

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Dominika Rožová

**Příprava myšního interleukinu 2 spojeného
s monoklonální protilátkou S4B6**

Production of interleukin 2 in fusion with
monoclonal antibody S4B6

Bakalářská práce

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

Konzultant: Mgr. Ondřej Skořepa

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 7. 1. 2020

Podpis

Abstrakt

Interleukin 2 je růstový faktor T buněk, ale i dalších lymfocytů, jako jsou NK, NKT buňky, dendritické a žírné buňky, které zajišťují jeho expresi a sekreci. IL-2 reguluje homeostázu imunitních buněk a používá se k léčbě řady poruch včetně rakoviny a autoimunitních chorob. V posledních letech bylo popsáno několik případů, kdy komplex interleukinu 2 s protilátkou anti-IL2 vykazoval mnohonásobně vyšší biologickou aktivitu *in vivo*. Tyto komplexy mají selektivní stimulační aktivitu pro různé receptory cílových buněk. Tato práce navazuje na předchozí neúspěšné pokusy o expresi a purifikaci dostatečného množství imunokomplexu myšního IL2 s protilátkou S4B6 spojenou 15 aminokyselinovou glycin-serinovou spojkou.

V rámci této práce byl připraven plazmid obsahující gen pro fúzní sekretovaný imunokomplex mIL2-S4B6, kterým byla následně stabilně transfekována buněčná linie HEK293T pomocí systému piggyBac. Protein byl následně izolován chelatační afinitní chromatografií a purifikován gelovou permeační chromatografií.

Klíčová slova

interleukin 2, IL-2, imunokomplexy, imunoterapie, HEK293T

Abstract

Interleukin 2 is a growth factor of T cells as well as other lymphocytes, such as NK, NKT cells, dendritic and mast cells, which ensure its expression and secretion. IL-2 regulates immune cell homeostasis and is used to treat a variety of disorders including cancer and autoimmune diseases. In recent years, several cases of interleukin 2 complexed with anti-IL2 antibody have been shown to exhibit dramatically higher biological activity *in vivo*. These complexes have selective stimulatory activity for different IL2 receptors on target cell. This work follows up previous unsuccessful attempts to express and purify a sufficient amount of the murine IL2 immunocomplex with the S4B6 antibody linked by a 15 amino acid long glycine-serine linker.

In this work, a plasmid containing the secreted fusion immunocomplex mIL2-S4B6 gene was prepared and stably transfected to the HEK293T cell line using piggyBac system. The protein was then isolated by chelation affinity chromatography and purified by gel permeation chromatography.

Key words

interleukin 2, IL-2, immunocomplexes, immunotherapy, HEK293T

OBSAH

Abstrakt	3
Klíčová slova.....	3
Abstract	4
Key words.....	4
Použité zkratky	7
1. Cíle práce.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Cytokiny.....	10
2.1.1 Interleukiny.....	11
2.1.1.1 Interleukin 2.....	12
2.1.1.2 Interleukin 2 receptory	12
2.1.1.3 IL2 imunokomplexy.....	13
2.2 Imunoterapie.....	15
2.2.1 IL2 v imunoterapii	16
2.2.2 Toxicita interleukinu 2.....	17
2.2.3 IL2 imunokomplexy v imunoterapii.....	17
2.3 Protilátky.....	17
2.3.1 Monoklonální protilátky.....	18
2.4 Expres proteinů v eukaryotickém expresním systému HEK293.....	19
2.4.1 Stabilní a tranzientní transfekce lidských buněčných linií.....	20
2.5 Expresní systém piggyBac.....	20
3. Experimentální část.....	22
3.1 Materiály	22
3.2 Metodika	27
3.2.6 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu	28
3.2.7 Transformace.....	29
3.2.8 Velkoobjemová produkce plazmidové DNA	29
3.2.9 Polymerázová řetězová reakce z kolonií.....	30
3.2.10 Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA	30
3.2.11 Příprava vzorků plazmidové DNA k sekvenaci.....	31
3.2.12 Rozmrazování buněčné linie HEK293T.....	31
3.2.13 Stabilní produkce proteinů v buněčné linii HEK293T.....	31
3.2.14 Tranzientní produkce proteinu v buněčné linii HEK293T	32

3.2.15 Zamrazování buněčné linie	32
3.2.16 Sklizení buněčných linií	33
3.2.17 Afinitní chromatografie proteinů	33
3.2.18 Koncentrování proteinů	33
3.2.19 Gelová permeační chromatografie	33
3.2.20 Stanovení koncentrace proteinů	34
3.2.21 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	34
3.2.22 SDS elektroforéza v gradientovém gelu.....	35
4. Výsledky.....	36
4.1 Produkce imunokomplexu mL2-S4B6	36
4.1.1 Konstrukty L1 a H2.....	36
4.1.2 Příprava inzertů DNA.....	37
4.1.3 Linearizace plazmidu	38
4.1.4 Příprava vektorů pUT7_L1 a pUT7_H2.....	38
4.1.5 Transfekce – tvorba stabilních linií.....	39
4.1.6 Purifikace proteinu.....	39
4.1.7 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	41
4.2 Produkce lidského interleukinu 2.....	42
5. Diskuse.....	44
5. Závěr	47
6. Poděkování	48
7. Literatura	49

Použité zkratky

A ₂₆₀	absorbance při 260 nm
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z anglického deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynukleotid trifosfáty, z anglického deoxynucleotide triphosphates
GnTI	N-acetylglukosaminyltransferasa I
Hc	označení těžkého řetězce, z anglického heavy chain
HEK293	označení linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293, z anglického human embryonic kidney cell line 293
hIL2	lidský interleukin 2
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie, z anglického high-performance liquid chromatography
IL	interleukin
IPEI	lineární polyethylenimin
kb	kilobáze DNA (1000 párů bází)
LB	kultivační médium, z anglického lysogeny broth
Lc	označení lehkého řetězce, z anglického light chain
mAb	monoklonální protilátka, z anglického monoclonal antibody
mIL2	myší interleukin 2
NK	přirozený zabíječ, z anglického natural killer
NKT	NK T-lymfocyty, z anglického natural killer T-lymphocytes
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok, z anglického phosphate buffered saline
PCR	polymerasová řetězová reakce, z anglického polymerase chain reaction
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsíranu sodného
SEC	gelová permeační chromatografie, z anglického size-exclusion chromatography
TAE	pufr, obsahující Tris, kyselinu octovou a EDTA
TGF	transformující růstový faktor, z anglického transforming growth factor
TNF	faktor nádorové nekrózy, z anglického tumour necrosis factor

TRE	reversní tetracyklinový transaktivátor, z anglického tetracycline response element
T _{reg}	T regulační buňky

1. CÍLE PRÁCE

- Vytvoření plazmidů určených pro stabilní expresi myší monoklonální protilátky S4B6 ve fúzi s myším interleukinem 2.
- Ustavení stabilně transfekovaných linií HEK293T.
- Produkce a charakterizace proteinu mIL2-S4B6.
- Produkce a charakterizace lidského interleukinu 2 s histidinovou kotvou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cytokiny

Cytokiny jsou malé sekretované proteiny s molekulární hmotností od 6 do 30 kDa. Jsou produkovány různými buňkami imunitního systému, ale převládajícími producenty jsou pomocné T buňky a makrofágy¹. Mají růstovou, diferenciací a aktivační funkci, regulují a kontrolují tedy imunitní odpověď těchto buněk. Mohou být produkovány v tkáni periferních nervů během fyziologických a patologických procesů makrofágy, žírnými buňkami, endoteliálními buňkami nebo Swannovými buňkami. Mohou mít vliv na buňky, které je produkují (autokrinní), na buňky, které jsou v jejich blízkém okolí (parakrinní) nebo na vzdálenější buňky (endokrinní)¹. Cytokiny můžeme dělit na²:

- 1) Interleukiny – IL1 až IL38, tato skupina má svoji funkci především ve vývoji a aktivaci leukocytů
- 2) Chemokiny – mají chemotaktickou aktivitu
- 3) Interferony – hlavní roli hrají při antivirových obranných mechanismech
- 4) Transformující růstové faktory
- 5) Faktory stimulující kolonie – stimulují diferenciaci granulocytů, monocytů
- 6) Faktory nekrotizující nádory – působí cytotoxicky a regulačně
- 7) Jiné růstové faktory

Dále je ovšem můžeme také rozdělit do několika strukturních skupin (tyto cytokiny mají velmi podobnou strukturu):

- 1) Hemopoetiny
- 2) Interferony a rodina IL-10
- 3) Skupina IL-1
- 4) Skupina IL-12
- 5) Skupina TNF
- 6) Skupina TGF-beta
- 7) Chemokiny
- 8) Ostatní

Podle funkce, kterou cytokiny zastávají se dají také rozdělit na:

- 1) Prozánětlivé cytokiny

- 2) Protizánětlivé cytokiny
- 3) Cytokiny s aktivitou růstových faktorů
- 4) Cytokiny uplatňující se v protilátkové imunitě
- 5) Cytokiny uplatňující se v buněčně zprostředkované imunitě
- 6) Cytokiny s antivirovým účinkem

Často se stává, že více buněčných typů produkují stejný cytokin nebo naopak jeden cytokin může působit na více buněčných typů. Jeden cytokin může nahradit jiný, jsou tedy tzv. redundantní.

Cytokiny hrají důležitou roli v imunitním systému, především při reakci na léky a nemoci. Proto jsou tyto proteiny využívány k terapiím, např. k boji proti patogenům nebo nádorům. Na druhou stranu však jejich nadměrná exprese způsobuje zánětlivá onemocnění. Cytokiny často využívají kaskádovité reakce, kdy jeden cytokin ovlivňuje syntézu dalšího cytokinu, který zprostředkovává biologickou reakci.

Prozánětlivé cytokiny jsou produkovány především aktivovanými makrofágy a podílejí se na regulaci zánětlivých reakcí¹. Pokud se nacházejí v lidském organismu, způsobují horečky, zánět, destrukci tkání nebo dokonce až šok a smrt³. Snížení biologických aktivit těchto cytokinů může být dosaženo různými cestami, jako například neutralizací protilátek, receptorů cytokinů nebo inhibitorů proteáz. Blokování těchto biologických aktivit bylo již dosaženo například u revmatoidní artritidy.

Protizánětlivé cytokiny jsou imunoregulační molekuly, které kontrolují prozánětlivou cytokinovou imunitní odpověď⁴. Působí ve shodě se specifickými inhibitory a rozpustnými receptory cytokinů k regulaci imunitní odpovědi.

2.1.1 Interleukiny

Jednou z významných skupin cytokinů jsou interleukiny. První interleukin byl objeven v roce 1977 a dosud jich bylo identifikováno 38⁵. Jsou produkovány převážně leukocyty, díky čemuž dostaly také své jméno, které znamená „mezi leukocyty“⁶. Exprese interleukinů je většinou přísně regulována, nejsou vylučovány stále⁷. Nejčastěji jsou produkovány po buněčné aktivaci v důsledku fyziologického či nefyziologického stimulu. Některé interleukiny mohou

být autoregulační a regulují tak svou vlastní syntézu nebo expresi svých receptorů. Pokud se interleukin produkuje, je transportován k cíli a váže se na receptor na povrchu buňky⁸. Tato vazba spustí celou kaskádu signálů, dle kterých se mění chování buňky. Interleukiny hrají také důležitou roli při nádorových procesech. Jsou využívány jak k léčbě nádorových onemocnění, tak mohou toto onemocnění i způsobit. Fyziologicky se produkují jako imunitní odpověď na zánětlivá onemocnění, která mohou doprovázet nádorový růst⁹. Díky interakci interleukinů a jejich receptorů s endotelovými buňkami mohou vykazovat prozánětlivou i protizánětlivou aktivitu.

2.1.1.1 Interleukin 2

V roce 1979 se ukázalo, že makrofágy produkují faktor, který aktivuje T buňky. Ten byl pojmenován jako lymfocyty aktivující faktor¹⁰. Později, jelikož bylo zjištěno, že lymfocyty aktivující faktor spíše zvyšoval produkci růstového faktoru T buněk, byl přejmenován na interleukin 1, protože byl první v pořadí¹¹. Dále se také růstový faktor T buněk přejmenoval na interleukin 2, jako druhý v pořadí. Ovšem interleukin 2 byl jako první purifikován (1983), identifikován a charakterizován (1981).

Interleukin 2 je sekretovaný glykoprotein, který má molekulární hmotnost 15-18 kDa, dle dané glykosylace¹². Interleukin 2 se skládá ze 4 alfa helixů a hraje významnou roli v dělení, růstu a aktivitě imunitních buněk. Je produkován především CD4⁺ pomocnými T buňkami, CD8⁺ T buňkami a NK buňkami. Aktivované T buňky spouštějí expresi a sekreci IL2, který je imunitními buňkami dále využíván jako růstový faktor¹¹. Interleukin 2 je pleiotropický cytokin, který kontroluje stálost imunitních buněk. Je často využíván k léčbě mnoha nemocí, včetně rakoviny nebo autoimunitních onemocnění.

2.1.1.2 Interleukin 2 receptory

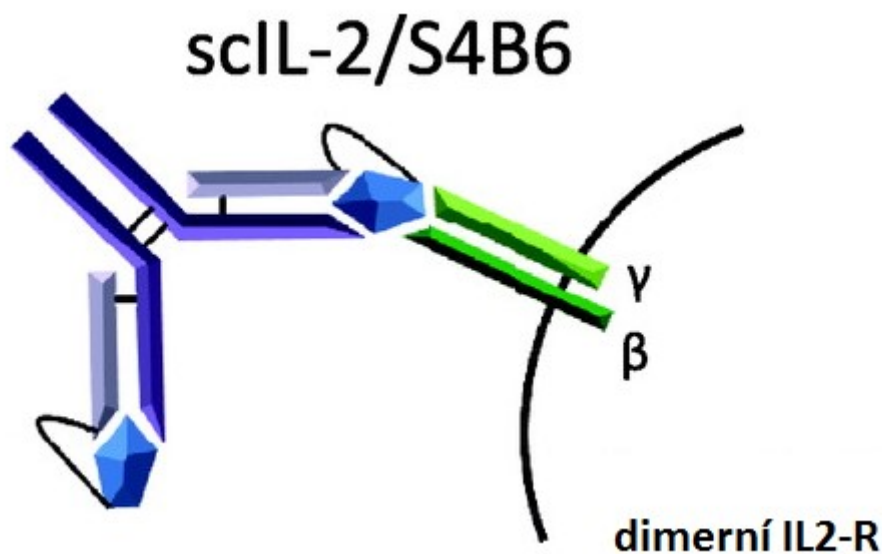
Interleukin 2 využívá svých pleiotropních schopností, tudíž signalizace může probíhat třemi různými signalizačními drahami¹³. Tři různé podjednotky receptoru pro IL2, se vyskytují na různých typech buněk a mají různou afinitu k IL2. Tyto podjednotky jsou CD25 (IL-2R α), CD122 (IL-2R β) a CD132 (γ_c řetězec). IL2 funguje na buňky exprimující vysokoafinitní trimerní IL2 receptor nebo i na nízkoafinitní dimerní IL2 receptor¹². Dimerní receptor se skládá

z CD122 (IL-2R β) a CD132 (γ_c řetězec) a nachází se na paměťových CD8⁺ T buňkách a na NK buňkách. Trimerní receptor obsahuje navíc ještě CD25 (IL-2R α) a můžeme ho najít především na aktivovaných T buňkách, T regulačních buňkách a aktivovaných B buňkách. Zatímco receptor CD25 je specifický pro IL2, CD122 funguje jako součást receptoru pro další cytokiny z rodiny interleukinů¹⁴. Přestože interakce mezi IL2 a jeho receptory indukuje fosforylaci tyrosinu mnoha buněčných proteinů, všechny 3 řetězce IL2 receptoru postrádají vnitřní aktivitu tyrosinkinázy. Tyto efekty ve skutečnosti způsobují kinázy, které interagují s cytoplazmatickými doménami receptorových podjednotek.

Hlavní třídy efektorů jsou rodina tyrosinkináz SRC a rodina kináz Janus (JAK)^{15,16}. Pokud se IL2 naváže na dimerní nebo trimerní IL2 receptor, dojde k heterodimerizaci CD122 a CD132 receptorových podjednotek, která aktivuje Janus kinázy a dojde k fosforylaci tyrosinu na konci CD122. Transkripční faktory z rodiny STAT (z anglického „Signal Transducers and Activators of Transcription“)¹⁷ proteinů dimerizují a transportují se do jádra, kde se vážou na DNA a ovlivňují tak transkripci daných genů.

2.1.1.3 IL2 imunokomplexy

Vytvoření komplexů volného IL2 s protilátkami anti-IL2 může mnohonásobně zvýšit biologickou aktivitu IL2 *in vivo*¹⁸. Mimořádně vysoká biologická aktivita imunokomplexů IL2 je pravděpodobně způsobena prodloužením poločasu cirkulace v krevním oběhu¹⁹. Tyto komplexy mají zároveň selektivní stimulační aktivitu pro různé buněčné podskupiny reagující na IL2. Byly popsány 2 základní typy imunokomplexů IL2 na základě různých mAb anti-IL2 použitých pro tvorbu imunokomplexu IL2. Mají velmi charakteristické rysy, pokud jde o strukturu a účinek na populace cílových buněk. Tyto klony mAb anti-IL2 rozpoznávají různá vazebná místa na IL2, díky čemuž mají tyto imunokomplexy rozdílné biologické účinky. Klon anti-IL2 mAb S4B6 se váže na oblast IL2, která interaguje s CD25 a brání IL2 v navázání na něj, čímž vylučuje výhodu buněk s vysokoafinitním trimerním receptorem v kompetici o IL2/S4B6 imunokomplexy. Naopak klon JES6-1A12 mAb se váže na jinou oblast IL2, která interferuje s vazbou IL2 na CD122/CD132. Vazba JES6-1A12 eliminuje stimulační aktivitu pro CD25⁻, CD122⁺, CD132⁺. Buňky CD25⁺ jsou tedy jediné, které jsou schopné tento imunokomplex využívat¹⁸. V této práci byl použit imunokomplex mIL2 s protilátkou S4B6 s 15ti aminokyselinovou (G₄S)₃ spojkou, který je vysoce stimulující pro paměťové CD8⁺ T buňky a NK buňky²⁰. Imunokomplexy IL2/JES6-1 stimulují výhradně regulační T buňky.



Obrázek 1: Imunokomplex IL2/S4B6 s 15 aminokyselinovou glycin-serinovou spojkou. Zeleně vyznačené části vyznačují receptor pro IL2. Modře je označen IL2, který je kovalentně spojen $(G_4S)_3$ spojkou s lehkým řetězcem anti-IL2 protilátky S4B6. Lehký řetězec je navázán na řetězec těžký disulfidickým můstkem a těžký řetězec tvoří dalšími disulfidickými můstky dimer celé molekuly protilátky typu IgG. Převzato a upraveno dle ²⁰.

Podávání anti-IL2 monoklonální protilátky S4B6 vede k selektivní přechodné proliferaci a expanzi paměťových $CD8^+$ T buněk, což je podobný efekt, jaký má podávání volného IL2. Podstata tohoto jevu byla ovšem dlouho neznámá ¹⁹. Studie Boyman et al. ukázala, že hlavním důvodem tohoto paradoxního jevu je tvorba imunokomplexů IL2 / anti-IL2 mAb. Takto se na endogenní IL2 naváže injikovaná S4B6 mAb, která je vysoce stimulační *in vivo* pro buňky, které měly vysoké hladiny CD122. Imunokomplex IL2-S4B6 může být připraven i jen pouhým smícháním IL2 a protilátky S4B6 v poměru 2:1. Takto byl poměr zvolen, jelikož IL2 může tvořit komplex i s další molekulou protilátky, což vede k mírné neutralizaci IL2. V případě námi připravovaného fúzního imunokomplexu má ovšem interleukin 2 a protilátka mezi sebou $(G_4S)_3$ peptidovou spojku, tudíž jsou kovalentně spojeny a nemohou tak od sebe disociovat příliš daleko, jako by tomu bylo v případě, kdy je IL2 s protilátkou pouze smíchán a nekovalentně vázán.

Zvyšování biologické aktivity vázáním daného cytokinu na příslušnou monoklonální protilátku v porovnání s volným cytokinem není typické pouze pro IL2 ¹⁸. Cytokinová/anti-cytokinová mAb je struktura, ve které mAb funguje částečně jako přenašeč a současně

umožňuje cytokinu uplatňovat nové vlastnosti (větší selektivita, delší poločas cirkulace v krevním oběhu). Další imunokomplexy z rodiny interleukinů byly pozorovány a použity v různých modelech protinádorových reakcí nebo autoimunitních chorob²¹.

2.2 Imunoterapie

Imunoterapie (také nazývána biologická léčba), je typ léčby rakoviny, kdy se využívá aktivace vlastního imunitního systému²². Imunoterapie je využívána k zastavení nebo zpomalení růstu nádorových buněk, zastavení šíření nádorových buněk do ostatních částí těla nebo k aktivování imunitního systému. Existuje několik typů imunoterapie, které pomáhají imunitnímu systému bojovat proti rakovině:

- 1) **„Checkpoint“ inhibitory** – Narušují signály rakovinných buněk a vystavují je útoku imunitního systému^{22,23}. Receptory, které jsou umístěné na povrchu imunitních buněk, mohou rozlišit zdravou buňku od rakovinotvorné. Rakovinotvorné buňky ovšem mohou posílat signály v určitých kontrolních bodech, které dávají signál imunitnímu systému, že jsou to buňky normální. Checkpoint inhibitory tyto signály blokují, a tak vystavují rakovinotvorné buňky útoku imunitního systému.
- 2) **Adoptivní přenos buněk** – V této léčbě je snaha o posílení přirozené schopnosti T buněk bojovat s rakovinou²⁴. Dojde k odebrání T buněk z daného nádoru nebo lymfatických uzlin a poté jsou neaktivnější T buňky pěstovány *in vitro* ve velkém množství. Takto se pěstují po dobu 2 – 8 týdnů a poté jsou intravenózně vráceny zpět pacientovi.
- 3) **Monoklonální protilátky** – Jednou z možností využití monoklonálních protilátek je cílená terapie k blokování abnormálního proteinu v rakovinné buňce²⁵. Lze je ale také využít v imunoterapii, kdy se některé monoklonální protilátky vážou na specifické proteiny na rakovinných buňkách. To označí rakovinné buňky, aby je imunitní systém mohl najít a zničit.
- 4) **Vakcíny** – Vakcíny vystavují imunitní systém antigenu²⁶. To spustí imunitní systém, aby rozpoznal a zničil tento antigen a jemu podobné látky. Existují 2 typy vakcín proti rakovině, preventivní a léčebná.

- 5) **Cytokiny** – Hrají velmi důležitou roli v imunitní odpovědi těla a také ve schopnosti imunitního systému reagovat na rakovinu ²⁷. Dvěma hlavními typy cytokinů, které se využívají při imunoterapii jsou interferony a interleukiny.

2.2.1 IL2 v imunoterapii

Interleukin 2 je velmi důležitý cytokin v imunoterapii pro léčbu nemocí včetně rakoviny ²⁸. Systematické podávání IL2 se ukázalo jako prospěšné u pacientů s melanomy. Tato léčba je ovšem limitována toxicitou IL2. Intravenózní podání IL2 způsobuje „syndrom prosakování kapilár“ nebo také únik tekutiny z oběhového systému do intersticiálního prostoru, což má za následek hypotenzi, otoky a dušnost, které mohou vést k oběhovým šokům. Proto bylo vyvinuto podávání IL2 ve formě aerosolu, které umožňuje podat IL2 pouze na určité místo a vyšší lokální aktivaci imunitních buněk.

Interleukin 2 byl první cytokin, který byl použit k léčbě rakoviny, jelikož může podporovat T buňky i NK buňky ²⁹. Ovlivňuje proliferaci a diferenciaci T lymfocytů, ale také je aktivuje.

Lymfokinem aktivované zabíjäcké (LAK) buňky jsou dalším efektorovým systémem, který hraje roli v imunitním dohledu. Byly stimulovány, aby zabíjely nádorové buňky. LAK buňky jsou heterogenní směsí aktivovaných T, NK a NKT buněk. Mohou rozpoznávat a zabíjet rakovinné buňky a také kultivované nádorové buněčné linie. Ukazuje se, že aktivita LAK buněk je interleukinem 2 stimulována.

Léčba interleukinem 2 je složitější, kvůli jeho toxicitě. Způsobená toxicita je ovšem předvídatelná a dobře zvládnutelná. Po terapii se toxicita rychle snižuje. Přesto tento typ zůstává možností v případech s rychlou progresí ³⁰.

Jelikož léčba samotným interleukinem 2 má mnoho nevýhod, začaly se hledat kombinace interleukinu s dalšími látkami. Jednou z nich je kombinace IL2 s dalším cytokinem, jako je například interferon alfa. Další možností je léčba IL2 kombinovaný s jinou buněčnou imunoterapií. IL2 v kombinaci s chemoterapeutiky (tzv. biochemoterapie) byla zkoumána především u pacientů s metastatickým melanomem. Tato terapie zatím však nebyla příliš úspěšná. Dnešním předmětem významného zkoumání je cílená terapie. Kombinace s IL2 by

mohla zvýšit účinnost cílených inhibitorů. Další možností léčby je kombinace IL2 s inhibitory kontrolních bodů³⁰.

2.2.2 Toxicita interleukinu 2

Využití interleukinu 2 v imunoterapii se zabývá čím dál tím více výzkumů. Při podání vyšších dávek je ovšem tento protein toxický, což je jeho hlavní nevýhodou³¹. Velmi běžnými vedlejšími účinky podávání vysoké dávky IL2 jsou například horečka, zimnice, průjem, anémie, zvýšení jaterních enzymů, eozinofilie, erythrodermie nebo zmatenost¹⁴. Imunoterapie IL2 je také známá tím, že způsobuje tzv. „syndrom prosakování kapilár“, kdy dochází k retenci tekutin, hypotenzi, syndromu respirační tísně a případně až infarktu myokardu.

Pacienti, kteří se léčili pomocí IL2 byli také více citliví na gramnegativními a grampozitivními organismy způsobené infekce. Díky prohlubujícím se znalostem o signalizačních drahách IL2 je v posledních letech léčba optimalizována pro dosažení stejného terapeutického efektu za současného potlačení vedlejších účinků terapie interleukinem 2.

2.2.3 IL2 imunokomplexy v imunoterapii

Imunokomplexy mají velmi slibnou budoucnost pro pacienty trpící rakovinou³². Dosud byly popsány dva prototypy imunokomplexů IL2, s protilátkou S4B6 nebo JES6-1. Klinické testování bylo ovšem zatím prováděno na úrovni pokusných zvířat. IL2-S4B6 bylo již testováno a prokazatelně vykazuje protinádorovou aktivitu u myší. IL2/JES6-1 zatím nebyla publikovaně testována na protinádorovou aktivitu³³. Jelikož tento imunokomplex velmi selektivně expanduje T_{reg} buňky, mohlo by to poněkud komplikovat použití těchto imunokomplexů v imunoterapii. Pokud je ovšem dávka imunokomplexu podána brzy po vzniku nádoru, tento imunokomplex vykazuje podobnou protinádorovou aktivitu jako IL2-S4B6 v některých nádorových modelech.

2.3 Protilátky

Protilátky jsou glykoproteiny patřící do imunoglobulinové rodiny, které jsou produkovány B buňkami a mají identifikovat a neutralizovat cizí organismy nebo antigeny³⁴.

Protilátky mají velkou diversitu funkcí, které zastávají³⁵. Příklady mohou být neutralizace, aglutinace nebo aktivace efektorových buněk. Přirozeně se vyskytující protilátky chrání organismus před škodlivými patogeny, viry a infekcemi. Téměř jakákoliv organická chemická látka indukuje produkci protilátek, které se specificky vážou na danou chemickou látku. Tyto protilátky jsou nejčastěji produkovány z více klonů B buněk a jsou označovány jako polyklonální. Získávají se imunizací laboratorních zvířat antigenem. Dochází ke stimulaci, proliferaci a diferenciaci B lymfocytů na plazmatické buňky. Produkuje se velké množství protilátek proti různým antigenům dané bílkoviny s různou schopností se na ni vázat. Poté je sérum obsahující protilátky proti původnímu imunogenu odebráno přímo ze zvířete. V dnešní době se velmi často využívá vysoce vyvinutého mechanismu imunitního systému k produkci strukturně a funkčně komplexních molekul, jako jsou protilátky z jednoho klonu B buněk, tzv. monoklonální protilátky.

Součástí protilátek jsou domény, které zahrnují oblasti určující komplementaritu (CDR)³⁶. CDR hrají klíčovou roli ve schopnosti protilátky se vázat a umožňuje jim identifikovat rozmanitý počet antigenů.

Protilátky jsou sekretovány jako globulární proteiny s molekulovou hmotností okolo 150 kDa²⁵. Mají dva lehké a dva těžké řetězce, přičemž vždy jeden lehký řetězec je kombinován s jedním těžkým řetězcem. Lehký řetězec má molekulovou hmotnost přibližně 25 kDa, zatímco těžký 50 kDa. Protilátky mají strukturu ve tvaru Y a oblast, kde se váže antigen je umístěna na horní části obou ramen. Tato část se definuje jako paratop (vázající epitop na antigenní struktuře). Odlišné řetězce jsou odděleny do variabilních a konstantních oblastí. Variabilní oblasti jsou důležité pro vazbu antigenu, konstantní oblasti zprostředkovávají efektorové funkce jako aktivaci komplementu nebo vazbu Fc – receptorů na makrofágy, což vede k sekreci cytokinů nebo histaminů. Řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky pro udržení stability proteinu.

Monoklonální protilátky a proteiny odvozené od monoklonálních protilátek jsou jednou z největších skupin biologických látek, které se dnes používají v široké škále terapií³⁷.

2.3.1 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou produkovány pouze jedním klonem B lymfocytů a mají tedy shodnou antigenní specifitu³⁸. Mají obrovský terapeutický potenciál a využívají se

především v onkologii, ovšem lze je použít i při tlumení nežádoucí zánětlivé reakce. Fungují jako činidla v biomedicinském výzkumu (detekce markerů nádorů, AIDS, chřipky), pro určení totožnosti infekcí po transfúzi, ale také mají význam v diagnostických testech pro detekci toxinů nebo hormonů, jako například v případě těhotenského testu pro detekci hormonu lidského choriongonadotropinu.

Tvorba monoklonálních protilátek je zahájena vhodnou imunitní odpovědí indukovanou imunizací zvířete ³⁹. Existuje mnoho druhů zvířat požívaných pro tvorbu monoklonálních protilátek, jako například králík nebo krysa, nejčastější je ale stále myš.

V roce 1975 Köhler a Milstein vyvinuli technologii, která umožňuje immortalizovat B lymfocyty produkující protilátky s myelomovými buňkami. Myelomové buňky jsou odvozené od B lymfomu a jsou charakterizovány nesmrtelným růstem a skutečností, že nevylučují žádné imunoglobuliny. Hybridomová technologie je standartní metodou pro generování protilátek.

Terapeutické monoklonální protilátky mají velký význam v dnešní klinické praxi ⁴⁰. Jejich výhodou je především specifita a schopnost reagovat s membránovými glykoproteiny. Po navázání na membránovou molekulu protilátka zablokuje signální cestu. Vazbou monoklonální protilátky na cílový antigen může dojít k aktivaci komplementového systému a k apoptóze buňky nebo ke spuštění dalších kaskád, které mohou vést k likvidaci cílové struktury.

2.4 Exprese proteinů v eukaryotickém expresním systému HEK293

HEK293 je buněčná linie odvozená z lidských embryonálních ledvinných buněk ⁴¹. Tato linie byla vytvořena transformací a kultivací normálních HEK buněk pomocí DNA adenoviru 5. Linie byla kultivována vědcem Alexem Van der Ebem na počátku 70. let v laboratoři v Leidenu v Nizozemsku a transformaci provedl Frank Graham. Zdrojem buněk byl zdravý plod potratu neznámého rodičovství. Název HEK293 je tedy odvozen od čísla experimentu, kterým tato linie vznikla.

V současné době jsou buňky HEK293 často používány v buněčné biologii a bylo vyvinuto mnoho variant, které jsou odvozené od původní linie, jako například:

- 1) HEK293S GnTI je buněčná linie odvozená od HEK293 linie, která postrádá gen pro N-acetylglukosaminyltransferázu I (GnTI) ⁴².
- 2) HEK293T je linie stabilně transfekovaná genem pro velký T antigen polyomaviru SV40, který umožňuje episomální replikaci plazmidů obsahujících počátek replikace tohoto viru ⁴³.
- 3) HEK293E je linie stabilně transfekovaná proteinem EBNA-1 viru Epstein-Barr, který umožňuje episomální replikaci plazmidů obsahujících počátek replikace tohoto viru ⁴⁴.

Tento expresní systém má řadu výhod. HEK293 linie jsou velmi snadno kultivovatelné, dobře transfekovatelné a poskytují vysoké výtěžky při produkci proteinů, což je činí výhodnějšími než jiné lidské buněčné linie.

2.4.1 Stabilní a tranzientní transfekce lidských buněčných linií

Tranzientní (přechodná) transfekce savčích buněk je účinný nástroj pro expresi rekombinantních proteinů pro výzkum a vývoj zejména v preklinických studiích ⁴⁵. Tranzientní transfekce pro produkci proteinu nejsou jen rychlejší než vytváření stabilně transfekovaných linií, ale celý transfekční proces je snadnější na provedení. To umožňuje výkonný „screening“ kandidátních proteinů k urychlení identifikace molekul pro použití v klinických testech. HEK293 jsou vhodné pro tento typ transfekce, jelikož jsou dobře transfekovatelné. Nevýhodou této metody může být vysoká spotřeba plazmidové DNA ⁴⁶. Další nevýhodou je, že je to transfekce pouze přechodná, tudíž se v případě potřeby musí opakovat.

Naproti tomu stabilní transfekce je užitečnější, pokud je potřeba dlouhodobá genová exprese nebo když je třeba transfekované buňky použít pro více experimentů ⁴⁷. Jelikož je integrace DNA vektoru do chromozomu vzácnou událostí, stabilní transfekce buněk je mnohem pracnější a náročnější proces, který vyžaduje selekci pomocí antibiotik. Z tohoto důvodu byly vyvinuty metody pro usnadněnou stabilní transfekci, například pomocí expresního systému piggyBac.

2.5 Expresní systém piggyBac

Expresní systém piggyBac využívá aktivity transpozázy pro tvorbu stabilně transfekovaných savčích buněčných linií pro produkci proteinů ve velkém měřítku.

Transpozony jsou semiparazitické sekvence DNA, které mohou být díky aktivitě enzymu transpozázy vystřiženy z původního místa v genomu a začleněny do místa nového.

Nejprve transpozáza odhalí 3' hydroxylovou skupinu na obou koncích genu. Volný 3'-OH napadne komplementární vlákno, vytvoří přechodnou vlásenkovou strukturu a uvolní transpozonové konce. Transpozáza rychle rozdělí tyto vlásenky do 5' „TTAA“ přesahů na obou stranách produktu excize. Transpozáza se poté připojí k vyříznutému prvku „TTAA“ na nové cílové struktuře, čímž je dokončena transpoziční reakce ⁴⁸.

V případě této bakalářské práce byl použit systém, který je indukovatelný doxycyklinem a produkci proteinu lze tedy spustit, když je kultura připravena. Systém piggyBac je upraven tak, že obsahuje navíc gen pro reversní tetracyklinový transaktivátor ⁴⁹. Po přidání doxycyklinu se reversní tetracyklinový transaktivátor naváže na TRE (z anglického „tetracycline response element“) na promotoru a indukuje expresi cílového proteinu.

Systém pracuje s běžně používanými adherentními a suspenzně adaptovanými savčími buněčnými liniemi a vyžaduje pouze jediný krok transfekce.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Chemikálie

1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkптоethanol	Sigma, USA
Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR
APS	Serva, USA
Blasticidin	Biotika, SR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
DMSO	Sigma, USA
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, ČR
Doxycyklin	Serva, USA
GoodView II	Ecoli, Slovensko
IPEI 25 kDa	Polysciences, USA
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel, Německo
PCR H ₂ O	Top-Bio, ČR
Puromycin	Serva, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
TEMED	Serva, USA

TruPAGE Precast Gels	Sigma, USA
Trypanová modř	Sigma, USA
Ostatní běžné chemikálie	

3.1.2 Roztoky a pufrů

Barvicí roztok pro SDS-PAGE (45% methanol, 10% kys. octová, 0,25% CBB R 250)

Elektrodotový pufr (0,025 M Tris, 0,19 M glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3)

ExCell 293 (komerční médium, před použitím doplněno o L-glutamin o výsledné koncentraci 4 mM; Sigma-Aldrich, USA)

LB – médium (1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4)

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE (35% ethanol, 35% kys. octová)

PBS pufr (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5)

PBS-TK (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,0)

Roztok AA pro SDS-PAGE (29% akrylamid, 1% N,N' methylenbisakrylamid)

Roztok IPEI (10 mg/ml IPEI v PBS-TK)

Roztok trypanové modři (0,4% trypanová modř v PBS-TK)

TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA)

TruPAGE SDS Running Buffer (Sigma, USA)

Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu (30% glycerol, bromfenolová modř v TAE)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný neredukující (31,5 mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN₃, pH 6,8)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný redukující (vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný naředěný desetinným podílem 2-merkptoethanolu)

3.1.3 Enzymy

CutSmart pufr	New England Biolabs, USA
Polymerasa Q5 a pufr	New England Biolabs, USA
InFusion enzym a pufr	Bioutil, USA
Restrikční endonukleasa NheI	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleasa PmeI	New England Biolabs, USA

3.1.4 Buněčné linie a bakteriální kmeny

<i>Escherichia coli</i> NEB10	New England Biolabs, USA
HEK293T	prof. Radu Aricescu, Oxford, UK

3.1.5 Vektory

PCMV3-IL2	Sino Biological
Plasmid PBase	Sanger Institute, UK
Plasmid PB-RB	prof. James M. Rini, Ph.D., University of Toronto
Plasmid pUT7	prof. James M. Rini, Ph.D., University of Toronto
Plasmidy pTW5sec_L1 a H2	Mgr. Lukáš Slavata, bakalářská práce, PřF UK, 2013

3.1.6 Oligonukleotidy

pCT5K-FW	5'-AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGGAGAACTG-3'
pCT5-REV	5'-CTGATCAGCGGGTTTTACCCGTGGTGGTGATG-3'
pCT5seq_FW	5'-TCAGATCGCCTGGAGACG-3'
pCT5seq_REV	5'-GTGGGAGTGGCACCTTCC-3'

3.1.7 Použité přístroje

Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Elektroforetická souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone, USA
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor IR 5000	LABsystem Praha, ČR
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Kahan Fuego SCS	Verkon, ČR
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona Ni-NTA Excell	GE Healthcare, USA
Koncentrátor Amicon Ultra	Millipore, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-LAB, ČR
Mikrocentrifuga Ministar Silverline	VWR, USA
Mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Mikrostríkačka Hamilton	P-LAB, ČR
Mikrovlnná trouba	Optimo Moulinex, Francie
Mikrozkumavka 1,5 ml	Eppendorf, USA
Mikrozkumavka 200 µl	Eppendorf, USA
pH metr Φ 200	Beckman Coulter, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo

Spektrofotometr DS-11	DeNovix, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler T100	Bio-Rad, USA
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka G24	New Brunswick Scientific, USA
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
UV prosvěcovací lampa 312 nm	UVItec, UK
Vortexový mixér	Velp Scientifica, Itálie
Zdroj stejnosměrného napětí EC250-90	E-C Apparatus Corporation, UK

3.2 Metodika

3.2.1 Štěpení restrikčními endonukleázami

Do celkového objemu 20 μl reakční směsi byly pipetovány 3 μg plazmidu. Dále byly přidány 2 μl 10 \times koncentrovaného reakčního pufru CutSmart a příslušné množství restrikční endonukleasy (5 U / 1 μg plazmidu). Zbylý objem byl doplněn dH₂O. Směs byla inkubována 2 h při 37 °C.

3.2.2 Agarosová elektroforéza

Pro přípravu agarosového gelu bylo smícháno 0,65 g agarosy s 65 ml TAE pufru. Tato směs byla povařena, zchlazena a do ještě tekutého gelu přidány 3 μl barviva GoodView II pro zviditelnění DNA v modrém (nebo UV) světle. Gel byl nalit do aparatury pro agarosovou elektroforézu a ponechán ztuhnout. K elektrodám byl nalit TAE pufr a gel byl převrstven přibližně 200 ml dH₂O. Do jedné z jamek bylo pipetováno 5 μl standardu a do dalších byly pipetovány vzorky, předem smíchané s příslušným množstvím vzorkového pufru (10 \times koncentrovaný). Elektroforéza probíhala 10–15 min při napětí 200 V (stejnoseměrné). Následně byl gel vizualizován modrým, či UV prosvěcovačem.

3.2.3 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace byla stanovena spektrofotometricky na spektrofotometru DeNovix. Absorbance roztoku byla měřena proti elučnímu pufru při vlnových délkách 260 a 280 nm a koncentrace byla spočtena empirickým přepočtem $A_{260} = 1$ odpovídá 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA.

3.2.4 Polymerázová řetězová reakce

Do dvou mikrozkušavek byla připravena reakční směs následovně: do každé bylo pipetováno 10 μl dH₂O, 1 μl templátu (100 ng), 2 μl přímého primeru, 2 μl zpětného primeru, 0,5 μl DNA polymerázy, 0,5 μl dNTPs. Takto připravené vzorky byly umístěny do termocykleru a PCR cyklus byl nastaven dle tabulky 1 (str. 28):

Tabulka 1: Nastavení teplot a časů programu pro PCR reakci.

	teplota	čas
1)	95 °C	5 min
2) (30x opakování)	95 °C	30 s
	54 °C	30 s
	72 °C	1 min
3)	72 °C	5 min
4)	4 °C	

Produkty PCR reakce byly dále analyzovány agarosovou elektroforézou a příslušné produkty extrahovány z gelu.

3.2.5 Extrakce DNA z agarosového gelu

K extrakci DNA z agarosového gelu byla použita komerční souprava NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Z gelu byly vzorky vyříznuty, přesunuty do mikrozkušavky a byl přidán solubilizační pufr ke každému z nich (200 µl/100 mg gelu). Mikrozkušavka byla přesunuta do termobloku, který byl vytemperovaný na 50 °C. Po rozpuštění gelu byl vzorek převeden na kolonku vloženou do mikrozkušavky a byl centrifugován 1 min při 11000 × g. Supernatant byl odstraněn a kolonka byla dvakrát promyta 600 µl promývacího pufru a centrifugována za stejných podmínek. Následně byla kolonka centrifugována 3 minuty pro odstranění zbytku ethanolu. Pro eluci plazmidové DNA bylo použito 20 – 50 µl elučního pufru přiloženého ke komerční soupravě.

3.2.6 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu

Do celkového objemu 20 µl reakční směsi bylo pipetováno 100 ng plazmidu štěpeného restrikními endonukleázami (viz kapitolu 3.2.1). Poté bylo pipetováno 25 ng insertu (PCR produkt kódující cílový gen) a 4 µl reakční směsi InFusion master mix. Směs byla doplněna do 20 µl dH₂O. Takto byla směs inkubována při 37 °C 1 hodinu. Dále byla směs použita pro transformaci *Escherichia coli* NEB10.

3.2.7 Transformace

K transformaci bylo použito 100 μ l buněčné suspenze kompetentních *Escherichia coli* DH5 α (pro velkoobjemovou produkci plazmidu), nebo *Escherichia coli* NEB10 (pro transformace ve fázi klonování). K suspenzi bakterií bylo přidáno přibližně 100 ng plazmidové DNA. Po dobu 10 minut byla tato suspenze ponechána na ledové lázni a poté byla rozetřena na agarovou plotnu s příslušným antibiotikem (ampicilin, kanamycin). Plotna byla přenesena do inkubátoru a inkubována přes noc na 37 °C.

3.2.8 Velkoobjemová produkce plazmidové DNA

Na plotnu s koloniemi *Escherichia coli* DH5 α byly přidány 2 ml LB média, ve kterých byly narostlé kolonie rozetřeny a přeneseny do 2l sterilní Erlenmayerovy baňky s 0,5 l LB média s daným antibiotikem (o koncentraci 100 μ g/ml). Byly inkubovány přes noc (max. 16 hodin) na třepačce při 37 °C a 220 ot./min.

Další den byla kultura centrifugována ve dvou 250 ml kyvetách po dobu 30 min při 3900 \times g, 20 °C. Peleta byla resuspendována v 10 ml TES pufru a opět centrifugována. Supernatant byl odstraněn, peleta byla zmrazena na -20 °C a uchována pro další zpracování.

Dále byla použita souprava NucleoBond® Xtra Midi / Maxi k izolaci plazmidové DNA. Bakteriální peleta byla resuspendována v 18 ml RES pufru a bylo přidáno příslušné množství RNAsy (výsledná koncentrace 0,1 mg/ml). Bylo přidáno 9 ml LYS pufru a roztok byl opatrně promíchán. Takto byl roztok ponechán 5 min při 20 °C. Dále bylo přidáno 9 ml NEU pufru a opět opatrně promícháno, dokud se roztok neodbarvil. Poté byl tento roztok přefiltrován přes filtr, který byl součástí komerční soupravy. Před filtrováním byl filtr i kolona promyta EQ1 puftrem. Po přefiltrování byla kolona promyta WASH puftrem. Roztok byl eluován pomocí 15 ml ELU pufru a k eluátu bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu a dobře promícháno. Roztok byl centrifugován 30 min při 20000 \times g a 4 °C. Poté byl supernatant odstraněn a bylo přidáno 5 ml 70% ethanolu. Roztok byl opět centrifugován 5 min při 20000 \times g a 4 °C. Peleta byla vysušena a poté rozpuštěna v 1 ml filtrované dH₂O.

3.2.9 Polymerázová řetězová reakce z kolonií

Do PCR mikrozkušavky bylo pipetováno 6 μl sterilní dH_2O . Z kultivační plotny, která byla přes noc inkubována, byla špičkou pipety setřena kolonie bakterií. Bakterie, které ulpěly na špičce byly resuspendovány do vzorku. Poté byla stejná špička vložena do připravené 50 ml zkumavky s 5 ml LB média a 5 μl ampicilinu (výsledná koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$). Do připravené mikrozkušavky s resuspendovanou kolonií bylo přidáno 10 μl reakční směsi „Combi PPP Master Mix“, 2 μl přímého primeru a 2 μl zpětného primeru pro daný templát. Mikrozkušavka byla umístěna do termocykleru a byl nastaven teplotní a časový program dle tabulky 2. Teplota nasedání primerů pro PCR z kolonie byla zvolena na 54 °C. Po dokončení PCR byla ověřena úspěšnost pomocí agarosové elektroforézy.

Tabulka 2: Nastavení teplot a časů programu pro PCR reakci.

	teplota	čas
1)	95 °C	5 min
2) (20x opakování)	95 °C	30 s
	54 °C	30 s
	72 °C	1 min
3)	72 °C	5 min
4)	4 °C	

3.2.10 Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA

Zkušavka o objemu 50 ml s inokulovaným médiem bakteriální kolonií byla volně překryta víčkem a zalepena lepící páskou tak, aby mohlo docházet k výměně plynů s okolím. Takto byla zkumavka inkubována na třepačce přes noc při 37 °C a 200 ot./min. K izolaci plazmidové DNA byla použita souprava NucleoSpin Plasmid. Kultura, která přes noc narostla byla centrifugována při 3900 \times g při 20 °C po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a zbylá peleta byla resuspendována v 250 μl A1 pufru. Směs byla přenesena do 1,5 ml mikrozkušavek a bylo přidáno 250 μl A2 pufru. Tato suspenze byla inkubována po dobu 5 min při 25 °C. Dále bylo přidáno 300 μl A3 pufru a po promíchání byla směs centrifugována při 11000 \times g při 20 °C

5 min. Supernatant byl pipetován na kolonku, která byla součástí soupravy. Poté byl roztok centrifugován 1 min při $11000 \times g$ při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Filtrát byl odstraněn a kolonka byla promyta $500\ \mu\text{l}$ AW pufru a opět byl roztok centrifugován při stejných podmínkách. Filtrát byl odstraněn a na kolonku bylo pipetováno $600\ \mu\text{l}$ A4 pufru a opět centrifugováno. Následně byl filtrát odstraněn a kolonka byla centrifugována 2 min při $11000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. K eluci bylo použito $50\ \mu\text{l}$ pufru AE, který byl přehřátý na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.11 Příprava vzorků plazmidové DNA k sekvenaci

Do dvou mikrozkušavek bylo pipetováno 200 ng plazmidové DNA. Do první mikrozkušavky byl přidán $1\ \mu\text{l}$ přímého sekvenačního primeru a do druhé $1\ \mu\text{l}$ zpětného sekvenačního primeru. Vzorky byly naředěny na $8\ \mu\text{l}$ a odeslány k sekvenaci RNDr. Štěpánce Hrdé do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK.

3.2.12 Rozmrazování buněčné linie HEK293T

Alikvot buněčné suspenze HEK293T, který je uchovávaný v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, o objemu 1 ml, byl rozmražen ve vodní lázni o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl objem suspenze přenesen do 10 ml média ExCell293 a byl centrifugován 5 minut při $95 \times g$. Supernatant byl slit a vzniklá peleta byla resuspendována v 10 ml média ExCell293. Tímto byly buňky opláchnutím zbaveny 10% DMSO, ve kterém byly zmrazeny. Buněčná suspenze byla přenesena na Petriho misku a inkubována při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 5% CO_2 atmosféře.

3.2.13 Stabilní produkce proteinů v buněčné linii HEK293T

Objem buněčné suspenze odpovídající celkovému množství 60 mil. buněk HEK293T byl centrifugován při $95 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Peleta byla resuspendována v ExCELL293 do výsledného objemu 1,2 ml. Suspenze byla pipetována na 12 jamkovou kultivační destičku. Do každé jamky bylo poté přidáno $300\ \mu\text{l}$ sterilního DNA transfekčního mixu v PBS TK a IPEI (tak, aby poměr IPEI a transfekční DNA byl 4:1). Obsah transfekčního mixu je uveden v následující tabulce 3. Na 10^6 buněk bylo použito $1\ \mu\text{g}$ DNA. Transfekce byla provedena plazmidy dle následující tabulky (tabulka 3, str. 32) v hmotnostním poměru 6,4:1,6:1:1.

Tabulka 3: Složení transfekčního mixu.

Plazmidy	L1	H2	PBase	PBRB
Množství DNA (µg)	38,4	9,6	6,0	6,0

Buněčné linie byly na destičce inkubovány při 135 ot./min, 37 °C a 5% CO₂ po dobu 4 hodin. Poté byla buněčná suspenze přenesena pomocí pipety do 100 ml lahve s prodyšným víkem. Takto byla buněčná suspenze inkubována na třepačce 48 hodin při 135 ot. / min, 37 °C a 5% CO₂. Selektce stabilně transfekovaných linií byla zahájena po 48 hodinách od transfekce. Linie byla přemístěna do čerstvého média a selektce probíhala na antibiotika puromycin (5 µg/ml) a blasticidin (2,5 µg/ml). Když kultura dosáhla viability asi 95 % po subkultivacích pod antibiotiky, byla buněčná suspenze zamrazena do pěti alikvotů. Pro zahájení produkce proteinu byl přidán doxycyklin do koncentrace 1 µg/ml. Produkce proteinu probíhala 8 – 9 dnů při počáteční buněčné koncentraci asi 1×10^6 b/ml.

3.2.14 Tranzientní produkce proteinu v buněčné linii HEK293T

Buněčná suspenze byla transfekována plazmidem PCMV3-IL2 (800 µg DNA na 800×10^6 buněk). Byla přidána antibiotika (penicilin 10 U/ml a streptomycin 1 µg/ml) a kyselina valproová (do výsledné koncentrace 2mM). Produkce probíhala v 11 láchvi v objemu 400 ml média ExCell při 135 ot. / min, 37 °C a 5% CO₂. Po 4 dnech byla buněčná suspenze sklizena centrifugací při $4500 \times g$ 1 hodinu při laboratorní teplotě. Supernatant byl přefiltrován přes 0,22 µm filtr a protein byl ihned purifikován.

3.2.15 Zamrazování buněčné linie

Médium s potřebným množstvím buněk (tak, aby výsledný alikvot obsahoval 1 ml suspenze o buněčné koncentraci 5×10^6 b / ml) bylo centrifugováno 5 min při $95 \times g$ a 20 °C. Vzniklá peleta byla resuspendována ve 45 % nového média, 45 % původního média a 10 %

DMSO. Takto byla suspenze rozdělena do alikvotů po 1 ml a vložena do mrazícího kontejneru, ve kterém byla umístěna do mrazícího boxu a uchována při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.16 Sklizení buněčných linií

Protein byl produkován do média, jelikož na začátku sekvence obsahuje sekreční signál. Buněčná suspenze byla centrifugována při $20000 \times g$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Supernatant byl přefiltrován přes $0,22\text{ }\mu\text{m}$ filtr. Filtrát byl zředěn PBS pufrém v objemovém poměru 1:1 a následně byl použit pro purifikaci proteinu nebo zmražen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ k pozdějšímu použití.

3.2.17 Afinitní chromatografie proteinů

Těžký řetězec protilátky S4B6, která je předmětem této práce, obsahuje histidinovou kotvu, díky které bylo možné pro purifikaci použít chelatační afinitní chromatografii na koloně Ni-NTA ExCell. Tato kolona byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic. Dále byla kolona ekvilibrována pufrém PBS. Rychlost průtoku pro nanášení zfiltrovaného média s cílovým proteinem byla nastavena na 5 ml/min . Po nanesení média byla kolona promyta PBS pufrém při stejném průtoku. Pro předeluci byl použit 20 mM imidazol v pufru PBS. Eluce probíhala při průtoku $2,5\text{ ml/min}$ PBS pufrém s 250 mM imidazolem. Následně byla kolona regenerována octanovým pufrém o $\text{pH} = 4$. Po regeneraci byla kolona převedena do 20% ethanolu, ve kterém byla uchována.

3.2.18 Koncentrování proteinů

Proteiny byly koncentrovány pomocí koncentrátorů Millipore Amicon Ultra MWCO 10000 při $3900 \times g$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn, koncentrátor byl doplněn vzorkem proteinu a opět byl centrifugován při stejných podmínkách. Tento krok byl opakován až do dosažení požadovaného objemu vzorku (méně než $250\text{ }\mu\text{l}$) pro gelovou permeační chromatografii.

3.2.19 Gelová permeační chromatografie

Pro gelovou permeační chromatografii byla použita kolona Superdex 200 10/300 GL, která byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic. Chromatografická kolona byla promyta pufrem PBS TK. Před nanesením byl vzorek centrifugován při $20000 \times g$ po dobu 5 minut. Nástřiková smyčka byla promyta pufrem PBS TK. Vzorek byl nanesen do nástřikové smyčky a chromatografie probíhala při průtoku 0,5 ml/min. Jednotlivé frakce byly sbírány do připravených mikrozkušavek.

3.2.20 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovována spektrofotometricky. K měření byl použit 1 μ l daného vzorku. Vzorek byl měřen třikrát, přičemž z naměřených hodnot byl použit průměr všech hodnot. V případě odlehlého výsledku bylo měření vyřazeno. Pro výpočet koncentrace proteinu byla zadána jeho molekulová hmotnost a teoretický extinkční koeficient při 280 nm.

3.2.21 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Ke kontrole čistoty jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie, byla použita SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Pro elektroforézu byly použity dva typy gelů, zaostřovací a rozdělovací. Složení jednotlivých gelů je uvedeno v tabulce 4. Byl připraven roztok rozdělovacího gelu, který byl pipetován mezi dvě skla elektroforetické aparatury, převrstven dH_2O a ponechán ztuhnout. Po zatuhnutí rozdělovacího gelu byla voda odlita a byl pipetován připravený zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřeben s požadovaným množstvím jamek. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byla skla přesunuta do elektroforetické vany, hřeben byl vyjmut a elektroforetická vana byla naplněna elektrodoým pufrem po rysku. K 10 μ l vzorku byly přidány 2 μ l $5\times$ koncentrovaného vzorkového pufru (redukující či neredukující) tak, aby ve výsledné směsi byl $1\times$ koncentrovaný. Vzorky byly nejprve přemístěny do termobloku a zahřívány na $98\text{ }^\circ\text{C}$ a poté centrifugovány 2 min při $11000 \times g$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$. Do první jamky byly pipetovány 3 μ l standardu molekulových hmotností, do dalších byly pipetovány připravené vzorky. Elektroforéza probíhala přibližně 40 minut při stejnosměrném napětí 200 V. Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty a barveny barvicím roztokem po dobu alespoň 30 minut. Po nabarvení byly odbarveny pomocí odbarvovacího roztoku a poté byly gely vyfoceny a uchovány v dH_2O .

Tabulka 4: Složení polyakrylamidových gelů pro SDS elektroforézu.

	rozdělovací gel (12,5 %)	zaostřovací gel
dH₂O	1,265 ml	0,7 ml
30 % AA	1,675 ml	0,25 ml
1,5M Tris (pH = 8,8)	1 ml	
1,5M Tris (pH = 6,4)		0,125 ml
10 % SDS	40 μ l	10 μ l
10 % APS	40 μ l	10 μ l
TEMED	2 μ l	1,5 μ l

3.2.22 SDS elektroforéza v gradientovém gelu

Byl použit gel komerční gradientový gel TruePAGE Precast Gel 4 – 20% s příslušným elektrodoým pufrem. K 10 μ l vzorku byly přidány 2 μ l 5 \times koncentrovaného vzorkového pufru (redukující či neredukující) tak, aby ve výsledné směsi byl 1 \times koncentrovaný. Vzorky byly nejprve přemístěny do termobloku a zahřívány na 98 °C a poté centrifugovány 2 min při 11000 \times g a 20 °C. Do první jamky byly pipetovány 3 μ l standardu molekulových hmotností, do dalších byly pipetovány připravené vzorky. Elektroforéza probíhala přibližně 40 minut při stejnosměrném napětí 200 V. Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty a barveny barvicím roztokem po dobu alespoň 30 minut. Po nabarvení byly odbarveny pomocí odbarvovacího roztoku a poté byly gely vyfoceny a uchovány v dH₂O.

4. VÝSLEDKY

4.1 Produkce imunokomplexu mIL2-S4B6

Konstrukty L1 a H2 byly již použity Mgr. Lukášem Slavatou v plazmidu pTW5sec, ovšem s velmi malými výtěžky⁵⁰. Za účelem zvýšení výtěžků byly stejné konstrukty L1 a H2 (viz Obrázek 2 a Obrázek 3) přeneseny do plazmidu pUT7 pro tvorbu stabilních linií (viz kapitola 2.4.1) s indukovatelnou expresí. Koexpresí proteinů z plazmidů L1 a H2 vzniká imunokomplex mIL2-S4B6, který se skládá z lehkého řetězce protilátky S4B6 fúzované s myším interleukinem 2 (dále jen mIL2-(G₄S)₃-S4B6-Lc, viz obrázek 2) a z těžkého řetězce (S4B6-Hc, viz obrázek 3).

Dále byl produkován lidský IL2, který bude následně použit jako standard pro ověření aktivity fúzních konstruktů protilátek s IL2.

4.1.1 Konstrukty L1 a H2

Pro expresi byl zvolen konstrukt se sekrečním signálem ze sekretované alkalické fosfatázy na N-konci. Histidinová kotva His₈ je přítomna pouze na C-konci Hc. Z tranzientní produkce v HEK293T bylo v minulých pracích získáno nekvantifikovatelné množství aktivního proteinu⁵⁰.

L1: mIL2-(G₄S)₃-S4B6-Lc

```
ITGAPTSSSTSSSTAEAAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRL  
TFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLK  
GSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIHSTSPQGGGGSGGGGSDIQVTQ  
SPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNYLSWYQQLGKSPQLLIHSATSLADGVPSRFGS  
RSGTQYSLKINRLQVEDTGIYYCLQHYSTPYTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSTEQ  
LATGGASVVCLMNNFYDPDISVKWKIDGTERRDGVLDVTDQDSKDYMSSTLSLT  
KADYESHNLYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC*
```

Obrázek 2: Aminokyselinová sekvence L1 konstruktů. Počáteční černě označené „I“ je zbytek sekrečního signálu, „TG“ je pozůstatek štěpení restriční endonukleázou AgeI. Zeleně označený úsek znázorňuje sekvenci myšího interleukinu 2. Oranžová část sekvence značí 15 aminokyselinovou GS spojku a lehký řetězec mAb S4B6 je vyznačen modře.

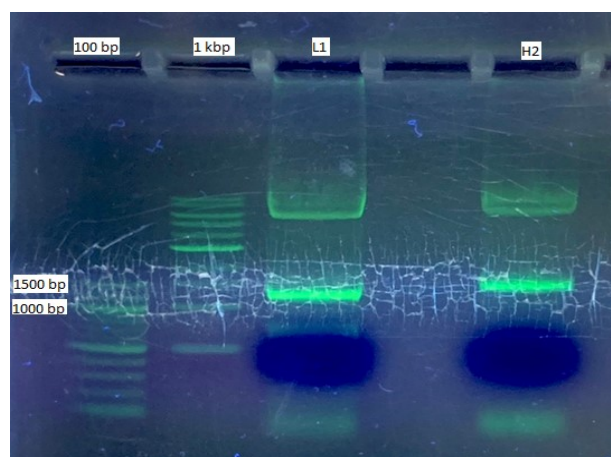
H2: S4B6-Hc

```
ITGEVQLQESGAELVRPGTSVKLSCKVSGDTITAYYLHFVRQRPGQGLEWIGRIDPED
DSTKYAENFKNKATFTADASSNTAYLRLSSLTSEDATYFCTTVTFYYSRELRWFAY
WGQGTLLTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGA
LSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRECN
PCGCTGSEVSSVFIFPPKTKDVLITLTPKVTICVVVDISQNDPEVRFSWFIDDVEVHTA
QTHAPEKQSNSTLRSVSELPIVHRDWLNGKTFKCKVNSGAFPAPIEKSSISKPEGTPRGP
QVYTMAPPKEEMTQSQVSITCMVKGFYPPDIYTEWKMNGQPQENYKNTPTMDTDG
SYFLYSKLNVKKETWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGKGTHHHHHHHHHG
*
```

Obrázek 3: Aminokyselinová sekvence H2 konstruktů. Oranžový úsek aminokyselinové sekvence znázorňuje těžký řetězec a černě označené aminokyseliny jsou pozůstatky po štěpení restriční endonukleázou AgeI a KpnI. Histidinová kotva, která byla do sekvence vložena pro následnou purifikaci proteinu, je vyznačena modře.

4.1.2 Příprava inzertů DNA

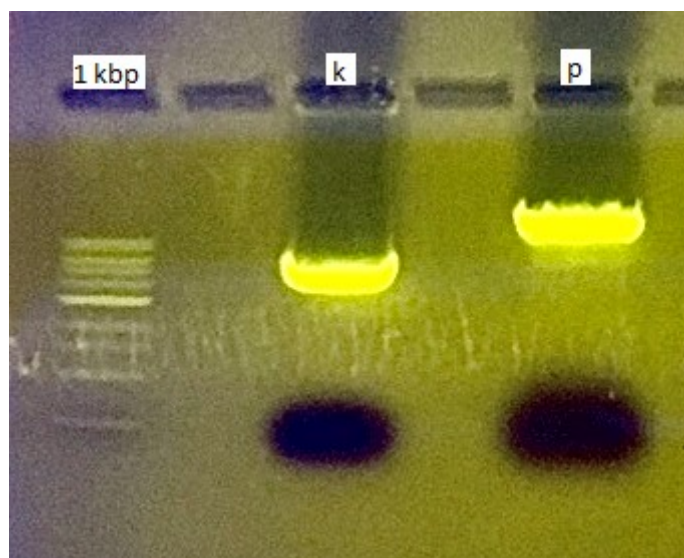
Geny pro řetězce L1 a H2 byly amplifikovány pomocí PCR reakce za účelem přenesení těchto genů do plazmidu pUT7. Zároveň byly díky použitým primerům PCT5K_FW a PCT5_REV na konce vzniklých fragmentů zaneseny přesahy vhodné pro následnou InFusion reakci (viz kapitola 3.2.6). Následně byly produkty PCR reakce separovány a vizualizovány na agarosové elektroforéze (viz Obrázek 4, str. 37). Fragmenty byly z gelu izolovány a byla změřena jejich koncentrace.



Obrázek 4: Agarosová elektroforéza konstruktů L1 a H2. V první a druhé dráze se nacházejí standardy pro porovnání velikostí. Ve třetí dráze je konstrukt L1 s velikostí 1275 bp a v páté dráze konstrukt H2 s velikostí 1473 bp.

4.1.3 Linearizace plazmidu

Plazmid pUT7 byl linearizován pomocí restričních endonukleas NheI a PmeI (viz Obrázek 5, str. 38), aby do něj mohl být vložen amplifikovaný gen. Dále byla provedena agarosová elektroforéza a jako kontrola byl na gel nanesen neštěpený plazmid pUT7. Po elektroforéze byl tento štěpený plazmid izolován z gelu (koncentrace 156 ng/ μ l) metodou, která je popsána v kapitole 3.2.5 a dále použit pro InFusion reakci.



Obrázek 5: Elektroforéza štěpeného plazmidu pUT7. V první jamce zleva je 1 kbp standard, v následující jamce označené „k“ je neštěpený plazmid jako kontrola, a v poslední dráze označené „p“ je štěpený plazmid pUT7.

4.1.4 Příprava vektorů pUT7_L1 a pUT7_H2

Byl použit štěpený plazmid a amplifikované inzerty DNA pro provedení InFusion reakce. Při této reakci došlo ke vložení inzertu do plazmidu pUT7. Dále proběhla transformace bakterií *Escherichia coli* NEB10, které byly ponechány na agarové plotně se selekčním antibiotikem ampicilinem přes noc při 37 °C. Druhý den bylo pomocí PCR z kolonií, které na plotně narostly, ověřeno správné vložení genů do plazmidů. Následně byly produkty PCR reakce vizualizovány na agarosové elektroforéze.

Pozitivní kolonie byly kultivovány v 5 ml LB média s ampicilinem do druhého dne. Další den byla ze vzorků izolována plazmidová DNA, která byla poslána na sekvenaci s primery dle tabulky 5, str. 39. Po kontrole sekvenací byly konstrukty použity pro velkoobjemovou produkci plazmidů v 500 ml LB média s ampicilinem.

Tabulka 5: Složení vzorků pro sekvenaci. "

Primer	Templát	Vzorek
PCT5K_seq_FW	pUT7_L1	DOR1
PCT5_seq_REV	pUT7_L1	DOR2
PCT5K_seq_FW	pUT7_H2	DOR3
PCT5_seq_REV	pUT7_H2	DOR4

4.1.5 Transfekce – tvorba stabilních linií

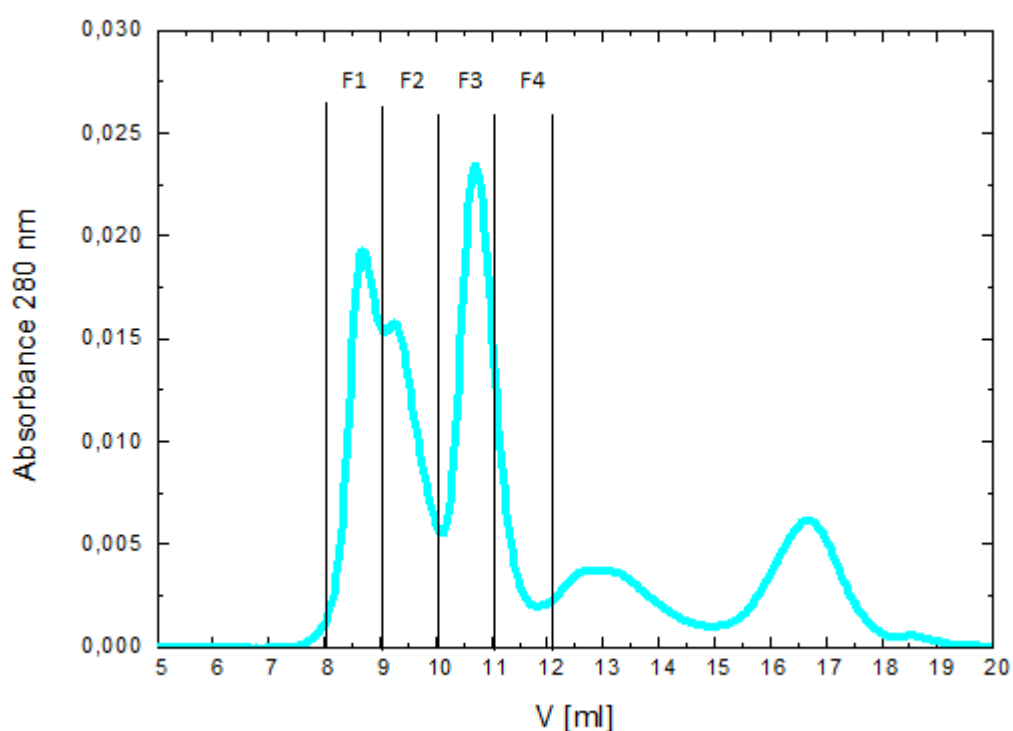
Kotransfekcí plazmidů pUT7_L1 a pUT7_H2 v molárním poměru 4:1 a plazmidy PB-RB a PBase byly transfekovány buňky HEK293T. Jelikož konstrukty obsahují sekreční signál sekretované alkalické fosfatázy na N-konci, byla umožněna sekrece cílových proteinů do kultivačního média. Z buněk, které přežily selekci antibiotiky, byly vytvořeny stabilní linie. Pro indukci produkce proteinu byl použit doxycyklin (koncentrace 1 µg/ml) a po uplynulé době inkubace byly buňky sklizeny centrifugací. Po centrifugaci bylo médium zfiltrováno a uchováno při -20 °C.

4.1.6 Purifikace proteinu

Pro purifikaci proteinu byla použita chelatační afinitní chromatografie pomocí kolony Ni-NTA. Po předeluci a následné eluci byl eluát zkoncentrován a nanesen na kolonu pro gelovou permeační chromatografii. Jednotlivé frakce byly sbírány po 1 ml automatickým sběračem a následně byla stanovena koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích, které jsou znázorněny v tabulce 6.

Tabulka 6: Koncentrace proteinu mIL2-S4B6 v jednotlivých frakcích. Celkový teoretický výtěžek byl tedy 0,18 mg ze 100 ml.

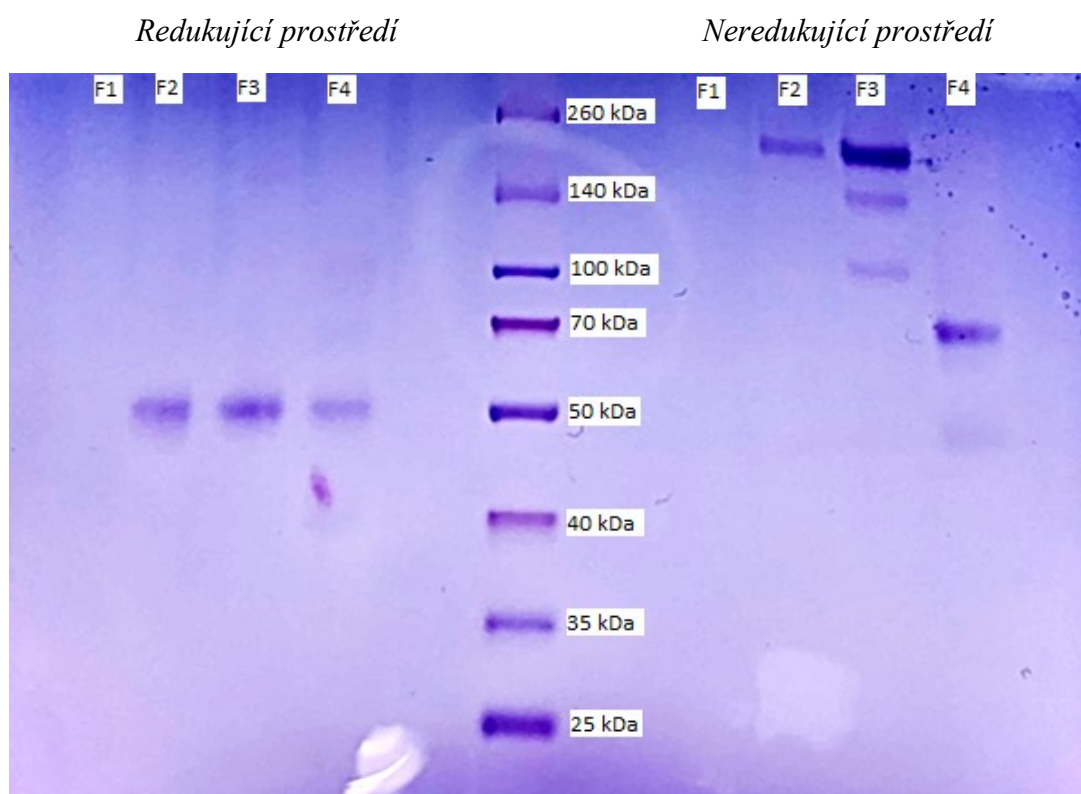
<u>sbírané frakce</u>	<u>koncentrace [mg/ml]</u>
1	0,06
2	0,05
3	0,05
4	0,02



Obrázek 6: Gelová permeační chromatografie mIL2-S4B6 na koloně Superdex 200 10/300. Svislé čáry označují počátek a konec sbírání jednotlivých frakcí F1-F4. Chromatografie byla zaznamenána detekcí absorbance při 280 nm (modře). Pík sbíraný ve třetí frakci odpovídá elučním objemem 10,6 ml předpokládané mobility monomeru cílového komplexu (mIL2-S4B6). Předcházející dva píky (eluční objem 8,5 ml a 9,4 ml) jsou pravděpodobně agregáty stejného proteinu (anebo di-, či více- mery). Sebrané frakce byly dále analyzovány SDS-PAGE.

4.1.7 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Byla provedena SDS elektroforéza v komerčním gradientovém gelu pro charakterizaci a ověření čistoty jednotlivých frakcí po gelové permeační chromatografii postupem popsaným v kapitole 3.2.20. Frakce byly před smícháním se vzorkovým pufrům zkoncentrovány na membránovém koncentrátoru z důvodu příliš nízké koncentrace proteinu pro vizualizaci barvením barvicím roztokem s Coomassie Brilliant Blue R-250.



Obrázek 7: SDS elektroforéza jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie v gradientovém gelu. Frakce jsou označeny F1 – F4 v redukujícím a neredukujícím prostředí. Byl použit komerční gradientový gel TruePAGE Precast Gel 4 – 20%, pro lepší rozlišení proteinů vyšších molekulových hmotností.

Ve frakci 1 se nenachází žádný proužek, tudíž lze předpokládat, že ve vzorku žádný protein nebyl přítomen. Dle očekávání se ve frakci 2 v neredukujícím prostředí nachází proužek okolo 180 kDa (předpokládaná hmotnost celého imunokomplexu 184,6 kDa) a v redukujícím prostředí okolo 50 kDa, což odpovídá hmotnosti těžkého řetězce. Ve frakci 3 se opět nachází

proužek okolo očekávaných 180 kDa v neredukujícím prostředí, ovšem ještě navíc v okolí 140 kDa, který by mohl odpovídat imunokomplexu s pouze jedním lehkým řetězcem fúzovaným s IL2. Zóna o molekulové hmotnosti 100 kDa indikuje přítomnost pouze dvou těžkých řetězců. V poslední čtvrté frakci v redukujícím prostředí proužek odpovídá hmotnosti těžkého řetězce, pod nímž lze pozorovat slabý proužek o hmotnosti přibližně 40 kDa, což by odpovídalo očekávané hmotnosti lehkého řetězce s IL2. Ovšem v neredukujícím prostředí se tento proužek nachází okolo 70 kDa, což by mohlo naznačovat tvorbu nežádoucího dimeru tohoto IL2-lehkého řetězce sama se sebou.

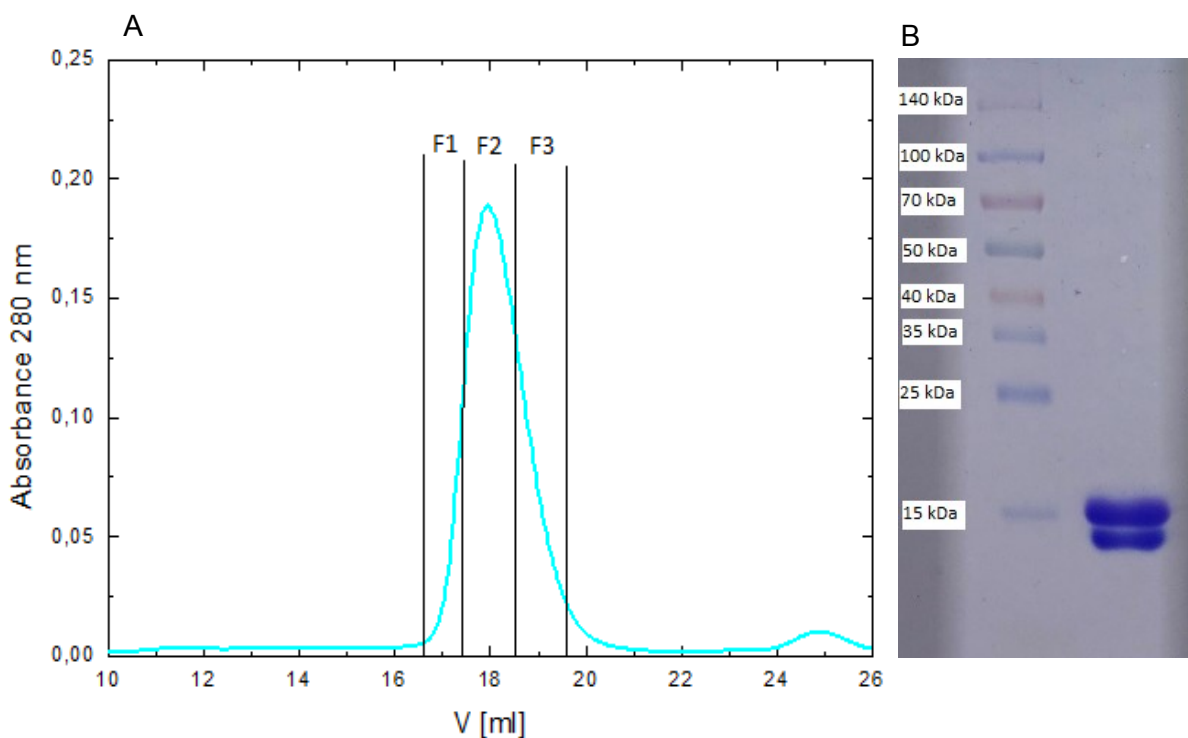
4.2 Produkce lidského interleukinu 2

Zakoupený plazmid PCMV3-IL2 byl amplifikován za účelem získání dostatečného množství DNA pro tranzientní transfekce (viz kapitola 3.2.14). Sekvence cílového proteinu hIL2 (lidský interleukin 2 s histidinovou kotvou) je zobrazena na obrázku 8.

```
MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR  
MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL  
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSHHHHHHHHHHH-
```

Obrázek 8: Sekvence aminokyselin lidského IL2. Červeně je vyznačen sekreční signál pro IL2, modré T značí threonin 23, který nese O-glykosylaci. Žlutě je vyznačena GS peptidová spojka a zeleně histidinová kotva. Předpokládaná hmotnost bez sekrečního signálu a bez glykosylace je 17,1 kDa.

Protein hIL2 byl produkován v buněčné linii HEK293T. Ta byla transfekována (viz kapitola 3.2.14) plazmidem PCMV3-IL2. Buněčná suspenze byla sklizena po 4 dnech produkce a protein byl ihned purifikován na koloně Ni-NTA ExCell. Následně byl protein zkoncentrován a nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL. Jako mobilní fáze byl použit pufr PBS-TK, který je kompatibilní s použitím v buněčných liniích, na kterých bude dále testována aktivita cílového proteinu. Protein byl sbírán do 3 frakcí (viz obrázek 9A), které byly následně smíchány, rozděleny do alikvotů a uchovány při -80 °C. Čistota proteinu byla dále ověřena SDS elektroforézou (viz obrázek 9B).



Obrázek 9: A: Záznam z gelové permeační chromatografie hIL2. Svislé čáry označují počátek a konec sbírání jednotlivých frakcí F1 – F3. Chromatografie byla zaznamenána detekcí absorbance při 280 nm (modře). Jediný pík odpovídá elučním objemem 18 ml předpokládané mobility monomeru cílového proteinu. Sebrané frakce byly smíchány a dále analyzovány SDS-PAGE. **B: SDS-PAGE analýza lidského IL2.** Předpokládaná hmotnost hIL2 bez sekrečního signálu a bez glykosylace je 17,1 kDa. Na elektroforéze jsou dobře rozlišené 2 pruhy, které naznačují, že protein je zčásti glykosylován. Vzhledem k tomu, že nejsou patrné jiné další pruhy, lze čistotu vzorku považovat za uspokojivou.

5. Diskuse

Myší interleukin 2 fúzovaný s protilátkou S4B6 byl již v práci Mgr. Lukáše Slavaty produkován tranzientně, ovšem s tak malým výtěžkem, že se tento protein ani nepodařilo purifikovat a detekovat na SDS elektroforéze. V případě této práce byly tedy vytvořeny stabilní linie pro produkování většího množství proteinu a možnosti zamražení stabilních linií, a tedy případnému pozdějšímu opakování produkce proteinu. Jelikož i v této práci by výtěžky fúzního mIL2-S4B6 mohly být větší, metodu budeme dále optimalizovat.

Fúzní protein mIL2-S4B6 byl produkován v lidské buněčné linii HEK293T. Jelikož pro tranzientní transfekci je potřeba velké množství čisté plazmidové DNA a každá produkce proteinu musí být znovu transfekována, byla za účelem zvýšení výtěžku a možnosti trvalé produkce zvolena stabilní transfekce. Z tohoto důvodu byly konstrukty L1 (mIL2-(G₄S)₃-S4B6-Lc) a H2 (S4B6-Hc) vloženy do plazmidu pUT7, který je součástí systému piggyBac a umožňuje tvorbu stabilních linií (viz kapitola 2.5). Tento systém umožňuje selekci stabilně transfekovaných linií a produkci proteinu indukovat přidáním doxycyklinu. Ke kotransfekci byl po odborné konzultaci s RNDr. Jakubem Tomalou, Ph.D. z Laboratoře nádorové imunologie MBÚ AV ČR zvolen poměr L1 a H2 4:1. Je totiž velice obtížné přesně stanovit míru exprese lehkého a těžkého řetězce protilátky S4B6, zejména když se produkuje jen malé množství tohoto imunokomplexu²⁰. Z předchozí zkušenosti Dr. Jakuba Tomaly s podobnými imunokomplexy vyplývá, že vyšší poměr lehkého řetězce fúzovaného s mIL2 ku těžkému řetězci přináší vyšší výtěžky proteinu (data nepublikována). Transfekce stabilních linií není jednoduchý proces a ani v případě této bakalářské práce se nepovedla na první pokus. V prvních experimentech bylo použito 5 µg/ml puromycinu a 5 µg/ml blastidinu jako selekčních antibiotik, což se později ukázalo jako příliš velké množství, a tak bylo množství blastidinu sníženo na polovinu. Další již úspěšné transfekce byly provedeny Mgr. Barborou Kalouskovou. Protein byl produkován do média, jelikož konstrukt obsahuje sekreční signál ze sekretované alkalické fosfatázy. Výtěžek nebyl příliš vysoký, ale vzhledem k vysoké stimulační aktivitě připraveného IL2 imunokomplexu je dostačující pro zamýšlené *in vitro* a *in vivo* studie, které budou prováděny RNDr. Jakubem Tomalou, Ph.D v návaznosti na tuto práci.

Na obrázku 6 (str. 40) z gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL jsou kromě hlavního nejvyššího píku o elučním objemu 11 ml vidět další dva menší píky v elučním objemu 8 – 10 ml. To může být zapříčiněno oligomerními formami

imunokomplexu mIL2-S4B6, které mají větší molární hmotnost a jsou tedy eluovány při nižším elučním objemu. Shodné chování (profil tří píků na SEC) potvrzují výsledky purifikace mutovaných verzí cílového imunokomplexu, které ovšem nejsou předmětem této bakalářské práce (výsledky zatím nebyly publikovány).

Na SDS elektroforéze (obrázek 7, str. 41) v neredukujícím prostředí pro frakce 2 a 3 je možné vidět proužek odpovídající molekulové hmotnosti okolo 180 kDa, což by mělo odpovídat velikosti proteinu mIL2-S4B6 (předpokládaná molekulová hmotnost 184,6 kDa). Ostatní viditelné pruhy ve frakci 3 mohou odpovídat neúplně sbaleným komplexům, např. dimeru těžkého řetězce, případně s jedním lehkým řetězcem. Pro jistější identifikaci by bylo nutno použít nějakou metodu, která odhalí identitu proteinu v daném pruhu na SDS-PAGE, např. imunodetekci s pomocí protilátek rozeznávajících histidinovou kotvu a myší IL2 (čímž by bylo možno odlišit proužky obsahující pouze těžký nebo pouze IL2-lehký řetězec), nebo s pomocí hmotnostní spektrometrie. V redukujícím prostředí jsou ve všech případech nejvýraznější proužky okolo 50 kDa, což indikuje přítomnost samostatného těžkého řetězce. V poslední čtvrté frakci v neredukujícím prostředí se ovšem proužek nachází okolo 70 kDa, který neodpovídá žádnému očekávanému produktu. Mohl by snad naznačovat tvorbu dimeru IL2-lehkého řetězce sama se sebou (cca 80 kDa), což by vysvětlovalo, proč v předcházející frakci pozorujeme neúplné formy imunokomplexu, kterým patrně IL2-lehký řetězec chybí.

K přesnější identifikaci jednotlivých frakcí gelové permeační chromatografie by bylo třeba využít dalších metod. Proteiny z jednotlivých frakcí rozdělených na SDS-PAGE by bylo možno přesněji identifikovat použitím hmotnostní spektrometrie. O chování imunokomplexu mIL2-S4B6 by mohla více říci i analytická ultracentrifugace, kdy se částice identifikují dle jejich sedimentačního koeficientu závislého na molekulové hmotnosti a dalších hydrodynamických vlastnostech. Přesnější metodou pro určení velikosti molekul ve frakcích z gelové permeační chromatografie by mohla být detekce MALS (z anglického „multi-angle light scattering“), technika, která je založena na měření světla rozptýleného vzorkem do několika úhlů. Používá se ke stanovení absolutní molární hmotnosti detekcí dle toho, jak částice rozptylují světlo. Případně by se mohla použít metoda DLS (z anglického „dynamic light scattering“), která se běžně využívá k určení velikosti malých částic v suspenzi nebo polymerů v roztoku⁵¹.

Výsledkem exprese lidského IL2 byl výtěžek až 4 mg velmi čistého proteinu z jedné produkce (400 ml). Jak je zřejmé z výsledku SDS-PAGE (obr. 9A), lidský IL2 je ve vzorku

přítomen ve dvou na SDS-PAGE dobře rozlišitelných stavech. Vzhledem k tomu, že je známo, že lidský IL2 nese O-vázanou glykosylaci na Thr23 byl takovýto výsledek očekáván – protein byl totiž produkován v lidské buněčné linii, která má aparát pro přirozenou glykosylaci lidského typu. Vyšší pruh na elektroforéze pak odpovídá glykosylovanému proteinu, nižší potom proteinu neglykosylovanému. Glykosylace by neměla mít vliv na aktivitu IL2, nicméně by mohla zvýšit jeho stabilitu. Přestože hlavním tématem této práce byla příprava myšního IL2 ve fúzi s protilátkou S4B6, přistoupili jsme rovněž k expresi lidského IL2, který v následujících studiích bude sloužit jako reference ke stanovení aktivity dalších fúzních komplexů protilátek právě s lidským IL2. Tyto fúzní protilátky jsou společně s imunokomplexem mIL2-S4B6 předmětem výzkumu vedeného RNDr. Jakubem Tomalou Ph.D. ve spolupráci s mým školitelem a konzultantem, do kterého jsem se zapojila při řešení této bakalářské práce.

5. ZÁVĚR

Byly připraveny plazmidy určené pro stabilní expresi myší monoklonální protilátky S4B6 ve fúzi s myším interleukinem 2. Byla vytvořena stabilně transfekovaná linie HEK293T, ve které byl produkován protein mIL2-S4B6. Přítomnost proteinu ve frakcích po purifikaci byla ověřena pomocí SDS elektroforézy. Byl vyprodukován a purifikován lidský IL2 s histidinovou kotvou, který bude dále předmětem ověření biologické aktivity.

6. PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za vedení práce a konzultace spojené s touto prací. Ráda bych také poděkovala především Mgr. Ondřeji Skořepovi za pomoc v experimentální části a za trpělivost a cenné rady po celou dobu práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře 204 za příjemné pracovní prostředí.

7. LITERATURA

- (1) Zhang, J.-M.; An, J. Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics* **2007**, *45* (2), 27–37.
- (2) Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špíšek, R. *Základy Imunologie*, 6. vydání; TRITON: Praha, 2017.
- (3) Sino Biological. Inflammatory Cytokines. <https://www.sinobiological.com/inflammatory-cytokines.html> (23. 8. 2019).
- (4) Opal, S. M.; DePalo, V. A. Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest* **2000**, *117* (4), 1162–1172.
- (5) Interleukins for the Paediatric Pulmonologist. *Paediatr. Respir. Rev.* **2014**, *15* (1), 56–68.
- (6) Encyclopaedia Britannica. Interleukin. <https://www.britannica.com/science/interleukin> (15. 11. 2019).
- (7) GoldBio. Interleukins. <https://www.goldbio.com/articles/article/interleukins> (15. 11. 2019).
- (8) Sino Biological. What Are Interleukins. <https://www.sinobiological.com/what-are-interleukins-a-6072.html> (15. 11. 2019).
- (9) Interleukins as Modulators of Angiogenesis and Anti-Angiogenesis in Tumors. *Cytokine* **2019**, *118*, 3–7.
- (10) Gery, I.; Gershon, R.; Waksman, B. Potentiation of T-Lymphocyte Response to Mitogens .1. Responding Cell. *J. Exp. Med.* **1972**, *136* (1), 128.
- (11) Tomala, J.; Kovar, M. IL-2/Anti-IL-2 MAbs Immunocomplexes: A Renaissance of IL-2 in Cancer Immunotherapy? *OncoImmunology* **2016**, *5* (3), e1102829.
- (12) Boyman, O.; Sprent, J. The Role of Interleukin-2 during Homeostasis and Activation of the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12* (3), 180–190.
- (13) Arenas-Ramirez, N.; Woytschak, J.; Boyman, O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends in Immunology* **2015**, *36* (12), 763–777.
- (14) Dudek, A. Z.; Antony, G. K. Interleukin 2 in Cancer Therapy, Current Medicinal Chemistry **2010**, *17*: 3297.
- (15) Hatakeyama, M.; Kono, T.; Kobayashi, N.; Kawahara, A.; Levin, S. D.; Perlmutter, R. M.; Taniguchi, T. Interaction of the IL-2 Receptor with the Src-Family Kinase P56lck: Identification of Novel Intermolecular Association. *Science* **1991**, *252* (5012), 1523–1528.
- (16) Russell, S. M.; Johnston, J. A.; Noguchi, M.; Kawamura, M.; Bacon, C. M.; Friedmann, M.; Berg, M.; McVicar, D. W.; Witthuhn, B. A.; Silvennoinen, O. Interaction of IL-2R Beta and Gamma c Chains with Jak1 and Jak3: Implications for XSCID and XCID. *Science* **1994**, *266* (5187), 1042–1045.

- (17) Loh, C.-Y.; Arya, A.; Naema, A. F.; Wong, W. F.; Sethi, G.; Looi, C. Y. Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication. *Front. Oncol.* **2019**, *9*.
- (18) Votavova, P.; Tomala, J.; Kovar, M. Increasing the Biological Activity of IL-2 and IL-15 through Complexing with Anti-IL-2 MAbs and IL-15R α -Fc Chimera. *Immunol. Lett.* **2014**, *159* (1), 1–10.
- (19) Boyman, O. Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes. *Science* **2006**, *311* (5769), 1924–1927.
- (20) Tomala, J.; Kovarova, J.; Kabesova, M.; Votavova, P.; Chmelova, H.; Dvorakova, B.; Rihova, B.; Kovar, M. Chimera of IL-2 Linked to Light Chain of Anti-IL-2 MAb Mimics IL-2/Anti-IL-2 MAb Complexes Both Structurally and Functionally. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (5), 871–876.
- (21) Webster, K. E.; Walters, S.; Kohler, R. E.; Mrkvan, T.; Boyman, O.; Surh, C. D.; Grey, S. T.; Sprent, J. In Vivo Expansion of T Reg Cells with IL-2–MAb Complexes: Induction of Resistance to EAE and Long-Term Acceptance of Islet Allografts without Immunosuppression. *J. Exp. Med.* **2009**, *206* (4), 751–760.
- (22) National Cancer Institute. Immunotherapy for Cancer <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy> (4. 9. 2019).
- (23) Haanen, J. B. A. G.; Robert, C. Immune Checkpoint Inhibitors. *Immuno-Oncol.* **2015**, *42*, 55–66.
- (24) Bonini, C.; Mondino, A. Adoptive T-Cell Therapy for Cancer: The Era of Engineered T Cells. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45* (9), 2457–2469.
- (25) Hanack, K.; Messerschmidt, K.; Listek, M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. In *Protein Targeting Compounds*; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer, Cham, 2016, 11–22.
- (26) Understanding Immunotherapy. <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/immunotherapy-and-vaccines/understanding-immunotherapy> (4. 9. 2019).
- (27) Cancer Center. Immunotherapy for Cancer. What is it & How This Treatment Works. <https://www.cancercenter.com/treatment-options/precision-medicine/immunotherapy> (4. 9. 2019).
- (28) Dhupkar, P.; Gordon, N. Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy. In *Immunotherapy*; Naing, A., Hajjar, J., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer, Cham, 2017, 33–51.
- (29) Choudhry, H.; Helmi, N.; Abdulaal, W. H.; Zeyadi, M.; Zamzami, M. A.; Wu, W.; Mahmoud, M. M.; Warsi, M. K.; Rasool, M.; Jamal, M. S. Prospects of IL-2 in Cancer Immunotherapy. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*.
- (30) Jiang, T.; Zhou, C.; Ren, S. Role of IL-2 in Cancer Immunotherapy. *Oncoimmunology* **2016**, *5* (6), e1163462.

- (31) Lotze, M. T.; Matory, Y. L.; Rayner, A. A.; Ettinghausen, S. E.; Vetto, J. T.; Seipp, C. A.; Rosenberg, S. A. Clinical Effects and Toxicity of Interleukin-2 in Patients with Cancer. *Cancer* **1986**, *58* (12), 2764–2772.
- (32) Kamimura, D.; Sawa, Y.; Sato, M.; Agung, E.; Hirano, T.; Murakami, M. IL-2 In Vivo Activities and Antitumor Efficacy Enhanced by an Anti-IL-2 MAb. *J. Immunol.* **2006**, *177* (1), 306–314.
- (33) Tomala, J.; Chmelova, H.; Mrkvan, T.; Rihova, B.; Kovar, M. In Vivo Expansion of Activated Naive CD8(+) T Cells and NK Cells Driven by Complexes of IL-2 and Anti-IL-2 Monoclonal Antibody As Novel Approach of Cancer Immunotherapy. *J. Immunol.* **2009**, *183* (8), 4904–4912.
- (34) Buss, N.; Henderson, S. J.; McFarlane, M.; Shenton, J. M.; Haan, L. Monoclonal Antibody Therapeutics: History and Future. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12* (5), 615–622.
- (35) Wootla, B.; Denic, A.; Rodriguez, M. Polyclonal and Monoclonal Antibodies in Clinic. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2014**, *1060*, 79–110.
- (36) Papageorgiou, L.; Cuong, N. T.; Vlachakis, D. Antibodies as Stratagems against Cancer. *Mol. Biosyst.* **2016**, *12* (7), 2047–2055.
- (37) Reichert, J. M. Antibodies to Watch in 2016. *mAbs* **2016**, *8* (2), 197–204.
- (38) WikiSkripta. Využití monoklonálních protilátek v medicíně. https://www.wikiskripta.eu/w/Vyu%C5%BEit%C3%AD_monoklon%C3%A1ln%C3%ADch_protil%C3%A1tek_v_medic%C3%ADn%C4%9B (20. 9. 2019).
- (39) Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495–497.
- (40) Malíčková, K. Terapeutické monoklonální protilátky v klinické laboratoři. *Klin. Biochem. Metab.*, **2017**, *25* (46), 101–107.
- (41) HEK293 Cell Line Origins, Cytogenetics, and Expression. <https://www.hek293.com/> (27. 11. 2019).
- (42) Chaudhary, S.; Pak, J. E.; Gruswitz, F.; Sharma, V.; Stroud, R. M. Overexpressing Human Membrane Proteins in Stably Transfected and Clonal Human Embryonic Kidney 293S Cells. *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (3), 453–466.
- (43) Dyson, M. R. Fundamentals of Expression in Mammalian Cells. In *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*; Vega, M. C., Ed., **2016**; Sb. 896, 217–224.
- (44) Sasso, E.; Latino, D.; Froehlich, G.; Succio, M.; Passariello, M.; De Lorenzo, C.; Nicosia, A.; Zambrano, N. A Long Non-Coding SINEUP RNA Boosts Semi-Stable Production of Fully Human Monoclonal Antibodies in HEK293E Cells. *mAbs* **2018**, *10* (5), 730–737.
- (45) Arena, T. A.; Harms, P. D.; Wong, A. W. High Throughput Transfection of HEK293 Cells for Transient Protein Production. In *Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells*; Hacker, D. L., Ed., **2018**; Sb. 1850, 179–187.

- (46) Thomas, P.; Smart, T.G. HEK293 cell line: A vehicle for expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; Sb. 51(3), **2005**, Pages 187-200.
- (47) Thermofisher scientific. Choosing a Transfection Strategy. <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/choosing-transfection-strategy.html> (27. 11. 2019).
- (48) Keith, J. H.; Schaeper, C. A.; Fraser, T. S.; Fraser, M. J. Mutational Analysis of Highly Conserved Aspartate Residues Essential to the Catalytic Core of the PiggyBac Transposase. *BMC Mol. Biol.* **2008**, *9*, 73.
- (49) Li, Z.; Michael, I. P.; Zhou, D.; Nagy, A.; Rini, J. M. Simple PiggyBac Transposon-Based Mammalian Cell Expression System for Inducible Protein Production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (13), 5004–5009.
- (50) Slavata, L.; Příprava plazmidů pro expresi interleukin 2-fúzní monoklonální protilátky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, **2013**.
- (51) Mahl, D.; Diendorf, J.; Meyer-Zaika, W.; Epple, M. Possibilities and Limitations of Different Analytical Methods for the Size Determination of a Bimodal Dispersion of Metallic Nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *377* (1), 386–392.