuhnout.

Mezitím byla na ledu rozmrazena suspenze kompetentních buněk *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (100 µL) s rezistencí na chloramfenikol a také roztok plasmidu pETDuet-1-Gal-8 nebo pETDuet-1-Gal-8N s rezistencí na ampicilin. Po rozmrznutí bylo sterilně přidáno 1,5 µL plasmidu (1 µg) k buňkám, směs byla lehce promíchána a ponechána 20 minut na ledu. Byl proveden teplotní šok, kdy byla mikrozkuhavka vložena do termobloku vyhřátého na 42 °C na dobu 30 sekund. Po 2 minutách na ledu byl sterilně přidán 1 mL LB média. Mikrozkuhavka byla uložena do termobloku na hodinovou regeneraci při 37 °C a 300 ot./min. Po regeneraci byla mikrozkuhavka centrifugována na 10 minut při 17 700 × g. Bylo sterilně odebráno 800 µL supernatantu a pelet byl resuspendován ve zbylém objemu. 100 µL buněčné suspenze bylo nanášeno na Petriho misku s ampicilinem (100 µg/mL) a chloramfenikolem (34 µg/mL) a rozetřeno sterilní hokejkou. Miska byla inkubována při 37 °C v termostatu do druhého dne.

Pro přípravu galektinů nesoucích N-terminální histidinovou kotvu a zároveň AVI-kotvu byla na ledu rozmrazena suspenze kompetentních buněk *E. coli* BL 21 λ DE3 (*birA*) (100 μ L) s rezistencí na chloramfenikol a také roztok plasmidu pETDuet-1-Gal-8-AVI nebo pETDuet-1-Gal-8N-AVI s rezistencí na ampicilin. Po rozmrznutí buněk byl přidán sterilně 1 μ L plasmidu (1 μ g) do mikrozkušavky s alikvotem 100 μ L buněk. Po 20 minutách inkubace na ledu byla mikrozkušavka vložena na 5 minut do termobloku vyhřátého na 37 °C. Po dalších 2 minutách na ledu byl přidán 1 mL LB média a proběhla regenerace v termobloku při 37 °C a 300 ot./min. Mikrozkušavka byla po regeneraci na 3 sekundy centrifugována 5500 \times g. Byl z ní sterilně odebrán supernatant 800 μ L a pelet byl resuspendován ve zbylém objemu. 100 μ L suspenze bylo nanášeno na Petriho misku s ampicilinem (150 μ g/ml) a chloramfenikolem (10 μ g/mL) rozetřeno sterilní hokejkou. Miska byla inkubována při 37 °C v termostatu do druhého dne.

3.3.2 Kultivace bakterií

Druhý den byl růst kolonií na miskách zastaven jejich přenesením do lednice. Kultivace probíhala různě u buněk *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS transformovaných plasmidem pETDuet-1-Gal-8 nebo pETDuet-1-Gal-8N a buněk *E. coli* BL 21 λ DE3 (*birA*) transformovaných plasmidy pETDuet-1-Gal-8-AVI nebo pETDuet-1-Gal-8N-AVI.

Buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS transformované plasmidem nesoucí geny Gal-8 nebo Gal-8N byly očkované do LB média (postup identický pro oba plasmidy). Byla připravena Erlenmayerova baňka (500 mL) s 60 mL sterilního LB média (tzv. prekultura) se směsí antibiotik: 40 μ L ampicilinu (100 μ g/mL) a 60 μ L chloramfenikolu (35 μ g/mL). Médium v baňce bylo naočkováno sterilně v laminárním boxu jednou kolonií z misky (párátkem) a ponecháno inkubovat přes noc při 37 °C a 220 ot./min (tak, aby roztok při míchání nepěnil). Následující den (po 16 - 18 hodinách) byl obsah prekultury přelit do Erlenmayerovy baňky (3 L) s 600 mL sterilního TB média (tzv. hlavní kultura) se směsí antibiotik: 400 μ L ampicilinu (100 μ g/mL) a 600 μ L chloramfenikolu (35 μ g/mL). Hlavní kultura byla dále inkubována při 37 °C a 150 ot./min, než absorbance bakterií při 600 nm dosáhla hodnot v rozmezí 0,6 až 0,8. Poté bylo do baňky přidáno 600 μ L 1mM roztoku IPTG na indukci proteinové exprese a kultura byla inkubována při 25 °C a 150 ot./min do druhého dne (po dobu 22 – 24 hodin). Bakterie byly poté centrifugovány 20 min při 5000 \times g a 4 °C. Pelet byl převeden do 50 mL centrifugační zkumavky a následně zmražen při -20 °C.

Buňky *E. coli* BL 21 λ DE3 (*birA*) transformované plasmidy nesoucími geny Gal-8-AVI nebo Gal-8N-AVI byly očkované do MDO média (postup identický pro oba plasmidy). Bylo připraveno sterilní MDO médium do Erlenmayerovy baňky (250 mL) o objemu 50 mL se směsí antibiotik: 50 μ L ampicilinu (150 μ g/mL) a 14,3 μ L chloramfenikolu (10 μ g/mL). Prekultury byly ponechány inkubovat přes noc. Následující den bylo vždy 12 mL prekultury naočkováno do dvou

Erlemayerových baněk (3 L) s 300 mL sterilního MDO média se směsí antibiotik: 300 μ L ampicilinu (150 μ g/mL) a 77,6 μ L chloramfenikolu (9 μ g/mL). Hlavní kultura byla dále inkubována při 37 °C a 130 ot./min, než absorbance bakterií při 600 nm dosáhla hodnot 0,6. Poté bylo přidáno do jedné z Erlemayerových baněk (3 L) obsahující hlavní kulturu 18,7 mL 50 μ M vodného roztoku D-biotinu, pro selektivní biotinylací *in vivo*. Po 5 minutách byly obě Erlemayerovy baňky (3 L) obsahující hlavní kulturu indukovány 600 μ L 1mM roztoku IPTG. Hlavní kultura byla kultivována 4 hodiny při teplotě 37 °C. Bakterie byly poté centrifugovány 20 min při 5000 \times g a 4 °C. Pelet byl převeden do 50 mL centrifugační zkumavky a následně zmražen při -20 °C.

3.3.3 Purifikace galektinů produkovaných postupy popsány v kapitole 3.3.2 probíhala následovně.

Purifikace galektinů produkovaných postupy popsány v kapitole 3.3.2 probíhala následovně. Ke zmraženému peletu buněk bylo přidáno 500 μ L PMSF (inhibitor proteas) a 25 mL ekvilibračního pufru pro afinitní chromatografii. Množství přidaného ekvilibračního pufru záviselo na množství peletu, cca v rozmezí 10-40 mL. Pelet byl ponechán pomalu rozmraznout, pak byl resuspendován a sonikován (6 \times 1 minuta) s dvouminutovými pauzami s 52% amplitudou. Po sonikaci byla buněčná suspenze rozdělena po 1,5 mL do mikrozkuvek a centrifugována při 21 900 \times g po dobu 20 minut a teplotě 4 °C. Supernatant z mikrozkuvek byl přenesen do 50mL zkumavky a byl doplněn ekvilibračním pufrem na objem 50 mL. Tento roztok surového proteinu (tzv. *load*) byl zfiltrován přes 0,8 μ m filtr.

Do plastové kolony bylo nalito 5 mL vodné suspenze komerčního nosiče s imobilizovanými nikelnatými ionty (Ni-NTA). Takto připravená kolona byla promyta 150 mL destilované vody a následně stejným množstvím ekvilibračního pufru. Do promyté kolony byl nanesen roztok surového proteinu a poté byla kolona opětovně promyta 150 mL ekvilibračního pufru s 20mM imidazolem za účelem vymytí nespecificky navázaných proteinů.

Na kolonu byl nanesen eluční puf (50 mL) s obsahem 250mM imidazolu pro uvolnění navázaného proteinu. Poté byly jímány frakce (1,5 mL) do sterilních mikrozkuvek. Po eluci byla kolona promyta 50 mL vody a 50 mL 20% ethanolu pro skladování. V každé frakci byla stanovena koncentrace proteinů dle Bradforda. Frakce obsahující vysokou koncentraci proteinu byly spojeny a dialyzovány 18 hodin v 7 L EPBS pufru přes noc a následně 4 hodiny v 7 L PBS pufru. Po dialýze byl protein přefiltrován přes 0,22 μ m filtr a opětovně mu byla změřena koncentrace dle Bradforda. Byl dále skladován při 4 °C s dobrou stabilitou po dobu 4-6 týdnů.

3.3.4 Ověření čistoty a stanovení koncentrace

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

aparatury Bio-Rad byla nanese na 15% separační gel přibližně do výše 2 cm od horního okraje, do zbylé části byl nanesen 1 mL *n*-butanolu, aby nedošlo k vyschnutí gelu. Po zatuhnutí při teplotě 50 °C byl butanol odstraněn a na gel byl nanesen gel zaostřovací až po okraj aparatury. Do zaostřovacího gelu byl vsunut hřebínek a gel byl ponechán při laboratorní teplotě ztuhnout.

Byly připraveny vzorky obsahující 20-30 µg proteinu a 5 × koncentrovaný vzorkový pufr obsahující denaturační činidla SDS a DTT. SDS je přidáno za účelem denaturace proteinu a aby udělilo proteinu negativní náboj. DTT i SDS je přidáno za účelem redukce disulfidických můstků. Vzorky byly denaturovány v termobloku při teplotě 99 °C po dobu 5 minut, následně byly centrifugovány při 5500 × g, po dobu 30 sekund a teplotě 25 °C. Na gel bylo nanese nízkomolekulární hmotnostní pravitko (LMW, z angl. *low molecular weight*) a vzorky do ostatních drah vytvořených hřebínkem v SDS gelu. Gel byl ponořen do elektrodového pufru uvnitř elektroforetické vany. Elektroforéza byla zahájena bezpečným uzavřením vany a jejím připojením ke zdroji proudu s napětím nastaveným na hodnotu 130 V na dobu 1 – 1,5 hodiny. Po ukončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut z aparatury. Na obarvení byl použit barvicí roztok obsahujícím *Coomassie Brilliant Blue*. Odbarvení proběhlo odbarvovacím roztokem po dobu přibližně 2 hodin (do odstranění pozadí). Gel byl následně vložen do obalu a skenován.

Na stanovení koncentrace proteinu byla využita metoda podle Bradforda. Tato metoda je založena na interakci proteinů s barvivem *Coomassie BrilliantBlue* G-250 v kyselém prostředí, konkrétně s bazickými aminokyselinami v řetězci (histidin, lysin, arginin), Navázání barviva na protein způsobí změnu zbarvení z hnědé na modrou; množství navázaného barviva je tedy zhruba přímo úměrné množství pozitivních nábojů v proteinu. Na kvantifikaci se pak využívá spektrofotometrické stanovení při 595 nm a porovnání získané absorbance s kalibrační přímkou vytvořenou pro proteinový standard. V této práci byla využita kalibrace na hovězí γ -globulin dle vztahu: $ABS_{595} = 2,544 \times c_{\text{protein}}$.

Pro samotné měření byly připraveny vzorky o objemu 100 µL s vhodným ředěním proteinu s přidavkem 1 mL Bradfordova činidla. Tato směs se promíchala a ponechala inkubovat ve tmě za laboratorní teploty po dobu 15 minut. Měření absorbance proběhlo proti slepému vzorku (100 µL vody, 1 mL Bradfordova činidla) při 595 nm.

3.3.5 Ověření biotinylace galektinů metodou Western blot

Pro kvalitativní selektivní detekci biotinylovaného galektinu ve vzorku byla použita metoda *Western blot*. V prvním kroku byla provedena SDS-PAGE, kdy byly na gel nanese vzorky dvakrát. Narozdíl od klasické SDS-PAGE je vhodnější použít barevný LMW, sloužící jako kontrola při blotování proteinů. Na gel je vhodné kromě studovaných galektinů nanést i galektin, u kterého byla biotinylace prokázána, aby mohl být použit jako pozitivní kontrola při chemiluminiscenční

detekci. Gel byl po ukončení SDS-PAGE rozdělen na dvě poloviny. První polovina byla zpracována postupem určeným pro SDS-PAGE a byla použita k ověření velikosti a čistoty galektinů (viz kapitola 3.3.4). Druhá polovina gelu byla použita pro ověření biotinylace galektinů pomocí *Western blotu*. Gel po SDS-PAGE byl vyjmut a ponořen do transferového pufru. Byla připravena blotovací aparatura. Do kazety byly vloženy součásti *Western blotu*: kazeta (záporná část), houbička, filtrační papír, SDS-PAGE gel, nitroceluloseová membrána, filtrační papír, houbička, druhá část kazety (kladná část). Všechny části, podobně jako SDS-PAGE gel, byly před vložením do aparatury namočený do transferového pufru. Aparatura byla doplněna o menší míchadlo a dolita transferovým pufrem. *Western blot* byl zahájen uzavřením aparatury a připojením ke zdroji s napětím 100 V po dobu 2 hodin a při teplotě 4 °C.

Po skončení přenosu byla nitroceluloseová membrána vyjmuta a blokována pomocí 10% roztoku odtučněného mléka přes noc a při teplotě 4 °C. Druhý den byla membrána omyta 3 × 15 minut PBST pufrem. Po omytí byla 1 hodinu inkubována s kozí protilátkou proti biotinu konjugovanou s křenovou peroxidasou (ředění 1:5000). Po označení protilátkou byla membrána znovu omyta 3 × 15 minut PBST pufrem. Byl připraven chemiluminiscenční substrát obsahující zesilovač (ECL, z angl. *enhanced chemiluminescence*) pro chemiluminiscenční detekci. Substrát byl nanesen na promytou membránu a vložen do G:boxu Chemi XRQ a byla detegována chemiluminiscence.

3.3.6 Stanovení aktivity připravených galektinů

Vazebná afinita připravených galektinů (Gal-8; Gal-8N; Gal-8N-AVI) k sacharidovým standardům byla ověřena pomocí imunochemické metody ELISA, viz Obr. 4.

Byla připravena 96-jamková mikrotitrační destička, do níž bylo naneseo po 50 µL 0,1 µM roztoku asialofetuinu (ASF) v PBS. Destička byla zakryta a inkubována do druhého dne za laboratorní teploty. Druhý den byla destička promyta 3 × 250 µL PBST a bylo naneseo 250 µL blokovacího pufru s obsahem 2% hovězího sérového albuminu (BSA, z angl. *bovine serum albumin*), který zabránil nespecifické vazbě analyzovaného galektinu na povrch jamky, po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty. Destička byla opět promyta 3 × 250 µL PBST a byly naneseo připravené vzorky - nejprve ředící řady jednotlivých standardů (inhibitorů) (25 µL/jamka) a následně připravené galektiny (1 µM; 25 µL/jamka). Vzorky inkubovány po dobu 2 hodin za laboratorní teploty. Po inkubaci byla destička opětovně promyta 3 × 250 µL PBST a byla naneseo myší protilátka proti histidinové značce konjugovaná s křenovou peroxidasou (1:2000 ředění, 50 µL/jamka); inkubace proběhla po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty. Nenavázaná protilátka byla vymyta posledním promýváním 3 × 250 µL PBST a za tmy byl přidán fotosenzitivní substrát *TMB One* (50 µL/jamka) čímž byla zahájena jeho enzymová přeměna z bezbarvého na modrý

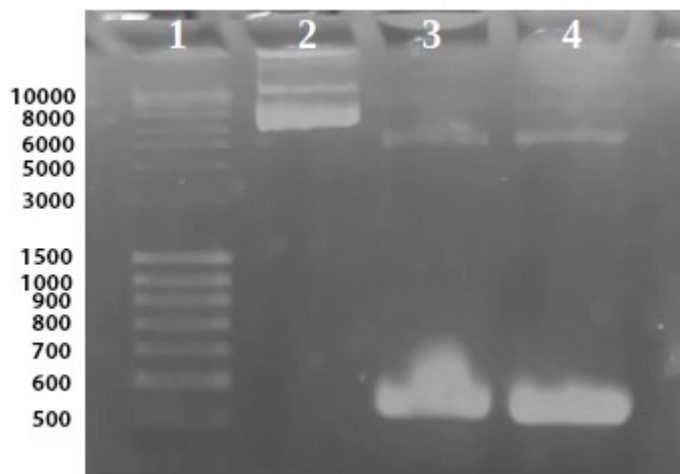
produkt. Enzymová přeměna byla zastavena přidáním 3M HCl (50 μ L/jamka), v čase, kdy zabarvení odpovídalo absorbanci zhruba 0,8; to způsobilo změnu barvy z modré na žlutou. Kvantifikace kolorimetrické změny byla provedena pomocí spektrofotometru Sunrise Tecan měřením absorbance při 450 nm.

Vazebná afinita konstruktů Gal-8N-AVI byla také ověřena pomocí interferometrie na biovrstvě (BLI, z angl. *biolayer interferometry*), kterou provedl Mgr. Jakub Červený z Laboratoře biotransformací.

4. VÝSLEDKY

4.1. Příprava genových konstruktů galektinů

Pomocí metody PCR byl z plasmidu pET-Duet-1-Gal-8-AVI, který byl použit jako templát (k dispozici na školicím pracovišti) připraven genový konstrukt Gal-8N-AVI. Příprava genového konstruktu byla provedena namnožením genu obsahující podjednotku Gal-8N-AVI (i s peptidovým můstkem), její následnou restrikcí a ligací (viz kapitola 3.2.1). Produkty PCR reakce byly analyzovány pomocí 1% agarosového gelu (Obr. 11). Na gelu bylo patrné, že v reakci vznikl produkt odpovídající velikostí požadovaného genu Gal-8N-AVI (dráhy 3 a 4) - zhruba 600 bp (migroval tedy výrazně rychleji než templát pET-Duet-1-Gal-8-AVI viditelný v horní části gelu). Následně byla provedena izolace PCR produktu z gelu a jeho purifikace pomocí komerčního setu. Následovala restrikce produktu pomocí restrikčních endonukleas *AscI* a *NotI*, aby došlo k naštěpení požadovaného produktu, který tak mohl být následně vložen do plasmidu pET-Duet-1 štěpeného stejnými restrikčními endonukleasami. Po restrikci byla směs purifikována pomocí komerčního setu, aby došlo k odstranění inaktivovaných endonukleas a pufrů. Poté byl takto připravený genový konstrukt vložen do naštěpeného expresního vektoru a lineární úseky DNA byly spojeny do cirkulárního plasmidu pomocí ligace T4 DNA ligasou. Správnost jednotlivých kroků byla ověřena transformací kompetentních buněk *E. coli* Top10.



Obr. 11: Preparativní 1% agarosový gel na separaci PCR produktu.

Zleva, 1 - hmotnostní pravítko [bp] (DNA ladder); 2 - referenční vzorek Gal-8-AVI; 3 a 4 - ve dvou drahách rozdělený PCR produkt Gal-8N-AVI.

Z narostlých kolonií bylo vybráno osm, které byly očkované do LB média s ampicilinem. Tyto kolonie byly zpracovány v analytickém množství komerčním setem *High Pure Plasmid Isolation Mini Kit* od firmy Sigma-Aldrich (viz kapitola 3.2.2). Izolované plasmidy byly

analyzovány pomocí 1% agarosového gelu. Plasmidy 1-2 a 4-8, které měly odpovídající velikost a koncentraci na gelu, byly sekvenovány Sangerovou metodou firmou SEQme s.r.o. Sekvence byly analyzovány v programu Nucleotide BLAST a bylo zjištěno, že všechny plasmidy (vyjma č. 3) obsahovaly požadovaný genový konstrukt.

Vybraný plasmid (č. 7) byl použit na transformaci kompetentních buněk *E. coli* Top10. Vybraná narostlá kolonie po transformaci byla naočkovaná do LB média s ampicilinem a dále použita při izolaci genu v preparativním množství komerčním setem *Genopure Plasmid Midi Kit* od firmy Roche Life Science (viz kapitola 3.2.3). Správnost sekvence genu byla opět ověřena Sangerovou metodou firmou SEQme s.r.o. Sekvence byla analyzována v programu Nucleotide BLAST. Touto metodou se podařilo připravit požadovaný genový konstrukt Gal-8N-AVI ve vektoru pET-Duet-1, který tak mohl být použit pro expresi biotinylované N-koncové podjednotky Gal-8N-AVI. Koncentrace a čistota DNA izolovaného plasmidu je uvedena v Tab. 1.

Tab. 1: Koncentrace a čistota DNA izolovaného genu.

Izolovaný gen	Koncentrace DNA [µg/mL]	Čistota DNA (A₂₆₀/A₂₈₀)
<i>Gal-8N-AVI</i>	730	1,4

4.2 Produkce a purifikace galektinů

4.2.1 Produkce a purifikace

Na produkci galektinových konstruktů nesoucích pouze histidinovou kotvu (Gal-8, Gal-8N) byly použity buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3) a na přípravu galektinových konstruktů nesoucích AVI-kotvu (Gal-8-AVI, Gal-8N-AVI) byly použity buňky *E. coli* BL 21 λDE3 (birA) pro selektivní biotinylací *in vivo* (viz kapitola 3.3.1). Kultivace *E. coli* Rosetta 2 (DE3) buněk byla provedena v TB médiu, jejichž naočkováním do noční prekultury, dále byla kultivována hlavní kultura po dobu 2 hodin, a indukce byla provedena IPTG. Kultivace *E. coli* BL 21 λDE3 (birA) byla provedena v MDO médiu, jejichž naočkováním do noční prekultury, dále byla kultivována hlavní kultura po dobu 2 hodin, a indukce byla provedena IPTG; zároveň byla v tomto kroku provedena samotná biotinylace AVI-kotvy (viz kapitola 3.3.2). Po rozbití produkovaných buněk sonikací byla provedena purifikace galektinů afinitní chromatografií s imobilizovanými nikelnatými ionty na NTA nosiči (viz kapitola 3.3.3). Po rozbití produkovaných buněk sonikací byla provedena purifikace galektinů afinitní chromatografií s imobilizovanými nikelnatými ionty na NTA nosiči (viz kapitola 3.3.3). Následně byla provedena dialýza pro odstranění imidazolu použitého pro eluci galektinu z kolony a sterilní filtrace produkovaných galektinů. Sterilní roztoky galektinů byly pak

uskladněny při teplotě 4 °C v nezměněné aktivitě po dobu 4-6 týdnů. I když byly pro porovnání produkovány i formy galektinů bez biotinylované AVI-kotvy, dále s nimi nebyla prováděna všechna měření. Byly použity hlavně jako negativní kontrola pro ověření správnosti biotinylace metodou *Western blot*, jak je popsáno v kapitole 4.2.2.

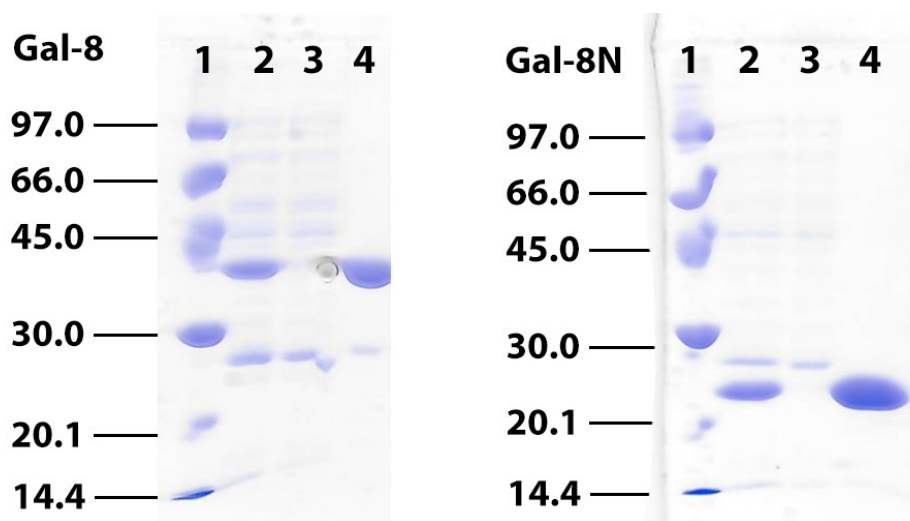
Výsledkem produkce a purifikace bylo šest galektinových konstruktů: Gal-8, Gal-8N, Gal-8-AVI, Gal-8-AVI s biotinem, Gal-8N-AVI a Gal-8N-AVI s biotinem. Všechny galektiny se podařilo připravit čisté a ve vysoké koncentraci. Nízký výtěžek buněk u galektinů s AVI-kotvou (viz Tab. 2) je dán menším množstvím produkováných buněk z důvodu krátké kultivace, která byla ukončena již po 4 hodinách, aby byla zachována aktivita biotinligasy (optimalizovaný protokol k dispozici na školicím pracovišti). Výtěžky produkce a purifikace galektinů, spolu s jejich koncentracemi stanovenými dle Bradforda, jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Množství produkováných galektinů

Galektin	množství buněk na 1 L	množství proteinu na	molární koncentrace
	media [g]	1 g buněk [mg]	[μ M]
Gal-8	6,9	20,0	171,9
Gal-8N	7,5	24,0	278,9
Gal-8-AVI s biotinem	3,0	7,6	25,2
Gal-8N-AVI s biotinem	3,3	6,6	38,1

Byla ověřena čistota vyprodukovaných galektinů Gal-8 a Gal-8N pomocí SDS elektroforézy (viz kapitola 3.3.4). Na gel byly nanесeny vzorky surových galektinů před nanесením na kolonu (před purifikací, LOAD), vzorek proteklý přes kolonu (ELUT) a finální vzorek po dialýze. Molekulová hmotnost byla srovnána pomocí hmotnostního pravítka obsahujícího nízkomolekulární proteinové standardy (LMW, z angl. *low molecular weight*) (Obr. 12). Dle gelu je zřejmé, že byly produkovány galektiny s čistotou 99 %, které odpovídají tabelovaným velikostem (Gal-8 37,6 kDa; Gal-8N 22,7 kDa). Zároveň je vidět, že purifikace vedla k přečištění surových proteinů. Jediný větší proužek, který neodpovídá velikostně celému galektinu, je ve dráze Gal-8 (Obr. 12, levý gel). Tento proužek velikostně odpovídá jedné podjednotce tohoto galektinu (Obr. 12, pravý gel) – podjednotky mají podobné velikosti: Gal-8N 22,7 kDa; Gal-8C 20,6 kDa, takže lze předpokládat, že se na gelu nebudou za těchto podmínek dobře dělit. K rozštěpení na podjednotky došlo buď během purifikace nebo postpurifikačních kroků; k částečnému rozštěpení může dojít též během samotné SDS-PAGE. Každopádně se jedná o méně než 10 % celkového množství galektinu, a proto jsme v další studii

tento fakt dále nezohledňovali. Čistota galektinů Gal-8-AVI a Gal-8N-AVI a jejich forem s biotinem byla též ověřena a je popsána v kapitole 4.2.2.



Obr. 12: 12% SDS-PAGE gel s Gal-8 a Gal-8N, zobrazující průběh jejich purifikace a jejich čistotu

Gal-8: Zleva, 1 - LMW; 2 - LOAD; 3 - ELUT; 4 - Gal-8 po dialýze.

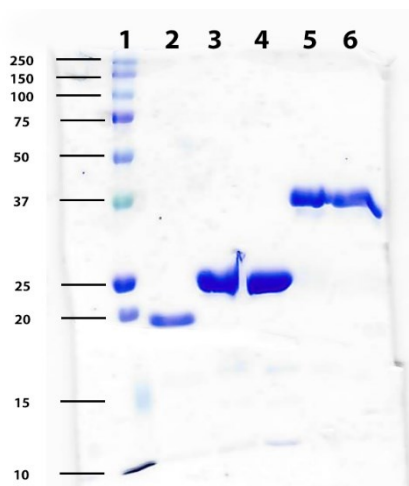
Molekulová hmotnost Gal-8 je 37,6 kDa.

Gal-8N: Zleva, 1 - LMW; 2 - LOAD; 3 - ELUT; 4 - Gal-8N po dialýze.

Molekulová hmotnost Gal-8N je 22,7 kDa.

4.2.2 Western blot

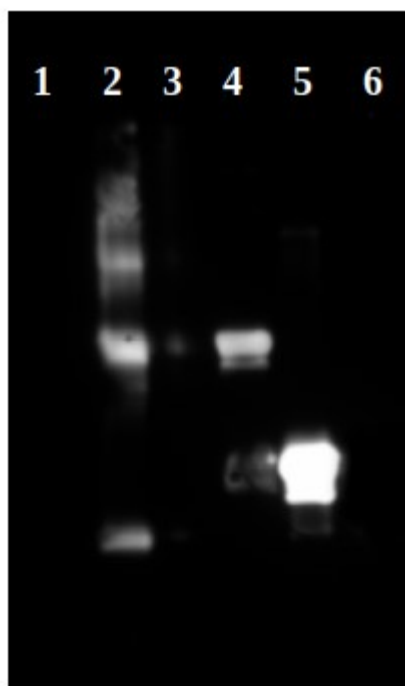
Metoda *Western blot* s imunochemickou detekcí byla použita k analýze biotinylace galektinových konstruktů Gal-8-AVI, Gal-8-AVI s biotinem, Gal-8N-AVI a Gal-8N-AVI s biotinem. V prvním kroku byla provedena SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.4), a byla tak ověřena čistota a velikost galektinů (Obr. 13). Gel ukazuje, že byly produkovány čisté galektiny, s čistotou větší než 95 %. Jsou viditelné pouze proužky odpovídající velikostí příslušným galektinům, proto můžeme konstatovat, že odstranění nečistot pomocí purifikace a dialýzy bylo úspěšné. Velikosti jsou oproti Obr. 12, kde jsou galektiny pouze s histidinovou kotvou, vyšší. To je dáno přítomností AVI-kotvy, což přináší zvýšení velikosti konstruktu o cca 2,2 kDa. Velikost D-biotinu je přibližně 0,2 kDa, proto jeho navázání není z SDS-PAGE analýzy zřejmé.



Obr. 13: 12% SDS-PAGE gel zobrazující velikost a čistotu galektinů

Zleva, 1 - LMW (barevný); 2 - Gal-1 AVI s biotinem (standard pro pozitivní kontrolu pro metodu *Western blot*); 3 – Gal-8N-AVI (bez biotinu); 4 - Gal-8N-AVI s biotinem; 5 – Gal-8-AVI (bez biotinu); 6 – Gal-8-AVI s biotinem.

Úspěšnost biotinylace (navázání D-biotinu) byla ověřena metodou *Western blot*. Proteiny z SDS-PAGE gelu byly blotováním přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Membrána byla blokována 10% roztokem odtučněného mléka přes noc. Druhý den byla membrána omyta a navázaný biotin byl označen anti-biotin protilátkou s křenovou peroxidasou, která byla zodpovědná za chemiluminiscenci. Byla detekována chemiluminiscence biotinu v konstruktech pomocí ECL substrátu v G: boxu Chemi XRQ (viz kapitola 3.3.5). Detekce biotinu byla úspěšná, tj. bylo prokázáno, že připravené konstrukty nesou navázaný biotin, jak lze vidět na Obr. 14. Potvrzením správnosti provedené techniky jsou výsledky pozitivní a negativní kontroly. Pozitivní kontrolu představuje dříve ověřený konstrukt Gal-1-AVI s biotinem (k dispozici na školicím pracovišti). Negativní kontrolou jsou galektiny bez biotinylované AVI-kotvy, u kterých není detekována chemiluminiscence, bylo tedy ověřeno, že se u nich biotin nenavázal a že samotný konstrukt chemiluminiscenci nevykazuje.



Obr. 14: Chemiluminiscenční detekce biotinylovaných galektinových konstruktů

Zleva, 1 - LMW (není viditelný, pouze kontrola pro blotování); 2 - Gal-1-AVI s biotinem (standard pro pozitivní kontrolu); 3 - Gal-8-AVI (bez biotinu sloužící jako negativní kontrola); 4 - Gal-8-AVI s biotinylovanou AVI-kotvou; 5 - Gal-8N-AVI s biotinylovanou AVI-kotvou; 6 – Gal-8N-AVI (bez biotinu sloužící jako negativní kontrola).

4.3 Stanovení aktivity galektinů

Vazebná afinita připravených galektinových konstruktů ke standardním inhibitorům byla ověřena pomocí imunochemické kompetitivní metody ELISA. Lektinová aktivita představuje biologickou schopnost galektinů vázat β -galaktosidy. Byly vybrány tři standardy pro stanovení, komerčně dostupné inhibitory galektinů, pomocí nichž byla lektinová aktivita připravených konstruktů ověřena: laktosa (β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranosa); TDG (thiodigalaktosid, β -D-galaktopyranosyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid); 2'-FL (2'-fukosyllaktosa, α -L-fukopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranosa).

Stanovení vazebné afinity představuje schopnost inhibitoru inhibovat vazbu galektinu ke standardnímu ligandu asialofetuinu (ASF), používanému jako imobilizovaný kompetitor. Výsledkem stanovení vazebné afinity je hodnota IC_{50} (polovina maximální inhibiční koncentrace). IC_{50} představuje koncentraci ligandu, u které inhibice vazby galektinu na imobilizovaný ASF dosáhne 50 %. Hodnota IC_{50} byla kvantifikována komerční protilátkou proti histidinové kotvě s křenovou peroxidasou. Ta reagovala po přidání fotosenzitivního substrátu *TMB One* enzymovou proměnou na modrý produkt. Enzymová reakce byla zastavena 1M HCl a žluté zabarvení bylo

měřeno spektrofotometricky při 450 nm. Hodnota získané absorbance byla nepřímo úměrná vazebné afinitě analyzovaného inhibitoru.

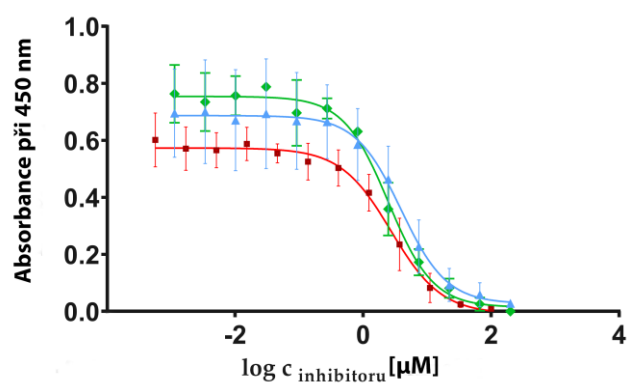
Měření proběhlo ve třech nezávislých stanoveních, všechny měřené proteiny měly stejnou koncentrací (1 μ M) a zároveň všechny standardy byly měřeny se stejnými koncentracemi (v rozmezí 200 mM – 0,56 μ M). Získaná data byla vyhodnocena nelineární regresí v programu GraphPad Prism a byla odečtena hodnota IC_{50} . Hodnoty IC_{50} pro inhibitor 2'-FL jsou nejnižší z testovaných inhibitorů; pro Gal-8N 2,1 \pm 0,2 mM; pro Gal-8N-AVI s biotinem 2,1 \pm 0,2 mM; a pro Gal-8N-AVI bez biotinu 1,9 \pm 0,1 mM; hodnoty jsou velice podobné a poněkud nižší než pro celý Gal-8 (IC_{50} = 2,9 \pm 1,2 mM). Inhibitor 2'-FL se zdá být nejlepším inhibitorem pro N-podjednotku Gal-8. Hodnoty IC_{50} pro inhibitor TDG byly pro celý Gal-8 2,4 \pm 0,3 mM; pro Gal-8N 3,1 \pm 0,1 mM; pro Gal-8N-AVI s biotinem 2,8 \pm 0,3 mM; tyto hodnoty jsou pro N-podjednotku poněkud vyšší než pro celý Gal-8. Hodnoty IC_{50} pro inhibitor laktosa jsou ze všech inhibitorů nejvyšší, a to pro Gal-8 3,9 \pm 0,3 mM; pro Gal-8N 4,4 \pm 1,1 mM; pro Gal-8N-AVI s biotinem 2,6 \pm 0,4 mM. Zde v jediném případě vidíme významnější rozdíl ve vazebné afinitě mezi chováním původního konstruktů bez AVI-kotvy a biotinylované podjednotky. U 2'-FL i u laktosy je evidentní, že biotinylace N-podjednotky neměla na vazebnou afinitu žádný vliv. Vytvořené inhibiční křivky v závislosti na koncentraci inhibitorů pro jednotlivé galektiny vytvořené proložením experimentálních dat nelineární regresí jsou na Obr. 15 a všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.

Funkčnost připraveného konstruktů Gal-8N-AVI s biotinem byla ověřena také pomocí interferometrie na biovrstvě (BLI analýzu provedl Mgr. Jakub Červený). Lektinová aktivita připraveného galektinu s AVI-kotvou byla zachována.

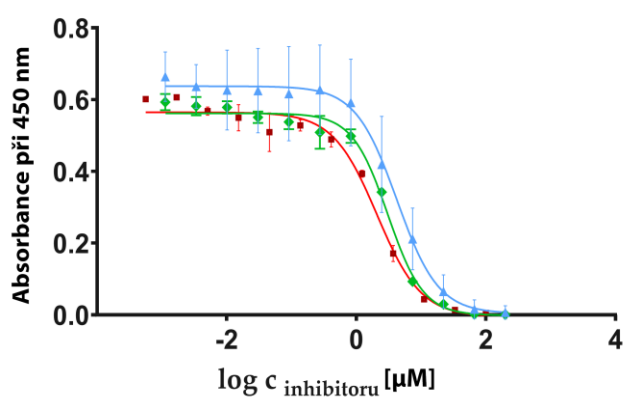
Tab. 3: Afinita standardu vyjádřena inhibičním potenciálem (IC_{50})

Galektin	Inhibitor	IC_{50} [mM]	IC_{50} [mM]	IC_{50} [mM]	Průměr [mM]	Směrodatná odchylka [mM]
Gal-8	Laktosa	4,3	3,9	3,7	3,9	0,3
	TDG	2,6	2,7	2,1	2,4	0,3
	2'-FL	2,3	2,2	4,4	2,9	1,2
Gal-8N	Laktosa	4,8	3,2	5,2	4,4	1,1
	TDG	3,2	3,0	2,9	3,1	0,1
	2'-FL	2,2	2,3	1,9	2,1	0,2
Gal-8N-AVI s biotinem	Laktosa	2,2	2,8	2,8	2,6	0,4
	TDG	2,8	2,5	3,0	2,8	0,3
	2'-FL	2,3	2,2	1,9	2,1	0,2

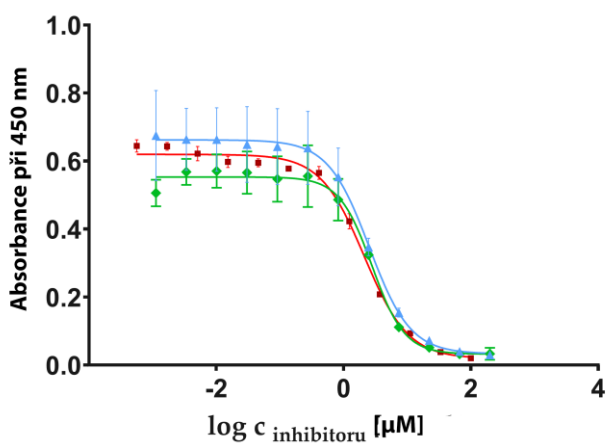
A) Gal-8



B) Gal-8N



C) Gal-8N AVI s biotinem



★ Laktosa ◆ TDG ■ 2'-FL

Obr. 15: Průběh závislosti míry inhibice vazby galektinů na imobilizovaný ASF na koncentraci testovaných sacharidových inhibitorů laktosy, TDG a 2'-FL (vytvořeno v programu GraphPad Prism 8.4.3)

A: Inhibice celého konstruktů Gal-8 sacharidovými inhibitory

B: Inhibice podjednotky Gal-8N sacharidovými inhibitory

C: Inhibice značené podjednotky Gal-8N s biotinylovanou AVI-kotvou sacharidovými inhibitory

5. DISKUZE

V klasifikaci galektinů patří galektin-8 do skupiny tandemových galektinů. Sestává ze dvou odlišných CRD podjednotek spojených peptidovým můstkem [8]. *In vivo* vystupuje jako modulátor buněčného růstu nebo buněčné adheze, dále má důležitý klinický význam při autoimunitních zánětech i nádorových onemocněních. Díky jeho široké expresi napříč tkáněmi má potenciál pro terapeutické využití, např. ve formě klinického prognostického faktoru pro spinocelulární karcinom hrtanu při sledování hladin jeho exprese [20]. Jeho role v angiogenezi naznačují také možnosti pro využití v terapii rakoviny, díky jeho schopnosti specificky vázat glykany, které se nacházejí na povrchu krevních destiček, které spouští šíření, mobilizaci vápníku a vazbu fibrinogenu [7]. Detailní zkoumání interakce tohoto galektinu se syntetickými glykokonjugáty a výzkum účinných selektivních inhibitorů je proto atraktivním výzkumným směrem, který má potenciální využití ve vývoji jak nových terapeutik, tak nových diagnostických postupů, např. založených na analýze vzorků od pacientů pomocí biosenzorů.

In vivo biotinylace je novou levnou a praktickou metodou pro značení proteinových konstruktů. Umožňuje přímo během samotné heterologní exprese produkovat selektivně označit jednou molekulou biotinu na vybraném místě konstruktů. To přináší značnou výhodu oproti v zásadě neselektivním postupům značení, jak jsou popsány v kapitole 1.3.2.1, a kde se selektivita dá dosáhnout pouze vhodnou volbou specificky lokalizovaných funkčních skupin pro modifikaci, jako v případě Cho a kol. [52]. Jinak jsou takové modifikace ohledně své lokalizace nebo i četnosti spíše málo selektivní, jako v případě Küçük a kol. [51]. Selektivně značený konstrukt se dá využít jak pro imobilizaci na biosenzory či jiné povrchy pro biofyzikální detekci, tak pro sledování chování konstruktů např. v buněčné kultuře pomocí průtokové cytometrie. Oproti specifickým protilátkám je tato metoda několikanásobně levnější a v podstatě umožňuje jednoduše připravit téměř neomezené množství označeného proteinu.

Oproti neselektivním metodám značení vyžaduje ale selektivní *in vivo* biotinylace předchozí přípravu proteinového konstruktů nesoucího AVI-kotvu metodami molekulární biologie. U tandemových galektinů je navíc problematické, že blízkost AVI-kotvy může ovlivnit jednu z galektinových podjednotek více než tu druhou, což může vést k nechtěnému ovlivnění přirozeného biologického chování výsledného konstruktů. Cílem je proto, aby vložení AVI-kotvy a následná biotinylace měly na lektinovou aktivitu konstruktů zanedbatelný nebo minimální vliv. Proto se tato bakalářská práce zabývala primárně N-terminální podjednotkou Gal-8, která přímo sousedí s vloženou AVI-kotvou. Zároveň dle práce od autorů Carlsson a kol. [27] můžeme N-podjednotku považovat za aktivnější a dle práce od autorů Hiroko a kol. [29] vidíme její

významnější roli ve vazebných interakcích. N-podjednotka se podle těchto publikací tedy zdá být významnější i zajímavější pro další studium.

V této práci byl proto připraven konstrukt Gal-8N nesoucí peptidovou AVI-kotvu z již existujícího konstruktu Gal-8-AVI ve vektoru pETDuet-1, který byl k dispozici na školicím pracovišti z předchozích studií. To bylo realizováno pomocí PCR s následnou restrikcí a ligací. Nově připravený plasmid byl sekvenován a byla potvrzena správnost vložené sekvence odpovídající N-terminální podjednotce Gal-8N. Důležitým faktorem je i ponechání spojovacího peptidového můstku za sekvencí genu Gal-8N, protože v rámci předchozích experimentů s tandemovými galektiny v laboratoři bylo zjištěno, že zachování peptidového můstku napomáhá správnému složení podjednotek a zachování jejich lektinové aktivity. Plasmid byl připraven čistý dle spektrofotometrického stanovení ($A_{260} / A_{280} = 1,4$) a v dostatečné koncentraci (730 $\mu\text{g/mL}$) pro další práci. Následně jsem se zabývala produkcí připraveného konstruktů a jeho purifikací. Pak byl tento konstrukt, už ve formě aktivního proteinu, porovnáván se svým nebiotinylovaným protějškem, podjednotkou galektinu bez AVI-kotvy i s celým galektinem.

Všechny připravené galektiny měly ověřenu i svou čistotu a velikost pomocí SDS-PAGE. Dle 12% SDS gelů je zřejmé, že byly produkovány čisté galektiny (většinou s čistotou větší než 99 %), které odpovídají svým tabelovaným velikostem dle své aminokyselinové sekvence (př. Gal-8 37,6 kDa; Gal-8N 22,7 kDa). Jediná větší „nečistota“, viditelná na SDS-PAGE, byla u purifikovaného Gal-8 (Obr. 12 část Gal-8). Tento proužek velikostně odpovídal jedné podjednotce tohoto galektinu (Obr. 12 část Gal-8N; Gal-8N 22,7 kDa; Gal-8C 20,6 kDa), takže předpokládám, že došlo ve velmi malém procentu (méně než 5 %) k částečnému rozštěpení celého galektinu, buď během purifikace, nebo při postpurifikačních krocích či při samotné přípravě vzorku na SDS-PAGE. Dále i firma *abcam* při prodeji rekombinantního lidského Gal-8 uvádí SDS-PAGE, v které jsou viditelné nečistoty o velikosti N-podjednotky [58]. Metodou *Western blot* byla následně ověřena účinnost biotinylace AVI-kotvy u obou konstruktů (jak podjednotky, tak celého galektinu). Pozitivní i negativní kontroly byly úspěšné. Touto metodou nemůžeme stanovit výtěžek *in vivo* biotinylace, protože velikost molekuly biotinu je natolik nízká (0,2 kDa), že na gelu nedojde k rozdělení biotinylovaných a nebiotinylovaných molekul. Teoreticky může tedy vzorek biotinylovaného galektinu obsahovat směs mono-biotinylovaných a nebiotinylovaných molekul a z intenzity luminiscence v porovnání s jiným biotinylovaným konstruktem můžeme případně orientačně usuzovat na jejich poměr. Lepší odpověď nám mohou dát další metody, např. funkčnost detekce proteinu navázaného na buňky metodou průtokové cytometrie či výtěžek imobilizace konstruktů na biosenzor. Praktické provedení těchto metod bylo mimo rozsah této práce. Nicméně připravený konstrukt byl úspěšně a v dostatečné koncentraci imobilizován na biosenzor pro interferometrii na biovrstvě, což provedl Mgr. Jakub Červený z Laboratoře biotransformací, při

zachování lektinové aktivity po imobilizaci. Z toho usuzují, že návrh i příprava zamýšleného Gal-8N-AVI konstruktů v rámci této práce byla úspěšná.

V poslední části práce jsem se zabývala potvrzením lektinové aktivity připraveného konstruktů metodou ELISA, která je již zavedena pro jiné galektiny v laboratoři. Nejprve bylo nutné optimalizovat samotnou metodu ELISA pro tento konstrukt, zejména z hlediska použité koncentrace galektinu a koncentrace protilátky proti histidinové kotvě. Vyšší koncentrace galektinu vedla k nutnosti použít vyšší koncentrace inhibitorů, což bylo nepraktické vzhledem k riziku nedostatečné saturace inhibičních křivek a vysoké spotřeby mnohdy poměrně drahých inhibitorů (např. 2'-FL, 10 mg za 67 €, tj. 1650 CZK, od firmy Biosynth s.r.o., což je spotřeba na několik málo stanovení). Příliš nízká koncentrace galektinu zase zhoršovala kolorimetrickou detekci. Nakonec byla zvolena po optimalizačních experimentech koncentrace 1 μ M.

Pro studium lektinové aktivity byly zvoleny tři inhibitory – standardní inhibitor laktosa, základní syntetický inhibitor thiodigalaktosid (TDG) a oligosacharidový inhibitor 2'-fukosyllaktosa (2'-FL). Porovnání vazebné afinity těchto ligandů u jednotlivých galektinových konstruktů ukazuje na vzájemné rozdíly. Celý Gal-8 a jeho podjednotka Gal-8N nevykazují stejný trend preferencí ligandů. Pro Gal-8 je nejhorším inhibitorem laktosa ($3,9 \pm 0,3$ mM), lepším 2'-FL ($2,9 \pm 1,2$ mM) a nejlepším TDG ($2,4 \pm 0,3$ mM); zatímco pro Gal-8N je TDG ($3,1 \pm 0,1$ mM) lepším inhibitorem než 2'-FL ($2,1 \pm 0,2$ mM). Nejběžněji používaný inhibitor laktosa vyšel pro tento galektin i jeho podjednotku jako nejméně účinný. Z výsledků se dále zdá, že přidání biotinylované peptidové AVI-kotvy na N-konec N-terminální podjednotky Gal-8 nezpůsobilo zásadní změny v jeho lektinové aktivitě vůči testovaným inhibitorům. Při použití ligandu 2'-FL jsou hodnoty pro podjednotku Gal-8N ($2,1 \pm 0,2$ mM), Gal-8N-AVI ($1,9 \pm 0,1$ mM) a Gal-8N-AVI s biotinem ($2,1 \pm 0,2$ mM), podobné v rámci experimentální chyby měření, a zároveň byla 2'-FL v rámci trendu preferencí ligandů vyhodnocena jako nejlepší. Ligand TDG byl vyhodnocen v rámci trendu preferencí ligandů u Gal-8N ($3,1 \pm 0,1$ mM) v pořadí jako druhý nejlepší, a získaná hodnota se dobře shoduje s hodnotou pro Gal-8N-AVI s biotinem ($2,8 \pm 0,3$ mM). Ligand laktosa byl v rámci trendu preferencí ligandů vyhodnocen u Gal-8N-AVI s biotinem ($2,6 \pm 0,4$ mM) jako druhý nejlepší a u Gal-8N ($4,4 \pm 1,1$ mM) jako nejhorší; zde pozorujeme významný rozdíl v afinitě jednotlivých konstruktů. Zároveň měl tento ligand velký rozptyl hodnot a vyšší směrodatnou odchylku, co naznačuje možnou technickou chybu samotného měření metodou ELISA. Chyba mohla též nastat při přípravě standardního roztoku tohoto ligandu. Každopádně je nutné provést další zpřesňující experimenty, ideálně s různými šaržemi nově produkovaných proteinů za použití dalších ligandů, což bylo mimo rozsah této práce. Otázka ovlivnění vazebné afinity u tandemového galektinu, jako je Gal-8, a jeho podjednotky přítomností AVI-kotvy je zcela nová a poprvé je studována v této práci. U předchozích známých AVI-konstruktů galektinů (např. Bumba a kol. [37], nebo Hovorková

a kol. [60]) kde je popisována aktivita galektinů po navázání AVI-kotvy, se jednalo o galektiny z jiných skupin – chimerický Gal-3 nebo prototypický Gal-1, kde jsou strukturální vlastnosti poměrně odlišné, a proto nenabízejí tolik opěrných bodů pro tuto studii. Získané výsledky naznačují, že podjednotka Gal-8N se zdá vhodná pro navázání AVI-kotvy v uspořádání, jak je uvedeno v této práci. Finální potvrzení vhodnosti konstruktů pro jak biologické, tak biofyzikální aplikace si ještě vyžádá větší rozsah budoucích experimentů.

Jak již bylo zmíněno, práce od autorů Hiroko a kol. [29]; od autorů Carlsson a kol. [27]; od autorů Bohari a kol. [40] se zabývají studiem vazebných interakcí Gal-8 a zejména jeho N-podjednotky. Avšak inhibiční potenciál Gal-8 či Gal-8N vůči inhibitorům studovaným v této práci není dle získaných informací z literatury v těchto pracích srovnatelně kvantifikován a zatím asi nebyl podrobně zkoumán, a proto nejsme schopni porovnat naše výsledky s literaturou. Nicméně i z našich výsledků vyplývá, že Gal-8N podjednotka má dobrou afinitou ke všem testovaným inhibitorům, a to i po navázání biotinylované AVI-kotvy (Obr. 15). Zároveň je nutno podotknout, že z vybraných komerčních ligandů se jako nejlepší jeví 2'-FL (Obr. 15). Je zřejmé, že biologický význam má samozřejmě spíše celý galektin, jak ukazuje i Hutter a kol. [8], kde je popsáno zhoršení schopností buněčné adheze a signalizačních funkcí Gal-8 pokud není přítomen celý galektin.

6. ZÁVĚR

Tato práce ve své teoretické části obsahuje dosavadní poznatky o galektinech, konkrétně se zaměřuje na popis tandemových galektinů a jejich zástupce Gal-8. Dál stručně popisuje informace o ligandech/ inhibitech galektinů a možnostech metod pro jejich značení.

V experimentální části práce byl připraven konstrukt N-terminální podjednotky Gal-8N-AVI, z již existujícího konstrukt celého galektinu Gal-8-AVI. Připravený konstrukt byl spolu s ostatními konstrukty Gal-8 sloužícími pro porovnání v dalších experimentech heterologně exprimován v *E. coli* a purifikován afinitní chromatografií. Purifikací a následnou dialýzou byl dosažen výtěžek 6,6 mg čistého proteinu Gal-8N s biotinylovanou AVI-kotvou. Přítomnost biotinylace byla ověřena metodou *Western blot*.

Dále byla potvrzena lektinová aktivita produkovaných galektinových konstruktů pomocí metody ELISA se třemi komerčně dostupnými sacharidovými inhibitory galektinů. Zde bylo zjištěno, že celý Gal-8 a jeho podjednotka Gal-8N nevykazují zcela stejný trend vazebných afinit vůči inhibitorům. U Gal-8 byl vyhodnocen jako nejlepší inhibitor TDG a u Gal-8N byl vyhodnocen za nejlepší inhibitor 2'-FL, u obou byla nejhorším inhibitorem laktosa. Dále bylo zjištěno, že afinita studovaných inhibitorů k připravenému konstrukt Gal-8N-AVI s biotinylovanou i nebiotinylovanou AVI-kotvou se oproti Gal-8N výrazně nezměnila. Odlišnost byla nalezena jenom u jednoho ze tří testovaných inhibitorů, laktosa, kde byla hodnota IC_{50} odlišná. Finální validace funkčnosti nového konstrukt včetně biologických experimentů bude předmětem budoucího výzkumu.

BIBLIOGRAFIE

- [1] S. Barondes, et al.: Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* 33, 20807-20810 (1994).
- [2] S. Komath, et al.: Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research“, *Org Biomol Chem.* 4, 973-988 (2006).
- [3] R. D. Cumming, et al.: Galectins. *Essentials of Glycobiology. 2nd edition.* kapitola 33 (2009).
- [4] L. Johannes, et al.: Galectins at a glance. *J. Cell. Sci.* 131 (2018).
- [5] F. Tatsuyoshu, et al.: Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology.* 24 (2014).
- [6] P. Navarro, et al.: Impact of Galectins in Resistance to Anticancer Therapies. *Clin. Cancer Res,* 23 (2020).
- [7] A. Gupta, et al.: Animal lectins: Form, function and clinical applications. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical.* 669-691 (2012).
- [8] S. Hutter, et al.: Fetal gender specific expression of tandem-repeat galectins in placental tissue from normally progressed human pregnancies and intrauterine growth restriction (IUGR). *Placenta.* 36, 1352-1361 (2015).
- [9] M. F. Tronsco, et al.: Integrating structure and function of ‘tandem-repeat’ galectins. *Front Biosci.* 4, 864-887 (2012).
- [10] Y. Zick, et al.: Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj J.* 19, 517-526 (2004).
- [11] A. Norambuena, et al.: Galectin-8 induces apoptosis in Jurkat T cells by phosphatidic acid-mediated ERK1/2 activation supported by protein kinase A down-regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 12670-12679 (2009).
- [12] L. Eshkar Sebban, et al.: The involvement of CD44 and its novel ligand galectin-8 in apoptotic regulation of autoimmune inflammation. *J. Biol. Chem.* 179, 1225-1235 (2007).
- [13] E. Pardo, et al.: Antibodies against galectin-8 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rev Méd Chile.* 134, 159-166 (2006).
- [14] N. Nishi, et al.: Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM. *Glycobiology.* 13, 755-763 (2003).
- [15] N. Bidon-Wagner, et al.: Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj J.* 19, 557-563 (2004).
- [16] H. Ahmed, et al.: Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 358, 241-246 (2007).

- [17] N. Nagy, et al.: Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut*. 50, 392-401 (2002).
- [18] H. Lu, et al.: The tumor antigen repertoire identified in tumor-bearing neu transgenic mice predicts human tumor antigens. *Cancer Res*. 66, 9754-9761 (2006).
- [19] I. Camby, et al.: Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol*. 11, 12-26 (2001).
- [20] G. W. Dong, et al.: Galectin-8 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2, 13-19 (2009).
- [21] V. L. Thijssen, et al.: The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol*, 172, 545-553, (2008).
- [22] L. N. Cueni, et al.: Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp Cell Res*. 315, 1715-1723 (2009).
- [23] V. M. Cárdenas Delgado, et al.: Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the ‘tandem-repeat’ lectin galectin-8. *FASEB J*. 25, 242-254 (2011).
- [24] M. A. Romaniuk, et al.: Human platelets express and are activated by galectin-8. *Biochem J*. 432, 535-547 (2010).
- [25] N. A. Kamili, et al.: Key regulators of galectin–glycan interactions. *Proteomics*. 16, 3111–3125 (2016).
- [26] Y. Chan, et al.: Dissecting the Structure–Activity Relationship of Galectin–Ligand Interactions. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 392 (2018).
- [27] S. Carlsson, et al.: Affinity of galectin-8 and its carbohydrate recognition domains for ligands in solution and at the cell surface. *Glycobiology*. 17, 663–676 (2007).
- [28] P. Gagneux, et al.: Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*. 9, 747–755 (1999).
- [29] I. Hiroko, et al.: Galectin-8-N-domain Recognition Mechanism for Sialylated and Sulfated Glycans. *J Biol Chem*. 286, 11346–11355 (2011).
- [30] P. Sorme, et al.: Fluorescence polarization to study galectin-ligand interactions. *Methods Enzymol*. 362, 504–512 (2003).
- [31] R. Petersen.: Strategies Using Bio-Layer Interferometry biosensor technology for vaccine research and development. *Biosensors*. 7, 49 (2017).
- [32] G. Vauquelin.: Effects of target binding kinetics on *in vivo* drug efficacy: K_{off} , k_{on} and rebinding. *Br. J. Pharmacol*. 173, 2319–2334 (2016).

- [33] N. C. Garbett, et al.: Thermodynamic studies for drug design and screening. *Expert Opin. Drug Discov.* 7, 299–314 (2012).
- [34] A. Velazquez-Campoy, et al.: Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nat. Protoc.* 1, 186–191 (2006).
- [35] E. Freire.: Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? *Drug Discov. Today.* 13, 869–874 (2008).
- [36] A. Suleyman.: A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.* 72, 4–15 (2016).
- [37] L. Bumba, et al.: Poly-*N*-Acetyllactosamine Neo-Glycoproteins as Nanomolar Ligands of Human Galectin-3: Binding Kinetics and Modeling. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 372 (2018).
- [38] S. R. Stowell, et al.: Dimeric Galectin-8 Induces Phosphatidylserine Exposure in Leukocytes through Polylactosamine Recognition by the C-terminal Domain. *J. Biol. Chem.* 283, 20547–20559 (2008).
- [39] J. A. Patel, et al.: Structure based design of inhibitors targeting galectin-8. Thesis (PhD Doctorate), Griffith University, Queensland, Australia (2020).
- [40] M. H. Bohari, et al.: Structure-based rationale for differential recognition of lacto- and neolacto- series glycosphingolipids by the N-terminal domain of human galectin-8. *Scientific Reports.* 6 (2016).
- [41] J. Lakowicz.: Principles of fluorescence spectroscopy. Springer London, Limited (2009).
- [42] R. Wombacher, et al.: Chemical tags: applications in live cell fluorescence imaging. *J. Biophotonics.* 4, 391–402 (2011).
- [43] NB Cole.: Site-specific protein labeling with SNAP-tags. *Curr Protoc Protein Sci.* 73, 1-30 (2013).
- [44] G. Crivat, et al.: Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends Biotechnol.* 30, 8-16 (2012).
- [45] J. M. Walker.: The Dansyl Method for Identifying N-Terminal Amino Acids. *Basic Protein and Peptide Protocols.* 32 (1994).
- [46] G. Weber.: Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method. *Biochem J.* 51, 145-155 (1952).
- [47] B. Barat, et al.: Metabolic biotinylation of recombinant antibody by biotin ligase retained. *Biomolecular Engineering.* 24, 283–291 (2007).
- [48] A. Chapman-Smith, et al.: *In vivo* enzymatic protein biotinylation. *Biomolecular Engineering* 16, 119–125 (1999).
- [49] A. Gibbs.: Elements and modulation of functional dynamics. *J. Med. Chem.* 19, 7819-7837 (2014).

- [50] N. M. Green.: Avidin. *Biochem. J.* 89, 585-591 (1963).
- [51] N. Küçük, et al.: Labeling Carboxyl Groups of Surface-Exposed Proteins Provides an Orthogonal Approach for Cell Surface Isolation *J. Proteome Res.* 17, 1784–1793 (2018).
- [52] I. Cho, et al.: Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces. *Anal. Biochem.* 365, 14–23 (2007).
- [53] A. Chapman-Smith, et al.: The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci.* 9, 359-363 (1999).
- [54] S. K. Henke, et al.: Successful Conversion of the *Bacillus subtilis* BirA GroupII Biotin Protein Ligase into a Group I Ligase, 9 (2014).
- [55] The UniProt Consortium.: P06709 · BIRA_ECOLI. Dostupné z URL: <<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06709/entry>> [cit. 10.07.2022].
- [56] M. G. Cull, et al.: Biotinylation of Proteins/*in Vivo* and *in vitro* Using Small Peptide Tags. *Methods Enzymol.* 326, 430-440 (2000).
- [57] Ch. Kokotidou, et al. Adenovirus Fibers as Ultra-Stable Vehicles for Intracellular Nanoparticle and Protein Delivery. *Biomolecules.* 12, 308 (2022).
- [58] Abcam plc. All rights reserved.: Recombinant Human Galectin 8/Gal-8 protein (ab99294). Dostupné z URL: <<https://www.abcam.com/recombinant-human-galectin-8gal-8-protein-ab99294.html>> [cit. 22.08.2022].
- [59] Hovorkova a et al.: Advanced high-affinity glycoconjugate ligands of galectins. *Bioorg. Chem.* (dosud nepublikováno)