

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra biochemie



**Příprava vektoru pro rekombinantní expresi proteinu
NKR-P1A, receptoru potkaních NK buněk**

Bakalářská práce

Němcová Petra

Školitel: Mgr. Ondřej Vaněk

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc.

Praha 2007

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOUNA CHEMIE



3233141186

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli Mgr. Ondřejovi Vaňkovi za vstřícné odborné vedení, cenné rady a velkou trpělivost při vypracovávání této bakalářské práce.

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. za možnost vypracování bakalářské práce. Všem členům Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také svým rodičům za jejich podporu poskytovanou po celou dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele Mgr. Ondřeje Vaňka a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 28.5.2007

Petra Němcová

Petra Němcová

Seznam použitých zkratek

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátce
bp	počet párů bazí, jednotka délky řetězce DNA
BSA	hovězí sérový albumin
CD	označení povrchových molekul leukocytů
CRD	lektinová doména rozpoznávající sacharid
CTLD	doména podobná lektinům C-typu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	směs deoxynukleotidtrifosfátů
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Fc	fragment imunoglobulinu po štěpení papainem
FcγRIII	receptor III pro Fc část IgG
GalNAc	N-acetyl-D-galaktosamin
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
H-2	hlavní histokompatibilní myší komplex
HLA	hlavní histokompatibilní lidský komplex
IFN	interferon
IL	interleukin
Ig	imunoglobulin
ITAM	imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu
ITIM	imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu
KIR	zabíječský receptor imunoglobulinového typu
LAK	lymfokinem aktivované buňky
LB	název média dle Luria-Bertaniho
LCR	komplex genů leukocytárních receptorů
ManNAc	N-acetyl-D-manosamin
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NK	přirozeně zabíječské buňky
NKC	komplex genů NK buněčných receptorů
NKD	NK buněčná doména
NK-T	přirozeně zabíječské T buňky

PCR	polymerázová řetězová reakce
rpm	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfátsodný
TCR	antigenní receptor T lymfocytů
TNF	faktor nekrotizující nádory
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Obsah

Seznam použitých zkratek	4
1. LITERÁRNÍ ÚVOD	8
1.1. Imunitní systém.....	8
1.2. NK buňky.....	8
1.3. Receptory NK buněk	10
1.3.1. Receptory imunoglobulinové rodiny	11
1.3.2. Receptory C-lektinového typu	11
1.3.3. Rodina receptorů NKR-P1	12
1.4. rNKR-P1A	13
2. CÍL PRÁCE.....	15
3. MATERIÁL	16
3.1. Přístroje a pomůcky	16
3.2. Chemikálie	17
3.2.1. Enzymy	17
3.2.2. Bakteriální kmeny.....	18
3.2.3. Vektory	18
3.2.4. Primery pro PCR.....	18
3.2.5. Roztoky a média	18
4. METODY	20
4.1. Fosforylace primeru.....	20
4.2. PCR	20
4.3. Štěpení pomocí restrikčního enzymu Hind III.....	21
4.4. Příprava linearizovaného plasmidu pRSET B	21
4.5. Preparativní elektroforéza.....	22
4.6. Extrakce DNA z gelu pomocí kitu.....	22
4.7. Ligace.....	22
4.8. Transformace bakterií	22
4.9. Rychlá izolace plasmidové DNA, restrikční štěpení pomocí enzymů Hind III, Nde I	23
4.10. Izolace plasmidové DNA.....	23

4.11. Kontrolní restrikční štěpení	24
4.12. Příprava zásobního množství plasmidu	24
5. VÝSLEDKY	27
5.1. Příprava expresního vektoru	27
5.2. Ověření správnosti připraveného vektoru restrikčním štěpením	30
5.3. Příprava zásobního množství plasmidu	31
6. DISKUSE.....	34
7. SOUHRN	36
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	37

1. Literární úvod

1.1. Imunitní systém

Imunitní systém udržuje integritu organismu, rozeznává škodlivé látky od neškodných, a tím chrání organismus od škodlivin vnitřního i vnějšího původu.

Imunitní systém pracuje na základě dvou mechanismů, prvním z nich je neadaptivní mechanismus. Neadaptivní, též nespecifický, mechanismus je evolučně starší a je zajišťován buněčnými i humorálními složkami. Mezi buněčné složky patří fagocytující a NK buňky. Humorálními složkami jsou interferony, komplementový systém, lektiny a jiné sérové proteiny. Tyto molekuly a buňky jsou v organismu připravené předem a reagují na společné strukturní nebo funkční rysy škodlivin velmi rychle, řádově v minutách. Nemají tzv. imunologickou paměť.

Zatímco neadaptivní mechanismus je znám u všech mnohobuněčných organismů, druhý, adaptivní, mechanismus je přítomný až u obratlovců. Specifické molekuly adaptivního mechanismu (protilátky, antigenně specifické receptory T-lymfocytů) reagují na cizorodé látky až po setkání s daným antigenem, mají tzv. imunologickou paměť. Rozvoj imunitní reakce nastává za několik dnů až týdnů.

Pro obratlovce jsou oba uvedené mechanismy nezbytné a vzájemně spolupracují¹.

1.2. NK buňky

V 70. letech minulého století byla objevena nová subpopulace lymfocytů označená jako NK buňky (z angl. natural killer). NK buňky byly prvotně charakterizovány jako lymfocyty, které mají schopnost zabíjet nádorové buňky bez předchozí stimulace². NK buňky se diferencují společně s B a T buňkami z lymfoidní linie z pluripotentních kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni¹. Od ostatních lymfocytů se odlišují absencí receptorů pro antigen, které byly nalezeny na B a T buňkách³.

Ačkoliv NK buněčná aktivita byla původně popsána u myší a člověka, byly tyto buňky izolovány z mnoha obratlovců, včetně opic, potkanů, křečků, koček, psů, ptáků a ryb. NK buňky se nacházejí ve slezině, kostní dřeni, játrech, plicích, střevech a rovněž v periferní krvi².

Mechanismus rozeznávání abnormálních buněk vysvětuje „missing self“ hypotéza, podle které NK buňky rozeznávají buňky, které mají na svém povrchu abnormálně malé množství MHC molekul I. třídy (z angl. major histocompatibility complex). Lidské MHC molekuly se nazývají HLA (z angl. human leukocyte antigen), homologické myši molekuly H-2. Nádorové a i některé viry infikované buňky se brání napadení T buňkami tím, že snižují povrchovou expresi MHC glykoproteinů I. třídy¹.

Po setkání NK buňky s některou jinou buňkou může dojít k aktivaci nebo inhibici NK buněčné činnosti, podle toho zda převáží stimulační nebo inhibiční signály. Pokud má buňka na svém povrchu normální množství MHC molekul I. třídy, dochází k převaze negativních signálů a NK buňka není aktivována. Má-li buňka abnormálně málo MHC glykoproteinů I. třídy, pak je cílová buňka NK buňkou cytotoxicky zabita. NK buňky používají tři druhy cytotoxických mechanismů. Cytoplazma NK buněk obsahuje cytotoxické granule, ve kterých se nachází protein perforin a proteasy zvané granzomy. Poté co je rozpoznána abnormální buňka, dochází k migraci cytotoxických granulí k plazmatické membráně v místě kontaktu buněk, tyto granule fúzují s membránou a jejich obsah je uvolněn do úzké štěrbiny mezi buňkami. Perforin vytváří póry, kterými se do buňky dostanou granzomy. Ty štěpí v cytoplazmě prekurzory proteas ze skupiny tzv. kaspas, dochází k jejich aktivaci. Kaspasy spustí sled reakcí, který končí apoptotickou smrtí buňky¹. Druhým cytotoxickým mechanismem je Fas-Fas ligand cesta. Na povrchu NK buněk se nachází protein zvaný Fas-ligand. Fas-ligand patří do rodiny TNF (z angl. tumor necrosis factor), váže se na apoptotický receptor Fas, který je přítomný na povrchu mnoha různých buněk. Signály se přenášejí přes receptor Fas do buňky, kaskádou reakcí dochází k apoptotické smrti buňky^{1,4}. Třetím cytotoxickým mechanismem je cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC, z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity). ADCC je zprostředkována specifickým receptorem NK buněk, známým jako Fc γ RIII (CD 16), prostřednictvím tohoto receptoru se NK buňka váže na konstantní část protilátek třídy IgG^{1,2}.

NK buňky mají i regulační funkce, které jsou zprostředkovány produkci cytokinů. Cytokiny ovlivňují proliferaci a cytotoxickou aktivitu NK buněk. Mezi nejvíce studované patří interferony (IFN) a IL-2. Interferony α , β a γ mohou zvyšovat cytotoxickou aktivitu NK buněk, přičemž interferony α a β stimulují aktivitu NK buněk ve větší míře než IFN- γ . Interferony nezpůsobují proliferaci NK buněk, ve skutečnosti se zdá, že inhibují NK

buněčnou proliferaci, která je vyvolaná IL-2. Na druhé straně IFN a IL-2 synergicky zvyšují cytotoxicitu NK buněk².

Četné studie ukazují, že NK buňky nemají úlohu jen v protinádorovém imunitním dohledu, ale že hrají roli v obraně proti některým virům, kterými mohou být infikovány savčí buňky (včetně herpesvirů, viru kravských neštovic, spalniček, příušnic, chřipky). NK buňky mohou likvidovat i jiné patogeny – gram pozitivní i gram negativní bakterie, příkladem jsou *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii* a *Trypanosoma cruzi*. NK buňky se rovněž podílejí na regulaci hematopoézy².

Mezi první pokusy využití NK buněk v klinické terapii se řadí podávání LAK buněk (lymfokiny aktivované zabíječské buňky) pacientům, které měli diagnostikované solidní nádory v pokročilém stadiu².

Zvláštní typ buněk představují NK-T lymfocyty. Tyto buňky mají receptor TCR (z angl. T-cell receptor) typu αβ, který je charakteristický pro povrch T lymfocytů, ale zároveň na svém povrchu nesou celou řadu receptorů, které jsou typické pro NK buňky¹.

1.3. Receptory NK buněk

NK buňky mají dva typy povrchových receptorů, a to receptory aktivační a inhibiční. Působení NK buněk je zprostředkováno zapojením inhibičních a aktivačních signálů vysílaných povrchovými receptory po interakci s ligandem. Inhibiční receptory rozpoznávají zdravé buňky od buněk abnormálních pomocí mapování povrchové exprese MHC glykoproteinů I. třídy^{1,5}. Mezi receptory rozpoznávající MHC molekuly I. třídy patří tři odlišné receptorové rodiny: KIR, Ly-49 a CD94/NKG2⁶.

Inhibiční receptory obsahují imunoreceptorový tyrosin vázající inhibiční motiv ITIM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Tento motiv (V/IxYxxL/V) se vyskytuje v cytoplazmatické doméně těchto receptorů. Na ITIM sekvenci se váže protein tyrosin fosfatasa 1 (SHP1) a další fosfatasy jako SHP2 a SHIP1 (inositol polyfosfát 5'fosfatasa), a tak je inhibována signalizační kaskáda³.

Aktivační receptory obsahují v transmembránové části nabité aminokyseliny, které interagují s transmembránovými proteiny, které obsahují imunoreceptorový tyrosin vázající aktivační motiv ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Jedná se o sekvenci aminokyselin D/ExxYxxL/I oddělenou 6-8 aminokyselinami od

sekvence YxxL/I. Transmembránovými molekulami jsou DAP12, Fc ϵ RI γ a CD3 ζ . K aktivaci NK buněk dochází kaskádou fosforylačních reakcí ³.

Aktivační i inhibiční receptory jsou kódovány geny, které jsou lokalizovány ve dvou odlišných regionech: NK genový komplex (NKC, z angl. natural killer complex), který se nachází u myší na 6., u lidí na 12. a u potkanů na 4. chromozomu, kóduje lektinové receptory C-typu; receptory imunoglobulinové rodiny jsou kódovány LCR komplexem (z angl. leucocyte-receptor complex) ^{3,5,6}.

1.3.1. Receptory imunoglobulinové rodiny

Do této rodiny receptorů patří například membránové receptory NK buněk Fc γ RIII a CD2, ale především se sem řadí receptory KIR. Receptory KIR (z angl. killer Ig-like receptor) jsou charakterizovány počtem imunoglobulinových domén, KIR2D obsahuje dvě domény imunoglobulinového typu, zatímco KIR3D mají tyto domény tři. Receptory KIR jsou dále charakterizovány délkou cytoplazmatické domény. Receptory KIR s dlouhou cytoplazmatickou doménou (KIR2DL nebo KIR3DL) obsahují ITIM motiv a jsou zodpovědné za inhibiční funkci těchto molekul, receptory s krátkou cytoplazmatickou doménou (KIR2DS nebo KIR3DS) tento motiv nemají a vysílají aktivační signály skrze asociaci adaptorové signální molekuly DAP12 a nabitého transmembránového úseku. Některé receptory KIR mají specifické ligandy, kterými jsou klasické molekuly HLA. U člověka jsou tyto receptory kódovány LCR komplexem, který se nachází na 19. chromosomu. Byly nalezeny homology těchto receptorů u primátů, avšak myší nebo potkaní homology, které by rozeznávaly H-2, zatím nebyly identifikovány ^{5,6}.

1.3.2. Receptory C-lektinového typu

Lektinové receptory C-typu jsou transmembránové proteiny II. typu, tyto proteiny mají C-konec extracelulární a N-konec je lokalizován v cytoplazmě. Jsou klasifikovány jako V. skupina C-lektinové rodiny. Lektiny jsou proteiny, které mají schopnost vázat sacharidy beze změny jejich struktury, C-lektiny byly nazvané dle skutečnosti, že jejich vazebná aktivita závisí na přítomnosti Ca²⁺ iontů ^{1,7}.

Lektinové receptory C-typu jsou disulfidicky vázané dimery, které v extracelulární části mají zpravidla šest cysteinových zbytků tvořících disulfidové můstky. Jejich struktura

kromě C-terminální domény dále obsahuje krček variabilní délky, transmembránovou část a doménu intracelulární. C-terminální doména těchto receptorů se nazývá NK buněčná doména (NKD, z angl. natural killer domain), tato doména tvoří podskupinu CTLD domén (z angl. C-type lectin-like domain). Druhou podskupinu CTLD domén reprezentuje CRD doména, tzv. sacharid rozpoznávající doména (z angl. carbohydrate-recognition domain), která je doménou klasických lektinů C-typu. CTLD i NKD domény jsou evolučně uzpůsobeny tak, aby vyhovovaly velkému množství strukturně odlišných potenciálních ligandů. Ligandy pro CRD domény jsou pouze sacharidy a vápník^{3,7}.

Do skupiny C-lektinového typu patří rodina receptorů NKR-P1, Ly-49 a NKG2. V odstavci 1.3.3. bude popsána rodina receptorů NKR-P1. Rodina receptorů Ly-49 byla nejlépe charakterizována u myší, kde ji kóduje 16 genů a pseudogenů (Ly-49A – Ly-49Q). Většina členů této rodiny má inhibiční funkci, ale receptory Ly-49D a H fungují jako receptory aktivační. Tyto receptory byly nalezeny také u potkanů. U člověka byl nalezen jeden gen známý jako Ly-49L, který je sice přepisován, ale zdá se, že kóduje nefunkční molekulu. I rodina receptorů NKG2 je složena z aktivačních i inhibičních receptorů. Aby došlo k jejich expresi na buněčném povrchu a mohla být plněna jejich funkce, musí tyto receptory dimerizovat s molekulou CD94³.

Mezi další receptory kódované NK genovým komplexem patří lidské receptory LLT1 (z angl. lectin-like transcript), AICL (z angl. activation-induced C-type lectin), myší CLR (z angl. C-lectin related protein). Tyto molekuly tvoří další rodinu receptorů, která je strukturně podobná molekule CD69. Tento receptor patří mezi první molekuly exprimované během aktivace NK buňky³.

1.3.3. Rodina receptorů NKR-P1

Receptory NKR-P1 patří do skupiny lektinů C-typu, jsou exprimovány jako disulfidicky vázané homodimery na povrchu většiny NK buněk a podskupiny T buněk⁶.

Tyto receptory byly identifikovány u myší, potkanů a člověka. Na myších NK buňkách se vyskytuje pět receptorů z rodiny NKR-P1. Receptory NKR-P1A, C, F patří mezi aktivační receptory, obsahují nabity transmembránový úsek, který je důležitý pro asociaci s adaptorovými molekulami. Inhibiční receptory NKR-P1B a NKR-P1D ve své cytoplazmatické doméně obsahují motiv ITIM³. U potkanů byly identifikovány tři proteiny patřící do této rodiny, NKR-P1-A a dva receptory s odlišnými sekvencemi, které

jsou v GenBank uvedeny pod označením NKR-P1B, respektive U56936 a X97477. U56936 narozdíl od X97477 obsahuje ITIM motiv. Sekvence X97477 byla označena jako NKR-P1D^{8,9}. Dospod byl nalezen pouze jeden lidský homolog označený jako NKR-P1A. U všech hlodavcích receptorů NKR-P1 se nachází CxCP motiv, který byl také nalezen v cytoplazmatické doméně CD4 a CD8 receptorů, kde interaguje s protein tyrosin kinasou rodiny Src – p56^{lck}. Lidský receptor NKR-P1A tento motiv neobsahuje⁶. Nedávno byly nalezeny fyziologické ligandy pro myší receptory NKR-P1F a NKR-P1D, které rozeznávají CLR-G, respektive CLR-B¹⁰. Byl identifikován rovněž ligand pro lidský receptor NKR-P1A, kterým je LLT1¹¹. Fyziologické ligandy pro ostatní receptory rodiny NKR-P1 dosud nebyly nalezeny⁶.

1.4. rNKR-P1A

Receptor rNKR-P1A se vyskytuje na povrchu potkaních NK buněk, kde je prezentován jako disulfidicky vázaný homodimer o velikosti 60 kDa¹². Funkčními studiemi bylo dokázáno, že receptor rNKR-P1A patří mezi aktivační receptory NK buněk¹³. Jako zástupce rodiny receptorů C-lektinového typu vykazuje i jejich strukturu, která byla popsána výše (odstavec 1.3.2.). Lektinová doména tohoto receptoru obsahuje dvě disulfidové vazby mezi Cys₁₂₂ – Cys₂₁₀ a Cys₁₈₉ – Cys₂₀₂, které korespondují s CRD doménou klasických C-lektinů¹⁴. Některé CRD domény nazývané pak jako „dlouhé“ obsahují další dva disulfidicky vázané cysteinové zbytky blíže N-terminální části¹⁵. Třetí disulfidová vazba mezi Cys₉₄ – Cys₁₀₅ lektinovou doménu tohoto receptoru řadí mezi „dlouhou“ doménu¹⁶.

Studie tohoto receptoru se zabývají jeho molekulární stavbou a vazebnými vlastnostmi, jsou vyhledávány sacharidové ligandy pro tento receptor a zkoumána je také vazba vápníku⁷.

Počáteční biochemické studie týkající se vazby vápníku ukazují, že vápník je nezbytný pro správné sbalení proteinu *in vitro*⁷. Jiné studie vykonané pracovní skupinou v Harrow navrhují, že lektinová doména tohoto receptoru nebude vázat Ca²⁺, ačkoliv rNKR-P1A patří mezi lektiny C-typu¹⁶.

Identifikace ligandů receptoru rNKR-P1A je nezbytná pro pochopení toho, jak tento protein participuje na aktivaci NK buněčné činnosti. Dospod byla objevena celá řada sacharidových ligandů, jedná se o acetylované hexosaminy – N-acetyl-D-manosamin,

N-acetyl-D-galaktosamin a N-acetyl-D-glukosamin. Jako silné neutrální sacharidové ligandy byly identifikovány disacharid GalNAc β 1→4ManNAc a trisacharid GalNAc β 1→4GlcNAc β 1→4ManNAc. Mimo tyto sacharidové struktury byly objeveny vysoko afinitní ligandy obsahující oligosacharidové motivy např. glykosaminglykanů. Preinkubace nádorových buněk s liposomy nesoucí sacharidové ligandy pro receptor rNKR-P1A může výrazně zvýšit zabíjení těchto buněk. Tyto přirozené ligandy mají však řadu nevýhod, příkladem je omezená dostupnost, nízká stabilita a vysoká cena. Výzkum byl zaměřen na sloučeniny kombinující sacharidovou strukturu se syntetickou kostrou – sacharidové mimikry. Sacharidové mimikry slouží k prezentaci ligandu tomuto receptoru. Fyziologický ligand zůstává však stále neznámý⁷.

2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- připravit expresní vektor pro protein rNKR-P1A
- ověřit správnost připraveného plasmidu restrikčním štěpením
- připravit zásobního množství plasmidu

3. Materiál

3.1. Přístroje a pomůcky

• Analytické váhy	<i>AND</i> , USA
• Automatické pipety	<i>Gilson</i> , USA
• Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter</i> , USA
• Centrifuga MPW-375	<i>Mechanika Precyzyjna</i> , Polsko
• Centrifuga VSMC-13	<i>Shelton scientific</i> , USA
• Centrifuga Z 233 MK-2	<i>Hermle</i> , Německo
• Centrifuga stolní, Spectrofuge 16M	<i>Edison</i> , USA
• Chladnička	<i>Zannusi</i> , Itálie
• JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	<i>Genomed</i> , Německo
• JETQUICK Plasmid Purification Spin Kit	<i>Genomed</i> , Německo
• Ledovač UBE 50-35	<i>Ziegra</i> , Německo
• Luminescentní analyzátor LAS-1000 CH	<i>Fuji photo film</i> , Japonsko
• Magnetická míchačka MM 2A	<i>Lab.přístroje Praha</i> , ČR
• Mrazící box (-80°C) Bio Freezer	<i>Forma scientific</i> , USA
• Mrazící box (-20°C)	<i>Zannusi</i> , Itálie
• pH metr Φ 200	<i>Beckman</i> , Německo
• Předvázky HF-1200 G	<i>AND</i> , USA
• Rotační vakuová odparka	<i>Trigon</i> , Francie
• Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Sigma</i> , USA
• Spektrofotometr DU-70	<i>Beckman</i> , Německo
• Termocykler	<i>Eppendorf</i> , Německo
• Termostat BT 120M	<i>Lab.přístroje Praha</i> , ČR
• Třepačka	<i>VELP Scientifica</i> , Itálie
• UV lampa UVGL-58	<i>Science Company</i> , USA
• Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica</i> , Itálie
• Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore</i> , USA
• Zdroj napětí BM 551	<i>Tesla</i> , ČR

3.2. Chemikálie

• Agar	<i>Oxoid</i> , Anglie
• Agarosa	<i>Jersey Lab Supply</i> , USA
• Ampicilin	<i>Biotika</i> , SR
• Bromfenolová modř	<i>Sigma</i> , USA
• BSA	<i>New England Biolabs</i> , USA
• dNTP	<i>Fermentas</i> , Kanada
• EDTA	<i>Fluka</i> , Švýcarsko
• Ethanol	<i>Lachema</i> , ČR
• Ethidiumbromid	<i>Jersey Lab Supply</i> , USA
• Fenol	<i>Reactiva</i> , Rumunsko
• Glukosa	<i>Lachema</i> , ČR
• Glycerol	<i>Sigma</i> , USA
• Chlorid sodný	<i>Lachema</i> , ČR
• Chloroform	<i>Lachema</i> , ČR
• Isoamylalkohol	<i>Lachema</i> , ČR
• Isopropylalkohol	<i>Lachema</i> , ČR
• Kvasničný extrakt	<i>Imuna Pharm</i> , ČR
• Kyselina octová	<i>Lachema</i> , ČR
• Octan sodný	<i>Lachema</i> , ČR
• Polyethylenglykol M _r = 8000	<i>Fluka</i> , Švýcarsko
• Sacharosa	<i>Lachema</i> , ČR
• Síran hořečnatý	<i>Lachema</i> , ČR
• Standard pro agarosovou elektroforézu	<i>New England Biolabs</i> , USA
• Tetracyklin	<i>Lab scientific</i> , USA
• Tris	<i>Serva</i> , USA
• Trypton	<i>Oxoid</i> , Anglie

3.2.1. Enzymy

• Bst XI (10000 U/ml)	<i>New England Biolabs</i> , USA
-----------------------	----------------------------------

• Dde I (10000 U/ml)	<i>New England Biolabs</i> , USA
• Deep Vent DNA polymerasa (2000 U/ml)	<i>New England Biolabs</i> , USA
• Hind III (20000 U/ml)	<i>New England Biolabs</i> , USA
• Klenowův fragment	<i>Fermentas</i> , Kanada
• Lysozym	<i>Fluka</i> , Švýcarsko
• Nde I (20000 U/ml)	<i>New England Biolabs</i> , USA
• RNAasa A (10 mg/ml)	<i>Sigma</i> , USA
• T4 DNA ligasa (1000 U/μl)	<i>Fermentas</i> , Kanada
• T4 polynukleotidkinasa (10000 U/ml)	<i>New England Biolabs</i> , USA
• Xba I (20000 U/ml)	<i>New England Biolabs</i> , USA

3.2.2. Bakteriální kmeny

- *E. coli*: XL 1-BLUE STRAIN *E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'proAB lac^rZΔM15 Tn10 (Tet^r)] *Stratagene*, USA

3.2.3. Vektory

- pRSET B (1 μg/μl) *Invitrogen*, USA

3.2.4. Primery pro PCR

- Reverzní primer pRSET BRE*62B2
5' TAG TTA TTG CTC AGC GGT GGC AGC 3'
Invitrogen, USA
- Přímý primer RNKRPI FW M2
5' TGG CTA AGT TAA AGT GCC CAA AAG AC 3'
Generi Biotech, ČR

3.2.5. Roztoky a média

- **LB agar:** 1,5 % agar v LB médiu
- použité koncentrace antibiotik:
ampicilin 150 μg/ml (zásobní koncentrace 150 mg/ml)

tetracyklin 12,5 µg/ml (zásobní koncentrace 5 mg/ml)

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

- použité koncentrace antibiotik:

ampicilin 150 µg/ml (zásobní koncentrace 150 mg/ml)

tetracyklin 12,5 µg/ml (zásobní koncentrace 5 mg/ml)

- **Pufr pro T4 DNA ligasu** - 1 x koncentrovaný: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, pH = 7,5 (*Fermentas*, Kanada)

- **EP pufr:** 10 mM Tris (pH = 8,0), 1 mM EDTA, 15 % sacharosa, 2 mg/ml lysozym, 0,2 mg/ml RNAasa, 0,1 mg/ml BSA

- **NEB2 pufr:** 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH = 7,9 (*New England Biolabs*, USA)

- **NEB3 pufr:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH = 7,9 (*New England Biolabs*, USA)

- **PCR pufr** - Thermo pol, 1 x koncentrovaný: 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100, pH = 8,8 (*New England Biolabs*, USA)

- **Roztok L1:** NaClO₄, octan sodný, TBE (*Genomed*, Německo)

- **Roztok L2:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl (*Genomed*, Německo)

- **Roztok G1:** 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAasa A (*Genomed*, Německo)

- **Roztok G2:** 200 mM NaOH, 1 % SDS (*Genomed*, Německo)

- **Roztok G3:** guanidin hydrochlorid, octan sodný (*Genomed*, Německo)

- **Roztok GX:** guanidin hydrochlorid (*Genomed*, Německo)

- **Roztok G4:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl (*Genomed*, Německo)

- **Gel pro agarosovou elektroforézu:** 1 % agarosa v TAE pufru, 2 µl ethidiumbromid, resp. 1,1 % agarosa v TAE pufru, 4 µl ethidiumbromid pro preparativní elektroforézu

- **Pufr pro agarosovou elektroforézu** - TAE pufr, 1 x koncentrovaný: 40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA

- **STOP pufr:** 50 % glycerol, bromfenolová modř, ethanol, TE pufr

- **TE pufr:** 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH = 8,0

- **Roztok I:** 50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA

- **Roztok II:** 3 mM octan sodný, 10 % CH₃COOH

4. Metody¹⁸

4.1. Fosforylace primeru

Pro fosforylací přímého primeru RNKRP1 FW M2 byla použita T4 polynukleotidkinasa. Směs 42 µl ddH₂O, 2 µl 0,1 mM primeru RNKRP1 FW M2, 5 µl pufru pro T4 DNA ligasu (10 x koncentrovaný) a 1 µl T4 polynukleotidkinasy byla inkubována 30 min při 37°C.

4.2. PCR

Byla připravena reakční směs pro PCR, která obsahovala 29,5 µl ddH₂O, 1,5 µl 100 mM MgSO₄, 5 µl PCR pufru (10 x koncentrovaný), 1,5 µl 10 mM dNTP, 6 µl 4 µM fosforylovaného primeru RNKRP1 FW M2, 5 µl 5 µM reverzního primeru pRSET BRE*62B2, 1 µl templátu, 0,5 µl Deep Vent DNA polymerasy.

PCR reakce proběhla v termocykleru. Program PCR reakce byl nastaven následovně:

- 1) 94°C 2 min
- 2) 35 cyklů: 94°C – 30 s, 52°C – 30 s, 72°C – 60 s
- 3) 72°C 10 min

Po těchto krocích se teplota snížila na 4°C, až do té doby než byl produkt z termocykleru vyjmut.

Výsledný produkt PCR byl detekován pomocí agarové elektroforézy. Ke 2 µl PCR produktu bylo přidáno 8 µl STOP pufru. Tato směs byla nanесена do jamky agarového gelu, do druhé jamky bylo vneseno 2 µl standardu. Elektroforéza byla ponechána probíhat 30 min při 120 V.

Jako standard pro agarovou elektroforézu byl použit plasmid pRSET B naštěpený restrikční endonukleasou Dde I. Tento standard byl získán smícháním 10 µl plasmidu pRSET B, 26 µl Tris-HCl pufru o pH = 8, 4 µl NEB3 pufru, 1 µl enzymu Dde I. Tato směs byla inkubována při 37 °C 4 hod, po ukončení inkubace bylo přidáno 12 µl STOP pufru.

Se zbylým PCR produktem bylo provedeno srážení. K produktu bylo napipetováno 5 μ l 3 M octanu sodného a 125 μ l 100 % ethanolu. Směs byla nechána srážet při -20°C asi 12 hod. Vysrážený vzorek byl centrifugován v chlazeném rotoru při 12000 x g po dobu 20 min.

Tento postup byl proveden dvakrát kvůli získání dostatečného množství PCR produktu.

4.3. Štěpení pomocí restrikčního enzymu Hind III

Výsledný produkt PCR reakce byl štěpen pomocí restrikční endonukleasy Hind III, takto naštěpený produkt byl dále použit pro ligaci. Restrikční enzymy byly uchovávány při -20°C, pro zachování jejich aktivity byly při práci umístěny do ledu. Ke sraženině PCR produktu bylo přidáno 34 μ l ddH₂O, dále 4 μ l NEB2 pufru a 2 μ l enzymu Hind III. Směs byla inkubována 3 hod při teplotě 37°C.

4.4. Příprava linearizovaného plasmidu pRSET B

Pro ligaci bylo potřeba získat linearizovaný plasmid pRSET B, linearizace proběhla ve třech krocích.

Prvním krokem bylo restrikční štěpení pomocí enzymu Nde I. K 1 μ l plasmidu pRSET B bylo přidáno 16 μ l ddH₂O, 2 μ l NEB2 pufru a 1,5 μ l enzymu Nde I. Směs byla inkubována po dobu 3 hod při teplotě 37°C.

Druhým krokem bylo zarovnání Nde I místa Klenowovým fragmentem. Byla připravena směs obsahující 6 μ l ddH₂O, 1 μ l NEB2 pufru, 3 μ l 333 μ M dNTP, 1 μ l Klenowova fragmentu a 20 μ l linearizovaného plasmidu pRSET B (získaného z předchozího kroku). Poté byla provedena inkubace 15 min při 25°C a následně inaktivace 20 min při 75°C.

Posledním třetím krokem bylo štěpení pomocí restrikčního enzymu Hind III. Směs obsahující 9 μ l ddH₂O, 1 μ l NEB2 pufru, 1,5 μ l enzymu Hind III a 30 μ l linearizovaného plasmidu pRSET B (z předchozího kroku) byla ponechána inkubovat 3 hod při teplotě 37°C.

4.5. Preparativní elektroforéza

Ke 40 µl připraveného linearizovaného plasmidu pRSET B bylo přidáno 10 µl STOP pufru, toto množství pufru bylo také přidáno ke 40 µl naštěpeného PCR produktu (dále insert). Ke kontrole sloužil nenaštěpený plasmid pRSET B, k 1 µl tohoto plasmidu bylo napippetováno 2 µl STOP pufru a 5 µl ddH₂O. Takto připravené vzorky byly naneseny do jamek agarosového gelu. Elektroforéza byla ponechána probíhat po dobu 30 min nejdříve při 40 V, poté bylo napětí zvýšeno na 80 V.

Výsledky byly detekovány pod dlouhovlnnou UV lampou, byla vyříznuta část gelu obsahující linearizovaný plasmid a insert.

4.6. Extrakce DNA z gelu pomocí kitu

Extrakce DNA z gelu pomocí kitu byla provedena dle instrukcí od výrobce. K vyříznutým vzorkům gelu bylo přidáno 900 µl roztoku L1 a vzorky byly ponechány inkubovat při 50°C 15 min. Vzorky byly napippetovány do příslušných kolonek vložených v mikrozkumavce a byla provedena centrifugace (12000 x g, 1 min). Následně byly kolonky promyty 500 µl roztoku L2 a opět byla provedena centrifugace (12000 x g, 1 min). Vzorky DNA byly vymyty 50 µl ddH₂O a odstředěny při 12000 x g 2 min.

4.7. Ligace

K ligaci molekul DNA byla použita T4 DNA ligasa. Pro ligaci byl použit insert a linearizovaný plasmid získaný v předchozím kroku.

Ligační směs byla připravena z 6 µl ddH₂O, 2 µl pufru pro T4 DNA ligasu, 2 µl linearizovaného plasmidu, 10 µl insertu a 1 µl T4 DNA ligasy. Ligace byla ponechána probíhat v chladničce při 4 °C po dobu 70 hodin.

4.8. Transformace bakterií

Pro transformaci bakterií bylo využito metody tepelného šoku. Kompetentní buňky uchovávané při -80°C byly nechány roztát na ledu. Ke 150 µl těchto buněk byla přidána

ligační směs. Směs byla inkubována 30 min na ledu. Poté byla směs ponořena na 50 s do vodní lázně o teplotě 42°C a ihned uložena na led. Po 1 min byl přidán 1 ml sterilního LB média a směs byla ponechána inkubovat 1 hod při 37°C. Po ukončení inkubace byla směs odstředěna při 1500 x g 2 min, bylo ponecháno přibližně 100 µl supernatantu, v němž byly pelety resuspendovány. Poté byly naneseny na Petriho misku obsahující tuhé LB médium, ampicilin a tetracyklin. Bakterie byly ponechány inkubovat při 37°C 17 hod. Misky s vyrostlými koloniemi byly uchovávány při 4°C v chladničce.

Deset kolonií bylo naočkováno do 2 ml LB média s příslušnými antibiotiky a ponecháno třepat rychlostí 200 rpm při 37°C přes noc. Byl odebrán 1 ml kultury, odstředěn při 12000 x g 5 min. Pelety byly uchovávány v chladničce při 4°C. Druhý ml kultury byl převeden do 10 ml LB média s příslušnými antibiotiky, následovalo třepání ve sterilních zkumavkách rychlostí 200 rpm při 37°C přes noc. Bakteriální kultury byly uloženy v chladničce, 4°C.

4.9. Rychlá izolace plasmidové DNA, restrikční štěpení pomocí enzymů Hind III, Nde I

Pelety byly resuspendovány pomocí vortexového mixéru ve 30 µl EP pufru (z angl. easy prep), suspenze byly ponechány 10 min na ledu a 5 min povařeny. Suspenze byly odstředěny (3 min, 12000 x g). K 10 µl supernatantu bylo přidáno 1 µl NEB2 pufru, 0,2 µl enzymu Hind III a 0,2 µl enzymu Nde I. Roztoky byly ponechány inkubovat 3 hod při 37°C, poté k nim bylo přidáno 3 µl STOP pufru. Vzorky byly naneseny na start agarosového gelu, elektroforéza byla ponechána probíhat 30 min při 120 V. Byly vybrány buňky se správně vneseným plasmidem.

4.10. Izolace plasmidové DNA

Vybrané bakteriální kultury (uchovávané v chladničce) byly odstředěny (12000 x g, 2 min), z pelet byla izolována DNA pomocí kitu.

K peletám bylo přidáno 250 µl roztoku G1, pelety byly resuspendovány pomocí pipety. K suspenzi bylo přidáno 250 µl roztoku G2, směs byla opatrně promíchána a ponechána inkubovat 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 350 µl roztoku G3,

směs byla opět opatrně promíchána a odstředěna při 12000 x g po dobu 10 min. Supernatant byl převeden do kolonky uložené v mikrozkumavce, zcentrifugován při 12000 x g 1 min. Do kolonky bylo dále přidáno 500 µl roztoku GX, roztok byl odstředěn při 12000 x g 1 min. Poté bylo do kolonky napijetováno 500 µl roztoku G4 a odstředěno při 12000 x g 1 min. Na závěr bylo přidáno 75 µl ddH₂O, odstředěno 1 min při 12000 x g. Supernatanty byly uchovávány zmrazené na -20°C.

4.11. Kontrolní restrikční štěpení

Kontrolní restrikční štěpení bylo provedeno s dvojicí enzymů Nde I a Hind III, Bst XI a Hind III, Xba I a Hind III. Poslední uvedené restrikční štěpení probíhalo v prostředí BSA.

Byly připraveny roztoky obsahující 0,2 µl jednotlivých enzymů a 1 µl NEB2 pufru, třetí roztok byl ještě doplněn o 0,2 µl BSA. K těmto roztokům bylo přidáno 10 µl plasmidu. Směs obsahující enzym Bst XI byla inkubována 1 hod při 55°C a 1 hod při 37°C. Ostatní směsi byly inkubovány 2 hod při 37°C. Po inkubaci bylo přidáno 3 µl STOP pufru a vzorky byly naneseny na agarosový gel, společně s 2 µl standardu. Agarosová elektroforéza byla ponechána probíhat při 120 V 30 min.

4.12. Příprava zásobního množství plasmidu

Prvním krokem při přípravě zásobního množství plasmidu byla transformace bakterií.

Transformace bakterií byla prováděna metodou tepelného šoku. Kompetentní buňky uchovávané při -80°C byly ponechány roztát na ledu. K 40 µl těchto buněk bylo přidáno 10 µl plasmidu. Směs byla ponechána reagovat 1 hod na ledu, poté byla ponořena do lázně o teplotě 42°C na 45 s a ihned uložena na led. Po 2 min byl přidán 1 ml sterilního LB média a směs byla inkubována 1 hod při 37°C na třepačce při 200 rpm. Směs byla odstředěna při 100 x g 5 min, následně při 1000 x g další 3 min. Bylo odebráno 800 µl supernatantu, ve zbylém supernatantu byly pelety resuspendovány. Následovalo nanesení na Petriho misku obsahující tuhé LB médium s antibiotiky. Bakterie byly ponechány inkubovat při 37°C přes noc. Misky s vyrostlými koloniemi byly uchovávány při 4°C v chladničce.

Na misku s vyrostlými koloniemi bylo aplikováno 5 ml sterilního LB média, v tomto médiu byly buňky resuspendovány pomocí bakteriální kličky, suspenze byla následně přenesena do 200 ml sterilního LB média s příslušnými antibiotiky. Bakteriální kultura byla ponechána růst na třepačce při 36°C a 200 rpm přes noc. Poté byla odstředěna při 12000 x g 10 min a zmrazena, -20°C.

K peletě bylo přidáno 13 ml roztoku I, peleta byla resuspendována pomocí vortexového mixéru. Po převedení suspenze do kyvety byla provedena centrifugace po dobu 10 min při 2300 x g a 4°C. Po centrifugaci bylo přidáno 17,5 mg lysozymu v 3,5 ml roztoku I, enzym byl ponechán působit 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 7 ml 0,2 N NaOH, / 1 % SDS, směs byla promíchána pomocí vortexového mixéru a ihned převedena na led na 10 min. Poté bylo přidáno 5,2 ml roztoku II, směs byla promíchána a převedena na led. Po 10 min byla provedena centrifugace při 12000 x g, 4°C po dobu 30 min. K supernatantu bylo přidáno 10 ml isopropanolu. Po 15 min stání za laboratorní teploty byla provedena centrifugace při 12000 x g po dobu 30 min. Peleta byla promyta 70 % ethanolem, ethanol byl odstraněn. Po vyschnutí kyvety bylo přidáno 0,5 ml TE pufru a 10 µl RNAasy A. Dále byla provedena extrakce 0,5 ml směsi fenolu a chloroformu (1:1), směs byla promíchána 30 s na vortexovém mixéru a odstředěna při 12000 x g 5 min. Horní vrstva byla odebrána a dále zpracovávána. K této vrstvě bylo přidáno 0,5 ml směsi chloroformu:isoamylalkoholu (49:1), směs byla promíchána na vortexovém mixéru a odstředěna při 12000 x g po dobu 5 min. Opět byla odebrána horní vrstva, ke které bylo přidáno 50 µl 3 M octanu sodného a 1250 µl 100 % ethanolu. Roztok byl promíchán a uložen na 30 min do mrazícího boxu, -78°C. Poté byla provedena centrifugace při 12000 x g po dobu 5 min, supernatant byl odstraněn, peleta byla promyta 70 % ethanolem a ponechána vyschnout v rotační vakuové odparce. Peleta byla resuspendována ve 160 µl ddH₂O, dále bylo přidáno 40 µl 4 M NaCl a 200 µl 13 % polyethylenglykolu, směs byla ponechána srážet v chladničce při 4°C po dobu asi 60 hod. Vysrážená směs byla odstředěna při 4°C, 12000 x g po dobu 30 min, supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována ve 100 µl TE pufru. Dále byly extrahovány proteiny od plasmidové DNA postupně pomocí 100 µl fenolu, směsi fenolu:chloroformu a směsi chloroformu a isoamylalkoholu. Směs byla vždy promíchána na vortexovém mixéru, odstředěna při 12000 x g po dobu 10 min, vždy byla odebrána horní vrstva, která byla dále zpracovávána. Po posledním kroku bylo k této vrstvě přidáno 10 µl octanu sodného a 250 µl 100 % ethanolu. Směs byla promíchána, ponechána srážet při teplotě -78°C po dobu 30 min a

následně odstředěna při 12000 x g po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn, peleta byla promyta 100 µl 70 % ethanolu, ethanol byl odstraněn a peleta byla vysušena v rotační vakuové odparce. Po vysušení byla peleta resuspendována v 300 µl TE pufru. Zásobní roztok plasmidu byl uchováván v mrazícím boxu při -20°C. 5 µl takto získaného plasmidu bylo naředěno 1 ml ddH₂O, u tohoto roztoku byla změřena absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm. Jako srovnávací vzorek sloužil roztok 5 µl TE pufru v 1 ml vody. Toto měření absorbance bylo použito ke stanovení čistoty DNA. Pro čistou DNA je poměr A₂₆₀/A₂₈₀ roven přibližně 1,8. Pokud je DNA znečištěna proteiny bude tento poměr nižší vlivem vznikající absorpce proteinů při vlnové délce 280 nm.

Bylo provedeno kontrolní restrikční štěpení se zásobním roztokem plasmidu a s dvojicí enzymů Bst XI a Hind III, NdeI a Hind III. Vždy byl připraven roztok obsahující 2 µl ddH₂O, 2 µl NEB2 pufru, 1 µl jednotlivých enzymů a 5 µl roztoku plasmidu. Roztok obsahující enzymy NdeI a Hind III byl inkubován při 37°C 1 hod, roztok obsahující enzymy Bst XI a Hind III byl inkubován 0,5 hod při 55°C ve vodní lázni a následně při 37°C další 0,5 hod. Po inkubaci bylo přidáno 5 µl STOP pufru a vzorky byly naneseny na start agarosového gelu, společně se 4 µl standardu. Elektroforéza byla ponechána probíhat při 120 V 30 min.

5. Výsledky

5.1. Příprava expresního vektoru

Příprava expresního vektoru zahrnuje vložení požadovaného fragmentu DNA – insertu do vektoru, kterým je v tomto případě plasmid. Insert byl připraven pomocí PCR reakce. Při přípravě insertu se vycházelo z plasmidu pRSET B, který obsahoval sekvenci kódující protein rNKR-P1A v rozmezí aminokyselin Glu₈₁ – Lys₂₁₅, tento plasmid byl použit jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci. Plasmid pRSET B obsahuje selekční marker, který je zodpovědný za rezistenci vůči ampicilinu. Sekvence Glu₈₁ – Lys₂₁₅ je vyznačena modře a oranžově na obr. 1. Cílem bylo připravit takový expresní vektor, který by obsahoval insert o sekvenci kódující protein rNKR-P1A začínající Ala₉₀ a končící Lys₂₁₅, na obr. 1 znázorněno oranžově.

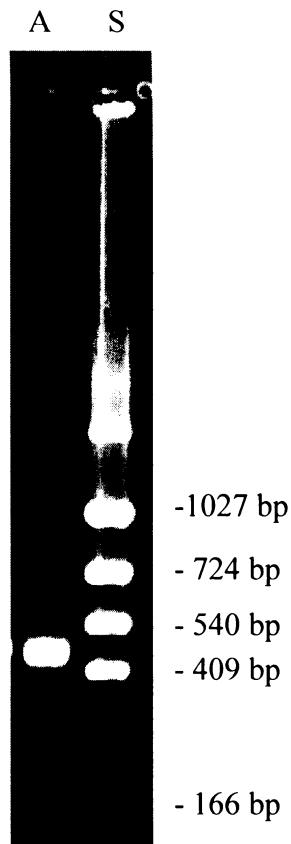
MDTARVYLSLKPSKTAAGAQCVSPPSLPPDACRCPRSHRLALKLSCAGLILLV
LALVGMSILVRVLVQKPSVEPCRVLIQE█LSKTGSPAKLKCPKDWLSHRDKC
FHVSQTSITWKESSLADCGGKGATLLLVDQEEELRFLR█LTKRISSFWIGLSY
TLSDENWKWI█GSTLNSDVLSITGDTEKDSCASVSQDKVLSECDSDNIWVCQ
KEI.KCECMC█DS

Obr. 1: Sekvence aminokyselin potkaního receptoru NKR-P1A. Zeleně intracelulární část, červeně transmembránový úsek, modře sekvence obsažená v původním konstruktu rM1NKR-P1A, o kterou byl nový konstrukt zkrácen, oranžově nový konstrukt rM2NKR-P1A, žlutě cysteiny tvořící disulfidické můstky, █ potenciální místa N-glykosylace.

Před samotným provedením PCR reakce byl navržen přímý primer RNKRP1 FW M2, který byl před použitím fosforylován pomocí T4 polynukleotidkinasy. Díky fosforylací tohoto primeru zůstane fosfátová skupina na 5' konci syntetizovaného řetězce a při ligaci umožní správné spojení insertu s plasmidem. Dále byl použit univerzální reverzní primer pRSET BRE*62B2. Tyto primery vymezují velikost PCR produktu.

Výsledný produkt PCR byl detekován pomocí agarosové elektroforézy (obr. 2, str.28). Velikost PCR produktu byla určena na základě porovnání se standardem, nachází

se mezi fragmenty standardu o velikosti 409 a 540 bp, což odpovídá očekávané velikosti 450 bp.



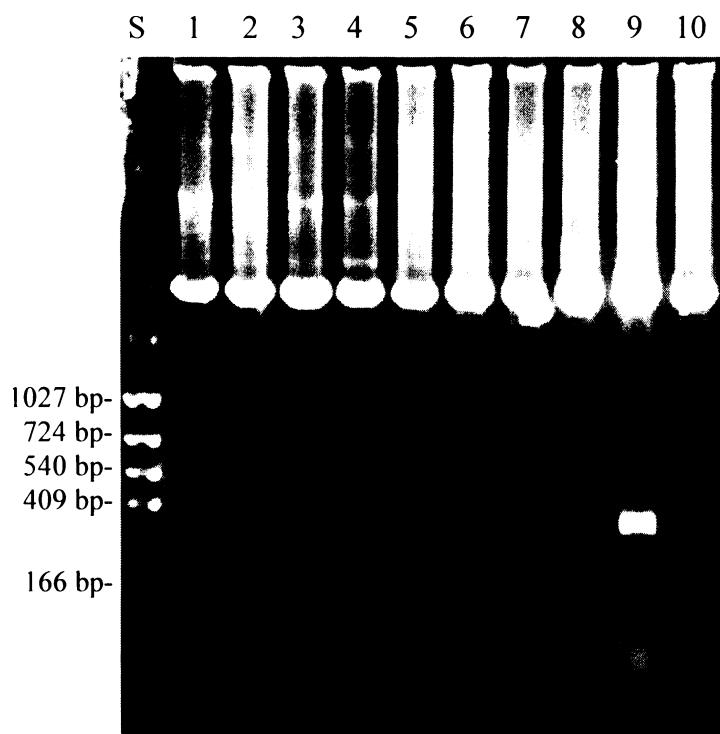
Obr. 2: Výsledek PCR reakce na agarosovém gelu. Dráha A označuje produkt PCR, S standard.

Produkt PCR byl dále zakoncentrován srážením a štěpen pomocí restrikční endonukleasy Hind III. Takto získaný fragment DNA představuje požadovaný insert o velikosti 380 bp.

Pro vložení požadovaného fragmentu DNA do plasmidu je nutné tento vektor rozštěpit restrikční endonukleasou. Linearizovaný plasmid pRSET B byl získán dle postupu uvedeného v metodické části (odstavec 4.4.). Při přípravě linearizovaného plasmidu se vycházelo z plasmidu pRSET B, který obsahoval sekvenci kódující část extracelulární domény receptoru CD 69. Plasmid pRSET B byl nejdříve štěpen restrikční endonukleasou Nde I, pro úpravu 5' přesahujícího konce byl použit Klenowův fragment, plasmid byl dále naštěpen restrikční endonukleasou Hind III. Takto byly získány kompatibilní konce pro ligaci linearizovaného plasmidu s insertem. Protože ligace je možná pouze s čistou molekulou DNA, byl plasmid a insert podroben preparativní

elektroforéze, DNA byla získána z agarosového gelu pomocí kitu firmy Genomed. K ligaci získaného linearizovaného plasmidu a insertu byla použita T4 DNA ligasa.

Připraveným vektorem byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* (kmen XL 1-BLUE) Tento kmen nese rezistenci proti antibiotiku tetracyklinu. Transformace bakterií byla provedena metodou tepelného šoku, bakterie byly vysety na misky s LB agarem obsahující antibiotika ampicilin a tetracyklin. Na misce vyrostlo asi 150 kolonií. Bylo vybráno 10 kolonií, které byly zaočkovány do zkumavek s LB médiem, ampicilinem a tetracyklinem. Bakteriální kultury byly rozděleny na dvě části. Z první části byla izolována plasmidová DNA využitím EP pufru, plasmidová DNA byla štěpena restrikčními endonukleasami Nde I a Hind III. Tento krok sloužil k selekci buněk nesoucích plasmid s insertem. Na základě agarosové elektroforézy (obr. 3) byly identifikovány plasmidy pocházející z kolonií 9 a 10 jako správné vektory nesoucí insert. Pro další práci byl vybrán plasmid č. 9. Pokud plasmidy insert neobsahovaly, na agarosovém gelu se po vizualizaci neobjevily charakteristické proužky.

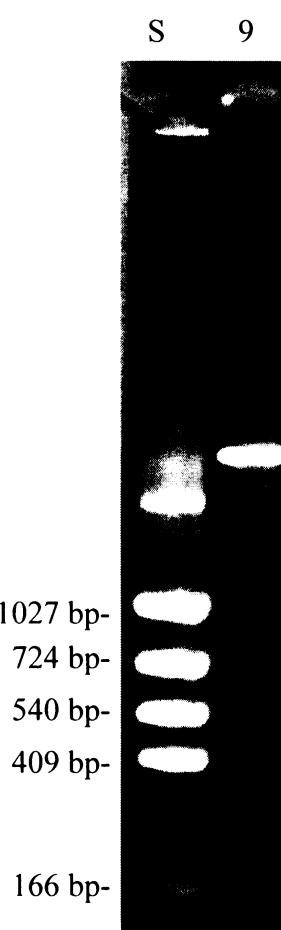


Obr. 3: Selekce buněk nesoucích plasmid s insertem pomocí agarosové elektroforézy.
Dráha S označuje standard, dráhy 1-10 kolonie, ze kterých pocházely jednotlivé plasmidy.
Jako správné plasmidy nesoucí insert byly identifikovány plasmidy označené 9 a 10.

Druhá část kultury byla převedena do 10 x 10 ml LB média obsahujícího příslušná antibiotika. Na základě předchozí selekce byla z kultury č. 9 izolována plasmidová DNA. Pro izolaci plasmidové DNA od zbytku buněčného obsahu bylo využito tzv. minipreparace, která byla provedena pomocí kitu firmy Genomed.

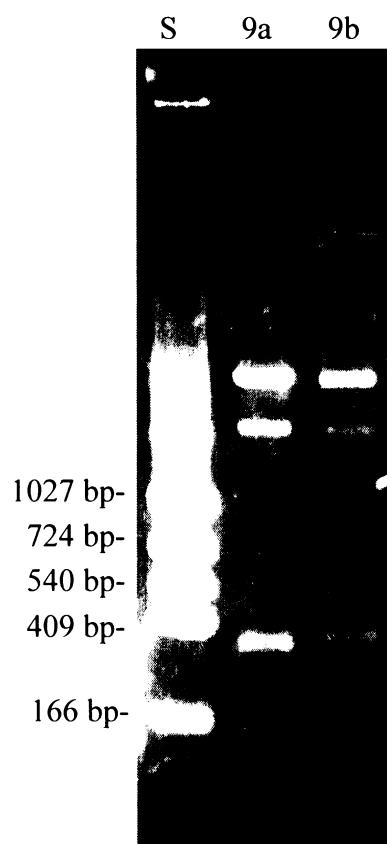
5.2. Ověření správnosti připraveného vektoru restrikčním štěpením

K ověření správnosti připraveného plasmidu bylo využito štěpení stejnými restrikčními endonukleasami, kterými byly upraveny koncová místa plasmidu pRSET B i insertu, tedy enzymy Nde I a Hind III. Naštěpený plasmid byl nanesen na agarosový gel. Pokud plasmid obsahuje insert, objeví se v oblasti 382 bp proužek (obr. 4)



Obr. 4: Kontrolní restrikční štěpení enzymy Nde I a Hind III. Dráha S označuje standard, dráha 9 štěpený plasmid pocházející z kolonie č. 9. Správnost připraveného plasmidu byla potvrzena proužkem v oblasti 382 bp.

Kontrolní restrikční štěpení bylo provedeno i s dalšími enzymy – Bst XI a Hind III, respektive Xba I a Hind III. Štěpící místo pro enzym Bst XI je obsaženo v sekvenci insertu, štěpící místo pro enzym Xba I je přítomné díky původnímu plasmidu pRSET B. Štěpení pomocí restrikčních endonukleas Bst XI a Hind III poskytuje fragment DNA o velikosti 355 bp, na obr. 5 proužek v dráze 9a. Štěpení restrikčními endonukleasami Xba I a Hind III poskytuje fragment DNA o velikosti 422 bp, na obr. 5 proužek v dráze 9b.



Obr. 5: Kontrolní restrikční štěpení. Štěpení probíhalo s enzymy Bst XI a Hind III (dráha 9a), Xba I a Hind III (dráha 9b). Velikost fragmentů DNA byla určena na základě porovnání se standardem (dráha S). Správnost připraveného plasmidu byla potvrzena proužkem v oblasti 355 bp (9a) a 422 bp (9b).

5.3. Příprava zásobního množství plasmidu

Prvním krokem při přípravě zásobního množství plasmidu byla transformace bakterií (*E.coli*, kmen XL 1-BLUE) metodou tepelného šoku. Bakterie byly vysety na misky s LB agarem a antibiotiky ampicilinem a tetracyklinem. Na misce vyrostlo přibližně

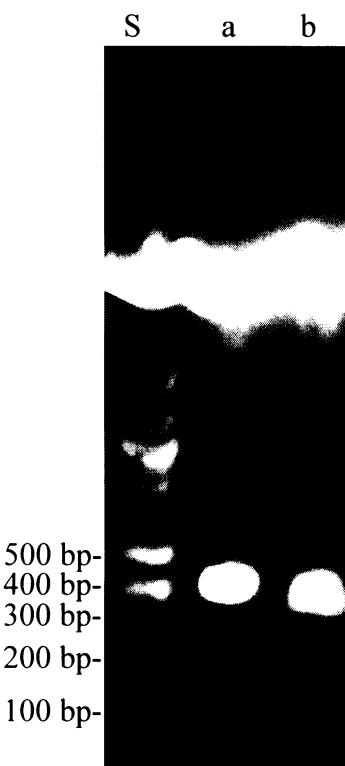
1000 kolonií. Tyto kolonie byly zaočkovány do LB média s příslušnými antibiotiky. Plasmidová DNA byla získána sledem reakcí označovaných jako tzv. maxipreparace. Postup je uveden v metodické části (odstavec 4.12.). Pro určení čistoty a množství získané plasmidové DNA byla měřena absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1. Poměr A_{260}/A_{280} charakterizuje čistotu plasmidové DNA, hodnota 1,78 odpovídá čisté DNA.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty absorbance zásobního roztoku plasmidu.

A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
0,1327	0,2357	1,78

Byl připraven roztok plasmidové DNA o $c = 2,36 \text{ mg/ml}$, bylo získáno 0,7 mg DNA.

Správnost připraveného plasmidu byla potvrzena pomocí restrikčních štěpení. Restrikční štěpení probíhalo s enzymy Nde I a Hind III, které poskytují fragment DNA o



Obr. 6: Kontrolní restrikční štěpení II. Štěpení probíhalo s enzymy Nde I a Hind III (dráha a), Bst XI a Hind III (dráha b). Velikost fragmentů DNA byla určena na základě porovnání se standardem (dráha S).

velikosti 382 bp (na obr. 6 dráha a, str. 32). Druhé restrikční štěpení proběhlo v přítomnosti enzymů Bst XI a Hind III, tyto enzymy poskytují fragment DNA o velikosti 355 bp (na obr. 6 dráha b, str. 32).

6. Diskuse

Tato bakalářská práce doplňuje studie prováděné v Laboratoři architektury proteinů, které se týkají struktury a vazebných vlastností receptorů buněk imunitního systému. Receptor potkaních NK buněk rNKR-P1A patří mezi nejdéle studované receptory C-lektinového typu nejen v pracovní skupině Prof. Bezoušky.

Mým úkolem bylo připravit dostatečné množství vektoru pro rekombinantní expresi proteinu rNKR-P1A a navazující strukturní a vazebné studie. Cílem bylo získat takový vektor, který by obsahoval insert o sekvenci kódující protein rNKR-P1A v rozsahu aminokyselin Ala₉₀ – Lys₂₁₅. V Laboratoři architektury proteinů byly již dříve připraveny vektory obsahující sekvenci kódující podobný, ale delší, úsek extracelulární části tohoto receptoru. Avšak proteiny získané z těchto vektorů nebyly dostatečně stabilní, pravděpodobně obsahovaly nejen CTLD doménu, ale i tzv. krček. Mým cílem bylo tedy vytvoření vektoru, který by kódoval pouze CTLD doménu proteinu rNKR-P1A. Sekvence aminokyselin Ala₉₀ – Lys₂₁₅ byla vybrána na základě porovnání s proteinem CD 69, jehož struktura již byla rozřešena¹⁷.

Pro přípravu expresního vektoru byl použit plasmid pRSET B, který obsahoval sekvenci kódující část extracelulární domény receptoru CD 69. Tato sekvence byla do plasmidu vložena pomocí restrikčních endonukleas Nde I a Hind III. Pomocí těchto endonukleas byla sekvence kódující protein CD 69 opět vyštěpena, takto byl získán linearizovaný plasmid k ligaci s novým insertem. Oba konci linearizovaného plasmidu by po štěpení restrikčními endonukleasami obsahovaly jednovláknové přesahy, což by mohlo způsobit špatnou orientaci vkládaného insertu. Proto byl konec po štěpení enzymem Nde I zarovnán Klenowovým fragmentem. Insert byl připraven pomocí polymerázové řetězové reakce z původního vektoru kódujícího delší sekvenci proteinu rNKR-P1A (Glu₈₁ – Lys₂₁₅). Přímý primer použitý pro metodu PCR bylo nutné fosforylovat. Díky tomu byla na 5' koncích získaného insertu navázána fosfátová skupina, která následně umožnila ligaci s linearizovaným plasmidem. Bez přítomnosti fosfátové skupiny by ligace pravděpodobně vůbec neproběhla. Připraveným plasmidem byly transformovány kompetentní buňky *E.coli* kmen XL-1 BLUE metodou tepelného šoku, tento typ buněk je s úspěchem používán k namnožení plasmidové DNA. K identifikaci buněk se správným plasmidem byl využit EP pufr, kdy po rozbití buněk byla plasmidová DNA štěpena restrikčními endonukleasami

Nde I a Hind III. Z vybrané kolonie byla izolována DNA metodou tzv. minipreparace a správnost připraveného plasmidu byla ověřena ještě jednou pomocí stejných restrikčních endonukleas. Z vybrané kolonie bylo připraveno zásobní množství plasmidu. Bylo získáno 0,7 mg plasmidové DNA, toto množství je odpovídající použitému protokolu a dostačující pro provedení mnoha expresních experimentů pro přípravu proteinu.

7. Souhrn

- byl připraven expresní vektor pro část proteinu rNKR-P1A v rozmezí aminokyselin Ala₉₀ – Lys₂₁₅
- správnost připraveného vektoru byla ověřena restrikčním štěpením
- byl připraven roztok plasmidové DNA o c = 2,36 mg/ml, bylo získáno 0,7 mg DNA

8. Seznam citované literatury

1. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie. Triton, Praha (2005)
2. Robertson, M. J., Ritz, J.: Blood 76, 2421-2438 (1990)
3. Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F. M.: Nat. Rev. Immunol. 3, 304-316 (2003)
4. Nagata, S.: Cell 88, 355-365 (1997)
5. McQueen, K. L., Parham, P.: Curr. Opin. Immunol. 14, 615-621 (2002)
6. Lanier, L. L.: Annu. Rev. Immunol. 16, 359-393 (1998)
7. Bezouška, K.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 535-563 (2004)
8. Appasamy, P. M., Kenniston, T. W., Brissette-Storkus, C. S., Chambers, W. H.: Nat. Immun. 15, 259-268 (1996)
9. Li, J., Rabinovich, B. A., Harren, R., Shannon, J., Miller, R.G.: Int. Immunol. 15, 411-416 (2003)
10. Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M.: Nat. Immunol. 4, 801-807 (2003)
11. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. a., Warren, H. S., Lanier, L. L.: J. Immunol. 176, 7796-7799 (2005)
12. Chambers, W. H., Vujanovic, N. L., Deleo, A. B., Olszowy, R., Herberman, R. B., Hiserodt, J. C.: J. Exp. Med. 169, 1373-1378 (1989)
13. Ryan, J. C., Niemi, E. C., Nakamura, M. C., Seaman, W. E.: J. Exp. Med. 181, 1911-1915 (1995)
14. Drickamer, K.: Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 393-400 (1993)
15. Day, A. J.: Biochem. Soc. Trans. 22, 83-88 (1994)
16. Kogelberg, H., Lawson, A. M., Muskett, F.W., Carruthers, R. A., Feizi, T.: Protein Expr. Purif. 20, 10-20 (2000)
17. Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: Biochemistry 39, 14779-14786 (2000)
18. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York (1989)

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

Tabulka 2: Seznam vypůjčovatelů