

3141

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE

# **Vysokoafinitní sacharidové ligandy leukocytárního lektinového receptoru CD69**

Diplomová práce

Michal Navrátil

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc.

Vypracováno na MBÚ AV ČR, v. v. i.

**Praha 2007**

Rád bych poděkoval celému kolektivu Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR, v. v. i. prof. Bezoušky, jmenovitě zejména Mgr. Danielu Kavanovi a Janu Sklenářovi, PhD za vynikající technickou podporu, Petru Pompachovi, PhD za měření MALDI-TOF hmotnostních spekter, Mgr. Ondřejovi Vaňkovi za jeho diplomovou práci, která mi posloužila jako vzor, a samozřejmě svému školiteli prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. za možnost vypracování diplomové práce a za trpělivost, cenné připomínky a rady. Děkuji Petru Novákovi, PhD z Laboratoře charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR, v. v. i., který mi pomohl s interpretací MALDI-TOF hmotnostních spekter sacharidů, a také Radku Gažákovi, PhD z Laboratoře biotransformací za syntézu OvoTRI-Dimerů. Dík patří i vývojářům a dobrovolníkům z celého světa, kteří se podíleli na vývoji operačního systému openSuse 10.2 a programů Open Office 2, Inkscape 0.44 (vektorový ilustrační program), Gimp 2.2.13 (program pro úpravu obrázků a fotografií) a Bibus 1.3 (správce citací), které umožňují vypracování textů jako diplomová práce.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Karla Bezoušky, CSc. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citoval.

V Praze dne 9. května 2007

.....*Michal Navrátil*.....

Michal Navrátil

# 1. Obsah

<b>1. Obsah</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Seznam zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Úvod</b> .....	<b>12</b>
3.1. Leukocytární lektinový receptor CD69.....	12
3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69.....	14
3.2.1. N-glykosidické sacharidy ovomukoidu.....	14
3.2.2. Syntetické sacharidy.....	16
3.3. Úvod do metod.....	19
3.3.1. Deglykosylace glykoproteinů.....	19
3.3.1.1. Enzymatické metody deglykosylace glykoproteinů.....	20
3.3.1.1.1. Enzymatické metody pro odštěpení N-glykosidicky vázaných sacharidových složek.....	20
3.3.1.1.2. Enzymatické metody pro odštěpení O-glykosidicky vázaných sacharidových složek.....	21
3.3.1.2. Chemické metody deglykosylace glykoproteinů.....	21
3.3.1.2.1. Hydrazinolýza.....	21
3.3.1.2.2. Alkalická $\beta$ -eliminace.....	22
3.3.1.2.3. Redukční $\beta$ -eliminace.....	22
3.3.2. Separční metody sacharidů založené na HPLC.....	23
3.3.2.1. Volba mobilní fáze pro HPLC s detekcí v UV oblasti.....	23
3.3.2.2. Separace sacharidů od glykopeptidů, peptidů a proteinové složky.....	24
3.3.2.3. Odsolení.....	24
3.3.2.4. Odstranění detergentů.....	24
3.3.2.5. Separace sacharidů gelovou permeační chromatografií.....	25
3.3.2.6. Separace sacharidů chromatografií na normální fázi.....	25
3.3.2.7. Separace sacharidů chromatografií na obrácené fázi.....	26
3.3.2.8. Separace sacharidů chromatografií na grafitizovaném uhlíku.....	26
3.3.2.9. Separace sacharidů pomocí HPAE-PAD.....	26
3.3.2.10. Separace sialovaných oligosacharidů.....	28
3.3.3. Analytické metody.....	28
3.3.3.1. Chemická stanovení.....	28
3.3.3.1.1. Stanovení hexos (vázaných a volných).....	28
3.3.3.1.2. Stanovení vázaných a celkových kyselin sialových perjodát resorcinolovou metodou.....	28
3.3.3.2. SDS-PAGE.....	29
3.3.3.3. Hmotnostní spektrometrie.....	29
3.3.4. Vazebné studie.....	30
3.3.4.1. Destičkové inhibiční testy.....	30
3.3.4.2. Destičkové precipitační testy.....	31
3.3.4.3. Rovnovážná dialýza.....	32
<b>4. Cíle diplomové práce</b> .....	<b>34</b>
<b>5. Materiál</b> .....	<b>35</b>
5.1. Použité přístroje.....	35
5.2. Použité chemikálie.....	36
5.3. Použité proteiny.....	38
5.4. Použité sacharidy.....	38

5.5. Použité enzymy.....	39
5.6. Použité protilátky.....	39
5.7. Použité nosiče do kolon.....	39
5.8. Použité pufrý.....	39
5.9. Použité roztoky a činidla.....	39
5.9.1. Stanovení sacharidů.....	39
5.9.1.1. Stanovení hexos (volných i vázaných).....	39
5.9.1.2. Stanovení vázaných a celkových kyselin sialových.....	40
5.9.2. De-N-glykosylace glykoproteinů.....	40
5.9.3. SDS-PAGE.....	40
<b>6. Metody.....</b>	<b>42</b>
6.1. Sacharidové složky ovomukoidu.....	42
6.1.1. Získání frakce obsahující ovomukoid srážením.....	42
6.1.2. Kontrola průběhu srážení ovomukoidu pomocí SDS-PAGE.....	43
6.1.3. Purifikace ovomukoidu.....	43
6.1.4. Kontrola čistoty ovomukoidu pomocí SDS-PAGE.....	44
6.1.5. Deglykosylace ovomukoidu.....	44
6.1.6. Kontrola stupně deglykosylace pomocí SDS-PAGE.....	45
6.1.7. Odstranění detergentů.....	45
6.1.8. Kontrola pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.....	46
6.1.9. Odsolení.....	46
6.1.10. Separace jednotlivých oligosacharidů.....	46
6.1.11. Kontrola stupně separace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.....	47
6.1.12. Stanovení hexos (vázaných i volných).....	47
6.2. Izolace sacharidů z PSM.....	48
6.2.1. Stanovení vázaných a celkových kyselin sialových perjodát resorcinolovou metodou.....	48
6.3. Destičkové inhibiční testy.....	49
6.4. Destičkové precipitační testy.....	50
6.4.1. Optimalizace koncentrace srážecího roztoku.....	50
6.4.2. Vlastní precipitační test.....	51
<b>7. Výsledky.....</b>	<b>52</b>
7.1. Sacharidové složky ovomukoidu.....	52
7.1.1. Získání frakce obsahující ovomukoid srážením.....	52
7.1.2. Purifikace ovomukoidu.....	53
7.1.3. Deglykosylace ovomukoidu.....	55
7.1.4. Purifikace N-glykosidických sacharidů odštěpených z ovomukoidu.....	56
7.1.5. Separace N-glykosidických sacharidů odštěpených z ovomukoidu.....	59
7.1.6. Stanovení hexos (vázaných i volných).....	62
7.2. Destičkové inhibiční testy.....	63
7.3. Destičkové precipitační testy.....	71
<b>8. Diskuze.....</b>	<b>73</b>
<b>9. Souhrn.....</b>	<b>76</b>
<b>10. Seznam použité literatury.....</b>	<b>77</b>

## 2. Seznam zkratek

- BSA z angl. bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
- ccpm z angl. corrected counts per minute, přepočtené impulzy za minutu, tedy vlastně dpm (60 dpm = 1 Bq)
- CD69 z angl. cluster of differentiation 69, systematické označení tohoto receptoru
- CD69NG70 CD69 nekovalentní dimer, každá podjednotka odpovídá zkrácené sekvenci Gly70 - Lys199
- CD69NS84 CD69 nekovalentní dimer, každá podjednotka odpovídá zkrácené sekvenci Ser84 - Lys199
- CD69NV82 CD69 nekovalentní dimer, každá podjednotka odpovídá zkrácené sekvenci Val82 - Lys199
- CRD z angl. carbohydrate recognition domain, sacharid rozpoznávající doména
- DMA dimethyladipimidát
- DMS dimethylsuberimidát
- DST dusukcinimidyltartarát
- Gal galaktosa
- GalNAc N-acetylgalaktosamin
- Glc glukosa
- GlcNAc N-acetylglukosamin
- GlcNAc<sub>17</sub>BSA hovězí sérový albumin modifikovaný 17 molekulami GlcNAc na lysinových zbytcích<sup>[1]</sup>
- GalNAc<sub>17</sub>BSA hovězí sérový albumin modifikovaný 17 molekulami GlcNAc na lysinových zbytcích
- HAc kyselina octová
- HPAE-PAD z angl. High-pH anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection, anexová chromatografie za vysokého pH spojená s pulzní elektrochemickou detekcí
- MALDI-TOF z angl. matrix assisted laser desorption/iontization with time-of-flight detection, hmotnostní

	spektrometrie s desorpcí/ionizací laserem za pomoci matrice a detekcí měřením doby letu
●Man	manosa
●ManNAc	N-acetylmanosamin
●NeuAc	kyselina N-acetylneuraminová
●NeuGc	kyseliny N-glykolyneuraminová
●NK-buňka	z anglického <u>n</u> atural <u>k</u> iller cell, přirozená zabíječská buňka
●NKC	z angl. <u>n</u> atural <u>k</u> iller <u>c</u> omplex, komplex genů přirozených zabíječských buněk
●OvoPENTA	pentaantenární N-glykosidický sacharid izolovaný z ovomukoidu (viz. 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69 na str. 11)
●OvoTRI	triantenární N-glykosidický sacharid izolovaný z ovomukoidu (viz. 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69 na str. 11)
●OvoTRI-Dimer(2)	OvoTRI dimerizovaný pomocí DST
●OvoTRI-Dimer(4)	OvoTRI dimerizovaný pomocí DMA
●OvoTRI-Dimer(6)	OvoTRI dimerizovaný pomocí DMS
●PSM	z angl. <u>p</u> orcine <u>s</u> ubmaxillary <u>m</u> ucin, vepřový podčelistní mucin
●SDS-PAGE	z angl. <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate <u>p</u> olyacrylamide gel <u>e</u> lectrophoresis, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
●SiaTn	disacharid NeuAca2→6GalNAc
●SiaTn-Dimer(2)	SiaTn-L dimerizovaný pomocí DST
●SiaTn-Dimer(4)	SiaTn-L dimerizovaný pomocí DMA
●SiaTn-Dimer(6)	SiaTn-L dimerizovaný pomocí DMS
●SiaTn-L	SiaTn antigen s připojeným linkerem (viz. 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69 na str. 11)
●SiaTnTRI-Dimer(2)	SiaTn-L dimerizovaný pomocí DST
●SiaTnTRI-Dimer(4)	SiaTn-L dimerizovaný pomocí DMA
●SiaTnTRI-Dimer(6)	SiaTn-L dimerizovaný pomocí DMS

- SiaTnTRI-L trimerizovaný SiaTn antigen, s linkerem (viz. 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69 na str. 11)
- TEMED N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminoethan
- Tris tris(hydroxymethyl)aminomethan



## 3. Úvod

### 3.1. Leukocytární lektinový receptor CD69

Ve starší literatuře se tato molekula vyskytuje pod několika jmény EA-1 (z angl. early activation antigen 1)<sup>[2]</sup>, AIM (z angl. activation inducer molecule)<sup>[3]</sup>, MLR3 antigen (antigen rozpoznávaný protilátkou MLR3)<sup>[4]</sup> nebo Leu-23<sup>[5]</sup>. Nakonec byla označena CD69<sup>[6]</sup>.

Molekula CD69 je glykosylovaný receptorový transmembránový protein II. třídy (jeho C-konec je orientován extracelulárně)<sup>[7]</sup>. Na buněčném povrchu je prezentována jako disulfidicky vázaný homodimer<sup>[8]</sup> s konstitutivně fosforylovanými podjednotkami<sup>[9]</sup> o velikosti 28 nebo 32 kDa<sup>[2]</sup> – což je dáno tím, že jedna z podjednotek může být glykosylována více než druhá<sup>[10][11]</sup>. CD69 je asociována s GTP-vázajícím proteinem<sup>[12]</sup>. Spadá do rodiny lektinů C-typu<sup>[7][13][14][15]</sup> (lektin je protein vázající sacharid). Společným znakem této rodiny lektinů je CRD doména, která váže sacharidy za přítomnosti vápenatých iontů, z čehož je odvozen i jejich název (z angl. calcium-type lectins)<sup>[16]</sup>. V rodině lektinů C-typu se CD69 řadí spolu s receptorem NK-buněk NKR-P1 do skupiny V, pro kterou je charakteristické, že téměř zcela postrádá konzervované AMK pro vazbu Ca<sup>2+</sup> a sacharidů. Vazebná doména takových proteinů je často označována jako „doména podobná lektinům C-typu“, CTLD (z angl. C-type lectin-like domain). Gen CD69 je evolučně příbuzný s genovými rodinami receptorů NK-buněk kódujícími lektinové receptory C-typu a je umístěn v NKC, komplexu genů přirozených zabíječských buněk<sup>[17][18][19]</sup>.

CD69 se skládá z cytoplazmatické části, transmembránové části, extracelulárního krčku a extracelulární globulární části. Cytoplazmatická a transmembránová část je zodpovědná za signalizaci a expresi na buněčném povrchu. Krček obsahuje Cys68, který je důležitý pro dimerizaci receptoru<sup>[15]</sup>. Koncová globulární část odpovídající sacharid rozpoznávající doméně (Ser100 – Lys199) je schopná fungovat nezávisle na zbytku molekuly<sup>[20]</sup> a pravděpodobně váže fyziologické ligandy<sup>[21]</sup>.

Původně se myslelo, že exprese molekuly CD69 je omezena na aktivované lymfocyty (odtud také názvy jako časný aktivační antigen, viz. výše). Nyní se ví, že je exprimována na všech leukocytech hematopoetického původu, mj. thymocytech, monocytech, neutrofilech, epidermálních Langerhansových buňkách a krevních destičkách, a že je to univerzální spouštěcí molekula aktivující mnoho důležitých efektorových funkcí leukocytů<sup>[10]</sup>.

Ohledně ligandů tohoto receptoru bylo zjištěno, že se na CD69 vážou vápenaté ionty<sup>[8][15][20]</sup>, některé sacharidové struktury (viz. níže, 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69) a také např. mykobakteriální protein tepelného šoku hsp65 (za specifickou vazbu je zodpovědná aminokyselinová sekvence LELTE)<sup>[22]</sup>.

Vzhledem k tomu, že fyziologický ligand receptoru CD69 ale stále zůstává neznámý<sup>[10]</sup>, není známa ani jeho funkce. Je jen známo, že monoklonální protilátka proti této molekule spouští cytotoxickou aktivitu in vitro např. u CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK buněk a u T-lymfocytů exprimujících receptor TCR  $\gamma/\delta^+$ , ale ne TCR  $\alpha/\beta^+$ <sup>[23]</sup>. Naproti tomu CD69<sup>-/-</sup> myši vykazují ve srovnání s myši divokého kmene zvýšenou odolnost a dobu přežití při růstu MHC I<sup>-</sup> nádorů díky až trojnásobně zvýšené lokální koncentraci NK-buněk a CD3<sup>+</sup> T-lymfocytů (nikoliv díky zvýšené aktivitě NK-buněk)<sup>[24]</sup>. Dále, použití monoklonální protilátky proti CD69 in vivo u myši zcela přeruší její expresi ve zralých i nezralých hematopoetických buňkách v centrálních i periferních lymfoidních orgánech, což zvyšuje protinádorovou imunitní odpověď<sup>[24]</sup>. CD69 zmenšuje nejen protinádorovou imunitní odpověď, ale i autoimunitní odpověď a zánětlivou reakci – CD69<sup>-/-</sup> myši vykazují např. vyšší výskyt a závažnost kolagenem indukované artritidy, což je dáno zejména zvýšenou T- a B-buněčnou odpovědí ke kolagenu typu II<sup>[25]</sup>.

Signalizace spuštěná receptorem CD69 zvyšuje produkci TGF- $\beta$ <sup>[24]</sup>, což je faktor potlačující zánětlivé reakce regulací hladiny prozánětlivých cytokinů<sup>[26]</sup>. Myši ošetřené blokující monoklonální protilátkou proti TGF- $\beta$  vykazují rovněž zvýšenou protinádorovou odpověď<sup>[24]</sup>.

K vazebným studiím byl v mé práci použit konstrukt lidské CD69 Gly70 – Lys199 (dlouhý 130 aminokyselin), vyskytující se v roztoku jako nekovalentní

dimer<sup>[27]</sup> (označován jako CD69NG70). Vzhledem k tomu, že konstrukt CD69NG70 byl náchylný k degradaci od N-konce až o 11 aminokyselin<sup>[8]</sup>, byly vyprodukovány i konstrukty CD69NV82 (Val82 – Lys199) a CD69NS84 (Ser84 – Lys199), které se v roztoku vyskytují rovněž jako nekovalentní dimer. Jejich sacharidová specifita byla porovnána pomocí inhibičních testů se sacharidovou specifitou CD69NG70 (viz. 7.2. Destičkové inhibiční testy na str. 60). Všechny konstrukty byly bez glykosylace, protože k jejich produkci byl použit bakteriální expresní systém<sup>[8]</sup>.

## 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69

Z monosacharidů mají k CD69 nejvyšší afinitu GlcNAc a GalNAc<sup>[15]</sup>. Bylo prokázáno, že každá ze dvou podjednotek CD69 má jedno vazebné místo pro vápenatý ion a vazebná místa pro molekuly N-acetylhexosaminu (tři pro GlcNAc a dvě pro GalNAc)<sup>[20]</sup>. CD69 silně interaguje se sacharidovými složkami obsahujícími motiv NeuAca2→6GalNAc nebo ještě lépe NeuGca2→6GalNAc<sup>[28]</sup>. Rovněž bylo evidentní, že ligandy obsahující nějakým způsobem klastrovaný GlcNAc nebo GalNAc mají vyšší afinitu k CD69 – neoglykoproteiny GlcNAc<sub>17</sub>BSA a GalNAc<sub>17</sub>BSA mají o několik řádů vyšší afinitu k CD69 než pouhé monosacharidy GlcNAc a GalNAc. Souvisí to pravděpodobně s již zmíněnou existencí vazebných tří vazebných míst pro GlcNAc a dvou pro GalNAc na každé ze dvou podjednotek molekuly CD69 – z tohoto důvodu byla zkoumána afinita vysoce větvených N-glykosidických sacharidů izolovaných z ovomukoidu, zejména triantenárního (OvoTRI) a pentaantenárního (OvoPENTA), syntetického sacharidu GlcNAca1→3(GlcNAca1→4)-(GlcNAca1→6)GlcNAc k CD69 a také OvoTRI-Dimerů.

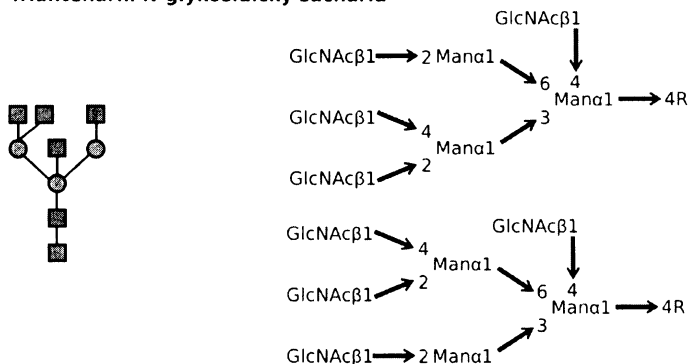
### 3.2.1. N-glykosidické sacharidy ovomukoidu

N-glykosidické sacharidové složky ovomukoidu byly pro vazebné studie izolovány z důvodů výše uvedených (viz. výše, 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69) a také proto, že jejich struktura je poměrně dobře

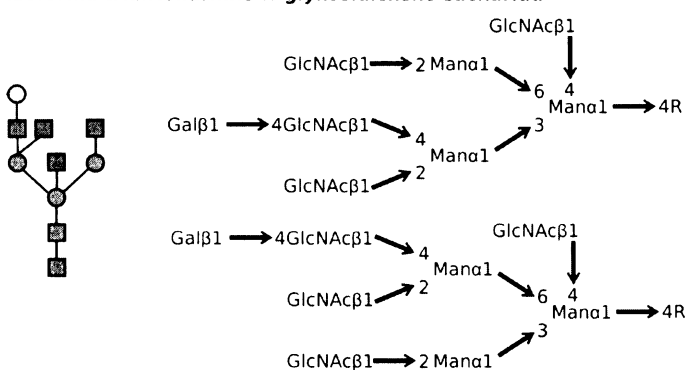
prozkoumána<sup>[29][30]</sup> a že pro izolaci ovomukoidu z vaječného bílku byl již vypracován postup<sup>[31][32]</sup>.

### Vybrané N-glykosidické sacharidy ovomukoidu 1

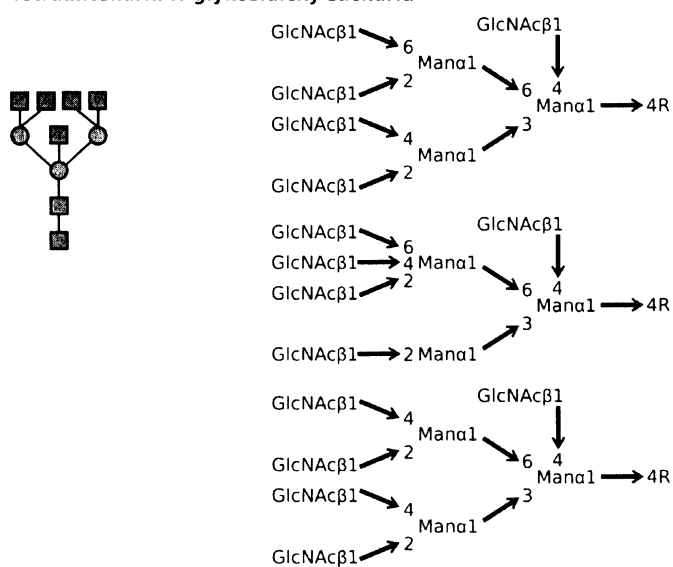
#### Triantenární N-glykosidický sacharid



#### Izoforma triantenárního N-glykosidického sacharidu



#### Tetraantenární N-glykosidický sacharid



#### Vysvětlivky

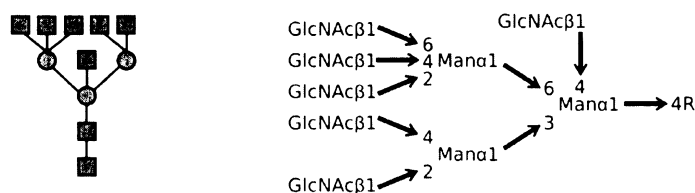
- Gal
- Man
- GlcNAc

R = GlcNAcβ1 → 4GlcNAc

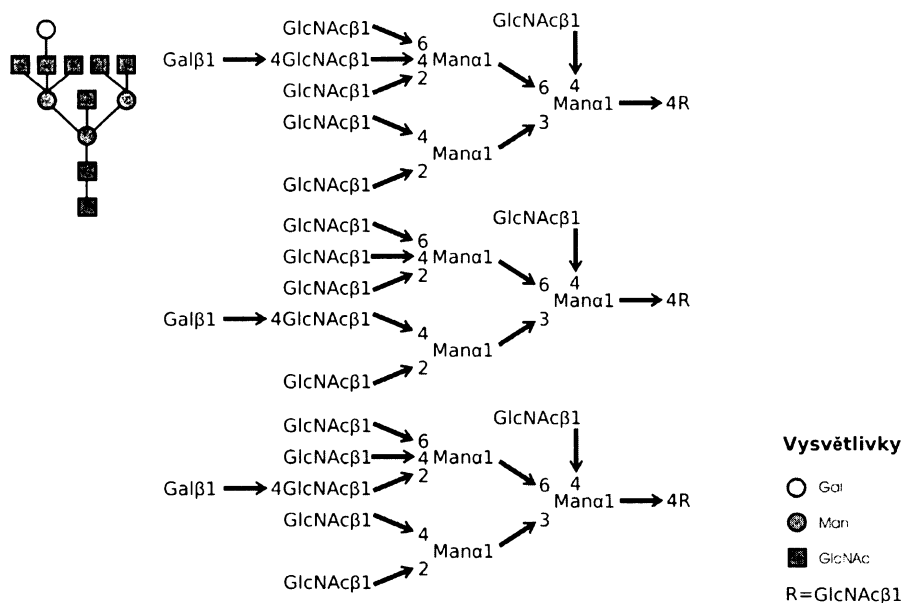
**Obr. 1: Vybrané N-glykosidické sacharidy ovomukoidu.** Vlevo je znázorněna schematická značka, která bude používána v dalším textu, vpravo je jsou znázorněny jednotlivé polohové izomery. Triantenární sacharid je v dalším textu označován OvoTRI. Izoforma je zde znázorněna pouze pro tetraantenární N-glykosidický sacharid – v případě triantenárního sacharidu by izoforma analogicky vypadala tak, že jeden zbytek N-acetylglukosaminu by byl nahrazen jedním zbytkem galaktosy.

## Vybrané N-glykosidické sacharidy ovomukoidu 2

### Pentaantenární N-glykosidický sacharid



### Pentaantenární N-glykosidický sacharid s galaktosou



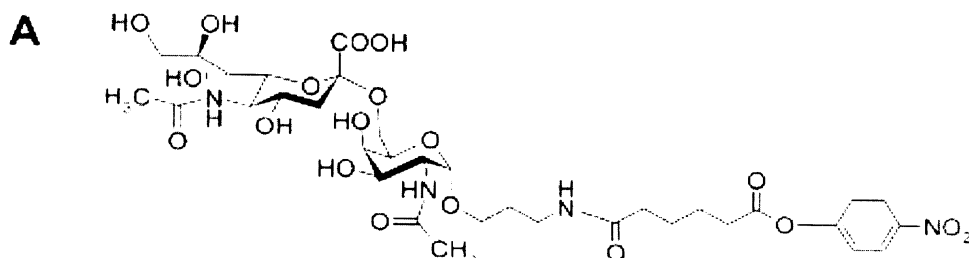
**Obr. 2: Vybrané N-glykosidické sacharidy ovomukoidu.** Vlevo je znázorněna schematická značka, která bude používána v dalším textu, vpravo je znázorněny jednotlivé polohové izomery. Pentaantenární sacharid je v dalším textu označován OvoPENTA. Izoformy pentaantenárního sacharidu resp. pentaantenárního sacharidu s galaktosou by vypadaly tak, že jeden zbytek N-acetylglukosaminu by byl nahrazen jedním zbytkem galaktosy (stejně jako v případě tetraantenárního N-glykosidického sacharidu, viz. výše, Obr. 1).

## 3.2.2. Syntetické sacharidy

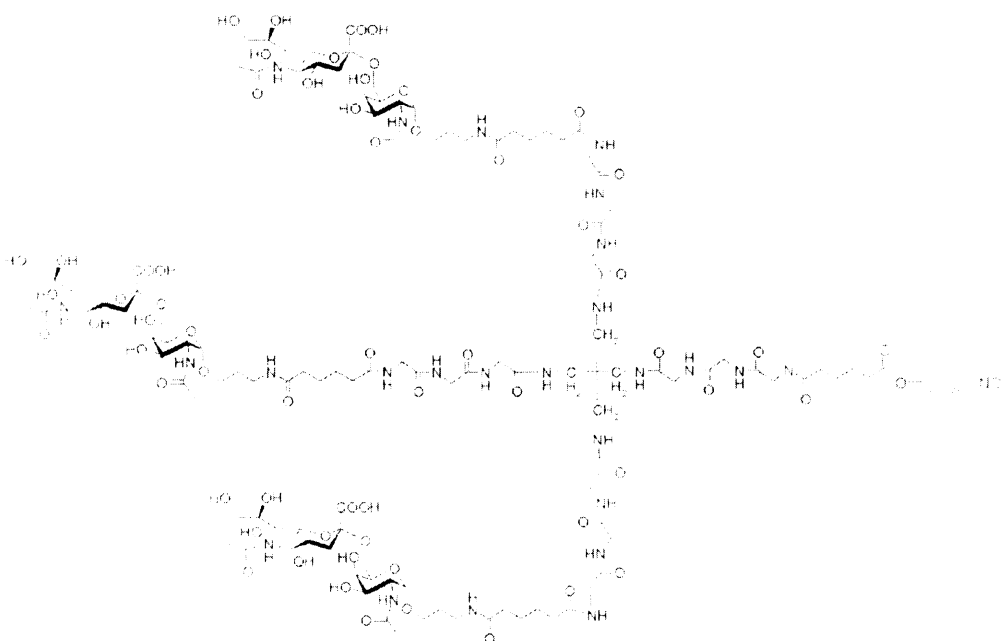
Na základě již známé sacharidové specifity (viz. 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69 na str. 11) byly provedeny inhibiční testy se sacharidy SiaTn-Dimer(2), SiaTn-Dimer(4), SiaTn-Dimer(6), SiaTnTRI-Dimer(2), SiaTnTRI-Dimer(4), SiaTnTRI-Dimer(6) a také OvoTRI-Dimer(2), OvoTRI-Dimer(4) a OvoTRI-Dimer(6) – jejich struktury viz. níže, Obr. 3 až 8. Na základě výsledků inhibičních testů byl se sacharidy SiaTnTRI-Dimer(2), SiaTnTRI-Dimer(4), SiaTnTRI-Dimer(6), OvoTRI-Dimer(2), OvoTRI-Dimer(4) a OvoTRI-Dimer(6) proveden rovněž precipitační test – sacharidy posloužily jako

tzv. molekulární pravítka – více viz. 3.3.4.2. Destičkové precipitační testy na str. 28.

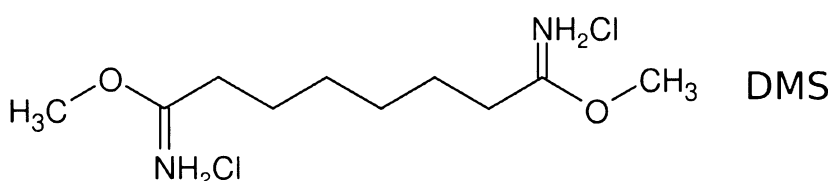
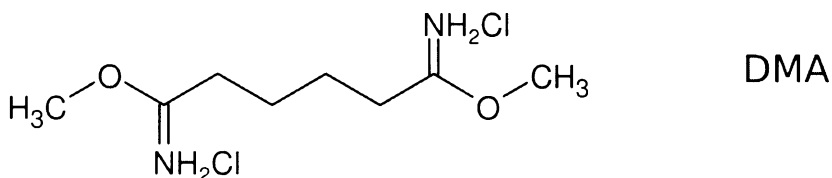
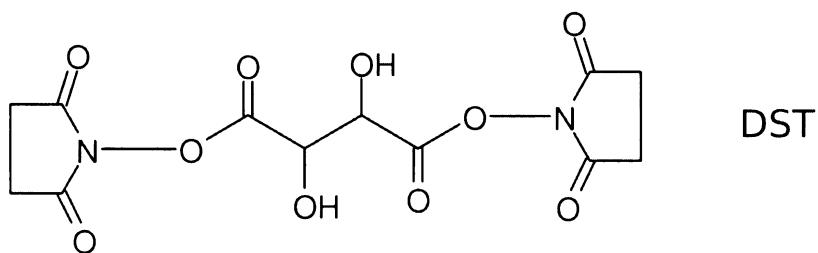
Pro inhibiční test byl použit také sacharid OvoTRI, OvoPENTA a  $\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 3(\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 4)(\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 6)\text{GlcNAc}^{[33]}$  – z důvodů uvedených výše, viz. 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69 na str. 11.



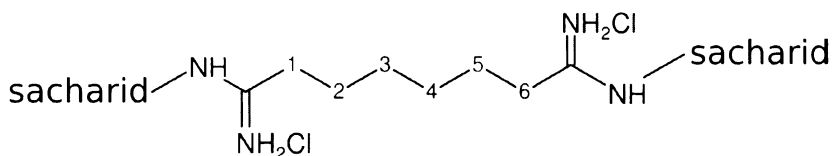
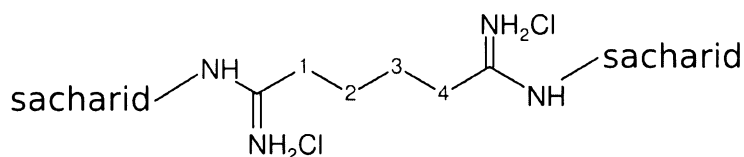
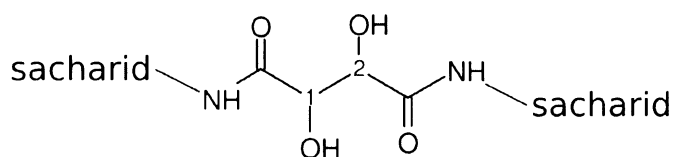
**Obr. 3: SiaTn-L.** SiaTn antigen modifikovaný linkerem, který umožňuje po redukcí nitroskupiny na aminoskupinu na palladiu dimerizaci např. pomocí DST (vznikne SiaTn-Dimer(2)), DMA (vznikne SiaTn-Dimer(4)) nebo DMS (vznikne SiaTn-Dimer(6)) – struktura různých dlouhých dimerizačních můstek viz níže, Obr. 6.



**Obr. 4: SiaTnTRI-L.** Trimerizovaný antigen SiaTn, SiaTnTRI, modifikovaný linkerem umožňuje po redukcí nitroskupiny na aminoskupinu na palladiu dimerizaci např. pomocí DST (vznikne SiaTnTRI-Dimer(2)), DMA (vznikne SiaTnTRI-Dimer(4)), nebo DMS (vznikne SiaTnTRI-Dimer(6)) – struktura různých dlouhých dimerizačních můstek viz níže, Obr. 6.

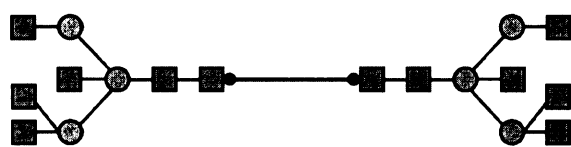


**Obr. 5: Zesíťovací činidla použitá pro dimerizaci sacharidů SiaTn, SiaTnTRI a OvoTRI.** Tato zesíťovací činidla byla navržena pro zkoumání struktury proteinů – koncové esterově vázané skupiny při reakci s aminoskupinou odstupují i s esterovým kyslíkem a vznikají tak struktury uvedené na Obr. 6, viz. níže.



**Obr. 6: Struktura dimerizačních můstků použitých pro dimerizaci sacharidů SiaTn, SiaTnTRI a OvoTRI.** Dimerizované sacharidy v případě SiaTn a SiaTnTRI byly připraveny tak, že nitroskupina nedimerizovaných jednotek (viz. výše, Obr. 3 a 4) byla redukována na palladiu na aminoskupinu a s použitím DST, DMA nebo DMS byly sacharidy zdimerizovány. V případě OvoTRI byl dimerizovaný sacharid připraven tak, že hydroxyskupina na redukujícím konci byla převedena na  $\beta$ -aminoskupinu<sup>[1]</sup> a s použitím DST, DMA nebo DMS byly sacharidy zdimerizovány.

### OvoTRI-Dimery



#### Vysvětlivky

- Man
- GlcNAc
- Dimerizační můstek

**Obr. 7: OvoTRI-Dimery.** Schematické znázornění struktury dimerů OvoTRI-Dimer(2), OvoTRI-Dimer(4) a OvoTRI-Dimer(6) – struktura různě dlouhých dimerizačních můstků viz výše, Obr. 6. OvoTRI je triantenární N-glykosidický sacharid izolovaný z ovomukoidu, viz. Obr. 1 na str. 12.

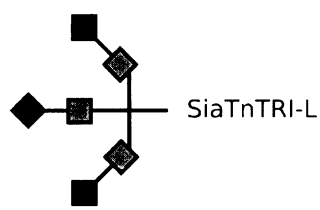
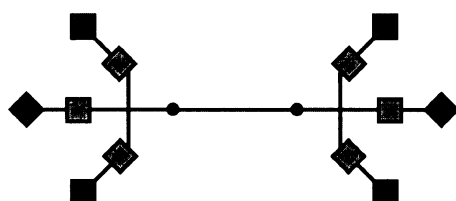
### SiaTn-Dimery



#### Vysvětlivky

- GalNAc
- ◆ NeuAc
- ◆ ■ SiaTn-L

### SiaTnTRI-Dimery



- Dimerizační můstek

**Obr. 8: SiaTn-Dimery a SiaTnTRI-Dimery.** Schematické znázornění struktury dimerů SiaTn-Dimer(2), SiaTn-Dimer(4), SiaTn-Dimer(6), SiaTnTRI-Dimer(2), SiaTnTRI-Dimer(4) a SiaTnTRI-Dimer(6) – struktura různě dlouhých dimerizačních můstků viz výše, Obr. 6. Struktura SiaTn antigenu s připojeným linkerem (SiaTn-L) je uvedena na Obr. 3 na str. 14, struktura trimerizovaného SiaTn antigenu s připojeným linkerem (SiaTnTRI-L) na Obr. 4 na str. 14.

## 3.3. Úvod do metod

### 3.3.1. Deglykosylace glykoproteinů

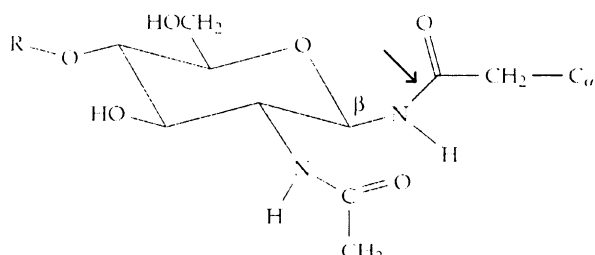
K deglykosylaci glykoproteinů se používají buď enzymatické nebo chemické metody.



### 3.3.1.1. Enzymatické metody deglykosylace glykoproteinů

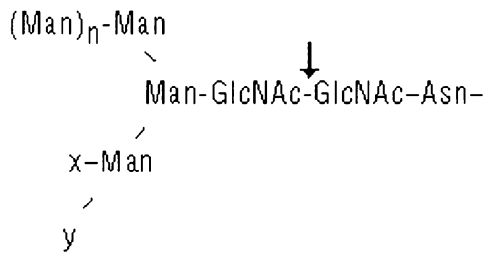
#### 3.3.1.1.1. Enzymatické metody pro odštěpení N-glykosidicky vázaných sacharidových složek

Existuje několik enzymů pro odštěpení N-glykosidicky vázaných sacharidových složek. Nejpoužívanější je peptid: N-glykosidasa F<sup>[34]</sup>, známá jako PNGasa F, která štěpí vazbu mezi N-acetylglukosaminem na redukujícím konci N-glykosidicky vázané sacharidové složky a aminokyselinovým zbytkem asparaginu (detaily viz. níže, Obr. 9). PNGasa F štěpí prakticky všechny typy N-glykosidicky vázaných sacharidových složek, bez ohledu na jejich strukturu, kromě těch obsahujících fukosu vázanou  $\alpha 1 \rightarrow 3$  na N-acetylglukosamin nacházející se na redukujícím konci, což je běžné u rostlinných N-glykosidických sacharidů<sup>[35]</sup>. V tomto případě bývá účinná PNGasa A<sup>[36]</sup>. PNGasa F je komerčně dostupná a získává se z organismu *Flavobacterium meningosepticum*.



**Obr. 9: Místo štěpení PNGasou F.** Peptid: N-glykosidasa F štěpí vazbu mezi N-acetylglukosaminem na redukujícím konci N-glykosidicky vázané sacharidové složky a aminokyselinovým zbytkem asparaginu (místo štěpení vyznačeno šipkou)<sup>[36]</sup>. Produktem enzymové reakce tak je glykosylamin a aminokyselinový zbytek kyseliny asparagové<sup>[36]</sup>. Glykosylamin pak ochotně hydrolyzuje na sacharid, pokud reakční pufr neobsahuje amonné ionty<sup>[37]</sup>.

Velmi používaným enzymem je i peptid: N-glykosidasa H, která narozdíl od PNGasy F (viz. výše, Obr. 9) neodštěpuje celou N-glykosidicky vázanou sacharidovou složku, ale štěpí mezi dvěma N-acetylglukosaminy<sup>[36]</sup> - viz. níže, Obr. 10.



**Obr. 10: Místo štěpení PNGasou H.** PNGasa H odštěpuje pouze N-glykosidicky vázané sacharidové složky vysokomanosového typu (kdy  $n = 2 - 150$ ,  $x = (\text{Man})_{1,2}$  a  $y = \text{H}$ ) a hybridního typu (kdy  $n = 2$ ,  $x$  a/nebo  $y = \text{NeuAc-Gal-GlcNAc}$ )<sup>[34]</sup>. Šipkou je označeno místo štěpení.

### 3.3.1.1.2. Enzymatické metody pro odštěpení O-glykosidicky vázaných sacharidových složek

V současnosti je jedinou možností použít enzym O-glykosidasa, který má ale velmi omezenou specifitu – štěpí vazbu GalNAc $\alpha$ 1→O-Ser/Thr, přičemž odštěpuje pouze žádnými dalšími sacharidy nesubstituovaný disacharid Gal $\beta$ 1→3GalNAc<sup>[38]</sup>. Pokud jde tedy o analýzu nebo preparaci O-glykosidických sacharidů, není k dispozici žádný stejně mocný nástroj jako PNGasa F v případě N-glykosidických sacharidů.

### 3.3.1.2. Chemické metody deglykosylace glykoproteinů

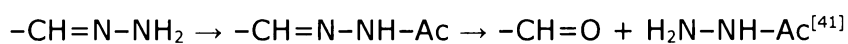
Nejpoužívanějšími metodami chemické deglykosylace glykoproteinů jsou hydrazinolýza<sup>[39]</sup> a alkalická  $\beta$ -eliminace<sup>[40]</sup> – pokud je cílem získat pouze sacharidy.

#### 3.3.1.2.1. Hydrazinolýza

Hydrazinolyticky se dají odštěpovat bez omezení jak O-glykosidicky tak N-glykosidicky vázané sacharidové složky<sup>[39]</sup>. O-glykosidické sacharidy se dají odštěpit inkubací při 60 °C (poměrně specificky – na 90 % de-O-glykosylaci připadá asi 10 % de-N-glykosylace), pro odštěpení N-glykosidických sacharidů se používá inkubace při teplotě 95 °C, při které se odštěpují zároveň i O-glykosidické sacharidy<sup>[41]</sup>.

Mezi problémy této metody patří různé modifikace na redukujícím konci oligosacharidů, de-N-acetylace N-acetylaminosacharidů<sup>[42]</sup> a acetylace hydroxyskupin při reacetylaci de-N-acetylovaných aminosacharidů (v malé míře)<sup>[42]</sup>.

Redukující konec oligosacharidů je obvykle uvolňován ve formě hydrazidu – zpátky na aldehyd je převeden N-acetylací:



Výtěžek této reakce ale není 100 %, odhaduje se, že 20 - 25 % sacharidů nelze získat s intaktním redukujícím koncem<sup>[43]</sup>.

N-acetylací se zároveň převádí aminosacharidy zpět na N-acetylderiváty, které byly de-N-acetylovány hydrazinolýzou – dochází ale přitom ke ztrátě informace, zda se jednalo o neacetylovaný aminosacharid a v případě kyseliny neuraminové zda se jednalo o kyselinu N-acetyl- nebo N-glykolyneuraminovou<sup>[42]</sup>.

### **3.3.1.2.2. Alkalická β-eliminace**

O-glykosidické sacharidové složky se od proteinové kostry odštěpují nejčastěji alkalickou hydrolýzou (alkalickou β-eliminací)<sup>[42]</sup>. Jako báze se používá hydroxid sodný, triethylamin, ethylamin nebo n-butylamin (n-butylamin je méně alkalický než ethylamin). Nejlepší výsledky poskytuje asi 70 % ethylamin (w/v)<sup>[44]</sup>, ale i v tomto případě dochází k nezanedbatelnému rozkladu redukujícího konce sacharidu anebo jiným druhům degradace<sup>[42]</sup>. Zabránění rozkladu redukujícího konce sacharidu v alkalickém pH – viz. níže, 3.3.1.2.3. Redukční β-eliminace.

### **3.3.1.2.3. Redukční β-eliminace**

Aby se zabránilo rozkladu redukujícího konce sacharidu při vysokém pH, je možné spolu s alkálií použít také redukční činidlo borohydrid sodný<sup>[40]</sup> – aldehydová skupina na redukujícím konci je tak redukována, sacharidy jsou uvolňovány ve formě zvané alditol (kdy uhlík č. 1 redukující sacharidové jednotky nese místo aldehydové skupiny alkoholovou). Alditoly jsou pak

stabilní i při vysokém pH a je možné uvažovat např. o analýze pomocí HPAE-PAD (viz. 3.3.2.9. Separace sacharidů pomocí HPAE-PAD na str. 23).

## **3.3.2. Separační metody sacharidů založené na HPLC**

### **3.3.2.1. Volba mobilní fáze pro HPLC s detekcí v UV oblasti**

GlcNAc a kyselina N-acetylneuraminová mají v oblasti 400 až 200 nm absorpční maximum při 200 nm, takže pokud sacharidy nechceme nebo nemůžeme označit např. 2-aminobenzamidem, je třeba najít mobilní fázi, která v tomto rozmezí nebude absorbovat.

Jako mobilní fáze se nejlépe hodí voda, která umožňuje spektrofotometrickou detekci i při 200 nm (v oblasti 400 až 200 nm vůbec neabsorbuje). Použit lze i např. 5 % (v/v) ethanol s detekcí při 210 nm, 25 % methanol (v/v) s detekcí při 200 – 210 nm a acetonitril : voda v různém poměru (podle druhu chromatografie) – např. směs acetonitril : voda v poměru 1 : 1 má i při 200 nm absorpenci pouhých 0,04.

Jako pufr se hodí 50 mM NH<sub>3</sub>/HAc pufr o pH 5 nebo 10 mM NH<sub>3</sub>/HAc pufr o pH 6 s detekcí při 230 nm, 10 mM N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>/HCOOH pufr o pH 4,5 s detekcí při 200 nm nebo 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0 : acetonitril (s oběma složkami v různém objemovém poměru) s detekcí při 214 nm<sup>[45]</sup> (při poměru 37,5 : 62,5 je dle mých měření citlivější detekce v případě N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylneuraminové v rozmezí 210 - 205 nm).

Pokud jsou předmětem našeho zájmu sialované oligosacharidy, jsou vhodné rovněž mobilní fáze jako 3 % kyselina octová<sup>[46]</sup>.

### **3.3.2.2. Separace sacharidů od glykopeptidů, peptidů a proteinové složky**

Glykopeptidy a peptidy, pokud je jejich molekulová hmotnost dostatečně větší než molekulová hmotnost sacharidů, se dají od sacharidů oddělit gelovou permeační chromatografií na nosiči Sephadex G-15 (frakcionační rozmezí do 1500 Da) nebo Bio-Gel P-6 (frakcionační rozmezí 1000 Da – 6000 Da).

Při enzymatické deglykosylaci zbyde proteinová kostra nepřerušena v celé sekvenci – vhodným prvním krokem je srážení ethanolem v objemovém poměru k vodě 2 : 1.

Proteiny, peptidy, glykopeptidy a detergenty se dají od sacharidů rovněž oddělit chromatografií na obrácené fázi např. na koloně Vydac C<sub>4</sub> 25 × 0,46 cm při eluci 12 % acetonitrilem a 0,1 % trifluoroctovou kyselinou při průtoku 1 ml/min<sup>[47]</sup>.

### **3.3.2.3. Odsolení**

Odsolení sacharidů lze provést rovněž gelovou permeační chromatografií na nosičích Sephadex G-15 (frakcionační rozmezí do 1500 Da), Bio-Gel nebo Toyopearl HW-40.

### **3.3.2.4. Odstranění detergentů**

Rozdělit směs detergentů a sacharidů je možné chromatograficky na koloně s nosičem LiChroprep RP-18 (silikagel modifikovaný osmnáctiuhlíkatými lineárními řetězci). Sacharidy se z kolony eluují 5 % ethanolem, detergenty 20 % ethanolem. Detekci je možné provádět při 210 nm.

Detergenty se dají odstranit rovněž chromatografií na obrácené fázi např. na koloně Vydac C<sub>4</sub> 25 × 0,46 cm při eluci 12 % acetonitrilem a 0,1 % trifluoroctovou kyselinou při průtoku 1 ml/min<sup>[47]</sup>.

### **3.3.2.5. Separace sacharidů gelovou permeační chromatografií**

Sacharidy složené z jedné až šesti monosacharidových jednotek se dají poměrně uspokojivě frakcionovat podle své molekulové hmotnosti gelovou permeační chromatografií na nosiči Toyopearl HW-40, který se dodává ve třech zrnitostech a nejvyšší rozlišení frakcionace se dosahuje s nejmenší zrnitostí (Toyopearl HW-40S, superfine, velikost částic 30 μm). Touto chromatografií ale nelze rozlišit např. jednotlivé polohové izomery (viz. 3.3.2.9. Separace sacharidů pomocí HPAE-PAD na str. 23) o stejné molekulové hmotnosti. Výhodou této chromatografie je možnost použití poměrně hydrofilní mobilní fáze, takže i rozpustnost vzorku není nijak omezena (na rozdíl od chromatografie na normální fázi s diolovou kolonou, viz. níže). Další výhodou je, že chromatografie běží při nižším tlaku (i samospádem).

### **3.3.2.6. Separace sacharidů chromatografií na normální fázi**

Sacharidy složené z šesti a více monosacharidových jednotek lze oddělit chromatografií na normální fázi na koloně s nosičem LiChrosorb® DIOL (o rozměrech např. 25 × 0,4 cm) – tento nosič je tvořen silikagelovými částicemi pokrytými epoxysilanem. Vzorek se nanáší na kolonu ekvilibrovanou v hydrofobnějším solventu, např. 75 % acetonitrilu, a velmi pozvolným gradientem do solventu s vyšším podílem vody se eluují jednotlivé sacharidy – sacharidy složené z většího počtu monosacharidů se eluují později než sacharidy složené z menšího počtu monosacharidů. Uspokojivé množství sacharidů obvykle nelze rozpustit v hydrofobnějším solventu než je 60 % acetonitril, což je nejvýraznější omezení této metody – takovýto vzorek je ale přesto možné nanášet na kolonu ekvilibrovanou 75 % acetonitrilem. Dalším omezením je velký provozní tlak kolony – při průtoku 1 ml/min je potřeba HPLC systému, který umožňuje pracovní tlak minimálně 10 – 14 MPa. Nejvýraznějším pozitivem této metody je šetrnost k sacharidům, nehrozí při ní žádná degradace.

### **3.3.2.7. Separace sacharidů chromatografií na obrácené fázi**

Separace je umožněna hydrofobní interakcí acetylových skupin s hydrofobním nosičem<sup>[48]</sup>. Tímto druhem chromatografie lze rozdělit např. směs n-acetylglukosaminu, chitobiosy, chitotriosy a chitotetraosy při použití vody jako mobilní fáze<sup>[49]</sup>. Dokonce je takto možné rozlišit i  $\alpha$  a  $\beta$  anomery. Pokud je zvýšena hydrofobicita mobilní fáze, je možné oddělit až chitoheptaosu.

### **3.3.2.8. Separace sacharidů chromatografií na grafitizovaném uhlíku**

Hydrofobnost tohoto materiálu je větší než u konvenčních nosičů pro chromatografii na obrácené fázi, takže ve srovnání s ní je pro eluci sacharidů potřeba poměrně vysoké procento organického solventu. Velkou výhodou je odolnost tohoto materiálu, která umožňuje opakované používání bez ztráty reprodukovatelnosti. Nosič vydrží celé rozmezí pH a může být použit s širokou škálou solventů. Největší výhodou je bezkonkurenční schopnost rozlišit i strukturně blízké a izomerické sacharidy<sup>[40]</sup>.

### **3.3.2.9. Separace sacharidů pomocí HPAE-PAD**

HPAE-PAD nebo-li anexová chromatografie za vysokého pH spojená s pulzní elektrochemickou detekcí umožňuje účinnou separaci sacharidů složených z jedné až jedenácti monosacharidových jednotek nejen podle počtu monosacharidových jednotek, ale i oddělení polohových izomerů o stejné molekulové hmotnosti<sup>[50]</sup>.

Tato metoda je založena na skutečnosti, že monosacharidy jsou slabé kyseliny s hodnotou  $pK_a$  12 – 13, které se dají za vysokého pH separovat mechanismem ionexové chromatografie. Pulzní ampérometrická detekce umožňuje detekovat i pouhých 10 pmol sacharidů při vynikajícím poměru signálu k šumu<sup>[51]</sup>.

Pro separaci sacharidů existují zejména tyto kolony (jak v rozměrech 25 × 0,4 cm pro analytické účely, v rozměrech 25 × 0,9 cm pro semipreparativní účely, tak i v rozměrech 25 × 2,2 cm pro preparativní účely):

- CarboPac MA1 od firmy Dionex. Tento typ kolony je vhodný zejména pro separaci monosacharidů a dokonce i jejich redukovaných forem, které jsou ještě slabší kyseliny než neredukované ( $pK_A$  mají mezi 13 a 14). Rovněž redukované di- a trisacharidy (uvolněné např. redukční  $\beta$ -eliminací) se na této koloně dobře separují. Oproti koloně PA1 (viz. níže) je MA1 plněna makroporézním polymerním nosičem se zhruba 45 krát větší kapacitou, což zvyšuje rozlišovací schopnost zejména u redukovaných monosacharidů.

- CarboPac PA1 od firmy Dionex. Tento typ byl navržen zejména pro separaci redukujících monosacharidů a lineárních homopolymerů. Nosič je tvořen polymerními neporézními částicemi o velikosti 5  $\mu\text{m}$  (stejně tak i u kolony PA-100).

- CarboPac PA-100 od firmy Dionex. Je optimalizována pro separaci oligosacharidů, např. N-glykosidických sacharidů.

Mezi výhody této metody patří hlavně vysoká rozlišovací schopnost, velká stabilita nosiče při zvýšeném tlaku umožňující maximální pracovní tlak od 14 MPa (CarboPac MA1) až do 28 MPa (CarboPac PA1 a PA-100) a vysoká citlivost detekce (detekční limit min. 10 pmol).

Mezi nevýhody patří zejména nestabilita některých vazeb při vysokém pH<sup>[51]</sup>:

- N-acetylglukosamin epimerizuje na N-acetylmanosamin, takže oligosacharidy separované pomocí 100 mM NaOH, zejména pokud jsou sialylované (což zvyšuje jejich retenční čas), vykazují 0 – 15 % epimerizaci. Protože alditoly při vysokém pH neepimerizují, lze tomuto jevu zabránit redukcí N-acetylglukosaminu na alditol (viz. 3.3.1.2.3. Redukční  $\beta$ -eliminace na str. 19).

- Deacetylace N-acetylaminosacharidů – GlcNAc inkubovaný přes noc při laboratorní teplotě ve 150 mM NaOH se rozloží zhruba z 20 % na glukosamin. Při chromatografii s GlcNAc však k žádnému pozorovatelnému rozkladu nedochází, stejně tak s kyselinou N-acetyl- nebo N-glykolylnauraminovou.

- $\beta$ -eliminace 3-O-substituentů redukujících sacharidů – tato vazba je opět citlivá na vysoké pH, např. chromatografie s laminaribosou ale proběhne tak



rychle, že žádný rozklad není pozorovatelný. Naopak D-glukosa-3-sulfát se během chromatografie rychle rozpadá na D-glukosu a sulfát.

### **3.3.2.10. Separace sialovaných oligosacharidů**

Předfrakcionaci sialovaných oligosacharidů lze provést podle počtu kyselin sialových na koloně Mono Q – sacharidy se na kolonu nanáší ve vodě a gradientem do 100 mM NaCl se sacharidy eluují podle počtu kyselin sialových<sup>[45]</sup>. Jako další separační krok lze zařadit např. chromatografii na normální fázi s tzv. aminokolonu (silikagel s aminoskupinami, např. LiChrosorb®-10-NH<sub>2</sub>) za použití pufru acetonitril/30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zmíněného v oddíle 3.3.2.1. Volba mobilní fáze pro HPLC s detekcí v UV oblasti na str. 20. Použitelná by pravděpodobně byla i kolona s nosičem LiChrosorb® DIOL (tzv. diolová kolona). Jako finální purifikační krok může posloužit HPAE-PAD na CarboPac PA1 koloně<sup>[52]</sup>.

## **3.3.3. Analytické metody**

### **3.3.3.1. Chemická stanovení**

#### **3.3.3.1.1. Stanovení hexos (vázaných a volných)**

Stanovení hexos, vázaných a volných zároveň, lze provést pomocí 5 % fenolu a koncentrované kyseliny sírové<sup>[53]</sup>. Jako standard je možné použít např. glukosu. Technické detaily viz. oddíl 6.1.12. Stanovení hexos (vázaných i volných) na str. 44.

#### **3.3.3.1.2. Stanovení vázaných a celkových kyselin sialových perjodát resorcinolovou metodou**

Stanovení kyselin sialových (kyseliny N-acetylneuraminové nebo N-glykolyneuraminové) je možné provést pomocí 40 mM kyseliny hexaoxojodisté, resorcinového činidla (viz. 5.9. Použité roztoky a činidla,

str. 37) a terciárního butylalkoholu (2-methyl-2-propanolu)<sup>[54]</sup>. Pro stanovení vázaných kyselin sialových je možné použít jako standard fetuin, o kterém je známo, že 1 mol proteinu obsahuje asi 13,6 mol kyselin sialových<sup>[55]</sup>. Pro stanovení volných kyselin sialových je možné použít kyselinu N-acetylneuraminovou. Technické detaily viz. oddíl Metody, 6.2.1. Stanovení vázaných a celkových kyselin sialových perjodát resorcinolovou metodou na str. 45.

### **3.3.3.2. SDS-PAGE**

SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je technika používaná pro separaci proteinů zejména podle jejich elektroforetické pohyblivosti, což je v těchto podmínkách funkce zejména délky polypeptidového řetězce a stupně jeho glykosylace.

Vzorkový pufr obsahuje SDS, anionický detergent, který denaturuje sekundární a terciární struktury (kromě disulfidických můstků). SDS se váže na protein v poměru asi 1,4 g SDS : 1,0 g proteinu, což protein linearizuje, dává mu přibližně jednotný poměr molekulová hmotnost : náboj a zaručuje dělení podle molekulové hmotnosti. Protein se ve vzorkovém pufru před nanesením na gel 5 minut povaří; pokud je třeba přerušit disulfidické můstky, použije se vzorkový pufr navíc s redukčním činidlem, např. DTT nebo 2-merkapt ethanol.

SDS elektroforéza se provádí nejčastěji v dvougelovém provedení. V prvním gelu (do kterého se vzorek nanáší) je pH 6,8 a póry jsou tak velké, že nedojde k žádné separaci proteinu, nýbrž jen k izotachoforetickému zakoncentrování vzorku do jednoho ostrého pruhu, proto se tento gel nazývá zaostřovací. V následujícím gelu je pH 8,8 a póry jsou o takové velikosti, že kladou pohybu denaturovaných proteinu odpor, díky kterému dochází k separaci podle molekulové hmotnosti, proto se tento gel nazývá separační.

### **3.3.3.3. Hmotnostní spektrometrie**

Pro analýzu sacharidů se používá zejména MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization). Vzorek se

kokrysalizuje na terčiku s matricí, v případě sacharidů nejčastěji s kyselinou 2,5-dihydroxybenzoovou<sup>[42]</sup>, v molárním poměru 1 : 10 000 - 1 : 100 000, ozáří krátkým pulsem UV laseru, čímž se matrice se vzorkem odpaří, a vzorek je matricí ionizován. Energii laseru absorbuje hlavně matrice a tato energie je také zodpovědná za desorpci a ionizaci (ve vakuu). Tento typ ionizace je velmi měkký, nedochází buď k žádné nebo malé fragmentaci (u sacharidů také). Nejčastěji vznikají molekulové ionty  $[M + H]^+$  nebo  $[M - H]^-$ , u sacharidů při použití kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové jako matrice bývá hlavní ion sodný adukt  $[M + Na]^+$ , v menší míře také často draselný adukt  $[M + K]^+$ <sup>[42]</sup>.

### **3.3.4. Vazebné studie**

#### **3.3.4.1. Destičkové inhibiční testy**

Principem inhibičního testu je inhibice vazby zkoumaného proteinu na imobilizovaný (polyvalentní) ligand zkoumaným potenciálním ligandem.

Prakticky se v případě CD69 postupuje tak, že jamky PVC destiček se nejprve „pokryjí“ molekulami GlcNAc<sub>17</sub>BSA (které na povrchu PVC drží hydrofobními interakcemi) a potom molekulami BSA, které na povrchu PVC „blokuje“ místa, která neobsadil GlcNAc<sub>17</sub>BSA (technické detaily viz. 7.2. Destičkové inhibiční testy na str. 60). Do takto upravené jamky se přidá směs radionuklidem <sup>125</sup>I značeného proteinu CD69 a zkoumaného zkoumaného ligandu o určité koncentraci – čím větší afinitu má zkoumaný ligand k proteinu, tím menší množství proteinu se během inkubace naváže na GlcNAc<sub>17</sub>BSA imobilizovaný na destičkách. Po inkubaci se destičky opláchnou puřrem, ve kterém byl test prováděn, vysuší se a pomocí scintilačního roztoku se v jamkách měří radioaktivita. Inhibice se měří při několika koncentracích inhibitoru – obvykle se volí „desítkové ředění“ – inhibitor je ředěn např. 10<sup>0</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> krát. Z takových dat je možné sestrojít inhibiční křivku a z ní odečíst IC<sub>50</sub> (platící pro příslušnou koncentraci proteinu).

Procento inhibice se počítá dle následujícího vztahu:

$$\text{procento inhibice} = \left( 1 - \frac{\text{ccpm}(\text{jednotlivé měření}) - \text{ccpm}(\text{pozadí})}{\text{ccpm}(\text{maximální}) - \text{ccpm}(\text{pozadí})} \right) \cdot 100\%$$

**Rovnice 1:** ccpm (z angl. *corrected counts per minute*) udává impulsy naměřené přístrojem a přepočtené na rozpady za minutu. Odečet pozadí provádí přístroj většinou automaticky. Hodnotu ccpm(maximální) lze zjistit tak, že v jedné sadě se místo řady různých koncentrací inhibitoru použije slepý vzorek (např. voda, pokud jsou inhibitory rozpuštěné ve vodě).

### 3.3.4.2. Destičkové precipitační testy

Při destičkovém precipitačním testu se měří precipitační křivka stejným způsobem, jako lze měřit precipitační křivku při srážení proteinu protilátkou. Podmínkou pro vytvoření precipitátu je obecně to, aby jak protein tak i ligand byly minimálně bivalentní.

Sacharidy OvoTRI-Dimery a SiaTnTRI-Dimery slouží v precipitačním testu jako tzv. molekulární pravítka – sacharidový dimer s dimerizačním můstkem o optimální délce precipituje protein nejlépe. Tento test je ale vhodné doplnit o test buněčné aktivity, protože receptor vázaný na buněčnou membránu může vykonávat pouze laterální pohyb. Pravidelně proto při těchto testech vychází jiná optimální délka dimerizačního můstku, většinou větší.

Prakticky se postupuje tak, že ligand – OvoTRI-Dimery nebo SiaTnTRI-Dimery (detaily struktur viz. Obr. 1, 4, 5, 6, 7, a 8 na str. 12 až 16) – se inkubuje s proteinem, poté se inkubuje se srážecím roztokem (např. roztok  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nebo PEG 6000 – koncentrace je optimalizovaná tak, že podpoří tvorbu precipitátu, ale zároveň neprecipituje samotný protein) a sraženina se stočí v centrifuze. V destičkovém provedení se supernatant vyhodí, sraženina resuspenduje ve srážecím roztoku o optimalizované koncentraci, opět stočí a supernatant opět vyhodí. Toto promytí se provádí celkem třikrát.

Při vyhodnocení výsledků se vynáší procento vysráženého proteinu proti molárnímu poměru ligand : protein (v logaritmické škále). Procento vysráženého proteinu se zjistí tak, že se vydělí radioaktivita změřená v jamce radioaktivitou, která by byla změřena, kdyby se protein vysrážel ze 100 %.

### 3.3.4.3. Rovnovážná dialýza

Rovnovážná dialýza je nejpřesnější metoda pro charakterizaci síly vazby ligandu na protein<sup>[56]</sup>. Jediným problémem je stanovení koncentrace ligandu, což se řeší tak, že např. v případě vazby sacharidového ligandu na CD69 se sacharid naznačí radioaktivním tritiem a koncentrace je pak mírou radioaktivity.

Experiment je dobré navrhnout např. tak, aby molární poměr protein : ligand byl např. 20; 6,7; 2,2; 0,74; 0,25; 0,08; 0,03; 0,01 („trojkové ředění“).

Po experimentu v případě tritiem značených sacharidů, který trvá obvykle 48 hodin, se odeberou příslušné alikvoty, ve kterých se změří radioaktivita, a radioaktivita se pomocí specifické aktivity (dpm/mol nebo Bq/mol látky) přepočte na koncentraci sacharidů.

Pro další výklad si definujme následující symboly:

$[B]$  = celková koncentrace obsazených vazebných míst, nebo-li koncentrace vázaného ligandu

$[R]$  = celková koncentrace neobsazených vazebných míst

$[F]$  = koncentrace volného ligandu

$[L]$  = celková koncentrace ligandu

$[R_T]$  = celková koncentrace vazebných míst

$[P]$  = celková koncentrace proteinu

$k_D$  = disociační konstanta

$k_1$  = rychlostní konstanta vzniku komplexu ligand – protein

$k_{-1}$  = rychlostní konstanta zániku komplexu ligand – protein

Výpočet vazebných parametrů z experimentálních dat:

Přepokladem je, že při rovnováze se rychlost vzniku komplexu rovná rychlosti rozpadání komplexu:

$$[F] \cdot [R] \cdot k_1 = [B] \cdot k_{-1}$$

**Rovnice 2:** Definice jednotlivých symbolů – viz. výše.

Z rovnice 2 vyplývá:

$$\frac{[F] \cdot [R]}{[B]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = k_D \Leftrightarrow [R] = k_D \cdot \frac{[B]}{[F]}$$

**Rovnice 3:** Definice jednotlivých symbolů – viz. výše.

Dosažením vztahu pro  $[R]$  (viz. výše, rovnice 3) do vztahu pro stupeň nasycení (viz. níže, rovnice 4) dostáváme:

$$\text{stupeň nasycení} = \frac{[B]}{[R_T]} = \frac{[B]}{[R] + [B]} = \frac{[B]}{k_D \cdot \frac{[B]}{[F]} + [B]} = \frac{1}{\frac{k_D}{[F]} + 1} = \frac{[F]}{[F] + k_D} = \frac{[F]}{[F] + k_D} = \frac{[B]}{[R_T]}$$

**Rovnice 4:** Definice jednotlivých symbolů – viz. výše.

Z předchozí rovnice zároveň vyplývá:

$$\frac{[R_T] \cdot [F]}{[F] + k_D} = [B]$$

**Rovnice 5:** Definice jednotlivých symbolů – viz. výše.

Z rovnice 5 vyplývá, že proložením experimentálních bodů závislosti koncentrace vázaného ligandu,  $[B]$ , na koncentraci volného ligandu,  $[F]$ , hyperbolou získáme jak parametry  $[R_T]$ , tak  $k_D$ . Pro výpočet stechiometrie vazby ligandu na receptor platí tento vztah:

$$n = \frac{[R_T]}{[P]}$$

**Rovnice 6:**  $n$  je počet vazebných míst na receptoru, definice ostatních symbolů – viz. výše.

Získání parametrů  $[R_T]$ ,  $k_D$  a  $n$  je možné i pomocí tzv. Scatchardova výnosu, fitování dat je v tomto případě ale méně přesné než v předchozím případě<sup>[56]</sup>, takže rovnici Scatchardova výnosu uvedme bez důkazu:

$$\frac{[B]}{[F]} = \frac{1}{k_D} \cdot [R_T] - \frac{1}{k_D} \cdot [B]$$

**Rovnice 7:** Scatchardův výnos. Definice jednotlivých symbolů – viz. výše.

## 4. Cíle diplomové práce

- ✓ Izolovat N-glykosidické sacharidy z ovomukoidu pro vazebné studie s proteinem CD69.
- ✓ Izolovat O-glykosidické sacharidy z PSM pro vazebné studie s proteinem CD69.
- ✓ Provést vazebné studie se sacharidy izolovanými z ovomukoidu a PSM, se syntetickými sacharidy a s dimery syntetických sacharidů o různé délce dimerizačního můstku.
- ✓ Ověřit sacharidovou specifitu proteinu CD69.
- ✓ Porovnat sacharidovou specifitu dvou nových konstruktů CD69NV82 a CD69NS84 s CD69NG70.

## 5. Materiál

### 5.1. Použité přístroje

- Analytické váhy AND, USA
- Automatické pipety Gilson, Francie
- Centrifuga J2-21 Beckman, USA
- Centrifuga J-6M Beckman, USA
- Centrifuga MPW-365 Mechanika Precyzyjna, Polsko
- Centrifuga stolní, Spectrafuge 16M Edison, USA
- Centrifuga Z 233 MK-2 Hermle, SRN
- Dialyzační trubice ( $M_r$  "cut off" 10000) Sigma, USA
- Filtry PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  a 0,40  $\mu\text{m}$  Millipore, USA
- HPLC systém BioSys 510 Beckman, USA
- HPLC systém Waters 660 Controller, Waters 717 Autosampler, Waters 996 Photodiode Array Detector, program Millenium<sup>32</sup> Waters Corporation, USA
- HTS monochromátorová čtečka Safire<sup>2</sup> Tecan, Rakousko
- Chladnička Zanussi, Itálie
- Chladnička Skandiluxe, Dánsko
- Kolona Superformance cartridge 150-16 (15 × 1,6 cm) Merck, SRN
- Kolona Superformance cartridge 150-26 (15 × 2,6 cm) Merck, SRN
- Kolona Superformance cartridge 300-10 (30 × 1 cm) Merck, SRN
- Kolona Superformance cartridge 600-16 (60 × 1,6 cm) Merck, SRN
- Kolona Hibar<sup>®</sup> RT 250-4 LiChrosorb<sup>®</sup> DIOL (25 × 0,4 cm) Merck, SRN
- Lyofilizátor Lyovac GT-2 Leybold-Heraus, SRN



•Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
•MALDI TOF hmotnostní spektrometr BIFLEX II	BRUKER, SRN
•Microbeta 1450 Trilux	Wallac, Finsko
•Mrazicí box (-20°C)	Zanussi, Itálie
•Mrazicí box (-80°C) Ultra Low	Revco, USA
•Nástavec pro centrifugaci destiček do rotoru JS-5.2	Beckman, USA
•Olejová vývěva	Chirana, ČR
•Parafilm	Sigma, USA
•pH metr Ø200	Beckman, USA
•Předvážky HF-1200G	AND, USA
•PVC destičky	Thermo, USA
•Rotor 220.87 VO5/6	Hermle, SRN
•Rotor JA25.50	Beckman, USA
•Rotor JS-5.2	Beckman, USA
•Souprava pro elektroforézu	Sigma, USA
•Souprava pro filtraci za sníženého tlaku	Sigma, USA
•Spektrofotometr DU70	Beckman, USA
•Ultrazvuková lázeň	KRAINTEK, Slovensko
•Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710	Cole-Parmer Instrument Co., USA
•Vakuová centrifugační odparka RC 10.10	Jouan, Francie
•Vortexový mixér 2x <sup>3</sup>	VELP Scientifica, Itálie
•Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore, USA
•Zdroj napětí EPS 500/400	Pharmacia, USA

## 5.2. Použité chemikálie

•Aceton	Lachema, ČR
•Acetonitril	Merck, SRN
•Acetonitril	Fluka, Švýcarsko
•3'-N-acetylneuraminyllaktosa	Sigma, USA

•6'-N-acetylneuraminyllaktosa	Sigma, USA
•3'-N-acetylneuraminyl-N-acetyllaktosamin	Sigma, USA
•6'-N-acetylneuraminyl-N-acetyllaktosamin	Sigma, USA
•Akrylamid	Sigma, USA
•APS (peroxodisíran amonný)	Sigma, USA
•Azid sodný	Merck, SRN
•Biodegradable Counting Scintillator, NBCS 104	Amersham Biosciences, UK
•Bromfenolová modř	Serva, SRN
•n-butylamin	Sigma, USA
•Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, SRN
•Čpavek, 25 % vodný roztok	Lachema, ČR
•Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, ČR
•DTT	Fluka, Švýcarsko
•EDTA, disodná sůl, dihydrát	Jersey Lab Supply, USA
•Ethanol pro UV spektroskopii	Lachema, ČR
•Fenol	Reactivul, Rumunsko
•GlcNAc <sub>17</sub> BSA	Sigma, USA
•Glukosa, mohohydrát	Merck, SRN
•Glycerol	Lachema, ČR
•Glycin	Fluka, Švýcarsko
•Hydrogenfosforečnan disodný	Lachema, ČR
•Hydroxid sodný	Lachema, ČR
•Chlorid draselný	Lachema, ČR
•Chlorid sodný	Lachema, ČR
•Chlorid vápenatý	Reactivul, Rumunsko
•Kyselina N-acetylneuraminová	Fluka, Švýcarsko
•Kyselina hexaoxodistá	Fluka, Švýcarsko
•Kyselina chlorovodíková	Merck, SRN
•Kyselina octová	Lachema, ČR
•Kyselina trichloroctová	Avondale Laboratories, UK
•Kyselina sírová	Lachema, ČR
•2-merkapt ethanol	Merck, SRN
•Methanol	Fluka, Švýcarsko
•N,N'-metylen-bis-akrylamid	Serva, SRN

- PEG 6000
- Resorcinol
- SDS
- Standard pro SDS-PAGE
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminoethan)
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)
- Triethylamin

Lachema, ČR  
 Fluka, Švýcarsko  
 Jersey Lab Supply, USA  
 Serva, SRN  
 Serva, SRN  
 Jersey Lab Supply, USA  
 Fluka, Švýcarsko

Všechny použité chemikálie byly nejvyšší komerčně dostupné čistoty, nejméně však p. a.

### 5.3. Použité proteiny

- CD69NG70
- CD69NV82
- CD69NS84
- <sup>125</sup>I-CD69NG70
- <sup>125</sup>I-CD69NV82
- <sup>125</sup>I-CD69NS84
- PSM

Mgr. Daniel Kavan  
 Mgr. Daniel Kavan  
 Mgr. Daniel Kavan  
 Prof. Bezouška  
 Prof. Bezouška  
 Prof. Bezouška  
 Laboratoř prof. Tiché

### 5.4. Použité sacharidy

- SiaTn
- SiaTnTRI
- OvoTRI-Dimer(2)
- OvoTRI-Dimer(4)
- OvoTRI-Dimer(6)

Lectinity, Finsko  
 Lectinity, Finsko  
 Laboratoř biotransformací,  
 MBÚ AV ČR, v. v. i., prof.  
 Křen  
 Laboratoř biotransformací,  
 MBÚ AV ČR, v. v. i., prof.  
 Křen  
 Laboratoř biotransformací,  
 MBÚ AV ČR, v. v. i., prof.  
 Křen

•SiaTn-Dimer(2)	Lectinity, Finsko
•SiaTn-Dimer(4)	Lectinity, Finsko
•SiaTn-Dimer(6)	Lectinity, Finsko
•SiaTnTRI-Dimer(2)	Lectinity, Finsko
•SiaTnTRI-Dimer(4)	Lectinity, Finsko
•SiaTnTRI-Dimer(6)	Lectinity, Finsko
•GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3(GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)(GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)GlcNAc	Mgr. Anna Kovářová-Rohlenová, PhD

## 5.5. Použité enzymy

•PNGasa F (500000 jednotek/ml)	New England Biolabs, UK
--------------------------------	-------------------------

## 5.6. Použité protilátky

•monoklonální protilátka proti CD69	BD Biosciences, USA
-------------------------------------	---------------------

## 5.7. Použité nosiče do kolon

•Sephadex G-15	Amersham Biosciences, UK
•SP-Sepharosa FF	Amersham Biosciences, UK
•LiChroprep RP-18, 5 - 20 $\mu$ m	Merck, SRN

## 5.8. Použité pufry

- Acetátový pufr: kyselina octová o požadované koncentraci titrovaná hydroxidem sodným
- PBS: fosfátový pufr, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4

## 5.9. Použité roztoky a činidla

### 5.9.1. Stanovení sacharidů

#### 5.9.1.1. Stanovení hexos (volných i vázaných)

- standard glukosy: 502 µg/ml
- fenolové činidlo: 5 % fenol (w/v)
- koncentrovaná kyselina sírová

#### 5.9.1.2. Stanovení vázaných a celkových kyselin sialových

- standard fetuinu: 20 nmol/ml
- standard kyseliny N-acetylneuraminové: 100 µg/ml (=0,32 µmol/ml)
- kyselina jodistá: 40 mM
- resorcinolové činidlo: 0,60 g resorcinolu + 6,1 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 40 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
+ 60 ml konc. HCl

### 5.9.2. De-N-glykosylace glykoproteinů

- 10 × Glycoprotein Denaturing Buffer [5 % SDS, 0,4M DTT]  
New England Biolabs, UK
- NP-40 (10 %)  
New England Biolabs, UK
- 10 × G7 Reaction Buffer[1 × G7 Reaction Buffer = 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,5]  
New England Biolabs, UK

### 5.9.3. SDS-PAGE

- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující: 50 mM Tris (pH = 6,8), 100 mM DTT, 10 % glycerol, 2 % SDS, 0,01 % bromfenolová modř
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující: 50 mM Tris (pH = 6,8), 10 % glycerol, 2 % SDS, 0,01 % bromfenolová modř

- 5% gel pro SDS-PAGE (zaostřovací): destilovaná voda (1,4 ml), 30 % akrylamidový mix (0,33 ml), 1 M Tris (pH=6,8) (0,25 ml), 10 % SDS (0,02 ml), TEMED (0,004 ml), 10 % APS (0,02 ml)
- Elektrodotový pufr: 0,25 M Tris, 0,25 M glycin, 0,1 % SDS, pH = 8,3
- Akrylamidový mix: 30 % akrylamid, 1 % N,N'-methylen-bis-akrylamid
- Marker pro SDS elektroforézu: BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), trypsinogen (24 kDa), lysozym (14,3 kDa) (koncentrace jednotlivých proteinů 0,2 mg/ml)
- Barvicí roztok pro SDS elektroforézu: 45 % MeOH, 10 % kyselina octová , 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250
- Fixační a odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu: 35 % EtOH, 10 % kyselina octová
- Roztok pro skladování polyakrylamidových gelů: 1 % kyselina octová (v/v)

## **6. Metody**

### **6.1. Sacharidové složky ovomukoidu**

#### **6.1.1. Získání frakce obsahující ovomukoid srážením**

Bylo rozklepnuto 20 slepičích vajec a oddělen bílek od žloutku. Bílek byl rozmíchán na magnetické míchačce. Přidáním 600 ml směsi acetonu a 0,5 M kyseliny trichloroctové v objemovém poměru 2 : 1 bylo sníženo pH na 3,0 (dle protokolu mělo být 3,5), čímž se objevila bílá sraženina (bylo třeba důkladné míchání). Směs byla umístěna na 50 min do 4 °C a poté centrifugována 20 min při 4000 ot./min na centrifuze Beckman J-6M, rotor JS-5.2. Supernatant měl dle protokolu obsahovat ovomukoid.

Supernatant byl přefiltrován přes filtrační papír. Pro získání frakce obsahující ovomukoid bylo provedeno srážení acetonem – za intenzivního míchání bylo přidáno 860 ml acetonu, čímž vznikla opět sraženina. Směs byla umístěna na 1,5 h do 4 °C a poté centrifugována 20 min při 4000 ot./min na centrifuze Beckman J-6M, rotor JS-5.2. Supernatant byl vyhozen a sraženina smísená s přibližně stejným množstvím acetonu, důkladně rozmíchána a přefiltrována na Büchnerově nálevce. Kromě jemné sraženiny se objevili i větší sklovité kusy, které nebyly použity k dalšímu zpracování. Bílá sraženina vážila po vysušení 3,32 g (15 min při 50 °C).

Sraženina byla rozpuštěna v 50 ml 25 mM acetátového pufru o pH 4,5 a přes noc dialyzována v dialyzační trubici s „cut-off“ 10 000 Da proti 2 l tohoto pufru (pro odstranění acetonu). Poté byla dialýza opakována ještě jednou, při stejném množství a složení vnějšího média, 6 h. Během dialýzy se objevila sraženina, která byla odstraněna centrifugací 30 min při 20000 ot./min na centrifuze Beckman J2-21, rotor JA25.50. Supernatant byl vzorkem pro následující krok.

### **6.1.2. Kontrola průběhu srážení ovomukoidu pomocí SDS-PAGE**

Kontrola průběhu srážení ovomukoidu byla provedena pomocí SDS-PAGE. Sraženiny po prvním srážení a sraženina vzniklá závěrečnou dialýzou vzorku (pro následnou lyofilizaci a HPLC purifikaci, viz. výše) byly rozpuštěny v jedenkrát koncentrovaném redukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE, alikvoty supernatantů po prvním a druhém srážení byly smíseny se stejným objemem dvakrát koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Vzorky byly před nanesením povařeny 5 min v mikrozkuhacích a stočeny na centrifuze Spectrafuge 16M při 10000 ot./min, 5 min. Jako standard byla použita směs proteinů o molekulových hmotnostech 66, 45, 24 a 14 kDa (detaily viz. 5.9. Použité roztoky a činidla na str. 37). Před zaputováním vzorků do separačního gelu bylo na zdroji nastavené napětí 80 mV, po zaputování bylo zvýšeno na 150 mV.

### **6.1.3. Purifikace ovomukoidu**

Se vzorkem (viz. výše) byla provedena anexová chromatografie na HPLC systému Beckman Biosys 510 na koloně o rozměrech 15 × 1,6 cm s náplní SP-Sepharosa FF. Jako solvent A posloužil 25 mM acetátový pufr o pH 4,5 a jako solvent B 25 mM acetátový pufr o pH 4,5 a s 1 M NaCl. Vzorek se na kolonu nanášel, když byla ekvilibrovaná solventem A. Po nanesení vzorku byla kolona promývána ještě 15 min solventem A, poté byl zahájen 40 min gradient do 60 % solventu B. Průtok byl nastaven na 4 ml/min. Kontinuální spektrofotometrická detekce byla prováděna při 280 nm. Solventy byly pro chromatografii filtrovány přes 0,40 µm PVDF membránu.

Chromatografie vyšla na asi deset běhů. Frakce příslušející ovomukoidu z jednotlivých chromatografických běhů (dohromady jich bylo přibližně deset) byly spojeny po kontrole pomocí SDS-PAGE (viz. 6.1.4. Kontrola čistoty ovomukoidu pomocí SDS-PAGE na str. 41) a dialyzovány dvakrát proti 10 l deionizované vody – jednou 4 hodiny a poté přes noc (celkový objem roztoku ovomukoidu k dialýze byl asi 150 ml). Dialyzát byl lyofilizován ve skleněné baňce. Lyofilizát vážil přibližně 1,0 g.



## **6.1.4. Kontrola čistoty ovomukoidu pomocí SDS-PAGE**

Kontrola čistoty ovomukoidu byla provedena pomocí SDS-PAGE na 15 % gelu. Z příslušných frakcí bylo odebráno po 5  $\mu$ l, přidáno po 5  $\mu$ l dvakrát koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE, vzorky povařeny 5 min v mikrozkušavkách a stočeny na centrifuze Spectrafuge 16M při 10000 ot./min, 5 min. Jako standard byla použita směs proteinů o molekulových hmotnostech 66, 45, 24 a 14 kDa (detaily viz. 5.9. Použité roztoky a činidla na str. 37). Před zaputováním vzorků do separačního gelu bylo na zdroji nastavené napětí 80 mV, po zaputování bylo zvýšeno na 150 mV.

## **6.1.5. Deglykosylace ovomukoidu**

Přibližně 0,5 g lyofilizátu ovomukoidu bylo rozpuštěno v 9 ml vody a rozděleno do dvou zkumavek na 10 ml. Do každé zkumavky bylo přidáno 0,5 ml „Glycoprotein Denaturing Buffer“ (glykoprotein denaturujícího pufru), zkumavky uzavřeny parafilmem a inkubovány 8 minut na vařící vodní lázni. Poté následovalo ochladnutí při laboratorní teplotě. Do každé zkumavky bylo přidáno po 0,5 ml 10 % NP-40, 0,5 ml „10 × G7 Reaction Buffer“ (reakčního pufru), 25  $\mu$ l roztoku enzymu PNGasa F (koncentrace 500000 jednotek/ml) a 25  $\mu$ l 1 M  $\text{NaN}_3$  (podle údajů výrobce má deglykosylace probíhat v 50 mM fosfátovém pufru a 1 % NP-40 při pH 7,5). Zkumavky byly opět uzavřeny parafilmem a umístěny do 37 °C na tři dny. Detergent NP-40 se do deglykosylační směsi přidává proto, aby chránil deglykosylační enzym PNGasa F v přítomnosti SDS a umožnil tak jeho enzymatickou aktivitu.

## **6.1.6. Kontrola stupně deglykosylace pomocí SDS-PAGE**

Po třech dnech inkubace deglykosylační směsi byla provedena kontrola průběhu deglykosylace pomocí SDS-PAGE na 15 % separačním a 5 % zaostřovacím gelu. Jako kontrola posloužil ovomukoid získaný v předchozím kroku – nanášeno bylo 5  $\mu$ l v neredukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE, koncentrace byla 6  $\mu$ g/5 ml. Z deglykosylační směsi bylo pro analýzu odebráno 5  $\mu$ l z každé zkumavky. K 5  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 5  $\mu$ l dvakrát koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Na gel bylo nanášeno 5  $\mu$ l, tedy polovina. Vzorky byly před nanášením povařeny 5 min v mikrozkuhavkách a stočeny na centrifuze Spectrafuge 16M při 10000 ot./min, 5 min. Jako standard byla použita směs proteinů o molekulových hmotnostech 66, 45, 24 a 14 kDa (detaily viz. 5.9. Použité roztoky a činidla na str. 37). Před zaputováním vzorků do separačního gelu bylo na zdroji nastavené napětí 80 mV, po zaputování bylo zvýšeno na 150 mV.

## **6.1.7. Odstranění detergentů**

Nejprve bylo potřeba z deglykosylační směsi odstranit proteiny (zejména deglykosylovaný ovomukoid), což bylo provedeno srážením ethanolem v poměru k deglykosylační směsi 2 : 1 (v/v). Po přidání ethanolu byla směs umístěna na 3 h do 4 °C. Následovala centrifugace při 4 °C, 10000 ot./min, 30 min na přístroji MPW-365. Supernatant byl převeden do 2 l baňky, zmražen a vzorek byl lyofilizován na přístroji Lyovac GT-2. Lyofilizát byl rozpuštěn ve 4 ml 5 % ethanolu a před chromatografií centrifugován 15 min při 15000 ot./min a 4°C na přístroji Hermle Z233 MK-2, rotor 220.87 VO5/6.

Se vzorkem byla provedena chromatografie na obrácené fázi na přístroji Beckman Biosys 510. K separaci byla použita kolona o rozměrech 30  $\times$  1 cm s nosičem LiChroprep RP-18 o velikosti částic 5-20  $\mu$ m. Kolona byla ekvilibrována 5 % ethanolem při průtoku 1 ml/ml. Po nanášení vzorku byly zachovány izokratické podmínky eluce tak dlouho, dokud se z kolony něco vymývalo. Poté byla promyta 20 % ethanolem při průtoku 2,5 ml/min, čímž byly z kolony odstraněny detergenty. Kontinuální spektrofotometrická detekce

byla prováděna při 210 nm. Frakce příslušející prvnímu elučnímu vrcholu (obsahující sacharidy), byly spojeny a lyofilizovány v 1 l baňce.

### **6.1.8. Kontrola pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie**

To jestli první eluční vrchol z chromatografie na obrácené fázi (viz. 6.1.7. Odstranění detergentů na str. 42) skutečně přísluší sacharidům, bylo potvrzeno MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Měření bylo provedeno v pozitivním módu za použití matrice kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové.

### **6.1.9. Odsolení**

Fosfátový pufr, který byl použit při deglykosylaci byl odstraněn gelovou permeační chromatografií na přístroji Beckman Biosys 510 na koloně o rozměrech 30 × 1 cm s náplní Sephadex G-15. Lyofilizát (viz. 6.1.7. Odstranění detergentů na str. 42) byl rozpuštěn v 1,75 ml vody. Průtok byl nastaven na 1 ml/min (tento nosič vydrží tlak do 1 MPa) a detekce prováděna při 210 nm. Zároveň byla měřena vodivost, aby bylo možné rozeznat eluční vrchol příslušející fosfátovému pufru. Příslušné frakce byly spojeny a lyofilizovány na přístroji Jouan RC 10.10.

### **6.1.10. Separace jednotlivých oligosacharidů**

Lyofilizát byl rozdělený do dvou rovných dílů a každý díl byl rozpuštěn nejprve ve 400 µl vody a poté bylo přidáno 1,2 ml acetonitrilu. Objevil se zákal, protože v této koncentraci byly sacharidy zřejmě v 75 % acetonitrilu nerozpustné. Roztoky byly proto titrovány vodou po 50 µl. Mezi každým přidavkem byly roztoky míchány a sonikovány na ultrazvukové lázni. Celkem bylo přidáno 400 µl, takže výsledné roztoky byly tvořeny 60 % acetonitrem (v/v).

Separace sacharidů byla provedena na koloně o rozměrech 25 × 0,4 cm s nosičem LiChrosorb DIOL 5 µm. Jako solvent A byl použit 75 % acetonitril

(v/v), jako solvent B 50 % acetonitril. Průtok byl nastaven na 1 ml/min (tlak kolísal podle složení mobilní fáze mezi asi 10 - 14 MPa). Po nanesení vzorku následovalo 10 min izokratické eluce solventem A, poté byl zahájen 90 min gradient do 40 % solventu B. K reekvilibraci kolony solventem A postačilo 20 min. Vzorku bylo celkem 4 ml, což vyšlo asi na 14 chromatografických běhů. V prvním analytickém běhu bylo na kolonu nanesen asi 1 mg směsi sacharidů, při dalších chromatografiích bylo nanášeno asi 8 mg sacharidů.

### **6.1.11. Kontrola stupně separace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie**

Elučním vrcholům příslušejícím triantenárnímu a pentaantenárnímu N-glykosidickému sacharidu (struktury viz. Obr. 1 a 2 na str. 12 a 13) byla věnována největší pozornost – každý chromatografický běh byl prověřen MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Eluční vrcholy příslušející tetraantenárnímu N-glykosidickému sacharidu a pentaantenárnímu N-glykosidickému sacharidu s galaktosou (struktury viz. Obr. 1 a 2 na str. 12 a 13) byly MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií prověřeny jen u jednoho chromatografického běhu.

Frakce příslušející triantenárnímu, tetraantenárnímu a pentaantenárnímu N-glykosidickému sacharidu a pentaantenárnímu N-glykosidickému sacharidu s galaktosou byly spojeny a lyofilizovány.

### **6.1.12. Stanovení hexos (vázaných i volných)**

Lyofilizáty byly rozpuštěny ve vodě a v alikvotech bylo provedeno stanovení hexos pomocí 5 % fenolu (w/v) a koncentrované kyseliny sírové: Připravil jsem si standardy o koncentraci glukosy 502 µg/ml, 402 µg/ml, 301 µg/ml, 201 µg/ml a 100 µg/ml. Ze standardů jsem odebral do mikrozkušavek na 1,5 ml po 100 µl, přidal po 100 µl 5 % fenolu (v/v), poté mikrozkušavky zavřel, promíchal jednu po druhé a všechny opět otevřel. Po přidání 500 µl koncentrované kyseliny sírové jsem mikrozkušavku zavřel a obsah asi 5 s

protřepával. Stejně jsem postupoval se vzorky (postup byl velmi závislý na přesnosti provedení).

## **6.2. Izolace sacharidů z PSM**

Izolace sacharidů z PSM nebyla úspěšná, viz. 8. Diskuze na str. 70. Úspěšně bylo provedeno jen stanovení kyselin sialových, jak vázaných, tak volných (viz. níže).

### **6.2.1. Stanovení vázaných a celkových kyselin sialových perjodát resorcinolovou metodou**

Stanovení bylo prováděno následujícím způsobem:

- Objem vzorku byl doplněn vodou na 500  $\mu$ l.
- Přidáno 100  $\mu$ l 40 mM kyseliny hexaoxojodisté.
- Směs inkubována 70 min při 37 °C (pro stanovení vázaných kyselin sialových) nebo 35 min při 0 °C (pro stanovení celkových kyselin sialových).
- Přidáno 1,25 ml resorcinolového činidla.
- Inkubace 5 min při 0 °C (pro ustálení zbarvení).
- Inkubace 15 min při 100 °C.
- Ochlazení vodou z vodovodu.
- Přidání 1,25 ml terciárního butylalkoholu.
- Inkubace 3 min při 37 °C, důkladné promíchání před i po inkubaci.
- Ochladnutí na laboratorní teplotu.
- Změřena absorbance výsledné směsi při 630 nm.

Pro kalibrační křivku v případě vázaných kyselin sialových byl použit standard fetuinu o koncentraci 20 nmol/ml – neředěný a ředěný do koncentrací 12 nmol/ml, 4 nmol/ml a 2 nmol/ml.

Pro kalibrační křivku v případě celkových kyselin sialových byl použit standard kyseliny N-acetylneuraminové o koncentraci 100  $\mu$ g/ml (0,32  $\mu$ mol/ml) – neředěný a ředěný do koncentrací 80  $\mu$ g/ml, 60  $\mu$ g/ml, 40  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml a 2  $\mu$ g/ml.

### 6.3. Destičkové inhibiční testy

Nejprve je potřeba PVC destičky s jamkami s kulatým dnem „pokrýt“ vysokoafinitním ligandem – v případě CD69 to byl GlcNAc<sub>17</sub>BSA. Roztok GlcNAc<sub>17</sub>BSA o koncentraci 0,1 mg/ml byl do každé jamky napipetován v množství 50 µl a destičky byly inkubovány minimálně hodinu až dvě při 4 °C, většinou ale přes noc. Po inkubaci byl roztok odstraněn pipetou a destičky třikrát opláchnuty puřrem PBS. Do každé jamky bylo napipetováno 150 µl 2 % BSA (w/v) a destičky byly minimálně hodinu inkubovány při 4 °C. Poté byl 2 % BSA odstraněn pipetou a destičky opět třikrát opláchnuty puřrem PBS. Do každé jamky pak byl napipetováno 50 µl inhibitoru o příslušné koncentraci (viz. níže) a 50 µl proteinu CD69 (konstrukty CD69NG70, CD69NV82 nebo CD69NS84) o koncentraci 1,0 µg/ml (a specifické aktivitě  $1,7 \cdot 10^5$  Bq). Po inkubaci dvě hodiny při 4 °C byla směs odstraněna, destičky opláchnuty třikrát nebo čtyřikrát puřrem PBS a destičky byly umístěny do 37 °C (přes noc).

Inhibitor byl koncentrovaný např. tak, že výchozí roztok byl 20 µM a tudíž po smísení se stejným objemem roztoku proteinu byla koncentrace inhibitoru 10 µM. Inhibitor o řadě koncentrací 20 µM, 2,0 µM, 0,20 µM, 20 nM, 2,0 nM, 0,20 nM byl připraven buď přímo na destičkách (což není výhodné zejména pro několikeré opakování) nebo ve větším množství předem v mikrozkušavkách (což je výhodné pro několikanásobné opakování). Technicky bylo tohoto „desítkového ředění“ dosaženo tak, že do mikrozkušavky s 1 ml vody bylo napipetováno 1/9 ml výchozího roztoku, obsah se promíchal, odebralo se 1/9 ml tohoto (oproti výchozímu roztoku desetkrát zředěného) roztoku, přidalo do další mikrozkušavky s 1 ml vody, atd.

Do každé jamky usušených destiček bylo napipetováno 100 µl scintilačního roztoku, destičky byly přelepeny lepící páskou a byla změřena radioaktivita na scintilačním počítací Microbeta 1450 Trilux.

## 6.4. Destičkové precipitační testy

### 6.4.1. Optimalizace koncentrace srážecího roztoku

Byly testovány následující srážecí roztoky:

0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

1,0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

1,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

2,0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

5 % PEG 6000 (w/v)

10 % PEG 6000 (w/v)

15 % PEG 6000 (w/v)

20 % PEG 6000 (w/v)

Optimální koncentrace srážecího roztoku byla zjištěna tak, že ke 20 µl proteinu <sup>125</sup>I-CD69NG70 o koncentraci 0,50 µg/ml (a specifické aktivitě 1,7 · 10<sup>5</sup> Bq) bylo v 5 µl přidáno ekvimolární množství monoklonální protilátky proti CD69, směs byla inkubována minimálně 30 min při 4 °C, přidán srážecí roztok v množství 25 µl (takže se dvakrát naředil!) a směs inkubována minimálně dvě hodiny při 4 °C. Poté byla destička centrifugována na přístroji Beckman J-6M, rotor JS-5.2, 10 min při 2500 ot./min. Supernatant byl odstraněn, následovalo promytí 50 µl srážecího roztoku o příslušné koncentraci (v tomto kroku byla koncentrace srážecího roztoku dvakrát vyšší než při inkubaci s roztokem proteinu, viz. 8. Diskuze na str. 70) a opět centrifugace. Toto promytí bylo provedeno třikrát. Nakonec byly destičky usušeny při 37 °C (přes noc). Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl scintilačního roztoku, destičky přelepeny lepící páskou a změřena radioaktivita na scintilačním počítači Microbeta 1450 Trilux. Ukázalo se, že největší množství sraženiny se objevilo při použití 10 % PEG 6000.

## 6.4.2. Vlastní precipitační test

Nejprve byly připraveny koncentrační řady sacharidových ligandů proteinu CD69NG70 (OvoTRI-Dimery a SiaTnTRI-Dimery): 1,5  $\mu\text{M}$ , 0,50  $\mu\text{M}$ , 0,17  $\mu\text{M}$ , 56 nM, 19 nM. Technicky bylo toto „trojkové ředění“ provedeno následovně: Do mikrozkušavky s 1 ml vody bylo napipetováno 1/2 ml výchozího roztoku, obsah se promíchal, odebralo se 1/2 ml tohoto (oproti výchozímu roztoku třikrát zředěného) roztoku, přidalo do další mikrozkušavky s 1 ml vody, atd. Test byl navržen tak, že k 20  $\mu\text{l}$  proteinu o koncentraci 0,5  $\mu\text{g/ml}$  bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  sacharidového ligandu o příslušné koncentraci (viz. výše). Destička byla inkubována při 4 °C minimálně půl hodiny. Poté byl přidán srážecí roztok – 10  $\mu\text{l}$  40 % PEG 6000, výsledná koncentrace PEG 6000 byla tudíž 8 %. Destičky byly inkubovány minimálně dvě hodiny při 4 °C. Další postup byl stejný jako při optimalizaci koncentrace srážecího roztoku (viz. výše, 6.4.1. Optimalizace koncentrace srážecího roztoku), s tím rozdílem, že jamky byly promývány 50  $\mu\text{l}$  směsí 40 %PEG 6000 a PBS v objemovém poměru 1 : 4.

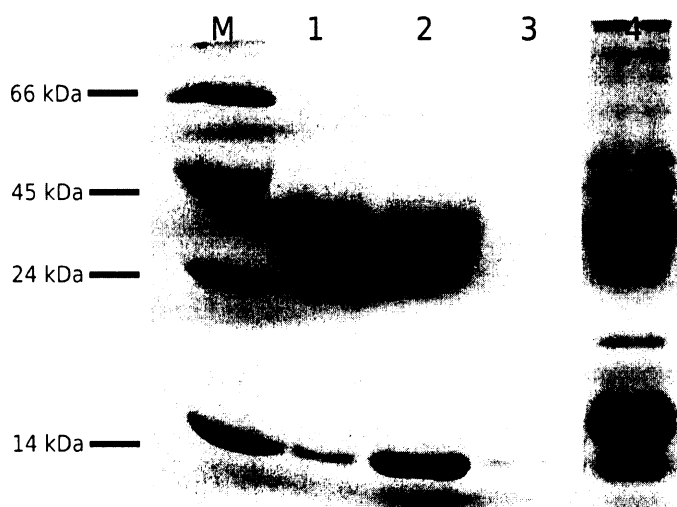


## 7. Výsledky

### 7.1. Sacharidové složky ovomukoidu

#### 7.1.1. Získání frakce obsahující ovomukoid srážením

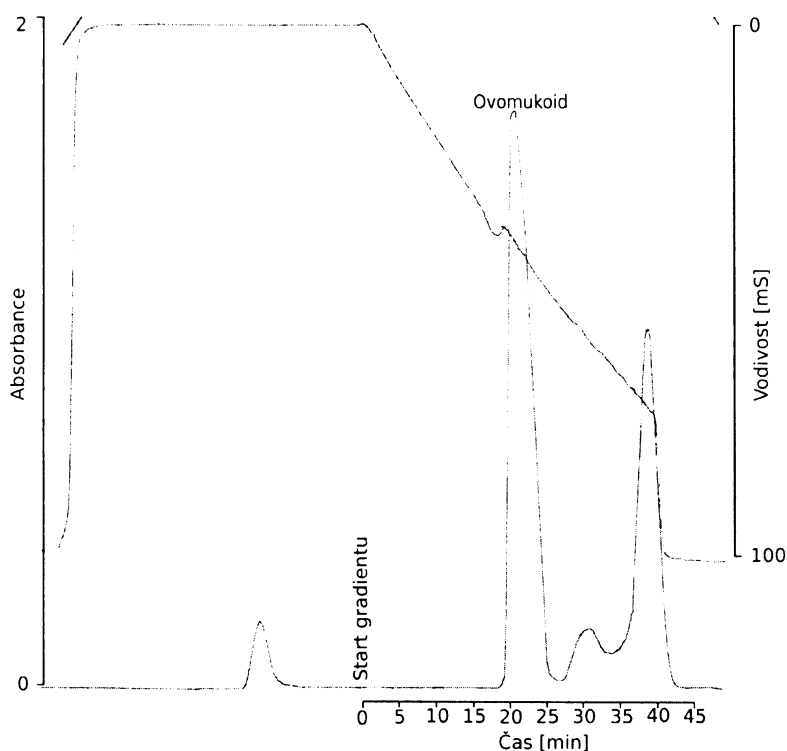
Při kontrole průběhu frakčního srážení vaječného bílku se ukázalo (viz. níže, Obr. 11), že sice velké množství ovomukoidu se srazilo již při prvním srážení, ale srovnatelné množství zůstalo v supernatantu, které se navíc zcela srazilo při druhém srážení (je možné, že to bylo odchylkou od protokolu, viz. 8. Diskuze na str. 70). Dále se ukázalo, že při závěrečné dialýze se sice určité množství ovomukoidu vysráželo, ale jeho zastoupení ve sraženině bylo výrazně menší než v původním dialyzátu.



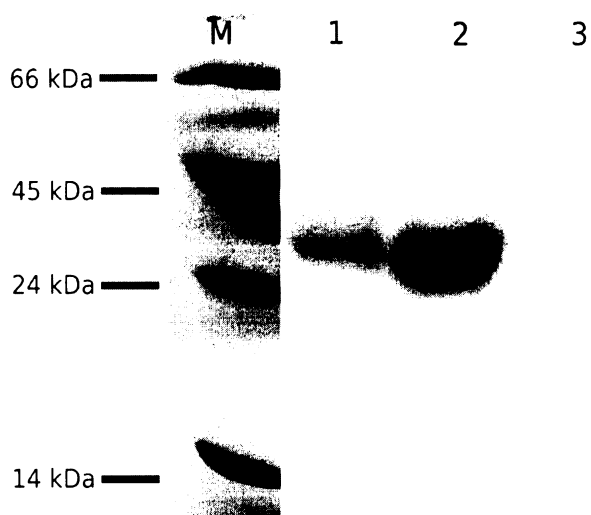
**Obr. 11: Elektroforetická kontrola srážení ovomukoidu.** Jedná se o SDS-PAGE, na 15 % gelu, detekce provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250, vzorky nanoseny v redukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE. V dráze M je nanesen marker, v dráze 1 precipitát po prvním srážení (směsí acetonu a 0,5 M kyseliny trichloroctové v objemovém poměru 2 : 1), v dráze 2 supernatant po prvním srážení, v dráze 3 supernatant po druhém srážení (acetonem) a v dráze 4 sraženina, která se objevila při závěrečném odsolení vzorku dialýzou (pro následnou lyofilizaci a purifikaci pomocí HPLC).

## 7.1.2. Purifikace ovomukoidu

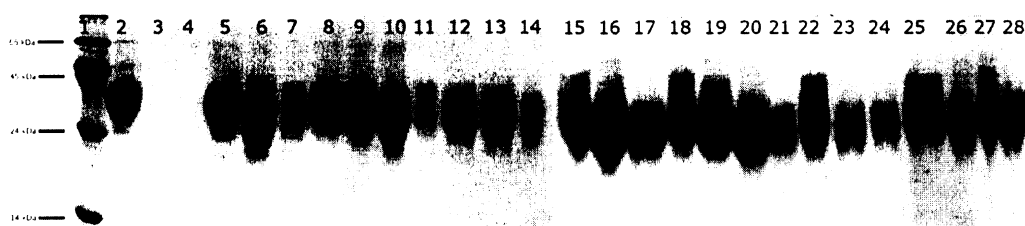
Ovomukoid se podařilo purifikovat katexovou chromatografií (viz. níže, Obr. 12), což bylo potvrzeno i pomocí SDS-PAGE (viz. Obr. 13 na str. 51). Protože purifikace vyšla na několik chromatografických běhů, byly před spojením frakcí prověřeny i frakce jednotlivých chromatografických běhů (viz. Obr. 14 na str. 51).



**Obr. 12: Purifikace ovomukoidu.** Eluční profil katexové chromatografie v provedení na HPLC systému. Precipitát vaječného bílku obsahující ovomukoid byl rozpuštěn v 25 mM acetátovém pufru o pH 4,5 (solvent A) a nanesen na kolonu o rozměrech 15 x 1,6 cm s nosičem SP-Sepharosa FF. Po 15 minutách při průtoku 4 ml/min solventu A byl nastartován gradient do 60 % solventu B (25 mM acetátový pufr o pH 4,5, 1 M NaCl) během 40 minut. Detekce byla prováděna spektrofotometricky při 280 nm. Rozsah absorbance je 2. Ovomukoid se eluoval přibližně při 40 % solventu B.



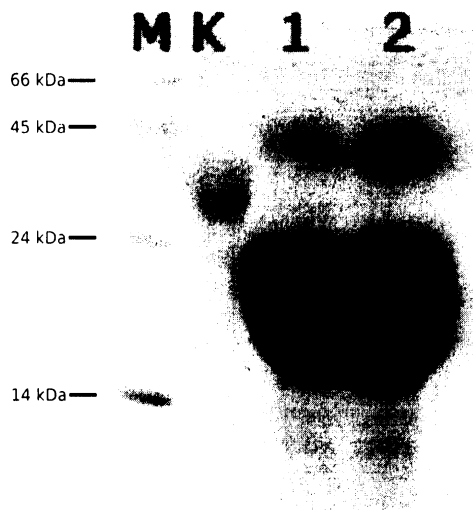
**Obr. 13: Elektroforetická kontrola čistoty ovomukoidu, purifikovaného gradientovou kationově výměnnou chromatografií.** Jedná se o SDS-PAGE, na 15 % gelu, detekce provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250, vzorky nanесeny v redukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE. V dráze M je nanесen marker, v drahách 1, 2, 3 frakce příslušející elučnímu vrcholu ovomukoidu při chromatografii na SP-Sepharose FF (viz.výše, Obr. 12).



**Obr. 14: Elektroforetická kontrola čistoty ovomukoidu, purifikovaného gradientovou kationově výměnnou chromatografií.** Jedná se o SDS-PAGE, na 15 % gelu, detekce provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250, vzorky nanесeny v redukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE. V dráze 1 je nanесen marker, v drahách 2 a 5 až 28 frakce příslušející elučním vrcholům ovomukoidu z jednotlivých chromatografických běhů. Pro další zpracování byly spojeny frakce, které jsou zde na gelu reprezentovány drahami 2, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 – 20 a 22 – 28 (vzorky příslušející drahám 7, 11 a 21 tedy použity nebyly).

### 7.1.3. Deglykosylace ovomukoidu

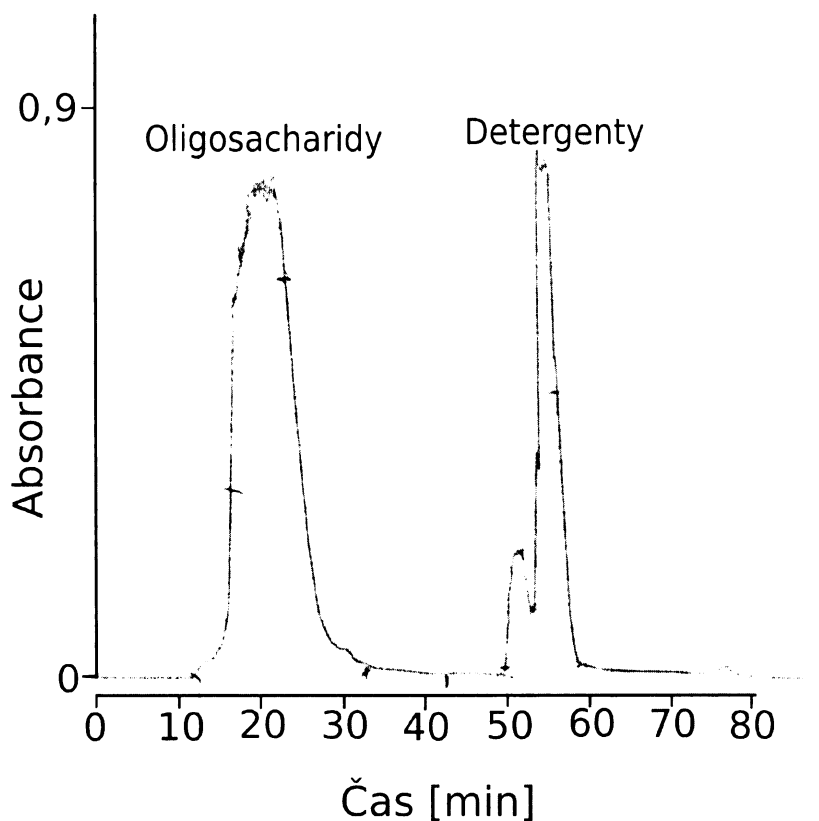
Metodou SDS-PAGE bylo ověřeno, že deglykosylace ovomukoidu PNGasou F proběhla prakticky kvantitativně (viz. níže, Obr. 15).



**Obr. 15: Elektroforetická kontrola stupně deglykosylace ovomukoidu.** Jedná se o SDS-PAGE, na 15 % gelu, detekce provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250, vzorky nanoseny v neredukujícím vzorkovém pufru pro SDS-PAGE. V dráze M je nanesen marker, v dráze K kontrola (purifikovaný ovomukoid), v drahách 1 a 2 vzorky z 1. a 2. části deglykosylační směsi (směs bylo třeba z technických důvodů rozdělit do dvou zkumavek). Je evidentní, že vzorku bylo do dráhy 1 a 2 nanášeno příliš (mnohem více než kontroly), čímž vynikla pravděpodobná kontaminace ovalbuminem, jehož molekulová hmotnost je 45 kDa<sup>[57]</sup>, viz. také 8. Diskuze na str. 70.

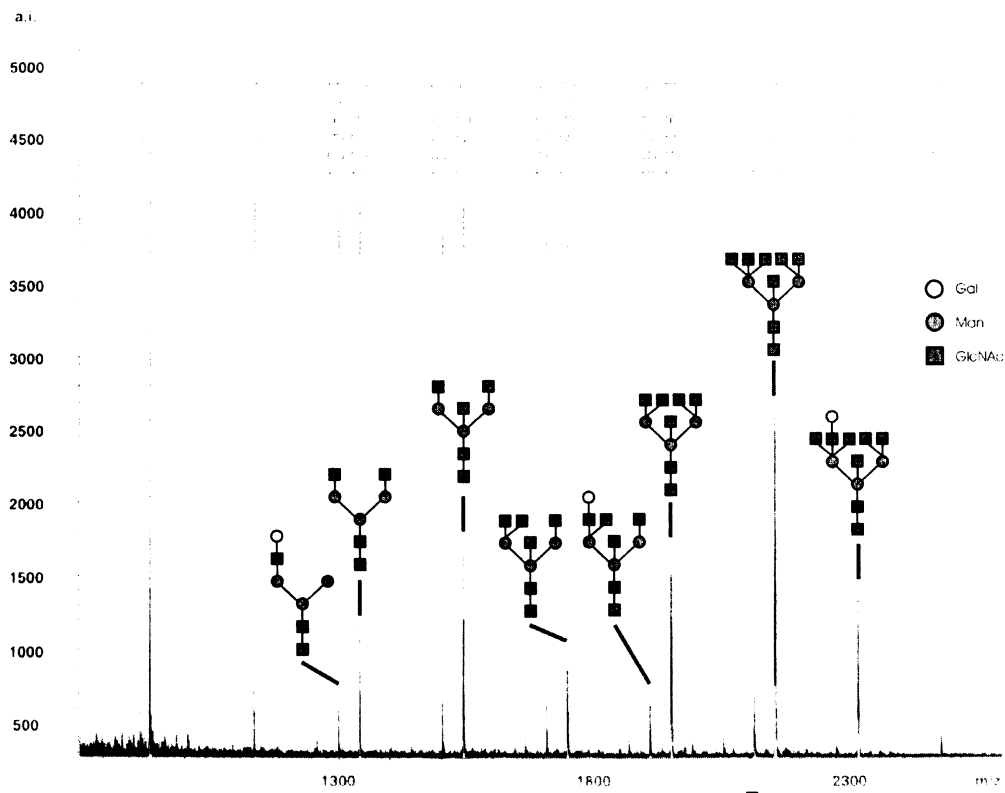
### 7.1.4. Purifikace N-glykosidických sacharidů odštěpených z ovomukoidu

Sacharidy byly úspěšně odděleny od detergentů použitých při deglykosylaci (viz. níže, Obr. 16) chromatografií na obrácené fázi.



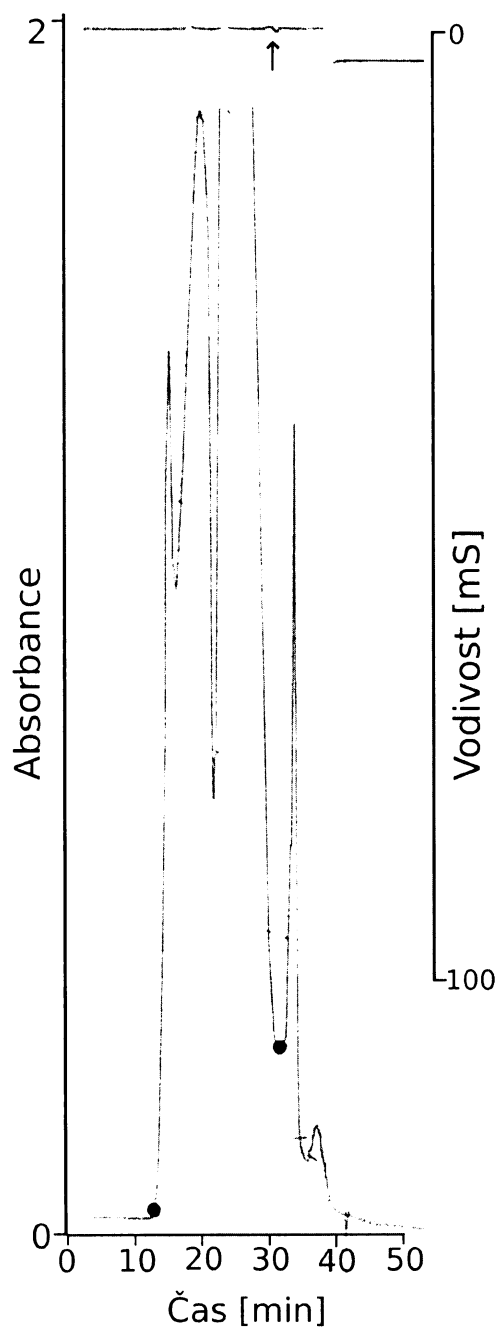
**Obr. 16: Purifikace oligosacharidů odštěpených z ovomukoidu.** Eluční profil chromatografie na obrácené fázi v provedení na HPLC systému. Na kolonu o rozměrech 30 × 1 cm s nosičem LiChroprep RP-18 o velikosti částic 5-20 μm bylo naneseno přibližně 34 mg sacharidů, materiál byl pro tuto chromatografii rozpuštěn v 5 % ethanolu (v/v). Solventem A, ve kterém byla provedena izokratická eluce oligosacharidů při průtoku 1 ml/min, byl 5 % ethanol (v/v), solventem B, kterým byly z kolony vymyty detergenty při průtoku 2,5 ml/min, byl 20 % ethanol. Detekce prováděna spektrofotometricky při 210 nm.

Po odstranění detergentů byla provedena kontrola MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, která prokázala, že byly získány požadované sacharidy (viz. níže, Obr. 17).



**Obr. 17: Kontrola purifikace oligosacharidů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.** Naměřené hmoty oligosacharidů odpovídají jejich sodnému aduktu  $[M + Na]^+$ . Legenda k značkám jednotlivých monosacharidů je v obrázku. Analýza byla provedena po separaci oligosacharidů od detergentů.

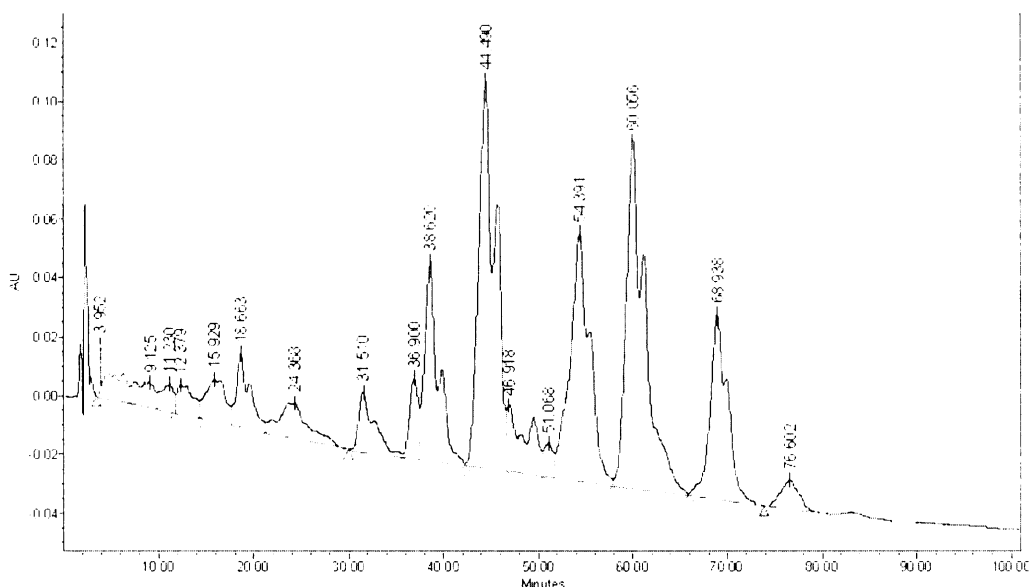
Nakonec byly sacharidy i úspěšně odsoleny na koloně s nosičem Sephadex G-15 (viz. níže, Obr. 18). Po odsolení vzorku kontrola MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií již prováděna nebyla (viz. 8. Diskuze na str. 70).



**Obr. 18: Odsolení oligosacharidů odštěpených z ovomukoidu.** Eluční profil gelové filtrace v provedení na HPLC systému. Na kolonu o rozměrech 30 × 1 cm s nosičem Sephadex G-15 bylo nanášeno přibližně 45 mg směsi sacharidů, materiál byl pro tuto chromatografii rozpuštěn ve vodě. Jako mobilní fáze posloužila voda, při průtoku 1 ml/min. Detekce prováděna spektrofotometricky při 210 nm. Šipka vyznačuje signál ve vodivosti naznačující přítomnost solí. Pro další zpracování tedy byly spojeny frakce příslušející intervalu vyznačenému černými kolečky (o správnosti tohoto rozhodnutí viz. 8. Diskuze na str. 70).

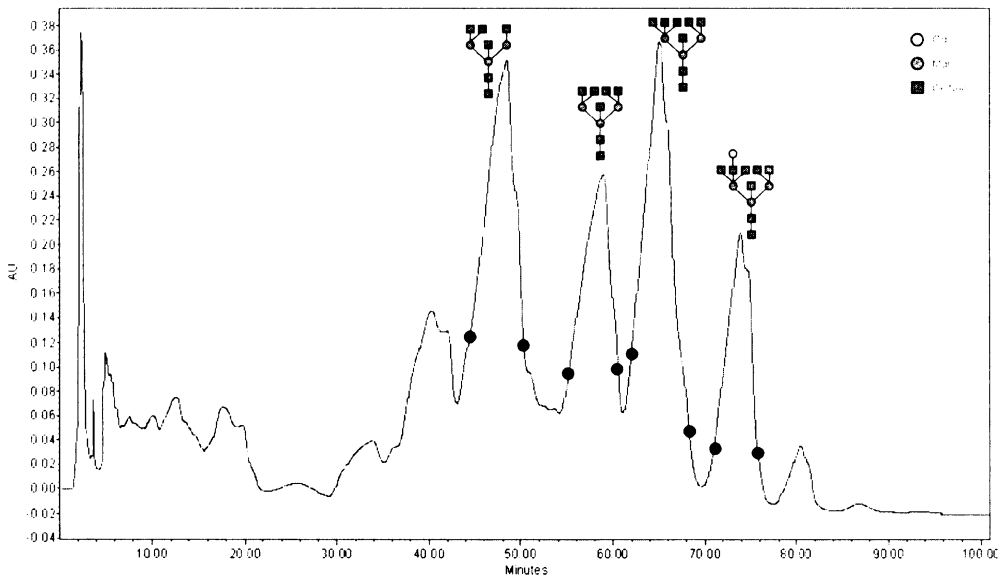
## 7.1.5. Separace N-glykosidických sacharidů odštěpených z ovomukoidu

Na základě kontroly MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií (viz. Obr. 21, 22, 23, 24 na str. 57 až 59) lze konstatovat, že N-glykosidické sacharidy ovomukoidu byly úspěšně rozděleny na diolové koloně (chromatogramy viz. níže, Obr. 19 a 20), i když s určitými výhradami, viz. 8. Diskuze na str. 70.

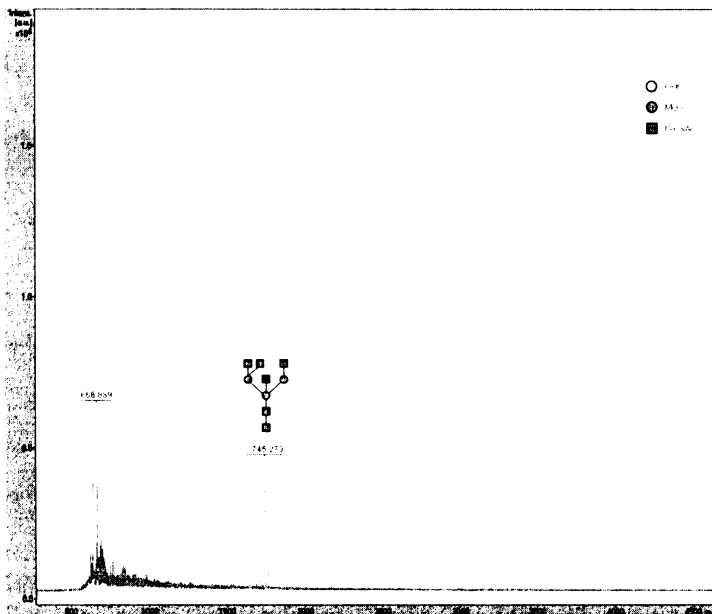


**Obr. 19: Separace jednotlivých oligosacharidů – analytická nanáška.** Eluční profil gradientové chromatografie na normální fázi v provedení na HPLC systému při pracovním tlaku 10 – 14 MPa. Na kolonu o rozměrech 25 × 0,4 cm s nosičem LiChrosorb DIOL 5 μm byl nanesen přibližně 1 mg směsi sacharidů, rozpuštěného v přibližně 60 % acetonitrilu (v/v). Jako solvent A byl zvolen 75 % acetonitril (v/v), jako solvent B 50 % acetonitril (v/v). Po nanesení vzorku následovalo ještě 10 min izokratické eluce solventem A při průtoku 1 ml/min, poté devadesátiminutový gradient do 40 % solventu B. Detekce prováděna spektrofotometricky při 210 nm.

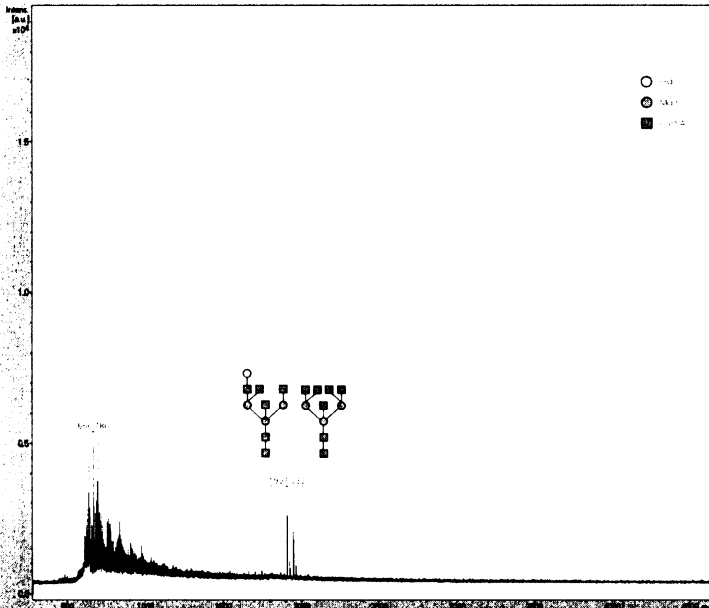




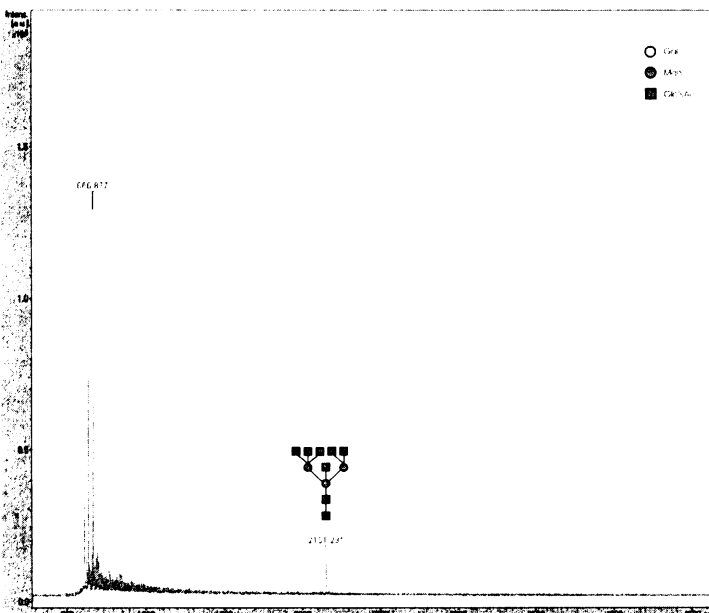
**Obr. 20: Separace jednotlivých oligosacharidů – preparativní nanáška.** Eluční profil gradientové chromatografie na normální fázi v provedení na HPLC systému při pracovním tlaku 10 – 14 MPa. Na kolonu o rozměrech 25 × 0,4 cm s nosičem LiChrosorb DIOL 5 μm bylo nanášeno přibližně 8 mg směsi sacharidů, rozpuštěných v přibližně 60 % acetonitrilu (v/v). Jako solvent A byl zvolen 75 % acetonitril (v/v), jako solvent B 50 % acetonitril (v/v). Po nanášení vzorku následovalo ještě 10 min izokratické eluce solventem A při průtoku 1 ml/min, poté devadesátiminutový gradient do 40 % solventu B. Detekce prováděna spektrofotometricky při 210 nm. Jednotlivé píky byly přiřazeny jednotlivým oligosacharidům při pozdější kontrole MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií – viz. Obr. 21, 22, 23, 24 a 17. Černými kolečky je vyznačen přibližný sběr frakcí.



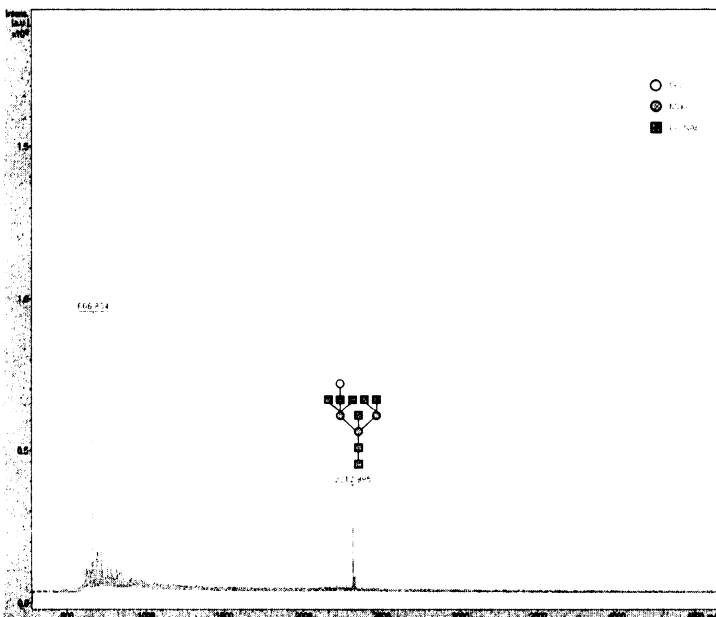
**Obr. 21: Kontrola separace jednotlivých oligosacharidů na koloně s nosičem LiChrosorb DIOL 5 μm MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.** Hodnota m/z naměřená pro triantenární N-glykosidický oligosacharid odpovídá monosodnému aduktu  $[M + Na]^+$  a v tomto případě představuje 99,92 % teoretické průměrné hmoty. Legenda k značkám jednotlivých monosacharidů je v obrázku.



**Obr. 22: Kontrola separace jednotlivých oligosacharidů na koloně s nosičem LiChrosorb DIOL 5  $\mu\text{m}$  MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.** Hodnota m/z naměřená pro izoformu tetraantenárního N-glykosidického oligosacharidu (v obrázku sacharid vlevo) odpovídá monosodnému aduktu  $[M + \text{Na}]^+$  a v tomto případě představuje 99,91 % teoretické průměrné hmoty. Legenda k značkám jednotlivých monosacharidů je v obrázku.



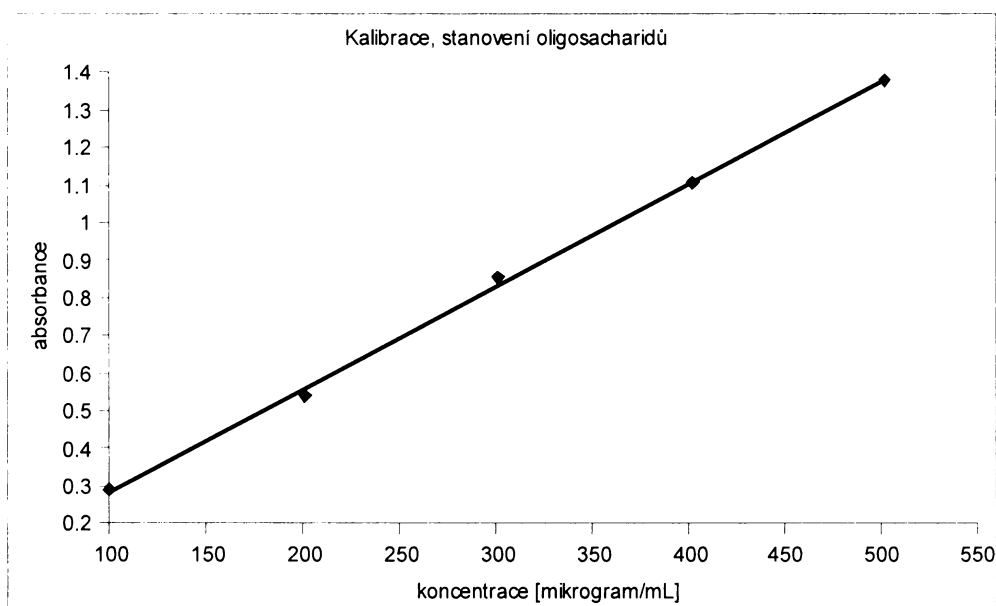
**Obr. 23: Kontrola separace jednotlivých oligosacharidů na koloně s nosičem LiChrosorb DIOL 5  $\mu\text{m}$  MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.** Hodnota m/z naměřená pro pentaantenární N-glykosidický oligosacharid odpovídá monosodnému aduktu  $[M + \text{Na}]^+$  a v tomto případě představuje 99,91 % teoretické průměrné hmoty. Legenda k značkám jednotlivých monosacharidů je v obrázku.



**Obr. 24: Kontrola separace jednotlivých oligosacharidů na koloně s nosičem LiChrosorb DIOL 5  $\mu\text{m}$  MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.** Hodnota  $m/z$  naměřená pro pentaantenární N-glykosidický oligosacharid s galaktosou odpovídá monosodnému aduktu  $[M + \text{Na}]^+$  a v tomto případě představuje 99,91 % teoretické průměrné hmoty. Legenda k značkám jednotlivých monosacharidů je v obrázku.

### 7.1.6. Stanovení hexos (vázaných i volných)

Chemicky pomocí 5 % fenolu a kyseliny sírové byly ve výsledných preparátech stanoveny hexosy, jejichž látkové množství mohlo být díky znalosti struktury jednotlivých sacharidů přepočteno na látkové množství příslušných sacharidů (viz. níže, Obr. 25). Kromě tetraantenárního sacharidu, který byl izolován ve směsi s izoformou, může být tento přepočet považován za přesný (viz. 8. Diskuze na str. 70).



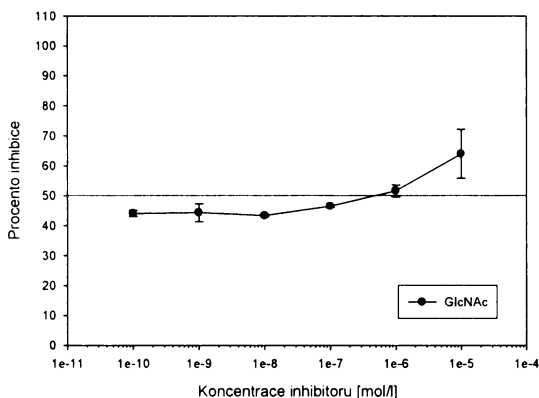
**Obr. 25: Kalibrační křivka – stanovení koncentrace hexos dle Dubois.** Ve vzorcích jednotlivých N-glykosidických sacharidů bylo stanoveno molární množství hexos a to bylo přepočteno na příslušnou hmotnost (díky znalosti struktury těchto sacharidů). Procentuální výtěžky byly (vztaženo k teoretickým výtěžkům převzatým z literatury<sup>[29][30]</sup>) následující: triantenární N-glykosidický sacharid 81 %, tetraantenární 94 %, pentaantenární 45 %, pentaantenární s galaktosou 64 %.

## 7.2. Destičkové inhibiční testy

Destičkové inhibiční testy potvrdily, že ačkoliv je afinita samotného GlcNAc k proteinu CD69 malá, je daleko vyšší, pokud je GlcNAc nějakým způsobem klastrován (viz. níže, Obr. 26 a 27).

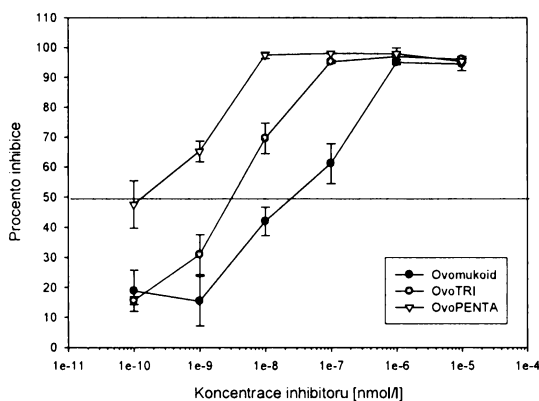
Dimery triantenárního N-glykosidického sacharidu izolovaného z ovomukoidu (OvoTRI-Dimery) mají srovnatelnou afinitu jako pentaantenární N-glykosidický sacharid (OvoPENTA) (viz. níže, Obr. 27 a 28), dimerizace sacharidu OvoTRI tedy zvyšuje afinitu k CD69, a afinita v řadě ovomukoid, OvoTRI, OvoPENTA roste (viz. níže, Obr. 27), což dokumentuje vliv klastrovanosti GlcNAc-zbytků na afinitu vazby na CD69.

Vazba GlcNAc na CD69NG70



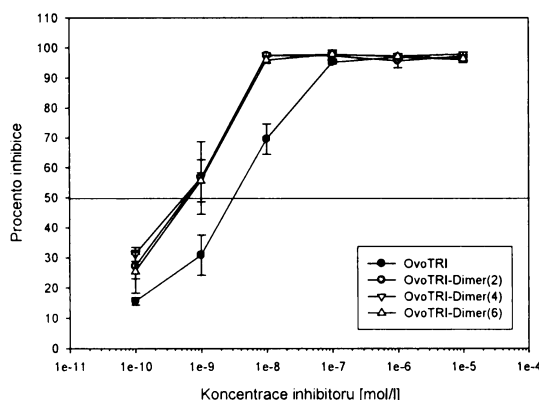
**Obr. 26: Vazba GlcNAc na protein CD69NG70.** Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (33 nmol/l).

Vazba ovomukoidu, OvoTRI a OvoPENTA na CD69NG70



**Obr. 27: Vazba ovomukoidu a sacharidů OvoTRI a OvoPENTA na protein CD69NG70.** Struktury sacharidů OvoTRI a OvoPENTA jsou uvedeny na Obr. 1 a 2 na str. 12 a 13. Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (33 nmol/l).

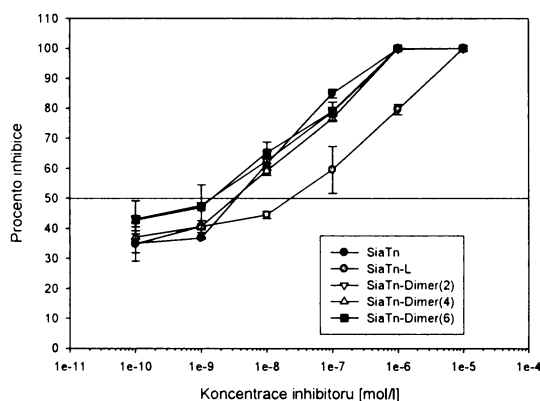
Vazba OvoTRI a OvoTRI-Dimerů na CD69NG70



**Obr. 28: Vazba sacharidů OvoTRI a OvoTRI-Dimerů na protein CD69NG70.** Struktury sacharidů OvoTRI a OvoTRI-Dimerů jsou uvedeny na Obr. 1 a 7 na str. 12 a 16. Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (33 nmol/l).

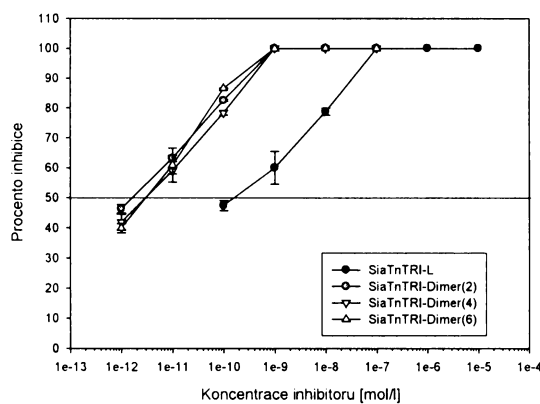
SiaTn-L a SiaTn-Dimery se na protein CD69 váží sice silně (viz. níže, Obr. 29), ale SiaTnTRI-L a SiaTnTRI-Dimery se váží s výrazně vyšší afinitou (viz. níže, Obr. 30). Stejně jako v případě sacharidu GlcNAc (viz. výše, str. 60), i zde platí, že vyšší klastrovanost SiaTn je spojena s vyšší afinitou vazby k CD69, a že dimerizace SiaTn-L i SiaTnTRI afinitu k CD69 výrazně zvyšuje.

Vazba SiaTn-L a SiaTn-Dimerů na CD69NV70



**Obr. 29: Vazba sacharidů SiaTn, SiaTn-L a SiaTn-Dimerů na protein CD69NG70.** Struktury těchto sacharidů jsou uvedeny na Obr. 3. a 8 na str. 14 a 16. Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (33 nmol/l).

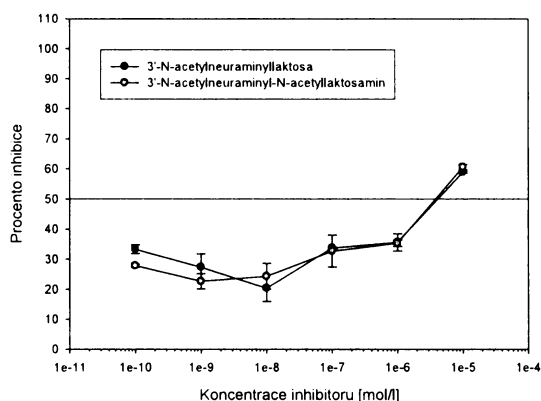
Vazba SiaTnTRI-L a SiaTnTRI-Dimerů na CD69NV70



**Obr. 30: Vazba SiaTnTRI-L a SiaTnTRI-Dimerů na protein CD69NG70.** Struktury těchto sacharidů jsou uvedeny na Obr. 4 a 8 na str. 14 a 16. Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (33 nmol/l).

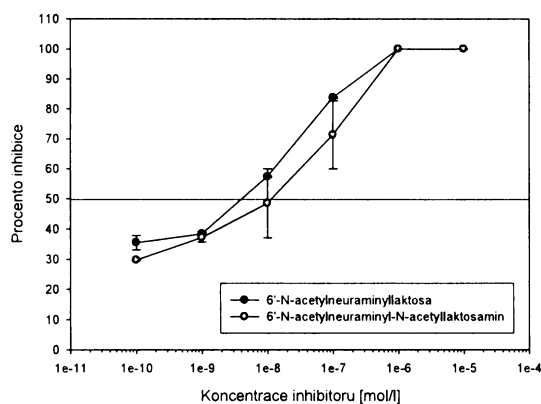
Na příkladu 3'-N-acetylneuraminyllaktosy, 3'-N-acetylneuraminyllaktosaminu (viz. níže, Obr. 31), 6'-N-acetylneuraminyllaktosy a 6'-N-acetylneuraminyllaktosaminu (viz. níže, Obr. 32) bylo potvrzeno, že afinita vazby na CD69 je v případě 6'-sialylace o několik řádů vyšší než v případě 3'-sialylace.

Vazba 3'-N-acetylneuraminyllaktosy a 3'-N-acetylneuraminyllaktosaminu na CD69NV70



**Obr. 31: Vazba 3'-N-acetylneuraminyllaktosy a 3'-N-acetylneuraminyllaktosaminu na protein CD69NG70.** Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (33 nmol/l).

Vazba 6'-N-acetylneuraminyllaktosy a 6'-N-acetylneuraminyllaktosaminu na CD69NV70



**Obr. 32: Vazba 6'-N-acetylneuraminyllaktosy a 6'-N-acetylneuraminyllaktosaminu na protein CD69NG70.** Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (33 nmol/l).

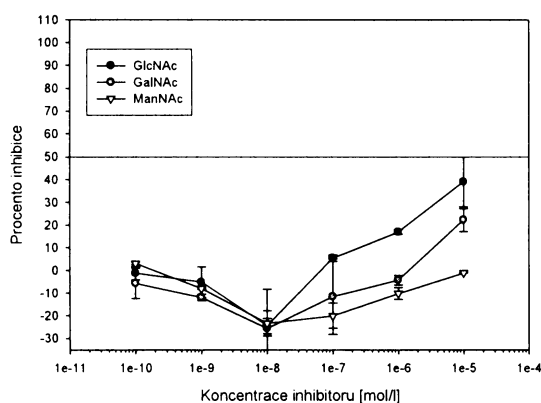
Na příkladu sacharidů OvoTRI a OvoPENTA bylo ověřeno, že sacharidová specifita nových konstruktů CD69NV82 a CD69NS84 je velmi podobná jako u konstruktů CD69NG70 (viz.níže, Tab. 1, inhibiční křivky viz. Obr. 27 na str. 61 a Obr. 34 a 36 níže).

Dále, inhibičními testy byla zkoumána afinita nových konstruktů CD69NV82 a CD69NS84 (nikoliv však konstruktů CD69NG70) k sacharidům GlcNAc, GalNAc, ManNAc, GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3(GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)(GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)GlcNAc a chitotetraose (viz. níže, Obr. 33, 35 a 37; výsledky pro chitotetraosu nejsou zobrazeny – chitotetraosa nevykazovala žádnou inhibici). Výsledky inhibičních testů odpovídají tomu, co bylo pracovní skupinou prof. Bezoušky zjištěno dříve pro konstrukt CD69NG70<sup>[15][33]</sup>.

Inhibice proteinů CD69NG70, CD69NV82 resp. CD69NS84 o koncentracích 1,0 $\mu$ g/ml (33 nmol/l), 1,0 $\mu$ g/ml (36 nmol/l) resp. 1,0 $\mu$ g/ml (37 nmol/l)			
Inhibitor	IC <sub>50</sub> [mol/l]		
	CD69NG70	CD69NV82	CD69NS84
OvoTRI	3,E-009	4,E-009	4,E-009
OvoPENTA	1,E-010	6,E-010	4,E-010

**Tab. 1: Srovnání IC<sub>50</sub> příslušných sacharidů pro různé konstrukty CD69NG70, CD69NV82 a CD69NS84.** Inhibičními testy byla zkoumána afinita nových konstruktů CD69NV82 a CD69NS84 rovněž k sacharidům GlcNAc, GalNAc, ManNAc, GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3(GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)(GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)GlcNAc a chitotetraose, již ne ale paralelně s konstruktem CD69NG70 (v tomto případě bylo porovnání provedeno na základě dřívějších výsledků získaných pracovní skupinou prof. Bezoušky pro konstrukt CD69NG70). Příslušné inhibiční křivky jsou uvedeny na Obr. 27 na str. 61 a na Obr. 33 až 37, viz. níže.

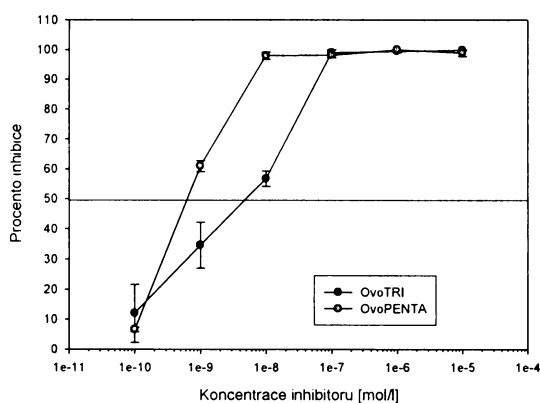
Vazba GlcNAc, GalNAc a ManNAc na CD69NV82



**Obr. 33: Vazba GlcNAc, GalNAc a ManNAc na protein CD69NV82.** Koncentrace proteinu byla 1,0  $\mu$ g/ml (36 nmol/l).

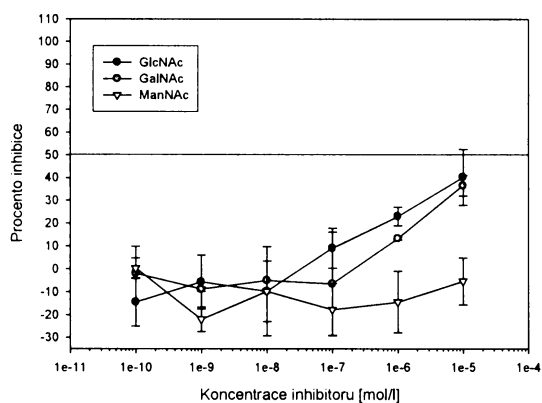


Vazba OvoTRI a OvoPENTA na CD69NV82



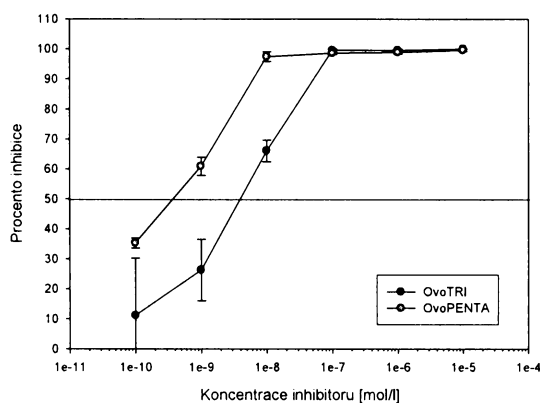
**Obr. 34: Vazba sacharidů OvoTRI a OvoPENTA na protein CD69NV82.** Struktury sacharidů OvoTRI a OvoPENTA jsou uvedeny na Obr. 1 a 2 na str. 12 a 13. Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (36 nmol/l).

Vazba GlcNAc, GalNAc a ManNAc na CD69NS84



**Obr. 35: Vazba GlcNAc, GalNAc a ManNAc na protein CD69NS84.** Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (37 nmol/l).

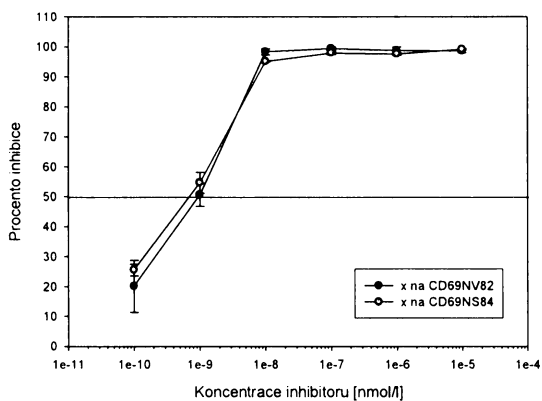
Vazba OvoTRI a OvoPENTA na CD69NS84



**Obr. 36: Vazba sacharidů OvoTRI a OvoPENTA na protein CD69NS84.** Struktury sacharidů OvoTRI a OvoPENTA jsou uvedeny na Obr. 1 a 2 na str. 12 a 13. Koncentrace proteinu byla 1,0 µg/ml (37 nmol/l).

Bylo zjištěno, že  $\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 3(\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 4)(\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 6)\text{GlcNAc}$  se váže silně i na nové konstrukty CD69NV82 a CD69NS84 (viz. níže, Obr. 37). Spolu s výsledky získanými pro sacharidy OvoTRI a OvoPENTA (viz. výše, Obr. 34 a 36) to potvrzuje důležitost klastrovanosti GlcNAc-zbytků na velikost afinity sacharidu k CD69.

Vazba x na CD69NV82 a na CD69NS84



**Obr. 37: Vazba x na proteiny CD69NV82 a CD69NS84.** Koncentrace proteinu CD69NV82 byla 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (36 nmol/l), CD69NS84 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (37 nmol/l).

Tab. 2, viz. níže, shrnuje hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých inhibitorů změřené při příslušné koncentraci proteinu CD69NG70.

Inhibice proteinu CD69NG70					
Inhibitor	$IC_{50}$				
	1. série	2. série	3. série	4. série	Průměr
GlcNAc	1,E-006	-	5,E-006	n. m.	3,00E-06
GlcNAc	1,E-006	-	2,E-006	n. m.	2,00E-06
GlcNAc	3,E-006	-	5,E-006	n. m.	4,00E-06
SiaTn	-	1,E-008	4,E-009	n. m.	3,00E-09
SiaTn-L	1,E-008	2,E-007	2,E-008	n. m.	8,E-008
SiaTn-Dimer(2)	3,E-008	1,E-008	2,E-009	n. m.	1,E-008
SiaTn-Dimer(4)	2,E-008	1,E-008	3,E-009	n. m.	1,E-008
SiaTn-Dimer(6)	6,E-008	8,E-009	2,E-009	n. m.	2,E-008
SiaTnTRI-L	2,E-009	1,E-009	2,E-010	n. m.	1,E-009
SiaTnTRI-Dimer (2)	-	-	2,E-012	1,E-012	2,E-012
SiaTnTRI-Dimer (4)	-	-	3,E-012	4,E-012	4,E-012
SiaTnTRI-Dimer (6)	-	-	3,E-012	9,E-012	6,E-012
3'-N-acetylneuraminyllaktosa	3,E-006	-	4,E-006	n. m.	4,E-006
3'-N-acetylneuraminyl-N-acetyllaktosamin	3,E-006	6,E-006	4,E-006	n. m.	4,E-006
6'-N-acetylneuraminyllaktosa	3,E-009	1,E-008	4,E-009	n. m.	6,E-009
6'-N-acetylneuraminyl-N-acetyllaktosamin	4,E-009	2,E-008	1,E-008	n. m.	1,E-008
Ovomukoid	n. m.	n. m.	n. m.	2,E-008	2,E-008
OvoTRI	n. m.	n. m.	n. m.	3,E-009	3,E-009
OvoPENTA	n. m.	n. m.	n. m.	1,E-010	1,E-010
OvoTRI-Dimer(2)	n. m.	n. m.	n. m.	6,E-010	6,E-010
OvoTRI-Dimer(4)	n. m.	n. m.	n. m.	5,E-010	5,E-010
OvoTRI-Dimer(6)	n. m.	n. m.	n. m.	6,E-010	6,E-010

**Tab. 2: Výsledky inhibičních testů s proteinem CD69NG70.** Pomlčka vyznačuje, že  $IC_{50}$  nebylo z naměřených dat možné určit (kvůli nevhodnému nařazení inhibitoru nebo v případě druhé série u 3'-N-acetylneuraminyllaktosy kvůli jiné příčině). "n. m." znamená, že hodnota nebyla měřena, tzn. že tento inhibiční test nebyl vůbec proveden.

Výsledky zkoumání afinity sacharidových ligandů k CD69 inhibičními testy jsou shrnuty v Tab. 3, viz. níže. Ukazují, že ligandy lze rozdělit podle hodnot  $IC_{50}$  do tří kategorií (nízkoafinitní, středněafinitní a vysokoafinitní).

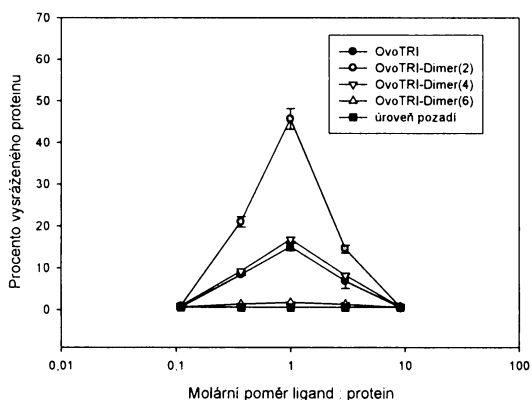
Rozdělení sacharidových ligandů podle afinity k CD69 (na základě výsledků inhibičních testů s proteinem CD69NG70 o koncentraci 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (33 $\text{nmol/l}$ ))		
Kategorie	Inhibitor	$IC_{50}$ [mol/l]
Nízkoafinitní	GlcNAc	3E-06
	3'-N-acetylneuraminyllaktosa	4E-06
	3'-N-acetylneuraminyllaktosamin	4E-06
Středněafinitní	SiaTn	3E-09
	SiaTn-L	8E-08
	SiaTn-Dimer(2)	1E-08
	SiaTn-Dimer(4)	1E-08
	SiaTn-Dimer(6)	2E-08
	SiaTnTRI-L	1E-09
	6'-N-acetylneuraminyllaktosa	6E-09
	6'-N-acetylneuraminyllaktosamin	1E-08
	Ovomukoid	2E-08
	OvoTRI	3E-09
	OvoPENTA	1E-10
	OvoTRI-Dimer(2)	6E-10
	OvoTRI-Dimer(4)	5E-10
	OvoTRI-Dimer(6)	6E-10
Vysokoafinitní	SiaTnTRI-Dimer (2)	2E-12
	SiaTnTRI-Dimer (4)	4E-12
	SiaTnTRI-Dimer (6)	6E-12

**Tab. 3: Rozdělení sacharidových ligandů podle afinity k CD69 na základě výsledků inhibičních testů s proteinem CD69NG70 o koncentraci 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (33  $\text{nmol/l}$ ).** Mezi středněafinitní ligandy by mohl být zařazen i sacharid  $\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 3(\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 4)(\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 6)\text{GlcNAc}$ , jeho afinita ale byla v této práci zkoumána na konstruktech CD69NV82 a CD69NS84.

### 7.3. Destičkové precipitační testy

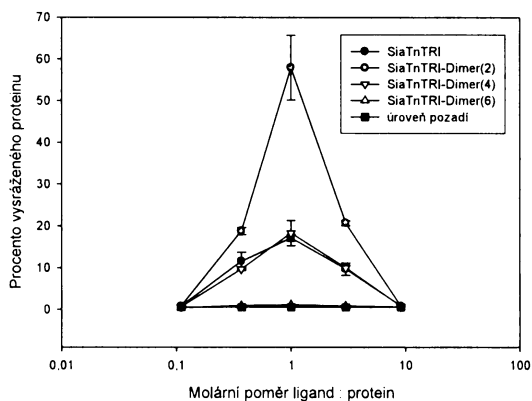
Destičkovými precipitačními testy bylo prokázáno, že jak v případě OvoTRI-Dimerů, tak v případě SiaTnTRI-Dimerů jsou nejlepšími ligandy proteinu CD69NG70 ty dimery, které měly nejkratší dimerizační můstek (viz. níže, Obr. 38 a 39).

Precipitace CD69NG70 sacharidem OvoTRI a OvoTRI-Dimery



**Obr. 38: Precipitace proteinu CD69NG70 sacharidy OvoTRI a OvoTRI-Dimery.** Struktura OvoTRI je uvedena na Obr. 1 na str. 12. Koncentrace proteinu byla 0,50  $\mu\text{g/ml}$  (17 nmol/ml), struktura dimerizačních můstků je uvedena na Obr. 6 na str. 15. Pozitivní kontrola nebyla provedena (monoklonální protilátkou) – viz. 8. Diskuze na str. 70.

Precipitace CD69NG70 sacharidem SiaTnTRI a SiaTnTRI-Dimery



**Obr. 39: Precipitace proteinu CD69NG70 sacharidy SiaTnTRI-L a SiaTnTRI-Dimery.** Struktura SiaTnTRI je uvedena na Obr. 4 na str. 14. Koncentrace proteinu byla 0,50  $\mu\text{g/ml}$  (17 nmol/ml), struktura dimerizačních můstků je uvedena na Obr. 6 na str. 15. Pozitivní kontrola nebyla provedena (monoklonální protilátkou) – viz. 8. Diskuze na str. 70.

## 8. Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo mj. izolovat a charakterizovat oligosacharidové řetězce dobře dostupného glykoproteinu vaječného bílku ovomukoidu, a takto připravené oligosacharidy poté použít společně s některými komerčně dostupnými sacharidovými látkami k vazebným testům s receptorem CD69.

Oproti publikovanému postupu pro izolaci ovomukoidu z vaječného bílku došlo k následující odchylce: Podle protokolu mělo být srážením směsí acetonu a 0,5 M kyseliny trichloroctové v objemovém poměru 2 : 1 pH sníženo na 3,5, bylo ale sníženo až na 3,0, což by mohla být příčina toho, proč se poměrně velké množství ovomukoidu srazilo i při prvním srážení.

Další drobnou chybou bylo, že pomocí SDS-PAGE nebyl analyzován dialyzát ovomukoidu po odstranění sraženiny centrifugací (sraženina analyzována byla, viz. Obr. 11 na str. 49).

Při SDS-PAGE kontrolující průběh deglykosylace ovomukoidu vyšlo najevo, že ovomukoid je pravděpodobně kontaminován menším množstvím ovalbuminu, což je protein o molekulové hmotnosti 45 kDa<sup>[57]</sup> tvořící 60 – 65 % vaječného bílku<sup>[58]</sup>.

Po odsolení N-glykosidických sacharidů ovomukoidu již nebyla provedena kontrola pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (byla prováděna až v dalším kroku – separace jednotlivých oligosacharidů). Pokud jeden nebo oba eluční vrcholy, které nebyly vzaty k dalšímu zpracování (viz. Obr. 18 na str. 55), příslušely nějakým sacharidům, byly to pravděpodobně ale sacharidy jen o několika málo jednotkách (vzhledem k tomu, že Sephadex G-15 má frakcionační rozmezí do 1500 Da), které nebyly předmětem zájmu.

Na diolové koloně se sice podařilo získat sacharidy OvoTRI a OvoPENTA v uspokojivé čistotě (viz. MALDI-TOF spektra, Obr. 21 a 23 na str. 57 a 58), ale v případě tetraantenárního sacharidu byl podíl izoformy nepříjemně vysoký (v případě triantenárního a pentaantenárního sacharidu a pentaantenárního sacharidu s galaktosou byl podíl izoformy velmi malý, viz. MALDI-TOF spektra, Obr. 21 až 24 na str. 57 až 59). Pro oddělení těchto

sacharidů by pravděpodobně bylo potřeba zařadit ještě jeden separační krok, např. chromatografii na grafitizovaném uhlíku. Kromě signálu příslušejícího sodnému aduktu sacharidu je v jednotlivých spektrech patrný i signál příslušející draselnému aduktu (viz. MALDI-TOF spektra, Obr. 21 až 24 na str. 57 až 59), což je příčina toho, že na spektru není jen jediný signál.

Gradient, jakým byly eluovány sacharidy z diolové kolony (viz. Obr. 20 na str. 57), mohl být zvolen o něco pomalejší, a zároveň pro takto velké nanášky by byla vhodnější preparativní kolona (o rozměrech např. 25 × 2,2 cm).

U tetraantenárního N-glykosidického sacharidu byla k výpočtu výtěžku použita molekulová hmotnost tetraantenárního sacharidu, podle spektra na Obr. 22 v preparátu ale bylo zřejmě i srovnatelné množství izoformy, takže výtěžek může být maximálně o 2 % nadsazený (podle poměru molekulových hmotností tetraantenárního N-glykosidického sacharidu a jeho izoformy).

Byl rovněž vykonán pokus o izolaci sialovaných sacharidů z PSM alkalickou hydrolýzou za použití 70 % (v/v) n-butylaminu, analýzou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií však izolované sacharidy nebylo možné přiřadit – byly pravděpodobně nezjištěným způsobem degradované.

MALDI-TOF hmotnostně spektrometrická analýza rovněž odhalila kontaminaci standardu jak kyseliny N-acetylneuraminové tak 3'-N-acetylneuraminyllaktosy (oba standardy byly od firmy Fluka).

Srovnání sacharidové specifity dvou nových konstruktů CD69V82 a CD69NS84 s CD69NG70 inhibičním testem bylo provedeno pouze na dvou sacharidech – OvoTRI a OvoPENTA. U ostatních sacharidů (GlcNAc, GalNAc, ManNAc, chitotetraosa, GlcNAc $\alpha$ 1→3(GlcNAc $\alpha$ 1→4)(GlcNAc $\alpha$ 1→6)GlcNAc) byly inhibiční testy provedeny pouze s novými konstrukty a porovnání s konstruktem CD69NG70 bylo provedeno na základě předchozích výsledků pracovní skupiny prof. Bezoušky.

Optimalizace koncentrace srážecího roztoku při destičkovém precipitačním testu byla provedena s jednou chybou – při promývání sraženiny v jamkách destičky byl použit dvakrát koncentrovanější srážecí roztok než při vlastní precipitaci proteinu (neuvědomil jsem si včas, že při vlastní precipitaci

proteinu se srážecí roztok dvakrát naředil). Zároveň ale data takto získaná nasvědčovala tomu, že precipitátu bylo prakticky stejné množství jak při použití 5 %, tak 10 % PEG 6000, takže použití 8 % PEG 6000 (směs 40 % PEG 6000 a pufru PBS v objemovém poměru 1 : 4) při destičkovém precipitačním testu s dimerizovanými sacharidy lze považovat za přijatelné. Zároveň by ale bylo správnější, kdyby zásobní roztoky srážecích látek  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a PEG 6000 byly připraveny v PBS, a nikoliv ve vodě, jak tomu bylo v tomto případě.

Další chybou při provedení precipitačního testu bylo nezařazení pozitivní kontroly – monoklonální protilátky. Nicméně podle naměřených hodnot byl stupeň precipitace velmi vysoký (až 60 % u SiaTnTRI-Dimer(2), viz. Obr. 39 na str. 69).

Vzhledem k tomu, že fyziologické ligandy pro receptor CD69 dosud nebyly identifikovány, používají se pro imunobiologickou modulaci  $\text{CD69}^+$  buněk ligandová mimetika – monovalentní a bivalentní vysokoafinitní ligandy. S vysokou afinitou se na CD69 mohou vázat nejen sacharidy, ale i struktury nesoucí karboxylové skupiny, např. aminokyselinová sekvence LELTE, zodpovědná za vazbu Hsp65 na protein CD69<sup>[22]</sup>, nebo karboxylované calixareny<sup>[59]</sup>. V této diplomové práci byly provedeny vazebné testy se dvěma typy takových (sacharidových) ligandů – neutrálními (OvoTRI, OvoTRI-Dimery, OvoPENTA,  $\text{GlcNAc}\alpha 1 \rightarrow 3(\text{GlcNAc}\alpha 1 \rightarrow 4)(\text{GlcNAc}\alpha 1 \rightarrow 6)\text{GlcNAc}$ ) a sialovanými sacharidy (SiaTn, SiaTn-Dimery, SiaTnTRI, SiaTnTRI-Dimery) (z důvodů uvedených v oddíle 3.2. Sacharidové ligandy receptoru CD69).

Co se týče OvoTRI sacharidu, jeho afinita k CD69 dle inhibičního testu byla poměrně vysoká ( $\text{IC}_{50}$   $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l) a v precipitačním testu OvoTRI-Dimer účinně precipitoval protein CD69, nicméně dimerizací OvoTRI se afinita k CD69 dle inhibičního testu zvýšila jen asi pětkrát a test buněčné aktivace prokázal jen poměrně malý účinek<sup>[60]</sup>.

Prakticky stejné afinity jako OvoTRI dosahoval i antigen SiaTn resp. trimerizovaný antigen SiaTn (SiaTnTRI-L), naproti tomu dimerizací SiaTnTRI-L vznikly ligandy s imunobiologicky významnou afinitou – ve vazebném testu vyšla afinita SiaTnTRI-Dimerů až  $2 \cdot 10^{-12}$  mol/l, v destičkovém precipitačním



testu SiaTnTRI-Dimer(2) účinně precipitoval protein CD69 (až ze 60 %). Dále, imunologickými testy ex vivo (které provedla Markéta Vančurová z pracovní skupiny prof. Bezoušky) bylo prokázáno<sup>[60]</sup>, že dimerní formy SiaTnTRI-L (SiaTnTRI-Dimery) způsobují výraznou apoptózu NK-buněk, zatímco monomerní SiaTnTRI-L naopak NK-buňky před tímto apoptotickým efektem SiaTnTRI-Dimerů chrání. V in vivo testech na modelu myšího B16 melanomu navíc SiaTnTRI-L výrazně zpomaluje růst nádorů a prodlužuje přežití myší. Tyto výsledky naznačují možnost terapeutického použití SiaTnTRI sloučenin jako protinádorových a imunomodulačních látek.

## 9. Souhrn

- ✓ Triantenární a pentaantenární N-glykosidický sacharid byl úspěšně izolován z ovomukoidu.
- ✓ O-glykosidické sacharidy z PSM se izolovat nepodařilo.
- ✓ Z vazebných studií byly úspěšně provedeny destičkové inhibiční testy a destičkové precipitační testy. Rovnovážná dialýza úspěšná nebyla.
- ✓ Na příkladu sacharidů OvoTRI, OvoPENTA a  $\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 3(\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 4)(\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 6)\text{GlcNAc}$  bylo potvrzeno že pokud je GlcNAc nějakým způsobem klastrován, je afinita takového sacharidu k CD69 o několik řádů vyšší než pouhého monosacharidu GlcNAc.
- ✓ Jakožto středněafinitní sacharidový epitop byl rovněž potvrzen SiaTn antigen.
- ✓ Ze sacharidových dimerů se v destičkovém precipitačním testu ukázaly být nejlepším ligandem proteinu CD69 SiaTnTRI-Dimer(2) a OvoTRI-Dimer(2).
- ✓ Sacharidová specifita nových konstruktů CD69NV82 a CD69NS84 je prakticky stejná jako u konstruktu CD69NG70.

## 10. Seznam použité literatury

- [1] Semeňuk T., Krist P., Pavlíček J., Bezouška K., Kuzma M., Novák P., Křen V.: *Synthesis of chitooligomer-based glycoconjugates and their binding to the rat natural killer cell activation receptor NKR-P1*. Glycoconj. J., 18, 817-26 (2001)
- [2] Hara T., Jung L. K., Bjorndahl J. M., Fu S. M.: *Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens*. J. Exp. Med., 164, 1988-2005 (1986)
- [3] Cebrián M., Yagüe E., Rincón M., López-Botet M., de Landázuri M. O., Sánchez-Madrid F.: *Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes*. J. Exp. Med., 168, 1621-37 (1988)
- [4] Cosulich M. E., Rubartelli A., Risso A., Cozzolino F., Bargellesi A.: *Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 4205-9 (1987)
- [5] Testi R., Phillips J. H., Lanier L. L.: *Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca<sup>++</sup>] and stimulation of protein kinase C*. J. Immunol., 142, 1854-60 (1989)
- [6] Knapp W., et al.: *Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. Oxford University Press (1989)
- [7] Ziegler S. F., Ramsdell F., Hjerrild K. A., Armitage R. J., Grabstein K. H., Hennen K. B., Farrah T., Fanslow W. C., Shevach E. M., Alderson M. R.: *Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens*. Eur. J. Immunol., 23, 1643-8 (1993)
- [8] Vaněk O.: *Příprava a strukturní studie proteinu CD69, receptoru NK buněk*: Diplomová práce PŘF UK, katedra biochemie (2005)
- [9] Gerosa F., Tommasi M., Scardoni M., Accolla R. S., Pozzan T., Libonati M., Tridente G., Carra G.: *Structural analysis of the CD69 early activation antigen by two monoclonal antibodies directed to different epitopes*. Mol. Immunol., 28, 159-68 (1991)
- [10] Testi R., D'Ambrosio D., De Maria R., Santoni A.: *The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells*. Immunol. Today, 15, 479-83 (1994)

- [11] Sánchez-Mateos P., Sánchez-Madrid F.: *Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69*. Eur. J. Immunol., 21, 2317-25 (1991)
- [12] Risso A., Smilovich D., Capra M. C., Baldissarro I., Yan G., Bargellesi A., Cosulich M. E.: *CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression*. J. Immunol., 146, 4105-14 (1991)
- [13] Hamann J., Fiebig H., Strauss M.: *Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain*. J. Immunol., 150, 4920-7 (1993)
- [14] López-Cabrera M., Santis A. G., Fernández-Ruiz E., Blacher R., Esch F., Sánchez-Mateos P., Sánchez-Madrid F.: *Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors*. J. Exp. Med., 178, 537-47 (1993)
- [15] Bezouška K., Nepovím A., Horváth O., Pospíšil M., Hamann J., Feizi T.: *CD 69 antigen of human lymphocytes is a calcium-dependent carbohydrate-binding protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 208, 68-74 (1995)
- [16] Drickamer K., Taylor M. E.: *Biology of animal lectins*. Annu. Rev. Cell. Biol., 9, 237-64 (1993)
- [17] Santis A. G., López-Cabrera M., Hamann J., Strauss M., Sánchez-Madrid F.: *Structure of the gene coding for the human early lymphocyte activation antigen CD69: a C-type lectin receptor evolutionarily related with the gene families of natural killer cell-specific receptors*. Eur. J. Immunol., 24, 1692-7 (1994)
- [18] Barten R., Torkar M., Haude A., Trowsdale J., Wilson M. J.: *Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors*. Trends. Immunol., 22, 52-7 (2001)
- [19] Brown M. G., Scalzo A. A., Matsumoto K., Yokoyama W. M.: *The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity*. Immunol. Rev., 155, 53-65 (1997)
- [20] Pavlíček J., Sopko B., Ettrich R., Kopecký, V., Jr., Baumruk V., Man P., Havlíček V., Vrbacký M., Martínková L., Křen V., Pospíšil M., Bezouška K.: *Molecular characterization of binding of calcium and carbohydrates by an early activation antigen of lymphocytes CD69*. Biochemistry, 42, 9295-306 (2003)
- [21] Sancho D., Santis A. G., Alonso-Lebrero J. L., Viedma F., Tejedor R., Sánchez-Madrid F.: *Functional analysis of ligand-binding and signal transduction domains of CD69 and CD23 C-type lectin leukocyte receptors*. J. Immunol., 165, 3868-75 (2000)

- [22] Kubínková Z.: *Mykobakteriální protein Hsp65 jako ligand pro leukocytární receptor CD69*: Diplomová práce PŘF UK, katedra biochemie (2006)
- [23] Moretta A., Poggi A., Pende D., Tripodi G., Orengo A. M., Pella N., Augugliaro R., Bottino C., Ciccone E., Moretta L.: *CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta*. J. Exp. Med., 174, 1393-8 (1991)
- [24] Esplugues E., Sancho D., Vega-Ramos J., Martínez C., Syrbe U., Hamann A., Engel P., Sánchez-Madrid F., Lauzurica P.: *Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69*. J. Exp. Med., 197, 1093-106 (2003)
- [25] Sancho D., Gómez M., Viedma F., Esplugues E., Gordón-Alonso M., García-López M. A., de la Fuente H., Martínez-A C., Lauzurica P., Sánchez-Madrid F.: *CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis*. J. Clin. Invest., 112, 872-82 (2003)
- [26] Letterio J. J., Roberts A. B.: *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annu. Rev. Immunol., 16, 137-61 (1998)
- [27] Kavan D., Nálezková M., Vaněk O., Bílý J., Borovičková I., Pompach P., Novák P., Kopecký, M., Jr., Hofbauerová K., Gorčík L., Žídek L., Bezouška K.: *Production, characterization and ligand binding properties of the unusually stable form of soluble human CD69, the earliest activation antigen of leukocytes, that resembles the natural form of the receptor* (rukopis v přípravě)
- [28] Vrbacký M., Horváth O., Pavlíček J., Bezouška K.: *Sialylated oligosaccharides of mucin type: new ligands for CD69, an early activation antigen of lymphocytes* (rukopis v přípravě)
- [29] Yamashita K., Kamerling J. P., Kobata A.: *Structural studies of the sugar chains of hen ovomucoid. Evidence indicating that they are formed mainly by the alternate biosynthetic pathway of asparagine-linked sugar chains*. J. Biol. Chem., 258, 3099-106 (1983)
- [30] Yamashita K., Kamerling J. P., Kobata A.: *Structural study of the carbohydrate moiety of hen ovomucoid. Occurrence of a series of pentaantennary complex-type asparagine-linked sugar chains*. J. Biol. Chem., 257, 12809-14 (1982)
- [31] Piskarev V. E., Galenko E. L., Likhoshesterov L. M., Derevitskaya V. A., Kochetkov N. K.: *Fractionation of hen egg glycoproteins and their purification by means of preparative HPLC*. Bioorg. Khim. (Russ.), 14, 1171 - 1178 (1988)
- [32] Lineweaver M., Murray C. W.: *Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid*. J. Biol. Chem., 171, 565-581 (1947)

- [33] Kovářová-Rohlenová A.: *Syntéza oligosacharidů D-hexosaminového typu - potenciálních ligandů aktivačních receptorů NK-buněk*: Doktorská dizertační práce PŘF UK, katedra biochemie (2006)
- [34] Maley F., Trimble R. B., Tarentino A. L., Plummer T. H.: *Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases*. *Anal. Biochem.*, 180, 195-204 (1989)
- [35] Tretter V., Altmann F., Marz L.: *Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1----3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue*. *Eur. J. Biochem.*, 199, 647-652 (1991)
- [36] Al-Rubeai M.: *Cell Engineering, Vol. 3: Glycosylation*. Kluwer Academic Publishers (2002)
- [37] Kuster B., Harvey D. J.: *Ammonium containing buffers should be avoided during enzymatic release of glycans from glycoproteins when followed by reducing terminal derivatization*. *Glycobiology*, 7, vii-ix (1997)
- [38] Hooper N.: *Alzheimer's Disease: Methods and Protocols*. Humana Press (2000)
- [39] Patel T., Bruce J., Merry A., Bigge C., Wormald M., Jaques A., Parekh R.: *Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins*. *Biochemistry*, 32, 679-93 (1993)
- [40] Mechref Y., Novotny M. V.: *Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity*. *Chem. Rev.*, 102, 321-69 (2002)
- [41] Fukuda M., Kobata A.: *Glycobiology: A practical approach*. IRL PRESS (1993)
- [42] Harvey D. J.: *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates*. *Mass. Spectrom. Rev.*, 18, 349-450 (1999)
- [43] Bendiak B., Cumming D. A.: *Hydrazinolysis-N-reacetylation of glycopeptides and glycoproteins. Model studies using 2-acetamido-1-N-(L-aspart-4-oyl)-2-deoxy-beta-D-glucopyranosylamine*. *Carbohydr. Res.*, 144, 1-12 (1985)
- [44] Chai W., Feizi T., Yuen C. T., Lawson A. M.: *Nonreductive release of O-linked oligosaccharides from mucin glycoproteins for structure/function assignments as neoglycolipids: application in the detection of novel ligands for E-selectin*. *Glycobiology*, 7, 861-72 (1997)
- [45] Van Pelt J., Van Kuik J. A., Kamerling J. P., Vliegthart J. F., Van Diggelen O. P., Galjaard H.: *Storage of sialic acid-containing carbohydrates in the placenta of a human galactosialidosis fetus. Isolation and structural characterization of 16 sialyloligosaccharides*. *Eur. J. Biochem.*, 177, 327-38 (1988)
- [46] Misaki R., Kimura Y., Palacpac N. Q., Yoshida S., Fujiyama K., Seki T.: *Plant cultured cells expressing human beta1,4-galactosyltransferase secrete glycoproteins with galactose-extended N-linked glycans*. *Glycobiology*, 13, 199-205 (2003)

- [47] Ohyama C., Hosono M., Nitta K., Oh-eda M., Yoshikawa K., Habuchi T., Arai Y., Fukuda M.: *Carbohydrate structure and differential binding of prostate specific antigen to Maackia amurensis lectin between prostate cancer and benign prostate hypertrophy*. *Glycobiology*, 14, 671-9 (2004)
- [48] El Rassi Z.: *Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species*. *J. Chromatogr. A*, 720, 93-118 (1996)
- [49] Blumberg K., Linier F., Pustilnik L., Bush C. A.: *Fractionation of oligosaccharides containing N-acetyl amino sugars by reverse-phase high-pressure liquid chromatography*. *Anal. Biochem.*, 119, 407-12 (1982)
- [50] Hardy M. R., Townsend R. R.: *Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85, 3289-93 (1988)
- [51] Dionex Corporation: *Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD)*, *Technical Note 20* (2000)
- [52] Hokke C. H., Kamerling J. P., van Dedem G. W., Vliegenthart J. F.: *Determination of the branch location of extra N-acetylglucosamine units in sialo N-linked tetraantennary oligosaccharides*. *FEBS Lett.*, 286, 18-24 (1991)
- [53] Dubois M., Gilles K., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.: *A colorimetric method for the determination of sugars*. *Nature*, 168, 167 (1951)
- [54] Jourdain G. W., Dean L., Roseman S.: *The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides*. *J. Biol. Chem.*, 246, 430-5 (1971)
- [55] Spiro R. G.: *Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. I. Isolation, chemical composition, and physicochemical properties*. *J. Biol. Chem.*, 235, 2860-9 (1960)
- [56] Harvard Bioscience: *Guide to equilibrium analysis* (2002)
- [57] Nisbet A. D., Saundry R. H., Moir A. J., Fothergill L. A., Fothergill J. E.: *The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin*. *Eur. J. Biochem.*, 115, 335-45 (1981)
- [58] Huntington J. A., Stein P. E.: *Structure and properties of ovalbumin*. *J. Chromatogr. B*, 756, 189-98 (2001)
- [59] Křenek K., Kuldová M., Hulíková K., Stibor I., Lhoták P., Dudič M., Budka J., Pelantová H., Bezouška K., Fišerová A., Křen V.: *N-Acetyl-D-glucosamine substituted calix[4]arenes as stimulators of NK cell-mediated antitumor immune response*. *Carbohydr. Res.* (2007, v tisku)
- [60] Bezouška K.: *osobní sdělení*

