

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Zuzana Urbanová

**Rekombinantní exprese potkaního NK buněčného  
receptoru Clr-b v přítomnosti fluorovaných analogů  
monosacharidů**

Recombinant expression of rat NK cell receptor Clr-b in the presence  
of fluorinated analogues of monosaccharides

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Konzultant: Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu

Praha, 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. Všechny použité zdroje jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24.8.2022

Zuzana Urbanová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za vedení mé bakalářské práce a za možnost ji vypracovat v Laboratoři strukturní biochemie imunitního rozpoznávání. Dále děkuji mé konzultantce Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu za pomoc při práci v laboratoři i při psaní této práce, za užitečné rady a velkou trpělivost. V neposlední řadě také děkuji Mgr. Ondřeji Skořepovi, Ph.D. a ostatním členům laboratoře za pomoc a rady při provádění experimentů.

## **Abstrakt**

NK buňky jsou buňkami nespecifické imunity, které kromě likvidace tělu vlastních poškozených buněk také produkují chemokiny a cytokiny, kterými zasahují i do imunity specifické, stojí tedy na pomezí obou těchto druhů imunity. NK buňky na svém povrchu exprimují aktivační a inhibiční receptory, jejichž rovnováha udržuje buňku v inaktivovaném stavu, narušení této rovnováhy spustí cytotoxické mechanismy buňky. Dvěma z potkaních inhibičních receptorů NK buněk jsou receptory NKR-P1B a NKR-P1D, jejichž ligandem je protein Clr-b, což je receptor z rodiny proteinů podobných lektinům typu C. Cílem práce bylo rekombinantně připravit tento protein v prostředí sedmi fluorovaných analogů monosacharidů jakožto potenciálních inhibitorů N-glykosylace proteinu. Protein byl úspěšně exprimován v buněčné linii HEK293T ve formě konstruktů obsahujícího kromě extracelulární části Clr-b také Fc fragment lidského IgG a histidinovou kotvu, a to několikrát, pokaždé v prostředí jednoho ze sedmi fluorovaných analogů monosacharidů. Vzhledem k tomu, že glykosylace proteinů má výrazný vliv na jejich funkčnost, se inhibice glykosylace se jeví jako vhodné terapeutické řešení mnoha nemocí včetně například roztroušené sklerózy či rakoviny. Cílem zde bylo posoudit vliv fluorovaných analogů monosacharidů na přirozenou N-glykosylaci buněčné linie HEK293T s využitím konstruktů Clr-b jako modelového glykoproteinu.

## **Klíčová slova**

NK buňky, protein Clr-b, N-glykosylace, fluorované analogy monosacharidů, buněčná linie HEK293T, rekombinantní exprese proteinů, inhibice glykosylace

## **Abstract**

NK cells are part of innate immunity that, besides eliminating damaged cells, also produce chemokines and cytokines, which affect the cells of adaptive immunity. NK cells express activating and inhibitory receptors on their surface. The balance between them keeps the NK cells inactive. When the balance is disrupted, the cytotoxic mechanisms of the cell are activated. Receptors NKR-P1B and NKR-P1D are two rat NK cell inhibitory receptors whose ligand is protein Clr-b, a receptor belonging to the C-type lectin-like receptor family. This work aimed to recombinantly produce Clr-b in the presence of seven fluorinated analogues of monosaccharides as potential inhibitors of N-glycosylation. The protein was successfully expressed in the HEK293T cell line as a construct containing the extracellular part of Clr-b, the Fc fragment of human IgG, and a histidine tag multiple times, each time in the presence of one of the compounds. As glycosylation plays a major role in the functionality of many proteins, inhibition of glycosylation appears to be a promising way of treatment of different diseases such as cancer or multiple sclerosis. The aim here was to assess the effect of fluorinated analogues of monosaccharides on the native N-glycosylation of the HEK293T cell line using the Clr-b construct as a model glycoprotein.

## **Key words**

NK cells, protein Clr-b, N-glycosylation, fluorinated analogues of monosaccharides, HEK293T cell line, recombinant protein expression, inhibition of glycosylation

# Obsah

1	Teoretický úvod.....	10
1.1	Imunitní systém.....	10
1.2	Nespecifická imunita.....	10
1.3	NK buňky.....	11
1.3.1	Regulace a mechanismus aktivity NK buněk.....	12
1.4	NK buněčné receptory.....	13
1.4.1	Receptory imunoglobulinové nadrodiny.....	14
1.4.2	Rodina receptorů podobných lektinům C-typu.....	15
1.4.3	Systematické zařazení.....	15
1.5	Protein Clr-b.....	16
1.5.1	Rodina receptorů NKR-P1.....	16
1.5.2	Protein Clr-b.....	16
1.5.3	Ligandy proteinu Clr-b.....	17
1.6	Glykosylace proteinů.....	17
1.6.1	Mechanismus glykosylace.....	18
1.7	Fluorované analogy monosacharidů.....	20
2	Cíle práce.....	25
3	Materiál.....	26
3.1	Přístroje a pomůcky.....	26
3.2	Chemikálie.....	26
3.3	Vektory.....	27
3.4	Enzymy.....	27
3.5	Bakteriální a buněčné kmeny.....	27
3.6	Kultivační média.....	27
3.7	Roztoky.....	28
4	Metody.....	29
4.1	Příprava médií s obsahem fluorovaných analogů monosacharidů.....	29
4.2	Transformace a velkoobjemová produkce plazmidové DNA.....	29
4.2.1	Extrakce DNA.....	30
4.2.2	Určení čistoty a koncentrace DNA.....	31

4.3	Manipulace s buněčnou linií HEK293T.....	31
4.3.1	Suspenzní kultivace .....	31
4.3.2	Určení buněčné koncentrace .....	32
4.3.3	Transfekce.....	32
4.4	Purifikace rekombinantních proteinů.....	33
4.4.1	Afinitní chromatografie .....	33
4.4.2	Gelová permeační chromatografie.....	33
4.4.3	Určení koncentrace proteinů.....	34
4.4.4	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	34
5	Výsledky.....	36
5.1	Konstrukt FcHis_C1 .....	36
5.2	Purifikace proteinu Clr-b .....	37
5.2.1	Afinitní chromatografie .....	37
5.2.2	Gelová permeační chromatografie.....	37
5.2.3	Určení koncentrace proteinu.....	40
5.2.4	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	43
6	Diskuze .....	47
7	Závěr.....	50
8	Seznam použité literatury .....	51

## Seznam zkratek

(v/v)	Objem/objem ( <i>volume/volume</i> )
(w/v)	Hmotnost/objem ( <i>weight/volume</i> )
A <sub>260</sub>	Absorbance při 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorbance při 280 nm
AA	Akrylamid
APS	Peroxodisíran amonný ( <i>ammonium persulfate</i> )
CBB R-250	Barvivo Coomassie brilantní modř R-250 ( <i>Coomassie Brilliant Blue</i> )
CD	Diferenciační skupina ( <i>cluster of differentiation</i> )
CLA	Antigen asociovaný s kožními lymfocyty ( <i>cutaneous lymphocyte-associated antigen</i> )
CLR	Receptor z rodiny lektinů typu C ( <i>C-type lectin receptor</i> )
CTLD	Doména podobná lektinům C-typu ( <i>C-type lectin-like domain</i> )
CRD	Doména rozpoznávající sacharidy ( <i>carbohydrate recognition domain</i> )
CSPG	Proteoglykan obsahující chondroitin sulfát ( <i>chondroitin sulphate proteoglycan</i> )
DAMP	Strukturní motiv charakteristický pro poškozenou tkáň ( <i>damage-associated molecular pattern</i> )
dH <sub>2</sub> O	Deionizovaná voda
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fc	Krystalizovatelný fragment protilátky ( <i>fragment crystallizable</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon gama
HEK	Buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk ( <i>human embryonic kidney</i> )
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
ITAM	Imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrosinu ( <i>immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i> )
ITIM	Imunoreceptorový inhibiční motiv na bázi tyrosinu ( <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> )



KIR	Zabíječský receptor z imunoglobulinové superrodiny ( <i>killer immunoglobulin-like receptors</i> )
IPEI	Lineární polyethylenimin
MAMP	Strukturní motiv charakteristický pro mikroby ( <i>microbial-associated molecular pattern</i> )
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
NCR	Receptor přirozené cytotoxicity ( <i>natural cytotoxicity receptor</i> )
NK	Přirozený zabíječ ( <i>natural killer</i> )
NKC	NK genový komplex ( <i>natural killer gene complex</i> )
Ocil	Osteoklasty inhibující lektin ( <i>osteoclast inhibitory lectin</i> )
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PAMP	Strukturní motiv charakteristický pro patogeny ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
SDS	Dodecylsírán sodný ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je zodpovědný za ochranu organismu proti škodlivým vlivům z vnějšího, ale také z vnitřního prostředí<sup>1</sup>. Složky imunitního systému jsou schopny pomocí specializovaných mechanismů rozpoznávat a následně hubit patogeny<sup>1,2</sup>. Dokážou likvidovat také buňky těla vlastní, pokud se ukáže, že jsou napadeny virem či pokud se jedná o buňky nádorové nebo u nich došlo k jinému poškození<sup>1</sup>. Imunita se dělí na vrozenou (nespecifickou) a adaptivní (antigenně specifickou). Oba tyto systémy obsahují jak složku buněčnou, tak složku humorální (pomocné proteiny, peptidy, protilátky). Vrozená imunita zahrnuje buňky a molekuly, které jsou v organismu přítomny od narození a které jsou schopny likvidovat patogeny i bez toho, že by se s nimi předem setkaly<sup>1,2</sup>. Rozpoznávání těchto patogenů je antigenně nespecifické, rozeznávány jsou například obecné strukturní motivy společné pro mnoho mikroorganismů (tzv. PAMP, pathogen-associated molecular patterns) nebo molekuly spojené s nekrotizací buněk (tzv. DAMP, damage-associated molecular patterns)<sup>3</sup>. Buňky nespecifické imunity jsou schopny na setkání s patogenem reagovat prakticky okamžitě. Účinek nespecifické imunity je tedy velmi rychlý a jedná se o první vlnu obrany<sup>1,2</sup>.

Adaptivní neboli antigenně specifická imunita je evolučně mladší<sup>1</sup>, její mechanismy jsou složitější a vyvíjí se až v průběhu života. Buňkami specifické imunity jsou T- a B-lymfocyty<sup>1</sup>. Tyto buňky rozpoznávají tzv. antigeny, tedy specifické struktury na povrchích konkrétních patogenů a aktivují se pouze po setkání s tímto antigenem<sup>1</sup>. Oba typy imunity spolu kooperují a specifická imunita by bez pomoci té nespecifické nemohla fungovat, neboť buňky specifické imunity jsou ovládány cytokiny a chemokiny produkovanými buňkami nespecifické imunity<sup>1,2</sup>.

## 1.2 Nespecifická imunita

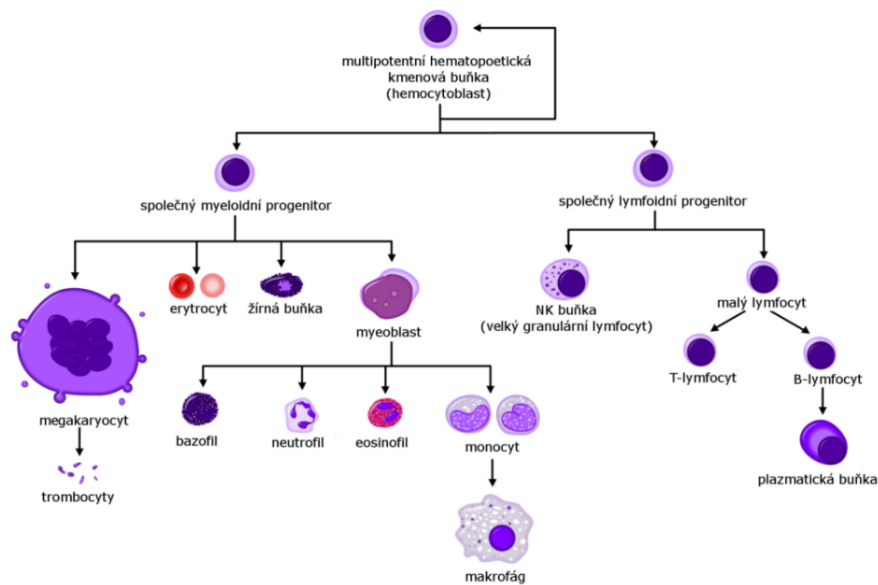
Nespecifická imunita se skládá z buněčné složky, ke které patří fagocytující a cytotoxické buňky, a ze složky humorální (neboli komplementární), která zahrnuje pomocné proteiny a peptidy nacházející se v krvi<sup>1,2</sup>. Mezi fagocytující buňky patří granulocyty, makrofágové a dendritické buňky<sup>2</sup>. Všechny tyto buňky jsou velké, rozpoznávající mikroorganismy, které poté fagocytózou pohltnou. Dendritické buňky navíc plní funkci antigen-prezentujících buněk a na svém povrchu prezentují antigeny buňkám specifického imunitního systému<sup>2</sup>. Buňkami s cytotoxickým účinkem jsou přirozeně zabíječské buňky (NK buňky, z angl. natural killer

cells), které odhalují a likvidují viry napadené, nádorové či jinak poškozené buňky. Likvidují tedy buňky těla vlastní, pokud poznají, že tyto buňky nejsou v pořádku, čímž chrání zdravé buňky okolní tkáně<sup>1</sup>. Proteiny humorální složky imunity mohou být různými způsoby aktivovány, načež účinkují jako spouštěč kaskády, která je ukončena smrtí patogenu. Napomáhají tak buněčné složce imunity<sup>1,2</sup>.

### 1.3 NK buňky

NK buňky jsou buňky nespecifické imunity. Jedná se o velké granulární lymfocyty, jejichž lytické granule obsahují proteolytické enzymy a pomocné proteiny, díky kterým mají NK buňky cytotoxické schopnosti. Stejně jako cytotoxické T-lymfocyty mají NK buňky na starosti likvidaci tělu vlastních buněk, které byly napadeny viry, buněk nádorových či jiným způsobem poškozených<sup>1,4</sup>. U těchto poškozených buněk vyvolávají řízenou buněčnou smrt, čímž chrání okolní zdravou tkáň před rozšířením infekce<sup>5</sup>. NK buňky účinkují bez předchozí senzitivace antigenem, bez proliferace a diferenciaci, a tudíž rychle, již v řádu hodin, čímž se liší od cytotoxických T-lymfocytů, které zastávají podobnou funkci, ovšem účinkují až po několika dnech<sup>1,2</sup>. NK buňky mají také schopnost imunomodulace. Produkují chemokiny a cytokiny, tedy peptidové či malé proteinové molekuly, které působí na ostatní buňky imunitního systému včetně buněk specifické imunity<sup>1,4</sup>. Příkladem cytokinů produkovaných NK buňkami jsou například IFN- $\gamma$  (interferon gama) aktivující fagocytickou schopnost makrofágů, GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů) stimulující kmenové buňky k produkci granulocytů, či tumor nekrotizujícího faktoru TNF- $\alpha$ <sup>5</sup>. Díky tomuto vlivu na buňky specifické imunity lze říci, že NK buňky stojí na pomezí obou imunit, specifické i nespecifické.

NK buňky se diferencují z hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni přes lymfoidní progenitor stejně jako lymfocyty (obrázek 1, str. 12)<sup>6</sup>. K jejich dozrání dochází kromě kostní dřeni také v sekundárních lymfatických uzlinách a zralé buňky se poté vyskytují v kostní dřeni, lymfatických uzlinách, slezině, děloze, játrech a také v krevním řečišti, kde tvoří přibližně 10 % všech cirkulujících lymfocytů<sup>4</sup>.



**Obrázek 1: Schéma diferenciace buněk kostní dřeně.** Jednotlivé typy buněk imunitního systému jsou odvozeny od hematopoetické kmenové buňky, která se diferenciuje na myeloidní a lymfoidní progenitor. Z lymfoidního progenitoru vznikají NK buňky, T- a B-lymfocyty a plazmatické buňky, tedy buňky specifické imunity, z myeloidního progenitoru naopak buňky imunity nespecifické. Kromě buněk imunitního systému se z myeloidního progenitoru diferenciuje také další krevní buňky jako erytrocyty či trombocyty.

### 1.3.1 Regulace a mechanismus aktivity NK buněk

Hlavním způsobem regulace cytotoxické aktivity NK buněk je rovnováha mezi jejich povrchovými aktivačními a inhibičními receptory a signály, které tyto receptory přijímají od jejich ligandů. Zdravé buňky exprimují na svém povrchu určité struktury, které jsou známkou toho, že je buňka v pořádku. Typickým příkladem je MHC-I (hlavní histokompatibilní komplex třídy I, z angl. major histocompatibility complex class I). Pokud NK buňky tyto struktury pomocí svých inhibičních receptorů na povrchu buňky rozeznají, zůstávají v klidu. U buněk, které jsou například napadeny virem, je exprese těchto ligandů potlačena<sup>7</sup>. Pokud NK buňka narazí na buňku, která MHC I postrádá, pozná, že je potřeba ji zahubit. Tento způsob regulace cytotoxické aktivity NK buněk je nazýván jako tzv. „missing-self“ hypotéza<sup>7</sup>.

Další hypotézou je tzv. „induced-self“ hypotéza, která se naopak týká aktivačních receptorů NK buněk a jejich ligandů, jimiž jsou struktury, které jsou exprimovány především na poškozených buňkách, případně i na buňkách zdravých, avšak jen ve velmi malé míře<sup>8</sup>. Pokud tedy aktivační receptor na buňce naleznе ligand značící poškození, buňku opět zlikviduje.

Kromě aktivace pomocí buněčných ligandů mohou být NK buňky aktivovány také působením rozpustných molekul jako jsou například interferony I. typu či interleukiny<sup>9</sup>. Mezi ligandy aktivačních receptorů patří také protilátky, kterými mohou být buňky určené k likvidaci označeny. Imunitní buňky tyto protilátky rozpoznávají a poté hubí. Na tomto principu fungují cytotoxické T-lymfocyty i NK buňky, které váží Fc-fragment protilátky pomocí aktivačního receptoru CD16<sup>1</sup>.

Mechanismus cytotoxického účinku NK buňky spočívá v tom, že buňka po aktivaci exocytuje lytické granule, které obsahují proteiny perforin a granzymy<sup>10</sup>. Perforin narušuje buněčnou stěnu likvidované buňky a napomůže tak vstupu granzymů, což jsou enzymy, které způsobí apoptózu, tedy programovanou buněčnou smrt napadené buňky.

#### 1.4 NK buněčné receptory

Systematické označení NK buněk je CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>. Toto označení vypovídá o povrchových znacích (proteinech) specifických pro NK buňky. Označení CD3<sup>-</sup> vypovídá o absenci receptoru CD3 (cluster of differentiation 3), který je naopak přítomen u cytotoxických T-lymfocytů, CD56<sup>+</sup> potom poukazuje na přítomnost molekuly CD56 (neural cell adhesion molecule). Molekula CD56 je na povrchu NK buněk exprimována v různé míře, což je také určující pro dělení NK buněk do podkategorií CD56<sup>dim</sup> a CD56<sup>bright</sup>. NK buňky z podkategorie CD56<sup>bright</sup> se vyznačují vysokou mírou exprese CD56 a ty z podkategorie CD56<sup>dim</sup> se naopak vyznačují menším množstvím těchto povrchových struktur<sup>4,5</sup>. Buňky z těchto podskupin se také liší svým výskytem v rámci lymfatických tkání, kdy CD56<sup>bright</sup> buňky se vyskytují především v lymfatických uzlinách či krčních mandlích a buňky CD56<sup>dim</sup> především v krvi, kostní dřeni či slezině. CD56<sup>bright</sup> rychle a účinně produkují chemokiny a cytokiny, ovšem nevynikají v cytotoxicitě, u CD56<sup>dim</sup> buněk je tomu naopak<sup>4</sup>. Typickou povrchovou strukturou je také receptor NKp46<sup>5</sup>.

Podle funkce je možné receptory NK buněk rozdělit na receptory aktivační a inhibiční, podle toho, jakou funkční jednotku receptor obsahuje. Funkční jednotkou aktivačních receptorů je strukturní motiv ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif), který sestává z tandemově se opakujícího pořadí aminokyselin YXXL (X = libovolná aminokyselina) nebo motiv hemi-ITAM, který je tvořen pouze jednou konzervovanou sekvencí aminokyselin YXXL<sup>3</sup>. Doména ITAM (příp. hemi-ITAM) ovšem nemusí být přímou součástí receptoru, ale může být k receptoru připojena pomocí opačně nabitých polárních aminokyselin jako součást

tzv. adaptorového proteinu. Receptor ve své transmembránové části obsahuje kladně nabitý lysin či arginin a adaptorová molekula záporně nabitý aspartát<sup>9,11</sup>. Adaptorovým proteinem může být například Dap12 nebo Fc-receptor gamma<sup>3,12</sup>. Důležitou aminokyselinou ve funkční sekvenci YXXL je tyrosin, který je po navázání ligandu na receptor fosforylován, což spouští kaskádu signálů, která vede až k aktivaci imunitní reakce buňky<sup>3</sup>.

Inhibiční receptory se vyznačují tím, že součástí jejich cytoplazmatické domény je konzervovaný motiv ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)<sup>8</sup>. Fosforylace tyrosinu na této struktuře naopak aktivuje proteiny, které inhibují aktivační kaskádu popsanou výše u receptorů aktivačních. Existují ovšem i jiné možnosti. Některé aktivační či inhibiční receptory neobsahují ani motiv ITAM ani motiv ITIM a ke spuštění signalizační kaskády používají jiné dráhy, například přes serin/threonin kinázu u receptoru RAF-1<sup>3</sup>. Jedna konzervovaná doména podobná lektinům typu C ovšem nemusí být vyhrazena pouze k aktivaci nebo pouze k inhibici. Její funkce se může měnit v závislosti na konkrétním ligandu nebo na mikroprostředí<sup>3</sup>.

Pokud se na NK buněčné receptory díváme ze strukturního hlediska, jedná se o glykoproteiny, které řadíme buď k imunoglobulinové nadrodině, kam patří zabíječské receptory (KIR, killer immunoglobulin-like receptors) a receptory přirozené cytotoxicity (NCR, natural cytotoxicity receptors), či k nadrodině receptorů podobným lektinům C-typu (CLR, C-type lectin-like receptors)<sup>9</sup>. Neexistuje však přímá spojitost mezi funkcí a strukturou, tedy do jedné strukturní receptorové rodiny mohou patřit jak receptory aktivační, tak inhibiční.

#### **1.4.1 Receptory imunoglobulinové nadrodiny**

Receptory patřící do imunoglobulinové nadrodiny se vyznačují jednou či více imunoglobulinovými vazebnými doménami. Dělíme je do dvou podskupin, KIR a NCR.

Receptory KIR jsou většinou inhibičními receptory, které rozpoznávají MHC-I a inhibují aktivaci cytotoxicity a to velmi specificky, rozpoznají totiž změnu i v jediné aminokyselině MHC-I. KIR ovšem mohou být i receptory aktivačními<sup>13</sup>.

Druhou podskupinou jsou NCR. Jedná se o transmembránové receptory typu I. Mohou mít jak aktivační tak inhibiční funkci<sup>11</sup>. Jejich ligandy jsou například povrchové proteoglykany nádorových buněk či struktury typické pro buněčnou stěnu bakterií či virů<sup>14</sup>.

### 1.4.2 Rodina receptorů podobných lektinům C-typu

Receptory z nadrodiny receptorů podobných lektinům C-typu (CLR) jsou glykoproteiny, které jsou definovány jako transmembránové receptory obsahující minimálně jednu konzervovanou doménu podobnou lektinům C-typu (CTLD, C-type lectin-like domain)<sup>3,15,16</sup>. Slouží k rozpoznávání a vazbě sacharidových, proteinových i jiných ligandů, čímž ovlivňují imunitní odpověď, mezibuněčnou adhezi a další důležité signální a regulační děje<sup>17</sup>. Důležitou funkcí je rozpoznávání strukturních motivů charakteristických pro patogeny (PAMP, pathogen-associated molecular patterns), označovaných také jako motivy charakteristické pro mikroby (MAMP, microbial-associated molecular patterns)<sup>18</sup> a strukturních motivů charakteristických pro poškozenou tkáň (DAMP, damage-associated molecular patterns)<sup>3</sup>. Jako PAMP, resp. MAMP se označují vysoce konzervované struktury, které se vyskytují na povrchu buněk patogenů, a které slouží jako jejich jakési univerzální poznávací znamení. V případě bakterií se může jednat o lipoproteiny, lipopolysacharidy, peptidoglykany či bakteriální nukleové kyseliny. Viry jsou rozpoznávány především skrze jejich nukleové kyseliny, případně glykoproteiny. Patogeny z řad plísní a hub jsou rozpoznávány díky sacharidům z jejich buněčné stěny<sup>18</sup>. DAMP jsou molekuly, které se uvolňují ze stresovaných buněk, u nichž došlo k rozrušení plazmatické membrány, typicky v důsledku nekrózy buňky<sup>18</sup>. V důsledku nekrózy se nekontrolovaně vylévá obsah buňky včetně enzymů do jejího okolí, což může mít za následek poškození okolní zdravé tkáně. Obě struktury jsou tedy důležitým ukazatelem ohrožení organismu a jejich včasné rozpoznání je potřebné k tomu, aby mohla být zvolena správná a rychlá imunitní odpověď. Důsledkem signalizační kaskády může být například produkce chemokinů a cytokinů, pro- nebo protizánětlivá odpověď, antimikrobiální odpověď, indukce fagocytózy a další děje podle potřeby<sup>3,18</sup>.

### 1.4.3 Systematické zařazení

Název nadrodiny receptorů podobných lektinům typu C je odvozen od skupiny lektinů C-typu. Lektiny jsou obecně proteiny neenzymatické povahy, které jsou schopny rozpoznávat a vázat sacharidové části glykoproteinů, a to vysoce specificky. Obsahují konzervovanou doménu rozpoznávající sacharidy<sup>19</sup>. Pro proteiny ze skupiny lektinů typu C je charakteristické, že sacharidy vážou za pomoci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, čímž se od jiných typů lektinů liší. Proteiny z rodiny receptorů podobných lektinům typu C se lektinům typu C podobají strukturou, ovšem rozdílem je to, že rozpoznávání a vazba sacharidů v jejich případě probíhá nezávisle na vápenatých iontech. Strukturně charakteristická doména těchto receptorů se označuje jako doména podobná

lektinu typu C (CTLD). Receptory podobné lektinům typu C navíc spíše než sacharidy váží proteiny<sup>20</sup>. Doména CTLD má kompaktní globulární strukturu, jejíž součástí jsou dvě proteinové smyčky, které jsou propojeny dvěma disulfidickými můstky. Struktura domény CTLD se u jednotlivých receptorů může mírně různit a podle těchto typů CTLD struktury dělíme receptory do 17 podskupin<sup>15</sup>.

## **1.5 Protein Clr-b**

### **1.5.1 Rodina receptorů NKR-P1**

Součástí nadrodiny receptorů podobných lektinům C-typu jsou receptory z rodiny NKR-P1. Tyto receptory jsou exprimovány na povrchu NK a NKT buněk<sup>21</sup>. Jedná se o transmembránové proteiny s dvěma homologickými podjednotkami propojenými disulfidickými můstky, které byly původně identifikovány na myších buňkách<sup>21</sup>. Geny pro receptory této rodiny jsou součástí NK genového komplexu (NKC, natural killer gene complex), který se u potkanů nachází na chromozomu 6, u lidí potom na chromozomu 12<sup>21,22</sup>. Z potkaních receptorů se do této rodiny řadí receptory inhibiční NKR-P1B a NKR-P1B a aktivační receptory NKR-P1A, NKR-P1C a NKR-P1F<sup>21</sup>.

### **1.5.2 Protein Clr-b**

Ligandem potkaních inhibičních receptorů NKR-P1B a NKR-P1D je protein D11 z další rodiny proteinů s doménou podobnou lektinům typu C, jiným označením také Clr-b (C-type lectin-like protein B), či Ocil (osteoclast inhibitory lectin)<sup>24</sup>. Tento protein (dále jen Clr-b) je potkaní membránový receptor z nadrodiny receptorů podobných lektinům C-typu, patří tedy do stejné strukturní skupiny jako jeho receptory<sup>19</sup>. Jedná se proto o tzv. „self-ligand recognition“ neboli rozpoznávání proteinu tělu vlastního<sup>23</sup>. Mezi účinky proteinu Clr-b patří inhibice diferenciací osteoklastů a také inhibice cytotoxické aktivity zprostředkované NK buňkami. Druhý zmíněný účinek je zprostředkován pomocí vazby Clr-b na jeho receptor NKR-P1B a NKR-P1D<sup>19</sup>.

Gen pro protein Clr-b se, stejně jako geny pro NKR-P1, nachází v NKC. Stejně jako MHC I je Clr-b exprimován na povrchu zdravých buněk a u buněk napadených virem, rakovinných buněk či buněk jinak poškozených dochází k potlačení jeho exprese<sup>21</sup>. V souvislosti s NK buněčnými receptory z rodiny NKR-P1 se tedy jedná o ligand s inhibičním účinkem a pokud je na povrchu buňky rozpoznán, je zastavena aktivace cytotoxicity NK buněk. Pokud ligandy Clr-b chybí, NK buňka se stává cytotoxicky aktivní. Jedná se tedy o „missing-self“ rozpoznávání, konkrétně o



„missing-self rozpoznávání nezávislé na MHC-I“<sup>21</sup>. Pomocí značení monoklonálními protilátkami 4A6, které jsou specifické pro Clr-b, byla přítomnost tohoto proteinu potvrzena na povrchu buněk téměř všech tělních tkání kromě mozku, což potvrzuje to, že role tohoto proteinu je důležitá pro ochranu buněk před nežádanou likvidací imunitními buňkami<sup>21</sup>.

Fakt, že Clr-b působí na NK buňky inhibičně, byl potvrzen například ve studii, v níž byly zkoumány myši, kterým chyběl receptor NKR-P1B, tedy receptor rozpoznávající ligand Clr-b. U NK buněk těchto myší nemohlo docházet k inhibici cytotoxické aktivity, neboť se ligand Clr-b neměl kam navázat. Tímto bylo potvrzeno, že receptor NKR-P1B je receptorem inhibičním a tedy i ligand Clr-b má inhibiční účinky<sup>22</sup>.

### 1.5.3 Ligandy proteinu Clr-b

Mezi další poznatky o proteinu Clr-b patří to, že jeho vazba na příslušné receptory probíhala nezávisle na vápenatých iontech<sup>19</sup>. U proteinu Clr-b byla také potvrzena lektinová funkce, tedy schopnost vázat sacharidy<sup>19</sup>. Testovány byly vazby s různými polysacharidy a vazba byla potvrzena u rozpustných sulfatovaných glykosaminoglykanů o vysoké molekulové hmotnosti (fukoidany, karagenan lambda typu, dextran sulfát). Naopak nebyla potvrzena u nesulfatovaného dextranu, sialované kyseliny hyaluronové a u monosacharidů v imobilizované ani rozpustné formě, či u glykosaminoglykanů s nízkou molekulovou hmotností (např. heparin) v imobilizované formě<sup>19</sup>.

## 1.6 Glykosylace proteinů

Glykosylace je nejrozšířenější posttranslační modifikací proteinů. Spočívá v připojení sacharidových řetězců na proteinovou kostru přes určité aminokyselinové zbytky. Glykosylace proteinů má vliv na funkčnost, stabilitu, strukturu či lokalizaci proteinu v buňce, významně se uplatňuje v buněčném rozpoznávání. Enzymy, které zprostředkovávají tyto modifikace, se u eukaryot nachází v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Připojované sacharidy mohou být různě dlouhé, mohou být složeny z různých monosacharidů i jejich derivátů a izomerů. Řetězce mohou být jak rozvětvené, tak nerozvětvené a výsledný oligosacharid může obsahovat různé vazby mezi jednotlivými monosacharidy. To vše velmi významně rozšiřuje proteom organismu nad rámec proteinů kódovaných nukleovými kyselinami, tj. v genomu<sup>25</sup>.

### 1.6.1 Mechanismus glykosylace

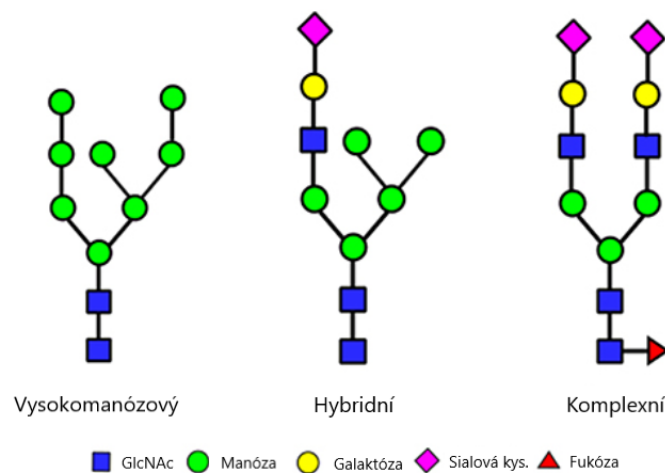
N-glykosylace u eukaryot sestává ze tří kroků: (1) sestavení oligosacharidového řetězce, (2) připojení tohoto řetězce na polypeptidový řetězec a (3) následné úpravy vzniklého glykoproteinu. Celý proces bývá jinak také dělen do dvou fází, přičemž do primární fáze spadá vznik samotného glykoproteinu a do druhé jeho úpravy.

Syntéza glykoproteinu začíná sestavením oligosacharidového řetězce z jednotlivých monosacharidů. Tento krok probíhá v endoplazmatickém retikulu buňky, v jehož membráně jsou zanořeny molekuly lipidu dolicholu, který v celém procesu zastává klíčovou roli, neboť právě na něj je vázán vznikající sacharidový řetězec. Dolichol je molekula složená z 15–19 isoprenových jednotek spojených v řetězec, jenž je zanořen do endoplazmatické membrány. Hlava molekuly vyčnívá na cytozolární stranu a je zakončena fosfátovou skupinou. Aby byl dolichol schopen navázat první molekulu sacharidu, musí být nejprve fosforylován reakcí s druhou molekulou dolichol-fosfátu, která mu fosfát předá. Sacharidy musí být před vazbou na dolichol-pyrofosfát aktivovány pomocí nukleosidtrifosfátu či dolichol-fosfátu<sup>25</sup>.

Sacharidy se připojují podle přesného pořadí a vytváří tak jakousi základní strukturu. Na dolichol se vážou nejprve dvě aktivované molekuly N-acetylglukosaminu (GlcNAc), poté 5 manóz, v následujícím kroku další 4 manózy a 3 glukózy. Tento tzv. vysokomanózový oligosacharid ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) je poté přenesen na polypeptidový řetězec a dalším úpravám podléhá sacharid již jako součást glykoproteinu. Dvě molekuly GlcNAc aktivovaného UDP (tedy UDP-GlcNAc) jsou na dolichol připojeny na cytozolární straně membrány ER, stejně tak jako pět molekul GDP-Man. Tímto je dokončena první fáze syntézy. Následně je celá vzniklá molekula překlomena pomocí enzymů flipáz do lumen ER, kde syntéza pokračuje navázáním čtyř dalších manóz a následně tří glukóz, které jsou před navázáním na řetězec aktivovány vazbou na dolichol-fosfát. Pomocí dolicholu se tyto molekuly dostávají přes membránu ER. Následuje přenos tohoto základního oligosacharidu na polypeptid, konkrétně na amidový dusík asparaginu. Aby mohl být na asparagin navázán oligosacharid, musí být splněny určité podmínky. Glykosylovaný asparagin se musí nacházet v okolí konkrétních aminokyselin, vhodné sekvence jsou Asn-X-Ser, Asn-X-Thr, případně také Asn-X-Cys (kde X je libovolná aminokyselina kromě prolinu), což souvisí se specifitou enzymu oligosacharyltransferázy. Další podmínkou je vhodné umístění v prostoru. Glykosylovány jsou pouze asparaginy na povrchu proteinu, resp. polypeptidu, což je způsobeno tím, že polární molekuly sacharidů by

se s hydrofobní vnitřní částí proteinů odpuzovaly. S tím souvisí i sekvence, kterou glykosylace vyžaduje. Serin, threonin i cystein jsou polární aminokyseliny, a právě proto se nachází na povrchu molekuly a nikoli uvnitř. Někdy se ovšem dovnitř přeci jen dostanou, a to proto, že ještě před navázáním glykanu na peptid dojde ke sbalení peptidu<sup>25</sup>.

Následuje sestřih a úpravy oligosacharidu již připojeného k proteinovému řetězci. Tento proces začíná v endoplazmatickém retikulu, kde byl prekurzor glykoproteinu sestaven, a pokračuje v Golgiho aparátu. Z původní struktury vysokomanóзовého oligosacharidu  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  jsou postupně odštěpeny molekuly glukózy a některé molekuly manózy. Po odštěpení glukózy a manózy se molekula přesouvá do cis-kompartmentu Golgiho aparátu, kde jsou odštěpeny další tři manózy. Další dvě molekuly manózy jsou odštěpeny ve středním kompartmentu, kde také proběhne připojení dvou molekul GlcNAc. Molekula se poté přesouvá do trans kompartmentu Golgiho aparátu a jsou na ni navázány dvě galaktózy a konečně dvě kyseliny sialové, čímž je syntéza kompletní. Na každém ze zmíněných kroků se podílí příslušné specifické enzymy. Odštěpování monosacharidů zprostředkovávají exoglykosidázy, navazování nových potom zprostředkovávají glykosyltransferázy. Takovýto N-glykan je označován jako komplexní glykan vzhledem k pestrosti monosacharidů, které obsahuje. Dalšími typy N-glykanů jsou vysokomanóзовý a hybridní typ<sup>25</sup>. Struktury jednotlivých typů N-glykanů jsou znázorněny na obrázku 2 (str. 19)<sup>26</sup>. V buňkách HEK293T se vyskytují komplexní glykany.



**Obrázek 2: Příklady struktur základních typů N-glykanů.** Všechny struktury obsahují společnou část: dvě molekuly N-acetylglukosaminu a tři molekuly manózy. Vysokomanóзовý typ kromě tohoto základního motivu obsahuje pět dalších manóz. Hybridní a komplexní typ navíc kromě základní struktury obsahují různý počet dalších molekul manózy, N-acetylglukosaminu, galaktózy a sialové kyseliny. Komplexní typ navíc zpravidla obsahuje i molekulu fukózy.

## 1.7 Fluorované analogy monosacharidů

Termínem fluorované analogy monosacharidů jsou v této práci označeny sloučeniny, které jsou odvozeny od struktur monosacharidů (konkrétně od glukózy, galaktózy či fukózy) a jejichž jedna z hydroxylových skupin je substituována atomem fluoru (struktura znázorněna na obrázku 3, str. 23). U určitých těchto sloučenin byla prokázána schopnost inhibice glykosylace větvených N-glykanů či inhibice biosyntézy určitých glykanových struktur jako je například sialyl-Lewis<sup>x</sup> a sialyl-Lewis<sup>a</sup>, heparan či chondroitin sulfát nebo laktosamin<sup>27,28</sup>. Se změnami v glykosylaci se pojí změny v některých buněčných pochodech, jako adheze buněk pomocí selektinů, snížení migrace lymfocytů do míst s výskytem zánětu, či snížení tzv. imunitního úniku rakovinných buněk cytotoxickým buňkám. Objevují se návrhy využít inhibici glykosylace jako možnou terapii některých chorob, jako je roztroušená skleróza nebo některá nádorová onemocnění<sup>29,30</sup>.

Molekuly zkoumané v rámci této bakalářské práce jsou deriváty N-acetylglukosaminu, N-acetylgalaktosaminu či fukózy. U některých z nich je schopnost inhibice glykosylace již potvrzena (4F-Ac<sub>3</sub>-GlcNAc, 3F-Ac<sub>3</sub>-GlcNAc, 4F-Ac<sub>3</sub>-GalNAc, 6F-Ac<sub>3</sub>-GalNAc, 2F-Ac<sub>3</sub>-Fuc) a některé z nich v tomto ohledu ještě nebyly testovány (6F-Ac<sub>3</sub>-GlcNAc, 3F-Ac<sub>3</sub>-GalNAc). Struktury všech zkoumaných molekul jsou zobrazeny na obrázku Obrázek 3 (str. 23).

V souvislosti s ovlivněním nádorového bujení byly fluorované monosacharidy zkoumány již v devadesátých letech. V rámci studia rakoviny vaječníků byly testovány sloučeniny 4-fluoro-N-acetylglukosamin (**4F-GlcNAc**) a 3-fluoro-N-acetylglukosamin (**3F-GlcNAc**) jako látky, které by potenciálně mohly zakončovat či jinak modifikovat rostoucí sacharidové řetězce glykoproteinu a zabraňovat jeho prodlužování. Předmětem zkoumání byl vliv těchto sloučenin na glykosylaci povrchových struktur na nádorových buňkách a adheze buněk pomocí těchto struktur na molekuly galektinu okolních tkání<sup>31</sup>. Tím, že nádorové buňky adherují k okolním buňkám, totiž rozšiřují ložiska rakoviny. Na lidských buňkách rakoviny vaječníků A-121 byly identifikovány struktury lamp-1 a lamp-2, což jsou glykosylované proteiny, jejichž struktura obsahuje polylaktosaminové řetězce složené z opakujících se jednotek N-acetylaktosaminu. N-acetylaktosamin je ligandem molekuly galektinu, tedy proteinového receptoru, který rozpoznává sacharidy, systematicky se tedy jedná o lektin. Galektiny jsou exprimovány na extracelulární bazální lamině buněk mnoha tělních tkání. U nádorových buněk A-121 ošetřených těmito sloučeninami byla pozorována inhibice glykosylace struktur lamp, což vedlo

ke snížení schopnosti adheze buněk na okolní tkáň a tedy i ke snížení metastatických schopností nádorových buněk<sup>31</sup>. Největší účinek byl pozorován při aplikaci obou látek dohromady, kdy nebyla pozorována téměř žádná adheze. Byla proto vyslovena domněnka, že by bylo možné tyto molekuly využívat při léčbě rakoviny jako doplněk chemoterapie a operací. Stejný efekt **4F-GlcNAc** na adhezi rakovinných molekul přes struktury lamp a přes galektin byl o dva roky později pozorován na buňkách HT-29 rakoviny tlustého střeva. Pozorována byla také nižší molekulová hmotnost struktur lamp, což bylo způsobeno jejich redukovanou glykosylací<sup>32</sup>.

Sloučenina **4F-GlcNAc** byla testována také jako potenciální inhibitor migrace leukocytů do zanícené pokožky. Ke vstupu leukocytů do pokožky dochází díky E-selektinu na povrchu jejích buněk. Leukocyty na svém povrchu naopak exprimují antigen asociovaný s kožními lymfocyty (CLA, cutaneous lymphocyte-associated antigen), který se na E-selektin váže. Modulační struktury CLA a tím pádem i znemožnění vazby na E-selektin se tedy jevila jako dobrý cíl k ovlivnění migrace lymfocytů do zanícené pokožky. Fluorovaný analog 4F-GlcNAc se v tomto ohledu ukázal jako účinný. Navíc se molekula ukázala být netoxická a neovlivňující metabolismus lymfocytů. Teorie, které vysvětlovala princip inhibice glykosylace zněla tak, že se molekula inhibitoru zabudovává do struktury vznikajícího sacharidu a kvůli substitucí hydroxylové skupiny fluorem její syntézu zastavuje<sup>33</sup>.

Dále byl vliv **4F-GlcNAc** testován v souvislosti s tzv. imunitním únikem nádorových buněk, což je strategie, pomocí níž se nádorové buňky vyhýbají zlikvidování cytotoxickými imunitními buňkami. Činí tak pomocí galektinů. Galektiny jsou proteiny, které vážou sacharidové ligandy, podílí se na signalizaci, regulaci imunitní odpovědi, zánětu či apoptózy. Nádorové buňky exprimují galektin-1. Ligandem galektinu-1 jsou N-acetyllaktosaminy exprimované na povrchu cytotoxických leukocytů. Když dojde k vazbě galektinu-1 a N-acetyllaktosaminu, je indukována apoptóza leukocytu, čímž se nádorová buňka zachrání před tím, aby ji leukocyt zlikvidoval. Experiment stál na předpokladu, že když dojde k omezení syntézy N-acetyllaktosaminů na povrchu leukocytu, buňky se nebudou schopny navázat na galektin-1 a tím se vyhnou apoptóze. Zvolený inhibitor 4F-GlcNAc byl aplikován intraperitoneálně myším s rakovinou. Bylo pozorováno, že leukocyty byly ochráněny před apoptózou indukovanou nádorovými buňkami díky tomu, že došlo ke snížení exprese

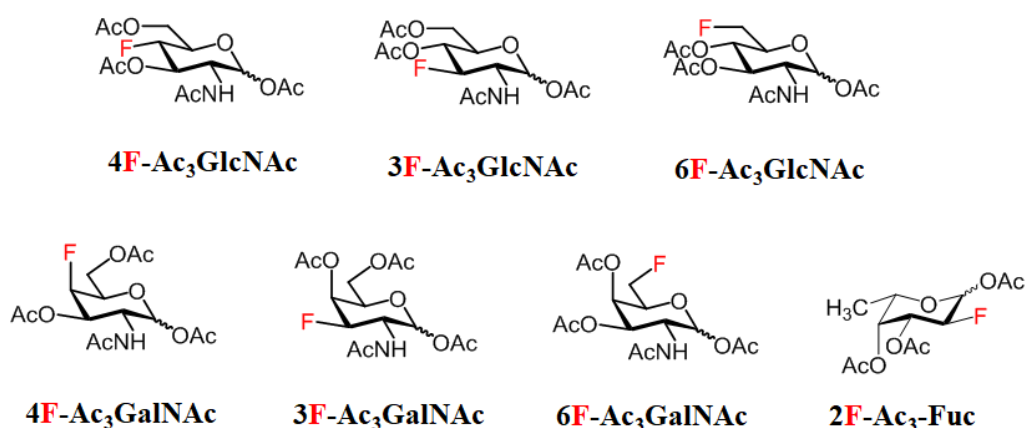
N-acetylglukosaminů na leukocytech a nedocházelo tedy k vazbě na nádorovými buňkami exprimovaný galektin-1<sup>30</sup>.

**4F-GlcNAc** působí také jako inhibitor biosyntézy glykosaminoglykanů s obsahem GlcNAc či GalNAc, jakými jsou i heparan a chondroitin sulfát<sup>28,29</sup>. Ve studii, která zkoumala vliv tohoto inhibitoru na glykosylaci na buňkách hladkého svalstva dýchacích cest, se předpokládalo, že k inhibici biosyntézy heparan sulfátu dochází na principu ukončení řetězce molekulou 4F-GlcNAc, na niž se nemohou navazovat další monosacharidy pomocí 1,4-glykosidické vazby a řetězec tím pádem nemůže dál růst. Předpokládaným klíčovým krokem inhibice biosyntézy chondroitin sulfátu byla přeměna UDP-GlcNAc, tedy aktivované formy N-acetylglukosaminu, na UDP-GalNAc, kterou zprostředkovává enzym 4-epimeráza. Podle této teorie dojde k vyčerpání substrátu UTP pro vznik aktivovaného GlcNAc, neboť zároveň dochází k aktivaci sloučeniny 4F-GlcNAc<sup>28</sup>. V jiné studii se ukázalo, že inhibice biosyntézy proteoglykanů složených z proteinového jádra a postranních řetězců chondroitin sulfátu (CSPG, chondroitin sulphate proteoglycans) pomocí 4F-GlcNAc měla pozitivní účinky při remyelinizaci nervových vláken neuronů, které byly poškozeny v důsledku roztroušené sklerózy. CSPG totiž remyelinizaci brání a to tím, že znemožňuje migraci prekurzorů do místa léze<sup>29</sup>. V této studii byl testován také difluorovaný analog 4,4-diF-GlcNAc, jehož inhibiční účinek byl ještě větší než analogu monofluorovaného<sup>29</sup>.

U sloučeniny **3F-GlcNAc** byla prokázána schopnost inhibice biosyntézy hyaluronanu, lineárního polysacharidu složeného z opakujících se kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu. Hyaluronan je součástí receptorů na povrchu nádorových buněk a podílí se mimo jiné na proliferaci těchto buněk. Návrh experimentu vycházel z předpokladu, že se fluorované analogy monosacharidů zabudují do struktury vznikajícího hyaluronanu a zamezí dalšímu růstu sacharidového řetězce, neboť místo hydroxylové skupiny, přes kterou by se měl navázat další sacharid, je na uhlíku C3 atom fluoru. Snížení biosyntézy hyaluronanu vedlo také k výraznému snížení proliferace nádorových buněk, neboť na tomto procesu se povrchové molekuly hyaluronanu podílí<sup>34</sup>.

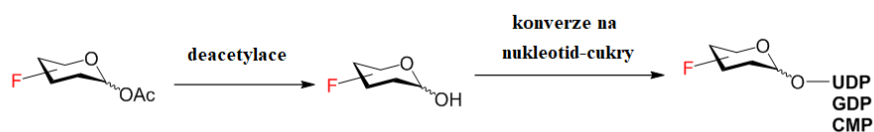
Přídavek **4F-GalNAc** k růstovému médiu pro buňky HL-60 zapříčinil redukci exprese epitopu HECA-452. Struktura HECA-452 je součástí ligandu 1 glykoproteinu P-selektinu, tedy ligandu, díky kterému buňky adherují na P-selektin, což ve výsledku snížilo buněčnou adhezi, což je žádoucí v léčbě zánětlivých onemocnění<sup>27</sup>. Dalším potvrzeným inhibitorem glykosylace z řady

fluorovaných analogů monosacharidů je **6F-GalNAc**, u něž byla pozorována inhibice glykosylace biosyntézy heparan sulfátu a chondroitin sulfátu. Spolu s omezením biosyntézy těchto struktur došlo také k redukci angiogeneze, neboť se zmíněné struktury účastní signálních drah růstových faktorů, které angiogenezi indukují<sup>35</sup>. Jako účinný inhibitor fukosylace a sializace se ukázal fluorovaný analog fukózy, **2F-Fuc**. Účinek byl pozorován na myeloidních buňkách na struktuře sialyl-Lewis<sup>x</sup>, která je fukosylována a sialována. Pomocí struktury sialyl-Lewis<sup>x</sup> se buňky váží na selektiny. Snížení glykosylace struktury sialyl-Lewis<sup>x</sup> tedy vedlo ke snížení vazby buněk na selektiny<sup>36</sup>. Molekuly **6F-Ac<sub>3</sub>-GlcNAc** a **3F-Ac<sub>3</sub>-GalNAc** zatím nebyly testovány jako potenciální inhibitory glykosylace.



**Obrázek 3: Přehled struktur sloučenin potenciálních inhibitorů glykosylace, použitých v této bakalářské práci.** Jedná se o peracetylované sloučeniny odvozené od glukózy, galaktózy a fukózy, které mají na různých pozicích hydroxylovou skupinu substituovanou fluorem.

Pro účinnou inhibici *in vivo* je nezbytné, aby molekuly fluorovaných monosacharidů měly peracetylované jejich hydroxylové skupiny. To snižuje jejich hydrofobicitu a umožňuje vstup do buňky přes plazmatickou membránu<sup>28,29,35</sup>. Po průchodu peracetylované molekuly do buňky jsou acetyly opět hydrolyticky odštěpeny. Fluorovaný monosacharid je poté aktivován molekulou nukleosidtrifosfátu. Schéma reakce je znázorněno na obrázku 4 (str. 24).



**Obrázek 4: Předpokládané reakce peracetylovaného fluorovaného analogu monosacharidu po vstupu do buňky.** Po vstupu peracetylovaného fluorovaného monosacharidu dochází k deacetylaci pomocí cytozolických esteráz. Deacetylovaný monosacharid je poté aktivován pomocí nukleosidtrifosfátů.

Původní předpoklady o tom, že se fluorované monosacharidy zabudovávají do sacharidových struktur nebyly potvrzeny. Aktivované fluorované monosacharidy tedy neslouží jako substrát pro příslušné glykosyltransferázy, pouze se akumulují v buňce, což zabraňuje vzniku přirozených aktivovaných monosacharidů, tedy stavebních jednotek vznikajícího sacharidového řetězce a glykosylace je tedy utlumena<sup>37</sup>. Je však také možné, že fluorované monosacharidy působí přímo na glykosyltransferázy a inhibují je<sup>28</sup>.

Glykosylace je tedy nezbytná v mnoha buněčných strukturách a zásadní pro mnohé biologické funkce. Inhibicí glykosylace je možné tyto procesy ovlivňovat, což by mohlo mít i určité terapeutické účinky v léčbě různých nemocí. Cílem této bakalářské práce je rekombinantní příprava proteinu Clr-b v prostředí fluorovaných analogů monosacharidů, aby potom na tomto modelovém glykoproteinu mohly být zkoumány případné změny N-glykosylace.



## **2 CÍLE PRÁCE**

Rekombinantní příprava potkaního NK buněčného receptoru Clr-b v buněčné linii HEK293T v přítomnosti sedmi různých fluorovaných analogů monosacharidů jakožto potenciálních inhibitorů glykosylace.

## 3 MATERIÁL

### 3.1 Přístroje a pomůcky

Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Avanti JXN-26	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Allegra X-30R	Beckman Coulter, USA
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	Sigma, USA
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Hemocytometr Corning Cell Counter	Sigma-Aldrich, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor CO <sub>2</sub> MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona INDIGO-Ni	Cube Biotech, Německo
Koncentrátory Amicon Ultra (MWCO 10000)	Millipore, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-Lab, ČR
Laminární box Clean Air	PMV, Nizozemí
Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	VWR, USA
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Německo
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Plastik pro tkáňové kultury	Sigma, USA
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Stericup Quick Release filtr	Millipore, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí 251–2	Sigma, USA

### 3.2 Chemikálie

2-merkapt ethanol	Sigma, USA
-------------------	------------

Akrylamid	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR
Azid sodný	Serva, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
DMSO	Sigma, USA
ExCell 293 médium	Sigma, USA
Kvasničný extrakt	ImunaPharm, Slovakia
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, ČR
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Standard pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
TEMED	Serva, USA
Tris	Roth, Německo
Trypanová modř	Sigma, USA
Trypton	Oxoid, USA

### 3.3 Vektory

pHLsec_FcHis_C1	Mgr. Petra Celadová, PřF UK
pTW5_p27	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK
pTW5_aFGF	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK

### 3.4 Enzymy

RNAsa A	Sigma, USA
---------	------------

### 3.5 Bakteriální a buněčné kmeny

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Thermo Scientific, USA
HEK293T	Prof. Radu Aricescu, UK

### 3.6 Kultivační média

**LB médium:** 1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH 7,4

**ExCell 293:** Komerční médium (Sigma, USA), doplněno o L-glutamin (do 4 mM koncentrace)

### 3.7 Roztoky

**PBS pufr:** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

**PBS pufr s 20 mM imidazolem:** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 20 mM imidazol, pH 7,5

**PBS pufr s 250 mM imidazolem:** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 250 mM imidazol, pH 7,5

**PBS-TK pufr:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0

**HEPES pufr:** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5

**Elektrodový pufr pro SDS-PAGE (10× koncentrovaný):** 250 mM Tris, 1,9 M glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3

**Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 % CBB R-250

**Roztok AA pro SDS-PAGE:** 29 % akrylamid, 1 % N,N' methylenbisakrylamid

**Roztok IPEI:** 10 mg/ml IPEI v PBS-TK

**Roztok trypanové modři:** 0,4 % trypanová modř v PBS-TK

**Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35 % ethanol, 10 % kyselina octová

**Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující (5× koncentrovaný):** 31,5 mM Tris, 10 % (v/v) glycerol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8

**Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující (5× koncentrovaný):** 31,5 mM Tris, 10 % (v/v) glycerol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 10 % (v/v) 2-merkaptoethanol, pH 6,8

## 4 METODY

### 4.1 Příprava médií s obsahem fluorovaných analogů monosacharidů

K dispozici bylo šest fluorovaných derivátů monosacharidů, které byly z praktických důvodů označeny zkratkami. Zásobní množství jednotlivých látek byla zvážena. Navážky byly rozpuštěny v takovém objemu DMSO, abychom získali koncentraci 40 mM. Přehled zkratk pro jednotlivé sloučeniny, jejich relativní molekulové hmotnosti a navážky jsou uvedeny v tabulce 1. Z každého ze vzniklých roztoků bylo odebráno 625  $\mu$ l a naředěno malým množstvím ExCell 293 média a roztoky byly přefiltrovány přes sterilní 0,22  $\mu$ m filtr a poté doplněny do 500 ml čerstvým ExCell 293 médiem, čímž byla získána výsledná 50  $\mu$ M koncentrace fluorovaných analogů v kultivačním médiu. Zbylé objemy roztoků byly uschovány při -80 °C. Ke každému médiu byla přidána antibiotika (100 $\times$  koncentrovaný roztok: 6 mg/ml penicilin, 10 mg/ml streptomycin). Média byla skladována při 4 °C a před každým použitím byla vyhřáta na teplotu 37 °C.

**Tabulka 1:** Seznam použitých sloučenin, jejich zkratk, relativních molekulových hmotností a navážek.

Název sloučeniny	Zkratka	Relativní molekulová hmotnost	Navážka [mg]
4F-Ac3-GlcNAc	F1		28,3
3F-Ac3-GlcNAc	F2		18,0
3F-Ac3-GalNAc	F3		8,9
4F-Ac3-GalNAc	F4	393,31	16,6
6F-Ac3-GlcNAc	F5		19,5
6F-Ac3-GalNAc	F6		15,4
2F-Ac3-Fuc	F7	292,259	42,9

### 4.2 Transformace a velkoobjemová produkce plazmidové DNA

K namnožení plazmidu pHLsec\_FcHis\_C1 byl použit bakteriální kmen *E. coli* DH5 $\alpha$ , který byl skladován při teplotě -80 °C. Manipulace s bakteriálními buňkami probíhala ve sterilních

podmínkách. Alikvot buněk byl rozmražen v ledové lázni. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 50  $\mu$ l této bakteriální suspenze společně s 0,2  $\mu$ l suspenze plazmidu pHLsec\_FcHis\_C1 (0,1-1  $\mu$ g) a směs byla inkubována 30 minut v ledové lázni. Suspenze byla poté nanášena na Petriho misku (předehřátou v inkubátoru na 37 °C) s 1,5 % (w/v) agarem s obsahem ampicilinu (100  $\mu$ g/ml) a byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C. Po inkubaci se na misce rozrostly bakteriální kolonie. Díky obsahu ampicilinu v agaru bylo jisté, že se jedná pouze o bakterie s obsahem transformovaného plazmidu, jelikož ten jim poskytl proti ampicilinu rezistenci. Jedna z kolonií byla přenesena do 2 l Erlenmeyerovy baňky s 500 ml LB média, do nějž bylo přidáno 500  $\mu$ l zásobního roztoku ampicilinu do výsledné koncentrace 100  $\mu$ g/ml. Suspenze byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C a při třepání 180 ot./min. Po inkubaci byla suspenze centrifugována při 4255  $\times$  g, 3 °C, 45 minut. Supernatant byl zlikvidován a pelet pomocí důkladného míchání resuspendován v 10 ml TES pufru. Následovala centrifugace při 4255  $\times$  g, 3 °C, 15 minut. Pelet byl přes noc skladován při -20 °C.

#### 4.2.1 Extrakce DNA

Extrakce DNA byla provedena pomocí komerční soupravy NucleoBond Xtra Maxi. Pelet byl resuspendován ve 12 ml resuspendačního pufru s obsahem RNasy A o výsledné koncentraci 60  $\mu$ g/ml, suspenze byla lyzována přidáním 12 ml lyzačního pufru po dobu přesně 5 minut, neboť při delším působení pufru by mohlo dojít k degradaci DNA. Suspenze byla následně neutralizována 12 ml neutralizačního pufru a centrifugována při 4255  $\times$  g, 4 °C, 30 minut. Kolona NucleoBond Xtra Maxi s filtrem byla ekvilibrována 25 ml ekvilibračního pufru. Suspenze byla následně přes skládaný filtr nanášena na kolonu. Kolona s filtrem byla poté promyta 15 ml ekvilibračního pufru, filtr byl vyjmut a samotná kolona byla promyta ještě 25 ml promývacího pufru. Poté byla DNA z kolony eluována 15 ml elučního pufru, eluát byl zachycen do zkumavky. DNA byla poté precipitována přidáním 10,5 ml isopropanolu předchlazeného na -20 °C a důkladným promícháním na vortexu. Suspenze byla centrifugována v Oak Ridge kyvetách při 16000  $\times$  g, 0 °C, 10 minut. Supernatant byl slit a k peletu byly přidány 4 ml 70 % ethanolu předchlazeného na -20 °C. Následovala centrifugace při 16000  $\times$  g, 0 °C, 10 minut. Supernatant byl slit a pelet vysušen na rolovací třepačce. K DNA byl přidán 1 ml sterilní dH<sub>2</sub>O a v mikrozkušavce byl tento roztok skladován při -20 °C. Kolona byla promyta 10 ml 1M HCl a 1 l dH<sub>2</sub>O, zakryta a skladována ve 20 % ethanolu.

#### **4.2.2 Určení čistoty a koncentrace DNA**

Koncentrace izolované DNA byla určena na spektrofotometru DS-11+ na základě absorbance při 260 nm. Zjištěny byly také poměry absorbancí při 260/280 nm a při 260/230 nm. DNA se považuje za čistou, pokud poměr A260/280 není nižší než 1,8. Poměr A260/230 by se u čisté DNA měl ležet v rozmezí 2,0-2,2. Roztok DNA může být znečištěn proteiny či například pufrů a jinými látkami. Jako slepý vzorek při měření byla použita sterilní deionizovaná voda.

#### **4.3 Manipulace s buněčnou linií HEK293T**

S buněčnými liniemi bylo manipulováno ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Veškerá média byla před použitím vyhřáta na teplotu 37 °C. Práce byla rozdělena na tři etapy. V první z nich byla buněčná kultura kultivována v přítomnosti sloučeniny F1, ve druhé etapě bylo kultivováno 5 kultur, každá z nich v přítomnosti jedné z látek F2–F6. Ve třetí etapě byla buněčná kultura kultivována s látkou F7. V každé etapě byla také jedna kultura kultivována v ExCell 293 médiu bez přídavku jiných látek a proteiny exprimované těmito buňkami byly použity jako kontrola pro jednotlivé etapy.

##### **4.3.1 Suspenzní kultivace**

K práci byla využita buněčná kultura HEK293T, která byla předem již minimálně třikrát s rozestupem 2–3 dní subkultivována v čistém ExCell 293 médiu s přídavkem antibiotik a to až do konečné buněčné koncentrace 0,5 - 2 × 10<sup>6</sup> buněk/ml. Buněčné kultury jsou skladovány při teplotě -80 °C, po rozmrazení jsou proto citlivé, a z toho důvodu byly do médií s obsahem fluorovaných derivátů sacharidů uvedeny až po těchto několika subkultivacích v médiu čistém. Kultury byly kultivovány v čtyřhranných skleněných lahvích. Aby bylo zajištěno dostatečné provzdušnění, velikost kultivační lahve byla zvolena tak, aby objem buněčné suspenze nepřesahoval třetinu objemu lahve.

Takto připravená buněčná suspenze byla rozdělena do 6 zkumavek po 5 ml a v nich byla centrifugována 5 minut při 95 × g a laboratorní teplotě. Supernatanty byly slity a pelety pomocí pipety důkladně resuspendovány v 5 ml média, nyní již s obsahem příslušných fluorovaných derivátů monosacharidů. Objemy byly poté doplněny opět na 30 ml příslušnými médii. Kultury byly kultivovány v inkubátoru MC0-18 AIC při teplotě 37 °C, třepání 135 ot./min a v atmosféře s obsahem 5 % CO<sub>2</sub>. Před transfekcí byly provedeny opět minimálně 3 subkultivace s odstupem 2–3 dnů tak, aby bylo dosaženo buněčné koncentrace 0,5 - 2 × 10<sup>6</sup> buněk/ml. Při poslední

subkultivaci byla část objemu buněčné suspenze přemístěna do 500 ml lahve a objem byl médiem doplněn na 100 ml. Buňky byly kultivovány do té doby, dokud nebylo dosaženo jejich dostatečného množství pro provedení transienční transfekce.

#### **4.3.2 Určení buněčné koncentrace**

Buněčná koncentrace v jednotlivých suspenzích byla určena pomocí hemocytometru Corning Cell Counter, na němž byla využita funkce automatického počítání buněk. Z každé suspenze bylo vždy pipetováno 20  $\mu$ l do mikrozkušavky a tento objem byl 6 $\times$  zředěn barvicím roztokem 0,4 % trypanové modři v PBS-TK pufru. Tato směs byla poté pipetována na sklíčko hemocytometru. Počítány byly buňky v rozmezí 8–26  $\mu$ m, což je typická velikost HEK293T buněk. Pomocí automatického počítače buněk bylo určeno celkové množství buněk v jednotlivých kulturách a také viabilita buněk. Buňky byly pěstovány až do dosažení požadované buněčné hustoty a viability pro transienční transfekci.

#### **4.3.3 Transfekce**

Buněčné suspenze byly centrifugovány 5 minut při 95  $\times$  g a 25  $^{\circ}$ C. Supernatanty byly slity a pelety resuspendovány v objemu takovém, aby bylo v každé suspenzi dosaženo buněčné koncentrace 20  $\times$  10<sup>6</sup> buněk/ml. K suspenzím byla dále přidána směs DNA v množství odpovídajícím 1  $\mu$ g na 1 milion buněk. Byl přidán také roztok lineárního polyethyleniminu v hmotnostním poměru 3:1 k DNA. Směs DNA sestávala z plazmidu pHLsec\_FcHis\_C1 a pomocných plazmidů pTW5\_p27 a pTW5\_aFGFR v hmotnostním poměru 88:10:2. Takto připravená transfekční směs byla přefiltrována přes sterilní 0,22  $\mu$ m filtr a inkubována 1,5 h při 37  $^{\circ}$ C, třepání 137 ot./min a s 5 % obsahem CO<sub>2</sub> v atmosféře. Po této inkubaci byly jednotlivé suspenze 10 $\times$  naředěny příslušnými médii, tedy až na koncentraci 2  $\times$  10<sup>6</sup> buněk/ml, a byla přidána kyselina valproová do výsledné 2 mM koncentrace a směsi byly inkubovány po dobu 4 – 6 dní při stejných podmínkách. Po uplynutí této doby byly buňky sklizeny. Suspenze byly přelity do kyvet Beckman a centrifugovány 15 minut při 20000  $\times$  g a laboratorní teplotě v centrifuze Beckman Coulter (Avanti JXN-26). Supernatant, jež obsahoval rekombinantní protein, byl přefiltrován přes 0,22  $\mu$ m filtr (Stericup Quick release filtr, Millipore express PLUS, membrána z PES) a uschován při teplotě -20  $^{\circ}$ C pro další použití.



## **4.4 Purifikace rekombinantních proteinů**

### **4.4.1 Afinity chromatografie**

Médium s obsahem rekombinantního proteinu, které bylo uchováváno při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bylo rozmraženo ve vodní lázni ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), naředěno PBS pufrem v poměru zhruba 1:1 (v/v) a přefiltrováno přes  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  filtr. Chromatografie byla prováděna na koloně INDIGO-Ni 5 ml, která pomocí imobilizovaných nikelnatých iontů specificky váže proteiny s histidinovou kotvou. Kolona byla připojena k HPLC systému ÄKTAbasic. Před nanesením vzorku byla kolona promyta 20 % ethanolem při průtoku 1 ml/min, poté  $\text{dH}_2\text{O}$  při 4 ml/min, a nakonec PBS pufrem (pH 7,4) při 4 ml/min, každým roztokem tak dlouho, dokud kolonou neprošlo zhruba 5 jejích objemů. Průběh chromatografie byl sledován spektrofotometricky při 280 nm. Když se při promývání pufrem PBS ustálil poměr absorbance a konduktivity, byla kolona připravena k nanesení vzorku. Médium s proteinem bylo naneseno rychlostí 4 ml/min. Kolona byla poté propláchnuta PBS pufrem při 4 ml/min. Následovala předeluce z kolony pomocí PBS pufru s 20 mM imidazolem při průtoku 1,5 ml/min. Eluce proteinu z kolony byla provedena pomocí PBS pufru s 250 mM imidazolem při průtoku 0,5 ml/min. Frakce dle měření absorbance obsahující proteiny byla jímána do zkumavky. Protein v roztoku byl zkoncentrován pomocí koncentrátoru Amicon Ultra (MWCO 10000, Millipore, USA). Vzorek byl v koncentrátoru několikrát centrifugován při  $4255 \times g$  a laboratorní teplotě, a to do té doby, než se jeho objem zmenšil na maximálně 250  $\mu\text{l}$ . Kolona byla po použití promyta PBS pufrem, destilovanou vodou a byla uschována v 20 % ethanolu při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **4.4.2 Gelová permeační chromatografie**

K HPLC systému ÄKTAbasic byla připojena kolona Superdex 200 10/300 GL. Kolona byla při průtoku 0,5 ml/min promyta pufrem HEPES. Nástříková smyčka byla promyta manuálně pomocí mikrostříkačky rovněž pufrem HEPES. Poté byl mikrostříkačkou na kolonu aplikován zkoncentrovaný roztok proteinu. Chromatografie probíhala při průtoku 0,5 ml/min a průběh byl sledován opět pomocí spektrofotometrického detektoru při 280 nm. Frakce s obsahem proteinu byly jímány automatickým sběračem frakcí do mikrozkušavek. Kolona byla poté převedena do 20 % ethanolu a v něm byla i skladována.

#### 4.4.3 Určení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích byla určena na základě změření absorbance při 280 nm na spektrofotometru DS-11+. Jako slepý vzorek byl použit pufr HEPES. Koncentrace proteinu byly přístrojem vypočítány na základě jeho molekulové hmotnosti a extinkčního koeficientu určených z jeho aminokyselinové sekvence s pomocí online programu ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>).

#### 4.4.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Pro ověření úspěšnosti purifikace proteinů byly jednotlivé frakce podrobeny elektroforéze na 10 % polyakrylamidovém gelu o tloušťce 1 mm v prostředí denaturačního činidla dodecylsírany sodného (SDS, z angl. sodium dodecyl sulphate), který proteinům zároveň poskytl záporný náboj. Pomocí elektroforetických sklíček byly vytvořeny gely. Každý gel obsahoval kromě rozdělovací části (spodní část gelu) také zaostřovací (vrchní) část. Složení rozdělovacího gelu je uvedeno v tabulce 2 a složení zaostřovacího gelu v tabulce 3. Pomocí hřebínku byly v gelech vytvořeny jamky pro nanesení vzorků.

**Tabulka 2:** Složení rozdělovacího gelu (uvedeno pro jeden gel).

Sloučenina	dH <sub>2</sub> O	AA (30 %)	Tris pufr, pH 8,8	SDS	TEMED	APS
Objem	2 ml	1,66 ml	1,25 ml	50 µl	2,5 µl	50 µl

**Tabulka 3:** Složení zaostřovacího gelu (uvedeno pro jeden gel).

Sloučenina	dH <sub>2</sub> O	AA (30 %)	Tris pufr, pH 6,8	SDS	TEMED	APS
Objem	1,4 ml	0,5 ml	0,25 ml	20 µl	3 µl	20 µl

Jako vzorky byly použity frakce s obsahem proteinu získané při gelové permeační chromatografii. Použity byly pouze ty frakce, které obsahovaly dostatečné množství proteinu. Z vybraných frakcí byly do mikrozkuvek připraveny vzorky a to tak, že z frakcí byl do mikrozkuvek pipetován objem odpovídající 5 µg proteinu, dále byly přidány 3 µl 5× koncentrovaného vzorkového pufru a směs byla doplněna destilovanou vodou na 15 µl. Totéž bylo provedeno se vzorkovým pufrem s obsahem 2-merkptoethanolu, který zajistil redukující

podmínky. Před nanesením byly všechny vzorky 5 minut inkubovány při 95 °C v termobloku a odstředěny 5 minut při 15000 × g a laboratorní teplotě.

Skříčka s gely byla umístěna do aparatury s elektrodoým pufrem a po vytažení hřebínků z gelu byly i samotné gely přelity elektrodoým pufrem. Do jamek v gelu byly poté pipetovány jednotlivé vzorky o objemu 10 µl. Na každý gel byly pipetovány také 3 µl standardu molekulových hmotností. Vzorky proteinu Clr-b pocházející z jednotlivých purifikací (z produkci v přítomnosti odlišných fluorovaných analogů monosacharidů) byly analyzovány na samostatných gelech. Elektroforéza probíhala 40 minut při stejnosměrném napětí 180 V. Po skončení elektroforézy byly gely vyjmuty z aparatury a obarveny pomocí barvy Coomassie Brilliant Blue R-250 přes noc za pomalého míchání na třepačce. Odbarvení poté probíhalo pomocí odbarvovacího roztoku opět za míchání na třepačce, a to alespoň 3× po 30 minutách.

## 5 VÝSLEDKY

Předmětem této bakalářské práce byla rekombinantní příprava potkaního receptoru Clr-b v prostředí fluorovaných analogů monosacharidů, jakožto potenciálních inhibitorů N-glykosylace. Bylo zkoumáno celkem 7 sloučenin odvozených od N-acetylglukosaminu, N-acetylgalaktosaminu či fukózy, přičemž všechny byly peracetylovány a měly na různých místech substituovanou hydroxylovou skupinu fluorem. Sloučeniny jsou znázorněny na obrázku 3 (str. 23). Protein Clr-b je membránový receptor ze strukturní rodiny receptorů podobných lektinům typu C a je ligandem potkaního NK buněčného receptoru NKR-P1B. V této práci byl rekombinantně exprimován ve formě konstruktu FcHis\_C1 obsahujícím extracelulární část Clr-b ve fúzi s Fc fragmentem lidského IgG. Tento proteinový konstrukt byl již dříve v Laboratoři strukturní biochemie imunitního rozpoznávání úspěšně připraven a dále studován<sup>38,39</sup>.

Protein byl rekombinantně exprimován v buněčné linii HEK293T. Buňky HEK293T byly transfekovány plazmidem s genem pro konstrukt FcHis\_C1 a poté kultivovány v suspenzi. Buněčná suspenze byla rozdělena do několika částí, každá byla kultivována samostatně ve vlastním médiu, přičemž každé médium obsahovalo 50  $\mu$ M jednoho z fluorovaných analogů monosacharidů. Práce byla rozdělena do tří etap, kdy v každé z nich se pracovalo s jinými fluorovanými analogy. Během každé etapy byl připraven také příslušný standard proteinu, který byl rekombinantně připraven v čistém médiu ExCell 293. Proteiny byly z médií purifikovány pomocí afinitní chromatografie za použití kolony s obsahem nikelnatých iontů a následně pomocí gelové permeační chromatografie. U frakcí získaných z gelové permeační chromatografie byla změřena koncentrace obsaženého proteinu měřením absorbance při 280 nm. Čistota proteinů získaných po purifikaci byla ověřena pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

### 5.1 Konstrukt FcHis\_C1

Na obrázku 5 (str. 37) je znázorněna aminokyselinová sekvence konstrukt FcHis\_C1. Modře jsou zvýrazněny aminokyseliny asparaginy, na nichž je předpovídána N-glykosylace. Jedná se o asparaginy, za nimiž následuje libovolná aminokyselina a serin či threonin. Sekvence Asn-X-Ser/Thr/Cys je specificky rozpoznávána enzymem, který připojuje glykan k peptidu<sup>25</sup>. Jedná

se o polární aminokyseliny, což souhlasí s povahou oligosacharidové molekuly, která je rovněž polární. Glykany se poté v kompletním sbaleném glykoproteinu nachází na povrchu molekuly. Sekreční signál kóduje peptid, který je nezbytný k tomu, aby protein syntetizovaný v endoplazmatickém retikulu z něj mohl být transportován sekreční drahou ven z buňky do extracelulárního prostoru. Díky polyhistidinové kotvě bylo možné protein purifikovat na koloně INDIGO-Ni. Při tomto typu chromatografie jsou nikelnaté ionty chelátované na koloně a fungují jako činidlo, které zachytí protein přes histidiny koordinačně kovalentní vazbou.

MGILPSPGMPALLSLVSLLSVLLMGCVAETGVKMTPQISTINTYAA<sup>C</sup>PRNWIGVGNK<sup>C</sup>FYFSE  
YAS<sup>N</sup>WTFSQTF<sup>C</sup>KAQEAELARFDTEEELNFLSRYKGSFDYWIGLHRESSEHPWKWTDNTQY  
<sup>N</sup>YSL SIRGVERYAYLNDIGISSARVYADKRWS<sup>C</sup>SRLNSYSLQ<sup>C</sup>KTPFSPM<sup>G</sup>TLEVL<sup>F</sup>QGP<sup>K</sup>SC<sup>C</sup>  
DKTHT<sup>C</sup>PP<sup>C</sup>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<sup>V</sup>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQY<sup>N</sup>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK<sup>C</sup>CVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLT<sup>C</sup>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNV<sup>F</sup>SC<sup>S</sup>VMEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHHH

**Obrázek 5: Sekvence konstruktů FcHis\_C1.** Sekreční signál, konstrukt V65-M207 Clr-b se zvýrazněnými **cysteiny** tvořícími disulfidické můstky a místy předpokládané **N-glykosylace**, aminokyseliny přidávané z **klonovacího místa**, **štěpící místo pro C3 proteázu**, Fc fragment lidského IgG, **histidinová kotva**.

## 5.2 Purifikace proteinu Clr-b

### 5.2.1 Afinitní chromatografie

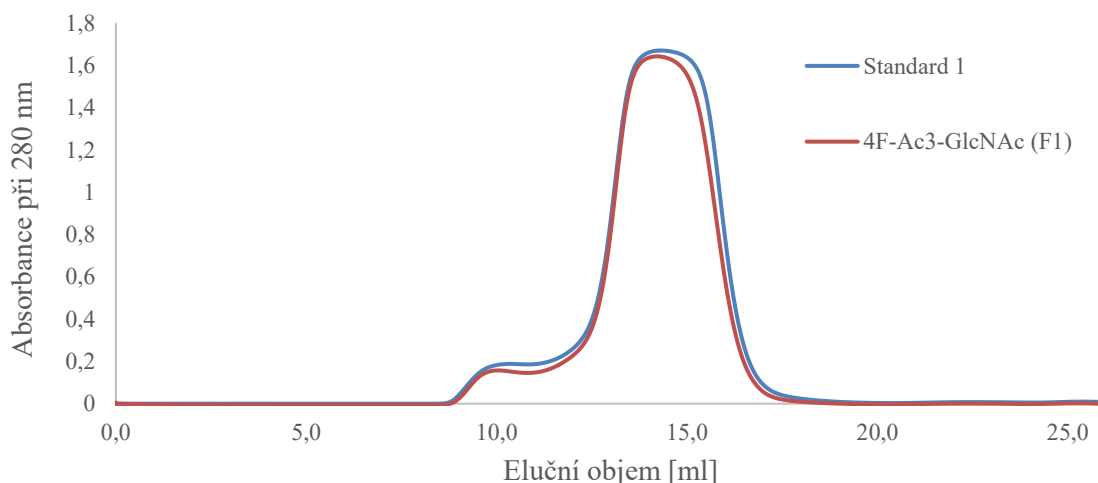
Vzhledem k tomu, že připravovaný protein obsahoval polyhistidinovou kotvu, bylo možné jej purifikovat pomocí afinitní chromatografie na koloně INDIGO-Ni (viz. 4.4.1, str. 33). Kolona obsahuje nikelnaté ionty, které histidinovou kotvu selektivně váží. Z kolony poté byly proteiny eluovány pomocí PBS pufru s obsahem imidazolu (250 mM). Imidazol se na nikelnaté ionty nosiče váže s vyšší afinitou než protein, protein je tedy z kolony vyvážen. Před elucí proteinu z kolony byla provedena předeluce pomocí pufru s nižší koncentrací imidazolu (20 mM), čímž byly z kolony eluovány proteiny, které se navázaly neselektivně. Díky spektrofotometrickému detektoru, který měřil absorbanci eluátu při 280 nm, bylo možné sledovat průběh eluce a bylo možné zachytit frakci obsahující protein. Eluát byl poté zkoncentrován a purifikován gelovou permeační chromatografií.

### 5.2.2 Gelová permeační chromatografie

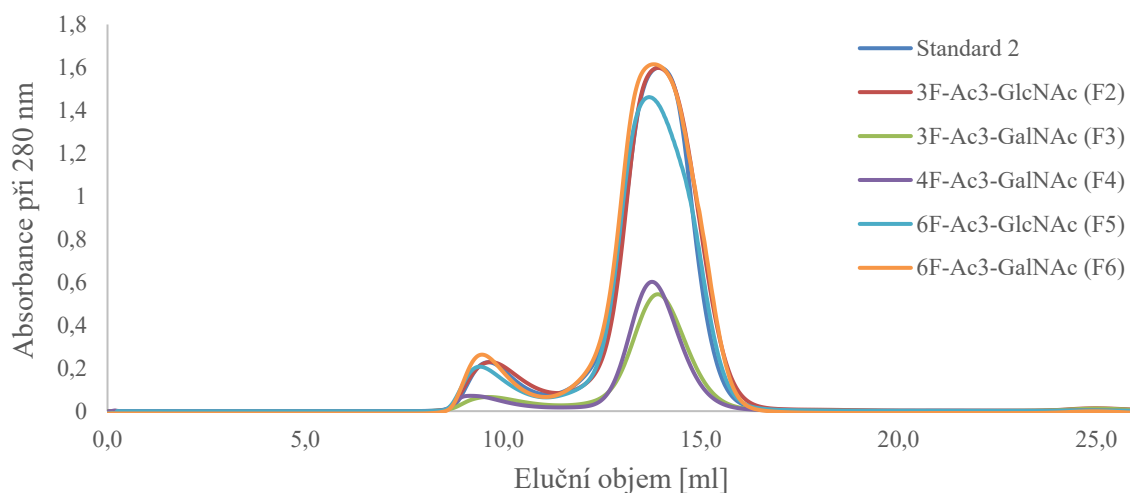
Pomocí gelové permeační chromatografie lze proteiny dělit podle velikosti. Proteiny v roztoku prochází kolonou, která obsahuje stacionární fázi z modifikovaného dextranu či agarózy. Proteiny v mobilní fázi mezi těmito kuličkami prochází. Malé proteiny se zachytávají do pórů

stacionární fáze a oproti proteinům větším se tedy opožďují. Porovnáním elučních objemů několika proteinů tedy můžeme porovnávat i jejich velikost, resp. molekulovou hmotnost. Výška vrcholů potom souvisí s množstvím daného proteinu: čím vyšší je pík, tím více bylo daného proteinu z kolony eluováno.

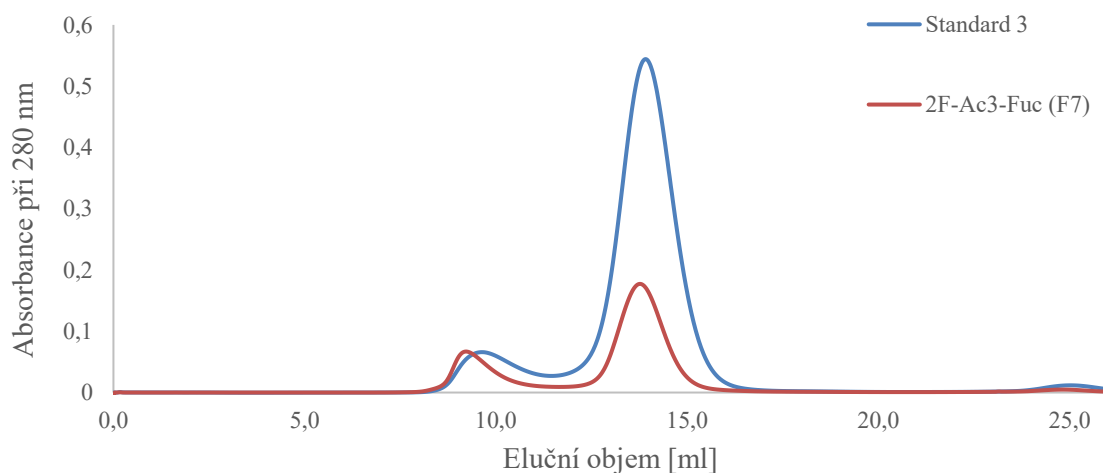
Chromatografie byla provedena na koloně Superdex 200 10/300 GL (viz. 4.4.2, str. 33). Průběh chromatografie byl sledován pomocí detektoru měřícím absorbancí při 280 nm a je zobrazen ve formě závislosti absorbance na elučním objemu na chromatogramech na obrázcích 6-8 (str. 38-39). Proteinu Clr-b odpovídá druhý vrchol křivek. První vrchol náleží agregátům. Křivky jednotlivých vzorků byly rozděleny do tří grafů. Každý graf odpovídá jedné ze tří fází práce (v každé fázi se pracovalo s jinými sloučeninami). Křivky v rámci jedné pracovní fáze jsou vloženy do jednoho grafu, aby bylo možné je porovnat s příslušným standardem a také vzájemně.



**Obrázek 6: Gelová permeační chromatografie proteinů získaných v první fázi práce.** Modře je znázorněna křivka pro standard 1, červeně křivka pro vzorek F1. Proteinu Clr-b odpovídá druhý vrchol křivek.



**Obrázek 7: Gelová permeační chromatografie proteinů získaných v druhé fázi práce.** Tmavě modře je znázorněna křivka pro standard 2, ostatními barvami vzorky F2-F6. Proteinu Clr-b odpovídá druhý vrchol křivek.



**Obrázek 8: Gelová permeační chromatografie proteinů získaných ve třetí fázi práce.** Modře je znázorněna křivka pro standard 3, červeně křivka pro vzorek F7. Proteinu Clr-b odpovídá druhý vrchol křivek.

V tabulkách 4-6 (str. 40) jsou dále uvedeny hodnoty maximální absorbance křivek a hodnoty vrcholů elučních objemů za účelem přehlednějšího porovnání změn ve výšce vrcholů a jejich posuvu v rámci elučního objemu.

**Tabulka 4:** Přehled elučních objemů, maximální absorbance proteinů. Dále celkový výtěžek rekombinantní exprese proteinů získaný součtem obsahů proteinu v jednotlivých frakcích gelové permeační chromatografie a procentuální výtěžek proteinů vůči standardu.

Vzorek	Eluční objem vrcholu (ml)	Maximální absorbance	Výtěžek (mg/l)	Procentuální výtěžek (%)
Standard 1	14,31	1,67	132,94	100
F1	14,23	1,64	111,78	84,1

**Tabulka 5:** Přehled elučních objemů, maximální absorbance proteinů. Dále celkový výtěžek rekombinantní exprese proteinů získaný součtem obsahů proteinu v jednotlivých frakcích gelové permeační chromatografie a procentuální výtěžek proteinů vůči standardu.

Vzorek	Eluční objem vrcholu (ml)	Maximální absorbance	Výtěžek (mg/l)	Procentuální výtěžek (%)
Standard 2	13,94	1,60	66,46	100
F2	13,93	1,60	85,53	128,7
F3	13,75	1,09	43,74	65,8
F4	13,78	0,60	35,30	53,1
F5	13,70	1,46	55,50	83,5
F6	13,83	1,61	82,65	124,4

**Tabulka 6:** Přehled elučních objemů, maximální absorbance proteinů. Dále celkový výtěžek rekombinantní exprese proteinů získaný součtem obsahů proteinu v jednotlivých frakcích gelové permeační chromatografie a procentuální výtěžek proteinů vůči standardu.

Vzorek	Eluční objem vrcholu (ml)	Maximální absorbance	Výtěžek (mg/l)	Procentuální výtěžek (%)
Standard 3	13,93	0,54	31,35	100
F7	13,77	0,18	6,95	22,2

### 5.2.3 Určení koncentrace proteinu

Ve frakcích získaných při gelové permeační chromatografii byly změřeny koncentrace proteinu pomocí spektrofotometru DS-11+. Na základě aminokyselinové sekvence byla v programu ProtParam vypočítána molekulová hmotnost jako 44790,42 Da (bez N-glykosylace) a molární absorpční koeficient pro protein se všemi cysteiny tvořícími disulfidické můstky jako 85550 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Hodnoty koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích proteinů jsou



zaznamenány v tabulkách 7-16 (str. 41-43). Šedě jsou zvýrazněny frakce z oblasti vrcholu křivky, které byly použity pro analýzu pomocí SDS-PAGE. Zvoleny byly frakce s dostatečně vysokou koncentrací proteinu. O relativním výtěžku proteinů oproti příslušným standardům však přesněji vypovídají hodnoty procentuálních výtěžků vůči standardu zaznamenané v tabulkách 4-6 (str. 40).

V tabulce 7 jsou zaznamenány koncentrace proteinu ve frakcích standardu 1 a v tabulce 8 koncentrace proteinu z prostředí sloučeniny F1. V případě proteinu z prostředí sloučeniny F1 sledujeme pokles ve výtěžku oproti standardu 1. Relativní výtěžek činí 84,1 %.

**Tabulka 7: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro Standard 1.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	2	3	4	5	6	7	8	9
Koncentrace [mg/ml]	0,299	0,418	0,511	1,351	6,794	<b>10,797</b>	5,373	0,932

**Tabulka 8: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro vzorek F1.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	6	7	8	9	10	11	12	13
Koncentrace [mg/ml]	0,288	0,365	0,471	1,249	6,006	<b>8,660</b>	4,331	0,839

V tabulce 9 jsou uvedeny koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích pro standard 2. V tabulkách 10-14 (str. 42) jsou potom zaznamenány koncentrace proteinu ve frakcích pro vzorky F2-6. Relativní výtěžky oproti standardu 2 jsou jak nižší než 100 %, což platí pro proteiny z prostředí F3, F4 a F5, tak ale i vyšší, jak je tomu u proteinů z prostředí sloučenin F2 a F6.

**Tabulka 9: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro Standard 2.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	9	10	11	12	13	14	15	16
Koncentrace [mg/ml]	0,223	0,433	0,218	0,441	2,868	<b>7,030</b>	2,814	0,262

**Tabulka 10: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro vzorek F2.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	2	3	4	5	6	7	8	9
Koncentrace [mg/ml]	0,127	0,445	1,990	0,281	1,890	<b>5,984</b>	3,515	0,321

**Tabulka 11: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro vzorek F3.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	10	11	12	13	<b>14</b>	15	16	17
Koncentrace [mg/ml]	0,293	0,396	0,124	0,722	<b>3,045</b>	2,050	0,353	0,028

**Tabulka 12: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro vzorek F4.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	5	6	7	8	<b>9</b>	10	11	12
Koncentrace [mg/ml]	0,158	0,107	0,091	0,157	<b>1,160</b>	1,145	0,233	0,060

**Tabulka 13: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro vzorek F5.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	4	5	6	7	<b>8</b>	9	10	11
Koncentrace [mg/ml]	0,420	0,194	0,231	1,336	<b>4,337</b>	2,999	0,881	0,061

**Tabulka 14: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro vzorek F6.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	2	3	4	5	6	7	8	9
Koncentrace [mg/ml]	0,578	0,325	0,267	1,276	6,465	<b>6,849</b>	1,808	0,146

V tabulce **15** (str. 43) jsou uvedeny koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích pro standard 3 a v tabulce **16** (str. 43) koncentrace proteinu ve frakcích vzorku F7. V tomto případě je výtěžek proteinu poměrně malý i u standardu 3. Oproti němu je však výtěžek proteinu z prostředí sloučeniny F7 o poznání menší a činí pouze 22,2 %.

**Tabulka 15: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro Standard 3.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	4	5	6	7	8	<b>9</b>	10
Koncentrace [mg/ml]	0,142	0,112	0,080	0,156	0,905	<b>1,259</b>	0,324

**Tabulka 16: Koncentrace proteinu ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie pro vzorek F7.** Šedě jsou zvýrazněny frakce, které byly vybrány pro analýzu pomocí SDS-PAGE a tučně frakce vybraná pro analýzu pomocí MS.

Číslo frakce	3	4	5	6	7	<b>8</b>	9	10
Koncentrace [mg/ml]	0,042	0,125	0,052	0,020	0,072	<b>0,377</b>	0,166	0,015

#### 5.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

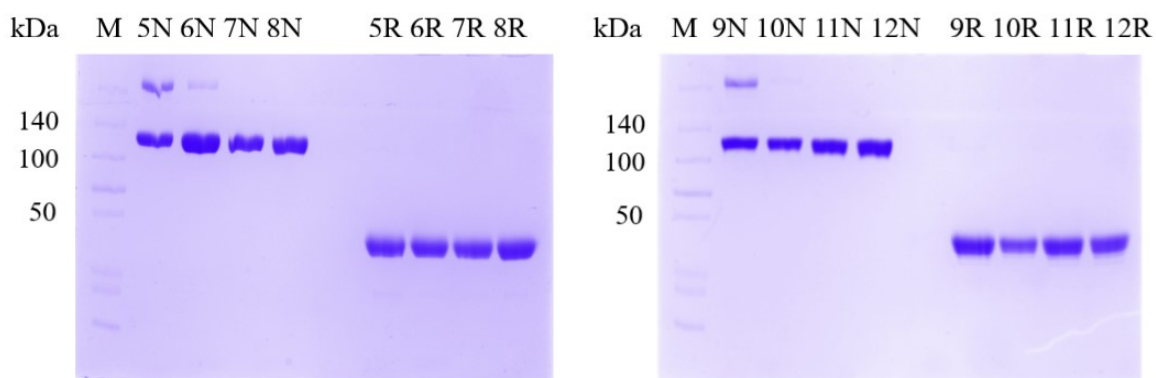
Elektroforéza byla provedena pro ověření toho, zda se purifikace zdařila a protein je dostatečně čistý pro budoucí analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Kromě toho také elektroforéza může posloužit jako přibližná kontrola toho, že byl purifikován správný protein, a to tak, že polohu proužků proteinu porovnáme se standardem molekulových hmotností. Elektroforéza byla provedena v 10 % polyakrylamidovém gelu o tloušťce 1 mm v prostředí dodecylsírany sodného. Byly analyzovány frakce získané z gelové permeační chromatografie. Vzorky byly připraveny tak, aby nanáška činila celkem 5 µg proteinu. Frakce byly analyzovány jak v neredukujícím, tak v redukujícím vzorkovém pufru obsahujícím 2-merkptoethanol. U vzorků F7 a S3 bylo do jamek nanášeno množství odpovídající menšímu množství než 5 µg proteinu, a to z toho důvodu, že u těchto vzorků byly koncentrace frakcí příliš nízké pro splnění tohoto požadavku.

Na obrázcích 9-13 (str. 44-46) jsou zobrazeny gely s jednotlivými vzorky po provedení elektroforézy. Ve sloupcu označeném písmenem M se nachází standard molekulových hmotností (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder), sloupky označené písmenem R obsahují vzorky v redukujícím prostředí a sloupky označené písmenem N vzorky v prostředí neredukujícím. Čísla sloupců potom odpovídají číslům frakcí získaných při gelové permeační chromatografii.

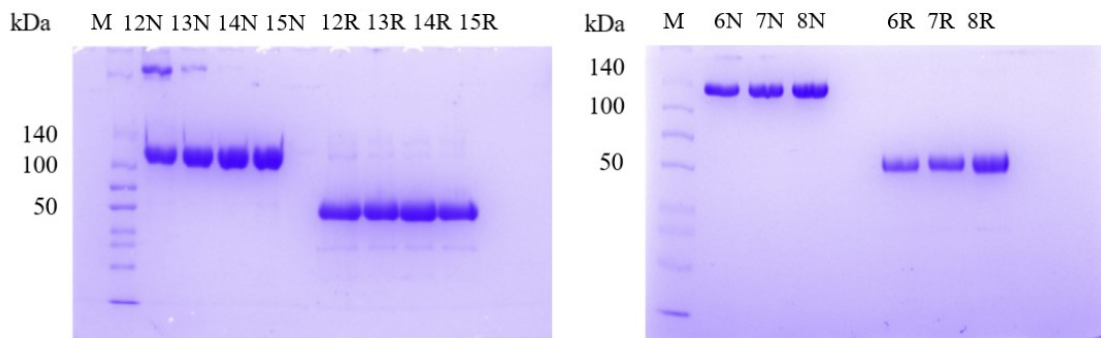
Na všech gelech se u vzorků v neredukujícím prostředí nachází jeden proužek ve výšce mezi 100 a 140 kDa a u vzorků v redukujícím prostředí jeden proužek těsně pod linií odpovídající

50 kDa. Jedná se o dimerní a monomerní formy proteinu Clr-b, k dimerizaci dochází díky tvorbě disulfidických můstků mezi Cys200 Clr-b a také třemi zbytky Cys v pantové oblasti Fc IgG. Kromě proužků odpovídajících konstruktů FcHis\_C1 proteinu Clr-b můžeme na některých gelech v neredukujícím prostředí vidět také proužky odpovídající vyšším oligomerům tohoto konstruktů, které se nachází v horních částech drah a vznikly pravděpodobně špatným zapojením disulfidických můstků v pantové oblasti IgG, jež dalo vzniknout disulfidickým trimerům či tetramerům celého fúzního konstruktů. Tyto proužky jsou viditelné na obrázku 9 na levém gelu v drahách 5N a 6N i na pravém gelu v dráze 9N. Slaběji jsou zřetelné na obrázku 10 na levém gelu v dráze 8N a na pravém gelu v dráze 6N, na obrázku 11 na levém gelu v dráze 13N, na obrázku 12 vlevo v dráze 7N a na obrázku 13 vlevo v dráze 8N a vpravo v drahách 8N a 9N.

Na gelech se dále vyskytují proužky ve výšce pod proužky odpovídajícími studovanému proteinu, které značí obsah nečistot. Tyto proužky můžeme pozorovat na obrázku 10 vlevo v drahách se vzorky v redukujícím prostředí, na obrázku 12 na obou gelech u všech vzorků v redukujícím prostředí a také na obrázku 13 vlevo opět u všech vzorků v redukujícím prostředí.

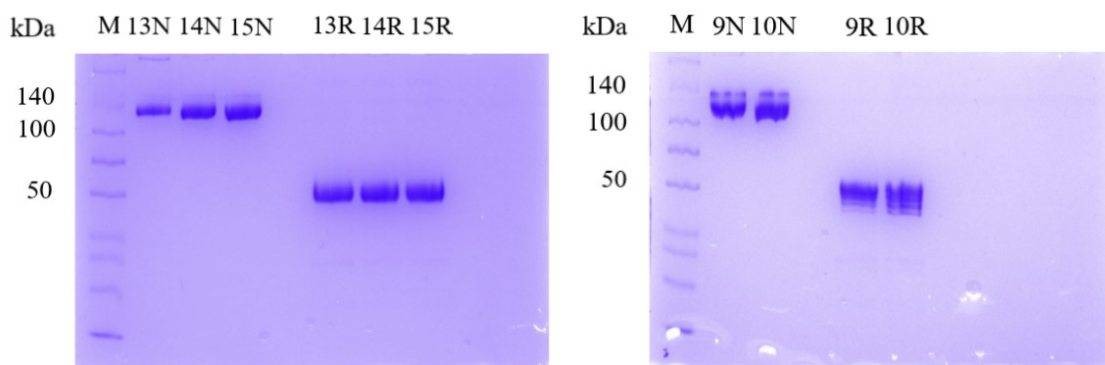


**Obrázek 9: Výsledky elektroforézy v polyakrylamidovém gelu pro standard 1 (vlevo) a pro vzorek F1 (vpravo).** Dráhy označené písmenem M obsahují standard molekulových hmotností. Dráhy značené písmenem N obsahují příslušné frakce v neredukujícím prostředí, dráhy značené R potom příslušné frakce v redukujícím prostředí. Molekulová hmotnost monomeru konstruktů FcHis\_C1 je 44,8 kDa plus N-glykosylace.

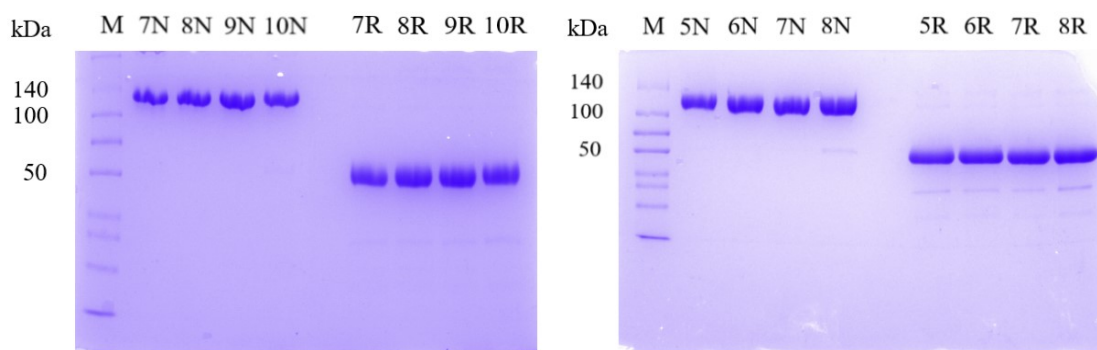


**Obrázek 10: Výsledky elektroforézy v polyakrylamidovém gelu pro standard 2 (vlevo) a pro vzorek F2 (vpravo).** Dráhy označené písmenem M obsahují standard molekulových hmotností. Dráhy značené písmenem N obsahují příslušné frakce v neredukujícím prostředí, dráhy značené R potom příslušné frakce v redukujícím prostředí. Molekulová hmotnost monomeru konstruktu FcHis\_C1 je 44,8 kDa plus N-glykosylace.

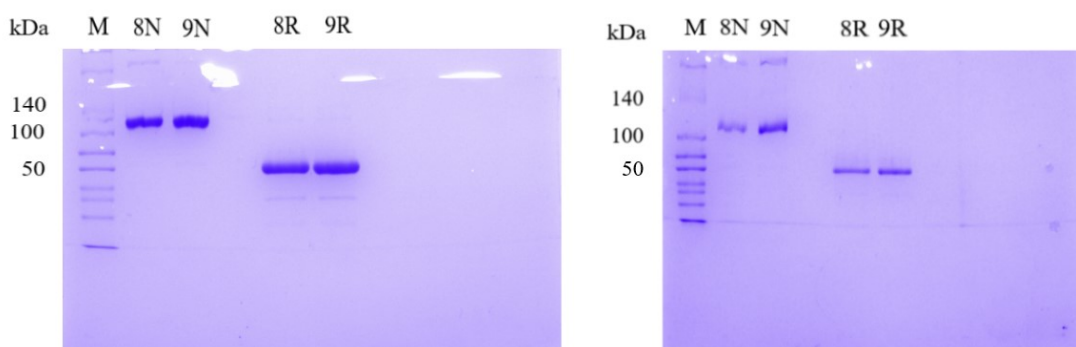
Na obrázku *11* na pravém gelu, který znázorňuje výsledky elektroforézy vzorku F4 můžeme ve všech drahách vidět, že jsou proužky zdvojené až ztrojené. Na levém gelu na stejném obrázku můžeme vidět mírné rozdvojení proužků v drahách 14N a 15N. Jedná se o jednotlivé glykoformy proteinu.



**Obrázek 11: Výsledky elektroforézy v polyakrylamidovém gelu pro vzorek F3 (vlevo) a pro vzorek F4 (vpravo).** Dráhy označené písmenem M obsahují standard molekulových hmotností. Dráhy značené písmenem N obsahují příslušné frakce v neredukujícím prostředí, dráhy značené R potom příslušné frakce v redukujícím prostředí. Molekulová hmotnost monomeru konstruktu FcHis\_C1 je 44,8 kDa plus N-glykosylace.



**Obrázek 12: Výsledky elektroforézy v polyakrylamidovém gelu pro vzorek F5 (vlevo) a pro vzorek F6 (vpravo).** Dráhy označené písmenem M obsahují standard molekulových hmotností. Dráhy značené písmenem N obsahují příslušné frakce v neredukujícím prostředí, dráhy značené R potom příslušné frakce v redukujícím prostředí. Molekulová hmotnost monomeru konstruktu FcHis\_C1 je 44,8 kDa plus N-glykosylace.



**Obrázek 13: Výsledky elektroforézy v polyakrylamidovém gelu pro standard 3 (vlevo) a pro vzorek F7 (vpravo).** Dráhy označené písmenem M obsahují standard molekulových hmotností. Dráhy značené písmenem N obsahují příslušné frakce v neredukujícím prostředí, dráhy značené R potom příslušné frakce v redukujícím prostředí. Molekulová hmotnost monomeru konstruktu FcHis\_C1 je 44,8 kDa plus N-glykosylace.

## 6 DISKUZE

Cílem této bakalářské práce bylo rekombinantně připravit potkaní NK buněčný receptor Clr-b v přítomnosti fluorovaných analogů monosacharidů, na což bude navazovat analýza těchto rekombinantních proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie, čímž se odhalí případné změny v N-glykosylaci. Bylo použito celkem 7 těchto sloučenin. Jedná se o sloučeniny 3F-Ac<sub>3</sub>-GlcNAc, 4F-Ac<sub>3</sub>-GlcNAc, 6F-Ac<sub>3</sub>-GlcNAc, 3F-Ac<sub>3</sub>-GalNAc, 4F-Ac<sub>3</sub>-GalNAc, 6F-Ac<sub>3</sub>-GalNAc, 2F-Ac<sub>3</sub>-Fuc. U některých sloučenin (4F-Ac<sub>3</sub>-GlcNAc) už byla dříve potvrzena schopnost inhibice glykosylace proteinů, některé v tomto ohledu dosud testovány nebyly. Pro tento experiment byl zvolen protein Clr-b, jiným názvem také Ocil či Clr-11, což je potkaní NK buněčný transmembránový receptor, který patří do rodiny lektinů typu C. Protein Clr-b nebyl exprimován celý, ale pouze jeho extracelulární část ve formě fúzního konstruktů FcHis\_C1. Konkrétně se jedná o úsek V65-M207 tohoto proteinu, který je připojen k Fc fragmentu lidského IgG. Součástí konstruktů je také histidinová kotva a další části, které slouží k účinnější expresi. Protein Clr-b obsahuje dvě glykosylační místa. Další glykosylační místo se nachází na Fc fragmentu, a právě glykosylace na tomto místě bude u rekombinantních proteinů analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie, a to z toho důvodu, že glykosylační místo na Fc fragmentu je velmi dobře prostudováno. Pro rekombinantní přípravu byl zvolen expresní systém HEK293T. Fluorované analogy monosacharidů byly aplikovány během rekombinantní exprese a to tak, že byly přidány do živného média buněk, každý analog zvlášť. Protein byl tedy exprimován v sedmi médiích s obsahem jednotlivých fluorovaných monosacharidů a dále ve třech kontrolních médiích bez jakýchkoli přidaných látek. Tři kontroly byly exprimovány z toho důvodu, že práce s fluorovanými monosacharidy byla rozdělena do tří fází kvůli nedostupnosti všech sloučenin ve stejnou dobu. Pro každou tuto fázi byl tedy exprimován i příslušný standard, resp. kontrola. Koncentrace fluorovaných monosacharidů v médiu byla zvolena jako 50 μM, což vycházelo z předchozích studií těchto sloučenin<sup>40</sup>.

Purifikace byla provedena pomocí afinitní chromatografie a následně gelové permeační chromatografie. První z nich sloužila k tomu, aby se zkoumaný protein oddělil od ostatních proteinů v médiu. Byla k tomu použita kolona s nikelnatými ionty, které specificky navázaly protein přes histidinovou kotvu. Takto získaný roztok proteinu byl zkoncentrován a podroben gelové permeační chromatografii, která dělí proteiny na základě velikosti. Tímto byl Clr-b zbaven případných agregátů, či jiných proteinů, které mohly být při předchozí chromatografii

zachyceny na kolonu. Čistota purifikovaného proteinu byla ověřena elektroforézou v polyakrylamidovém gelu.

Důležitým poznatkem je už i jen to, že se protein podařilo úspěšně rekombinantně připravit v prostředí všech studovaných sloučenin. Prokázalo se tedy, že žádná ze sloučenin není při koncentraci 50  $\mu$ M pro buňky HEK293T toxická. Výtěžky všech proteinů se však vzájemně více či méně lišily. V tabulkách 4-6 (str. 40) jsou uvedeny relativní výtěžky proteinů z prostředí jednotlivých sloučenin vůči příslušným standardům. Výraznou změnu v relativním výtěžku pozorujeme u proteinu z prostředí F7, který dosahoval pouze 22,2 % výtěžku standardu 3. U proteinů z prostředí sloučenin F2 a F6 naopak relativní výtěžek přesahoval hodnotu sta procent.

Změny ve výtěžcích proteinů jsou patrné také z vrcholů křivek chromatogramů získaných při gelové permeační chromatografii (obr. 6-8, str. 38-39). Z chromatogramů lze také vyčíst mírné posuny vrcholů křivek. Tyto posuny jsou číselně zaznamenány v tabulkách 4-6 (str. 40). Hlavním důvodem těchto odlišností je to, každý roztok proteinu byl aplikován na chromatografické kolony v jiném objemu. Ač jsou tedy tyto změny způsobeny především tím, že jednotlivé vzorky byly na kolonu gelové permeační chromatografie nanášeny v rozdílných objemech, je možné, že na posuny chromatogramů mohly mít vliv i změny v N-glykosylaci proteinů.

Pro studium koncových struktur glykanových řetězců je možné použít specificky se vážící lektiny či protilátky, pro studium glykanového profilu proteinu potom hmotnostní spektrometrii. Hmotnostní spektrometrie také bude použita k další analýze připravených rekombinantních proteinů. Díky tomu bude možné s jistotou potvrdit hypotézy o změnách v glykosylaci proteinů. Před analýzou vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie bylo potřeba ověřit, zda byla purifikace úspěšná a proteiny jsou dostatečně čisté.

Výsledky elektroforézy v polyakrylamidovém gelu potvrdily čistotu proteinů a díky analýze v redukujícím a neredukujícím prostředí zároveň také to, že protein Clr-b, resp. jeho konstrukt FcHis\_C1 tvoří dle očekávání disulfidické dimery (obr. 9-13, str. 44-46). Na gelech se nacházely kromě proužků náležících monomerům a dimerům proteinu Clr-b také proužky náležící vyšším oligomerům, které bylo možné vidět v horních částech gelu v drahách vzorků v neredukujícím prostředí. Dále se na gelech vyskytovaly proužky níže než proužky odpovídající zkoumanému proteinu. Tyto proužky bylo možné vidět v drahách se vzorky



v redukujícím prostředí a byly pravděpodobně způsobeny kontaminací či proteolytickým štěpením. Na obrázku *II* (str. 45) na gelu vpravo vidíme ve všech drahách v neredučujícím prostředí zdvojené a ve všech drahách v redukujícím prostředí ztrojené proužky. Nabízí se vysvětlení, že se jedná o dvě, resp. tři různě glykosylované formy daného proteinu, které se tím pádem liší v molekulové hmotnosti.

Závěrem lze říci, že se podařilo úspěšně rekombinantně připravit potkaní NK buněčný receptor Clr-b v přítomnosti všech sedmi použitých fluorovaných analogů monosacharidů a to v dostatečném množství i čistotě pro budoucí analýzu těchto rekombinantních proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie, díky který budeme schopni posoudit vliv fluorovaných sloučenin na N-glykosylaci těchto proteinů, ačkoli i některé výsledky získané již v této bakalářské práci naznačují, že k určitým změnám v glykosylaci pravděpodobně došlo.

## 7 ZÁVĚR

- NK buněčný receptor Clr-b byl rekombinantně exprimován v buněčné linii HEK293T v prostředí sedmi fluorovaných analogů monosacharidů.
- Proteiny byly purifikovány pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie.
- Čistota připravených proteinů byla ověřena pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Hořejší, Bartůňková. *Základy Imunologie*, 3.; TRITON: Praha, 2005.
- (2) Beutler, B. Innate Immunity: An Overview. *Molecular Immunology* **2004**, *40* (12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>.
- (3) Drouin, M.; Saenz, J.; Chiffolleau, E. C-Type Lectin-Like Receptors: Head or Tail in Cell Death Immunity. *Front Immunol* **2020**, *11*, 251. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00251>.
- (4) Caligiuri, M. A. Human Natural Killer Cells. *Blood* **2008**, *112* (3), 461–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>.
- (5) Campbell, K. S.; Hasegawa, J. NK Cell Biology: An Update and Future Directions. *J Allergy Clin Immunol* **2013**, *132* (3), 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.006>.
- (6) Rad, A.; Häggström, M.: *Simplified Hematopoiesis*; 2009.
- (7) Ljunggren, H. G.; Kärre, K. In Search of the “Missing Self”: MHC Molecules and NK Cell Recognition. *Immunol Today* **1990**, *11* (7), 237–244. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90097-s](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90097-s).
- (8) Stokic-Trtica, V.; Diefenbach, A.; Klose, C. S. N. NK Cell Development in Times of Innate Lymphoid Cell Diversity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 813. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00813>.
- (9) Brown, M. G.; Scalzo, A. A. NK Gene Complex Dynamics and Selection for NK Cell Receptors. *Seminars in Immunology* **2008**, *20* (6), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2008.06.004>.
- (10) Prager, I.; Watzl, C. Mechanisms of Natural Killer Cell-Mediated Cellular Cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology* **2019**, *105* (6), 1319–1329. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>.
- (11) Barrow, A. D.; Martin, C. J.; Colonna, M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol* **2019**, *10*, 909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00909>.
- (12) Pyž, E.; Marshall, A. S. J.; Gordon, S.; Brown, G. D. C-type Lectin-like Receptors on Myeloid Cells. *Annals of Medicine* **2006**, *38* (4), 242–251. <https://doi.org/10.1080/07853890600608985>.
- (13) Moretta, L.; Moretta, A. Killer Immunoglobulin-like Receptors. *Current Opinion in Immunology* **2004**, *16* (5), 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.07.010>.
- (14) Bellora, F.; Castriconi, R.; Dondero, A.; Carrega, P.; Mantovani, A.; Ferlazzo, G.; Moretta, A.; Bottino, C. Human NK Cells and NK Receptors. *Immunology Letters* **2014**, *161* (2), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.009>.
- (15) Sancho, D.; Reis e Sousa, C. Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annu Rev Immunol* **2012**, *30*, 491–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101352>.
- (16) Zelensky, A. N.; Gready, J. E. The C-Type Lectin-like Domain Superfamily. *The FEBS Journal* **2005**, *272* (24), 6179–6217. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>.
- (17) Drickamer, K. C-Type Lectin-like Domains. *Current Opinion in Structural Biology* **1999**, *9* (5), 585–590. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00009-3).
- (18) Hoving, J. C.; Wilson, G. J.; Brown, G. D. Signalling C-Type Lectin Receptors, Microbial Recognition and Immunity. *Cell Microbiol* **2014**, *16* (2), 185–194. <https://doi.org/10.1111/cmi.12249>.
- (19) Gange, C. T.; Quinn, J. M. W.; Zhou, H.; Kartsogiannis, V.; Gillespie, M. T.; Ng, K. W. Characterization of Sugar Binding by Osteoclast Inhibitory Lectin \*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (28), 29043–29049. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312518200>.
- (20) Hao, L.; Klein, J.; Nei, M. Heterogeneous but Conserved Natural Killer Receptor Gene Complexes in Four Major Orders of Mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (9), 3192–3197. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511280103>.
- (21) Carlyle, J. R.; Jamieson, A. M.; Gasser, S.; Clingan, C. S.; Arase, H.; Raulet, D. H. Missing Self-Recognition of Ocil/Clr-b by Inhibitory NKR-P1 Natural Killer Cell Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (10), 3527–3532. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308304101>.
- (22) Rahim, M. M. A.; Chen, P.; Mottashed, A. N.; Mahmoud, A. B.; Thomas, M. J.; Zhu, Q.; Brooks, C. G.; Kartsogiannis, V.; Gillespie, M. T.; Carlyle, J. R.; Makrigiannis, A. P. The Mouse NKR-

- PIB:Clr-b Recognition System Is a Negative Regulator of Innate Immune Responses. *Blood* **2015**, *125* (14), 2217–2227. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-556142>.
- (23) Balaji, G. R.; Aguilar, O. A.; Tanaka, M.; Shingu-Vazquez, M. A.; Fu, Z.; Gully, B. S.; Lanier, L. L.; Carlyle, J. R.; Rossjohn, J.; Berry, R. Recognition of Host Clr-b by the Inhibitory NKR-P1B Receptor Provides a Basis for Missing-Self Recognition. *Nat Commun* **2018**, *9*, 4623. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06989-2>.
- (24) *Clec2d11 - C-type lectin domain family 2 member D11 - Rattus norvegicus (Rat) | UniProtKB | UniProt*. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q0H8B9/entry> (accessed 2022-07-05).
- (25) Maureen E. Taylor, Krut Drickamer. *Introduction to Glycobiology*, 3.; OXFORD; Vol. 2011.
- (26) *Figure 1: Different stages of N-glycan complexity. N-linked glycans are...* ResearchGate. [https://www.researchgate.net/figure/Different-stages-of-N-glycan-complexity-N-linked-glycans-are-classified-into\\_fig4\\_297662819](https://www.researchgate.net/figure/Different-stages-of-N-glycan-complexity-N-linked-glycans-are-classified-into_fig4_297662819) (accessed 2022-08-12).
- (27) Marathe, D. D.; Buffone, A.; Chandrasekaran, E. V.; Xue, J.; Locke, R. D.; Nasirikenari, M.; Lau, J. T. Y.; Matta, K. L.; Neelamegham, S. Fluorinated Per-Acetylated GalNAc Metabolically Alters Glycan Structures on Leukocyte PSGL-1 and Reduces Cell Binding to Selectins. *Blood* **2010**, *115* (6), 1303–1312. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-231480>.
- (28) Nigro, J.; Wang, A.; Mukhopadhyay, D.; Lauer, M.; Midura, R. J.; Sackstein, R.; Hascall, V. C. Regulation of Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Biosynthesis by 4-Fluoro-Glucosamine in Murine Airway Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* **2009**, *284* (25), 16832–16839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002956>.
- (29) Stephenson, E. L.; Zhang, P.; Ghorbani, S.; Wang, A.; Gu, J.; Keough, M. B.; Rawji, K. S.; Silva, C.; Yong, V. W.; Ling, C.-C. Targeting the Chondroitin Sulfate Proteoglycans: Evaluating Fluorinated Glucosamines and Xylosides in Screens Pertinent to Multiple Sclerosis. *ACS Cent Sci* **2019**, *5* (7), 1223–1234. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00327>.
- (30) Cedeno-Laurent, F.; Opperman, M. J.; Barthel, S. R.; Hays, D.; Schatton, T.; Zhan, Q.; He, X.; Matta, K. L.; Supko, J. G.; Frank, M. H.; Murphy, G. F.; Dimitroff, C. J. Metabolic Inhibition of Galectin-1-Binding Carbohydrates Accentuates Antitumor Immunity. *J Invest Dermatol* **2012**, *132* (2), 410–420. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.335>.
- (31) Woynarowska, B.; Skrincosky, D. M.; Haag, A.; Sharma, M.; Matta, K.; Bernacki, R. J. Inhibition of Lectin-Mediated Ovarian Tumor Cell Adhesion by Sugar Analogs. *J Biol Chem* **1994**, *269* (36), 22797–22803.
- (32) Woynarowska, B.; Dimitroff, C. J.; Sharma, M.; Matta, K. L.; Bernacki, R. J. Inhibition of Human HT-29 Colon Carcinoma Cell Adhesion by a 4-Fluoro-Glucosamine Analogue. *Glycoconj J* **1996**, *13* (4), 663–674. <https://doi.org/10.1007/BF00731455>.
- (33) Dimitroff, C. J.; Kupper, T. S.; Sackstein, R. Prevention of Leukocyte Migration to Inflamed Skin with a Novel Fluorosugar Modifier of Cutaneous Lymphocyte-Associated Antigen. *J Clin Invest* **2003**, *112* (7), 1008–1018. <https://doi.org/10.1172/JCI19220>.
- (34) Wasonga, G.; Tatara, Y.; Kakizaki, I.; Huang, X. Synthesis of N-Acetyl Glucosamine Analogs as Inhibitors for Hyaluronan Biosynthesis. *J Carbohydr Chem* **2013**, *32* (5–6), 392–409. <https://doi.org/10.1080/07328303.2013.815196>.
- (35) van Wijk, X. M.; Lawrence, R.; Thijssen, V. L.; van den Broek, S. A.; Troost, R.; van Scherpenzeel, M.; Naidu, N.; Oosterhof, A.; Griffioen, A. W.; Lefeber, D. J.; van Delft, F. L.; van Kuppevelt, T. H. A Common Sugar-Nucleotide-Mediated Mechanism of Inhibition of (Glycosamino)Glycan Biosynthesis, as Evidenced by 6F-GalNAc (Ac3). *FASEB J* **2015**, *29* (7), 2993–3002. <https://doi.org/10.1096/fj.14-264226>.
- (36) Rillahan, C. D.; Antonopoulos, A.; Lefort, C. T.; Sonon, R.; Azadi, P.; Ley, K.; Dell, A.; Haslam, S. M.; Paulson, J. C. Global Metabolic Inhibitors of Sialyl- and Fucosyltransferases Remodel the Glycome. *Nat Chem Biol* **2012**, *8* (7), 661–668. <https://doi.org/10.1038/nchembio.999>.
- (37) Barthel, S. R.; Antonopoulos, A.; Cedeno-Laurent, F.; Schaffer, L.; Hernandez, G.; Patil, S. A.; North, S. J.; Dell, A.; Matta, K. L.; Neelamegham, S.; Haslam, S. M.; Dimitroff, C. J. Peracetylated 4-Fluoro-Glucosamine Reduces the Content and Repertoire of N- and O-Glycans without Direct Incorporation. *J Biol Chem* **2011**, *286* (24), 21717–21731. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194597>.

- (38) Celadova, P. Rekombinantní Příprava Receptorů Potkaních NK Buněk v Expresním Systému HEK293T. 2010. Diplomová Práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Katedra Biochemie. Vedoucí Práce Bezouška, Karel.
- (39) Dvorská, A. Strukturní Biologie Komplexu Potkaních NK Buněčných Receptorů NKR-P1B a Clrb. 2014. Diplomová Práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Katedra Biochemie. Vedoucí Práce Vaněk, Ondřej.
- (40) Del Solar, V.; Gupta, R.; Zhou, Y.; Pawlowski, G.; Matta, K. L.; Neelamegham, S. Robustness in Glycosylation Systems: Effect of Modified Monosaccharides, Acceptor Decoys and Azido Sugars on Cellular Nucleotide-Sugar Levels and Pattern of N-Linked Glycosylation. *Mol Omics* **2020**, *16* (4), 377–386. <https://doi.org/10.1039/d0mo00023j>.

