

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Andrea Janoušková

**Příprava mutovaných forem proteinu CD69, receptoru lidských
lymfocytů**

Production of mutant forms of the CD69 protein, a human lymphocyte receptor

Bakalářská práce

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

Praha, 2025

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsou uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Při psaní této závěrečné práce jsem využila umělou inteligenci (AI) a technologie podporované AI pouze ke zlepšení čitelnosti a jazyka. Tyto technologie nebyly použity k nahrazení klíčových výzkumných úkolů, jako je interpretace dat nebo vyvození vědeckých závěrů.

V Praze dne 16. 5. 2025

Andrea Janoušková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D., za možnost pracovat na zvoleném projektu a za příležitost stát se součástí kolektivu Laboratoře strukturní biochemie imunitního rozpoznávání. Dále děkuji Bc. Jakobovi Jeníčkoví za čas a pomoc, kterou mi během práce věnoval, a Bc. Anastassiyi Rudenko za její cenné rady a podporu. Poděkování patří také celému kolektivu laboratoře za příjemné a přátelské prostředí. Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (25-18490S).

Abstrakt

Receptor CD69, známý jako časný aktivační marker lymfocytů, je povrchový protein exprimovaný na aktivovaných leukocytech, kde hraje důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi. Tento receptor tvoří disulfidicky vázaný homodimer a jeho extracelulární doména obsahuje dvě místa pro N-vázanou glykosylaci, která mohou ovlivňovat jeho interakce s ligandy.

V rámci této bakalářské práce byly připraveny tři stabilně transfekované buněčné linie HEK293T, v nichž byly exprimovány mutantní formy extracelulární části proteinu CD69. Tyto varianty byly vytvořeny bodovou mutací v oblasti N-glykosylačních míst. Transfekce byla provedena pomocí transposonového systému piggyBac. Exprimované proteiny byly následně purifikovány pomocí chelatační afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie. Čistota a oligomerní stav proteinů byly ověřeny pomocí gelové elektroforézy v redukujících i neredučujících podmínkách.

Cílem této práce bylo vytvořit varianty proteinu CD69 s cílenou bodovou mutací glykosylačních míst, která umožní následné testování jeho interakce s Galektinem-1. Takto připravené proteiny představují základ pro pochopení vlivu jednotlivých glykanových motivů na vazbu tohoto imunomodulačního ligandu.

Klíčová slova

CD69, Galektin-1, N-glykosylace, mutace, HEK293

Abstract

The CD69 receptor, known as an early lymphocyte activation marker, is a surface protein expressed on activated leukocytes where it plays an important role in regulating the immune response. This receptor forms a disulfide-linked homodimer and its extracellular domain contains two N-linked glycosylation sites that may influence its interactions with ligands.

Three stably transfected HEK293T cell lines expressing mutant forms of the extracellular part of the CD69 protein were prepared as part of this thesis. These variants were created by point mutation in the region of the N-glycosylation sites. Transfection was performed using the piggyBac transposon system. The expressed proteins were subsequently purified by immobilised-metal affinity chromatography and size-exclusion chromatography. The purity and oligomeric state of the proteins were verified by gel electrophoresis under reducing and non-reducing conditions.

The aim of this work was to create variants of the CD69 protein with targeted point mutations of the glycosylation sites to allow subsequent tests of its interaction with Galectin-1. Proteins prepared in this way provide a basis for understanding the influence of individual glycan motifs on the binding of this immunomodulatory ligand.

Keywords

CD69, Galectin-1, N-glycosylation, mutation, HEK293

Seznam zkratek

APC	Antigen Presenting Cell (buňka prezentující antigen)
CD	Cluster of Differentiation (klastř diferenciace)
CM1	Extracelulární doména receptoru CD69
CRD	Carbohydrate Recognition Domain (doména rozpoznávající sacharidy)
CTLD	C-type Lectin-like Domain (doména podobná lektinům C-typu)
DOX	Doxycyklin
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
Gal-1	Galektin-1
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonová kyselina
His-tag	Polyhistidinová kotva (značení pro afinitní purifikaci proteinů)
IFN- γ	Interferon gama
IgG, IgA, IgM, IgD, IgE	Třídy imunoglobulinů (protilátek)
IL-2, IL-10, IL-17, IL-22	Interleukiny (cytokiny)
IMAC	Immobilized-Metal Affinity Chromatography (afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech)
IPEI	Lineární polyethylenimin (polykationický polymer používaný k transfekci)
LAT1-CD98	Aminokyselinový transportní komplex
MHC	Major Histocompatibility Complex (hlavní histokompatibilní komplex)
NK	Natural Killer (přirozený zabiják, typ imunitní buňky)
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (polyakrylamidová gelová elektroforéza)
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns (s patogeny asociované molekulární vzorce)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (fosfátem pufovaný fyziologický roztok)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (polyakrylamidová

	gelová elektroforéza v prostředí dodecylsíranu sodného)
SEC	Size-Exclusion Chromatography (gelová permeační chromatografie)
TAE	Tris-acetát-EDTA (elektroforetický pufr)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Treg	Regulační T lymfocyty
TCR	T-cell receptor (T-buněčný receptor)
Th1, Th17	Subtypy pomocných T-lymfocytů
TRM	Tissue-Resident Memory (tkáňově rezidentní paměťové T buňky)
VPA	Kyselina valproová

Obsah

1	Teoretický úvod	10
1.1	Imunitní systém	10
1.1.1	Vrozená imunita.....	10
1.1.2	Adaptivní imunita.....	11
1.1.3	Leukocyty, lymfocyty a NK buňky	11
1.2	Rozpoznávání imunitního systému	13
1.3	Lektiny	14
1.3.1	C-lektiny.....	16
1.3.2	Galektiny.....	16
1.4	Receptor CD69.....	18
1.4.1	Struktura receptoru	18
1.5	Rekombinantní produkce glykoproteinů	22
2	Cíle práce	23
3	Materiál	24
3.1	Přístroje a pomůcky	24
3.2	Chemikálie	26
3.2.1	Plasmidy a vektory	27
3.2.2	Buněčné linie	27
3.3	Kultivační média.....	28
3.4	Roztoky	28
3.4.1	Roztoky pro purifikaci proteinů	28
3.4.2	Roztoky pro SDS – PAGE	29
4	Metody	30
4.1	Kultivace buněk HEK293T	30
4.2	Počítání buněčné hustoty a kontrola viability buněk	30
4.3	Transfekce buněk HEK293	30
4.4	Selekce a udržování stabilní linie buněk	31
4.5	Exprese proteinů.....	31
4.6	Purifikace proteinů	32
4.6.1	Koncentrování proteinů.....	33
4.6.2	Gelová permeační chromatografie	33

4.7	Charakterizace proteinů	34
4.7.1	Stanovení koncentrace proteinů	34
4.7.2	SDS-PAGE.....	34
5	Výsledky.....	36
5.1	Konstrukce plasmidů a příprava transfekční směsi.....	36
5.2	Stabilní exprese a purifikace rekombinantních proteinů	37
5.3	Výsledný výtěžek proteinů.....	40
6	Diskuse.....	41
7	Závěr	42
8	Seznam literatury.....	43

1 Teoretický úvod

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je komplexní obranný systém lidského těla, který zajišťuje ochranu před vnějšími i vnitřními škodlivými vlivy. Tvoří jej síť lymfoidních orgánů, buněk, humorálních složek a cytokinů, které spolu vzájemně komunikují a koordinovaně se podílejí na udržení homeostázy organismu. Imunitní systém nejenže brání vniknutí patogenů do těla, ale je rovněž schopen rozeznat a odstranit například patogenní bakterie. Úzce spolupracuje s dalšími regulačními systémy, jako jsou nervový a endokrinní systém, což dokládá jeho systémový význam (Delves a Roitt, 2000).

Základní úlohou imunitního systému je rozeznat a zneškodnit cizorodé struktury, které se do organismu dostávají inhalací, perorálně nebo při kontaktu s povrchem těla. Účinnost imunitní odpovědi závisí na dvou faktorech: na patogenitě daného mikroorganismu a na integritě obranných mechanismů hostitele. Odpovědi imunitního systému jsou zprostředkovány širokým spektrem buněk a molekul, které spolu interagují buď prostřednictvím přímého buněčného kontaktu, nebo za pomoci signálních molekul, cytokinů (Stříž a Holáň, 2015).

Jednou z klíčových vlastností imunitního systému je schopnost odlišovat vlastní a cizí molekuly. Tato rozpoznávací schopnost je zásadní pro správnou regulaci imunitní odpovědi a prevenci autoimunitních onemocnění. Při selhání tohoto mechanismu může dojít buď ke snížení aktivity imunitního systému (imunodeficiency), která vede k častým infekcím a nádorovým onemocněním, nebo naopak k jeho nadměrné aktivitě, která je spojena s rozvojem alergií a autoimunitních chorob (Parkin a Cohen, 2001).

Imunitní odpověď lze rozdělit na dvě základní složky: vrozenou a adaptivní imunitu. Tyto dvě složky jsou spolu úzce spojeny a tvoří provázaný funkční celek.

1.1.1 Vrozená imunita

Vrozená imunita představuje první linii obrany, která je rychlá, avšak nespecifická. Její výhodou je okamžitá reakce na široké spektrum patogenů, často během několika minut od vniknutí patogenu do hostitele. Evolučně se jedná o starší typ imunity, přítomný i u nižších živočichů. Typickým rysem tohoto typu imunity je neměnná reakce na opakované setkání se stejným patogenem, neboť vrozená imunita nedisponuje imunologickou pamětí (Parkin a Cohen, 2001).

Hlavními buněčnými komponentami vrozené imunity jsou neutrofilů, monocytů, makrofágů a přirozeně zabíjácí buňky (natural killer cells, NK buňky), dále se zapojují také dendritické buňky. Humorální složku zastupuje například komplementový systém a různé druhy cytokinů (Parkin a Cohen, 2001).

1.1.2 Adaptivní imunita

Na vrozenou imunitu navazuje adaptivní imunita, která je pomalejší, ale výrazně specifičtější. Její hlavní výhodou je schopnost vytvářet imunologickou paměť, která umožňuje rychlejší a účinnější odpověď při opětovném setkání s antigenem. Tento typ imunity se objevuje u vyšších obratlovců a je zprostředkován T a B lymfocyty, jejichž receptory jsou schopné rozeznávat specifické antigenní struktury neboli epitopy (Delves a Roitt, 2000).

Adaptivní imunita se dělí na humorální a buněčnou složku, obě jsou navzájem propojené a zároveň jsou ovlivňovány/ovlivňují vrozenou imunitu. Humorální složka imunity je zprostředkována protilátkami produkovanými B lymfocyty. Buněčná složka je zprostředkována aktivitou T lymfocytů. Odpověď adaptivního imunitního systému se typicky rozvíjí řádu dnů až týdnů (Rosypal, 2003).

Pochopení funkcí a koordinace vrozené a adaptivní imunity je zásadní pro interpretaci nejen obranných reakcí organismu, ale i pro vývoj imunoterapií, vakcín a nových diagnostických metod (Parkin a Cohen, 2001).

1.1.3 Leukocyty, lymfocyty a NK buňky

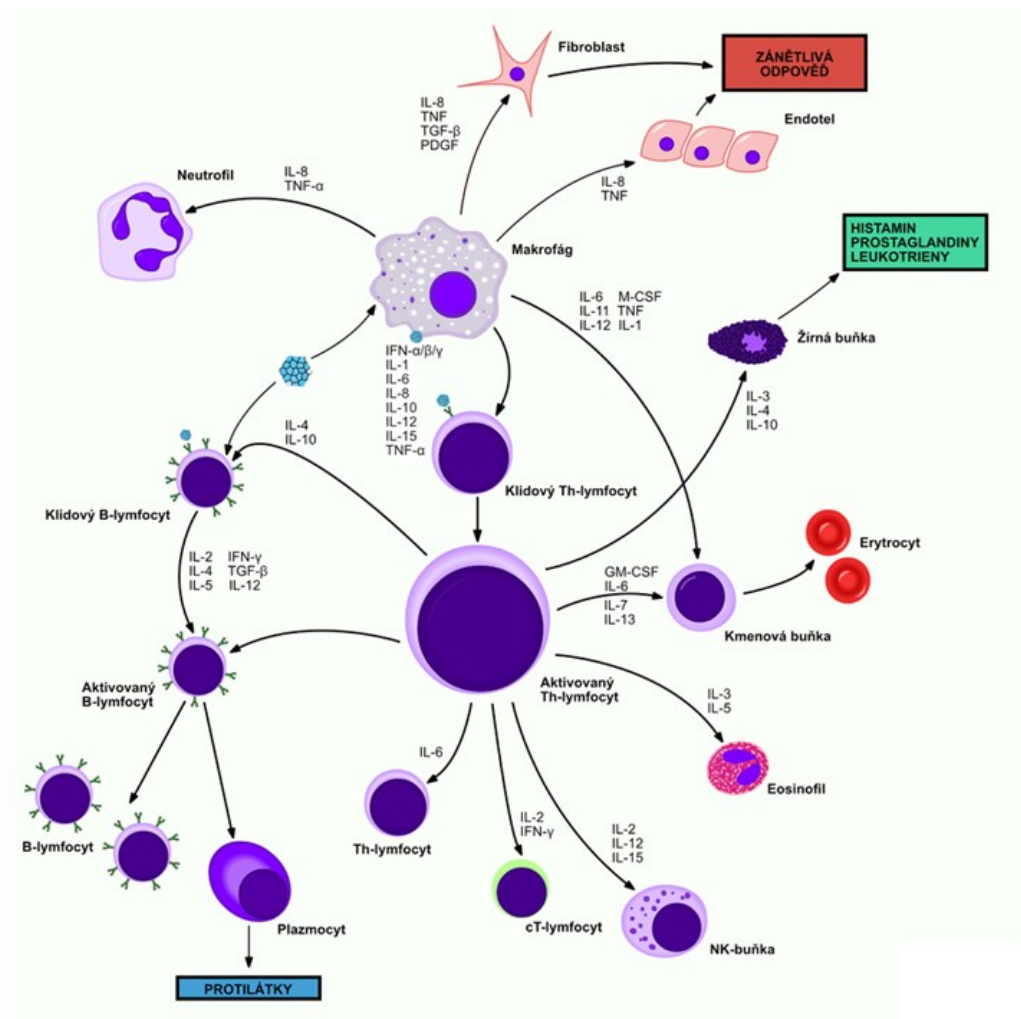
Leukocyty (bílé krvinky) představují širokou skupinu buněk imunitního systému, jejichž hlavní funkcí je rozpoznání, signalizace a likvidace cizorodých nebo patologických struktur v organismu. Jejich celkový obsah zaujímá asi $4 - 10 \times 10^9$ buněk/l krve (Rosypal, 2003). Kromě neutrofilů, bazofilů a eozinofilů zahrnují také monocyty, NK buňky a lymfocyty B a T. Všechny leukocyty se vyznačují schopností reagovat na chemotaktické signály a lokalizovat se v místech infekce či zánětu. Tyto buňky exprimují adhezní molekuly, receptory pro cytokiny, a navzájem si pomocí těchto molekul předávají informace, zejména pomocí interleukinů, což jsou cytokiny s regulačním účinkem zejména na další leukocyty (Delves a Roitt, 2000).

Lymfocyty B a T jsou klíčovými efektorovými buňkami adaptivní imunity. B lymfocyty vznikají i dozrávají v kostní dřeni, konečným produktem diferenciací B lymfocytů jsou plazmatické buňky, které jsou schopné uvolňovat specifické protilátky (Ig, imunoglobuliny) a paměťové buňky. Podle struktury a vlastností dělíme protilátky na pět základních typů: IgG, IgM, IgA, IgE a IgD (Rosypal, 2003). Paměťové buňky umožňují rychlou odpověď imunitního systému v případě opakovaného setkání s antigenem. Antigeny mohou být B buňkami rozpoznány přímo nebo za pomoci T_H buněk (z *angl.* T helper cells, T pomocné buňky) (Parkin a Cohen, 2001).

T lymfocyty naproti tomu dozrávají v thymu, kde procházejí pozitivní a negativní selekcí. Výsledkem jsou dvě základní funkční populace: $CD4^+$ pomocné T buňky (T_H) a $CD8^+$ cytotoxické T buňky (T_C). $CD4^+$ buňky se dále diferencují na různé subtypy, například Th_1 nebo Th_2 , které regulují různé typy imunitních odpovědí. $CD8^+$ T lymfocyty rozpoznávají antigeny prezentované molekulami MHC I (z *angl.* major histocompatibility complex, molekuly hlavního histokompatibilního komplexu) na povrchu cílových buněk a ničí tak dané buňky, například infikované buňky. Specifitu zajišťuje antigenní receptor TCR (z *angl.* T-cell receptor, T-buněčný

receptor), jehož diverzita vzniká přeskupením genových segmentů během vývoje v thymu (Hořejší *et al.*, 2017).

Po aktivaci dochází k expanzi specifických klonů B a T buněk, které se dále diferencují na efektorové a paměťové buňky (Obrázek 1). Tento proces, klonální selekce, je základem imunologické paměti. Aktivace T buněk vyžaduje nejen vazbu antigenu, ale i kostimulační signály (např. CD3 komplex), a je často iniciována antigen prezentujícími buňkami, jako jsou dendritické buňky (Delves a Roitt, 2000).



Obrázek 1. Ovlivňování diferenciace pomocí cytokinů. Převzato a upraveno z https://www.wikiskripta.eu/w/Imunokompetentn%C3%AD_bu%C5%88ky

NK buňky jsou součástí vrozené imunity, ale mají některé rysy adaptivní imunity, zejména podobnost s cytotoxickými buňkami CD8⁺ T. Oproti T a B lymfocytům však nevytvářejí antigenně specifické receptory pomocí genové rekombinace. Jejich funkcí je rychlá eliminace virových, bakteriálních a parazitárních infekcí, dále bojují proti nádorově změněným buňkám, které neexprimují molekuly třídy MHC I molekul. Tento stav je signálem k aktivaci cytotoxických mechanismů NK buněk, zejména uvolnění perforinů a granzymů, které indukují apoptózu cílové buňky (Stříž a Holář, 2015).

NK buňky využívají rovnováhu aktivačních a inhibičních receptorů k regulaci své funkce. Inhibiční receptory NK buněk rozpoznávají vlastní MHC I a brání tak autoimunitní reakci. Naopak aktivace nastává v případě jejich absence nebo přítomnosti specifických ligandů (Stříž a Holář, 2015).

K aktivaci a proliferaci NK buněk přispívají různé cytokiny, zejména interleukin-2 (IL-2) a interferon- γ (IFN- γ), který je zároveň produkován NK buňkami i Th₁ lymfocyty a hraje důležitou roli v aktivaci makrofágů. Na Obrázek 1, strana 12 můžeme vidět dráhy, jak cytokiny ovlivňují diferenciaci nebo aktivaci různých typů buněk. V některých případech se vyskytují i tzv. NKT buňky, které sdílejí znaky T i NK buněk a mají imunoregulační schopnosti (Hořejší *et al.*, 2017).

1.2 Rozpoznávání imunitního systému

Molekuly hlavního histokompatibilního komplexu I a II jsou zásadní pro prezentaci antigenů a tím i pro adaptivní imunitu, váží peptidové fragmenty patogenů a vystavují je na povrchu buňky k rozpoznání příslušnými T lymfocyty. MHC I se nachází na všech jádrových buňkách a prezentují intracelulární antigeny cytotoxickým T lymfocytům (CD8⁺) (Rabinovich, Van Kooyk a Cobb, 2012), zatímco MHC II je exprimován převážně na buňkách prezentujících antigen (APC, z *angl.* antigen-presenting cell, např. dendritické buňky, makrofágy, B lymfocyty) a předkládá extracelulární antigeny pomocným T lymfocytům (CD4⁺). Tato prezentace antigenů zajišťuje, že buňky infikované virem jsou eliminovány CD8⁺ cytotoxickými T lymfocyty, makrofágy aktivované CD4⁺ pomocnými T lymfocyty likvidují intracelulární bakterie a B lymfocyty stimulované T lymfocyty produkují protilátky proti extracelulárním patogenům (Janeway, 2001).

Glykosylace (posttranslační připojení cukerných řetězců na proteiny či lipidy) představuje další klíčový biochemický aspekt imunity a významně se uplatňuje v imunitních procesech. Usnadňuje rozpoznávání patogenů, většina mikroorganismů je pokryta glykokalyxem a jejich povrchové glykanové struktury (např. bakteriální lipopolysacharid) fungují jako PAMPs (z *angl.* pathogen-associated molecular patterns, s patogeny asociované molekulární vzorce) rozpoznávané receptory vrozené imunity (Rabinovich, Van Kooyk a Cobb, 2012). Imunitní systém využívá lektiny, jako je např. manosu vázající lektin (MBP, z *angl.* mannose-binding lectin), či lektinový receptor dendritických buněk DC-SIGN (z *angl.* dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), které se váží na cukerné struktury patogenů a iniciují tak imunitní reakci; další lektiny, například selektiny na endoteliálních buňkách, zprostředkovávají navádění leukocytů do místa zánětu (Rabinovich, Van Kooyk a Cobb 2012). Kromě rozpoznání cizorodých struktur moduluje glykosylace i průběh imunitní odpovědi. Například silně sialované protilátky IgG vysílají inhibiční signály pro imunitní buňky, zatímco IgG postrádající terminální sialové zbytky naopak vyvolávají aktivaci efektorových mechanismů (Rabinovich, Van Kooyk a Cobb, 2012). V neposlední řadě je správná glykosylace nezbytná pro stabilitu a funkci membránových proteinů, neboť prakticky všechny povrchové a sekreční proteiny imunitního systému jsou glykoproteiny a sacharidové složky

těchto molekul zajišťují jejich správnou strukturu, stabilitu a vzájemné interakce (Rabinovich, Van Kooyk a Cobb, 2012; Janeway, 2001).

1.3 Lektiny

Lektiny jsou skupina proteinů neimunitního původu, které se vyznačují absencí enzymové aktivity. Jejich charakteristickým rysem je schopnost specificky a reverzibilně vázat sacharidy, a to jak volné monosacharidy, tak sacharidy vázané v různých glykokonjugátech (Kumar *et al.* 2012). Sacharidové struktury se často nacházejí na povrchu buněk, což činí lektiny klíčovými molekulami v mechanismu buněčného rozpoznávání. Glykosylace proteinů hraje zásadní roli v řadě buněčných procesů, mezi něž patří transport proteinů, buněčná adheze, signalizace a modulace imunitní odpovědi. V rámci imunitního systému lektiny přispívají k rozlišování vlastních a cizorodých buněk či poškozených struktur na základě odlišného glykanového profilu. Tímto způsobem se podílejí například na rozpoznávání patogenů a odstraňování apoptotických buněk (De Mejía a Prisecaru, 2005).

Lektiny ve své struktuře obsahují doménu rozpoznávající sacharidy (CRD, z *angl.* carbohydrate recognition domain), která se podílí na specifické interakci se sacharidy podle principu zámek-klíč. Tyto domény bývají evolučně vysoce konzervované, což svědčí o jejich biologickém významu (Komath, Kavitha a Swamy, 2006).

Lektiny lze klasifikovat podle několika kritérií, například na základě taxonomie, buněčné lokalizace nebo specifity vazby na sacharidy. Podle typu rozpoznávaných sacharidů se rozlišuje pět hlavních tříd lektinů (Čtvrtníčková, 2009):

- Manosa-vazebné lektiny
- Galaktosa/N-acetylgalaktosamin-vazebné lektiny
- N-acetylglukosamin-vazebné lektiny
- Fukosa-vazebné lektiny
- Kyselina N-acetylneuraminová (sialová kyselina)-vazebné lektiny

V živočišných buňkách se vyskytuje více tříd lektinů, dále popsané budou C-lektiny a galektiny, které se liší mechanismem vazby na sacharidy a strukturálními rysy jejich rozpoznávacích domén. C-lektiny vyžadují ke své funkci přítomnost vápenatých iontů (Ca^{2+}), které stabilizují vazbu se sacharidy. Galektiny, na rozdíl od C-lektinů, nejsou závislé na přítomnosti vápníku a vážou převážně β -galaktosidové struktury. Další živočišné lektiny jsou uvedeny v Tabulka 1 na straně 15.

Tabulka 1. Rozdělení živočišných lektinů dle struktury, převzato a praveno (Zárubová, 2024).

Podskupina lektinů	Sacharidové ligandy	Lokalizace	Funkce
Calnexin	Glc ₁ Man ₉	Endoplazmatické retikulum	Třídění proteinů v ER
M-tyt	Man ₈	Endoplazmatické retikulum	Degradace glykoproteinů asociovaná s ER
L-tyt	Různé	Endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát	Třídění proteinů
P-tyt	Man-6-fosfát a další	Sekreční dráha (ER, GA, sekreční granula, lysosomy)	Třídění proteinů z GA, degradace glykoproteinů v ER
F-box lektiny	(GlcNAc) ₂	Cytoplasma	Degradace špatně sbalených proteinů
Fikoliny	GlcNAc, GalNAc	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Vrozená imunita
F-tyt	Oligosacharidy zakončené fukosou	Extracelulární prostor	Vrozená imunita
Chitinase podobné lektiny	Chitooligosacharidy	Extracelulární prostor	Metabolismus kolagenu
I-tyt (Siglec)	Sialové kyseliny	Plazmatická membrána	Buněčná adheze
C-tyt	Různé	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Buněčná adheze, vrozená imunita
R-tyt	Různé	Golgiho aparát, plazmatická membrána	Třídění enzymů, regulace glykoproteinových hormonů
S-tyt (Galektiny)	β-D-galaktosa	Extracelulární prostor, cytoplasma	Regulace cytoplazmatických dějů (např. apoptozy), prokřížení extracelulárních glykoproteinů

Podskupina lektinů	Sacharidové ligandy	Lokalizace	Funkce
Interlektiny	Galaktosa, galaktofuranosa, pentosy	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Vrozená imunita, oplodnění, embryogeneze

1.3.1 C-lektiny

Tento typ lektinů se vyskytuje jako rozpustná forma proteinu nebo membránově vázaná. Tato rodina proteinů se vyznačuje tím, že pro navázání sacharidu potřebuje vazbu na vápník. V extracelulární části se proto vedle domény vázající sacharid vyskytuje místo pro vazbu vápníku. Pokud hovoříme o receptoru, tak protein obsahuje i transmembránovou signální doménu (Veldhuizen, Van Eijk a Haagsman, 2011).

Klasické C-lektiny často dělíme do dvou velkých skupin: C-lektiny preferující manosu, obsahující motiv tří aminokyselin EPN, a C-lektiny přednostně vázající galaktosu, které obsahují aminokyselinový motiv QPD (Veldhuizen, Van Eijk a Haagsman, 2011).

1.3.1.1 Doména podobná C-typu lektinům

Tato doména se vyskytuje především v extracelulární části receptorů imunitních buněk, často se jedná o transmembránové glykoproteiny II. typu. CTLD (z *angl.* C-type lectin-like domain, doména podobná lektinům C-typu) na rozdíl od „pravých“ C-lektinů typicky postrádá klíčové aminokyselinové motivy pro vazbu sacharidů a pro vazbu vápenatých iontů. Strukturně jsou jinak C-lektinům podobné.

1.3.2 Galektiny

Tato rodina lektinů se vyznačuje dvěma základními vlastnostmi: afinitou k β -galaktosidům a charakteristickou aminokyselinovou sekvencí. Galektiny obsahují jednu nebo více domén rozpoznávající sacharidy (CRD), které mají délku přibližně 130 aminokyselin (Yang, Rabinovich a Liu, 2008).

Dosud bylo popsáno 16 savčích galektinů, které lze na základě počtu a struktury CRD rozdělit do tří hlavních typů:

- Prototypické galektiny – obsahují jednu CRD, ale funkčně se vyskytují jako dimery, které jsou stabilizovány elektrostatickými interakcemi. Do této skupiny patří galektin-1, -2, -5, -10, -11, -13, -14 a -15.
- Tandemové galektiny – nesou dvě neidentické CRD propojené peptidovým můstkem. Mezi tyto galektiny patří galektin-4, -6, -8, -9 a -12.
- Chimérický galektin – do této skupiny patří pouze galektin-3, který se vyznačuje jednou CRD spojenou s N-terminální oligomerizující doménou (Franeckova a Jabor, 2022).

Galektiny jsou syntetizovány na volných ribozomech v cytoplazmě buněk, a proto je můžeme nacházet jak v intracelulárních kompartmentech, tak v jádře buněk. Pokud obsahují signální sekvenci pro klasickou sekreční dráhu, mohou být sekretovány do extracelulárního prostoru. Zde se váží na povrch buněk prostřednictvím N-acetyl-laktosaminových struktur a podílejí se na tvorbě dynamické galektin-glykanové mřížky, která reguluje různé buněčné procesy, například difusi a endocytosu membránových glykoproteinů (Storti, Marchica a Giuliani, 2017).

Kromě vazby na buněčný povrch galektiny také interagují s glykoproteiny extracelulární matrix, jako jsou laminin, fibronectin a elastin. Tímto způsobem ovlivňují buněčný růst a diferenciaci, regulaci imunitního systému a mohou přispívat k vzniku profibrotického prostředí v různých tkáních (Franeckova a Jabor, 2022).

Intracelulárně galektiny hrají důležitou roli v regulaci buněčných procesů prostřednictvím interakcí s jádrem a dalšími intracelulárními kompartmenty (Yang, Rabinovich a Liu, 2008).

1.3.2.1 Galektin-1

Je to prototypický galektin, obsahuje dvě podjednotky o velikosti 14,5 kDa, které jsou elektrostaticky spojené do dimeru v závislosti na koncentraci. Lidský galektin-1 je složený ze šestivláknového a pětvláknového β -skládaného listu v antiparalelním uspořádání (Yang, Rabinovich a Liu, 2008). Dimerní forma vede k vyšší afinitě ke glykanům, umožňuje bivalentní interakce s glykany na povrchu buněk, což umožňuje tvorbu sítě složené z glykanů a Gal-1 (Blanchard *et al.*, 2016).

Monomery Galektinu-1 obsahují šest cysteinových zbytků, díky tomu se Galektin-1 vyskytuje ve dvou formách, a to v oxidované nebo redukované (Blanchard *et al.* 2016). Právě oxidace cysteinových zbytků může vést k biologické inaktivaci. Dimerizace, které zvyšuje afinitu ke glykanům, pomáhá ochránit Gal-1 před zmiňovanou inaktivací způsobenou oxidací (Stowell *et al.*, 2009).

Galektin-1 rozpoznává N- i O- vázané glykany na různých receptorech buněčného povrchu, například CD45 nebo pre-BCR (B buněčný receptor, z *angl.* B-cell receptor) . Gal-1 se váže na mnohočetné jednotky N-acetyl-laktosaminu (LacNAc). Jeho vaznosti na glykany brání přítomnost kyseliny α -2,6-sialové, pokud je inkorporována v LacNAc (Sundblad *et al.*, 2017).

Galektin-1 je důležitým modulátorem homeostázy, vykazuje široké protizánětlivé účinky. Vykazuje aktivitu jako kontrolní bod pro řízenou buněčnou smrt. Je tedy klíčový v roli regulace imunitního systému a svoji roli hraje i v onkogenezi (Sundblad *et al.*, 2017).

Protein je široce exprimován v různých tkáních a má klíčovou úlohu v regulaci imunitních reakcí:

- Modulace zánětu: Gal-1 podporuje řešení akutního zánětu modulací osudu a funkce vrozených imunitních buněk, včetně makrofágů, dendritických buněk, žírných buněk, eozinofilů a neutrofilů.

- Interakce s regulačními T buňkami (Treg): Gal-1 je nadměrně exprimován v regulačních T buňkách a jeho exprese se zvyšuje po jejich aktivaci. Nedávné důkazy naznačují, že Gal-1 přispívá k imunosupresivní aktivitě CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg buněk.
- Vliv na apoptosu T buněk: Gal-1 může indukovat apoptosu specifických subpopulací T lymfocytů, čímž přispívá k udržení homeostázy imunitního systému a prevenci autoimunitních reakcí.

1.4 Receptor CD69

Receptor CD69 je membránově vázaný glykoprotein II. typu, patřící do superrodiny receptorů podobných C-lektinům. Jeho výskyt a exprese jsou úzce spojeny s aktivací imunitních buněk, a proto je často využíván jako diagnostický nebo experimentální marker v imunologii. Vzhledem k rychlé indukci exprese a jeho povrchové lokalizaci slouží CD69 jako jeden z prvních detekovatelných znaků aktivace lymfocytů a dalších leukocytů v zánětlivých nebo infekčních stavech (Cibrián a Sánchez-Madrid, 2017).

Z hlediska fyziologických funkcí se ukazuje, že CD69 zasahuje do celé řady imunitních mechanismů. Hraje důležitou roli v rozhodování o osudu T-buněk – reguluje rovnováhu mezi setrváním buněk v lymfatických tkáních a jejich migrací do periferních míst zánětu. Dále se podílí na regulaci cytokinové produkce, diferenciaci T lymfocytů a udržení imunitní homeostázy. Významná je také jeho funkce při ovlivňování metabolického profilu aktivovaných T buněk prostřednictvím interakcí s dalšími receptory a transportními komplexy (Cibrián a Sánchez-Madrid, 2017).

CD69 je mimo jiné exprimován u tkáňových paměťových T buněk (TRM) a gama-delta T buněk, a proto je považován také za marker tkáňové retence. Je široce známý jako klasický časný marker aktivace lymfocytů, neboť jeho exprese je velmi rychle indukována po stimulaci imunitních buněk. CD69 se objevuje na povrchu leukocytů v rámci několika málo hodin a jeho exprese je detekovatelná u řady buněčných typů – zejména T a B lymfocytů, NK buněk, monocytů, neutrofilů i krevních destiček (Cibrián a Sánchez-Madrid, 2017).

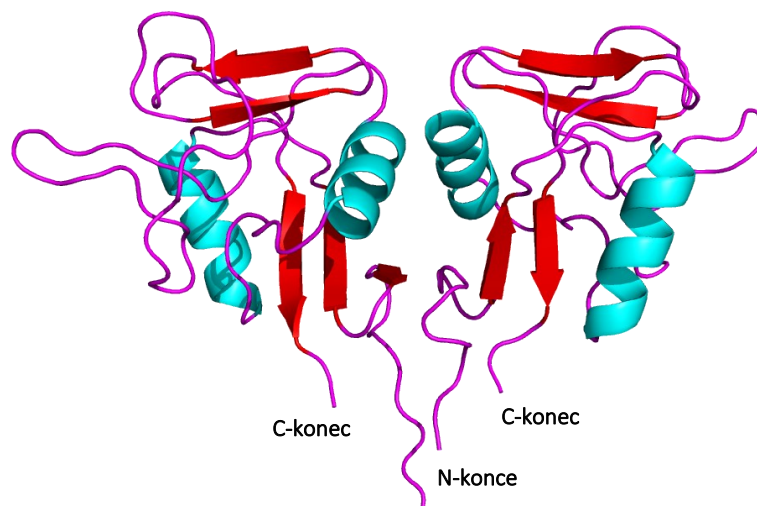
Kromě role aktivačního markeru se však ukazuje, že CD69 zastává daleko komplexnější funkce v imunitní odpovědi. Hraje významnou roli v regulaci diferenciaci efektorových T-buněk, jejich migrace, retence v tkáních i metabolického přeprogramování. Významné jsou rovněž jeho funkce ve zprostředkování imunitní tolerance, například přes regulační T buňky (Treg) a ovlivnění produkce prozánětlivých cytokinů, jako jsou IFN- γ , IL-17 a IL-22 (De La Fuente *et al.*, 2014; Cibrián a Sánchez-Madrid, 2017).

1.4.1 Struktura receptoru

CD69 je tvořen dvěma různě glykosylovanými podjednotkami, které jsou spojeny disulfidovou vazbou a tvoří tak homodimer o molekulové hmotnosti 28–32 kDa. Každá podjednotka se skládá z krátké intracelulární části, jedné transmembránové domény a extracelulární části, která

obsahuje doménu podobnou C-lektinům (C-type lectin-like domain, CTLD). Tato extracelulární doména zaujímá více než polovinu celé aminokyselinové sekvence a nese strukturální znaky typické pro C-lektinové receptory jako jsou manosu vázající protein nebo Ly-49A. CTLD se skládá ze dvou α -helixů a dvou antiparalelních β -listů, viz Obrázek 2, strana 19 (Cibrián a Sánchez-Madrid, 2017).

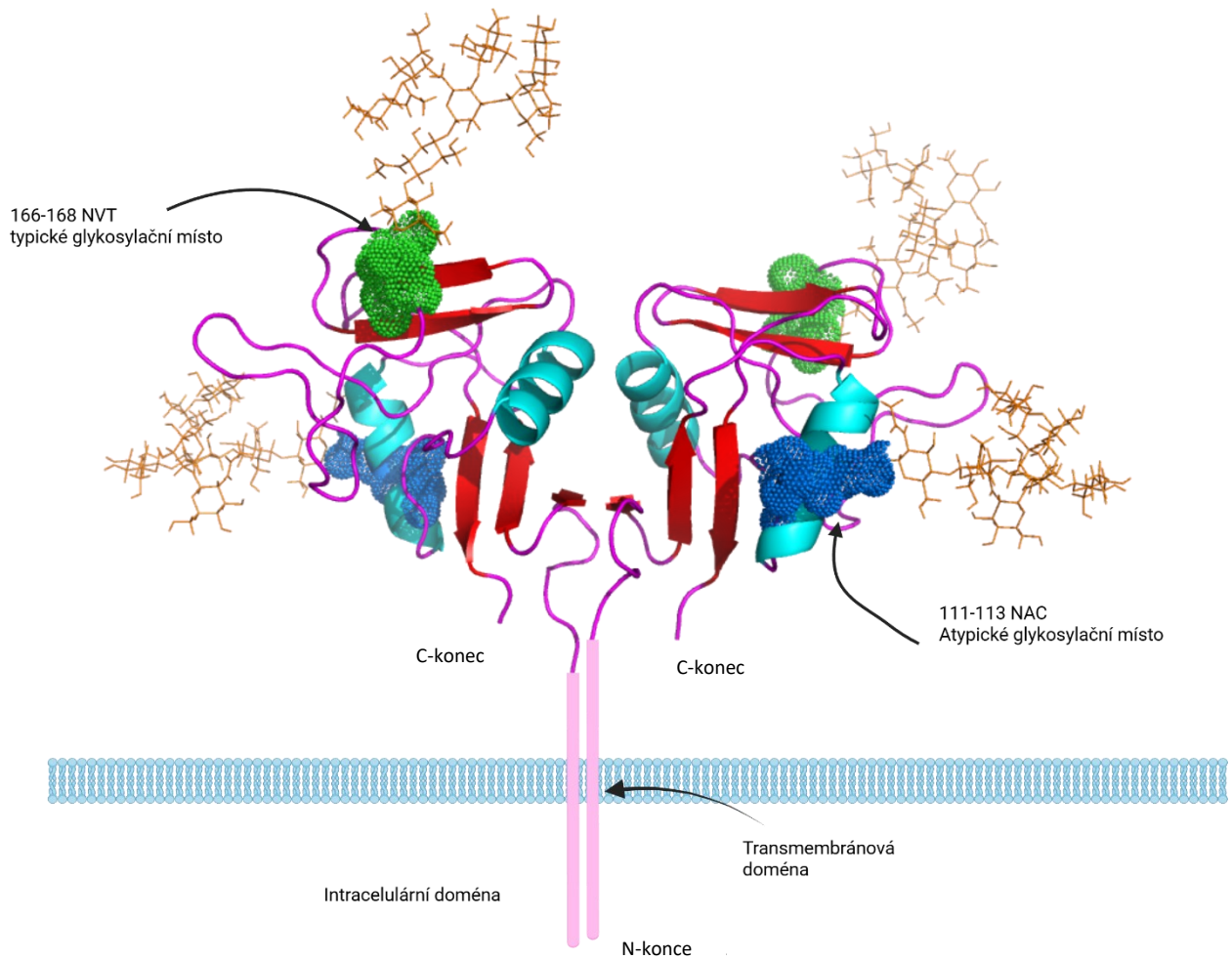
CTLD doména CD69 má vysoce konzervované rysy a podobá se doménám jiných C-lektinů, jako jsou CD94 nebo Ly-49A. Obsahuje tři intramolekulární disulfidické můstky (Cys85–Cys96, Cys113–Cys194 a Cys173–Cys186), které přispívají ke stabilitě struktury. Na rozdíl od některých pravých C-lektinů však CD69 postrádá vazebná místa pro vápník, což je pravděpodobně způsobeno zkrácením smyčky 3 ve srovnání s MBP a Ly-49A, která je v těchto receptorech běžně zapojena do koordinace Ca^{2+} iontů. Oblast krčku mezi transmembránovou doménou a CTLD je strukturálně neuspořádaná a zřejmě flexibilní, což může usnadňovat interakci s ligandy. Gen pro CD69 se nachází v NK genovém klastru, u člověka na chromozomu 12, a jeho exprese je regulována transkripčními faktory jako NF- κ B, ERG-1 a AP-1 (Natarajan *et al.*, 2000; Cibrián a Sánchez-Madrid, 2017).



Obrázek 2. Část extracelulární domény receptoru CD69. Struktura byla vytvořena v programu PyMOL na základě krystalové struktury 3HUP (Kolenko *et al.*, 2009).

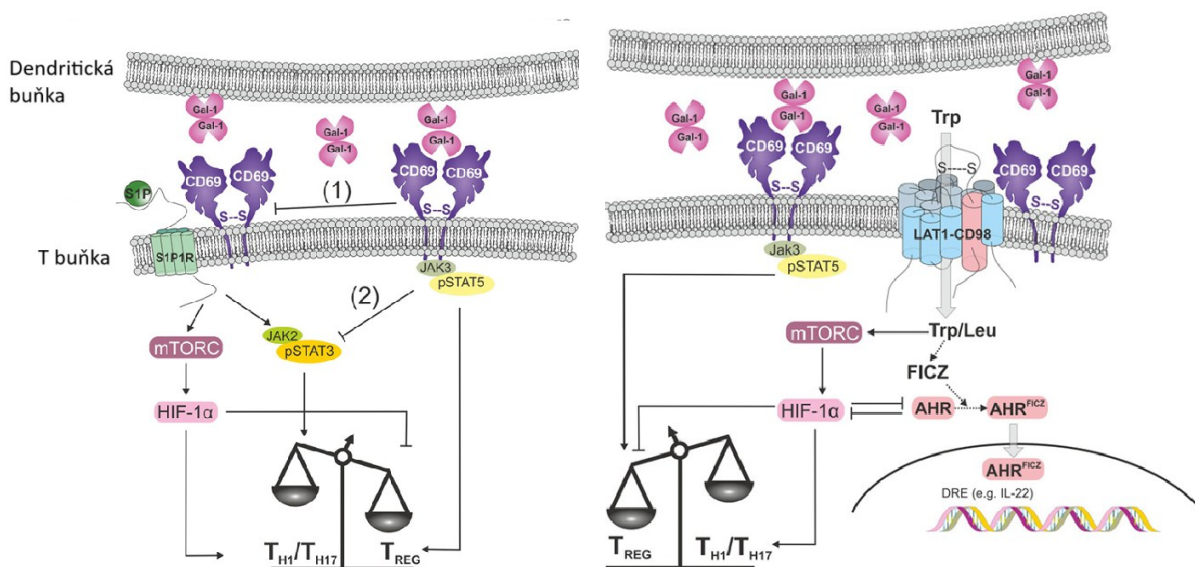
Extracelulární doména receptoru CD69 obsahuje dvě místa pro N-vázanou glykosylaci, která zásadně ovlivňují vlastnosti a funkci proteinu, tato místa jsou vyznačená na Obrázku 3, strana 20. Prvním z nich je typický motiv *Asn-Val-Thr* (NVT) na pozicích 166–168, zatímco druhé místo je atypické, tvořené sekvencí *Asn-Ala-Cys* (NAC) na pozicích 111–113, toto místo obsahuje cystein tvořící disulfidický můstek stabilizující extracelulární doménu (Vance *et al.*, 1997).

Studie ukazují, že glykosylace proteinu CD69 probíhá v endoplazmatickém retikulu a nezávisí na dalším zpracování v Golgiho aparátu. Různá míra glykosylace ovlivňuje dimerní stav receptoru a jeho interakce s ligandy, včetně Galektinu-1 (Vance *et al.*, 1997).



Obrázek 3. Glykosylovaný receptor CD69. Model struktury připojených N-glykanů byl vytvořen s pomocí programu GlycoShape (<https://glycoshape.org/reglyco>) na základě krystalové struktury 3HUP (Kolenko *et al.*, 2009). Obrázek byl vytvořen s pomocí <https://BioRender.com>.

V literatuře je popsána interakce CD69 s některými ligandy, jedním z nich je výše zmíněný Galektin-1. Tato interakce je přímá, specifická a závislá na sacharidových strukturách - konkrétně na N-glykanových strukturách v extracelulární doméně CD69. Studie naznačují, že CD69 a Gal-1 interagují specifickým způsobem závislým na přítomnosti sacharidových struktur, což bylo ukázáno metodou rezonance povrchového plasmonu. Interakce s Gal-1 má funkční dopad, inhibuje diferenciaci Th17 buněk a podporuje produkci IL-10, jak je naznačeno na Obrázku 4 níže (De La Fuente *et al.*, 2014; Cibrián a Sánchez-Madrid, 2017).



Obrázek 4. Naznačení reakce receptoru CD69 s ligandy Gal-1 a S1PR1 a LAT1-CD98. Schéma také znázorňuje dráhy, kterými je ovlivňována diferenciace T buněk. Převzato a upraveno (Cibrián a Sánchez-Madrid, 2017).

Kromě Gal-1 CD69 laterálně (cis) asociuje s receptorem S1PR1 (sfingosin-1-fosfátový receptor 1), čímž reguluje migraci lymfocytů. Tato asociace vede k internalizaci S1P a brání výstupu lymfocytů z lymfoidních orgánů (Bankovich, Shioh a Cyster, 2010). Další významnou interakcí je vazba na aminokyselinový transportní komplex LAT1-CD98. Interakce umožňuje efektivní transport L-tryptofanu do buňky, což následně aktivuje AHR (z *angl.* aryl hydrocarbon receptor, arylhydrokarbonový receptor) a podporuje sekreci IL-22. LAT1-CD98 zprostředkovaný transport také aktivuje mTOR (z *angl.* mammalian target of rapamycin) signální dráhu, která ovlivňuje diferenciaci Th1 a Th17 buněk, jak je patrné z Obrázku 4. CD69 tak prostřednictvím těchto interakcí významně ovlivňuje imunitní odpovědi, metabolismus a migraci T-lymfocytů (Cibrian *et al.*, 2016).

Kromě Gal-1 (De La Fuente *et al.*, 2014), S1PR1 (Bankovich, Shioh a Cyster, 2010) a komplexu LAT1-CD98 (Cibrian *et al.*, 2016) bylo popsáno, že CD69 v závislosti na své glykosylaci interaguje i s komplexem S100A8/S100A9 (Lin *et al.*, 2015).

1.5 Rekombinantní produkce glykoproteinů

Buněčná linie HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) byla vytvořena na počátku 70. let Alexandrem Van der Ebem na Univerzitě v Leidenu. Buňky pocházejí z embryonálních ledvinných buněk lidského plodu a byly transformovány DNA adenoviru typu 5 (Durocher, 2002), čímž došlo k integraci fragmentů virového genomu, včetně genů E1A/E1B, do chromozomu 19 (Berk, 2005; Y.-C. Lin *et al.*, 2014). Přesný původ buněk není znám, spekuluje se o děni nadledvin (Shaw *et al.*, 2002). Z původní linie vznikly další varianty, například HEK293E a HEK293T, nesoucí virové proteiny (EBNA1 nebo SV40 velký T antigen), které umožňují episomální amplifikaci plasmidů (Durocher, 2002).

HEK293 buňky a jejich deriváty patří mezi nejčastěji používané systémy pro expresi rekombinantních proteinů v biomedicínském výzkumu (Durocher, 2002). Výhodou je vysoká transfekční účinnost, růst v suspenzi bez séra a schopnost provádět lidsky relevantní posttranslační modifikace. Linie HEK293E, díky expresi EBNA1, umožňuje zvýšenou expresi proteinů z plasmidů s oriP sekvencí (Durocher, 2002). Vysoká aktivita CMV promotoru odvozeného od cytomegaloviru v těchto buňkách dále přispívá k efektivní produkci jak intracelulárních, tak sekretovaných proteinů (Foecking a Hofstetter, 1986).

Důležitou vlastností HEK293 buněk je jejich schopnost glykosylovat exprimované proteiny. Standardně produkují heterogenní N-glykany, ale varianty s delecí genu *MGAT1* (např. HEK293S GnTI⁻) umožňují tvorbu homogenních oligomanosových glykanů, což je výhodné pro strukturní výzkum (Y.-C. Lin *et al.*, 2014). Experimenty ukazují, že v buňkách HEK293 dochází k využití jak typických, tak atypických glykosylačních motivů (např. Asn-X-Cys), což ovlivňuje vznik různých glykoforem a biologické vlastnosti proteinu (Vance *et al.*, 1997).

Kromě syntézy a modifikace proteinů zajišťují HEK293 buňky i jejich správné skládání, dimerizaci a zabalení do sekrečních váčků, které jsou vylučovány do kultivačního média. Díky integraci adenovirových genů jsou navíc schopné podporovat balení virové DNA do adenovirových částic, což je využíváno při výrobě vektorů pro genovou terapii (Durocher, 2002).

2 Cíle práce

- Příprava buněčných linií stabilně transfekovaných geny pro mutované varianty vazebné domény receptoru CD69.
- Produkce a purifikace tří mutovaných variant proteinu CD69.

3 Materiál

3.1 Přístroje a pomůcky

Přístroje a pomůcky	Výrobce / Země původu
Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety	Discovery HTL, Polsko
Automatické pipety	Pipetman Gilson, USA
Automatický pipetovací nástavec	Pipetus Hirschmann, Německo
Automatický sběrač frakcí	Amersham Biosciences, UK
Blokový termostat LS1	VLM, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifugační kyvety PPCO 250 ml	Nalgene, USA
Centrifugační zkumavky Oak Ridge 50 ml	Sigma-Aldrich, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor, CO ₂ MCO-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Kolona HiTrap Talon Crude 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona HiPrep 26/10 Desalting	Sigma-Aldrich, USA
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Koncentrátory Amicon Ultra – MWCO 10000	Millipore, USA

Přístroje a pomůcky	Výrobce / Země původu
Kónické zkumavky 50 ml / 15 ml	VWR, USA
Lahve s prodyšnými víčky (1 l, 800 ml, 500 ml, 100 ml)	P-LAB, ČR
Laminární box Clean Air	PMV, Nizozemsko
Mikrocentrifuga miniStar silverline	VWR, USA
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mikrostříkačka HAMILTON	Hamilton, USA
pH metr Φ 200	Beckman Coulter, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Spektrofotometr Cary 60 UV-Vis	Agilent Technologies, USA
Stříkačkový mikrofiltr 0,22 μ m	Carl Roth, Německo
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Mini Shaking Incubator	MIULAB, Čína
Třepačka Orbi-Safe TS	Gallenkamp, UK
Ultrazvuková sonda Sonopuls	Bandelin, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí EC250-90	E-C Apparatus Corporation, UK
Zobrazovací zařízení Alliance Q9	UVITEC, UK

3.2 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce / Země původu
2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
AA (akrylamid)	Sigma-Aldrich, USA
APS (amonium persulfát)	Sigma-Aldrich, USA
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
DMSO (dimethylsulfoxid)	New England Biolabs, USA
Doxycyklin	Serva, USA
Ethanol	Lach-Ner, ČR
Ethanol denaturovaný	Lach-Ner, ČR
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Německo
Glycerol	Lach-Ner, ČR
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
Hydroxid sodný	Penta, ČR
Chlorid draselný	Lach-Ner, ČR
Chlorid hořečnatý	Lach-Ner, ČR
Chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
Imidazol	Carl Roth, Německo
Kyselina octová	Lach-Ner, ČR
L-glutamin	Sigma-Aldrich, USA
L-glycin	Lach-Ner, ČR

Chemikálie	Výrobce / Země původu
N,N'-metylenbisakrylamid	Serva, USA
Octan sodný	Sigma-Aldrich, USA
Proteinový standard Spectra Multicolor	Thermo Fisher Scientific, USA
SDS (dodecylsírán sodný)	Jersey Lab Supply, USA
Sírán hořečnatý	Penta, ČR
TEMED (tetramethylethyldiamin)	Serva, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth, Německo
Trypanová modř	Sigma-Aldrich, USA
Trypton	Duchefa, Nizozemsko

3.2.1 Plasmidy a vektory

Biologický materiál	Zdroj / Země původu
pBase	Sanger Institute, Velká Británie
PB-RB	Prof. James M. Rini, Ph.D., Kanada
pUT7	Prof. James M. Rini, Ph.D., Kanada
pUT7_T107A, pUT7_N105Q, pUT7_N50Q	Bc. Jakub Jeníček, PŘF UK, ČR

3.2.2 Buněčné linie

Buněčná linie	Zdroj / Země původu
HEK293T	Prof. Radu A. Aricescu, Ph.D., Velká Británie

3.3 Kultivační média

Kultivační média	Popis / Výrobce
EX-CELL 293	Komerčně dostupné médium (Merck, USA), před použitím doplněno L-glutaminem do 4 mM

3.4 Roztoky

3.4.1 Roztoky pro purifikaci proteinů

Pufry	Složení
Acetátový pufr pro afinitní chromatografii	20 mM kyselina octová, 100 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , pH 4,0
Eluční pufr pro afinitní chromatografii	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , 250 mM imidazol, pH 7,5
HEPES pufr	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , pH 7,5
PBS pufr	50 mM Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O, 300 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ , pH 7,5
PBS TK pufr	8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,4
Předeluční pufr pro afinitní chromatografii	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, 25 mM imidazol, NaN ₃ , pH 7,5
Roztok trypanové modři	0,4% trypanová modř v PBS-TK

3.4.2 Roztoky pro SDS – PAGE

Roztoky	Složení
Barvicí roztok pro SDS-PAGE	45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 % CBB R-250
Elektrodový pufr pro SDS-PAGE (10× konc.)	0,25 M Tris, 1,9 M glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3
Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE	35 % ethanol, 10 % kyselina octová
Pufr TAE pro agarosovou elektroforézu	40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA
Roztok AA pro SDS-PAGE	29 % akrylamid (AA), 1 % N,N'-methylenbisakrylamid
Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu	Gel loading dye, Purple (6×), New England Biolabs, USA
Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (5× konc., neredukující)	31,5 mM Tris, 10 % (v/v) glycerol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % bromfenolová modř, 10 mM NaN ₃ , pH 6,8
Vzorkový pufr pro SDS-PAGE (5× konc., redukující)	100 µl 2-merkaptoethanolu + 900 µl neredukujícího 5× pufru pro SDS-PAGE

4 Metody

4.1 Kultivace buněk HEK293T

Buňky HEK293T byly kultivovány ve čtvercových kultivačních lahvích se šroubovacím víčkem opatřeným membránou propouštějící vzduch v inkubátoru na třepačce Celltron při 37 °C, 135 ot./min a 5% obsahu CO₂ v atmosféře. Buňky vždy zabíraly maximálně 40 % objemu použité kultivační lahve, pro jejich dostatečné provzdušnění.

Buňky byly kultivovány v komerčně dostupném médiu EX-CELL 293, které bylo vyměňováno dvakrát týdně. Před výměnou média byla provedena kontrola viability buněk a byl určen obsah buněk v médiu dle postupu popsaného níže. Následně byl vypočítaný objem suspence centrifugován 5 min při 95 × g a 25 °C. Peleta byla resuspendována ve vhodném objemu čerstvého kultivačního média předem vytemperovaného na 37 °C.

4.2 Počítání buněčné hustoty a kontrola viability buněk

Pro počítání buněčné hustoty byl využit automatický hemocytometr Corning Cell Counter, do kterého bylo pipetováno 20 µl roztoku, který byl získán smícháním 20 µl buněčné suspenze a 20 µl roztoku trypanové modře. Hemocytometr byl vložen pod mikroskop, který byl připojen k počítači. Vyhodnocení bylo provedeno programem CytoSMART, ten počítal celkový obsah buněk, který následně přepočítal na počet buněk na mililitr média a zároveň také spočítal počet mrtvých buněk, modře zbarvených. Životaschopnost buněk byla určena jako procento živých buněk v celkovém počtu všech buněk.

4.3 Transfekce buněk HEK293

Pro každou ze tří variant mutovaného proteinu (CM1 T107A, CM1 N105Q a CM1 N150Q) byl připraven transfekční mix o objemu 200 µl. Tento mix obsahoval 48 µg pUT7_CM1 daného plasmidu, 6 µg pomocného vektoru pBase a 6 µg plasmidu PB-RB. Roztok byl doplněn PBS TK pufrům do konečného objemu 200 µl.

Buněčná suspenze obsahující přibližně 60 milionů buněk byla centrifugována 5 min při 95 × g. Po odstředění byla peleta resuspendována ve 2,4 ml média EX-CELL 293 tak, aby výsledná koncentrace činila 25 milionů buněk na mililitr. Připravená buněčná suspenze byla následně přenesena do jamky vícejamkové kultivační destičky.

K suspenzi buněk byl přidán transfekční mix obsahující 60 µg plasmidové DNA. Následně byl do reakční směsi přidán polymer IPEI v poměru 3:1 (IPEI:DNA). Destička byla inkubována 90 min v inkubátoru s orbitální třepačkou při 135 ot./min, 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂.

Po inkubaci byla celá buněčná suspenze přenesena do 100ml kultivační lahve opatřené prodyšným šroubovacím víčkem a doplněna čerstvým médiem EX-CELL 293 do celkového objemu 30 ml.

4.4 Selekcce a udržování stabilní linie buněk

Přibližně 48 hod po provedené transfekci byla za účelem selektování úspěšně transfekovaných buněk k buněčné kultuře přidána selekční antibiotika puromycin a blasticidin, každé do výsledné koncentrace 5 µg/ml.

Transfekované buněčné linie byly nadále kultivovány v čtvercových kultivačních lahvích se šroubovacím víčkem opatřeným membránou propouštějící vzduch. Buňky byly udržovány v komerčně dostupném médiu EXCELL293, které bylo pravidelně vyměňováno třikrát týdně. Do média byla průběžně přidávána antibiotika puromycin a blasticidin, obě vždy do výsledné koncentrace 5 µg/ml. Buněčné kultury byly udržovány v rozmezí hustoty 0,3–4 miliony buněk na mililitr.

Při výměně média byla vždy nejprve určena hustota buněčné suspenze dle výše popsaného postupu. Na základě získaných hodnot bylo vypočteno potřebné množství buněčné suspenze tak, aby výsledná hustota buněk v novém médiu dosahovala alespoň 0,3 milionu buněk/ml. Vypočtené množství suspenze bylo centrifugováno 5 min při 95 × g. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v odpovídajícím objemu čerstvého média EX-CELL 293. Do média byla přidána antibiotika a buněčná suspenze byla převedena do kultivační lahve. Kultivace probíhala za obvyklých podmínek v inkubátoru s orbitální třepačkou (37 °C, 135 ot./min, 5 % CO₂).

4.5 Expese proteinů

Pro indukci exprese rekombinantního proteinu bylo nezbytné získat dostatečné množství buněk. Z tohoto důvodu byly buňky kultivovány až do dosažení cílového počtu buněk, přibližně 800 milionů buněk. Kultivace probíhala následovně: kultivační lahev o objemu 500 ml byla předeřhřáta na 37 °C. Na základě aktuální hustoty buněk byl vypočten potřebný objem buněčné suspenze, který byl následně centrifugován 5 min při 95 × g. Vzniklá peleta byla resuspendována v malém množství média EX-CELL 293 a přenesena do kultivační lahve, do které byl následně doplněn objem média na 200 ml. Počáteční koncentrace buněk v této fázi byla nejméně 0,3 milionu buněk/ml.

Kultivace pokračovala až do dosažení hustoty 4 miliony buněk/ml, což odpovídalo celkovému počtu přibližně 800 milionů buněk. V tomto bodě byla zahájena indukce exprese proteinu. Celý objem buněčné suspenze byl centrifugován 5 min při 95 × g. Peleta byla resuspendována v malém objemu média EX-CELL 293 a přenesena do předeřhřáté kultivační lahve o objemu 1000 ml. Objem suspenze byl doplněn čerstvým médiem na konečných 400 ml. K buněčné suspenzi byly přidány indukční a podpůrné látky: doxycyklin do výsledné koncentrace 1 µg/ml,

kys. valproová do výsledné koncentrace 2 mM spolu se 4 ml 100× koncentrovaného roztoku antibiotik (6 mg/ml penicilin, 1 mg/ml streptomycin).

Po sedmidenní inkubaci byla buněčná suspenze centrifugována 5 min při 95 × g. Získaný supernatant byl dále centrifugován 1 hod při 20000 × g a 4 °C. Výsledná peleta byla uchovávána při teplotě 4 °C pro další použití. Supernatant po druhé centrifugaci byl přefiltrován přes sterilní filtr o velikosti pórů 0,22 µm. K přefiltrovanému supernatantu byl přidán PBS pufr v poměru 1:1. Takto připravený roztok byl buď uchováván při -20 °C, nebo použit přímo pro purifikaci exprimovaného proteinu.

4.6 Purifikace proteinů

Purifikace exprimovaného proteinu byla provedena pomocí chromatografického systému ÄKTA Basic ve spojení s afinitní kolonou HisTrap Excel 5 ml, která obsahovala navázané nikelnaté ionty. Před samotnou purifikací bylo médium obsahující cílový protein rozmrazeno a přefiltrováno přes sterilní filtr o velikosti pórů 0,22 µm.

Kolona HisTrap Excel byla nejprve ekvilibrována pěti objemy PBS pufru, dokud nebyly dosaženy ustálené hodnoty absorbance při 280 nm a konduktivity. Byla připravena i kolona HiPrep 26/10 Desalting určená pro následné odsolení proteinu, která byla promyta HEPES puftrem do ustálení hodnot konduktivity a absorbance. Veškeré přiváděné roztoky a objemy sbíraných frakcí jsou uvedeny v Tabulka 2 na straně 33.

Následně byl na kolonu HisTrap přiveden supernatant obsahující exprimovaný protein. Díky přítomnosti histidinové kotvy (His-tag) na C-konci proteinu docházelo k interakci s nikelnatými ionty, což umožnilo jeho navázání na kolonu. Prošlé médium bylo sbíráno a uchováváno pro případnou repurifikaci.

Po navázání cílového proteinu následovala předeluční fáze, jejímž účelem bylo odstranění slabě vázaných kontaminujících proteinů a dalších nečistot. K tomuto účelu byl použit PBS pufr obsahující 25 mM imidazol. Eluovaná frakce měla celkový objem 15 ml. Poté byla kolona promyta čistým HEPES puftrem, aby došlo k odstranění zbytků imidazolu a kolona byla připravena na finální eluci proteinu.

Eluce cílového proteinu byla provedena ve spojení kolony HisTrap s odsolovací kolonou HiPrep 26/10 Desalting. K uvolnění proteinu z kolony byl použit PBS pufr obsahující 250 mM imidazol. Eluční frakce byly sbírány jednotlivě a kontinuálně monitorovány.

Zvláštní pozornost byla věnována frakcím vykazujícím nárůst konduktivity, které byly sbírány samostatně. Na základě předchozích zkušeností a chromatografických profilů se očekávalo, že cílový protein bude eluován v objemovém rozmezí 18-20 ml z celkového elučního objemu přibližně 55 ml.

Tabulka 2. Průběh purifikace proteinů na koloně HisTrap Excel s okamžitým odsolením.

	Roztok	Objem	Průtok
Ekvilibrace kolony HisTrap Excel 5 ml	PBS pufr	25 ml	5 ml/min
Ekvilibrace kolony HiPrep 26/10 Desalting	HEPES pufr	Do ustálení hodnot konduktivity	0,5 ml/min
Na kolonu HisTrap Excel 5 ml	Médium s cílovým proteinem	500 ml	5 ml/min
Předeluční fáze	PBS pufr s obsahem 25 mM imidazolu	15 ml	5 ml/min
	PBS pufr	Do ustálení hodnot konduktivity	
Eluce proteinu z tandemu kolon	PBS pufr s obsahem 250 mM imidazolu	55 ml, dle hodnot absorbance a konduktivity	0,5 ml/min

4.6.1 Koncentrování proteinů

Frakci s proteinem získanou z afinitní chromatografie bylo nutné zkoncentrovat na objem 250-500 μ l. K tomuto účelu byl použit koncentrátor Amicon Ultra s membránou propustnou pro molekuly menší než 10 kDa. Roztok exprimovaného proteinu byl opatrně nanesen do vrchní části koncentrátoru, načež byl opakovaně podroben centrifugaci při 4 °C a 3900 \times g s trváním jednotlivých cyklů 7 min. Mezi jednotlivými cykly centrifugace byl vzorek vždy důkladně promíchán pomocí pipety a jeho objem byl dle potřeby doplňován. Tento proces byl opakován až do momentu, kdy byl celkový objem vzorku zredukován na 250-500 μ l. Poté byl koncentrovaný vzorek přenesen do čisté mikrozkuhavky, zatímco koncentrátor byl důkladně promyt nejprve pufrém HEPES, následně deionizovanou vodou, a nakonec uchován při teplotě 4 °C naplněný 20% ethanolem pro zachování funkčnosti filtrační membrány.

4.6.2 Gelová permeační chromatografie

Zkoncentrovaný roztok proteinu byl rozdělen podle velikosti jednotlivých molekul obsažených v roztoku na koloně Superdex 200 10/300 GL. Kolona byla připojena na systém HPLC ÄKTA basic a ekvilibrována HEPES pufrém do ustálení hodnot absorbance při 280 nm a konduktivity. Stejným pufrém byla promyta nástřiková smyčka, a to jejími pěti objemy. Roztok s koncentrovaným proteinem byl nastříknut na kolonu v objemu nepřesahující polovinu objemu nástřikové smyčky. Jednotlivé frakce eluátu byly automaticky jímány do mikrozkuhavy v objemu jednoho mililitru. Frakce byly buď rovnou použity k charakterizaci proteinu nebo byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80°C.

4.7 Charakterizace proteinů

4.7.1 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinu byla měřena na přístroji DeNovix DS-11+ typu „nanodrop“ při vlnové délce 280 nm, jako slepý vzorek byl použit filtrovaný HEPES pufr. Do programu Protein A280 byl zadán extinkční koeficient daného proteinu. Tento koeficient byl vypočítán programem ProtParam na základě známé aminokyselinové sekvence proteinu.

4.7.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE (*z angl.* sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) neboli polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného byla využita pro ověření čistoty výsledných exprimovaných proteinů.

Pro SDS-PAGE byla připravena dvojice gelů o tloušťce 0,75 mm, hustota dělicího gelu byla 12,5 %. Každý z obou gelů byl složen z dělicího gelu a zaostřovacího gelu, ty se mezi sebou se liší hodnotou pH a hustotou gelu. Nejprve byla elektroforetická skla umístěna do aparatury určené pro přípravu gelů. Dále byl připraven roztok pro přípravu 12,5% dělicího gelu dle Tabulka 3. Příklad APS iniciuje polymerační reakci, proto je nutné po jeho přidavku co nejrychleji roztok pipetovat mezi připravená elektroforetická skla. Tekutý roztok gelu byl převrstven vodou. Po zatuhnutí gelu, kdy je ostré rozhraní voda-gel, byla voda vylita a gel byl dosušen filtračním papírem.

Tabulka 3. Složení roztoku pro přípravu 12,5% dělicího gelu na SDS-PAGE.

Chemikálie	Objem
Deionizovaná voda	2,53 ml
AA pro SDS-PAGE	3,36 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2 ml
10 % SDS	80 μ l
TEMED	4 μ l
10 % APS	80 μ l

Dále byl připraven zaostřovací gel dle Tabulka 4. Opět po přidavku APS byl roztok rychle pipetován mezi elektroforetická skla na již zatuhlý dělicí gel. Ještě do tekutého zaostřovacího gelu byl vložen hřeben sloužící na vytvoření jamek pro vzorky.

Tabulka 4. Složení roztoku pro přípravu zaostřovacího gelu na SDS-PAGE.

Chemikálie	Objem
Deionizovaná voda	2,1 ml
AA pro SDS-PAGE	0,75 ml
0,5 M Tris pH 6,8	0,375 ml
10 % SDS	30 μ l
TEMED	4 μ l
10 % APS	30 μ l

Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byla elektroforetická skla s gely přemístěna do aparatury pro elektroforézu. Aparatura byla naplněna elektrodoým pufrem tak, aby gely byly převrstveny pufrem. Z gelů byly vyjmuty hřebeny.

Vzorky pro elektroforézu z vybraných frakcí byly připravovány v duplikátech o maximálním objemu 20 μ l, obsah proteinu v každém vzorku byl 3,6 μ g. Z každé frakce byl připraven vzorek v redukujícím a v neredukujícím prostředí. Proteinová frakce byla smíchána s příslušným 5 \times koncentrovaným vzorkovým pufrem a podle potřeby doplněna deionizovanou vodou.

Připravené vzorky byly umístěny do blokového termostatu na 5 min při 95 °C, následně byly krátce centrifugovány na stolní centrifuze. Takto připravené vzorky byly pipetovány do jamek gelu, do jedné jamky bylo pipetováno 5 μ l proteinového standardu. Elektroforéza probíhala 40-55 minut, při stejnosměrném napětí 200 V.

Po konci elektroforézy byly gely vyjmuty z elektroforetických skel a byly přemístěny do barvicí lázně na minimálně 30 min, za stálého míchání na třepačce při 60 ot./min. Následně byly gely odbarveny v odbarvovacím roztoku, který byl vyměněn minimálně dvakrát po 25 min, za stálého míchání na třepačce při 60 ot./min. Fotografie gelů byly pořízeny na zobrazovacím zařízení Alliance Q9.

5 Výsledky

5.1 Konstrukce plasmidů a příprava transfekční směsi

Pro expresi tří mutantních variant extracelulární domény proteinu CD69 (N50Q, N105Q, T107A) (Obrázek 5 a 6) byly připraveny plasmidy nesoucí odpovídající geny, příklad plasmidu je ukázán na Obrázku 7, strana 37. Tyto geny byly navrženy tak, aby zachovávaly pouze jedno z původních N-glykosylačních míst. Geny byly amplifikovány pomocí PCR, následně klonovány do plasmidu pUCT7 a ověřeny sekvenací. Výsledné konstrukty nesly C-terminální histidinovou kotvu, umožňující afinitní purifikaci exprimovaného proteinu.

MSENCFVAENSSLHPESGOENDATSPHFSTRHEGSFQVPVLCAVMNVVFITILIALIALSV
GQYNC[■]PGQYTFMPSDSHVSS[■]SEDWVG[■]YQRK[■]CYFISTVKRSW[■]TAQNA[■]CSEHGATLAVI
DSEKDMN[■]FLKRYAGREEHWVGLKKEPGHPWKWSNGKEFNNWFN[■]VTGSDK[■]CVFLKNTEV
SSME[■]C[■]EKNLYWIC[■]NKPYK

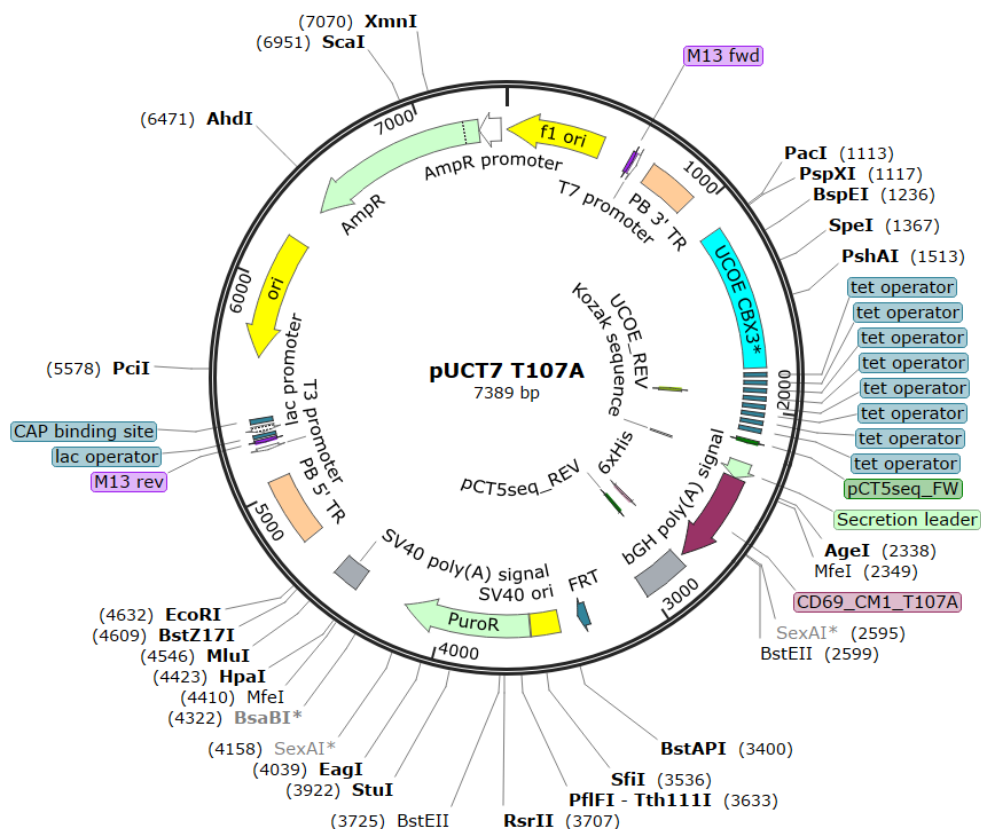
Obrázek 5. Aminokyselinová sekvence receptoru CD69. Modrým písmem je značená intracelulární doména, černě je označen transmembránový úsek a oranžově je označena extracelulární část, žlutě značené jsou cysteiny.

ITGQYNC[■]PGQYTFMPSDSHVSS[■]SEDWVG[■]YQRK[■]CFISVKRSW[■]TAQNA[■]CSEHGATLAVI
DSEKDMN[■]FLKRYAGREEHWVGLKKEPGHPWKWSNGKEFNNWFN[■]VTGSDK[■]CVFLKNTEV
SSME[■]C[■]ELYWIC[■]NPYK[■]GTKHHHHHH

Obrázek 6. Aminokyselinová sekvence exprimovaných proteinů. Žlutě značené jsou cysteiny, fialově jsou značené asparaginy, dvakrát podtržené místo značí atypický aminokyselinový motiv N-glykosylace, jednou podtržené místo označuje klasický motiv N-glykosylace, zeleně zbytek sekrečního signálu, modře histidinová kotva.

Podtržená místa jsou sekvenční motivy pro N-glykosylaci a jsou to právě ta místa, která byla mutována. V případě mutantu N50Q byl první označený asparagin (dvakrát podtržené místo) vyměněn za aminokyselinu glutamin. Stejná varianta výměny aminokyselin byla použita v případě mutace N105Q, tento asparagin se nachází na druhém, jednou podtrženém místě. Na stejném místě byla provedena i třetí mutace, když byl threonin vyměněn za alanin, tj. mutant T107A.

K vytvoření stabilních buněčných linií byl použit transposonový systém piggyBac, složený ze tří plasmidů: pBase, PB-RB a pUCT7. Plasmid pBase nese gen pro transposasu, která dokáže specificky vyštěpit určité sekvence a následně jinou sekvenci integrovat do genomu hostitelského organismu. PB-RB plasmid nese selekční marker, kterým je rezistence vůči blasticidinu, a indukovatelný transaktivátor citlivý na doxycyklin. pUCT7_CD69_CM1 ve třech mutacích vždy nese gen pro mutantní variantu proteinu CD69 (Li *et al.*, 2013). Trojice mutovaných plasmidů pUCT7 byla připravena Bc. Jakubem Jeníčkem. Tyto plasmidy byly smíšeny a použity k transfekci buněk HEK293T.



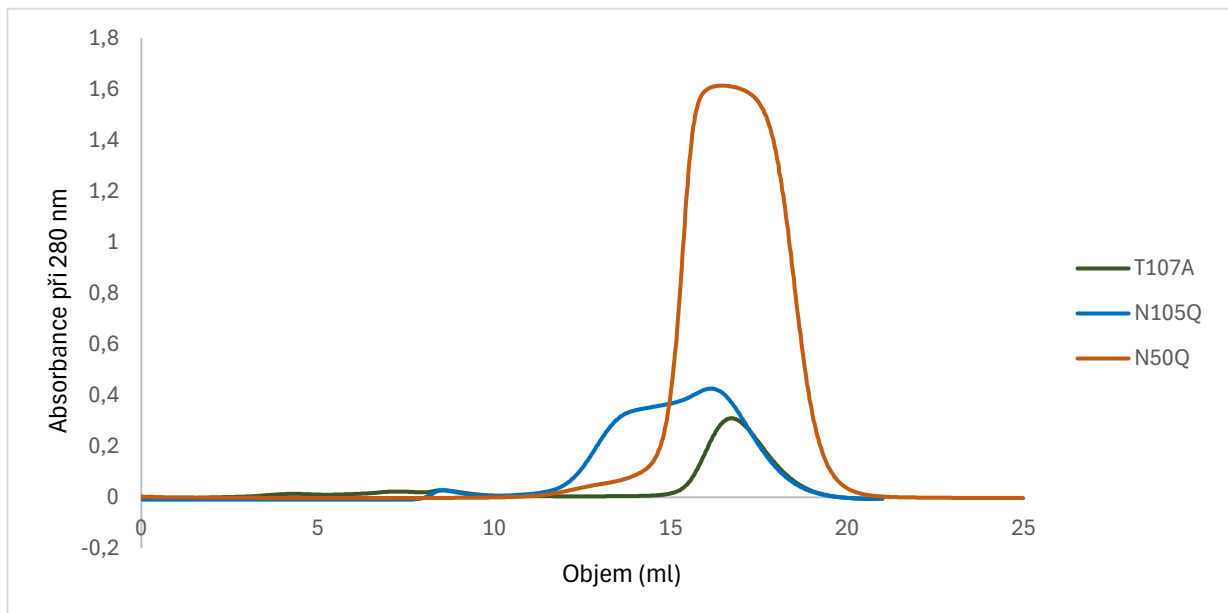
Obrázek 7. Příklad mapy plasmidu pro variantu mutace T107A. Vínová šipka označuje vloženou aminokyselinovou sekvenci pro tuto variantu.

5.2 Stabilní exprese a purifikace rekombinantních proteinů

Po provedené transfekci byly buňky selektovány za použití antibiotik blastidinu a puromycinu přidávaných do kulturačního média. Stabilně transfekované klony byly dále kultivovány po dobu přibližně tří týdnů, přičemž médium bylo pravidelně vyměňováno alespoň dvakrát týdně. Expres rekombinantního proteinu byla indukována přidávkem doxycyklinu v celkovém objemu 400 ml. Použitý expresní systém umožňoval sekreci cílového proteinu přímo do kulturačního média, což výrazně usnadnilo následnou purifikaci. Po ukončení kultivace byly buněčné suspenze odstředěny a pro následnou purifikaci byl použit získaný supernatant obsahující exprimovaný protein.

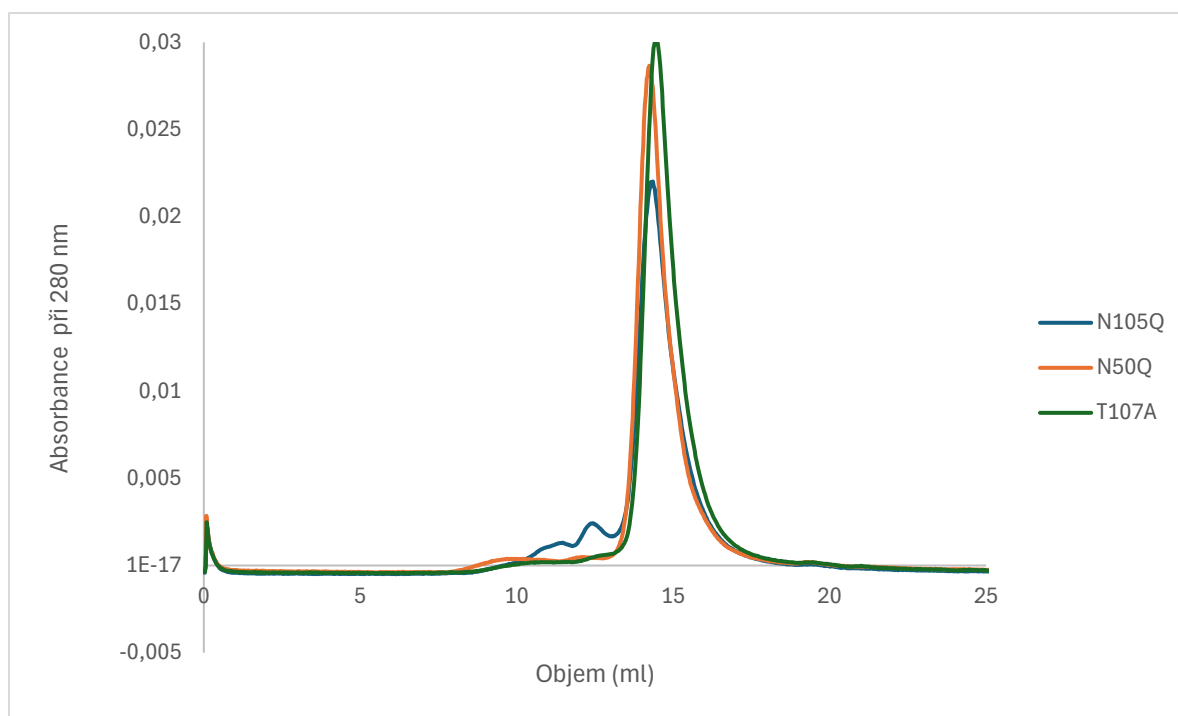
Purifikace proteinů byla provedena metodou afinní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC, z *angl.* immobilised-metal affinity chromatography) za použití kolony HisTrap Excel 5 ml, využívající interakce mezi histidinovou kotvou na C-konci proteinu a nikelnatými ionty navázanými na chromatografickém nosiči. Následně byla použita kolona HiPrep 26/10 Desalting za účelem okamžitého odstranění imidazolu. Takto získaný eluát byl dále koncentrován ultrafiltrací pomocí membrány s mezní molekulovou hmotností 10 kDa.

Finální krok purifikace zahrnoval preparační gelovou permeační chromatografií (SEC, z *angl.* size-exclusion chromatography) na koloně Superdex 200 10/300 GL, která umožnila frakcionaci proteinových forem na základě jejich hydrodynamické velikosti (Obrázek 8).



Obrázek 8. Preparativní gelová permeační chromatografie variant proteinu CD69. Purifikace na koloně Superdex 200 10/300 GL.

Pro variantu proteinu N50Q byly provedeny dvě preparační gelové permeační chromatografie, v grafu je uvedena pouze druhá nanáška na kolonu z důvodu vysoké koncentrace proteinu ve vzorku. Z důvodu vysokých koncentrací všech variant proteinu při preparační gelové permeační chromatografii byla provedena analytická gelová permeační chromatografie, kde nástřik vzorku proteinu na kolonu byl 100 μg (Obrázek 9, strana 39).

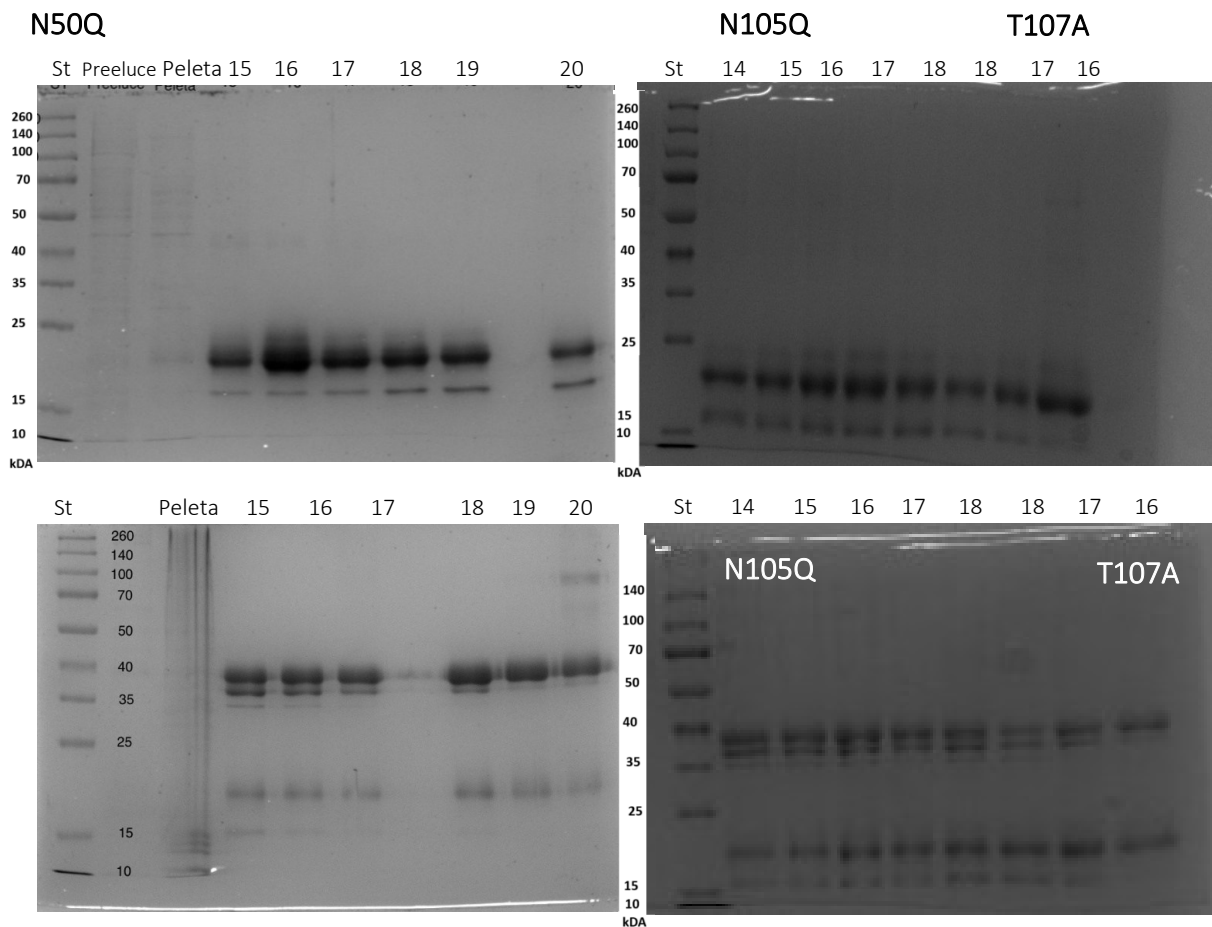


Obrázek 9. Analytická gelová permeační chromatografie variant proteinu CD69. Provedeno na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL.

Konečná čistota exprimovaných proteinů byla ověřena metodou SDS-PAGE (Obrázek 10, strana 40). Analýza byla provedena za redukujících i neredučujících podmínek za účelem posouzení přítomnosti disulfidických můstků (přítomnosti dimerních forem proteinu) a stupně N-glykosylace.

V redukčním prostředí se proteiny nacházely v monomerní formě o molekulové hmotnosti přibližně 18,5 kDa, což odpovídá teoretické velikosti N-glykosylované CM1 domény, v gelu jsou viditelné i proteinové proužky s nižší molekulovou hmotností, to ukazuje na neglykosylované monomerní jednotky s teoretickou molekulovou hmotností 16,5 kDa. Naopak jsou patrné i proužky s vyšší molekulovou hmotností až 25 kDa v případě mutantu N50Q frakce 16.

V neredučujících podmínkách byly detekovány dimerní formy, které mají molekulovou hmotnost kolem 35 kDa. Opět je zde patrný různý stupeň glykosylace, tomu odpovídají proteinové proužky s hmotností až 39 kDa. Na gelu jsou viditelné i monomerní formy.



Obrázek 10. SDS-PAGE analýza čistoty připravených proteinů. 12,5% polyakrylamidový gel, dva horní gely jsou provedeny v redukujícím prostředí, spodní gely v neredučujícím prostředí. Označení drah odpovídá číslům frakcí z gelové permeační elektroforézy pro jednotlivé varianty proteinu. Proteiny jsou nanášeny v množství 3,6 μ g.

5.3 Výsledný výtěžek proteinů

Množství purifikovaných proteinů získané z kultivací pro jednotlivé mutanty bylo následující:

- N50Q – 64,09 mg, tj. 160,2 mg na litr média
- N105Q – 3,58 mg, tj. 8,9 mg na litr média
- T107A – 1,15 mg, tj. 2,9 mg na litr média

6 Diskuse

Exprimovaná část extracelulární domény proteinu CD69 obsahuje dvě potenciální N-glykosylační místa – klasický sekvenční motiv *Asn-Val-Thr* (pozice 166–168) a atypický motiv *Asn-Ala-Cys* (pozice 111–113). Právě tento atypický motiv byl ve variantě N50Q cíleně mutován substitucí asparaginu za glutamin. Ačkoliv motiv *Asn-X-Cys* neodpovídá obvyklému sekvenčnímu motivu pro N-glykosylaci *Asn-X-Ser/Thr*, podle studie Vance *et al.*, 1997 je v proteinu CD69 tento atypický motiv glykosylován, byť s nižší účinností.

V důsledku mutace N50Q zůstalo zachováno pouze klasické glykosylační místo, které je podle výše uvedené studie glykosylováno s vyšší frekvencí. Lze tedy předpokládat, že zachování dominantního motivu a odstranění méně efektivního glykosylačního místa přispělo k efektivnějšímu posttranslačnímu zpracování proteinu. Tato hypotéza je podpořena vysokým výtěžkem varianty N50Q (64 mg), který výrazně převyšuje výtěžky ostatních dvou variant. Možným vysvětlením je, že odstranění tohoto místa glykosylace přispělo k vyšší translační aktivitě.

U varianty N105Q, kde bylo mutováno klasické místo *Asn-Val-Thr*, byl výtěžek podstatně nižší (3,6 mg). Analýza gelové permeační chromatografie odhalila sekundární pík v oblasti kolem 13 ml (Obrázek 8, strana 38), jehož charakter není dosud zcela objasněn. Může odrážet přítomnost nesprávně sbalených proteinových forem nebo jiných kontaminantů. Vhodné by bylo provést doplňující SDS-PAGE analýzu frakcí 11-13 a případně zopakovat purifikaci gelovou permeační chromatografií pro přečištění získaného preparátu.

Pozornost si zaslouží varianta T107A, kde došlo k záměně polární aminokyseliny threoninu za nepolární alanin. Tato změna vedla k nejnižšímu výtěžku (1,15 mg), což naznačuje negativní vliv na stabilitu nebo efektivitu translace. Záměna threoninu za alanin mohla ovlivnit lokální konformaci proteinu a tím i jeho sbalování.

Pro srovnání lze uvést výsledky z diplomové práce Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu (katedra biochemie PŘF UK, 2019), v níž byla pomocí tranzientní transfekce exprimována nemutovaná forma CM1 konstruktů CD69 s výtěžkem 17,6 mg (přepočteno na stejný objem produkčního média). Ačkoliv je známo, že stabilní transfekce často přináší vyšší výtěžky než tranzientní, výtěžek varianty N50Q přesahuje očekávání a naznačuje, že právě tato mutace má pozitivní vliv na expresi proteinu. Naopak výrazně nižší výtěžek varianty T107A oproti výchozí nemutované formě ukazuje na negativní dopad této substituce.

Připravené mutantní formy byly navrženy s cílem umožnit funkční charakterizaci interakce proteinu CD69 s Galektinem-1 (Gal-1). Následné experimenty zaměřené na testování vazebné afinity těchto variant ke Gal-1 mohou objasnit, jak jednotlivá místa N-glykosylace ovlivňují sílu a specifitu interakce. Tyto poznatky budou zásadní nejen pro pochopení biologické funkce CD69, ale i pro navržení konstruktů CD69 vhodných ke strukturní analýze jeho komplexu s Gal-1, včetně krystalografických studií.

7 Závěr

- Byly úspěšně připraveny tři stabilně transfekované buněčné linie HEK293T exprimující mutantní formy extracelulární části proteinu CD69.
- Exprimované proteiny byly získány v dostatečném množství a purifikovány metodami afinitní a gelové permeační chromatografie. Výsledné výtěžky jednotlivých variant byly následující: N50Q – 64,09 mg, N105Q – 3,58 mg, T107A – 1,15 mg.
- Čistota a oligomerní stav jednotlivých variant byly potvrzeny metodou SDS-PAGE.

Všechny cíle stanovené na začátku této bakalářské práce byly úspěšně splněny a vzniklé varianty představují základ pro strukturní analýzu interakce receptoru CD69 s Galektinem-1.

8 Seznam literatury

- Bankovich, Alexander J., Lawrence R. Shiow, a Jason G. Cyster. 2010. „CD69 Suppresses Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 (S1P1) Function through Interaction with Membrane Helix 4". *Journal of Biological Chemistry* 285 (29): 22328–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123299>.
- Berk, Arnold J. 2005. „Recent Lessons in Gene Expression, Cell Cycle Control, and Cell Biology from Adenovirus". *Oncogene* 24 (52): 7673–85. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209040>.
- Blanchard, Helen, Khuchtumur Bum-Erdene, Mohammad Hussaini Bohari, a Xing Yu. 2016. „Galectin-1 Inhibitors and Their Potential Therapeutic Applications: A Patent Review". *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26 (5): 537–54. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1163338>.
- Cibrián, Danay, María Laura Saiz, Hortensia De La Fuente, Raquel Sánchez-Díaz, Olga Moreno-Gonzalo, Inmaculada Jorge, Alessia Ferrarini, et al. 2016. „CD69 Controls the Uptake of L-Tryptophan through LAT1-CD98 and AhR-Dependent Secretion of IL-22 in Psoriasis". *Nature Immunology* 17 (8): 985–96. <https://doi.org/10.1038/ni.3504>.
- Cibrián, Danay, a Francisco Sánchez-Madrid. 2017. „CD69: From Activation Marker to Metabolic Gatekeeper". *European Journal of Immunology* 47 (6): 946–53. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>.
- Čtvrtníčková, Lenka. 2009. „Lektiny". Masarykova univerzita. Staženo dne 16. 4. 2025. https://is.muni.cz/th/fglz9/ctvrtnickova_bc_lektiny.pdf.
- De La Fuente, Hortensia, Aranzazu Cruz-Adalia, Gloria Martinez Del Hoyo, Danay Cibrián-Vera, Pedro Bonay, Daniel Pérez-Hernández, Jesús Vázquez, et al. 2014. „The Leukocyte Activation Receptor CD69 Controls T Cell Differentiation through Its Interaction with Galectin-1". *Molecular and Cellular Biology* 34 (13): 2479–87. <https://doi.org/10.1128/MCB.00348-14>.
- De Mejía, Elvira González, a Valentin I. Prisecaru. 2005. „Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (6): 425–45. <https://doi.org/10.1080/10408390591034445>.
- Delves, Peter J., a Ivan M. Roitt. 2000. „The Immune System". Editoval Ian R. Mackay a Fred S. Rosen. *New England Journal of Medicine* 343 (1): 37–49. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107>.
- Durocher, Y. 2002. „High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells". *Nucleic Acids Research* 30 (2): e9. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.e9>.
- Foecking, Mary K., a Hans Hofstetter. 1986. „Powerful and Versatile Enhancer-Promoter Unit for Mammalian Expression Vectors". *Gene* 45 (1): 101–5. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(86\)90137-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(86)90137-X).
- Franeckova, J., a A. Jabor. 2022. „Galektin-3: patofyziologie, analytické charakteristiky, interpretační meze a biologická variabilita". *Klinická biochemie a metabolismus* 30 (3): 68–72.
- Hořejší, Václav, Jiřina Bartůňková, Tomáš. Brdička, a Radek Špišek. 2017. *Základy imunologie*. 6., Aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton.
- Janeway, Charles, ed. 2001. *Immunobiology 5: The Immune System in Health and Disease*. 5. vydání. New York: Garland Pub.
- Kolenko, Petr, Tereza Skálová, Ondřej Vaněk, Andrea Štěpánková, Jarmila Dušková, Jindřich Hašek, Karel Bezouška a Jan Dohnálek. 2009. „The high-resolution structure of the

- extracellular domain of human CD69 using a novel polymer". *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 65: 1258–1260.
<https://doi.org/10.1107/S1744309109043152>.
- Komath, Sneha Sudha, Mannem Kavitha, a Musti J. Swamy. 2006. „Beyond Carbohydrate Binding: New Directions in Plant Lectin Research". *Organic & Biomolecular Chemistry* 4 (6): 973. <https://doi.org/10.1039/b515446d>.
- Kumar, K. Kiran, Lalith K. Prakash Chandra, J. Sumanthi, Sridhar G. Reddy, Chandra P. Shekar, a B. V. R. Reddy. 2012. „Biological Role of Lectins: A Review". *Journal of Orofacial Sciences* 4 (1): 20. <https://doi.org/10.4103/0975-8844.99883>.
- Li, Zhijie, Iacovos P. Michael, Dongxia Zhou, Andras Nagy, a James M. Rini. 2013. „Simple piggyBac Transposon-Based Mammalian Cell Expression System for Inducible Protein Production". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (13): 5004–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218620110>.
- Lin, Chih-Ru, Tong-You Wade Wei, Hsien-Yu Tsai, Ying-Ta Wu, Pei-Yu Wu, a Shui-Tein Chen. 2015. „Glycosylation-dependent Interaction between CD69 and S100A8/S100A9 Complex Is Required for Regulatory T-cell Differentiation". *The FASEB Journal* 29 (12): 5006–17. <https://doi.org/10.1096/fj.15-273987>.
- Lin, Yao-Cheng, Morgane Boone, Leander Meuris, Irma Lemmens, Nadine Van Roy, Arne Soete, Joke Reumers, et al. 2014. „Genome Dynamics of the Human Embryonic Kidney 293 Lineage in Response to Cell Biology Manipulations". *Nature Communications* 5 (1): 4767. <https://doi.org/10.1038/ncomms5767>.
- M44gz. 2018. *Cytokinová signalizace*. Staženo dne: 30. 4. 2025.
https://www.wikiskripta.eu/w/Imunokompetentn%C3%AD_bu%C5%88ky#/media/Soubor:Cytokinov%C3%A1_signalizace.png.
- Natarajan, Kannan, Mark W. Sawicki, David H. Margulies, a Roy A. Mariuzza. 2000. „Crystal Structure of Human CD69: A C-Type Lectin-Like Activation Marker of Hematopoietic Cells". *Biochemistry* 39 (48): 14779–86. <https://doi.org/10.1021/bi0018180>.
- Parkin, Jacqueline, a Bryony Cohen. 2001. „An Overview of the Immune System". *The Lancet* 357 (9270): 1777–89. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7).
- Rabinovich, Gabriel A., Yvette Van Kooyk, a Brian A. Cobb. 2012. „Glycobiology of Immune Responses". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1253 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06492.x>.
- Radulovic, Katarina, a Jan Hendrik Niess. 2018. „CD69". In *Encyclopedia of Signaling Molecules*, editoval Sangdun Choi, 943–51. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101600.
- Rosypal, Stanislav. 2003. *Nový přehled biologie*. 1. vydání. Praha: Scientia.
- Shaw, Gerry, Silas Morse, Miguel Ararat, a Frank L. Graham. 2002. „Preferential Transformation of Human Neuronal Cells by Human Adenoviruses and the Origin of HEK 293 Cells". *The FASEB Journal* 16 (8): 869–71. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0995fje>.
- Storti, Paola, Valentina Marchica, a Nicola Giuliani. 2017. „Role of Galectins in Multiple Myeloma". *International Journal of Molecular Sciences* 18 (12): 2740. <https://doi.org/10.3390/ijms18122740>.
- Stowell, Sean R., Moonjae Cho, Christa L. Feasley, Connie M. Arthur, Xuezheng Song, Jennifer K. Colucci, Sougata Karmakar, et al. 2009. „Ligand Reduces Galectin-1 Sensitivity to Oxidative Inactivation by Enhancing Dimer Formation". *Journal of Biological Chemistry* 284 (8): 4989–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808925200>.
- Stříž, Ilja, a Vladimír Holáň. 2015. *Cytokiny v klinické medicíně*. Praha: Maxdorf.

- Sundblad, Victoria, Luciano G Morosi, Jorge R Geffner, a Gabriel A Rabinovich. 2017. „Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation". *The Journal of Immunology* 199 (11): 3721–30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701172>.
- Vance, Barbara A., Wenyu Wu, Randall K. Ribaldo, David M. Segal, a Kelly P. Kearse. 1997. „Multiple Dimeric Forms of Human CD69 Result from Differential Addition of N-Glycans to Typical (Asn-X-Ser/Thr) and Atypical (Asn-X-Cys) Glycosylation Motifs". *Journal of Biological Chemistry* 272 (37): 23117–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23117>.
- Veldhuizen, Edwin J. A., Martin Van Eijk, a Henk P. Haagsman. 2011. „The Carbohydrate Recognition Domain of Collectins". *The FEBS Journal* 278 (20): 3930–41. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08206.x>.
- Yang, Ri-Yao, Gabriel A. Rabinovich, a Fu-Tong Liu. 2008. „Galectins: Structure, Function and Therapeutic Potential". *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10: e17. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>.
- Zárubová, Veronika. 2024. „Detekce N-acetylglukosaminových struktur zóny pellucidy oocytů prasete". Diplomová práce, Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. https://theses.cz/id/l6s8mi/zaverecna_prace.pdf_.