

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Tomáš Otépka

**PŘÍPRAVA RŮSTOVÉHO FAKTORU TGF- β 3
S COILED-COIL KOTVOU**

Preparation of growth factor TGF- β 3 with coiled-coil tag

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.

Praha 2023

Prohlášení

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. prosince 2023,

podpis

Poděkování

Děkuji RNDr. Ondřejovi Vaňkovi, Ph.D. za průběžné vedení práce a odborné rady v průběhu experimentální fáze výzkumu i během samotného sepsování závěrečné práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Ondřejovi Skořepovi, Ph.D. za jeho konzultace nad průběhem výzkumu, především si vážím jeho vstřícné spolupráce, návodných doporučení a ochoty pomoci. Děkuji také celému týmu doktora Vaňka za ochotné jednání a přátelské prostředí, které v laboratoři celou dobu panovalo. Rozhodně také patří obrovské poděkování mé rodině, která mě podporovala v průběhu celého studia.

Abstrakt

Růstové faktory představují skupinu významných látek metabolismu organismů. Jedná se o signální molekuly, které kontrolují aktivitu buňky na endokrinní, parakrinní nebo autokrinní úrovni. Jsou klíčovým prostředníkem vázajícím se na receptory buňky, čímž spouští kaskádu reakcí vedoucí k regulaci genetické transkripce v jádře buňky a stimulaci buněčné odpovědi. Růstové faktory ovlivňují řadu fyziologických funkcí jako buněčnou proliferaci, diferenciaci a hojení tkání.

Využití růstových faktorů se nabízí například v regenerativní medicíně. Za obdobným účelem byla zahájena výzkumná práce na přípravu růstového faktoru TGF- β 3 s možným připojením na polymerní nosič pomocí coiled-coil kotvy. Tato práce se zabývá rekombinantní produkcí TGF- β 3, resp. jeho obdoby spojené s peptidem asociovaným s latencí (LAP) a aplikací některé z technik, která by byla využitelná pro záměr této práce, tedy k připojení proteinu k polymernímu nosiči na bázi aminokyselin.

Vzhledem ke strukturní komplexitě, se kterou se růstové faktory fyziologicky z buněk uvolňují, příprava růstových faktorů s coiled-coil kotvou *in vitro* představuje na poli rekombinantní exprese proteinů neprobádanou výzvu. V našem expresním systému buněčné linie HEK293T bylo možné připravit latentní formu LAP-TGF- β 3, pro niž byla ověřena biologická aktivita na krysích mesenchymálních kmenových buňkách. Bylo navrhnuo a úspěšně zaklonováno několik konstruktů růstového faktoru s coiled-coil kotvou, jež by měly teoreticky umožnit jeho řízené uvolňování z polymerního nosiče do kultivačního média. V rámci experimentální práce byl taktéž objeven potenciál sortasy A jako alternativní metody k přípravě kýženého proteinu.

Klíčová slova: rekombinantní exprese, TGF- β 3, růstový faktor, HEK293, coiled-coil kotva

Abstract

Growth factors represent a group of significant substances in the metabolism of organisms. They are signaling molecules that control cell activity at the endocrine, paracrine, or autocrine levels. They act as key mediators binding to cell receptors, triggering a cascade of reactions leading to the regulation of genetic transcription in the cell nucleus and stimulation of cellular response. Growth factors influence various physiological functions such as cell proliferation, cell differentiation, and tissue healing.

The utilization of growth factors is evident, for example, in regenerative medicine. For a similar purpose, research has been initiated to prepare the growth factor TGF- β 3 with the possibility of attaching it to a polymeric carrier using a coiled-coil tag. This work focuses on the recombinant production of TGF- β 3 – its analog with a latency-associated peptide (LAP) – and the application of techniques applicable to the intention of this work, specifically, attaching the protein to a polymeric carrier based on amino acids.

Given the structural complexity with which growth factors are physiologically released from cells, the preparation of growth factors with a coiled-coil tag *in vitro* represents an unexplored challenge in the field of recombinant protein expression. In our HEK293T cell line expression system, it was possible to prepare the latent form of LAP-TGF- β 3, whose biological activity was verified on rat mesenchymal stem cells. Several constructs of the growth factor with a coiled-coil tag theoretically enabling its controlled release from the polymeric carrier into the culture medium were designed and successfully cloned. As part of the experimental work, the potential of sortase A was also discovered as an alternative method for preparing the desired protein.

Keywords: recombinant expression, TGF- β 3, growth factor, HEK293, coiled-coil tag

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	7
1. Teoretická část.....	10
1.1 Role imunitního systému v regeneraci tkání.....	10
1.1.1 Proces regenerace tkáně po jejím poškození.....	11
1.2 Růstové faktory.....	15
1.2.1 TGF- β rodina.....	18
1.2.2 TGF- β 3.....	22
1.3 Aplikace růstových faktorů v regenerativní medicíně.....	24
1.3.1 Coiled-coil struktura.....	28
1.3.2 Sortasa A.....	29
2. Cíl práce.....	32
3. Experimentální část	33
3.1 Použitý materiál	33
3.1.1 Buněčné kmeny a linie	33
3.1.2 Vektory.....	33
3.1.3 Enzymy	33
3.1.4 Chemikálie	33
3.1.5 Kultivační média	34
3.1.6 PCR primery a jiné oligonukleotidy	35
3.1.7 Roztoky a pufrы.....	35
3.1.8 Použité přístroje a pomůcky.....	36
3.2 Použité metody	38
3.2.1 Enzymové štěpení plazmidu	38
3.2.2 Klonování metodou Quick Fusion	38
3.2.3 Transformace bakterií plazmidovou DNA.....	38
3.2.4 Polymerasová řetězová reakce	39
3.2.5 Polymerasová řetězová reakce z kolonií	39
3.2.6 Agarosová elektroforéza	40
3.2.7 Extrakce DNA z agarosového gelu.....	40
3.2.8 Sekvenování plazmidové DNA.....	41
3.2.9 Nízkoobjemová příprava zásobního množství plazmidové DNA.....	41
3.2.10 Velkoobjemová příprava plazmidové DNA pro transfekci	42
3.2.11 Měření koncentrace plazmidové DNA.....	43
3.2.12 Příprava buněčné kultury HEK293T před transfekcí.....	43
3.2.13 Tranzientní produkce proteinů	44

3.2.14	Produkce sortasy A7+ v bakteriích	44
3.2.15	Purifikace proteinů z média chelatační afinitní chromatografií	45
3.2.17	Purifikace za použití magnetických kuliček	45
3.2.18	Koncentrování proteinů.....	46
3.2.19	Stanovení koncentrace proteinů	46
3.2.20	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	46
3.2.21	Elektropřenos proteinů na membránu	47
3.2.22	Imunodetekce proteinů.....	47
4.	Výsledky.....	49
4.1	Příprava expresního vektoru obsahující gen pro produkci TGF-β3	49
4.2	Produkce růstového faktoru TGF-β3 v expresním systému HEK293T.....	51
4.3	Příprava expresního vektoru obsahující gen pro produkci LAP-TGF-β3.....	54
4.4	Produkce LAP-TGF-β3 v expresním systému HEK293T	55
4.5	Vliv krysích mesenchymálních kmenových buněk na strukturu LAP-TGF-β3 ..	58
4.6	Příprava expresních vektorů pro produkci LAP-TGF-β3 s coiled-coil kotvou a jejich produkce v linii HEK293T.....	60
4.7	Produkce sortasy A7+.....	63
5.	Diskuze	66
6.	Závěr.....	68
	Seznam použité literatury	69

Seznam zkratek a symbolů

(w/w)	hmotnost/hmotnost (z angl. weight/weight)
AA	akrylamid
APC	buňka prezentující antigen (z angl. antigen presenting cell)
APS	peroxidisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
bp	páry bází (z angl. base pair)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
CCR2	C-C chemokinový receptor typu 2 (z angl. C-C chemokine receptor type 2)
CMV	cytomegalovirus
CTGF	růstový faktor pojivové tkáně (z angl. connective tissue growth factor)
CX3CR1	chemokinový receptor CX3C motivu 1 (z angl. C-X3-C motif chemokine receptor 1)
Da	Dalton
DAMP	molekulární motivy spojené s poškozením (z angl. damage-associated molecular patterns)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMEM	kultivační médium (z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
dNTPs	směs deoxyribonukleotidtrifosfátů
EGF	epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor)
FGF	růstový faktor fibroblastů (z angl. fibroblast growth factor)
FGFR	receptor růstového faktoru FGF (z angl. fibroblast growth factor receptor)
FPLC	rychlá proteinová kapalinová chromatografie (z angl. fast protein liquid chromatography)
HEK293T	linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293T (z angl. human embryonic kidney 293T)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IFN	interferon

IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
IL-1RI	receptor interleukinu 1 typu I
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
kbp	kilobáze (z angl. kilobase pair)
LAP	peptid asociovaný s latencí (z angl. latency-associated peptide)
LB	kultivační médium (z angl. lysogeny broth)
LLC	velký latentní komplex (z angl. large latent complex)
IPEI	lineární polyethylenimin
LTBP	latentní TGF- β vázající protein (z angl. latent TGF- β -binding protein)
Ly6C ^{hi}	lymfocyt s vysokou expresí Ly6C
Ly6C ^{low}	lymfocyt s nízkou expresí Ly6C
MMP	matrix metaloproteinasa (z angl. matrix metalloproteinase)
NBT	roztok modrého barviva (z angl. nitroblue tetrazolium chloride)
NGF	nervový růstový faktor (z angl. nerve growth factor)
NK	přirozený zabíječ (z angl. natural killer)
NTA	nitrilotrioctová kyselina (z angl. nitrilotriacetic acid)
OD ₆₀₀	optická hustota při vlnové délce 600 nm (z angl. optical density)
PAMP	molekulární motivy spojené s patogeny (z angl. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (z angl. phosphate-buffered saline)
PBS-TK	fosfátem pufovaný fyziologický roztok pro tkáňové kultury
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PEG	polyethylenglykol
PDGF	růstový faktor uvolněný z krevních destiček (z angl. platelet-derived growth factor)
RNAsa A	ribonukleasa A
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulphate)
SMAD	transkripční faktor sloužící k přenosu signálů a regulaci transkripce (z angl. small mothers against decapentaplegic)

SMURF	regulační faktor ubikvitinylace (z angl. SMAD ubiquitination regulatory factor)
SOB	kultivační médium (z angl. super optimal broth)
SOX9	transkripční faktor s rolí diference buněk (z angl. SRY (Sex-determining Region Y)-box 9)
T-bet	transkripční faktor regulující imunitní odpověď (z angl. T-box expressed in T cells)
T _{reg}	regulační T lymfocyt
TAE	pufr obsahující Tris (T), kyselinu octovou (A, z angl. acetic acid) a kyselinu ethylendiamintetraoctovou (E)
TB	kultivační médium (z angl. terrific broth)
TBS	fyzilogický roztok pufrovaný Tris (z angl. Tris-buffered saline)
TCR	T-buněčný receptor (z angl. T-cell receptor)
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGF	transformující růstový faktor (z angl. transforming growth factor)
TGFBR	beta receptor růstového faktoru TGF (z angl. transforming growth factor beta receptor)
Th	pomocný T-lymfocyt (z angl. helper T-cell)
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteinasy (z angl. tissue inhibitor of metalloproteinase)
TLR	receptor podobný receptoru Toll (z angl. toll-like receptor)
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α (z angl. tumor necrosis factor α)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)
VEGF-A	vaskulární endotelový růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor A)
Vis	viditelné záření (z angl. visible)

1. Teoretická část

1.1 Role imunitního systému v regeneraci tkání

Imunitní systém představuje jeden ze základních pilířů, který organismu zajišťuje stálost vnitřního prostředí [1]. Imunitní systém je klasicky rozdělován do dvou kategorií: vrozená a adaptivní imunita. Evolučně starší vrozená imunita zahrnuje buněčné mechanismy jako jsou fagocytující a NK buňky (z angl. natural killer cells), dále pak složky humorálního systému (komplementový systém, lektiny, interferony). Adaptivní imunita je založena na vysoce specifických molekulách (protilátky, antigenně specifické receptory T lymfocytů) a je úzce navázána na imunitu vrozenou, jejíž aktivita imunitu adaptivní iniciuje [2].

Cizorodé struktury nacházejících se na povrchu patogenů rozpoznávané buňkami vrozené imunity jsou obvykle označovány v literatuře jako PAMP (angl. pathogen-associated molecular patterns) [1]. Jako DAMP (angl. damage-associated molecular patterns) jsou označovány molekuly uvolňující se z poškozených buněk rozpoznávané imunitními mechanismy. Většinou se jedná o molekuly zajišťující základní fyziologické funkce a které se za normálních podmínek vyskytují intracelulárně (ATP, histony, kyselina močová aj.). Mikrobiální a nepatogenní struktury jsou obvykle rozpoznávány různými receptory na leukocytech. Jak PAMP, tak i mnohé DAMP jsou rozpoznávány receptory skupiny TLR (angl. toll-like receptors), jejichž hlavní funkcí je indukce exprese řady membránových receptorů na povrchu buněk prezentujících antigen (APC, z angl. antigen-presenting cell) a prozánětlivých cytokinů, které interagují s antigenně specifickými složkami imunitního systému.

Imunitní systém hraje významnou roli v případě hojení tkání a regenerace [2]. Imunitní odpověď na poškození tkáně je rozhodující pro dobu trvání a výsledek procesu hojení, tedy kvalitu opravné odpovědi zahrnující rozsah jizev, obnovu struktury orgánů a jejich funkce. Existuje rozšířený názor vycházející z dosavadních objevů u řady druhů organismů, že ztráta kvality regenerativní schopnosti je spojena s evolučním vývojem imunitní obranyschopnosti [2]. Vztah mezi regenerací tkání a imunitní odpovědí je komplexní; imunitní systém může zastávat jak pozitivní, tak negativní roli v závislosti na typu tkáně, orgánu či období vývojového stádia organismu. Také druh imunitní odpovědi, její trvání a imunitní buňky v imunitní odpovědi zahrnuté mohou výrazně změnit výsledek procesu hojení, a tak mohou způsobit nekompletní opravu tkáně (jizvení, fibróza), či její celkovou obnovu (regenerace) [2].

Při poškození tkáně je nejprve důležité ránu zacelit koagulačním systémem spuštěním kaskády po sobě aktivujících se proteas [1]. Trombin jako poslední článek této kaskády štěpí rozpustný krevní protein fibrinogen, který vytváří zesíťovaný fibrin, jenž ránu zaceluje a krvácení zastavuje. Na fibrinová vlákna se vážou imunokomplexy, na kterých se aktivuje komplement a které stimulují fagocyty. Tento proces významně přispívá ke vzniku zánětlivé reakce, která organismus chrání před infikováním poškozeného místa. První fáze imunitní odpovědi na poškození tkáně zahrnuje složky nespecifické imunity, které poskytují okamžitou obranu proti potenciálním patogenům v místě poškozené tkáně [2]. I v případě nepřítomnosti patogenů je poškozenou tkání spuštěn signálními molekulami vznik zánětu. Jsou to především makrofágy, které uvádí poškozenou tkáň do původního stavu likvidací buněčných pozůstatků, přestavbou extracelulární matrix a syntézou řady cytokinů a růstových faktorů [3]. Důležitou roli v regeneraci hraje také specifická imunita prostřednictvím T buněk.

1.1.1 Proces regenerace tkáně po jejím poškození

Lokální zánětlivá reakce jako důsledek poranění tkáně je spuštěna v odpovědi na molekuly DAMP, případně na PAMP [2]. Endogenní spouštěcí signály jsou uvolňovány nekrotickými buňkami nebo poškozenou extracelulární matrix. TLR a jiné typy receptorů rozpoznávají struktury signalizující poškození buněk a zahajují zánětlivou reakci. Receptory TLR aktivují tkáňové rezidenční makrofágy a zahájí expresi atraktantů pro neutrofilů, monocytů a makrofágů. Také indukují expresi prozánětlivých cytokinů jako jsou faktory nádorové nekrózy (TNF- α), IL-1 β (interleukin-1 β) a IL-6 (interleukin 6) [4]. Jaké signály molekul DAMP převažují, záleží především na okolnostech vzniklého poranění, jako jsou místo a typ orgánu, u kterého k poškození došlo, na rozsahu poškození, způsobu zániku buněk a čase od vzniku poranění [5]. Proces hojení může být receptory TLR a IL-1RI (receptor pro interleukin-1 typu I) negativně ovlivněn. Například signalizace receptorů IL-1RI významně omezuje hojení tkáně myokardu po infarktu; narušení dráhy IL-1, která by vedla k aktivaci receptorů IL-1RI, může naopak navýšit kvalitu regenerace poškozené tkáně [6]. Podobně nežádoucí účinky mají receptory TLR a IL-1RI na rekonstrukci kostní tkáně. Ačkoliv mohou být receptory skupiny TLR a IL-1RI pro řadu tkání potenciálně nežádoucí, v jiných tkáních může být jejich role nezastupitelná [7]. Například TLR4 receptor napomáhá hojení porušené tkáně stimulací exprese transformujícího růstového faktoru β .

První buňky, které se dostávají k místu poranění a iniciují zánětlivou reakci,

bývají neutrofilů [2]. Neutrofilů primárně zvyšují imunitní obranu organismu a také se podílejí na odstranění zbytkových částí poškozených buněk [8]. Neutrofilů se shromáždí při změnách proběhlých na povrchu endotelu vyvolaných histaminem, cytokiny a chemokiny uvolněnými po rozpoznání molekul DAMP a aktivaci TLR receptorů v okolí poškozené tkáně. Volné neutrofilů jsou transportovány z krevního řečiště do místa zánětu za současného zvýšení permeability krevních cév v místě poškozené tkáně. Neutrofilů produkují antimikrobiální látky a proteasy, které napomáhají usmrcovat a rozkládat potenciální patogeny. Také sekretují cytokiny a faktory, jako je IL-17 (interleukin-17) a cévní endoteliální růstový faktor VEGF-A (angl. vascular endothelial growth factor A), které shromažďují a aktivují ještě více neutrofilů a další prozánětlivé buňky, podporují tvorbu nových cévních svazků, stimulují proliferaci buněk jako jsou fibroblasty, epiteliální buňky a keratinocyty. Neutrofilů působí také protizánětlivě usnadněním imobilizace monocytů a makrofágů, kteří fagocytují zanikající neutrofilů a jiná buněčná residua. Tak neutrofilů zajišťují svůj vlastní zánik a napomáhají výsledku zánětlivé reakce. Například u infarktu myokardu neutrofilů napomáhají kontrolovat polarizaci makrofágů, což je kritický krok pro řádnou regeneraci tkáně [9].

Makrofágy kromě své schopnosti fagocytovat buněčné pozůstatky, mikroorganismy, neutrofilů a jiné apoptotické buňky, aktivně regulují proces hojení tkáně [2,10]. Rezidenční makrofágy se nacházejí v organismu ve většině tkání, ve větších koncentracích jsou makrofágy nashromážděny v okolí místa poranění. Imobilizované i rezidenční makrofágy jsou vystaveny proliferaci a fenotypovým, funkčním změnám. Makrofágové jsou zdrojem řady proteas, cytokinů, růstových faktorů, rozpustných mediátorů podporujících hojení, regeneraci, nebo fibrózu tkáně. Makrofágy vznikají diferenciací z volných monocytů, které se dostanou na místo poškozené tkáně jeden až tři dny po neutrofilech [11]. Nejvíce jsou makrofágy akumulovány čtvrtý až sedmý den od vzniku zranění, ačkoliv zvýšené hodnoty lze zaznamenat v některých případech i jedenáctý den. Prozánětlivé makrofágy mohou být polarizovány alternativní aktivací na protizánětlivé makrofágy. Dva zásadní receptory, které se podílí na vychytávání monocytů z krve, kostní dřeně a sleziny jsou CCR2 receptor (angl. C-C chemokine receptor type 2) a CX3CR1 (angl. C-X3-C motif chemokine receptor 1) receptor. Jejich názvy jsou odvozené od chemokinů, které jsou produkovány fibroblasty, epiteliálními a endoteliálními buňkami v okolí poškozené tkáně jako odpověď na přítomnost molekul DAMP. U člověka se lze setkat se dvěma populacemi monocytů, které se shromažďují v místě probíhajícího zánětu, a to populací Ly6C^{hi} (lymfocyt s vysokou expresí Ly6C) a

Ly6C^{low} (lymfocyt s nízkou expresí Ly6C) [12]. V závislosti na druhu tkáně jsou rekrutovány jedna nebo obě populace. Například u modelů poškozené kosterní svaloviny bylo zaznamenáno nashromáždění pouze populace se zánětlivou funkcí Ly6C^{hi}, která se později diferenciovala do populace s funkcí regenerační Ly6C^{low}. Naopak u infarktu myokardu je možné sledovat vychytání obou populace monocytů v různých stádiích zánětlivé reakce aktivací CCR2 a CX3CR1 receptorů [13]. Populace Ly6C^{hi} v srdeční tkáni vyvolá prozánětlivé procesy, zatímco populace Ly6C^{low} vychytávána v pozdějších stádiích stimuluje rekonstrukci poškozené tkáně expresí velkého množství VEGF-A a podporuje ukládání kolagenu. Prozánětlivé a protizánětlivé makrofágy jsou běžně v literatuře na základě *in vitro* charakterizace popisovány podle cytokinů, kterým jsou vystaveny. M(IL-4) makrofágy jsou považovány za složky imunitního systému zodpovědné za rekonstrukci tkáně, jelikož produkují řadu faktorů jako arginasy, složky extracelulární matrix a růstové faktory jako jsou VEGF-A, růstový faktor z krevních destiček PDGF (angl. platelet-derived growth factor) a insulinu podobný růstový faktor IGF (angl. insulin-like growth factor).

Lipoxiny, resolviny a protektiny stimulují ukončení zánětlivé reakce [1]. Tyto lipidové mediátory vznikají přesměrováním dráhy původně vedoucí k syntéze prozánětlivých prostaglandinů a leukotrienů. Tyto látky zajišťují inhibici syntézy prozánětlivých cytokinů makrofágy a zamezují přenosu nových neutrofilů do místa zánětu. Fagocytóza neutrofilů makrofágy spustí u makrofágů sekreci protizánětlivých cytokinů, například TGF-β1, který významně přispívá k obnově poškozené tkáně stimulováním diferenciací fibroblastů na myofibroblasty, které umožňují zacelení rány a syntézu složek extracelulární matrix [3]. Produkované proteasy přispívají ke štěpení a inaktivaci prozánětlivých cytokinů a chemokinů.

Zatímco prozánětlivé makrofágy mohou výrazně zkomplikovat probíhající regeneraci tkáně, u déle přetrvávající aktivace nebo mobilizace M(IL-4) makrofágů se předpokládá, že přispívá k rozvoji patologické fibrózy [2]. Fibróza tkáně způsobená působením M(IL-4) makrofágů byla přisouzena na základě produkce a aktivace TGF-β1 v experimentálním modelu plicní fibrózy [14]. TGF-β1, je-li nadměrně sekretován, podílí se na vzniku chronického zánětu až rozvoji fibrotické tkáně [1]. Dále byl u M(IL-4) makrofágů pozorován pozitivní vliv na udržení a aktivaci myofibroblastů, jež představují klíčové komponenty pro tvorbu extracelulární matrix ve všech orgánech [15]. M(IL-4) makrofágy také produkují značné množství matrix metaloproteinás (MMP), které usnadňují přenos buněk zapojujících se do zánětlivé reakce v místě poranění [3].

Protizánětlivě z imunoregulačních cytokinů působí interleukin-10 (IL-10) [2]. Tento zásadní protizánětlivý mediátor je produkován pomocnými T lymfocyty typu 2 (Th2), regulačními T lymfocyty (T_{reg}) a makrofágy. Na povrchu každého T lymfocytu se nachází desítky tisíc identických klonálně jedinečných receptorů TCR (z angl. T-cell receptor) [1]. T lymfocyty můžeme rozdělit podle typu přítomných receptorů na $\alpha\beta$ -T lymfocyty, které jsou u savců většinovým typem, a na méně zastoupené a méně prozkoumané $\gamma\delta$ -T lymfocyty. Zatímco frakce $\alpha\beta$ -T lymfocytů může mít jak prozánětlivé, tak i protizánětlivé subpopulace, u $\gamma\delta$ -T lymfocytů byly zjištěny pouze protizánětlivé účinky. T lymfocyty uvolňují širokou škálu cytokinů a růstových faktorů, které působí na regeneraci tkáně kladně, ale i inhibičně. Například u kostní tkáně bylo dokázáno, že prozánětlivé pomocné T lymfocyty typu 1 a cytotoxické T lymfocyty inhibují regeneraci [16]. Na experimentech s myši bylo také dokázáno, že T lymfocyty inhibují formaci kostní tkáně z mesenchymálních kmenových buněk produkcí faktorů IFN- γ (interferon- γ) a TNF- α . Podobný výzkum zaměřený na lidský systém prokázal, že sekrece těchto faktorů efektorovými paměťovými cytotoxickými T lymfocyty může vést k opožděné osteogenezi a může vést k horšímu zacelení fraktury. Naopak přítomnost T_{reg} lymfocytů vyvolává produkci arginasy a protizánětlivých cytokinů jako jsou IL-10 a TGF- β . Tvorba protizánětlivého prostředí ve tkáni vede k polarizaci makrofágů ve směru k protizánětlivému typu. Množství T_{reg} lymfocytů zůstává v místě poškozené tkáně vysoké dlouho po působení ostatních T lymfocytů. Taktéž $\gamma\delta$ -T lymfocyty významně přispívají k obnově tkáně. Nepřítomnost tohoto typu T lymfocytů u lidského organismu způsobuje například výrazně pomalejší hojení kožních poranění.

Rekonstrukce samotné tkáně spočívá v proliferaci buněk formujících granulační tkáň a iniciaci angiogeneze [17]. Granulační tkáň se skládá z fibroblastů, novovaskulárních cév, makrofágů, hyaluronové kyseliny a fibronektinu, které postupně vyplňují oblast narušené tkáně. Růstové faktory PDGF a TGF- β 3 uvolněné buňkami zánětlivé reakce chemotakticky přitahují fibroblasty do místa zranění. Aktivace a proliferace fibroblastů, které později produkují extracelulární matrix, je zajištěna kontinuální sekrecí fibroblastového růstového faktoru FGF (angl. fibroblast growth factor) makrofágy. Po fázi proliferace fibroblast uvolní kolagen a glykosaminoglykany, které spoluvytvářejí amorfní gel, ve kterém jsou uložena a shlukována kolagenní vlákna. Fibroblasty jsou jedním ze zdrojů matrixové metaloproteinasy, která může odstranit nežádoucí kolagenní vlákna pro zvýšení strukturální integrity formující se tkáně. Vzájemná rovnováha mezi aktivitou MMP a jejího inhibitoru TIMP (angl. tissue inhibitor

of metalloproteinase) je významná pro výslednou kvalitu obnovené tkáně. Společně s proliferací fibroblastů provází regeneraci tkáně také angiogeneze, tedy vytváření nových cévních svazků. Fibronektin, adhezivní glykoprotein, působí v organismu jako biologické lepidlo, které zprostředkovává interakce mezi buňkami a jinými proteiny extracelulární matrix, nebo tvoří kontaktní most mezi sousedními buňkami [18]. Extracelulární matrix obklopují hydrofilní glykosaminoglykany a proteoglykany, které jsou schopny absorbovat tisícinásobek vody oproti svému objemu za vytvoření gelovitého prostředí, které zajišťuje metabolické potřeby extracelulární matrix. Proteoglykany a kyselina hyaluronová nebo hyaluronan mají vysokou viskozitu, která vede k zvýšenému vyloučení metabolitů, změnám v tkáňové osmóze a regulaci průtokového odporu. Vysoké koncentrace hyaluronanu byly nalezeny ve fetální extracelulární matrix a jeho nadbytek oproti kolagenu vede u plodu k hojení bez jizev [19].

V závěrečné fázi hojení nejdříve tři týdny od poškození tkáně fibroblasty začnou ustupovat a je formována granulační tkáň, jejíž hlavní složkou je kolagen III [17]. Kolagenní vlákna na regenerované tkáni jsou neorganizovaná a uskupena náhodně. V dalších fázích pak dochází k nahrazení kolagenu III kolagenem typu I a kolagenní vlákna jsou přeskupena do více organizované mřížkové struktury, která propůjčuje tkáni vyšší mechanickou odolnost. Přesto je nově utvořená zjizvená tkáň na asi 75 % roztažitelné síly oproti tkáni netknuté [18].

1.2 Růstové faktory

Růstové faktory jsou molekuly mnohdy řazené mezi cytokiny, které se podílejí podobně jako hormony na regulaci buněčné aktivity [20]. Na rozdíl od hormonů, jejichž sféra vlivu je širší, je tato regulace na úrovni mezi nejbližšími buňkami, tedy na parakrinní a autokrinní hladině. Objevení růstových faktorů se datuje do roku 1952, kdy byl poprvé identifikován nervový růstový faktor NGF (angl. nerve growth factor) [21]. Ačkoliv jejich charakteristika nikterak nevybočuje od jiných interleukinů, byl ponechán jejich tradiční název [1]. Růstové faktory jsou peptidy, které přenášejí signál mezi buňkami a mají různé účinky na okolní prostředí v závislosti na charakteru probíhajících fyziologických dějů. Obecně se však dá jejich aktivita charakterizovat proliferačními, diferenciačními, stimulačními nebo migračně působícími vlastnostmi [1].

Jedním z prvních objevených mechanismů, jakým růstové faktory působí na buněčnou mitózu, byla stimulace sekundárních intracelulárních posílek jako je fosfodiesterasa, která může zvýšit koncentraci vápenatých iontů a pH v buňkách a vést

k indukci proteosyntézy z DNA [20, 22]. Typickým zástupcem růstových faktorů stimulujících mitózu jsou PDGF a EGF (angl. epidermal growth factor). Jiné růstové faktory stimulují buněčnou diferenciaci a mitózu inhibují. Příkladem mohou být některé faktory z rodiny TGF- β , které jsou schopny inhibovat aktivitu tyrosin kinas. Stimulací diferenciaci hrají některé ze skupiny růstových faktorů TGF- β zásadní roli při regulaci syntézy extracelulární matrix a jejích složek: kolagenu, fibronektinu, elastinu a glykosaminoglykanu [23].

Růstové faktory se kromě obnovy tkáně podílí na embryologickém rozvoji plodu, nebo rozrůstání rakovinných buněk [24]. Onkogeny, tedy geny virálního nebo buněčného původu, jejichž exprese vede k rozvoji malignity, mohou způsobit buněčnou transformaci pomocí proteinů vlastnostmi podobné růstovým faktorům, jejich receptorům, protein kinasám a dalším signalizačním molekulám. Tato skutečnost vzbudila rozpaky ohledně bezpečnosti využití růstových faktorů jako terapeutických látek [24].

V průběhu regenerace tkáně se do extracelulárního prostředí uvolňuje nadměrné množství MMP, které kromě podílu na rekonstrukci tkání rozkládají růstové faktory a jejich receptory [18]. MMP také hrají klíčovou roli v uvolňování růstových faktorů a cílového štěpení proteinů extracelulární matrix, čímž obnaží oblasti, které mohou aktivovat receptory růstových faktorů. Produkce MMP je regulována buněčnými interakcemi s extracelulární matrix. Například při růstu keratinocytů z nativního typu kolagenu I byla prokázána vyšší exprese MMP oproti denaturovanému kolagenu [25]. Ovšem nadprodukce MMP je především spojena s rozložením extracelulární matrix a narušením hojení poškozené tkáně, případně vzniku chronického zánětu.

Interakce mezi růstovými faktory a extracelulární matrix probíhá několika cestami, které vedou k vzájemné regulaci [18]. Extracelulární matrix může vázat a uvolňovat konkrétní růstové faktory, čímž vykazuje kontrolu nad jejich aktivitou. Extracelulární matrix tak funguje jako úložiště pro růstové faktory, koncentruje jejich aktivitu v blízkosti buněk a chrání je před degradací. Například FGF-2 se takto váže na proteoglykan heparan sulfát. FGF-2 indukuje růst fibroblastů a endoteliálních buněk během hojení poškozené tkáně. Dále bylo zjištěno, že molekuly FGF se vážou na receptory FGFR (z angl. fibroblast growth factor receptor) v přítomnosti proteoglykanu heparinu nebo heparan sulfátu, který stabilizuje dva receptory FGFR pro dvě molekuly FGF za tvorby symetrického dimerního komplexu, ve kterém jsou receptory FGFR mezi sebou v přímé interakci a FGF jsou vázány na receptory FGFR nezávisle na sobě [26]. Navázání FGF-2 na heparan sulfát propůjčuje větší stabilitu

růstovému faktoru. FGF-2-heptaransulfátové komplexy mohou být aktivovány pomocí proteolýzy [18]. FGF-2 vázaný na heparan sulfát taktéž vykazuje dlouhodobější aktivitu. Dalším příkladem přímé interakce mezi extracelulární matrix a růstovými faktory je ve vazbě VEGF s heparan sulfátem. VEGF je významný pro angiogenesi, kontrolu tvorby krevních elementů a proliferaci tkáně. Plasmin, který se vyskytuje v prostředí poraněné tkáně, uvolňuje vázané izoformy VEGF a spouští jejich endoteliální buněčnou mitogenní aktivitu [27].

Významnými receptory zajišťujícími primárně propojení buněk s extracelulární matrix jsou integriny [18]. Integriny se také zapojují do fosforylačních dějů zahrnutých v některých signalizačních kaskádách. Vybrané integriny jsou exprimovány dočasně v oblasti zranění a hrají významnou roli v případě regenerace tkáně. V případě angiogenese jsou integriny žádoucí pro adhezi buněk s extracelulární matrix, aby mohly reagovat na uvolňované růstové faktory.

Růstové faktory také zpětně regulují extracelulární matrix stimulací buněk pro zvýšení produkce jejich složek nebo navýšením syntézy metaloproteinas, které extracelulární matrix rozloží [18]. Například TGF- β má zásadní vliv na kontrolu produkce extracelulární matrix a její degradaci. TGF- β stimuluje syntézu kolagenu a fibronektinu v řadě buněčných linií. TGF- β také redukuje proteolytickou degradaci složek extracelulární matrix redukcí syntézy a sekrece proteas, nebo stimuluje syntézu jejich inhibitorů [28]. Další příklad regulace extracelulární matrix růstovými faktory lze vypožorovat v počátku fáze rekonstrukce poškozené tkáně, kde uvolnění PDFG krevními destičkami v oblasti zranění působí jako chemoatraktant pro fibroblasty [18]. PDFG tak navýší ukládání kolagenu v kolagenní matrix.

V případě metabolických abnormalit u žilní nedostatečnosti nebo diabetu mellitu může být regenerace zranění zkomplikována a přejít ve zranění chronické [18]. Takový stav je charakterizován zásadními odchylkami v biochemii extracelulární matrix, dochází k zvýšení syntézy proteas jako jsou MMP nebo neutrofilní elastasy. V takovém stavu je většina interakcí mezi extracelulární matrix a růstovými faktory narušena. V případě bércového vředu lze sledovat uvěznění uvolněných růstových faktorů jako TGF- β převrstvenými plasmatickými proteiny. U chronických zranění dochází k degradaci extracelulární matrix především kvůli ztrátě rovnováhy mezi matrix degradujícími enzymy a jejich inhibitory, opakovaným poškozením stejné tkáně nebo působením přerostlých kolonií bakterií.

Tab. 1: Přehled nejznámějších růstových faktorů, míst jejich produkce a objevených funkcí, kterými disponují. Čerpáno z [17], [24] a [29].

Růstový faktor	Označení	Zdroj produkce	Vlastnosti
Růstový faktor pojivové tkáně	CTGF	Fibroblasty Endoteliální buňky	Stimulace proliferace a syntézy extracelulární matrix
Epidermální růstový faktor	EGF	Krevní destičky Makrofágy	Stimulace proliferace keratinocytů, fibroblastů a cévních endoteliálních buněk
Růstový faktor fibroblastů	FGF	Fibroblasty Makrofágy Endoteliální buňky	Indukce angiogenese Stimulace tvorby granulační tkáně, remodelace extracelulární matrix a reepitelizace
Inzulinu podobný růstový faktor	IGF	Fibroblasty Makrofágy	Stimulace proliferace fibroblastů Podílení se na reepitelizaci
Růstový faktor uvolněný z krevních destiček	PDGF	Krevní destičky Fibroblasty Makrofágy Cévní endoteliální buňky	Chemotaktická atrakce fibroblastů, neutrofilů, monocytů a buněk hladké svaloviny k místu zranění Aktivace makrofágů pro uvolnění růstových faktorů Podílení se na proliferaci fibroblastu a produkci extracelulární matrix
Transformující růstový faktor	TGF	Krevní destičky Makrofágy	Chemotaktická atrakce makrofágů Mitogenní vliv na fibroblasty Stimulace nebo inhibice proliferace řady buněk Podílení se na tvorbě granulační tkáně
Vaskulární endotelový růstový faktor	VEGF	Krevní destičky Makrofágy Keratinocyty	Stimulace angiogenese Podílení se na přenosu endoteliálních buněk a proliferaci

1.2.1 TGF- β rodina

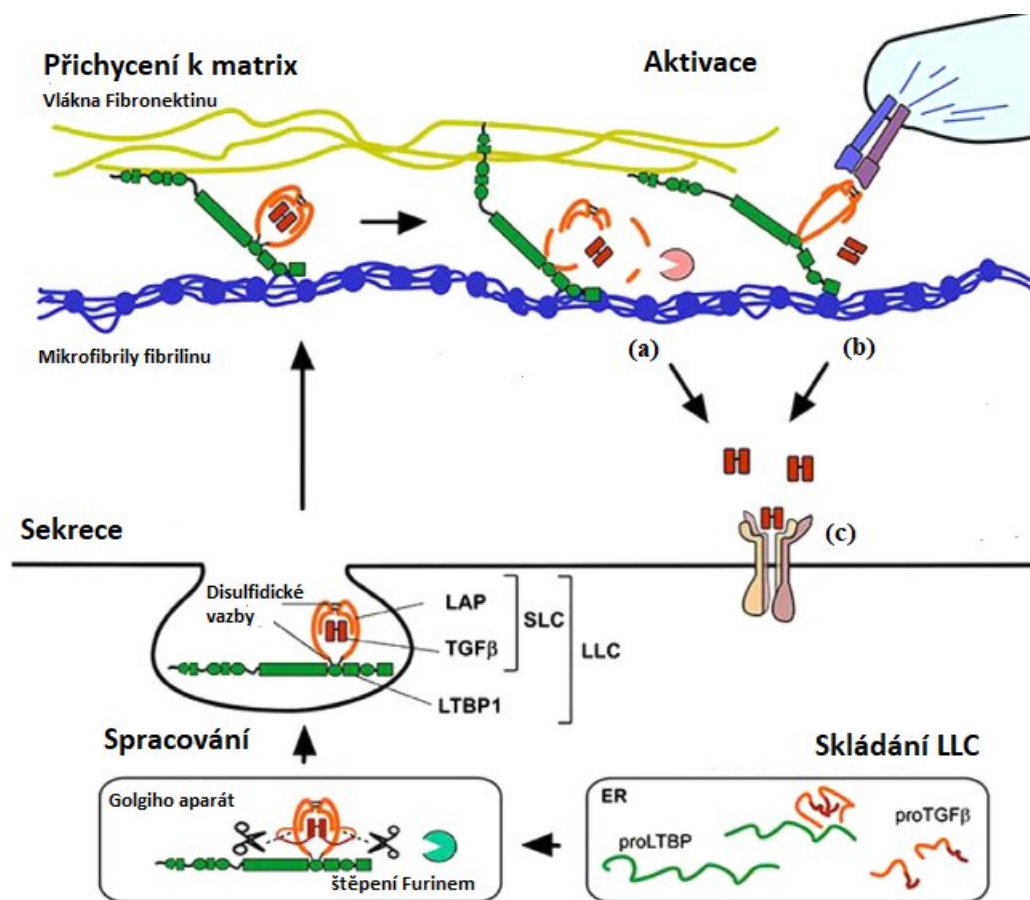
U rodiny TGF- β je známá existence pěti izoform: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 a TGF- β 5 [30]. Ty jsou produkovány různými typy buněk, nejčastěji trombocyty a makrofágy z cirkulujících monocytů, kterým byly prekurzorem hematopoetické kmenové buňky v kostní dřeni. TGF- β působí chemotakticky pro makrofágy, stimuluje produkci prokolagenu a fibronektinu, navíc inhibuje metaloproteinasy [24]. Tyto procesy probíhají

jako důsledek zvýšeného ukládání kolagenu v průběhu hojení poškozené tkáně. TGF- β 1 působí protizánětlivě potlačením proliferace a aktivity lymfocytů, podporováním indukce imunosupresivních T_{reg} lymfocytů [2]. Mnohé rodiny růstových faktorů působí vzájemně synergicky. TGF- β rodina může působit inhibičně v závislosti na aktuálním stádiu regenerující se tkáně. Pokud je v poškozené tkáni přítomen EGF, působí TGF- β tlumivě vůči nárůstu fibroblastu. Pokud je však v tkáni přítomen PDGF, je růst fibroblastu stimulován. TGF- β je využíván u *in vitro* experimentů proliferace a diferenciaci lidských kmenových buněk a syntézy extracelulární matrix. Například u lidských mesenchymálních a epitelálních kmenových buněk byla přidáním aktivní složky TGF- β 3 a dexamethasonu sledována chondrogenese [31]. Výsledkem byla po 14 dnech sekretovaná extracelulární matrix a v ní inkorporován kolagen II a agrekan, strukturní protein, který je pro správnou funkci chrupavky nepostradatelný. Zatímco u aktivních TGF- β 1 a TGF- β 2 byla pozorována iniciace mezibuněčných interakcí u zhuštěných progenitorových buněk a zprostředkovaná hypertrofní diferenciaci, TGF- β 3 má výraznější vliv na diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk.

Členové rodiny TGF- β jsou produkováni jako homodimerické proproteiny, jejichž součástí je na N-konci aminokyselinového řetězce široká doména, která růstovému faktoru zajišťuje správné sbalení a dimerizaci domény na C-konci [32]. Široká doména růstového faktoru je štěpena v Golgiho aparátu proteasou furin [33]. TGF- β jsou sekretovány z buněk ve formě latentního prekursoru, jehož součástí je LAP doména, která je kovalentně připojena disulfidickým můstkem na C-konec aktivního dimeru a zabraňuje vazbě TGF- β na specifické receptory na povrchu buněk. Taktéž LAP doména existuje v homodimerní formě. Aktivita TGF- β dimerů je regulována enzymy a integriny. Součástí proproteinu je také signální peptid nacházející se na N-konci růstového faktoru. Krystalové struktury TGF- β prozradily podobu tohoto komplexu, kde homodimer LAP obepíná aktivní TGF- β , a tak skrývá rozpoznávací a zásahová místa pro vlastní specifické heterotetramerické receptory [34]. V mnoha buněčných typech je pak LAP ještě spojen disulfidickými můstky s latentním TGF- β vazebným proteinem (LTBP) dohromady tvořící velký latentní komplex (LLC) [33].

LTBP jsou významnou složkou extracelulární matrix, která interaguje s mikrofibrily, které stabilizuje, a plní řadu dalších rolí [35]. V lidském genomu jsou známy čtyři izoformy, do aktivace růstového faktoru TGF- β 3 zasahují zásadně pouze dvě, a to LTBP-1 a LTBP-3. Tvorba těchto latentních komplexů se děje v endoplazmatickém retikulu buněk. Mechanismy zapojení do aktivace TGF- β 3 jsou však známy pouze u

LTBP-1, které zapojují do biochemického procesu primárně proteasy a integriny. Obě izoformy se však vzájemně mohou doplňovat v případě diferenciaci lidských mesenchymálních kmenových buněk na osteoblasty, kde LTBP-3 kontroluje úroveň TGF- β v průběhu časného zhušťovacího stádia buněk, zatímco LTBP-1 dominuje během zrání buněk [36]. Hlavní funkcí těchto izoform LTBP se nejpravděpodobněji jeví zajištění řádného složení prekurzoru TGF- β , přispění k jeho sekreci a řízené zapojení se na extracelulární matrix. Disulfidické můstky se při tvorbě LLC v endoplazmatickém retikulu tvoří mezi třetí 8-C doménou LTBP a páru C33 řetězce LAP dimeru. Nahrazení cysteinu v řetězci LTBP zodpovědného za toto navázání serinem vykazovalo u myši zánětlivé a tumorigenické projevy jako u myši, které měly geny pro tvorbu TGF- β umlčeny [37]. Lze tak usuzovat, že spojení LAP TGF- β s LTBP je nepostradatelné pro extracelulární aktivitu růstových faktorů TGF- β . Kromě spojení s LAP růstového faktoru nebo interakce s fibrilinem přes jeho C-konec, se váže LTBP-1 svým N-koncem na fibronektin, dokonce i když není fibrilin přítomný. LTBP-3 a LTBP-4 jsou na přítomnosti fibrilinu naopak závislé, aby se vůbec mohly zavést do extracelulární matrix. Vazba s fibronektinem probíhá za účasti proteoglykanu heparan sulfátu. Klíčovým kotvicím bodem pro LLC sloužícím k uvolnění a aktivaci TGF- β jsou $\alpha\beta 6$ a $\alpha\beta 8$ heterodimerní integriny, které růstový faktor specificky rozpoznávají a vážou se na motiv Arg-Gly-Asp v LAP doméně komplexu růstového faktoru (Obr. 1) [33]. To vyvolá roztažení LLC mezi integriny vázanými na povrchu buněk a extracelulární matrix. Tento proces zprostředkuje vyvázání TGF- β z LAP domény a uvolní aktivní růstový faktor z komplexu. Uvolnění TGF- β z LLC by nebylo možné bez kontrakčních aktin-myosinových mechanismů myofibrilových vláken. Jelikož bylo zjištěno, že LTBP-1 a LTBP-2 navzájem kompetují o stejné vazebné místo na fibrilinu-1 v extracelulární matrix, je LTBP-2 nepřímým regulátorem aktivního TGF- β . Ztráta schopnosti vazby LTBP k fibrilinu-1 mikrofil v důsledku mutace vede v organismu k hyperaktivitě TGF- $\beta 1$ a rozvoji Marfanova syndromu [38]. Mechanismus, který vede ke zvýšené aktivitě růstového faktoru v důsledku této mutace, zůstává neobjasněn. Jak již bylo zmíněno, významnou roli nejenom pro aktivitu, ale také celkovou dostupnost růstových faktorů včetně TGF- $\beta 3$ hraje extracelulární matrix, která může sloužit jako jejich zásobní depozitář a regulátor. Specificky se mohou vázat TGF- β na molekuly dekorinu a betaglykanu [18]. Uvolnění aktivních TGF- β molekul z latentní formy může proběhnout také enzymatickým štěpením působením proteasami plazminem, katepsinem D a proteasami ze skupiny metaloproteinasy [33].



Obr. 1: Role LTBP-1 v signalizaci TGF- β .

LTBP-1 je skládán a pojen kovalentně s LAP disulfidickými můstky. Velký latentní komplex je následně sekretován a může se navázat na tkáň extracelulární matrix. Aktivace latentního TGF- β může proběhnout více způsoby. (a) uvolnění a aktivace TGF- β po degradaci LAP proteasami, (b) aktivace TGF- β stahem buněčnými membránovými integriny, (c) aktivní TGF- β se váže na specifické receptory. Převzato z [35].

Velikost proproteinu TGF- β čítá kolem 400 aminokyselinových jednotek [39]. K proteolytickému štěpení proproteinu TGF- β v endoplazmatickém retikulu dochází mezi C278 a C279 aminokyselinového řetězce. Dva cysteiny v doméně LAP v pozici 223 a 225 aminokyselinového řetězce stojí za vytvořením disulfidických vazeb mezi monomery. Cystein v pozici 33 LAP domény pak připojuje LTBP.

Signalizační kaskáda TGF- β molekul zahrnuje aktivaci transkripčních faktorů SMAD, kterou iniciuje přímý kontakt růstového faktoru se specifickým receptorem [33, 40]. Aktivované proteiny SMAD se vážou v jádře na řadu lokusů genomu, jak mu určují partnerské transkripční faktory, jejichž dostupnost a přítomnost záleží na celkovém buněčném kontextu, který rozhodne o odpovědi na stimul růstovým faktorem. Na začátku této signalizační dráhy je dvojice transmembránových receptorů serin/threonin proteinových kinas označovaných jako receptor I (TGFBR1) a

receptor II (TGFBR2) [33]. Některé izotypy SMAD proteinů působí regulačně. SMURF1/2 (angl. SMAD ubiquitination regulatory factor 1,2) ubikvitin ligasy lokalizované SMAD7 proteinem a ubikvitin specifické peptidasy regulují degradaci receptorů zachycujících TGF- β molekuly. TGF- β uvolněný z latentního komplexu se váže na receptory přímo nebo za pomoci asistence kotvícího betaglykanu. Ve fázi navázání TGF- β na receptor, TGFBR2 (angl. transforming growth factor beta receptor 2) fosforyluje a aktivuje TGFBR1, který potom fosforyluje SMAD2 a SMAD 3 na dvou C-koncových postranních řetězcích serinu. Fosforylované SMAD2 a SMAD3 proteiny poté vytváří heterotrimerické komplexy se SMAD4. V jádře se pak aktivované SMAD komplexy vážou na stovky regulačních regionů za pomoci dalších transkripčních faktorů a tyto děje jsou pak regulovány enzymatickou fosforylací nebo defosforylací transkripčních komplexů.

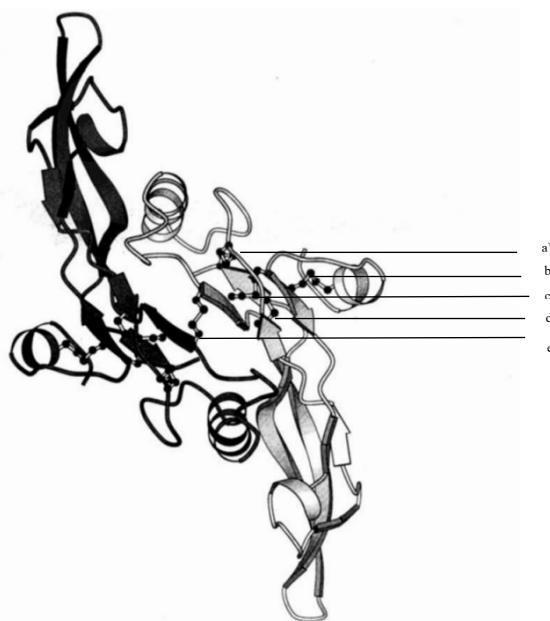
Negativním aspektem rodiny TGF- β může být skutečnost, že může výrazně přispět k malignitě nádorových buněk vytvořením imunopresivního mikroprostředí [33]. Rakovinné buňky se mohou nahromaděním růstového faktoru TGF- β na integrinech $\alpha\beta 8$ vyhnout imunitnímu systému. Uvolnění aktivního růstového faktoru TGF- β mimo jiné chemotakticky přitahuje T_{reg} buňky, které působí lokálně v mnoha tkáních protizánětlivě, potlačují přítomnost efektorových T lymfocytů a zabraňují imunitnímu systému se s nádorovými buňkami vypořádat. Signalizace růstovými faktory TGF- β také blokuje funkci NK buněk na mnoha úrovních. Zabraňuje expresi IFN- γ a T-bet (angl. T-box expressed in T cells); tak inhibuje Th1 imunitní odpovědi, a pozastavuje rozpoznání maligních buněk. V počátečních stádiích ovšem může TGF- β zastavit rozvoj rakovinového bujení spuštěním apoptosy u premaligních buněk.

1.2.2 TGF- $\beta 3$

TGF- $\beta 3$ se ve své biologické aktivitě od ostatních izoform výrazně neliší [24, 41]. Oproti ostatním izoformám bylo experimentálně ověřeno, že TGF- $\beta 3$ redukuje tvoření jizev v průběhu regenerace tkáně a také zastává dominantní pozici ve stimulaci angiogeneze. Kompetiční experimenty na buňkách předvedly, že radioizotopicky značený TGF- $\beta 1$ se váže na stejné receptory jako ostatní izoformy a také se váže víc efektivně. Za těmito rozdíly budou pravděpodobně stát rozdílné sterické interakce [41].

Strukturně TGF- $\beta 3$ tvoří dimer dvou identických podjednotek [42]. Každá podjednotka tvoří polypeptidový řetězec 112 aminokyselin představující jednu doménu.

Jádro každé podjednotky obsahuje tři disulfidické můstky vytvářející strukturu podobnou uzlu. Disulfidické vazby mezi Cys44-Cys109 a Cys48-Cys111 vytvářejí široký kruh, skrze který se váže vnitřní disulfidickou vazbou poslední dvojice Cys15 a Cys78. Vytvořený uzel nahrazuje hydrofobní jádro typické pro globulární proteiny a zakládá molekule rigidní strukturu. Podobně jako u izoformy TGF- β 1 a TGF- β 2, také TGF- β 3 ve své struktuře disponuje třemi α -helixy a čtyřmi β -skládanými listy. Disulfidická vazba mezi Cys7 a Cys16 umožňuje úzké sbalení α -helixu na N-konci řetězce do disulfidického jádra molekuly. Obě podjednotky jsou rozdělené dutinou, která je v krystalových strukturách naplněna molekulami vody. Tato dutina je překlenuta disulfidickou vazbou Cys77 obou podjednotek. Interakce mezi oběma podjednotkami jsou relativně slabé a zásadní vazebná energie je uložena v disulfidické interakci. Pouze dalších osm vodíkových vazeb je rozprostřeno v kontaktní oblasti. Trp30 a Trp32 by mohly být zahrnuté v rozpoznávání uhlovodíků, v kontextu růstových faktorů by mohly rozpoznávat receptory I a II, které jsou vysoce glykosylované. Nasvědčují tomu alespoň experimenty, kde dioxan byl schopen se zanořit do hydrofobní kapsy, kterou poblíž vnější smyčky β -skládaného listu definují hydrofobní postranní řetězce Trp30 a Trp32. Kromě vazby na receptory je známo, že jsou molekuly TGF- β 3 schopny vazby s proteoglykany extracelulární matrix dekorinem, biglykanem a dalšími. Na základě znalostí struktury TGF- β 2 lze usuzovat, že vazebné oblasti u TGF- β 3 se budou nacházet v podobných polohách na polypeptidovém řetězci.



Obr. 2: Molekulární reprezentace modelu neaktivního homodimeru TGF- β 3.

Podjednotky jsou vyznačeny odlišným odstínem šedi, disulfidické můstky jako modely spojených kuliček následovně: a) Cys48-Cys111, b) Cys7-Cys16, c) Cys15-Cys78, d) Cys44-Cys109, e) Cys77 obou podjednotek dimeru. Převzato z [42].

1.3 Aplikace růstových faktorů v regenerativní medicíně

V posledních několika dekádách množství lidí trpící chronickými onemocněními nehojících se tkání narostlo [17]. Těmito onemocněními je v současnosti dotčeno okolo 1–2 % populace USA a Evropy. Péče o tyto pacienty si ročně vyžádá 2-4 % rozpočtu ministerstev zdravotnictví, což může činit až 10000 Eur na jednoho pacienta. Regenerativní medicína se proto zaměřila na nalezení nových terapií, které by mnohdy špatné prognózy pacientů zvrátily.

Regenerativní medicína je mezioborová disciplína, která hledá způsoby náhrady nebo opravy poškozených buněk, tkání a orgánů, a která by jim navrátila správné fungování [43]. Růstové faktory se nabízí jako optimální terapeutické agens, jelikož znalosti o jejich roli v patofyziologii chronických ran se stále rozšiřují [17]. Možnosti aplikací jsou však výrazně limitovány krátkým poločasem rozpadu růstových faktorů, které byly sledovány *in vivo*, dané jejich nízkou stabilitou nebo rychlou krevní clearance. Mezi další vlivy, které mohou ohrozit integritu proteinu patří změny v teplotě, změny v pH, hydrolýza peptidových vazeb nebo oxidace postranních řetězců aminokyselin při dlouhodobém skladování. Často je tak pro dosažení terapeutického efektu vyžadováno několikanásobné podávání a vysoké dávky, což vede nejenom k vysokým cenám terapií, ale také se může o to spíše u pacientů projevit vedlejší účinek z častého podávání [44]. Regenerativní medicína tak neustále hledá promyšlené systémy přenosu léčiv, které by zabránily předčasnému rozložení růstového faktoru, a které by v čase a prostoru kontrolovaly přenos samotného faktoru (někdy i kombinaci více typů růstových faktorů) *in vivo*. Zároveň je v zájmu regenerativní medicíny připravit takové preparáty, které by byly dostupné pro širokou veřejnost.

Aby se z růstových faktorů stala efektivní terapeutická látka, musí platit, že dosáhne cílového místa v organismu, aniž by se rozložila, a poté musí pobýt v daném místě dostatečně dlouhou dobu pro projevení vlastní aktivity [45]. Růstové faktory, které jsou poskytnuty exogenně v roztoku jsou většinou neefektivní a mají tendenci difundovat mimo oblasti poškozené tkáně, jsou enzymaticky štěpeny nebo oxidativně deaktivovány. Například VEGF disponuje poločasem rozpadu menším než 30 minut, pokud je podán intravenózně [46]. Kompenzování krátkého poločasu by zde však nemělo být na úkor větší podané dávky nebo dávky opakované, neboť vyšší hladina VEGF v krvi může vést k tvorbě patologických krevních elementů mimo zásahové místo. Nevyhovující klasické doručení růstových faktorů vedlo k pokusům využití polymerních

matric. Bioaktivní faktory mohou být chemicky imobilizovány nebo fyzikálně zapouzdřeny do matric polymerů, které je chrání před denaturací. Jejich uvolnění může být kontrolováno mírou rozkladu polymerní matrice, možností difundovat přes polymerní konstrukt nebo může být jejich uvolnění vyvoláno vnějším podnětem, například specifickým enzymatickým štěpením. Pro přenašečové matrice platí několik podmínek. Přenašeče by měly být netoxické a v organismu rozložitelné. Vazba faktoru na přenašeč nesmí ovlivnit aktivitu proteinu. Přenašečový nosič by měl být schopen kontrolovaně uvolnit aktivní látku a zároveň ji chránit před fyzikální nebo chemickou degradací. Přenašeč by měl také být schopen správně zacílit a udržet se na požadovaném místě tkáně. V neposlední řadě by měl uvolňovat růstové faktory postupně, aby co nejlépe napodoboval časový profil přirozeného hojení tkáně *in vivo*.

Imobilizace růstových faktorů na polymerních nosičích může využít kovalentních nebo nekovalentních interakcí [45]. Řada technik může konjugovat růstové faktory na přírodní nebo syntetické biomateriály [46]. Díky chemické konjugaci jsou imobilizované růstové faktory dostupné buňkám, které jsou v přímém kontaktu s připravenou matrix a poskytují vysoce lokalizované signály kontrolující osud buněk. Růstové faktory mohou být připravené aktivní již v navázaném stavu na polymerním nosiči, nebo mohou být aktivovány štěpením. Biopolymerní gely složené z fibronektinu, kolagenu, elastinu nebo z glykosaminoglykanů heparin sulfátu, chondroitin sulfátu, hyaluronové kyseliny nebo syntetické hydrogely byly použity jako materiál napodobující extracelulární matrix pro imobilizaci růstových faktorů nebo jejich signál indukujících částí [46]. Například fúzní protein β -nervového růstového faktoru byl imobilizován na fibrinu a uvolněn proteolytickou aktivitou plasminu [47]. Tento model prokázal úspěšně zvýšenou regeneraci nervů [46]. Tato řízená uvolnění růstových faktorů však mohou mít škodlivé následky, pokud není model dostatečně optimalizován a využit pro konkrétní účel. Kinetika uvolňování je závislá nejenom na elektrostatických vazbách mezi molekulami, ale také na vnějším prostředí, kde může hrát roli teplota, pH nebo hydrofobicita. Molekuly růstových faktorů mohou být konjugovány k polymernímu materiálu vlastními funkčními skupinami, které jsou inkorporovány kopolymerizací nebo chemickým či fyzikálním ošetřením. Například TGF- β 1 molekuly kovalentně konjugované na polyethylenglykolové (PEG) hydrogely účinně zvyšují produkci extracelulární matrix [48]. Překážkami v rozsáhlejšímu využití kovalentně vázaných systémů je především riziko ztráty bioaktivity růstového faktoru při jeho imobilizaci a složitost selektivního přichycení proteinu k materiálu [46].

Syntetické polymery jako poly(α -hydroxykyseliny), poly(anhydridy), dextryny, poly(aminokyseliny), poly(glykosidy) a jejich kopolymery jsou také využívány pro zapouzdření růstových faktorů [46]. Stupeň zapouzdření a mechanismus uzamčení růstového faktoru je závislý na hydrofobních a hydrofilních interakcích mezi molekulami růstového faktoru a polymery.

Dalším využitelným přístupem zapouzdření je využití částic na bázi liposomů [46]. Tento systém byl použit pro model přenosu VEGF po infarktu myokardu, kde příznivě zapůsobil na fungování srdce. Nevýhodou využití těchto částic oproti síťovacím polymerním systémům je poměrně krátké trvání uvolňování růstového faktoru.

Polymery na bázi přírodních materiálů využívají keratin, hedvábí, fibrinogen, elastin, chitosan, hyaluronovou kyselinu, celulózu, alginát, které se taktéž jeví jako zajímaví přenašeči aktivních látek [46]. Jejich přírodní původ umožňuje navrhnout takové systémy, které působí na molekulární úrovni a minimalizují riziko zánětlivé reakce. Jsou většinou rozpustné ve vodě a síťování růstového faktoru probíhá v roztoku polymeru. Hlavní problém, se kterým se tyto materiály potýkají, je neschopnost dlouhodobě udržet bioaktivitu zapouzdřených růstových faktorů. Taktéž je těžší kontrola nad mírou rozkladu materiálu ve fyziologickém prostředí. Růstové faktory u přírodních materiálů se uvolňují difuzí nebo degradací materiálu. Příliš rychlá degradace vede k rapidnímu uvolnění růstového faktoru. Proto se u těchto polymerů využívá chemických modifikací, kterými lze získat větší kontrolu nad mírou rozkladu materiálu.

V mnoha situacích se vyskytla potřeba, aby přenosné systémy reagovaly na signály lokálního prostředí nebo vnější podněty pro kontrolované uvolnění růstového faktoru [46]. Toto uvolnění může být spuštěno také přidáním stimulujících složek do přenosných systémů. Nejvíce využívané spouštěcí mechanismy využívají změny v lokálním prostředí, jako změny pH, teploty, nebo enzymy, které štěpí síťování imobilizovaného růstového faktoru na polymerním nosiči. Pro tyto účely jsou často využívány proteasy. Nejvíce populární jsou systémy založené na katalytických matrix metaloproteinasách (MMP). MMP ligandy lze využít jako činidlo k síťování typu hydrogelů, které mají na sobě přivěšené oligopeptidy RGD. Vlastností této sekvence je její schopnost specificky se vázat na integriny. Tím se dosáhne větší efektivity přenosu růstového faktoru.

Použití kombinace růstových faktorů ať už simultánně nebo v postupných krocích prokázalo vyšší terapeutickou účinnost [45, 41]. Právě kompozitní materiály mohou být navrženy tak, aby byly schopny vázat a přenést více druhů aktivních látek na postižené

místo. Například kombinace VEGF, PDGF a TGF- β 1 na alginátovém přenašeči prokázala účinnější angiogenesi oproti využití samotného FGF.

V současnosti se ve zdravotnictví na trhu nachází několik přípravků, které obsahují růstové faktory jako aktivní látku [43]. U některých z nich byly prokázány neblahé vedlejší účinky. Například klinicky schválený přípravek Regranex s PDGF, který je určen na topické zmírnění diabetického neuropatického vředu, je podezříván ze zvýšeného rizika vzniku rakoviny [44]. Přípravek Kepivance s FGF-7 jako aktivní látkou je podáván intravenózně při poškození gastrointestinálního traktu. I u něj bylo prokázáno vyšší riziko vzniku rakovinného bujení. TGF- β 1 v topickém přípravku Citrix CRS je používán na zestárlou pleť.

Jednou z hlavních výzev pro použití exogenních růstových faktorů jako terapeutik je poměrně slabý výtěžek při jejich rekombinantní expresi [43]. Rekombinantní exprese často vyžaduje savčích expresních systémů kvůli komplexní struktuře růstových faktorů. Přesto se našly způsoby, jak využít i bakteriálních systémů expresí jen specifických domén růstových faktorů. Rekombinantní produkce proteinů se stává stále více nenahraditelnou technologií z hlediska izolace a studia požadovaných proteinů [49]. Peptidové kotvy umožňují izolaci exprimovaných proteinů na afinitní chromatografii. Krátké peptidové sekvence určené ke štěpení oproti větším minimalizují vliv na skládání a konformaci exprimovaného proteinu. Oligo- nebo polyhistidinové kotvy, vyvinuté výzkumníky z Roche, jsou využívány v afinitní chromatografii exprimovaných rekombinantních proteinů. Histidinovými repeticemi jsou proteiny značeny na svých N- nebo C-koncích [50]. Běžný chromatografický systém zahrnuje hexahistidinovou značku a chelát kovu nikelnatých iontů vázaný na nitrilotrioctovou kyselinu (NTA). Nikelnaté ionty jsou hexakoordinované, čtyři elektrony jsou využity na vazbu s NTA, dva elektrony jsou potom dostupné na vazbu s histidinovou kotvou. Tato interakce má vysokou afinitu a selektivitu.

Příprava rekombinantního proteinu TGF- β 3 byla experimentálně provedena a proteiny použity pro vyvolání chondrogenese u kmenových buněk v několika studiích [51]. V jedné z nich byl připraven fúzní protein TGF- β 3, který byl posléze inkorporován společně s kmenovými buňkami tukové tkáně do peptidových přenašečů a řízeně tak byla stimulována chondrogenese díky zásahovému restriktivnímu místu pro MMP ve fúzním proteinu [52]. Jelikož u osteoartrity je charakteristické vyšší zastoupení MMP, které se výrazně podílí na rozkladu matrix, nabízí se použití fúzního proteinu se zásahovým místem pro MMP jako zajímavá strategie cílené terapie. V další

studii byl sledován mimo vlivu růstového faktoru taktéž vliv hydrostatického tlaku na diferenciaci lidských mesenchymálních kmenových buněk, který tím simuloval podmínky běžné pro kloubní chrupavky [53]. Ve výsledku došlo k expresi sledovaných markerů jako byl agrekan či kolagen II, typických pro chrupavkovou matrix. Stejně tak došlo ke zvýšení exprese SOX9 (angl. „SRY (Sex-determining Region Y)-box 9“), transkripčního faktoru, který zajišťuje diferenciaci buněk. Ačkoliv největší chondrogenezi poskytovala kombinace aplikace růstového faktoru TGF- β 3 a působení hydrostatického tlaku, i samotný tlak poskytl v menším množství stanovované markery.

Zaměření této práce se týká coiled-coil kotvy, která by umožnila vazbu na hydrogelový polymerní nosič za využití nekovalentních interakcí mezi coiled-coil polypeptidovou sekvencí v gelu a růstovým faktorem exprimovaným s komplementární coiled-coil kotvou, navíc s možností řízeného uvolnění růstového faktoru díky MMP.

1.3.1 Coiled-coil struktura

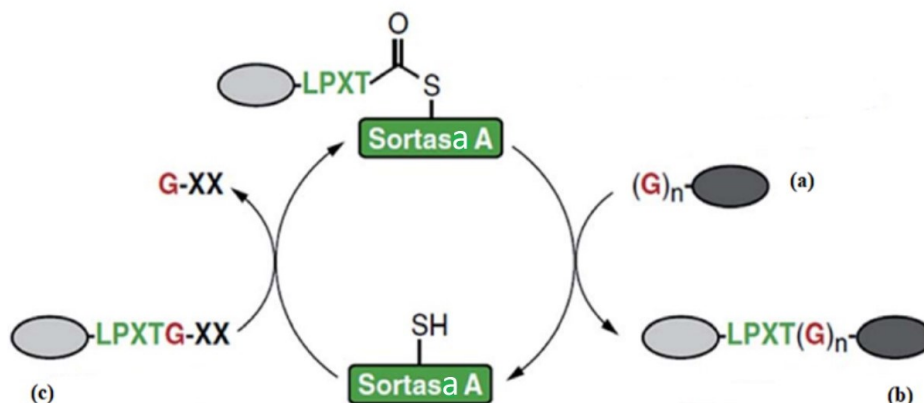
Coiled-coil sekvence představují pravotočivé α -helikální strukturní proteinové motivy, které se navzájem obmotávají do podoby levotočivých superšroubovic [54]. Sekvence aminokyselin coiled-coil peptidů se typicky skládá z repeticí sedmi aminokyselinových článků $(a-b-c-d-e-f-g)_n$ [55]. Pozice *a* a *d* je obsazena hydrofobními skupinami aminokyselin a pozice *e* a *g* jsou obvykle obsazeny nabitými nebo polárními skupinami. Coiled-coil sekvence hrají významnou roli jako podjednotky větších struktur, které oligomerizují proteinové komplexy zahrnuté v biologických procesech nebo tvoří strukturální prvky biologických materiálů. Typickým příkladem může být leucinový zip, který obsahuje coiled-coil motivy, které dimerizují a jako transkripční faktor regulují transkripci genů. Při expresi *in vitro* lze navrhnout vlastní pořadí těchto aminokyselin a připravit coiled-coil struktury se specifickými vlastnostmi a využít tyto peptidy jako značky nebo pojící prvek při sestavování molekulárních komplexů. Některé strategie návrhů představují nekovalentní interakce s coiled-coil kotvou, jiné tyto struktury modifikují nabitými rezidui na N- nebo C-konci řetězce pro řízené vázání helixů. Coiled-coil kotvy mohou být využity jako efektivní systémové přenašeče léčiv vázající nekovalentně dva makromolekulární systémy. Tato iniciovaná spojení musí splňovat několik parametrů: coiled-coil heterodimer musí zůstat dostatečně stabilní za fyziologických podmínek a antiparalelní orientace helixů by měla být upřednostňována kvůli sterickým požadavkům cílového ligandu a polymeru, se kterým

by se měl ligand propojit. V jiné experimentální práci byl vyvinut systém na bázi proteinových nanočástic využívající coiled-coil struktury pro nekovalentní připoutání růstových faktorů [56]. Jak nanočástice, tak růstové faktory byly připraveny tak, že obsahovaly ve své doméně coiled-coil sekvenci. Růstový faktor zde byl použit jednořetězcový VEGF pro zacílení na VEGF receptory rakovinných buněk. Po imobilizaci VEGF na nanočásticích bylo do nanočástic zavedeno protirakovinné léčivo paclitaxel a byla pozorována buněčná smrt rakovinných buněk vyvoláním apoptózy.

Příprava coiled-coil kotvy vázané na jiné proteiny v laboratorních podmínkách nedosahuje vždy kýžených výsledků, což může vést k hledání alternativních cest přípravy. V této práci se takto dospělo k experimentování se sortasou A, která by mohla samostatně exprimovanou či chemicky syntetizovanou coiled-coil kotvu enzymově vázat k samostatně exprimovanému růstovému faktoru.

1.3.2 Sortasa A

Sortasy představují enzymy, které se řadí do třídy transpeptidas, které jsou produkovány gram pozitivními bakteriemi a v bakteriích fungují jako katalyzátory tvorby peptidické vazby mezi dvěma specifickými peptidovými řetězci, a to zásahovou sekvencí na C-konci a N-koncovým nukleofilem [57]. Sortasy jsou na základě svých vlastností a sekvencí, které rozpoznávají, děleny do tříd A až F. Hlavní funkcí sortas v buňkách bakterií je přichycení proteinů, jako jsou například adheziny, k buněčné stěně bakterie. Tato interakce s buněčnou stěnou může být důležitá pro adhezi k povrchům a tvorbu biofilmů. Významně se také podílí na zprostředkování tvorby pili. Bakteriální sortasa A je extracelulární enzym vázaný na membránu. Sortasa A kovalentně zakotvuje proteiny s rozpoznávací sekvencí LPXTG (kde X představuje libovolnou aminokyselinu) na N-koncových oligoglycinových doménách buněčných stěn procesem dvoukrokové transpeptidace (Obr. 3). Cysteinový zbytek v aktivní části sortasy A napadá a štěpí peptidickou vazbu mezi threoninem a glycinem v LPXTG motivu a tvoří thioacylovou vazbu v LPXT-SrtA komplexu, zatímco je odštěpen glycinový zbytek. Následně je tento thioacylový intermediát štěpen nukleofilním zásahem N-koncového oligoglycinu. Dojde k vytvoření peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou threoninu LPXT a aminoskupinou oligoglycinu. Tímto mechanismem si bakterie vystavují virulentní faktory na buněčných stěnách a zprostředkovávají bakteriální adhezi, což zvyšuje jejich patogenezí.



Obr. 3: Cyklus sortasou katalyzované reakce.

Tvorba thioesterového meziproduktu je následována reakcí s oligoglycinovým nukleofilem a cyklus je zakončen formací ligačního produktu. (a) aminoglycinový nukleofil, (b) ligační produkt, (c) LPXTG motiv. Převzato z [57].

První izolovanou sortasou byla na konci devadesátých let minulého století sortasa A z bakterií *Staphylococcus aureus* [58]. Její experimentální využití je poměrně rozsáhlé [57]. Uplatnění našla například při ligaci fluorescenčně značených proteinů se zkoumanými proteiny, při fúzním spojení proteinů, které by jako jeden celek nebylo možné připravit přímou rekombinantní expresí, nebo při inkorporování funkčních proteinů do hydrogelové matrice. Zvláštním případem jsou spojení proteinů s neproteinovými biomolekulami jako například s upravenými molekulami DNA. Také byla úspěšně otestována schopnost sortasy A síťování hydrogelu [59]. Připravit sortasu A je možné rekombinantní expresí. Rekombinantní exprese sortasy A může být provedena v bakterii *Escherichia coli*. Sortasa A pak může být využita laboratorně pro katalyzování transpeptidasové reakce pro modifikované systémy [57]. Sortasou A katalyzovaná reakce umožňuje imobilizaci proteinů na površích různých materiálů. Transpeptidasová reakce je závislá na koncentracích jednotlivých složek, přičemž nedostatek glycinového nukleofilu v reakci vede ke vzniku stabilní thioacylsortasy [60]. Nativní sortasa A je katalyticky málo účinná. Důležité je proto v reakci udržet ekvimolární množství substrátu a enzymu. Reakce katalyzované nativní sortasou A vyžadují delší inkubační čas za vyšší teploty než u jejich nově vyvinutých variant. Optimální teplota pro enzymaticky katalyzovanou reakci bývá uváděna v rozmezí 20-80 °C [61]. Optimalizace provedená na nativní sortase A uvádí podmínky 30 °C po dobu 8 hodin jako poměrně vysoce účinné pro přeměnu většího množství substrátu za vysoké aktivity enzymu [61]. Navíc sortasa A izolovaná z bakterií *Staphylococcus aureus* má svou enzymatickou aktivitu závislou na vápenatých iontech a reakce jí katalyzovaná je

zvratná. Biotechnologickými metodami došlo k úpravám enzymu, díky kterým získal nejenom vyšší aktivitu, ale také nezávislost na vápenatých iontech pro své fungování [60]. Vzhledem k reverzibilitě reakce je kvantitativní konverze substrátu prakticky nemožná. Posunutí reakce více směrem k produktům může pomoci postupné odebírání vedlejšího produktu, tedy glycinových zbytků, nebo přidání molárního nadbytku polyglycinového nukleofilu do reakce. Množství glycinů vázaných na nukleofilu nemá významný vliv na účinnost katalyzované reakce. Zaváděním cílených mutací byla vyvinuta řada upravených sortas A [60]. 5M varianta, která má ve své sekvenci oproti nativní verzi právě 5 mutací, se například projevila jako několikanásobně účinnější oproti variantě původní. Kombinací dalších mutací byla připravena sortasa A 7M, která je nejenom vysoce aktivní, ale její aktivita je také nezávislá na vápenatých iontech.

2. Cíl práce

- Příprava nativního TGF- β 3 rekombinantní expresí v buněčné linii HEK293
- Příprava varianty TGF- β 3 fúzované s LAP (s latencí asociovaný peptid)
- Příprava fúzního proteinu růstového faktoru TGF- β 3 s coiled-coil kotvou pro další *in vitro* experimenty na krysích mesenchymálních kmenových buňkách
- Příprava Sortasy A 7+ rekombinantní expresí v *E. coli*.

3. Experimentální část

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Buněčné kmeny a linie

<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Thermo Scientific, USA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Thermo Scientific, USA
<i>Escherichia coli</i> NEB10	New England Biolabs, USA
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Thermo Scientific, USA
HEK293T	CRL-3216™, prof. Radu Aricescu, UK

3.1.2 Vektory

Plazmid pCMV3
Plazmid pET30b
Plazmid pTCCsec-C
Plazmid pTCCsec-N
Plazmid pTW5sec

3.1.3 Enzymy

AgeI-HF	New England Biolabs, USA
EmeraldAmp GT PCR MasterMix	Takara Bio, USA
KpnI	New England Biolabs, USA
Q5 DNA polymerasa	New England Biolabs, USA
Quick Fusion (Ligation-free cloning)	Biotool, USA
RNAsa A	Lach-Ner, ČR

3.1.4 Chemikálie

100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkaptoethanol	Sigma, USA
Agar	Sigma, USA
Agarosa	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR

APS	Serva, USA
Azid sodný	Serva, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
Coomassie Brilliant Blue (R-250)	Fluka Chemika, Švýcarsko
dNTPs	Top-Bio, ČR
Doxycyklin	Biotika, Slovensko
GoodView II barvivo	Ecoli, Slovensko
Hovězí sérový albumin	Sigma, USA
IPEI	Polysciences, USA
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
Kanamycin	Serva, Německo
Kozí polyklonální protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou	Sigma, USA
Králičí polyklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou	Sigma, USA
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, Slovensko
Kyselina valproová	Sigma, USA
N,N'-methylenbisakrylamid	Sigma, USA
PCR H ₂ O	Top-Bio, ČR
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Streptomycin	Biotika, Slovensko
Sušené odtučněné mléko	Lactino, ČR
TEMED	Serva, USA
Tris	Sigma, USA
Trypanová modř	Sigma, USA
Trypton	Oxford, UK
Q5 enhancer	New England Biolabs, USA
Ostatní základní chemikálie	Lach-Ner, ČR

3.1.5 Kultivační media

ExCELL293	Sigma, USA
LB médium	1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4

SOB médium	2% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄
TB medium	2% trypton, 2,4% kvasničný extrakt, 4 mM glycerol, 0,017 M KH ₂ PO ₄ , 0,072 M K ₂ HPO ₄

3.1.6 PCR primery a jiné oligonukleotidy

LAP_pTCCsecC_inf_FW

5'-TCTTGAATTACCGGTCTGAGCACCTGTACCAC-3'

TGF_MMP_CC_inf_REV

5'-TTCAGCGCTGCTACGGTACCTGAACCGCCGCCTGCCAGAGGCCAAGAG
GGGAACCACCTCCGCTGCACTTGCAGCTC-3'

pTT_FW

5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

pTW5seq_REV

5'-AAGCAGCGTATCCACATAGCG-3'

pTW5sec_TGFb3_INF_FW

5'-TCTTGAATTACCGGTGCTTTGGACACCAATTACTG-3'

pTW5sec_TGFb3_INF_REV

5'-TGGTGGTGGTGGTGGGTACCGCTACATTTACAAGACTTCACCAC-3'

TGFb3_Srt_inf_FW

5'-GGCCGCCACCAAGCTTATGCCACTGCTGCTCTTG-3'

TGFb3_Srt_inf_REV

5'-GGGCCC GAATTCGGCGGCCGCTTATCCACCTTCAGTAGGAAGAGATCCAC
CACCAGCCCACAGTCCGAGAGGAGATCCTCCGCCGCTACATTTACAAGACT
TCACCAC-3'

3.1.7 Roztoky a pufry

AP pufr: 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaN₃, pH 9,0

Barvicí roztok pro SDS-PAGE: 45% methanol, 10% kyselina octová,
0,25% Coomassie Brilliant Blue (R-250)

BCIP roztok: 50 mg/ml bromo-chloro-indolyl fosfát v dimethylformamidu

Elektrodový pufr: 25 mM Tris, 190 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

Elektropřenosový pufr: 25 mM Tris, 150 mM glycin, 10% methanol, pH 8,3

Mobilní fáze pro gelovou permeační chromatografii: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl,
10 mM NaN₃, pH 7,5

NBT roztok: 50 mg/ml nitrotetrazoliová modř v 70% dimethylformamidu

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE: 35% ethanol, 10% kyselina 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

TAE pufr: 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA

TBS pufr: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5

TBS-Tween/Triton: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X100, pH 7,5

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: k 900 µl 5× koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru přidáno 100 µl merkptoethanolu

3.1.8 Použité přístroje a pomůcky

Alliance Q9	UVItec, UK
Analytické váhy AND HA 180M	A&D, Japonsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Automatické pipety Discovery comfort	HTL, Polsko
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	Sigma, USA
Centrifuga Allegra X 22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
CO ₂ inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Elektroforetická souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone, USA
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories, USA
ESP Ultratenká magnetická míchačka	Velp Scientifica, Itálie
Fotoaparát Cyber-shot DSC W570	SONY, Japonsko
HisPur™ Ni-NTA magnetické kuličky	Thermo Scientific, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Inkubovaná třepačka Multitron Pro	Infors AG, Švýcarsko
Inverzní mikroskop AE 31	Motic, Německo

Jenway pH metr 3310	Cole-Parmer Ltd, UK
Kolona HiTrap Desalting 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona HisTrap Excel 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Koncentrátor Amicon Ultra	Merck Millipore, USA
Laboratorní kahan Fuego SCS	WLD-TEC, Německo
Mikrocentrifuga Ministar Silverline	VWR, USA
Mikrostříkačka	Hamilton, USA
Mikrovlnná trouba Opticook	Moulinex, Francie
Mikrovlnný autokláv Microjet	Rodwell, UK
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
Nástavec s filtrem na čištění roztoků s velikostí pórů 0,22 μm	Merck Millipore, USA
Nitrocelulosová přenosová membrána 30 cm × 3 m Biotrace	Pall, USA
Nitrilové rukavice	VWR, USA
Nucleobond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel, Německo
Pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Rolovací třepačka	Scilogex, USA
Spektrofotometr DS-11 FX+	DeNovix, USA
Spektrofotometr UV/VIS UV4-500	UNICAM, UK
Stolní centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Stříkačkový mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 μm	Carl Roth, Německo
T100 Termocykler	Bio-Rad Laboratories, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Transiluminátor s modrým světlem DR-45M	Clare Chemical Research, USA
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls	Bandelin, Německo
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	UVItec, UK
Varič	ETA, ČR
Vodní lázeň	Memmert, Německo

Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zařízení pro elektropřenos Trans Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories, USA
Zdroj deionizované vody Milli-Q	Merck Millipore, USA
Zdroj stejnosměrného napětí	Sigma-Aldrich, USA

3.2 Použité metody

3.2.1 Enzymové štěpení plazmidu

Množství plazmidu bylo štěpeno ekvivalentním množstvím restričních endonukleas, kdy na jeden μg plazmidu připadlo 5 U enzymu. Množství použitého plazmidu či enzymů bylo v průběhu práce optimalizováno a lišilo se v celkovém objemovém a koncentračním množství. Například pro štěpení plazmidu pTW5sec o koncentraci $3,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bylo použito $0,5 \mu\text{l}$ plazmidu platné pro reakci do objemu $20 \mu\text{l}$, do kterého bylo přidáno $2 \mu\text{l}$ NEB1 a $2 \mu\text{l}$ BSA pufru, $1 \mu\text{l}$ restriční endonukleasy KpnI a $0,5 \mu\text{l}$ AgeI a doplněno dH_2O do patřičného objemu. Takový reakční mix byl inkubován při teplotě 37°C .

3.2.2 Klonování metodou Quick Fusion

Quick Fusion reakce (tzv. ligation-free cloning) sestávala ze $0,09 \text{ pmol}$ insertu, $0,03 \text{ pmol}$ štěpeného plazmidu, $4 \mu\text{l}$ Quick Fusion master mixu ($5\times$ koncentrovaného) a byla doplněna do $20 \mu\text{l}$ sterilní vodou bez obsahu nukleas. Směs byla inkubována na ledu po dobu asi 30 minut a použita na transformaci do bakterií *E. coli* TOP10, případně NEB10.

3.2.3 Transformace bakterií plazmidovou DNA

Na jednu transformaci se použilo $50 \mu\text{l}$ suspenze buněk kompetentních bakterií *E. coli* a k ní bylo přidáno množství plazmidu pohybující se v rozmezí $100\text{--}1000 \text{ ng}$. Následně byla mikrozkuhavka se směsí uložena do ledu na dobu asi 20 minut. Pro zefektivnění transformace byl proveden krok tzv. teplotního šoku, kdy byla mikrozkuhavka po dobu 45 s vložena do předehřátého termobloku s teplotou nastavenou na 42°C . Poté byla mikrozkuhavka znovu ponechána na ledě po dobu asi 5 minut. Obsah mikrozkuhavky byl následně přenesen automatickou pipetou na předehřátou kultivační Petriho misku s agarem o koncentraci 15 g/l v SOB nebo LB mediu s ampicilinem/kanamycinem o koncentraci $100 \mu\text{g/ml}$ a rozetřen sterilní mikrobiologickou kličkou po misce. Miska s vsáknutou suspensí byla umístěna do inkubátoru, kde byla inkubována přes noc při teplotě 37°C .

3.2.4 Polymerasová řetězová reakce

Pro amplifikaci DNA úseků použitých pro klonování byla využita polymerasová řetězová reakce. Reakce prováděná v mikrozkuvkách byla složena ze 100 ng DNA templátu, k němu byly přidány 4 μ l Q5 pufru, 4 μ l Q5 enhanceru pro optimalizace reakce, po 2 μ l přímého a zpětného zředěného příslušného primeru, 0,5 μ l roztoku dNTPs. V předposledním kroku bylo přidáno ke směsi 0,5 μ l Q5 polymerasy a jako poslední byla směs doplněna do objemu 20 μ l sterilní dH₂O. Po promíchání směsi automatickou pipetou byla mikrozkuvka umístěna do termocykléru, ve kterém proběhla řízená reakce dle teplotního programu uvedeného v Tab. 2. Agarosovou elektroforézou byla ověřena úspěšnost PCR reakce srovnáním velikosti amplikonu s DNA standardem.

Tab. 2: Teplotní program PCR pro amplifikaci genu TGF- β 3 z plazmidu pCMV3 a pTW5sec.

Průběh	Teplota (°C)	Čas
I. Inicializace	95	5 min
II. 30 \times opakující se cyklus	a) 90 (denaturace řetězce)	30 s
	b) Nasednutí primerů: 62 (plazmid pCMV3) 54 (plazmid ptw5sec)	30 s
	c) 72 (polymerace)	30 s
III. Elongace	72	5 min
IV. Uchování přes noc	12	-

1 μ g amplifikovaných insertů byl dále enzymově štěpen, viz kapitola 3.2.1.

3.2.5 Polymerasová řetězová reakce z kolonií

Pro předběžnou kontrolu úspěšnosti vložení genu do plazmidu byla provedena procedura PCR z kolonií. Vyrostlé a označené kolonie bakterií na kultivační Petriho misce byly očkované pipetovacími špičkami jednotlivě do připraveného PCR mixu složeného z 10 μ l komerčního roztoku EmeraldAmp GT Mastermix (Takara Bio), 2 μ l přímého a zpětného, obvykle sekvenačního, primeru a 6 μ l dH₂O. Mikrozkuvka s touto směsí byla vložena do termocykléru. Následovalo spuštění teplotního programu uvedeného v Tab. 3 na str. 40, provedení agarózové elektroforézy a ověření vložení genu srovnáním amplikonu s DNA standardem pod modrým světlem na transiluminátoru nebo pod UV lampou. Při použití zmiňovaného master mixu není pak potřeba použít vzorkovací pufr pro zobrazení jednotlivých úseků DNA pod lampou. Kolonie, u nichž byl výsledek PCR pozitivní, byly použity pro nízkoobjemovou přípravu zásobního množství transformovaného plazmidu a sekvenování jeho genetického kódu.

Tab. 3: Teplotní program PCR z kolonií.

Průběh	Teplota (°C)		Čas
I.	Inicializace	95	5 min
II.	20 × opakující se cyklus	a) 95 (denaturace řetězce)	30 s
		b) 54 (nasednutí primerů)	30 s
		c) 72 (polymerace)	1 min
III.	Elongace	72	10 min
IV.	Uchování přes noc	4	-

3.2.6 Agarosová elektroforéza

Pro izolaci fragmentů DNA a ověření výsledku transformace plazmidové DNA byl připraven agarosový gel pro elektroforézu o příslušné hustotě v závislosti na velikosti předpokládaných štěpených fragmentů DNA. Nejčastěji byl připraven 1% agarosový gel rozpuštěním 0,65 g práškové agarosy v 65 ml TAE pufru a zahřátím po dobu 90 sekund v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí na teplotu kolem 40 °C bylo do roztoku agarosy přidáno 3 µl interkalačního barviva GoodView II, roztok byl zamíchán a nalit na předpřipravenou plochu elektroforetické aparatury. Do gelu byly vtisknuty jamky pomocí hřebene. Ztuhnutý gel byl převrstven destilovanou vodou jako chladícím médiem, oddělené oblasti elektrod TAE pufrům. Do vzorku se štěpeným plazmidem byl přidán 10× koncentrovaný DNA vkládací pufr a vzorky byly nanášeny pipetou do jamek. Do prvních dvou jamek bylo pipetováno 5 µl standardu pro větší a menší fragmenty DNA, tzv. 1kb a 100bp DNA standard. Aparatura byla uzavřena, připojena ke zdroji elektrického napětí a separace byla provedena pod napětím 180 V po dobu asi 20 min. Výsledek analýzy byl ověřen pod UV světlem nebo v případě následné izolace pod neionizujícím modrým světlem.

3.2.7 Extrakce DNA z agarosového gelu

Po srovnání s DNA markery byly zvoleny proužky odpovídající velikosti našeho amplifikovaného produktu nebo štěpeného insertu vyříznuty z gelu a dále extrahovány pomocí Nucleospin and PCR Clean-up soupravy. Nejprve byly kousky gelu rozpuštěny v mikrozkuhavce v objemu 200 µl NTI pufru na 100 mg zváženého vyřízlého gelu. Vzorek směsi byl inkubován po dobu 10 minut a teplotě 50 °C v termobloku. Průběžně byl obsah ručně protřepáván pro zajištění úplného rozpuštění gelu. V následujícím kroku byl roztok rozpuštěného gelu aplikován na kolonku nasazenou ve sběrné mikrozkuhavce. Centrifugací po dobu asi 30 sekund, nastavené teplotě 20 °C a síle 11000 × g byl na

koloně vázán na sorbentu SiO₂ DNA produkt, roztok ve sběrné mikrozkuhavce byl vylit. Obdobně bylo na kolonku se sběrnou mikrozkuhavkou následně přidáno 700 µl promývacího NT3 pufru a centrifugováno za stejných podmínek. Tento proces byl zopakován. Pro odstranění ulpělého pufru na membráně byla kolona se sběrnou mikrozkuhavkou ještě odstředěna po dobu 1 minuty při síle 11000 × g. DNA byla eluována 50 µl pufru NE do mikrozkuhavky v centrifuze působením síly 11000 × g po dobu 1 minuty.

3.2.8 Sekvenování plazmidové DNA

Příprava plazmidové DNA na sekvenování spočívala ve smíchání 200 ng připraveného plazmidového templátu v mikrozkuhavce se sekvenačním primerem. Na sekvenaci konkrétního úseku plazmidové DNA byly použity dvě mikrozkuhavky pro zpětný a přímý primer zvlášť. Množství přidaného primeru odpovídalo 2 µl. Objem byl doplněný sterilní dH₂O. Celkový připravený objem odpovídal 8 µl směsi. Vzorke byly poslány do Laboratoře sekvenace DNA výzkumného centra BIOCEV na sekvenování. Obdržené výsledky sekvenace byly zkontrolovány a porovnány s teoretickou sekvencí.

3.2.9 Nízkoobjemová příprava zásobního množství plazmidové DNA

Pro přípravu na minipreparaci byla použita peleta transformovaných buněk získaných z kultivace v 50ml zkuhavce v 5 ml SOB média s ampicilinem/kanamycinem v inkubační míchačce přes noc při teplotě 37 °C a 200 otáček/min. Buněčná kultura byla odstředěna v centrifuze po dobu 5 minut při 3900 × g a teplotě 25 °C. Minipreparace plazmidové DNA byla prováděna pomocí soupravy Nucleospin® Plasmid QuickPure. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v 250 µl pufru A1 na vortexu. Obsah byl převeden do mikrozkuhavky. K suspenzi bylo přidáno 250 µl pufru A2 a zkuhavkou bylo asi 10× přetočeno. Směs byla inkubována po dobu 5 minut a následně k ní přidáno 300 µl pufru A3. Směs byla promíchána opětovným převrácením mikrozkuhavky, a to celkově asi 10×. Směs byla odstředěna na stolní centrifuze 5 min při 11000 × g a teplotě 25 °C. Supernatant byl následně převeden na kolonku, která byla součástí soupravy a zbylý lyzát byl odstraněn. Uzavřená kolonka s odpadní mikrozkuhavkou byla vložena do odstředivky a centrifugována po dobu 1 min a 11000 × g. Filtrát v odpadní zkuhavce byl odstraněn a membrána na kolonce byla v následném kroku omývána 450 µl AQ pufru a odstředěna po dobu 3 min a stejné odstředivé síle. Poté bylo přidáno 600 µl pufru A4 a odstředěno za stejných podmínek. Následné vysoušení membrány kolonky bylo

provedeno dalším odstředěním po dobu 3 min. Plazmidová DNA byla eluována 50 μ l pufru AE do mikrozkušavky po inkubaci pufru na kolonce při pokojové teplotě po dobu alespoň 1 min a následném odstředění po dobu 1 min při 11000 \times g.

3.2.10 Velkoobjemová příprava plazmidové DNA pro transfekci

Pro velkoobjemovou produkci plazmidové DNA byly připraveny na pevném agarovém médiu narostlé kolonie kompetentních bakterií DH5 α transformovaných plazmidovou DNA. 1 až 2 ml LB média bylo dávkováno na Petriho misku s koloniemi, které byly pomocí sterilní kličky rozetřeny v médiu a resuspendovány. Vzniklá suspenze byla převedena do 2l Erlenmeyerovy baňky s 0,5 l LB média a 500 μ l ampicilinu/kanamycinu a inkubována při 37 $^{\circ}$ C přes noc na třepače za podmínek 180 otáček/min. Narostlé bakteriální kolonie byly centrifugovány v kyvetách po dobu alespoň 15 min, při odstředivé síle 3900 \times g a teplotě 20 $^{\circ}$ C. V následných krocích bylo postupováno dle manuálu, jež byl součástí komerční soupravy pro purifikaci plazmidové DNA Nucleobond® Xtra. Po odebrání supernatantu byla zbylá peleta buněk resuspendována v 15 ml pufru RES, k suspenzi přidáno 160 μ l RNAsy a opatrně automatickou pipetou promícháno tak, aby na dně nezůstala žádná část z pelety. Buněčná stěna buněk byla rozrušena přidáním 15 ml modrého lyzačního pufru LYS v 50ml zkumavce, která byla spolu se směsí pětkrát opatrně převrácena víčkem nahoru a dolů. Směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Mezitím byla ekvilibrována kolona, která byla součástí komerční soupravy určené pro purifikaci DNA, 15 ml EQU pufru přes nanosený filtr. Inkubovaná směs byla neutralizována 15 ml pufrům NEU a opatrně promíchána, dokud modré zbarvení směsi úplně nezmizelo. Homogenní suspenze byla 15 \times promíchána jemným převrácením zkumavky a poté byla převedena na kolonu přes připravený papírový filtr. Po odkapání supernatantu gravitací do odpadu bylo přes papírový filtr pipetováno 15 ml pufru EQU, filtr byl odebrán a kolona byla promyta promývacím pufrům WASH, a to objemem 15 ml. Plazmidová DNA vázaná na koloně byla eluována 15 ml ELU pufru do 50ml centrifugační zkumavky. Pro vysrážení plazmidové DNA bylo k eluátu přidáno 10,5 ml isopropanolu o pokojové teplotě a směs byla promíchána na laboratorním vortexovém mixéru. Ověření precipitace bylo možné sledovat změnou čírosti roztoku v zakalený. Roztok byl následně opatrně přenesen přes stříkačku na 0,22 μ m filtr. Proteklá kapalina byla odebrána. Pro vyčištění DNA od proteinů byl použit 70% ethanol následovaný vysoušecím procesem. 4 ml tohoto roztoku ethanolu byly nanoseny na filtr a opatrným tahem pístu stříkačky se roztok přenesl přes

filtr do odpadní zkumavky. Následovalo několik cyklů vysoušení filtru vzduchem stlačením pístu stříkačky na prázdno. Filtr byl po každém cyklu sundán, píst odňat, poté byl filtr zase připevněn k válci stříkačky a vysoušení bylo zopakováno. Cyklů bylo provedeno alespoň 6 a vysoušení filtru bylo ověřeno sledováním kapalně stopy při vysoušení na filtračním papíru. V poslední fázi byla DNA eluována z filtru pomocí roztoku Tris nebo sterilní vodou do sběrné mikrozskumavky. Elučního roztoku byl použit 1 ml. Tato zásoba plazmidové DNA byla obvykle použita pro transfekci buněčných kultur HEK293T.

3.2.11 Měření koncentrace plazmidové DNA

Informace o množství připravené DNA jsme získali pomocí UV-Vis spektrofotometru DeNovix DS-11. Absorbance roztoku DNA byla měřena při 260 nm proti slepému vzorku, kterým byl pufr, nebo sterilní dH₂O, do kterých byla eluována plazmidová DNA. Koncentrace DNA byla spočtena díky vztahu, kdy absorbance 1 při této vlnové délce je pro dvoušroubovicovou DNA rovna koncentraci 50 µg/ml. Čistotu roztoku DNA jsme mohli ověřit změřením absorbance při 280 nm a porovnáním s absorbancí při vlnové délce 260 nm. Poměr absorbancí při 260 a 280 nm by se pro čistou DNA měl pohybovat kolem 1,8. Na plošku pro detekci byly pipetovány 2 µl.

3.2.12 Příprava buněčné kultury HEK293T před transfekcí

Před transfekcí bylo nutné stanovit viabilitu buněk HEK293T. Pro transfekci bylo potřeba, aby byla narostlá kultura o vysoké hustotě. Buňky byly kultivovány v inkubátoru v komerčním mediu ExCELL293 s přidaným 4 mM L-glutaminem při teplotě 37 °C a 5% CO₂ na třepačce při 135 otáčkách/min v lahvích s prodyšným víčkem. Stanovení viability buněk bylo provedeno odpipetováním 20 µl buněčné suspenze do mikrozskumavky, k ní bylo přidáno 160 µl 0,4% trypanové modři v PBS-TK pufru. Směs byla pipetována pod sklíčko na hemocytometru na světelném mikroskopu a na něm spočteno množství živých buněk. Viabilita byla spočtena jako poměr všech živých buněk proti všem buňkám (mrtvým i živým) a při výpočtu buněk na 1 ml suspenze byl počet buněk na jeden čtverec hemocytometru vynásoben ředícím faktorem a objemových faktorem, který činí 1×10^4 . Připraven byl před transfekcí taktéž transfekční mix, který se skládal z našeho expresního plazmidu, který tvořil 88 % (w/w), plazmidu pTW5_p27 z 10 % (w/w) a plazmidu pTW5_aFGF, na nějž připadly 2 % (w/w) transfekčního mixu. Celkově bylo připraveno asi 1000 µg DNA transfekčního mixu a objem byl doplněn do 7 ml TK-PBS pufrém.

3.2.13 Tranzientní produkce proteinů

Byl odebrán objem média odpovídající 400 milionům kultivovaných HEK293T buněk. Tento objem byl odstředěn při $95 \times g$ po dobu 5 min a teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Pelet buněk byl resuspendován v 17 ml předehřátého média ExCELL293 a převeden do 0,5l skleněné láhve. Ke směsi byly přidány 3 ml sterilně zfiltrovaného transfekčního mixu. Poměrem 1:3 (w/w) k DNA bylo přidáno příslušné množství transfekčního činidla lineárního polyethyleniminu (IPEI) zajišťující přenos DNA do buněk. Takto připravená transfekční směs byla vložena do inkubátoru na dobu 3 hodin za podmínek $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 135 ot./min. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno do láhve takové množství média ExCELL293, aby koncentrace buněk činila 2×10^6 b/ml. Navíc byly přidány kyselina valproová do výsledné koncentrace 2mM a $100\times$ koncentrovaná směs antibiotik penicilinu a streptomycinu. Po pěti až sedmi dnech došlo ke sklizni buněk, konkrétně v okamžiku, kdy viabilita buněk klesla pod asi 75 %. Kultura buněk byla odstředěna v centrifuze nejprve 5 minut v 85ml kyvetách při $1000 \times g$ pro zbavení se živých buněk. Následně po dobu 0,5 h bylo centrifugováno při $10000 \times g$. Pelet buněk byl uchován při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Médium se sekretovaným rekombinantním růstovým faktorem bylo přefiltrováno přes $0,22\mu\text{m}$ filtr. Médium bylo použito okamžitě na purifikaci nebo uchováno při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.14 Produkce sortasy A7+ v bakteriích

Bakterie *E. coli* BL21(DE3) transformované plazmidovou DNA byly inkubovány v 5 ml LB média s kanamycinem ($50 \mu\text{g/ml}$) ve třepačce při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ přes noc. Následující den byly namnožené bakterie převedeny do 0,5 l TB média v Erlenmeyerově baňce a ta byla inkubována při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 200 ot./min. Průběžně byla sledována OD_{600} média na spektrofotometru. Jakmile dosáhla OD_{600} hodnoty 0,6, byly bakterie indukovány pro produkci isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidem (*IPTG*) přidaným do celkové koncentrace 1 mM a inkubovány při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a 200 ot./min do dalšího dne. Bakterie byly sklizeny centrifugací při $3900 \times g$ a teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 min. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 50 ml Ni-NTA promývacího pufru (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,6). Bakterie byly lyzovány ultrazvukovým homogenizátorem 3×1 minutu při výkonu 40 W a získaný lyzát byl centrifugován při $2500 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 min. Supernatant byl izolován a opakovaně zfiltrován $0,22\mu\text{m}$ filtrem. Za využití chelatační chromatografie byla sortasa A purifikována a eluována elučním puftrem (50mM Tris, 150mM NaCl, 500mM imidazol, pH 7,6).

3.2.15 Purifikace proteinů z média chelatační afinitní chromatografií

Námi navržené konstrukty obsahovaly sekvenci s histidinovou kotvou, již bylo využito při purifikaci proteinu. Pro chromatografii byla využita Ni-NTA kolonka využívající chelatačních vlastností Ni^{2+} zapojená do FPLC systému ÄKTA basic. Za kolonkou pak ještě byla instalována řada odsolovacích kolon GE Healthcare HiTrapTM 5×5 ml (pouze v kroku eluce proteinu z Ni-NTA kolonky). Průběh purifikace byl sledován pomocí programu UnicornTM, během chromatografie byla pozorována změna absorbance při vlnové délce 280 nm. Kolona byla ekvilibrována PBS pufrem. Vzorek s proteinem byl zředěn objemově 1:1 PBS pufrem a nanesen za průtoku 5 ml/min a maximálního povoleného tlaku na koloně 0,5 MPa. Kolona byla následně promývána PBS pufrem a následně PBS pufrem s 20mM imidazolem, který uvolní zbylé proteiny, které by mohly být slabě vázány ke koloně. Protein byl eluován do 15ml zkumavky PBS pufrem s 250mM imidazolem při průtoku 2 ml/min.

3.2.16 Purifikace proteinů gelovou permeační chromatografií

Pro gelovou permeační chromatografii byla využita kolona Superdex 200 10/300 GL, která byla instalována na chromatografický systém ÄKTA basic. Kolona byla ekvilibrována 1× zředěným pufrem HEPES při průtoku 0,5 ml/min. Následně byla stejným pufrem promyta nástřiková smyčka, a to jejím pětinasobným objemem (10 ml) Hamiltonovou injekční stříkačkou. Vzorek byl nanesen do smyčky a následně nastříknut na kolonu. Při následující gelové chromatografii za stejného průtoku, jejíž průběh jsme sledovali spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm a vodivostním detektorem na FPLC systému, byl eluát s proteinem rozdělen do několika frakcí.

3.2.17 Purifikace za použití magnetických kuliček

Po proběhlých experimentech s proteiny růstového faktoru na krysích mesenchymálních kmenových buňkách při studiu jejich působení na proliferaci byl zkontrolován vliv na strukturu růstového faktoru TGF- β 3. Kontrolní vzorky s buňkami, na něž byl protein aplikován, byl před další analýzou purifikován za využití nikelnatých iontů imobilizovaných na magnetických kuličkách. Objem 5 ml vzorků byl nanesen do zkumavky s odstředěnými magnetickými kuličkami. Zkumavky byly třepány přes noc při teplotě 4 °C a 180 otáčkách/min. S pomocí magnetu bylo kultivační médium následně odstraněno bez ztrát kuliček. Ty byly nejprve dvakrát promyty 1× zředěným PBS pufrem

s následným opětovným odseparováním kuliček od pufru. Následovala eluce PBS puftrem s 250 mM imidazolem a extrakce roztoku s purifikovaným proteinem od kuliček pomocí magnetu.

3.2.18 Koncentrování proteinů

Vzorky proteinů byly obvykle před krokem gelové permeační chromatografie koncentrovány pomocí koncentrátorů Amicon® Ultra (MWCO 10000, Millipore, USA). Vzorek tak byl zkoncentrován na požadovaný objem opakovanou centrifugací za podmínek 4500 otáček/min a okolní teploty po dobu 5 minut. Filtrát byl vždy odstraněn a zbylé množství vzorku bylo přidáváno postupně.

3.2.19 Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace získaných proteinů proběhlo spektrofotometricky na spektrofotometru DS-11+ (DeNovix). Z kapky roztoku proteinu byla zjištěna jeho koncentrace měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a následným výpočtem při znalosti teoretického extinkčního koeficientu proteinu a jeho molekulové hmotnosti. Měření proběhlo proti slepému vzorku představujícím mobilní fázi, ve které byl protein eluován v průběhu závěrečné purifikace.

3.2.20 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Výsledky práce po purifikaci proteinů byly zobrazeny pomocí SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu složeném ze zaostřovací a rozdělovací části. Podle potřeby a velikosti proteinu byl připraven 12,5% nebo 15% rozdělovací gel (množství použitých chemikálií je uvedeno v Tab. 4, str. 47). Po iniciaci polymerace rozdělovacího gelu umístěného mezi sklíčky aparatury byl gel převrstven dH₂O. Polymerace byla spuštěna přidáním APS. Po ztuhnutí gelu byla voda vylita a její prostor vyplnil zaostřovací gel. Na něj byl před ztuhnutím vtlačen hřeben pro vylisování jamek pro vzorky. Po ztuhnutí byly gely vloženy do elektroforetické aparatury, která byla následně naplněna elektrodoým puftrem. Vzorky proteinů byly smíchány s 5× koncentrovaným redukujícím nebo neredukujícím vzorkovým puftrem. Vzorky byly zahřáty v termobloku 10 min při teplotě 95 °C a centrifugovány 3 min při 10000 × g. Podle zvoleného typu hřebenu bylo pipetováno 10 nebo 20 µl vzorku do jamek zaostřovacího gelu. Výsledek elektroforézy byl porovnán se standardem molekulových hmotností, kterého bylo do první jamky nanášeno 5 µl. Elektroforéza v elektroforetické soupravě připojené ke zdroji elektrického

napětí byla spuštěna při zvoleném stejnosměrném napětí 200 V po dobu asi 50 min. Elektroforéza byla ukončena a gel s proteiny rozdělenými podle velikosti byl odebrán z aparatury a obarven vložení do misky s barvicím roztokem, kde byl míchán přes noc na míchače při 40 ot./min. Druhý den byl roztok vylit a gel promyt odbarvovacím roztokem pro odbarvení pozadí gelu 2× po dobu 20 min za stálého míchání na míchače při 60 ot./min. Gel byl vyfocen nebo naskenován na přístroji Alliance Q9. Pro dlouhodobé uchování gelu bylo k roztoku s gelem přidáno asi 100 µl 20% ethanolu.

Tab. 4: Chemikálie a jejich množství použité při přípravě rozdělovacího a zaostřovacího gelu pro SDS elektroforézu. Pořadí chemikálií ve sloupci představuje pořadí, v jakém byly chemikálie smíchány.

Rozdělovací gel	Zaostřovací gel			
	12,5 %	15 %		
<i>AA (29%) s bis-AA (1%)</i>	1675 µl	2000 µl	<i>AA (29%) s bis-AA (1%)</i>	250 µl
<i>dH₂O</i>	1265 µl	900 µl	<i>dH₂O</i>	700 µl
<i>Tris (1,5M, pH 8,8)</i>	1000 µl	1000 µl	<i>Tris (0,5M, pH 6,8)</i>	125 µl
<i>SDS (10%)</i>	40 µl	40 µl	<i>SDS (10%)</i>	10 µl
<i>TEMED</i>	2 µl	2 µl	<i>TEMED</i>	1,5 µl
<i>APS (10%)</i>	40 µl	40 µl	<i>APS (10%)</i>	10 µl

3.2.21 Elektropřenos proteinů na membránu

Polyakrylamidový gel s rozdělenými proteiny byl ihned po SDS elektroforéze podroben elektropřenosu proteinů na membránu. Nejprve bylo nastříháno 20 ks filtračního papíru o rozměrech asi 10,5 × 7 cm. 10 ks nastříhaných papírů bylo namočeno v připraveném přenosovém pufru v Petriho misce a následně na sebe přeloženo do elektropřenosové aparatury. Válečkem byly filtrační papíry zatlačeny na sebe. Následně na ně byla položena nitrocelulosová membrána o rozměrech asi 8,5 × 5 cm, taktéž předem smočená v přenosovém pufru. Na membránu byl vložen gel z SDS elektroforézy s odstraněným zaostřovacím gelem. Gel byl následně překryt dalšími 10 ks filtračního papíru nasáklého přenosovým pufrem, a možné vzduchové bubliny vytlačeny válečkem. Elektropřenosová aparatura byla uzavřena a byl zahájen elektropřenos proteinů z gelu na membránu za podmínek 25 V a až 2,5 A po dobu 15 min.

3.2.22 Imunodetekce proteinů

Membrána s proteiny po elektropřenosu byla pro kontrolu úspěšnosti přenosu krátce obarvena inkubací s 0,5% roztokem Ponceau červeně v 1% kys. octové a následně odbarvena opláchnutím dH₂O. Poté byla vložena na Petriho misku. Do misky s membránou byl přidán 1% roztok BSA v TBS pufru tak, aby roztok převrstvil

membránu a takto byla ponechána v lednici přes noc. Na druhý den jsme membránu 2× opláchli 5 ml TBS-Tween/Triton pufru a 1× TBS pufru vždy po pěti minutách. 1 µl roztoku myší monoklonální protilátky proti histidinové kotvě PentaHis bylo zředěno do 5 ml 5% BSA v TBS a roztok byl nalit na membránu. Ta byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě v 15ml zkumavce na rotátoru. Membrána byla následně propláchnuta stejným postupem jako po blokaci, tedy 2× TBS Tween/Triton pufrům a následně 1× TBS pufrům. Následně byla membrána převedena do čisté zkumavky a bylo k ní přidáno 5 ml 10% roztoku sušeného odtučněného mléka v TBS pufru s 1 µl kozí polyklonální protilátky proti myšimu IgG konjugované s alkalickou fosfatase. Inkubace trvala 1 hodinu při pokojové teplotě za stálého míchání na rotátoru. Na závěr byla membrána 3× opláchnuta TBS pufrům každých 5 minut, poté bylo k membráně přidáno 5 ml AP pufru, 13 µl roztoku NBT a 17,5 µl roztoku BCIP. Po proběhnutí kolorimetrické reakce byla membrána opláchnuta dH₂O, ponechána oschnout a vyfocena pomocí přístroje Alliance Q9 (UVItec).

4. Výsledky

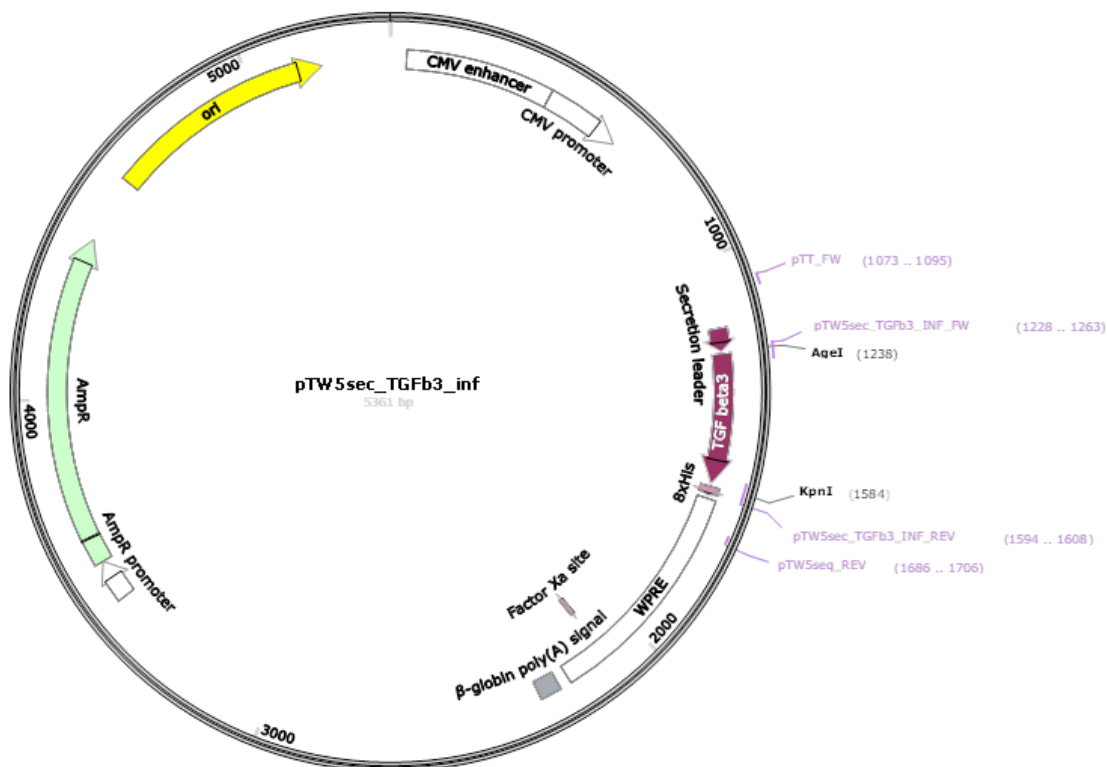
Experimentální práce probíhala ve spolupráci s Ing. Janou Dvořákovou, Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, která se zabývá výzkumem nových aplikací růstových faktorů na kmenových buňkách a hledáním cest, kterými by je regenerativní medicína mohla potenciálně využít při řešení léčby chronických ran. Smyslem této spolupráce bylo nalézt nové možnosti propojení známých polymerních nosičů s nově navrženými konstrukty proteinů; v mezích této práce se pracovalo na návrzích růstového faktoru TGF- β 3, který by měl ve své doméně nést část kotvící se k materiálu aminokyselinového polymerního hydrogelového nosiče.

4.1 Příprava expresního vektoru obsahující gen pro produkci TGF- β 3

První pokusy o produkci TGF- β 3 proběhly s konstruktem v plazmidu pCMV3, který byl již navrhnut a připraven Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D. Po velkoobjemové produkci v bakteriích DH5 α byl plazmid transfekován do buněk HEK293T v ExCELL293 médiu. Koncentrace připraveného vektoru obsahující gen pro TGF- β 3 činila 1,4 μ g/ μ l.

Výsledkem transfekce po sklizení buněk a purifikaci média na gelové permeační chromatografii byl poměrně malý výtěžek proteinu, který by nestačil pro další účely práce. Bylo také zjištěno, že TGF- β 3 tvoří přirozeně dimer, jehož monomerní jednotky jsou navzájem spojeny disulfidickými můstky cysteinů v aminokyselinovém řetězci. Pro optimalizaci extracelulární sekrece růstového faktoru byl zvolen plazmid pTW5sec. V tomto plazmidu je obecně protein taktéž tranzientně produkován pod CMV promotorem a enhancerem, jako tomu bylo u pCMV3, zásadní rozdíl představuje změna v translaci využívající sekrečního signálu ze sekretované alkalické fosfatasy nacházející se na N-konci proteinu, který by měl zajistit a usnadnit transport do extracelulárního prostředí a který je zároveň buňkou odštěpen tak, že na N-konci výsledného proteinu zůstávají pouze tři aminokyseliny ITG s pokračováním sekvence vloženého proteinu. Histidinová kotva se nachází na C-konci proteinu (viz Obr. 4, str. 50, a Obr. 5, str. 51).

Z plazmidu pCMV3 byl insert genu pro TGF- β 3 amplifikován polymerasovou řetězovou reakcí a následně vložen do plazmidu pTW5sec linearizovaného restrikčními endonukleasami AgeI a KpnI. Izolace amplifikovaného insertu TGF- β 3 proběhla pomocí agarosové elektroforézy, kdy byl pod modrým světlem vyříznut proužek o velikosti příslušného insertu, a extrakce z gelu.



Obr. 4: Mapa vektoru pTW5sec s vloženým insertem genu pro TGF- β 3.

Sekreční signál alkalické fosfatasy před genem kódujícím TGF- β 3 by měl zajistit optimálnější extracelulární produkci proteinu do média. Konstrukt je navrhnut tak, že histidinová kotva se při translaci bude exprimovat na C-konci polypeptidového řetězce. Na zobrazené mapě si lze povšimnout mimo jiné genu pro ampicilinovou rezistenci znázorněnou zelenou šipkou a zachovanou oblastí pro štěpení restrikcí endonukleasami AgeI a KpnI. Při klonování se pracovalo výhradně s kultivačními médii obsahující ampicilin jako antibiotikum.

Vložení do štěpeného plazmidu proběhlo metodou klonování nezávislého na ligaci pomocí tzv. Quick Fusion reakce (viz kap. 3.2.2, str. 38) a plazmid pTW5sec s růstovým faktorem byl transformován do kompetentních bakterií *E. coli* TOP10. Narostlé bakterie obsahující náš plazmid nesoucí rezistenci vůči ampicilinu byly pro kontrolu provedeného klonování analyzovány pomocí PCR z kolonií, pro kterou byly využity sekvenační primery pTT_FW a pTW5seq_REV. Pozitivní kolonie, které na agarosové elektroforéze vykazovaly amplifikovaný úsek o přibližné velikosti 380 bp, byly kultivovány v malém objemu média s ampicilinem do druhého dne. Poté z nich byly izolovány plazmidy minipreparací pro závěrečnou kontrolu našich klonovaných plazmidů jejich sekvenováním pomocí sekvenačních primerů pTT_FW a pTW5seq_REV v Laboratoři sekvenace DNA (BIOCEV). Vybrané pozitivní klony byly následně podrobeny velkoobjemové produkci plazmidové DNA pro transientní vysokohustotní produkci proteinu v buňkách HEK293T v ExCELL293 médiu.

```

ATGGGAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCTTCAGCTGAGTCTTGGAATT
ACCGGTGCTTTGGACACCAATTACTGCTTCCGCAACTTGGAGGAGAACTGCTGTGTGCGC
CCCCTCTACATTGACTTCCGACAGGATCTGGGCTGGAAGTGGGTCCATGAACCTAAGGGC
TACTATGCCAACTTCTGCTCAGGCCCTTGCCATACCTCCGCACTGCAGACACAACCCACA
GCACGGTGCTGGGACTGTACAACACTCTGAACCCTGAAGCATCTGCCTCGCCTTGCTGCG
TGCCCAGGACCTGGAGCCCCTGACCATCCTGTACTATGTTGGGAGGACCCCAAAGTGG
AGCAGCTCTCCAACATGGTGGTGAAGTCTTGTAAATGTAGCGGTACCCACCATCACCA
TCACCACCACGGGTGA

MGELLLLLLLGLRLQLSLGITGALDNTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQLGWKWWHEPKGYAN
FCSGPCPYLRADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVV
KSKKCSGTHHHHHHHHG

```

Obr. 5: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence expresního konstruktů TGF-β3 v plazmidu pTW5sec.

Světle zeleně je označena sekvence kódující a představující samotnou aktivní formu TGF-β3, tmavě zelená představuje sekvenci sekrečního signálu pro alkalickou fosfatázu. Modře jsou označeny v nukleotidové sekvenci zásahová místa pro restrikční endonukleasy AgeI a KpnI. Fialově je označen úsek kódující/představující histidinovou kotvu vázanou na C-konci polypeptidového řetězce. Žlutě je označen stop kodon ukončující translaci. Barevně psaná písmena v polypeptidové sekvenci představují významná místa ovlivňující podobu struktury proteinu; jedná se o cysteiny vytvářející v molekule TGF-β3 disulfidické můstky. Barevně psané jednopísmenné zkratky pro cystein lze nalézt v páru, což představuje místa, mezi kterými jsou cysteiny růstového faktoru spojeny. Žlutě zvýrazněný cystein v poloze 77 polypeptidového řetězce se váže disulfidickým můstkem na druhou podjednotku homodimeru růstového faktoru ve stejné poloze.

4.2 Produkce růstového faktoru TGF-β3 v expresním systému HEK293T

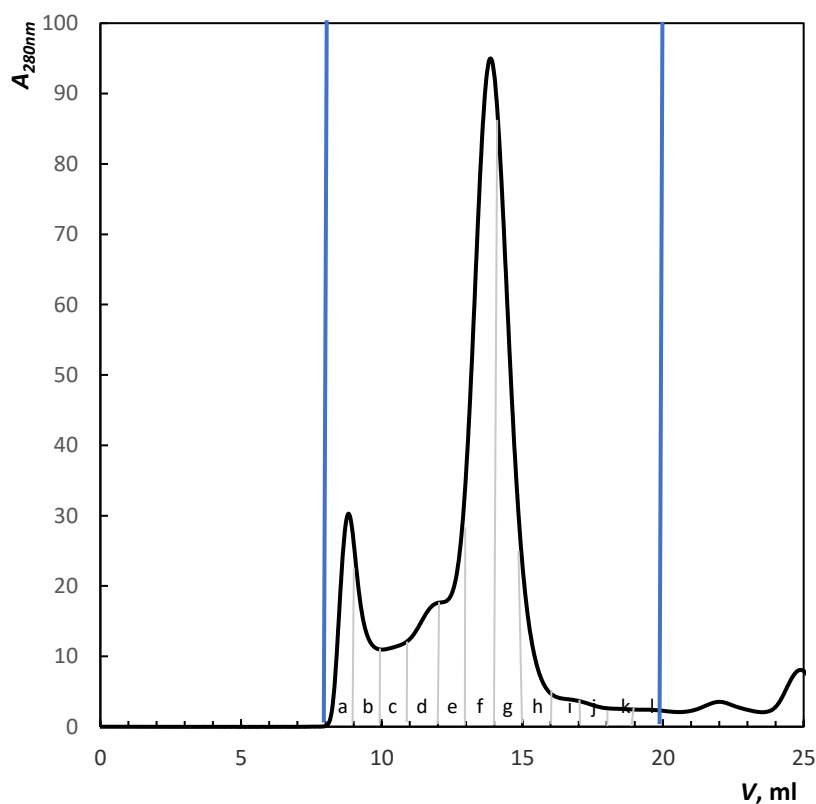
Produkce růstového faktoru provedená z plazmidu pCMV3 v linii HEK293T byla sklizena po 5 dnech od transfekce a po filtraci média byl TGF-β3 purifikován pomocí chelatační afinitní chromatografie na kolonce HisTrap Excel. Principiálně bylo využito histidinové kotvy nacházející se v polypeptidovém řetězci před růstovým faktorem pro zachycení se na agarosovém nosiči s ionty Ni²⁺ vázanými na nitrilotrioctové kyselině. Nikelnaté ionty vážou koordinačně histidinovou kotvu s vysokou afinitou. Eluce proteinu proběhla pufrům PBS s 250mM imidazolem, který vázané postranní řetězce histidinů kotvy vytěsňuje. Pro opětovné použití kolonky bylo vždy potřeba kolonu regenerovat octanovým pufrům o pH 4 a uchovávat ji v 20% ethanolu. Průběh kapalinové chromatografie byl sledován pomocí měření absorbance a v momentě, kdy se začaly objevovat první náznaky růstu absorbance a objevovat se pík našeho proteinu, byl protein sbírán do zkumavky. Eluovaný vzorek byl koncentrován pomocí koncentrátoru proteinů pro proteiny větší než 10 kDa, menší proteiny by měly během centrifugace projít

membránou do odpadní zkumavky. Předpokládaná teoretická velikost monomerního růstového faktoru s histidinovou kotvou činila 14 kDa.

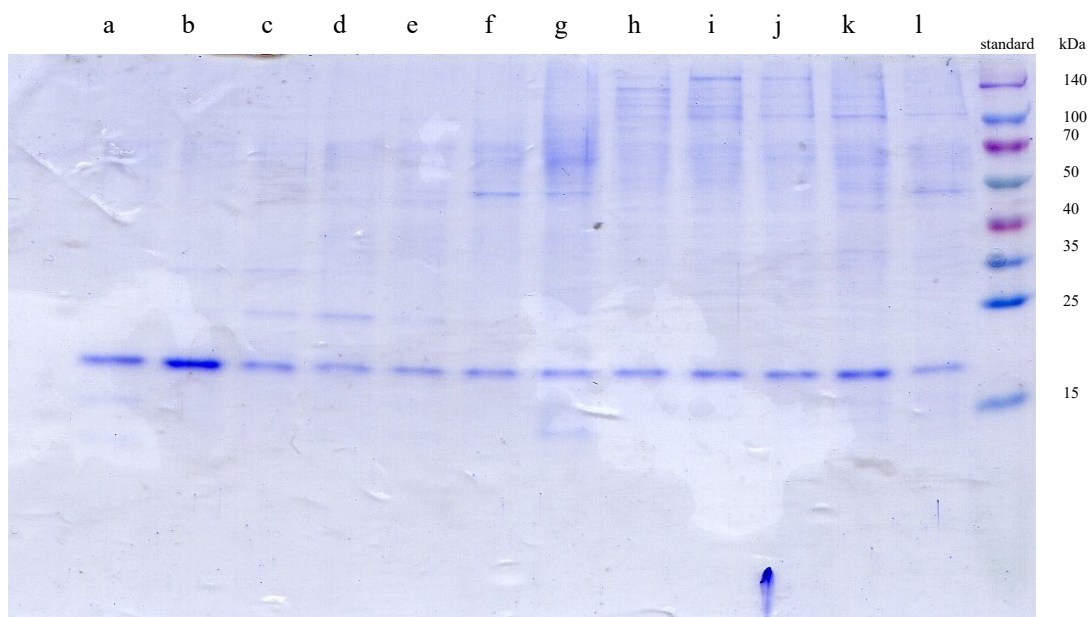
Zkoncentrovaný protein byl nastříknut do FPLC systému při zavedené gelové permeační chromatografii. Kolona Superdex 200 10/300 GL byla předtím ekvilibrována pufrům HEPES. Výsledek chromatografie byl zaznamenán a uložen (Obr. 6). Eluát byl rozdělen do několika frakcí o objemu 1 ml automaticky každé dvě minuty.

Bylo zjištěno celkové množství získaného proteinu proměřením absorbance každé frakce na spektrofotometru DeNovix DS-11+ a zadáním údaje o relativní molekulové hmotnosti produkovaného růstového faktoru a jeho teoretického extinkčního koeficientu $23420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Příklad pak spočítal koncentraci každé frakce Lambert-Beerovým zákonem. Celkové produkované množství TGF- β 3 činilo po sečtení všech frakcí asi 1,13 mg (Tab. 5, str. 53).

Jednotlivé frakce byly dále analyzovány SDS elektroforézou na 12,5% polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí (Obr. 7, str. 53) pro potvrzení identity (mol. hmotnosti) a ověření čistoty našeho exprimovaného proteinu.



Obr. 6: Gelová permeační chromatografie proteinu TGF- β 3 na koloně Superdex 200 10/300 GL. Na chromatogramu je zaznamenán počátek a konec sbírání frakcí tlustou modrou svislou čarou. Jednotlivé sesbírané frakce jsou na chromatogramu ohraničeny a oblasti označeny písmeny a-l. Na chromatogramu lze pozorovat dva píky, přičemž ten větší by mohl představovat exprimovaný TGF- β 3 a menší jeho dimer.



Obr. 7: SDS elektroforéza frakcí TGF- β 3 z gelové permeační chromatografie.

Jednotlivá písmenka představují sbírané frakce při gelové permeační chromatografii (viz Obr. 6, str. 52). SDS elektroforéza proběhla v redukujícím prostředí. Proužky pohybující se při srovnání se standardem okolo 15 kDa by mohly odpovídat monomerní variantě TGF- β 3. Zpoždění proteinu o jednotky kDa může být vysvětleno přítomností post-translačních modifikací růstového faktoru.

Tab. 5: Naměřené koncentrace frakcí TGF- β 3 získaných při gelové permeační chromatografii.
Označení frakcí odpovídá Obr. 6, str. 52.

Frakce	Koncentrace (mg.ml ⁻¹)
a	0,248
b	0,022
c	0,055
d	0,069
e	0,186
f	0,373
g	0,128
h	0,026
i	0,005
j	0,002
k	0
l	0

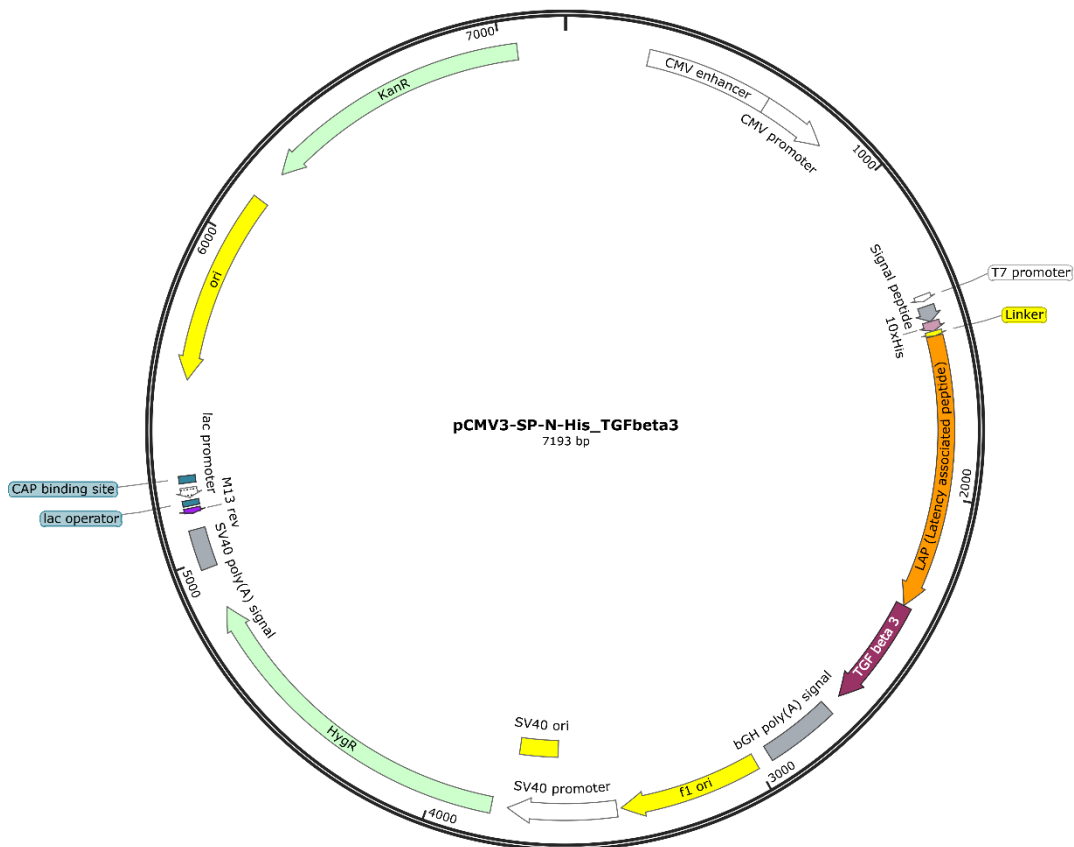
Výsledek purifikace napověděl, že TGF- β 3 se produkoval taktéž jako dimer, ačkoliv se to SDS elektroforézou na polyakrylamidovém gelu plně neprokázalo. Důvodem může být redukční prostředí, ve kterém byly vzorky připraveny, což rozrušilo disulfidické můstky mezi cysteiny dimeru.

Pro účely práce bylo potřeba získat větší množství aktivní formy růstového faktoru. Byl proto navrhnout genetický konstrukt růstového faktoru vloženého do plazmidu pTW5sec. Jeho produkce v HEK293T se však nezdařila, což bylo pozorováno v průběhu purifikace na afinitní chromatografii s kolonou HisTrap Excel, kdy nebylo zaznamenáno významně velké množství růstového faktoru.

Při hlubším studiu TGF- β 3 bylo zjištěno, že tento růstový faktor se za fyziologických podmínek produkuje v latentní formě jako LAP-TGF- β 3. Po dohodě s Dr. Dvořákovou došlo ke změně plánu a naše pozornost se přenesla na latentní formu TGF- β 3, kterou jsme se pokusili připravit.

4.3 Příprava expresního vektoru obsahující gen pro produkci LAP-TGF- β 3

Pro produkci latentní formy růstového faktoru byl navrhnout a objednan nový konstrukt v plazmidu pCMV3 obsahující gen pro LAP před genem kódující samotný růstový faktor (Obr. 8 níže a Obr. 9, str. 55).



Obr. 8: Mapa vektoru pCMV3 s insertem genu pro LAP-TGF- β 3.

Na mapě se úsek kódující histidinovou kotvu v sekvenci nachází před latentním růstovým faktorem na N-konci kódovaného polypeptidu a je s ním spojený přes spojovací úsek (z angl. linker). Zelená šipka KanR představuje gen pro rezistenci na kanamycin, při klonování a transformaci se pracovalo výhradně s médii obsahujícími toto antibiotikum.

```

ATGCCACTGCTGCTCTTGCTGCCTCTGCTTTGGGCTGGAGCTCTGGCTCACCATCACCAC
CATCATCACCACCATCACGGTGGAGGCGGTAGCCTGTCCACTTGCACCACCTTGGACTTC
GGCCACATCAAGAAGAAGAGGGTGAAGCCATTAGGGGACAGATCTTGAGCAAGCTCAGG
CTCACCAGCCCCCTGAGCCAACGGTATGACCCACGTCCCCTATCAGGTCTTGCCCTT
TACAACAGCACCCGGGAGCTGCTGGAGGAGATGCATGGGGAGAGGGAGGAAGGCTGCAC
CCAGGAAAACACCGAGTCGGAATACTATGCCAAAGAAATCCATAAATTCGACATGATCCAG
GGGCTGGCGGAGCACAACGAAGTGGCTGTCTGCCCTAAAGGAATTACCTCCAAGGTTTTTC
CGCTTCAATGTGTCCTCAGTGGAGAAAAATAGAACCAACCTATTCCGAGCAGAATTCCGGG
TCTTGCGGGTGCCCAACCCAGCTCTAAGCGGAATGAGCAGAGGATCGAGCTCTTCCAGA
TCCTTCGGCCAGATGAGCACATTGCCAACAGCGCTATATCGGTGGCAAGAATCTGCCCA
CACGGGCACTGCCGAGTGGCTGTCTTGTGATGTCACACTGACACTGTGCGTGAGTGGCTGT
TGAGAAGAGAGTCCAACCTAGGTCTAGAAATCAGCATTCACTGTCCATGTCACACCTTCA
GCCCAATGGAGATATCCTGGAAAACATTACGAGGTGATGGAAATCAAATTCAAAGGCGTG
GACAATGAGGATGACCATGGCCGTGGAGATCTGGGGCGCCTCAAGAAGCAGAAGGATCA
CCACAACCCTCATCTAATCCTCATGATGATTCCCCACACCGGCTCGACAACCCGGGCCA
GGGGGGTCAGAGGAAGAAGCGGCTTTGGACACCAATTACTGCTTCCGCAACTTGGAGGA
GAACTGCTGTGTGCGCCCCCTCTACATTGACTTCCGACAGGATCTGGGCTGGAAGTGGGT
CCATGAACCTAAGGGCTACTATGCCAACTTCTGCTCAGGCCCTTGGCCATACCTCCGCAGT
GCAGACACAACCCACAGCACGGTGTGGGACTGTACAACACTCTGAACCCTGAAGCATCT
GCCTCGCCTTGCTGCGTGCCCCAGGACCTGGAGCCCCTGACCATCCTGTACTATGTTGGG
AGGACCCCCAAAGTGGAGCAGCTCTCCAACATGGTGGTGAAGTCTTGAAATGTAGCTAA
MPLLLLLPLLWAGALAHHHHHHHHHHGGGSLSTCTTLDGFIKKRVEAIRGQILSKLRLTSP
PEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLEEMHGEREEGCTQENTESEYYAKEIHKFDMIQGLAEHNE
LAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRNTLFRAEFRVLRVNPSSKRNEQRIELFQILRPDEHIAKQR
YIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDTVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIK
FKGVDNEDDHGRGDLGRLKKQKDHNNPHLILMMIPPHRLDNPQGQQRKKRALDTNYCFRNL
EENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEAS
ASPCCVQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVKKSCKS

```

Obr. 9: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence LAP-TGF-β3 v plazmidu pCMV3.

Barevně jsou odlišené následující úseky: šedou barvou signální peptid, zelenou histidinová kotva, žlutou spojovací článek (tzv. linker), modrou barvou LAP doména růstového faktoru, který následuje za ním a červenou barvou je vyznačen stop kodon.

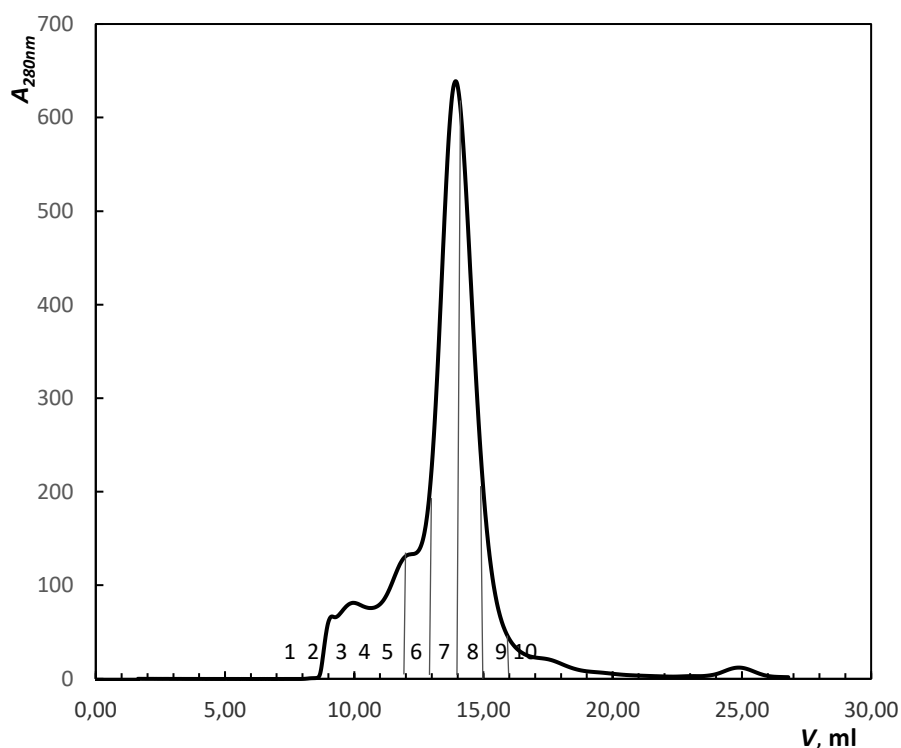
Po úspěšném transformaci kompetentních bakterií *E. coli* DH5a bylo připraveno zásobní množství plazmidu pro velkoobjemovou tranzientní transfekci HEK293T buněk. Pro maximalizaci výtěžku byly souběžně provedeny dvě produkce.

4.4 Produkce LAP-TGF-β3 v expresním systému HEK293T

Transfekované buňky HEK293T byly sklizeny po šesti dnech, kdy viabilita buněk zkontrolovaná pod světelným mikroskopem klesla pod 70 %. Po oddělení média od buněk a jeho zfiltrování proběhla purifikace růstového faktoru. Nejprve byl protein purifikován chelatační chromatografií na kolonce HisTrap Excel. Po promytí systému asi 800 ml PBS pufrem byl nanesen náš vzorek proteinu. Po zachycení na koloně následoval krok promytí PBS pufrem a poté byla provedena předeluce PBS pufrem s 20mM imidazolem. Protein byl eluován PBS pufrem s 250mM imidazolem do sběrné zkumavky. Ve fázi eluce byla ke kolonce za sebou nainstalována řada odsolovacích kolonek pro získání eluátu

zbaveného imidazolu a nečistot. 1 ml eluátu byl ponechán pro SDS elektroforézu pro srovnání vlivu purifikace na výsledek čistoty proteinu před jeho zkoncentrováním.

Při následné purifikaci na gelové permeační chromatografii bylo využito pufru PBS-TK, do kterého byla převedena kolona a kapalinový chromatograf. Tento pufr byl zvolen, jelikož je svým složením vhodnější pro další práci na kmenových buňkách. Po ekvilibraci kolony pufrem a zkoncentrování eluátu byl protein LAP-TGF- β 3 nastříknut na kolonu. Záznam proběhlé purifikace na koloně Superdex 200 10/300 GL je zobrazen na Obr. 10. Eluát byl jímán automaticky po frakcích o objemu 1 ml při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min.



Obr. 10: Gelová permeační chromatografie LAP-TGF- β 3 na koloně Superdex 200 10/300 GL.

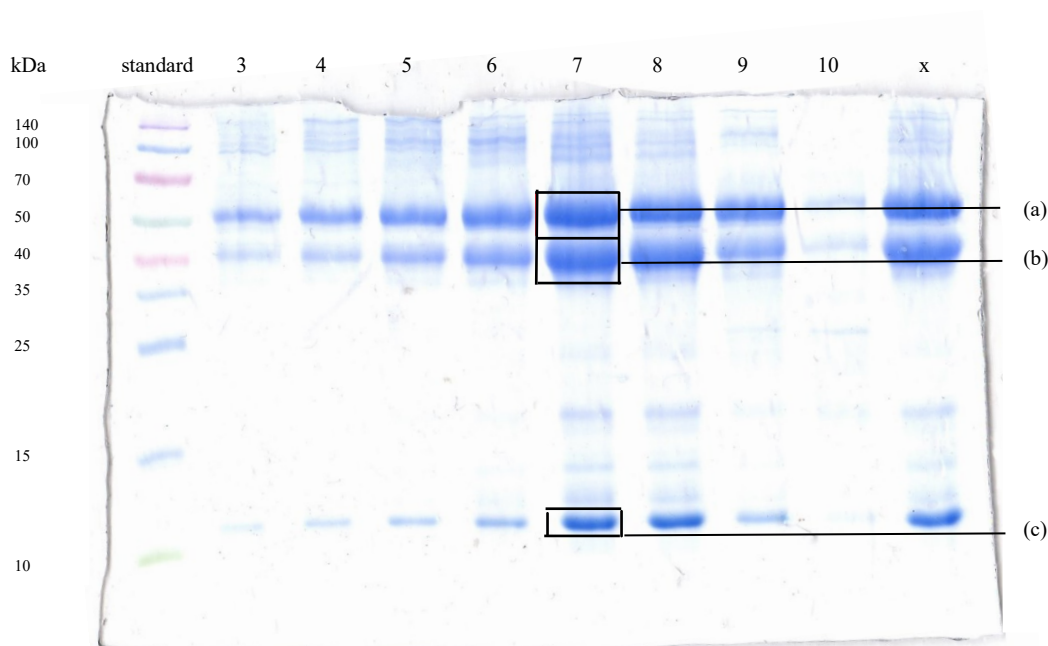
Na chromatogramu jsou číselně označeny jednotlivé frakce jímáné po 1 ml od sedmého mililitru znázorněného na ose V . Svislými čarami jsou vyznačeny frakce, se kterými bylo pracováno dále.

Na spektrofotometru DeNovix DS-11+ byla změřena absorbance při 280 nm u frakcí 6, 7, 8 a 9 uvedených na Obr. 10. Teoretická velikost proteinu odpovídá 46,5 kDa a jeho extinkční koeficient činí $41370 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Po proměření každé frakce bylo spočteno celkové množství produkovaného proteinu odpovídající 6,0 mg (Tab. 6, str. 57).

Tab. 6: Naměřené koncentrace frakcí LAP-TGF- β 3 získaných při gelové permeační chromatografii. Označení frakcí odpovídá Obr. 10, str. 56.

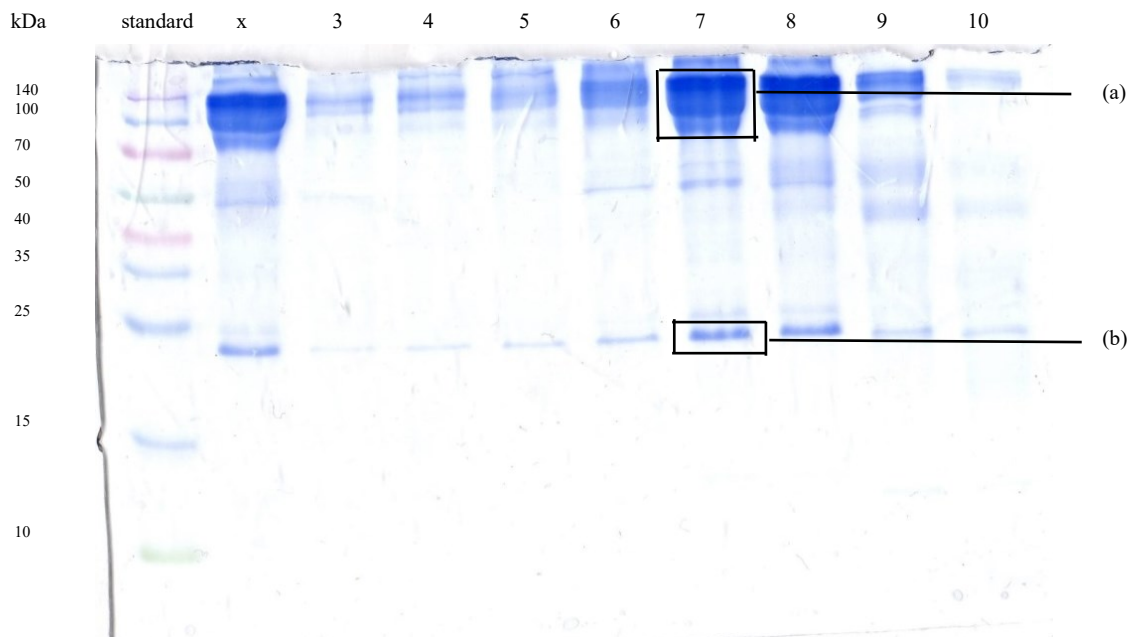
Frakce	Koncentrace (mg.ml ⁻¹)
6	0,71
7	2,36
8	2,29
9	0,60

U všech zmíněných frakcí byla provedena SDS elektroforéza na 12,5% polyakrylamidovém gelu a s ohledem na výše uvedená zjištění o struktuře růstového faktoru byla provedena v redukujícím i neredukujícím prostředí (Obr. 11 níže a Obr. 12, str. 58).



Obr. 11: SDS elektroforéza frakcí LAP-TGF- β 3 z gelové permeační chromatografie v redukujícím prostředí.

Číslo drah odpovídají frakcím získaných při gelové permeační chromatografii (Obr. 10, str. 56). Linie x představuje vzorek proteinu purifikovaného pouze chelatační afinitní chromatografií. Na základě teoretické hmotnosti produkovaného proteinu a jeho struktury se dá usoudit, že na gelu proužek (a) představuje neštěpený monomerní protein LAP-TGF- β 3, proužek (b) štěpený monomerní LAP a (c) monomerní štěpený TGF- β 3.



Obr. 12: SDS elektroforéza frakcí LAP-TGF- β 3 z gelové permeační chromatografie v neredukujícím prostředí.

Číslo drah odpovídají frakcím získaných při gelové permeační chromatografii (Obr. 10, str. 56). Linie x představuje vzorek proteinu purifikovaného pouze chelatační afinitní chromatografií. V neredukujícím prostředí by velikostně proužek (a) mohl při srovnání se standardem představovat velký latentní komplex tvořený dimerem LAP vázaného na dimer TGF- β 3. Proužek (b) by mohl představovat dimer TGF- β 3 uvolněný z latentního komplexu s LAP.

Eluovaný protein byl sterilně filtrován, zmrazen v tekutém dusíku a následně byl předán Dr. Dvořákové pro experiment, ve kterém sledovala, jaký efekt bude mít námi připravený růstový faktor na krysí mesenchymální kmenové buňky.

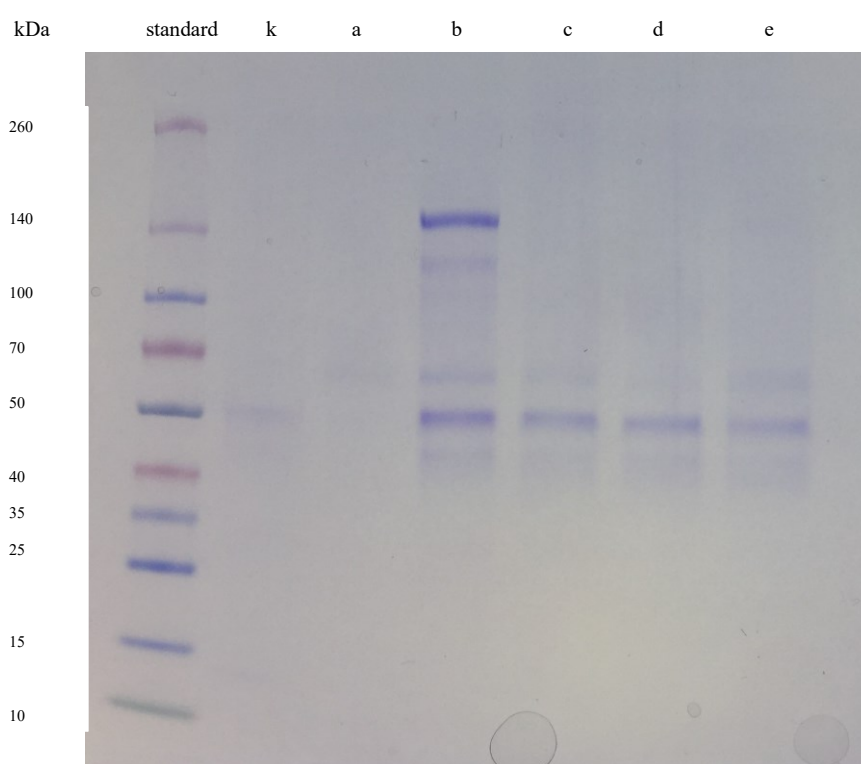
4.5 Vliv krysích mesenchymálních kmenových buněk na strukturu LAP-TGF- β 3

Při experimentech na krysích mesenchymálních kmenových buňkách byl protein rozpuštěn v DMEM médiu a buňky mu byly vystaveny bez navázání proteinu na polymerní nosič. Vzorky s použitým růstovým faktorem se nám vrátily v několika frakcích. Každá představovala jinou dobu inkubace kmenových buněk s růstovým faktorem. Ve všech koncentrace růstového faktoru na začátku experimentu odpovídala 2 μ g/ml a všechny frakce kromě kontrolní byly smíchány s kmenovými buňkami na koncentraci $7,24 \times 10^5$ buněk/ml. Alikvoty byly doplněny do objemu 7 ml mediem DMEM. Obdržené vzorky byly zkoncentrovány a purifikovány chelatační metodou se sorbentem vázaným na magnetických kuličkách. Výsledek purifikace byl zobrazen SDS elektroforézou v redukčním prostředí na 12,5% polyakrylamidovém gelu (Obr. 13, str. 59). Záměrem této experimentální práce bylo odhalit, jakým způsobem působí a

strukturně ovlivňují kmenové buňky námi vyprodukovaný růstový faktor, což by se teoreticky mělo projevit kolorimetrickou změnou na polyakrylamidovém gelu v intenzitě proužků proteinu.

Před elektroforézou se uvažovalo nad následující možnými scénáři:

- Buňky rozštěpily LAP-TGF- β 3 na LAP protein a TGF- β 3 protein.
- Buňky LAP-TGF- β 3 nerozštěpily.
- LAP-TGF- β 3 byl metabolizován na menší fragmenty.
- Buňky rozštěpily růstový faktor na LAP protein a TGF- β 3 protein a metabolizovaly je na menší fragmenty.



Obr. 13: SDS elektroforéza LAP-TGF- β 3 po inkubaci s krysími mesenchymálními kmenovými buňkami.

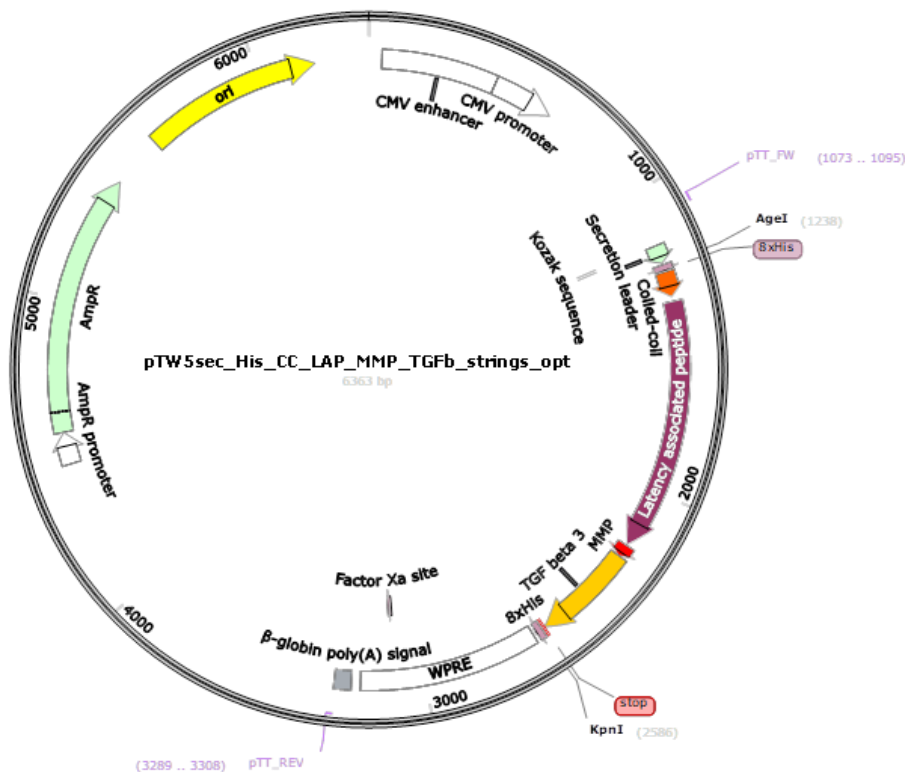
Purifikované vzorky byly smíchány s redukujícím pufrem. Linie (k) reprezentuje kontrolní vzorek růstového faktoru v DMEM médiu bez přidání kmenových buněk, linie (a) až (e) vzorky růstového faktoru v DMEM médiu inkubovaného s kmenovými buňkami po dobu: (a) 0 h, (b) 4 h, (c) 8 h, (d) 24 h, (e) 48 h.

Výsledek elektroforézy je těžké interpretovat, jelikož kontrolní vzorek na Obr. 13 vyšel bezvýsledně. Na liniích (b) až (e) však lze pozorovat proužek o velikosti ca 50 kDa, což by mohlo odpovídat neštěpenému LAP-TGF- β 3. Tento proužek v čase viditelně ztrácí na intenzitě, což by mohlo naznačovat na variantu, ve které je růstový faktor metabolizován na menší fragmenty, které byly zfiltrány do odpadní zkumavky při zkoncentrování proteinu. Za nejednoznačným zobrazením na gelu může stát řada faktorů,

například chyba práce při purifikaci na magnetických kuličkách, nedostatečná imobilizaci na magnetických kuličkách nebo došlo k degradaci proteinu.

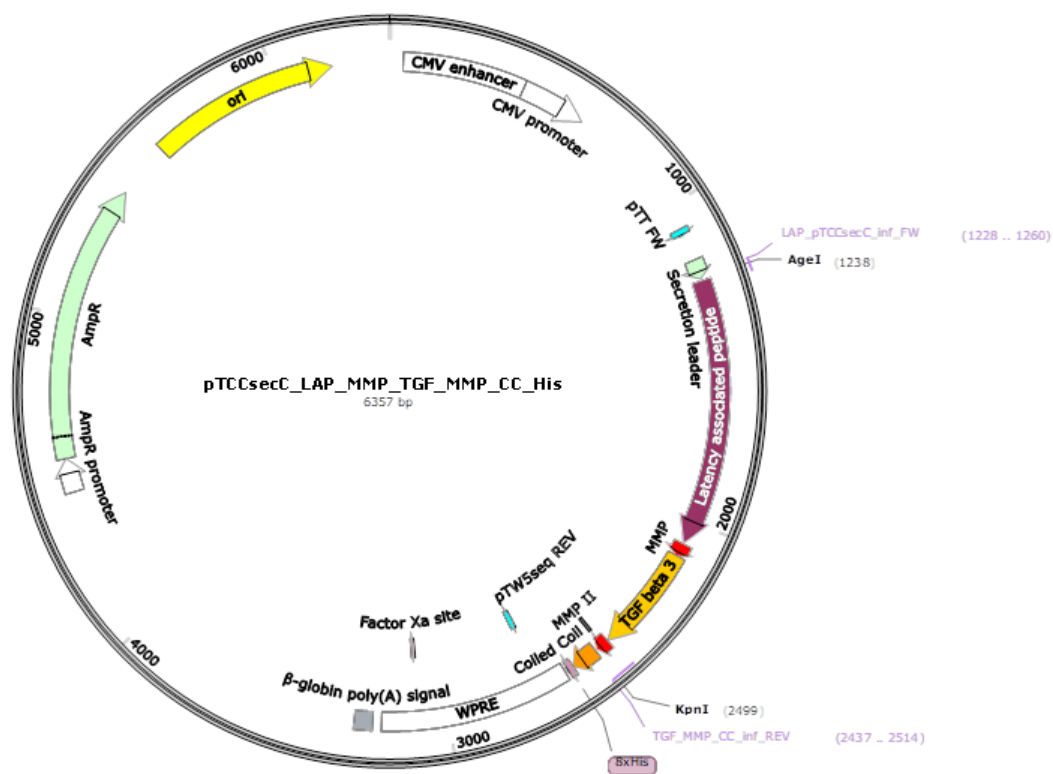
4.6 Příprava expresních vektorů pro produkci LAP-TGF-β3 s coiled-coil kotvou a jejich produkce v linii HEK293T

Za účelem přípravy růstového faktoru, který by bylo možné uchytit na polymerní nosič, byly navrženy konstrukty v plazmidu pTCCsecC, obsahujícím sekvenci kódující peptidovou coiled-coil kotvu, a pTW5sec, do kterého jsme gen s coiled-coil kotvou vkládali (Obr. 14). Coiled-coil motiv by se nekovalentně vázal ke komplementární coiled-coil sekvenci na postranních řetězcích polymerního polyaminokyselinového hydrogelu. U plazmidu pTCCsecC se coiled-coil kotva nachází na C-konci vloženého polypeptidového řetězce (Obr. 15, str. 61), analogicky byl navrhnout konstrukt do pTW5sec plazmidu, ve kterém se coiled-coil kotva nacházela na N-konci. Při vytváření návrhů jsme také uvažovali, jak připravit růstový faktor tak, aby se z nosiče uvolňoval řízeně a v aktivní konformaci. Do konstruktů jsme proto také zanesli sekvenci kódující oblast rozpoznatelnou a štěpitelnou matrix metaloproteinázy, které jsou buňkami produkovány při regeneraci a remodelaci tkání.



Obr. 14: Mapa vektoru pTW5sec s konstruktem His-CC-LAP-MMP-TGFβ3.

Exprimovaný protein by v tomto konstruktě měl nést histidinovou kotvu na N-konci před coiled-coil sekvencí následovanou LAP, sekvencí rozpoznatelnou a štěpitelnou MMP a samotným TGF-β3.

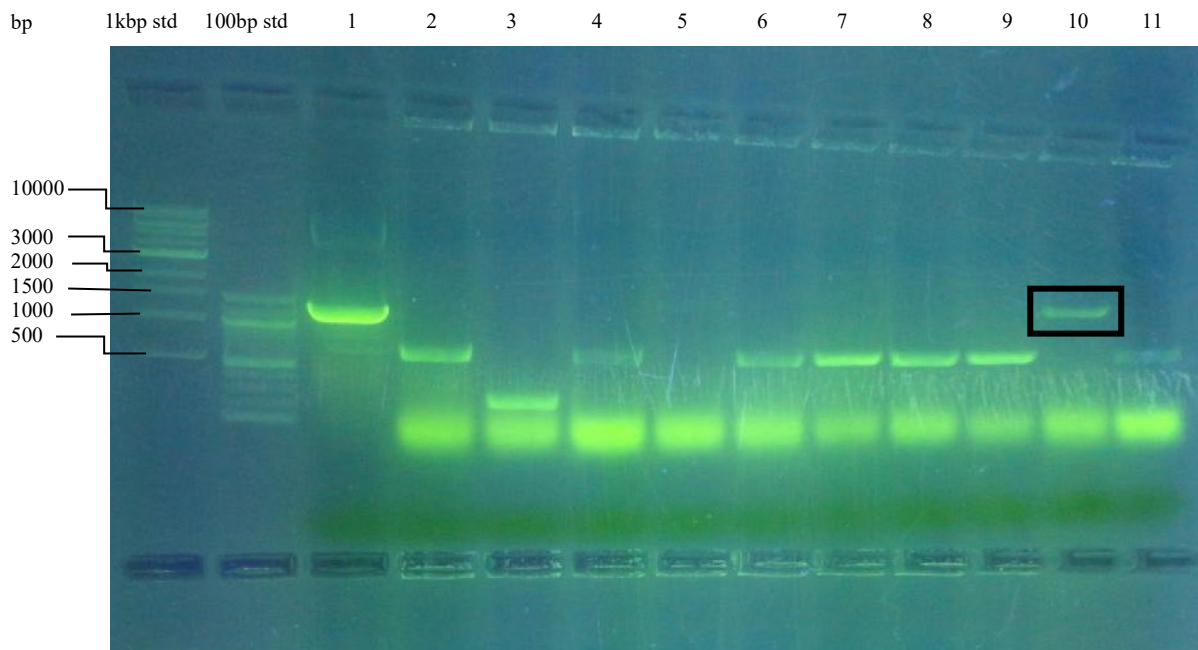


Obr. 15: Mapa vektoru pTCCsecC s konstruktem LAP-MMP-TGFβ3-MMP-CC-His.

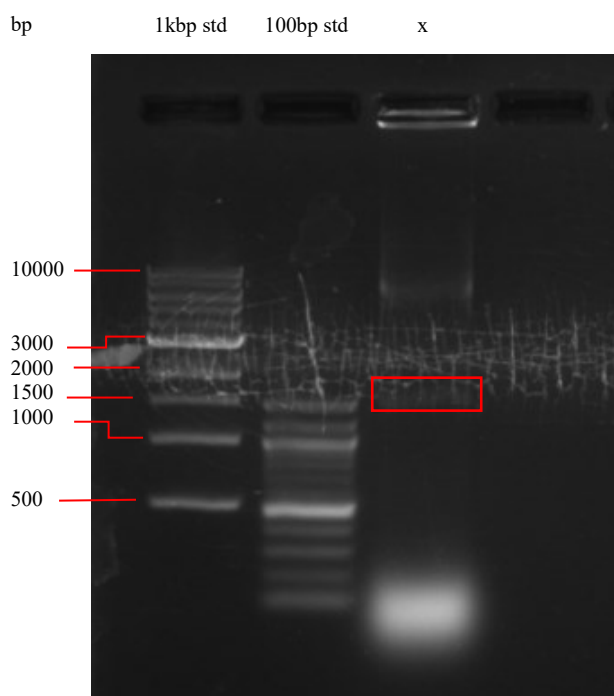
Exprimovaný protein by v tomto konstruktu měl počítat na N-konci LAP sekvencí, pokračovat MMP spojkou, TGF-β3 proteinem, další MMP spojkou, coiled-coil sekvencí a histidinovou kotvou na C-konci řetězce.

Plazmid pTW5sec byl linearizován restričními endonukleasami AgeI a KpnI přes noc v inkubátoru a po následné agarosové elektroforóze byl izolován z agarosového gelu. Za pomoci Quick Fusion reakce do něj byl vložen námi navrhnutý a objednaný syntetický DNA fragment. Ověření úspěšnosti klonování proběhlo pomocí PCR z kolonií narostlých bakterií NEB10, které byly transformovány našim konstruovaným plazmidem (Obr. 16, str. 62); byly použity sekvenační primery pTT_FW a pTW5seq_REV. U pozitivních kolonií, které na gelu vykazovaly amplifikovaný úsek o velikosti asi 2200 bp jsme provedli nízkoobjemovou izolaci plazmidu v bakteriích *E. coli* DH5α a správnost klonování jsme ověřili sekvenací DNA v Laboratoři sekvenace DNA (BIOCEV).

Obdobně byl připraven konstrukt v plazmidu pTCCsecC. Do plazmidu linearizovaného restričními endonukleasami AgeI a KpnI byl vložen zakoupený DNA fragment. Transformace do bakterií *E. coli* NEB10 byla zkontrolována PCR z kolonií a pozitivní kolonie byly připraveny na sekvenování (Obr. 17, str. 62).



Obr. 16: PCR z kolonií pro plazmid pTW5sec s konstruktem His-CC-LAP-MMP-TGF β 3. Agarosová elektroforéza v 1% gelu. Čísla 1-10 značí kolonie na živném SOB médiu s ampicilinem, které narostly po transformaci plazmidem a které byly vybrány pro PCR z kolonií. Pro ověření byla na sekvenaci vybrána kolonie 10, jejíž amplifikovaný úsek ve srovnání se standardem nejvíce odpovídal teoretické velikosti 2200 bp (na fotografii gelu označen obdélníkem).



Obr. 17: PCR z kolonií pro plazmid pTCCsecC s konstruktem LAP-MMP-TGF β 3-MMP-CC-His. Agarosová elektroforéza v 1% gelu. Po transformaci do bakterií *E. coli* NEB10 vyrostla na kultivační misce s ampicilinem jediná kolonie, u které byla provedena PCR z kolonií (dráha x). Velikost amplifikovaného úseku vyznačeného na fotografii gelu obdélníkem odpovídá ve srovnání se standardem jeho teoretické velikosti, která činí asi 1590 bp.

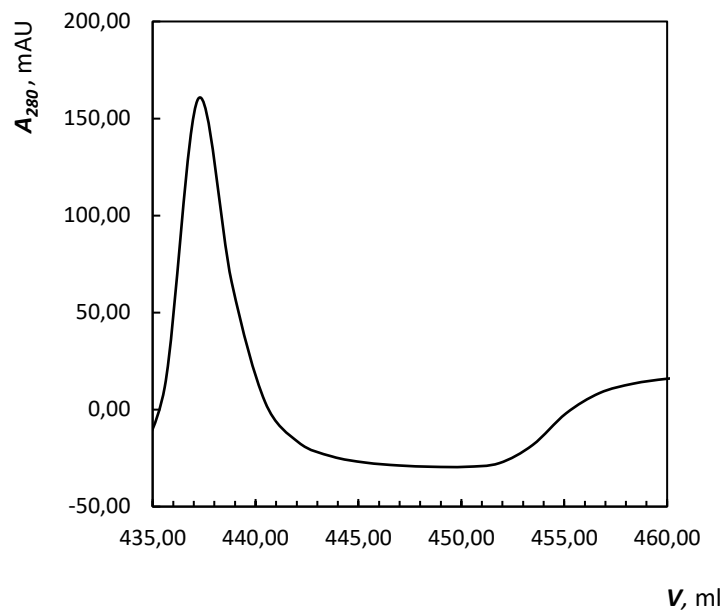
Sekvenace plazmidů prokázala úspěšné vložení našich konstruktů. Následovala velkoobjemová izolace plazmidové DNA v bakteriích *E. coli* DH5 α a příprava na transfekci do buněk HEK293T v objemu 400 ml ExCELL293 média. Průběh purifikace média ze sklizených buněk na chelatační afinitní chromatografii, gelové permeační chromatografii a SDS elektroforéza však ukázaly, že se protein nepodařilo produkovat ani v jednom případě.

Bylo navrženo několik dalších konstruktů s coiled-coil kotvou jak na N-konci, tak C-konci polypeptidového řetězce, žádný se nám však nepovedlo produkovat. Pro další experimenty bylo využito několik oligonukleotidů pro amplifikaci insertu a jeho přenos do jiného plazmidu, příkladem jsou LAP_pTCCsecC_inf_FW, TGF_MMP_CC_inf_REV, pTW5seq_REV, pTW5sec_TGFb3_INF_FW. Detailněji popsaná práce na produkci růstových faktorů s coiled-coil kotvou uvedená výše byla uvedena jen pro příklad; průběh přípravy se v dalších experimentech zásadně nelišil.

4.7 Produkce sortasy A7+

Vzhledem k neúspěšným produkcím růstového faktoru s coiled-coil kotvou jsme hledali jiné cesty jeho přípravy. Naše pozornost se proto přenesla na sortasu A, která by mohla přispět k řešení problému svými enzymatickými vlastnostmi, které umožňují ligovat k sobě proteiny, které nebyly geneticky kódovány jako jeden celek. Je však nutné připravit proteiny se specifickými zásahovými místy.

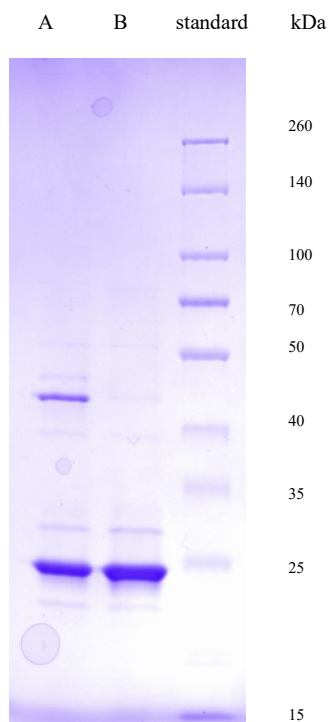
Zakoupili jsme plazmid pET30b s úsekem kódujícím sortasu A, mutanta 7+. Na rozdíl od jiných mutací, je tato ve své aktivitě nezávislá na přítomnosti vápenatých iontů. Plazmid byl zakoupen v bakteriích *E. coli* DH5 α v živném médiu. Plazmid byl po velkoobjemové izolaci z kultivovaných bakterií transformován do bakterií *E. coli* BL21(DE3). Narostlé kolonie byly naočkovány do 5 ml LB média s kanamycinem, proti kterému byly bakterie s plazmidem pET30b rezistentní, a inkubovány při 37 °C na třepačce do druhého dne. Následující den byla narostlá kultura převedena do většího objemu TB média. Bakterie byly třepány v TB médiu do doby, než OD₆₀₀ nedosáhla po několika hodinách hodnoty 0,6. Poté byla exprese zahájena přidáním IPTG a kultura byla třepána přes noc za teploty 30 °C. Bakterie byly druhý den sklizeny, lyzovány ultrazvukem a po odstředění byl zfiltrovaný supernatant nanesen na kolonu HisTrap Excel a produkovaný enzym byl purifikován (Obr. 18, str. 64). Molekulová hmotnost sortasy A7+ činí 17,8 kDa a její extinkční koeficient 12950 M⁻¹cm⁻¹. Spektrofotometricky bylo změřeno, že jsme připravili zásobní roztok enzymu o koncentraci 8,6 mg/ml.



Obr. 18: Chelatační afinitní chromatografie při purifikaci sortasy A7+.

Z celkového průběhu chromatografie je zobrazen pouze úsek s elucí sortasy A7+. Z grafu lze taky vyčíst, kolik objemově předcházela ekvilibrace kolony a purifikace, a jaký objem byl při eluci jímán.

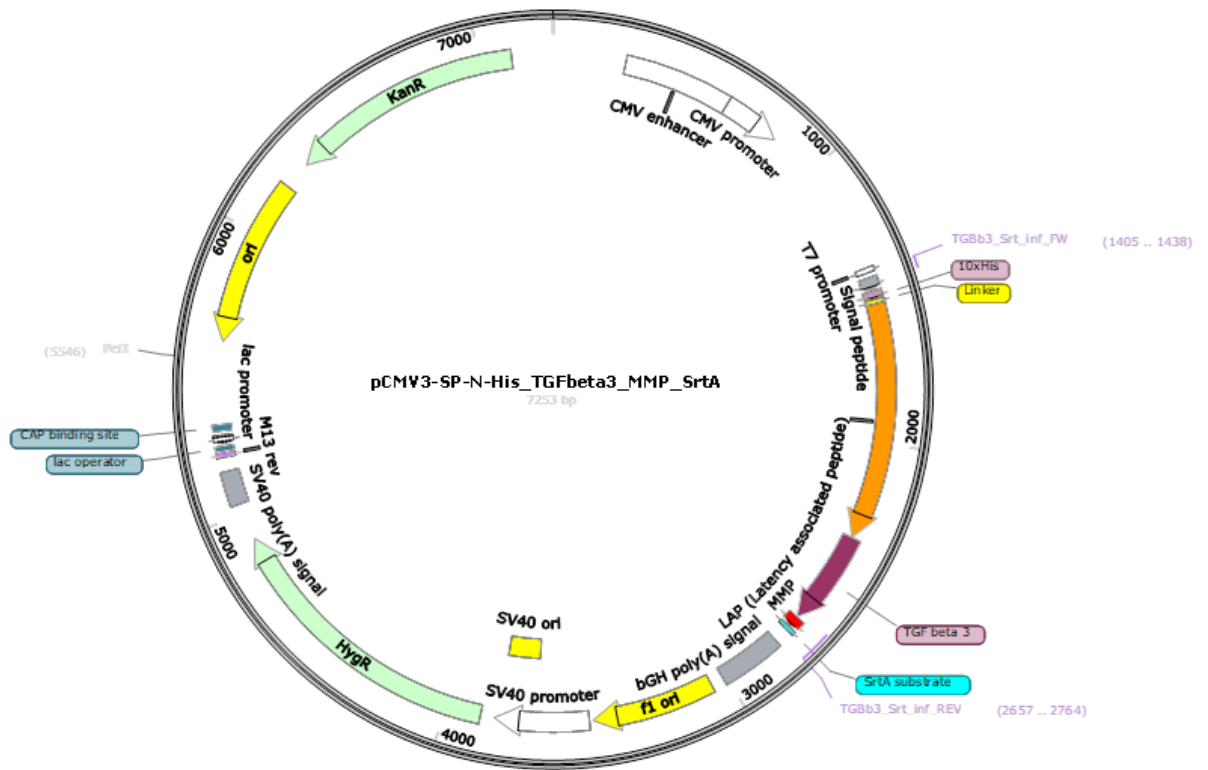
Eluovaný protein byl použit na SDS elektroforézu na 12,5% akrylamidovém gelu, kterou jsme potvrdili úspěšnost produkce (Obr. 19). Vzorek enzymu byl připraven v redukujícím i neredukujícím pufru.



Obr. 19: SDS elektroforéza produkované sortasy A7+.

(A) vzorek sortasy A7+ připravený v neredukujícím prostředí, (B) v redukujícím prostředí. Na záznamu v obou liniích lze pozorovat ve srovnání se standardem proužky přibližně odpovídající předpokládané velikosti sortasy A7+, tedy asi 18 kDa. V neredukujícím prostředí si lze povšimnout také proužku o velikosti kolem 40 kDa. Mohlo by se jednat o dimer sortasy A7+.

V poslední řadě byl navrhnut konstrukt v plazmidu pCMV3 (Obr. 20), u něhož by se využilo spojení enzymově katalyzovaného sortasou A k připojení exprimovaného proteinu na jiné proteiny s polyglycinovým N-koncem, pro naše účely na modifikovanou coiled-coil kotvu.



Obr. 20: Návrh plazmidu pCMV3 k produkci LAP-TGF- β 3 s motivem rozpoznávaným sortasou A. Za sekvenci LAP-TGF- β 3 byl vložen motiv LPETG rozpoznávaný sortasou A.

5. Diskuze

Relativně velkou výzvu představovala příprava růstového faktoru TGF- β 3 s coiled-coil kotvou, který měl být produkován pro další experimentální účely. Růstové faktory navázané na polymerní nosič aplikované na krysí mesenchymální kmenové buňky měly být využity pro studium aplikace řízeného uvolňování růstových faktorů z hydrogelů a studium jejich účinku. Výzvou se ukázala práce také proto, protože, jak již napovídala literatura, exprese růstového faktoru *in vitro* se dařila kvůli své složité struktuře nikoliv bez obtíží [43].

Mezi první produkované proteiny patřila aktivní forma růstového faktoru TGF- β 3, kterou se podařilo připravit sekrecí do média z plazmidu pCMV3 transfekcí lidských ledvinných embryonálních buněk HEK293T, které by měly poskytovat savčí rekombinantní proteiny se správnými a přirozenými post-translačními modifikacemi. Kvůli nízkému výtěžku 1,1 mg, který by nebyl pro práci na kmenových buňkách dostatečný, byl gen TGF- β 3 vložen do plazmidu pTW5sec obsahující sekreční signál ze sekretované alkalické fosfatasy, který teoreticky měl zajistit snadnější přenos proteinu přes biologickou membránu buněk. Po úspěšném klonování však byly pokusy o produkci v HEK293T bezúspěšné. Aktivní konformace růstových faktorů jsou na základě studií aplikace *in vivo* prezentovány jako vysoce nestabilní, mimo jiné i proto se práce zaměřila na produkci latentní formy LAP-TGF- β 3 [17].

LAP-TGF- β 3 vložený do plazmidu pCMV3 byl úspěšně exprimován v kultuře buněk HEK293T a po dvojí produkci a purifikaci gelovou permeační chromatografií jsme získali necelých 6 mg proteinu. Výsledek SDS elektroforézy potvrdil dimerní strukturu růstového faktoru (Obr. 11, str. 57). Aplikovaný latentní růstový faktor smíšený s volnými mesenchymálními buňkami v médiu viditelně na gelu po SDS elektroforéze neprokázal štěpení růstového faktoru (Obr. 13, str. 58). Je možné se pouze domnívat, zdali došlo ke štěpení části LAP-TGF- β 3 a štěpené fragmenty byly metabolizovány na menší fragmenty, nebo byl rozložen celý latentní růstový faktor jako takový.

Hlavním záměrem této práce bylo připravit růstový faktor tak, aby jej bylo možné navázat na polymerní aminokyselinové hydrogely připravované týmem Dr. Dvořákové z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. Přípravou růstového faktoru s motivem coiled-coil kotvy na jednom z konců polypeptidového řetězce mělo být řešeno toto navázání nekovalentními vazbami ke coiled-coil kotvě modifikovaného polyaminokyselinového hydrogelu. Pro řízené uvolňování růstového faktoru byly

pozdější konstrukty růstového faktoru opatřeny MMP spojkou štěpitelnou metaloproteinasi uvolňovanými mesenchymálními buňkami (Obr. 14, 15, str. 60-61). Ačkoliv proběhlo několik úspěšných klonování plazmidů s našimi konstrukty, transfekované buňky HEK293T nevyprodukovaly ani v jednom z případů protein s vázanou coiled-coil kotvou. V některých případech došlo k produkci proteinu, po proběhlé SDS elektroforéze a imunodetekci histidinové kotvy na nitrocelulosové membráně bylo však těžké identifikovat detekované fragmenty, jelikož velikostně neodpovídaly žádnému z fragmentů, které by vznikly štěpením dimerů růstového faktoru.

Pro budoucí práci se nabízí možnost optimalizace podmínek zmíněných neúspěšných produkcí růstových faktorů, experimentování s odlišnými konstrukty či využití bakteriálních systémů pro expresi. U bakteriálních systémů by však exprese nemusela poskytnout formu růstového faktoru fyziologicky totožnou jako pro savčí buňky, což by mohlo mít negativní dopad na rozpoznávání růstových faktorů receptory na povrchu buněčných membrán buněk. Gely s fragmenty separovanými SDS elektroforézou, získané produkcí růstových faktorů s coiled-coil kotvou, by bylo možné pro větší pochopení translace proteinu dále analyzovat u těchto konstruktů například hmotnostní spektroskopií vybraných úseků gelu, které byly při imunodetekci histidinové kotvy pozitivně zobrazeny na membráně.

Jednou z dalších variant přípravy růstových faktorů s coiled-coil kotvou je její připojení pomocí specifického enzymatického vázání s využitím enzymu sortasy A7+, která byla úspěšně produkována v bakteriích *E. coli* BL21(DE3), kdy bylo získáno její zásobní množství o koncentraci 8,6 mg/ml. Její aplikace však již nebyla v této práci využita pro tyto účely. Nicméně sortasa A7+ je od té doby v laboratoři vedoucího práce dále využívána a testována pro jiné účely jako tvorbu fúzních bispecifických terapeutických proteinů či fluorescenční značení proteinů pro superrozlišovací mikroskopii. Příprava sortasy A tak představuje hlavní výstup této diplomové práce.

6. Závěr

V rámci práce se povedlo produkovat dostatečné zásobní množství latentní formy růstového faktoru LAP-TGF- β 3 pro experimentální využití na krysích mesenchymálních kmenových buňkách a od přípravy aktivní formy bylo upuštěno. Byly navrhnuty konstrukty růstového faktoru s coiled-coil kotvou, jejich produkce se však nezdařila. To by do budoucna mohla změnit sortasa A7+, která byla úspěšně připravena v bakteriálním expresním systému.

Seznam použité literatury

1. Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špišek, R.: *Základy imunologie*. 6. vydání, Praha, TRITON (2017).
2. Julier, Z.; Park, A. J.; Briquez, P. S.; Martino, M. M.: Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomaterialia*. **53**, 13-28 (2017).
3. Vannella, K. M.; Wynn, T. A.: Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annual Review of Physiology*. **79**, 593-617 (2017).
4. Takeuchi, O.; Akira, S.: Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. **140**:6, 805-820 (2010).
5. Kono, H.; Onda, A.; Yanagida, T.: Molecular determinants of sterile inflammation. *Current Opinion in Immunology*. **26**, 147-156 (2014).
6. Bujak, M.; Dobaczewski, M.; Chatila, K.; Mendoza, L. H.; Li, N.; Reddy, A.; Frangogiannis, N. G.: Interleukin-1 Receptor Type I Signaling Critically Regulates Infarct Healing and Cardiac Remodeling. *The American Journal of Pathology*. **173**:1, 57-67 (2008).
7. Suga, H.; Sugaya, M.; Fujita, H.; Asano, Y.; Tada, Y.; Kadono, T.; Sato, S.: TLR4, rather than TLR2, regulates wound healing through TGF- β and CCL5 expression. *Journal of Dermatological Science*. **73**:2, 117-124 (2014).
8. Kolaczowska, E.; Kubes, P.: Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 159-175 (2013).
9. Horckmans, M.; Ring, L.; Duchene, J.; Santovito, D.; Schloss, M. J.; Drechsler, M.; Weber, Ch.; Soehnlein, O.; Steffens, S.: Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *European Heart Journal*. **38**:3, 187-197 (2016).
10. Wynn, T. A.; Vannella, K. M.: Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. **44**:3, 450-462 (2016).
11. Gurtner, C. G.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M. T.: Wound repair and regeneration. *Nature*. **453**, 314-321 (2008).
12. Arnold, L.; Henry, A.; Poron, F.; Baba-Amer, Y.; van Rooijen, N.; Plonquet, A.; Gheraldi, R. K.; Chazaud, B.: Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. **204**:5, 1057-1069 (2007).
13. Nahrendorf, M.; Swirski, F. K.; Aikawa, E.; Stangenberg, L.; Wurdinger, T.; Figueiredo, J. L.; Libby, P.; Weissleder, R.; Pittet, M. J.: The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *Journal of Experimental Medicine*. **204**:12, 3037-3047 (2007).
14. Murray, L. A.; Chen, Q.; Kramer, M. S.; Hesson, D. P.; Argentieri, R. L.; Peng, X.; Gulati, M.; Homer, R. J.; Russell, T.; van Rooijen, N.; Elias, J. A.; Hogeboom, C. M.; Herzog, E. L.: TGF-beta driven lung fibrosis is macrophage dependent and blocked by Serum amyloid P. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **43**:1, 154-162 (2011).
15. Pradere, J. P.; Kluwe, J.; De Minicis, S.; Jiao, J. J.; Gwak, G. Y.; Dapito, D. H.; Jang, M. K.; Guenther, N. D.; Mederacke, I.; Friedman, R.; Dragomir, A. C.; Aloman, C.; Schwabe, R. F.: Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*. **58**:4, 1461-1473 (2013).

16. Liu, Yi; Kikuri, T.; Akiyama, K.; Chen, Ch.; Xu, X.; Yang, R.; Chen, W.; Wang, S.; Shi, S.: Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nature Medicine*. **17**, 1594-1601 (2011).
17. Park, J. W.; Hwang, S. R.; Yoon I. S.: Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules*. **22**:8, 1259 (2017).
18. Schultz, G. S.; Wysocki, A.: Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. **17**:2, 153-162 (2009).
19. Mast, B. A.; Diegelmann, R. F., Krummel; T. M., Cohen, I. K.: Hyaluronic acid modulates proliferation collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix*. **13**, 441-446 (1993).
20. McGeachie, J.; Tennant, M.: Growth factors and their implications for clinicians: A brief review. *Australian Dental Journal*. **42**:6, 375-380 (1997).
21. Caballero Aguilar, L. M.; Silva, S. M.; Moulton, S. E.: Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. **306**, 40-58 (2019).
22. Steenfoss, H. H.: Growth factors and wound healing. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*. **28**:2, 95-105 (1994).
23. Pfeilschifter, P.: Transforming growth factor beta. In: *Growth factors, differentiation factors, and cytokines*. Habenicht, A. (ed.). Berlin: Springer-Verlag, 1990, s. 56-64 (1990).
24. Carter, K.: Growth factors: the wound healing therapy of the future? *British Journal of Community Nursing*. **8**, 15-16, 18-19, 22-23 (2003).
25. Sudbeck, B. D.; Parks, W. C.; Welgus, H. G.; Pentland, A. P.: Collagen-stimulated induction of keratinocyte collagenase is mediated via tyrosine kinase and protein kinase C activities. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**:47, 30022-30029 (1994).
26. Schlessinger, J.; Plotnikov, A. N.; Ibrahimi, O. A.; Eliseenkova, A. V.; Yeh, B. K.; Yayon, A.; Linhardt, R. J.; Mohammadi, M.: Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Molecular Cell*. **6**:3, 743-750 (2000).
27. Houck, K. A.; Leung D. W.; Rowland, A. M.; Winer, J.; Ferrara, N.: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. **267**, 26031-26037 (1992).
28. Edwards, D. R.; Murphy, G., Reynolds; J. J., Whitham, S. E.; Docherty, A. J.; Angel, P.; Heath, J. K.: Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *The EMBO Journal*. **6**:7, 1899-1904 (1987).
29. Zarei, F.; Soleimaninejad, M.: Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. **46**, 906-911 (2018).
30. Bhardwaj, N.; Devi, D.; Mandal, B. B.: Tissue-Engineered Cartilage: The Crossroads of Biomaterials, Cells and Stimulating Factors. *Macromolecular Bioscience*. **15**:2, 153-182 (2014).
31. Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Chichester, C. O.; Pittenger, M. F.: Chondrogenic Differentiation of Cultured Human Mesenchymal Stem Cells from Marrow. *Tissue Engineering*. **4**:4, 415-428 (1998).
32. Kim, Y. V.; Gasparian, M. E.; Bocharov, E. V.; Chertkova, R. V.; Tkach, E. N.; Dolgikh, D. A.; Kirpichnikov, M. P.: New Strategy for High-Level Expression and Purification of Biologically Active Monomeric TGF- β 1/C77C in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*. **57**:2, 160-171 (2014).

33. Batlle, E.; Massagué, J.: Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. **50**:4, 924-940 (2019).
34. Shi, M.; Zhu, J.; Wang, R.; Wang, R.; Chen, X.; Mi, L.; Walz, T.; Springer, T. A.: Latent TGF- β structure and activation. *Nature*. **474**, 343–349 (2011).
35. Robertson, I. B.; Horiguchi, M.; Zilberberg, L.; Dabovic, B.; Hadjiolova, K.; Rifkin, D. B.: Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix Biology*. **47**, 44-53 (2015).
36. Koli, K.; Ryyänen, M. J.; Keski-Oja, J.: Latent TGF- β binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*. **43**:4, 679-688 (2008).
37. Yoshinaga, K.; Obata, H.; Jurukovski, V.; Mazzieri, R.; Chen, Y.; Zilberberg, L.; Huso, D.; Melamed, J.; Prijatelj, P.; Todorovic, V.; Dabovic, B.; Rifkin, D. B.: Perturbation of transforming growth factor (TGF)- β 1 association with latent TGF- β binding protein yields inflammation and tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**:48, 18758-18763 (2008).
38. Hinz, B.: The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biology*. **47**, 54-65 (2015).
39. Khalil, N.: TGF- β : from latent to active. *Microbes and Infection*. **1**:15, 1255-1263 (1999).
40. Massagué, J.: TGF β signalling in context: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **13**, 616-630 (2012).
41. Graycar, J. L.; Miller, D. A.; Arrick, B. A.; Lyons, R. M.; Moses, H. L.; Derynck, R.: Human Transforming Growth Factor- β 3: Recombinant Expression, Purification, and Biological Activities in Comparison with Transforming Growth Factors- β 1 and - β 2. *Endocrine*. **8**:3, 291-299 (1998).
42. Mittl, P. R. E.; Priestle, J. P.; Cox, D. A.; McMaster, G.; Cerletti, N.; Grütter, M. G.: The crystal structure of TGF- β 3 and comparison to TGF- β 2: Implications for receptor binding. *Protein Science*. **5**:7, 1261-1271 (1996).
43. Mitchell, A. C.; Briquez, P. S.; Hubbell, J. A.; Cochran, J. R.: Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomaterialia*. **30**, 1-12 (2005).
44. Ren, X.; Zhao, M.; Lash, B.; Martino, M. M.; Julier, Z.: Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **7**: 469, 1-9 (2020).
45. Chen, F.-M.; Zhang, M.; Wu, Z.-F.: Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*. **31**:24, 6279-6308 (2010).
46. Lee, K.; Silva, E. A.; Mooney, D. J.: Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the Royal Society Interface*. **8**:55, 153-170 (2011).
47. Sakiyama-Elbert, S. E.; Panitch, A. & Hubbell, J. A.: Development of growth factor fusion proteins for cell-triggered drug delivery. *FASEB Journal*. **15**, 1300–1302 (2001).
48. Mann, B. K.; Schmedlen, R. H.; West, J. L.: Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* **22**, 439–444 (2001).
49. Hamley, I. W.: Small Bioactive Peptides for Biomaterials Design and Therapeutics. *Chemical Reviews*. **117**:24, 14015-14041 (2017).
50. Parnham M. J.; Bruinvels J.: *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*. Basel, Die Deutsche Bibliothek (2009).

51. Zheng, D.; Dan, Y.; Huang, P.; Xia, T.; Yang, S.; Xu, W.; Yang, C.; Liu, G.; Liu, X.; Feng, Y.: Induction of Chondrogenesis of Adipose-derived Stem Cells by Novel Recombinant TGF- β 3 Fusion Protein. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. **33**:4, 536-542 (2013).
52. Zheng, D.; Dan, Y.; Yang, S.; Liu, G.; Shao, Z.; Yang, C.; Xiao, B.; Liu, X.; Wu, S.; Zhang, T.; Chu, P. K.: Controlled chondrogenesis from adipose-derived stem cells by recombinant transforming growth factor- β 3 fusion protein in peptide scaffolds. *Acta Biomaterialia*. **11**, 191-203 (2015).
53. Miyanishi, K.; Trindade, M. C. D.; Lindsey, D. P.; Beaupré, G. S.; Carter, D. R.; Goodman, S. B.; Schurman, D. J.; Smith, R. L.: Effects of Hydrostatic Pressure and Transforming Growth Factor- β 3 on Adult Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis *In Vitro*. *Tissue Engineering*. **12**:6, 1419-1428 (2006).
54. Park, W. M.: Coiled-Coils: The Molecular Zippers that Self-Assemble Protein Nanostructures. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**:10, 3584 (2020).
55. Pechar, M.; Pola, R.; Laga, R.; Braunová, A.; Filippov, S. K.; Bogomolova, A.; Bednárová, L.; Vaněk, O.; Ulbrich, K.: Coiled Coil Peptides and Polymer-Peptide Conjugates: Synthesis, Self-Assembly, Characterization and Potential in Drug Delivery Systems. *Biomacromolecules*. **15**:7, 2590-2599 (2014).
56. Assal, Y.; Mizuguchi, Y.; Mie, M.; Kobatake, E.: Growth Factor Tethering to Protein Nanoparticles via Coiled-Coil Formation for Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*. **26**:8, 1672-1677 (2015).
57. Dai, X.; Böker, A.; Glebe, U.: Broadening the scope of sortagging. *RSC Advances*. **9**, 4700-4721 (2019).
58. Mazmanian, S. K.; Liu, G.; Ton-That, H.; Schneewind, O.: Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*. **285**, 760-763 (1999).
59. Brogiere, N.; Formica, F. A.; Barreto, G.; Zenobi-Wong, M.: Sortase A as a cross-linking enzyme in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. **77**, 182-190 (2018).
60. Pishesha, N.; Ingram, J. R.; Ploegh, H. L.: Sortase A: A Model for Transpeptidation and Its Biological Applications. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **34**, 163-188 (2018).
61. Wu, Z.; Hong, H.; Zhao, X.; Wang, X.: Efficient expression of sortase A from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* and its enzymatic characterizations. *Bioresources and Bioprocessing*. **4**:13 (2017).