

**ČESKÉ VYSOKÉ  
UČENÍ TECHNICKÉ  
V PRAZE**

**FAKULTA  
BIOMEDICÍNSKÉHO  
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ  
PRÁCE**

**2019**

**LIESELOTTE  
SEDLÁKOVÁ**



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Biokompatibilní glykopolymery s aktivním cílením na galektiny**

**Biocompatible Glycopolymers Actively Targeted to Galectins**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

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

**Lieselotte Sedláková**

---

**Kladno, květen 2019**

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Sedláková** Jméno: **Lieselotte** Osobní číslo: **433959**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Biokompatibilní glykopolymery s aktivním cílením na galektiny**

Název bakalářské práce anglicky:

**Biocompatible Glycopolymers Actively Targeted to Galectins**

Pokyny pro vypracování:

Galektiny jsou živočišné lektiny, které se in vivo účastní zásadních procesů jako kancerogeneze, angiogeneze či fibróza a zapojují se i do řady metabolických poruch. Vzhledem ke zvýšenému výskytu při mnohých patogenních procesech jsou galektiny výbornou strukturou pro cílenou vazbu terapeutik nebo činidel pro zobrazovací metody. Zásadním požadavkem na glykokonjugáty s vazebným potenciálem ke galektinovým cílům je multivalentní vazba, biokompatibilita a stabilita in vivo. Tyto požadavky splňují N-(2-hydroxypropyl) metakrylamidové (HPMA) kopolymery. Cílem práce je příprava funkcionalizovaného disacharidového epitopu Gal 4GlcNAc pomocí komerční  $\beta$ -galaktosidasy z *Bacillus circulans* a stanovení jeho vazebné afinity ke galektinu-1 a galektinu-3 metodou ELISA. Teoretická část práce bude zaměřena na problematiku syntetických inhibitorů galektinu-1 a -3. V rámci praktické části práce bude optimalizován postup enzymové syntézy, funkcionalizovaný epitop bude izolován pomocí gelové chromatografie a bude změněna a porovnána afinita volného epitopu a epitopu po konjugaci na HPMA kopolymer (příprava glykopolymery není součástí práce). Teoretická část práce bude zaměřena na problematiku syntetických inhibitorů galektinu-1 a -3.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Laaf, D., Bojarová, P., Elling, L., Křen, V., Galectin-carbohydrate interactions in biomedicine and biotechnology, Trends Biotechnol, 2018, submitted.
- [2] Bojarová, P., Křen, V., Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives, Biomat. Sci, číslo 4(8), 2016, ISSN 1142-60
- [3] Koziolová, E., Goelb, S., Chytil, P., Janoušková, O., Barnhart, T. E., Cai, W., Etrych T., A tumor-targeted polymer theranostics platform for positron emission tomography and fluorescence imaging, Nanoscale, číslo 9(30), 2017, ISSN 10906 - 10918
- [4] Bojarová, P., Tavares, M. R., Laaf, D., Bumba, L., Petrásková, L., Konefal, R., Bláhová, M., Pelantová, H., Elling, L., Etrych, T., Chytil, P., Křen, V., Biocompatible glyconanomaterials based on HPMA-copolymer for specific targeting of galectin-3, J. Nanobiotechnol, 2018, in print.


Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**RNDr. Pavla Bojarová, PhD.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**



prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.  
podpis vedoucí(ho) katedry



prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.  
podpis děkana(ky)

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Biokompatibilní glykopolymery s aktivním cílením na galektiny 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).

V Kladně dne 16.05.2019

.....  
Lieselotte Sedláková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí práce RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D. za trpělivost, čas věnovaný této práci a za její odborné rady, které mi byly přínosem. Za umožnění výkonu praktické části bakalářské práce a cenné rady dále děkuji prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc., vedoucímu Laboratoře biotransformací Mikrobiologického ústavu AV ČR. Za měření a interpretaci NMR spekter děkuji RNDr. Heleně Pelantové, Ph.D., a za analýzy HPLC Ing. Lucii Petráskové, Ph.D. Za konjugaci připraveného epitopu na polymer děkuji Mgr. Petru Chytilovi, Ph.D. a jeho týmu z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. Za vstřícnost, podání pomocné ruky a ochotu podílet se na dílčích částech mé práce patří poděkování vědeckým pracovníkům Laboratoře biotransformací.

## Abstrakt

Galektiny jsou proteiny patřící mezi lektiny S-typu. Jejich významnou vlastností je, že dokáží vázat  $\beta$ -galaktosidy, které se nacházejí na povrchu glykoproteinů či glykolipidů, a tím rozeznat normální buňku od patologické. Většina galektinů, zvláště galektin-1 a -3, se podílí na procesu kancerogeneze a dalších přidružených procesech.

Běžným sacharidovým ligandem pro galektiny je *N*-acetylaktosamin. Při vazbě na multivalentní sacharidové ligandy spolu molekuly galektinu navzájem asociují a vytvářejí heterogenní mřížku, která spouští signalizační procesy. Biokompatibilní ve vodě rozpustný kopolymer *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamid (HPMA) umožňuje multivalentní prezentaci sacharidových epitopů, což zvyšuje inhibiční potenciál výsledného glykokonjugátu ke galektinům.

V této práci byl enzymovou syntézou připraven disacharidový epitop Gal $\beta$ 4GlcNAc-N<sub>3</sub> za katalýzy komerční  $\beta$ -galaktosidasou z *Bacillus circulans*. Epitop byl následně ve spolupráci s Oddělením biolékařských polymerů Ústavu makromolekulární chemie (Mgr. Petrem Chytilém, Ph.D.) konjugován na *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidový (HPMA) kopolymer. Byl stanoven inhibiční potenciál připraveného glykopolymeru ke galektinu-1 a galektinu-3 a porovnána vazebná afinita volného sacharidu a sacharidu vázaného na kopolymer.

Připravený glykopolymer s 22 mol. % LacNAc vykazoval pro oba galektiny vysokou vazebnou afinitu. Vazebná afinita na galektin-1 byla 18krát vyšší než pro galektin-3, takže lze připravený glykopolymer považovat za selektivní ligand galektinu-1.

## Klíčová slova

Biomateriál; enzymová syntéza; ELISA; galektin; glykosidasy; HPMA; oligosacharid.

## Abstract

Galectins are proteins belonging among S-type lectins. Their important feature is that they can bind  $\beta$ -galactosides that are located on the surface of glycoproteins or glycolipids, and thus recognize a normal cell from a pathological one. Most galectins, especially galectin-1 and galectin-3, are involved in cancerogenesis and other associated processes.

*N*-Acetyllactosamine is a common carbohydrate ligand for galectins. At binding to multivalent carbohydrate ligands, galectin molecules associate and create a heterogeneous lattice, which triggers signalling processes. The biocompatible water-soluble copolymer *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) enables multivalent presentation of carbohydrate epitopes, which increases the inhibitory potential of the resulting glycoconjugate to galectins.

In this work, a disaccharide epitope of Gal $\beta$ 4GlcNAc-N<sub>3</sub> was prepared by enzymatic synthesis using commercial  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. The epitope was then conjugated to HPMA copolymer in cooperation with the Department of Biomedical Polymers of the Institute of Macromolecular Chemistry (Mgr. Petr Chytil, Ph.D.). The inhibitory potential of the prepared glycopolymer to galectin-1 and galectin-3 was determined and the binding affinity of the free carbohydrate and the carbohydrate conjugated to copolymer were compared.

The prepared glycopolymer with 22 mol. % LacNAc showed high affinity to both galectins. The binding affinity to galectin-1 was 18-times higher than for galectin-3. Thus, the prepared glycopolymer may be considered as a selective ligand of galectin-1.

## Keywords

Biomaterial; enzymatic synthesis; ELISA; galectin; glycosidase; HPMA; oligosaccharide.

## Obsah

1	ÚVOD .....	11
2	SOUČASNÝ STAV .....	12
2.1	Galektiny .....	12
2.1.1	Charakteristika a klasifikace.....	12
2.1.2	Funkce galektinů v organismu.....	14
2.1.3	Galektin-1 a -3 v nádorových onemocněních.....	15
2.1.4	Nízkomolekulární inhibitory galektinů.....	18
2.2	Biomateriály .....	18
2.2.1	Typy a charakteristika .....	18
2.2.2	Syntetické polymery .....	20
2.2.3	HPMA .....	22
2.3	Syntetické inhibitory galektinů .....	23
2.3.1	Nízkomolekulární inhibitory galektinů.....	23
2.3.2	Multivalentní inhibitory galektinů .....	24
2.4	Glykosidasy v syntéze .....	26
2.4.1	Charakteristika a klasifikace.....	26
2.4.2	$\beta$ -Galaktosidasy .....	26
2.4.3	$\beta$ -N-Acetylhexosaminidasy .....	27
2.4.4	Syntetický potenciál glykosidas .....	28
3	CÍL PRÁCE .....	31
4	METODIKA .....	32
4.1	Přístroje a materiál.....	32
4.1.1	Použité přístroje.....	32



4.1.2 Použitý materiál .....	33
4.1.3 Pufry a roztoky .....	35
4.2 Produkce Gal-1 a -3 .....	37
4.2.1 Transformace plasmidu do <i>E. coli</i> .....	37
4.2.2 Produkce galektinů v <i>E. coli</i> .....	38
4.2.3 Purifikace galektinů afinitní chromatografií.....	39
4.2.4 Charakterizace galektinů .....	39
4.3 Stanovení enzymových aktivit.....	40
4.4 Tenkovrstvá chromatografie.....	42
4.4 Enzymová syntéza.....	43
4.4.1 Analytická reakce .....	43
4.4.2 Preparativní reakce .....	43
4.4.3 Příprava chitooligomerních linkerů .....	44
4.5 Kompetitivní ELISA stanovení.....	45
5. VÝSLEDKY.....	47
5.1 Produkce a purifikace Gal-1 a -3.....	47
5.2 Optimalizace enzymové reakce .....	48
5.2.1 Aktivita enzymového preparátu v různých pH .....	48
5.2.2 Aktivita enzymového preparátu v přítomnosti rozpouštědla .....	49
5.3 Enzymová syntéza .....	50
5.3.1 Analytické reakce .....	50
5.3.2 Příprava a purifikace LacNAc-N <sub>3</sub> .....	51
5.3.3 Příprava a purifikace chitooligomerních linkerů .....	53
5.4 Inhibiční potenciál připravených látek s galektiny .....	54

6. DISKUZE.....	57
7. ZÁVĚR.....	60
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	61
9. BIBLIOGRAFIE .....	63
10. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ.....	67
11. SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK .....	68
12. SEZNAM PŘÍLOH.....	69

# 1 ÚVOD

Galektiny jsou skupinou strukturně příbuzných proteinů s vysokou afinitou pro glykokonjugáty s navázaným *N*-acetylaktosaminem a dalšími  $\beta$ -galaktosidy a plní řadu funkcí v lidském organismu. Galektin-1 a -3 jsou úzce spojeny s rakovinným bujením a vznikem metastáz. Galektin-1, homodimerní galektin, navíc dokáže do jisté míry regulovat buněčný cyklus, apoptózu a buněčnou adhezi a podílí se na rozvoji zánětu. Galektin-3 je jediným chimerním galektinem. Podílí se na nádorových a fibrotizačních procesech.

Exprese galektinů se zvyšuje během progresu rakoviny a vede k potlačení imunitní reakce organismu. Inhibice galektinů pomocí glykokonjugátů by byla možností zmírnění imunitní suprese a snížení růstu nádoru.

Vhodným multivalentním nosičem pro *in vivo* aplikace je netoxický, neimunogenní, ve vodě rozpustný *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidový kopolymer. Při transportu kancerostatik k místu nádoru má dlouhou životnost v organismu a posléze je vylučován ledvinami.

Teoretickým cílem této práce je podat informace o galektinech, jejich inhibitech a vhodných biomateriálech pro jejich multivalentní prezentaci. V praktické části je studován inhibiční potenciál *N*-acetylaktosaminu volného a po konjugaci s glykopolymerem.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Galektiny

#### 2.1.1 Charakteristika a klasifikace

Galektiny jsou živočišné lektiny S-typu s afinitou k  $\beta$ -galaktosidům, který jsou součástí oligosacharidů nebo vázané na glykoproteinech či glykolipidech. Bylo objeveno patnáct galektinů, z nichž některé jsou specifické pro daný živočišný druh, jako například galektin-5 a -6, které se nacházejí pouze u hlodavců, či galektin-11 a -15 u koz a ovcí. Nacházejí se především v cytoplazmě a jádru buněk, ale vyskytují se i na buněčné membráně a v extracelulárním prostoru [1; 2; 3]. Chybí jim signální sekreční peptid, a proto jejich vylučování mimo buňku probíhá neklasickou cestou a jeho mechanismus není zatím plně objasněn [4].

Specifická schopnost galektinů přečíst sacharidový kód na povrchu buněk nebo glykoproteinů by se dala využít pro cílenou léčbu, např. pro specifický transport léčiv nebo zobrazovacích činidel či cílenou inhibici. [1; 2].

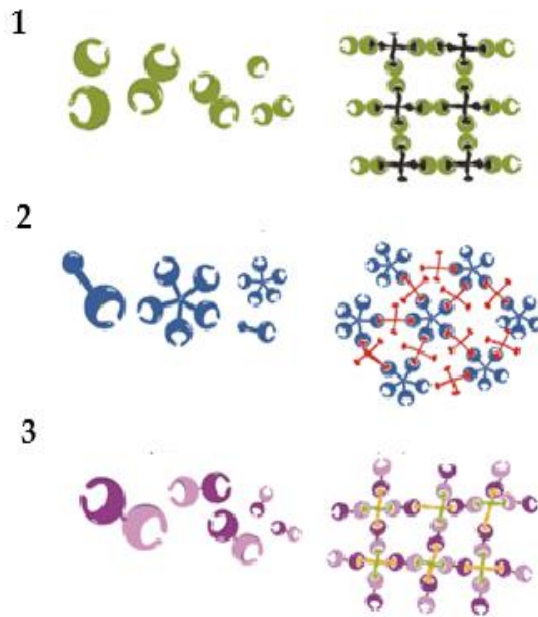
Běžným sacharidovým ligandem pro galektiny je *N*-acetylglukosamin ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc, LacNAc). Při vazbě na multivalentně prezentované sacharidové ligandy (např. vystavené na buněčném povrchu) spolu molekuly galektinu navzájem asociují a vytvářejí heterogenní galektin-glykanovou mřížku, která často spouští signalizační procesy.

Galektiny rozpoznávají sacharidy pomocí specifických domén rozpoznávajících sacharid („*carbohydrate recognition domain*“, CRD). Extracelulární galektiny se přes CRD váží na povrchové glykoproteiny buněk, jako například na T-lymfocyty, endotelové buňky či stromální buňky [4; 3; 5].

CRD galektinů se skládá přibližně ze 130 aminokyselin a má tvar dvou paralelních  $\beta$ -listů, na něž se z jedné strany váže 6 aminokyselinových řetězců, a

tvoří tak konkávní stranu, a ze strany druhé 5 řetězců tvořících stranu konvexní. Konkávní strana tvoří drážku pro vazbu sacharidového ligandu [6].

Rozlišujeme tři typy galektinů lišící se strukturou: prototypové, tandemové a chimerické. V závislosti na struktuře mohou být galektiny bivalentní (galektiny tandemové), nebo tvoří homotypické di- až oligomery pomocí specifických interakcí (prototypové a chimerické galektiny) [7].



*Obr. 1: Typy galektinů a tvorba galektinových mřížek (převzato z [8]). 1- Prototypové galektiny s jednou CRD doménou; 2- chimerický galektin-3 obsahující jednu CRD doménu a doménu neelektinového typu v pentamerním uspořádání; 3- tandemové galektiny se dvěma CRD doménami spojenými peptidem.*

Prototypové galektiny se sestávají z jedné CRD domény a řadíme sem galektin-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 a 15 (dále jen Gal-). Gal-4, 6, 8, 9 a 12 tvoří tandemové struktury se dvěma různými CRD doménami spojenými peptidem, což jim umožňuje vázat dva různé sacharidové epitopy. Gal-8 může tvořit prototypovou i tandemovou formu v závislosti na sestřihu v aminokyselinové sekvenci. Mezi chimerické galektiny se řadí pouze Gal-3 s jednou CRD doménou

a N-koncovou doménou neelektinového typu. Po navázání multivalentního ligandu tvoří oligomery, nejčastěji pentamery [7].

Aminokyseliny se přímo podílejí na vazbě sacharidů tvorbou vodíkových vazeb nebo van der Waalsových interakcí se sacharidem. Nejdůležitější roli hrají aminokyseliny His-Asn-Arg, které tvoří vodíkové vazby se zbytkem galaktosy, například u Gal-1, -3 a u N-terminální domény Gal-8 [7].

### 2.1.2 Funkce galektinů v organismu

Galektiny ovlivňují řadu dějů v našem organismu, například mezibuněčné interakce, transmembránovou signalizaci, apoptózu, sestřih pre-mRNA, buněčnou adhezi, imunitní odpověď, migraci a diferenciaci buněk [1; 2]. Většina galektinů se podílí na patofyziologickém procesu karcinogeneze a různých přidružených procesech. Výskyt jednotlivých galektinů v krevním séru je spojen se zvýšenou pravděpodobností výskytu některých typů nádorů, a mohou tak sloužit jako biomarkery rakovinného bujení [9]. Extracelulární galektiny se váží na glykoproteiny laminin, elastin a fibronectin [1; 2].

Galektiny mohou podporovat adhezi nebo ji blokovat. Podporují ji v případě, pokud galektiny zesilují glykany vystavené na různých buňkách nebo v extracelulární matrix. Adheze je naopak snížena, když galektiny blokuji buněčné receptory pro jiné vazebné interakce [7].

Gal-1 indukuje apoptózu u CD45 deficientních T-buněk. *In vivo* má silné imunoregulační vlastnosti díky své schopnosti inhibovat funkci T-buněk [10]. Gal-1 je také produkován myoblasty při jejich finální diferenciaci. To bylo prokázáno exogenně po přidání galektinu na extracelulární matrix proteinu, kdy došlo k inhibici myoblastové fúze. Gal-1 tedy reguluje interakci myoblastů

s extracelulární matrix, což může ovlivnit další vývoj svalových buněk a jejich diferenciaci [8].

Gal-3 potlačuje apoptózu, zvyšuje proliferaci T-buněk a intenzivně se podílí na rakovinném bujení a metastatických procesech. Dále jeho výskyt vzrůstá ve spojení s fibrózou, při různých patologiích, např. i při některých srdečních onemocněních [10].

Gal-7 přispívá k regeneraci rohovky a pokožky. Gal-9 je zvýšen u lidí s diabetes mellitus, je regulátorem alergických reakcí organismu a má schopnost do jisté míry regulovat hladinu glukosy v krvi [4; 11].

Gal-4 je exprimován v epitelových buňkách střev a vylučován do extracelulárního systému. Obsahuje dvě domény s podobnou aminokyselinovou sekvencí a díky této vlastnosti může hrát roli v řadě biologických procesů, jako je např. transport apikálního proteinu, hojení ran, střevní zánětlivé procesy a progresse nádoru [12].

### **2.1.3 Galektin-1 a -3 v nádorových onemocněních**

Galektiny se v nádorových buňkách nacházejí v cytoplazmě, v jádře i na membráně; z membrány jsou potom uvolňovány do extracelulárního prostoru. Jsou zapojeny do procesu proliferace, apoptózy, diferenciaci a progresse nádoru [13].

#### **2.1.3.1 Galektin-3**

Gal-3 se skládá ze tří částí: 1. N-terminální sekvence (12 aminokyselin) se dvěma fosforylačními místy; 2. kolagenová doména bohatá na prolin a glycin nezbytná pro oligomeraci; 3. doména rozpoznávající sacharidy (CRD) [7].

Gal-3 byl detekován při nádorech různých orgánů, jako například žaludku, jater, štítné žlázy, nervové soustavy a pohlavních orgánů (vaječníky, varlata) [13]. Je využíván rakovinnými buňkami k pohybu a růstu, protože dokáže zprostředkovat buněčnou interakci. Nádorové buňky jej dokáží produkovat pro snížení imunitní odpovědi hostitelského systému. Gal-3 má rozdílné chování z hlediska apoptózy v závislosti na tom, kde se nachází [14]. Extracelulární Gal-3 reguluje důležité funkce lymfocytů, jako je signalizace TCR, migrace, adheze a produkce IL-5. Extracelulární Gal-3 indukuje apoptózu v T-buňkách přímou vazbou na glykoproteinové receptory CD45 a CD71. [15]. V jádru je Gal-3 odpovědný za regulaci genové exprese prostřednictvím faktorů SP1 a  $\beta$ -kateninu. V cytoplazmě potom moduluje signální dráhy podílející se na rakovinných stavech, jako jsou RAS, BCL-2 a MYC [14]. Proto je důležité při léčbě rakoviny Gal-3 blokovat.

Gal-3 také interaguje s K-Ras proteinem v rakovinných buňkách a spouští kaskádu PI3K-AKT [5]. Právě tato signalizační kaskáda podporuje proliferaci, růst nádoru a angiogenezi [16]. Interakce s adhezními molekulami integriny a kadheriny na povrchu rakovinných buněk podporuje rakovinnou invazi [5]. Gal-3 je schopen indukovat uvolňování cytokinů, jako jsou IL-6, G-CSF, GM-CSF a sICAM-1 z endotelových buněk. To vede ke zvýšení adheze molekul, jako je integrin  $\alpha 5\beta 1$  (receptor fibronektinu), k endotelovému povrchu a metastazování [5].

Gal-3 by mohl být výborným ukazatelem i v nádorovém epiteliálním onemocnění vaječníků, které je nejsmrtelnějším gynekologickým onemocněním u žen a umírá na něj každá pátá žena s touto diagnózou [17].



### 2.1.3.2 Galektin-1

Gal-1 se strukturně skládá ze dvou paralelně uspořádaných  $\beta$ -listů, jednoho o pěti a druhého o šesti aminokyselinových řetězcích. V závislosti na koncentraci v roztoku tvoří homodimery [8].

Ve zdravých tkáních se Gal-1 nachází uvnitř buňky v cytoplazmě nebo jádru, kde zůstává až do doby, než dojde k aktivaci imunitním systémem. Poté je vyplaven i do extracelulárního prostoru. Bylo zjištěno, že nejvíce je jeho sekrece zvýšena u rakoviny plic, prsu, pankreatu, jater a štítné žlázy. U nádorů plic, štítné žlázy a gliomů je jeho vysoká koncentrace měřitelná v krvi [14].

Gal-1 se váže na poly-*N*-acetylglukosaminové řetězce na proteinech extracelulární matrix, jako je laminin a fibronectin, které se účastní dějů, jako je například buněčná adheze nebo migrace [18].

Kromě toho podporuje Gal-1 produkci IL-10 a snižuje sekreci IFN- $\gamma$ , což vede ke snížení imunitní odpovědi organismu na nádorové buňky. Například u nádorů hlavy a krku, kde je Gal-1 při rakovinném bujení velmi zvýšen, snižuje infiltraci T-buněk a indukuje apoptózu CD<sup>3+</sup> a CD<sup>8+</sup> lymfocytů.

Zatímco Gal-3 interaguje s proteinem K-Ras v rakovinných buňkách, Gal-1 interaguje s onkogenním proteinem H-Ras (H-Ras-GTP) k podpoře angiogeneze, růstu a dělení rakovinných buněk [14; 4]. Dokáže také inhibovat přirozené zabíječské buňky (NK, „*natural killer cells*“) imunitního systému [3].

Potlačuje imunitní odpověď gravidní ženy proti placentárním aloantigenům a zabraňuje náhlému potratu. Je tedy důležitou součástí průběhu normálního těhotenství [4].

### 2.1.4 Nízkomolekulární inhibitory galektinů

Účinnými ligandy pro Gal-3 jsou deriváty poly-*N*-acetylaktosaminu. Gal-3 váže oligosacharidové struktury nesoucí vnitřní LacNAc motiv, zatímco Gal-1 váže pouze terminální disacharidové sekvence. Nejsilnějšími přirozenými ligandy galektinů jsou LacNAc a *N,N'*-diacetylaktosamin ( $\beta$ -D-GalNAc-(1→4)-D-GlcNAc, LacdiNAc) [19].

Ligand LacdiNAc vykazuje výrazně silnější afinitu ke Gal-3 než ke Gal-1, což je způsobeno sterickým bráněním *N*-acetamidové skupiny na terminálním galaktosylu ve vazebném místě pro Gal-1. Vazebné místo Gal-3 má konzervovanou a nekonzervovanou část. Proto je nezbytné při návrhu ligandů pro Gal-3 pochopit jeho vazebnou a architektonickou strukturu.

Přirozený ligand LacNAc, který je společným ligandem všech galektinů, se váže pouze do konzervované části vazebného místa. Nekonzervovaná vazebná část má však mnohem větší význam pro přípravu sacharidových ligandů selektivních přímo pro Gal-3, jako jsou tetrasacharidy LacdiNAc-LacNAc a nízkomolekulární glykomimetika substituovaná aryle [19].

## 2.2 Biomateriály

### 2.2.1 Typy a charakteristika

Znalosti ohledně biomateriálů nesoucích bioaktivní sacharidy se značně rozšířily v posledním desetiletí. Biomateriály s konjugovanými sacharidovými ligandy umožňují díky multivalentnímu charakteru značné zesílení glykan-  
lektinové interakce. Tyto materiály mohou být využity v cíleném transportu léčiv nebo v diagnostických a analytických biochemických metodách, při konstrukci biosenzorů, jako matrice pro zobrazování *in vivo*, pro cílenou hypertermální léčbu

tkání postižených rakovinou, jako selektivní inhibitory bakteriálních toxinů, lektinových receptorů, patogenů a v dalších aplikacích [11].

Nejrozšířenějšími biomateriály se sacharidovými ligandy jsou glykany navázané na pevném nosiči, mezi které patří glykonanočástice, glykoarraye a „kvantové body“ (z angl. „*quantum dots*“) [11].

Nanočástice jsou tvořeny oxidy kovů, jako je například  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , které se používají jako kontrastní látky při neinvazivním vyšetření magnetickou rezonancí lidských měkkých tkání. Jsou velice výhodné při biomedicínských aplikacích, protože jsou netoxické a snadno biologicky odbouratelné oproti „kvantovým bodům“, které obsahují těžké kovy. Glykonanočástice se mohou použít při podávání léčiv, detekci rakovinných buněk nebo termoterapii *in vivo* [11].

Zlaté nanočástice se dají použít v kolorimetrických biologických testech, kde vykazují vysokou citlivost díky vysokému extinkčnímu koeficientu zlata. Při navázání nanočástic zlata na lektinový ligand změní glykonanočástice barvu z červené na fialovou, což můžeme pozorovat i pouhým okem. Při zkoumání vazby nanočástic zlata s glykoproteiny z vaječného bílku bylo pozorováno červené fotoluminiscenční zbarvení, které bylo přisuzováno přítomnosti aminokyselin cysteinu a tyrosinu ve vejci. Zlaté glykonanočástice jsou perspektivní i při cílené terapii nádorových onemocnění. Byla demonstrována vazba zlatých glykonanočástic na Gal-3 přes Thomsen-Friedenreichův antigen ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalNAc), typický povrchový antigen rakovinných buněk [11].

Termín „kvantové body“ zavedl prof. Mark A. Reed [11]. Jsou to polovodičové nanokrystaly obsahující binární nebo ternární sloučeniny těžkých kovů (Cd, Pb) s fluorescenčními vlastnostmi. Jejich velkou nevýhodou je relativně vysoká toxicita [11].

Glykoarraye představují soubor vybraných sacharidových struktur kovalentně či nekovalentně navázaných na pevný nosič. Výsledný povrch pak

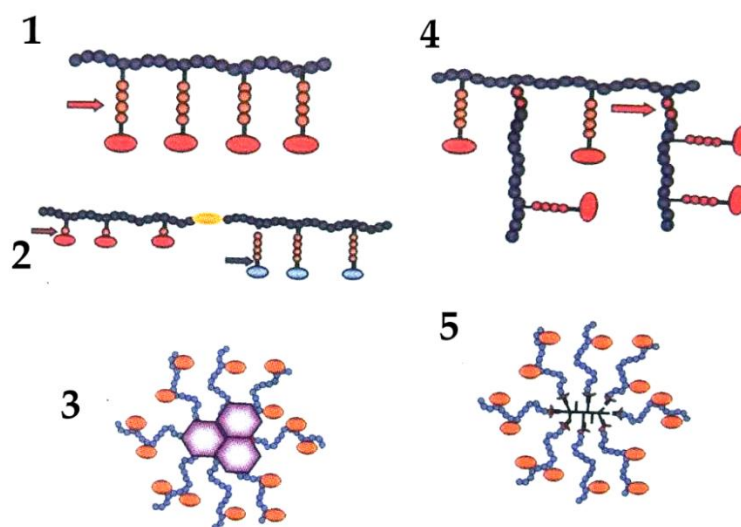
může s různou silou specificky vázat např. lektiny či enzymy z testovaných vzorků. Glykoarraye nacházejí uplatnění v diagnostice, analýze substrátové specifity enzymů, studiu nových inhibitorů a v dalších použitích [11].

### 2.2.2 Syntetické polymery

Syntetický polymer je makromolekulární látka tvořená dlouhými řetězci monomerů, na kterých může být navázána bioaktivní látka (léčivo) buď přímo, nebo např. přes biodegradovatelnou spojku, která se štěpí jen za určitých podmínek. Velmi záleží na rozpustnosti, délce řetězce a molekulové hmotnosti nosiče; pro použití *in vivo* je nutná vysoká biokompatibilita. Nízkomolekulární léčiva v krevním oběhu jsou z těla rychle odstraňována filtrací přes ledviny. U léčiv vázaných na polymer je vylučování pomalejší díky vyšší molekulové hmotnosti výsledného konjugátu, takže zůstávají déle v oběhu. V závislosti na délce polymerního řetězce se prodlužuje doba cirkulace, což je výhodné zejména u cílené léčby pevných nádorů, kdy se polymer postupně z krevního oběhu akumuluje na povrchu buněk a proniká do nich [20].

Polymer s léčivem se může k nádoru dopravit dvěma způsoby, aktivním směřováním nebo pasivní akumulací. Aktivní směřování je prováděno pomocí tzv. směřujících struktur, které se specificky vážou na membránové receptory nádorových buněk. Následně polymer s léčivem pronikne endocytózou do nádoru a dojde k uvolnění léčiva. Směřující strukturou může být taková molekula, která obsahuje specifický receptor pro vazbu, např. monoklonální a polyklonální protilátky, ale i lektin, sacharid, kyselina listová nebo oligopeptid. Byly zkoumány dvě různé metody s protilátkami, kdy jako směřující struktura byl použit sacharid. V prvním případě byly protilátka i léčivo navázány na postranní řetězce polymeru (klasický typ). Druhý typ byl tvořen centrální protilátkou, na níž bylo navázáno

několik řetězců kopolymeru (hvězdicový typ). Mezi polymerem a léčivem byla hydrazonová vazba nebo oligopeptid (nejčastěji GlyPheLeuGly), kdy obojí je lehce štěpitelné. Tyto metody byly zkoumány pro cytostatikum doxorubicin (imunosupresivum cyklosporinu A a chlorinu e<sub>6</sub>). Hvězdicový typ polymeru měl lepší protinádorovou aktivitu *in vivo*, proto by mohl být lepší variantou k aktivnímu cílení léčby [20].



Obr. 2: Struktury pasivně směřovaných polymerních léčiv (převzato z [20]). 1- Lineární řetězec s nedegradovatelným řetězcem; 2- lineární řetězec s přídatnými řetězci s biodegradovatelnou vazbou; 3- struktura s centrálním hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem; 4- lineární struktura s navázanými lineárními polymery, 5- hvězdicovitá struktura s rozvětveným jádrem a lineárními polymery.

Pasivní akumulace polymeru se využívá pro léčbu vaskularizovaných nádorů a je založena na fúzi makromolekul přes endotel buňky a jeho následném hromadění v nádoru. Tento jev se nazývá EPR efekt („*enhanced permeability and retention effect*“) a poprvé ho popsal prof. Maeda [20]. Molekuly účastníci se pasivní akumulace musí mít takovou molekulovou hmotnost, aby byly ledvinami vyloučeny, a zároveň musí být schopny prostoupit do nádoru. Bylo zkoumáno pět

různých struktur, od lineárních až po hvězdicovité. Hvězdicový polymer s dendritickým jádrem a navázanými řetězci lineárního polymeru (Obr. 2, struktura 5) se v krevním řečišti nacházel nejdéle, a tudíž jeho akumulace v nádoru byla nejúčinnější [20].

### 2.2.3 HPMA

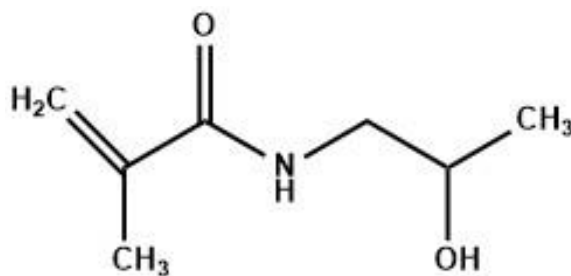
*N*-(2-Hydroxypropyl)metakrylamidové (HPMA) kopolymery jsou ve vodě rozpustné biomateriály, které jsou netoxické, neimunogenní a biologicky kompatibilní. HPMA kopolymer tvoří ve vodě kulovité útvary o velikosti 5-20 nm. Unikátní strukturní, fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti těchto kopolymerů je předurčují pro *in vivo* aplikace. [21].

HPMA o molekulové hmotnosti 30 000 g/mol nevyvolává žádnou imunitní odpověď. Pokud je na něj navázána oligopeptidová spojka, je jeho imunitní odpověď minimální. Po navázání léčiva již organismus tvoří protilátky, jejichž množství ale případného pacienta neohrožuje [20].

HPMA kopolymer vykazuje podobné vlastnosti jako poly(ethylenglykol), který snižuje imunogenitu navázaných proteinů. Při vazbě na HPMA se snižuje imunitní odpověď navázaných glykoproteinů, imunoglobulinu IgG, albuminu a jiných látek. IgG byl zkoumán u pacientek po prodělání rakoviny prsní žlázy, které byly léčeny polymerním konjugátem DOX-PHPMA-IV s doxorubicinem. Ani po několika měsících od podání terapeutika nebyly pozorovány anti-IgG protilátky v periferní krvi [20].

HPMA neinterferuje negativně s tvorbou buněk imunitního systému, jako jsou přirozené zabíječské buňky (NK, „*natural killer cells*“), cytotoxické lymfocyty nebo makrofágy, což je velmi důležité pro potlačení metastazování a primárního nádoru [20].

Kromě doxorubicinu byl HPMA konjugován s mnoha léčivy jako doxycyklin, daunomycin, cyklosporin a další. Při testování na myších s určitým typem nádoru byla pozorována až 100% účinnost léčby. Kromě transportu terapeutik může být použit např. i jako nosič specifických inhibitorů nebo jiných bioaktivních sloučenin, u nichž bude prodlužovat poločas života [20].



Obr. 3: Strukturální vzorec *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA) (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

## 2.3 Syntetické inhibitory galektinů

### 2.3.1 Nízkomolekulární inhibitory galektinů

Byla vyvinuta řada přirozených či syntetických sacharidových ligandů pro galektiny. Tyto ligandy mohou pak v biologickém procesu fungovat jako inhibitory interakce galektinu s biologickými strukturami, a tedy inhibovat příslušnou biologickou odpověď, neboť se navážou do vazebného místa galektinu, a tak ho zablokují pro další vazbu. Toho lze využít při terapii stavů spojených s patologickou produkcí galektinů. Mezi hlavní přirozené galektinové ligandy patří galaktosa, laktosa ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc) a *N*-acetyllaktosamin. Po zavedení aromatické skupiny na pozici C-3 u galaktosylu na neredukujícím konci se výrazně zvyšuje afinita těchto látek ke galektinům. Výhodou je, že takto modifikované cukerné ligandy jsou značně rezistentní vůči enzymové degradaci *in vivo* [19].

Afinita ligandů substituovaných na C-3 ke Gal-3 může být dále zvýšena zavedením sulfátu na pozici C-2. [19].

Molární hmotnost těchto nízkomolekulárních inhibitorů obecně nepřesahuje 1000 Da. Pro dosažení vysoké afinity a selektivity je důležité, jak struktura těchto ligandů vyhovuje strukturním požadavkům jednotlivých galektinů [19]. Dosud nejselektivnější molekulou je inhibitor založený na thio- $\alpha$ -D-galaktosidu, který má stokrát vyšší afinitu ke Gal-3 než ke Gal-1 [19].

### 2.3.2 Multivalentní inhibitory galektinů

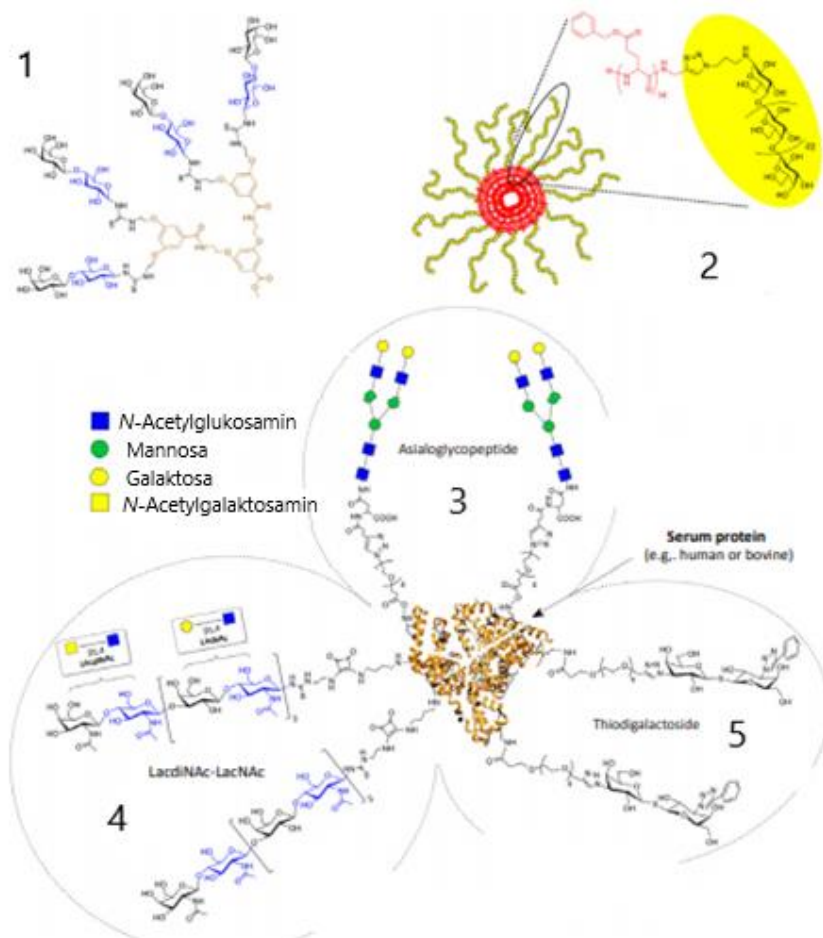
V přírodě jsou živočišné glykany prezentovány na glykoproteinech na více glykosylačních místech, což má za následek více interakčních míst a multivalenci. Multivalentní glykomateriály nesoucí glykany nebo glykomimetika napodobují přirozenou prezentaci glykanů na povrchu buněk a na glykoproteinech. Hustota prezentace epitopů a typ navázání na biomateriál jsou důležitými předpoklady pro napodobení přirozené glykanové prezentace, a tím i maximální zesílení interakce s lektinem [19].

Poly-amidoaminové dendrimery byly spolu s kalixareny prvními multivalentními chemickými strukturami, které se používaly jako ligandy galektinů. Jejich výhodou je kontrolovaná struktura dendrimery, která určuje valenci dendrimery, velikost a fyzikálně-chemické vlastnosti [19].

Připojení čtyř laktos modifikovaných na C-3 na jednoduchou dendrimerní strukturu zvýšilo inhibiční potenciál ke Gal-3 více než  $10\times$  (Obr. 4, struktura 1). Bylo zjištěno, že jak Gal-1, tak Gal-3 tvoří s glykodendrimery v roztoku agregáty podobné nanočásticím. Gal-3 tyto agregáty tvoří dokonce i s rakovinnými buňkami. [19]



Účinným ligandem Gal-1 jsou amfifilní glykopeptidy s *N*-acetylglukosaminem (Obr. 4, struktura 2). Dokáží se nekovalentně shlukovat do supramolekulárních nanovláken uspořádaných do  $\beta$ -listu. Vázaly Gal-1 s vysokou afinitou a inhibovaly galektinem indukovanou apoptózu T-buněk Jurkat [19].



**Obr. 4: Struktury multivalentních glykanů** (převzato z [19]). 1- Polymer se čtyřmi molekulami laktosy modifikovanými na C-3; 2- amfifilní glykopeptid tvořící nanovlákná pro vazbu galektinů; 3- neo-glykosylovaný albumin s asialoglykopeptidy; 4- neo-glykosylovaný albumin s oligosacharidy typu poly-LacNAc; 5- neo-glykosylovaný albumin s thiodigalaktosidem substituovaným fenylem.

## 2.4 Glykosidasy v syntéze

### 2.4.1 Charakteristika a klasifikace

Glykosidasy (EC 3.2.1.) jsou stabilní enzymy s širokou substrátovou specifitou, a mohou být proto použity v řadě syntetických reakcí i s nepřírodními donory glykosylu, které nesou různé funkční skupiny [22]. Ačkoliv jsou to enzymy hydrolytické a v přírodě se uplatňují pro štěpení glykosidických vazeb v poly- a oligosacharidech, glykoproteinech či glykolipidech, vhodnou úpravou reakčních podmínek lze dosáhnout dobrých výtěžků při syntéze. Existuje více než 140 skupin glykosidas s příbuznou primární strukturou a architekturou dle databáze Carbohydrate Active enZymes (<http://www.cazy.org/>) [23]. Dle substrátové specifity dělíme glykosidasy do několika skupin. Pro účely této práce budeme charakterizovat dvě skupiny glykosidas, a to  $\beta$ -galaktosidasy a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy, s nimiž jsme pracovali.

### 2.4.2 $\beta$ -Galaktosidasy

$\beta$ -Galaktosidasy se nacházejí v lidském těle, rostlinách a mikroorganismech. Katalyzují hydrolýzu  $\beta(1\rightarrow3)$  a  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidových vazeb v oligosacharidech. Využívají klasický katalytický mechanismus glykosidas se zachováním anomerní konfigurace (štěpený substrát má stejnou anomerní konfiguraci jako vzniklý produkt). Hrají důležitou roli při získávání energie a uhlíku štěpením laktosy na galaktosu a glukosu [24]. Průmyslově se využívají k syntéze galaktooligosacharidů [25]. Galaktooligosacharidy jsou důležitá prebiotika, která zvyšují proliferaci střevních bifidobakterií a laktobacilů v tlustém střevě, což je důležité pro lidské zdraví a ochranu před toxiny, bakteriemi a infekcemi střev. V potravinářském průmyslu je  $\beta$ -galaktosidasa používána při výrobě mléka bez laktosy pro osoby

s laktosovou intolerancí [24]. V potravinářském průmyslu se využívá nejhojněji  $\beta$ -galaktosidasa BgaD z *Bacillus circulans*. Má mnohem vyšší syntetickou aktivitu a tepelnou stabilitu než jiné galaktosidasy [24]. Všechny  $\beta$ -galaktosidasy obsahují katalytickou doménu (*TIM barrel*) se dvěma katalytickými zbytky kyseliny glutamové [24].

### 2.4.3 $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidasy

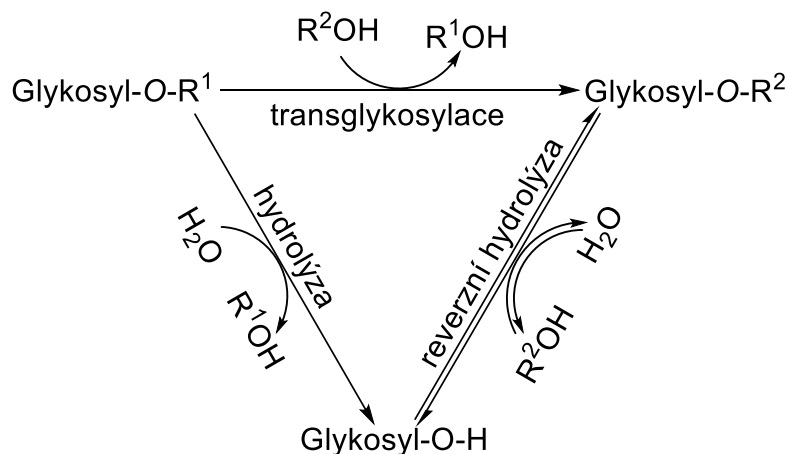
$\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidasy katalyzují štěpení koncových monosacharidových zbytků  $\beta$ -D-GlcNAc a  $\beta$ -D-GalNAc v *N*-acetylhexosaminových strukturách.  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidasy využívají zvláštní katalytický mechanismus, tzv. mechanismus s asistencí substrátu. Kyslík ze substrátu C-2 acetamidové skupiny působí jako katalytický nukleofil a vzniká reakční meziproduct oxazolin [26].

V mořských chinolytických bakteriích jako *Vibrio furnissii* nebo *Alteromonas* se  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy spolu s chitinasou podílejí na degradaci chitinu. Gramnegativní bakterie obsahují  $\beta$ -*N*-acetylglukosaminidasu NagZ, která hydrolyzuje  $\beta$ -1,4-glykosidické vazby mezi *N*-acetylglukosaminem a kyselinou anhydro-*N*-acetylmuramovou. Výsledné peptidy kyseliny 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramové působí jako induktory  $\beta$ -laktamasy AmpC, čímž způsobují bakteriím rezistenci vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům.  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z vláknitých hub jsou za laboratorních podmínek schopny štěpit a přenášet substráty nesoucí různé funkční skupiny, např. karboxyláty, sulfáty, azidy a 4-deoxyglykosidy [26].

#### 2.4.4 Syntetický potenciál glykosidas

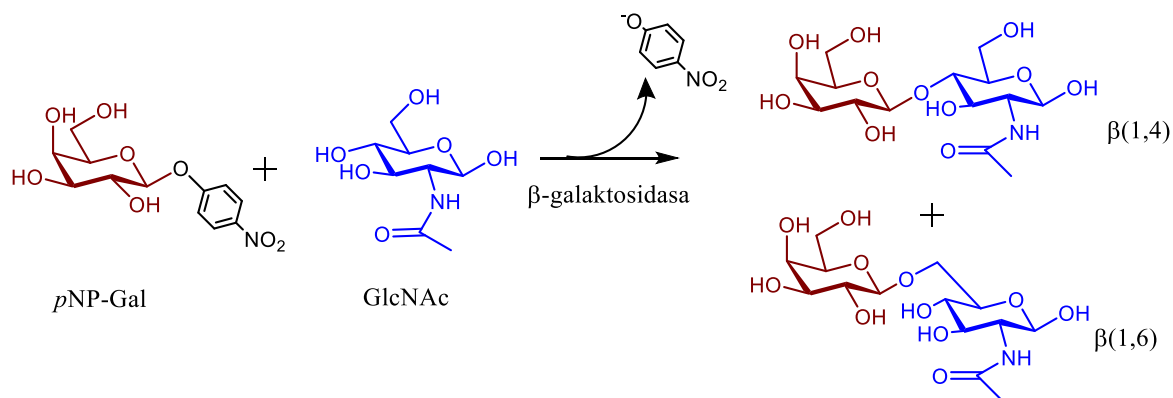
Glykosidasy přirozeně štěpí sacharidové řetězce *in vivo* přenesením glykosylu na akceptor vody [27]. Pokud je v dostatečné koncentraci přítomen jiný akceptor s hydroxylovou skupinou, může vznikat nová glykosidová vazba. Syntéza pomocí glykosidas je stimulována sníženou aktivitou vody, např. vysokou koncentrací reaktantů, přítomností organických rozpouštědel nebo solí [27].

Existují dva způsoby syntézy glykosidů za katalýzy glykosidasami, termodynamicky a kineticky řízený. Termodynamicky řízený proces probíhá jako kondenzace dvou molekul ve vysokých koncentracích v přítomnosti enzymu za vzniku nové glykosidické vazby a odštěpení molekuly vody. Nevýhodou reakce je, že často vzniká směs produktů. Kineticky řízená reakce probíhá za použití reaktivního sacharidového donoru s vhodnou odstupující skupinou. Tato reakce je selektivnější a probíhá rychleji.



Obr. 5: Reakce katalyzované glykosidasami

$\beta$ -Galaktosidasa z *Bacillus circulans* katalyzuje přenos galaktosylu z vhodných donorů na různé substráty. S akceptorem *N*-acetylglukosaminem (GlcNAc) vznikají různé regioisomery produktu *N*-acetylglukosamin (obr. 6) [28].



Obr. 6: Transglykosylační reakce katalyzovaná  $\beta$ -galaktosidasou z *Bacillus circulans* (vytvořeno v programu ChemDraw Prime).

U syntetických reakcí katalyzovaných glykosidasami probíhá vždy paralelně hydrolyza, protože reakční produkt slouží zároveň jako substrát, což snižuje reakční výtěžek. Kromě úprav reakčních podmínek a složení reakční směsi je možné podpořit transglykosylační aktivitu glykosidas též proteinovým inženýrstvím a mutagenézí [23].

Bodovou mutací katalytického nukleofilu může být zrušena hydrolytická aktivita enzymu. Tyto mutantní enzymy se nazývají glykosynthasy. V reakcích s glykosynthasami vystupuje jako donor glykosylu glykosylfluorid opačné anomerní konfigurace než původní substrát. Protože takový donor dokáže imitovat glykosylový enzymový meziprodukt a katalýza může proběhnout, dojde k vytvoření glykosidové vazby. Mutantní enzym je však hydrolyticky neaktivní, a tak nedochází ke snížení výtěžku produktu hydrolyzou [23]. Bylo vytvořeno mnoho glykosynthas, jako například glykosynthasa z *Thermus thermophilus*, selektivně syntetizující  $\beta$ -1,3-glykosidové vazby ve výtěžcích až 90 % a xylosynthasa odvozená od  $\beta$ -glukosidasy z *Agrobacterium sp.* Existují další xylosynthasy odvozené od endo-1,4- $\beta$ -xylanasy z *Cellulomonas fimi* a  $\beta$ -xylosidasy z *Geobacillus stearothermophilus* [29].

Mutantní endo- $\beta$ -*N*-acetylglukosaminidasa z *Mucor hiemalis* vykazuje vysokou transglykosylační aktivitu oproti hydrolytické díky bodové mutaci Tyr217 na Phe. Tím bylo dokázáno, že transglykosylační aktivita se může výrazně zvýšit na úkor hydrolytické aktivity mutací aminokyselinového zbytku tyrosinu (Tyr), který v aktivním centru stabilizuje vodu jako akceptor glykosylu [29].

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je příprava funkcionalizovaného disacharidového epitopu  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcNAc-N<sub>3</sub> za katalýzy komerční  $\beta$ -galaktosidasou z *Bacillus circulans* a stanovení jeho vazebné afinity ke galektinu-1 a galektinu-3 pomocí metody ELISA.

Funkcionalizovaný epitop bude izolován pomocí gelové chromatografie a bude změřena a porovnána afinita volného epitopu a epitopu po konjugaci na HPMA kopolymer.

Dílčí cíle práce:

- Literární rešerše problematiky syntetických inhibitorů galektinu-1 a -3
- Optimalizace postupu enzymové syntézy *N*-acetylaktosaminu s azidoskupinou za katalýzy  $\beta$ -galaktosidasou z *Bacillus circulans*.
- Příprava chitooligomerních linkerů s azidoskupinou za katalýzy mutantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou z *Talaromyces flavus* pro následnou galaktosylaci (tato galaktosylace není předmětem této práce)
- Stanovení afinity glykokonjugátů s navázaným *N*-acetylaktosaminem ke galektinu-1 a galektinu-3 pomocí ELISA stanovení (chemickou syntézu glykokonjugátů provádělo spolupracující pracoviště).

## 4 METODIKA

### 4.1 Přístroje a materiál

#### 4.1.1 Použité přístroje

- Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- Centrifugy:
  - Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, USA)
  - Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA)
  - Sorvall RC 6 Plus Centrifuge (Thermo Scientific™, USA)
- Destičky na ELISA — F16 Maxisorp NUNC-Imunno modules (Fisher ThermoScientific, Dánsko)
- HPLC Nexera XR a Prominence (Shimadzu, Japonsko)
- Kolona TSK- gel amide 80; 5 µm; 250×4,6 mm (TOSOH BIOSCIENCE, JP)
- Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)
- Lyofilizátor Lyovac GT2 (Leybold GmbH, Německo)
- pH metr - pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, ČR)
- Purifikační kolona HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie)
- Sběrač- Pump P-1 (Pharmacia Biotech, USA)
- SDS-PAGE aparatura (Bio-Rad, USA)
- Sonikátor UP50 H Ultra Sonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie)
- Spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)
- Termomixér: Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, USA)
- Třepačka IKA KS 4000 ic control (Schöller, Česká republika)
- UV lampa, UV 240 (A. KrüssOptronik, Německo)
- Váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)



- Vakuová filtrace (Milford, MA 01757, USA)
- Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

#### 4.1.2 Použitý materiál

- (Hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), (Sigma-Aldrich, USA)
- 1-(2'-Azidoethyl)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosid (GlcNAc-N<sub>3</sub>; připraven v laboratoři)
- Aceton (VWR Chemicals, Česká republika)
- Acetonitril (VWR Chemicals, Česká republika)
- Akrylamid (WVR Chemicals, Česká republika)
- Amoniak (Lach-Ner, Česká republika)
- Antibiotika
  - Ampicilin (Serva Elektrophoresis GmbH, Německo)
  - Chloramfenikol (Sigma Aldrich, USA)
- Asialofetuin (Sigma Aldrich, USA)
- Bradfordovo činidlo, ředěno 1:4 s destilovanou vodou - *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
- Bromfenolová modř (SERVA, USA)
- Buňky *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (Sigma-Aldrich, USA)
- Destilovaná a ultračistá voda (filtrační zařízení WATREX)
- Dihydrogenfosforečnan sodný, mohohydrát (Carl Roth, Německo)
- Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Enzymy
  - mutantní  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasa z *Talaromyces flavus* Y470N (rekombinantní enzym; připravena v laboratoři)

- $\beta$ -galaktosidasa z *Bacillus circulans* Biolacta FN5 (hrubý enzymový preparát; Daiwa Kasei, Japonsko)
- Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Fenylmethansulfonylfluorid (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol (WVR Chemicals, Česká republika)
- Glycin (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný (WVR Chemicals, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Carl Roth, Německo)
- Chlorid sodný (Carl Roth, Německo)
- Imidazol (Carl Roth, Německo)
- IPTG (Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid), (Sigma-Aldrich, USA)
- Isopropanol (WVR Chemicals, Česká republika)
- Kyselina boritá (Lachema, Česká republika)
- Kyselina citronová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina fenyloctová (Lachema, Česká republika)
- Kyselina fosforečná (Lachema, Česká republika)
- Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika)
- Methanol (ISOLAB, Německo)
- Molekulový marker: Amersham LMW (*Low molecular weight marker*) Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, Velká Británie)
- Myší monoklonální protilátka anti-His<sub>6</sub>-peroxidasa, ředění 1:1000 v 1×PBS (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- *N, N', N'', N'''*-Tetramethylethylendiamin (TEMED), (Sigma-Aldrich, USA)
- *N*-Acetyl-D-laktosamin ( $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa), (Carbosynth, Velká Británie)

- N-Acetylglukosamin (2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa), (Acros Organics, USA)
- Plasmid Gal-1 a -3 (připraveno v laboratoři)
- *p*-Nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid (*p*NP-Gal; Senn Chemicals, Švýcarsko)
- Polyakrylamidový gel na gelovou chromatografii – Bio-gel P2 (Bio-Rad, USA)
- SDS (SERVA, USA)
- Substrát „TBM One”- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Kem-En-Tec, Dánsko)
- Tekutý dusík (Maneko, Česká republika)
- Uhličitan sodný (Lachner, Česká republika)

#### 4.1.3 Pufry a roztoky

- 12% SDS gel
  - Separační gel- 1,6 ml H<sub>2</sub>O, 2,0 ml 30% akrylamid, 1,3 ml Tris-Cl (1,5 M, pH 8,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,002 ml TEMED
  - Zaostřovací gel- 3,4 ml H<sub>2</sub>O, 0,83 ml 30% akrylamid mix, 0,63 ml Tris-Cl (1,0 M, pH 6,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,005 ml TEMED
- 15% SDS gel
  - Separační gel- 1,1 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml 30% akrylamid, 1,3 ml Tris-Cl (1,5 M, pH 8,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,002 ml TEMED
  - Zaostřovací gel- 3,4 ml H<sub>2</sub>O, 0,83 ml 30% akrylamid mix, 0,63 ml Tris-Cl (1,0 M, pH 6,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,005 ml TEMED

- 1×PBS (pH 7,5)- 8,76 g 0,15 M NaCl, 6,9 g 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O v 1000 ml dH<sub>2</sub>O
- 3 M HCl- 66 ml HCl, 186 ml dH<sub>2</sub>O
- 2% BSA v PBS pufru (Sigma-Aldrich, USA)
- 5% kyselina sírová (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) v ethanolu
- Acetátový pufr- 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH, 0,2 M CH<sub>3</sub>COONa (pH 5,0)
- Barvicí roztok – 0,5 g Coomasie Blue Brilliant, CH<sub>3</sub>OH: CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O, 9 : 1 : 9
- Blokovací roztok- 2 g 2% BSA (hovězí sérový albumin; *bovine serum albumin*) rozpustíme ve 100 ml 1×PBS a sterilně přefiltrujeme
- Britton-Robinsonův pufr: 40 mM kyselina fosforečná, 40 mM kyselina fenyloctová, 40 mM kyselina boritá, 200 mM hydroxid sodný (pH 2-12)
- Ekvilibrační pufr- 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 500 mM NaCl, 20 mM imidazol (pH 7,4)
- Elektrodotový pufr- 15,1 g TRIS báze a 94 g glycinu rozpustíme v 900 ml H<sub>2</sub>O; 5 g SDS (dodecylsulfát sodný) rozpustíme v 50 ml H<sub>2</sub>O a přidáme ho k připravenému roztoku; objem doplníme na 1000 ml
- Eluční pufr- 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol (pH 7,4)
- EPBS (pH 7,5) – v 250 ml 1×PBS rozpustíme 0,186 g 2 mM EDTA a upravíme pH
- Fosforečnanový pufr - 16 ml 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 84 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 ml ultračisté H<sub>2</sub>O (pH 7,5), filtrace
- McIlvaine pufr – 0,1M kyselina citrónová, 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 5,0)
- Odbarvovací roztok - 350 ml etanolu, 550 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml kyseliny octové
- Pevné Luria-Bertani medium - 10 g/l trypton, 0,5 g/l NaCl, 5 g/l extrakt z kvasnic a 15 g/l agar

- Plasmidy Gal-1 a Gal-3 (geny zaklonované v pET-Duet-1 vektoru; připraveny v laboratoři)
- Promývací roztok- 250 ml Tween 20 smícháme s 9750 ml 1×PBS, poté odebereme 5 ml roztoku a smícháme s 245 ml 1×PBS
- Vytvájecí fáze na TLC - izopropylalkohol : voda: amoniak; 7 : 2 : 1
- Vzorová barva- 250 mM Tris, 500 mM DTT, 10% SDS, 0,5% bromfenolová modř, 50% glycerol

## 4.2 Produkce Gal-1 a -3

### 4.2.1 Transformace plasmidu do *E. coli*

Do připraveného zásobního agaru s Luria-Bertani médiem (LB, 100 ml) byl po rozehrátí sterilně přidáno ampicilin (100 µg/ml) a chloramfenikol (34 µg/ml) a agary na Petriho miskách byly ponechány ztuhnout v laminárním boxu.

Na ledu byla rozmrazena kryokonzervovaná kultura kompetentních buněk *E. coli* Rosetta 2 pLysS (100 µl) a promíchána. Stejně tak byl rozmražen zásobní roztok plasmidu Gal-3, ze kterého byl v laminárním boxu odebrán 1 µl a přenesen do buněk. Celá směs byla promíchána a po dobu dvou minut inkubována na ledu. Poté byla směs v mikrozkuřavce přenesena do termomixéru, kde se inkubovala při 42 °C bez míchání a pak byla přenesena zpět na led na 2 min, čímž byl vytvořen „teplotní šok“.

Buněčná směs byla opět vložena do termomixéru s přídatkem 100 µl LB media a inkubována jednu hodinu při 37 °C a 300 otáčkách za minutu.

Poté byla směs stočena (10 s, 13 500 otáček za minutu). Horní část supernatantu byla odstraněna a spodní část s buňkami byla rozsuspendována, naočkována na misku (50 µl) a ponechána inkubovat přes noc při 37 °C.

Druhý den byla do tří Erlenmayerových baněk o objemu 500 ml s 60 ml TB media přidána antibiotika ampicilin (100 mg/ml) a chloramfenikol (34 mg/ml). Do media byly zaočkovány narostlé kolonie z předešlého dne párátkem tak, že v každé baňce byla jedna kolonie. Kultury byly inkubovány při 37 °C a 220 otáčkách za minutu.

Po 17 hodinách byl obsah prekulrut z Erlenmayerových baněk přelit do tří třílitrových Erlenmayerových baněk se 600 ml TB media a antibiotiky ampicilinem (100 µg/ml) a chloramfenikolem (34 µg/ml). Poté byly kultury znovu inkubovány za stejných podmínek, dokud absorbance při 600 nm nedosahovala hodnot mezi 0,6-0,8. Poté bylo do každé baňky přidáno 600 µl IPTG na indukci proteinové exprese a kultury byly inkubovány při 25 °C a 150 otáčkách za minutu po dobu 24 hod.

#### **4.2.2 Produkce galektinů v *E. coli***

Bakterie byly stočeny při 5000 otáčkách za minutu po dobu 20 minut při 10 °C. Buněčný pelet byl přenesen do vychlazeného ekvilibračního pufru (50 ml) o pH 7,4. Byl přidán PMSF (inhibitor proteas, 500 µl) a promíchán. Poté bylo provedeno šest cyklů sonikace (s 52% amplitudou) na ledu po dobu 1 minuty a pauzou 2 minuty. V průběhu pauzy byla směs vždy mírně promíchána. Po skončení sonikace byla suspenze přelita do mikrozkušavek (2 ml) a stočena při 15 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut a 8 °C. Supernatant byl poté přelit do zkumavky a přefiltrován (filtr 0,8 µm) před nanesením na kolonu.

### 4.2.3 Purifikace galektinů afinitní chromatografií

Gal-3 nesoucí histidinovou kotvu byl purifikován pomocí chelatační afinitní chromatografie na koloně na bázi Sepharosy (HisTrap™ 5 ml; GE Healthcare), která je nabitá  $\text{Ni}^{2+}$  ionty.

Před nanesením vzorku na kolonu zapojenou do chromatografické sestavy Äkta Prime Plus byla kolona promyta 150 ml ultračisté vody a 150 ml ekvilibračního pufru (průtok 5 ml/min). Poté byl nanesen přefiltrovaný vzorek rozředěný v 50 ml ekvilibračního pufru a průtok byl nastaven na 1 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona znovu promyta 150 ml ekvilibračního pufru (2 ml/min), aby se odstranily nespecificky vázané proteiny.

Čistý Gal-3 byl eluován elučním puftrem s obsahem 500 mM imidazolu a byly sbírány frakce (1 ml; 2 ml/min). Průběh eluce byl analyzován pomocí UV detektoru (240 nm) a obsah proteinu v jednotlivých frakcích byl zjištěn pomocí Bradfordova činidla. Frakce s nejvyšším obsahem proteinů byly spojeny a dialyzovány ve  $2 \times 7$  l dialyzačního pufru (EPBS) po dobu celkem 24 h.

Po eluci byla kolona promyta 150 ml elučního pufru, 150 ml ultračisté vody a 150 ml 20% ethanolu.

Stejným postupem probíhala i produkce a purifikace Gal-1 s rozdílem, že buněčné kolonie byly před purifikací zmrazeny.

### 4.2.4 Charakterizace galektinů

Koncentrace galektinu v roztoku byla zjištěna pomocí Bradfordova činidla. Molekulová hmotnost Gal-3 je 28 000 Da, Gal-1 je 16 500 Da.

Dále byla měřena čistota Gal-1 a -3 pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Byl připraven 15% gel pro Gal-1 a 12% pro Gal-3.

Skříčka pro přípravu SDS gelu byla upnuta do držáku a zasazena do stojánku, jehož těsnění jsme natřeli vazelínou a předem vyzkoušeli čistou vodou, jestli neprosakuje. Do baňky byl namíchán separační gel (dle kap. 4.1 směsi) a opatrně napipetován do aparatury. Ten byl poté převrstven 1 ml butanolu a nechal se ztuhnout (cca 15 minut). Po ztuhnutí byl butanol slit, byl napipetován zaostřovací gel, do něhož byl zasazen hřebínek a nechal se ztuhnout. (cca 15 minut).

Do mikroskopavek byly připraveny vzorky se vzorkovou barvou a denaturovány při 99 °C po dobu 5 minut.

Byla sestavena aparatura a skříčka s gelem do ní byla upevněna. Do jednotlivých drah byl napipetován vzorek a marker (LMW, *Low Molecular Weight*). Aparatura byla naplněna pufrům a připojena ke zdroji napětí (130 V) přibližně na 1 hodinu. Pak byla aparatura rozebrána a skříčka jemně oddělena. Gel byl přenesen do Petriho misky, barven 10 minut v Coomasie blue a poté odbarvován v odbarvovacím roztoku asi 30 minut. Poté byl gel uchováván v 1% kyselině octové v destilované vodě.

### 4.3 Stanovení enzymových aktivit

Byla stanovena aktivita  $\beta$ -galaktosidasy a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy v preparátu Biolacta při různých pH v přítomnosti různého procentuálního obsahu rozpouštědla ve směsi jako kosolventu.

Stanovení pH optima bylo provedeno v Britton-Robinsonově pufru o široké škále pH (2-12) ve triplikátu se substráty *p*NP-Gal pro  $\beta$ -galaktosidasu a *p*NP-GlcNAc pro  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasu. Do tří mikroskopavek bylo napipetováno 10  $\mu$ l 10 mM substrátu a 30  $\mu$ l pufru o daném pH (výsledná koncentrace v reakční směsi 2 mM). Směs byla vložena do termomixéru na 37 °C



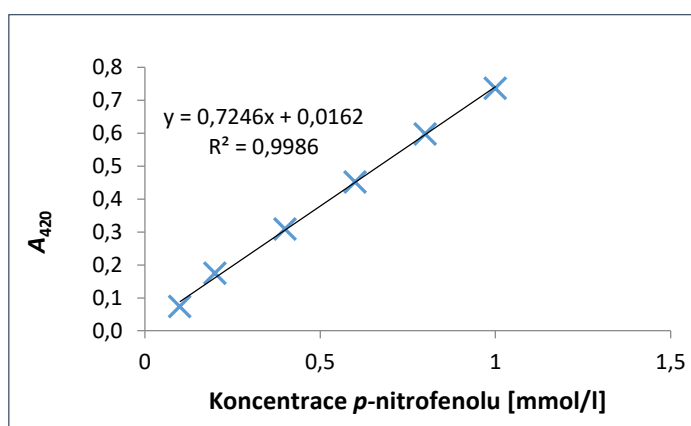
při 850 otáčkách a po preinkubaci (1 min) bylo přidáno 0,25 U/ml enzymu (10  $\mu$ l), který zahájil hydrolytickou reakci. Reakce trvala 10 minut a po uplynutí této doby byla reakce zastavena přidáním 1 ml 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Reakční směs byla přenesena do kyvet a změřena oproti negativní kontrole (10  $\mu$ l substrát a 40  $\mu$ l pufr) na spektrofotometru při 420 nm.

U stanovení aktivity enzymu v závislosti na stoupajícím procentuálním obsahu rozpouštědla se postupovalo analogickým postupem s tím rozdílem, že část směsi tvořil aceton nebo acetonitril v obsahu 0–40 obj. %.

Ze získaných hodnot absorbance byla vypočítána aktivita dle vztahu:

$$AKT [U/ml] = \frac{\overline{ABS} \times V_{roztoku} \times \text{ředění}}{k \times V_{enzymu} \times t}$$

Kde  $AKT$  je aktivita enzymu vyjádřená v U/ ml;  $\overline{ABS}$  je průměrná absorbance;  $V_{roztoku}$  je celkový objem reakční směsi [ $\mu$ l];  $\text{ředění}$  je ředění enzymu v reakční směsi;  $k$  je směrnice kalibrační přímky závislosti absorbance na koncentraci  $p$ -nitrofenolu v reakční směsi [l/mmol];  $V_{enzymu}$  je objem enzymu přidaného k reakční směsi [ $\mu$ l] a  $t$  je reakční čas [min].



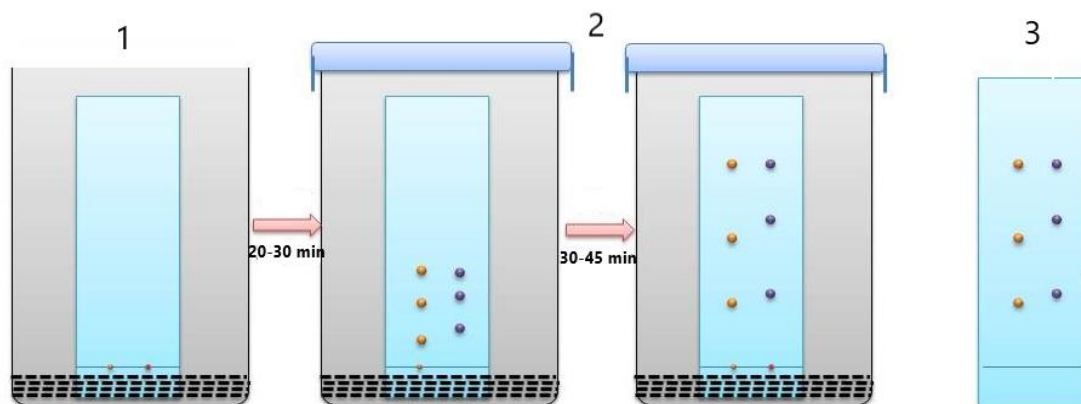
**Obr. 7: Kalibrační přímka.** Závislost absorbance na koncentraci  $p$ -nitrofenolu pro stanovení enzymové aktivity. Lineární regresí byla proložena přímka s rovnicí  $A_{420} = 0,7246 \times c(pNP)$  se stanovenou konstantou úměrnosti  $k = 0,7246$ .

## 4.4 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je založena na principu separace, která závisí na afinitě sloučenin ke stacionární a mobilní fázi. Sloučeniny pod vlivem mobilní fáze procházejí po povrchu fáze stacionární a dochází k separaci sloučenin na základě jejich velikosti a polariry. Tím dojde k oddělení sloučenin. Při detekci (viz níže) jsou jednotlivé látky na desce zobrazeny jako skvrny, které můžeme porovnat s nanesenými standardy [30].

Na připravenou desku stacionární fáze byl kapilárou nanesen vzorek (3 kapky) probíhající transglykosylační reakce. Na stejnou desku byly naneseny i standardy (*p*NP-Gal, galaktosa, GlcNAc-N<sub>3</sub>) pro porovnání retence.

Deska s nanesenými vzorky byla vyvíjena v mobilní fázi cca 45 minut, poté byla vysušena a pozorována napřed pod UV světlem pro detekci UV-aktivních sloučenin, kde byl vidět *p*NP-OH a ubývající donor. Deska byla pak vložena do 5% kyseliny sírové v ethanolu a skvrny byly vizualizovány zahřátím horkovzdušnou pistolí cca 10 s. Výsledkem byly skvrny odpovídající sloučeninám v reakční směsi.



**Obr. 8:** Schéma tenkovrstvé chromatografie. (převzato a upraveno z [31]). 1- vyvíjecí cela s mobilní fází se vzorky nanesenými na startu TLC desky; 2- vzorky jsou unášeny po povrchu stacionární fáze a dochází k jejich dělení; 3- separované látky ve směsi dle velikosti a polariry.

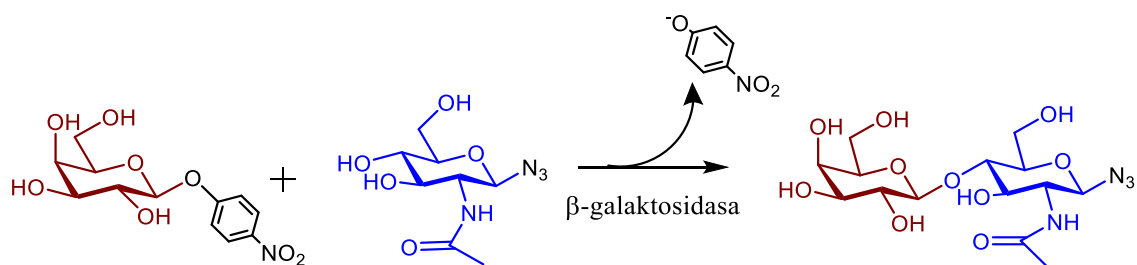
## 4.4 Enzymová syntéza

### 4.4.1 Analytická reakce

Pro přípravu produktu  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcNAc-N<sub>3</sub> (LacNAc-N<sub>3</sub>) byl použit jako donor *p*NP-Gal (30 mM) a akceptor GlcNAc-N<sub>3</sub> (100-250 mM) v 0-40 % acetonitrilu v 50 mM acetátovém pufru pH 5 nebo fosforečnanovém pufru pH 7,5 za katalýzy  $\beta$ -galaktosidasou (0,07-0,25 U/ml) v reakční směsi o objemu 1 ml.

### 4.4.2 Preparativní reakce

Do tří mikrokumavek bylo naváženo 3 $\times$ 9 mg *p*NP-Gal, 3 $\times$ 37 mg GlcNAc-N<sub>3</sub>, přidáno 3 $\times$ 800  $\mu$ l 50 mM acetátového pufru pH 5 nebo fosforečnanového pufru pH 7,5 a 3 $\times$ 200  $\mu$ l acetonitrilu (v případě vyššího obsahu rozpouštědla bylo množství pufru adekvátně sníženo). Mikrokumavky se směsí byly vloženy do termomixéru při 37 °C a 850 otáčkách za minutu a po jedné minutě preinkubace bylo přidáno 0,07-0,25 U/ml enzymu, čímž se zahájila reakce. Přibližně každou hodinu byla provedena analýza reakční směsi tenkovrstvou chromatografií, dle čehož jsme identifikovali, kolik v reakci zbylo donoru a kolik naopak přibylo produktu. Po úbytku cca 90 % donoru byla reakce zastavena tepelnou inaktivací enzymu při 99 °C po dobu 2 minut. Délka reakce závisela na množství přidaného enzymu (cca 6-25 hod).



**Obr. 9:** Reakční schéma vzniku LacNAc-N<sub>3</sub> (vytvořeno v programu ChemDraw Prime). Transglykosylační reakce *p*NP-Gal jako donoru s GlcNAc-N<sub>3</sub> akceptorem za vzniku  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcNAc-N<sub>3</sub> (LacNAc-N<sub>3</sub>) byla katalyzovaná  $\beta$ -galaktosidasou z *Bacillus circulans* (přípravek Biolacta).

Po ukončení reakce byla směs stočena po dobu 10 minut při 13 500 otáčkách za minutu. Na dně mikrozkušavek zůstal pelet denaturovaného enzymu a nad ním supernatant se zbytky reakčních substrátů a produktem, který byl odebrán do baňky. Pelet byl promyt ještě 100  $\mu$ l destilované vody a připojen k supernatantu. Takto připravený vzorek byl nanesen na kolonu gelové chromatografie ekvilibrované v ultračisté vodě. Po nasáknutí do gelu byl vzorek převrstven 3 ml destilované vody a po zasáknutí se kolona převrstvila vodou, uzavřela a byl zapnut automatický sběrač frakcí s časovou prodlevou 14 hodin. Frakce byly sbírány po 2 ml do zkumavek.

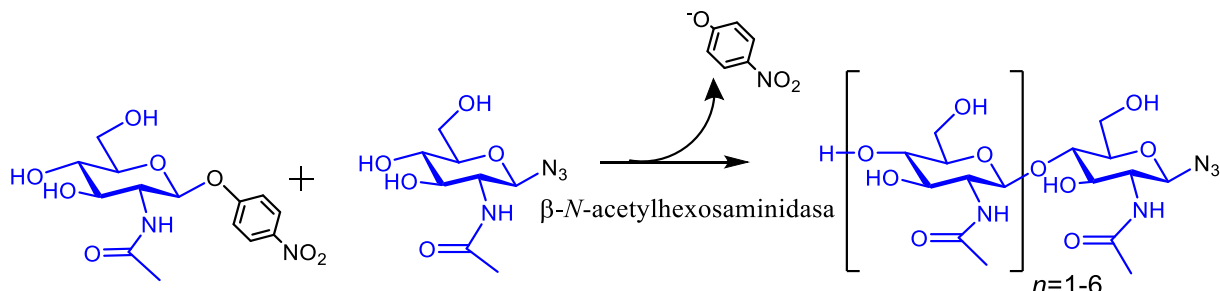
Po dokončení gelové chromatografie se jednotlivé frakce analyzovaly TLC s reakční směsí jako standardem. Frakce obsahující produkt a zbytek akceptoru byly spojeny a lyofilizovány. Čistoty látek byly ověřeny pracovníky laboratoře pomocí HPLC a NMR. Recyklovaný akceptor byl poté použit v dalších reakcích.

#### 4.4.3 Příprava chitooligomerních linkerů

Příprava chitooligomerních linkerů probíhala podobně jako transglykosylační reakce z kapitoly 4.4.2. Jako donor byl použit *p*NP-GlcNAc (50 mM) a akceptor GlcNAc-N<sub>3</sub> (100 mM) v pufru McIlvaine pH 5 za katalýzy mutantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou z *T. flavus* Y470N (připravena jinými pracovníky laboratoře).

Do tří mikrozkušavek bylo naváženo 3 $\times$ 17 mg *p*NP-GlcNAc a 3 $\times$ 25 mg GlcNAc-N<sub>3</sub>. Bylo přidáno 927,5  $\mu$ l pufru a po minutové inkubaci v termomixéru při 35 °C na 1000 otáček za minutu byla reakce spuštěna 0,42 U/ml (30,8  $\mu$ l) enzymu. Každých 30 minut byla provedena analýza tenkovrstvou chromatografií, abychom viděli, kolik v reakci zbývá donoru. Po jeho téměř 90% spotřebování, což nastalo cca po dvou hodinách, byla do reakce přidána další dávka donoru

(*p*NP-GlcNAc, 3×17 mg). Po šesti hodinách byla reakce zastavena denaturací enzymu (99 °C, 2 min). Další zpracování reakční směsi probíhalo stejně jako v kap. 4.4.2.



**Obr. 10:** Reakční schéma vzniku funkcionalizovaných chitooligomerů (vytvoreno v programu ChemDraw Prime). Reakce donoru *p*NP-GlcNAc a akceptoru GlcNAc-N<sub>3</sub> byla katalyzovaná mutantní  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasou Y470N z *T. flavus*.

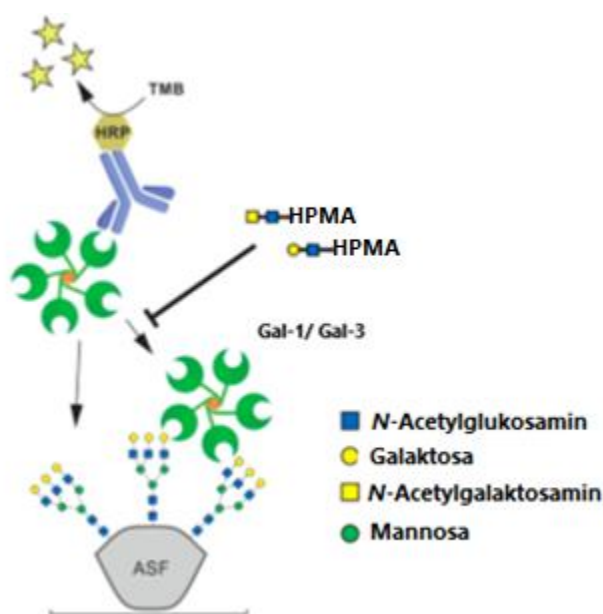
## 4.5 Kompetitivní ELISA stanovení

Pomocí kompetitivní metody ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) byla stanovena afinita ligandů ke Gal-1 a Gal-3. Pozitivní kontrolou byla laktosa, negativní kontrolou byl pufr EPBS.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo multikanálovou pipetou napipetováno 50  $\mu$ l 0,1  $\mu$ M roztoku asialofetuinu (ASF) v PBS a ponecháno inkubovat přes noc při laboratorní teplotě. ASF je multivalentní glykoprotein prezentující tři *N*-glykany zakončené devíti molekulami LacNAc.

Druhý den ráno byla destička promyta 3×250  $\mu$ l PBS Tween, aby se odstranil nenavázaný ASF. Poté byly jamky blokovány 250  $\mu$ l 2% hovězího sérového albuminu (BSA) 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následovalo promytí 3×250  $\mu$ l PBS Tween a bylo nanášeno 25  $\mu$ l vzorku testovaných inhibitorů v různých koncentracích spolu 25  $\mu$ l příslušného galektinu (Gal-1 nebo Gal-3, výsledná koncentrace 10  $\mu$ M). Následovala inkubace (2 hod při laboratorní teplotě)

s následným promytím ( $3 \times 250 \mu\text{l}$  PBS Tween) a přidáním  $50 \mu\text{l}$  myší protilátky konjugované s křenovou peroxidasou v PBS (Anti-His<sub>6</sub>-peroxidasa, ředěna 1: 1000). Po inkubaci (1 hod při laboratorní teplotě) byly jamky promyty ( $3 \times 250 \mu\text{l}$  PBS Tween) a byl přidán substrát TMB One ( $50 \mu\text{l}$ ) pro iniciaci chromogenní reakce s křenovou peroxidasou. Reakce probíhala bez přítomnosti světla a byla zastavena 3 M HCl ( $50 \mu\text{l}$ ) po dosažení absorbance 0,9-1 při 450 nm (Magellan Shortcat) [32].

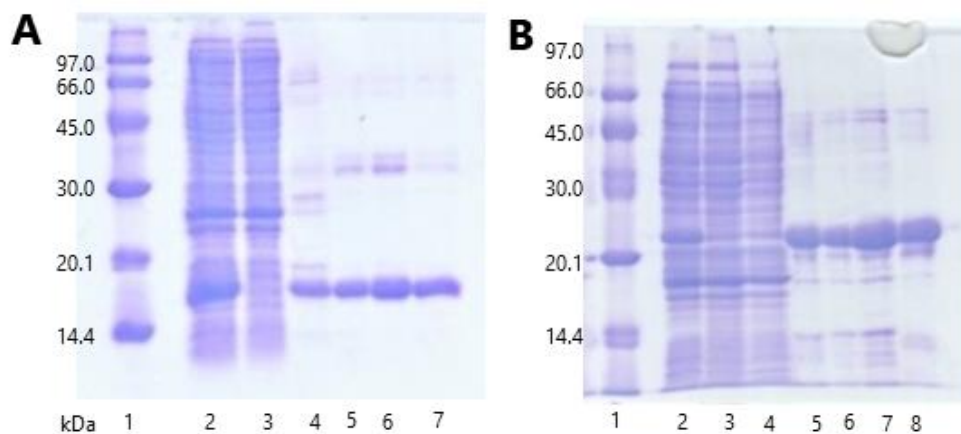


**Obr. 11:** Schéma metody kompetitivní ELISA (převzato a upraveno z [32]). Testované rozpustné glykany a glykopolymeru kompetují o vazbu Gal-1 nebo Gal-3 na imobilizovaný asialofetuin (ASF). Křenová peroxidasa (HRP) mění chromogenní substrát TMB za vzniku barevného výsledku pro spektrofotometrickou detekci.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Produkce a purifikace Gal-1 a -3

Plasmid galektinu byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* pomocí teplotního šoku. Při kultivaci byla exprese galektinu indukována pomocí IPTG. Následně byla bakteriální stěna rozbita sonikací, čímž došlo k uvolnění intracelulárně vyprodukovaného galektinu do lyzátu. Stočený a přefiltrovaný hrubý buněčný extrakt byl navázán na kolonu HisTrap nabitou  $\text{Ni}^{2+}$  ionty díky specifické vazbě pomocí histidinové kotvy, která je umístěna na N-konci proteinového konstruktu. Následně byl čistý galektin eluován elučním pufrem s vysokou koncentrací imidazolu, který rozvolnil vazbu mezi  $\text{Ni}^{2+}$  a histidinovou kotvou galektinu. Imidazol byl z roztoku proteinu odstraněn dialýzou proti EPBS pufru pH 7,5, ve kterém je pak sterilně filtrovaný galektin po dobu 2 měsíců stabilní. Gal-1 má nižší stabilitu než Gal-3, a proto se uchovává ve 20% glycerolu.



**Obr. 12: Analýza průběhu purifikace Gal-1 (A) a Gal-3 (B) pomocí SDS-PAGE . (A) 1- Marker LMW; 2- buněčný extrakt před nanesením vzorku na kolonu; 3- eluát po nanesení vzorku; 4- Gal-1 před dialýzou; 5,6- Gal-1 po dialýze; 7- standard Gal-1. (B) 1- marker LMW; 2- buněčný extrakt před nanesením vzorku na kolonu; 3- eluát po nanesení vzorku; 4- vzorek v ekoilibračním pufru; 5- Gal-3 před dialýzou; 6,7- Gal-3 po dialýze; 8- standard Gal-3.**

Čistota galektinů byla ověřena pomocí SDS elektroforézy, kdy byl na gel nanesen marker, vzorek před nanesením na kolonu, před dialýzou a po dialýze. Molekulová hmotnost Gal-3 je 28 kDa a Gal-1 je 16,5 kDa.

Na produkci Gal-3 bylo použito 16 g buněk z 1,8 l media. Bylo získáno 15 mg čistého Gal-3. Na produkci Gal-1 bylo použito 6,4 g buněk z 600 ml media. Bylo získáno 74 mg čistého Gal-1.

## 5.2 Optimalizace enzymové reakce

Komerční  $\beta$ -galaktosidasa obsahuje jako příměs  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasu, která je schopna degradovat funkcionalizovaný GlcNAc- $N_3$  akceptor, a tak snižovat výtěžek. Cílem optimalizace transglykosylační reakce bylo minimalizovat  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasovou aktivitu oproti  $\beta$ -galaktosidasové, a tak maximalizovat výtěžek produktu LacNAc- $N_3$ .

### 5.2.1 Aktivita enzymového preparátu v různých pH

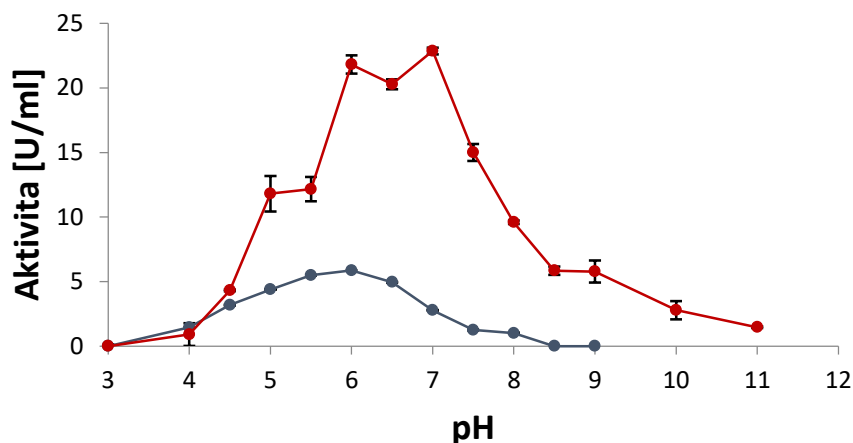
Předmětem zkoumání bylo zjistit, ve kterém pH výrazně klesá  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasová aktivita oproti  $\beta$ -galaktosidasové.

Bylo provedeno proměření obou enzymových aktivit při různých pH v Britton-Robinsonově pufru (pH 2-12) s příslušnými substráty: *p*NP-Gal pro  $\beta$ -galaktosidasovou aktivitu a *p*NP-GlcNAc pro  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasovou aktivitu (stanovení popsáno v kap. 4.3).

Z vypočítaných aktivit pro jednotlivé hodnoty pH (dle vzorce v kap. 4.3) byl sestaven graf závislosti  $\beta$ -galaktosidasové a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasové aktivity na pH reakční směsi. Nežádoucí  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasová aktivita byla nejvíce potlačena v pH 7,5 a 8 (poměr  $\beta$ -galaktosidasa/  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa- 12,0 a 9,6), ale v analytických transglykosylačních reakcích (kap. 4.4.1) se posléze



ukázalo, že v tomto pH není reakce regioselektivní, a tak bylo nakonec zvoleno pH 5 s poměrem aktivit 2,7.



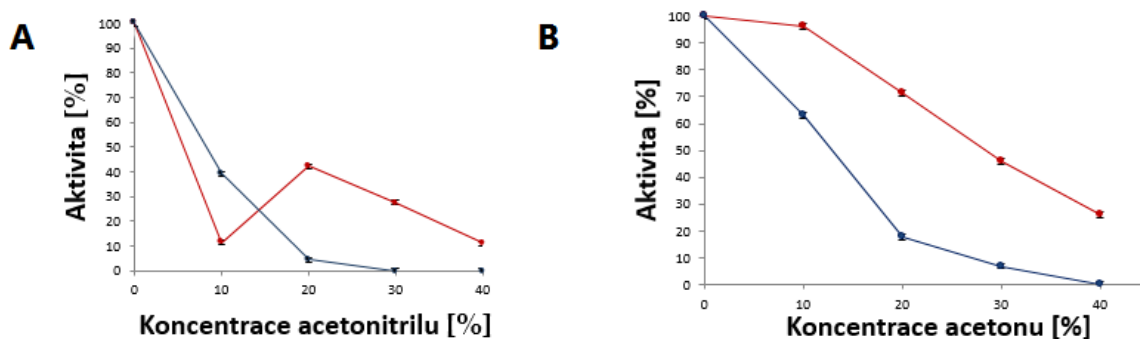
Obr. 13: Porovnání závislosti  $\beta$ -galaktosidasové a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasové aktivity na pH.  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidasová aktivita (modře) byla stanovena se substrátem pNP-GlcNAc a  $\beta$ -galaktosidasová (červeně) s pNP-Gal.

### 5.2.2 Aktivita enzymového preparátu v přítomnosti rozpouštědla

Dále jsme studovali, zda by se nežádoucí  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasová aktivita dala ještě více snížit přidáním vhodného rozpouštědla. V našem případě byl použit aceton a acetonitril v množství 0-40 obj. %. Vliv přítomnosti rozpouštědel jsme sledovali pomocí měření aktivit (průběh stanovení v kap. 4.3).

Závislost enzymové aktivity na vzrůstajícím procentuálním obsahu rozpouštědla v reakční směsi je uvedena na Obr. 14.

Obě rozpouštědla podporovala  $\beta$ -galaktosidasovou aktivitu oproti  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasové. Aceton je rozpouštědlo, které se v reakci rychle vypařuje, a tudíž je nutné ho neustále doplňovat. Dle výsledků vyšel nejlépe 20 % acetonitril, v němž  $\beta$ -galaktosidasová aktivita přesáhla 42 % v porovnání s hodnotou bez rozpouštědla, zatímco  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasová aktivita klesla na 4 % (více než 10 $\times$ ).



Obr. 14: Závislost enzymové aktivity na vzrůstajícím obsahu acetonitrilu (A) a acetonu (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy (červeně) byla měřena se substrátem pNP-Gal a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasy (modře) s pNP-GlcNAc v reakční směsi s obsahem 0-40% rozpouštědla.

Proto výhodnějším rozpouštědlem je 20% acetonitril, u kterého byla  $\beta$ -galaktosidasová aktivita  $136\times$  vyšší než  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasová. Aceton za stejných podmínek měl nejlepší poměr aktivit 53.

## 5.3 Enzymová syntéza

### 5.3.1 Analytické reakce

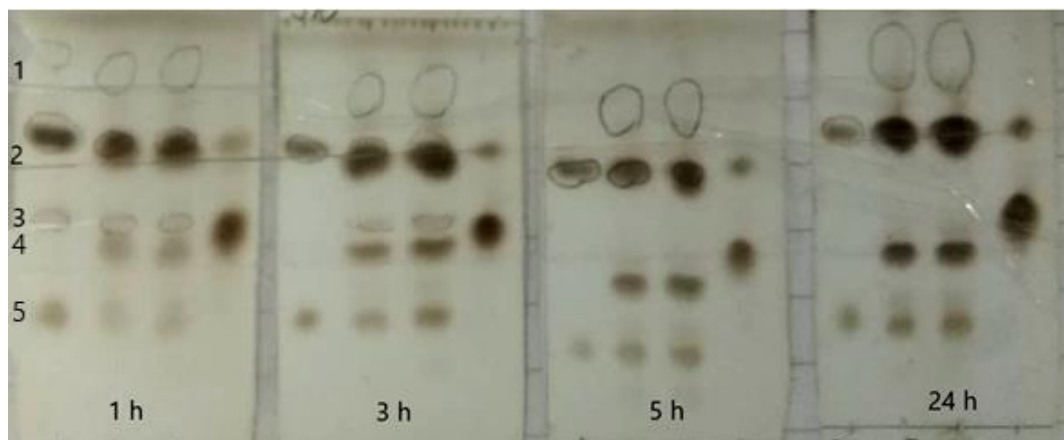
Transglykosylační reakce probíhala s donorem pNP-Gal (30 mM) a akceptorem GlcNAc-N<sub>3</sub> (100-250 mM) při pH 5 nebo 7,5 s přidavkem 20% acetonitrilu za katalýzy komerční  $\beta$ -galaktosidasou z *B. circulans* (preparát Biolacta). V přítomnosti 250 mM akceptoru byla reakce výrazně inhibována a výtěžek LacNAc-N<sub>3</sub> byl nejvíce 5 mg (10 %). Koncentrace akceptoru 150 mM se ukázala jako optimální pro výtěžek produktu. Rychlost reakce úzce souvisela s množstvím přidaného enzymu, při menším množství enzymu byla reakce ukončena až po 24 h a při množství enzymu 0,25 U/ml (10  $\mu$ l) byl donor kompletně zreagován již po 6 hodinách. Úbytek donoru byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie, kdy pod UV světlem bylo vidět, jak donor ubývá.

Optimální podmínky pro maximální výtěžek produktu byly 30 mM *p*NP-Gal, 150 mM GlcNAc-N<sub>3</sub> a 0,07 U/ml (3 μl) enzymu v acetátovém pufru pH 5 s přidavkem 20% acetonitrilu. Reakce probíhala při 35 °C a 850 otáčkách za minutu po dobu 24 hodin.

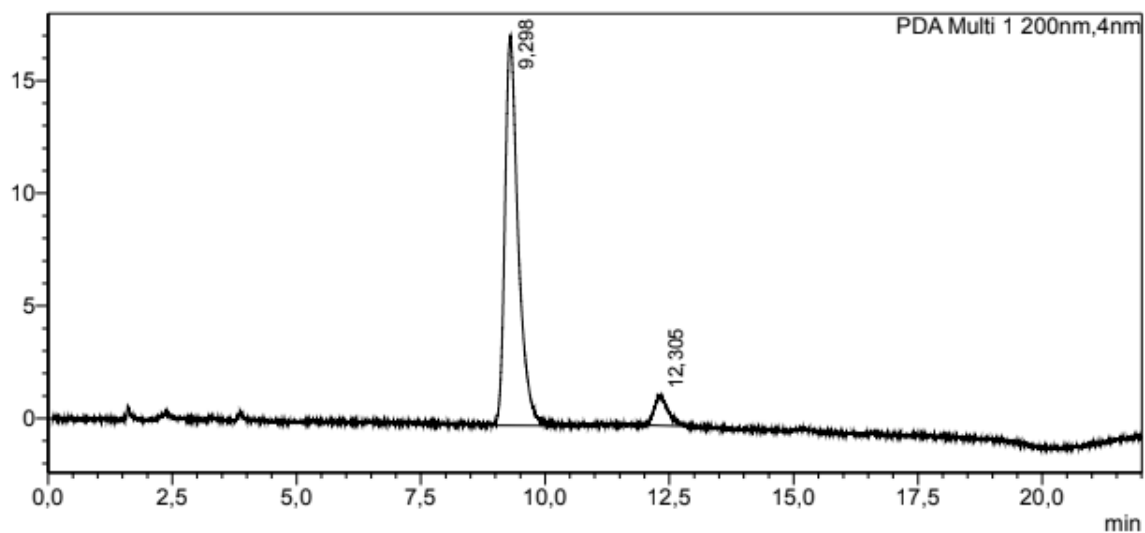
Reakce pro přípravu chitooligomerních linkerů probíhala s donorem *p*NP-GlcNAc (50 mM) a akceptorem GlcNAc-N<sub>3</sub> (100 mM) v pufru McIlvaine (pH 5) za katalýzy mutantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou Y470N (0,42 U/ml) po dobu asi 6 hodin, kdy po 2 hodinách byl do reakce přidán ještě další podíl donoru (100 %). Díky použití mutantního enzymu v reakci neprobíhala hydrolýza a vznikala celá série chitooligomerů.

### 5.3.2 Příprava a purifikace LacNAc-N<sub>3</sub>

Po optimalizaci reakčních podmínek byla provedena transglykosylační reakce v preparativním měřítku pro izolaci produktu LacNAc-N<sub>3</sub>. Reakce byla sledována pomocí tenkovrstvé chromatografie a zastavena při spotřebování donoru tepelnou denaturací enzymu. Po vychladnutí byla reakční směs stočena na minicentrifuze a supernatant byl nanesen na kolonu gelové chromatografie (Biogel P2) připojené ke sběrači frakcí. Po proběhnutí chromatografie byly frakce obsahující požadovaný produkt spojeny a lyofilizovány. Získaný produkt byl analyzován pomocí HPLC a NMR (prováděli jiní pracovníci). Bylo zjištěno, že při pH 7,5 v reakci vzniká neoddělitelná směs produktů  $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-GlcNAc-N<sub>3</sub> a (požadovaný LacNAc-N<sub>3</sub>; Obr. 9) a jeho  $\beta$ (1→6) regioisomer. Proto bylo optimální pH reakce stanoveno jako pH 5. Nejlepší dosažený výtěžek produktu LacNAc-N<sub>3</sub> byl 24 mg (35 %). Charakterizace produktů pomocí NMR je v Příloze 1.



*Obr. 15: TLC transglykosylační reakce pro přípravu LacNAc-N<sub>3</sub>. 1- pNP-OH; 2- donor pNP-Gal spolu s akceptorem GlcNAc-N<sub>3</sub>; 3- stopy GlcNAc; 4- produkt LacNAcN<sub>3</sub>; 5- galaktosa.*



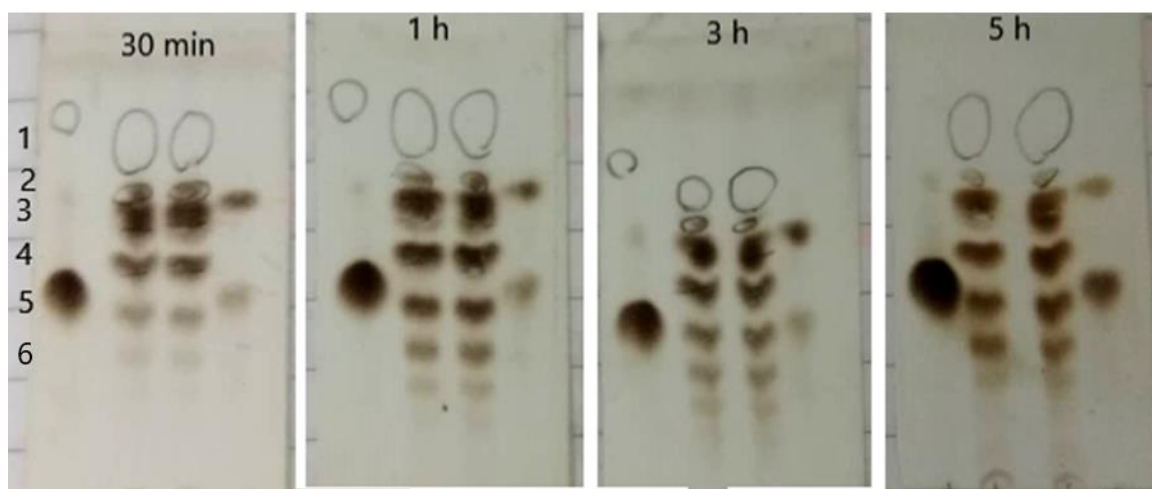
*Obr. 16: HPLC chromatogram (kolona TSK- gel amide 80; 5  $\mu$ m; 250  $\times$  4,6 mm (TOSOH BIOSCIENCE, JP); průtok 1 ml/min, 25  $^{\circ}$ C, detekce při 200 nm naměřila Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.). Produkt LacNAc-N<sub>3</sub> (1) s retenčním časem 9,3 min má čistotu 93 %.*

Charakterizovaný produkt LacNAc-N<sub>3</sub> byl dále předán ke konjugaci na dendrimerní linker a posléze na polymer do Ústavu makromolekulární chemie AV ČR na Oddělení biolékařských polymerů (Mgr. Petr Chytil, Ph.D.).

### 5.3.3 Příprava a purifikace chito oligomerních linkerů

Po optimalizaci reakčních podmínek byly připraveny preparativní transglykosylační reakcí chito oligosacharidy s různým množstvím sacharidových podjednotek, nesoucí azidovou skupinu na C-1 (Obr. 10). Dle předchozích protokolů byl po dvou hodinách od začátku reakce přidán do reakce další donor pro zvýšení celkového výtěžku. Pomocí TLC (Obr. 17) bylo určeno, kdy je veškerý donor v reakci spotřebován, což nastalo po šesti hodinách. Reakce byla ukončena, výsledný roztok byl po odstranění enzymu centrifugací nanesen na kolonu gelové chromatografie, jak je popsáno v kap. 5.3.2. V reakci vznikla sada chito oligomerů  $(\text{GlcNAc})_2\text{-N}_3$  až  $(\text{GlcNAc})_6\text{-N}_3$  ( $N,N'$ -diacetylchitobiosylazid až  $N,N',N'',N''',N''''',N''''''$ -hexaacetylchitohexaosylazid). Pouze chito oligomery se dvěma až čtyřmi jednotkami GlcNAc byly získány v dostatečné čistotě ke strukturální charakterizaci NMR (viz Příloha 2)

Pomocí HPLC (Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.) byla zjištěna čistota jednotlivých látek (viz Tab. 1).



Obr. 17: TLC transglykosylační reakce pro přípravu funkcionalizovaných chito oligomerů. 1- pNP-OH; 2- donor pNP-GlcNAc; 3- akceptor GlcNAc-N<sub>3</sub>; 4-  $(\text{GlcNAc})_2\text{-N}_3$ ; 5-  $(\text{GlcNAc})_3\text{-N}_3$ ; 6-  $(\text{GlcNAc})_4\text{-N}_3$ .

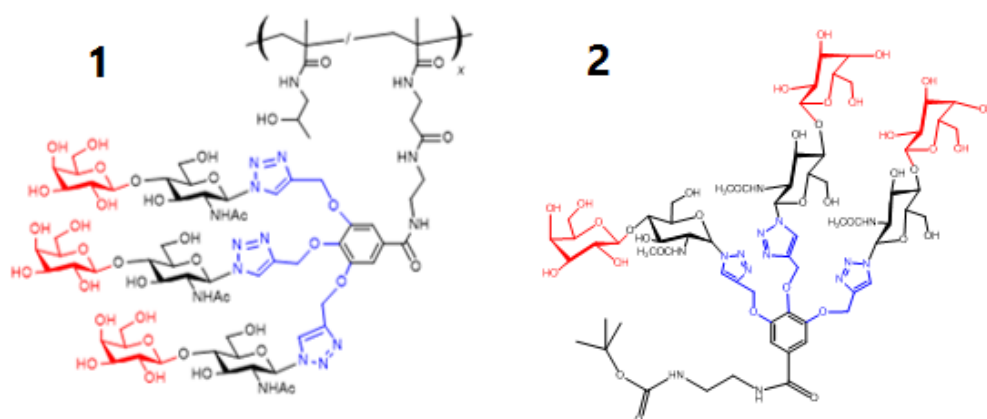
Tab. 1: Funkcionalizované chitooligomery, jejich výtěžek a čistota.

Produkt	Výtěžek [mg]	Čistota [%]
$N,N',N'',N''',N''''',N''''''-$	1	< 80
$N,N',N'',N''',N''''$ -pentaacetylchitopentosylazid	3	< 80
$N,N',N'',N'''$ -tetraacetylchitotetrosylazid	7	88
$N,N',N''$ -triacetylchitotriosylazid	12	97
$N,N'$ -diacetylchitobiosylazid	16	99

Na vzniklé funkcionalizované chitooligomery může být vnesen transglykosylací terminální  $\beta$ -galaktosyl a po konjugaci na polymer může být zkoumána jejich afinita ke galektinům a vliv délky chitooligomerního řetězce na účinnost a výslednou afinitu.

## 5.4 Inhibiční potenciál připravených látek s galektiny

Inhibiční potenciál látek s Gal-1 a Gal-3 byl stanoven pomocí metody kompetitivní ELISA jako  $IC_{50}$ , což je koncentrace ligandů, při níž je dosaženo 50% inhibice vazby galektinů k imobilizovanému ligandu ASF. Byl studován volný disacharid LacNAc, dendrimerní linker se třemi molekulami LacNAc a glykopolymer s obsahem 22 mol. % LacNAc. Všechna stanovení probíhala ve triplicátu. Získaná data byla vyhodnocena v programu Graphpad Prism (model *log(inhibitor) vs. response - variable slope*), byl vytvořen graf závislosti absorbance na koncentraci inhibitoru a vypočtena hodnota  $IC_{50}$  k jednotlivým galektinům.



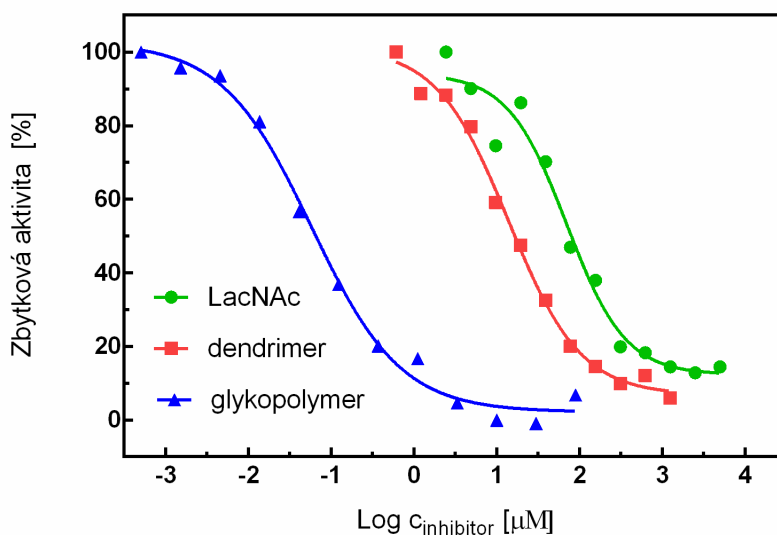
Obr. 18: Struktury použitých glykokonjugátů. 1- Konjugát HPMA kopolymeru s navázaným sacharidem LacNAc (22 mol. %); 2- trivalentní dendrimer se třemi navázanými molekulami LacNAc.

Tab. 2: Stanovení inhibičního potenciálu připravených látek ke Gal-1.

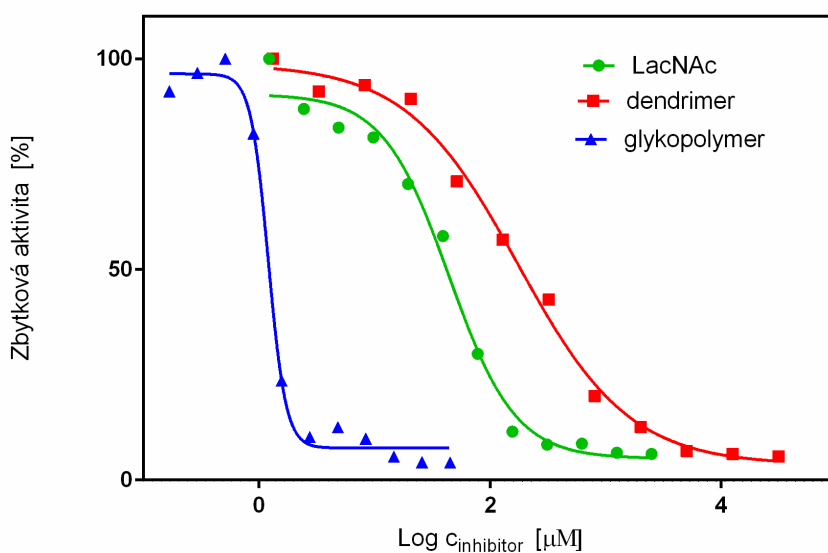
Inhibitor	Počet glykanů	$M_w/M_n$ [g/mol]	$IC_{50}$ na konjugát [ $\mu M$ ]	$IC_{50}$ na glykan [ $\mu M$ ]
LacNAc	1	383	-	$62 \pm 9$
Dendrimer	3	1652	$9 \pm 1$	$26 \pm 4$
Glykopolymer	27,8 (22 mol. %)	32 400	$0,08 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,4$

Tab. 3: Stanovení inhibičního potenciálu připravených látek ke Gal-3.

Inhibitor	Počet glykanů	$M_w/M_n$ [g/mol]	$IC_{50}$ na konjugát [ $\mu M$ ]	$IC_{50}$ na glykan [ $\mu M$ ]
LacNAc	1	383	-	$44 \pm 7$
Dendrimer	3	1652	$7 \pm 2$	$21 \pm 6$
Glykopolymer	27,8 (22 mol. %)	32 400	$1,5 \pm 0,3$	$42 \pm 8$



Obr. 19: Inhibiční potenciál připravených látek ke Gal-1.



Obr. 20: Inhibiční potenciál připravených látek ke Gal-3.

Konjugát HPMA kopolymeru s navázaným sacharidem LacNAc vykazoval více než osmnáctkrát vyšší afinitu (nižší IC<sub>50</sub>; 80 nM vs. 1,5 µM) ke Gal-1 než Gal-3, ačkoliv volný LacNAc je lepším inhibítorem Gal-3 než Gal-1 (44 µM vs. 62 µM). Dendrimerní trivalentní konjugáty byly pro dané galektiny silnějšími inhibitory než volný LacNAc.



## 6. DISKUZE

Galektiny jsou proteiny účastníci je mnoha dějů v našem organismu, jako jsou mezibuněčné interakce, transmembránová signalizace, apoptóza a buněčná adheze. Některé typy galektinů se podílejí na patofyziologických procesech, z nichž nejdiskutovanějším je proces kancerogeneze, který je u mnoha typů nádorů doprovázen zvýšeným výskytem některých galektinů, zvláště Gal-1 a Gal-3, v krevním séru [1; 2].

Selektivní inhibice galektinů pomocí biokompatibilních glykopolymerů s konjugovanými sacharidovými ligandy je perspektivní experimentální metodou imunoterapie vybraných nádorů. Tato práce je zaměřena na studium afinity disacharidu LacNAc konjugovaného na HPMA kopolymer ke Gal-1 a Gal-3. HPMA kopolymer je pro organismus netoxický, neimunogenní a biologicky kompatibilní, a proto je vhodným kandidátem pro budoucí *in vivo* aplikace [21].

Příprava funkcionalizovaného LacNAc epitopu probíhala enzymovou syntézou za katalýzy komerční  $\beta$ -galaktosidasou, obsahující jako příměs  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasu, která štěpí GlcNAc-N<sub>3</sub> akceptor, což má za následek nižší výtěžek požadovaného funkcionalizovaného produktu  $\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-GlcNAc-N<sub>3</sub> (LacNAc-N<sub>3</sub>). Aktivita  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy byla výrazně potlačena kombinací vhodného pH a přídavku kosolventu, takže reakce probíhala selektivně a s dobrým výtěžkem (až 35 %)

Hodnota pH byla klíčová pro regioselektivitu reakce. Zatímco při pH 7,5 byla reakce neselektivní, vznikaly dva regioisomery požadovaného produktu ( $\beta$ (1→4) a  $\beta$ (1→6)) a výtěžnost byla značně nižší, při pH 5 byla reakce regioselektivní a vznikal pouze požadovaný produkt. Pro potlačení nežádoucí aktivity se ukázala jako nejlepší varianta 20% acetonitril. Aceton se v reakci rychle vypařoval, tudíž byla třeba neustálá kontrola a doplňování.

Po zajištění optimálních reakčních podmínek probíhala syntéza při 35 °C a 850 otáčkách za minutu v termomixéru. Teplota mezi 30 a 40 °C je optimální, protože vyšší teplota reakce podporuje hydrolyzu na úkor syntézy, což by znamenalo menší výtěžek transglykosylačního produktu.

Výtěžky disacharidu LacNAc-N<sub>3</sub> v preparativních reakcích se pohybovaly mezi 6-35 %. Před úpravou podmínek byly značně nižší, za což mohla právě nežádoucí β-N-acetylhexosaminidasová aktivita. Po jejím potlačení byl minimální izolovaný výtěžek z reakce 21 %, což bylo již přijatelné množství pro získání dostatečného množství disacharidu pro konjugaci na polymer.

Galektiny nesoucí histidinovou kotvu pro snazší purifikaci byly produkovány v buňkách *E. coli* Rosetta 2 pLysS. Čistota galaktinů získaných purifikací afinitní chromatografií je asi 95 %, což je pro účely ELISA stanovení dostatečné. Pro případně krystalografické studie by bylo třeba čistotu galektinu zvýšit další metodou, například gelovou chromatografií. Purifikované galektiny jsou stabilní po dobu asi dvou měsíců po uchování v příslušném roztoku. Gal-1 je uchováván ve 20% glycerolu v EPBS pufru a Gal-3 v pouze v EPBS pufru, a to v koncentraci asi 50-200 μM. Vyšší koncentrace vedou k precipitaci galektinů a zakoncentrování galektinů např. ultracentrifugací je problematické z důvodu jejich absorpce na ultracentrifugační membránu.

Konjugace připraveného disacharidového epitopu probíhala za spolupráce s Oddělením biolékařských polymerů (Mgr. Petr Chytil, Ph.D.) na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR.

Inhibiční potenciál připravených látek byl měřen pomocí kompetitivní metody ELISA. Vyhodnocením experimentálních dat byla získána hodnota IC<sub>50</sub>, což je koncentrace inhibitoru, při níž je dosaženo 50% inhibice vazby galektinu k imobilizovanému standardnímu ligandu asialofetuinu. Byl studován volný LacNAc, trivalentní dendrimer se třemi molekulami LacNAc a LacNAc

konjugovaný na HPMA kopolymer v množství 22 mol. %. Konjugace epitopu na dendrimer zvýšila aviditu vůči oběma galektinům, zvláště vůči Gal-1. Při konjugaci dendrimeru na polymer bylo umožněno navázání epitopů ve vyšší hustotě, než by bylo možné při lineární prezentaci, což mělo za následek ještě vyšší inhibici Gal-1, dosahující nanomolárních hodnot  $IC_{50}$ . U Gal-3 nebyla tato vysoká hustota prezentace výhodná a totožný konjugát vykazoval inhibici pouze v mikromolárních hodnotách. Původním výsledkem této práce je poznatek, že Gal-1 na rozdíl od Gal-3 toleruje vyšší hustotu epitopu, tudíž lze volbou koncentrace epitopu na polymeru manipulovat selektivitu mezi oběma galektiny. U připraveného glykopolymerního konjugátu HPMA-LacNAc bylo dosaženo více než 18-násobného zvýšení selektivity vůči Gal-1 v porovnání s Gal-3.

## 7. ZÁVĚR

V rámci teoretické části práce byly shrnuty poznatky o galektinech a jejich přirozených i syntetických ligandech. Byly charakterizovány glykosidasy, zejména  $\beta$ -galaktosidasa a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa využité pro transglykosylační reakce.

V experimentální části byly vyprodukovány galektiny o výtěžku 74 mg pro Gal-1 a 15 mg pro Gal-3.

Dále byla provedena optimalizace reakčních podmínek pro enzymovou syntézu disacharidu  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcNAc-N<sub>3</sub> a v několika reakcích bylo připraveno celkem více než 100 mg tohoto disacharidu ve výtěžku až 35 %.

Vyprodukovaný disacharid byl za spolupráce s Mgr. Petrem Chytilým, Ph.D. (ÚMCH AV ČR) konjugován na HPMA kopolymer a byl změřen inhibiční potenciál připravených glykopolymerů ke Gal-1 a Gal-3. Pro oba galektiny se jevil jako nejúčinnější glykopolymer s 22 mol. % LacNAc. Pro Gal-1 je tento ligand téměř 20 $\times$  selektivnější, dosahoval IC<sub>50</sub> 0,08  $\pm$  0,01  $\mu$ M, zatímco pro Gal-3 pouze 1,5  $\pm$  0,3  $\mu$ M.

Byla provedena enzymová syntéza funkcionalizovaných chitooligomerů za katalýzy mutantní  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasou s celkovým výtěžkem 39 mg sacharidových epitopů s různou délkou monosacharidových podjednotek. Takto připravené chitooligomery mohou sloužit jako akceptory pro terminální galaktosylaci.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ABS: absorbance
- ASF: asialofetuin
- CRD: doména rozpoznávající sacharid („*carbohydrate recognition domain*“)
- DOX: doxorubicin
- EPR: zvýšená permeabilita a retence („*enhanced permeability and retention*“)
- Gal-1 / Gal-3: galektin-1/ -3
- G-CSF; GM-CSF: faktor stimulující kolonie granulocytů
- HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HPMA: *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamid
- HSA: lidský sérový albumin („*human serum albumin*“)
- IgG: imunoglobulin G
- IL-5, 6, 10: interleukiny
- IPTG: isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid
- *LacA*, *LacZ*: strukturní geny lac operonu
- LacdiNAc: *N*, *N'*-diacetylaktosamin ( $\beta$ -D-GalNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc)
- LacNAc: *N*-acetylaktosamin ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc)
- LB: medium Luria-Bertani
- LMW: marker na SDS elektroforézu („*Low Molecular Weight*“)
- NDP: nukleosiddifosfáty
- NK: přirozené zabíječské buňky („*Natural Killer Cells*“)
- PMSF: fenylmethylsulfonylfluorid
- *p*NP-Gal: *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
- *p*NP-GlcNAc: *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosid
- TLC: chromatografie na tenké vrstvě
- EPBS: Pufr pro stanovení ELISA

- PBS: Pufr pro stanovení ELISA
- TMB: Substrát pro ELISA stanovení (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin)
- DTT: Dithiothreitol
- TEMED: Tetramethylethyldiamin

## 9. BIBLIOGRAFIE

- [1] BARONDES, S., D. COOPER, M. GITT a H. LEFFLER. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, **269**(33), 20807-20810. ISSN 0021-9258. 8063692.
- [2] KOMATH, Sneha, Mannem KAVITHA a Musti SWAMY. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2006, **4**(6), 973-988. DOI: 10.1039/b515446d. ISSN 1477-0520.
- [3] STORTI, Paola, Valentina MARCHICA a Nicola GIULIANI. Role of Galectins in Multiple Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(12). DOI: 10.3390/ijms18122740. ISSN 1422-0067.
- [4] BATZKE, Katharina, Gabriele BÜCHEL, Wiebke HANSEN a Alexander SCHRAMM. TrkB-Target Galectin-1 Impairs Immune Activation and Radiation Responses in Neuroblastoma: Implications for Tumour Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(3). DOI: 10.3390/ijms19030718. ISSN 1422-0067.
- [5] KINDT, Nadège, Fabrice JOURNE, Ghanem GHANEM a Sven SAUSSEZ. Galectins and Carcinogenesis: Their Role in Head and Neck Carcinomas and Thyroid Carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(12). DOI: 10.3390/ijms18122745. ISSN 1422-0067.
- [6] Galectin, carbohydrate recognition domain. *InterPro: Protein sequence analysis & classification* [online]. b.r. [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001079>
- [7] RÖMER, Christiane E. a Lothar ELLING. Galectins: Structures, Binding Properties and Function in Cell Adhesion. *Biomaterials - Physics and Chemistry*. InTech, 2011. DOI: 10.5772/24647. ISBN 978-953-307-418-4.
- [8] YANG, Ri-Yao, Gabriel RABINOVICH a Fu-Tong LIU. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2008, **10**(17). DOI: 10.1017/S1462399408000719. ISSN 1462-3994.

- [9] THIJSSSEN, Rachel, Erik SLINGER, Katinka WELLER, Christian R. GEEST, Tim BEAUMONT, Marinus H. J. VAN OERS, Arnon P. KATER a Eric ELDERING. Resistance to ABT-199 induced by microenvironmental signals in chronic lymphocytic leukemia can be counteracted by CD20 antibodies or kinase inhibitors. *Haematologica*. DOI: 10.3324/haematol.2015.124560. ISSN 0390-6078.
- [10] CAMBY, Isabelle, Marie LE MERCIER, Florence LEFRANC a Robert KISS. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006, **16**(11), 137-157. DOI: 10.1093/glycob/cwl025. ISSN 1460-2423.
- [11] BOJAROVÁ, Pavla a Vladimír KŘEN. Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives. *Biomaterials Science*. 2016, **4**(8), 1142-1160. DOI: 10.1039/C6BM00088F. ISSN 2047-4830.
- [12] CAO, Zhan-Qi a Xiu-Li GUO. *The role of galectin-4 in physiology and diseases*. 2016, **7**(5), 314-324. DOI: 10.1007/s13238-016-0262-9. ISSN 1674-800X.
- [13] TRIMBOLI, Pierpaolo, Camilla VIRILI, Francesco ROMANELLI, Anna CRESCENZI a Luca GIOVANELLA. Galectin-3 Performance in Histologic and Cytologic Assessment of Thyroid Nodules: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(8). DOI: 10.3390/ijms18081756. ISSN 1422-0067.
- [14] WADOWIAK, Kamil, Tomasz FRANCUZ, Enrique GALLEG0-COLON, Natalia RUIZ-AGAMEZ, Marcin KUBECZKO, Iga GROCHOŁA a Jerzy WOJNAR. Galectin Targeted Therapy in Oncology: Current Knowledge and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(1). DOI: 10.3390/ijms19010210. ISSN 1422-0067.
- [15] FARHAD, Mohammad, Annah ROLIG a William REDMOND. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *OncImmunity*. 2018, **7**(6). DOI: 10.1080/2162402X.2018.1434467. ISSN 2162-402X.
- [16] PI3K-AKT Signaling Pathway. *Creative Diagnostics* [online]. USA, b.r. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://www.creative-diagnostics.com/PI3K-AKT-Signaling-Pathway.htm>



- [17] SCHULZ, Heiko, Elisa SCHMOECKEL, Christina KUHN, Simone HOFMANN, Doris MAYR, Sven MAHNER a Udo JESCHKE. Galectins-1, -3, and -7 Are Prognostic Markers for Survival of Ovarian Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(6). DOI: 10.3390/ijms18061230. ISSN 1422-0067.
- [18] COLOWICK, Nathan P. a Nathan P. KAPLAN. Methods in enzymology. *Medicine: general issues*. b.r., **618**. ISSN 0076-6879.
- [19] LAAF, Dominic, Pavla BOJAROVÁ, Lothar ELLING a Vladimír KŘEN. Galectin–Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2019, **37**(4), 402-415. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.10.001. ISSN 01677799.
- [20] ULBRICH, Karel a Blanka ŘÍHOVÁ. *Léčiva pro cílenou léčbu nádorů*. 1. Praha: Academia, 2018, 56 s. ISBN 978-80-200-2844-0.
- [21] KOPEČEK, Jindřich a Pavla KOPEČKOVÁ. HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, **62**(2), 122-149. DOI: 10.1016/j.addr.2009.10.004. ISSN 0169409X.
- [22] SLÁMOVÁ, Kristýna, Jana KREJZOVÁ, Petr MARHOL, Lubica KALACHOVA, Natallia KULIK, Helena PELANTOVÁ, Josef CVAČKA a Vladimír KŘEN. *Synthesis of Derivatized Chitooligomers using Transglycosidases Engineered from the Fungal GH20  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase*. 2015, **357**(8), 1941-1950. DOI: 10.1002/adsc.201500075. ISSN 16154150.
- [23] DANBY, Phillip a Stephen WITHERS. Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis. *ACS Chemical Biology*. 2016, **11**(7), 1784-1794. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00340. ISSN 1554-8929.
- [24] ISHIKAWA, Kazuhiko, Misumi KATAOKA, Toshiaki YANAMOTO, Makoto NAKABAYASHI, Masahiro WATANABE, Satoru ISHIHARA a Shotaro YAMAGUCHI. Crystal structure of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382 (BgaD) and the construction of the thermophilic mutants. *FEBS Journal*. 2015, **282**(13), 2540-2552. DOI: 10.1111/febs.13298. ISSN 1742464X.
- [25] FISCHER, Christin a Thomas KLEINSCHMIDT. Synthesis of Galactooligosaccharides

- in Milk and Whey: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018, **17**(3), 678-697. DOI: 10.1111/1541-4337.12344. ISSN 15414337.
- [26] SLÁMOVÁ, Kristýna, Pavla BOJAROVÁ, Lucie PETRÁSKOVÁ a Vladimír KŘEN.  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase: What's in a name...?. *Biotechnology Advances*. 2010, **28**(6), 682-693. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.04.004. ISSN 07349750.
- [27] BOJAROVÁ, Pavla a Vladimír KREN. Glycosidases in Carbohydrate Synthesis: When Organic Chemistry Falls Short. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 2011, **65**(1), 65-70. DOI: 10.2533/chimia.2011.65. ISSN 00094293.
- [28] AIRES-TRAPOTE, Antonio, Aitana TAMAYO, Juan RUBIO, Angel RUMBERO a María HERNÁIZ. Sustainable synthesis of N-acetyllactosamine using an immobilized  $\beta$ -galactosidase on a tailor made porous polymer. *RSC Advances*. 2015, **5**(50), 40375-40383. DOI: 10.1039/C5RA03527A. ISSN 2046-2069.
- [29] BOJAROVÁ, Pavla a Vladimír KŘEN. Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2009, **27**(4), 199-209. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.12.003. ISSN 01677799.
- [30] Thin Layer Chromatography (TLC): Principle and Procedure. *Owlcation* [online]. 2015 [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <https://owlcation.com/stem/tlc-thin-layer-chromatography-Principle-Procedure>
- [31] Chromatography - Thin Layer Chromatography. *B for biology* [online]. 2017 [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <http://namrataheda.blogspot.com/2017/02/chromatography-thin-layer-chromatography.html>
- [32] BUMBA, Ladislav, Dominic LAAF, Vojtěch SPIWOK, Lothar ELLING, Vladimír KŘEN a Pavla BOJAROVÁ. Poly-N-Acetyllactosamine Neo-Glycoproteins as Nanomolar Ligands of Human Galectin-3: Binding Kinetics and Modeling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(2), 3-4. DOI: 10.3390/ijms19020372. ISSN 1422-0067.

## 10. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obr. 1: Typy galektinů a tvorba galektinových mřížek.....	13
Obr. 2: Struktury pasivně směřovaných polymerních léčiv .....	21
Obr. 3: Strukturní vzorec <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA) .....	23
Obr. 4: Struktury multivalentních glykanů.....	25
Obr. 5: Reakce katalyzované glykosidasami .....	28
Obr. 6: Transglykosylační reakce katalyzovaná $\beta$ -galaktosidasou z <i>Bacillus circulans</i> .....	29
Obr. 7: Kalibrační přímka.....	41
Obr. 8: Schéma tenkovrstvé chromatografie .....	42
Obr. 9: Reakční schéma vzniku LacNAcN <sub>3</sub> .....	43
Obr. 10: Reakční schéma vzniku funkcionalizovaných chitooligomerů .....	45
Obr. 11: Schéma metody kompetitivní ELISA.....	46
Obr. 12: Analýza průběhu purifikace Gal-1 (A) a Gal-3 (B) pomocí SDS-PAGE.....	47
Obr. 13: Porovnání závislosti $\beta$ -galaktosidasové a $\beta$ - <i>N</i> -acetylhexosaminidasové aktivity na pH .....	49
Obr. 14: Závislost enzymové aktivity na vzrůstajícím obsahu acetonitrilu (A) a acetonu (B). .....	50
Obr. 15: TLC transglykosylační reakce pro přípravu LacNAc-N <sub>3</sub> . .....	52
Obr. 16: HPLC chromatogram.....	52
Obr. 17: TLC transglykosylační reakce pro přípravu funkcionalizovaných chitooligomerů. .....	53
Obr. 18: Struktury použitých glykokonjugátů.....	55
Obr. 19: Inhibiční potenciál připravených látek ke Gal-1.....	56
Obr. 20: Inhibiční potenciál připravených látek ke Gal-3.....	56

## 11. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tab. 1: Funkcionalizované chitooligomery, jejich výtěžek a čistota.....	54
Tab. 2: Stanovení inhibičního potenciálu připravených látek ke Gal-1. ....	55
Tab. 3: Stanovení inhibičního potenciálu připravených látek ke Gal-3. ....	55

## 12. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: NMR analýza produktu LacNAc-N <sub>3</sub> .....	70
Příloha 2: NMR analýza funkcionalizovaných chitooligomerů. ....	71
Příloha 3: Abstrakt přednášky na konferenci Eurocarb 2019 (červenec 2019, Leiden, Holandsko) .....	73

## Příloha 1: NMR analýza produktu LacNAc-N<sub>3</sub>

**Instrument:** Bruker Avance III 600 MHz (600.23 MHz for <sup>1</sup>H, 150.93 MHz for <sup>13</sup>C, D<sub>2</sub>O, 30 °C)

**Experiments performed:** <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC, HSQC-TOCSY, 1D-TOCSY.

**Referencing:** <sup>1</sup>H NMR spectrum was referenced using the residual signal of water ( $\delta_{\text{H}}$  4.732 ppm), <sup>13</sup>C NMR spectrum to the signal of acetone ( $\delta_{\text{C}}$  30.50 ppm)

### Hlavní složka (vazba 1-4)

	Atom	$\delta_{\text{C}}$	m	$\delta_{\text{H}}$	n	m.	J[Hz]	HMBC
GlcN	1	88.81	D	4.831	1	d	8.7	
	2	54.89	D	3.82 <sup>H</sup>	1	m		
	3	72.56	D	3.80 <sup>H</sup>	1	m		
	4	<b>78.31</b>	D	3.81 <sup>H</sup>	1	m		1 <sup>Gal</sup>
	5	77.04	D	3.732 <sup>T</sup>	1	m		
	6	60.21	T	4.051	1	dd	12.4, 2.3	
				3.912	1	dd	12.4, 4.9	
	<b>2-CO</b>	175.04	S	-	0			
	<b>2-Ac</b>	22.39	Q	2.110	3	s		
Gal	1	103.16	D	4.530	1	d	7.8	
	2	71.24	D	3.598	1	dd	10.0, 7.8	
	3	72.81	D	3.721	1	dd	10.0, 3.4	
	4	68.84	D	3.983	1	dd	3.4, 0.8	
	5	75.64	D	3.79 <sup>H</sup>	1	m		
	6	61.28	T	3.82 <sup>H</sup>	2	m		

### Minoritní složka (vazba 1-6)

	Atom	$\delta_{\text{C}}$	m	$\delta_{\text{H}}$	n	m.	J[Hz]	HMBC
GlcN	1	89.08	D	4.851	1	d	9.3	
	2	55.26	D	3.77 <sup>H</sup>	1	m		
	3	73.89	D	3.646	1	dd	$\Sigma J = 18.7$	
	4	69.70	D	3.610	1	dd	$\Sigma J = 18.4$	
	5	77.24	D	3.769 <sup>T</sup>	1	m		
	6	<b>68.81</b>	T	4.301	1	dd	11.7, 2.1	1 <sup>Gal</sup>
				3.955	1	dd	11.7, 5.8	
	<b>2-CO</b>	175.08	S	-	0			
	<b>2-Ac</b>	22.38	Q	2.113	3	s		
Gal	1	103.66	D	4.509	1	d	7.8	6u <sup>GlcNAc</sup>
	2	71.04	D	3.621	1	dd	10.0, 7.8	
	3	72.797	D	3.712	1	dd	10.0, 3.4	
	4	68.94	D	3.983	1	dd	3.4, 0.8	
	5	75.45	D	3.75 <sup>H</sup>	1	m		
	6	61.26	T	3.82 <sup>H</sup>	2	m		

<sup>H</sup> ... HSQC readout; <sup>T</sup> ... 1D-TOCSY readout

- Poměr regioisomerů  $\beta(1,4)$  :  $\beta(1,6)$  ve vzorku = 73 : 27

## Příloha 2: NMR analýza funkcionalizovaných chitooligomerů.

**Instrument:** Bruker Avance III 700 MHz (700.13 MHz for  $^1\text{H}$ , 176.05 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30 °C)

**Experiments performed:**  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, gCOSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, HSQC-TOCSY, 1D-TOCSY.

**Referencing:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum was referenced using the residual signal of water ( $\delta_{\text{H}}$  4.732 ppm),  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum to the signal of acetone ( $\delta_{\text{C}}$  30.50 ppm)

### *N,N',N'',N'''*-tetraacetylchitotetraosylazid

	Atom	$\delta_{\text{C}}$	m	$\delta_{\text{H}}$	n	m.	J[Hz]
GlcN	1	88.77	D	4.752	1	m	$\Sigma J = 9.1$
	2	54.76	D	3.73 <sup>H</sup>	1	m	
	3	72.52	D	3.73 <sup>H</sup>	1	m	
	4	78.98	D	3.65 <sup>H</sup>	1	m	
	5	76.75	D	3.592	1	ddd	9.8, 5.2, 2.2
	6	60.20	T	3.868	1	dd	12.2, 2.2
				3.676	1	dd	12.2, 5.2
	2-CO	175.05	S	-	0		
	2-Ac	22.37	Q	2.055	3	s	
	GlcN	1	101.49	D	4.584	1	d
2		55.31	D	3.777 <sup>b</sup>	1	dd	10.5, 8.4
3		72.32	D	3.716	1	dd	10.5, 8.4
4		79.19	D	3.644	1	dd	9.7, 8.4
5		74.80	D	3.550	1	ddd	9.7, 5.4, 2.2
6		60.20 <sup>a</sup>	T	3.850	1	dd	12.2, 2.2
				3.665 <sup>c</sup>	1	dd	12.2, 5.4
2-CO		174.85	S	-	0		
2-Ac		22.37	Q	2.065	3	s	
GlcN		1	101.49	D	4.582	1	d
	2	55.27	D	3.776 <sup>b</sup>	1	dd	10.5, 8.4
	3	72.39	D	3.722	1	dd	10.5, 8.4
	4	79.44	D	3.644	1	dd	9.7, 8.4
	5	74.76	D	3.556	1	ddd	9.7, 5.4, 2.2
	6	60.25 <sup>a</sup>	T	3.853	1	dd	12.2, 2.2
				3.662 <sup>c</sup>	1	dd	12.2, 5.4
	2-CO	174.85	S	-	0		
	2-Ac	22.37	Q	2.061	3	s	
	GlcN	1	101.72	D	4.588	1	d
2		55.84	D	3.75 <sup>H</sup>	1	m	
3		73.70	D	3.571	1	dd	10.5, 8.5
4		69.98	D	3.471	1	dd	9.9, 8.5
5		76.17	D	3.503	1	ddd	9.9, 5.6, 2.2
6		60.81	T	3.923	1	dd	12.2, 2.2
				3.75 <sup>H</sup>	1	m	
2-CO		174.87	S	-	0		
2-Ac		22.37	Q	2.070	3	s	

<sup>H</sup> ... HSQC readout; <sup>a, b, c</sup> ... might be interchanged

*N,N',N''*-triacylchitotriosylazid

	Atom	$\delta_c$	m	$\delta_u$	n	m.	J[Hz]
GlcN	1	88.77	D	4.754	1	m	$\Sigma J = 9.1$
	2	54.77	D	3.736	1	m	
	3	72.52	D	3.736	1	m	
	4	78.96	D	3.660	1	m	
	5	76.76	D	3.593	1	ddd	9.7, 5.2, 2.1
	6	60.20	T	3.871	1	dd	12.3, 2.1
				3.679	1	dd	12.3, 5.2
	2-CO	175.05	S	-	0		
	2-Ac	22.37	Q	2.056	3	s	
GlcN	1	101.49	D	4.589	1	d	8.4
	2	55.27	D	3.783	1	dd	10.5, 8.4
	3	72.39	D	3.725	1	dd	10.5, 8.5
	4	79.42	D	3.648	1	dd	9.9, 8.5
	5	74.77	D	3.559	1	ddd	9.9, 5.5, 2.1
	6	60.24	T	3.854	1	dd	12.3, 2.1
				3.666	1	dd	12.3, 5.5
	2-CO	174.86	S	-	0		
	2-Ac	22.37	Q	2.066	3	s	
GlcN	1	101.72	D	4.589	1	d	8.4
	2	55.85	D	3.749	1	dd	10.4, 8.4
	3	73.70	D	3.573	1	dd	10.4, 8.6
	4	69.98	D	3.472	1	dd	9.9, 8.6
	5	76.17	D	3.504	1	ddd	9.9, 5.6, 2.1
	6	60.81	T	3.924	1	dd	12.3, 2.1
				3.75 <sup>H</sup>	1	m	
	2-CO	174.87	S	-	0		
	2-Ac	22.37	Q	2.070	3	s	

<sup>H</sup> ... HSQC readout

*N,N'*-diacylchitobiosylazid

	Atom	$\delta_c$	m	$\delta_u$	n	m.	J[Hz]
GlcN	1	88.77	D	4.760	1	m	$\Sigma J = 9.1$
	2	54.73	D	3.742	1	m	
	3	72.59	D	3.742	1	m	
	4	79.20	D	3.669	1	m	
	5	76.72	D	3.603	1	ddd	9.7, 5.1, 2.1
	6	60.24	T	3.876	1	dd	12.2, 2.1
				3.683	1	dd	12.2, 5.1
	2-CO	175.06	S	-	0		
	2-Ac	22.37	Q	2.058	3	s	
GlcN	1	101.71	D	4.596	1	d	8.5
	2	55.84	D	3.755	1	dd	10.4, 8.5
	3	73.71	D	3.575	1	dd	10.4, 8.6
	4	69.97	D	3.475	1	dd	9.9, 8.6
	5	76.17	D	3.508	1	ddd	9.9, 5.6, 2.1
	6	60.80	T	3.925	1	dd	12.4, 2.1
				3.755	1	dd	12.4, 5.6
	2-CO	174.88	S	-	0		
	2-Ac	22.38	Q	2.076	3	s	



**Příloha 3: Abstrakt přednášky na konferenci Eurocarb 2019 (červenec 2019, Leiden, Holandsko)**

**Glycopolymers with LacNAc branching discriminate between galectins**

Pavla Bojarová<sup>1,3</sup>, Marina Tavares<sup>2</sup>, Petr Chytil<sup>2</sup>, Lieselotte Sedláková<sup>1,3</sup>, Markéta Bláhová<sup>2</sup>, Lucie Petrásková<sup>1</sup>, Tomáš Etrych<sup>2</sup>, Vladimír Křen<sup>1</sup>

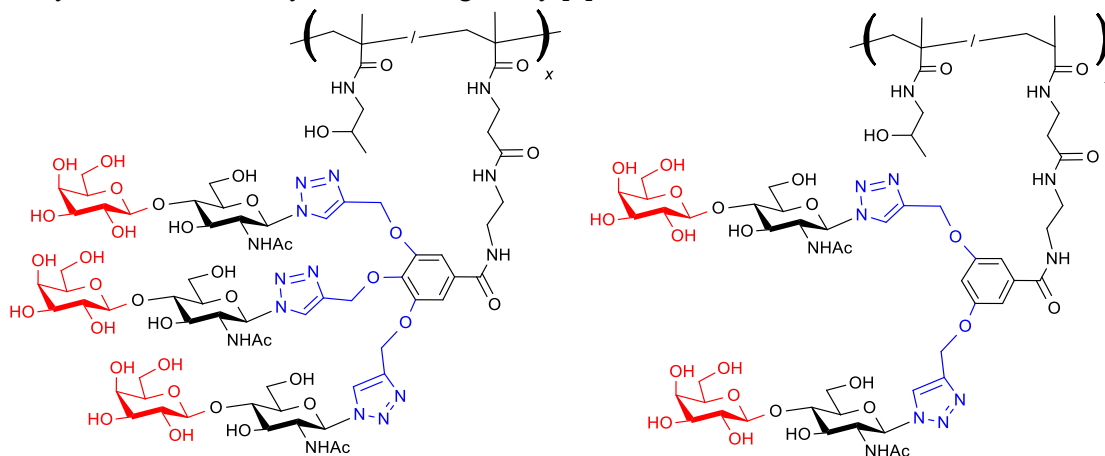
<sup>1</sup>*Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Videňská 1083, CZ-14220 Praha 4, Czech Republic. E-mail: bojarova@biomed.cas.cz*

<sup>2</sup>*Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences, Heyrovského nám. 2, CZ-16206 Praha 6, Czech Republic*

<sup>3</sup>*Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Nám. Sítná 3105, CZ-272 01 Kladno, Czech Republic*

LacNAc (Gal $\beta$ 4GlcNAc) is a typical carbohydrate ligand of galectins - human lectins regulating, e.g., intercellular communication, adhesion and signaling [1]. Human galectins participate in a number of pathologies including cancerogenesis, metastatic formation, inflammation or fibrosis. Therefore, they are prospective targets for therapeutical applications where selectivity for one particular galectin is highly desirable.

In the present study we synthesized a series of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymers decorated with LacNAc epitope in various concentrations and architectures. The functionalized LacNAc disaccharide was prepared by enzymatic synthesis catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* [2]. In a structure-affinity relationship study we compare the difference in affinity between LacNAc distributed statistically on the polymer backbone or nested on bi- and trivalent phenyl branches. The affinity of prepared glycopolymers to galectins was determined in ELISA-type assay. We conclude that the manner of the LacNAc presentation on the HPMA copolymer brings a clear discrimination between galectins, reaching affinity in nanomolar range. The prepared selective glycopolymers are attractive for *in vivo* use due to their good water solubility and lack of toxicity and immunogenicity [3].



**Acknowledgement:** Support by grant projects LTC17005, LTC18038 and LTC18041 by MSMT CR is gratefully acknowledged.

[1] D. Laaf, P. Bojarová, L. Elling, V. Křen, *Trends Biotechnol.* 2018, in press.

[2] P. Bojarová, V. Křen, *Chimia* 2011, **65**, 65-70.

[3] K. Ulbrich, V. Šubr, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, **62**, 150-166.