



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE  

---

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

## **Detekce galektinů ve vybraných nádorových buněčných liniích**

### **Detection of galectins in selected cancer cells**

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Hana Kožmínová

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

Konzultantka bakalářské práce: Ing. Miluše Vlachová, Ph.D.

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kožmínová** Jméno: **Hana** Osobní číslo: **491702**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Detekce galektinů ve vybraných nádorových buněčných liniích**

Název bakalářské práce anglicky:

**Detection of Galectins in Selected Cancer Cell Lines**

Pokyny pro vypracování:

Galektiny jsou proteiny ze skupiny lektinů, které jsou schopné vázat sacharidové jednotky. Podílejí se na mnoha buněčných funkcích, zejména na mezibuněčných interakcích a na transmembránové signalizaci nebo regulují buněčnou smrt. Vyskytují se především v cytosolu, jádře, extracelulární matrix nebo v cirkulaci. Zvýšená hladina galektinů je spojena s poruchou imunitního systému nebo s nádorovými stavy, a proto jsou galektiny vhodnými cílovými proteiny ke studiu diagnostiky a terapie rakoviny. Cílem teoretické části práce bude vypracovat rešerši shrnující současné poznatky o galektinech, jejich výskytu a biologických funkcích v nádorech. Cílem experimentální části práce bude kultivace vybraných nádorových linií, separace proteinů buněčného lyzátu a detekce několika vybraných galektinů imunochemicky pomocí western blotu nebo imunofluorescenčně mikroskopickými metodami.

Seznam doporučené literatury:

- [1] BOJAROVÁ, P. a V. KŘEN, Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives, online, Biomaterial Science, ed. 2019, ročník 4, číslo 16, Přístupné z: doi:10.1039/c6bm00088f, ISSN 2047-4849
- [2] AAF, Dominic, Pavla BOJAROVÁ, Lothar ELLING a Vladimír KŘEN, Galectin-Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology, online, Trends in Biotechnology, ed. 2019, ročník 37, číslo 4, Přístupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2018.10.001, ISSN 0167-7799
- [3] SEDLÁŘ, Antonín, Martina TRÁVNÍČKOVÁ, Pavla BOJAROVÁ, Miluše VLACHOVÁ, Kristýna SLÁMOVÁ, Vladimír KŘEN a Lucie BAČÁKOVÁ, Interaction between Galectin-3 and Integrins Mediates Cell-Matrix Adhesion in Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells, online, international Journal of Molecular Science, ed. 2021, ročník 22, číslo 10, Přístupné z: doi: 10.3390/ijms22105144, ISSN 1422-0067

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**doc. RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

**Ing. Miluše Vlachová, Ph.D.**

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Detekce galektinů ve vybraných nádorových buněčných liniích vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

Ve Velké Dobré dne 12.05.2022

.....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce doc. RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D., za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost a ochotu. Děkuji také Ing. Miluši Vlachové, Ph.D., za četné konzultace, cenné rady, ochotu učit mě novým věcem, vstřícnost při poskytnutí materiálů a odborné vedení během experimentální části práce. Dále bych chtěla poděkovat celé Laboratoři biotransformací a jejím členům za příjemný a přátelský přístup a ochotu kdykoliv poradit.

## **ABSTRAKT**

Galektiny se vyskytují v různých organismech a patří mezi skupinu proteinů, které dokáží rozpoznávat a vázat sacharidy. Jejich hlavní funkční doménou je doména vázající sacharidy, která specificky váže  $\beta$ -galaktosidy. Existují tři základní strukturní typy: prototypický, tandemový a chimerický. Vyskytují se v různých orgánech a buněčných kompartmentech, od kterých se odvíjí jejich další funkce. Fyziologicky se účastní prozánětlivé i protizánětlivé reakce, sestřihu pre-mRNA nebo mezibuněčné adheze.

Galektiny hrají významnou roli také v progresi nádorových onemocnění. Jejich změněné hladiny jsou spojeny s angiogenezí, transformací buněk, regulací apoptózy, ovlivněním metabolismu rakovinných buněk nebo tvorbou metastáz. Mohou však mít i opačný účinek a nádorová onemocnění potlačovat. V současnosti je kladen důraz především na možnost jejich budoucího využití pro imunoterapii a také jako nádorových markerů.

V rámci praktické části této práce byly kultivovány nádorové buněčné linie MCF7, SW620, DLD-1 a A549. Následně byla pomocí metody Western blot s imunodetekcí zkoumána přítomnost galektinů-1, -3, -4, -8 a -9. Získané poznatky byly porovnány s literaturou a bylo vyvozeno, jakým způsobem který galektin specifickou linií ovlivňuje, pokud se v ní vyskytuje.

## **Klíčová slova**

galektin-1; galektin-3; galektin-4; galektin-8; galektin-9; rakovina; invazivita; buněčná adheze; metastázy; nádorové buněčné linie.

## **ABSTRACT**

Galectins appear in many different organisms and belong to a family of proteins that are able to recognize and bind carbohydrates. Their main protein domain is the carbohydrate recognition domain, which specifically binds  $\beta$ -galactosides. There are three main structural types of galectins: prototype, tandem and chimera. Galectins are found in various organs and cellular compartments, which then determine their further purpose. Biologically, they participate in both inflammatory and anti-inflammatory response, pre-mRNA splicing or intercellular adhesion.

Galectins also play an important role in the progression of cancer. Their altered levels are connected with pathological angiogenesis, cellular transformation, regulation of apoptosis, deregulation of cancer cell metabolism or metastases formation. They can, however, also have the opposite effect on cancer and suppress the progression of the disease. Currently the main attention is focused on the possible future use of galectins in immunotherapy and also their use as tumor markers.

In the experimental part of this thesis, MCF7, SW620, DLD-1 and A549 cancer cell lines were cultivated. The presence of galectin-1, -3, -4, -8 and -9 was examined in these cell lines, using Western blotting and immunodetection. The obtained results were then compared with the literature and the way how the presence of a particular galectin affects a specific cell line was discussed.

## **Keywords**

galectin-1; galectin-3; galectin-4; galectin-8; galectin-9; cancer; invasiveness; cellular adhesion; metastases; cancer cell lines

## Obsah

1	Úvod .....	9
2	Cíle práce .....	10
3	Přehled současného stavu .....	11
3.1	Galektiny.....	11
3.1.1	Charakteristika galektinů .....	11
3.1.2	Vybrané lidské galektiny.....	13
3.1.3	Výskyt a funkce v buňce a v organismu .....	17
3.2	Galektiny a rakovina.....	21
3.2.1	Vliv na invazivitu .....	21
3.2.2	Shrnutí a možnosti v budoucnosti .....	28
4	Metodika .....	30
4.1	Přístroje a materiál.....	30
4.1.1	Použité přístroje.....	30
4.1.2	Použitý materiál.....	31
4.1.3	Buněčné linie .....	33
4.2	Postupy .....	33
4.2.1	Kultivace buněk .....	33
4.2.2	Pasážování buněk .....	34
4.2.3	Lýze buněk .....	35
4.2.4	Stanovení koncentrace proteinu v buněčném lyzátu .....	36
4.2.5	Elektroforéza .....	37
4.2.6	Barvení pomocí Coomassie blue .....	38
4.2.7	Western blot .....	39

4.2.8	Imunodetekce.....	40
4.2.9	Denzitometrické porovnání obsahu galektinu.....	40
5	Výsledky .....	42
5.1	Výběr a příprava buněčných linií.....	42
5.1.1	Ověření účinnosti lýze ..... <b>Chyba! Záložka není definována.</b>	
5.2	Analýza galektinů v lyzátech buněk nádorových linií .....	45
5.2.1	Galektin-1 .....	46
5.2.2	Galektin-3.....	46
5.2.3	Galektin-4.....	47
5.2.4	Galektin-8.....	48
5.2.5	Galektin-9.....	48
5.3	Souhrn výsledků.....	49
5.4	Denzitometrické porovnání .....	51
6	Diskuze.....	52
7	Závěr.....	56
8	Seznam použitých zkratk .....	57
9	Seznam použité literatury .....	58
10	Seznam použitých obrázků.....	67
11	Seznam použitých tabulek .....	68



# 1 ÚVOD

Galektiny jsou proteiny patřící do rodiny lektinů, které specificky vážou  $\beta$ -galaktosidy prostřednictvím své domény rozpoznávající sacharidy (CRD). Mají řadu fyziologických funkcí, mezi něž patří protizánětlivé schopnosti, ovlivnění transkripce, účast na mezibuněčných interakcích, přenosu živin i růstu buněk. V případě, že dojde ke vzniku rakovinného bujení, mohou se tyto jejich funkce projevit ve vývoji choroby negativně i pozitivně. Velkou roli v prognóze hrají samotné galektiny, ale zdaleka největší roli má, v jaké tkáni se nacházejí. Bylo prokázáno, že jeden galektin může mít zcela opačný účinek v závislosti na tkáni, ve které se nachází, nebo na tom, zda se vyskytuje intracelulárně či extracelulárně. Galektiny se účastní všech fází rozvoje rakoviny a často bývá jejich produkce zvýšena již na začátku onemocnění, čímž se jeho nástup urychluje. Naopak galektin-9 mívá na začátku nemoci sníženou hladinu a nemohou se tedy projevit jeho rakovinu potlačující vlastnosti. Změněné hladiny galektinů a některé jejich funkce by mohly být v budoucnu využity v detekci a léčbě těchto onemocnění. Cílem této práce je shrnout současné poznatky o vybraných galektinech a detekovat je ve vybraných nádorových buněčných liniích. Díky těmto výsledkům bude moci být posouzeno, jaký vliv má výskyt jednotlivých galektinů na rozvoj daného nádorového onemocnění.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce je vypracovat rešerši shrnující současné poznatky o galektinech, jejich výskytu a biologických funkcích se zaměřením na galektin-1, -3, -4, -8 a -9. Dále bude rozebrán mechanismus, jakým ovlivňují progresi nádorových onemocnění a jejich potenciální využití v léčbě.

Cílem experimentální části práce je kultivace nádorových linií MCF7, SW620, DLD-1 a A549, separace proteinů buněčného lyzátu a detekce galektinů-1, -3, -4, -8 a -9 v těchto liniích imunochemicky pomocí Western blotu.

Takto získaná data budou použita pro zhodnocení vlivu jednotlivých galektinů na rozvoj daných nádorových onemocnění a dále bude diskutováno jakou roli hraje každý galektin u jednotlivých buněčných nádorových linií.

## 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

### 3.1 Galektiny

#### 3.1.1 Charakteristika galektinů

Galektiny jsou součástí velké skupiny proteinů rozpoznávajících sacharidy – lektinů. Dříve byly také nazývány S-lektiny. Vyskytují se v různých organismech přes houby a rostliny až po živočichy včetně člověka a zastávají širokou škálu funkcí. Obzvláště lidské galektiny se vyskytují nejen v různých tkáních a buněčných kompartmentech v závislosti na svých fyziologických funkcích – např. mají odlišné intracelulární a extracelulární funkce – ale liší se také ve své struktuře. V některých případech se jejich funkce se částečně překrývají, v jiných případech mohou být i protichůdné. Všechny tyto atributy mají obrovský vliv na obranyschopnost a průběh chorob (Modenutti 2019).

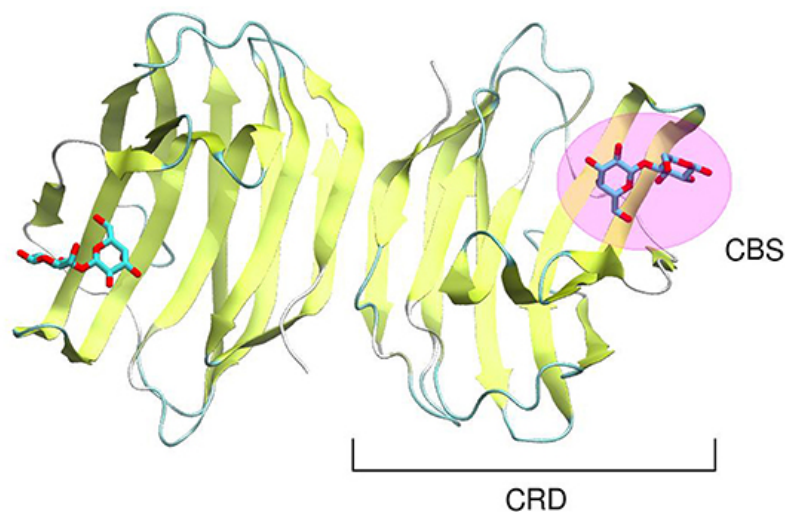
Galektiny obsahují jednu až dvě charakteristické domény o velikosti přibližně 130 aminokyselin, tzv. domény rozpoznávají sacharidy (CRD). Specificitou galektinů je, že v rámci svých CRD obsahují místo pro vazbu  $\beta$ -galaktosidů (Johannes 2018). Nejběžnějším ligandem je disacharid *N*-acetyllaktosamin (LacNAc). Vazebné místo pro tento substrát je u většiny galektinů velmi podobné (Dam 2007).

Přestože CRD obsahují velké množství aminokyselin, jen málo z nich se přímo účastní vazby. Porovnáním sekvencí zhruba 130 galektinů různého původu bylo zjištěno, že osm aminokyselin, které se účastní vazby sacharidů, je zcela konzervovaných. Dalších dvanáct se jeví jako značně konzervované. Část motivu této konzervované sekvence, který je použit k identifikaci jednotlivých galektinů, je zobrazen na obrázku 1 (Cummings 2017).

	41	*	*	*		56	*		66	*	71	*	*																	
Galectin-1	-NLCL	H	F	N	P	R	F	N	A	H	G	D	-----	ANTI	V	C	N	S	K	D	-GG	A	W	G	-T	E	Q	R	E	
Galectin-2	-KLNL	H	F	N	P	R	F	S	-----	ESTI	V	C	N	S	L	D	-GS	N	W	G	-Q	E	Q	R	E	-----				
Galectin-3	-DVA	F	H	F	N	P	R	F	N	E	N	-----	RRVI	V	C	N	T	P	K	L	-D	N	N	W	G	-R	E	E	R	Q
Galectin-4	-DVA	F	H	F	N	P	R	F	D	G	-----	WDK	V	V	F	N	T	L	Q	-G	G	K	W	G	-S	E	E	R	K	-----
	-DIAL	H	I	N	P	R	M	G	-----	NGT	V	V	R	N	S	L	L	-N	G	S	W	G	-S	E	E	K	K	-----		
Galectin-7	-DAAL	H	F	N	P	R	L	D	-----	TSEV	V	F	N	S	K	E	-Q	G	S	W	G	-R	E	E	R	G	-----			

**Obrázek 1 – Sekvence vybraných lidských galektinů obsahující vysoce konzervované aminokyseliny. Ty, které se účastní vazby sacharidů jsou označeny hvězdičkou, červené jsou hydrofilní a modré hydrofobní. Aminokyseliny jsou očíslovány dle sekvence galektinu-1 (Cummings 2017).**

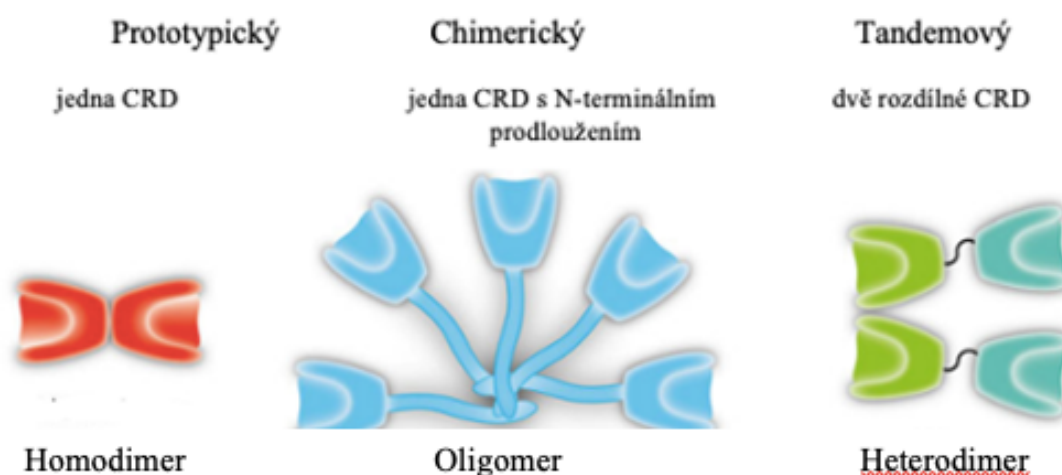
Všechny galektiny mají globulární část, která se skládá ze dvou antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů a tvoří jednu nebo dvě CRD konkávního tvaru (obrázek 2). Vazebná afinita se liší díky variabilitě  $\beta$ -skládaných listů, protože jinak je CRD vysoce konzervovaná. Biologická funkčnost galektinů je z významné části dána supramolekulárním spojováním do oligomerních struktur na povrchu buněk (Bojarová 2016).



**Obrázek 2 – Struktura dimerního galektinu-1 s vyznačenými CRD a CBS (Modenutti 2019).**

U galektinů rozeznáváme kvarterní strukturu (především počet a typ CRD), podle níž je můžeme rozdělit do několika skupin. Dle těchto kritérií rozlišujeme tři typy galektinů: prototypické, tandemové a chimerické. Prototypické galektiny tvoří homodimery, kde každá podjednotka obsahuje stejnou CRD. Tandemové galektiny obsahují dvě různé CRD, které jsou spojeny krátkou peptidovou

doménou v rámci jednoho polypeptidu a dále mohou tvořit i bivalenty složené ze dvou tandemových galektinů. Chimerický typ je specifický pro galektin-3. Na C-konci je CRD podobná galektinu, zatímco na N-konci je lokalizována doména bohatá na prolin a glycin. Chimerický typ se vyskytuje převážně jako monomer, ale za určitých podmínek může dojít k tvorbě oligomerů. Rozdělení galektinů dle kvarterní struktury je zobrazeno na obrázku 3 (Laaf 2018; Vasta 2016). Prototypické jsou galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15, -16. Mezi tandemové galektiny patří galektin-4, -6, -8, -9, -12 a chimerický je pouze galektin-3 (Brinchmann 2018).



Obrázek 3 – Rozdělení galektinů dle kvarterní struktury (Arthur 2015).

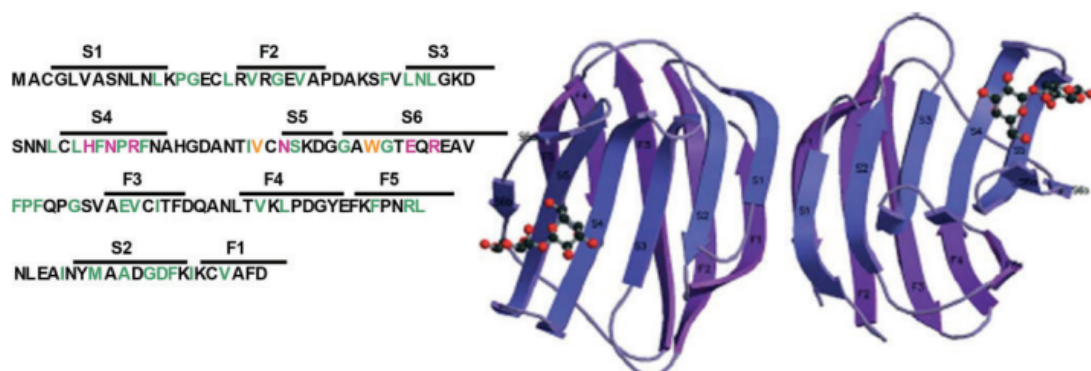
### 3.1.2 Vybrané lidské galektiny

„K dnešnímu datu je známo 19 savčích galektinů z nichž se 13 vyskytuje u člověka“ (Laaf 2018, s. 405).

Z biomedicínského a biotechnologického hlediska jsou nejlépe prozkoumány galektin-1 a -3, ale důkladný výzkum je zaměřen i na další galektiny, jako například galektin-4, -8 a -9 (Laaf 2018).

## a) Galektin-1

Galektin-1 (Gal-1) se skládá ze 135 aminokyselin a jeho struktura je znázorněna na obrázku 4. Obsahuje dva antiparalelní  $\beta$ -skládané listy s pěti (F1-F5) a šesti (S1-S6) vlákny. Může se vyskytovat jako monomer nebo jako homodimer. N- a C-konce jednotlivých monomerů směřují ke styčné ploše dimeru a CRD jsou umístěny na vzdálených koncích. Ve středové části je štěrbina se silným záporným nábojem. Díky takto vzniklému hydrofobnímu jádru dimeru je lidský Gal-1 v roztoku stabilní. Přesto část dimerů spontánně disociuje. Monomer je i nadále schopen vázat sacharidy, ale má k nim nižší afinitu. Gal-1 se může vyskytovat také v neaktivní oxidované formě (Camby 2006).

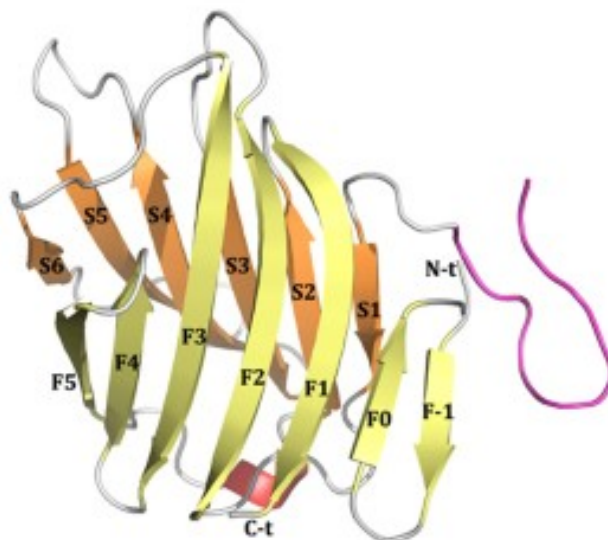


**Obrázek 4 – Struktura Gal-1.** Vysoce konzervované aminokyseliny jsou znázorněny zeleně. Aminokyseliny, které přímo vážou sacharidy pomocí vodíkových můstků jsou znázorněny růžově. Oranžově jsou znázorněny aminokyseliny, které sacharidy vážou van der Waalsovými silami (Camby 2006)

## b) Galektin-3

Galektin-3 (Gal-3) je tvořen 250 aminokyselinami. Jeho N-terminální oblast (NTD) je nelektinového typu, a je bohatá na prolin a není strukturně výrazně definována. Ze 113 aminokyselin se v NTD prolin objevuje 27krát. NTD se pravděpodobně podílí na následné oligomerizaci do pentamerní či oligomerní struktury. Kromě NTD obsahuje Gal-3 také vysoc konzervovanou C-terminální doménu CRD. CRD u Gal-3 je podobná jako u Gal-1 a má strukturu dvou

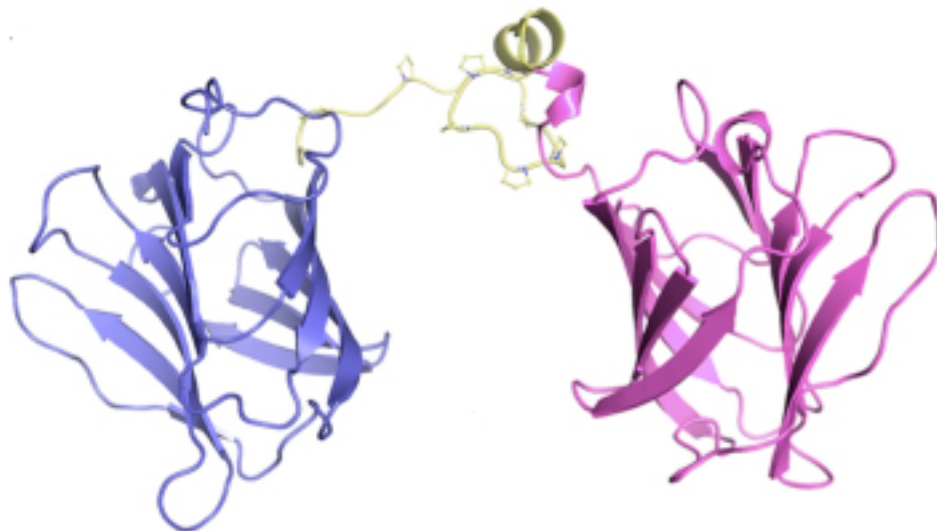
antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů. Prostorové uspořádání Gal-3 je znázorněno na obrázku 5. V roztoku se Gal-3 vyskytuje primárně jako monomer (Zhao 2021).



**Obrázek 5 – Prostorové uspořádání galektinu-3.** Červeně je znázorněn C-konec, fialově NTD. CRD je označena F0-5 a S1-6 (Flores-Ibarra 2018).

### c) Galektin-4

Řetězec galektinu-4 (Gal-4) má délku 323 aminokyselin a obsahuje dvě různé CRD, které jsou kovalentně spojené krátkým flexibilním peptidem. Tento spojovací peptid má dvě části. Pantová část je bohatá na prolin a krátká na  $\alpha$ -helixy. Gal-4 má dvě CRD: doména 4N na N-konci a obsahuje aminokyseliny 1-150, druhá CRD na C-konci (4C) se skládá z aminokyselin 179-323. Spojovací peptid je tedy v oblasti 151-178. Každá CRD má typickou strukturu dvou antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů, což je typická struktura tandemových galektinů. Uspořádání galektinu-4 je na obrázku 6 (Rustiguel 2016).



**Obrázek 6** – Gal-4. Modrá CRD je 4N doména a růžová je 4C doména. Žlutý je spojovací peptid (Rustiguel 2016).

#### d) Galektin-8

Lidský galektin-8 (Gal-8) je geneticky kódován v sedmi izoformách, které mohou být tandemové i prototypové. Mohou se vyskytovat i bivalentní tandemové formy. Tandemové izoformy se dvěma různými CRD jsou tři a dělí se podle délky spojovacího peptidu na krátký Gal-8S (short), střední Gal-8M (medium) a dlouhý Gal-8L (long). Nejčastěji se vyskytuje forma 8M, která má délku 317 aminokyselin a spojovací řetězec je z 28 aminokyselin. Na proteinové úrovni nebyly prototypové izoformy zatím detekovány. Izoformy jsou schematicky znázorněny na obrázku 7 (Tronsoco 2014).

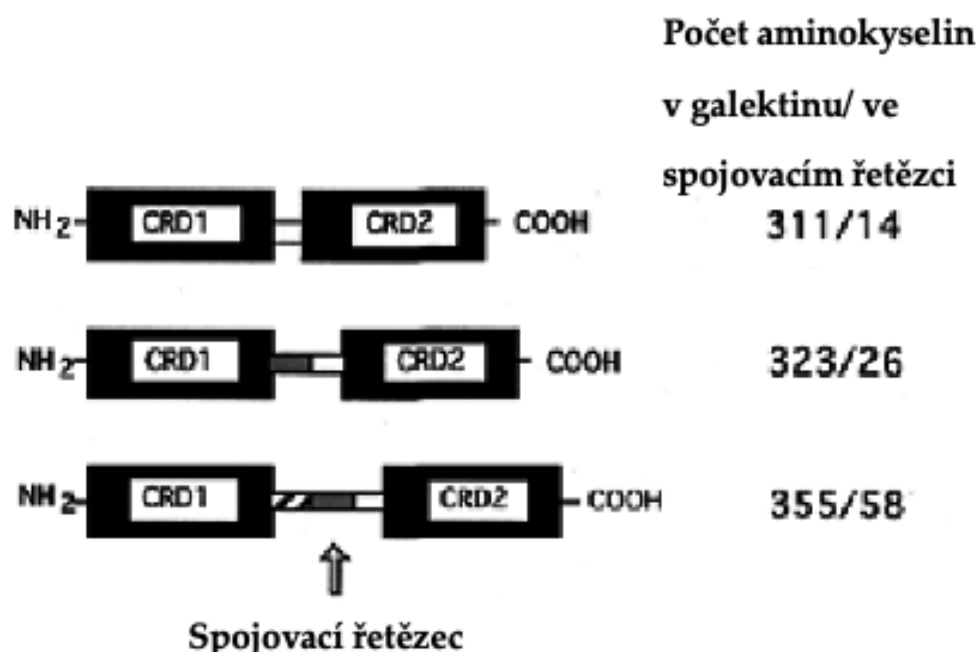


**Obrázek 7** – Schematické znázornění izoform galektinu-8, žlutě je znázorněna N-terminální CRD Gal-8N a modře C-terminální CRD Gal-8C (Tronsoco 2014).



### e) Galektin-9

Galektin-9 (Gal-9) se nejčastěji vyskytuje v tandemové formě, ale byl už detekován i s pouze jednou CRD. Známych je v současnosti celkem šest izoform. Na základě alternativního sestřihu mohou vznikat monovalentní izoformy, kterým chybí C-terminální CRD. Tandemový Gal-9 obsahuje dvě rozdílné CRD spojené různě dlouhým peptidovým řetězcem. Tandemové izoformy se vyskytují tři, a to krátký Gal-9S (short), střední Gal-9M (medium) a dlouhý Gal-9L (long). Jejich schematický náčrt je na obrázku 8. Nejčastěji se tento galektin vyskytuje v izoformě Gal-9M, která má délku 323 aminokyselin a spojovací řetězec je z 26 aminokyselin (Aanhane 2018; John 2016).



Obrázek 8 – Schematické znázornění tandemových izoform galektinu-9 (Chabot 2002).

#### 3.1.3 Výskyt a funkce v buňce a v organismu

Galektiny jsou exprimovány v různém množství ve všech živočišných buňkách. Většina galektinů se vyskytuje volně v cytosolu, jádře i v extracelulární matrix (ECM) v rozpustné formě. Bylo už však objeveno i několik výjimek, které

mají i transmembránové domény, a jsou tedy součástí buněčné membrány (Vasta 2012).

Galektiny mají obrovské množství fyziologických funkcí, které nejsou jednotné ani pro specifický galektin, protože je velmi ovlivňuje umístění v organismu. Původně se předpokládalo, že pouze vážou endogenní glykany a zprostředkovávají růstové procesy jako je diferenciaci, uspořádání tkání a buněčná smrt. Poté bylo zjištěno, že se účastní také regulace imunitní homeostázy. Nejnovější výzkumy prokázaly, že galektiny jsou schopny vázat také exogenní glykany, např. na povrchu potenciálně patogenních mikrobu a parazitů, čímž dále zprostředkovávají rozpoznávání a efektorové funkce vrozené imunity (Vasta 2012).

#### **a) Galektin-1**

Fyziologicky se Gal-1 vyskytuje především v orgánech bohatých na imunitní tkáň, jako je placenta, varlata nebo oční sítnice. Je tvořen a sekretován velkým množstvím buněk, jmenovitě jsou to například T a B lymfocyty, makrofágy, regulační lymfocyty, dendritické buňky, mikroglie nebo supresorové buňky myeloidního původu. Jeho hlavní funkce spočívá v protizánětlivé aktivitě a schopnosti zánětlivou reakci zcela ukončit, což je žádoucí u chronických zánětů způsobených autoimunitními, neurodegenerativními a metabolickými onemocněními. Také se uplatňuje během infekcí, astmatu a rakoviny nebo těhotenství. Společně s dalšími protizánětlivými mediátory řídí probíhající zánět a snižuje imunopatologii (Sundblad 2017).

Protizánětlivé schopnosti Gal-1 jsou založeny na dovednosti částečně potlačit vrozenou i získanou imunitu. Blokuje syntézu prozánětlivých cytokinů tím, že pozmění buněčnou signalizaci B a T lymfocytů. Inhibuje pohyb neutrofilů a eozinofilů a zabraňuje degranulaci žírných buněk a stimuluje jejich apoptózu (Sundblad 2017).

### **b) Galektin-3**

Gal-3 se primárně vyskytuje v cytoplazmě, z níž se přesouvá do jádra. Kromě toho je sekretován na povrch buňky, odkud se dostává do tělních tekutin včetně séra a moči. Je zapojen do diferenciaci buněk, zánětlivých reakcí, angiogeneze, fibrotizace nebo apoptózy (Dong 2017).

Více se ho vyskytuje v mladých buňkách a jeho funkce se liší podle jeho umístění. Cytoplazmatická frakce je důležitá pro přežití buňky, které Gal-3 ovlivňuje pomocí interakce s dalšími proteiny. Jaderná frakce Gal-3 podporuje sestřih pre-mRNA a reguluje genovou transkripci. Extracelulární Gal-3 upravuje mezibuněčné interakce, a to dvojnásobem. Buď zastane funkci adhezního receptoru na povrchu buňky, nebo se sám chová jako extracelulární ligand buněčného receptoru (Dong 2017; Sedlář 2021).

### **c) Galektin-4**

Gal-4 se vyskytuje intracelulárně i extracelulárně. Nejvíce je obsažen v epitelích střevního traktu, ze kterých je dále vyplavován do extracelulárních prostor. Reguluje buněčnou proliferaci, apoptózu a diferenciaci a zprostředkovává mezibuněčnou adhezi (Cao 2016).

V enterocytech vytváří homogenní síť, a tak stabilizuje lipidový raft. Lumen tenkého střeva je díky tomu stabilnější a zvyšuje se jeho funkčnost. Účastní se také apikálního přenosu transportních váčků přes membránu enterocytů. Projevuje se u něj i baktericidní aktivita proti bakteriím exprimujícím antigeny krevních skupin, jako například *Escherichia coli*. Gal-4 dále podporuje hojení poškozené epitelální bariéry ve střevech a růstu axonů a myelinizaci neuronů (Cao 2016).

#### **d) Galektin-8**

Gal-8 se vyskytuje v různých tkáních, a to převážně v sekretované podobě v ECM. Ovlivňuje mezibuněčnou adhezi a migraci, rozvoj zánětu a autofáгии (Cattaneo 2014).

Jeho nejvýznamnější funkcí je zprostředkování adheze krevních destiček tím, že stimuluje uvolňování von Willebrandova faktoru. Dále se chová prozánětlivě, neboť indukuje produkci prozánětlivých cytokinů (Cattaneo 2014). Cytoplazmatický Gal-8 je schopen detekovat, že došlo k napadení buňky bakterií. Rozpoznává totiž komplexní sacharidy bakteriálního původu uvnitř buňky a následně omezí jejich proliferaci (Thurston 2012).

Nejnovější výzkumy ukazují, že Gal-8 dokáže usnadnit imunitní odpověď zprostředkovanou T lymfocyty. Indukuje vazbu, internalizaci a vystavení rozpustných antigenů na povrchu antigen prezentujících buněk, které poté rozeznávají T lymfocyty (Prato 2020).

#### **e) Galektin-9**

Gal-9 se vyskytuje v kostech, svalech, v dýchací, trávicí, a močové soustavě i v dalších soustavách. Podle toho, ve které soustavě a orgánu se nachází se liší jeho funkce. Můžeme ho nalézt intracelulárně i extracelulárně. Mezi jeho funkce patří transport glykoproteinů, mezibuněčné interakce a interakce buněk s ECM nebo přenos signálů a diferenciací (John 2016).

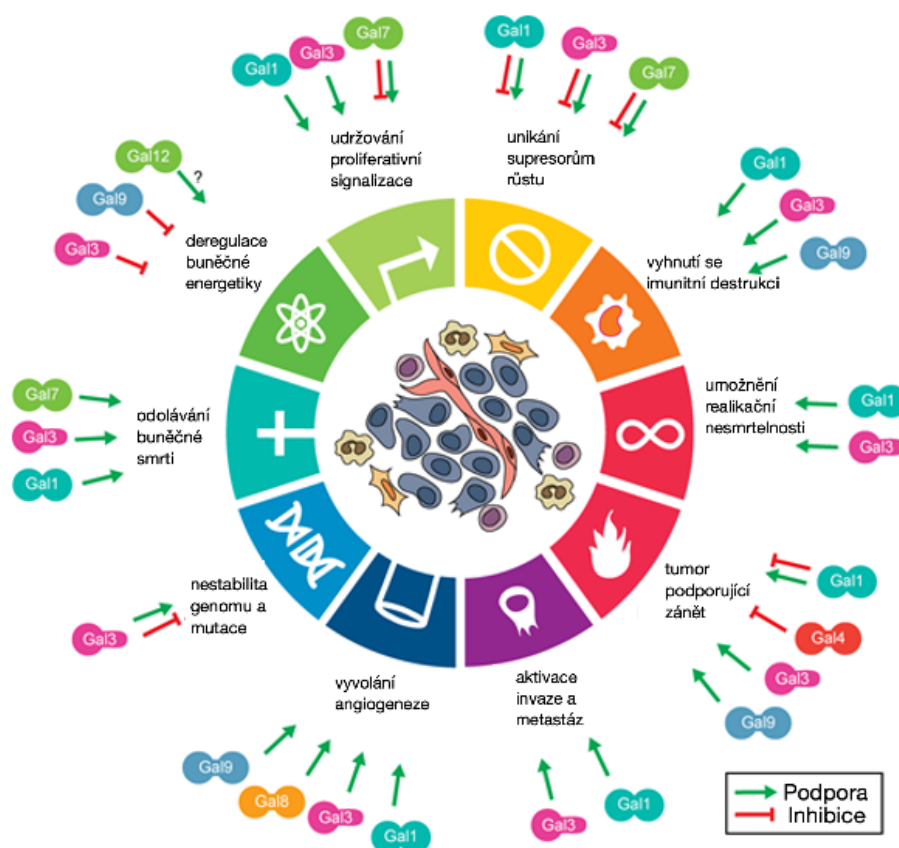
Extracelulární Gal-9 se selektivně váže na oligosacharidy a glykoproteiny obsahující galaktosu. Dochází pak k agregaci a vznikají můstky mezi ECM a buňkami. Intracelulární frakce se může volně přesouvat mezi cytoplazmou a jádrem a díky tomu může zprostředkovávat vývoj a růst buněk i imunologické pochody a buněčnou smrt. Dokáže také agregovat rakovinné buňky, které tak nemohou metastazovat (John 2016).

## 3.2 Galektiny a rakovina

Kromě své fyziologické funkce se galektiny projevují také u různých chorob, zejména u rakoviny. Častým jevem je zde pozměněná glykosylace jak na povrchu nádorové buňky, tak v ECM. Velká část funkcí, které jsou zprostředkovány galektiny, se může projevit jako patologická, pokud se odehrávají v nevhodné tkáni nebo za nevhodných podmínek. To může podporovat růst nádorů a progresi onemocnění (Bartolazzi 2018).

### 3.2.1 Vliv na invazivitu

Zvýšená hladina různých typů galektinů byla prokázána u mnoha typů rakovin (karcinomy plic, kolorektální, prostaty, melanomy a další). Velké množství výzkumů se dnes především snaží odhalit mechanismy, jakými galektiny ovlivňují nádorová onemocnění. Mechanismů je celá řada a jsou částečně shrnuty na obrázku 9 (Mandika 2018).



Obrázek 9 – Mechanismy, kterými vybrané galektiny ovlivňují rozvoj rakoviny (Girotti 2020).

### **a) Vliv galektinu-1**

Změněná hladina Gal-1 byla prokázána u rakoviny děložního čípku, dělohy, vaječníků, plic, kolorektálního karcinomu a dalších. Zvýšená hladina Gal-1 koreluje s různými procesy rozvoje rakoviny, jako jsou agregace a tvorba nádoru, šíření rakoviny metastázemi, angiogeneze a buněčná smrt. Intracelulární Gal-1 se při tom účastní interakcí protein-protein. Extracelulární Gal-1 umožňuje tvorbu metastáz tím, že vazbou na glykoproteiny v ECM, jako je laminin a fibronectin, pozmění procesy na buněčném povrchu (Cousin 2016).

- **Homotypická buněčná agregace**

Gal-1 interaguje s glykokonjugáty na povrchu různých buněk, čímž zprostředkovává homotypickou agregaci rakovinných buněk. Může se také vázat na transmembránové proteiny, mezi které patří muciny. Po navázání Gal-1 se muciny na povrchu buňky zmenší a odkryjí se tak další vazebné molekuly. Díky tomu dochází k agregaci sousedních buněk (Cousin 2016).

- **Buněčná adheze na ECM**

U buněk melanomu a ovariální rakoviny se Gal-1 může vázat na ECM rakovinných buněk pomocí lamininu, fibronectinu a dalších glykoproteinů. Tuto adhezi ovlivňují dva mechanismy. Gal-1 tvořený rakovinnými buňkami má prometastatické účinky. Naopak exogenní Gal-1 se uplatňuje během antiadhezni regulace. Exogenní Gal-1 se naváže na volná vazebná místa v ECM, a blokuje tak vazbu rakovinných buněk. Gal-1 tedy působí na migraci rakovinných buněk v těle a na jejich případné zachycení nebo uvolnění (Cousin 2016).

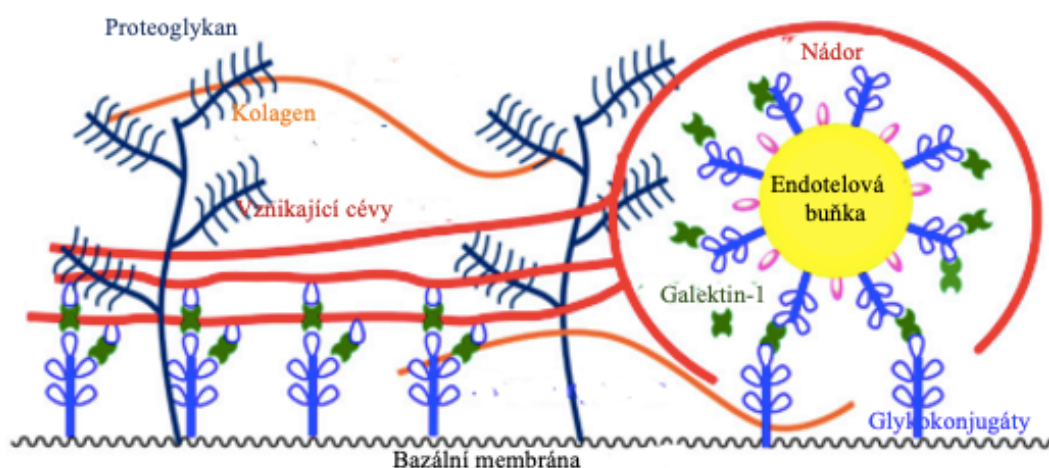
- **Migrace a invaze rakovinných buněk**

Zvýšená produkce Gal-1 byla prokázána jako známka míry invazivity u buněk karcinomu prsu nebo glioblastomu. Gal-1 se účastní migrace zmnožených

rakovinných buněk krevním řečištěm a zvýšení produkce proteolytických enzymů (Cousin 2016).

- **Angiogeneze nádorů**

K angiogenezi tkání dochází přirozeně během hojení a ovulace. Naproti tomu nádorem indukovaná angiogeneze, např. u buněk rakoviny prostaty, plic nebo tlustého střeva, je patologický proces, kde se zvyšuje hladina Gal-1. Mechanismus, jakým dochází k ovlivnění angiogeneze, zatím nebyl zcela objasněn. Gal-1 pravděpodobně zprostředkovává migraci cévních endoteliálních buněk v ECM a poskytuje strukturální podporu pro vznikající síť budoucích cév – viz obrázek 10 (Cousin 2016).



*Obrázek 10 – Patologická angiogeneze v nádorové tkáni indukovaná Gal-1 (Cousin 2016).*

- **Apoptóza T-lymfocytů.**

Hlavním důvodem špatné prognózy u pacientů se zvýšenou hladinou galektinu-1 je schopnost nádoru unikat imunitní odpovědi. Sekretovaný galektin-1 indukuje apoptózu T lymfocytů tím, že shlukuje receptory CD45, CD43 a CD7 do mikrodomén, které následně vytvoří homogenní signální komplexy, a tak podněcují vlastní apoptózu (Cousin 2016).

## b) Vliv galektinu-3

Zvýšená hladina Gal-3 byla zjištěna u řady onkologických onemocnění, jako například v buňkách rakoviny prsu, glioblastomu, chronické myeloidní leukémie (CML), akutní myeloidní leukémie (AML) a dalších. Nejvýrazněji Gal-3 ovlivňuje proliferaci a metabolismus nádorů, apoptózu a reguluje imunosupresi. Z těchto důvodů je jeho zvýšená hladina spojená se zhoršenou prognózou u CML a AML. Účastní se také migrace a angiogeneze. Velkou roli navíc hraje umístění Gal-3 v buňce, protože jaderný Gal-3 má protinádorový účinek, zatímco cytoplazmatický má pronádorový účinek (Guo 2020).

- **Regulace imunosuprese**

Gal-3 se podílí na imunosupresi indukované nádorem. Různým způsobem ovlivňuje vrozenou i získanou imunitu (viz tabulka 1; Guo 2020).

*Tabulka 1 – Způsoby ovlivnění imunity galektinem-3 (Guo 2020).*

Vrozená imunita	Získaná imunita
Podpora akutního zánětu	Indukce apoptózy T lymfocytů (extracelulární)
Zvýšená migrace eozinofilů	Ochrana T lymfocytů před apoptózou (intracelulární)
Podpora transportu a degranulace neutrofilů	Podpora Th2 odpovědi (extracelulární)
Inhibice produkce IL-12 v dendritických buňkách	Podpora Th1 odpovědi (intracelulární)
Atypická aktivace makrofágů	Podpora diferenciaci B lymfocytů

- **Regulace proliferace a apoptózy**

Gal-3 reguluje funkci T lymfocytů několika mechanismy. Intracelulární Gal-3 inhibuje apoptózu T lymfocytů podporou proliferace a stimulací T buněčných



receptorů. Naopak extracelulární Gal-3 apoptózu stimuluje svou vazbou na receptory CD45 a CD71 (Filipová 2020).

- **Ovlivnění metabolismu nádorů**

Gal-3 se v některých nádorech účastní glykolýzy a mitochondriálního metabolismu. Díky tomu se nádory mohou přizpůsobit stresovému prostředí s malým množstvím živin a kyslíku, ve kterém by jinak nepřežily. Toho je dosaženo pomocí Warburgova efektu, kdy rakovinné buňky vždy preferují anaerobní glykolýzu, která je zde výhodnější. Dále také Gal-3 ovlivňuje signální kanály, které se účastní regulace metabolismu nádorů. V mitochondriích pak pomáhá udržet homeostázu a blokuje mitochondriální apoptotický kanál. Vliv Gal-3 na signální kanály není omezen pouze na metabolické cesty, ale projevuje se i při buněčné migraci a invazi (Guo 2020).

- **Angiogeneze**

Mechanismus, kterým Gal-3 ovlivňuje angiogenezi, je založen na modifikaci angiogeneze zprostředkované vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF). Na povrchu buňky se Gal-3 váže na receptor pro VEGF a zabraňuje jeho internalizaci, což vede k následnému zvýšení angiogeneze (Funasaka 2014).

- **Tvorba metastáz**

Gal-3 zprostředkovává homotypickou agregaci rakovinných buněk a zároveň heterotypickou agregaci s buňkami endotelu, díky čemuž se můžou rakovinné buňky snadno pohybovat krevním řečištěm. Umožňuje také vazbu na ECM, takže se rakovinné buňky mohou uvolnit ze své primární pozice (Funasaka 2014).

### **c) Vliv galektinu-4**

Gal-4 je ve zvýšené míře produkován v nádorové tkáni prsu, jater, vaječnicků, pankreatu, sinonazálního adenokarcinomu a dalších. Naopak snížená hodnota se objevuje v raných stádiích rakoviny tlustého střeva. Gal-4 na rozdíl od ostatních galektinů zabraňuje tvorbě metastáz. V rakovinných buňkách dále zvyšuje jejich schopnost vyvolat apoptózu slizničních T lymfocytů, zde ale není jeho funkce zatím dostatečně prozkoumána (Brinchmann 2018; Sundblad 2013).

- **Inhibice tvorby metastáz**

Gal-4 zvyšuje buněčnou adhezi mezi rakovinnými buňkami. Buňky se tak pevně shlukují a snižuje se pravděpodobnost jejich migrace a tvorby metastáz. Proto je snížená hladina Gal-4 nežádoucí a bylo prokázáno, že zvyšuje nádorovou invazivitu (Belo 2013).

### **d) Vliv galektinu-8**

U Gal-8 je patrná značná orgánová specifita, která ovlivňuje, jak jeho změněná hladina ovlivní prognózu daného typu rakoviny. Zvýšená hodnota Gal-8 byla prokázána u pacientů s rakovinou prsu a štítné žlázy, zatímco snížená hladina provázela rakovinu tlustého střeva, jater nebo pankreatu. Gal-8 se účastní rakovinného růstu, adheze a tvorby metastáz. Podporuje zánětlivou reakci, která dále poškozuje tkáň (Zick 2022).

- **Adheze a migrace**

Sérový Gal-8 interaguje s cévním endotelem, který poté na svém povrchu prezentuje více adhezních molekul. Díky tomu se mohou migrující rakovinné buňky zachytit. Také indukuje produkci cytokinů v oblastech s nevyzrálými buňkami jako jsou například osteoblasty (Zick 2022).

- **Tvorba metastáz**

Gal-8 zvyšuje produkci cytokinů a chemokinů, které se účastní metastatického procesu. Kromě toho zvyšuje adhezi a růst buněk a selektivní metastatický rozsev do citlivých tkání (Zick 2022).

- e) **Vliv galektinu-9**

Role cytoplazmatického Gal-9 byla popsána u buněk rakoviny prsu a jater. Jaderný Gal-9 se účastní procesů v rakovinných buňkách tlustého střeva, monocytů, melanomů a jater. Podílí se na úniku imunitní odpovědi, pozměňuje buněčný metabolismus, podporuje zánět a angiogenezi, ale může mít i protirakovinný účinek (John 2016).

- **Transformace buněk**

Je prokázána korelace mezi sníženou expresí Gal-9 a transformací zdravých buněk na maligní. Mechanismus zatím není znám (John 2016).

- **Odolávání imunitní destrukci**

Hlavním mechanismem, který Gal-9 využívá k ovlivnění imunitní odpovědi, je změna diferenciací imunitních buněk. U většiny buněk exprese Gal-9 zvyšuje apoptózu, a tím ničí rakovinné buňky (např. u CML). U jiných buněk se Gal-9 naopak může vázat na buněčné receptory a spouští signalizaci, která apoptózu blokuje. Pomocí vazby na imunoglobulinovou a mucinovou doménu na povrchu T lymfocytů může Gal-9 narušit imunitní odpověď NK buněk. (Girotti 2019; John 2016)

- **Adheze, migrace a invaze**

Gal-9 má podobně jako Gal-4 primárně inhibiční účinek na tvorbu metastáz. Podporuje agregaci rakovinných buněk a zabraňuje jejich migraci. Zároveň blokuje jejich adhezi k endotelu cév. Narušuje také proces invaze, takže buňky nejsou schopny se navázat k ECM. Během rakovinných procesů tedy většinou pozorujeme sníženou hladinu Gal-9 (John 2016).

- **Změna buněčného metabolismu**

Gal-9 pozměňuje průběh metabolismu v rakovinných buňkách a zpomaluje v nich glykolýzu. To může vést až k úplné inhibici buněčné proliferace, jak bylo pozorováno u buněk myeloidní leukémie (Girotti 2019).

### **3.2.2 Shrnutí a možnosti v budoucnosti**

Přes velké množství známých mechanismů, kterými galektiny ovlivňují progresi nádorových onemocnění, nejsou naše znalosti o jejich biologických účincích ještě kompletní. Velkou roli hraje orgánová a tkáňová specificita, která se u galektinů projevuje. Jeden galektin může mít též různý účinek v závislosti na tkáni, ve které se nachází. Kromě toho je jejich aktivita ovlivněna i umístěním v buňce nebo ECM.

V současnosti se výzkum zaměřuje především na možnost využití galektinů pro možnosti imunoterapie. Aby byla imunoterapie co nejúčinnější, je potřeba podrobně znát mechanismy, kterými galektiny ovlivňují specifické buněčné linie. Schopnost rakovinných buněk využívat různé imunosupresivní mechanismy nám zatím brání galektiny zcela zapojit do léčby (Sundblad 2013).

Výzkum se soustředí hlavně na dva způsoby, kterými by bylo možné galektiny využít. V potaz přichází využití galektinů, které se podílí na potlačení růstu nádorů nebo použití inhibitorů galektinů. Jako úspěšná ukázka může sloužit kyselina farnesylthiosalicylová, která zabraňuje vazbě protoonkogenu

Ras na buněčnou membránu. Protoonkogen tak není aktivován a nedochází k jeho transkripci a další proliferaci (Sundblad 2013).

Kromě imunoterapie spočívá další využití galektinů v jejich použití jako nádorových markerů pro včasnou diagnózu. Stanovení jejich sérové hladiny by se také dalo využít k určení prognózy onemocnění (Labrie 2017).

## 4 METODIKA

### 4.1 Přístroje a materiál

Vzorky a materiály, které jsem používala k získání dat pro svou bakalářskou práci, byly k dispozici v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. Veškerá experimentální práce probíhala na přístrojích v tomto ústavu.

#### 4.1.1 Použité přístroje

- Centrifugy:
  - Minicentrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Německo)
  - Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Německo)
- Detekční kamera G:BOX Chemi XRQ (Syngene, Velká Británie)
- Inkubační box MCO-170AIC (PHCbi Holdings Corporation, Japonsko)
- Laminární box SafeFAST Premium, třída II (Faster S.r.l., Itálie)
- Magnetická míchačka s ohřevem Arex (Velp Scientifica S.r.l., Itálie)
- pH metr - pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, ČR)
- SDS-PAGE aparatura (Bio-Rad, USA)
- Sonikátor UP50 H Ultra Sonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie)
- Spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Japonsko)
- Termomixér Comfort (Eppendorf, Německo)
- Třepačka/Kývačka MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- Váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)
- Western blot aparatura (Bio-Rad, USA)
- Zdroje napětí:
  - EPS 601 (GE Healthcare / Amersham Pharmacia, USA)
  - omniPac (Clever Scientific, Velká Británie)
  - PowerPac (Bio-Rad, USA)

#### 4.1.2 Použitý materiál

- 0,02 mol/l TBS-Tween pH 8,0 (2,4 g Tris + 8 g NaCl + 1,0 ml Tween 20, rozpuštěno v 1 l H<sub>2</sub>O)
- 12% separační gel na SDS-PAGE (3,3 ml H<sub>2</sub>O + 4,0 ml 30% akrylamid + 2,5 ml Tris-HCl pH 8,8 + 0,01 ml 10% SDS + 0,01 ml 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> + 0,004 ml TEMED)
- 5% zaostřovací gel na SDS-PAGE (1,4 ml H<sub>2</sub>O + 0,33 ml 30% akrylamid + 0,25 ml 1,0 mol/l Tris-HCl pH 6,8 + 0,02 ml 10% SDS + 0,02 ml 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> + 0,002 ml TEMED)
- Barvicí roztok (0,5 g Coomassie Blue Brilliant, rozpuštěno v 90 ml CH<sub>3</sub>OH + 18 ml CH<sub>3</sub>COOH + 90 ml H<sub>2</sub>O)
- Bradfordovo činidlo – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
- Dodecylsírán sodný – SDS (SERVA, USA)
- Elektrodový pufr (15,1 g Tris + 94 g glycin + 5 g 10% SDS, rozpuštěno v 1 l H<sub>2</sub>O)
- Fosfátový pufr (PBS) (8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, rozpuštěno v 1 l H<sub>2</sub>O)
- Lyzovací pufr (0,16 g 0,01 mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O + 0,36 g 0,01 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O + 0,80 g 0,15 mol/l NaCl + 1 g 1% deoxycholát sodný + 1 ml 1% Triton X-100 + 1 ml PMSF inhibitor proteáz (100x), rozpuštěno ve 100 ml H<sub>2</sub>O)
- Marker pro elektroforézu – Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards (Bio-Rad, USA)
- Médium RPMI 1640 (10 % fetální bovinní sérum + 1 % směs antibiotik)
- Nitrocelulózová membrána, porozita 0,45 μm (ThermoFisher Scientific, USA)
- Odtučněné sušené mléko (Nutri House, ČR)

- Odbarvovací roztok (350 ml etanol, 550 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml kyselina octová)
- Protilátky:
  - Primární protilátky:
    - Králičí monoklonální protilátka proti Gal-1:  
*Galectin-1/LGALS1 (D608T) Rabbit mAb* (Cell Signaling Technology, USA)
    - Králičí monoklonální protilátka proti Gal-3:  
*Galectin-3/LGALS3 (D4I2R) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb* (Cell Signaling Technology, USA)
    - Králičí polyklonální protilátka proti Gal-4:  
*Galectin 4 Antibody (PA5-95353)* (ThermoFisher Scientific, USA)
    - Králičí monoklonální protilátka proti Gal-8:  
*Galectin-8 Antibody (JB85-35)* (Novus Biologicals, USA)
    - Králičí polyklonální protilátka proti Gal-9:  
*Galectin 9 Antibody (PA5-50966)* (ThermoFisher Scientific, USA)
  - Sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou (HRP):
    - Kozí polyklonální protilátka proti králičí protilátce:  
*Goat anti-Rabbit IgG (H + L), HRP (31460)* (ThermoFisher Scientific, USA)
- Substrát SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity (Thermofisher, USA)
- Transferový pufr pH 9,2 (2,9 g glycin + 5,8 g Tris + 100 ml methanol, rozpuštěno v 1 l H<sub>2</sub>O)
- Trypsin s kyselinou ethylendiamintetraoctovou – EDTA 1:1 (roztoky připraveny v Přípravně médií a umývárně skla, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.)
- Vzorkový pufr 5x koncentrovaný (250 mM Tris + 500 mM dithiotreitol (DTT) + 10% SDS + 0,5% bromfenolová modř + 50% glycerol)



### 4.1.3 Buněčné linie

- MCF7 – epitelie lidského karcinomu prsu, izolovány z 69leté ženy bílé rasy, adenokarcinom (Mikrobiologickému ústavu darovala doc. Ing. Jitka Viktorová, Ph.D., VŠCHT)
- SW620 – epitelie lidského kolorektálního adenokarcinomu, stádium C dle systému Duke, získané od 51letého muže (darovala Mgr. Marcela Filipová, Ph.D., Ústav Makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.)
- DLD-1 – epitelie kolorektálního adenokarcinomu, stádium C dle systému Duke (daroval prof. Ing. Peter Šebo, CSc., Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.)
- A549 – epitelie plicního karcinomu (daroval prof. Ing. Peter Šebo, CSc., Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.)

## 4.2 Postupy

### 4.2.1 Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány v Petriho miskách pro tkáňové kultury. Jako živné médium bylo použito RPMI. Kultivace probíhala v inkubačním boxu při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti, obrázek 11. Buňky byly průběžně kontrolovány v mikroskopu.



*Obrázek 11 – Inkubační box MCO-170AIC používaný pro kultivaci (vlastní zdroj).*

#### **4.2.2 Pasážování buněk**

Pokud bylo při kontrole buněk zjištěno, že je kultura již dostatečně narostlá (70-80% konfluence – zaplnění dna Petriho misky), mohla být následně rozdělena do více misek a ponechána dále kultivovat. Celý proces pasážování opět probíhal v laminárním boxu, obrázek 12, s následujícím postupem:

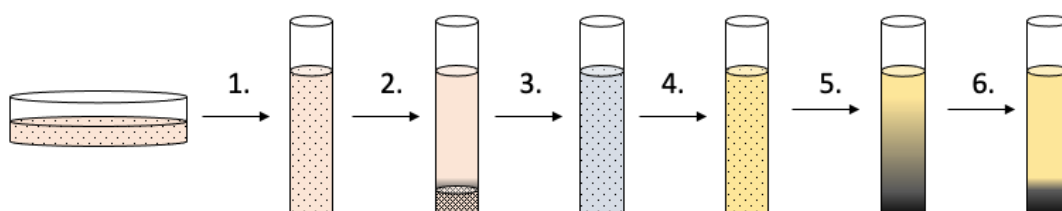
- a) Odsátí živného média;
- b) Opláchnutí 4 ml PBS a následné odsátí;
- c) Přidání 4 ml roztoku trypsinu s EDTA;
- d) Inkubace v inkubačním boxu 3-5 minut, kdy došlo k odštěpení buněk od povrchu Petriho misky, což bylo možné ověřit pouhým okem;
- e) Přidání 10 ml RPMI – zastavení reakce trypsinu s EDTA obsaženým sérem;
- f) Propipetování roztoku, aby došlo k jeho homogenizaci;
- g) Rozdělení buněčné suspenze po 4 ml do nových misek a přidání 8 ml RPMI;
- h) Vrácení nově připravených Petriho misek do inkubačního boxu.



*Obrázek 12 – Laminární box (vlastní zdroj).*

### 4.2.3 Lýze buněk

Před použitím buněk bylo potřeba je lyzovat, aby bylo možné stanovit požadované galektiny. Lýze byla prováděna při 100% konfluenci. Nejprve byly buňky uvolněny z povrchu Petriho misky, což probíhalo stejně jako u pasážování. Postup je schematicky zachycen na obrázku 13:



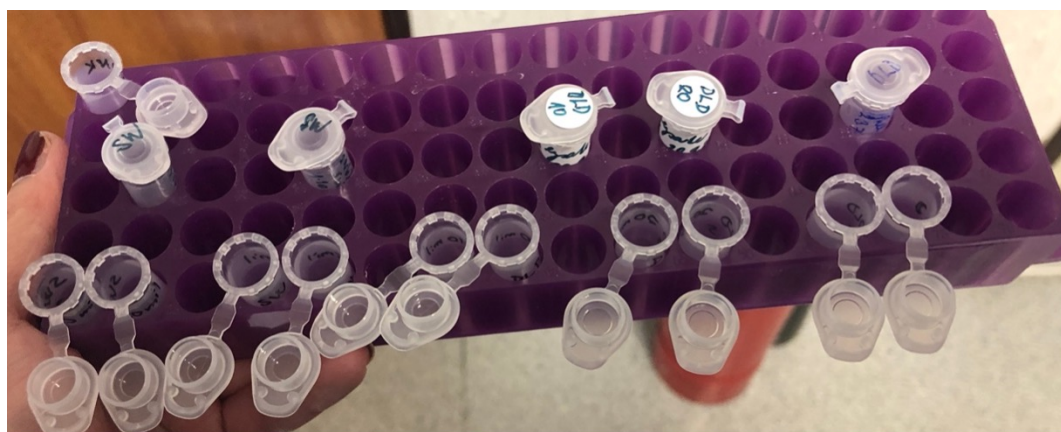
*Obrázek 13 – Schematické znázornění lýze buněk. 1. Sklizení buněk, 2. Centrifugace, 3. Promytí PBS, 4. Odsátí PBS a přidání lyzovacího pufru, 5. Sonikace, 6. Stočení (vlastní zdroj).*

Stočení buněk probíhalo 3 minuty při  $150 \times g$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Následovalo 3x promytí 10 ml PBS, po každém promytí následovalo stočení za stejných podmínek. Po posledním promytí byl přidán 1 ml lyzovacího pufru. Dále proběhla sonikace na ledu  $3 \times 10 \text{ s}$ , s přestávkami 30 s. Vlastní lýze probíhala přes noc na kývačce v chladu. Nakonec byl roztok stočen (10 minut při  $1000 \times g$ ), aby došlo k odstranění buněčných zbytků, a supernatant byl použit pro další práci.

#### 4.2.4 Stanovení koncentrace proteinu v buněčném lyzátu

Aby bylo možné provést denzitometrické porovnání množství galektinu v různých buněčných liniích, bylo nutné nejdříve stanovit koncentraci proteinu v buněčném lyzátu. Měření koncentrace proteinu probíhalo následujícím způsobem:

- a) Homogenizace vzorku na vortexu;
- b) Příprava zkumavek se 100  $\mu$ l vzorku. Každý vzorek byl připraven jako 2% a 5% roztok. Slepým vzorkem bylo 100  $\mu$ l destilované vody, obrázek 14;
- c) Přidání 1 ml Bradfordova činidla do každé zkumavky;
- d) Inkubace 15 minut při laboratorní teplotě ve tmě;
- e) Změření absorbance vzorku na spektrofotometru při 595 nm proti slepému vzorku;
- f) Vypočtení koncentrace bílkovin dle vzorce:  $c_{prot} = K_{BSA} \cdot A \cdot f$ , kde  $K_{BSA}$  je směrnice kalibrační přímky závislosti absorbance na koncentraci standardu hovězího sérového albuminu (BSA),  $A$  je absorbance a  $f$  je koeficient ředění. Jednotkou  $K_{BSA}$  a  $c_{prot}$  jsou mg/ml,  $A$  a  $f$  jsou bezrozměrné veličiny.



*Obrázek 14 – Homogenizované lyzáty a připravené zkumavky pro různě koncentrované vzorky (vlastní zdroj).*

#### 4.2.5 Elektroforéza

Před vlastní elektroforézou bylo potřeba připravit elektroforetický gel. Po sestavení aparatury pro jeho výrobu byl nejdříve napipetován 12% separační polyakrylamidový gel mezi skla uchycená v aparatuře a byl převrstven destilovanou vodou. Po jeho ztuhnutí byla voda odsáta filtračním papírem a byl napipetován 5% zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřebínek s deseti jamkami, a byl nechán ztuhnout (obrázek 15).

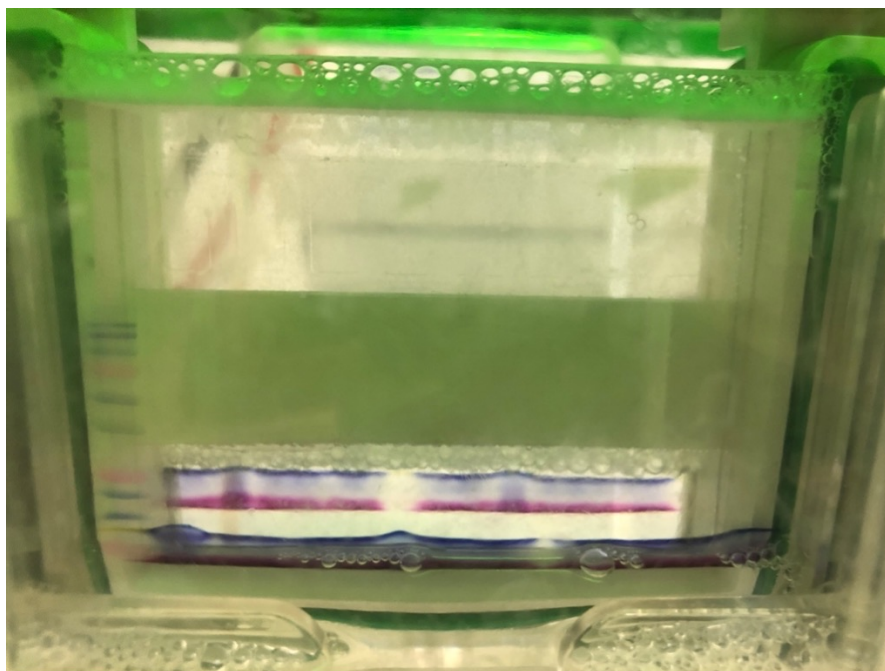


*Obrázek 15 – Příprava polyakrylamidového gelu (vlastní zdroj).*

Následovala příprava vzorků pro elektroforézu: vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 1:5. Vzorky byly inkubovány 5 minut v termomixéru při 99 °C. Během inkubace došlo vysokou teplotou a vazbou SDS k denaturaci proteinů, díky tomu se vzorky v gelu mohly pohybovat rovnoměrně a být rozděleny jen na základě své velikosti. Všechny proteiny také po vazbě s SDS získaly záporný náboj, čímž byla umožněna migrace k anodě.



Byla sestavena elektroforetická aparatura s vloženým gelem, kam bylo nalito přibližně 400 ml elektrodového pufu. Na gel v takto připravené aparatuře už bylo možné nanést vzorky a zahájit elektroforézu při konstantním napětí 130 V, která byla ukončena, když se čelo přiblížilo ke konci gelu, obrázek 16.



*Obrázek 16 – Elektroforéza před ukončením s viditelným markerem vlevo a vzorky přiblíženými ke konci gelu (vlastní zdroj).*

#### **4.2.6 Barvení pomocí Coomassie blue**

Barvivo Coomassie blue se v kyselém prostředí váže především na bazické aminokyseliny. Elektroforeticky rozdělené proteiny byly obarveny, aby byla ověřena účinnost procesu lýze buněk. Byly porovnány vzorky, které byly lyzovány postupem dle 4.2.3 a vzorek, který byl lyzován přímo ve vzorkovacím pufu.

Získaný elektroforetický gel s rozdělenými proteiny byl přenesen do Petriho misky, kde byl 10 minut barven v Coomassie blue. Následně byl 30 minut odbarvován odbarvovacím roztokem na kývačce. Obarvený gel byl uchováván v 1% roztoku kyseliny octové v destilované vodě.

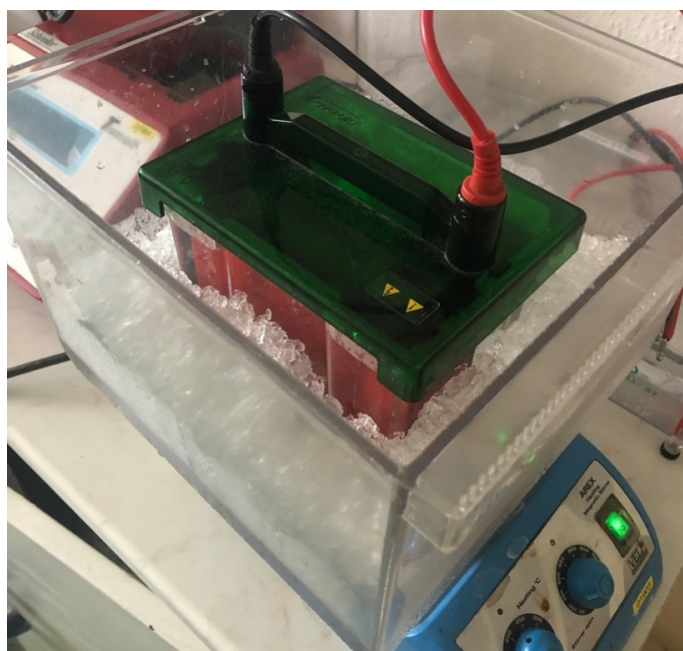
#### 4.2.7 Western blot

Během metody Western blot docházelo k přenosu vzorků, rozdělených během elektroforézy, na nitrocelulóзовou membránu, kde mohly být poté detekovány specifickými protilátkami.

Elektroforetický gel byl po vyjmutí z aparatury promyt v transferovém pufru. Promytý gel byl použit pro sestavení sendviče Western blotu, který se skládal z následujících částí (od katody k anodě):

- Porézní podložka;
- Filtrační papír;
- Gel;
- Membrána;
- Filtrační papír;
- Porézní podložka.

Takto sestavený sendvič byl vložen do aparatury, ve které bylo vložené míchadlo a kam byl nalit 1 l transferového pufru. Western blot probíhal na ledu na míchačce 2 hodiny při konstantním napětí 100 V, obrázek 17.



*Obrázek 17 – Probíhající Western blot na ledu (vlastní zdroj).*

#### 4.2.8 Imunodetekce

Po ukončení Western blotu byla membrána vyjmuta, nastříhána na požadované úseky a promyta v roztoku TBS-Tween.

Následně byla membrána nasycena 10% roztokem odtučněného mléka v TBS-Tween 2 hodiny na kývačce. Po promytí byla membrána inkubována s roztokem primární protilátky proti požadovanému galektinu v 5% roztoku odtučněného mléka v TBS-Tween přes noc na kývačce v chladu.

Po promytí roztokem TBS-Tween, vždy 3 x 10 minut na kývačce, mohla být membrána inkubována se sekundární protilátkou v 5% roztoku odtučněného mléka v TBS-Tween 1 hodinu na kývačce. Tato protilátka byla značena křenovou peroxidázou. Poté byla membrána naposled promyta roztokem TBS-Tween 3 x 10 minut na kývačce, a byl přidán komerční substrát, který byl smíchán v poměru 1:1. Vlastní detekce byla prováděna chemiluminiscenčně kamerou.

#### 4.2.9 Denzitometrické porovnání obsahu galektinu

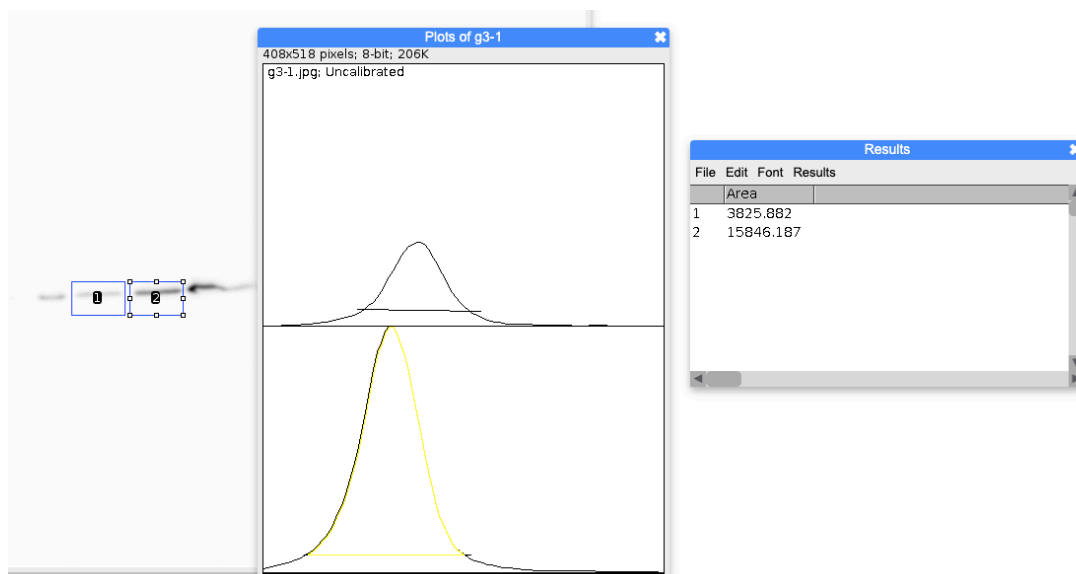
Pokud byly na gel nanášeny vzorky se stejným obsahem proteinu, mohlo být následně provedeno denzitometrické porovnání obsahu galektinu v různých buněčných liniích. Toto porovnání bylo provedeno pomocí programu ImageJ pro Gal-3 v linii SW620 a DLD-1.

Nejprve byl snímek gelu, který byl získán při chemiluminiscenční detekci, vložen do programu ImageJ. Následně byla vybrána oblast prvního proužku stiskem kláves Ctrl + 1. Poté byl shodný obdélník přetažen na druhý proužek a fixován stiskem kláves Ctrl + 2. Ukončení označování oblastí pro denzitometrii bylo provedeno stiskem kláves Ctrl + 3.

Objevilo se okno s histogramy, které vyobrazovaly množství barevných bodů v každém obdélníku. Po stisknutí nástroje *line* bylo možné vyznačit okraje histogramů, aby se eliminoval šum pozadí. Posledním krokem bylo stisknutí



nástroje *magic wand* a kliknutí do vzniklých ploch pod histogramy, tím došlo ke spočtení velikosti těchto ploch a ty mohly být následně porovnány, obrázek 18.



**Obrázek 18 – Denzitometrické porovnání** – jednotlivé kroky porovnání. Vlevo jsou vidět označené proužky - obdélník 1 linie SW620 a obdélník 2 linie DLD-1. Uprostřed jsou znázorněny histogramy a vpravo je okno se spočítanými plochami histogramů (vlastní zdroj).

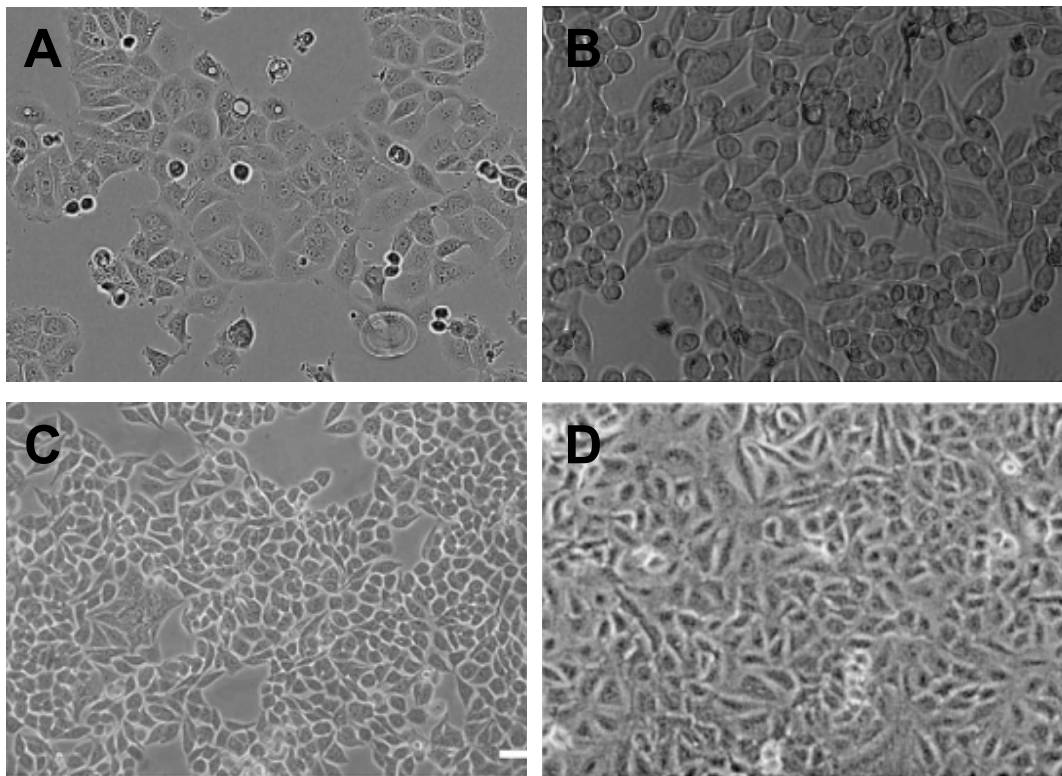
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Výběr a příprava buněčných linií

Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány linie MCF7, SW620, DLD-1 a A549, protože jsou to ve všech případech epitelální buňky a můžeme tedy sledovat, jak se liší výskyt galektinů na základě orgánové specifity. Také mohlo být následně porovnáno, zda výskyt galektinů v daných liniích odpovídá literatuře.

Dle literatury by linie MCF7 měla exprimovat Gal-1, -3, -8 a -9, které byly již dříve stanoveny pomocí metody ELISA s protilátkami, metodou Western blot, qPCR, imunohistochemicky a imunoprecipitačně (Geiger 2016; Lin 2015; Satelli 2008; Yasinska 2019). U linie SW620 by měl být přítomen Gal-1, 3-, 4- a -8, již dříve stanoven metodou Western blot a qPCR (Lahm 2001). Linie DLD-1 dle literatury exprimuje Gal-1, -3, -8 a -9, již dříve stanoven metodou Western blot a qPCR (Lahm 2001). A u linie A549 by měly být přítomny Gal-1, -3, -8 a -9, které byly v dřívějších studiích stanoveny imunohistochemicky, imunoprecipitačně a metodou Western blot (Chung 2015; Dalotto-Moreno 2013; Meinohl 2020; Yang 2021). Protože ve všech těchto liniích byl dle literatury očekáván výskyt většiny galektinů studovaných v této práci, byly tyto linie vhodné pro detekci těchto galektinů metodou Western blot s následnou imunodetekcí.

Linie MCF7 je pro nás zajímavá, protože si tyto buňky ponechávají rysy charakteristické pro zdravý prsní epitel. Pokud rostou *in vitro* v jedné vrstvě tak se sféricky vyklenují, protože se mezi nimi a dnem Petriho misky akumuluje tekutina. Také je zde silná mezibuněčná adheze (ECACC 2020). Buňky linie SW620 jsou kulovité a podobné fibroblastům, pravděpodobně prodělaly epitelomezenchymální tranzici typickou pro rakovinné buňky (Maamer-Azzabi, 2013). Linie DLD-1 si ponechává epitelální charakter a buňky jsou dlaždicovité (Tanaka 2016). Buňky linie A549 jsou dlaždicovité a *in vitro* rostou v jedné vrstvě (Townsend 2017). Jednotlivé buněčné kultury jsou zobrazeny na obrázku 19.



**Obrázek 19 – Buněčné kultury (A) linie MCF7; (B) linie SW620; (C) linie DLD-1; (D) linie A549 (Aarbiou 2002; Arun 2017; ECACC 2020; Ji 2013).**

Používané linie byly po rozmražení kultivovány v Petriho miskách v termoboxu. Růst buněk byl kontrolován po třech dnech od nanesení a poté bylo podle rychlosti růstu odhadnuto, jak často budou následovat další kontroly, dokud nebylo dosaženo 70-80% konfluence. Rychlost růstu nebyla vždy stejná ani u téže linie, bylo tedy vždy třeba se průběžně řídit stavem jednotlivých kultur. Důvodem různé rychlosti růstu kultur bylo jejich stáří (kolikrát již byla kultura pasážována), různé množství média v Petriho misce nebo pasážovaných buněk.

Po dosažení požadované hustoty buněk na dně Petriho misky byly kultury pasážovány a rozdělené vzorky byly ponechány dále kultivovat, dokud nebylo získáno dostatečné množství vzorků pro další zpracování. Nejvhodnější byly vzorky s obsahem 10-20 milionů buněk. Takto vypěstované buňky byly následně sklizeny a lyzovány, aby vznikl homogenní vzorek a uvolnil se všechny protein včetně námi sledovaného galektinu.

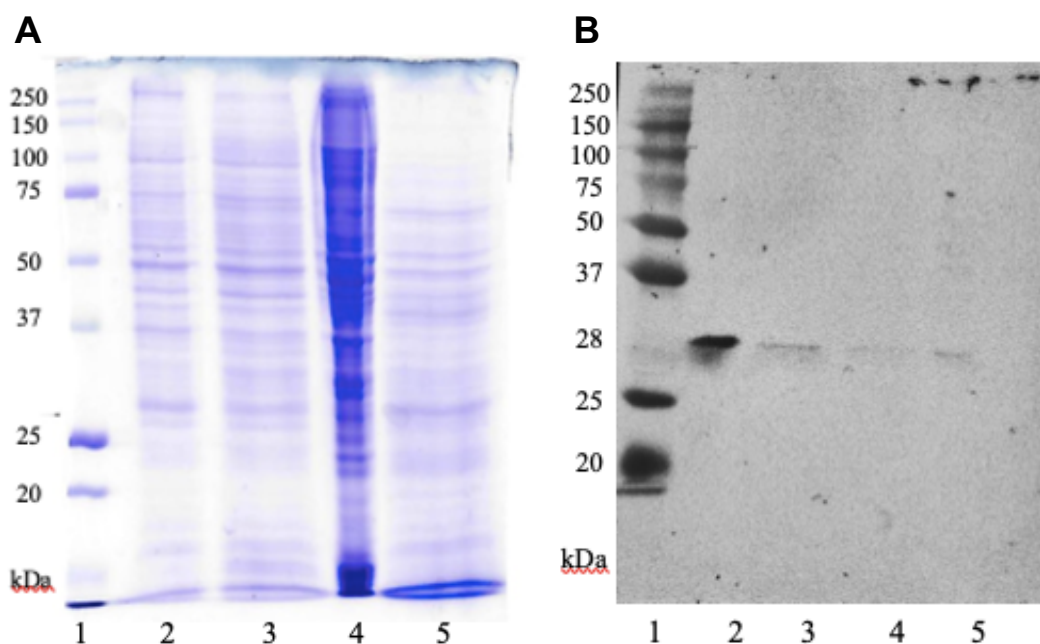
V lyzovaných roztocích byl změřen obsah proteinu metodou dle Bradforda. Jde o spektrofotometrické stanovení pomocí kalibrovaného činidla, kdy se pro každý vzorek změřily roztoky o různé koncentraci a z nich byla následně spočítána koncentrace proteinu porovnáním s kalibrační křivkou. Měření bylo provedeno, aby byly nanášeny vzorky se srovnatelným obsahem proteinu a bylo tedy možno orientačně srovnat, v jaké buněčné linii je galektin více zastoupen.

### 5.1.1 Ověření účinnosti lýze

Pro linie SW620, DLD-1 a MCF byla ověřena účinnost lýze pomocí barvení Coomassie blue. U linie A549 nebylo barvení Coomassie blue provedeno z důvodu malého množství vzorku.

Na obarveném SDS-PAGE gelu je dobře patrné mnoho buněčných proteinů (viz obrázek 20-A) a získaný gel odpovídá tomu, jak by měl celobuněčný lyzát vypadat dle literatury (Hong 2016). Lýze neiontovým detergentním činidlem, a následná separace byla tedy zvolena pro další detekci jednotlivých galektinů. Naproti tomu buňky, které byly lyzovány přímo ve vzorkovacím pufru – SW620 SDS (A – linie č.4) – tvořily na gelu šmouhu a tento způsob lýze tedy nebyl používán. Lýze ve vzorkovacím pufru probíhá pomocí iontového detergentního činidla SDS, které je velmi silné a může poškodit strukturu bílkovin.

Připravené lyzáty byly dále zpracovány metodou Western blot, aby bylo zjištěno, zda jsou vhodné pro vlastní detekci galektinů. Byla provedena chemiluminiscenční detekce Gal-3 (viz obr. 20-B). Jak je patrné z obrázku, v lyzátech všech linií je Gal-3 detekovatelný. Tím bylo potvrzeno, že lýze mírnějším neiontovým detergentním činidlem je pro záměry práce vhodná a byla dále používána.



**Obrázek 20** Gel SDS-PAGE obarvený Coomassie blue se všemi proteiny (A) a Gal-3 (B) vizualizovaný chemiluminiscenčně. (A) 1- Marker; 2- linie DLD-2; 3- linie SW620; 4- linie SW620 lyzovaná ve vzorkovacím pufru; 5- linie MCF7 (B) 1- Marker; 2- Gal-3 v linii DLD-1, dvojnásobná koncentrace proteinů; 3- Gal-3 v linii DLD-1; 4- Gal-3 v linii SW620; 5- Gal-3 v linii MCF7 (vlastní zdroj).

## 5.2 Analýza galektinů v lyzátech buněk nádorových linií

Zpracované vzorky buněčných linií byly před nanesením do jamek denaturovány vzorkovým pufrům a následně byly elektroforeticky rozděleny na základě velikosti a částečně tvaru molekul. Získaný gel SDS-PAGE byl dále použit pro Western blot.

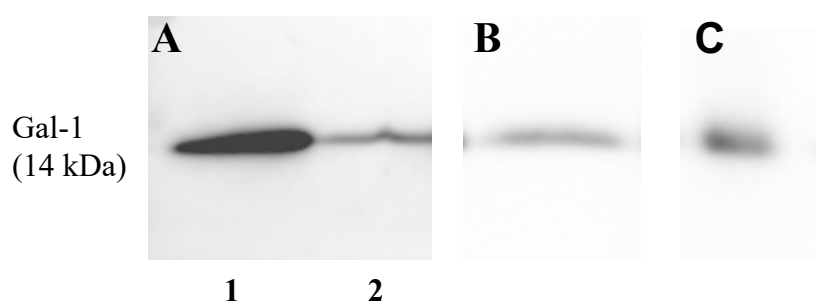
Během Western blotu byly proteiny separované na gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Ta byla následně nastříhána na požadované části pro jednotlivé galektiny, které byly použity k vlastní imunodetekci specifickými protilátkami.

Pro imunodetekci byl použit systém primární a sekundární protilátky. Primární králičí protilátka označila požadovaný galektin; u Gal-1, -3 a -8 se jednalo o monoklonální protilátky. Pro Gal-4 a -9 byly králičí primární protilátky

polyklonální. Jako sekundární protilátka byla použita kozí polyklonální protilátka, která byla totožná proti všem použitým primárním králičím protilátkám – Goat anti-Rabbit IgG (H + L), HRP (31460). Sekundární protilátka byla enzymaticky značena (konjugována s křenovou peroxidázou, *horseradish peroxidase* (HRP)) a po přidání substrátu mohlo dojít k chemiluminiscenci a následné detekci vzniklých fotonů kamerou.

### 5.2.1 Galektin-1

Gal-1 (14 kDa) byl imunochemicky detekován ve všech analyzovaných nádorových buněčných liniích (linie MCF7, DLD-1, S620 a A549), viz obrázek 21. U linie MCF-7 byl pravděpodobně drobný problém se strukturní homogenitou gelu, který způsobil, že proužek Gal-1 je užší než u ostatních linií.

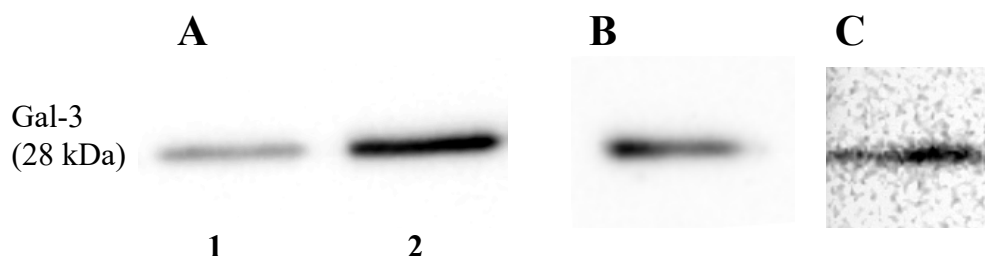


**Obrázek 21 – Imunodetekce Gal-1.** Gal-1 byl prokázán ve všech analyzovaných liniích pomocí králičí monoklonální protilátky (*Galectin-1/LGALS1 (D608T) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, USA)*). (A) 1- linie SW620; 2- linie DLD-1; (B) linie A549; (C) linie MCF7 (vlastní zdroj).

### 5.2.2 Galektin-3

Gal-3 (28 kDa) byl imunochemicky prokázán ve všech analyzovaných buněčných liniích (linie MCF7, DLD-1, S620 a A549, viz obr. 22). U linií SW620 a DLD-1 byly nanесeny vzorky o identickém obsahu 20  $\mu$ g proteinu a mohlo být následně provedeno i denzitometrické porovnání (viz Kapitola 5.4). U linie MCF7 musela být nastavena delší expozice, aby bylo možné Gal-3 detekovat, a je zde tedy patrný šum pozadí. Kvůli slabému signálu byl prodloužen detekční

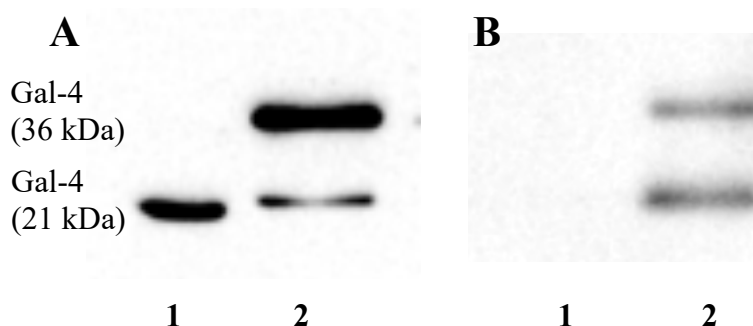
čas na tři minuty a během dlouhého časového úseku dochází kromě zesílení požadovaného signálu také k zesílení nespécifického signálu pozadí, který se poté projeví jako šum. Získané snímky gelů jsou na obrázku 22.



**Obrázek 22 – Imunodetekce Gal-3.** Gal-3 byl prokázán ve všech analyzovaných liniích pomocí králičí monoklonální protilátky (Galectin-3/LGALS3 (D4I2R) XP® Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, USA)); (A) 1- linie DLD-1; 2- linie SW620; (B) linie A549; (C) linie MCF7 (vlastní zdroj).

### 5.2.3 Galektin-4

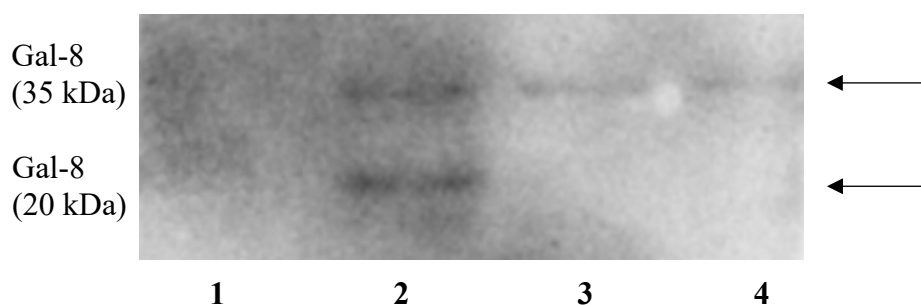
Na rozdíl od Gal-1 a Gal-3 nebyla přítomnost Gal-4 (tandemový 36kDa, monomerní 21 kDa) potvrzena ve všech čtyřech studovaných buněčných liniích. Imunodetekcí se ho podařilo prokázat v liniích DLD-1, SW620 a A549, zatímco u linie MCF7 nebyl detekován (obrázek 23). Je patrné, že v linii SW620 a A549 se Gal-4 vyskytoval v monomerní formě i v dimerní formě. Nativně se Gal-4 vyskytuje v tandemové formě (36 kDa). Výskyt monomerů byl pravděpodobně způsoben přípravou vzorku v redukujícím prostředí, což mělo za následek odštěpení jedné CRD (~15 kDa).



**Obrázek 23 – Imunodetekce Gal-4.** Gal-4 byl prokázán v liniích DLD-1, SW620 a A549 pomocí králičí polyklonální protilátky (Galectin 4 Antibody (PA5-95353) (ThermoFisher Scientific, USA)) (A) 1- linie DLD-1; 2- SW620; (B) 1- linie MCF7; 2- linie A549. (vlastní zdroj).

#### 5.2.4 Galektin-8

Proužek odpovídající velikostí Gal-8 (tandem 35 kDa, monomer 20 kDa) byl imunochemicky zjišťován ve všech sledovaných buněčných liniích, ale prokázán byl pouze u linií DLD-1, SW-620 a A549, obrázek 24. V tomto případě není zobrazení příliš kvalitní. Během detekce byl používán euroobal, aby membrána nevyschla, ale po jeho otevření a opětovném uzavření došlo ke snížení chemiluminiscence z důvodu posunu substrátu uvnitř fólie, a tím pádem se při detekci signálu projevil více šum/nespecifický signál pozadí. Při dalších detekcích byl šum odstraněn eliminací manipulace s fólií. V těchto liniích byl Gal-8 detekován v bivalentní formě, u DLD-1 bylo patrné, že se zde Gal-8 vyskytuje i v monomerní formě. Z důvodu horší kvality zobrazení a vzniklého šumu se u linie MCF7 Gal-8 prokázat nepodařilo, proužek byl pravděpodobně zamaskován. Gal-8 se nativně vyskytuje v tandemové formě (35 kDa), v redukujícím prostředí pravděpodobně došlo k odštěpení jedné CRD (~15 kDa) a vzniku monomeru Gal-8 (20 kDa).



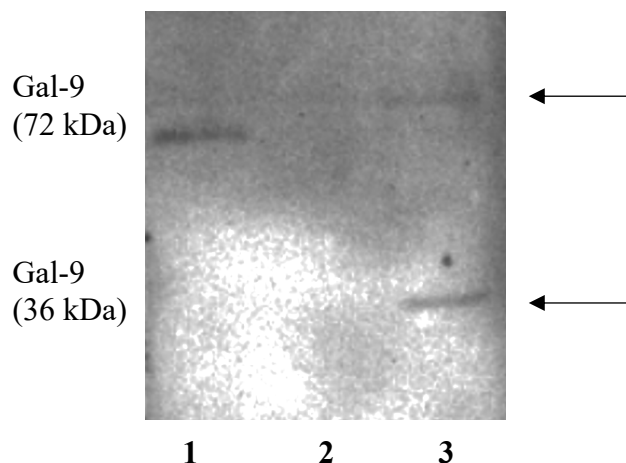
**Obrázek 24 – Imunodetekce Gal-8.** Gal-8 byl prokázán v liniích DLD-1, SW620 a A549 pomocí králičí monoklonální protilátky (*Galectin-8 Antibody* (JB85-35) (Novus Biologicals, USA)) 1- linie MCF7; 2- linie DLD-1; 3- linie SW620; 4- linie A549 (vlastní zdroj).

#### 5.2.5 Galektin-9

Proužek odpovídající velikostí Gal-9 (tandemový 36kDa, bivalentní 72 kDa) byl imunochemicky zjišťován v liniích SW620, DLD-1 a A549. Prokázán byl v liniích DLD-1 a A549. V linii SW620 se ho prokázat nepodařilo, obrázek 25.



Stejně jako u Gal-8 zde bohužel vznikl vlivem euroobalu světelný šum, který komplikoval vizualizaci. Gal-9 se nativně vyskytuje v tandemové formě (36 kDa), ale může tvořit i bivalent tandemu (72 kDa). U linie A549 byl pravděpodobně drobný strukturní problém v gelu, který způsobil, že proužek bivalentní formy Gal-9 je o něco výše než u linie DLD-1.



**Obrázek 25 – Imunodetekce Gal-9.** Gal-9 byl detekován pomocí králičí polyklonální protilátky (Galectin 9 Antibody (PA5-50966) (ThermoFisher Scientific, USA)) 1- linie DLD-1; 2- linie SW620; 3- linie A549 (vlastní zdroj).

### 5.3 Souhrn výsledků

Ve všech nádorových buněčných liniích (linie MCF7, SW620, DLD-1 a A549) epiteliálního původu se podařilo prokázat několik galektinů. Byla zjišťována přítomnost Gal-1, -3, -4, -8, a -9.

Gal-1 (14 kDa) je prototypický a jeho přítomnost byla imunochemicky zjišťována u všech buněčných nádorových linií. Také chimerický Gal-3 (28 kDa) byl imunochemicky zjišťován u všech buněčných nádorových linií. Oba Gal-1 i -3 se ve všech liniích podařilo prokázat. Ve všech buněčných liniích byl imunochemicky zjišťován také tandemový Gal-4 (tandemový 36 kDa, monomerní 21 kDa), ten byl následně prokázán v liniích SW620, DLD-1 a A549, v linii MCF7 se ho prokázat nepodařilo. Přítomnost tandemového Gal-8 (tandemový 35 kDa, monomerní 20 kDa) byla také imunochemicky zjišťována ve

všech buněčných liniích, ale nebyl prokázán v linii MCF7; proužek odpovídající Gal-8 byl pravděpodobně pouze zamaskován zhoršenou kvalitou zobrazení. Gal-8 byl tedy prokázán v liniích SW620, DLD-1 a A549. Pro tandemový Gal-9 (tandemový 36kDa, bivalentní 72 kDa) proběhla imunochemická analýza v liniích SW620, DLD-1 a A549; pro linii MCF7 nebyla jeho přítomnost z časových důvodů zjišťována. Prokázat Gal-9 se podařilo pro linii DLD-1 a A549.

V tabulce 2 je shrnuto, jaké galektiny byly studovány, u kterých buněčných linií a jaké se podařilo prokázat. Zeleně jsou označeny galektiny, které se podařilo imunochemicky prokázat, oranžově jsou označeny galektiny, které imunodetekcí prokázány nebyly a v jednom případě (označen šedě) nebyla analýza z časových důvodů provedena.

*Tabulka 2 – Galektiny detekované u jednotlivých buněčných linií.*

	MCF7	SW620	DLD-1	A549
Galektin-1	prokázán	prokázán	prokázán	prokázán
Galektin-3	prokázán	prokázán	prokázán	prokázán
Galektin-4	neprokázán	prokázán	prokázán	prokázán
Galektin-8	neprokázán	prokázán	prokázán	prokázán
Galektin-9	nezjišťován	neprokázán	prokázán	prokázán

## 5.4 Denzitometrické porovnání

Denzitometrické porovnání obsahu galektinů bylo provedeno pro Gal-3 u linií SW620 a DLD-1, kde byly oba vzorky lyzáty byly nanášeny na stejný gel a obsahovaly přesně stejné množství proteinu, 20 µg. U ostatních vzorků nebylo možné porovnání provést, protože buď nebyla dostatečná kvalita získaných snímků nebo nebylo možno provést detekci chemiluminiscenční reakce se stejnou časovou expozicí.

Snímek imunoblotu byl vložen do programu na denzitometrické zpracování – ImageJ. Po označení oblastí proužků jednotlivých linií byly generovány křivky znázorňující intenzitu barvy proti pozadí. Denzitometrické profily měly různě velkou výšku a plochu, podle množství obsaženého galektinu.

Porovnáním získaných hodnot, tabulka 3, bylo zjištěno, že Gal-3 je v linii DLD-1 obsaženo přibližně 4krát více než v linii SW620.

*Tabulka 3 – Denzitometrické porovnání obsahu Gal-3 v buněčných liniích SW620 a DLD-1.*

Buněčná linie	Velikost plochy denzitometrického profilu [pixely]	Poměry ploch
SW620	3 825,882	1,0
DLD-1	15 846,187	4,14

## 6 DISKUZE

Galektiny jsou proteiny, které se vyskytují ve velkém množství organismů včetně člověka. Zastávají mnoho fyziologických funkcí, které se liší dle orgánové specifity i buněčné kompartmentalizace. Mezi jejich funkce patří zprostředkování rozpoznávání a efektorových funkcí vrozené imunity, mezibuněčných interakcí nebo podpora sestřihu pre-mRNA (Sedlář 2021; Vasta 2012).

Kromě těchto fyziologických funkcí se některé galektiny podílí i na patologických procesech, zejména během rozvoje nádorových onemocnění. Mechanismů, kterými galektiny ovlivňují rozvoj onemocnění, je celá řada a mezi nejdůležitější patří adheze rakovinných buněk k endotelu cév a tvorba metastáz. Některé galektiny však mohou rozvoj rakovinného bujení v závislosti na své koncentraci a lokalizaci i potlačovat (John 2016; Zick 2022). Celá tato problematika je velice komplexní a zčásti neprozkoumaná. Proto jsou jakékoliv experimentální údaje v tomto směru výzkumu přínosem pro současné vědění.

Detekce Gal-1, -3, -4, -8 a -9 ve vybraných buněčných nádorových liniích byla prováděna za účelem zjištění jejich výskytu v těchto liniích a posouzení jejich případné role v těchto buňkách a jejich případného vlivu na rozvoj nádorového onemocnění. Tyto poznatky by mohly být v budoucnu použity pro cílenou terapii nebo pro diagnostické účely (Labrie 2017; Sundblad 2013).

V této práci byla použita metoda Western blot s imunochemickou detekcí. Tato metoda je poměrně časově náročná, protože během imunodetekce jsou dlouhé inkubační doby. Metodou Western blot lze zpracovat menší panel vzorků, ale je méně náročná na laboratorní vybavení. Metoda qPCR, při které dochází k izolaci, purifikaci a následné amplifikaci specifického úseku DNA vzorku, má naopak výhodu v použití menšího množství primárního templátu a je kvantitativní, takže rovnou zjistíme množství obsaženého galektinu. Metoda Western blot je pouze semikvantitativní a musí být spojena s další metodou, např. denzitometrie, aby bylo možné obsah galektinu stanovit (Edvardsson

2016). Pomocí metody Western blot ani qPCR nezjistíme, zda mají přítomné galektiny zachovanou lektinovou aktivitu a jsou tedy funkční. Pro toto zjištění může být použita metoda ELISA se sacharidovými ligandy (Wolfenden 2015). Další metodou, která může být použita pro detekci galektinů a dokáže rozlišit živé a mrtvé buňky dle porovnání bočního a přímého rozptylu je průtoková cytometrie. Při ní jsou buňky roztríděny na základě fluorescenční značky, obvykle protilátky, kterou je označen studovaný protein (Bi 2008). Mezi běžně používané metody pro detekci galektinů patří také protilátková ELISA (Perugino 2019). Pomocí ní lze stanovit přítomnost galektinu, a podobně jako u Western blotu lze poté denzitometricky stanovit jeho obsah.

U buněčné linie karcinomu prsu MCF7 byl prokázán pouze Gal-1 a -3. Tento výsledek je ve shodě s dřívějšími výzkumy (Geiger 2016; Lin 2015), které výskyt těchto galektinů v linii MCF7 potvrzují. Gal-1 byl dříve prokázán pomocí metody ELISA s protilátkami a Gal-3 byl prokázán metodou Western blot. Gal-1 i -3 byly v této práci v této linii prokázány. Oba tyto galektiny zvyšují adhezivitu rakovinných buněk k buňkám endotelu cév. V jiném výzkumu se podařilo v této linii prokázat i Gal-8 metodou Western blot, Gal-4 ale prokázán nebyl. Neprokázání Gal-8 mohlo být způsobeno nevhodnou manipulací s euroobalem během detekce. Tím vznikl světelný šum, který pravděpodobně proužek odpovídající Gal-8 v tomto vzorku pouze zamaskoval (Satelli 2008).

V buněčné linii kolorektálního karcinomu SW620 byly prokázány Gal-1, -3, -4 i -8. Byly tak potvrzeny informace z literatury, kdy byly tyto galektiny již dříve prokázány pomocí metod Western blot a qPCR, kdy však nebyly porovnávány hladiny exprimovaných galektinů (Lahm 2001). Gal-1 vyvolává apoptózu T lymfocytů a podpor tvorby metastáz. Gal-3 se prokazatelně účastní posttranskripčních úprav pre-mRNA a zvyšuje invazivitu buněk SW620. Vliv Gal-4 není u této linie zcela objasněn a Gal-8 ovlivňuje adhezi buněk k endotelu plicních cév (Lu 2017; Reham 2010; Zhang 2020)

Buněčná linie kolorektálního karcinomu DLD-1 obsahovala dle získaných výsledků všechny galektiny. Všechny kromě Gal-4 už byly také dříve popsány metodou Western blot a qPCR v jiných studiích společně se svým mechanismem účinku (Lahm 2001). Gal-3 usnadňuje buněčnou migraci buněk DLD-1. Gal-9 má naopak cytotoxický účinek na buňky kolorektálního karcinomu DLD-1 a při rozvoji rakovinného bujení je tvorba Gal-9 snížena, malé množství Gal-9 však přesto v buňkách přetrvává (Bacigalupo 2017; Weinmann 2018; Wiersma 2015; Wu 2018).

Denzitometricky bylo zjištěno, že linie DLD-1 obsahuje přibližně 4krát více Gal-3 než linie SW620. Toto zjištění je v souladu s literaturou, protože v linii DLD-1 je méně exprimována mikroRNA-451, která reguluje expresi genů pro Gal-3. Čím více je mikroRNA-451 exprimována, tím méně se Gal-3 tvoří a naopak (Li 2018).

Poslední buněčná linie plicního karcinomu A549 dle získaných výsledků také obsahovala všechny galektiny. Stejně jako u DLD-1 byly pro linii A549 popsány všechny zkoumané galektiny kromě Gal-4 pomocí imunohistochemické a imunoprecipitační metody a metodou Western blot. Gal-1 zvyšuje rezistenci buněk proti chemoterapii a podněcuje zánětlivou reakci Th2, která dále podporuje rozvoj nádoru. Gal-3 podporuje tvorbu nádorových kmenových buněk. Gal-8 poskytuje integrinem zprostředkovanou signalizaci a usnadňuje následnou migraci rakovinných buněk. Gal-9 indukuje buněčnou smrt zprostředkovanou T lymfocyty a buňky A549 ho tedy produkují jen ve sníženém množství. (Chung 2015; Dalotto-Moreno 2013; Meinohl 2020; Yang 2021; Zhang 2016).

Porovnáním těchto informací můžeme usuzovat, že vliv na prognózu rozvoje nádorového onemocnění má, jaký galektin daná nádorová buněčná linie exprimuje. Pokud se jedná o Gal-1, -3, -4 nebo -8, je prognóza horší, jelikož tyto galektiny podporují rozvoj nádorového onemocnění. Oproti tomu výskyt Gal-9

prognózu zlepšuje, protože Gal-9 má primárně protinádorové vlastnosti, jeho hladina se však často během nádorových onemocnění snižuje, a nemůže se tak plně účastnit obrany organismu. Další možností využití galektinů je stanovení jejich sérové hladiny, které by mohlo být v budoucnu využito pro časnou diagnózu.

## 7 ZÁVĚR

V této práci byly charakterizovány vybrané nádorové buněčné linie MCF7, SW620, DLD-1 a A549, z hlediska výskytu pěti galektinů – Gal-1, -3, -4, -8 a -9.

Bylo zjištěno, že linie MCF7 obsahuje Gal-1 a -3. U linie SW620 byl prokázán Gal-1, -3, -4 a -8. A v liniích DLD-1 a A549 byly zastoupeny všechny zkoumané galektiny-1, -3, -4, -8 i -9.

Výskyt Gal-1 a -3 u všech linií byl ve shodě s literaturou. Výskyt Gal-9 také odpovídal literatuře, nebyl potvrzen pouze v linii MCF7, protože z časových důvodů nebyla analýza provedena. Navíc se podařilo prokázat Gal-4 v liniích DLD-1 a A549, kterému se v těchto liniích zatím výzkum nevěnoval. V linii MCF7 se naopak nepodařilo prokázat Gal-8, který tato linie dle literatury exprimuje. Bylo prokázáno, že v buněčných liniích se vyskytovaly galektiny, které mohly být dle vlastností těchto karcinomů očekávány a předpokládány na základě mechanismu, jakým se tato onemocnění vyvíjejí v těle.

Z výsledků této práce může být usuzováno, že prognózu kancerogeneze negativně ovlivňuje výskyt Gal-1, -3, -4 a -8. Naopak Gal-9 působí jako regulátor rozvoje onemocnění a prognózu zlepšuje.

Na závěr je důležité zmínit, že ač jsou galektiny a jejich vliv na onemocnění zkoumány velmi podrobně a již mnoho let, stále nebyly všechny souvislosti zcela objasněny. Samotná kapitola jejich možného využití v terapii se teprve otevírá a nabízí mnoho možností.



## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AML – Akutní myeloidní leukémie

CBS – Vazebné místo sacharidu (*carbohydrate binding site*)

CML – Chronická myeloidní leukémie

CRD – Doména rozpoznávající sacharidy (*carbohydrate recognition domain*)

CTD – C-terminální oblast (*C-terminal domain*)

ECM – Extracelulární matrix (*extracellular matrix*)

EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Gal-1, -3, -4, -8, -9 – Galektin-1, -3, -4, -8, -9

LacNAc – *N*-acetylaktosamin

NTD – N-terminální oblast (*N-terminal domain*)

PAGE – Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

PBS – Fosfátový pufr se solankou (*phosphate buffered saline*)

SDS – Dodecylsírán sodný (*sodium dodecyl sulphate*)

SDS-PAGE – Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíránu sodného

TBS – Fyziologický roztok pufrovaný Tris (*Tris-buffered saline*)

Th1 – Pomocné lymfocyty Th1 (*T helper cells subtype 1*)

Th2 – Pomocné lymfocyty Th2 (*T helper cells subtype 2*)

Tris - Tris(hydroxymethyl)aminomethan

VEGF – Vaskulární endoteliální růstový faktor (*vascular endothelial growth factor*)

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AANHANE, Ed, Iris A. SCHULKENS, Roy HEUSSCHEN, Kitty CASTRICUM, Hakon LEFFLER, Arjan W. GRIFFIOEN a Victor L. THIJSSSEN. Different angioregulatory activity of monovalent galectin-9 isoforms. *Angiogenesis* [online]. 2018, **21**(3), 545-555. ISSN 0969-6970. Dostupné z: doi:10.1007/s10456-018-9607-8
2. AARBIOU, Jamil, Marloes ERTMANN, Sandra VAN WETERING, Peter VAN NOORT, Denise ROOK, Klaus F. RABE a Sergey V. LITVINOV. Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *Journal of Leucocyte Biology* [online]. 2002, 2002, **72**(1), 167-174. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.72.1.167
3. ARTHUR, Connie M., Marcelo Dias BARUFFI, Richard D. CUMMINGS a Sean R. STOWELL. Evolving Mechanistic Insights into Galectin Functions. STOWELL, Sean R. a Richard D. CUMMINGS, ed. *Galectins* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, 2015-8-25, s. 1-35. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-1395-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-1396-1\_1
4. ARUN, Raj Pranap, Divya SIVANESAN, Prasanna VIDYASEKAR a Rama Shanker VERMA. PTEN/FOXO3/AKT pathway regulates cell death and mediates morphogenetic differentiation of Colorectal Cancer Cells under Simulated Microgravity. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-06416-4
5. BACIGALUPO, María L, Pablo CARABIAS a María F TRONCOSO. Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2017, **23**(29). ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v23.i29.5266
6. BARTOLAZZI, Armando. Galectins in Cancer and Translational Medicine: From Bench to Bedside. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(10). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19102934
7. BELO, Ana I., Astrid M. VAN DER SAR, Boris TEFSSEN, Irma VAN DIE a Roger CHAMMAS. Galectin-4 Reduces Migration and Metastasis Formation of Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(6). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0065957

8. BI, Shuguang, Lesley A. EARL, Linsey JACOBS a Linda G. BAUM. Structural Features of Galectin-9 and Galectin-1 That Determine Distinct T Cell Death Pathways. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, **283**(18), 12248-12258. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M800523200
9. BOJAROVÁ, P. a V. KŘEN. Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives. *Biomaterials Science*. 2016, **4**(8), 1142-1160. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C6BM00088F
10. BRINCHMANN, Monica Fengsrud, Deepti Manjari PATEL a Martin Haugmo IVERSEN. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators of Inflammation* [online]. 2018, **2018**, 1-11. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2018/9186940
11. CAMBY, Isabelle, Marie LE MERCIER, Florence LEFRANC a Robert KISS. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* [online]. 2006, **16**(11), 137R-157R. ISSN 1460-2423. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwl025
12. CAO, Zhan-Qi a Xiu-Li GUO. The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein & Cell* [online]. 2016, **7**(5), 314-324. ISSN 1674-800X. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-016-0262-9
13. CATTANEO, Valentina, María Virginia TRIBULATTI, Julieta CARABELLI, Agostina CARESTIA, Mirta SCHATTNER a Oscar CAMPETELLA. Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology* [online]. 2014, **24**(10), 966-973. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwu060
14. CHABOT, S., Y. KASHIO, M. SEKI, et al. Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology* [online]. 2002, **12**(2), 111-118. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/12.2.111
15. CHUNG, Ling-Yen, Shye-Jye TANG, Yi-Ching WU, Guang-Huan SUN, Huan-Yun LIU a Kuang-Hui SUN. Galectin-3 augments tumor initiating property and tumorigenicity of lung cancer through interaction with  $\beta$ -catenin. *Oncotarget* [online]. 2015, **6**(7), 4936-4952. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.3210
16. COUSIN, Jonathan a Mary CLONINGER. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of

- Galectin-1. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(9). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17091566
17. CUMMINGS, Richard D., Fu-Tong LIU a Gerardo R. VASTA. Essentials of Glycobiology. *Essentials of Glycobiology* [online]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017, kapitola 36. Dostupné z: doi: 10.1101/glycobiology.3e.036
  18. DALOTTO-MORENO, Tomás, Diego O. CROCI, Juan P. CERLIANI, et al. Targeting Galectin-1 Overcomes Breast Cancer-Associated Immunosuppression and Prevents Metastatic Disease. *Cancer Research* [online]. 2013, **73**(3), 1107-1117. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2418
  19. DAM, T. K. a C. F. BREWER. *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology*. Volume 3. 2007. New York: Albert Einstein College of Medicine, 2007, str. 419. ISBN 9780444519672. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044451967-2/00058-1
  20. DONG, Rui, Min ZHANG, Qunying HU, Shan ZHENG, Andrew SOH, Yijie ZHENG a Hui YUAN. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine* [online]. 2017. ISSN 1107-3756. Dostupné z: doi:10.3892/ijmm.2017.3311
  21. ECACC General Cell Collection: MCF7. *UK Health Security Agency: Culture Collections* [online]. Salisbury, UK, 2020. Dostupné z: <https://www.culturecollections.org.uk/media/130237/mcf7-cell-line-profile.pdf>
  22. EDVARDSSON, Maria. *A Comparative Study of qPCR, Western Blot and Mass Spectrometry for the Estimation of Protein Concentrations*. Stockholm, 2016. Dostupné také z: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1038984/FULLTEXT01.pdf>. Master's thesis. KTH ROYAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY. Vedoucí práce Torbjörn Gräslund.
  23. FILIPOVÁ, Marcela, Pavla BOJAROVÁ, Marina RODRIGUES TAVARES, et al. Glycopolymers for Efficient Inhibition of Galectin-3: In Vitro Proof of Efficacy Using Suppression of T Lymphocyte Apoptosis and Tumor Cell Migration. *Biomacromolecules* [online]. 2020, **21**(8), 3122-3133. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.0c00515

24. FLORES-IBARRA, Andrea, Sabine VÉRTESY, Francisco J. MEDRANO, Hans-Joachim GABIUS a Antonio ROMERO. Crystallization of a human galectin-3 variant with two ordered segments in the shortened N-terminal tail. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-28235-x
25. FUNASAKA, T., A. RAZ a P. NANGIA-MAKKER. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology* [online]. 2014, **24**(10), 886-891. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwu086
26. GEIGER, Pamina, Barbara MAYER, Irmi WIEST, Sandra SCHULZE, Udo JESCHKE a Tobias WEISSENBACHER. Binding of galectin-1 to breast cancer cells MCF7 induces apoptosis and inhibition of proliferation in vitro in a 2D- and 3D- cell culture model. *BMC Cancer* [online]. 2016, **16**(1). ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/s12885-016-2915-8
27. GIROTTI, María Romina, Mariana SALATINO, Tomás DALOTTO-MORENO a Gabriel A. RABINOVICH. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *Journal of Experimental Medicine* [online]. 2020, **217**(2). ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20182041
28. GUO, Yanan, Rong SHEN, Linghui YU, Xin ZHENG, Rong CUI, Yanfeng SONG a Degui WANG. Roles of galectin-3 in the tumor microenvironment and tumor metabolism (Review). *Oncology Reports* [online]. 2020 [cit. 2022-04-14]. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:10.3892/or.2020.7777
29. HONG, Xin, Yuling MENG a Steven N. KALKANIS. Serum proteins are extracted along with monolayer cells in plasticware and interfere with protein analysis. *Journal of Biological Methods* [online]. 2016, **3**(4). ISSN 2326-9901. Dostupné z: doi:10.14440/jbm.2016.129
30. JI, ZHE, QINGJIU TANG, JINSONG ZHANG, YAN YANG, YANFANG LIU a YINGJIE PAN. Oridonin-induced apoptosis in SW620 human colorectal adenocarcinoma cells. *Oncology Letters* [online]. 2011, **2**(6), 1303-1307. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2011.408
31. JOHANNES, Ludger, Ralf JACOB a Hakon LEFFLER. Galectins at a glance. *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists, 2018, **131**(9). ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.208884

32. JOHN, Sebastian a Rashmi MISHRA. Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. *Journal of Biosciences* [online]. 2016, **41**(3), 507-534. ISSN 0250-5991. Dostupné z: doi:10.1007/s12038-016-9616-y
33. LAAF, Dominic, Pavla BOJAROVÁ, Lothar ELLING a Vladimír KŘEN. Galectin–Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2018, **37**(4), 402-415. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2018.10.001
34. LABRIE, Marilyne, Lorena Oliveira Fernandes DE ARAUJO, Laudine COMMUNAL, Anne-Marie MES-MASSON a Yves ST-PIERRE. Tissue and plasma levels of galectins in patients with high grade serous ovarian carcinoma as new predictive biomarkers. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-13802-5
35. LAHM, Harald, Sabine ANDRÉ, Andreas HOEFLICH, Jürgen R. FISCHER, Bernard SORDAT, Herbert KALTNER, Eckhard WOLF a Hans-Joachim GABIUS. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 2001, **127**(6), 375-386. ISSN 0171-5216. Dostupné z: doi:10.1007/s004320000207
36. LI, Ling, Ran GAO, Yue YU, et al. Tumor suppressor activity of miR-451: Identification of CARF as a new target. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-18559-5
37. LIN, Tzu-Wen, Hui-Tzu CHANG, Chein-Hung CHEN, Chung-Hsuan CHEN, Sheng-Wei LIN, Tsui-Ling HSU a Chi-Huey WONG. Galectin-3 Binding Protein and Galectin-1 Interaction in Breast Cancer Cell Aggregation and Metastasis. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2015, **137**(30), 9685-9693. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.5b04744
38. LU, Weiqun, Jia WANG, Guohua YANG, et al. Posttranscriptional regulation of Galectin-3 by miR-128 contributes to colorectal cancer progression. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(9), 15242-15251. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.14839
39. MAAMER-AZZABI, A, O NDOZANGUE-TOURIGUINE a J BRÉARD. Metastatic SW620 colon cancer cells are primed for death when detached and can be sensitized to anoikis by the BH3-mimetic ABT-737. *Cell Death*

- & Disease* [online]. 2013, **4**(9), e801-e801. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2013.328
40. MANDIKA, Chetry, Thapa SAROJ, Xiaoli HU, Yizuo SONG, Jianan ZHANG, Haiyan ZHU a Xueqiong ZHU. The Role of Galectins in Tumor Progression, Treatment and Prognosis of Gynecological Cancers. *Journal of Cancer* [online]. 2018, **9**(24), 4742-4755. ISSN 1837-9664. Dostupné z: doi:10.7150/jca.23628
41. MEINOHL, Christopher, Sarah J. BARNARD, Karin FRITZ-WOLF, et al. Galectin-8 binds to the Farnesylated C-terminus of K-Ras4B and Modifies Ras/ERK Signaling and Migration in Pancreatic and Lung Carcinoma Cells. *Cancers* [online]. 2020, **12**(1). ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12010030
42. MODENUTTI, Carlos P., Juan I. Blanco CAPURRO, Santiago DI LELLA a Marcelo A. MARTÍ. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2019, 2019, **7**. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00823
43. PERUGINO, Cory A., Sultan B. ALSALEM, Hamid MATTOO, et al. Identification of galectin-3 as an autoantigen in patients with IgG4-related disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2019, **143**(2), 736-745.e6. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2018.05.011
44. PRATO, Cecilia Arahí, Julieta CARABELLI, Oscar CAMPETELLA a María Virginia TRIBULATTI. Galectin-8 Enhances T cell Response by Promotion of Antigen Internalization and Processing. *IScience* [online]. 2020, **23**(7). ISSN 25890042. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2020.101278
45. REHAM, Helwa. *Functional studies on the galectin-4 promoter and its use for establishing a transcription factors array assay*. Germany, 2010. Dissertation. Ruperto-Carola University of Heidelberg.
46. RUSTIGUEL, Joane K., Ricardo O. S. SOARES, Steve P. MEISBURGER, Katherine M. DAVIS, Kristina L. MALZBENDER, Nozomi ANDO, Marcelo DIAS-BARUFFI a Maria Cristina NONATO. Full-length model of the human galectin-4 and insights into dynamics of inter-domain communication. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep33633

47. SATELLI, Arun, Prema RAO a Prem GUPTA. *Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines* [online]. 68. 2008, 313 s. ISSN 1538-7445.
48. SEDLÁŘ, Antonín, Martina TRÁVNÍČKOVÁ, Pavla BOJAROVÁ, Miluše VLACHOVÁ, Kristýna SLÁMOVÁ, Vladimír KŘEN a Lucie BAČÁKOVÁ. Interaction between Galectin-3 and Integrins Mediates Cell-Matrix Adhesion in Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(10) [cit. 2022-04-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22105144
49. SUNDBLAD, Victoria, Veronique MATHIEU, Robert KISS a Gabriel A. RABINOVICH. Galectins. *Cancer Immunotherapy* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 537-563. ISBN 9780123942968. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394296-8.00031-2
50. SUNDBLAD, Victoria, Luciano G. MOROSI, Jorge R. GEFFNER a Gabriel A. RABINOVICH. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *The Journal of Immunology* [online]. 2017, **199**(11), 3721-3730. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1701172
51. TANAKA, Shoko, Wakako KOBAYASHI, Misako HARAGUCHI, Kiyohide ISHIIHATA, Norifumi NAKAMURA a Masayuki OZAWA. Snail1 expression in human colon cancer DLD-1 cells confers invasive properties without N-cadherin expression. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. 2016, **8**, 120-126. ISSN 24055808. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrep.2016.08.017
52. THURSTON, Teresa L. M., Michal P. WANDEL, Natalia VON MUHLINEN, Ágnes FOEGLEIN a Felix RANDOW. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* [online]. 2012, **482**(7385), 414-418. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature10744
53. TOWNSEND, Michelle, Michael ANDERSON, Evita WEAGEL, Edwin VELAZQUEZ, K. Scott WEBER, Richard ROBISON a Kim O'NEILL. Non-small-cell lung cancer cell lines A549 and NCI-H460 express hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase on the plasma membrane. *OncoTargets and Therapy* [online]. 2017, **10**, 1921-1932. ISSN 1178-6930. Dostupné z: doi:10.2147/OTT.S128416



54. TRONCOSO, M. F., F. FERRAGUT, M. L. BACIGALUPO, et al. Galectin-8: A matricellular lectin with key roles in angiogenesis. *Glycobiology* [online]. 2014, **24**(10), 907-914. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwu054
55. VASTA, Gerardo R. Galectins as Pattern Recognition Receptors: Structure, Function, and Evolution. LAMBRIS, John D. a George HAJISHENGALLIS, ed. *Current Topics in Innate Immunity II* [online]. New York, NY: Springer New York, 2012, 2012-9-23, s. 21-36. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-1-4614-0105-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-0106-3\_2
56. VASTA, Gerardo R. Lectins as Innate Immune Recognition Factors: Structural, Functional, and Evolutionary Aspects. *The Evolution of the Immune System* [online]. Elsevier, 2016, 2016, 205-224. ISBN 9780128019757. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801975-7.00008-6
57. WEINMANN, Daniela, Michael KENN, Sebastian SCHMIDT, et al. Galectin-8 induces functional disease markers in human osteoarthritis and cooperates with galectins-1 and -3. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2018, **75**(22), 4187-4205. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-018-2856-2
58. WIERSMA, Valerie R, Marco DE BRUYN, Yunwei WEI, et al. The epithelial polarity regulator LGALS9/galectin-9 induces fatal frustrated autophagy in KRAS mutant colon carcinoma that depends on elevated basal autophagic flux. *Autophagy* [online]. 2015, **11**(8), 1373-1388. ISSN 1554-8627. Dostupné z: doi:10.1080/15548627.2015.1063767
59. WOLFENDEN, Mark, Jonathan COUSIN, Pratima NANGIA-MAKKER, Avraham RAZ a Mary CLONINGER. Glycodendrimers and Modified ELISAs: Tools to Elucidate Multivalent Interactions of Galectins 1 and 3. *Molecules* [online]. 2015, **20**(4), 7059-7096. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules20047059
60. WU, K. L., Kuo, C. M., Huang, E. Y., Pan, H. M., Huang, C. C., Chen, Y. F., Hsiao, C. C., & Yang, K. D. Extracellular galectin-3 facilitates colon cancer cell migration and is related to the epidermal growth factor receptor. *American journal of translational research* [online]. 2018, **10**(8). ISSN 2402-2412.

61. YANG, Riyao, Linlin SUN, Ching-Fei LI, et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nature Communications* [online]. 2021, **12**(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-21099-2
62. YASINSKA, Inna M., Svetlana S. SAKHNEVYCH, Ludmila PAVLOVA, et al. The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.01594
63. ZHANG, Lei, Xuegang LIU, Zhen TANG, Xiaojun LI a Gengming WANG. Reversal of galectin-1 gene silencing on resistance to cisplatin in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2016, **83**, 265-270. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2016.06.030
64. ZHANG, Nan, Fu PENG, Yujia WANG, et al. Shikonin induces colorectal carcinoma cells apoptosis and autophagy by targeting galectin-1/JNK signaling axis. *International Journal of Biological Sciences* [online]. 2020, **16**(1), 147-161. ISSN 1449-2288. Dostupné z: doi:10.7150/ijbs.36955
65. ZHAO, Zihan, Xuejiao XU, Hairong CHENG, et al. Galectin-3 N-terminal tail prolines modulate cell activity and glycan-mediated oligomerization/ phase separation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2021, **118**(19). ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2021074118
66. ZICK, Yehiel. Galectin-8, cytokines, and the storm. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2022, **50**(1), 135-149. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/BST20200677

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Sekvence vybraných lidských galektinů.....	12
Obrázek 2 – Struktura dimerního galektinu-1.....	12
Obrázek 3 – Rozdělení galektinů dle kvarterní struktury .....	13
Obrázek 4 – Struktura Gal-1 .....	14
Obrázek 5 – Prostorové uspořádání galektinu-3.....	15
Obrázek 6 – Gal-4.....	16
Obrázek 7 – Schematické znázornění izoform galektinu-8.....	16
Obrázek 8 – Schematické znázornění tandemových izoform galektinu-9 ....	17
Obrázek 9 – Mechanismy, kterými galektiny ovlivňují rozvoj rakoviny .....	21
Obrázek 10 – Patologická angiogeneze indukovaná Gal-1.....	23
Obrázek 11 – Inkubační box .....	34
Obrázek 12 – Laminární box.....	35
Obrázek 13 – Schematické znázornění lýze buněk .....	35
Obrázek 14 – Homogenizované lyzáty a připravené zkumavky .....	36
Obrázek 15 – Příprava polyakrylamidového gelu.....	37
Obrázek 16 – Elektroforéza před ukončením.....	38
Obrázek 17 – Probíhající Western blot.....	39
Obrázek 18 – Denzitometrické porovnání .....	41
Obrázek 19 – Buněčné kultury. ....	43
Obrázek 20 – Gel SDS-PAGE obarvený Coomassie blue .....	45
Obrázek 21 – Imunodetekce Gal-1 .....	46
Obrázek 22 – Imunodetekce Gal-3 .....	47
Obrázek 23 – Imunodetekce Gal-4 .....	47
Obrázek 24 – Imunodetekce Gal-8 .....	48
Obrázek 25 – Imunodetekce Gal-9 .....	49

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Způsoby ovlivnění imunity galektinem-3.....	24
Tabulka 2 – Galektiny detekované u jednotlivých buněčných linií.....	50
Tabulka 3 – Denzitometrické porovnání obsahu Gal-3.....	51

