

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Příprava expresního vektoru pro produkci receptorů CD69 a S1P1**

Preparation of expression vector for production of receptors CD69 and S1P1

**Adrian Leontový**

Bakalářská práce

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

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze dne.....

Podpis.....

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost a snahu naučit mě novým dovednostem. Dále prof. RNDr. Karlovi Bezouškovi, DSc. za možnost vypracování bakalářské práce v jeho laboratoři a všem členům laboratoře 204, zejména Mgr. Janu Bláhovi za jeho cenné rady a ochotu pomoci. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

## **Abstrakt:**

T- a B-lymfocyty hrají klíčovou roli v imunitním systému, nebo v organismu zajišťují specifickou imunitu. Receptor S1P1 reguluje uvolnění lymfocytů z lymfatických orgánů do krve, odkud pak putují k místu infekce. Bylo zjištěno, že transmembránový helix 4 receptoru S1P1 interaguje s transmembránovou částí receptoru CD69 a tato interakce je následně zodpovědná za zadržení lymfocytů v lymfatických orgánech. Cílem této práce bylo připravit expresní plazmidy pro produkci těchto dvou receptorů a jejich další výzkum.

## **Abstract:**

T- and B- lymphocytes play a key role in immunity, because they provide specific immunity in organism. Receptor S1P1 regulates lymphocyte egress from lymphoid organs to blood, from which the lymphocytes travel to the site of infection. It was discovered that transmembrane helix 4 of S1P1 receptor interacts with transmembrane part of CD69 receptor and this interaction is responsible for retention of lymphocytes in lymphoid organs. The aim of this study is to prepare expression plasmids for production of these two receptors and their further research.

## **Klíčová slova:**

S1P1, CD69, lymfocyt

## **Key words:**

S1P1, CD69, lymphocyte

# Obsah

Seznam zkratk.....	7
1. Úvod.....	9
1.1. Imunitní systém.....	9
1.1.1. Imunitní mechanismy.....	9
1.1.2. Buňky imunitního systému.....	9
1.1.3. B- a T-lymfocyty.....	10
1.2. Lektiny.....	12
1.2.1. Lektiny C-typu.....	12
1.2.2. Receptor CD69.....	13
1.3. Receptory spážené s G-proteinem.....	14
1.3.1. Sfingosin-1-fosfátový receptor 1 (S1P1).....	16
1.3.2. Interakce receptor CD69 a S1P1.....	17
2. Cíl práce.....	18
3. Materiál.....	19
3.1. Pístroje a pomůcky.....	19
3.2. Chemikálie.....	20
3.3. Enzymy.....	20
3.4. Bakteriální kmeny a buněčné linie.....	20
3.5. Plazmidy.....	20
3.6. Primery.....	20
3.7. Roztoky a pufrů.....	21
4. Metody.....	22
4.1. Příprava expresního vektoru.....	22
4.1.1. Amplifikace inzert.....	22
4.1.2. Agarosová elektroforéza.....	22
4.1.3. Srážení DNA ethanolem.....	23
4.1.4. Štěpení inzert a plazmidu pTW5 restrikčními endonukleasami.....	23

4.1.5.	P e išt ní inzer t a plazmidu a agarosová elektroforéza .....	23
4.1.6.	Ligace inzer t do plazmidu pTW5.....	23
4.1.7.	Transformace plazmidu do bun k .....	24
4.1.8.	PCR z kolonií .....	24
4.1.9.	Izolace plazmidu .....	24
4.1.10.	Sekvenace.....	25
4.1.11.	Velkoobjemová p íprava plazmidu .....	25
5.	Výsledky.....	27
5.1.	P íprava inzer t .....	27
5.2.	P íprava expresních vektor .....	28
6.	Diskuze.....	32
7.	Záv r.....	33
8.	Seznam použité literatury .....	34
8.1.	Seznam p evzatých obrázk .....	36

## Seznam zkratek:

APC	antigen prezentující buňka (z angl. antigen presenting cell)
BCR	receptor B-buňky (z angl. B cell receptor)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
bp	pár bazí, jednotka délky křehké DNA (z angl. base pair)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CaSR	vápníkový senzor (z angl. calcium-sensing receptor)
CD	označení povrchových molekul leukocytů (z angl. cluster of differentiation)
CRD	doména rozpoznávající sacharid (z angl. carbohydrate recognition domain)
CTLD	doména podobná lektinům C-typu (z angl. C-type lectin-like domain)
dNTPs	směs deoxynukleosidtrifosfátů
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GDP	guanosindifosfát
GPCR	receptor spážený s G-proteinem (z angl. G-protein coupled receptor)
GTP	guanosintrifosfát
HEK	označení buněčné linie lidských embryonálních ledvinných buněk číslo 293 (z angl. human embryonic kidney 293)
LB	Luria Bertani medium
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
NK	přirozený zabíjece (z angl. natural killer)
NKR-P1A	rodina C-lektinových receptorů NK buněk (z angl. natural killer cell receptor - protein 1A)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
RGS	regulátor signalizace pomocí G-proteinu (z angl. regulator of G-protein signalling)
S1P	sfingosin-1-fosfát
S1P1	sfingosin-1-fosfátový receptor 1
S1P3	sfingosin-1-fosfátový receptor 3
TAE	tris-acetátový pufr s EDTA
TAS	chuťový receptor (z angl. taste receptor)
T <sub>C</sub>	cytotoxický T-lymfocyt (z angl. T cytotoxic cell)
TCR	receptor T-buňky (z angl. T cell receptor)

T <sub>H</sub>	pomocný T-lymfocyt (z angl. T helper cell)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
WPRE	posttranskripční regulační sekvence (z angl. Woodchuck posttranscriptional regulatory element)



# 1. Úvod

## 1.1. Imunitní systém

Imunitní systém je souhrn mechanismů udržujících integritu organismu rozpoznáváním a likvidací škodlivin z vnitřního i vnějšího prostředí. Funkce imunitního systému se projevuje jako obranyschopnost, což je rozpoznávání vnějších škodlivin jako jsou patogenní mikroorganismy a ochrana proti nim, autotolerance – imunitní systém dokáže rozpoznat vlastní tkáň a udržovat vůči nim toleranci, a imunitní dohled, což je rozpoznávání vnitřních škodlivin, jako jsou staré, poškozené nebo mutované buňky a jejich odstranění [1].

### 1.1.1. Imunitní mechanismy

Imunitní mechanismy se dělí na dvě kategorie: nespecifické (neadaptivní) a antigen specifické (adaptivní).

Evolučně starší nespecifické mechanismy jsou založeny na molekulách a buňkách, které reagují na společné strukturní nebo funkční rysy patogenů. Nespecifické imunitní mechanismy jsou tvořeny složkami buněnými (fagocytyující buňky a přirozeně cytotoxické buňky – NK buňky, „natural killer cells“) a humorálními (komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny). Reakce nespecifických složek imunitního systému je rychlá (řádově několik minut).

Evolučně mladší specifické mechanismy reagují na cizorodé struktury prostředí vysokou specifických molekul a aktivují se až po setkání s antigenem. Humorální mechanismy jsou založené na protilátkách a buněčně zprostředkované hlavně na T-lymfocytech. Úplné rozvinutí specifické imunitní reakce je časově náročný proces, který může trvat několik dní až týdnů. Specifická imunita je schopná zapamatovat si patogen, se kterým už se setkala, což významně urychlí imunitní odpověď, pokud dojde k opětovnému setkání s daným patogenem [1].

### 1.1.2. Buňky imunitního systému

Velmi důležitou roli hrají v imunitním systému různé druhy bílých krvinek (leukocytů). Leukocyty pocházejí z pluripotentních kmenových buněk, které se nacházejí v kostní dřeni a udržují se zde v malém množství po celý život. Podobením různých faktorů se kmenové

bu ky diferenciují na r zné typy leukocyt , které se dají rozdílit do dvou základních linií: myeloidní a lymfoidní. Úbytek kmenových buněk způsobený diferenciací je kompenzován jejich dělením.

Z myeloidní linie vznikají monocyty, ze kterých později vznikají makrofágy; ti dva druhy granulocytů: neutrofilů, eozinofilů a bazofilů; a dendritické buňky. Myeloidní buňky tvoří základ nespecifické části imunitního systému. Produkují cytokiny a další rozpustné mediátory a většina z nich je schopna fagocytovat. Velmi důležitá je funkce dendritických buněk, monocytů a makrofágů, které také působí jako buňky prezentující antigen (APC, „antigen-presenting cells“) pro T-lymfocyty, čímž se stávají součástí antigenově specifické části imunitního systému. Z myeloidní linie vznikají také červené krvinky (erytrocyty) a krevní destičky (trombocyty). Jejich hlavní funkce s imunitou nesouvisí, ale v nich kterých imunitních dějích (například zánět) mají určitý význam.

Z lymfoidní linie se diferenciují NK buňky, lymfocyty B a T. B lymfocyty se vyvíjejí v kostní dřeni a dozrávají v sekundárních lymfatických orgánech po setkání s antigenem. T-lymfocyty dozrávají v brzlíku, který opouští jako buňky jako prekurzory pomocných T-buněk ( $T_H$ ) nebo prekurzory cytotoxických buněk ( $T_C$ ). Tyto prekurzory se po setkání s antigenem diferenciují na zralé efektorové buňky [1].

### 1.1.3. B- a T-lymfocyty

B-lymfocyty hrají důležitou roli při humorální imunitní odpovědi. Je pro ně charakteristická přítomnost BCR receptoru („B-cell receptor“, receptor B-buněk), který je schopný specificky vázat antigen. Jejich hlavní funkcí je vyrábět protilátky proti antigenům a také pracují jako buňky prezentující antigen. B-lymfocyty vznikají v kostní dřeni jako prekurzory plazmatických neboli efektorových B-lymfocytů a paměťových buněk a dozrávají v sekundárních lymfatických orgánech. V průběhu zrání dochází k přeskupování genů v jaderné DNA a díky tomu BCR receptory (což jsou v podstatě imunoglobuliny), které daný zralý B-lymfocyt produkuje, mají zcela unikátní strukturu. Pokud B-lymfocyt rozpozná antigen, je stimulován kostimulačními signály  $T_H2$ -lymfocytů a dojde k jeho pomnožení a přeměně na plazmatické lymfocyty. Ty produkují velké množství protilátek stejné specifity, jako povodní BCR a váží se tedy na stejný antigen, čímž napomáhají k opsonizaci antigenu a umožňují tím ostatním buňkám, aby ho našly a zneškodnily.

B-buňky se mohou také vyvinout v paměťové buňky, které jsou schopné rozpoznat antigen, se kterým se už jednou setkaly, což velice urychlí imunitní odpověď.

T-lymfocyty jsou základem specifické imunity. P i r stu opouští kostní d e a migrují do brzlíku, kde dozrávají. V dosp losti se vývoj lymfocyt v brzlíku zastavuje, jejich po et je udržován díky dlouhožijícím individuálním T-bu kám a d lením zralých T-bun k mimo primární lymfatické orgány. Je pro n charakteristický TCR receptor („T-cell receptor“, receptor T-bun k), který dokáže rozpoznat antigen navázaný na MHC komplexu („major histocompatibility complex“, hlavní histokompatibilní komplex). Existuje n kolik typ T-lymfocyt :

- Pomocné T-lymfocyty ( $T_H$ -lymfocyty) stimulují ostatní bu ky imunitního systému prost ednictvím cytokin . N kdy jsou nazývány  $CD4^+$  lymfocyty, protože obsahují  $CD4$  receptor. Lze rozlišit dva r zné typy  $T_H$ -bun k,  $T_{H1}$ -lymfocyty, které stimulují hlavn p em nu makrofág a  $T_{H2}$ -lymfocyty, které spolupracují s B-bu kami
- Cytotoxické T-lymfocyty ( $T_C$ -lymfocyty) dokáží zabít nádorové nebo virem napadené bu ky. Jsou také nazývány  $CD8^+$  T-bu ky, protože na svém povrchu exprimují receptor  $CD8$ . Tyto bu ky rozpoznávají své potenciální cíle podle antigenu, navázaném na MHC I receptoru, který má tém každá bu ka v t le.
- Pam ové T-lymfocyty dokáží rozpoznat antigen, se kterým už se jednou setkaly, rychle se namnožit a velice tak urychlit imunitní odpov .
- Regula ní lymfocyty ( $T_{reg}$ -lymfocyty) také nazývané supresorové lymfocyty regulují imunitní systém, aby nezabíjel bu ky t lu vlastní, brání tak rozvinutí autoimunitních chorob.
- NK T-lymfocyty propojují složky specifického a nespecifického imunitního systému, dokáží aktivovat i inhibovat imunitní reakce.
- T-lymfocyty mají odlišný typ TCR receptoru. Rozpoznávají konzervované struktury a aktivují adaptivní imunitu. Také p íspívají k regulaci imunitní odpov di.

## 1.2. Lektiny

Lektiny jsou proteiny, které dokáží s vysokou specifitou rozpoznávat a vázat sacharidy, a už volně nebo vázané v glykoproteinech i glykolipidech [2, 3]. Prvním popsáním lektinem byl ricin, izolovaný již na konci 19. století Peterem Hermannem Stillmarkem ze semen skoce obecného (*Ricinus communis*) [2]. Lektiny se vyskytují u nejrozmanitějších organismů, a už se jedná o viry, bakterie, rostliny nebo živočichy.

Vazba sacharidu je zprostředkována tzv. sacharid rozpoznávající doménou (CRD, „carbohydrate recognition domain“). Lektiny se dají rozdělit do několika skupin [4, 5]:

Lektiny L-typu: jejich CRD se podobá lektinům vyskytujícím se u bobovitých rostlin (Leguminosae)

Lektiny P-typu: rozpoznávají a vážou manosa-6-fosfát

Lektiny C-typu: ke své funkci potřebují přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  iontů

Lektiny I-typu: jejich CRD se strukturálně podobá imunoglobulinům, váží kyselinu sialovou

Lektiny R-typu: jejich CRD se strukturálně podobá ricinu

Galektiny: váží galaktosidy

Pentraxiny: podjednotky jsou uspořádány do pentamerů

Kalnexin a kalretikulin: zadržují špatně složené glykoproteiny v endoplazmatickém retikulu, kde rozpoznávají glukosové zbytky oligosacharidů vázaných N-glykosidickou vazbou.

### 1.2.1. Lektiny C-typu

Pro lektiny C-typu je charakteristické, že jejich schopnost vázat sacharidové struktury závisí na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, podle čehož také získaly svůj název („calcium-type lectins“). Jejich CRD patří do větší skupiny označované jako CTLD („C-type lectin-like domain“), kterou obsahuje také sada proteinů, které neváží sacharidy ani vápenaté ionty. CTLD je velmi rozšířená doména, která byla nalezena ve více než 1000 proteinech. CRD lektinů C-typu obsahuje 110-130 aminokyselin; 14 aminokyselin je invariantních a 18 vysoce konzervovaných. Součástí domény jsou 4 invariantní cysteiny, které tvoří 2 disulfidické mostky, a až 4 vazebná místa pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Aminokyselinové zbytky s postraním methylem

obsahujícím karbonylovou skupinu tvoří koordinátní kovalentní vazbu s  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Tyto aminokyselinové zbytky poté mohou vázat sacharidy. Často dochází k nekovalentní asociaci více CRD, což ovlivňuje afinitu vazby k sacharidům.

Lektiny C-typu se vyskytují jako transmembránové proteiny i jako rozpustné proteiny v séru nebo extracelulární matrix. Účastní se řady biologických funkcí, jako jsou například rozpoznávání patogenů, mezibuněčné interakce, adheze, signalizace [6, 7].

Lze je rozdělit do 17 skupin (obr. 1.1, str. 14).

### 1.2.2. Receptor CD69

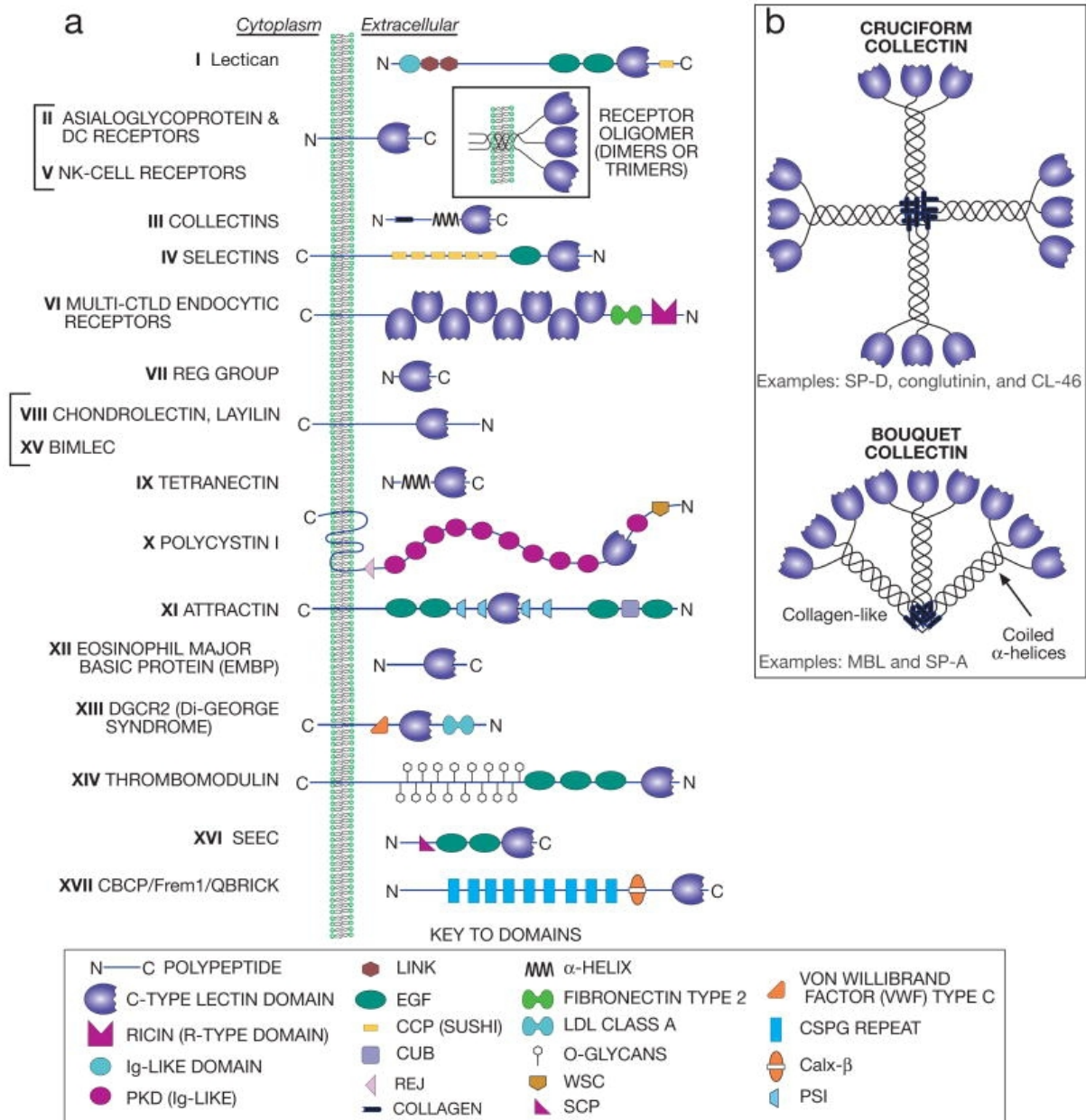
Receptor CD69 je lektin C-typu patřící do skupiny receptorů NK buněk, kódovaný jedním genem, který je u člověka lokalizovaný na chromozomu 12. Je to transmembránový glykoprotein II. typu, který lze nalézt u řady hematopoetických buněk, například T a B lymfocytů, NK buněk, makrofágů, neutrofilů a krevních destiček. [8, 9, 10].

Receptor CD69 je disulfidicky vázaný homodimer, jehož podjednotky mají molekulovou hmotnost 28 nebo 32 kDa (podle glykosylace na dvou možných *N*-glykosylačních místech). Samotný protein obsahuje 199 aminokyselin (22,5 kDa) [11, 12].

Receptor CD69 je exprimován lymfoidními buňkami velmi brzy po jejich aktivaci; u T-lymfocytů se objevují transkripty 30-60 min po stimulaci TCR/CD3 komplexu a po 2-3 hodinách lze detekovat protein na povrchu buňky (nejvyšších koncentrací dosahuje po 18-24 hodinách). Proto se CD69 používá jako marker aktivovaných lymfocytů. TCR/CD3 indukce vyžaduje zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu. CD69 má také kostimulační funkci, jeho zesílení specifickými anti-CD69 protilátkami (například v přítomnosti forbol esterů) stimuluje proliferaci, expresi cytokinů, mobilizaci  $\text{Ca}^{2+}$  a cytotoxickou odpověď. Zesílení u monocytů a neutrofilů vede k uvolnění oxidu dusného a degranulaci, u krevních destiček k agregaci [12, 13].

Receptor CD69 je zodpovědný za inhibici uvolnění lymfocytů z lymfoidních orgánů, tato inhibice je způsobena interakcí CD69 s 4. helixem GPCR receptoru S1P1 [14, 15].

Vazebný partner pro lektinovou doménu receptoru CD69 doposud nebyl spolehlivě popsán.



**Obr. 1.1: Jednotlivé skupiny lektin C-typu a struktura jejich domén.** Na obrázku je 17 skupin, které byly definovány na základ fylogenetické příbuznosti a strukturní podobnosti; (a) proteiny n kterých skupin jsou rozpustné, jiných transmembránové; (b) kolektiny (skupina III) tvoří oligomerické struktury, například řetězovou (surfactant SP-D, konglutinin nebo CL-46) a buketovou (MBP nebo surfactant SP-A). Upraveno dle [16].

### 1.3. Receptory spážené s G-proteinem,

Receptory spážené s G-proteinem (GPCRs, „G-protein coupled receptors“) jsou největší a nejrozmanitější skupinou transmembránových receptorů [17]. Vyskytují se téměř u všech

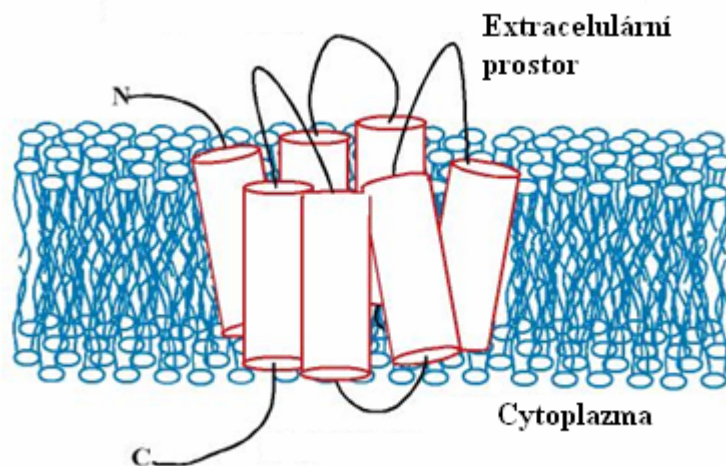
eukaryot [18]. Skládají se ze sedmi transmembránových  $\alpha$ -helix, které jsou propojeny třemi extracelulárními a třemi intracelulárními smyčkami, C-konec se nachází v cytoplazmě a N-konec je orientován extracelulárně (obr. 1.2, str. 16) [19]. Transmembránové helixy se veličností příliš neliší (20-27 aminokyselin), ale smyčky a C a N-konec se mohou lišit velmi (od několika až po několik set aminokyselin) [20].

Ligandy pro GPCRs jsou velmi rozmanité, od malých molekul přes peptidy až po velké proteiny. Po navázání ligandu na receptor dojde ke změně konformace receptoru, která vede k tvorbě ternárního komplexu ligand-receptor-G-protein. G-protein, do této doby neaktivní, má na své  $\alpha$ -podjednotce navázaný GDP. Po aktivaci receptoru je GDP navázaný na  $\alpha$ -podjednotce G-proteinu vyměněn za GTP, což způsobí disociaci  $\alpha$ -podjednotky od podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$ .  $\alpha$ - a  $\beta$ -podjednotky jsou ukotveny v cytoplazmatické membráně pomocí lipidových kotev, pohyb podjednotek tedy probíhá v rovině membrány.  $\alpha$ -podjednotka s navázaným GTP, ale i dimer podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$  mohou dále aktivovat různé signální kaskády, například tvorbu cyklického AMP (cAMP), který funguje jako druhý posel a aktivuje proteinkinasy. Deaktivace G-proteinu je zajištěna GTPázovou aktivitou  $\alpha$ -podjednotky, která hydrolyzuje navázaný GTP na GDP, což vede k opětovné asociaci podjednotek a obnovení trimeru G-proteinu. Tato deaktivace může být urychlena RGS proteiny („regulator of G protein signalling“), které urychlují hydrolyzu GTP na GDP [21, 22].

GPCRs se dají rozdělit do 5 hlavních rodin: glutamátová, rhodopsinová, sekretinová, adhezní a frizzled/taste2 rodina [23, 24]:

- Rodina glutamátových receptorů zahrnuje receptory vážící glutamát, kyselinu  $\alpha$ -aminomáselnou, „calcium-sensing receptor“ (CaSR) a chuťové receptory TAS1.
- Rodina rhodopsinových receptorů je největší rodinou GPCRs. Receptory této rodiny se odlišují od ostatních GPCRs krátkým N-koncem, který u ostatních rodin hraje klíčovou roli při vazbě ligandu. U receptorů rhodopsinové rodiny se ligand váže do prostoru mezi transmembránovými helixy.
- Rodina sekretinových receptorů se nejčastěji účastní parakrinní signalizace, receptory této rodiny váží hlavně velké peptidy. Název dostaly podle sekretinu, prvního klonovaného receptoru z této rodiny.
- Rodina adhezních receptorů zahrnuje receptory, jež mají dlouhý N-konec, obsahující hodně serinových a threoninových zbytků, na kterých je přítomna *O*-glykosylace.

- Rodina frizzled/taste2 receptor zahrnuje jednak „frizzled“ receptory, které kontrolují buněný osud, proliferaci a polaritu buňky během vývoje živočichů, jednak málo prozkoumané „taste2“ (TAS2) receptory, které jsou exprimovány epitelem jazyka a patra a pravděpodobně fungují jako receptory hořké chuti.



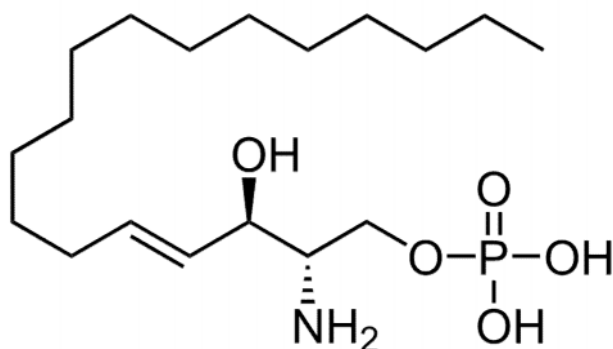
**Obr. 1.2: Obecná struktura receptoru spáženého s G proteinem.** Na obrázku je vidět 7 transmembránových helix receptoru spáženého s G proteinem, propojených třemi extracelulárními a třemi intracelulárními smyčkami. Upraveno dle [A].

### 1.3.1. Sfingosin-1-fosfátový receptor 1 (S1P1)

S1P1 patří do rhodopsinové rodiny GPCR receptorů. V rámci této rodiny se řadí do podrodiny plovoucí nazvané EDG (endothelial differentiation gene), která byla pojmenována na S1P poté, co se zjistilo, že ligandem pro receptory této podrodiny je sfingosin-1-fosfát (obr. 1.3, str. 17). S1P podrodina zahrnuje 5 receptorů (S1P1-5) [25].

S1P1 hraje klíčovou roli v uvolnění B-lymfocytů z lymfoidních orgánů a T-lymfocytů z brzlíku. Po aktivaci lymfocytů v lymfoidních orgánech se musí lymfocyty vrátit zpět do oběhu, aby se mohli dostat k místu infekce. Absence receptoru S1P1 vede k zadržení lymfocytů v lymfatických orgánech. Pokus na myších, jejichž hematopoetické buňky postrádaly receptor S1P1 ukázal, že T-lymfocyty bez tohoto receptoru se nacházely v brzlíku v normálních koncentracích, ale nebyly ho schopny opustit a v periferních částech téměř úplně chyběly. B-lymfocyty byly nalezeny v periferních lymfatických orgánech, avšak v krvi a lymfě také chyběly. Tyto pokusy prokázaly, že S1P1 je nezbytný pro recirkulaci lymfocytů a reguluje jejich uvolnění z brzlíku a periferních lymfatických orgánů [14, 26].





**Obr. 1.3: Chemická struktura sfingosin-1-fosfátu [B].**

### 1.3.2. Interakce receptor CD69 a S1P1

Lymfocyty neustále cirkulují mezi krví a lymfoidními orgány. B hem imunitní odpov di m že být p echodn zastaven proces uvol ování lymfocyt z lymfatických orgán . Pokud je uvol ování zastaveno lokáln , zvýší se po et lymfocyt v odpovídajícím lymfatickém orgánu, pokud by k zastavení došlo celkov , zp sobí to imunosupresi, protože dojde k vy erpání cirkulujících lymfocyt . Jednou z látek zp sobující zadržování lymfocyt je interferon / . Pokus z roku 2006 provedený Lawrence R. Shiwem ukázal, že p i podání kyseliny polyinosin-polycytidylové, která stimuluje tvorbu inerferonu / , dochází k zadržování lymfocyt v lymfoidních orgánech. Ovšem bu ky, které postrádaly receptor CD69 nebyly zadržovány a nacházely se v krvi a lymf v normálních koncentracích. Pro uvol ování lymfocyt je nezbytný receptor S1P1 a bylo zjišt no, že interferon / inhibuje schopnost bu ky reagovat na sfingosin-1-fosfát. Avšak bu ky, které postrádaly receptor CD69 si tuto schopnost zachovaly i po p sobení interferonu / . Z t chto pozorování vyplývá, že receptor CD69 tvo í komplex s receptorem S1P1 a negativn ho reguluje, což zp sobuje zadržování lymfocyt v lymfoidních orgánech. Tento komplex se poda ilo imunoprecipitovat [14].

Dalším výzkumem bylo zjišt no, že interakce probíhá mezi transmembránovou ástí receptoru CD69 a transmembránovým helixem 4 receptoru S1P1. R zné domény CD69 byly nahrazovány doménami p íbuzného receptoru NKR-P1 a bylo zjišt no, že interakce se ú astní skute n pouze transmembránová ást receptoru CD69. Stejným zp sobem byly nahrazovány domény receptoru S1P1 doménami receptoru S1P3, a interakce byla lokalizována pouze na helix 4 S1P1 receptoru [15].

## 2. Cíl práce

Připravit plazmidy umožňující expresi receptorů CD69 a S1P1 v lidské buněčné linii HEK293.

## 3. Materiál

### 3.1. P ístroje a pom cky

Analytické váhy	AND, USA
Aparatura pro filtraci	Sigma-Aldrich, N mecko
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	H+P Labortechnik GmbH, N mecko
Automatické pipety Discovery	HTL, Polsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12 R	Hettich, N mecko
Centrifuga Universal 320R	Hettich, N mecko
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	Corning, N mecko
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570 (16,1 MPix)	SONY, Japonsko
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, USA
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Genomed, N mecko
Kahan	závod Votice, R
Laminární box Clean Air Techniek B.V.	PMV a Telstar company, Belgie
Lednice 225 R (4 °C)	Calex, R
Magnetická mícha ka MM 2A	Lab. P ístroje Praha, R
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, USA
Mrazicí box (-20 °C)	Calex, R
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
pH metr ino Lab	Schoeller, N mecko
p edvážky KB1200-2	Kern, N mecko
PureLink™ HiPure Plasmid DNA	Invitrogen, USA
Rota ní vakuová odparka SpeedVac DNA 110	Savant, USA
Souprava pro agarózovou elektroforézu	Biokeystone Co, USA
Spektrofotometr NanoVue Plus	GE Healthcare, UK
Termoblok LS1	VLM, N mecko
Termocykler 0,5 ml x 20	Techne, UK
Termocykler 0,2 ml x 25	Techne, UK
Termostat LS1	VLM, N mecko
T epa ka Orbi-Safe TS NetWise	Gallenkamp
UV prosv covací lampa (312 nm)	UVItec, UK
UV prosv covací lampa (300 nm)	Ultra-Lum, USA
UV/Vis spektrometr UV2 Series	Unicam, UK
Va i	ETA, R
Vodní láze	Memmert, N mecko
Vodní láze TW2	Julabo, N mecko
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj nap tí PS 251-2	Sigma-Aldrich, USA

### 3.2. Chemikálie

Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Sigma, USA
Ampicilin 100 mg/ml	Biotika, SR
Azid sodný	Serva, USA
Bromfenolová mod	Lachema, R
Combi PPP master mix	Top-Bio, R
DNA marker 1 kb Plus GeneRuler	Fermentas, Kanada
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, R
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
GoodView	Ecoli, Slovensko
MgSO <sub>4</sub> , 100 mM	New England Biolabs, USA
PCR H <sub>2</sub> O	Top-Bio, R
ThermoPol Reaction Buffer, 10 × konc.	New England Biolabs, USA
Tris	Roth, N mecko
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, R

### 3.3. Enzymy

Deep Vent DNA polymerasa	New England Biolabs, USA
KpnI	New England Biolabs, USA
AgeI	New England Biolabs, USA
RNasa A	Serva, USA
T4 DNA ligasa	New England Biolabs, USA

### 3.4. Bakteriální kmeny a buněčné linie

E. coli DH5	RNDr. Marek Ingr, Ph.D., P F UK Praha, R
-------------	--

### 3.5. Plazmidy

pTW5	Bc. Edita Poláchová, P F UK Praha, R
------	--------------------------------------

### 3.6. Primery

**CD69\_FW:**

AAAAAAACCGGTAGCTCTGAAAATTGTTTCGTAGCAGAG

**CD69\_REV:**

TTTTTTGGTACCTTTTGTAAGGTTTGTACATATCCAGTATAAATTC S1P1\_FW

**S1P1\_FW:**

AAAAAAACCGGTGGGCCACCAGCGTCCCG

**S1P1\_REV:**

TTTTTTGGTACCCTAGGAAGAAGAGTTGACGTTTCC

**S1P1-HIS\_REV:**

TTTTTTGGTACCGGAAGAAGAGTTGACGTTTCCAGAAG

**pTT5\_FW:**

TGATATTCACCTGGCCCGATCTG

**pTT5\_REV:**

TATGTCCTTCCGAGTGAGAG

**pTW5\_REV:**

AAGCAGCGTATCCACATAGCG

### 3.7. Roztoky a pufry

**LB agar s ampicilinem:** 1,5% agar v LB médiu, 100 µg/ml ampicilinu

**LB médium:** 1% trypton, 0,5% kvasni ný extrakt, 1% NaCl, pH = 7,4

**L1, L2 roztoky:** JETquick Gel Extraction Spin Kit (*Genomed*, N mecko)

**Pufry pro agarosovou elektroforézu:**

- **TAE pufyr** (1 × koncentrovaný): 40mM Tris, 20mM CH<sub>3</sub>COOH, 1mM EDTA
- **STOP pufyr:** 30% glycerol, 1% bromfenolová mod , 70% TE pufyr

**Pufry k „Maxiprepu“ – PureLink™ HiPure Plasmid DNA (*Invitrogen*, USA):**

- **Roztok E4 (elu ní pufyr):** 100mM Tris-HCl (pH = 8,5), 1,2 M NaCl
- **Roztok EQ1 (ekvilibra ní pufyr):** 0,1M octan sodný (pH = 5,0), 0,6M NaCl, 0,15% (v/v) Triton® X-100
- **Roztok L7 (lyzující pufyr):** 0,2M NaOH, 1% (w/v) SDS
- **Roztok N3 (srážecí pufyr):** 3,1M octan draselný, pH = 5,5
- **Roztok R3 (resuspenda ní pufyr):** 50mM Tris (pH = 8,0), 10mM EDTA, 20 mg/ml RNasa A
- **Roztok W8 (mycí pufyr):** 0,1M octan sodný (pH = 5,0), 825mM NaCl

**Pufry k „Miniprepu“: High-Speed Plasmid Mini Kit (*Geneaid*, USA):**

- **PD1, PD2, PD3, W1, WASH, Elu ní pufyr**

## 4. Metody

### 4.1. Příprava expresního vektoru

#### 4.1.1. Amplifikace inzert

Do 0,5 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 30,5  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ , 1,5  $\mu\text{l}$  100mM  $\text{MgSO}_4$ , 1,5  $\mu\text{l}$  10mM dNTPs, 5  $\mu\text{l}$  5 $\mu\text{M}$  p ímého primeru, 5  $\mu\text{l}$  5 $\mu\text{M}$  reverzního primeru, 1  $\mu\text{l}$  templátu (10 ng/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  reak ního pufru (10  $\times$  koncentrovaný) a 0,5  $\mu\text{l}$  Deep Vent DNA polymerasy. Primery a templáty pro jednotlivé inzerty jsou uvedeny v tab. 4.1. Zkušavky byly vloženy do termocykléru, kde prob hla PCR reakce. Vzorčky byly nejprve zah áty na 94°C po dobu p ti minut, poté následovalo 30 cykl , kde se opakovalo 30 s p i 94°C, 30 s p i 50°C a 60 s p i 72°C. Poté byla 10 minut udržována teplota 72°C. Nakonec byly vzorčky chlazeny na 4°C dokud nebyly vyjmuty.

**Tab. 4.1: Primery a templáty použité p i amplifikaci inzert**

Inzert	P ímý primer	Reverzní primer	Templát
CD69	CD69_FW	CD69_REV	CD69
S1P1	S1P1_FW	S1P1_REV	S1P1
S1P1-HIS	S1P1_FW	S1P1-HIS_REV	S1P1

#### 4.1.2. Agarosová elektroforéza

V Erlenmayerov ba ce bylo smícháno 0,95 g agarosy a 95 ml TAE pufru. Tato směs byla pova ena a po zchladnutí na asi 50°C do ní byly p idány 3  $\mu\text{l}$  barviva Good View (*Ecoli*, Slovensko). Sm s byla poté nalita do aparatury pro elektroforézu a ponechána p i laboratorní teplot , dokud gel neztuhnul. Ztuhlý gel byl p evrstven 350 ml destilované vody a do jednotlivých elektrodových prostor bylo nalito 65 ml TAE pufru. Do jamek bylo pipetováno vždy 5  $\mu\text{l}$  vzorku, smíchaných s 1  $\mu\text{l}$  stop pufru. Do jedné jamky bylo napipetováno 5  $\mu\text{l}$  100 bp markeru. Elektroforéza b žela 15 min p i 220 V a 500 mA. Poté byl gel prosvícen UV prosv covací lampou, barvivo Good View interkalované do DNA zelen svítilo.

### **4.1.3. Srážení DNA ethanolem**

Ke 45  $\mu\text{l}$  každého zbylého PCR produktu bylo přidáno 4,5  $\mu\text{l}$  3M roztoku octanu sodného a 125  $\mu\text{l}$  100% ethanolu. Roztoky byly promíchány a ponechány přes noc v mrazáku při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Poté byly roztoky zcentrifugovány 2 min při  $23\,000 \times g$ , supernatant byl odstraněn a pelet opláchnut 100  $\mu\text{l}$  70% ethanolu. Následovala další centrifugace za stejných podmínek jako předtím, supernatant byl opět odstraněn a pelet vysušen na rotační vakuové odparce. Po vysušení byl pelet rozpuštěn v 15  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

### **4.1.4. Štěpení inzertu a plazmidu pTW5 restrikčními endonukleasami**

K 15  $\mu\text{l}$  inzertu byly přidány 2  $\mu\text{l}$  NEB1 pufru, 2  $\mu\text{l}$  BSA, 0,5  $\mu\text{l}$  enzymu AgeI a 0,5  $\mu\text{l}$  enzymu KpnI. Následovala inkubace při  $37^{\circ}\text{C}$  po dobu 45 min. Poté byly enzymy inaktivovány zahřátím na  $65^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 min.

Plazmid byl štěpen obdobným způsobem. K 46  $\mu\text{l}$  plazmidu bylo přidáno 6  $\mu\text{l}$  NEB1 pufru, 6  $\mu\text{l}$  BSA, 1  $\mu\text{l}$  enzymu AgeI a 1  $\mu\text{l}$  enzymu KpnI. Inkubace a tepelná inaktivace proběhly za stejných podmínek jako v případě inzertu.

### **4.1.5. Přečištění inzertu a plazmidu a agarosová elektroforéza**

Naštěpené inzerty a plazmid byly přečištěny pomocí soupravy Jetquick Gel Extraction Spin Kit (*Genomed*, Německo). Ke každému vzorku bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  roztoku L1. Asi po těchto minutách byl vzorek přenesen do kolonky vložené do mikrozkuhavky. Poté byl centrifugován 1 min při  $12\,000 \times g$ . Supernatant byl odstraněn, do kolonky bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  roztoku L2 a následovala centrifugace za stejných podmínek. Supernatant byl opět odstraněn a následovala ještě jedna centrifugace, aby došlo k odstranění zbytku roztoku L2. Poté byla kolonka umístěna do 1,5 ml mikrozkuhavky, na kolonku bylo nanášeno 50  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  předehřáté na  $70^{\circ}\text{C}$  a následovala centrifugace po dobu 2 min při  $15\,000 \times g$ .

Gel pro agarosovou elektroforézu byl připraven stejně jako v oddělení 4.1.2. Do jamek bylo nanášeno vždy 5  $\mu\text{l}$  vzorku smíchaných s 1  $\mu\text{l}$  stop pufru. Elektroforéza probíhala 15 min při 220 V a 500 mA. Výsledek byl opět detekován prosvícovací UV lampou (viz 4.1.2.).

### **4.1.6. Ligace inzertu do plazmidu pTW5**

V 1,5 ml mikrozkuhavce bylo smícháno 10  $\mu\text{l}$  plazmidu pTW5, 20  $\mu\text{l}$  inzertu, 3,5  $\mu\text{l}$  pufru pro T4 DNA ligasu a 1,5  $\mu\text{l}$  T4 DNA ligasy. Ligace probíhala 30 min při laboratorní teplotě.

#### **4.1.7. Transformace plazmidu do bun k**

Bylo rozmrazeno 200  $\mu$ l kompetentních bun k *Escherichia coli* kmene DH5 uchovávaných p i  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ke každému roztoku po ligaci bylo p idáno 67  $\mu$ l suspenze bun k. Sm s byla 30 min ponechána na ledu, poté byla na 1 min vložena do vodní lázn zah áté na  $42^{\circ}\text{C}$ , následn zchlazena na ledu. Poté byl ke sm si p idán 1 ml LB média a následovala inkubace 60 min p i  $37^{\circ}\text{C}$ .

Mezitím byly p ipraveny Petriho misky s LB agarem. 1,5 g agaru bylo rozmícháno ve 100 ml LB média, tato sm s byla pova ena a po vychladnutí na asi  $45^{\circ}\text{C}$  bylo k této sm si p idáno 100  $\mu$ l ampicilinu. Sm s byla nalita na Petriho misky a po zatuhnutí byly pootev ené misky vloženy do inkubátoru, aby vyschly.

Po 60 min inkubaci transformovaných bun k v LB médiu byly tyto bu ky centrifugovány 5 min p i  $15\,000 \times g$ . V tšina supernatantu byla odstran na a ve zbytku byl pelet resuspendován, poté byl napipetován na Petriho misku a rozet en sterilní kli kou. Bakterie byly inkubovány 15 hod p i  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.1.8. PCR z kolonií**

Od každého konstruktu byly vybrány 4 kolonie, které byly nasáty pipetou a resuspendovány v 6  $\mu$ l  $\text{dH}_2\text{O}$ . Malá ást této suspenze byla zao kována do 5 ml LB media s 5  $\mu$ l ampicilinu. K 6  $\mu$ l bakteriální suspenze byly p idány 2  $\mu$ l p ímého primeru pTW5\_FW, 2  $\mu$ l reverzního primeru pTW5\_REV a 10  $\mu$ l PCR reak ní sm si „Combi PPP master mix“ (*Top Bio*, R). Vzorky byly umíst ny do termocycleru, kde prob hla PCR reakce. Vzorky byly nejprve zah áty na  $94^{\circ}\text{C}$  po dobu p ti minut, poté následovalo 30 cykl , kde se opakovalo 30 s p i  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s p i  $50^{\circ}\text{C}$  a 120 s p i  $72^{\circ}\text{C}$ . Poté byla 10 minut udržována teplota  $72^{\circ}\text{C}$ . Nakonec byly vzorky chlazeny na  $4^{\circ}\text{C}$  dokud nebyly vyjmuty. PCR produkty byly detekovány pomocí agarosové elektroforézy.

Klony zao kované v LB médiu, které dle agarosové elektroforézy vykazovaly správnou délku vloženého inzertu, byly t epány rychlostí 220 ot./min po dobu 16 hod p i  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.1.9. Izolace plazmidu**

Z nap stované bakteriální kultury bylo odebráno pro každý klon 1,5 ml do 1,5ml mikrozku mavek, následovala centrifugace 1 min p i  $15\,000 \times g$ . Supernatant byl odstran n, zkumavka byla op t napln na kulturou a centrifugována za stejných podmínek. Takto bylo



postupně zcentrifugováno všech 5 ml kultury. Poté následoval postup podle návodu z komerčního kitu High Speed

Plasmid Mini Kit (*Geneaid*, USA). K peletě buněk bylo přidáno 200 µl roztoku PD1 (s přidanou RNasou) a peleta byla resuspendována pipetou. Poté bylo přidáno 200 µl roztoku PD2 a po opatrném promíchání a 2min inkubaci při laboratorní teplotě bylo přidáno 300 µl roztoku PD3. Roztok byl opět promíchán a zcentrifugován 3 min při 15 000 × g. Supernatant byl přenesen do kolonky, která byla umístěna v mikrozkuhavce. Následovala centrifugace 1 min při 15 000 × g. Potom byla kolonka promyta 400 µl roztoku W1 a 600 µl Wash pufru (po každém promytí následovala centrifugace 1 min při 15 000 × g). Nakonec byla plazmidová DNA eluována 50 µl dH<sub>2</sub>O přidělané na 65°C (centrifugace 3 min při 15 000 × g). Pomocí spektrofotometru NanoVue Plus byla stanovena koncentrace izolovaného plazmidu.

#### **4.1.10. Sekvenace**

Do 0,2µl PCR mikrozkuhavky bylo napipetováno 0,5 – 1 µl roztoku izolovaného plazmidu, 1 µl priméru nebo reverzního primeru a doplněno dH<sub>2</sub>O na celkový objem 14 µl. V Laboratorii sekvenace DNA PFUK byla RNDr. Štěpánkou Hrdou reakce doplněna 6 µl sekvenací směsí. Analýza byla provedena pomocí přístroje Genetic Analyzer 3130 (*Applied Biosystems*) s 16 kapilárami.

#### **4.1.11. Velkoobjemová příprava plazmidu**

Kompetentní buňky *Escherichia coli* kmene DH5 byly transformovány plazmidem stejně jako v kapitole 4.1.7. Druhý den bylo na misku s koloniemi přidáno asi 5 ml LB media, ve kterém byly buňky rozmíchány sterilní kličkou a převedeny do 2l Erlenmeyerových baněk s 0,5 l LB media s 5 ml ampicilinu. Kultury byly inkubovány na teplotě 14 hod při 37°C a 220 ot./min. Druhý den byly kultury centrifugovány 30 min při 4000 × g v 250ml kyvetách. Pelety byly resuspendovány v 20 ml TES pufru a převedeny do 30ml kyvet. Následovala další centrifugace po dobu 20 min při 4000 × g. Plazmid byl izolován pomocí komerčního kitu PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit (*Invitrogen*, USA). Pelety byly resuspendovány v roztoku R3 (s přidanou RNasou), poté bylo přidáno 9 ml roztoku L7, směs byla opatrně promíchána a ponechána 5 min při laboratorní teplotě. Potom bylo přidáno 9 ml roztoku N3 a směs byla opět opatrně promíchána. Následovala centrifugace 10 min při 15 000 × g. Supernatant byl aplikován na kolonu, která byla předtím dříve promyta dH<sub>2</sub>O a

ekvilibrována 30 ml roztoku EQ1. Po prokapání veškeré směsi byla kolona promyta 2 × 30 ml roztoku W8 a následně byla plazmidová DNA eluována 15 ml roztoku E4. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu a směs byla centrifugována 30 min při 15 000 × g a teplotě 0°C. Supernatant byl odstraněn a pelet byla omyta 5 ml 70% předchlazeného ethanolu. Následovala centrifugace 5 min při 15 000 × g a 0°C, supernatant byl opět odstraněn, pelet vysušen ve vakuové odparce a rozpuštěn v 1 ml dH<sub>2</sub>O.

Kolony pro izolaci plazmidu byly recyklovány. Po použití byly promyty 1M HCl a skladovány v 1M HCl v lednici při teplotě 4°C.

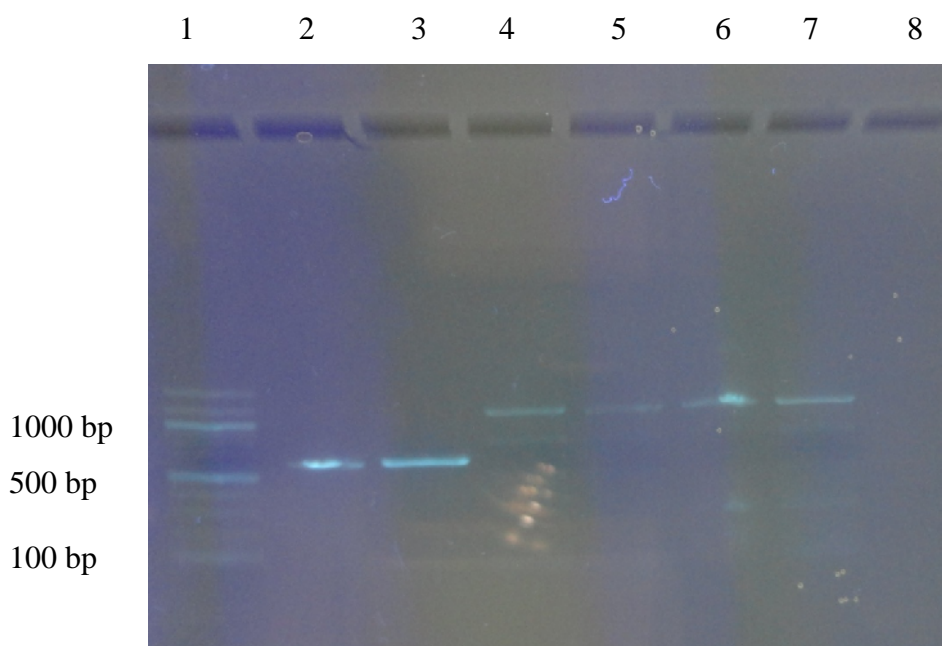
Koncentrace a čistota získaného plazmidu byla stanovena spektrofotometricky měřením při vlnové délce 260 a 280 nm.

## 5. Výsledky

### 5.1. Příprava inzert

Pro přípravu expresních vektorů byly nejdříve amplifikovány 3 konstrukty: CD69, S1P1 a S1P1-HIS. První konstrukt obsahoval sekvenci kódující protein CD69 a byl prodloužený o restriční místa pro enzymy AgeI (přímým primerem) a KpnI (reverzním primerem). Druhý a třetí konstrukt obsahovaly sekvenci proteinu S1P1 prodlouženou o stejná restriční místa jako CD69. Konstrukt S1P1 byl navíc prodloužen o stop kodon TAG. Stop kodon byl k tomuto konstruktu přidán proto, že plazmid pTW5 obsahuje za restričním místem pro KpnI sekvenci kódující 8 histidinů – tzv. histidinovou kotvu (HIS kotvu), která slouží pro snadnou analýzu proteinu. Expresní plazmid pro protein S1P1 se stop kodonem před HIS kotvou byl připraven proto, aby se mohla případně provést tvorba komplexu CD69-S1P1. Pokud bychom smíchali proteiny CD69 a S1P1, poté je purifikovali pomocí HIS kotvy (kterou obsahuje protein CD69) a stanovovali například elektroforézou, mohli bychom vidět pruhy velikostí odpovídající oběma receptorům, které spolu předtím tvořily komplex..

Na obr. 5.1 je vidět snímek z agarosové elektroforézy, kterou byly PCR produkty analyzovány. Očekávané délky amplifikovaných inzertů jsou uvedeny v tabulce 5.1, str. 28.



**Obr. 5.1: Snímek agarosové elektroforézy PCR produktů CD69, S1P1 a S1P1-HIS.**

V dráze 1 je 100bp marker, v dráze 2-3 je CD69, v dráze 4-5 je S1P1 a v dráze 6-7 je S1P1-HIS.

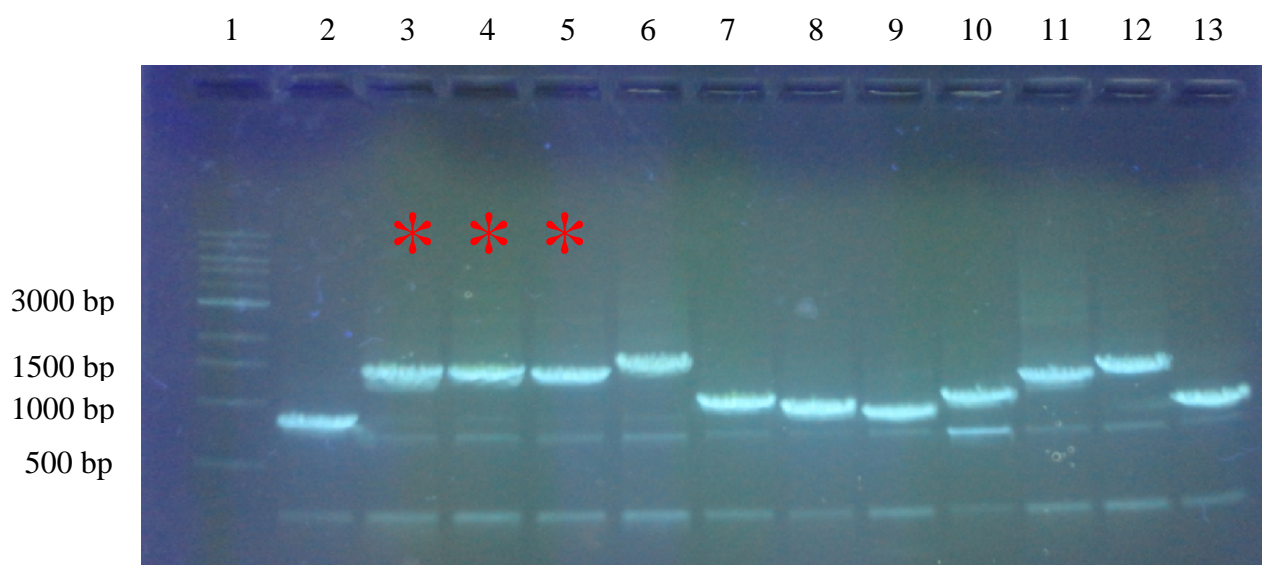
**Tab. 5.1: Délky inzert CD69, S1P1 a S1P1-HIS.**

Inzert	CD69	S1P1	S1P1-HIS
Velikost (bp)	618	1170	1167

Amplifikované konstrukty byly vysráženy ethanolem, vysušeny a rozpuštěny v dH<sub>2</sub>O. Poté byly naštřeny restrikčními endonukleasami AgeI a KpnI. Stejnými enzymy byl štěpen i plazmid pTW5, který připravila a poskytla Bc. Edita Poláčková. Plazmid pTW5 byl připraven modifikací plazmidu pTT5 [27] vložením Woodchuckovy posttranskripční regulační sekvence (WPRE, „Woodchuck posttranscriptional regulatory element“), která zvyšuje stabilitu mRNA vložených genů. Plazmid pTW5 neobsahoval sekreční signál, protože CD69 i S1P1 jsou transmembránové receptory. Mapa plazmidu pTT5 je na obrázku 5.3, str. 29.

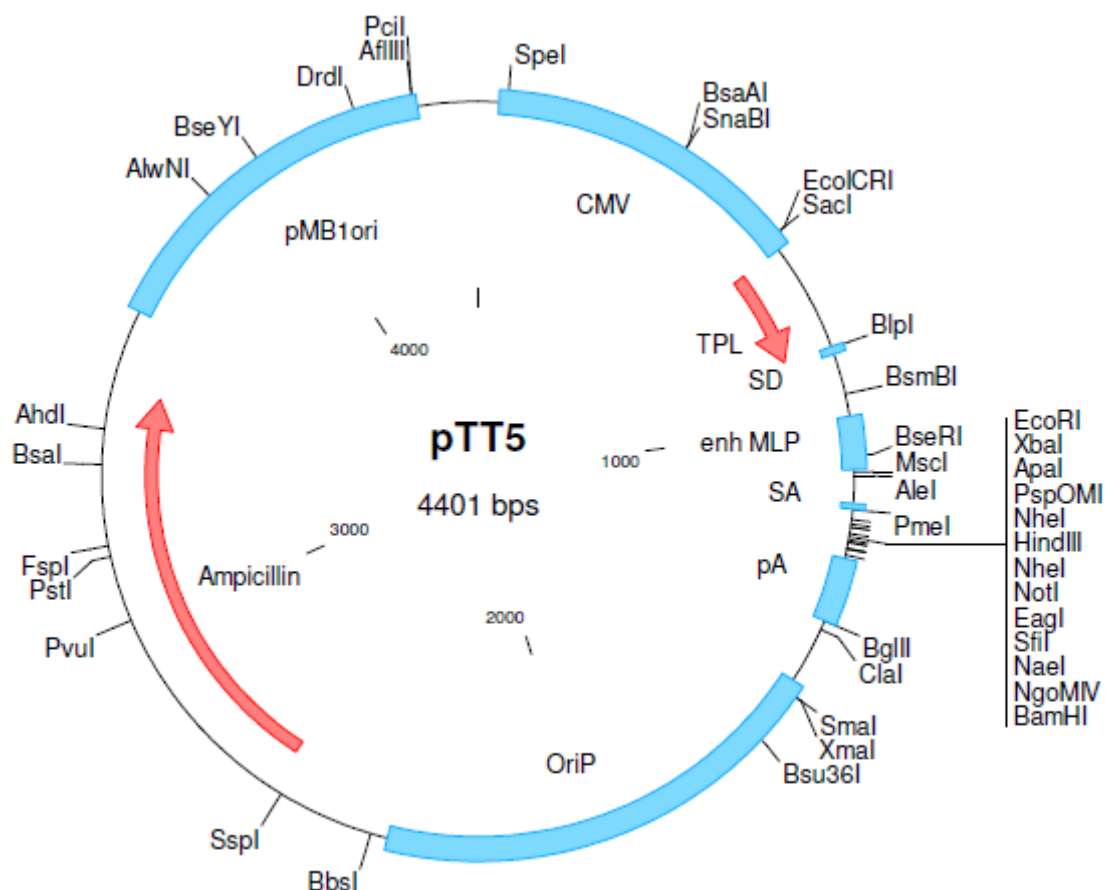
## 5.2. Příprava expresních vektorů

Inzerty byly ligovány T4 DNA ligasou do plazmidu pTW5. Plazmidy s vloženými inzerty byly transformovány do buněk *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$ . Buňky byly naneseny na Petriho misky s LB agarem a ampicilinem a inkubovány při 37°C do druhého dne. Od každého konstruktu byly vybrány 4 kolonie a byla provedena PCR. Na obr. 5.2 je vidět snímek z agarosové elektroforézy, kterou byly PCR produkty analyzovány. Velikosti PCR produktů jsou uvedeny v tabulce 5.2, str. 30.



**Obr. 5.2 : Snímek agarosové elektroforézy po PCR z kolonií.**

V dráze 1 je marker, v drahách 2-5 je CD69, v drahách 6-9 je S1P1-HIS a v drahách 10-13 je S1P1. červenými hvězdami jsou vyznačeny pozitivní klony.



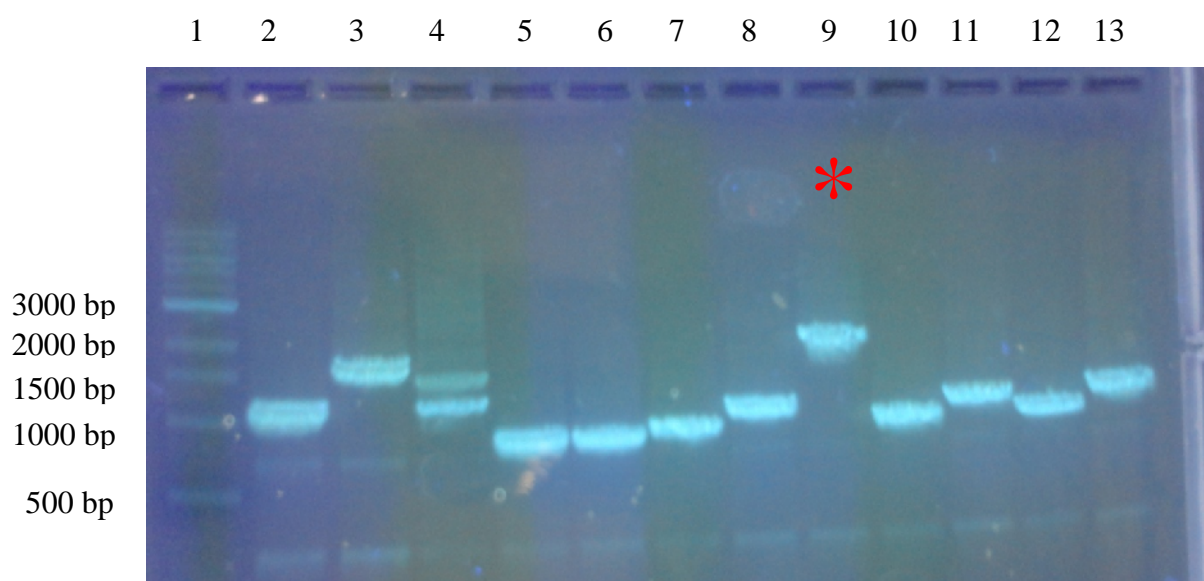
**Obr. 5.3: Mapa expresního plazmidu pTT5 [27].** Prokaryotní oblast: pMB1 - bakteriální poátek replikace, Ampicillin - gen pro rezistenci na antibiotikum ampicilin; eukaryotní oblast: oriP - replika ní poátek umožující EBNA1 epizomální replikaci; expresní kazeta: CMV - promotor lidského cytomegaloviru, TPL - adenovirus tripartite leader, SD - splice donor, enh MLP - hlavní pozdní promotor adenoviru, SA - splice acceptor, multi-klonovací místo, pA - polyadenyla ní signál.

V p ípad plazmidu s konstruktem CD69 byly pozitivní 3 kolonie (v obr. 5.2, str. 28 vyzna eno ervenými hv zdami). Jedna z nich byla vybrána, bakterie zao kované v LB mediu s ampicilinem byly inkubovány p í 37°C do druhého dne. Poté z nich byl izolován plazmid, který byl sekvenován RNDr. Št pánkou Hrdou. Sekvence ukázala, že vše prob hlo správn a sekvence p ípraveného plazmidu odpovídá požadované sekvenci.

V p ípad plazmid s konstrukty S1P1 a S1P1-HIS byly všechny kolonie negativní, proto bylo vybráno dalších 6 kolonií od každého plazmidu a znovu provedena PCR. Snímek z agarosové elektroforézy je na obrázku 5.4, str. 30. Velikosti PCR produkt jsou uvedeny v tabulce 5.2, str. 30.

Pouze produkt v dráze 9 m l požadovanou velikost. Plazmid byl osekvenován, obsahoval správnou sekvenci s jednou mutací, která ale nezmenila smysl tení aminokyselin (kodon CTG byl změněn na CTA, oba tyto triplety kódují leucin).

Konstrukt S1P1-HIS byl znovu naamplifikován, naštenpen a vložen do plazmidu pTW5. Štenpení konstruktu tentokrát probíhalo pouze 10 min. Po transformaci do buněk DH5 následovala op t PCR z kolonií, p i které byl použit nový reverzní primer pTW5\_REV. Díky tomu byl výsledný PCR produkt kratší (1408 bp).



**Obr. 5.4: Snímek agarosové elektroforézy po PCR z kolonií.**

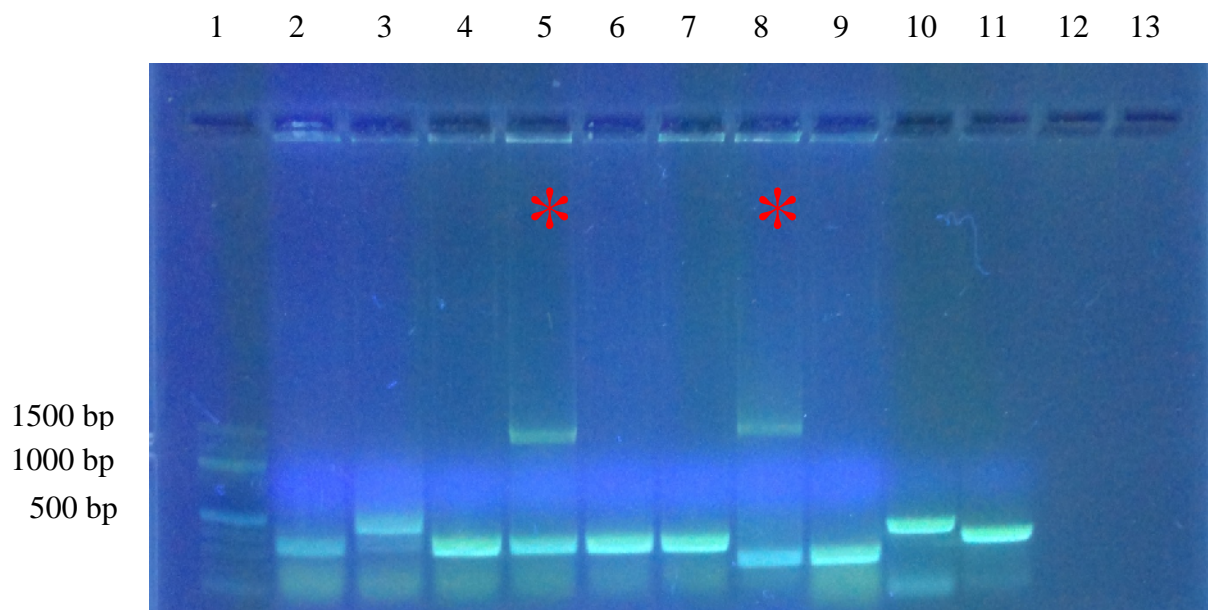
V dráze 1 je 1kb marker, v drahách 2-7 je S1P1-HIS, v drahách 8-13 je S1P1. červenou hv zdou je vyzna en pozitivní klon.

**Tab. 5.2: Délky PCR produkt CD69, S1P1 a S1P1-HIS.**

Inzert	CD69	S1P1	S1P1-HIS
Velikost (bp)	1459	2011	2008

Snímek z agarosové elektroforézy je na obr. 5.5, str. 31. Produkty v drahách 5 a 8 m ly správnou velikost, plazmidy byly poslány na sekvenaci, která potvrdila správnou sekvenci inzert . V p ípad produktu v dráze 8 došlo k jedné mutaci, která ale nezmenila smysl tení aminokyselin (kodon CCG byl změněn na CCT, oba tyto triplety kódují prolin).

Následovala velkoobjemová p íprava plazmid . Koncentrace DNA a její istota byly stanoveny spektrofotometricky, výsledky m ení jsou uvedeny v tab. 5.3, str. 31.



**Obr. 5.5: Snímek agarosové elektroforézy po PCR z kolonií.**

V dráze 1 je 100bp marker, v drahách 2-11 je S1P1-HIS. ervenými hv zdami jsou vyzna eny pozitivní klony.

**Tab 5.3: Výsledek spektrofotometrického stanovení koncentrace a istoty p ipraveného zásobního množství plazmid**

Plazmid	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
pTW5_CD69	0,713	0,406	1,76	10,70
pTW5_S1P1	0,439	0,250	1,76	6,59
pTW5_S1P1-HIS	0,535	0,304	1,76	8,03

## 6. Diskuze

Cílem této práce bylo připravit expresní vektory pro receptory CD69 a S1P1. Prvním krokem byla amplifikace inzert, která se nejprve nedařila, ale po upravení teploty nasedání primer z 55°C na 50°C proběhla PCR reakce úspěšně. Amplifikované inzerty byly poté analyzovány agarosovou elektroforézou, část gelu obsahující DNA inzertu byla vyiznuta a DNA byla extrahována pomocí soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (*Genomed, Německo*). Při tomto postupu však docházelo ke ztrátám, proto byly inzerty znovu amplifikovány a DNA byla vysrážena ethanolem. Na elektroforézu bylo nanášeno pouze 5 µl PCR produktu pro kontrolu.

Poté byly inzerty a plazmid štěpeny restrikčními endonukleasami AgeI a KpnI, následovala ligace a transformace do buněk *Escherichia coli*. V případě konstruktů CD69 proběhlo vše v pořádku a všechny kolonie ze čtyř vybraných obsahovaly plazmid s vloženým inzertem. Problém nastal u konstruktů S1P1 a S1P1-HIS. V případě S1P1 byla pozitivní pouze 1 kolonie z 10, u S1P1-HIS žádná. Dva plazmidy s vloženým S1P1-HIS, které se nejvíce blížily očekávané velikosti, byly poslány na sekvenaci a v obou případech chyběla v plazmidu část vkládaného inzertu, což bylo pravděpodobně způsobeno tím, že inzerty byly štěpeny moc dlouho (45 min). Proto byl konstrukt S1P1-HIS znovu amplifikován, vysrážen ethanolem a štěpen. Inzerty byly tentokrát štěpeny endonukleasami jen 10 min. Po ligaci, transformaci do buněk a inkubaci těchto buněk přes noc byla provedena PCR z kolonií a dvacet z deseti kolonií obsahovaly plazmid s vloženým inzertem.

S připravenými plazmidy byly prováděny expresní testy v buněčných liniích HEK293S a HEK293T. Tyto testy však zatím byly neúspěšné, proteiny se nepodařilo detekovat ani purifikovat.



## **7. Závěr**

Byly připraveny plazmidy umožňující expresi receptorů CD69 a S1P1 v lidské buněčné linii HEK293.

## 8. Seznam použité literatury

1. Hořejší, V., Bartáková, J., *Základy imunologie*. Vol. 3. 2005, Praha: Triton.
2. Sharon, N., Lis, H.: History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 2004. 14(11): p. 53R-62R.
3. Rini, J.M.: Lectin structure. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1995. 24: p. 551-77.
4. Gabius, H.J.: Animal lectins. *Eur J Biochem*, 1997. 243(3): p. 543-76.
5. Dodd, R.B., Drickamer, K.: Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 2001. 11(5): p. 71R-9R.
6. Lasserre, C., Simon, M.T., Ishikawa, H., Diriong, S., Nguyen, V.C., Christa, L., Vernier, P., Brechot, C.: Structural organization and chromosomal localization of a human gene (HIP/PAP) encoding a C-type lectin overexpressed in primary liver cancer. *Eur J Biochem*, 1994. 224(1): p. 29-38.
7. Weis, W.I., Taylor, M.E., Drickamer, K.: The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*, 1998. 163: p. 19-34.
8. Feng, C., Woodside, K.J., Vance, B.A., El-Khoury, D., Canelles, M., Lee, J., Gress, R., Fowlkes, B.J., Shores, E.W., Love, P.E.: A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int Immunol*, 2002. 14(6): p. 535-44.
9. Llera, A.S., Viedma, F., Sanchez-Madrid, F., Tormo, J.: Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem*, 2001. 276(10): p. 7312-9.
10. De Maria, R., Cifone, M.G., Trotta, R., Rippo, M.R., Festuccia, C., Santoni, A., Testi, R.: Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med*, 1994. 180(5): p. 1999-2004.
11. Kolenko, P., Skalova, T., Vanek, O., Stepankova, A., Duskova, J., Hasek, J., Bezouska, K., Dohnalek, J.: The high-resolution structure of the extracellular domain of human CD69 using a novel polymer. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2009. 65(Pt 12): p. 1258-60.
12. Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., Santoni, A.: The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*, 1994. 15(10): p. 479-83.
13. Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry*, 2000. 39(48): p. 14779-86.

14. Shioh, L.R., Rosen, D.B., Brdickova, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L.L., Cyster, J.G., Matloubian, M.: CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, 2006. 440(7083): p. 540-4.
15. Bankovich, A.J., Shioh, L.R., Cyster, J.G.: CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem*, 2010. 285(29): p. 22328-37.
16. Cummings, R.D., McEver, R.P., *C-type Lectins*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
17. Joost, P., Methner, A.: Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biol*, 2002. 3(11): p. RESEARCH0063.
18. Fatakia, S.N., Costanzi, S., Chow, C.C.: Molecular evolution of the transmembrane domains of G protein-coupled receptors. *PLoS One*, 2011. 6(11): p. e27813.
19. Vischer, H.F., Watts, A.O., Nijmeijer, S., Leurs, R.: G protein-coupled receptors: walking hand-in-hand, talking hand-in-hand? *Br J Pharmacol*, 2011. 163(2): p. 246-60.
20. Ji, T.H., Grossmann, M., Ji, I.: G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*, 1998. 273(28): p. 17299-302.
21. Strader, C.D., Fong, T.M., Graziano, M.P., Tota, M.R.: The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J*, 1995. 9(9): p. 745-54.
22. Digby, G.J., Lober, R.M., Sethi, P.R., Lambert, N.A.: Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(47): p. 17789-94.
23. Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B.: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 2003. 63(6): p. 1256-72.
24. Schioth, H.B., Fredriksson, R.: The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*, 2005. 142(1-2): p. 94-101.
25. Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., Sanna, M.G., Han, G.W., Kuhn, P., Rosen, H., Stevens, R.C.: Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science*, 2012. 335(6070): p. 851-5.
26. Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., Cyster, J.G.: Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 2004. 427(6972): p. 355-60.

27. Durocher, Y., Perret, S., Kamen, A.: High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30: p. e9.

## 8.1. Seznam použitých obrázků

- A. G-protein coupled receptors, Vanderbilt University  
[http://english.pku.edu.cn/News\\_Events/News/Focus/8263.htm](http://english.pku.edu.cn/News_Events/News/Focus/8263.htm)  
(aktuální ke dni 13.8.2012)
- B. Chemical structure of sphingosine 1-phosphate, Wikimedia Commons  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphingosine\\_1-phosphate.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sphingosine_1-phosphate.svg)  
(aktuální ke dni 13.8.2012)

Svoluji k zap j ení této práce pro studijní ú ely a prosím, aby byla řádn vedena evidence vyp j ovatel

Jméno a p íjmení s adresou	íslo OP	Datum vyp j ení	Poznámka