

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Chronopotenciometrické studium nespecifických interakcí glykomimetických ligandů galektinů

**Radan Čech
Jihomoravský kraj**

Brno 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Chronopotenciometrické studium nespecifických interakcí glykomimetických ligandů galektinů

Chronopotentiometric study of non-specific interactions of glycomimetic galectin ligands

Autor: Radan Čech

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Brno, Žižkova 55, příspěvková
organizace, 616 00 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: RNDr. Veronika Ostatná, Ph.D.

Brno 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 26.2.2025

Radan Čech

Anotace

Tato práce se zabývá chronopotenciometrickou analýzou nespecifických interakcí glykomimetických ligandů galektinů s lidským sérovým albuminem (HSA). Cílem bylo zjistit, do jaké míry tyto ligandy interagují s HSA, což je důležité pro jejich možné využití jako nosičů inhibitorů galektinů v léčbě metastazování nádorů, protože sérové albuminy jako početné bílkoviny krevní plazmy vážou některé nízkomolekulární látky. K měření byla použita chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza, která umožňuje sledování změn v proteinové struktuře. Výsledky ukázaly, že většina zkoumaných ligandů nevykazuje téměř žádnou vazbu na HSA, s výjimkou jednoho ligandu, který se váže více. To by mohlo ovlivnit jeho využitelnost v medicíně, protože zmíněný ligand má vysokou afinitu ke galektinu-1. Práce přispívá k lepšímu pochopení interakcí mezi proteiny a potenciálními antimetastatickými léčivy.

Klíčová slova

Chronopotenciometrie, pík-H, galektiny, ferrocenové ligandy, rtuťová kapková elektroda

Annotation

This study focuses on the chronopotentiometric analysis of nonspecific interactions between glycomimetic ligands of galectins and human serum albumin (HSA). The aim was to determine the extent to which these ligands interact with HSA. This is crucial for their potential use as carriers of galectin inhibitors in the treatment of tumor metastasis, because serum albumins, as abundant plasma proteins, can bind certain low-molecular-weight compounds. Chronopotentiometric stripping analysis was used to monitor changes in protein structure. The results showed that most of the examined ligands exhibit little to no binding to HSA, with the exception of one ligand that demonstrated a higher degree of interaction. This finding may influence its applicability in medicine, as the mentioned ligand exhibits high affinity for galectin-1. This work contributes to a better understanding of the interactions between proteins and potential antimetastatic agents.

Keywords

Chronopotentiometry, Peak-H, Galectins, Ferrocene-based ligands, Hanging Mercury Drop Electrode

Obsah

1	Úvod	6
2	Teoretická část.....	7
2.1	Analytické metody v elektrochemii.....	7
2.1.1	Galvanostatické metody	8
2.2	Akumulační rozpouštěcí metoda	9
2.3	Proteinová analýza.....	9
3	Metodika	11
3.1	Použité chemikálie.....	11
3.2	Příprava sérového albuminu a ligandů.....	12
3.3	Použité přístroje.....	13
4	Výsledky a diskuse	15
4.1	Chování HSA na elektrodovém povrchu	15
4.1.1	Opakovatelnost měření.....	15
4.2	Závislost výšky píku H na koncentraci HSA	16
4.2.1	Denaturace HSA	17
4.3	Interakce HSA s glykomimetickými ligandy	20
5	Závěr	25
6	Použitá literatura.....	26
7	Abecední seznam zkratk.....	28
8	Seznam obrázků a tabulek.....	29

1 ÚVOD

Metastazování zhoubných nádorů je velkým problémem, protože právě metastázy jsou často důvodem selháním živočišných funkcí vedoucí ke smrti pacienta. V procesu šíření nádorových buněk má významnou roli řada proteinů, mezi nimi jsou i galektiny [1]. Galektiny jsou proteiny, které na sebe vážou sacharidy a podílejí se na různých buněčných procesech. Blokace jejich vazebných míst by mohla teoreticky vést ke snížení metastatického potenciálu nádorových buněk.

K inhibici galektinů by šlo použít glykomimetické ligandy - syntetické molekuly, které jsou podobné sacharidům a mohou tím pádem specificky interagovat s galektiny [2]. Studium těchto ligandů je klíčové pro návrh léčiv, ale problémem jejich využití je možná existence nespecifických interakcí s jinými proteiny v těle, jako je například lidský sérový albumin (HSA). Tyto nespecifické interakce mohou ovlivnit účinnost i bezpečnost použití těchto léčiv. Na druhou stranu sérový albumin může být použit jako potenciální nosič léčiva.

Elektrochemické metody jsou často používané pro studium proteinů a jejich interakcí s jinými látkami [3, 4]. Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza, která byla využita v této práci, je jednou z elektrochemických technik vhodných pro zkoumání právě interakcí glykomimetických ligandů s HSA. Tato metoda je totiž velmi citlivá na změny struktury proteinu.

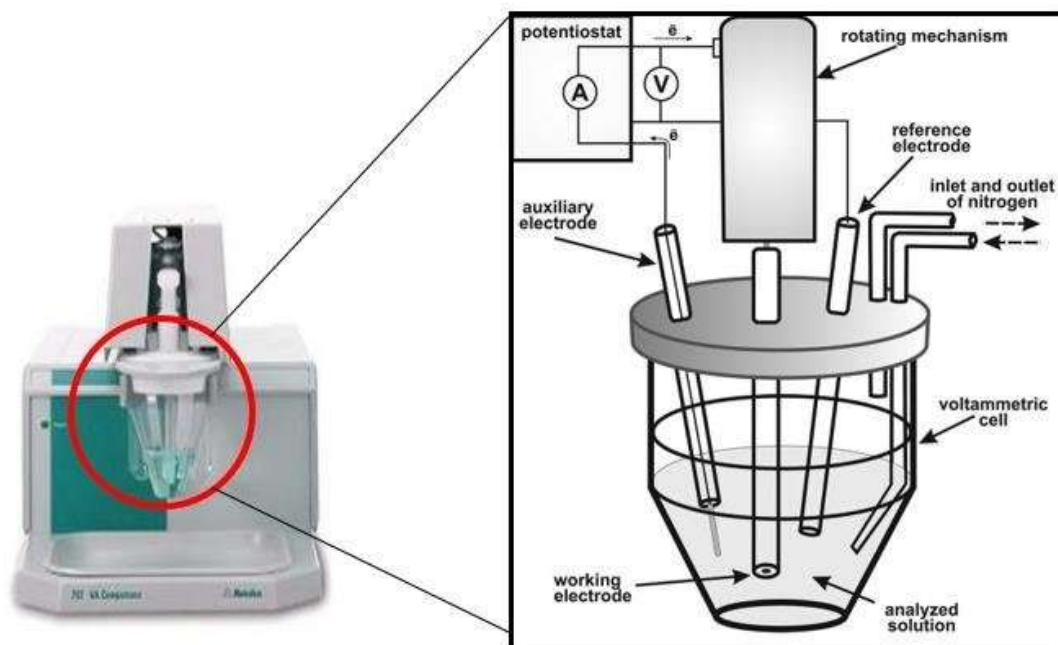
Tato práce se zaměřuje na chronopotenciometrické studium nespecifických interakcí glykomimetických ligandů galektinů s lidským sérovým albuminem. Cílem je zjistit, jak velkou mírou tyto ligandy interagují s HSA, a tím přispět ke zlepšení poznatků o nových inhibitech galektinů a jejich dalšímu využití.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Analytické metody v elektrochemii

Elektrochemické metody patří mezi analytické metody. Jejich pomocí se studuje vztah mezi elektrickými veličinami a chemickými vlastnostmi analyzovaného vzorků. Na rozdíl od mnoha jiných analytických metod, které zkoumají analyt v homogenních roztocích, elektrochemické procesy probíhají na heterogenním rozhraní elektroda|roztok [5] v elektrochemické cele (Obr.1). Elektrochemické metody lze rozdělit do dvou základních skupin, a to na potenciostatické a galvanostatické. Každá z nich má svůj specifický způsob měření, podle něhož se odvíjí i její využití.

Potenciostatické metody jsou specifické tím, že je na pracovní elektrodu aplikován konkrétní potenciál, přičemž se sleduje změna odezvy proudu. V rámci této metody získáváme informace o elektrochemických vlastnostech analyzované látky použitím vztahu právě mezi aplikovaným potenciálem a odpovídajícím proudem [6]. Na druhé straně u galvanostatických metod je využíván postup zcela opačný. Na pracovní elektrodu je přiváděn konstantní proud a měřena je změna potenciálu v čase. Výsledný potenciál poté závisí na elektrochemických procesech probíhajících na povrchu elektrody. Obě metody jsou hojně využívány jako komplementární, společně nám tedy poskytují ucelenější obraz o analyzovaných látkách [7].



Obrazek 1: Elektrochemická cela se třemi elektrodami: pracovní elektroda, referenční elektroda a pomocná elektroda.

2.1.1 Galvanostatické metody

Pro naše experimenty jsme používali galvanostatickou metodu, a to konkrétně tzv. chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzu konstantním proudem (z angl. Constant Current Chronopotentiometric Stripping, CPS).

Při provádění CPS je na rozhraní mezi elektrodou a roztokem aplikován konstantní proud (tzv. rozpouštěcí, I_{str}), přičemž se sleduje změna potenciálu v čase. Vyhodnocení křivky závislosti potenciálu na čase je ovšem velmi složité a z tohoto důvodu se v praxi většinou používá inverzní derivace této křivky, tzn.: $(dE/dt)^{-1}$, která je v grafu zobrazována jako funkce. Tuto získanou derivovanou křivku je možné následně analyzovat na základě její plochy, výšky i pozice [8].

CPS je oproti na první pohled podobným voltametrickým metodám výhodnější zejména při studiu proteinů. Mezi hlavní důvody patří lépe vyvinuté píky u CPS křivky, lepší citlivost a nižší šum v pozadí.

2.2 Akumulační rozpouštěcí metoda

Elektrochemické techniky mohou být kombinovány s akumulací rozpouštěcí metodou, která zahrnuje dvě hlavní fáze: akumulaci a rozpouštění. Během akumulace fáze se analyzovaná látka adsorbuje na povrch elektrody při konkrétním nastavení potenciálu a určitého časového intervalu. Po této fázi dochází k rozpouštění adsorbované látky, které se provádí právě buď voltametrickými, nebo galvanostatickými metodami [9].

Tato metoda se hojně využívá pro studium molekul, které se dokáží adsorbovat na povrch elektrody. Mezi ně patří mimo jiné i proteiny, u kterých je například využívána právě CPS [4].

Adsorpce látek na elektrody může probíhat různými způsoby, přičemž dvě nejběžnější metody jsou klasická adsorpce (AdS) a adsorpce s přenosem (AdST). Při klasické metodě AdS se analyt adsorbuje přímo z elektrolytu na povrch elektrody, kde se následně provádí měření. A u metody AdST se analyt adsorbuje na povrch elektrody buď z roztoku, nebo z malé kapky. Poté je elektroda opláchnuta a přenesena do čistého elektrolytu, kde probíhá vlastní měření.

Mezi výhody AdST patří především menší nároky na množství daného vzorku, dále zmenšení vlivu jiných látek na měření a v neposlední řadě možnost měření při jiných podmínkách než těch u samotné adsorpce. Díky těmto výhodám je metoda AdST vhodná pro různé elektrochemické analýzy, zejména při studiu složitějších biologických vzorků a analytických procesů, které vyžadují precizní kontrolu podmínek měření [9].

2.3 Proteinová analýza

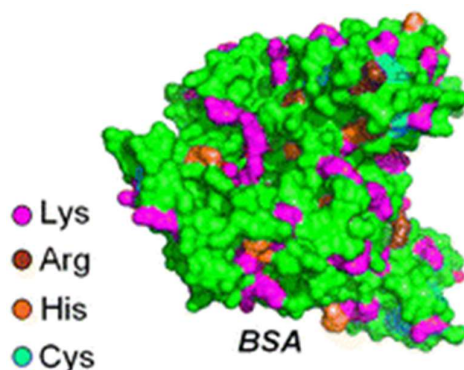
V poslední době dochází k významnému rozvoji v oblasti elektrochemické analýzy proteinů, zejména díky použití chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy s konstantním proudem (CPS) ve spojení s elektrodami obsahujícími rtuť např. rtuťová elektroda s visící kapkou (z angl. Hanging Mercury Drop Electrode, HMDE) [3].

V podmínkách, které se blíží fyziologickým, vykazují proteiny obsahující zbytky aminokyselin, jako jsou arginin (Arg), lysin (Lys), cystein (Cys) nebo histidin (His), výrazný signál označovaný jako H-pík. Tento pík je důsledkem katalytické reakce vývoje vodíku (z angl. Catalytic Hydrogen Evolution Reaction, CHER). CPS H-pík umožňuje bez použití činidel analyzovat strukturu prakticky jakéhokoli proteinu, protože proteiny bez těchto aminokyselinových zbytků se v přírodě téměř nevyskytují. Klíčovým požadavkem pro vznik

H-píku je však dostupnost katalyticky aktivních aminokyselinových zbytků pro reakce přímo na povrchu elektrody. V nativní struktuře proteinu mohou být tyto zbytky skryté uvnitř molekuly nebo daleko od elektrody, což způsobuje jejich katalytickou nečinnost. Naopak u denaturovaného proteinu se mohou i tyto zbytky do CHER zapojit, jelikož se dostávají na okraj molekuly a mohou nám tak vytvořit lépe vyvinutý H-pík [4].

Již první studie CPS H-píku ukázaly, že je možné sledovat jak lokální, tak globální změny v proteinové struktuře. To je dáno schopností proteinů vázaných na povrch elektrody udržet svoji složenou strukturu v blízkosti nulového náboje, avšak při působení záporně nabitého povrchu podléhat časově závislému rozkladu či denaturaci [10]. Díky vysoké citlivosti CPS H-píku na změny v proteinové struktuře lze tuto metodu využít nejen pro monitorování denaturace, ale také například při studiu agregace, oligomerizace, posttranslačních modifikací atd., kde se mění přístupnost elektroaktivních zbytků k elektrodě [3, 11].

H-pík je pozorovatelný při velmi záporných potenciálech, přibližně $-1,7$ V (vs. Ag|AgCl|3M KCl). Takto záporné potenciály vytvářejí mimořádně silné elektrické pole, které může ovlivnit elektrickou dvojvrstvu, kde jsou adsorbovány biomolekuly. Efekty elektrického pole mohou způsobit například denaturaci proteinů nebo rozpad molekulárních komplexů [12]. CPS H-pík byl také využit ke studiu proteinů v komplexních biologických směsích a při analýze klinických vzorků, jako je lidský sérový albumin (z angl. Human Serum Albumin, HSA), získaný z krevního séra, který je podobný (také zkoumanému) hovězímu sérovému albuminu (z angl. Bovine Serum Albumin, BSA) [13]. Rozložení aminokyselinových zbytků, které jsou v molekule BSA aktivní v rámci CHER, je znázorněno na Obr.2.

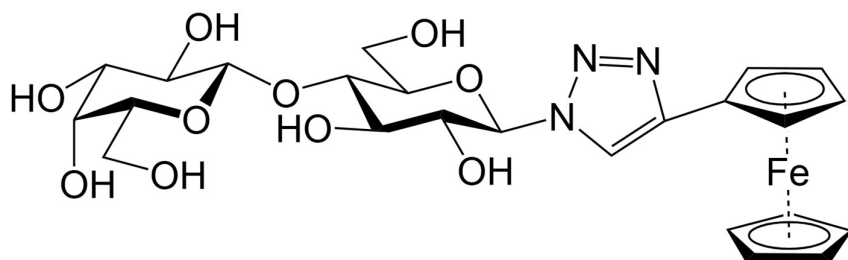


Obrázek 2: Grafické znázornění aminokyselinových zbytků BSA, které jsou aktivní v CHER. Přebráno z [13].

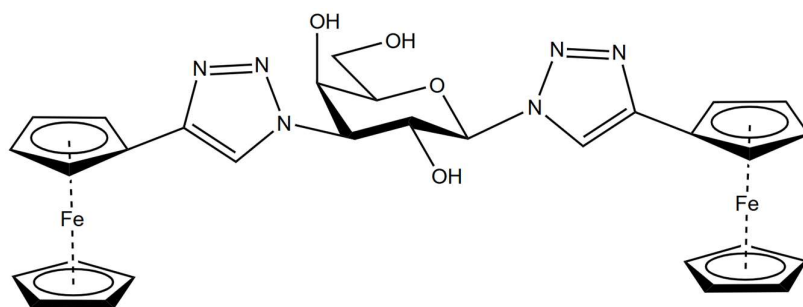
3 METODIKA

3.1 Použité chemikálie

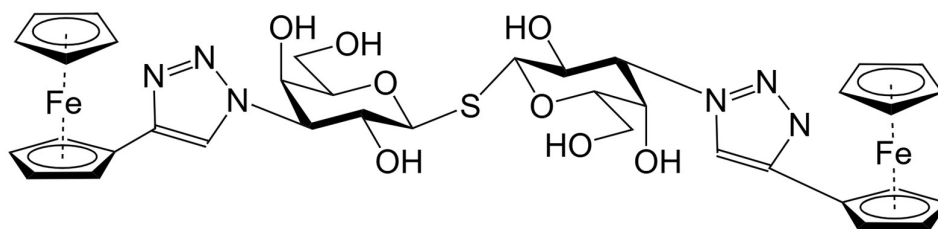
- Dihydrogenfosforečnan sodný ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) – monohydrát, Merck, Česká republika
- Hydrogenfosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – heptahydrát, Merck, Česká republika
- Lidský sérový albumin (HSA) – lyofilizovaný, Merck, Česká republika
- Dimethylsulfoxid (DMSO) – bezvodý, >99,9 %, Merck, Česká republika
- Glykomimetické ligandy (VH619, VH653R, VH684, VH880; Obr.3 - Obr.6) – syntetizovány skupinou Mgr. Jindřicha Karbana, Ph.D., Ústav chemických procesů Akademie věd České republiky, Praha
- Tridestilovaná voda



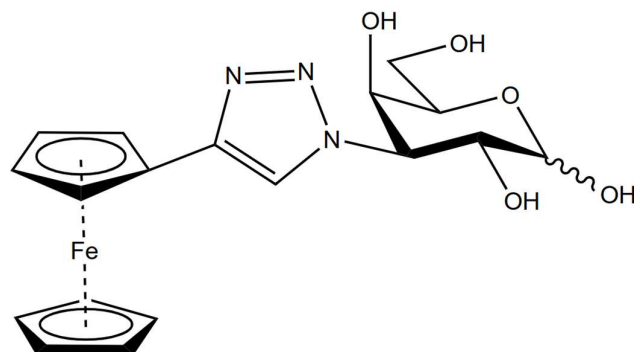
Obrázek 3: Chemický vzorec ligandu VH619 v geometrickém zobrazení.



Obrázek 4: Chemický vzorec VH653R v geometrickém zobrazení.



Obrázek 5: Chemický vzorec VH684 v geometrickém zobrazení.



Obrázek 6: Chemický vzorec VH880 v geometrickém zobrazení.

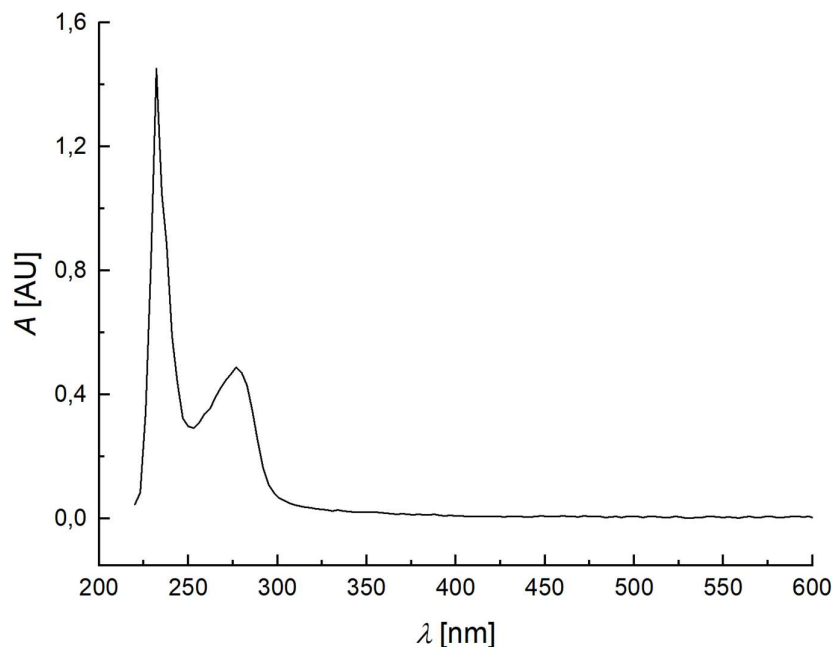
Fosfátový pufr (NaPh) byl připraven zředěním zásobních 0,8 M roztoků dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH_2PO_4) a hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4) na finální koncentraci 50 mM. Složky byly smíchány v poměru 2:3, výsledného pH 7,0 poté bylo dosaženo titrací a pH bylo ověřeno pomocí kalibrovaného pH metru (Hana Instruments).

3.2 Příprava sérového albuminu a ligandů

Chronopotenciometrická měření byla prováděna na elektrochemickém analyzátoru $\mu\text{Autolab III}$, v kombinaci s elektrochemickou celou Metrohm 663 VA Stand a rtuťovou kapkou Autolab IME 663 na HMDE.

2 mg HSA byly rozpuštěny v 200 μl tridestilované vody a po 1 h byla změřena jeho koncentrace. Pro elektrochemické měření byl následně ředěn na konečnou koncentraci 300 nM. Koncentrace HSA byla stanovena spektrofotometricky, tzn. měřením absorbance při vlnové délce 280 nm s extinkčním koeficientem 34 445 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na přístroji NanoDrop ND-1000 (Obr.7).

Denaturovaná forma HSA byla připravena inkubací HSA o koncentraci 2mg/ml v 8 M močovíně přes noc při 4 °C.



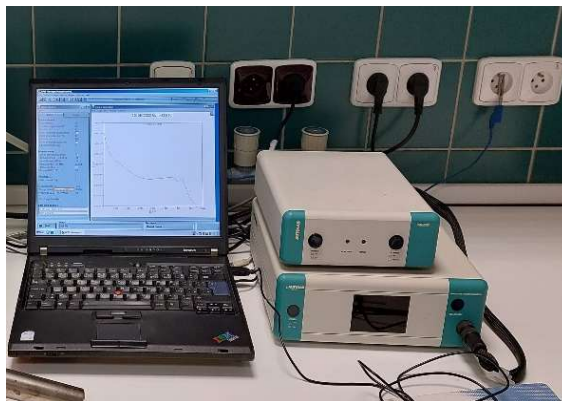
Obrázek 7: Závislost absorbance od vlnové délky pro stanovení koncentrace HSA pomocí UV-Vis.

Glykomimetické ligandy (VH880, VH619, VH653R, VH684) byly nejprve přes noc při pokojové teplotě rozpuštěny v DMSO na koncentraci 30 mM. Jejich koncentrace byla určena spektrofotometricky při vlnové délce 442 nm a extinkčním koeficientu $95 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Poté byly předředěny do 50 mM NaPh na koncentraci 420 μM a nakonec upraveny na finální koncentraci 3 μM pro jednotlivá měření.

3.3 Použité přístroje

Chronopotenciometrie byla měřena na elektrochemické analyzátoru microAutolab (Metrohm-Autolab, Holandsko, Obr.8) s elektrodovým systémem 663 VA STAND (Metrohm, Švýcarsko, Obr.9) a řízeném softwarem GPES 4.9.007 (Metrohm-Autolab, Holandsko). Všechna měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita HMDE, referenční elektrodou byla argentchloridová elektroda ($\text{Ag}|\text{AgCl}||3\text{M KCl}$) a jako pomocná elektroda byl použit platinový drát. Pro CPS měření byly použity tyto

parametry: depozice při akumulacním potenciálu $-0,3\text{ V}$ po dobu 60 s , čas equilibrace = 3 s , maximální čas měření = 5 s .



Obrázek 8: mikroAutolab III



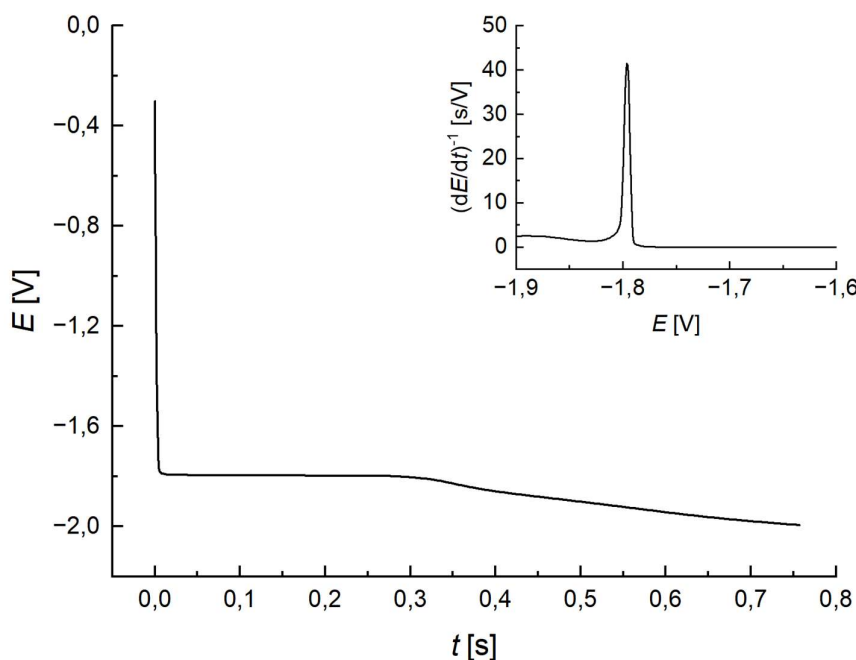
Obrázek 9: 663 VA STAND

Naměřená data byla zpracována pomocí software Origin 2021b (OriginLab Corporation, USA).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Chování HSA na elektrodovém povrchu

Základem každého chronopotenciometrického měření je záznam závislosti potenciálu na čase při konstantním proudu [8]. Jak již bylo zmíněno, tento potenciál je následně derivován podle času za účelem získání chronopotenciogramu s píkem-H místo vlny, která se hůře vyhodnocuje. Výsledkem derivace je poté funkce $(dE/dt)^{-1} = f(E)$, kde je pík H jednoduše pozorovatelný (Obr.10).



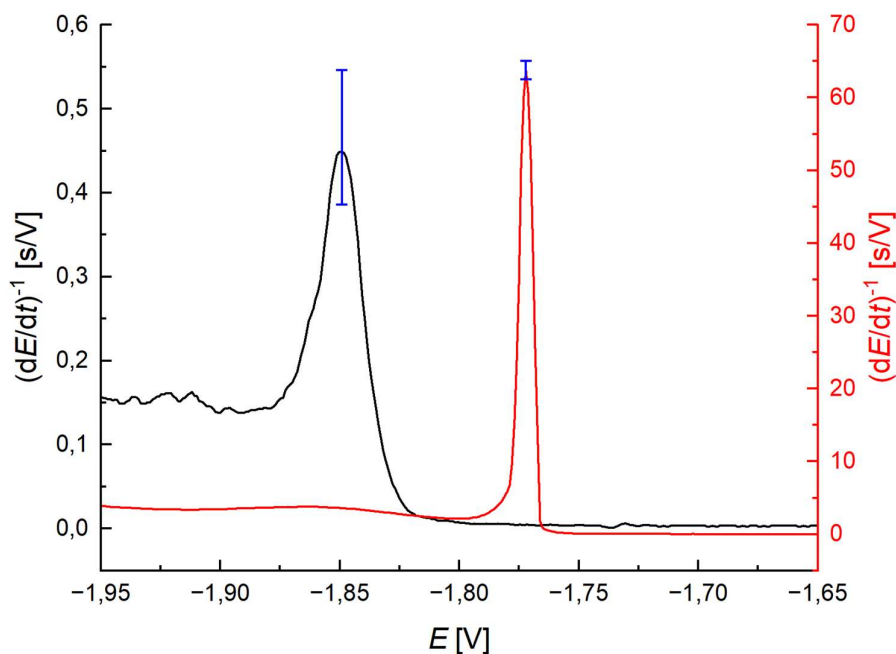
Obrázek 10: Závislost potenciálu E na čase t (tzv. E - t křivka). V horním rohu je odpovídající graf (s výrazným píkem-H) po provedení převrácené derivace pro 300 nM HSA v 50 mM NaPh, pH 7,0, $I_{str} = -30 \mu\text{A}$.

4.1.1 Opakovatelnost měření

Na začátku naší práce bylo důležité zjistit jaká je opakovatelnost našich měření. Proto jsme pětkrát měřili HSA při dvou parametrech, nejprve při rozpouštěcím proudu $I_{str} -25 \mu\text{A}$ a v zápětí při $I_{str} -50 \mu\text{A}$, abychom si ověřili validitu pozdějších měření jak pro proudy,

u kterých pík-H vykazuje nižší hodnotu, tak i pro ty, u nichž je výška píku mnohonásobně vyšší (Obr.11).

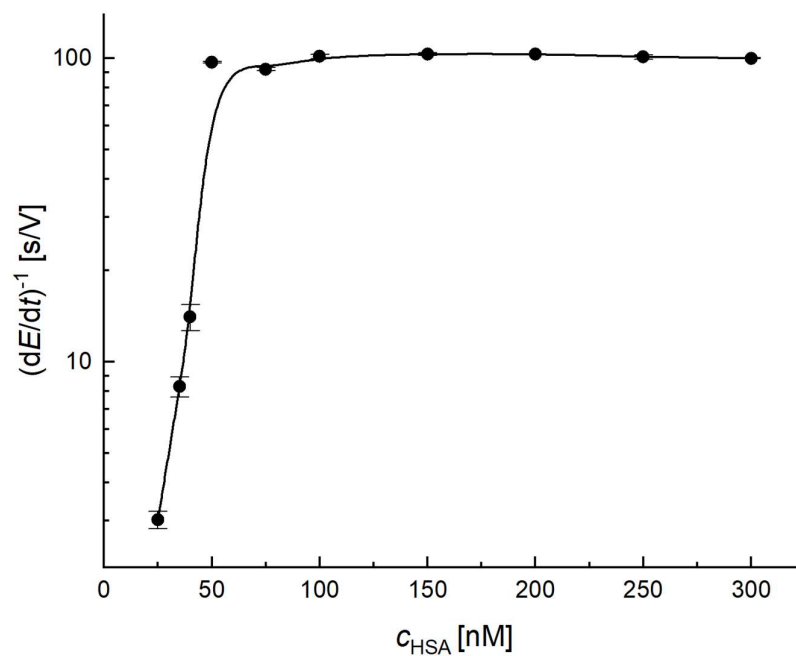
V naměřených výsledcích nebyla žádná neočekávaná nesrovnalost. Odchylka po pěti měřeních je při obou rozpouštěcích proudech poměrně malá cca. 5% u I_{str} -25 μ A (vyšší pík-H) a u I_{str} -50 μ A (nižší pík-H) se pohybuje cca. kolem 25%, ale výšky píků jsou v těchto místech poměrně nízké, takže odchylka je přijatelná.



Obrázek 11: Graf s vyznačenou odchylkou pro 5 měření pro 300nM HSA v 50mM NaPh, pH 7,0, měřeno při I_{str} -50 μ A (černá) a I_{str} -25 μ A (červená).

4.2 Závislost výšky píku H na koncentraci HSA

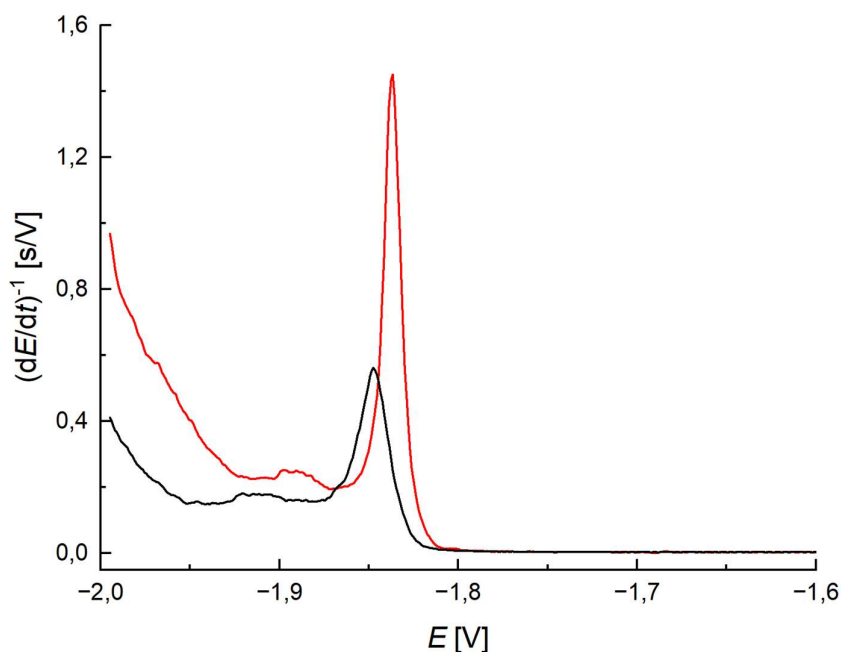
Nejdřív jsme ověřili vliv koncentrace HSA na výšku píku-H (Obr.12) v rozmezí koncentrací 25-300 nM při I_{str} -20 μ A. Pro koncentrace HSA 25-50 nM dochází k výraznému nárůstu výšky píku až na hodnotu cca. 100 s/V. Pro vyšší koncentrace HSA se už výška píku H nemění, což je pravděpodobně způsobeno pokrytím celého povrchu rtuťové kapkové elektrody proteinem. Pro další měření byla použita koncentrace HSA 300 nM, kdy tato hodnota zaručuje konstantní pokrytí povrchu elektrody a měření tak není ovlivněno koncentrací proteinu.



Obrázek 12: Graf závislosti výšky píku-H na koncentraci HSA pro 25–300 nM.

4.2.1 Denaturace HSA

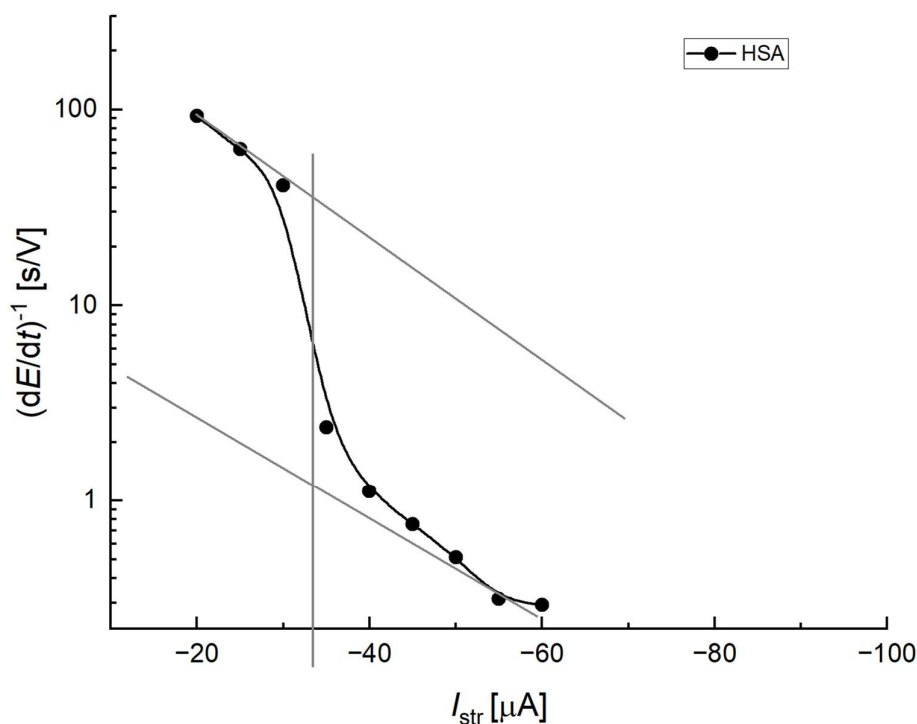
Denaturovaná forma HSA byla připravena inkubací tohoto proteinu v 8 M močovíně přes noc při 4 °C. Denaturovaný protein vykazuje při stejném rozpouštěcím proudu několikanásobně vyšší pík-H [10], což jsme potvrdili vlastním srovnáním (Obr.13). Tento nárůst je způsoben „rozbalením“ molekuly proteinu v rámci denaturace, čímž dochází k odhalení katalytických míst povrchu elektrody. Denaturací se dostanou k povrchu i hydrofobní skupiny, které se na hydrofobní rtuť lépe vážou.



Obrázek 13: Srovnání závislosti potenciálu na čase u nativního (černá) a denaturovaného (červená) HSA pro 300 nM HSA v 50mM NaPh, pH 7,0., $I_{str} = -50 \mu A$.

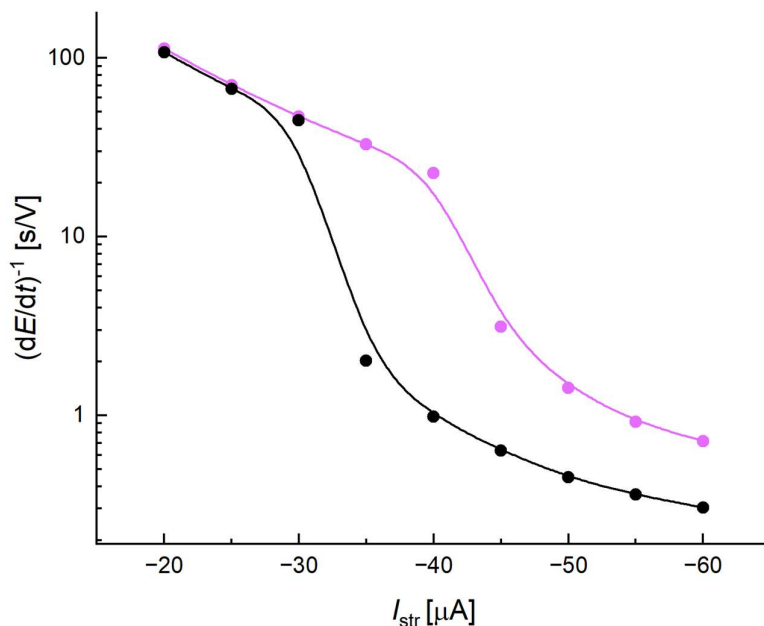
Dále jsme pozorovali změny píku-H u nativního HSA v závislosti na rozpouštěcím proudu. Rozpouštěcím proudem ovlivňujeme dobu působení elektrického pole[14]. Při nižších hodnotách $|I_{str}|$, měření chronopotenciogramu trvá déle než při vyšších hodnotách $|I_{str}|$. To znamená, že sledováním závislosti na I_{str} sledujeme efekty elektrického pole na sérový albumin.

Změnou rozpouštěcího proudu, t.j. posunem $|I_{str}|$ k nižším hodnotám dochází k postupné denaturaci sledované látky, což se projevuje postupným zvyšováním H-píku. Tuto změnu sledujeme jako závislost proudu (I_{str}) na $(dE/dt)^{-1}$. Ukazatelem, který určuje přechod mezi nativní a denaturovanou formou proteinu je $I_{str1/2}$, díky němu můžeme navzájem jednoduše srovnávat proudy, a stabilitu protein na povrchu elektrody (Obr.14).



Obrázek 14: Závislost výšky píku-H na rozpouštěcím proudu pro 300 nM nativní HSA, s vyznačeným bodem $I_{str1/2}$ v 50 mM NaPh, pH 7,0.

Následně jsme sledovali srovnání závislosti proudu na čase pro nativní a denaturovaný HSA (Obr.15). Předem denaturovaný HSA vykazuje při všech proudech vyšší hodnoty píku-H než nativní. Sigmoidní křivka u denaturovaného HSA ukazuje, že během zředění do nádoby mohlo dojít k částečné renaturaci HSA. Navíc jak už bylo zmíněno výše, na elektrodě probíhá více procesů. U nativního HSA lze považovat hodnoty za očekávané, při nižších proudech byla odezva katalytické reakce velmi nízká, ale s nárůstem I_{str} došlo k postupné denaturaci. Při proudech -20 až -30 μA , již výška H-píku dosahovala vysokých hodnot a změnil se i tvar píku-H. $I_{str1/2}$ pro HSA jsme určili -32 μA . Porovnání $I_{str1/2}$ pro nativní a denaturovaný HSA je v souladu s publikovanými daty, kdy stabilnější, nativní forma má hodnotu $|I_{str1/2}|$ menší jako je hodnota pro denaturovaný [15].



Obrázek 15: Srovnání závislostí výšky píku-H na rozpouštěcím proudu pro nativní (černá) a denaturovaný (fialová) HSA.

4.3 Interakce HSA s glykomimetickými ligandy

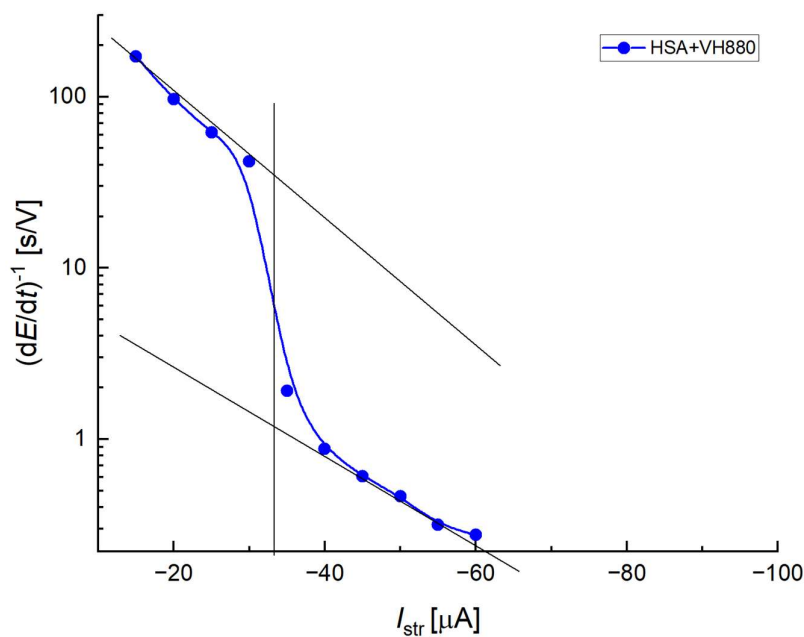
Abychom určili míru nespecifických interakcí HSA s glykomimetickými ligandy, měřili jsme závislosti výšky píku-H na rozpouštěcím proudu pro jednotlivé ligandy v kombinaci s HSA, které jsme následně srovnali se závislostí nativního HSA bez ligandů (Obr.14).

Nejprve jsme museli ověřit, že ligandy, se kterými budeme pracovat, samy o sobě neposkytují žádný H-pík, abychom měli v dalších měřeních jistotu, že k HSA přidáváme látky, jež nemohou v CPS poskytnout katalytickou odezvu vodíku. Měření jsme prováděli s ligandy VH880, VH619, VH653R a VH684, které jsme naředili v NaPh na hodnotu 3 μM . Mezi zaznamenanými výsledky jsme opravdu žádný H-pík dle očekávání neobjevili.

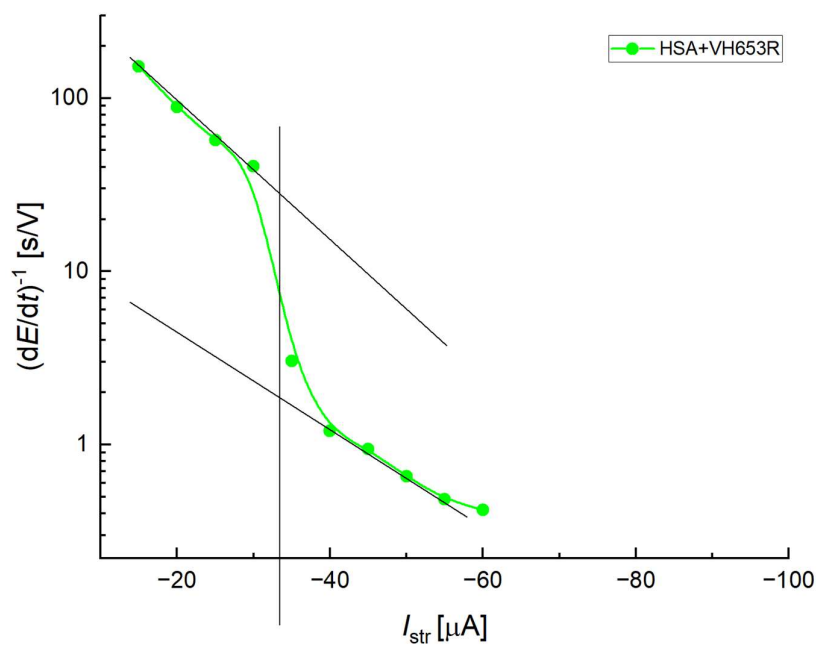
Ligandy se mezi sebou liší počtem ferrocenů (1 nebo 2) a počtem monosacharidových jednotek (1 nebo 2) a tím se liší i jejich vlastnosti jako je např. hydrofilicita/hydrophobicita. U ligandu s disacharidem s navázaným jedním ferrocenem VH619 bude hydrofilicita nejvyšší, naopak u ligandu VH653R skládající ho z monosacharidu a dvou ferrocenů bude nejvyšší hydrofobicita.

Pro měření interakcí jsme nechali vždy po dobu 15 minut inkubovat 3 μM ligand s 300 nM HSA v 50 mM NaPh (pH = 7,0). Důležité pro nás bylo změřit několik H-píků v rámci celé

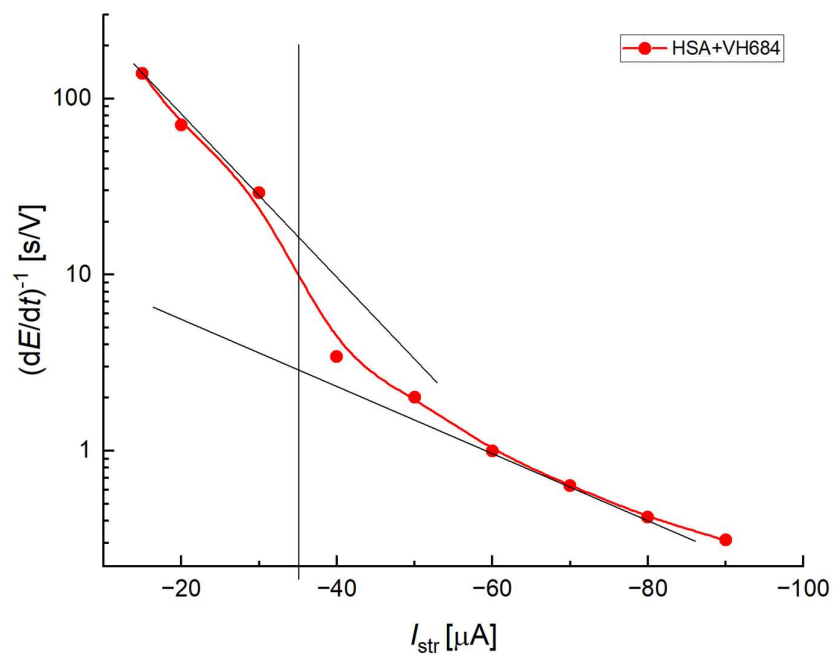
závislosti tak, abychom mohli po proložení hodnot křivkou vyčíst inflexní bod dané sigmoidní závislosti, což znamená získat hodnotu $I_{str1/2}$ (Obr.16 - Obr.19).



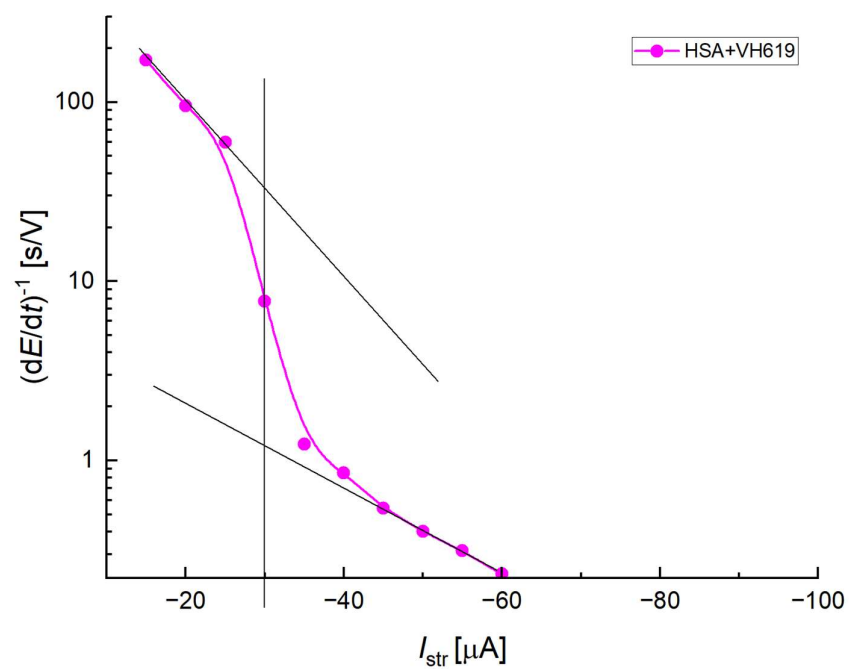
Obrázek 16: Závislost výšky H-píku na rozpouštěcím proudu pro 3 μ M VH880 s 300nM HSA v 50 mM NaPh, pH = 7.



Obrázek 17: Závislost výšky H-píku na rozpouštěcím proudu pro 3 μ M VH653R s 300nM HSA v 50 mM NaPh, pH = 7.



Obrázek 18: Závislost výšky H-píku na rozpouštěcím proudu pro 3 μ M VH684 s 300nM HSA v 50 mM NaPh, pH = 7.

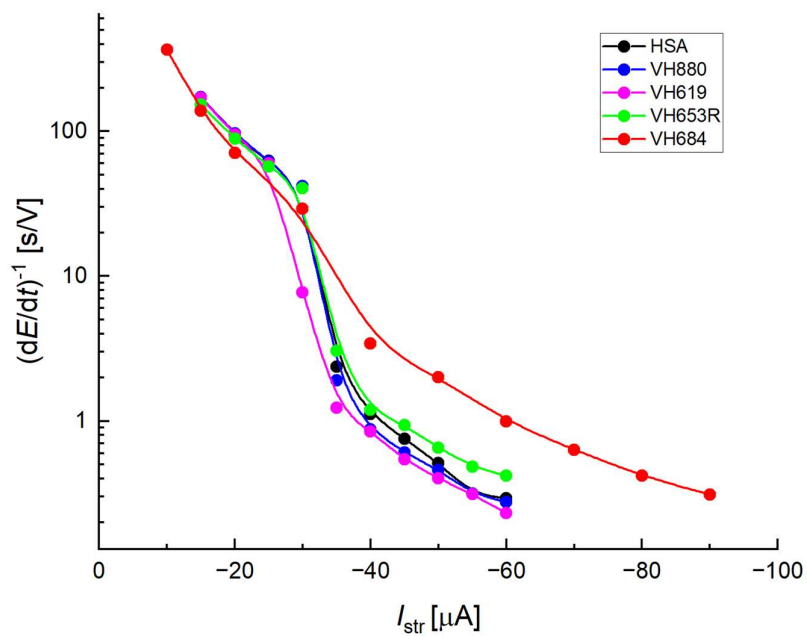


Obrázek 19: Závislost výšky H-píku na rozpouštěcím proudu pro 3 μ M VH619 s 300nM HSA v 50 mM NaPh, pH = 7.

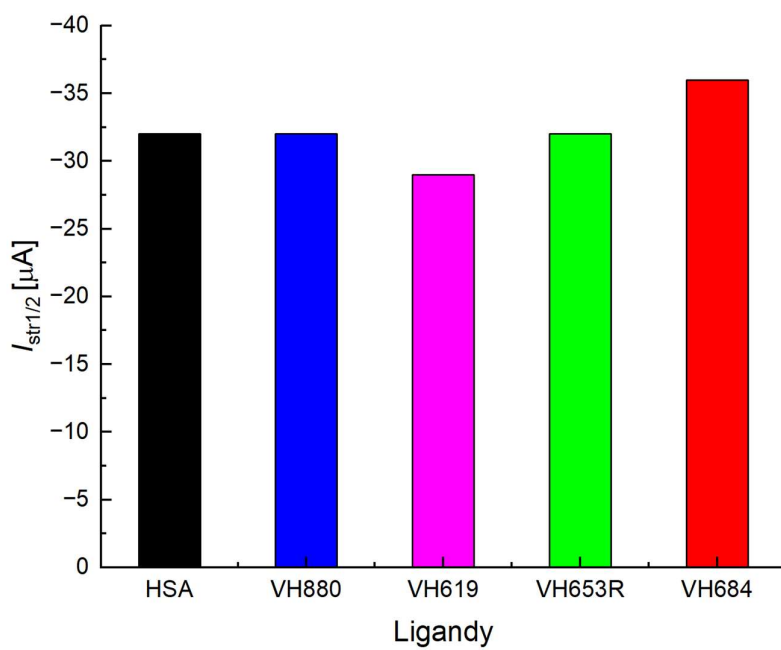
Glykomimetické ligandy byly syntetizovány a testovány jako inhibitory pro galektin-1 a galektin-3, kde jejich interakce byla popsána také pomocí CPS [2]. Interakce s proteinem se projeví na hodnotě $I_{str1/2}$. Změna hodnoty $I_{str1/2}$ částečně reflektuje míru stability proteinu na elektrodě. Když je hodnota $|I_{str}|$ jiná u nativního HSA vůči jeho kombinaci s nějakým z vybraných ligandů, mohlo dojít k vazbě právě mezi ligandem a HSA, což by mohlo vést například k destabilizaci proteinu, nebo k jeho reorientaci na povrchu [2].

Na základě srovnání závislosti výšky píku-H na rozpouštěcím proudu pro nativní HSA a pro HSA s jednotlivými ligandy (VH880, VH619, VH653R a VH684), které jsme naměřili (Obr. 20 a 21), lze usoudit, že ligandy VH880, VH653R neovlivňují katalytické vylučování vodíku HSA a s velkou pravděpodobností netvoří žádné či pouze minimální nespecifické vazby s HSA, jelikož hodnota $I_{str1/2}$ je shodná s hodnotou pouze pro nativní HSA a ligandy samy o sobě žádný H-pík nevykazují. Ligand VH619 s HSA poskytuje závislost podobnou samotnému nativnímu HSA, která je mírně posunuta k nižším hodnotám $|I_{str}|$. Tento posun může být způsoben mírnou nepřesností pro naměřenou hodnotou v $I_{str} = -30 \mu A$, jelikož hodnoty, měřené ve skokové oblasti mají nejmenší přesnost ze všech měření, ale také by tento výsledek mohl znamenat, že se ligand VH619 váže na HSA a stabilizuje ho.

Chování ligandu VH684 je oproti výše zmíněným jiné. Na základě srovnání hodnot $I_{str1/2}$ a na základě informací z grafu, lze usuzovat, že se tento ligand váže ze všech zkoumaných nejvíce nespecificky s lidským sérovým albuminem, na rozdíl od ostatních ligandů se hodnota $|I_{str1/2}|$ posouvá k vyšším hodnotám. Což by mohlo znamenat, že vazbou ligandu VH684 dochází k částečné destabilizaci HSA. Ovšem je třeba brát v potaz i možnou variantu, že naměřené hodnoty mohli být ovlivněny vazbou ligandu VH684 na povrch rtuťové elektrody, a proto je vhodné vyslovený závěr ověřit nějakou z komplementárních technik (např. pomocí fluorescenční spektroskopie či anizotropie). Nicméně nepublikovaná data od kolegyně ukazují, že VH684 se na HSA váže.



Obrázek 20: Srovnání závislosti výšky H-píku na rozpouštěcím proudu pro HSA a pro HSA v kombinaci s ligandy VH880, VH619, VH653R a VH684.



Obrázek 21: Srovnání hodnot $I_{str1/2}$ pro nativní HSA a pro HSA v kombinaci s ligandy VH880, VH619, VH653R a VH684.

5 ZÁVĚR

Výsledky této práce poskytují informace o nespecifické vazbě glykomimetických ligandů galektinů (VH880, VH619, VH653R a VH684), jakožto potenciálních antimetastatických léčiv. V rámci této práce jsme studovali jejich nespecifické interakce s lidským sérovým albuminem. Cílem bylo zjistit, do jaké míry se tyto ligandy vážou na HSA, což je důležité pro posouzení jejich využitelnosti jako potenciálních inhibitorů galektinů v léčbě metastazování nádorů. Z výsledků můžeme usuzovat, že mezi studovanými ligandy vykazoval nejsilnější nespecifické interakce ligand VH684, který pravděpodobně destabilizuje strukturu HSA.

Studium nespecifických interakcí je pro zdravotnictví klíčové, protože potenciální antimetastatická léčiva by měla především vázat cílové proteiny, v tomto případě galektiny, a co nejméně ty ostatní. Vázalo-li by se totiž léčivo ve velké míře na HSA, mohla by být jeho účinnost snížena nebo by také mohlo dojít k neočekávaným vedlejším účinkům. Získané výsledky se ukazují být zajímavé, a proto se bude ve výzkumu dále pokračovat. Nespecifické interakce budou ověřeny i jinými metodami (například spektroskopicky).

Přestože se jedná o základní výzkum, tak získané poznatky z této práce mohou být užitečné při dalším vývoji léčiv zaměřených na redukci metastazování nádorových buněk a snížit tak metastázemi způsobenou úmrtnost, ale také na zlepšení a zpřesnění proteinové elektrochemické analýzy.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] R. D. CUMMINGS, LIU F.-T., RABINOVICH G. A., STOWELL S. R., VASTA G. R., In *Essentials of Glycobiology*, 4th edition ed.; (Eds: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2022, doi:10.1101/9781621824213.
- [2] V. HAMALA, KURFIŘT M., ČERVENKOVÁ ŠŤASTNÁ L., HUJEROVÁ H., BERNÁŠKOVÁ J., PARKAN K., KAMINSKÝ J., HABANOVÁ N., KOZÁK J., MAGDOLENOVÁ A., ZAVŘEL M., STAROŇOVÁ T., OSTATNÁ V., ŽALOUDKOVÁ L., DAŇHEL A., HOLČÁKOVÁ J., VOŇKA P., HRSTKA R., KARBAN J., Ferrocene- and ruthenium arene-containing glycomimetics as selective inhibitors of human galectin-1 and -3, *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2024, doi: 10.1039/D4QI01555J
- [3] V. OSTATNÁ, CERNOCKÁ H., GALICOVÁ T., HASON S., Electrochemical analysis of proteins important in cancer: Behavior of anterior gradient receptors, p53 protein and their complexes at charged surfaces, *Current Opinion in Electrochemistry*, 2023, **39**, 101269101269, doi: 10.1016/j.coelec.2023.101269
- [4] E. PALEČEK, TKÁČ J., BARTOŠÍK M., BERTÓK T., OSTATNÁ V., PALEČEK J., Electrochemistry of nonconjugated proteins and glycoproteins. Toward sensors for biomedicine and glycomics. In *Chemical Reviews*, American Chemical Society: 2015; Vol. 115, pp 2045-2108.
- [5] J. VACEK, OSTATNÁ V., *Bioelektrochemie*. Univerzita Palackého v Olomouci: Křížkovského 8, 771 47 Olomouc, 2020; isbn: 978-80-244-5763-5, doi:10.5507/lf.20.24457635.
- [6] K. MARKUŠOVÁ, KLADEKOVÁ D., *Vybrané kapitoly z elektrochémie*. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach: Košice, 2013;
- [7] J. WANG, *Analytical Electrochemistry*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2006; p 250, isbn: 13 978-0-471-67879-3,
- [8] M. BARTOŠÍK, OSTATNÁ V., PALEČEK E., Electrochemistry of riboflavin-binding protein and its interaction with riboflavin, *Bioelectrochemistry*, 2009, **76**, 70-75, doi: 10.1016/j.bioelechem.2009.04.006
- [9] E. PALECEK, OSTATNA V., Electroactivity of nonconjugated proteins and peptides. Towards electroanalysis of all proteins, *Electroanalysis*, 2007, **19**, 2383-2403, doi: 10.1002/elan.200704033
- [10] V. OSTATNÁ, USLU B., DOGAN B., OZKAN S., PALEČEK E., Native and denatured bovine serum albumin. D.c. polarography, stripping voltammetry and constant current chronopotentiometry, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2006, **593**, 172-178, doi: 10.1016/j.jelechem.2006.03.037

- [11] L. RIMANKOVA, CERNOCKA H., TIHLARIKOVA E., NEDELA V., OSTATNA V., Chronopotentiometric sensing of native, oligomeric, denatured and aggregated serum albumin at charged surfaces, *Bioelectrochemistry*, 2022, **145**, 108100, doi: 10.1016/j.bioelechem.2022.108100
- [12] V. OSTATNA, WEST R. M., Effects of ex situ chronopotentiometric analysis on stability of bovine serum albumin on mercury electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, **860**, 113884113884, doi: 10.1016/j.jelechem.2020.113884
- [13] M. ZATLOUKALOVA, MOJOVIC M., PAVICEVIC A., KABELAC M., FREEMAN B. A., PEKAROVA M., VACEK J., Redox properties and human serum albumin binding of nitro-oleic acid, *Redox Biology*, 2019, **24**, 101213, doi: 10.1016/j.redox.2019.101213
- [14] L. ŘÍMÁNKOVÁ, ČERNOCKÁ H., TIHLAŘÍKOVÁ E., NEDEĚLA V., OSTATNÁ V., Chronopotentiometric sensing of native, oligomeric, denatured and aggregated serum albumin at charged surfaces, *Bioelectrochemistry*, 2022, **145**, 108100, doi: 10.1016/J.BIOELECHEMA.2022.108100
- [15] H. ČERNOCKÁ, OSTATNÁ V., PALEČEK E., Protein structural transition at negatively charged electrode surfaces. Effects of temperature and current density, *Electrochimica Acta*, 2015, **174**, 356-360, doi: 10.1016/j.electacta.2015.06.009

7 ABECEDNÍ SEZNAM ZKRATEK

AdS - klasická adsorpce

AdST - adsorpce s přenosem

Arg - arginin

BSA - hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)

CHER - katalytická reakce vývoje vodíku (z angl. Catalytic Hydrogen Evolution Reaction)

CPS - Chronopotenciometrická analýza konstantním proudem (z angl. Constant Current Chronopotentiometric Stripping)

Cys - cystein

dHSA - denaturovaný lidský sérový albumin

DMSO - Dimethylsulfoxid

His - histidin

HMDE - rtuťová elektroda s visící kapkou (z angl. Hanging Mercury Drop Electrode)

HSA - lidský sérový albumin (z angl. Human Serum Albumin)

I_{str} - rozpouštěcí proud

Lys - lysin

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Elektrochemická cela se třemi elektrodami: pracovní elektroda, referenční elektroda a pomocná elektroda.	8
Obrázek 2: Grafické znázornění aminokyselinových zbytků BSA, které jsou aktivní v CHER. Přebráno z [13].....	10
Obrázek 3: Chemický vzorec ligandu VH619 v geometrickém zobrazení.....	11
Obrázek 4: Chemický vzorec VH653R v geometrickém zobrazení.....	11
Obrázek 5: Chemický vzorec VH684 v geometrickém zobrazení.	12
Obrázek 6: Chemický vzorec VH880 v geometrickém zobrazení.	12
Obrázek 7: Závislost absorpance od vlnové délky pro stanovení koncentrace HSA pomocí UV-Vis.....	13
Obrázek 8: mikroAutolab III.....	14
Obrázek 9: 663 VA STAND	14
Obrázek 10: Závislost potenciálu E na čase t (tzv. E - t křivka). V horním rohu je odpovídající graf (s výrazným píkem-H) po provedení převrácené derivace pro 300 nM HSA v 50 mM NaPh, pH 7,0, $I_{str} = -30 \mu A$	15
Obrázek 11: Graf s vyznačenou odchylkou pro 5 měření pro 300nM HSA v 50mM NaPh, pH 7,0, měřeno při $I_{str} 50 \mu A$ (černá) a $I_{str} -25 \mu A$ (červená).....	16
Obrázek 12: Graf závislosti výšky píku-H na koncentraci HSA pro c_{HSA} 25–300 nM.	17
Obrázek 13: Srovnání závislosti potenciálu na čase u nativního (černá) a denaturovaného (červená) HSA pro 300 nM HSA v 50mM NaPh, pH 7,0., $I_{str} = -50 \mu A$	18
Obrázek 14: Závislost výšky píku-H na rozpouštěcím proudu pro 300 nM nativní HSA, s vyznačeným bodem $I_{str1/2}$ v 50 mM NaPh, pH 7,0.	19
Obrázek 15: Srovnání závislostí výšky píku-H na rozpouštěcím proudu pro nativní (černá) a denaturovaný (fialová) HSA.	20
Obrázek 16: Závislost rozpouštěcího proudu na výšce H-píku pro 3 μ M VH880 s 300nM HSA v 50 mM NaPh, ph = 7.	21
Obrázek 17: Závislost rozpouštěcího proudu na výšce H-píku pro 3 μ M VH653R s 300nM HSA v 50 mM NaPh, ph = 7.....	21
Obrázek 18: Závislost rozpouštěcího proudu na výšce H-píku pro 3 μ M VH684 s 300nM HSA v 50 mM NaPh, ph = 7.	22

Obrázek 19: Závislost rozpouštěcího proudu na výšce H-píku pro 3 μ M VH619 s 300nM HSA v 50 mM NaPh, ph = 7.	22
Obrázek 20: Srovnání závislosti proudu na výšce H-píku pro HSA a pro HSA v kombinaci s ligandy VH880, VH619, VH653R a VH684.	24
Obrázek 21: Srovnání hodnot $I_{str1/2}$ pro nativní HSA a pro HSA v kombinaci s ligandy VH880, VH619, VH653R a VH684.....	24