

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: biochemie

Studijní obor: biochemie



Tereza Prokopová

**Produkce a purifikace rekombinantního receptoru Clrb**

**Production and purification of recombinant receptor Clrb**

Bakalářská práce

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

Praha 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. a všechny informační zdroje jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis:.....

# Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali během práce na této bakalářské práci. Největší dík patří vedoucímu mé práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. a Mgr. Janu Bláhovi, kteří byli vždy ochotni zodpovědět mi dotazy týkající se mé práce a vše mi detailně vysvětlili. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Štěpánce Hrdé za sekvenaci plasmidu a v neposlední řadě celému osazenstvu laboratoře 204 za příjemné pracovní prostředí a ochotu kdykoli pomoci. Práce vznikla za finanční podpory z projektů GA ČR 15-15181S, UNCE 204025/2012, SVV 260079/2014 a s využitím evropských projektů pro strukturní biologii BioStruct-X a Instruct.

# Abstrakt

Přirozeně cytotoxické buňky hrají zásadní roli v nespecifické imunitě. I bez antigenně specifických receptorů na svém povrchu jsou schopny výkonné obranyschopnosti. Rozeznávají jak „cizí“, tak tělu vlastní molekuly, respektive absenci tělu vlastních molekul, konkrétně MHC glykoproteinů I. třídy, na površích cílových buněk. Jsou schopny rozeznat virem napadené a nádorové buňky v organismu. Pokud dojde ke kontaktu s buňkou nesoucí abnormálně málo MHC glykoproteinů I. třídy, je to pro přirozenou zabíječskou buňku („natural killer cell“, NK) signál, že tato buňka je například napadená virem. I bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci NK buňka spouští apoptózu cílové buňky. Je také schopna spustit zánětlivé reakce produkcí chemokinů a cytokinů. Výsledná reakce je vždy souhrou aktivačních a inhibičních signálů, které buňka přijímá ze svého okolí. Nejnovější výzkumy ukazují, že cílená modulace NK buněk vede ke zmírnění komplikací při transplantaci kostní dřeně. Zároveň mají potenciál v imunoterapiích, např. při léčbě autoimunitních onemocnění. Z tohoto důvodu jsou NK buňky velmi studovanou skupinou buněk. Tato práce se zabývá produkcí Clrb („C-type-lectin-related protein b“). Tento protein je ligandem pro inhibiční receptor potkaních NK buněk NKR-P1B. Pokud napadená buňka na svém povrchu exprimuje Clrb, je schopna uniknout imunitní odpovědi. Vektor pro Clrb byl připraven rekombinantním způsobem. Produkce proteinu proběhla v lidských embryonálních buňkách č. 293 s jednoduchou glykosylací (HEK293S GnTI<sup>-</sup>). Produkce proteinu v monomerní formě byla ověřena metodou SDS-PAGE, dále byl protein charakterizován pomocí analytické ultracentrifugace a proteinové krystalizace.

## Klíčová slova

rekombinantní exprese, tranzientní transfekce, HEK293S GnTI<sup>-</sup>, NK buňky, receptor, Clrb

# Abstract

The Natural Killer (NK) cells play a vital role in the nonspecific immunity. They are capable of efficient immunity reaction without any antigen specific receptors on their surface. NK cells recognize non-self molecules and they also recognize their molecules serving as health markers, and absence of these molecules such as MHC glycoproteins on the target cell surface. The NK cells are able to recognize viral infection or tumor transformation in the organism. If natural killer cell is in contact with a cell carrying an abnormally low MHC class I glycoproteins, it will create a signal which informs the cell is infected with a virus. NK cells trigger apoptosis of the target cell without prior stimulation, proliferation and differentiation. They also promote inflammatory responses by the production of chemokines and cytokines. The response is always the interplay of activating and inhibitory signals that the cell receives from its surroundings. The latest research shows that the targeted modulation of NK cells leads to less complications in bone marrow transplantation. They can be potentially used in immunotherapy, e.g. in the treatment of autoimmune diseases. Therefore, NK cells are a highly-studied group of cells. This thesis is focused on a production of Clrb („C-type-lectin-related protein b“). This protein is a ligand of a rat inhibitory NK cellular receptor NKR-P1B. If the cell expresses Clrb on its surface, it won't be destroyed. Vector for Clrb was prepared by recombinant cloning. We produced the protein in a human embryonic kidney 293 cells with simple glycosylation (HEK293S GnTI<sup>-</sup>). Production of a monomeric form was verified by SDS-PAGE. Protein was also characterized by analytical ultracentrifugation and crystallization.

(In Czech)

## Key words

recombinant expression, transient transfection, HEK293S GnTI<sup>-</sup>, NK cells, receptor, Clrb

# Obsah

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <u>1.</u> | <u>TEORETICKÝ ÚVOD</u>  | <u>11</u> |
| 1.1.      | Imunitní systém.  | 11        |
| 1.1.1.    | Buňky imunitního systému  | 12        |
| 1.2.      | NK buňky  | 14        |
| 1.2.1.    | Objev NK buněk  | 14        |
| 1.2.2.    | Obecná charakterizace NK buněk                                    | 15        |
| 1.2.3.    | Geny NK receptorů   | 16        |
| 1.2.4.    | Signalizace a aktivace NK buněk                                   | 16        |
| 1.2.5.    | Cytotoxicita NK buněk   | 18        |
| 1.2.6.    | Receptory NK buněk  | 19        |
| 1.2.6.1.  | Receptory C-lektinového typu                                      | 20        |
| 1.2.6.2.  | Inhibiční komplex NKR-P1B:Clrbb                                   | 20        |
| <u>2.</u> | <u>CÍLE PRÁCE</u>   | <u>22</u> |
| <u>3.</u> | <u>MATERIÁL</u>   | <u>23</u> |
| 3.1       | Pomůcky a přístroje   | 23        |
| 3.2.      | Chemikálie  | 25        |
| 3.3.      | Enzymy  | 26        |
| 3.4.      | Pufry pro enzymy  | 27        |
| 3.5.      | Bakteriální kmeny a buněčné linie                                 | 27        |
| 3.6.      | Plasmidy  | 27        |
| 3.7.      | Oligonukleotidy   | 27        |
| 3.8.      | Roztoky a média   | 27        |
| <u>4.</u> | <u>METODY</u>   | <u>30</u> |
| 4.1.      | Příprava vektoru pTW5_sec_C2                                      | 30        |
| 4.1.1.    | Amplifikace insertu konstruktů C2 pomocí PCR                      | 30        |
| 4.1.2.    | Restrikce plasmidu  | 31        |
| 4.1.3.    | Agarosová elektroforesa   | 31        |
| 4.1.4.    | Izolace DNA z gelu  | 31        |
| 4.1.5.    | Restrikce insertu   | 32        |
| 4.1.6.    | Ligace insertu do vektoru   | 33        |
| 4.2.      | Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i> tepelným šokem | 33        |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 4.3.    | PCR z kolonií _____                                  | 34 |
| 4.4.    | Minipreparace plasmidové DNA_____                    | 35 |
| 4.5.    | Sekvenace vektoru_____                               | 36 |
| 4.6.    | Transformace bakterií_____                           | 36 |
| 4.7.    | Příprava zásobního množství plasmidové DNA_____      | 36 |
| 4.7.1.  | Kultivace bakterií_____                              | 36 |
| 4.7.2.  | Izolace plasmidu z buněčné suspenze_____             | 37 |
| 4.8.    | Produkce rClrb v buněčné linii HEK293S_____          | 37 |
| 4.8.1.  | Určení buněčné hustoty a viability buněk_____        | 37 |
| 4.8.2.  | Vysokohustotní transfekce HEK293S buněčné linie_____ | 38 |
| 4.8.3.  | Sklizení transfekovaných buněk_____                  | 39 |
| 4.9.    | Purifikace proteinu_____                             | 39 |
| 4.9.1.  | Afinitní chromatografie_____                         | 39 |
| 4.9.2.  | Zkoncentrování proteinu_____                         | 39 |
| 4.9.3.  | Gelová permeační chromatografie_____                 | 40 |
| 4.10.   | Charakterizace proteinu_____                         | 40 |
| 4.10.1. | Měření koncentrace proteinu_____                     | 40 |
| 4.10.2. | SDS-PAGE_____  | 40 |
| 4.10.3. | Deglykosylace proteinu_____                          | 41 |
| 4.10.4. | Sedimentační analýza_____                            | 42 |
| 4.10.5. | Krystalizace proteinu_____                           | 42 |
| 5.      | <b>VÝSLEDKY</b> _____                                | 43 |
| 5.1.    | Příprava vektoru_____                                | 43 |
| 5.2.    | Produkce proteinu_____                               | 47 |
| 5.3.    | Charakterizace proteinu_____                         | 47 |
| 6.      | <b>DISKUSE</b> _____                                 | 52 |
| 7.      | <b>ZÁVĚR</b> _____                                   | 54 |
| 8.      | <b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b> _____              | 55 |

## Seznam zkratek

|           |  |
|-----------|--|
| AA        | akrylamid  |
| ADCC      | buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách („antibody dependent cellular cytotoxicity“)      |
| Amp       | ampicilin  |
| APS       | peroxosíran amonný („ammonium persulfate“)   |
| BSA       | hovězí sérový albumin („bovine serum albumin“)   |
| CBB R-250 | barva Coomassie Brilliant Blue R-250   |
| CD        | označení povrchových molekul leukocytu („cluster of differentiation“)                          |
| Clrb      | protein obsahující podobný motiv jako lektiny C-typu („C-type lectin related protein b“)       |
| DAP10     | adaptorová molekula nesoucí imunoglobulinový signalizační motiv odvozený od tyrosinu           |
| DAP12     | adaptorová molekula nesoucí imunoglobulinový inhibiční motiv odvozený od tyrosinu              |
| DMSO      | dimethylsulfoxid   |
| dNTPs     | deoxynukleotidtrifosfáty   |
| DTT       | dithiotreitol  |
| EDTA      | kyselina ethylendiamintetraoctová  |
| ExCELL293 | komerční kultivační médium   |
| Fc        | část molekuly protilátky („Fragment crystallizable“)   |
| F17       | komerční kultivační médium   |
| HEK293    | lidské embryonální ledvinné buňky číslo 293 („human embryonic kidney 293“)                     |
| HEPES     | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina  |
| HPLC      | vysokoúčinná kapalinová chromatografie („high-performance liquid chromatography“)              |
| IFN       | interferon   |
| Ig        | imunoglobulin  |
| ITAM      | imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) |
| ITIM      | imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv („immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif“) |
| kb        | kilobáze   |



|                |   |
|----------------|---|
| KIR            | zabíječské receptory imunoglobulinové povahy („killer-cell immunoglobulin-like receptors“)                            |
| LB             | Luria-Bertani médium  |
| LB Amp         | Luria-Bertani médium s ampicilinem (100 µg.ml <sup>-1</sup> )   |
| IPEI           | lineární polyethylenimin  |
| MCMV           | myší cytomegalovirus  |
| MES            | 2-(N-morpholino)-ethansulfonová kyselina  |
| MHC gp I       | glykoproteiny třídy I hlavního histokompatibilního komplexu („major histocompatibility complex type I glycoproteins“) |
| NK             | přirozený zabíječ („natural killer“)  |
| NKC            | NK genový komplex („natural killer gene complex“)   |
| NKR-P1B        | rodina C-lektinových receptorů NK buněk („natural killer cell receptor - protein 1B“)                                 |
| NKT            | přirozeně cytotoxické T-lymfocyty („natural killer T cells“)  |
| Ocil           | lektin inhibující formaci osteoklastu („Osteoclast inhibitory lectin“)  |
| PCR            | polymerasová řetězová reakce  |
| pb             | pár bází  |
| PBS            | fosfátem pufovaný fyziologický roztok („phosphate buffered saline“)   |
| rClrb          | potkaní protein obsahující podobný motiv jako lektiny C-typu („rat C-type lectin related protein b“)                  |
| RCMV           | potkaní cytomegalovirus („rat cytomegalovirus“)   |
| RCTL           | protein potkaního cytomegaloviru podobný lektinům C-typu („RCMV C-type lectin-like“)                                  |
| SDS            | dodecylsulfát sodný („sodium dodecyl sulphate“)   |
| PAGE           | polyakrylamidová gelová elektroforesa („polyacrylamide gel electrophoresis“)  |
| TAE            | tris-acetátový pufr s EDTA  |
| TBS            | Tris pufovaný fyziologický roztok („Tris-buffered saline“)  |
| T <sub>c</sub> | cytotoxický T-lymfocyt („T cytotoxic cell“)   |
| TCR            | T-buněčný receptor („T-cell receptor“)  |
| TEMED          | NNN'N'-tetramethylethyldiamin   |
| TES pufr       | Tris pufovaný fyziologický roztok s EDTA („Tris-buffered EDTA saline“)  |
| TK             | tkáňové kultury   |

|       |  |
|-------|--|
| TNF   | faktor nádorové nekrózy („tumor necrosis factor“)                      |
| TRAIL | receptor indukující apoptosu („TNF-related apoptosis-inducing ligand“) |
| Tris  | tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                       |
| ZAP70 | protein-kinasa 70 („Zeta-chain-associated protein kinase 70“)          |
| (v/v) | objem/objem („volume/volume“)  |
| (w/v) | hmotnost/objem („weight/volume“)                                       |

# 1. Teoretický úvod

## 1.1. IMUNITNÍ SYSTÉM

Dobře fungující, bezchybně rozlišující imunitní systém je fundamentální pro naše přežití. Spolu s termoregulací patří k základním homeostatickým mechanismům. Zjednodušeně se dá říct, že hlavní funkcí imunitního systému je rozpoznat, co je pro tělo vlastní a co cizí (škodlivé) a následně tyto cizí látky z těla eliminovat, či neutralizovat. Tuto funkci imunitního systému můžeme rozdělit do třech podkategorií:

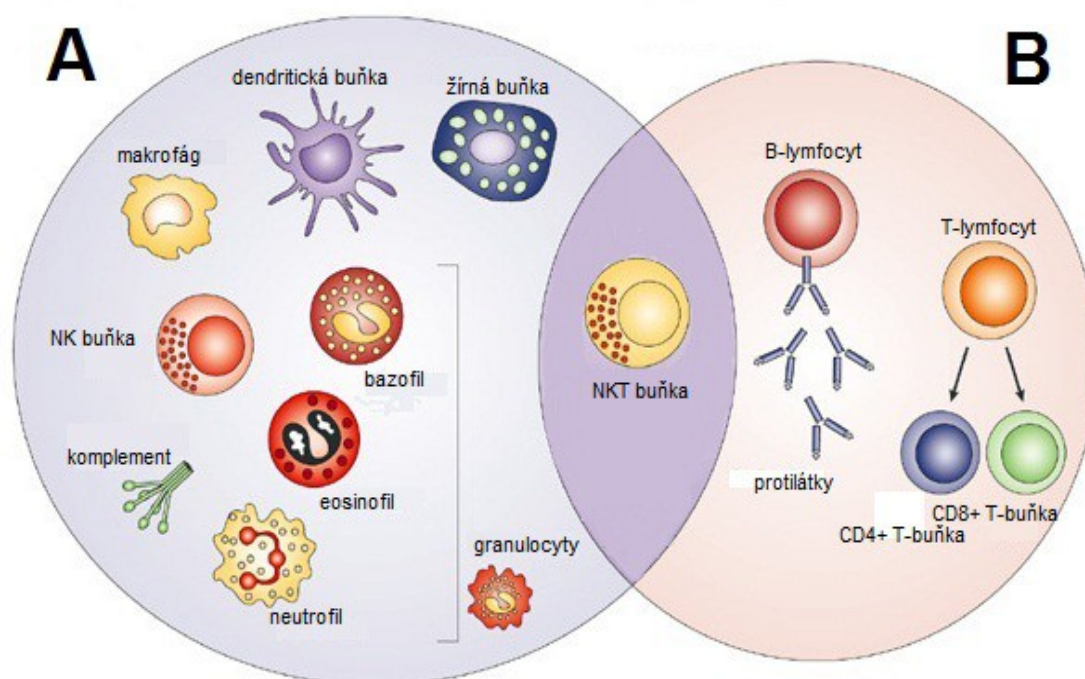
- obranyschopnost - rozpoznání škodlivin, ochrana před patogeny a jejich toxiny
- autotolerance - tolerance vlastních tkání
- imunitní dohled - odstranění vlastních starých nebo poškozených buněk

Dále můžeme imunitní systém rozdělit z hlediska mechanismu zásahu. A to na vývojově starší větev imunity nespecifické, čili vrozené a na imunitu specifickou, adaptivní. Nespecifická imunita je vlastní všem mnohobuněčným organismům. Je založena na fagocytujících buňkách, přirozeně cytotoxických buňkách („natural killer cells“, NKC). Humorální složkou nespecifické imunity je komplementový systém, lektiny, interferony a další sérové proteiny.

Specifická imunita má opět svou humorální část - protilátky a buněčnou část - založenou na B-lymfocytech a T-lymfocytech. Hlavním rysem imunity specifické je její schopnost „učit se“. Hovoříme o takzvané imunologické paměti. Imunologická paměť vzniká při styku lymfocytu B nebo lymfocytu T s antigenem, tyto buňky se pak diferencují v tzv. paměťové buňky, které se při dalším setkání se stejným antigenem mohou, často i po několika letech, rychle aktivovat a účinně zasáhnout [1].

Průnikem specifické a nespecifické imunity jsou přirozeně cytotoxické T-lymfocyty („natural killer T-cells“, NKT), viz obrázek č. 1 na straně 12. Tento termín byl poprvé použit roku 1995, jako charakterizace podmožiny myších T-lymfocytů, které sdílely některé charakteristiky s NK buňkami, zvláště pak expresi NK 1.1 antigenu. S dalšími výzkumy na tomto poli je jasné, že charakterizovat všechny NKT buňky, jako struktury exprimující NK 1.1 antigen je zavádějící. Existuje totiž mnoho myších linií, jejichž NKT buňky tento znak neexprimují [2]. Další strukturou, kterou NKT buňky exprimují, je například T-buněčný receptor („T-Cell Receptor“, TCR), což je specifický receptor T-lymfocytů. Ty však místo MHC glykoproteinů I. a II. třídy, rozpoznávají na povrchích cílových buněk antigeny

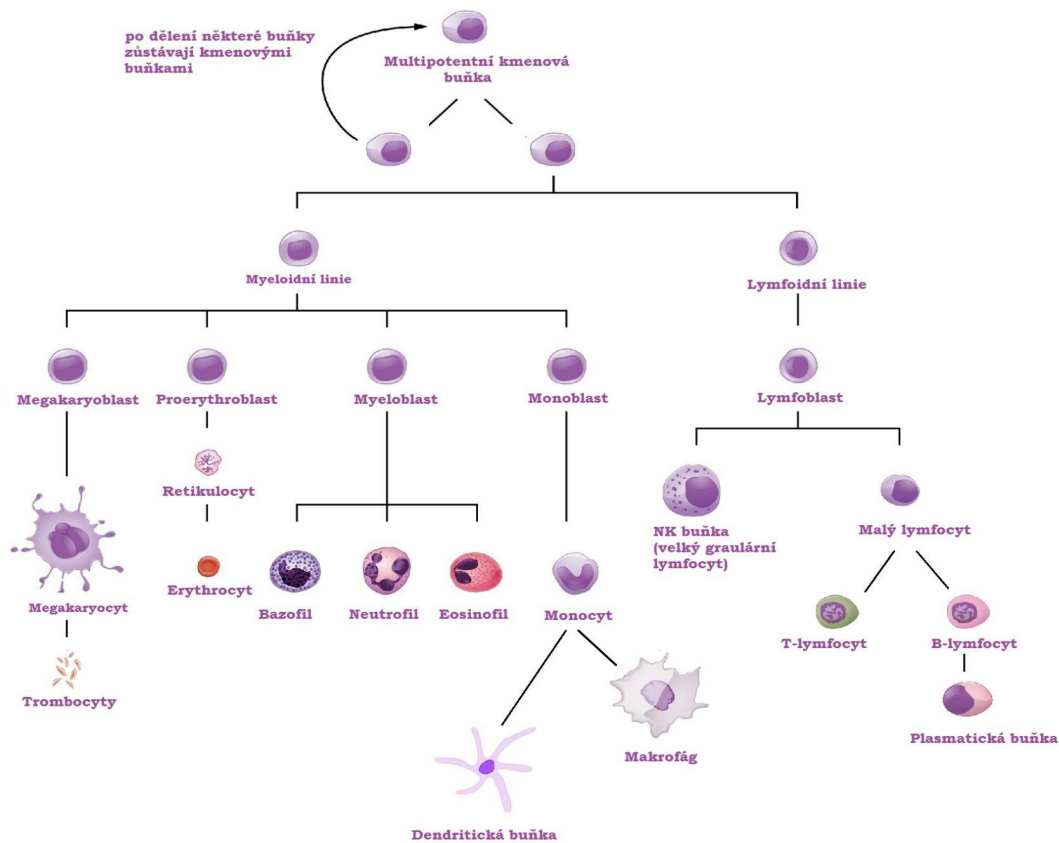
(glykolipidové nebo lipidové), navázané na receptor CD1d, což je glykoprotein příbuzný MHC glykoproteinům I. třídy [3].



**Obrázek č. 1** - Buňky specifické a nespecifické imunity. **Množina A** zobrazuje buňky vrozené imunity, schopné rychlé reakce. **Množina B** pak zobrazuje adaptivní imunitu, jejíž reakce není tak okamžitá. Průnikem těchto dvou množin jsou NKT buňky, které jsou přechodem mezi NK buňkami a T-lymfocyty (převzato a upraveno dle [4]).

### 1.1.1. Buňky imunitního systému

Jak ilustruje obrázek č. 2 na straně 13, všechny buňky imunitního systému se diferencují z jednoho typu buněk, a to z pluripotentních kmenových buněk. Ty vznikají v kostní dřeni. Dozrávají pak v primárních nebo sekundárních lymfatických orgánech. Nově vznikající buňky dělíme do dvou linií - myeloidní a lymfoidní.



**Obrázek č. 2** - Diferenciace jednotlivých typů buněk imunitního systému (převzato a upraveno dle [5]).

Z myeloidní linie se dále diferencuje megakaryoblast, který je velký cca 20-30  $\mu\text{m}$ , jeho dozráním v kostní dřeni vzniká megakaryocyt o velikosti cca 20-90  $\mu\text{m}$ . Fragmentací jednoho megakaryocyty vzniká až na 4000 krevních destiček [6]. Proerythroblast se diferencuje přes retikulocyt až na erythrocyt o velikosti cca 7  $\mu\text{m}$ . Z myeloblastu se diferencují tři druhy buněk - eozinofily, bazofily a neutrofil. Tkáňovou podobou bazofilů jsou žírné buňky, neboli mastocyty. Dalším typem diferenciací buněk myeloidní linie jsou monoblasty, které dozrávají v monocyty, ze kterých se následně odštěpují dvě linie buněk, makrofágy a dendritické buňky.

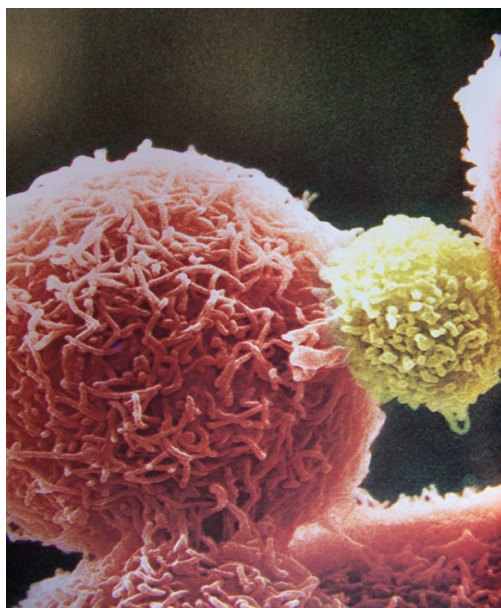
Co se týče lymfoidní linie buněk, zde jsou nejdůležitější složkou NK buňky, T-lymfocyty a B-lymfocyty [1].

## 1.2. NK BUŇKY

### 1.2.1. Objev NK buněk

Před rokem 1970 byly lymfocyty klasifikovány do dvou tříd, buď jako T nebo B lymfocyty. S objevem T-buněčného antigenu Thy-1 (jinak také CD90, z anglického „cluster of differetation 90“) byly lymfocyty indukované po předchozí aloimunizaci (imunizaci buňkami jiného jedince, například průnikem protilátek přes placentu do plodu) zařazeny do třídy T-lymfocytů. Po zjištění, že neimunizované lymfocyty mohou zničit protilátkou značené napadené buňky, se zvýšil zájem o studium těchto efektorových buněk.

V roce 1973 byl v laboratoři Ivana Roitta objeven nový druh buněk schopných zabíjení, pracovně nazvané jako „null“ lymfocyty, které nezapadaly ani do třídy T-lymfocytů, ani do třídy B-lymfocytů. Následující rok byl ve spolupráci s Johnem Playfairem rozpoznán neobvyklý typ spontánní cytotoxicity, kdy „null“ buňky byly schopny usmrtit cílovou buňku bez předchozí imunizace a bez označení protilátkami [7]. Ačkoli byly funkční vlastnosti těchto buněk známé již od 70. let, neexistoval zatím žádný molekulární znak pro jejich identifikaci [8].



**Obrázek č. 3** - NK buňka vážící se na nádorové buňky. NK buňka je znázorněna žlutě (převzato a upraveno dle [10]).

Roku 1975 Rolf Keissling se svými kolegy ve Švédsku popsal podobnou přirozenou cytotoxicitu. Svým pokusem demonstroval, že lymfocyty izolované z neočkované myši, respektive ze sleziny této myši, měly schopnost usmrtit nádorové buňky. A to jak vlastní, tak vložené. Keissling pojmenoval tyto výkonné buňky „natural killer cells“ (NKC, přirozeně cytotoxické buňky) [9], viz obrázek č. 3.

## 1.2.2. Obecná charakterizace NK buněk

NK buňky známé také jako velké granulární lymfocyty, mají schopnost rozpoznávat povrchové změny, kterými se odlišují nádorové a virem infikované buňky od zdravých. NK buňky využívají jiný rozpoznávací systém než cytotoxické T-lymfocyty. Hlavním důvodem proč jsou tak studovány, je fakt, že viry a některé bakterie se množí velice rychle a mají tak potenciál přemoci jedince ještě než adaptivní imunitní systém začne plně fungovat, což trvá až několik dní. Během této doby jsou právě NK buňky ve spolupráci s interferony důležité ke zpomalení šíření infekce. Interferony fungují jako antivirové proteiny limitující schopnost viru množit se v buňce. NK buňky mají kapacitu rozpoznat a zabít virem infikované nebo jinak stresované buňky [11].

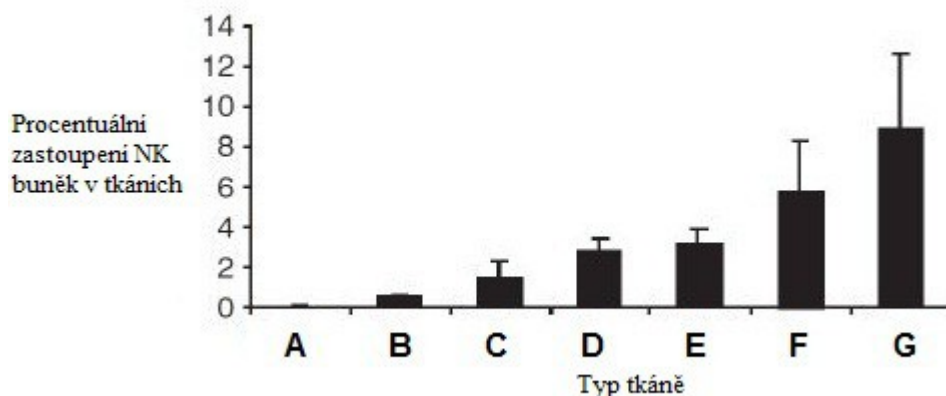
NK buňky tvoří cca 15% krevních lymfocytů, jsou odvozeny od kostní dřeně, morfologicky mají vzhled velkých granulárních lymfocytů. Funkční NK buňky nacházíme ve slezině, dále v lymfatických uzlinách, kde se nachází nezralé NK buňky (distribuci NK buněk v tkáních myši popisuje obrázek č. 4 na straně 16) [11, 12]. Jak již bylo zmíněno, normálně se NK buňky vyskytují v místě svého vzniku - v kostní dřeni, dále ve slezině a periferní krvi. Při zánětu jsou však chemicky atrahovány do místa tohoto zánětu [11]. NK buňky nacházející se v lymfatických uzlinách a thymu jsou fenotypově odlišné od NK buněk pocházejících z kostní dřeně. Dosud nebyla vyloučena alternativa, že se jedná pouze o buňky pocházející z kostní dřeně, které byly dopraveny do orgánu cirkulující krví [14].

Většina povrchových antigenů rozeznávaných na povrchu NK buněk je společná T-lymfocytům a monocytům/makrofágům. Dle specifických znaků byly objeveny 4 typy NK buněk:

- CD16<sup>+</sup> a CD56<sup>dim</sup> nacházející se v periferní krvi
- CD16<sup>-</sup> a CD<sup>bright</sup>, které jsou přednostně přijímány do tkání díky své expresi L-selektinu [15]
- mukosní NK produkující IL-22 [16]
- děložní NK buňky, které podporují vaskularizaci v časném těhotenství [17]

Pro charakterizaci NK buněk v lymfocytické linii se používají protilátky proti antigenu CD16. CD16 můžeme také najít na povrchu neutrofilů, některých makrofágů a některých T-lymfocytů. CD16 je na NK buňkách exprimován v transmembránové podobě, na rozdíl například od granulocytů, které připojují CD16 molekuly na svůj povrch pomocí glykoinositol fosfolipidové kotvy. Přítomnost znaků CD16, CD56 a

absence receptoru CD3 jasně ukazuje na fenotyp NK buněk [11].



**Obrázek č. 4** - Distribuce NK buněk v tkáních myši. Osa y představuje procentuální zastoupení NK buněk v dané tkáni vzhledem k celkovému zastoupení lymfocytů. Na ose x jsou vyneseny dané orgány a to v pořadí: **A** - brzlík, **B** - lymfocytární uzliny, **C** - kostní dřev, **D** - slezina, **E** - periferní krev, **F** - játra a **G** - plíce (převzato a upraveno dle [13]).

### 1.2.3. Geny NK receptorů

Zásadní pro NK buňky je velká míra rezistence proti virovým infekcím, které je docíleno vysokou mírou polymorfismu genů kódujících receptory NK buněk. Tyto geny můžeme rozdělit na aktivační a inhibiční. Jsou v genomu uloženy jednak v genomovém komplexu pro receptory leukocytů („leukocyte receptor complex“, LRC), který se u člověka nachází na chromosomu 19q13.4, u myši pak na chromosomu 7. Další lokací genů je NK genový komplex („natural killer receptor gene complex“, NKC), který u člověka najdeme na chromosomu 12p13 a u myši na chromosomu 6. Receptory kódované v LRC spadají do imunoglobulinové rodiny, receptory kódované NKC patří do rodiny receptorů podobných lektinům C-typu [18].

### 1.2.4. Signalizace a aktivace NK buněk

NK buňky zabezpečují časnou odezvu proti extracelulárním patogenům (proti parazitu nebo viru) a ochranu proti spontánním nádorům. Tato odpověď není pouze cytotoxická, čímž je myšleno cílené vylití cytotoxických granulí na povrch cílové buňky, ale také produkují



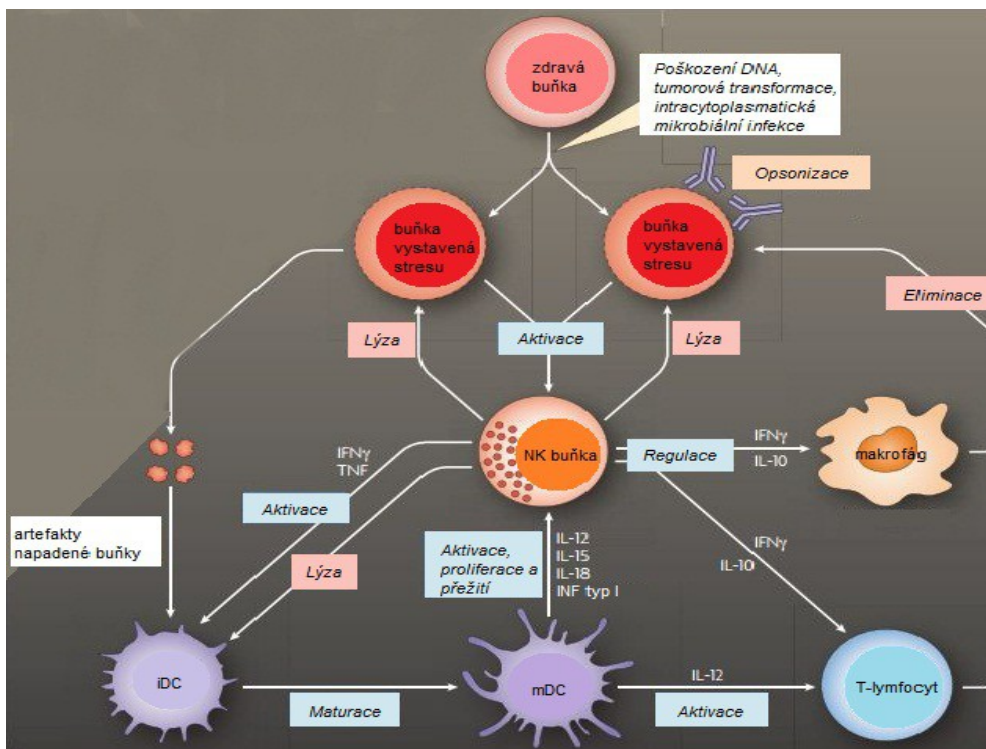
cytokiny a chemokiny. Při sledování zneškodnění nádoru NK buňkami se ukázalo, že NK buňky nereagují pouze přes perforinovou reakční cestu, ale také expresí Fas ligandu a expresí receptoru indukujícího apoptosu („Tumor necrosis factor- related apoptosis inducing ligand“, TRAIL) [19].

Ačkoli se NK řadí do komponent vrozené imunity, sdílí některé motivy společně s buňkami řadící se do adaptivní imunity. Jsou zapojeny do celého imunitního systému, například přes regulaci dendritických buněk („dendritic cell“, DC), makrofágů a dalších buněčných typů [11].

NK buňky mohou zahájit Th1 („T- helper type I“) buněčnou odpověď T-lymfocytů díky své schopnosti aktivovat DC a také díky schopnosti produkovat interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Velmi důležitým procesem je takzvaný „priming“, díky kterému se NK buňky stávají citlivé k podnětům. Priming zahrnuje specifické interakce s dalšími buněčnými typy, jako například s DC.

Aktivace NK buněk je vysoce regulovaný proces, viz obrázek č. 5 na straně 18. Díky aktivaci se NK buňky mohou vázat na zacílenou buňku a reagovat zde svými aktivačními nebo inhibičními receptory s příslušnými ligandy přítomnými na povrchu cílové buňky. Pokud aktivační signály převáží nad inhibičními, dojde k polarizaci sekrečních cytotoxických granulí a jejich následnému vylití proti cílové buňce [19].

NK buňky na rozdíl od T a B lymfocytů nemají pouze jeden aktivační receptor, který by řídil jejich aktivaci, namísto toho mají celou řadu receptorů, které mohou regulovat jejich buněčnou odpověď. Tyto receptory rozpoznávají poškozené buňky a dovolují NK buňkám jejich zničení. Zajímavé je, že čerstvě izolované klidové NK buňky je možno aktivovat spuštěním dvou a více aktivačních receptorů. Výjimku tvoří nízkoafinitní Fc receptor Fc  $\gamma$ RIIIa (neboli CD16), jehož stimulace sama o sobě stačí k aktivaci klidových NK buněk [21].



**Obrázek č. 5 - Procesy indukované NK buňkou.** NK buňky rozeznávají různé buňky vystavené stresu, které mohou nebo nemusí být opsonizovány protilátkami. NK aktivace spuštěná tímto rozpoznávacím procesem vede k cílené buněčné lyzi, stejně tak jako k produkci různorodých cytokinů a chemokinů. NK buňky jsou schopny různých typů komunikace s dendritickými buňkami (DC), včetně zahubení nezralých dendritických buněk (iDC). Pomocí interferonu  $\gamma$  ( $INF \gamma$ ) produkovaného NK buňkou, popř. TNF jsou DC schopny podstoupit diferenciaci. Těmito biologickými aktivitami se NK buňky účastní modulače imunitní odpovědi (převzato a upraveno dle [20]).

### 1.2.5. Cytotoxicita NK buněk

Cytotoxické T-lymfocyty (CTL) a NK buňky používají různé mechanismy odstranění poškozených buněk. Buď přímou signalizací zprostředkovanou přes povrchové struktury, nebo nepřímo přes cytokiny. Jak CTL, tak NK buňky obsahují granula s proteiny, které poškozují napadenou buňku, pokud jsou vylity přímo na povrch napadené buňky. Ačkoli CTL a NK rozlišují napadené buňky rozdílně, mechanismus zničení je stejný, takzvaný „polibek smrti“. Principem je shluknutí lytických granulí v místě kontaktu NK nebo CTL buňky a napadené buňky a následné vytvoření imunologické synapse. Lytická granula obsahují póry formující protein perforin a také enzymy asociované s granuly: granzymy, které jsou sekretovány po rozpoznání cílové buňky. Perforin je monomerní protein schopný polymerizace a tvorby pórů napříč membránou cílové buňky. Tento proces se uplatňuje až v konečné fázi, ve fázi lyzy napadené buňky.

NK buňka se může bránit například již zmíněné virové infekci produkcí perforinu. Ten je inaktivní, pokud se vyskytuje v granulech. Podléhá konformační aktivaci, která je závislá

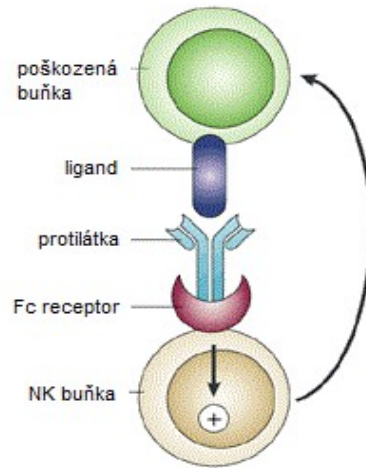
na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Perforin je schopen formovat homopolymery začleňující se do membrány napadené buňky tak, že tvoří cirkulární póry o velikosti v průměru přibližně 16 nm. Další ochranou je produkce interferonu  $\gamma$ , ten aktivuje makrofágy a napomáhá diferenciaci Th1 buněk, které také aktivují makrofágy [11].

### 1.2.6. Receptory NK buněk

NK buňky mají receptory, které rozpoznávají MHC gp I na cílové buňce a pokud se tomu tak stane, inhibují svou cytotoxickou reakci. Používají řadu receptorů pro identifikaci napadených buněk jako například CD2, CD69 nebo protilátky navázané na jejich Fc receptor (CD16), který váže protilátky navázané na cílové buňce a zprostředkovává buněčnou cytotoxickou reakci („Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity“, ADCC), u které Fc receptor na NK buňce rozpozná napadenou buňku cestou specifických protilátek [9]. Mechanismus reakcí NK buněk popisuje obrázek č. 6 na následující straně.

V prvních fázích výzkumu byly popsány 2 typy molekul. Byly nazvány souhrnně inhibiční receptory NK buněk („Killer Inhibitory Receptors“, KIR). Jedna skupina byla identifikována jako membránové glykoproteiny s doménou C-lektinového typu,  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní. Další skupinou byla imunoglobulinová rodina. Následně se však přišlo na to, že v každé skupině jsou zastoupeny jak aktivační, tak inhibiční receptory, takže nebylo korektní obě skupiny nazývat inhibičními receptory. V dnešní době dělíme receptory NK buněk do skupin podle struktury (imunoglobulinové a podobné lektinům C-typu) a podle funkce (aktivační, inhibiční, adhezivní, cytokinové, chemokinové typy) [11].

KIR i lektinové receptory se mohou vyskytovat v aktivační nebo inhibiční formě. Klíčovým rozdílem je přítomnost imunoreceptorového tyrosinového inhibičního motivu („immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs“, ITIM). Pokud je ITIM fosforylován, celková aktivita NK buněk se sníží. Na druhé straně KIR, kterým chybí ITIM, mohou asociovat s molekulou DAP12 (adaptorová molekula nesoucí imunoglobulinový inhibiční motiv odvozený od tyrosinu), která je odvozena od řetězce TCR komplexu. DAP12 obsahuje ITAM („immunoreceptor tyrosine activation motifs“), které mu umožňují fosforylovat a zvyšovat koncentraci protein tyrosin kinas, včetně kinasy ZAP-70 což vede k buněčné aktivaci [11].



**Obrázek č. 6** - Průběh buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách („Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity“, ADCC). Při této reakci převládá aktivační signály v NK buňce, která následně poškozenou buňku zabije (převzato a upraveno dle [22]).

### **1.2.5.1. Receptory C-lektinového typu**

Receptory C-lektinového typu („C-type lectin receptors“, CTLR) byly zařazeny do V. třídy uvnitř multifonní oblasti lektinů C-typu. Tato skupina zahrnuje atypické lektiny C-typu, které ztratily svou schopnost vázat sacharidy komplexací s  $Ca^{2+}$  ionty. Namísto toho interagují s proteiny jako se svými přirozenými ligandy. Tyto atypické lektiny řadíme mezi transmembránové glykoproteiny II. typu. Obsahují aminoterminální cytoplasmatickou doménu následovanou transmembránovou doménou s „krčkem“ a extracelulární doménou podobnou lektinu C-typu („C type lectin-like domain“, CTLD). CTLD doména se skládá ze dvou  $\alpha$  helixů a dvou antiparalelních  $\beta$  skládaných listů, které dohromady tvoří kompaktní strukturu stabilizovanou dvěma, častěji však třemi disulfidickými můstky. Dalším typickým motivem je takzvaný „WIGL“ motiv (W-tryptofan, I-isoleucin, G-glycin, L-leucin), což je úsek složený ze tří hydrofobních aminokyselin formující jádro CTLD.

Receptory C-lektinového typu obvykle formují homo- nebo heterodimery spojené disulfidicky. Tyto disulfidické můstky vznikají v oblasti „krčku“, tedy v místě spojujícím transmembránovou doménu s extracelulární doménou [23]

### **1.2.5.2. Inhibiční komplex NKR-P1B:ClrB**

Rodina receptorů NKR-P1 („natural killer cell receptor- protein 1“) byla před více jak dvaceti lety vůbec první popsanou receptorovou rodinou receptorů NK buněk. Geny, které je kódují, jsou sdruženy v NK genovém komplexu („natural killer gene complex“, NKC). Ten se

u lidí nachází na 12. chromosomu, u myši na 6. a u potkana pak na 4. chromosomu [24]. Tato rodina zahrnuje jak aktivační, tak inhibiční receptory C-lektinového typu. Prvním z této rodiny byl prozkoumaný inhibiční receptor NKR-P1C, který je stále znám pod svým původním jménem NK 1.1. Tento protein je v současnosti široce využíván jako znak pro rozpoznávání myších NK buněk. Tato receptorová rodina je zvláštní tím, že jako ligandy rozpoznává jiné receptory C-lektinového typu („C-type lectin related receptor", Clr), kódované clec2 geny [25].

Rodina Clr byla objevena během výzkumu kostní morfogeneze, kdy byl popsán genový produkt, který byl pro svou schopnost inhibovat osteoklastickou formaci (pokud byl exprimován buňkami osteoblastu), popsán jako Ocil („osteoclast inhibitory lectin“).

Receptorový systém NKR-P1:Clr se už od počátku svého objevení potýká s nedostatky v oblasti nomenklatur, a to jak v rámci daného druhu: u myši jsou tyto receptory známy jako NK1/NK1.1, NKR-P1 (A-G) - což je nejběžnější označení, popřípadě jako CD161 (název převzatý z označení lidských genů) a clec5b (odkazující na nomenklaturu C-lektinových receptorů). Samotné Clr proteiny jsou exprimovány jako homodimery, v poslední době se ale také spekuluje o výskytu Clr jako heterodimeru [24].

## 2. Cíle práce

Cílem této práce byla příprava vektoru pTW5\_sec\_C2, obsahujícího mutovanou formu potkaního receptoru Clrb, ligandu inhibičního receptoru NKR-P1B, bez dimerizačního krčku. Dále produkce proteinu v HEK293S GnTI<sup>-</sup> buněčné linii, jeho purifikace a následná charakterizace pomocí deglykosylace, analytické ultracentrifugace a proteinové krystalizace.

## 3. Materiál

### 3.1. POMŮCKY A PŘÍSTROJE

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| <b>Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I</b> | <i>Beckman Coulter, USA</i>           |
| <b>Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad</b>   | <i>New Brunswick Scientific, USA</i>  |
| <b>Analytické váhy</b>                             | <i>AND, USA</i>                       |
| <b>Aparatura pro filtraci</b>                      | <i>Sigma, USA</i>                     |
| <b>Autokláv Varioklav 400 E</b>                    | <i>H+P Labortechnik GmbH, Německo</i> |
| <b>Automatické pipety Discovery</b>                | <i>HTL, Polsko</i>                    |
| <b>Automatické pipety Pipetman</b>                 | <i>Gilson, USA</i>                    |
| <b>Centrifuga Allegra X-22R</b>                    | <i>Beckman Coulter, USA</i>           |
| <b>Centrifuga EBA 12R</b>                          | <i>Hettich, Německo</i>               |
| <b>Centrifuga Universal 320R</b>                   | <i>Hettich, Německo</i>               |
| <b>Centrifuga 5415R</b>                            | <i>Eppendorf, Německo</i>             |
| <b>Centrifugační zkumavky Oak Ridge</b>            | <i>Sigma-Aldrich, USA</i>             |
| <b>Filtry pro sterilizaci 0,22 µm</b>              | <i>Corning, Německo</i>               |
| <b>Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570</b>              | <i>SONY, Japonsko</i>                 |
| <b>Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit</b>        | <i>Geneaid, USA</i>                   |
| <b>High-Speed Plasmid Mini Kit</b>                 | <i>Geneaid, USA</i>                   |
| <b>HPLC systém ÄKTAbasic</b>                       | <i>Amersham Biosciences, Švédsko</i>  |
| <b>Inkubátor MCO-18AIC</b>                         | <i>Sanyo, Japonsko</i>                |
| <b>Inkubátor IR 5000</b>                           | <i>Flow Laboratories, USA</i>         |
| <b>Kahan Fuego SCS</b>                             | <i>VERKON, ČR</i>                     |
| <b>Kahan</b>                                       | <i>závod Votice, ČR</i>               |
| <b>Kolona Econo</b>                                | <i>Bio-Rad, Německo</i>               |
| <b>Kolona Hitrap MabSelect SuRe</b>                | <i>GE Healthcare, USA</i>             |

|   |  |
|---|--|
| <b>Kolona Superdex 200 10/300 GL</b>            | <i>GE Healthcare, USA</i>              |
| <b>Koncentrátory Amicon Ultra</b>               | <i>Merck-Millipore, USA</i>            |
| <b>Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky</b>     | <i>P-LAB, ČR</i>                       |
| <b>Laminární box Clean Air Techniek B.V.</b>    | <i>PMV, Belgie</i>                     |
| <b>Lednice 225 R</b>                            | <i>Calex, ČR</i>                       |
| <b>Magnetická míchačka MM 2A</b>                | <i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i> |
| <b>Mikrocentrifuga MiniStar silverline</b>      | <i>VWR, USA</i>                        |
| <b>Mikroskop inverzní AE31</b>                  | <i>Motic, Německo</i>                  |
| <b>Mrazicí box (-20°C)</b>                      | <i>Calex, ČR</i>                       |
| <b>Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80°C)</b>   | <i>Sanyo, Japonsko</i>                 |
| <b>Nosič pro afinitní chromatografii Talon</b>  | <i>Clontech, USA</i>                   |
| <b>pH metr</b>                                  | <i>Jenway, UK</i>                      |
| <b>Parafilm M</b>                               | <i>Ted Pella, USA</i>                  |
| <b>Pipetovací nástavec Midiplus</b>             | <i>Biohit, USA</i>                     |
| <b>Plastik pro tkáňové kultury</b>              | <i>Corning, Německo</i>                |
| <b>Předvážky KB1200-2</b>                       | <i>Kern, Německo</i>                   |
| <b>Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110</b> | <i>Savant, USA</i>                     |
| <b>Souprava pro agarosovou elektroforesu</b>    | <i>Biokeystone, USA</i>                |
| <b>Souprava pro SDS-PAGE</b>                    | <i>Bio-Rad, Německo</i>                |
| <b>Spektrofotometr DS-11</b>                    | <i>DeNovix, USA</i>                    |
| <b>Termoblok LS1</b>                            | <i>VLM, Německo</i>                    |
| <b>Termocykler Progene</b>                      | <i>Techne, UK</i>                      |
| <b>Termocykler Techgene</b>                     | <i>Techne, UK</i>                      |
| <b>Třepačka Orbi-Safe TS</b>                    | <i>NetWise Gallenkamp, UK</i>          |
| <b>Třepačka Celltron</b>                        | <i>Infors HT, Švýcarsko</i>            |
| <b>UV/Vis spektrometr UV2</b>                   | <i>Unicam, UK</i>                      |



|                                       |                                 |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| <b>UV prosvěcovací lampa (300 nm)</b> | <i>Ultra-Lum, USA</i>           |
| <b>UV prosvěcovací lampa (312 nm)</b> | <i>UVItec, UK</i>               |
| <b>Vařič</b>                          | <i>ETA, ČR</i>                  |
| <b>Vodní lázeň</b>                    | <i>Memmert, Německo</i>         |
| <b>Vodní lázeň</b>                    | <i>Julabo, Německo</i>          |
| <b>Vortexový mixér</b>                | <i>VELP Scientifica, Itálie</i> |
| <b>Zdroj deionizované vody</b>        | <i>Merck-Millipore, USA</i>     |
| <b>Zdroj napětí PS 251-2</b>          | <i>Sigma, USA</i>               |

### 3.2. CHEMIKÁLIE

|                                       |                                 |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Agar</b>                           | <i>Oxoid, Anglie</i>            |
| <b>Agarosa</b>                        | <i>Sigma, USA</i>               |
| <b>Akrylamid</b>                      | <i>Sigma, USA</i>               |
| <b>Ampicilin</b>                      | <i>Biotika, SR</i>              |
| <b>Peroxosíran amonný</b>             | <i>Serva, USA</i>               |
| <b>Azid sodný</b>                     | <i>Serva, USA</i>               |
| <b>Bromfenolová modř</b>              | <i>Lachema, ČR</i>              |
| <b>BSA</b>                            | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| <b>Coomassie Brilliant Blue R-250</b> | <i>Fluka Chemika, Švýcarsko</i> |
| <b>dNTPs, 10mM</b>                    | <i>Top-Bio, ČR</i>              |
| <b>Dithiothreitol</b>                 | <i>Serva, USA</i>               |
| <b>EDTA</b>                           | <i>Jersey Lab Supply, USA</i>   |
| <b>ExCELL293 médium</b>               | <i>Sigma, USA</i>               |
| <b>Freestyle F17 médium</b>           | <i>Gibco Invitrogen, USA</i>    |
| <b>L-glutamin</b>                     | <i>Sigma-Aldrich, USA</i>       |
| <b>GoodView</b>                       | <i>Ecoli, Slovensko</i>         |
| <b>Kvasničný extrakt</b>              | <i>Imuna Pharm, ČR</i>          |

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| <b>Kyselina valproová</b>                       | <i>Sigma, USA</i>                    |
| <b>Lineární polyethylenimin 25 kDa</b>          | <i>Polysciences, USA</i>             |
| <b>2-merkaptoethanol</b>                        | <i>Sigma, USA</i>                    |
| <b>MgSO<sub>4</sub> pro PCR 100mM</b>           | <i>New England Biolabs, USA</i>      |
| <b>Standard pro SDS-PAGE</b>                    | <i>Fluka, USA</i>                    |
| <b>Nosič pro chromatografii Talon</b>           | <i>Clontech, USA</i>                 |
| <b>PCR H<sub>2</sub>O</b>                       | <i>Top-Bio, ČR</i>                   |
| <b>Penicilin G, sodná sůl</b>                   | <i>Duchefa Biochemie, Nizozemsko</i> |
| <b>SDS</b>                                      | <i>Jersey Lab Supply, USA</i>        |
| <b>Standard pro SDS PAGE</b>                    | <i>Bio-Rad, Německo</i>              |
| <b>Streptomycin sulfát</b>                      | <i>Serva, USA</i>                    |
| <b>TEMED</b>                                    | <i>Serva, USA</i>                    |
| <b>Tris</b>                                     | <i>Roth, Německo</i>                 |
| <b>Triton X-100</b>                             | <i>Sigma-Aldrich, USA</i>            |
| <b>Trypanová modř</b>                           | <i>Sigma, USA</i>                    |
| <b>UltraPower</b>                               | <i>Ecoli, Slovensko</i>              |
| <b>1kb DNA standard</b>                         | <i>New England Biolabs, USA</i>      |
| <b>100bp DNA standard</b>                       | <i>New England Biolabs, USA</i>      |
| <b>Ostatní běžné chemikálie (čistota p. a.)</b> | <i>Lach-Ner, ČR</i>                  |

### 3.3. ENZYMY

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| <b><i>AgeI</i> (5 U·<math>\mu</math>l<sup>-1</sup>)</b>                     | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| <b><i>Deep Vent DNA polymerasa</i> (2 U·<math>\mu</math>l<sup>-1</sup>)</b> | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| <b><i>KpnI</i> (10 U·<math>\mu</math>l<sup>-1</sup>)</b>                    | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| <b><i>T4 DNA ligasa</i> (400 U·<math>\mu</math>l<sup>-1</sup>)</b>          | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| <b><i>RNasa A</i> (10 mg.ml<sup>-1</sup>)</b>                               | <i>Serva, USA</i>               |

### 3.4. PUFRY PRO ENZYMY

|                              |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|
| <b>NEB1 puf</b>              | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| <b>Puf</b> G5                | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| <b>Puf</b> pro T4 DNA ligasu | <i>Fermentas, Kanada</i>        |
| <b>Puf</b> ThermoPol         | <i>New England Biolabs, USA</i> |

### 3.5. BAKTERIÁLNÍ KMENY A BUNĚČNÉ LINIE

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| <b>Z kompetentní <i>E. coli</i> DH5a</b> | <i>Mgr. Jan Bláha, PřF UK, ČR</i> |
| <b>HEK293S GnTI- CRL-3022</b>            | <i>ATCC, USA</i>                  |

### 3.6. PLASMIDY

|                       |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| <b>pTW5_sec_C1</b>    | <i>Mgr. Jan Bláha, PřF UK, ČR</i> |
| <b>pTW5_sec_NitAB</b> | <i>Mgr. Jan Bláha, PřF UK, ČR</i> |

### 3.7. OLIGONUKLEOTIDY

**rClrbWAG\_Y77\_FW**  
5' *AAAAACCGGITACGCTGCTTGCCCGAGAAA* 3'

**rClrbWAG\_S195\_REV**  
5' *AAAAGGTACCGCTGTAAAGTCTGCTACAGCTC* 3'

**pTT\_FW**  
5' *TGATATTCACCTGGCCCGATCTG* 3'

**pTW5\_seq\_REV**  
5' *AAGCAGCGTATCCACATAGCG* 3'

### 3.8. ROZTOKY A MÉDIA

**ExCELL293 médium:** zakoupeno hotové médium (Sigma, USA) a před použitím doplněno o L- glutamin (výsl. konc. 4 mM)

**Freestyle F17 médium:** zakoupeno hotové médium (Gibco Invitrogen, USA) a před použitím doplněno o L- glutamin (výsl. konc. 4 mM) a Pluronic F-68 (výsl. konc. 0,1% w/v)

**HEPES pufr (pufr pro gelovou permeační chromatografii):** 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>; pH = 7, 5

**LB agar s Amp:** 1,5% (w/v) agar v LB médiu, 100 µg.ml<sup>-1</sup> Amp

**LB médium:** 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH = 7,4

**MES pufr:** 20mM MES, 100mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, pH = 5, 0

**PBS pufr:** 20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> .12 H<sub>2</sub>O, 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .2 H<sub>2</sub>O, 300mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7, 0

**PBS pufr s imidazolem:** 20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> .12 H<sub>2</sub>O, 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .2 H<sub>2</sub>O, 300mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, 250mM imidazol, pH = 7, 0

**PBS-TK pufr:** 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7, 0

#### **Pufry pro agarosovou elektroforézu:**

- TAE pufr (1 koncentrovaný): 40mM Tris, 20mM CH<sub>3</sub>COOH, 1mM EDTA, pH = 8, 3
- STOP pufr: 30% (v/v) glycerol, 1% (w/v) bromfenolová modř, 70% (v/v) TAE pufr

**Roztok IPEI:** 10 mg.ml<sup>-1</sup> IPEI v PBS-TK, pH = 7, 0

#### **Roztoky pro SDS-PAGE:**

- AA: 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) N, N' -metylen-bis-akrylamid
- Barvicí roztok pro SDS-PAGE: 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) CBB R-250
- Elektrodotový pufr pro SDS-PAGE (10× koncentrovaný): 3% (w/v) Tris, 14,4% (w/v) glycin, 1% (w/v) SDS, pH = 8, 3
- Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE: 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová, 55% (v/v) dH<sub>2</sub>O
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující (4× koncentrovaný): 277,8 mM Tris-HCl, 4,4% SDS, 44,4% (w/v) glycerol, 0,02% bromfenolová modř, pH = 6, 8
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující (2× koncentrovaný): 100mM Tris, 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) bromfenolová modř, 100mM DTT, pH = 6,8

**Roztoky pro přípravu zásobního množství plasmidové DNA:**

- ELU: 100mM Tris, 1,25M NaCl, pH = 8, 5
- EQ1: 0,1M CH<sub>3</sub>COOK, 0,6M NaCl, 0,15% (v/v) Triton X-100, pH = 5
- LYS: 0,2M NaOH, 1% (w/v) SDS
- RES: 50mM Tris, 10mM EDTA, 5 mg.ml<sup>-1</sup> RNasa A, pH = 8
- WASH: 0,1M CH<sub>3</sub>COONa, 0,825M NaCl, pH = 5

**Roztoky pro minpreparaci plazmidové DNA: Geneaid, USA**

**Roztoky pro extrakci z gelu:** Geneaid, USA

**Roztoky pro přečištění PCR produktů:** Geneaid, USA

**Směs antibiotik:** 10000 U.ml<sup>-1</sup> penicilin, 10000 µg.ml<sup>-1</sup> streptomycin

**TAE pufr:** 10mM Tris, 0,5mM EDTA, pH = 8, 0

**TES pufr:** 10mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM NaN<sub>3</sub>, pH = 8, 0

## 4. Metody

### 4.1. PŘÍPRAVA VEKTORU pTW5\_sec\_C2

#### 4.1.1. Amplifikace insertu konstruktů C2 pomocí PCR

Polymerasovou řetězovou reakci jsem provedla v 0,5ml PCR mikrozkušavce. Přesné složení reakční směsi zobrazuje tabulka č. 1. Takto připravená reakční směs byla následně doplněna PCR vodou do 50  $\mu$ l. Teploty a časy jednotlivých PCR reakcí zobrazuje tabulka č. 2, po skončení cyklu byla směs chlazená.

*Tabulka č. 1 - Složení reakční směsi pro PCR reakci.*

| Činidlo                  | Zásobní koncentrace                          | Použitý objem |
|--------------------------|--|---------------|
| Thermopol pufr           | 10 $\times$ koncentrovaný                    | 5 $\mu$ l     |
| Primer rClrbWAG_Y77_FW   | 5 $\mu$ mol.l <sup>-1</sup>                  | 5 $\mu$ l     |
| Primer rClrbWAG_S195_REV | 5 $\mu$ mol.l <sup>-1</sup>                  | 5 $\mu$ l     |
| MgSO <sub>4</sub>        | 0,1 mol.l <sup>-1</sup>                      | 1,5 $\mu$ l   |
| dNTPs                    | 20 mmol.l <sup>-1</sup>                      | 1,5 $\mu$ l   |
| Templát pTW5_sec_C1      | 1,25.10 <sup>6</sup> $\mu$ g.l <sup>-1</sup> | 0,5 $\mu$ l   |
| Deep Vent DNA polymerasa | 2.0.10 <sup>3</sup> U.l <sup>-1</sup>        | 0,5 $\mu$ l   |

*Tabulka č. 2 - Teploty a časy probíhání jednotlivých cyklů PCR reakce.*

| Cyklus                     | Teplota | čas      |
|----------------------------|---------|----------|
| 1                          | 94 °C   | 5 min    |
| 2 (30 $\times$ se opakuje) | 94 °C   | 0,5 min  |
|                            | 55 °C   | 0,5 min  |
|                            | 72 °C   | 1 min    |
| 3                          | 72 °C   | 8 min    |
| 4                          | 4 °C    | $\infty$ |

### 4.1.2. Restrikce plasmidu

Pro restrikci byl použit plasmid pTW5\_sec\_NitAB, nesoucí insert pro nitrilasu. Restrikce byla provedena v 1,5ml mikrozkuhavce, do níž byl napipetován plasmid, roztok BSA (1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), reakční pufr NEB1, enzymy *AgeI*, *KpnI* a celá směs byla následně doplněna do 20  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O. Přesná množství reaktantů zobrazuje tabulka č. 3. Reakce probíhala při 37 °C 1 hod a následně byla tepelně inaktivována 20 min při 65 °C.

*Tabulka č. 3 - Složení reakční směsi pro restrikci insertu z vektoru.*

| Reaktant          | Koncentrace                             | objem             |
|-------------------|---|-------------------|
| pTW5_sec_NitAB    | 1,02 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ | 1 $\mu\text{l}$   |
| BSA               | 10 $\times$ koncentrovaný               | 2 $\mu\text{l}$   |
| NEB1              | 10 $\times$ koncentrovaný               | 2 $\mu\text{l}$   |
| AgeI              | 5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$             | 0,5 $\mu\text{l}$ |
| KpnI              | 10 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$            | 0,5 $\mu\text{l}$ |
| dH <sub>2</sub> O | -----                                   | 14 $\mu\text{l}$  |

### 4.1.3. Agarosová elektroforesa

Neštěpený a štěpený plasmid s insertem pro nitrilasu pTW5\_sec\_NitAB a PCR produkt insertu konstruktu C2 byly vizualizovány pomocí elektroforesy v 1% agarosovém gelu. Ten byl připraven uvařením 0,65 g agarosy v 65 ml 1 $\times$  koncentrovaného TAE pufru. Po zchlazení gelu zhruba na 50 °C byly do gelu přidány 3  $\mu\text{l}$  fluorescenční barvy Good View a gel byl nalit do připravené aparatury pro agarovou elektroforesu s hřebenem. Po ztuhnutí gelu byl gel přelit dH<sub>2</sub>O, k elektrodám byl nalit 1 $\times$  koncentrovaný TAE pufr. Elektroforesa probíhala 20 min při napětí 200 V, poté následovala vizualizace pomocí prosvěcovací lampy Ultra-Lum.

### 4.1.4. Izolace DNA z gelu

Pro extrakci DNA z gelu byl použit komerční kit Gel/PCR DNA Fragments Extraction [26]. Z gelu byl vyříznut linearizovaný plasmid pTW5\_sec a amplifikovaný insert konstruktu C2. Gel s DNA byl vložen do 1,5ml mikrozkuhavky a přelit DF pufrům tak, aby na každých 100 mg gelu bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  pufru. Směs byla důkladně protřepána a

rozpuštěna po dobu 10 min ve vodní lázni při 50 °C. DF kolona byla vložena do sběrné zkumavky. Na kolonu byl aplikován rozpuštěný gel v DF pufu. Směs byla centrifugována v centrifuze EBA 12R (16000× g, 30 s). Filtrát byl vylit a na kolonu aplikováno 400 µl roztoku W1, centrifugováno za stejných podmínek. Filtrát byl slit a na kolonu aplikováno 600 µl Wash pufu, kolona s pufem byla inkubována 1 min při laboratorní teplotě. Následná centrifugace proběhla při stejných otáčkách po dobu 6 min. Supernatant byl slit. Kolonka byla přendána do nové mikrozukavky. Na kolonu bylo aplikováno 500 µl na 70 °C přehřáté dH<sub>2</sub>O a kolona se inkubována 2 min za laboratorní teploty. Následně byla kolona centrifugována (16000× g, 2 min). Eluovaná DNA byla uschována v dH<sub>2</sub>O.

#### 4.1.5. Restrikce insertu

PRC produkt byl štěpen pomocí enzymů AgeI a KpnI. Do reakce byl dále přidán NEB1 pufr, roztok BSA a 45 µl PCR produktu. Směs byla smíchána v 1,5ml mikrozukavce a samotná reakce probíhala po dobu 30 min za teploty 37 °C v termobloku. Po skončení reakce byla reakční směs aplikována na komerčně dodávanou kolonku pro extrakci DNA (High-Speed Plasmid Mini Kit) [27]. Na reakční směs byl aplikován roztok L1, směs byla centrifugována v centrifuze EBA 12R (16000× g, 1 min), supernatant byl slit. Následně byl na kolonku pipetován roztok L2 a postup opakován. Konečná eluce štěpené DNA byla provedena dH<sub>2</sub>O opět přehřátou na 60 °C. Tato eluce byla provedena 2× 50 µl. Eluovaná DNA byla zkoncentrována na 60 µl na vakuové odparce SpeedVac. Přesné koncentrace a objemy reaktantů zobrazuje tabulka č. 4.

*Tabulka č. 4 - Složení reakční směsi pro restrikci PCR produktu.*

| Činidlo        | Koncentrace              | objem  |
|----------------|--------------------------|--------|
| PCR produkt C2 | 22,5 ng·µl <sup>-1</sup> | 45 µl  |
| NEB1           | 10× koncentrovaný        | 5 µl   |
| KpnI           | 10 U·µl <sup>-1</sup>    | 0,5 µl |
| AgeI           | 5 U ·µl <sup>-1</sup>    | 0,5 µl |



#### 4.1.6. Ligace insertu do vektoru

Bylo smícháno 100 ng štěpeného plasmidu pTW5\_sec se 100 ng štěpeného insertu v prostředí reakčního pufru pro T4 DNA ligasu. Dále byla přidána T4 DNA ligasa a celá směs byla doplněna do 20  $\mu$ l sterilní dH<sub>2</sub>O. Reakce probíhala 30 min za teploty 37 °C v termobloku. Přesné složení ligační směsi popisuje tabulka č. 5.

Tabulka č. 5 - Složení ligační směsi.

| Činidlo                | Koncentrace                    | objem        |
|------------------------|--------------------------------|--------------|
| pTW5_sec               | 3,6 ng. $\mu$ l <sup>-1</sup>  | 6 $\mu$ l    |
| Insert C2              | 9,43 ng. $\mu$ l <sup>-1</sup> | 10,6 $\mu$ l |
| Pufř pro T4 DNA ligasu | 10 $\times$ koncentrovaný      | 1,7 $\mu$ l  |
| T4 DNA ligasa          | 400 U. $\mu$ l <sup>-1</sup>   | 0,5 $\mu$ l  |

#### 4.2. TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BAKTERIÍ *E.coli* TEPELNÝM ŠOKEM

Jeden 100 $\mu$ l alikvot kompetentních bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  [28], které se uchovávají při teplotě -80 °C, byl ponechán na ledu roztát. Po roztání byl ve sterilním prostředí laminárního boxu rozdělen do dvou 1,5ml mikrozkušavek po 2 $\times$  50  $\mu$ l. Do první zkumavky se byla přidána celá ligační směs z předchozího kroku, tedy 20  $\mu$ l plasmidu pTW5\_sec\_C2. Do druhé zkumavky bylo přidáno 20  $\mu$ l sterilní dH<sub>2</sub>O. Zkumavky s bakteriemi byly ponechány 30 min na ledu. Poté byly zkumavky přendány do vodní lázně (42 °C, 1 min). Z lázně byly zkumavky přendány opět na led. Do každé byl pipetován 1 ml na 37 °C předeřhátého LB Amp média. Následně byly bakterie spolu s předpřipravenými LB Amp plotnami inkubovány (37 °C, 1 hod). Poté byly zkumavky s bakteriemi centrifugovány na centrifuze Universal 320R (2500 $\times$  g, 5 min, 25 °C). Supernatant byl ze dvou třetin dekantován. Ve zbytku LB média byly buňky resuspendovány a v laminárním boxu vysety na plotny s LB Amp agarem. Plotny byly přeneseny do inkubátoru nastaveného na 37 °C, kde byly bakterie inkubovány přes noc, přibližně 15 hod. Po této době byly vyjmuty a uskladněny v lednici při 4 °C.

### 4.3. PCR Z KOLONIÍ

Protože na plotně vyrostlo jen několik kolonií, byla provedena PCR z kolonií. Bylo vybráno 5 kolonií, se kterými se dále pracovalo. V laminárním boxu byly jedna po druhé pomocí automatické pipety kolonie nabrány a resuspendovány v 6  $\mu\text{l}$  sterilní  $\text{dH}_2\text{O}$  napipetované do 200 $\mu\text{l}$  PCR zkumavky. Špička byla poté vložena do 15ml zkumavky s víčkem naplněné 5 ml LB Amp média. Zkumavky byly inkubovány na třepačce při teplotě 37 °C a při 220  $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ . Poté byly zkumavky uskladněny v lednici při teplotě 4 °C.

Do 200 $\mu\text{l}$  zkumavky s 6  $\mu\text{l}$  vody byly dále přidány 2  $\mu\text{l}$  přímého primeru pTT\_FW (o koncentraci  $5\cdot 10^{-3}$  mM) a 2  $\mu\text{l}$  reverzního primeru pTW5\_seq\_REV (o koncentraci  $5\cdot 10^{-3}$  mM) a 10  $\mu\text{l}$  vlastnoručně připravené reakční směsi, jejíž složení popisuje tabulka č. 6. Směs byla vložena do tepelného cyklátoru s nastaveným programem, který popisuje tabulka č. 7 na straně 35. Produkty PCR z kolonií byly charakterizovány agarosovou elektroforesou, postup provedení se lišil od provedení popsáném v pododdílu 4.1.3. jen v tom, že místo fluorescenčního barviva Good View bylo použito barvivo UltraPower. Na 65 ml agarosového gelu bylo přidáno 6,5  $\mu\text{l}$  tohoto barviva. Z bakteriálních klonů, které při PCR reakci poskytly produkt očekávané délky odpovídající vložení insertu C2 do vektoru pTW5\_sec, byla izolována plasmidová DNA, viz kapitola 4.4.

*Tabulka č. 6 - Složení reakční směsi.*

| Činidlo                  | Koncentrace činidla                | objem              |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------|
| Pufr Thermopol           | 10 $\times$ koncentrovaný          | 12 $\mu\text{l}$   |
| Deep Vent DNA polymerasa | 2 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  | 1,2 $\mu\text{l}$  |
| $\text{MgSO}_4$          | 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 3,6 $\mu\text{l}$  |
| dNTPs                    | 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 3,6 $\mu\text{l}$  |
| PCR voda                 | -----                              | 39,6 $\mu\text{l}$ |

Tabulka č. 7 - Průběh reakce PCR z kolonií.

| Cyklus             | Teplota | čas   |
|--------------------|---------|-------|
| 1                  | 94 °C   | 5 min |
| 2 (20× se opakuje) | 94 °C   | 30 s  |
|                    | 56 °C   | 30 s  |
|                    | 72 °C   | 1 min |
| 3                  | 72 °C   | 8 min |
| 4                  | 4 °C    | ∞     |

#### 4.4. MINIPREPARACE PLASMIDOVÉ DNA

Z 5 ml suspenze, jejíž přípravu popisuje kapitola 4.3., bylo odebráno 1,5 ml do 2ml mikrozkušavky a centrifugováno v centrifuze 5415R (15000× g, 1 min), supernatant byl slit. K peletě byl pipetován další 1,5 ml suspenze a postup byl opakován ještě třikrát. K výsledné peletě bylo přidáno 200 µl PD1 pufru obohaceného o 50 µl *RNasy A* (zásobní koncentrace 50 mg.ml<sup>-1</sup>), směs byla resuspendována. Následně byl přidán stejný objem PD2 pufru, mikrozkušavka byla lehce promíchána a poté v klidu inkubována 2 min při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo pipetováno 300 µl PD3 roztoku. Směs byla lehce promíchána a poté centrifugována (16000× g, 30 s). Supernatant byl nalit na PD kolonu umístěnou ve sběrné mikrozkušavce. Kolona se supernatantem byla analogicky centrifugována. Supernatant byl slit. Na kolonu bylo aplikováno 400 µl W1 roztoku. Následná centrifugace byla provedena jako ve dvou předchozích případech. Supernatant byl slit. Na kolonu bylo pipetováno 600 µl Wash pufru a opět centrifugováno. Pro celkové dosušení kolony od možných zbytků Wash pufru, byla kolona znovu centrifugována (16000× g, 5 min) bez přídavku jakéhokoli činidla. PD kolona byla přendána do mikrozkušavky a plasmid byl eluován 50 µl dH<sub>2</sub>O předehřáté na 70 °C. Po napipetování vody na kolonu byla kolona inkubována 2 min při laboratorní teplotě a následně byla centrifugována (16000× g, 2 min) [27].

Na spektrofotometru DS-11 byla změřena koncentrace eluovaných plasmidů, jako reference byla použita sterilní dH<sub>2</sub>O.

## 4.5. SEKVENACE VEKTORU

Sekvenaci provedla RNDr. Štěpánka Hrdá v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK pomocí přístroje 3130 Genetic Analyzer. Z dat poskytnutých Laboratoří sekvenace DNA byla vybrána kolonie, která neobsahovala žádnou chybu v nukleotidové sekvenci vloženého insertu, ani přilehlých oblastí plasmidu pTW5\_sec, se kterou se dále pracovalo (kolonie č. 1).

## 4.6. TRANSFORMACE BAKTERIÍ

Transformace byla provedena se zásobním roztokem plasmidu získaného z kolonie č. 1, koncentrací  $34 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Jeden 50  $\mu\text{l}$  alikvot kompetentních bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  [28], které se uchovávají při teplotě  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ , byl ponechán na ledu, aby roztál. Po roztání byl ve sterilním prostředí laminárního boxu rozdělen do dvou 1,5ml mikrozkušavek po 40  $\mu\text{l}$  a 10  $\mu\text{l}$ . Do první zkumavky se 40  $\mu\text{l}$  byly přidány 2  $\mu\text{l}$  plasmidu pTW5\_sec\_C2 o koncentraci  $34 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Do druhé zkumavky bylo přidáno jako kontrola 5  $\mu\text{l}$  dH $_2$ O. Zkumavky s bakteriemi byly ponechány na ledu po dobu 5 min. Následně byly bakterie asepticky vysety na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  předeřháté LB Amp plotny. Plotny byly přeneseny do inkubátoru nastaveného na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , kde byly inkubovány po dobu 17 hod. Po této době byly vyjmuty a uskladněny v lednici při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.7. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLASMIDOVÉ DNA

### 4.7.1. Kultivace bakterií

Do 2l Erlenmeyerových lahví bylo v laminárním boxu odměřeno 500 ml sterilního LB Amp média. Z lahve bylo odpipetováno 5 ml do Petriho misky s koloniemi transformovaných buněk. Buňky byly skleněnou tyčinkou v médiu resuspendovány a bylo jimi inokulováno připravené médium v Erlenmeyerových lahvích. Takto připravené lahve byly třepány 14 hodin při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , s následným chlazením při  $6 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 3 hod, na  $220 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ . Suspenze byla následně centrifugována v centrifuze Allegra X-22R ( $3900 \times g$ , 30 min,  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ve 250ml centrifugačních kyvetách. Supernatant byl slit a peleta resuspendována ve 20 ml TES pufru a znovu centrifugována, již ve zkumavce s víčkem.

## 4.7.2. Izolace plasmidu z buněčné suspenze

Bakteriální peleta byla resuspendována v 50ml zkumavce s víčkem pomocí vortexového mixéru v 18 ml RES pufru s přídáním *RNAsou A*. Takto vzniklá homogenní bakteriální směs byla rozdělena do dvou 30ml centrifugačních kyvet typu Oak Ridge. Ke každé bylo následně pipetováno 9 ml LYS pufru, zkumavka byla zlehka promíchána a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Dále bylo do každé kyvety přidáno 9 ml neutralizačního N3 pufru a opět zlehka, ale důkladně promícháno. Směs poté byla centrifugována v centrifuze Allegra X-22R (20000× g, 10 min, 20 °C). V mezičase byly připraveny recyklované, komerčně dodávané, kolony NucleoBond Xtra Maxi [29], uchovávané ve 20% ethanolu. Ethanol byl dekantován a kolona promyta dH<sub>2</sub>O a následně dostatečným množstvím elučního roztoku (cca 20 ml). Do kolony byl vložen papírový filtr a dále byla kolona ekvilibrována i s filtrem. Kolona byla promyta 3 × 25 ml roztoku EQ1. Po centrifugaci byl supernatant aplikován na kolonu s filtrem a eluát se nechal prokapat. Po prokapání celého objemu supernatantu, byla kolona promyta 25 ml Wash roztoku a až poté byl papírový filtr se zbytky buněčné sraženiny vyhozen. Následně byla 15 ml ELU roztoku eluována DNA do polypropylenových centrifugačních kyvet typu Oak Ridge. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu (-20 °C) a směs byla důkladně protřepána, následně centrifugována (16000× g, 30 min, 0 °C). Supernatant byl dekantován a k peletě přidáno 5 ml 70% ethanolu předchlazeného na -20 °C. Peleta byla v ethanolu omyta a centrifugována (16000× g, 10 min, 0 °C). Supernatant byl slit a peleta krátce vysušena ve vakuové odparce SpeedVac. Peleta byla následně resuspendována v 1 ml sterilní dH<sub>2</sub>O. Na spektrofotometru UV2 byla poté přeměřena koncentrace a čistota plasmidové DNA. Měření byla provedena na již zmíněném spektrofotometru UV2 tak, že jako reference byla použita sterilní dH<sub>2</sub>O, vzorek plasmidu byl dH<sub>2</sub>O naředěn 300× a poté byla změřena absorbance při 260 nm a 280 nm. Získané hodnoty byly pomocí aplikace pro empirický přepočítání závislosti absorbance a koncentrace (pokud absorbance dvouvláknové DNA při 260 nm dosahuje hodnoty 1, pak je její koncentrace číselně rovna 50 µg.ml<sup>-1</sup> [30]). převedeny v koncentraci a čistotu plasmidové DNA [31].

## 4.8. PRODUKCE rClrb V BUNĚČNÉ LINII HEK293S

### 4.8.1. Určení buněčné hustoty a viability buněk

Pro určení hustoty buněk v suspenzi byl použit hemocytometr. Ve sterilním prostředí laminárního boxu bylo odebráno 20 µl buněčné suspenze, k níž bylo přidáno 160 µl roztoku

trypanové modři v PBS-TK, čímž byla buněčná suspenze devětkrát naředěna. Směs byla pipetou promíchána a pipetována pod horní sklíčko hemocytometru. Následně byly všechny buňky v 9 čtvercích hemocytometru spočítány (živé buňky bezbarvé, mrtvé buňky modré) a výsledné číslo vynásobeno  $10^4$ , čímž výsledek odpovídal počet milionů buněk v jednom mililitru suspenze. Dle následujícího vzorce byla spočítána viabilita, tedy procento živých buněk v suspenzi:

$$V = \frac{\text{živé buňky}}{\text{živé buňky} + \text{mrtvé buňky}} \cdot 100$$

#### 4.8.2. Vysokohustotní transfekce HEK293S buněčné linie

Buněčná linie HEK293S byla kultivována ve čtverhranných láhvích s prodyšným víčkem na třepačce Celltron v inkubátoru při  $130 \text{ ot. min}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  v ExCELL293 médiu a subkultivovány ředěním čerstvým médiem tak, aby se jejich hustota pohybovala přibližně mezi  $0,2$  a  $4 \cdot 10^6 \text{ buněk.ml}^{-1}$ . Buněčná suspenze HEK293S o objemu  $400 \text{ ml}$  a hustotě  $3,4 \cdot 10^6 \text{ buněk.ml}^{-1}$  byla ve sterilním prostředí laminárního boxu rovnoměrně rozdělena do čtyřech  $50 \text{ ml}$  zkumavek s víčkem tak, aby výsledné množství buněk ve zkumavkách bylo  $400 \cdot 10^6$ , ty byly následně centrifugovány v centrifuze Universal 320R ( $90 \times g$ ,  $5 \text{ min}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Pelety byly po dekantaci resuspendovány v celkem  $16 \text{ ml}$  média ExCell293 a spojeny do jedné  $500 \text{ ml}$  čtverhranné láhve, čímž bylo dosaženo celkové koncentrace  $25 \cdot 10^6 \text{ buněk.ml}^{-1}$ . Transfekční směs byla připravena přesně tak, jak popisuje tabulka č. 8. Důležité je dodržet poměr  $1 \text{ } \mu\text{g DNA}$  na  $1 \cdot 10^6 \text{ buněk}$ . Směs byla vyředěna  $2,5 \text{ ml}$  PBS-TK tak, aby po přidání této směsi k buňkám se koncentrace buněk snížila na  $20 \cdot 10^6 \text{ buněk.ml}^{-1}$ . Tato směs byla zfiltrována pomocí  $0,22 \mu\text{m}$  filtru do buněčné kultury. Následovalo přidání  $120 \text{ } \mu\text{l}$  ( $1,2 \text{ mg}$ ) IPEI do kultury. Poměr celkové plasmidové DNA:IPEI byl 1:3. Vysokohustotní transfekce probíhala za třepání po  $4 \text{ hod}$  a následně byla suspenze vyředěna médiem ExCell293 na  $200 \text{ ml}$ , do celkové hustoty  $2 \cdot 10^6 \text{ buněk.ml}^{-1}$  s přídavkem  $1,6 \text{ ml}$   $0,5 \text{ M}$  kyseliny valproové (výsledná konc.  $2 \text{ mM}$ ) a  $4 \text{ ml}$  zásobního roztoku antibiotik.

*Tabulka č. 8 - Složení transfekční DNA směsi.*

| Plasmid     | Procentuální zastoupení | Zásobní koncentrace                          | Výsledný objem              |
|-------------|-------------------------|--|-----------------------------|
| pTW5_sec_C2 | 88 %                    | $9,5 \text{ } \mu\text{g.}\mu\text{l}^{-1}$  | $37,1 \text{ } \mu\text{l}$ |
| PTW5p27     | 10 %                    | $1,42 \text{ } \mu\text{g.}\mu\text{l}^{-1}$ | $28,2 \text{ } \mu\text{l}$ |
| pTW5_αFGF   | 2 %                     | $2,32 \text{ } \mu\text{g.}\mu\text{l}^{-1}$ | $3,44 \text{ } \mu\text{l}$ |

### 4.8.3. Sklizení transfekovaných buněk

Po sedmi dnech kultivace byly transfekované buňky s viabilitou 52 % a hustotou  $1,42 \cdot 10^6$  buněk. $\text{ml}^{-1}$  sklizeny. Suspenze byla centrifugována ve 250ml centrifugačních kyvetách v centrifuze Allegra X-22R ( $4500 \times g$ , 60 min,  $25^\circ\text{C}$ ). Následně bylo centrifugované médium přefiltrováno přes  $0,22 \mu\text{m}$  filtr pro odstranění buněčných zbytků. Zfiltrované médium bylo naředěno roztokem PBS v poměru 1:1.

## 4.9. PURIFIKACE PROTEINU

### 4.9.1. Afinitní chromatografie

Přefiltrované médium bylo přelito do 2l Erlenmeyerových lahví bez zábrusu s přidavkem 5 ml nosiče Talon, nabitého kobaltnatými ionty. Láhve byly inkubovány na třepačce OrbiSafe ( $130 \text{ ot.}\text{min}^{-1}$ , 30 min). Mezitím byla kolona Econo propláchnuta cca 5 ml PBS. Poté na ní bylo po částech aplikováno sklizené médium s nosičem Talon. Po prokapání celého objemu byl zachycený protein eluován z nosiče pomocí PBS s imidazolem. Bylo zachyceno celkem  $5 \times 5$  ml eluátu.

Nosič Talon byl regenerován propláchnutím PBS pufrem s imidazolem, MES pufrem, PBS pufrem,  $\text{dH}_2\text{O}$  a 20% ethanolem, v němž byl i skladován v lednici při  $4^\circ\text{C}$ .

### 4.9.2. Zkoncentrování proteinu

Koncentrování bylo provedeno na koncentrátoru Amicon, jehož membrána je propustná pro molekuly s molekulovou hmotností menší než 10000 Da. Před použitím byl koncentrátor propláchnut  $\text{dH}_2\text{O}$ , poté naplněn eluátem proteinu a centrifugován v centrifuze Allegra X-22R (rotor 4250,  $3900 \times g$ , 5 min,  $21^\circ\text{C}$ ). Po této době bylo metodou dle Bradfordové, v 96ti jamkové destičce, zkontrolováno, jestli membrána protein nepropouští. Do třech jamek bylo pipetováno  $200 \mu\text{l}$  činidla dle Bradfordové, do první jamky bylo pipetováno pouze činidlo (reference), do druhé jamky bylo přidáno  $5 \mu\text{l}$  koncentrátu proteinu, do třetí pak  $5 \mu\text{l}$  filtrátu. Po ověření funkce membrány se pokračovalo v koncentraci proteinu, a to do objemu  $< 500 \mu\text{l}$ . Výsledný roztok proteinu byl přenesen do sterilní mikrozkušavky, která byla centrifugována na centrifuze EBA 12R ( $20000 \times g$ , 5 min,  $21^\circ\text{C}$ ).

### 4.9.3. Gelová permeační chromatografie

Purifikace proteinu proběhla na HPLC systému za použití kolony Superdex 200 10/300 GL [32]. Kolona je uchovávána ve 20% ethanolu, tudíž byla před použitím promyta nejdříve dH<sub>2</sub>O a následně HEPES pufr. Před aplikací vzorku na kolonu byla také promyta dávkovací smyčka 10 ml HEPES pufru. Poté byl pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky aplikován celý zkoncentrovaný vzorek (370 µl) na kolonu. Průtok HEPES pufru kolonou byl nastaven na 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Bylo jímáno celkem šest frakcí zhruba po 0,5 ml do mikrozkuvek. Po skončení byla kolona promyta HEPES pufr a 20% ethanol.

## 4.10. CHARAKTERIZACE PROTEINU

### 4.10.1. Měření koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu ve vzorcích byly stanoveny měřením absorbance pomocí spektrofotometru DeNovix při vlnové délce 280 nm. Jako reference při měření byl použit HEPES pufr. Koncentrace proteinu byla vypočtena ze změřené hodnoty absorbance s pomocí teoretického extinkčního koeficientu 3,066 (vypočítán programem ProtParam na základě primární aminokyselinové sekvence proteinu [33]).

### 4.10.2. SDS-PAGE

Pro další charakterizaci proteinu byla zvolena elektroforesa v 15% polyakrylamidovém gelu. Polyakrylamidové gely byly připraveny smícháním dH<sub>2</sub>O, 30% roztoku AA, Tris pufrů, 10% SDS, 10% APS a TEMED. Zaostrovací gel se ve svém složení od rozlišovacího gelu lišil pouze v pH použitého Tris pufru. Přesné složení gelů zobrazuje tabulka č. 9 na straně 41.

Byly připraveny vzorky dvojího druhu - v redukujícím pufru a v neredukujícím pufru. Použitý neredukující pufr byl 4× koncentrovaný. Redukující pufr vznikl smícháním 4× koncentrovaného neredukujícího pufru s 0,2M roztokem dithiothreitolu v poměru 1:1, čímž vznikl 2× koncentrovaný redukující pufr. Vzorky v neredukujícím prostředí byly připraveny v 1,5ml mikrozkuvce smícháním 10 µl vzorku mnou připraveného proteinu s 2,5 µl neredukujícího pufru. Protein v redukujícím prostředí byl připraven pipetováním 5 µl redukujícího pufru k 10 µl vzorku proteinu. Krom mnou připravených vzorků byly na gelu analyzovány i vzorky deglykosylovaného proteinu rClrb konstrukt C2 (produkovaného také



v HEK293S buněčné linii, transfekované vektorem, jehož přípravu popisuje kapitola 4.7.) připravené Mgr. Janem Bláhou v Oxfordu. Tohoto deglykosylovaného proteinu bylo použito pouze pětinové množství (2  $\mu$ l). Všechny vzorky byly následně 5 min povařeny, poté 30 s centrifugovány na centrifuze MiniStar a naneseny na gel společně s 5  $\mu$ l standardu pro SDS-PAGE. Elektroforesa probíhala 50 min při napětí 200 V. Gely byly následně 30 min barveny v barvicí lázni a poté 1 hod v odbarvovací lázni odbarvovány. Takto připravené gely byly uchovány v dH<sub>2</sub>O.

**Tabulka č. 9 - Složení rozlišovacího (RG) a zaostřovacího (ZG) polyakrylamidového gelu.**

| Činidlo            | Objem      |             |
|--------------------|------------|-------------|
|                    | RG         | ZG          |
| dH <sub>2</sub> O  | 1,8 ml     | 2,1 ml      |
| 30% AA             | 4 ml       | 750 $\mu$ l |
| 1,5M Tris (pH=8,8) | 2 ml       | -           |
| 0,5M Tris (pH=6,8) | -          | 375 $\mu$ l |
| 10% SDS            | 80 $\mu$ l | 30 $\mu$ l  |
| 10% APS            | 80 $\mu$ l | 30 $\mu$ l  |
| TEMED              | 4 $\mu$ l  | 4 $\mu$ l   |

### 4.10.3. Deglykosylace proteinu

Deglykosylační reakce byly připraveny celkem dvě. Lišily se jen hmotnostním poměrem enzymu Endo F1, který u první reakce činil 1:100 a 1:50 u reakce druhé. Vzorek pro první reakci byl připraven smícháním 2,64  $\mu$ g proteinu, 1  $\mu$ l reakčního pufru G5 pro Endo F1 a 0,026  $\mu$ g Endo F1. Tato reakce byla doplněna dH<sub>2</sub>O tak, aby výsledný objem reakce byl 10  $\mu$ l. Druhá reakce, do které bylo přidáno 0,053  $\mu$ g Endo F1 byla také doplněna na 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Vzorky byly centrifugovány na centrifuze MiniStar (30 s) a inkubovány v termobloku (2 hod, 37 °C). Následně bylo ke vzorkům přidáno 0,5  $\mu$ l 4 $\times$  koncentrovaného neredukujícího pufru, vzorky byly 5 min povařeny a poté 30 s centrifugovány. Výsledek deglykosylace byl vizualizován metodou SDS-PAGE.

#### 4.10.4. Sedimentační analýza

Měření bylo provedeno na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I s rotorem An50Ti metodou sedimentační rychlosti. Z této analýzy, jejímž výsledkem je sedimentační koeficient pozorované molekuly a ze znalosti její molekulové hmotnosti, lze získat informace o tvaru a velikosti molekuly proteinu [34]. Toto měření a jeho vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

K měření byla použita dvoukomorová cela, kdy v jedné části byl přítomen roztok proteinu o objemu 400  $\mu\text{l}$  a v druhé příslušný pufr jako reference o objemu 430  $\mu\text{l}$ . Měření probíhalo při 36000  $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$  a sedimentace vzorku byla sledována spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm a zároveň i pomocí interferenční optiky. Měření bylo provedeno se vzorkem proteinu Clrb\_C2 v HEPES pufru o výsledné koncentraci 0,25  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a bylo sbíráno 150 snímků po 10 min. Parciální specifický objem proteinu společně s hustotou a viskozitou pufru byly predikovány pomocí programu SEDNTERP [35] a naměřená data byla vyhodnocena pomocí programů SEDFIT a SEDPHAT [36, 37].

#### 4.10.5. Krystalizace proteinu

Krystalizace připraveného proteinu probíhala v *Henry Wellcome Building for Genomic Medicine, University of Oxford, UK* pod dohledem Mgr. Jana Bláhy. Proběhla zde i exprese proteinu v HEK293S GnTI<sup>-</sup> linii a následná purifikace, část proteinu byla deglykosylována a po zkoncentrování na 9,5 nebo 7 resp. 5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nativní, resp. deglykosylovaný protein byly nasazeny krystalizační experimenty, přičemž bylo využito speciálních robotů schopných pipetovat kapky o objemech až 100 nl. Širokospektré nasazení optimalizačních podmínek probíhalo metodou sedící kapky na 96 jamkových krystalizačních destičkách (*Greiner, Německo*). Nejprve robot Hydra 96 (*Art Robbins Instruments, USA*) naplnil 96 rezervoárů sadou srážedel. Následovalo přemístění krystalizační destičky na robota typu Cartesian (*Genomic Solutions, USA*), který si ze zkumavky se odebral 9,6  $\mu\text{l}$  proteinového preparátu a do každé krystalizační pozice nad rezervoárem pipetoval 100 nl kapičku. Poté robot odebral z každého rezervoáru stejné množství srážedla a pipetoval ho ke kapce preparátu. Tím bylo připraveno 96 podmínek pro krystalizaci o objemu 200 nl. Pro zamezení odparu srážedel byla destička překryta speciální fólií. Krystalizační pokusy byly uskladněny při 20  $^{\circ}\text{C}$  v automatizovaném skladišti, které zajišťuje pravidelnou digitální vizualizaci všech krystalizačních podmínek přístupných ke kontrole po internetu. Tyto experimenty probíhají za podpory projektu Instruct - Integrating structural biology. Dosud byl pozorován vznik krystalů v krystalizačních podmínkách o složení: 12% w/v PEG 20000, 0,1 M imidazol, pH=7,0.

## 5. Výsledky

### 5.1. PŘÍPRAVA VEKTORU

Na základě porovnání krystalové struktury lidského hLLT1\_L2 a aminokyselinové sekvence konstruktů potkaního rClrb\_C1 byl navržen konstrukt potkaního inhibičního ligandu rClrb, úprava spočívala ve zkrácení C- a N-terminálních sekvencí, včetně tzv. „krčku“, který obsahuje dimerizační cystein. Nukleotidovou sekvenci rClrb a aminokyselinovou sekvenci navrženého konstruktů zobrazuje obrázek č. 7 a 8. Navržený insert byl amplifikován, jak popisuje kapitola 4.1.1., kde jako templát sloužil plasmid pTW5\_sec\_C1 [38]. Ten je odvozen od plazmidu pTT5, který byl poskytnut Dr. Y. Durocherem z Ústavu biochemie a molekulární medicíny montrealské univerzity, do nějž byl pro zvýšení exprese genu v HEK293 buněčné linii vložen promotor lidského cytomegaloviru, pro zvýšení stability vzniklé mRNA byl plasmid obohacen o posttranskripční regulační sekvenci WPRE („woodchuck post-transcriptional regulatory element“). Dále byla přidána sekvence Kozakové, která zabezpečuje translaci DNA na ribosomech. A jako poslední byl pro ukončení transkripce genu vložen polyadenylační signál [39].

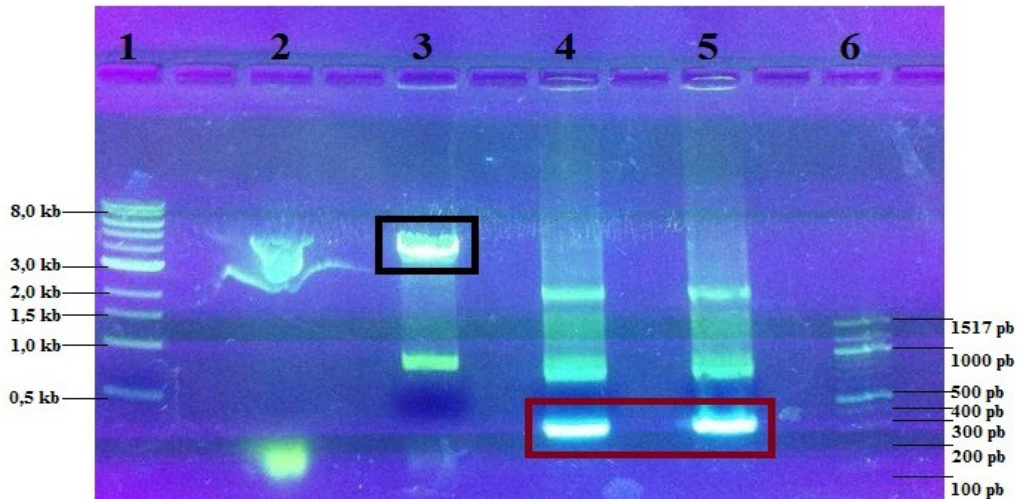
```
ATGAGTGCCAAAAAGGCTTCCCAACCTATGCTCAATACCACAGGCAGCCTGCAGGAGGGAGAAATGGGTAAAAT
GTTCCATGGGAAATGTCTCAGAATCGTCTCCCCGAATCTCCTGCTAAGCTTTACTGCTGCTATGGAGTGATCAT
GGTCCTCAGTGTAGCTGTAGTTGCTCTTTCTGTTGCTTTGTCAGTAAAAAATGACACCACAGATCTCAACCATAAAAT
ACCTACGCTGCTTGCCCGAGAAACTGGATTGGAGTTGGAAATAAATGTTTTTATTTTTCTGAATATGCAAGTAACT
GGACATTAGCCAGACCTTCTGCAAGGCACAAGAGGCCGAGCTAGCACGATTTGACACCGAGGAGGAGCTGA
ATTTCTTAAGCAGATACAAAGGGAGTTTTGATTACTGGATCGGCCTGCACAGAGAGTCTCAGAGCACCTTGG
AAGTGGACAGACAACACTCAGTATAACTACTCGCTTTCCATCCGGGGAGTGGAAAGATATGCCTACCTGAACGA
CATCGGGATCAGCAGTGCCAGGGTCTATGCAGACAAAAGATGAGCTGTAGCAGACTTAACAGCTATAGCCTC
CAATGCAAAACTCCTTTTTCTCCTATGTAG
```

**Obrázek č. 7** - Nukleotidová sekvence rClrb. Černě je vyznačena intracelulární část receptoru, modře konstrukt C1, červeně konstrukt C2, podtržením jsou zvýrazněny místa nasedání PCR oligonukleotidů.

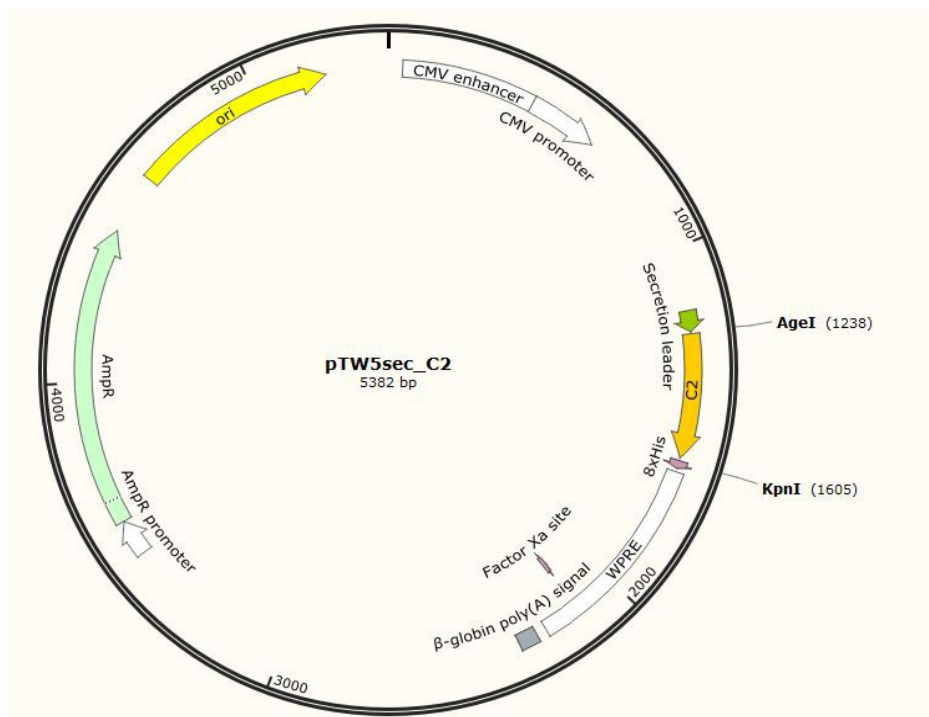
```
MSAKKASQPMLNTTGSLQEGEMGKMFHGKCLRIVSPESPAKLYCCYGVIMVLS
VAVVALSVALSVKMTPQISTINTYAACPRNWIGVGNKCFYFSEYASNWTFSQTF
CKAQEAELARFDTEEELNFLSRYKGSFDYWIGLHRESSEHPWKWTDNTQYNY
SLSIRGVERYAYLNDIGISSARVYADKRWSCSRLNSYSLQCKTPFSPM
```

**Obrázek č. 8** - Aminokyselinová sekvence rClrb. Černě je vyznačena intracelulární část, červeným podbarvením transmembránový úsek, modře konstrukt C1, fialově konstrukt C2, žlutě cysteiny a růžově N-glykosylační místa.

Insert byl dále štěpen restričními endonukleasami *AgeI* a *KpnI* a ligován do plasmidu pTW5\_sec, který byl připraven vyštěpením zhruba 1000 pb velké sekvence pro nitrilasu z plasmidu pTW5\_sec\_NitAB a následným vložení 357 pb insertu pro Clrb. Správnost provedených reakcí byla ověřena agarosovou elektroforesou v 1% gelu, viz obrázek č. 9. Po izolaci z gelu byl i PCR reakci produkt štěpen restričními enzymy *AgeI*, *KpnI*. Enzymová reakce byla zastavena zvýšením teploty z 37 °C na 65 °C, čímž se enzymy inaktivovaly. Plasmid pTW5\_sec a amplifikovaný insert byly ligovány v jeden plasmid, který nesl označení pTW5\_sec\_C2, viz obrázek č. 10 na následující straně.

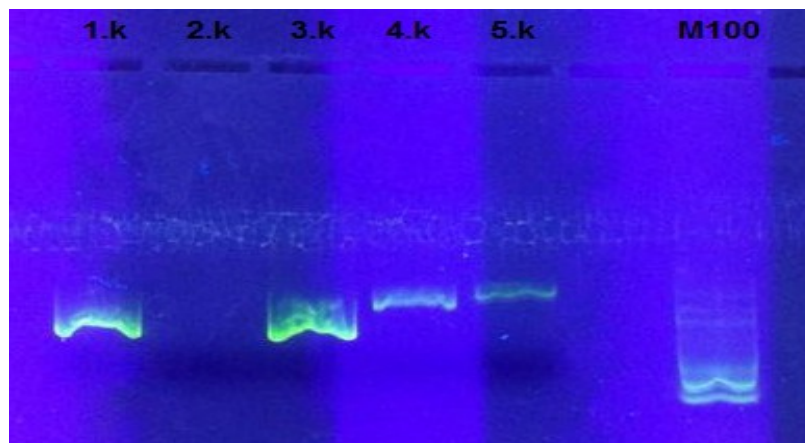


**Obrázek č. 9** - Agarosová elektroforesa plasmidu pTW5\_sec\_NitAB a amplifikovaného insertu konstruktu C2. Dráha 1- 1kb standard, dráha 2- neštěpený plasmid pTW5\_sec\_NitAB, dráha 3- štěpený plasmid pTW5\_sec\_NitAB, dráha 4 a 5- amplifikovaný insert C2, dráha 6- 100pb standard. Červený obdélník značí amplifikovaný insert (377 pb), Černý obdélník označuje linearizovaný plasmid pTW5\_sec.



**Obrázek č. 10** - Mapa vektoru *pTW5\_sec\_C2*.

Metodou rychlé transformace bylo transformováno 50  $\mu$ l kompetentních bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  [28] na plotny s LB Amp médiem. Tyto plotny byly inkubovány přes noc v inkubátoru, následující den byla z pěti kolonií, které přes noc vyrostly, provedena PCR z kolonií, detailněji popsána v kapitole 4.3. Pomocí 1% agarosové elektroforesy, viz obrázek č. 11 na straně 46, byly identifikovány ty kolonie, které nesly plasmid obsahující vložený insert C2. Celkem čtyři z pěti kolonií byly pozitivní na přítomnost insertu. Ze všech čtyř kolonií byla provedena minipreparace plasmidové DNA, jejíž postup popisuje kapitola 4.4., výtěžky a čistota plasmidů byly zjištěny pomocí spektrofotometrie. Čistota DNA se poměřuje pomocí poměru absorbancí měřených při 260 nm a 280 nm přičemž čistá DNA dosahuje poměru 1,8. Pokud se čistota plasmidu pohybuje pod hodnotou 1,8 - znamená to, že vzorek je kontaminován bílkoviny. To je způsobeno absorpcí záření aromatickými aminokyselinami bílkovin. Pokud je poměr absorbancí vyšší než 2,0 - tento výsledek poukazuje na kontaminaci RNA, která absorbuje při 260 nm [40]. Výslednou koncentraci a čistotu zobrazuje tabulka č. 10 na následující straně.



**Obrázek č. 11** - Agarosová elektroforesa PCR z kolonií. **1.k-5.k** označuje kolonii daného čísla, **M100** je 100pb standard. Tato elektroforesa byla provedena s fluorescenčním barvivem UltraPower, to jak je patrné z obrázku, ovlivnilo jak mobilitu standardu, tak mobilitu DNA. Na přítomnost insertu v plasmidu však poukazuje už samotná přítomnost PCR produktu.

**Tabulka č. 10**- Finální koncentrace plasmidů získaných minipreparací.

| Kolonie | Koncentrace              | A <sub>260/280</sub> |
|---------|--------------------------|----------------------|
| 1       | 34 ng.μl <sup>-1</sup>   | 1,60                 |
| 3       | 34,5 ng.μl <sup>-1</sup> | 1,60                 |
| 4       | 34,5 ng.μl <sup>-1</sup> | 1,64                 |
| 5       | 39,5 ng.μl <sup>-1</sup> | 1,50                 |

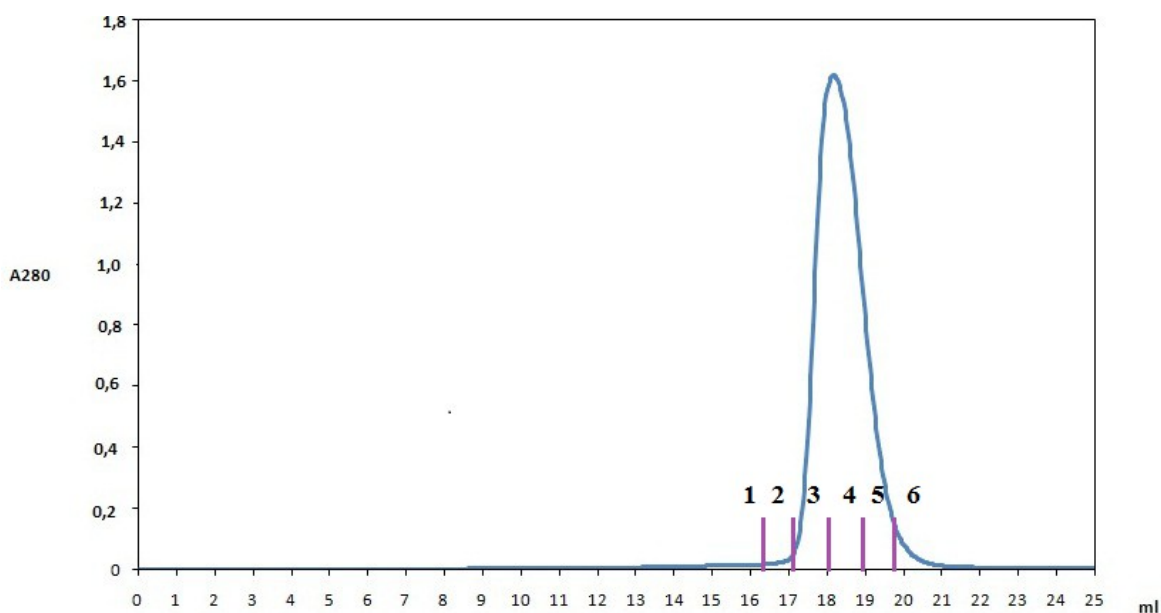
Kolonie, které vykazovaly přítomnost plasmidu pTW5\_sec\_C2, byly poslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace PřF UK. Výsledky prokázaly, že všechny kolonie obsahovaly insert požadované délky a nukleotidové sekvence. Dále se pracovalo s kolonií č. 1. Z ní bylo postupem popsáním v kapitole 4.7. připraveno zásobní množství DNA. Výtěžek zobrazuje tabulka č. 11.

**Tabulka č. 11** - Výtěžek velkoobjemové přípravy plasmidu z kolonie č. 1.

| Koncentrace             | A <sub>260/280</sub> |
|-------------------------|----------------------|
| 9,5 μg.μl <sup>-1</sup> | 1,52                 |

## 5.2. PRODUKCE PROTEINU

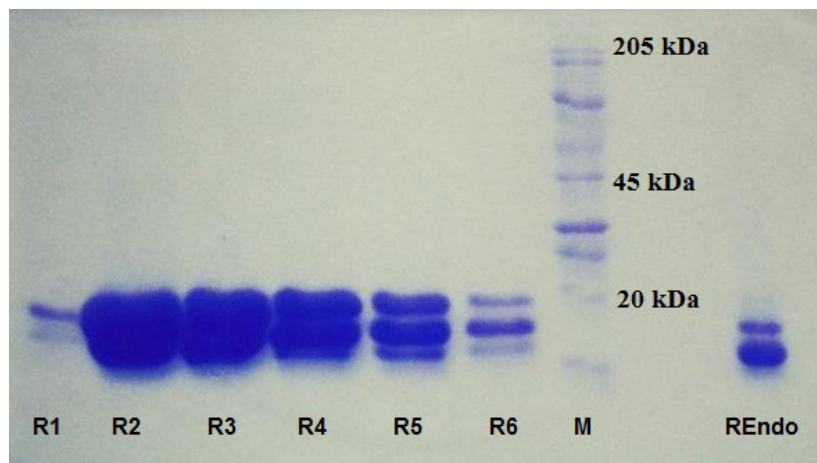
Se zásobním množstvím plasmidu pTW5\_sec\_C2 byla provedena transfekce HEK293S buněčné linie, přesný postup je zaznamenán v kapitole 4.8. Protein byl separován z média vsádkovou chromatografií pomocí nosiče Talon a následně přečištěn na HPLC systému pomocí gelové permeační chromatografie. Bylo jímáno celkem 6 frakcí. Eluci popisuje obrázek č. 12.



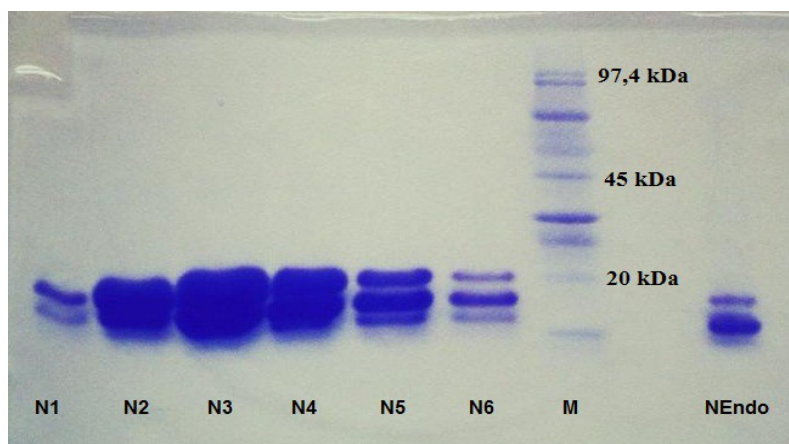
**Obrázek č. 12** - Průběh gelové permeační chromatografie. Fialové úsečky oddělují jednotlivé frakce jímání vždy přibližně po 0,8ml.

## 5.3. CHARAKTERIZACE PROTEINU

Frakce 1 - 6 byly následně charakterizovány pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí. Výsledky zachycují obrázky č. 13 a 14 na následující straně. Z výsledků je patrné, že protein byl produkován jako monomer, resp. že netvoří žádné disulfidicky vázané oligomery. Frakce 3 byla deglykosylována rekombinantním enzymem Endo F1 po dobu 2 hod ve dvou různých hmotnostních poměrech Endo F1:protein. Výsledek reakce byl opět vizualizován pomocí SDS-PAGE, viz obrázek č. 15 na straně 49.



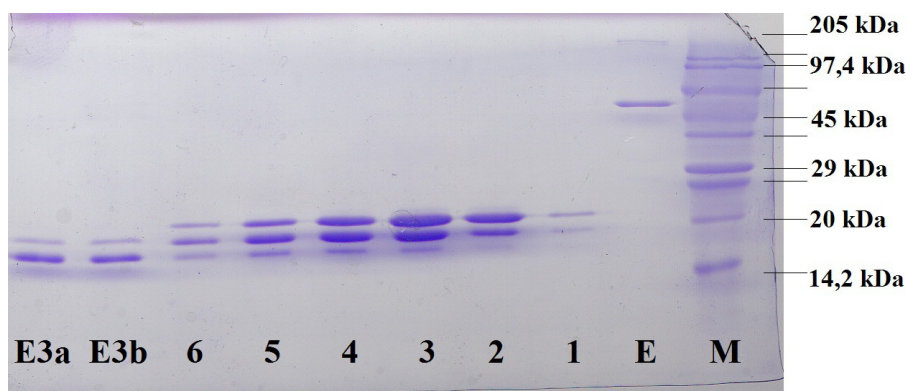
**Obrázek č. 13** - SDS-PAGE proteinu rClrb\_C2 v redukujícím prostředí. R1-R6 jsou vzorky frakcí 1-6 z gelové permeační chromatografie v redukujícím prostředí, M značí standard pro SDS-PAGE, REndo je vzorek proteinu, který byl připraven a deglykosylován Mgr. Janem Bláhou na pracovišti Univerzity v Oxfordu v redukujícím prostředí.



**Obrázek č. 14** - SDS-PAGE proteinu rClrb\_C2 v neredukujícím prostředí. N1-N6 jsou vzorky frakcí 1-6 z gelové permeační chromatografie v neredukujícím prostředí, M značí standard pro SDS-PAGE, NEndo je vzorek proteinu, který byl připraven a deglykosylován Mgr. Janem Bláhou na pracovišti Univerzity v Oxfordu v neredukujícím prostředí

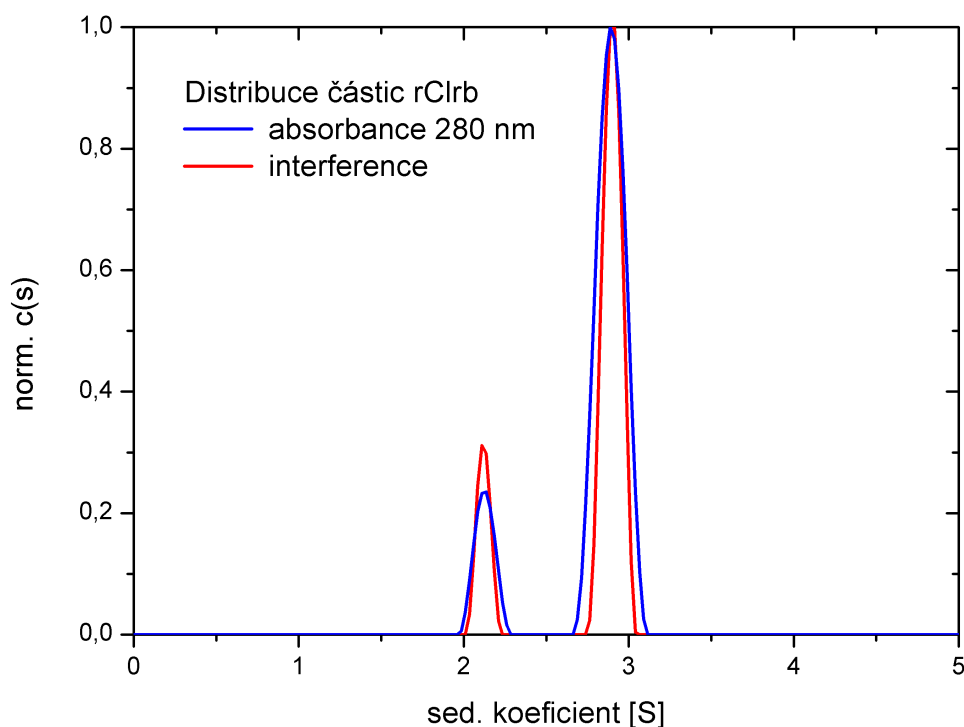
Aminokyselinová sekvence obsahuje celkem tři potenciální N-glykosylační místa, viz obrázek č. 8 na straně 43. Jedno z nich se však nachází v blízkosti cysteinu tvořícího disulfidický můstek a není pravděpodobně glykosylováno. Tento fakt byl potvrzen deglykosylací a následnou vizualizací metodou SDS-PAGE, jak zobrazuje obrázek č. 15, na nadcházející straně, kde spodní proužek odpovídá zcela deglykosylovanému proteinu, prostřední proteinu s jedním obsazeným glykosylačním místem a vrchní proužek se dvěma místy.





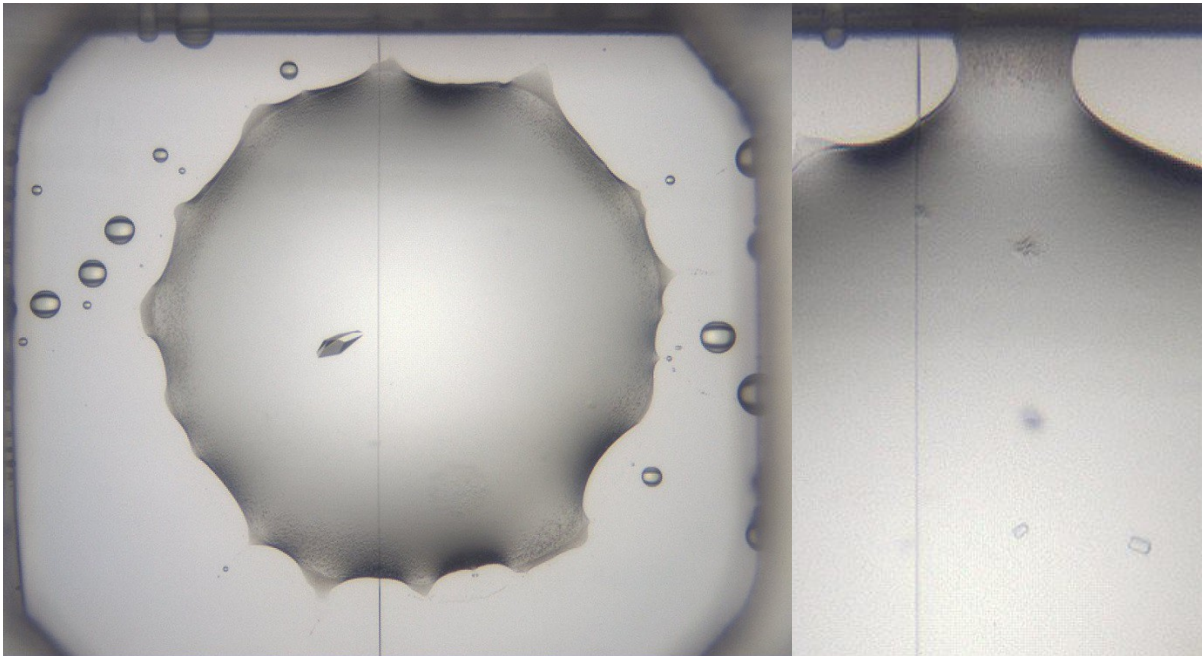
**Obrázek č. 15** - SDS-PAGE deglykosylovaného proteinu rClrb\_C2 v neredukujícím prostředí. **M** značí standard pro SDS-PAGE, **E** je enzym Endo F1, **1-6** jsou vzorky frakcí 1-6 po gelové permeační chromatografii, **E3b** je deglykosylovaná frakce 3 (v poměru protein:Endo F1= 100:1) a v dráze **E3a** je deglykosylovaná frakce 3 (v poměru protein:Endo F1= 50:1).

Metodou sedimentační rychlosti byl analyzován vzorek proteinu rClrb\_C2 o koncentraci  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Sedimentační data byla vyhodnocena metodou kontinuální distribuce sedimentujících částic  $c(s)$  v závislosti na jejich sedimentačním koeficientu, a to jak pro data získaná měřením absorpance při 280 nm, tak pro data z interferenčního optického systému. V obou případech bylo shodně pozorováno, že se protein v roztoku vyskytuje ve formě dvou částic se sedimentačním koeficientem  $s_{20,w} = 2,13$  a  $2,89 \text{ S}$ , viz obrázek č. 16 na následující straně. To vzhledem k jeho molekulové hmotnosti (17046 Da – monomer, 34092 Da – dimer) dobře odpovídá monomeru a dimeru, pravděpodobně ve stavu dynamické rovnováhy. Z dat byla dále získána přibližná molekulová hmotnost, která činila 21 a 33 kDa, což v rámci přesnosti odhadu poměrně dobře odpovídá skutečným hmotnostem monomeru a dimeru. Velikost molekuly byla stanovena přibližně na  $2-3 \times 5-7 \text{ nm}$  pro monomer a  $3-4 \times 6-8 \text{ nm}$  pro dimer, což koreluje s velikostí molekul příbuzných receptorů o známé krystalové struktuře, např. CD69 [11]. Měření a vyhodnocení výsledků provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.



**Obrázek č. 16** - Sedimentační analýza rClrb\_C2. Protein byl analyzován pomocí analytické ultracentrifugy metodou sedimentační rychlosti v koncentraci  $0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$  pomocí absorbanční a interferenční optiky. Na vertikální ose jsou vyneseny normalizované hodnoty distribuce sedimentujících částic o daném sedimentačním koeficientu.

S proteinem připraveným v laboratoři *Henry Wellcome Building for Genomic Medicine University of Oxford* bylo nasazeno široké spektrum krystalizačních podmínek. S proteinovým preparátem v nativním a deglykosylovaném stavu bylo paralelně nasazeno celkem 960 krystalizačních kapek na deseti 96 jamkových krystalizačních destičkách. Vývoj krystalizačních experimentů byl díky digitální kontrole sledován prostřednictvím internetu. Dosud byl pozorován vznik krystalů nativního proteinu v krystalizačních podmínkách o složení: 12% w/v PEG 20000, 0,1 M imidazol, pH=7,0, viz obrázek č. 17 na následující straně. Krystalizaci proteinu provedl Mgr. Jan Bláha.



**Obrázek č. 17** - Krystalizace rClrb\_C2. Krystaly nativního proteinu pozorované v krystalizační podmínce o složení 12% w/v PEG 20000, 0,1 M imidazol, pH 7,0, výchozí koncentrace proteinového roztoku je 9,5 mg/ml (vlevo), resp. 7 mg/ml (vpravo).

## 6. Diskuze

Prvním cílem práce bylo připravit expresní vektor pro rekombinantní expresi rozpustné extracelulární domény potkaního receptoru Clrb. To se podařilo, ačkoli ligace vektoru byla omylem provedena při 37 °C, přičemž správně by měla probíhat při laboratorní teplotě. To zřejmě vysvětluje jen několik kolonií narostlých na LB Amp plotně.

Pro vnesení vektoru do buněk HEK293S GnTI- buněčné linie byl použit transientní způsob. To znamená, že buňky nebyly schopny si vložený plasmid předávat z generace na generaci. Je tedy výhodné, aby se buňky množily co nejpomaleji a byly odolné vůči apoptose. Proto byl vektor vložen do buněk kotransfekcí s plasmidy pTW5\_sec\_p27 (kódující protein p27) a pTW5\_sec\_αFGF (kódující růstový faktor z acidofilních fibroblastů). Protein p27 je inhibítorem cyklin dependentních kinas, ty hrají velkou roli v buněčném cyklu. Na počátku buněčného cyklu je pomocí cyklin dependentních kinas spuštěna kondensace chromosomů, rozpad jaderného obalu a tvorba dělicího vřeténka. Po transfekci byla ke směsi přidána kyselina valproová, která slouží jako inhibitor histondeacetylas. HEK293S GnTI- je buněčná kultura, která postrádá aktivitu N-acetylglukosaminyltransferasy I (GnTI). Veškeré proteiny produkované touto linií mají homogenní manosovou N-glykosylaci [41].

Protein při gelové permeační chromatografii putoval v elučním objemu 16 až 19 ml, což ze zkušenosti s receptory podobnými lektinům C-typu může odpovídat jak dimeru, tak monomeru rozpustné extracelulární domény, v závislosti na jejím tvaru a interakci s maticí kolony. Proto byla provedena sedimentační analýza v analytické ultracentrifuze, kde se skutečně ukázalo, že protein tvoří v roztoku nekovalentní dimer, ovšem tato dimerizace je závislá na koncentraci proteinu – ve zředěných roztocích se dimer bude pravděpodobně rozpadat na monomer.

Na obrázku č. 15 na straně 50 v dráze E obsahující kontrolní vzorek endoglykosidasy Endo F1 není patrný pouze jeden proužek. To je pravděpodobně dané tím, že enzym je rekombinantně exprimován ve formě fúzního proteinu s glutathion-S-transferasou, která slouží jako afinitní značka pro purifikaci enzymu. Další viditelné proužky o nižší molekulové hmotnosti jsou pravděpodobně proteolytické fragmenty fúzního proteinu pomalu vznikající při dlouhodobém skladování enzymu.

Z charakterizace proteinu deglykosylací je patrné, že deglykosylace neproběhla úplně. Lepších výsledků by mohlo být pravděpodobně dosaženo, kdybychom prodloužili reakční čas, popřípadě navýšili poměr Endo F1 v reakční směsi. Dále je z analýzy patrné, že jedno z glykosylačních míst není obsazeno. Na základě aminokyselinové sekvence předpokládáme, že

se jedná o neklasické glykosylační místo NKC, kde je namísto obvyklého serinu či threoninu přítomen cystein. Glykosylace na tomto motivu však již byla několika proteinech pozorována, mj. právě např. na extracelulární doméně lidského receptoru CD69 [42], který je receptoru Clrb poměrně blízce příbuzný. S větší pravděpodobností by tento fakt potvrdila charakterizace pomocí hmotnostní spektrometrie.

## 7. Závěr

Rekombinantní expresí v buněčné linii HEK293S GnTI<sup>-</sup> byl připraven konstrukt potkaního receptoru Clrb\_C2 a byla provedena jeho purifikace. Bylo potvrzeno úspěšné odstranění dimerizačního cysteinu, protein se při SDS-PAGE v neredukujícím prostředí chová jako monomer a netvoří disulfidicky vázané oligomery. Deglykosylace rekombinantním enzymem Endo F1 poukázala na obsazení dvou ze tří teoretických míst N-glykosylace. Z měření sedimentační rychlosti protein pomocí analytické ultracentrifugy vyplývá, že protein se v roztoku vyskytuje převážně jako nekovalentní dimer. Byly získány první krystaly konstruktů C2 receptoru Clrb.

## 8. Seznam citované literatury

- [1] HOŘEJŠÍ V., BARTUŇKOVÁ J.: Základy imunologie. 4.vydání, Praha, Triton (2009)
- [2] GODFREY, D.I., MACDONALD, H., KRONENBERG, M., SMYTH, M., VAN KAER, L.: NKT Cells: What's in a Name?. *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4 (3) (2004)
- [3] BRIGL, M., BRENNER MB.: CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.*, 22 (2004)
- [4] dostupné online 10.3.2015  
<http://humanphysiology.wikispaces.com/08-+Immune+System>
- [5] dostupné online 12.4.2015  
<http://medquarterly.com/mq88/index.php/nimmunoinfectious/article/26cellsorgans-and-tissues-of-the-immune-system>
- [6] ROZENBERG G.: Microscopical Haematology: a practical guide for the laboratory. 3<sup>th</sup> edition, Elsevier Australia (2011)
- [7] GREENBERG, A.H.: The Origins of the NK Cell, Or a Canadian in King Ivan's Court. *Clin Invest Med.*, vol. 17 (6) (1994)
- [8] BIASSONI R., COLIGAN, J., MORETTA, L.: Natural Killer Cells in Healthy and Diseased Subjects. *J Biomed Biotechnol.*, vol. 2011 (2011)
- [9] KIESSLING, R., KLEIN, E., WIGZELL, H.: Natural killer cells in the mouse. *Eur J Immunol.*, vol. 5 (1975)
- [10] dostupné online 24.3.2015  
<http://www.conkwest.com/natural-killer-cells>
- [11] MALE, D., BROSTOFF, J., ROTH, D., ROITT, I.: Immunology. 7<sup>th</sup> edition, Elsevier (2006)
- [12] COOPER, M., FEHNIGER, T., CALIGIURI, A.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, vol. 22 (11) (2011)
- [13] GRÉGOIRE, C., CHASSON, L., CARMELO, L., TOMASELLO, E., GEISSMANN, F., VIVIER, E., WALZER, T.: The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.*, 220 (2007)
- [14] MORETTA A., BOTTINO, C., MINGARI, MC., BIASSONI, R., MORETTA, L.: What is a natural killer cell?. *Nat Immunol.*, 3 (2002)
- [15] COOPER M, FEHNIGER T, TURNER, S.: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood.*, vol. 97 (2010)
- [16] VIVIER E., SPITS H., CUPEDO T.: Interleukin-22-producing innate immune cells: new players in mucosal immunity and tissue repair?. *Nat Rev Immunol.*, vol 4 (2009)
- [17] ASHKAR A., DISANTO, J., CROY, B.: Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.*, vol. 2 (2000)

- [18] HAO L., KLEIN J., MASATOSHI N.: Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 103 (9) (2006)
- [19] SMYTH, M., HAYAKAWA, Y., YAGITA, H.: New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 2 (2002)
- [20] VIVIER E., UGOLINI S.: Poster on NK cells: receptors and functions. *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10 (12) (2012)
- [21] WALTZ, C., LONG, E.: Signal Transduction During Activation and Inhibition of Natural Killer Cells. *Curr. Protoc. Immunol.*, vol, 11 (2010)
- [22] YOKOYAMA W., PLOUGASTEL B.: *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3 (2003)
- [23] BARTEL, Y., BAUER, B., STEINLE, A.: Modulation of NK cell function by genetically coupled C-type lectin-like receptor/ligand pairs encoded in the human natural killer gene complex. *Front. in Immunol.*, vol. 4 (2013)
- [24] KIRKHAM, CH., CARLYLE, J.: Complexity and diversity of the NKR-P1:Clr (Klrbl:Clec2) recognition systems. *Front. in Immunol.*, 2 (2014)
- [25] AUST, J., GAYS, F., et al.: The Expression and Function of the NKRP1 Receptor Family in C57BL/6 Mice. *J Immunol.*, vol. 183, (1) (2009)
- [26] dostupné online 10.5.2015  
[www.geneaid.com/sites/default/files/DF13.pdf](http://www.geneaid.com/sites/default/files/DF13.pdf)
- [27] dostupné online 22.4.2015  
<http://www.geneaid.com/products/plasmid-dna-purification/plasmid-kit-miniprep>
- [28] dostupné online 4.5.2015  
<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/166/t3001i.pdf>
- [29] dostupné online 17.3.2015  
[www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Plasm%20DNA%20Purification/SP\\_NBXtra\\_LargeConstructs.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasm%20DNA%20Purification/SP_NBXtra_LargeConstructs.pdf)
- [30] dostupné online 20.4.2015  
[http://www.modernibiofyzika.cz/kurzy/OU/2011/OU\\_zaklad\\_kurz\\_2011.pdf](http://www.modernibiofyzika.cz/kurzy/OU/2011/OU_zaklad_kurz_2011.pdf)
- [31] dostupné online 10.3.2015  
[www.kenkyuu.net/js/nacalc/html](http://www.kenkyuu.net/js/nacalc/html)
- [32] dostupné online 10.4.2015  
[www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc71501796\\_20140108234952.pdf](http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc71501796_20140108234952.pdf)
- [33] dostupné online 14.5.2015  
[web.expasy.org](http://web.expasy.org)
- [34] VANĚK, O., BEZOUŠKA, K.: *Chem. Listy.*, 104 (2010)
- [35] dostupné online 10.5.2015  
[www.jphilo.mailway.com](http://www.jphilo.mailway.com)
- [36] SCHUCK, C.: *Biophys J.*, 78 (2000)
- [37] dostupné online 10.5.2015  
[www.analyticalultracentrifugation.com](http://www.analyticalultracentrifugation.com)



- [38] DVORSKÁ, A.: Strukturní biologie komplexu potkaních NK buněčných receptorů NKR-P1B a Clrb: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2004)
- [39] POLÁCHOVÁ, E.: Příprava expresních vektorů regulujících buněčný cyklus a apoptózu pro optimalizaci expresního systému HEK293 buněčné linie: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2014)
- [40] VOET D., VOETOVÁ J.: Biochemistry, Victoria Publishing, Praha (1995)
- [41] NETTLESHIP, J.: Structural Biology of Glycoproteins. InTech (2002)
- [42] VANCE, B., WU, W., RIBAUDO, R., SEGAL, D., KEARSE, K.: Multiple dimeric forms of human CD69 result from differential addition of N-glycans to typical (Asn-X-Ser/Thr) and atypical (Asn-X-cys) glycosylation motifs. *J Biol Chem.* vol. 272 (37), (1997)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely, a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

| Jméno, příjmení;<br>adresa | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|----------------------------|----------|-----------------|----------|
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |
|                            |          |                 |          |