

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Katedra biochemie**



**Příprava plazmidů pro expresi interleukin 2-fúzní  
monoklonální protilátky**

*Preparation of plasmids for expression of interleukin 2-fusion  
monoclonal antibody*

**Bakalářská práce**

Autor: Lukáš Slavata

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Vaněk Ph.D.

**Praha 2013**

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení práce a trpělivost. Dále děkuji Mgr. Janu Bláhovi za četné odborné konzultace a pomoc při práci. Kolektivu Laboratoře sekvenace DNA děkuji za provedené sekvenace připravených vektorů. Bc. Michale Černé děkuji za pomoc při editaci obrazových materiálů.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum:

Podpis:

### **Abstract:**

Aim of the thesis was optimization of production of monoclonal antibody against interleukin-2 (IL-2) as fusion construct with IL-2 by preparation of new expression vectors based on pTW5 plasmid and by replacing the native signal sequence with new one, originally from secreted alkaline phosphatase. This fusion antibody has interesting biological activity with therapeutic potential - prolonging the half-life of IL-2 in blood circulation. (The thesis is written in Czech.)

### **Abstrakt:**

Náplní práce byla optimalizace produkce monoklonální protilátky proti interleukinu-2 (IL-2) s navázaným fúzním IL-2, a to přípravou nových expresních vektorů založených na plasmidu pTW5 a nahrazením nativní signální sekvence novou, původem ze sekretované alkalické fosfatasy. Tato fúzní protilátka vykazuje zajímavou biologickou aktivitu s potenciálem pro terapeutické využití - prodloužení cirkulace IL-2 v krevním oběhu.

### **Klíčová slova:**

interleukin-2, IL-2, monoklonální protilátka, fúzní protein

### **Key Words:**

interleukin-2, IL-2, monoclonal antibody, fusion protein

## Seznam zkratk:

AA	aminokyselina (z angl. <i>amino acid</i> )
ADCC	na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (z angl. <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> )
AICD	aktivací — indukovaná buněčná smrt (z angl. <i>activation-induced cell death</i> )
Amp	ampicilin
ATP	adenosin-5'-trifosfát (z angl. <i>adenosine-5'-triphosphate</i> )
bcl-2	genová rodina bcl genů (název odvozen z angl. <i>B-cell lymphoma</i> )
BCR	receptor B-buněk (z angl. <i>B-cell receptor</i> )
bp	pár bází (z angl. <i>base pair</i> )
BiP	imunoglobuliny vázající protein (z angl. <i>binding immunoglobulin protein</i> )
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumine</i> )
CD	diferenční skupina (z angl. <i>cluster of differentiation</i> )
CDR	oblast determinující komplementaritu (z angl. <i>complementarity determining region</i> )
Clrb	receptor příbuzný lektinům C-typu (z angl. <i>C-type lectin related protein b</i> )
CSF	faktor stimulující kolonie (z angl. <i>colony-stimulating factor</i> )
CTLA-4	cytotoxický antigen T-lymfocytů 4, CD152 (z angl. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> )
dam	dam methylasa (z angl. <i>DNA adenine methyltransferase</i> )
dcm	dcm methylasa (z angl. <i>DNA cytosine methyltransferase</i> )
DNS	dansyl
dNTPs	směs deoxynukleotidtrifosfátů
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
Fc	část molekuly protilátky (z angl. <i>crystallizable fragment</i> )
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. <i>Federal Food and Drug Administration</i> )
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (z angl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> )
GRB-2	protein 2 vázaný na receptor pro růstový faktor (z angl. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> )

HEK293	označení buněčné linie lidských embryonálních ledvinných buněk číslo 293 (z angl. <i>human embryonic kidney 293</i> )
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
INF $\gamma$	interferon $\gamma$
JAK	Janusova kinasa (z angl. <i>Janus kinase</i> )
LAK	lymfokiny — aktivované zabíjačské buňky (z angl. <i>lymphokine-activated killer cells</i> )
LB	název média podle Luria-Bertaniho
LPS	lipopolysacharid
MAP	mitogeny aktivované proteinkinasy (z angl. <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. <i>major histocompatibility complex</i> )
NK	přírozený zabíječ (z angl. <i>natural killer</i> )
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
STAT5	přenašeč signálu a aktivátor transkripce 5 (z angl. <i>signal transducer and activator of transcription 5</i> )
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA
T <sub>C</sub>	cytotoxické T-lymfocyty (z angl. <i>T-cytotoxic cell</i> )
TCGF	růstový faktor T-buněk (z angl. <i>T-cell growth factor</i> )
TCR	receptor T-buněk (z angl. <i>T-cell receptor</i> )
TE	Tris pufr s EDTA
TGF	transformující růstové faktory (z angl. <i>transforming growth factors</i> )
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (z angl. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
T <sub>H</sub>	pomocné T-lymfocyty (z angl. <i>T-helper cell</i> )
TIL	tumor infiltrující lymfocyty (z angl. <i>tumour-infiltrating lymphocyte</i> )
TNF	faktor nádorové nekrózy (z angl. <i>tumor necrosis factor</i> )
TNF $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ (z angl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
T <sub>reg</sub>	regulační T-lymfocyty (z angl. <i>T-regulatory cell</i> )
VLS	<i>vascular leak syndrome</i>

# Obsah

<b>1</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	CY TOKINY .....	- 1 -
1.1.1	<i>Cytokiny.....</i>	- 1 -
1.1.2	<i>Receptory cytokinů.....</i>	- 4 -
1.1.3	<i>Receptor pro interleukin-2 .....</i>	- 5 -
1.1.4	<i>Interleukin-2.....</i>	- 8 -
1.2	IMUNOTERAPIE .....	- 11 -
1.2.1	<i>Imunoterapie nádorů .....</i>	- 11 -
1.2.2	<i>Imunoterapie IL-2.....</i>	- 12 -
1.3	PROTILÁTKY.....	- 13 -
1.3.1	<i>Protilátky.....</i>	- 13 -
1.3.2	<i>Struktura protilátek.....</i>	- 14 -
1.3.3	<i>Skládání a sekrece protilátek .....</i>	- 17 -
1.3.4	<i>Specificita protilátek a jejich interakce s antigeny.....</i>	- 19 -
1.3.5	<i>Fúzní terapeutické protilátky .....</i>	- 22 -
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>- 24 -</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL .....</b>	<b>- 25 -</b>
3.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	- 25 -
3.2	CHEMIKÁLIE.....	- 26 -
3.3	ENZYMY.....	- 26 -
3.4	BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	- 27 -
3.5	VEKTORY .....	- 27 -
3.6	PRIMERY PRO PCR.....	- 27 -
3.7	ROZTOKY A MÉDIA .....	- 28 -
<b>4</b>	<b>METODY.....</b>	<b>- 29 -</b>
4.1	PCR AMPLIFIKACE.....	- 29 -
4.2	AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA .....	- 29 -
4.3	ŠTĚPENÍ RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEASAMI .....	- 30 -
4.4	EXTRAKCE DNA Z AGAROSOVÉHO GELU .....	- 30 -
4.5	LIGACE INZERTU DO LINEARIZOVANÉHO VEKTORU .....	- 31 -
4.6	TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK <i>ESCHERICHIA COLI</i> (DH5A) TEPELNÝM ŠOKEM .....	- 31 -
4.7	TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH DAM <sup>-</sup> /DCM <sup>-</sup> BUNĚK <i>ESCHERICHIA COLI</i> TEPELNÝM ŠOKEM.....	- 32 -
4.8	PCR Z KOLONIÍ A PŘÍPRAVA SUSPENZNÍ BUNĚČNÉ KULTURY .....	- 32 -

4.9	IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA .....	- 32 -
4.10	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLASMIDU .....	- 33 -
4.11	STANOVENÍ KONCENTRACE DNA .....	- 33 -
4.12	PŘÍPRAVA VZORKŮ PLASMIDOVÉ DNA PRO SEKVENACI .....	- 34 -
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>- 35 -</b>
5.1	PRVNÍ POSTUP PŘÍPRAVY PLASMIDŮ .....	- 35 -
5.2	DRUHÝ POSTUP PŘÍPRAVY PLASMIDŮ .....	- 39 -
<b>6</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>- 46 -</b>
6.1	CÍLENÁ MUTAGENEZE .....	- 46 -
6.2	METHYLACE MSCI MÍSTA .....	- 47 -
6.3	EXPRESNÍ TEST PŘIPRAVENÝCH KONSTRUKTŮ .....	- 48 -
<b>7</b>	<b>SHRnutí.....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHA.....</b>	<b>- 58 -</b>
9.1	SEKVENCE AMPLIFIKOVANÝCH ÚSEKŮ L1, L2, H1, H2 A SIGSEC.....	- 58 -
9.2	SEKVENCE RESTRIKČNÍCH MÍST.....	- 60 -
9.3	SEKVENCE DNA PRO LEHKÝ ŘETĚZEC PROTILÁTKY S4B6 PROTI IL-2 FÚZOVANÝ S MÝŠÍM IL-2 V PLASMIDU PCDNA3.1_L.....	- 60 -
9.4	SEKVENCE DNA PRO TĚŽKÝ ŘETĚZEC PROTILÁTKY S4B6 PROTI IL-2 Z PLASMIDU PCDNA3.1_H.....	- 61 -
9.5	SEKVENACE PTW5SEC_SEAP (INZERCE NUKLEOTIDU).....	- 61 -
9.6	SEKVENACE PTW5SEC_C1 .....	- 62 -
9.7	SEKVENACE PTW5SEC_L1.....	- 63 -
9.8	SEKVENACE PTW5_L2.....	- 64 -
9.9	SEKVENACE PTW5SEC_H1 .....	- 65 -
9.10	SEKVENACE PTW5SEC_H2 .....	- 65 -
9.11	SEKVENCE RELEVANTNÍ ČÁSTI PTW5_SEAP .....	- 66 -
9.12	SEKVENCE RELEVANTNÍ ČÁSTI PTT28_C1 .....	- 67 -

# 1 Teoretická část

## 1.1 Cytokiny

### 1.1.1 Cytokiny

Původ názvu cytokin lze hledat ve složenině řeckých slov  $\kappa\upsilon\tau\omicron$  (kyto) a  $\kappa\iota\nu\omega$  (kinó), jež jsou označením pro buňku a pohyb. Jejich injekční podání způsobí totiž migraci leukocytů [1]. Jedná se o rozpustné glykoproteiny, sekretované převážně leukocyty (mnohdy i jinými buněčnými typy), které působí jako regulátory imunitního systému. Regulují mj. procesy obranyschopnosti, zánětlivé reakce či proliferace. Jde často o růstové faktory. Cytokiny jsou poměrně různorodou skupinou látek, jejíž definování nemusí být vždy jednoznačné. Obecně je lze řadit mezi tkáňové hormony působící v hematopoetickém systému. Hranice mezi cytokiny a klasickými hormony není nikterak ostrá. Některé klasické hormony ovlivňují i buňky imunitního systému a stejně tak některé cytokiny působí na buňky vně imunitního systému [1, 2].

Cytokiny mají velmi krátké poločasy života. Jsou masivně degradovány, čímž je zároveň regulována jejich funkce v časovém i prostorovém rozměru, a působí tedy jen po krátkou dobu a na krátkou vzdálenost [3]. Cytokiny tvoří velmi složitý regulační systém imunitního systému, který bývá nazýván cytokinovou sítí. Cytokinová síť zahrnuje pozitivně i negativně působící cytokiny a jejich induktory a inhibitory, což dohromady tvoří celkovou biologickou i klinickou odezvu [4]. Součinnost mnoha faktorů v této síti vyústí v přísně regulovaný systém, který je v rovnováze. Polymorfismy v promotorových oblastech genů pro jednotlivé cytokiny způsobují nerovnováhu a následné předpoklady pro rozvinutí různých zdravotních problémů. Příkladem může být polymorfismus v genu pro interleukin-1, který způsobí nadměrné zvýšení produkce IL-1 jako odpověď na infekci *Helicobacter pylori*. Jedinci s nadprodukcí IL-1 vykazují vyšší incidenci rakoviny žaludku způsobené gastritidou [5]. Pochopení této složité sítě je nezbytnou podmínkou k celkovému pochopení imunitního systému.



Společnými funkčními rysy všech cytokinů jsou [1]:

**Pleiotropie** ve smyslu ovlivnění různých buněčných subpopulací tímž cytokinem. Lze ji vysvětlit expresí receptorů na více buněčných typech.

**Redundance**, která je dána sdílením cytosolových jednotek a projevuje se identickými funkcemi některých cytokinů. Jako příklad lze uvést dva zástupce interleukinů (podskupina cytokinů) IL-2 a IL-15, jež oba podporují proliferaci T-lymfocytů.

**Potence** daná vysokou afinitou receptorů k ligandům a nízkou disociační rychlostí. Cytokiny účinkují v řádech nano- až femtomolárních koncentrací.

**Jsou součástí sítě či kaskády.**

Možností klasifikace cytokinů je několik. Za nejpřesnější lze považovat díky své jednoznačnosti rozdělení definované na základě struktury cytosolové domény receptoru pro daný cytokin. Příslušnost cytokinu k určité skupině je jednoznačně dána jeho vazbou na příslušný receptor [6]. Přes velký počet dnes známých cytokinů spadají jejich receptory do několika málo tříd s vysoce konzervovanou strukturou [1].

Dělení cytokinů do šesti hlavních rodin podle struktury cytosolové domény receptorů pro cytokiny [1]:

- 1) **Hematopoetinový typ**
- 2) **Cytokiny interagující s interferonovými receptory**
- 3) **Cytokiny interagující s TNF receptory**
- 4) **Cytokiny interagující s IL-1/Toll-like receptory**
- 5) **Cytokiny interagující s tyrosinkinasovými receptory**
- 6) **Cytokiny interagující s chemokinovými receptory**

Receptory cytokinů v jednotlivých rodinách se sekvenčně liší většinou v extracelulárních částech. Cytokiny, které jsou členy stejné rodiny, vykazují taktéž vysokou míru strukturální konzervace. Vysoká podobnost struktur příbuzných cytokinů jim umožňuje interagovat s příbuznými cytokinovými receptory. Avšak jemné rozdíly v jejich strukturách umožňují

cytokinům vybírat mezi jednotlivými velmi podobnými receptory a interagovat s nimi s různou intenzitou [1].

Z historického hlediska jsou cytokiny řazeny do několika skupin, které nikterak neodrážejí strukturní ani funkční příbuznost. Původně byla tato skupina látek rozdělena mezi lymfokiny a monokiny, které byli později souhrně nazvány interleukiny a systematicky označovány čísla podle pořadí charakterizace jejich struktury. Některé látky však nebyly historicky do tohoto číselného systému zahrnuty a byl proto zaveden název cytokiny, který všechny tyto látky zastřešuje [2].

Historické dělení cytokinů nesouvisející se strukturní ani funkční příbuzností:

- 1) **Interleukiny** – heterogenní skupina cytokinů regulující vývoj a aktivaci různých typů leukocytů
- 2) **Chemokiny** – molekuly s chemotaktickou aktivitou
- 3) **Interferony** – regulátory imunitní reakce a složky nespecifických antivirových obranných mechanismů
- 4) **Transformující růstové faktory (TGF)** – mj. indukují buněčnou transformaci
- 5) **Faktory stimulující kolonie (CSF)** – cytokiny stimulující diferenciaci granulocytů, monocytů a myeloidních buněk v kostní dřeni
- 6) **Faktory nekrotizující nádory (TNF)** – cytotoxicky či regulačně působící cytokiny
- 7) **Jiné růstové faktory** – např. růstový faktor kmenových buněk, erythropoetin, růstový faktor fibroblastů, nervový růstový faktor, faktor inhibující leukémii a další do jiných skupin nezařaditelné cytokiny

Rozsáhlé poznatky v oblasti trojrozměrné struktury proteinů umožnily stejně jako u cytokinových receptorů klasifikaci cytokinů na základě podobnosti jejich prostorové struktury [2]:

- 1) **Hemopoetiny** – strukturní podobností je přítomnost čtyř  $\alpha$ -helixů
- 2) **Interferony a rodina IL-10** – cytokiny vzdáleně podobné hemopoetinům obsahující místo čtyř pět  $\alpha$ -helixů
- 3) **Skupina IL-12** – heterodimery, jejichž menší podjednotka je podobná hemopoetinům
- 4) **Skupina TNF** – molekuly obsahující ve své trojrozměrné struktuře antiparalelně uspořádané  $\beta$ -struktury do tvaru typického  $\beta$ -barelu

- 5) **Skupina TGF- $\beta$**  – dimerní molekuly s charakteristickým strukturním prvkem tzv. cystinovým uzlem, který kovalentně stabilizuje jejich tvar
- 6) **Chemokiny** – malé molekuly obsahující různé počty cystinových můstků
- 7) **Ostani** – strukturou jinam nezařaditelné cytokiny

Dalším v literatuře užívaným způsobem klasifikace je dělení na  $T_H1$ ,  $T_H2$  a někdy také  $T_H3$  cytokiny, odvozené od čtyř podskupin pomocných T-lymfocytů ( $T_H$ -lymfocyty). Těmito skupinami jsou:  $T_H0$ ,  $T_H1$ ,  $T_H2$  a  $T_H3$ . Jednotlivé skupiny se odlišují právě produkcí různých cytokinů. Skupina  $T_H0$  produkuje směs cytokinů typu  $T_H1$  a  $T_H2$  a nebyla tedy logicky do nomenklatury cytokinů přenesena [1, 7]. Dělení  $T_H$ -lymfocytů, které bylo dokumentováno na myších, je však značně zjednodušené. Ukázalo se, že mnoho lidských klonů pomocných T-lymfocytů produkuje atypické kombinace cytokinů, čímž ztrácí dělení na základě nomenklatury  $T_H$ -lymfocytů pevný základ. I přesto se nadále užívá [2].

Podle funkce je pak možné cytokiny dělit na:

- 1) **Prozánětlivé**
- 2) **Protizánětlivé**
- 3) **S aktivitou růstových faktorů**
- 4) **Humorální**
- 5) **Buněčné**
- 6) **S antivirovým účinkem**

Popis funkcí jednotlivých cytokinů odděleně a nezávisle na ostatních je složitý kvůli ovlivnění exprese ostatních cytokinů a/nebo jejich receptorů. *In vitro* studie separovaných cytokinů nejsou tedy dokonale přenositelné na *in vivo* systémy, ve kterých nedochází k osamocené expresi a tím ani působení separovaných cytokinů [2]. Cytokiny bývají často presyntetizovány a uloženy v cytoplasmatických granulích, jako membránové proteiny nebo asociovány s povrchovými molekulami buněk nebo v extracelulární matrix [1].

### 1.1.2 Receptory cytokinů

Rozlišujeme rozpustné a membránové receptory cytokinů. Membránové receptory cytokinů se skládají ze dvou až tří podjednotek, které zajišťují vazbu cytokinu a spojení se signalizačními intracelulárními molekulami [2]. Receptory cytokinů jsou většinou prezentovány v menší míře, typicky 100 až 1000 receptorů na jednu buňku [6]. Signalizační podjednotky

bývají sdíleny více receptorovými komplexy cytokinů, které pak tvoří receptorové rodiny. Receptory nejčastěji dělíme podle strukturní podobnosti a asociace s dalšími signál přenášejícími komplexy [2].

Dělení receptorů cytokinů:

- 1) **Imunoglobulinová rodina** – obsahují jednu či více Ig domén
- 2) **Nekovalentně asociované s cytoplasmatickými kinasami**
- 3) **Asociované s trimerními G-proteiny** – receptory chemokinů
- 4) **Receptorové kinasy** (většinou tyrosinkinasy)

Poslední způsob dělení cytokinových receptorů přesně odpovídá dělení cytokinů do šesti hlavních rodin podle struktury jejich cytosolové domény a není zde tedy explicitně uveden [2].

### 1.1.3 Receptor pro interleukin-2

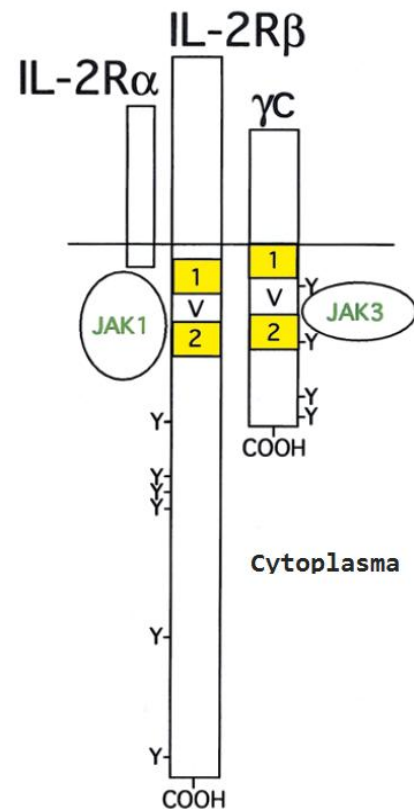
Receptorový komplex rozpoznávající interleukin-2 (IL-2R) je heterodimerní či heterotrimerní receptor s nekovalentně asociovanými podjednotkami [8]. Jedná se o první identifikovaný receptorový komplex pro interleukin, který byl objeven K. A. Smithem [9]. Komplex sestává z IL-2 specifického receptoru  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$ ), který je dle CD systému označován jako CD25, IL-2 receptoru  $\beta$  (IL-2R $\beta$ , CD122) a  $\gamma_c$  řetězce (IL-2R $\gamma_c$ , CD132) společného pro celou receptorovou rodinu [10]. Dalšími objevenými členy této receptorové rodiny jsou receptory pro IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 a IL-21 [2]. Exprese IL-2R je vysoce regulována. Rozdíl exprimovaných receptorů může během tří dnů činit od 0 až po 50 000 receptorových komplexů na buňku [6].

IL-2R $\alpha$  je schopen samostatně vázat IL-2 a proto byl jako první identifikován. Je také znám jako Tac antigen či již zmíněný CD25. Jedná se o glykoprotein o molekulové hmotnosti přibližně 55 kDa. Extracelulární doména obsahuje 219 AA zbytků, přes membránu prochází 19 AA a cytoplasmatická doména sestává z 13 AA zbytků. Neaktivované T-buňky neexprimují znatelná množství IL-2R $\alpha$  [11], avšak kontakt s antigenem způsobí aktivaci několika transkripčních faktorů (NF $\kappa$ B, c-Rel, serum response factor, Elf-1 a HMG-1(Y)) a tím masivní expresi  $\alpha$  řetězce. Na zvýšení produkce IL-2R $\alpha$  se podílí i jeho ligand IL-2, který vyvolá aktivaci STAT5 [10] a dalších transkripčních faktorů [6, 8].

IL-2R $\beta$  je glykoprotein o molekulové hmotnosti 75 kDa. Extracelulární doména obsahuje 214, transmembránová 25 a cytoplasmatická 286 AA zbytků. Náleží k hematopoetické rodině receptorů, která obsahuje oblast s Box1 a Box2 doménami umožňující asociaci s JAK kinasami (obr. 1) [8]. V neaktivovaných T-lymfocytech dochází pouze k nízké expresi [11]. Mírné zvýšení produkce T-lymfocyty následuje po stimulaci antigenem. IL-2R $\beta$  je konstitutivně ve středních až velkých množstvích exprimován u makrofágů a NK buněk [6, 8].

IL-2R $\gamma_c$  byl identifikován jako třetí komponenta komplexu IL-2R. Záhy na to bylo zjištěno, že je obsažen i v jiných receptorových komplexech pro interleukiny. C v názvu značí společný z anglického *common*. Jedná se o glykoprotein o molekulové hmotnosti 64 kDa. Extracelulární doména obsahuje 232, transmembránová 29 a cytoplasmatická 86 AA zbytků. Obsahuje řadu konzervovaných sekvenčních prvků (konzervované cysteinové zbytky a Trp-Ser-Glu-Trp-Ser motiv), které jej stejně jako IL-2R $\beta$  řadí k hematopoetické receptorové rodině. IL-2R $\gamma_c$  je konstitutivně exprimován v četných hematopoetických buňkách, např. makrofázích, T a B lymfocytech a NK buňkách. Gen pro IL-2R $\gamma_c$  je lokalizován na chromosomu X [6, 8].

Prostorovými vazebnými studiemi bylo zjištěno, že IL-2 vytváří ve své struktuře vazné místo pro každý z IL-2R řetězců. V případě receptoru pro IL-2 rozlišujeme dvě varianty, tzv. vysokoafinitní a nízkoafinitní receptor. Komplex vysokoafinitního receptoru ( $K_D = 5 - 10$  pM) sestává ze všech tří již zmíněných podjednotek (IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , IL-2R $\gamma_c$ ). Nalézají se na aktivovaných lymfocytech, na kterých tvoří  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotka při absenci ligandu stabilní heterodimer. Předpokládá se, že IL-2 se nejprve váže k tomuto heterodimeru a až posléze vstupuje do interakce s  $\gamma_c$  řetězcem. IL-2 se k vysokoafinitnímu



**Obr. 1: Schéma struktury komplexu receptoru pro IL-2.** Ve schématu jsou vyobrazeny tři podjednotky komplexu IL-2R. Žlutě jsou vyznačeny konzervované oblasti Box1 (1) a Box2 (2), mezi kterými leží variabilní region (V). Přibližně jsou zobrazena místa interakce JAK1 a JAK3 kinas a pozice tyrosinových zbytků (Y). Převzato a upraveno z [8].

receptorovému komplexu váže rychle (s vysokou rychlostí vazby, tzv. „*on-rate*“  $T_{1/2} = 35$  s) k čemuž přispívá IL-2R $\alpha$  a zůstává asociován po dlouhou dobu (nízká rychlost disociace, tzv. „*off-rate*“  $T_{1/2} = 250 - 300$  min). Středněafinitní receptor ( $K_D = 0,5 - 1$  nM) vzniká pouze interakcí IL-2R $\beta$  a IL-2R $\gamma_c$  podjednotek. Nalézá se na NK-buňkách, makrofázích a neaktivovaných T-lymfocytech. Někdy je uváděn také nízkoafinitní receptor ( $K_D = 5 - 10$  nM), který je tvořen pouze  $\alpha$  podjednotkou a není schopný účinné signalizace [6].

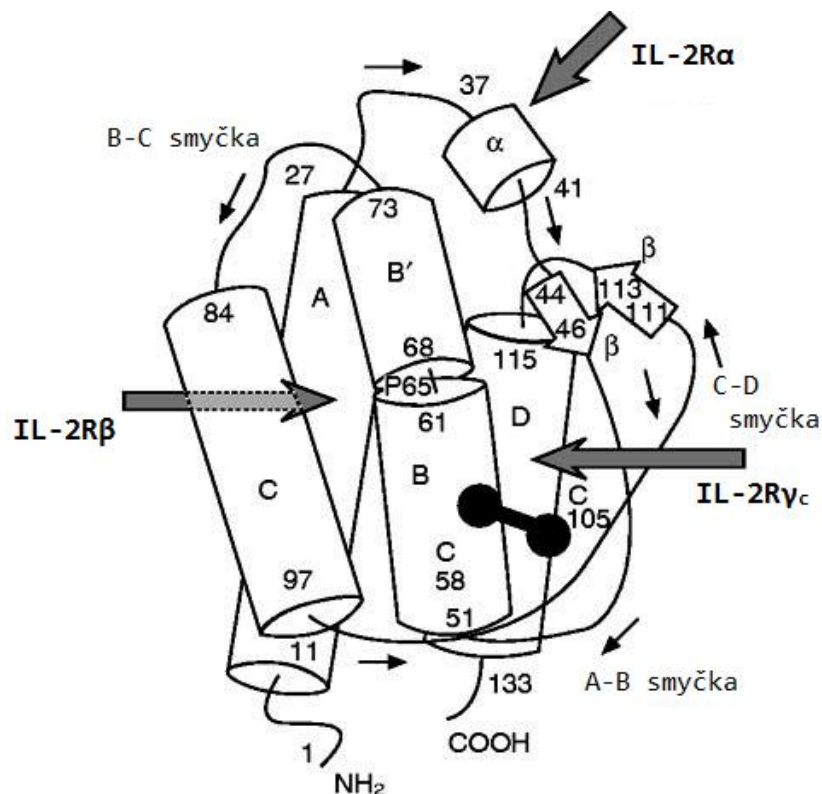
Středněafinitní i nízkoafinitní receptory vykazují stejný signální mechanismus. Po navázání ligandu na IL-2R dochází k heterodimerizaci intracelulárních domén  $\beta$  a  $\gamma_c$  řetězců. Proximální části cytoplasmatických domén těchto dvou řetězců nekovalentně asociují s tyrosinkinasami JAK1 (s doménou  $\beta$  řetězce) a JAK3 (s doménou  $\gamma_c$  řetězce; obr. 1, str. 6). IL-2R $\beta$  navíc interaguje s dalšími tyrosinkinasami jako jsou Fyn, Syk a Lck, která je u T-lymfocytů asociovaná s CD4 a CD8 receptory. V T-buňkách způsobuje heterodimerizace masivní aktivaci JAK1 a JAK3, která vyúsťuje ve fosforylaci tyrosinů v rozličných substrátech (JAK1, JAK3, IL-2R $\beta$ ,  $\gamma_c$ , transkripčním faktoru STAT5, adaptorových molekul, Shc, GRB-2, tyrosinfosfatasy SHP-2, fosfatidylinositol-3-kinasy a MAP kinasy). Transkripční faktor STAT5 po fosforylaci tyrosinu na C-konci dimerizuje a jako dimer přechází do jádra, kde dochází k vazbě na STAT5 promotorové místo. Fosforylované adaptorové proteiny zprostředkovávají interakci s proteinem Shc, který moduluje aktivitu G-proteinu Ras. Celá signalizace vede k indukci exprese mnoha genů souvisejících s proliferací, ať už mitogenních (c-myc, c-fos, c-jun, bcl-2) nebo nemitogenních (IL-2R $\alpha$ , onkostatín Mosm). Aktivace JAK3 je kritická pro většinu následných tyrosinkinasových dějů vedoucích v mitogenní odpověď. Na JAK3 jsou nezávislé fosforylace tyrosinu u IL-2R $\beta$  a SHP-2, indukce protoonkogenu bcl-2, prolongace přežívání buněk. Porušení funkce JAK1 kinasy vykazuje malý efekt na přenos mitogenního signálu. Pro přenos mitogenního signálu se zdají být esenciální tyrosinové zbytky IL-2R $\beta$  Tyr338 (potřebný pro fosforylaci Shc) nebo Tyr392 či Tyr510 (zprostředkovávající aktivaci STAT5). Kromě tyrosinkinas aktivuje IL-2 interakcí s IL-2R komponenty Ras/MAP kinasové dráhy, které regulují expresi c-fos a c-jun [6, 8, 10, 12].

Po interakci receptoru s ligandem bývají receptory internalizovány [13] i s ligandem a následně re-exprimovány. Hladina IL-2R se tedy po vystavení IL-2 značně mění. Nejprve klesá z důvodu internalizace a následně stoupá díky IL-2 indukované expresi [11].

## 1.1.4 Interleukin-2

### 1.1.4.1 Struktura interleukinu-2

Interleukin-2 je první identifikovaná molekula interleukinu, původně označovaná TCGF (růstový faktor T-buněk) [14]. Gen pro lidský IL-2 se nachází na 4. chromosomu, obsahuje 4 exony a kóduje 154 AA dlouhý prekurzor obsahující 20 AA zbytků dlouhou sekvenci pro sekreční signál. Sekretovaný lidský IL-2 má molekulovou hmotu přibližně v rozmezí 15-20 kDa a obsahuje jeden disulfidický můstek. Prekurzor myšičího IL-2 sestává ze 169 AA zbytků. Sekretovaný je pak složen ze 149 AA s molekulovou hmotou v rozmezí 15 – 30 kDa a obsahuje také jeden disulfidický můstek. Lidský a myšičí IL-2 vykazují asi 60% homologii a je pozoruhodné, že lidský IL-2 účinkuje i na myšičí lymfocyty. Tento vztah však není reciproční. Hlavním rozdílem primárních struktur lidského a myšičího IL-2 je inserce 12 opakujících se glutaminových zbytků následujících po Ala14 v myšičí verzi proteinu. Prostorová struktura lidského IL-2 znázorněná na obr. 2 je složena ze 4  $\alpha$ -helixů (A, BB', C a D), které jsou spojeny třemi smyčkami [6].



**Obr. 2: Model prostorové struktury interleukinu-2.** Na molekule jsou válci vyznačeny helixy (A, BB', C, D), šipkami místa interakce s podjednotkami komplexu receptoru IL-2R a černými body se spojníkem disulfidický můstek mezi Cys58 a Cys105. Převzato a upraveno z [6].

Na vazbě mezi IL-2 a se podílí helix A, na vazbě mezi IL-2 a IL-2R $\alpha$  se podílí smyčka mezi helixem A a helixem BB' a na vazbě mezi IL-2 a IL-2R $\gamma_c$  helix D. Pro patřičnou strukturu a tím zprostředkovaně i správnou biologickou funkci je u lidského IL-2 esenciální disulfidický můstek mezi Cys58 a Cys105. Lidský IL-2 obsahuje pouze jedno místo pro O-glykosylaci a tím je Thr3. Glykosylace v tomto místě je heterogenní a není podmínkou biologické aktivity [6].

#### **1.1.4.2 Funkce IL-2 v organismu**

Dle funkce řadíme IL-2 mezi prozánětlivé cytokiny. Stimuluje jak specifickou, tak nespecifickou aktivitu imunitního systému [6].

IL-2 je produkován především T-lymfocyty v průběhu imunitní odpovědi [15]. Neaktivované CD4<sup>+</sup> lymfocyty neprodukují výrazné hladiny IL-2. Produkce IL-2 je stimulována dvěma způsoby. Prvním je navázání antigenu nebo MHC na TCR (receptor T buněk). Tuto vazbu může mimikovat protilátka proti TCR. Druhým způsobem je navázání B7-1 či B7-2 na povrchové molekuly T-lymfocytů (CD28, CTLA-4) [6]. Téměř všechny buňky imunitního systému jsou schopny exprimovat alespoň jeden druh receptoru pro IL-2 a vzhledem k tomu je spektrum biologických účinků IL-2 velice široké. Ovlivňuje většinu typů leukocytů. Primární rolí IL-2 je stimulovat růst, diferenciaci antigenně specifických CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Indukcí exprese Bcl-2, proteinu, který chrání buňky před apoptotickou smrtí, podporuje přežívání CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. V případě CD4<sup>+</sup> lymfocytů se jedná o hlavní proliferační faktor [16]. IL-2 je autokrinní růstový faktor nezbytný pro dělení a proliferaci T<sub>H1</sub> buněk, parakrinně se podílí na dělení T<sub>H2</sub> buněk a cytotoxických T-lymfocytů (CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů) a stimuluje jejich cytotoxickou aktivitu. Ukazuje se však, že i některé CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty mohou produkovat malá množství IL-2 [17]. Přírodní regulační/supresorové CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty tzv. T<sub>reg</sub> lymfocyty jsou stimulovány IL-2 a podílejí se na potlačení autoimunitních reakcí [2], mj. procesem aktivací-indukované buněčné smrti (AICD) [18, 19]. Efektorovým mechanismem účinku T<sub>reg</sub> buněk je zastavení produkce IL-2 v buňkách reagujících na vlastní antigeny a odstranění IL-2 z prostředí zvýšením exprese IL-2R, který je po interakci s IL-2 internalizován a IL-2 je degradován. IL-2 se nikterak nepodílí na poměru T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub> [6].

Aktivované B-lymfocyty exprimují vysokoafinitní IL-2 receptor. Pod vlivem IL-2 intenzivně proliferují a produkují řadu imunoglobulinů (IgM, IgG, IgA). Různé stimuly mohou



indukovat senzitivitu B-lymfocytů k IL-2. Těmito stimuly mohou být v experimentálních podmínkách protilátka proti IL-2R nebo lipopolysacharid (LPS, endotoxin bakteriálních patogenů). IL-2 je tedy diferenciačním faktorem B-lymfocytů, u kterých indukuje sekreci imunoglobulinů [6, 20].

Všechny NK-buňky reagují spontánně na IL-2. Jako odpověď na tento stimul vykazují cytotoxickou aktivitu. IL-2 u zralých NK-buněk nestimuluje proliferaci. Cytotoxickou i proliferační odpověď vykazují jen ty NK-buňky, které exprimují vysokoafinitní IL-2 receptor [6].

Monocyty jsou také spontánně stimulovány IL-2. INF $\gamma$  a LPS stimulují expresi IL-2R na povrch monocytů a tím zvyšují jejich senzitivitu. Během stimulace monocyty produkují velké množství mediátorů cytotoxické reakce (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prostaglandin E, thromboxan B<sub>2</sub>, TNF $\alpha$ ). Tyto produkty mohou být zodpovědné za vedlejší efekty spojené s terapií IL-2 [6].

Neutrofilů jsou k IL-2 značně citlivé. IL-2 se podílí na jejich antimykotické aktivitě stimulací produkce laktoferrinu a TNF $\alpha$  [21].

#### **1.1.4.3 Využití interleukinu-2**

Vzhledem k vysokému počtu biologických účinků a jejich závažnosti je IL-2 využíván jak při výzkumu imunitních mechanismů, tak v klinické praxi. IL-2 například umožnil kultivaci HIV v počátcích jeho výzkumu [22, 23]. Injekčně vpravený do kůže způsobuje svědění, což odpovídá tomu, že vyšší hladiny IL-2 byly nalezeny ve svědivých lupénkových lézích [24]. IL-2 byl testován pro klinické využití v terapii rakoviny, terapii chronických virových infekcí [25], jako adjuvans vakcín [26] či za účelem zabránění propuknutí AIDS (zamítnuto po dvou klinických studiích) [27, 28]. Blokadou produkce IL-2 v antigenně specifických buňkách lze docílit imunosuprese, čehož by mohlo být využito v transplantační medicíně [29]. Komerční rekombinantní forma IL-2 je nazvána Proleukin® (*Prometheus Laboratories*) a byla schválena FDA (*Federal and Drug Administration*) pro terapii rakoviny, konkrétně maligního melanomu a renálního karcinomu. Administrace spočívá v přerušovaném podávání toxických dávek dle přesného schématu. Výrobce uvádí, že v klinických studiích 1 z 15 až 17 případů skončil nulovou evidencí remise po dobu tří měsíců až více než deseti let [30].

## 1.2 Imunoterapie

### 1.2.1 Imunoterapie nádorů

Imunoterapie je terapeutická metoda používaná při onkologické léčbě tzv. minimální reziduální nemoci, to jest po masivním odstranění nádorové masy klasickými terapeutickými postupy (chemoterapie, radioterapie, chirurgický zásah). Metody užití imunoterapie v měřítku odpovídajícímu primárním (klasickým) terapiím jsou zatím ve fázi klinických studií. Imunoterapie je dnes založena především na indukci přirozené protinádorové imunity nebo cílení léčivého přípravku do místa nádoru za využití imunitních mechanismů. Mnohé studie ukázaly, že imunitní systémy většiny pacientů vytvářejí vůči nádorům buněčnou a/nebo humorální imunitní odpověď. Tato odpověď je však slabá a neefektivní. Je tomu tak z části i proto, že nádorové buňky disponují schopností potlačit ve svém okolí imunitní odpověď. Kromě induktorů přirozené protinádorové imunity se vyvíjejí i antisupresivní imunoterapeutika, která by měla tyto induktory v imunoterapeutické léčbě doplňovat [31]. Protilátková imunoterapie využívá protilátky jako nosiče léčiv nebo induktor opsonizace či aktivity komplementu. Okrajové směry protilátkové imunoterapie zahrnují možné využití bifunkčních protilátek či čištění suspenze buněk kostní dřeně pro autologní transplantaci [2, 6].

Hlavní směry imunoterapie jsou:

1) **Nespecifická indukce zánětlivých procesů v místě nádoru**

Tento mechanismus souvisí s možným přirozeným mechanismem protinádorové imunity, který je založen na prezentaci nádorového antigenu T-lymfocytům prostřednictvím zánětem aktivovaných dendritických buněk [32].

2) **Stimulace LAK (lymfokiny-aktivované zabíječské buňky)**

LAK vznikají stimulací směsí NK a T buněk pacienta směsí cytokinů obsahující především IL-2, čímž se předpokládá i aktivace nádorově specifických lymfocytů [33].

3) **Zlepšení antigen-prezentující funkce tumorových buněk**

V principu jde o *in vitro* genetickou manipulaci buněk nádoru vedoucí buď k expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86, které stimulují aktivaci a přežívání T-lymfocytů [34] nebo produkci některých cytokinů. Následně se buňky vystaví působení cytostatik či záření, čímž se zamezí jejich dalšímu dělení. Tyto buňky

vpravené do pacienta stimulují imunitní odpověď nádorově specifických T-lymfocytů vůči nádoru [2].

#### 4) **Nádorové vakcíny**

Nádorové vakcíny jsou založeny na identifikaci a následné *in vitro* přípravě peptidů, které jsou rozeznávány nádorově specifickými T-lymfocyty. Těmito peptidy lze následně *in vitro* či *in vivo* stimulovat T<sub>C</sub> a T<sub>H1</sub> lymfocyty [2].

#### 5) **Imunoterapie dendritickými buňkami**

Tato imunoterapie je postavena na *in vitro* přípravě dendritických buněk z periferních monocytů a jejich inkubaci s tumorovými antigeny. Injekce takto připravených dendritických buněk stimulují u myši T-lymfocyty v nádorové odpovědi. Terapie pro humánní užití je ve fázi konečných klinických testů [32].

#### 6) **Imunoterapie produkty imunitního systému**

Při terapii určitých druhů nádorů lze využít jako léčiv některých produktů imunitního systému. Jako příklad lze uvést rekombinantně připravené cytokiny, které vedou k posílení či utlumení imunitních mechanismů ve prospěch pacienta. Využívají se takto připravené interleukiny (IL-2), interferony nebo faktory stimulující kolonie (GM-CSF). Vyšší dávky, které často poskytují slibné imunitní odpovědi, jsou však často toxické [2].

### 1.2.2 **Imunoterapie IL-2**

Hlavní využití IL-2 v terapii se týká oblasti tumorové imunity. Využití IL-2 v terapii nádorů je založeno na aktivaci buněk cytotoxických pro tumor. Užití IL-2 je limitováno četnými vedlejšími efekty. Novými směry jsou cílená distribuce IL-2 do tumorové tkáně či genetická modifikace nádorových buněk genem pro IL-2. Další možností je užití rekombinantních produktů fúzovaných s IL-2 [35]. IL-2 se podává při deficienci jeho produkce (HIV). Léčba maligního melanomu a renálního karcinomu je limitována jeho toxicitou. Obvyklé vedlejší účinky jsou chřipku připomínající nevolnosti, myelotoxicita, abnormální funkce jater, VLS (Vascular Leak Syndrome). Zvyšování VLS je nejzávažnější vedlejší účinek terapie a v podstatě limituje maximální dávku. Při VLS dochází ke zvýšení cévní permeability, které je doprovázeno extravazací tekutin a proteinů a vede k mezitkáňovému edému a selhání orgánů. VLS se projevuje zadržováním tekutin (pokles hladiny sérového albuminu a osmolarity), zvyšováním tělesné hmotnosti, periferními edémy, pohrudničními otoky, perikardiálními výpotky či vodnatelností břišní [36]. Veškeré tyto efekty zatěžují kardio-

vaskulární systém a při těžších stavech vedou až k jeho selhání. VLS se vyskytuje i u pacientů, kterým jsou podávány jiné interleukiny, konkrétně například IL-3 a IL-4, interferon  $\alpha$  nebo imunotoxiny, což jsou fúzní proteiny scFv nebo Fab částí protilátek specifických pro nádor s toxinem. VLS byl při terapii pozorován jak při samostatném podávání IL-2, tak při kombinovaných podáních s LAK buňkami, TIL buňkami (tumor infiltrující lymfocyty), jinými cytokiny či monoklonálními protilátkami. Mechanismem toxického účinku IL-2 se zdá být poškození endothelia způsobené aktivovanými leukocyty a prozánětlivou odpovědí [36].

## 1.3 Protilátky

### 1.3.1 Protilátky

Protilátky, neboli rozpustné či sekretované imunoglobuliny, jsou produkovány plasmocyty, což jsou B- lymfocyty, u nichž došlo mj. ke stimulaci BCR (receptoru B-buněk) a následně k jejich pomnožení a diferenciaci [2]. Fyziologický obsah nejpočetnějšího typu imunoglobulinu IgG v lidském séru činí v průměru 12 mg/ml [37] a tvoří až 80% všech sérových imunoglobulinů [22].

Základní funkce protilátek v organismu jsou:

#### 1) **Neutralizace**

Blokace toxické aktivity antigenů prostým navázáním na kritické epitopy toxinů či navázání na epitop důležitý pro patologickou funkci mikroorganismu (např. vazná místa).

#### 2) **Shlukování antigenů**

Shlukování antigenů usnadní jejich vylučování [22].

#### 3) **Opsonizace**

Navázáním na antigen či antigení strukturu na mikroorganismu se stimuluje jejich pohlcení fagocyty a zároveň se aktivují jejich destrukční mechanismy. Stimulují i napadení NK-buňkami. Dochází k tzv. cytotropní reakci protilátek, kdy na jedné straně protilátky vážou specifický antigen a na druhé pomocí Fc fragmentu protilátky vážou Fc receptor výkonných buněk.

#### 4) **Aktivace komplementu**

Indukují klasickou cestu aktivace komplementu navázáním komplexu antigen-protilátka na C<sub>1q</sub> komplementu. (vyjma IgG4 a IgA) [22].

#### 5) **ADCC** (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita)

Jedná se o cytotoxicitu zprostředkovanou protilátkou. Navázáním na Fc receptor NK-buněk, makrofágů, neutrofilů aktivuje cytotoxické mechanismy [2, 22].

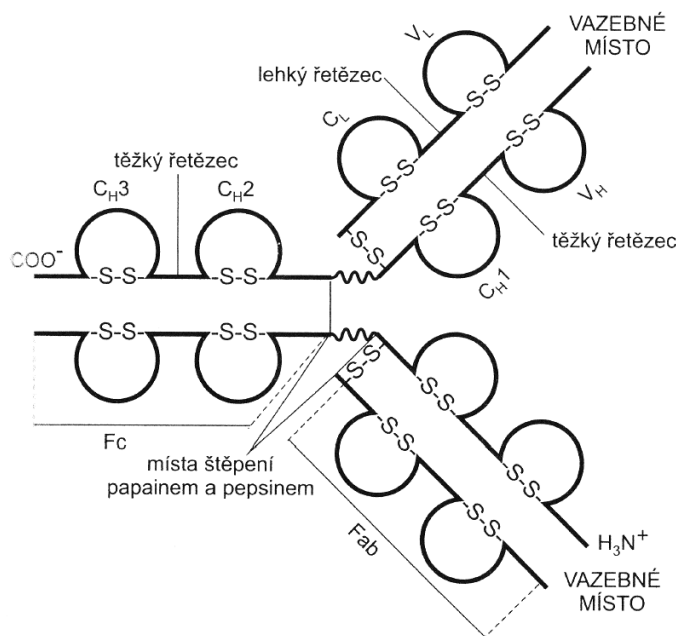
### 1.3.2 **Struktura protilátek**

Protilátky jsou glykoproteiny skládající se z glykosylovaných těžkých (H) a většinou neglykosylovaných lehkých (L) řetězců. Glykosylace je velmi důležitá pro správnou strukturu a rozpustnost. Neúplná glykosylace je důvodem nízké rozpustnosti. Základní jednotkou je dimer řetězců H a L. Aminokonce obou řetězců obsahují variabilní úseky. Karboxylové konce jsou pak zodpovědné za ostatní funkce mimo vázání antigenu jako jsou vazba a aktivace komplementu, vazba na Fc receptor a transport buňkou [6].

Kovalentní strukturu imunoglobulinů určila skupina G. Edelmana v roce 1968. Lokalizovali vnitřetězcové disulfidické můstky [38]. Těžký řetězec se skládá ze čtyř, u některých skupin až z pěti, strukturně podobných domén a jeho molekulová hmotnost bývá v rozmezí 50 – 70 kDa. Lehký řetězec o typické molekulové hmotnosti okolo 25 kDa sestává ze dvou domén. Domény jsou označovány podle míry jejich variability jako variabilní (V) nebo konstantní (C) s indexem řetězce (L nebo H) a poté číslovány podle pořadí v řetězci od aminokonce ke karboxylovému konci (obr. 3, str. 15). Indexy značící příslušnost k řetězci mohou být nahrazeny konkrétním typem řetězce. Geny pro C<sub>H</sub> domény vykazují až 95% homologii [22]. Jsou známy dva typy lehkého řetězce označované jako  $\kappa$  a  $\lambda$  a pět typů těžkého řetězce označovaných  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  a  $\epsilon$ . Řetězce  $\kappa$  a  $\lambda$  se odlišují sekvencí AA a jsou kódovány různými geny na různých chromosomech, avšak velikostí i výslednou prostorovou strukturou jsou si velice podobné. Řetězec  $\lambda$  je k některému z těžkých řetězců připojen předposledním AA zbytkem. Řetězec  $\kappa$  je připojen posledním zbytkem. Tyto zbytky tvoří disulfidický můstek s cysteiny v tzv. pantové oblasti. Geny pro izotypy těžkých řetězců jsou tandemově umístěny na jediném chromosomu, u lidí je to chromosom č. 14. U řetězců  $\gamma$  se rozlišují ještě další čtyři subtypy a u řetězců  $\alpha$  dva subtypy. Těmito řetězci jsou tvořeny IgM, IgD, IgG(1-4) a IgE. Podtřídy IgG se liší počtem disulfidických můstků a detaily struktury domén. Kterýkoliv typ těžkého řetězce se může párovat

s kterýmkoliv typem L řetězce, avšak v každé molekule Ig může být jen jeden typ L a H. Variabilní domény H a L řetězců tvoří dohromady místo pro vazbu antigenu [6, 22, 37].

Proteolytickým štěpením molekuly imunoglobulinu byly definovány její části, které jsou zobrazeny na obr. 3.

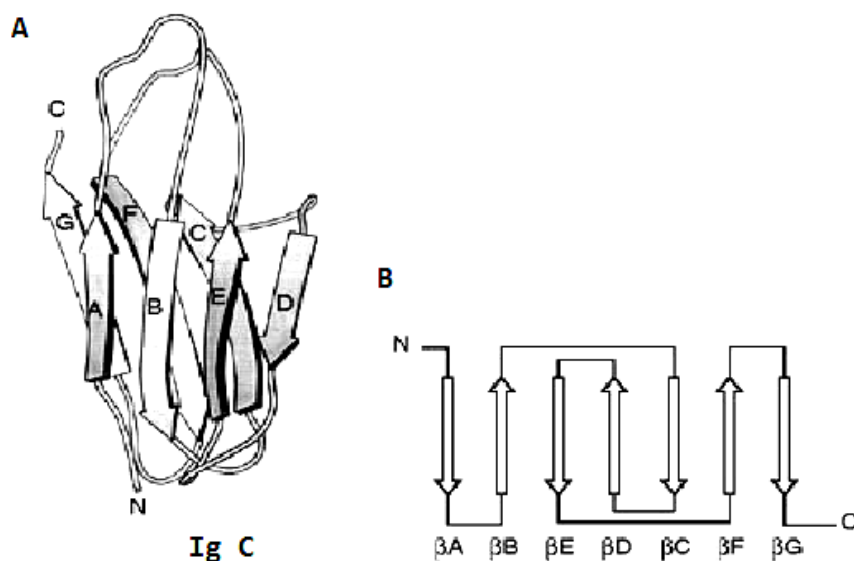


**Obr. 3: Schéma imunoglobulinové molekuly.** Molekula imunoglobulinu G je heterotetramer  $H_2L_2$ . Těžké (H) řetězce jsou složeny ze čtyř domén. Lehké (L) řetězce sestávají z domén dvou. Všechny imunoglobulinové domény obou řetězců jsou stabilizovány disulfidickými můstky. Interakce mezi L-H i H-H je kovalentně realizována disulfidickým můstkem. Domény lehkých a těžkých řetězců na svých N-koncích tvoří kooperaci jejich variabilních domén vazebná místa pro antigen. Papain štěpí IgG mezi disulfidickým můstkem spojujícím L a H řetězec a disulfidickým můstkem spojujícím dva H řetězce. Papain tak dává vzniknout dvěma fragmentům Fab a jednomu fragmentu Fc. Pepsin štěpí IgG za disulfidem spojujícím dva H řetězce blíže k jejich karboxylovým koncům a poskytuje tak disulfidicky vázané Fab fragmenty a fragment Fc. Převzato z [22].

Papain hydrolyticky štěpí IgG na dva fragmenty zvané Fab (antigen vázající fragment) a Fc (krystalizovatelný) fragment. Ke štěpení dochází v proximální pantové oblasti mezi disulfidem spojujícím dva těžké řetězce a disulfidickým můstkem spojujícím těžký a lehký řetězec. Pepsin hydrolyticky štěpí molekulu imunoglobulinu v distální části pantové oblasti, za oblastí disulfidických můstků, a poskytuje tak dva disulfidicky vázané Fab fragmenty. Fc fragment se váže na Fc receptor fagocytů a zprostředkovává tak signál pro fagocytózu protilátkami opsonizované částice. Váže se na něj protein A některých kmenů stafylokoků, což lze využít k afinitní purifikaci protilátek. Fc fragment je také spojen s polčasem života protilátky v séru, který u IgG činí asi tři týdny. Fv fragment sestává z nekovalentně

vázaných N-koncových variabilních částí Fab fragmentu. Převážnou část interakčního povrchu tvoří třívláknový pás, popřípadě pětivláknový rozšířený pás, variabilních domén H a L řetězce. Čtyřvláknové pásy jsou vystaveny solventu. Pantová oblast je část, ve které jsou oba těžké řetězce spojeny disulfidickými můstky. Pantová oblast zajišťuje flexibilitu Fab částem. Nachází se mezi  $C_{H1}$  a  $C_{H2}$  doménami. Disulfidické spojení se nachází v rigidním jádru pantové oblasti v sekvenci Cys-Pro-Pro-Cys-Pro. Pantová oblast u nejčastějšího lidského typu imunoglobulinu IgG1 je dlouhá 15 AA. S asi 1-2% zastoupením se vyskytují IgG, které mají pantovou oblast v H řetězci nepřítomnou a kovalentní dimer protilátky je pak tvořen disulfidickou interakcí lehkých řetězců [6, 22, 37, 39].

Variabilní domény obsahují úseky, které jsou vůči jiným molekulám imunoglobulinů prakticky unikátní, těmto říkáme hypervariabilní úseky. Primární struktura konstantních domén je pro daný isotyp Ig prakticky stejná. V případě podtypu IgG se liší často jen ve čtyřech a méně AA zbytcích na doménu. Každá doména je tvořena sekvencí 100 až 120 AA. Disulfidické můstky vytvářejí v doménách smyčky obsahující přibližně 60 AA. Úseky mezi doménami jsou tvořeny flexibilními segmenty. Prostorová struktura všech těchto domén připomíná soudek nebo sendvič tvořený smyčkami polypeptidového řetězce.  $\beta$ -struktura je dominantním stavebním prvkem imunoglobulinů. Základní strukturní motiv domén jsou dva pásy tvořené antiparalelními  $\beta$ -hřebeny. U konstantních domén jeden pás obsahuje tři hřebeny, druhý potom čtyři. Konstantní domény obsahují vždy tzv. motiv řeckého klíče (obr. 4, str. 17).



**Obr. 4: Struktura typické konstantní imunoglobulinové domény.** (A) Zobrazení prostorového průběhu řetězce. (B) Schematické zobrazení struktury řetězce klíče. Označení  $\beta$ -hřebenů v obou schématech si odpovídají. Převzato a upraveno z [6].

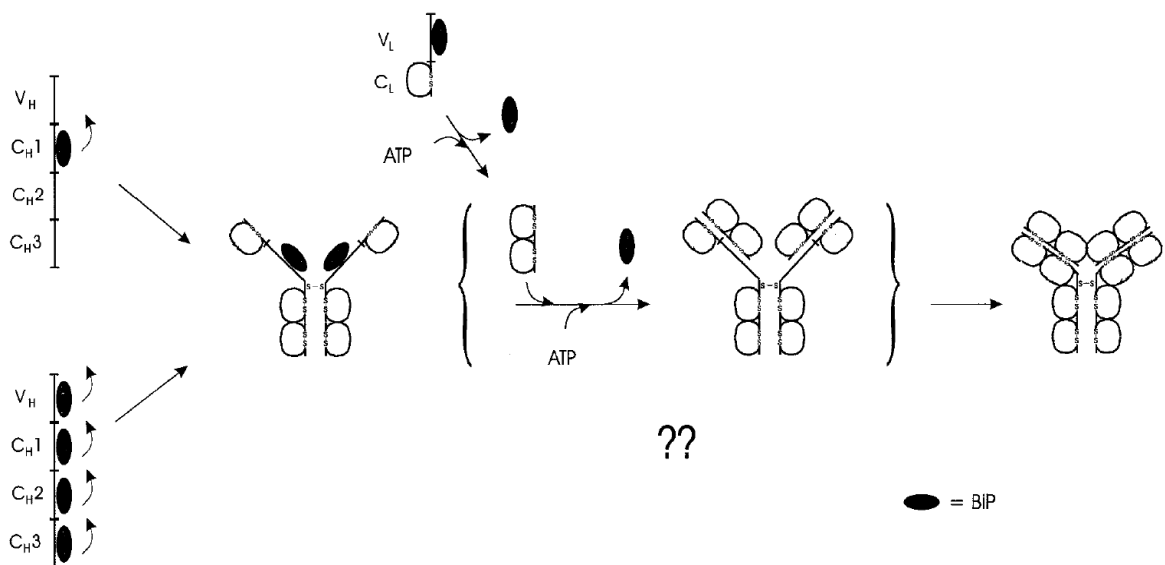
Variabilní domény se skládají z devíti  $\beta$ -hřebenů uspořádaných obdobně jako v případě konstantních domén do pásů. V tomto případě jsou však pásy tři a obsahují dva, tři nebo čtyři  $\beta$ -hřebenů. Někdy v jejich struktuře dochází k vodíkové vazebné interakci jedné smyčky (CDR2) s třířetězcovým pásem  $\beta$ -hřebenů, která dává vzniknout místo třívláknového spíše pětivláknovému uspořádání. Tím získává trojrozměrná struktura variabilní domény tvar spíše barelu oproti sendviči, který tvoří spíše konstantní domény [6, 22, 37].

### 1.3.3 Skládání a sekrece protilátek

Pro sekreci imunoglobulinů je esenciální správné složení jednotlivých podjednotek i jejich následné správné poskládání do multimerních komplexů, bez kterého nemohou být transportovány z endoplasmatického retikula [40]. V 80. a 90. letech byly identifikovány proteiny, které se přechodně vážou v endoplasmatickém retikulu na nekompletně složené proteiny či nezcela asociované multimerní komplexy proteinů. Často se jednalo o enzymy podílející se na glykosylaci, tvorbě disulfidických vazeb či izomerizaci peptidových vazeb [41]. Byly nazvány molekulární chaperony, čemuž odpovídá i jejich funkce, kterou je zabránění nesprávných interakcí mezi proteinovými doménami a stabilizace proteinu během jeho skládání. Nejhojnější rodinou těchto proteinů je rodina Hsp70. BiP, imunoglobuliny vázající protein, o molekulové hmotě 78 kDa někdy také nazývaný grp78 (glukosou regulovaný protein) je členem právě Hsp70 rodiny. BiP byl identifikován jako stabilní nekova-



lentní vazebný partner těžkých řetězců imunoglobulinů, které nebyly řádně asociovány s lehkými řetězci tak, aby tvořily molekulu Ig. BiP se stabilně váže pouze k první konstantní doméně těžkého řetězce  $C_{H1}$ . Tato vazba zajišťuje retenci těžkého řetězce v endoplasmatickém retikulu [42]. K ostatním doménám se neváže vůbec nebo jen transientně. Transientně se váže na nesložený variabilní region lehkého řetězce a opouští jej po složení domény. Lehké řetězce usnadňují jednak skládání  $C_{H1}$  domény a jednak disociaci této domény a BiP. Aby mohly lehké řetězce participovat na skládání a uvolňování  $C_{H1}$  domény, musí být již samy složeny [40]. V případě absence lehkého řetězce nedochází ke složení  $C_{H1}$  domény ani k vytvoření jejího mezimolekulového disulfidu a  $C_{H1}$  zůstává substrátem BiP. Nesložené lehké řetězce tedy způsobují prodlevu při sekreci [43]. BiP vykazuje ATPasovou aktivitu, kdy za současné hydrolýzy ATP uvolňuje asociovaný peptidový úsek [44]. Celý proces je schematicky shrnut na obr. 5.



**Obr. 5: Schéma skládání IgG.** Schematické znázornění dosavadního poznání procesu skládání podjednotek IgG za pomoci BiP. BiP se stabilně váže k  $C_{H1}$  doméně těžkého řetězce. K ostatním doménám se neváže nebo jen transientně. Následuje asociace dvou těžkých řetězců a téměř zároveň složení ostatních domén těžkých řetězců doprovázené oxidací cysteinů a vytvořením intramolekulárních disulfidických můstků. BiP se transientně váže k nesložené variabilní doméně lehkého řetězce  $V_L$ . Další mechanismus není přesně znám. Dochází však pravděpodobně za spotřeby ATP k disociaci BiP za současné asociace složeného lehkého řetězce a dimeru těžkých řetězců s nesloženými  $C_{H1}$  doménami, což vyústí ve složení jejich  $C_{H1}$  domén. Převzato z [40].

Přítomnost nesložených proteinů v endoplasmatickém retikulu obecně indukuje transkripci BiP a obecně inhibuje syntézu proteinů [44]. Přidání ATP *in vitro* ke komplexu BiP-H způsobí disociaci komplexu a složení  $C_{H1}$  domény bez přítomnosti lehkého řetězce. *In vitro* studie naznačují, že každá doména v řetězci se může složit nezávisle na ostatních [45,

44]. ATPasová aktivita je nejvíce stimulována hydrofobními peptidovými řetězci. BiP preferuje peptidy obsahující hydrofobní aminokyseliny v každé druhé pozici, což souvisí s možným umístěním těchto AA zbytků na stejné straně polypeptidového řetězce ve struktuře  $\beta$ -hřebenu [46]. Nesprávně a nekompletně sbalené Ig zůstávají navázány na BiP v endoplasmatickém retikulu a jsou označeny pro degradaci [40, 47]. Většina lehkých řetězců imunoglobulinů je schopna samostatné sekrece. Některé jsou však sekretovány pouze jako součást kompletně sbaleného imunoglobulinu. Má se za to, že rozdíl mezi lehkými řetězci, které mohou být sekretovány nezávisle na produkci těžkého řetězce, a lehkými řetězci, jejichž sekrece na těžkých řetězcích závisí, je jejich schopnost tvořit homodimery, která je lokalizovaná na V doménách [43]. Patologická verze takovýchto  $V_L$ - $V_L$  homodimerů se nazývá Bence-Jonesův protein, který je možné detekovat v moči a využít pro doplňkovou diagnosu např. mnohačetného myelomu (nádorové zvrhnutí plasmocytů), kde se vyskytuje u přibližně dvou třetin nemocných [6].

V normální plasmatické buňce je exprese lehkých a těžkých řetězců vyrovnaná nebo mírně převládá lehký řetězec, jehož nadbytek je v buňce degradován. Nevyrovnanou produkci vykazují buňky myelomové [6].

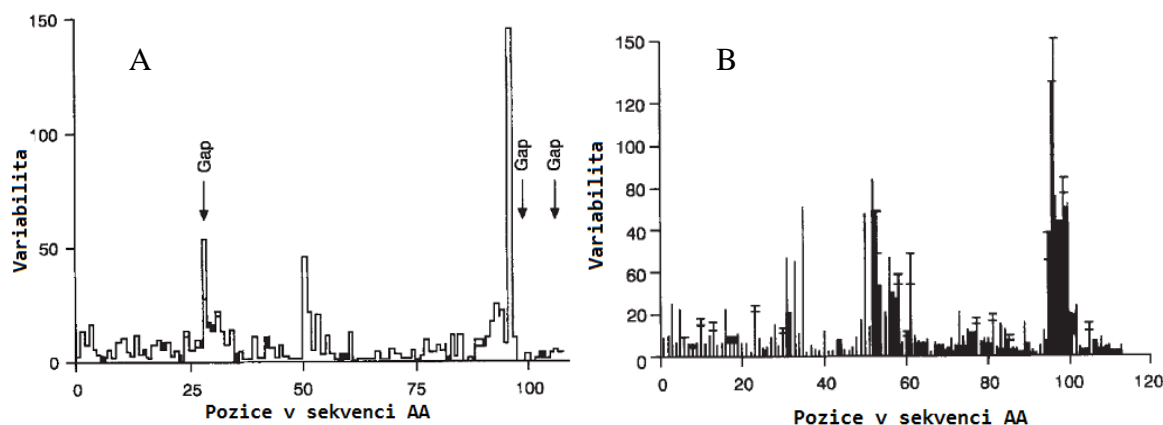
Správně poskládané heterodimery jsou transportovány skrz hrubé endoplasmatické retikulum do Golgiho aparátu a dále do post-Golgiho váčků, které mohou fúzovat s membránou, čímž dojde k sekreci Ig z buňky [6].

#### **1.3.4 Specificita protilátek a jejich interakce s antigeny**

Specificita protilátek je dána jejich afinitou k antigenům, kterou kvantitativně vyjadřuje rovnovážná disociační konstanta  $K_D$  nebo asociační konstanta  $K_A$ , které jsou dány pro každý možný antigen.  $K_D$  se mohou velmi lišit. U protilátek se vyskytují v rozmezí mezi  $10^{-3}M$  až  $10^{-11}M$ , ale nikdy nedosáhnou  $K_D$  vazby biotinu na avidin ( $10^{-15}M$ ).  $K_D$  pro sacharidové antigeny jsou o několik řádů menší ( $10^{-3}M$  až  $10^{-6}M$ ), než pro proteinové. Analýzou prostorových struktur antisacharidových a antiproteinových protilátek byly zjištěny rozdíly jejich vazebných míst. Vazebná místa protilátek proti sacharidovým antigenům vykazují drážkovitý nebo dutinový tvar a rozpoznávají lineární část sacharidového řetězce, která se do nich může vmezeřit respektive zastrčit svým neredukujícím koncem. Protilátky proti proteinovým strukturám obsahují vazná místa proti krátkým kontinuálním sekvencím nebo proti nekontinuálním sekvencím hydrofobních AA, které k sobě byly asociovány ve

vodném prostředí. Dá se říci, že v tomto případě protilátky rozeznávají spíše konformaci než sekvenci epitopu. Určení přesných konstant pro nízkomolekulární látky je obtížné, protože na interakci se kromě haptenu (nízkomolekulární látka navázaná na molekulu proteinu vyvolávající imunitní odpověď) podílí i proteinový nosič. U protilátek je třeba rozlišovat afinitu od avidity. Afinita vyjadřuje sílu interakce jednoho vazebného místa s jedním antigenem. Avidita pak vyjadřuje sílu, kterou polyvalentní protilátka interaguje s polyvalentním antigenem. Afinita protilátek je spojena s variabilními regiony H a L řetězců, avidita pak s konstantními regiony H řetězců. Třídy protilátek se liší svými aviditami [6].

Spojení lehkého a těžkého řetězce dává vzniknout vazebnému místu protilátky, které interaguje s antigenem a nazývá se oblast determinující komplementaritu (CDR, z angl. *complementarity determining region*). CDR interaguje s epitopem na antigenu, někdy nazývaným antigenní determinanta. Odhaduje se, že existuje  $10^4$  až  $10^7$  možných antigenních determinant [37]. Wu a Kabat prozkoumali v roce 1970 asi 70 variabilních domén lidských ( $V_K$  a  $V_L$ ) a myších ( $V_K$ ) a lokalizovali tři vysoce variabilní místa mezi 24-34, 50-56 a 89-97 AA zbytkem. Obdobnou analýzu provedli v roce 1979 i pro těžké řetězce. Variabilní místa byla nalezena mezi pozicemi 31-35, 50-65 a 95-102 (obr. 6) [48].



**Obr. 6: Grafy sekvenčních závislostí variability AA zbytků pro lehké (A) a těžké (B) řetězce.** Z grafů vyplývají umístění hypervariabilních regionů v AA sekvencích lehkých a těžkých řetězců. Gap značí místa, ve kterých byly pozorovány rozdíly v délce. Variabilita podle Kabata je dána podílem počtu různých AA vyskytujících se v dané pozici a četnosti výskytu nejhojnější AA. Převzato a upraveno z [48].

Pozdější lokalizace těchto úseků v prostorové struktuře imunoglobulinů prokázala, že tyto tvoří CDR. Zbytek  $V_H$  a  $V_L$  domén tvoří jakási lešení, která umísťují variabilní úseky v prostoru a jsou vysoce konzervovány. Variabilní segmenty tvoří v prostoru smyčkovité struktury umístěné na špičce bližší k aminokonci řetězce, které vytvářejí souvislou solven-

tu přístupnou oblast o ploše přibližně 2800 Å<sup>2</sup> [6]. Prostorové tvary smyček se odvíjejí od druhu a počtu jejich AA. V CDR jsou více a méně konzervované AA. Komparativními studii rentgenových struktur se zjistilo, že struktura smyček je dána několika konzervovanými zbytky AA v CDR segmentu [49]. Existuje jen několik málo konformací hlavního řetězce, tzv. kanonických struktur. V 381 myších IgG se vyskytovalo jen 33 z 300 možných kombinací kanonických struktur a 87 % protilátek spadalo jen do jedné ze šesti kombinací. Tyto kombinace korelují s typy antigenů a tvoří jakési prototypy CDR segmentů [6, 50].

Tvar antigen vázacího regionu a síla specifické interakce závisí na velikosti, tvaru a polaritě povrchu antigenu. Plocha styku či vnoření antigenu do protilátky závisí značně na velikosti antigenu a pohybuje se v rozmezí od 1,7 nm<sup>2</sup> do 9 nm<sup>2</sup>. Velikost této plochy limituje většinou velikost antigenu. V případě velkých antigenů, jako například největšího studovaného antigenu – neuraminidasy, se stává limitujícím antigen vázací region. Počet zapojených zbytků se pohybuje od 8 u malých molekul do 14 až 21 zbytků u proteinů. U proteinových antigenů se na interakci podílí asi 10 až 15 % jejich povrchu. U malých molekul to bývá 50 až 90 %. CDR regiony těžkých řetězců se na interakci s antigenem podílejí 50 až 80 % [6].

Ve vazbě proteinového antigenu a protilátky převažují Van der Waalsovy interakce mezi zbytky. Většina vazeb obsahuje alespoň jednu vodíkovou či iontovou vazbu, typicky jich obsahují 15 až 20. S obsahem vodíkových vazeb souvisí i četnost výskytu tyrosinu a tryptofanu. Častěji se vyskytují v antigen vázajících oblastech než ve zbytku molekuly. Tyto zbytky tvoří vodíkové vazby s atomy antigenu či solventu. Obsah vodíkových vazeb v těchto případech často nekoreluje se silou interakce. Nikdy neobsahují kovalentní vazby. Dle krystalových struktur komplexů antigen-protilátka interagují s protilátkou spíše postraní řetězce, minimálně pak atomy podél peptidové kostry. Karbonylový kyslík nebo amidový vodík někdy mohou participovat na vodíkových vazbách. Na rozhraní antigenu protilátky se nacházejí molekuly vody, které se také zapojují do interakce [2, 6].

Ani epitop ani CDR nejsou v průběhu vytváření komplexu zcela rigidními strukturami. Na obou stranách probíhá řada konformačních změn. V molekule protilátky dochází k rotaci V<sub>H</sub> relativně vůči V<sub>L</sub> a s tím souvisí i další změny konformace peptidové kostry. Dochází rovněž ke změně prostorového uspořádání postranních řetězců. Tyto změny se

týkají neproteinových antigenů. Pro proteinové antigeny není tato oblast zatím dostatečně prozkoumána z důvodu nedostatku krystalových struktur [6].

Komplexy antigenů a bivalentních protilátek bývají dobře rozpustné. Jen v případech, kdy se stechiometrie blíží nebo rovná ekvivalenci mohou být nerozpustné [6].

#### **1.3.4.1 Monoklonální protilátky**

Monoklonální protilátky jsou identické klony, produkty jednoho klonu plasmatických buněk. *In vivo* je jednotlivých klonů i přes ohromné celkové množství protilátek jen velmi malý počet. Pouze za patologických stavů jakým je například myelom dochází k výraznému navýšení množství jednoho klonu. Imunizací zvířete lze získat polyklonální antisérum, které obsahuje sadu protilátek interagujících s různými epitopy téhož antigenu a ze kterého je nutné monoklonální protilátky dále separovat. *In vitro* produkce monoklonálních protilátek se provádí pěstováním izolovaných B-lymfocytů v živném médiu. Z důvodu krátkého života B-lymfocytů se provádí jejich imortalizace fúzí B-lymfocytů s myelomovou linií, čímž vznikne hybridom, který produkuje stejné protilátky jako původní B-lymfocyt [51]. Využití monoklonálních protilátek je široké. Využívají se v oblasti výzkumu, klinické imunodiagnostiky, která je jejich nejširším užitím, terapeutiky, analytických aplikací, biotechnologií a mají tedy značný komerční význam [2, 37].

#### **1.3.5 Fúzní terapeutické protilátky**

Možnosti fúzování proteinových léčiv, toxinů či cytokinů s protilátkami jsou velice široké. Při konstrukci fúzních konstruktů se většinou snažíme docílit, aby výsledný fúzní produkt zachovával požadované funkce obou volných fúzních partnerů. Z principu lze daný protein připojit k N- i k C-konci. Výběr N-konce může být výhodnější v případě, že fúzovaný protein vyžaduje N-terminální zpracování či skládání. Příkladem může být fúzní protein NGF, růstový faktor nervů, s protilátkou, který vykazoval správnou biologickou funkci pouze při fúzování s N koncem těžkého řetězce, přičemž při fúzování na C-konci nebyla aktivita NGF zachována [52]. C-terminální připojení zvyšuje pravděpodobnost zachování funkční CDR. V případě, že funkce protilátky spojené s Fc fragmentem nejsou nezbytné nebo jsou snad nepříznivé, je možné provést fúzi hned za pantovou oblastí. V případě nepotřeby bivalentnosti dokonce hned za C<sub>H</sub>1 doménou. Další výhodou takovýchto zkrácených fúzních

protilátek může být nízká molekulová hmota. K fúzování jsou využívány oba konce obou řetězců (L i H) [53].

### 1.3.5.1 Fúzní IL-2 protilátka

Byl vytvořen fúzní protein lidského IL-2 s C<sub>H</sub>3 doménou IgG3 proti dansylu (DNS), který vykazoval u myši čtyřikrát větší afinitu k IL-2R $\alpha$  a desetkrát vyšší účinnost při generování LAK než rekombinantní lidský IL-2 a 17krát delší poločas cirkulace. Lepší terapeutické parametry vykazuje i IL-2 fúzovaný s polyethylenglykolem. Při léčbě subkutánních tumorů u myši pomocí IL-2 fúzovaného s antitumorovou protilátkou bylo vyléčeno 7 z 8 myší. Při podávání směsi IL-2 a tumorspecifické protilátky přežily 4 z 8 myší. U směsi IL-2 a nespecifické protilátky to byly 2 z 8 myší. Podávání samotného IL-2 nevedlo k vyléčení žádné z 8 myší. Fúzování IL-2 s protilátkami se využívá ke zkombinování účinků obou entit. Protilátka slouží k cílení terapie IL-2 na tumorovou tkáň. Takováto protilátka je specifická vůči tumorovému markeru cíleného nádoru. Protilátka dále obecně prodlužuje poločas cirkulace, což souvisí se zvýšením celkové hmotnosti, resp. hydrodynamického poloměru fúzního proteinu [53, 54, 55].

V Laboratoři nádorové imunologie Mikrobiologického ústavu AV ČR, zabývající se mj. imunokomplexy IL-2 s protilátkami proti IL-2, z nichž některé vykazují vyšší *in vivo* aktivitu než volný IL-2, byla připravena kovalentně vázaná verze imunokomplexu IL-2 s protilátkou proti IL-2 (klon S4B6). Důvodem přípravy toho produktu byla snaha získat stabilnější komplex oproti nekovalentně vázané verzi. IL-2 se zároveň díky kovalentní vazbě s protilátkou při disociaci z ní udržuje v její blízkosti a dochází tak k jeho zpětné asociaci. Pracovníci Laboratoře nádorové imunologie zjistili, že fúzní produkt vykazuje při srovnání s nekovalentně asociovaným imunokomplexem srovnatelnou aktivitu *in vitro*, avšak mnohem vyšší aktivitu při *in vivo* aktivních studiích. Tranzientní ko-transfekcí eukaryotních buněk je možno fúzní imunokomplex produkovat do produkčního média v řádech jednotek až desítek ng na ml produkčního média. Pro další výzkum by však bylo vhodné zavést systém umožňující produkci vyšších množství fúzního produktu a jeho jednoduchou purifikaci [56].

## 2 Cíle práce

- Zavedení sekrečního signálu ze sekretované alkalické fosfatasy do plasmidu pTW5
- Příprava transfekčních vektorů pro následující proteinové produkty:
  - Fúzní IL-2 s lehkým řetězcem mAb s nativní signální sekvencí
  - Fúzní IL-2 s lehkým řetězcem mAb se signální sekvencí ze sekretované alkalické fosfatasy
  - Těžký řetězec mAb se signální sekvencí ze sekretované alkalické fosfatasy
  - Těžký řetězec mAb se signální sekvencí ze sekretované alkalické fosfatasy zakončený histidinovou kotvou
- Produkce fúzních monoklonálních protilátek s IL-2 lišících se v nascentní podobě svými sekrečními signály
- Test biologických aktivit připravených fúzních monoklonálních protilátek s IL-2 a jejich porovnání
- Afinitní purifikace fúzních monoklonálních protilátek s IL-2 pomocí histidinové kotvy na těžkém řetězci

## 3 Materiál

### 3.1 Přístroje a pomůcky

Automatické pipety	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Backman Coulter, USA</i>
Centrifuga EBA 12R	<i>Schoeller Pharma, ČR</i>
Centrifuga MiniStar	<i>VWR, Korea</i>
Fotoaparát DSC-W570	<i>SONY, Japonsko</i>
High-Speed Plasmid Mini Kit	<i>Geneaid, Taiwan</i>
JetQuick Gel Extraction Spin Kit	<i>Genomed, Německo</i>
Koncentrátory Amicon Ultra	<i>Milipore, USA</i>
Magnetická mičačka MM 2A	<i>Lab. přístroje Praha, ČR</i>
Mrazicí box (-20°C)	<i>Zanussi, Itálie</i>
Mrazicí box (-80°C)	<i>Forma scientific, USA</i>
Mrazicí kontajner	<i>Nelgene, USA</i>
NanoVue Plus	<i>Hewlett-Packard, USA</i>
Pipetovací nástavec Midi Plus	<i>Biohit, Finsko</i>
pH metr 3310	<i>Jenway, UK</i>
Plynový hořák	<i>KAVALIER, ČR</i>
Předvážky KB1200-2	<i>KERN, Belgie</i>
PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit	<i>Life Technologies, USA</i>
Rotační vakuová odparka	<i>Trigon, Francie</i>
Souprava pro elektroforézu Liberty 120	<i>Biokeystone, USA</i>
Spektrofotometr UV/VIS UV4-500	<i>UNICAM, UK</i>
Termoblok LS 1	<i>VLM, Německo</i>
Termocykler FPROG05D	<i>Techne, USA</i>
Třepačka Orbi-safe TS	<i>Gallenkamp, NL</i>
UV prosvěcovací lampa BXT-F20.M	<i>Uvitec, UK</i>
Vaň ETA 2107	<i>ETA, ČR</i>
Vodní lázeň TW2	<i>Julabo, Německo</i>



Vortexový mixér Minishaker MS1	<i>Schoeller Pharma, ČR</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>
Zdroj napětí	<i>Sigma, USA</i>
Zdroj vakua VM-200	<i>MEZ, ČR</i>

### 3.2 Chemikálie

100 bp DNA žebřík	<i>New England Biolabs, USA</i>
1 kb DNA žebřík	<i>New England Biolabs, USA</i>
Agar	<i>Oxoid, UK</i>
Agarosa	<i>Sigma, USA</i>
Ampicilin	<i>Biotika, SR</i>
Barva GoodView II	<i>E-coli, SK</i>
Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
BSA	<i>New England Biolabs, USA</i>
Combi PPP Master Mix	<i>Top-Bio, ČR</i>
dNTPs	<i>Top-Bio, ČR</i>
EDTA	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Ethanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Glycerol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Isopropanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Kvasničný extrakt	<i>Imuna Pharm, SK</i>
MgSO <sub>4</sub>	<i>Lach-Ner, ČR</i>
NaCl	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Pufr pro T4 DNA ligasu	<i>New England Biolabs, USA</i>
Tris	<i>Sigma, USA</i>
Trypton	<i>Oxoid, UK</i>

### 3.3 Enzymy

AgeI (5 000 U/ml)	<i>New England Biolabs, USA</i>
Deep Vent DNA polymerasa (2 000 U/ml)	<i>New England Biolabs, USA</i>
KpnI (10 000 U/ml)	<i>New England Biolabs, USA</i>
MscI (5 000 U/ml)	<i>New England Biolabs, USA</i>

Phusion® HF DNA polymerasa (2 000 U/ml)	<i>New England Biolabs, USA</i>
PmeI (10 000 U/ml)	<i>New England Biolabs, USA</i>
RNasa	<i>P-Lab, ČR</i>
T4 DNA ligasa (400 000 U/ml)	<i>New England Biolabs, USA</i>

### 3.4 Bakteriální kmeny

<i>Escherichia coli</i> : DH5α	<i>Marek Ingr, PřF UK</i>
<i>Escherichia coli</i> : <i>dam</i> <sup>-</sup> / <i>dcm</i> <sup>-</sup> Competent <i>E. coli</i>	<i>New England Biolabs, USA</i>

### 3.5 Vektory

pcDNA3.1_L	<i>Marek Kovář, MBÚ AV ČR</i>
pcDNA3.1_H	<i>Marek Kovář, MBÚ AV ČR</i>
pTW5_SEAP	<i>Edita Poláchová, PřF UK</i>
pTT28_C1	<i>Petra Celadová, PřF UK</i>

### 3.6 Primery pro PCR

- H\_FW: 5' – AAAAACCGGTGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTG – 3'
- H\_REV: 5' – TTTTGGTACCTCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGA – 3'
- H\_His\_REV: 5' – TTTTGGTACCTTTACCAGGAGAGTGGGAGAGACT – 3'
- IL-2\_Sig\_FW: 5' – AAAAACCGGTTACAGCATGCAGCTCGCATCCTG – 3'
- IL-2\_FW: 5' – AAAAACCGGTGCACCCACTTCAAGCTCCACT – 3'
- L\_REV: 5' – TTTTGGTACCCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCT – 3'
- SecSig\_FW: 5' – AAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCGCCGCCAC-CATGGGAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCTTCAGCT-GAGTCTTGGAATTACCGGTAAAA – 3'
- SecSig\_REV: 5' – TTTTACCGGTAATTCCAAGACTCAGCTGAAGCCG-CAGCCCCAGCAGAAGGAGCAGCAGCAGTTCTCCCATGGTGGCGGCGCA-ATTCGCTAGAGATCCGTTTAACTTT – 3'
- pTT\_FW: 5' – TGATATTCACCTGGCCCGATCTG – 3'
- pTT\_REV: 5' – TATGTCCTTCCGAGTGAGAG – 3'
- pTW5Seq\_REV: 5' – AAGCAGCGTATCCACATAGCG – 3'

- pTW5SecDel\_FW: 5' – TGGGAGAACTGCTGCTGCTC – 3'
- pTW5SecDel\_REV: 5' – GAGCAGCAGCAGTTCTCCCA – 3'

### 3.7 Roztoky a média

- LB agar: 1,5% agar v LB médiu
- LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH = 7,4  
- používáno s přidaným antibiotikem ampicilinem (c = 100 µg/µl; LB Amp médium či agar)
- NEBuffer 1 – 10× koncentrovaný pufr pro restrikční reakce: 10mM bis-Tris-propan-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dithiothreitol, pH = 7,0
- NEBuffer 4 – 10× koncentrovaný pufr pro restrikční reakce: 50mM acetát draselný, 20mM Tris-acetát, 10mM acetát hořečnatý, 1mM dithiothreitol, pH = 7,9
- STOP pufr: 30% glycerol, bromfenolová modř, TE pufr
- TAE pufr – 1× koncentrovaný pufr pro agarosovou elektroforézu: 40mM Tris, 20mM octová kyselina, 1mM EDTA
- TE pufr: 10mM Tris, 0,5mM EDTA, pH = 8,0
- ThermoPol – 10× koncentrovaný pufr pro PCR: 20mM Tris-HCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, pH = 8,8

## 4 Metody

### 4.1 PCR amplifikace

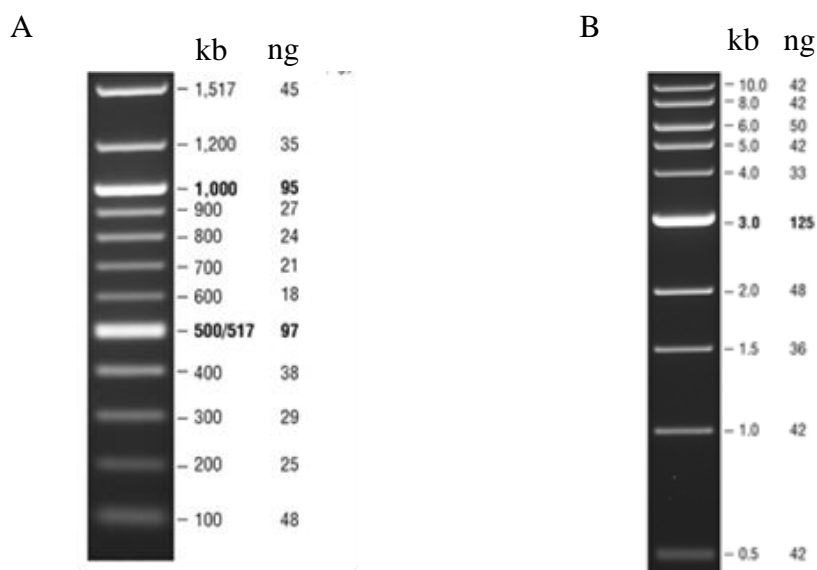
Pro přípravu reakční směsi bylo do 0,5ml mikrozkušavky odpipetováno v následujícím pořadí 30,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l ThermoPol pufru, 1,5  $\mu$ l 10mM dNTP, 1,5  $\mu$ l 100mM MgSO<sub>4</sub>, 5  $\mu$ l 5 $\mu$ M přímého primeru, 5  $\mu$ l 5 $\mu$ M zpětného primeru, 1  $\mu$ l templátu a 0,5  $\mu$ l Deep Vent DNA polymerasy. Samotná PCR reakce proběhla automatizovaně v termocykleru v následujících krocích:

- A. 5 min při 94 °C
- B. 25 cyklů:
  - 1) 30 s při 94 °C
  - 2) 1 min při 54 °C
  - 3) 1 min při 72 °C
- C. 10 min při 72 °C
- D. Teplota trvale snížena na 4 °C až do dalšího zpracování (maximálně 40 hodin).

Produkty reakce byly vizualizovány popřípadě přečištěny pomocí agarosové elektroforézy. Kontrolní vzorek byl připraven smísením 1  $\mu$ l STOP pufru s 5  $\mu$ l produktu. Vzorek pro přečištění smísením 4  $\mu$ l STOP pufru s 16  $\mu$ l produktu.

### 4.2 Agarosová elektroforéza

Agarosový gel byl připraven rozpuštěním 0,65 g (1%) nebo 0,82 g (přibližně 1,25%) agarosu v 65 ml TAE pufru varem. Po zchladnutí roztoku na přibližně 50 °C do něj bylo odpipetováno 3  $\mu$ l Good View II barvy. Po promíchání byl gel nalit do sestavené elektroforetické aparatury Liberty 120, kde byl ponechán zatuhnout. Dle návodu výrobce byl k elektrodám nalit příslušný objem TAE pufru a samotný gel byl převrstven dH<sub>2</sub>O. Do jednotlivých jamek byly pipetovány vzorky a vždy jeden ze standardů (100 bp DNA žebřík či 1 kb DNA žebřík, obr. 7, str. 30). Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 200 V. Komplex DNA s fluorescenčním barvivem byl vizualizován při osvětlení UV lampou (312 nm).



**Obr. 7: Vizualice používaných DNA standardů.**

A. 100 bp DNA žebřík vizualizovaný ethidium bromidem v 1,3% TAE agarosovém gelu při celkové nanášece 0,5  $\mu$ g.

B. 1 kb DNA žebřík vizualizovaný ethidium bromidem v 0,8% TAE agarosovém gelu při celkové nanášece 0,5  $\mu$ g. Převzato a upraveno z [57].

### 4.3 Štěpení restrikčními endonukleasami

Pro přípravu reakční směsi bylo do 1,5 ml mikrozkuřavky odpipetováno 7,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l roztoku obsahujícího štěpenou DNA (např. plasmid či produkt PCR), 2  $\mu$ l výrobcem doporučeného pufru (NEBuffer 1 či NEBuffer 4), 0,5  $\mu$ l restrikčního enzymu (AgeI, KpnI, PmeI nebo MscI). V případě současného použití dvou restrikčních enzymů byly oba přidány ve stejném objemu 0,5  $\mu$ l. V případě použití restrikčního enzymu KpnI byly do směsi přidány 2  $\mu$ l roztoku BSA (c = 1  $\mu$ g/ $\mu$ l). V případech těchto změn byl o navýšený objem zmenšen objem přidané dH<sub>2</sub>O. Následovala 30 min inkubace při 37 °C. Po ukončení reakce byly enzymy AgeI, PmeI a MscI inaktivovány zahřátím na 65 °C po dobu 20 min nebo ihned přečištěny agarosovou elektroforézou. Pokud byl použit enzym KpnI, který nelze tepelně inaktivovat, byla směs vždy ihned přečišťována.

### 4.4 Extrakce DNA z agarosového gelu

Extrakce DNA z agarosového gelu byla provedena komerční soupravou *JetQuick Gel Extraction Spin Kit* přesně dle výrobcem doporučeného postupu [58]. Ke každému ze vzorků vyříznutých z gelu, jejichž hmotnost byla v rozmezí 0,12 g až 0,17 g a byly přesunuty do

1,5ml mikrozkušavky, bylo odpipetováno 300  $\mu$ l solubilizačního pufru (L1) na každých 0,1 g gelu. Zkušavka byla umístěna do termobloku temperovaného na 50 °C, kde byla inkubována 15 min, přičemž každé tři minuty došlo k důkladnému promísení obsahu. Solubilizovaný vzorek byl převeden na kolonku vloženou do centrifugační mikrozkušavky a centrifugován 1 min při 16000  $\times$  g. Prošlý roztok byl odstraněn. Kolonka byla promyta 500  $\mu$ l promývacího pufru (L2), centrifugována 1 min při 16000  $\times$  g a po odstranění průtoku centrifugována 1 min při 20000  $\times$  g. Eluce plasmidové DNA do 1,5ml mikrozkušavky byla provedena 50  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O předehřáté na 70 °C. Centrifugace kolonky s dH<sub>2</sub>O probíhala 2 min při 16000  $\times$  g.

#### **4.5 Ligace inzertu do linearizovaného vektoru**

Ligační směs byla připravena v 1,5ml mikrozkušavce odpipetováním 8,5  $\mu$ l inzertu, 8,5  $\mu$ l vektoru, 2  $\mu$ l pufru pro T4 DNA ligasu a 1  $\mu$ l T4 DNA ligasy, pokud není uveden molární poměr vektor : inzert. V takovém případě byly odpipetovány příslušné objemy zkoncentrovaných roztoků inzertu a vektoru, ke kterým byly přidány 2  $\mu$ l ligačního pufru, 1  $\mu$ l ligasy a příslušný doplňkový objem dH<sub>2</sub>O do 20  $\mu$ l. Pokud není řečeno jinak, ligační reakce probíhaly 1 hodinu při laboratorní teplotě.

#### **4.6 Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) tepelným šokem**

Kompetentní buňky *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$  uchovávané v mrazícím boxu při -80 °C byly ponechány roztát na vodní lázni s ledem. 1  $\mu$ l zásobního roztoku plasmidu či celá výsledná ligační směs (20  $\mu$ l), vytemperované na vodní lázni s ledem, byly přidány ke 100  $\mu$ l dobře resuspendované buněčné suspenze. Následovala společná inkubace po dobu minimálně 30 minut a tepelný šok provedený ponořením mikrozkušavky na 1 min do 42 °C vodní lázně. Po tepelném šoku byla směs rychle převedena zpět na led. Po pětiminutové inkubaci na ledu byl přidán 1 ml sterilního LB vytemperovaného na 37 °C a směs byla inkubována 1 hod při 37 °C. Směs byla po inkubaci centrifugována 1 min při 15000  $\times$  g. Supernatant byl z většiny odstraněn a ve zbývajících cca 100  $\mu$ l byla peleta resuspendována a přenesena na Petriho misku s LB Amp agarem, kde byla rovnoměrně rozetřena bakteriologickou kličkou.

#### **4.7 Transformace kompetentních $\text{dam}^-/\text{dcm}^-$ buněk *Escherichia coli* tepelným šokem**

Transformace kompetentního  $\text{dam}^-/\text{dcm}^-$  kmene buněk *Escherichia coli* tepelným šokem byla prováděna postupem popsaným v kapitole 4.5 s dvěma drobnými úpravami. K transformaci bylo užíváno jen 80  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze a dle doporučení výrobce byla zkrácena doba tepelného šoku na 20 s.

#### **4.8 PCR z kolonií a příprava suspenzní buněčné kultury**

Pro přípravu reakční směsi bylo do 0,5ml mikrozkušavky odpipetováno postupně 6  $\mu\text{l}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$ , po 2  $\mu\text{l}$  přímého a reversního primeru a 10  $\mu\text{l}$  Combi PPP Master Mix reakční směsi. Testovaná kolonie byla z ampicilinového LB agaru vypíchnuta pomocí špičky na automatické pipetě a resuspendována v reakční směsi a poté s ní bylo zaočkováno 5 ml LB Amp média vytemperovaného na 37 °C. Připravená kultura byla inkubována při 37 °C 14 hod.

#### **4.9 Izolace plasmidové DNA**

Izolace plasmidové DNA byla prováděna soupravou *High-Speed Plasmid Mini Kit* dle protokolu dodávaného výrobcem [60]. Suspenzní bakteriální kultura byla postupně centrifugována 1 min při 15000  $\times$  g do jedné 1,5ml mikrozkušavky. Supernatant byl odstraněn a do zkumavky bylo odpipetováno 200  $\mu\text{l}$  PDB1 pufru s přídáním RNasou, ve kterých byla bakteriální peleta resuspendována pipetováním. K suspenzi bylo odpipetováno 200  $\mu\text{l}$  PDB2 pufru a obsah zkumavky byl jemně promíchán desetinasobným převrácením. Následovala centrifugace 3 min při 15000  $\times$  g. Supernatant byl přenesen na kolonku umístěnou ve 2ml centrifugační zkumavce. Kolonka se supernatantem byla centrifugována při 15000  $\times$  g po 30 s. Roztok prošlý do centrifugační zkumavky byl odstraněn. Na kolonku bylo pipetováno 400  $\mu\text{l}$  promývacího W1 pufru a centrifugováno 30 s při 15000  $\times$  g. Prošlý roztok byl odstraněn. Na kolonku bylo odpipetováno 600  $\mu\text{l}$  promývacího *Wash* pufru a centrifugováno 30 s při 15000  $\times$  g. Prošlý roztok byl odstraněn a kolonka byla vysušena centrifugací 3 min při 15000  $\times$  g. Kolonka byla přenesena do nové 1,5ml mikrozkušavky. Eluce plasmidové DNA byla provedena 50  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  vytemperované na 70 °C. Kolonka s  $\text{dH}_2\text{O}$  byla centrifugována 2 min při 15000  $\times$  g.

#### 4.10 Příprava zásobního množství plasmidu

Přípravě zásobního množství plasmidu předchází transformace buněk *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$  nebo dam $^{-}$ /dcm $^{-}$  provedená podle kapitoly 4.5, resp. 4.6. Na Petriho misku s koloniemi bylo pipetováno 5 ml LB média, ve kterém byly kolonie resuspendovány a převedeny do 2l Erlenmayerovy baňky s 0,5 l LB Amp média. Kultury byly třepány 14 hod při 37 °C rychlostí 220 ot./min. Kultury byly odstředěny 30 min při 4000  $\times$  g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována ve 20 ml TES pufru. Bunněčná suspenze byla přenesena do 30 ml centrifugačních kyvet a centrifugována 20 min při 18000  $\times$  g. Po odstranění supernatantu byly pelety ihned zpracovány nebo uschovány při -20 °C.

Izolace plasmidové DNA byla provedena komerční soupravou *PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit* podle upraveného protokolu dodávaného výrobcem [59]. Bakteriální peleta v centrifugační kyvetě byla resuspendována vortexováním v 9 ml resuspendačního pufru (R3) s přidanou RNasou A. K suspenzi bylo přidáno 9 ml lyzačního pufru (L7), jemně promícháno několikanásobným převrácením kyvety a inkubováno přesně 5 min. Následně byl roztok neutralizován 9 ml precipitačního pufru (N3) za současného mírného promíchání převrácením. Precipitovaný lyzát byl odstředěn 10 min při 15000  $\times$  g a supernatant přenesen na kolonu, která byla předem ekvilibrována 15 ml pufru EQ1. Kolona byla následně promyta třikrát 20 ml promývacího pufru (W8). Eluce byla provedena 15 ml elučního pufru (E4) do čisté 30 ml centrifugační kyvety. DNA byla vysrážena přidáním 10,5 ml isopropanolu po 20 hod při -20 °C. Precipitát byl poté odstředěn 30 min při 16000  $\times$  g a 0 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla opláchnuta 5 ml 70% ethanolu a odstředěna 10 min při 16000  $\times$  g a 0 °C. Supernatant byl odstředěn, vysušen na rotační vakuové odparce a peleta DNA byla rozpuštěna v 1 ml sterilní dH<sub>2</sub>O a převedena do 1,5ml mikrozkušavky, ve které byla uchovávána při -20 °C.

#### 4.11 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace a čistota DNA byly stanovovány spektrofotometricky. Vzorek pro stanovení byl 300 $\times$  naředěn dH<sub>2</sub>O. Absorbance roztoku byla změřena proti dH<sub>2</sub>O při vlnových délkách 260 a 280 nm. Koncentrace a čistota byla vypočítána pomocí webové aplikace *Nucleic Acids Calculator* [61].



#### 4.12 Příprava vzorků plasmidové DNA pro sekvenaci

Z roztoku plasmidové DNA určené k sekvenaci bylo odpipetováno po 2  $\mu$ l do dvou 0,2ml mikrozkušavek. Do první zkumavky byl dále odpipetován 1  $\mu$ l 5 $\mu$ M přímého sekvenačního primeru, do druhé pak 1  $\mu$ l 5 $\mu$ M zpětného sekvenačního primeru dle druhu daného sekvenovaného plasmidu (tab. 1). Takto připravené vzorky byly odeslány k sekvenaci RNDr. Štěpánce Hrdé do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK Praha (dále jen Laboratoř sekvenace DNA).

**Tab. 1: Přímé a zpětné sekvenační primery jednotlivých sekvenovaných plasmidů.**

Plasmid	Přímý primer	Zpětný primer
pTW5Sec_C1	pTT_FW	pTW5Seq_REV
pTW5Sec_L1	pTT_FW	L_REV
pTW5_L2	pTT_FW	L_REV, pTW5Seq_REV
pTW5Sec_H1	pTT_FW	H_REV, pTW5Seq_REV
pTW5Sec_H2	pTT_FW	H_REV

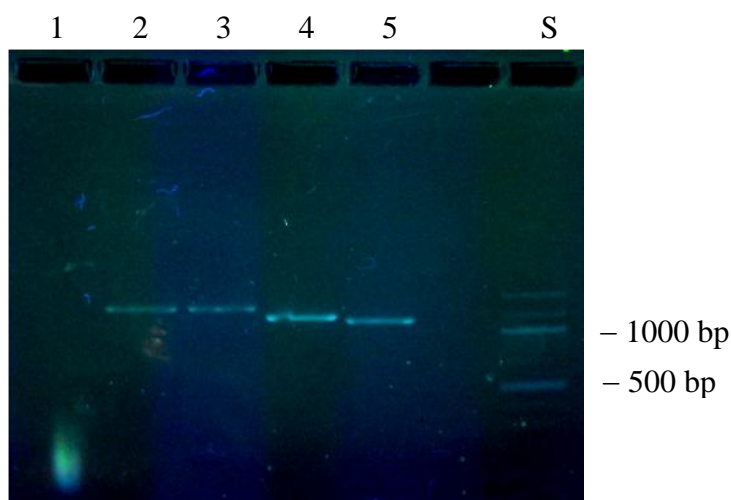
## 5 Výsledky

### 5.1 První postup přípravy plasmidů

Komerčně připravenými oligonukleotidy byly PCR reakcí amplifikovány úseky původních pcDNA3.1 plasmidů získaných od RNDr. Marka Kováře, Ph.D. z Laboratoře nádorové imunologie MBÚ AV ČR. Zároveň byl amplifikován *de novo* komerčně připravený oligonukleotid obsahující sekvenci úseku plasmidu pTW5 mezi PmeI restričním místem a AgeI restričním místem, za kterou následovala sekvence pro modifikovaný sekreční signál (SecSig) původem ze sekretované alkalické fosfatasy (SEAP). Amplifikační oligonukleotidy byly navrženy tak, aby při amplifikaci došlo k několika modifikacím. V první řadě se jednalo o vytvoření příslušných restričních míst na začátku (AgeI) a konci (KpnI) amplifikovaného úseku pomocí přesahů v oligonukleotidech. Dále pak došlo při některých amplifikacích k vynechání startovního translačního kodonu pro methionin (ATG) a terminačního translačního kodonu (TAG), tzv. STOP kodonu. Tímto bylo získáno následujících 5 fragmentů detekovaných agarosovou elektroforézou (obr. 8, str. 36):

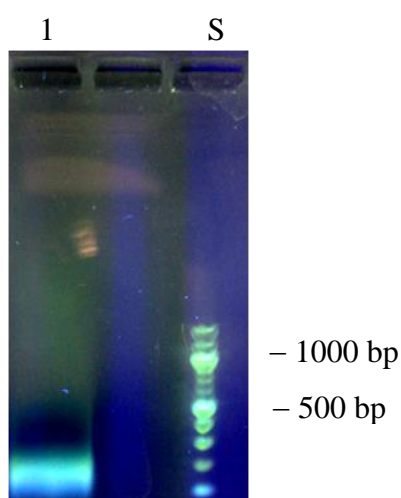
- 1) **L1:** AgeI-IL-2(bez nativní signální sekvence)-L-KpnI  
Přímý primer: IL-2\_FW                      Zpětný primer: L\_REV
- 2) **L2:** AgeI-IL-2(s nativní signální sekvencí)-L-KpnI  
Přímý primer: IL-2\_Sig\_FW                      Zpětný primer: L\_REV
- 3) **H1:** AgeI-H(se STOP kodonem)-KpnI  
Přímý primer: H\_FW                              Zpětný primer: H\_REV
- 4) **H2:** AgeI-H(bez STOP kodonu)-KpnI  
Přímý primer: H\_FW                              Zpětný primer: H\_His\_REV
- 5) **SecSig:** PmeI-SecSig-AgeI  
Přímý primer: SecSig\_FW                      Zpětný primer: SecSig\_REV

Jako templát byl při reakcích vedoucích k přípravě fragmentů L1 a L2 nebo H1 a H2 použit plasmid pcDNA3.1\_L resp. pcDNA3.1\_H. IL-2 značí v dalším textu sekvenci myšního IL-2 pokud není uvedeno jinak. H a L značí sekvence pro těžký resp. lehký řetězec potkaní monoklonální protilátky S4B6 proti myšimu IL-2. Sekvence jednotlivých fragmentů, těžkého, lehkého řetězce S4B6, IL-2 a rovněž restričních míst jsou uvedeny v příloze.



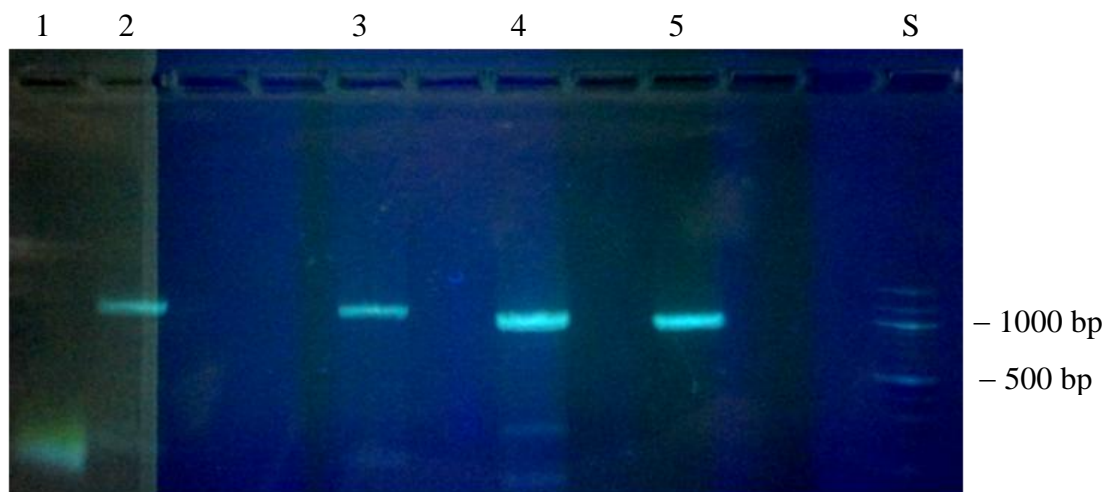
**Obr. 8: Amplifikované úseky plasmidu pcDNA3.1\_L a pcDNA3.1\_H.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V dráze 1 je fragment SecSig (107 bp), v dráze 2 fragment H2 (1355 bp), v dráze 3 fragment H1 (1358 bp), v dráze 4 fragment L2 (1214 bp), v dráze 5 fragment L1 (1157 bp). Dráha S označuje 100 bp DNA standard.

Fragment SecSig byl štěpen současně restričními endonukleasami AgeI a PmeI v pufru NEBuffer 4. Výsledek restrikce byl vizualizován a zároveň přečištěn preparativní agarosovou elektroforézou (obr. 9).



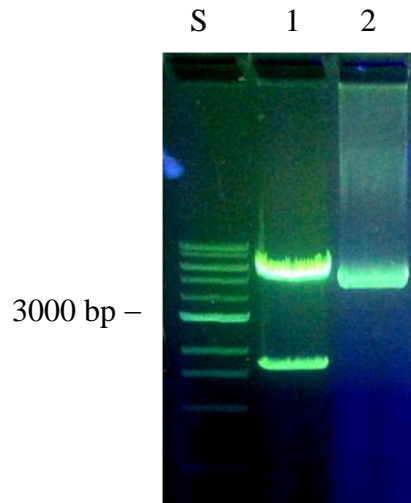
**Obr. 9: Fragment SecSig štěpený enzymy AgeI a PmeI.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V dráze 1 je štěpený fragment SecSig (93 bp). Dráha S označuje 100 bp DNA standard.

Fragmenty L1, L2, H1, H2 a SecSig byly štěpeny současně restrikcí endonukleasami AgeI a KpnI v pufru NEBuffer 1. Výsledek restrikce byl vizualizován a zároveň přečištěn preparativní agarosovou elektroforézou (obr. 10).



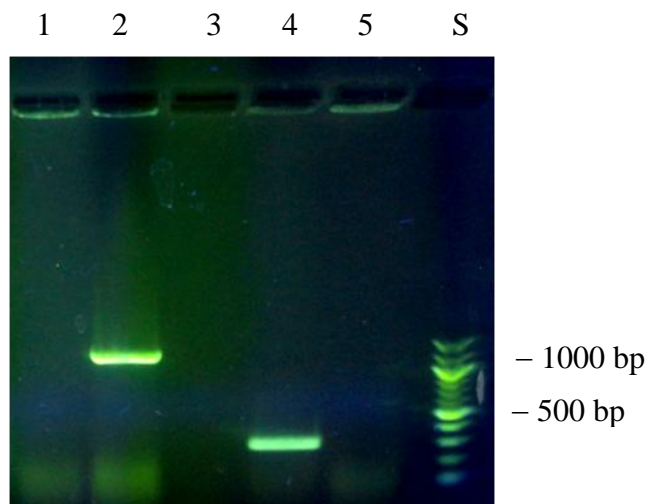
**Obr. 10: Fragmenty L1, L2, H1, H2, SecSig štěpené enzymy AgeI a KpnI.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V dráze 1 je fragment SecSig (93 bp), v dráze 2 fragment H2 (1341 bp), v dráze 3 fragment H1 (1344 bp), v dráze 4 fragment L2 (1200 bp), v dráze 5 fragment L1 (1143 bp). Dráha S označuje 100 bp DNA standard.

Plasmid pTW5\_SEAP (obsahující inzert sekretované alkalické fosfatasy) získaný od Bc. Edity Polákové byl štěpen dvěma kombinacemi restrikcí endonukleas. První byla PmeI v kombinaci s AgeI při použití NEBuffer 4 pufru, druhá pak AgeI a KpnI při použití NEBuffer 1 pufru. Výsledky štěpení byly vizualizovány a přečištěny pomocí agarosové elektroforézy (obr. 11, str. 38). Extrakt z gelu byly připraveny roztoky štěpených fragmentů L1\*AgeI/KpnI (70 ng/μl,  $A_{260}/A_{280} = 1,62$ ), L2\*AgeI/KpnI (50 ng/μl,  $A_{260}/A_{280} = 1,64$ ), H1\*AgeI/KpnI (60 ng/μl,  $A_{260}/A_{280} = 1,60$ ), H2\*AgeI/KpnI (70 ng/μl,  $A_{260}/A_{280} = 1,62$ ), SecSig\*PmeI/AgeI a linearizovaných plasmidů pTW5\*PmeI/AgeI a pTW5\*AgeI/KpnI.



**Obr. 11: Linearizovaný plasmid pTW5.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V dráze 1 jsou produkty štěpení plasmidu pTW5 (4986 a 1617 bp) enzymy AgeI a KpnI, v dráze 2 neštěpený pTW5\_SEAP (6603 bp). Dráha S označuje 1 kb DNA standard.

Do linearizovaného plasmidu pTW5\*AgeI/KpnI byl vložen fragment L2\*AgeI/KpnI, čímž byl připraven plasmid pTW5\_L2. Do linearizovaného plasmidu pTW5\*PmeI/AgeI byl vložen fragment SecSig\*PmeI/AgeI a tím byl připraven plasmid pTW5Sec. Výslednými ligačními směsmi byly úspěšně transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Úspěšnost ligace byla potvrzena PCR z kolonií (obr. 12). Pro PCR reakci byly odebrány vzorky ze tří kolonií buněk transformovaných plasmidem pTW5Sec a dva vzorky kolonií buněk transformovaných plasmidem pTW5\_L2.

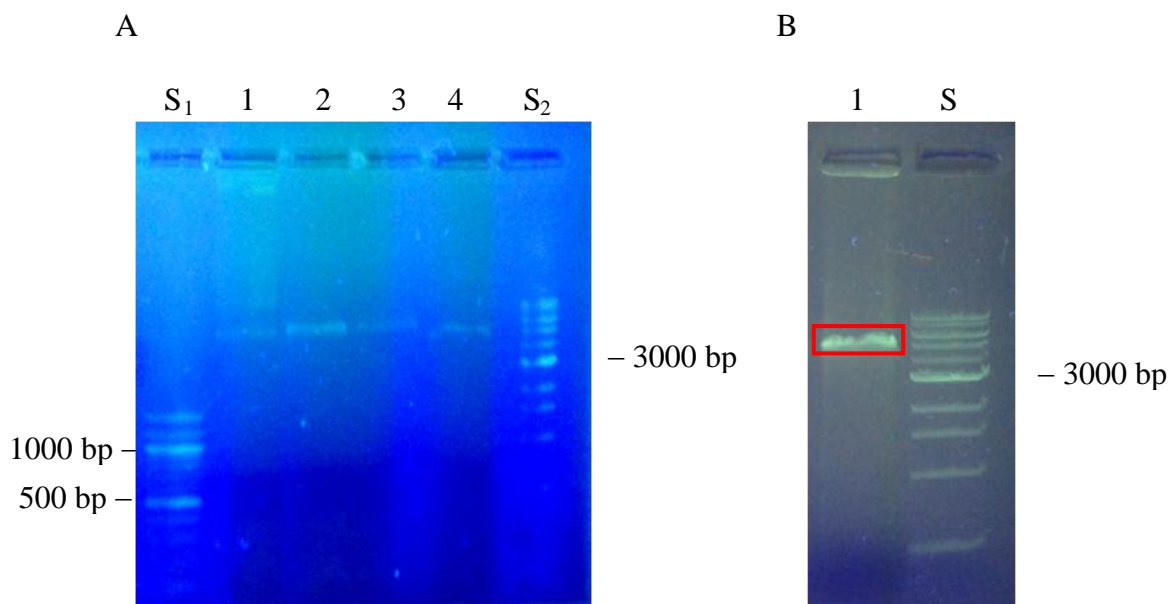


**Obr. 12: PCR z kolonií transformovaných pTW5Sec a pTW5\_L2.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V dráze 1 a 2 jsou vzorky pTW5\_L2 (1465 bp), v dráze 3 až 5 jsou vzorky pTW5Sec (325 bp). Dráha S označuje 100 bp DNA standard. Jako přímý primer byl použit oligonukleotid pTT\_FW, jako zpětný pTW5Seq\_REV.

Zbytky kolonií odebranými pro provedení PCR reakce byly zaočkovány zkumavky s LB Amp médiem. Z klonů odpovídajících pozitivním vzorkům z PCR z kolonií byla izolována plasmidová DNA, která byla podrobena sekvenaci. Sekvence plasmidu pTW5\_L2 odpovídala předpokladu a je součástí přílohy. Sekvence plasmidu pTW5Sec ukázala inserci jednoho nukleotidu cytidinmonofosfátu v oblasti *de novo* vytvořené signální sekvence.

## 5.2 Druhý postup přípravy plasmidů

Ideou druhého postupu bylo využití plasmidu pTT28, konkrétně pTT28\_C1, kde C1 označuje inzerce myšního receptoru Clrb, připravený Mgr. Petrou Celadovou. Plasmid pTT28 obsahuje v expresní oblasti námi požadovanou signální sekvenci (modifikovaná sekvence alkalické fosfatasy). Kompetentní  $dam^-/dcm^-$  buňky *Escherichia coli* (kmen deficientní v produkci methyltransferas) byly transformovány plasmidem pTW5 a následnou izolací plasmidové DNA byl získán roztok nemetylovaného plasmidu pTW5(Met<sup>-</sup>) (100  $\mu$ l, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l,  $A_{260}/A_{280} = 1,69$ ). Plasmid pTW5(Met<sup>-</sup>) byl následně štěpen kombinací restričních endonukleas MscI a KpnI (obr. 13, str. 40). Štěpením většího množství plasmidu pTW5(Met<sup>-</sup>) toutéž kombinací plasmidů, následným přečištěním agarosovou elektroforézou a izolací linearizovaného plasmidu z gelu byl získán roztok pTW5(Met<sup>-</sup>)\*MscI/KpnI (50  $\mu$ l, 0,061  $\mu$ g/ $\mu$ l; obr. 13, str. 40).



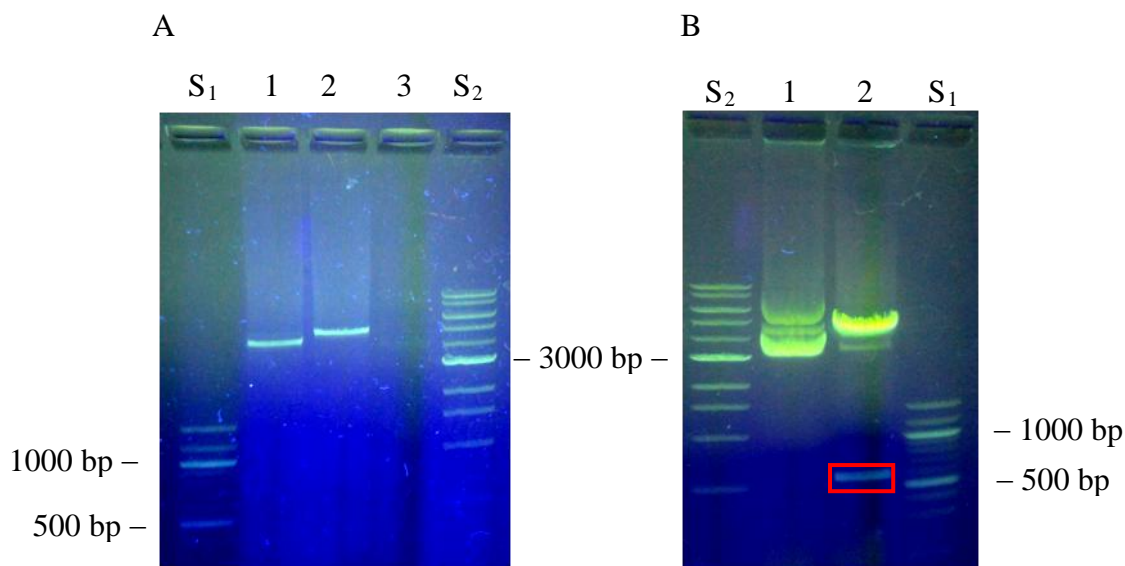
**Obr. 13: Štěpení plasmidu pTW5(Met<sup>-</sup>) a přečištění produktů štěpení agarosovou elektroforézou.**

Byly použity 1% agarosové TAE gely.

**A.** V dráze 1 je neštěpený pTW5(Met<sup>-</sup>) (4998 bp), v dráze 2 je enzymem KpnI linearizovaný pTW5(Met<sup>-</sup>)\*KpnI (4998 bp), v dráze 3 je enzymem MscI linearizovaný pTW5(Met<sup>-</sup>)\*MscI (4998 bp), v dráze 4 je linearizovaný plasmid pTW5(Met<sup>-</sup>)\*MscI/KpnI (4875 bp) štěpený současně enzymy MscI a KpnI. S<sub>1</sub> a S<sub>2</sub> označují 100 bp, resp. 1 kb DNA standardy.

**B.** V dráze 1 je vzorek pTW5(Met<sup>-</sup>)\*MscI/KpnI (4875 bp). Červeně je vyznačena oblast, která byla vyříznuta z gelu, a z níž byla izolována plasmidová DNA. Dráha S označuje 1 kb DNA standard.

Pomocí transformace kompetentních bakterií dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kmene *Escherichia coli* a následné izolace jejich plasmidové DNA byl získán zásobní roztok nemetylovaného plasmidu pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>) (1 ml, 5,73 µg/µl, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> = 1,77). Plasmid pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>) byl následně štěpen kombinací restričních endonukleas MscI a KpnI (obr. 14, str. 41). Větší množství plasmidu pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>) bylo štěpeno stejnou kombinací endonukleas, následně přečištěno agarosovou elektroforézou a izolováno z gelu (obr. 14, str. 41). Tím byl získán roztok pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>)\*MscI/KpnI (50 µl, 3,2 ng/µl).



**Obr. 14: Štěpení plasmidu pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>) a přečištění produktu štěpení agarosovou elektroforézou.** Byly použity 1% agarosové TAE gely.

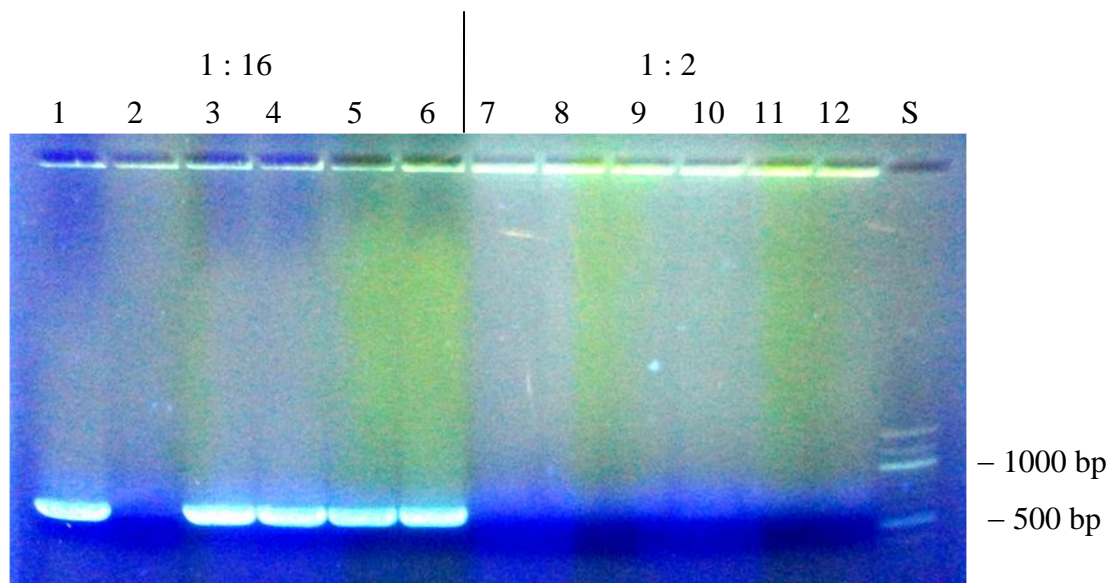
**A.** V dráze 1 enzymy MscI a KpnI současně štěpený linearizovaný pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>)\*MscI/KpnI (3867 bp), v dráze 2 linearizovaný plasmid pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>)\*KpnI (4446 bp) štěpený enzymem KpnI, v dráze 3 neštěpený pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>) (4446 bp).

**B.** V dráze 1 je plasmid pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>) (4446 bp), v dráze 2 enzymy MscI a KpnI současně štěpený linearizovaný pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>)\*MscI/KpnI (3867 bp). Červeně je vyznačena oblast, která byla vyříznuta z gelu, a z níž byla izolována plasmidová DNA.

Dráhy S<sub>1</sub> a S<sub>2</sub> označují 100 bp DNA, resp. 1 kb DNA standardy.

Ligace linearizovaného plasmidu pTW5(Met<sup>-</sup>)\*MscI/KpnI a připraveného inzertu pTT28\_C1(Met<sup>-</sup>)\*MscI/KpnI probíhala přes noc (přibližně 18 hodin) ve třech provedeních lišících se molárním poměrem plasmid : inzert (1 : 2, 1 : 8, 1 : 16). Výslednými ligačními roztoky byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$ . Transformovaná buněčná suspenze byla natřena na petriho misky s LB Amp agarem a kultivována přes noc při 37 °C. Na misce s ligací v poměru 1 : 8 nebyly kolonie znatelné. Celá miska byla pokryta bakteriálním plakem. Na miskách transformovaných ligacemi s poměrem 1 : 2 a 1 : 16 byly hustě narostlé drobné kolonie. Z každé této misky bylo odebráno šest vybraných kolonií (bez satelitních kolonií, relativně střední velikosti). Odebrané vzorky byly podrobeny PCR reakci z kolonií (obr. 15, str. 42) a zároveň těmito vzorky bylo zaočkováno vždy 5 ml LB Amp média.

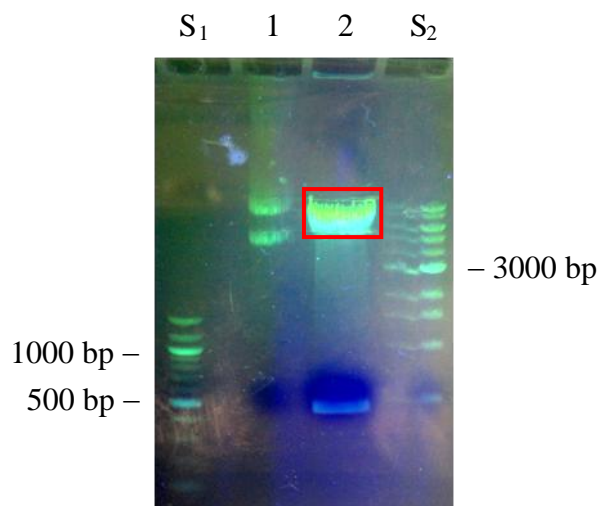




**Obr. 15: PCR z kolonií transformovaných pTW5Sec\_C1.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V drahách 1 až 6 jsou vzorky, u kterých byl při ligaci použit molární poměr vektor : inzert 1 : 16 (694 bp), v drahách 7 až 12 vzorky, u nichž byl použit molární poměr 1 : 2 (694 bp). Jako přímý primer byl použit oligonukleotid pTT\_FW, jako zpětný pTW5Seq\_REV. Dráha S označuje 100 bp DNA standard.

Ze suspenzí buněk odpovídajících drahám 1, 3, 4, 5 a 6 byly izolovány roztoky plasmidové DNA. Roztoky číslo 6 (125 ng/μl,  $A_{260}/A_{280} = 1,69$ ) a 4 (110 ng/μl,  $A_{260}/A_{280} = 1,65$ ), tedy ty s nejvyšší koncentrací a čistotou, byly vybrány pro sekvenaci v Laboratoři sekvenace DNA. Sekvence, která je součástí přílohy, potvrdila, že ligace proběhla správně a podařilo se připravit plasmid pTW5Sec\_C1.

Plasmid pTW5Sec\_C1 byl štěpen současně restrikními endonukleasami AgeI a KpnI. Linearizovaný plasmid byl přečištěn agarosovou elektroforézou (obr. 16, str. 43) a izolován z gelu. Byl tak získán roztok linearizovaného plasmidu pTW5Sec\*AgeI/KpnI (56,5 ng/μl,  $A_{260}/A_{280} = 1,67$ ).

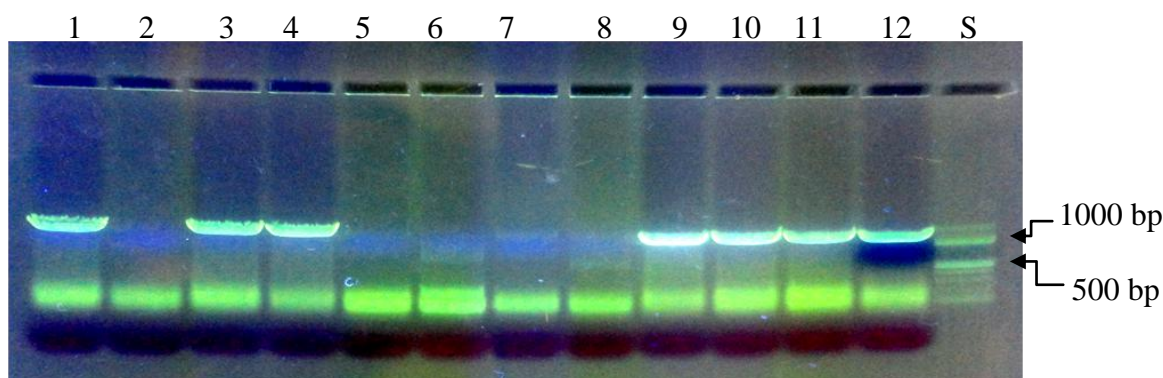


**Obr. 16: Přečištění produktů štěpení plasmidu pTW5Sec\_C1 enzymy AgeI a KpnI.** Byl použit 1% agarosový TAE gel. V dráze 1 je neštěpený plasmid pTW5Sec\_C1 (5454 bp), v dráze 2 linearizovaný plasmid pTW5Sec\*AgeI/KpnI (5019 bp) spolu s vyštěpeným inzertem C1 (435 bp). Dráhy S<sub>1</sub> a S<sub>2</sub> označují 100 bp, resp. 1 kb DNA standardy. Červeně je vyznačena oblast, která byla vyříznuta z gelu, a z níž byla izolována plasmidová DNA.

Dalším krokem byla ligace pTW5Sec\*AgeI/KpnI a vždy jednoho inzertu (L1\*AgeI/KpnI, H1\*AgeI/KpnI, H2\*AgeI/KpnI). Každá ze tří ligací byla prováděna ve dvou verzích, které se lišily molárním poměrem vektor : inzert. První sada reakcí obsahovala molární poměr v rozmezí 1 : 3-5, druhá pak v rozmezí 1 : 8-10. Ligačními reakcemi byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$ , které byly natřeny na misky s LB Amp agarem a ponechány inkubovat přes noc. Kolonie buněk byly pozorovány pouze u verze pTW5Sec\_H1(1 : 3). Ostatní ligace byly zopakovány se zvýšeným molárním množstvím inzertu. Ligace pTW5Sec\*AgeI/KpnI a L1\*AgeI/KpnI, pTW5Sec\*AgeI/KpnI a H2\*AgeI/KpnI byly nově provedeny v molárním poměru 1 : 30. Výsledek transformace byl pozitivní pouze pro verzi pTW5Sec\_L1(1 : 30). Ze všech pozitivních Petriho misek s ampicilinovým LB agarem byly odebrány jeden až tři vzorky kolonií, které byly podrobeny PCR reakci z kolonií. Všechny klony byly negativní.

Bylo přistoupeno k přípravě nových roztoků inzertů L1 (23,5 ng/ $\mu$ l,  $A_{260}/A_{280}$  = 1,64), H1 (17,5 ng/ $\mu$ l,  $A_{260}/A_{280}$  = 1,70) a H2 (60 ng/ $\mu$ l,  $A_{260}/A_{280}$  = 1,51). Tyto byly opět štěpeny kombinací restrikčních endonukleas AgeI a KpnI při použití NEBuffer 1 pufru, přečištěny agarosovou elektroforézou a izolovány z gelu pomocí kitu. Štěpené inzerty byly ligovány do plasmidu pTW5Sec\*AgeI/KpnI ve dvou molárních poměrech (1 : 3 a 1 : 8). Ligace probíhala 17 hodin. Výslednými ligačními směsmi byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Všech šest transformací proběhlo úspěšně a z koloniemi hustě

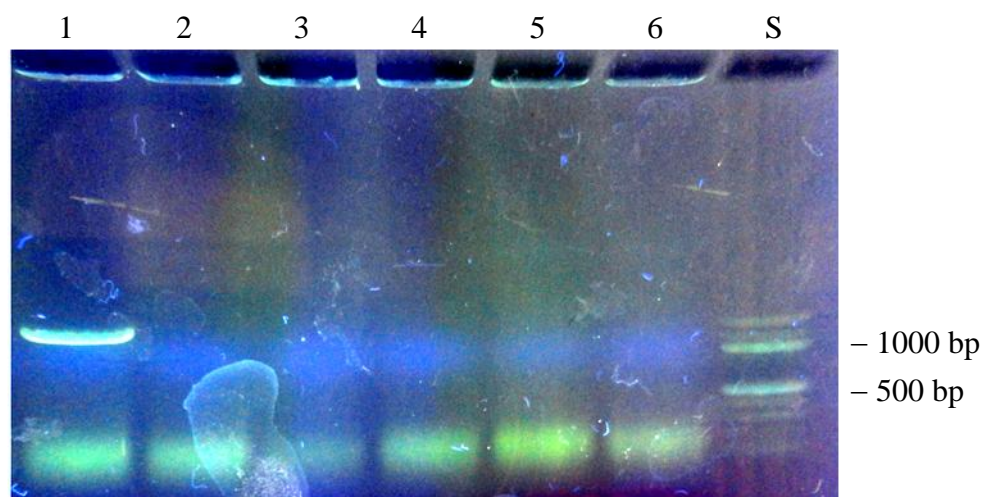
porostlých Petriho misek bylo odebráno po dvou koloniích, se kterými byla provedena PCR reakce (obr. 17) a zaočkováno LB Amp médium.



**Obr. 17: PCR z kolonií transformovaných plasmidy pTW5Sec\_L1, pTW5Sec\_H1, pTW5Sec\_H2.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V drahách 1 a 2 jsou vzorky pTW5Sec\_H2 (1 : 8, 1582 bp), v drahách 3 a 4 vzorky pTW5Sec\_H2 (1 : 3, 1582 bp), v drahách 5 a 6 vzorky pTW5Sec\_H1 (1 : 8, 1555 bp), v drahách 7 a 8 vzorky pTW5Sec\_H1 (1 : 3, 1555 bp), v drahách 9 a 10 vzorky pTW5Sec\_L1 (1 : 8, 1354 bp), v drahách 11 a 12 vzorky pTW5Sec\_L1 (1 : 3, 1354 bp). Jako přímý primer byl pro všechny reakce použit pTT\_FW. Jako zpětný primer byl u reakcí s pTW5Sec\_L1 použit L\_REV. U reakcí s pTW5Sec\_H1 a pTW5Sec\_H2 byl použit H\_REV. Dráha S označuje 100 bp DNA standard.

Z buněčných suspenzí, které odpovídali pozitivním vzorkům z PCR z kolonií, byla izolována plasmidová DNA. Byly získány roztoky plasmidů pTW5Sec\_L1 a pTW5Sec\_H2, které byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA. Sekvence potvrdila správnost sekvence připravených vektorů a je uvedena v příloze.

Poslední plasmid pTW5Sec\_H1 byl připraven ligací pTW5Sec\*AgeI/KpnI a H1\*AgeI/KpnI v molárním poměru 1 : 30. Výsledkem ligace byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , jejichž suspenze byla natřena na Petriho misky s LB Amp agarem. S šesti koloniemi byla provedena PCR z kolonií (obr. 18, str. 45) a zároveň jimi bylo zaočkováno LB Amp médium. Z média, které odpovídalo jedinému pozitivnímu vzorku, byla izolována a v Laboratoři sekvenace DNA sekvenována plasmidová DNA. Sekvence potvrdila správnost sekvence plasmidu pTW5Sec\_H1 a je uvedena v příloze.



**Obr. 18: PCR z kolonií transformovaných plasmidem pTW5Sec\_H1.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V drahách 1 až 6 jsou vzorky pTW5Sec\_H1 (1 : 30, 1555 bp). Jako přímý primer byl použit oligonukleotid pTT\_FW, jako zpětný pTW5Seq\_REV. Dráha S označuje 100 bp DNA standard.

Plasmidy pTW5Sec\_L1, pTW5\_L2, pTW5Sec\_H1 a pTW5Sec\_H2, jejichž správnost byla potvrzena sekvenacemi, byly transformovány buňky *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , které byly po transformaci převedeny do 500 ml LB Amp média a inkubovány 13 hodin. Plasmidová DNA byla izolována pomocí komerčního kitu a byly tak získány zásobní roztoky všech připravovaných plasmidů o objemu 1 ml. Koncentrace a čistota byly stanoveny spektrofotometricky (tab. 2), celistvost plasmidů v připravených zásobních roztocích byla ověřena agarosovou elektroforézou.

**Tab. 2: Příprava zásobního množství plasmidů pTW5Sec\_L1, pTW5\_L2, pTW5Sec\_H1 a pTW5Sec\_H2.** Koncentrace zásobního roztoku a jeho čistota vyjádřená jako  $A_{260} / A_{280}$ .

Plasmid	$c / \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$	$A_{260} / A_{280}$
pTW5Sec_L1	2,43	1,69
pTW5_L2	2,27	1,61
pTW5Sec_H1	1,89	1,68
pTW5Sec_H2	1,44	1,55

## 6 Diskuse

### 6.1 Cílená mutageneze

Sekvence plasmidu pTW5Sec, která ukázala inserci nukleotidu cytidinmonofosfátu v oblasti *de novo* připraveného sekrečního signálu, iniciovala pokusy o cílenou mutagenezi (deleci) tohoto nukleotidu. Deleční oligonukleotidy byly navrženy tak, aby překlenuly místo inserce. Přímý a zpětný deleční oligonukleotid byly vzájemně komplementární.

Prvním zvoleným postupem cílené mutageneze byla „dvoufragmentová verze“, která sestávala ze dvou přípravných PCR reakcí a jedné navazující PCR reakce, při které dojde ke vzniku dvouvláknového produktu s deletovaným nukleotidem. První přípravná PCR reakce měla jako přímý primer sekvenační oligonukleotid pTT\_FW. Jako zpětný primer byl použit deleční oligonukleotid pTW5SecDel\_REV, který sloužil k překlenutí místa delece. Druhá přípravná PCR reakce obsahovala jako přímý primer deleční oligonukleotid pTW5SecDel\_FW a jako zpětný primer sekvenační oligonukleotid pTW5Seq\_REV. V obou přípravných PCR reakcích byl jako templát použit plasmid pTW5Sec\_C1 s insercí nukleotidu. Výsledkem přípravných reakcí byly dva fragmenty o délce 147 bp a 198 bp, které obsahovaly 20 nukleotidů dlouhý vzájemně komplementární úsek tak, že konec jednoho vlákna odpovídal začátku druhého. V navazující PCR reakci byly amplifikované částečně komplementární fragmenty použity jako templát. Přímým primerem byl sekvenační oligonukleotid pTT\_FW. Zpětným primerem byl sekvenační oligonukleotid pTW5Seq\_REV. Byly vyzkoušeny různé koncentrace templátu pTW5Sec\_C1 (0,05 µg/µl a 0,1 µg/µl) i dvě různé DNA polymerasy (Deep Vent DNA polymerasa a Phusion HF DNA polymerasa). Agarosové elektroforézy produktů navazujících PCR reakcí neprokázaly ani v jednom případě přítomnost požadovaného produktu. Několikrát byly pozorovány jen pásy vyplňující celou dráhu, jejichž intenzita se směrem k vyšším mobilitám snižovala.

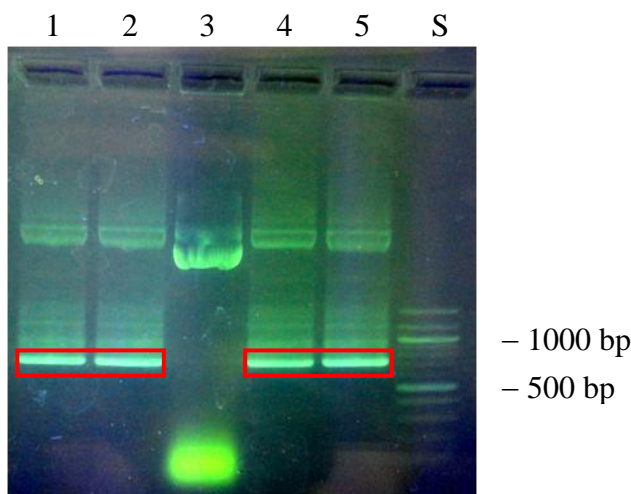
Druhým zvoleným postupem cílené mutageneze využívající jedinou PCR reakci byla metoda, při níž dochází k amplifikaci celého plasmidu. Jako přímý i zpětný primer byly použity mutační oligonukleotidy pTW5SecDel\_FW a pTW5SecDel\_REV. I zde byly použity obě výše uvedené DNA polymerasy. PCR reakce byla prováděna postupem popsáním

v kapitole 4.1 s rozdílem doby trvání syntetického kroku (72 °C), který byl prodloužen na 3 min. Ani tato cesta však nevedla k požadovanému produktu.

## 6.2 Methylace MscI místa

Důvodem přípravy zásobního množství plasmidu pTT28\_C1 a pTW5 v bakteriích *Escherichia coli* kmene  $\text{dam}^-/\text{dcm}^-$ , který se vyznačuje deficiencí produkce methyltransferas  $\text{dam}$  a  $\text{dcm}$ , byly neúspěšné pokusy, které jí předcházely, jež jsou stručně shrnuty v následujících odstavcích.

Pomocí sekvenačních oligonukleotidů pTT\_FW a pTT\_REV byl PCR reakcí amplifikován úsek o délce 738 bp nazvaný pTT28\_C1\_Frag. Tento fragment byl vizualizován a zároveň přečištěn pomocí preparativní agarosové elektroforézy (obr. 19).

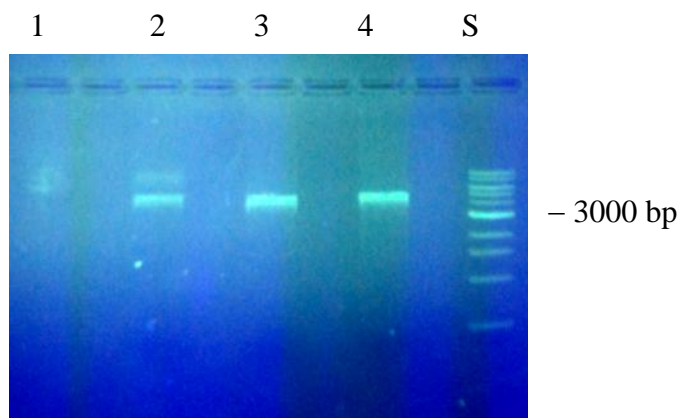


**Obr. 19: Přečištění amplifikovaného úseku plasmidu pTT28\_C1 agarosovou elektroforézou.** Byl použit 1% agarosový TAE gel. V drahách 1, 2, 4 a 5 je amplifikovaný úsek pTT28\_C1\_Frag (738 bp), v dráze 3 plasmid pTT28\_C1. Dráha S označuje 100 bp DNA standard. Jako přímý a zpětný primer byly použity sekvenační oligonukleotidy pTT\_FW a pTT\_REV.

Z tohoto amplifikovaného fragmentu byl pomocí restričních míst MscI a KpnI vyštěpen úsek pTT28\_C1\_Frag\*MscI/KpnI obsahující mj. požadovanou sekvenci pro sekreční signál. Obdobně byl z plasmidu pTW5, který obsahoval chybnou sekvenci pro sekreční signál, vyštěpen úsek mezi totožnými restričními místy. Proběhlo několik neúspěšných pokusů o ligaci inzertu pTT28\_C1\_Frag\*MscI/KpnI do linearizovaného plasmidu pTW5. Agarosová elektroforéza produktů štěpení plasmidu pTW5Sec\_C1 s inzercí kombinacemi restričních endonukleas MscI a AgeI, MscI a KpnI a štěpení samostatnou endonukleasou



MscI (obr. 20) napověděla při srovnání s restrikcí pTW5\_SEAP kombinací restrikčních endonukleas AgeI a KpnI (obr. 11, str. 38), že nedochází k optimálnímu štěpení endonukleasou MscI.



**Obr. 20: Štěpení plasmidu pTW5Sec\_C1 enzymy MscI, MscI a AgeI, MscI a KpnI.** Byl použit 1,25% agarosový TAE gel. V dráze 1 je neštěpený plasmid pTW5Sec\_C1 (5454 bp), v dráze 2 produkty štěpení pTW5Sec\_C1 enzymem MscI, v dráze 3 produkty štěpení pTW5Sec\_C1 enzymy MscI a KpnI, v dráze 4 produkty štěpení pTW5Sec\_C1 enzymy MscI a AgeI. Dráha S označuje 1 kb DNA standard.

Výrobce endonukleasy MscI upozorňuje na její neúčinnost v případě methylace restrikčního místa. K methylaci podle výrobce dochází u  $dcm^+$  kmenů bakterií v případě výskytu sekvence TGGCCAGG [62]. Tato sekvence přímo neodpovídá sekvenci ve štěpeném úseku v plasmidech pTW5 a pTT28\_C1 (TGGCCATA). Přesto bylo přistoupeno k přípravě nemethylovaných verzí obou plasmidů pomocí  $dcm^-$  kmene *Escherichia coli*, jejichž štěpení enzymem MscI již probíhalo standardně (obr. 13, str. 40, a obr. 14, str. 41).

### 6.3 Expresní test připravených konstruktů

Po přípravě zásobních roztoků všech požadovaných plasmidů bylo přistoupeno k expresnímu testu. Došlo ke ko-transfekci buněčné linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293T (HEK293T) vždy jednou z kombinací plasmidů pro fúzní produkt IL-2-lehký řetězec (pTW5Sec\_L1, pTW5\_L2) a plasmidu pro těžký řetězec (pTW5Sec\_H2). Plasmid pTW5Sec\_L1 má poskytovat fúzní produkt, který jako nascentní polypeptid obsahuje nově zavedený, modifikovaný sekreční signál původem ze sekretované alkalické fosfatasy. Plasmid pTW5\_L2 poskytuje tentýž fúzní produkt, který ovšem jako nascentní polypeptid obsahuje nativní sekreční signál pro IL-2. Plasmid pTW5Sec\_H2, použitý v obou kombinacích, poskytuje těžký řetězec protilátky ukončený histidinovou kotvou. Současně byla

provedena ko-transfekce kombinací původních plasmidů pro lehký a těžký řetězec (pcDNA3.1\_L a pcDNA3.1\_H). Plasmid pcDNA3.1\_L poskytuje tentýž nascentní polypeptid jako plasmid pTW5\_L2. Plasmid pcDNA3.1\_H poskytuje obdobu nascentního produktu plasmidu pTW5Sec\_H2 neobsahující histidinovou kotvu. Transfekce byly prováděny podle Mgr. Janem Bláhou optimalizovaného postupu, který je v laboratoři běžně užíván. Po produkci, která trvala 5 dní, bylo produkční médium prosté buněk 50× zkoncentrováno pomocí centrifugačních koncentrátorů s limitem průchodnosti 10 kDa a předáno Mgr. Jakubu Tomalovi, Ph.D. z Laboratoře nádorové imunologie MBÚ AV ČR k provedení *ex vivo* testu biologické aktivity na T-lymfocytech. Výsledky testu byly uspokojivé, neboť míra biologické odpovědi T-lymfocytů na jednotlivé fúzní produkty odpovídala předpokladu. Vzhledem k podobnosti všech testovaných fúzních proteinů lze předpokládat, že míra biologické odpovědi koreluje s množstvím fúzního proteinu v produkčním médiu. Biologická odpověď buněk na koncentrát média s fúzními produkty připravenými pomocí nových vektorů (pTW5) byla vyšší než u vektorů původních (pcDNA3.1). Zároveň bylo pozorováno, že zavedením sekrečního signálu z alkalické fosfatasy je také docíleno dalšího zvýšení produkce. Tyto předběžné pozitivní výsledky je však třeba ještě potvrdit dalšími podrobnými a opakovanými testy.



## 7 Shrnutí

- Sekreční signál ze sekretované alkalické fosfatasy byl zaveden do plasmidu pTW5.
- Byly připraveny čtyři transfekční vektory:
  - pTW5Sec\_L1  
Vektor kódující fúzní lehký řetězec monoklonální protilátky (proti IL-2) s IL-2. V nascentním polypeptidu je přítomný sekreční signál ze SEAP.
  - pTW5\_L2  
Vektor kódující fúzní lehký řetězec monoklonální protilátky (proti IL-2) s IL-2. V nascentním polypeptidu je přítomný nativní sekreční signál pro IL-2.
  - pTW5Sec\_H1  
Vektor kódující těžký řetězec monoklonální protilátky (proti IL-2).
  - pTW5Sec\_H2  
Vektor kódující těžký řetězec monoklonální protilátky (proti IL-2) zakončený histidinovou kotvou.
- Fúzní monoklonální protilátky s IL-2 byly připraveny pomocí lidské buněčné linie HEK293T.
- U připravených fúzních produktů byla předběžně stanovena jejich *ex vivo* biologická aktivita pomocí proliferační odpovědi T-lymfocytů.

## 8 Seznam použité literatury

- [1] FITZGERALD, K. A. *The Cytokine Factsbook*. 2. vyd. San Diego: Academic Press, 2001, 515 s. ISBN 01-215-5142-3.
- [2] HOŘEJŠÍ, V. a J. BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton, 2005, 279 s. ISBN 80-725-4686-4.
- [3] CHAPEL, H. et al. *Essential clinical immunology*. 4. vyd. Malden, MA, USA: Blackwell Science, 1999, 351 s. ISBN 06-320-4972-3.
- [4] BALKWILL, F. R. a F. BURKE. The cytokine network. *Immunology Today*. 1989, roč. 10, č. 9, s. 299 – 303.
- [5] EL-OMAR, E. M., M. CARRINGTON, W.-H. CHOW, K. E. L. MCCOLL, J. H. BREM, H. A. YOUNG, J. HERRERA, J. LISSOWSKA, Ch.-Ch. YUAN, N. ROTHMAN, G. LANYON, M. MARTIN, J. F. FRAUMENI a Ch. S. RABKIN. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000, č. 6776, s. 398 – 402.
- [6] DELVES, P. J a I. M. ROITT. *Encyclopedia of immunology*. 2. vyd. San Diego: Academic Press, 1998, 2516 s. ISBN 01222676994.
- [7] BURMESTER, G.-R., A. PEZZUTTO, T. ULRICHS a A. AICHER. *Color Atlas of Immunology*. New York: Thieme, 2003, 322 s. ISBN 31-312-6741-0.
- [8] GAFFEN, S. L. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*. 2001, roč. 14, č. 2, s. 63 – 77.
- [9] SMITH, K. A. T-cell growth factor. *Immunological Reviews*. 1980, č. 51, s. 337 – 357.
- [10] CHENG, G., A. YU a T. R. MALEK. T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunological Reviews*. 2011, č. 241, s. 63 – 76.

- [11] SMITH, K. A. a D. A. CANTRELL. Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985, č. 82, s. 864 – 868.
- [12] FRIEDMAN, M. C., T. S. MIGONE, S. M. RUSSELL a W. J. LEONARD. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, č. 93, s. 2077 – 2082.
- [13] MATTHEWS, D. J., P. A. CLARK, J. HERBERT, G. MORGAN, R. J. ARMITAGE, C. KINNON, A. MINTY, K. H. GRABSTEIN, D. CAPUT, P. FERRARA a R. CALLARD. Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor  $\gamma$ -chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13, and IL-15. *Blood*. 1995, č. 85, s. 38 – 42.
- [14] SMITH, K. A., M. F. FAVATA a S. OROSZLAN. Production and characterization of monoclonal antibodies to human interleukin 2: Strategy and tactics. *Journal of Immunology*. 1983, č. 131, s. 1808 – 1815.
- [15] CANTRELL, D. A. a K. A. SMITH. The interleukin-2 T-cell system: A new cell growth model. *Science*. 1984, č. 4655, s. 1312 – 1316.
- [16] STERN, J. B. a K. A. SMITH. Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression. *Science*. 1986, č. 4760, s. 203 – 206.
- [17] KRISTENSEN, N. N., J. P. CHRISTENSEN, A. R. THOMSEN a R. W. OLAFSON. High numbers of IL-2-producing CD8+ T cells during viral infection: correlation with stable memory development. *Journal of General Virology*. 2002, č. 83, s. 2123 – 2133.
- [18] AKDIS, M., S. BURGLER, R. CRAMERI, T. EIWEGGER, H. FUJITA, E. GOMEZ, S. KLUNKER, N. MAYER, L. O'MAHONY, O. PALMARES, C. RHYNER, N. QUAKED, A. SCHAFFARTZIK, W. Van De VEEN, S. ZELLER, M. ZIMMERMANN a C.A. AKDIS. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011, č. 127, s. 701 – 721.

- [19] GREEN, D. R., N. DROIN a M. PINKOSKI. Activation-induced cell death in T cells. *Immunological Reviews*. 2003, č. 193, s. 70 – 81.
- [20] WALDMANN, T. A. Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1984, č. 160, s. 1450 – 1466.
- [21] DJEU, J. Y., J. H. LIU, S. WEI, H. RUI, C. A. PEARSON, W. J. LEONARD a D. K. BLANCHARD. Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils - mechanism of activation of antifungal activity against candida-albicans by IL-2. *Journal of Immunology*. 1993, č. 150, s. 960 – 970.
- [22] TOMAN, M. *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2009, 392 s. ISBN 978-80-247-2464-5.
- [23] ZHDANOV, V. M., A. I. GROMYKO, F. I. ERSHOV, D. N. NOSIK a M. N. KORNEEVA. Cultivation of cells producing the human immunodeficiency virus. *Voprosy virusologii*. 1988, č. 192.
- [24] FALLAHZADEH, M. K., J. ROOZBEH, B. GERAMIZADEH a M. R. NAMAZI. Interleukin-2 serum levels are elevated in patients with uremic pruritus: a novel finding with practical implications. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011, č. 26, s. 3338 – 3344.
- [25] MOLLOY, M. J., W. ZHANG a E. J. USHERWOOD. Cutting Edge: IL-2 Immune Complexes As a Therapy for Persistent Virus Infection. *The Journal of Immunology*. 2009, č. 182, s. 4512 – 4515.
- [26] ZHANG, C., B. WANG a M. WANG. GM-CSF and IL-2 as adjuvant enhance the immune effect of protein vaccine against foot-and-mouth disease. *Virology Journal*. 2011, č. 8, s. 7 – 16.
- [27] SIVITZ, Laura. IL 2 Immunotherapy Fails to Benefit HIV-Infected Individuals Already Taking Antiretrovirals. In: *National Institutes of Health* [online]. Bethesda, Md.: National Institutes of Health, 2009 [cit. 23. 7. 2013]. Dostupné z: [http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2009/pages/il\\_2\\_therapy.aspx](http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2009/pages/il_2_therapy.aspx)

- [28] INSIGHT–ESPRIT Study Group a SILCAAT Scientific Committee. Interleukin-2 Therapy in Patients with HIV Infection. *New England Journal of Medicine*. 2009, č. 361, s. 1548 – 1559.
- [29] BOYMAN, O., C. KRIEG, S. LETOURNEAU, K. WEBSTER, C. D. SURH a J. SPRENT. Selectively Expanding Subsets of T Cells in Mice by Injection of Interleukin-2/Antibody Complexes: Implications for Transplantation Tolerance. *Transplantation Proceedings*. 2012, č. 44, s. 1032 – 1034.
- [30] SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. VEVEY, Switzerland. *Proleukin - Prometheus Laboratories Therapeutics & Diagnostic* [online]. 2012 [cit. 1. 7. 2013]. Dostupné z: <http://www.proleukin.com/>
- [31] PRENDERGAST, G. C. a E. M. JAFFEE. *Cancer immunotherapy: immune suppression and tumor growth*. Boston: Academic Press/Elsevier, 2007, s. 167 – 181. ISBN 0123725518.
- [32] BENENCIA, F., L. SPRAGUE, J. MCGINTY, M. PATE a M. MUCCIOLI. Dendritic Cells The Tumor Microenvironment and the Challenges for an Effective Antitumor Vaccination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, č. 2012, s. 1 – 15.
- [33] FAGAN, E. A. a A. L. EDDLESTON. Immunotherapy for cancer: the use of lymphokine activated killer (LAK) cells. *Gut*. 1987, č. 28, s. 113 – 116.
- [34] BAJORATH, J. Both Extracellular Immunoglobulin-like Domains of CD80 Contain Residues Critical for Binding T Cell Surface Receptors CTLA-4 and CD28. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, č. 270, s. 21 181 – 21 187.
- [35] THÈZE, J., P. M. ALZARI a J. BERTOGLIO. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunology Today*. 1996, č. 17, s. 481 – 486.
- [36] BALUNA, R. a E. S VITETTA. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology*. 1997, č. 37, s. 117 – 132.
- [37] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 1992. ISBN 80-200-0438-6.

- [38] EDELMAN, G. M. The Covalent Structure of an Entire gamma G Immunoglobulin Molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1969-05-01, č. 63, s. 78 – 85.
- [39] GUDDAT, L. W. Three-Dimensional Structure of a Human Immunoglobulin With a Hinge Deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993, č. 90, s. 4271 – 4275.
- [40] LEE, Y.-K., J.W. BREWER, R. HELLMAN a L. M. HENDERSHOT. BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Molecular Biology of the Cell*. 1999, č. 10, s. 2209 – 2219.
- [41] GETHING, M. J., J. SAMBROOK. Protein folding in the cell. *Nature*. 1992, č. 6355, s. 33 – 45.
- [42] HAAS, I. G. a M. WABL. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*. 1983, č. 5941, s. 387 – 389.
- [43] KNITTLER, M. R. Assembly of Immunoglobulin Light Chains as a Prerequisite for Secretion: A model for oligomerization-dependent subunit folding. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, č. 272, s. 3117 – 3123.
- [44] DORNER, A. J. Immunoglobulin Binding Protein (BiP) Function Is Required to Protect Cells from Endoplasmic Reticulum Stress but Is Not Required for the Secretion of Selective Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, č. 272, s. 4327 – 4334.
- [45] GOTO, Y. a K. HAMAGUCHI. Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *Journal of Molecular Biology*. 1982, č. 156, s. 891 – 910.
- [46] BLOND-ELGUINDI, S. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*. 1993, č. 75, s. 717 – 728.
- [47] HENDERSHOT, L. Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, roč. 93, č. 11, s. 5269 – 5274.

- [48] WU, T. T. a E. A. KABAT. An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *Journal of Immunology*. 2008, č. 180, 7057 – 7096.
- [49] CHOTHIA, C. a A. M. LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *Journal of Molecular Biology*. 1987, č. 196, s. 901 – 917.
- [50] VARGAS-MADRAZO, E., F. LARA-OCHOA a J. C. ALMAGRO. Canonical Structure Repertoire of the Antigen-binding Site of Immunoglobulins Suggests Strong Geometrical Restrictions Associated to the Mechanism of Immune Recognition. *Journal of Molecular Biology*. 1995, č. 254, s. 497 – 504.
- [51] KÖHLER, G., C. MILSTEIN a J. C. ALMAGRO. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, č. 256, s. 495 – 497.
- [52] McGRATH, J. P., X. CAO, A. SCHUTZ, P. LYNCH, T. EBENDAL, M. J. COLLOMA, S. L. MORRISON a S. D. PUTNEY. Bifunctional fusion between nerve growth factor and a transferrin receptor antibody. *Journal of Neuroscience Research*. 1997, č. 47, s. 123 – 133.
- [53] HELGUERA, G., S. L. MORRISON a M. L. PENICHER. Antibody-Cytokine Fusion Proteins: Harnessing the Combined Power of Cytokines and Antibodies for Cancer Therapy. *Clinical Immunology*. 2002, č. 105, s. 233 – 246.
- [54] PENICHER, M. L. a S. L. MORRISON. Antibody–cytokine fusion proteins for the therapy of cancer. *Journal of Immunological Methods*. 2001, č. 248, s. 91 – 101.
- [55] CRUZ, J. S., T. H. HUANG, M. L. PENICHER a S. L. MORRISON. Antibody-cytokine fusion proteins: innovative weapons in the war against cancer. *Clinical And Experimental Medicine*. 2004, č. 4, s. 57 – 64.
- [56] TOMALA, J., J. KOVÁŘOVÁ, M. KABEŠOVÁ, P. VOTAVOVÁ, H. CHMELOVÁ, B. DVOŘÁKOVÁ, B. ŘÍHOVÁ a M. KOVÁŘ. Chimera of IL-2 Linked to Light Chain of anti-IL-2 mAb Mimics IL-2/anti-IL-2 mAb Complexes Both Structurally and Functionally. *ACS Chemical Biology*. 2013, č. 8, s. 871 – 876.

- [57] NEW ENGLAND BIOLABS. *NEB / New England Biolabs* [online]. 2013 [cit. 17. 7. 2013]. Dostupné z: <https://www.neb.com/>
- [58] GENOMED. *JetQuick DNA Purification Kit* [online]. 21. 4. 2010 [cit. 17. 7. 2013]. Dostupné z: [http://www.genomed-dna.com/pdf/7015013\\_JetQuick%20Gel%20Extraction,%20PCR,%20CleanUp%20Manual,%2021%20Apr%202010\\_print.pdf](http://www.genomed-dna.com/pdf/7015013_JetQuick%20Gel%20Extraction,%20PCR,%20CleanUp%20Manual,%2021%20Apr%202010_print.pdf)
- [59] INVITROGEN. *PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit* [online]. 2011 [cit. 23. 7. 2013]. Dostupné z: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink\\_hipure\\_plasmid\\_filter\\_purification\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_hipure_plasmid_filter_purification_man.pdf)
- [60] DNATURE. *High-Speed Plasmid Mini Kit* [online]. Geneaid Biotech Ltd, 2011 [cit. 17. 7. 2013]. Dostupné z: <http://www.dnature.co.nz/assets/Uploads/Geneaid/DNA-protocols/dnature-Plasmid-Mini-Kit.pdf>
- [61] Nucleic Acids Calculator. KENKYUU-RYUUGAKU NET. *Kenkyuu.net* [online]. 2002 [cit. 18. 7. 2013]. Dostupné z: <http://www.kenkyuu.net/js/nacalc.html>
- [62] Dam and Dcm Methylases of E. coli. *NEB / New England Biolabs* [online]. 2013 [cit. 18. 7. 2013]. Dostupné z: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/dam-and-dcm-methylases-of-e-coli>
- [63] POLÁCHOVÁ, Edita. *Příprava expresních vektorů regulujících buněčný cyklus a apoptózu pro optimalizaci expresního systému HEK293 buněčné linie*. Bakalářská práce PŘF UK Praha. 2012.





**H1: 1358 bp**

AAAAACCGGTGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTATCTTGCAAAGTTTCTGGCGATACCATTACAGCATACTACTTGCACCTTGTGAGGCAAAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAACTTCAAAAAACAAGGCGACATTCAGTGCAGATGCATCCTCCAACACAGCCTACCTGAGGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACCTATTTTTGTACCACAGTGACTTTTTACTATAGCCGAGAACTACGCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTGAAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGAACCTGCTCTCAAAAAGTAACTCCATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGACCTGGAACCTCTGGA GCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGGACTCTACACTCTCACCAGCTCAGTGA CTGTACCCTCCAGCACCTGGTCCAGCCAGGCCGTACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGT GGACAAGAAAATTGTGCCAAGGGAATGCAATCCTTGTGGATGTACAGGCTCAGAAGTATCATCTGTCTTCATC TTCCCCCAAAGACCAAAGATGTGCTCACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATTA GCCAGAATGATCCCGAGGTCCGGTTCAGCTGGTTTTATAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTCAGACTCATGC CCCGGAGAAGCAGTCCAACAGCACTTTACGCTCAGTCACTGAACTCCCCATCGTGCACCCGGGACTGGCTCAAT GGCAAGACGTTCAAATGCAAAGTCAACAGTGGAGCATTCCCTGCCCCCATCGAGAAAAGCATCTCCAAACCCG AAGGCACACCACGAGGTCCACAGGTATACACCATGGCGCCTCCCAAGGAAGAGATGACCCAGAGTCAAGTCAG TATCACCTGCATGGTAAAAGGCTTCTATCCCCCAGACATTTATACGGAGTGGAAAGATGAACGGGCAGCCACAG GAAAAC TACAAGA AACTCCACCTACGATGGACACAGATGGGAGTTACTTCCTCTACAGCAAGCTCAATGTAA AGAAAGAAACATGGCAGCAGGGAAACACTTTCACGTGTTCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACAACCACCATAC TGAGAAGAGTCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGAGGTACCAAAA

**H2: 1355 bp**

AAAAACCGGTGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTATCTTGCAAAGTTTCTGGCGATACCATTACAGCATACTACTTGCACCTTGTGAGGCAAAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAACTTCAAAAAACAAGGCGACATTCAGTGCAGATGCATCCTCCAACACAGCCTACCTGAGGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACCTATTTTTGTACCACAGTGACTTTTTACTATAGCCGAGAACTACGCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTGAAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGAACCTGCTCTCAAAAAGTAACTCCATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGACCTGGAACCTCTGGA GCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGGACTCTACACTCTCACCAGCTCAGTGA CTGTACCCTCCAGCACCTGGTCCAGCCAGGCCGTACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGT GGACAAGAAAATTGTGCCAAGGGAATGCAATCCTTGTGGATGTACAGGCTCAGAAGTATCATCTGTCTTCATC TTCCCCCAAAGACCAAAGATGTGCTCACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATTA GCCAGAATGATCCCGAGGTCCGGTTCAGCTGGTTTTATAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTCAGACTCATGC CCCGGAGAAGCAGTCCAACAGCACTTTACGCTCAGTCACTGAACTCCCCATCGTGCACCCGGGACTGGCTCAAT GGCAAGACGTTCAAATGCAAAGTCAACAGTGGAGCATTCCCTGCCCCCATCGAGAAAAGCATCTCCAAACCCG AAGGCACACCACGAGGTCCACAGGTATACACCATGGCGCCTCCCAAGGAAGAGATGACCCAGAGTCAAGTCAG TATCACCTGCATGGTAAAAGGCTTCTATCCCCCAGACATTTATACGGAGTGGAAAGATGAACGGGCAGCCACAG GAAAAC TACAAGA AACTCCACCTACGATGGACACAGATGGGAGTTACTTCCTCTACAGCAAGCTCAATGTAA AGAAAGAAACATGGCAGCAGGGAAACACTTTCACGTGTTCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACAACCACCATAC TGAGAAGAGTCTCTCCCACTCTCCTGGTAAAGGTACCAAAA

Podtržením jsou zvýrazněny příslušné primery pro PCR reakce (viz kapitola 3.6).



**TAG** stop kodon

#### 9.4 Sekvence DNA pro těžký řetězec protilátky S4B6 proti IL-2 z plasmidu pcDNA3.1\_H

```
GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTATCTTGCAAAGTTT
CTGGCGATACCATTACAGCATACTACTTGCACCTTGTGAGGCAAAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGG
AAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAACTTCAAAAACAAGGCGACATTCAGTGCAGAT
GCATCCTCCAACACAGCCTACCTGAGGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACCTATTTTTGTACCA
CAGTGACTTTTTACTATAGCCGAGAACTACGCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTC
TTCAGCTGAAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGAAGTGTCTCAAAAAGTAACTCCATGGTG
ACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGACCTGGAAGTCTGGAGCCCTGTCCA
GCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGGACTCTACACTCTCACCAGCTCAGTGACTGTACCCTC
CAGCACCTGGTCCAGCCAGGCCGTCACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAA
ATTGTGCCAAGGGAATGCAATCCTTGTGGATGTACAGGCTCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAA
AGACCAAAGATGTGCTCACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATTAGCCAGAATGA
TCCCGAGGTCCGGTTCAGCTGGTTTATAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTCAGACTCATGCCCCGGAGAAG
CAGTCCAACAGCACTTTACGCTCAGTCAGTGAAGTCCCATCGTGCACCCGGGACTGGCTCAATGGCAAGACGT
TCAAATGCAAAGTCAACAGTGGAGCATTCCCTGCCCCATCGAGAAAAGCATCTCCAACCCGAAGGCACACC
ACGAGGTCCACAGGTATACACCATGGCGCCTCCAAGGAAGAGATGACCCAGAGTCAAGTCAGTATCACCTGC
ATGGTAAAAGGCTTCTATCCCCCAGACATTTATACGGAGTGGAAAGATGAACGGGCAGCCACAGGAAAACATA
AGAACACTCCACCTACGATGGACACAGATGGGAGTTACTTCCCTCTACAGCAAGCTCAATGTAAAGAAAAGAAC
ATGGCAGCAGGGAAACACTTTCAGTGTCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGT
CTCTCCCCTCTCCTGGTAAATGA
```

**TGA** stop kodon

**FIALOVÁ** sekvence těžkého řetězce protilátky

#### 9.5 Sekvence pTW5Sec\_SEAP (inzerce nukleotidu)

```
CATTGTAATGCATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAA
GTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCGCCGCCACCATGGGAGAACCTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCG
GCTTCAGCTGAGTCTTGGAAATACCGGTSEAPGGTACCACCATCACCACCATCACCACCACGGGTGATCAAAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGT
GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGATA
AATCCTGGTTGCTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTT
TGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCC
CTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCA
CTGACAATTCGGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGAT
TCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGCCTGCTG
CCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCTCTTTCGCTTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCC
CGCCTGGGATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAAT
TTTTTGTGCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAG
CTAGAGGATCGATCCCCGCCCGGGACGACTAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCGCGGGGCAGTG
CATGTATCCCTCAGTGGTGGTACACTTGCCACTGACCCTA
```

**ŠEDÁ** sekvence Kozakové

**ATG** start kodon

**TYRKYSOVÁ** sekvence sekrečního signálu pro SEAP

<b>SEAP</b>	značí inzert sekretované alkalické fosfatasy, který není pro svou rozsáhost explicitně uveden
<b>ZELENÁ</b>	histidinová kotva
<b>C</b>	inzerní nukleotid
<b>TGA</b>	stop kodon
<b>TMAVĚ ŠEDÁ</b>	sekvence WPRE

Barevné značení restričních míst odpovídá značení v kapitole 9.2.

## 9.6 Sekvence pTW5Sec\_C1

CTGCATGCATGAATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTATCGCCACCATGG  
GAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCTTCAGCTGAGTCTTGGAAATTACCGGTGTAAAAATGAC  
ACCACAGATCTCAACCATAAATACCTACGCTGCTTGCCCGAGAAACTGGATTGGAGTTGGAAATAAATGTTTT  
TATTTTTCTGAATATGCAAGTAACCTGGACATTTCAGCCAGACCTTCTGCAAGGCACAAGAGGCCGAGCTAGCAC  
GATTTGACACCGAGGAGGAGCTGAATTTCTTAAGCAGATACAAAGGGAGTTTTGATTACTGGATCGGCCTGCA  
CAGAGAGTCCTCAGAGCACCCCTTGGAAAGTGGACAGACAACACTCAGTATAACTACTCGCTTTCCATCCGGGGA  
GTGGAAAGATATGCCTACCTGAACGACATCGGGATCAGCAGTGCCAGGGTCTATGCAGACAAAAGATGGAGCT  
GTAGCAGACTTAACAGCTATAGCCTCCAATGCAAACTCCTTTTTCTCCTATGGGTACCACCATCACCACCA  
TCACCACCAAGGGTGATCAAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTAT  
GTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTT  
TCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCCGTTGTCAGGCAACG  
TGGCGTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCT  
TTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAAACTCATCGCCGCCCTGCCTTTGCCCGCTG  
CTGGGACAGGGCTCGGCCTGGTTGGCACTGGACAATTCCTGGTGGTTGGTTCGGGGAAGGCTGAACGTCATTG  
CATGGACTGCTCGCTGGATGCAACTGGAATTTCTGGCCGCGGGAACGTC

<b>ŠEDÁ</b>	sekvence Kozakové
<b>ATG</b>	start kodon
<b>TYRKYSOVÁ</b>	sekvence sekrečního signálu pro SEAP
<b>ČERVENÁ</b>	inzert C1
<b>ZELENÁ</b>	histidinová kotva
<b>TGA</b>	stop kodon
<b>TMAVĚ ŠEDÁ</b>	sekvence WPRE

Barevné značení restričních míst odpovídá značení v kapitole 9.2.



GGTGGACTTTCTGAGGAGATGGATAGCCTTCTGTCAAAGCATCATCTCAACAAGCCCTCAA GGTGGCGGAGGT  
TCTGGAGGAGGAGGATCCGGTGGCGGAGGTTCTGACATTGAGGTGACCCAGTCTCCTGCCTCCCTGTCTGCAT  
CTCTGGAAGAAATTGTCACCATCACATGCCAGGCAAGCCAGGACATTGGTAATTACTTATCATGGTATCAGCA  
GAAACTGGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCCATAGTGCAACCAGTTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTC  
AGCGGCAGTAGATCTGGCACACAGTATTCTCTTAAGATCAACAGACTACAGGTTGAAGATACTGGAATCTATT  
ACTGTCTACAACATTATAGTACTCCATACACGTTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAAGTCAAACGGGCTGATGC  
TGCACCAACTGTATCTATCTTCCCACCATCCACGGAACAGTTAGCAACTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCCTC  
ATGAACAACCTCTATCCCAGAGACATCAGTGTCAAGTGAAGATTGATGGCACTGAACGACGAGATGGTGTCC  
TGGACAGTGTACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACGTACAGCATGAGCAGCACCCCTCTCGTTGACCAAGGC  
TGACTATGAAAGTCATAACCTCTATACCTGTGAGGTTGTTTATAAGACATCATCCTCACCCGTCGTCAAGAGC  
TTCAACAGGAATGAGTGT TAGGGTACC CACCATCACCACCATCACCACCACGGG TGAATCAAACCTCTGG  
ATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAGTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGC  
TTTAATGCCTTTGTATCATGCTA

- ŠEDÁ** sekvence Kozakové
- ATG** start kodon
- ŽLUTÁ** sekvence nativního sekrečního signálu pro IL-2
- TMAVOŽLUTÁ** sekvence myšního IL-2
- MODRÁ** můstek spojující fúzní partnery
- RŮŽOVÁ** sekvence lehkého řetězce protilátky S4B6
- TAG, TGA** stop kodony
- ZELENÁ** histidinová kotva
- TMAVĚ ŠEDÁ** začátek sekvence WPRE

Barevné značení restričních míst odpovídá značení v kapitole 9.2.

## 9.9 Sekvence pTW5Sec\_H1

ATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTATCGCCACCATGGGAGAAGTCTGC  
TGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCTCAGCTGAGTCTTGGAAATTACCGGTGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG  
GGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTATCTTGCAAAGTTTCTGGCGATACCATTACAGCATA  
TACTTGCCTTTGTGAGGCAAAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATA  
GTACTAAATATGCTGAGAAGTTCAAAAACAAGGCGACATTCAGTGCAGATGCATCCTCCAACACAGCCTACCT  
GAGGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACCTATTTTTGTACCACAGTACTTTTTACTATAGCCGA  
GAACTACGCTGGTTTGTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCAGCTGAAACAACAGCCCCAT  
CTGTCTATCCACTGGCTCCTGGAAGTACTCTCAAAGTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGG  
CTATTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGACCTGGAAGTCTGGAGCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCT  
GTCCCTGCAGTCTGGACTCTACACTCTCACCAGCTCAGTACTGTACCCTCCAGCACCTGGTCCAGCCAGGCCG  
TCACCTGCAACGTAGCCACCCGGCCAGCAGCACCAGGTGGACAAGAAAATTTGTGCAAGGGAATGCAATCC  
TTGTGGATGTACAGGCTCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGACCAAAGATGTGCTCACCATC  
ACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATTAGCCAGAATGATCCCGAGGTCCGGTTCAGCTGGT  
TTATAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTCAGACTCATGCCCGGAGAAGCAGTCCAACAGCACTTTACGCTC  
AGTCAGTGAAGTCCCATCGTGCACCGGACTGGCTCAATGGCAAGACGTTCAAATGCAAAGTCAAACAGTGA

GCATTC CCTGCCCCCATCGAGAAAAGCATCTCCAAACCCGAAGGCACACCACGAGGTCCACAGGTATACACCA  
 TGGCGCCTCCCAAGGAAGAGATGACCCAGAGTCAAGTCAGTATCACCTGCATGGTAAAAGGCTTCTATCCCC  
 AGACATTTTATACGGAGTGAAGATGAACGGGCAGCCACAGGAAAACACTACAAGAACACTCCACCTACGATGGAC  
 ACAGATGGGAGTTACTTCTCTACAGCAAGCTCAATGTAAAGAAAAGAAACATGGCAGCAGGGAAAACACTTTCA  
 CGTGTCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGTCTCTCCCACTCTCCTGGTAAA  
 GGTACCTGA **CACCATCACCACCATCACCACCAC** GGGTGATCA AATCAACCTCTGGATTACAAAAT

- ŠEDÁ** sekvence Kozakové
- TYRKYSOVÁ** sekvence sekrečního signálu pro SEAP
- FIALOVÁ** sekvence těžkého řetězce protilátky
- TAG, TGA** stop kodony
- ZELENÁ** histidinová kotva
- TMAVĚ ŠEDÁ** začátek sekvence WPRE

Barevné značení restričních míst odpovídá značení v kapitole 9.2.

## 9.10 Sekvence pTW5Sec\_H2

TTATCGCCACC **ATGGGAGA**ACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCTTCAGCTGAGTCTTGAATT **AC**  
**CGGT**GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTATCTTGCAAAA  
 GTTTCTGGCGATACCATTACAGCATACTACTTGCACCTTGTGAGGCAAAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGA  
 TAGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAACTTCAAAAACAAGGCACATTCAGTGC  
 AGATGCATCCTCCAACACAGCCTACCTGAGGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACCTATTTTTGT  
 ACCACAGTGACTTTTTACTATAGCCGAGAACTACGCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTG  
 TCTCTCAGCTGAAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGAAGTCTCTCAAAAAGTAACTCCAT  
 GGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGACCTGGAAGTCTGGAGCCCTG  
 TCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGGACTCTACACTCTCACCAGCTCAGTACTGTAC  
 CCTCCAGCACCTGGTCCAGCCAGGCCGTACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAA  
 GAAAATTGTGCCAAGGGAATGCAATCCTTGTGGATGTACAGGCTCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCC  
 CCAAAGACCAAAGATGTGCTCACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTGTGGTAGACATTAGCCAGA  
 ATGATCCCGAGGTCCGGTTCAGCTGGTTTTATAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTCAGACTCATGCCCCGGA  
 GAAGCAGTCCAACAGCACTTACGCTCAGTCACTGAACTCCCCATCGTGCACCCGGGACTGGCTCAATGGCAAG  
 ACGTTCAAATGCAAAGTCAACAGTGGAGCATTCCCTGCCCCCATCGAGAAAAGCATCTCCAAACCCGAAGGCA  
 CACCACGAGGTCCACAGGTATACACCATGGCGCCTCCCAAGGAAGAGATGACCCAGAGTCAAGTCAGTATCAC  
 CTGCATGGTAAAAGGCTTCTATCCCCAGACATTTATACGGAGTGAAGATGAACGGGCAGCCACAGGAAAAC  
 TACAAGAACACTCCACCTACGATGGACACAGATGGGAGTTACTTCTCTACAGCAAGCTCAATGTAAAGAAA  
 AAACATGGCAGCAGGGAAAACACTTTCAGTGTCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAA  
 GAGTCTCTCCCACTCTCCTGGTAAA **GGTACC** **CACCATCACCACCATCACCACCAC** GGGTGATCA AATCAACCT  
 CTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTAT

- ŠEDÁ** sekvence Kozakové
- TYRKYSOVÁ** sekvence sekrečního signálu pro SEAP
- FIALOVÁ** sekvence těžkého řetězce protilátky
- ZELENÁ** histidinová kotva



TGA stop kodon

TMAVĚ ŠEDÁ začátek sekvence WPRE

Barevné značení restričních míst odpovídá značení v kapitole 9.2.

## 9.11 Sekvence relevantní části pTW5\_SEAP [63]

TGATATTCACCTGGCCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGG  
TGTCCACTCCCAGGTCCAA~~TTTTAAAC~~GGATCTCTAGCGAATTCGCCGCCACCATGGGAACCGGTCTGCTGCT  
GCTGCTGCTGCTGGGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCCAGTTGAGGAGGAGAACCCGGACTTC  
TGGAACCGCGAGGCAGCCGAGGCCCTGGGTGCCGCCAAGAAGCTGCAGCCTGCACAGACAGCCGCCAAGAACC  
TCATCATCTTCCCTGGGCGATGGGATGGGGGTGTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAAGGGCAGAAGAA  
GGACAAACTGGGCCCTGAGATACCCCCTGGCCATGGACCGCTTCCCATATGTGGCTCTGTCCAAGACATAACAAT  
GTAGACAAACATGTGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCACGGCCTACCTGTGCGGGGTCAAGGGCAACTTCCAGA  
CCATTGGCTTGAGTGACGCCGCCGCTTTAACAGTGCAACACGACACGCGCAACGAGGTCATCTCCGTGAT  
GAATCGGGCCAAGAAAGCAGGGAAGTCAGTGGGAGTGGTAACCACCACACGAGTGCAGCACGCCTCGCCAGCC  
GGCACCTACGCCACACGGTGAACCGCAACTGGTACTCGGACGCCGACGTGCCTGCCTCGGCCCGCCAGGAGG  
GGTGCCAGGACATCGCTACGCAGCTCATCTCCAACATGGACATTGACGTGATCCTAGGTGGAGGCCGAAAGTA  
CATGTTTCGCATGGGAACCCCAGACCCTGAGTACCCAGATGACTACAGCCAAGGTGGGACCAGGCTGGACGGG  
AAGAATCTGGTGCAGGAATGGCTGGCGAAGCGCCAGGGTGGCCGGTATGTGTGGAACCGCACTGAGCTCATGC  
AGGCTTCCCTGGACCCGTCTGTGACCCATCTCATGGGTCTCTTTGAGCCTGGAGACATGAAATACGAGATCCA  
CCGAGACTCCACACTGGACCCCTCCCTGATGGAGATGACAGAGGCTGCCCTGCGCCTGCTGAGCAGGAACCCC  
CGCGGCTTCTTCTCTTCGTGGAGGGTGGTGCATCGACCATGGTCATCATGAAAGCAGGGCTTACCGGGCAC  
TGACTGAGACGATCATGTTGACGACGCCATTGAGAGGGCGGGCCAGCTCACCAGCGAGGAGGACACGCTGAG  
CCTCGTCACTGCCGACCACTCCCACGTCTTCTCCTTCGGAGGCTACCCCTGCGAGGGAGCTCCATCTTCGGG  
CTGGCCCCCTGGCAAGGCCCGGGACAGGAAGGCCTACACGGTCTCTTACGGAAACGGTCCAGGCTATGTGC  
TCAAGGACGGCGCCCGGGCCGGATGTTACCGAGAGCGAGAGCGGGAGCCCCGAGTATCGGCAGCAGTCAGCAGT  
GCCCCCTGGACGAAGAGACCCACGCAGGCGAGGACGTGGCGGTGTTGCGCGCGGGCCCGCAGGGCGCACCTGGTT  
CACGGCGTGCAGGAGCAGACCTTCATAGCGCACGTTCATGGCCTTCGCCGCTGCCTGGAGCCCTACACCGCT  
GCGACCTGGCGCCCCCGGCCACCACCGACCGCGCACCCGGGTTACTCTAGAGTCGGGGCGGAAACGGA  
TCCTTGAGCCACCCGAGTTCGAGAAAACCGGTTCATCATCACCATCACCATCACCATGGAGGACAGTGAGGT  
ACCACCATCACCATCACCACCACGGGTGATCAAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGA  
CTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTAT  
TGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGG  
CCCCTTGTGACGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCC

ŠEDÁ sekvence Kozakové

ŽLUTÁ sekvence SEAP

ZELENÁ histidinová kotva

TGA stop kodon

TMAVĚ ŠEDÁ začátek sekvence WPRE

Barevné značení restričních míst odpovídá značení v kapitole 9.2. Podtržením jsou zvýrazněny příslušné primery pro PCR reakce (viz kapitola 3.6).

## 9.12 Sekvence relevantní části pTT28\_C1

TGATATTCACCTGGCCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGG  
TGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTATCGCCACCATGGGAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCT  
TCAGCTGAGTCTTGAATTACCGGTGTAAAAATGACACCACAGATCTCAACCATAAAATACCTACGCTGCTTGC  
CCGAGAAACTGGATTGGAGTTGGAAATAAATGTTTTTATTTTTCTGAATATGCAAGTAACTGGACATTGAGCC  
AGACCTTCTGCAAGGCACAAGAGGCCGAGCTAGCACGATTTGACACCGAGGAGGAGCTGAATTTCTTAAGCAG  
ATACAAAGGGAGTTTTGATTACTGGATCGGCCTGCACAGAGAGTCCTCAGAGCACCCCTTGGAAAGTGGACAGAC  
AACACTCAGTATAACTACTCGCTTTCCATCCGGGGAGTGGAAAGATATGCCTACCTGAACGACATCGGGATCA  
GCAGTGCCAGGGTCTATGCAGACAAAAGATGGAGCTGTAGCAGACTTAACAGCTATAGCCTCCAATGCAAAAC  
TCCTTTTTCTCCTATGGTACCAAGCACCATCACCACCATCACCACCACGGGTGATCAAGATCCCCCGACCTC  
GACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGA  
AGGACATA

ŠEDÁ

sekvence Kozakové

TYRKYSOVÁ

sekvence sekrečního signálu pro SEAP

ČERVENÁ

inzert C1

ZELENÁ

histidinová kotva

TGA

stop kodon

Barevné značení restričních míst odpovídá značení v kapitole 9.2. Podtržením jsou zvýrazněny příslušné primery pro PCR reakce (viz kapitola 3.6).

