

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie



Bakalářská práce

Klonování, exprese a charakterizace kuřecích růstových faktorů

Ondřej Svoboda

Školitel bakalářské práce: RNDr. Petr Bartůněk, CSc., Ústav molekulární
genetiky Akademie věd České republiky

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Nataša Šebková, Katedra fyziologie živočichů
a vývojové biologie

Laboratoř buněčné diferenciaci, ÚMG AV ČR

2006

Obsah:

Poděkování	4
Seznam použitých zkratk	5
1. Obecný úvod	6
1.1. Podstata a typy kmenových buněk	6
1.2. Mechanismy diferenciacie kmenových buněk	7
1.3. Růstové faktory	8
1.4. Kuře - modelový organismus	10
1.5. Krvetvorba	11
2. Cytokiny LIF a GM-CSF	13
2.1. LIF	13
2.1.1. Úvod	13
2.1.2. LIF a embryonální kmenové buňky	15
2.1.3. Nadexprese a knock-out(y)	16
2.1.4. Další významné funkce	17
2.1.4.1. LIF a nervový systém	17
2.1.4.2. LIF a kostní tkáň	19
2.1.4.3. Endokrinní funkce	19
2.1.4.4. Ostatní funkce	19
2.1.5. Rodina IL-6 a signalizace	20
2.2. GM-CSF	22
2.2.1. Úvod	22
2.2.2. Funkce	23
2.2.3. Nadexprese a knock-out(y)	24
2.2.4. Receptory a signalizace	24
3. Cíl práce	27
4. Materiál a metody	28
4.1. Materiál	28
4.1.1. Bakteriální buňky	28
4.1.2. Živné půdy a média pro bakteriální buňky	28
4.1.3. Eukaryotické tkáně a buňky	29
4.1.4. Vektory	29
4.1.5. Enzymy	30
4.1.6. Oligonukleotidy	30
4.1.7. Protilátky	31
4.1.8. Soupravy pro molekulární biologii	31
4.1.9. Materiál pro afinní chromatografii	31
4.1.10. Pufovy a další chemikálie pro práci s nukleovými kyselinami	32
4.1.11. Pufovy pro proteinovou elektroforézu za denaturujících podmínek	33
4.1.12. Pufovy pro přenos bílkovin na membránu a specifickou detekci bílkovin („Western-blotting“)	33
4.1.13. Roztoky pro afinní chromatografii	33
4.2. Metody	34
4.2.1. Práce s nukleovými kyselinami	34
4.2.2. Práce s proteiny	39
5. Výsledky	42
5.1. Homologie	42
5.2. Design primerů	44
5.3. Reverzní transkripce	46
5.4. Klonování – chLIF	46
5.5. Klonování – chGM-CSF	48
5.6. Expresa GM-CSF	50
5.7. Ověření biologické aktivity rekombinantního chGM-CSF	51
6. Souhrn a výhledy	53
7. Literatura	54

Abstrakt

Růstové faktory jsou důležitými regulátory nejrůznějších biologických procesů. Uplatňují se zejména během buněčné diferenciaci a při mezibuněčné komunikaci. Tato práce se zabývá růstovými faktory LIF (leukemia inhibitory factor) a GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor). Oba tyto růstové faktory náleží mezi cytokiny, do skupiny hemopoetinů, a jsou vysoce pleiotropní.

Cílem této práce bylo molekulárně biologickými metodami připravit rekombinantní kuřecí proteiny GM-CSF a LIF. Po izolaci RNA a RT-PCR byly geny pro chGM-CSF a chLIF vloženy do klonovacího vektoru pBSII SK+ a poté do expresního vektoru pETH2a (čímž vznikl vektor pHis-GM-CSF a pHis-chLIF). Po transformaci kompetentních buněk *E. coli* vektorem pHis-chGM-CSF byla indukována syntéza proteinu His-chGM-CSF a protein byl následně purifikován. Aktivita rekombinantního proteinu chGM-CSF byla ověřena na buňkách kostní dřeně *in vitro*.

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomáhali při vzniku této bakalářské práce. Především svému školiteli Dr. Petru Bartůňkovi za mnoho času, ochoty a úsilí, které věnoval mé experimentální a teoretické práci, Dr. Martině Zíkové a Mgr. Davidu Sedlákovi za nespočetné množství informací, rad a konzultací, a dále všem členům skupiny Dr. Michala Dvořáka. V neposlední řadě děkuji své rodině za projevenou trpělivost a podporu při psaní této práce.

Seznam použitých zkratek

BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
bFGF	basic fibroblast growth factor
cDNA	complementary DNA
CNS	centrální nervový systém
DAG	diacylglycerol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EGF	epithelial growth factor, epiteliální růstový faktor
ES buňky	embryonální kmenové buňky
fMLP	formyl-methionylleucylalanin
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
ECL	enhanced chemiluminescence, znásobená chemiluminiscence
h	hodina
H ₂ O	voda
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonová kyselina
hu	<i>Homo sapiens</i>
ch	<i>Gallus gallus</i>
IP ₃	inositol trifosfát
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
KAc	acetát draselný
lacZ'	α-fragment genu pro β-galaktosidasu
LIF	leukemia inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor
LIFR	α-podjednotka receptoru pro LIF
M	marker
min	minuta
M-MuLV	moloney murine leukaemia virus
mu	<i>Mus musculus</i>
NaAc	acetát sodný
Ni ²⁺ -NTA agarosa	nickel-nitriilotriacetic acid immobilized on crosslinked agarose
p(dN) ₆	náhodná směs hexanukleotid trifosfátů
PCR	polymerázová řetězová reakce
PNS	periferní nervový systém
RNA	ribonukleová kyselina
RNasin	inhibitor RNáz
rpm	rotations per minute, otáčky za minutu
s	sekunda
SC buňky	kmenové buňky
TSR	template supression reagent

1. Obecný úvod

1.1. Podstata a typy kmenových buněk

Mnohobuněčný organismus se v dospělosti skládá zhruba z dvou set buněčných typů. Na počátku ontogeneze to jsou však právě dvě buňky, ze kterých se zárodek vyvíjí. Podstatou vzniku takového množství buněčných linií je buněčná diferenciací. Obecně rozlišujeme tři typy buněk. Jsou to - zárodečné buňky, kmenové buňky a somatické buňky (buňky terminálně diferencované). Somatické buňky se do svého terminálního stadia mohou diferencovat v mnoha krocích z různých typů kmenových buněk. To znamená, že ačkoli nejsou jednotlivé typy kmenových buněk morfologicky rozlišitelné, přesto exprimují sadu proteinů, regulujících geny typické pro jejich terminálně diferencované potomstvo. Dále platí, že z jedné kmenové buňky se může vyvinout řada buněčných typů.

Kmenové buňky nepodléhají buněčnému stárnutí, nemají tedy limitovaný počet dělení, jako je tomu v případě terminálně diferencovaných buněk. Dělíme je do čtyř skupin.

První skupinou jsou totipotentní buňky. Tyto buňky vznikají po oplodnění splynutím vajíčka a spermie. Jak název napovídá, jsou tyto buňky „všeho schopné“, mohou tedy dát vzniknout libovolnému potomstvu, včetně buněk extraembryonální tkáně. Do druhé skupiny kmenových buněk patří pluripotentní buňky. Z těchto buněk může vzniknout libovolné potomstvo kromě buněk extraembryonální tkáně. Z pluripotentních buněk se diferencují multipotentní buňky. Ty tvoří v určitém směru již specializované, avšak stále nediferencované populace. Příkladem mohou být hematopoetické kmenové buňky, dávající vznik libovolným krevním buňkám, avšak nikoli například neuronům. Do poslední skupiny náleží unipotentní buňky, které se stále mohou neomezeně dělit, ale mohou se diferencovat jen v jediný typ. Typickým příkladem jsou kmenové buňky pokožky.

Alternativní způsob dělení kmenových buněk je dělení na kmenové buňky embryonální (ES) a somatické. ES buňky vznikají z „inner cell mass“ a mají na rozdíl od somatických kmenových buněk větší diferenciací potenciál. Somatické kmenové buňky (také „adult stem cells“) jsou multipotentní a nacházejí se v malém počtu v několika druzích tkání (kostní dřeň, mozek, játra, kosterní svaly, kůže, atd.). Některé nedávno provedené experimenty však naznačují, že i tyto buňky mohou být pluripotentní a že jeden typ somatické kmenové buňky se může „transdiferencovat“ v jiný typ. Pomocí několika stimulačních faktorů se podařilo z buněk kostní dřene vykultivovat buňky s neuronálním fenotypem (1).

V dnešní době známe tyto typy somatických kmenových buněk. Hematopoetické kmenové buňky, dávající vznik všem typům krevních buněk, mesenchymální kmenové buňky, ze kterých vzniká pojivová a tuková tkáň, neuronální kmenové buňky – vznikají neurony, astrocyty a oligodendrocyty, epitheliální kmenové buňky střevního traktu a pokožkové kmenové buňky, umístěné v basální vrstvě epidermu.

Somatické kmenové buňky mají nejasný původ. Dodnes tato a řada dalších otázek není plně zodpovězena. Jsou somatické kmenové buňky pouhými pozůstatky embryonálních kmenových buněk nebo vznikají jinou cestou? Proč zůstávají tyto buňky v nediferenciovaném stavu, když všechny buňky v okolní tkáni jsou diferenciované? Které signály přesně regulují jejich proliferaci a diferenciaci? Ačkoli celou pravdu stále ještě neznáme, přesto se můžeme pokusit o shrnutí dosavadních poznatků.

1.2. Mechanismy diferenciaci kmenových buněk

Mechanismy přeměny zárodečné či kmenové buňky na některý více diferenciovaný typ mohou být různé. Obecně těmito impulsy mohou být mezibuněčná komunikace prostřednictvím růstových faktorů a jejich receptorů, selektivní mezibuněčná adheze a programované změny exprese v genomu působením transkripčních faktorů.

Všechny tyto procesy se mohou podílet na udržování jednotlivých buněčných linií v tkáních. Podíváme-li se na jednotlivé mechanismy podrobněji, zjistíme, že pro diferenciaci je nejdůležitější mezibuněčná komunikace prostřednictvím růstových faktorů a mezibuněčná adheze. Ta je mimo to odpovědná hlavně za orientaci buněk v tkáni, za distribuci jednotlivých typů a za orientaci buněk v trojrozměrném prostoru. Jinými slovy, buňky mezi sebou musí selektivně vytvářet kontakty, aby nedošlo k jejich promíchání, a tyto kontakty jsou zprostředkovány různými kadheriny a jinými adhesivními molekulami, umístěnými v plasmatické membráně, které se váží buď na své protějšky na membráně druhé buňky nebo na složky extracelulární matrix.

Co se týče programovaných změn exprese působením transkripčních faktorů, dalo by se říci, že tento mechanismus je součástí vnitřního signálního okruhu u obou výše zmíněných typů komunikací. Zde je však uveden v souvislosti s ranným stadiem ontogeneze, kdy ještě není vytvořen dostatek sousedů pro komunikaci, a tak jediné, co zbývá, jsou transkripční faktory rozmístěné ve vajíčku, které podle gradientu svých koncentrací v jednotlivých částech vajíčka následně určují, v jakých místech se vyvine který buněčný typ.

V případě růstových faktorů mohou buňky mezi sebou komunikovat třemi způsoby: endokrinně, parakrinně a autokrinně.

Endokrinně jsou uvolňovány především hormony, avšak mohou tak být vylučovány i některé růstové faktory, přičemž je třeba podotknout, že tato slova často bývají označována jako synonyma. Endokrinní vylučování je uvolňování látek do cévního systému a odtud do jednotlivých tkání mezi buňky samotné.

Na druhou stranu parakrinním způsobem je vylučována většina růstových faktorů ve smyslu „tkáňových hormonů“ a jde o ovlivňování sousedních buněk přímo v tkáni. Nejméně častým způsobem signalizace je autokrinní vylučování. Jedná se o uvolňování molekul a následně jejich přijímání tou samou buňkou. Jako příklad může posloužit vylučování IL-2 TH1 buňkami. IL-2 je pro tyto thymocyty nezbytný, aby se mohly dělit a proliferovat, přitom ho však samy uvolňují.

1.3. Růstové faktory

Vlastní růstové faktory mohou být různé, avšak jedno mají společné. Jedná se o extracelulární signální polypeptidy, řídící růst, proliferaci, diferenciaci a přežití buněk. Každý růstový faktor má svůj receptor a buňka je tedy na signál schopna reagovat pouze v případě, je-li vybavena receptorem pro tento signál. Dále platí, že jeden typ signální molekuly se může vázat na více druhů receptorů a v závislosti na tom, se kterým receptorem interaguje, může interakce vyvolat někdy i značně rozdílnou odpověď. V takovém případě mluvíme o tom, že signální protein má pleiotropní účinky. Vazba na jediný receptor mnohdy není dostatečná, proto se signalizace často účastní více receptorů nebo pomocné receptory tzv. koreceptory. Receptory růstových faktorů mívají enzymatickou (kinázovou) aktivitu nebo jsou s kinázami asociovány, ale někdy také bývají spojeny s G-proteiny. Po navázání ligandu na odpovídající receptor dojde ke konformační změně a k aktivaci vnitrobuněčné signální kaskády. Většina receptorů růstových faktorů je asociována s proteinkinázami skupiny Src nebo Jak.

V případě proteinkináz skupiny Src dochází po navázání ligandu k dimerizaci receptoru, k fosforylaci obou podjednotek a následně je signál předán do jádra pomocí MAP kinázové dráhy. Alternativně k této dráze může probíhat cesta přes aktivaci fosfolipázy C a štěpení fosfoinositol 2-fosfátu na diacylglycerol (DAG) a inositol trifosfát (IP₃). IP₃ se váže na Ca²⁺ kanály na povrchu endoplasmatického retikula a tím je otevírá. Ca²⁺ společně s DAG(em) aktivují proteinkinázu A, která fosforyluje řadu substrátů, mezi něž patří i mnohé

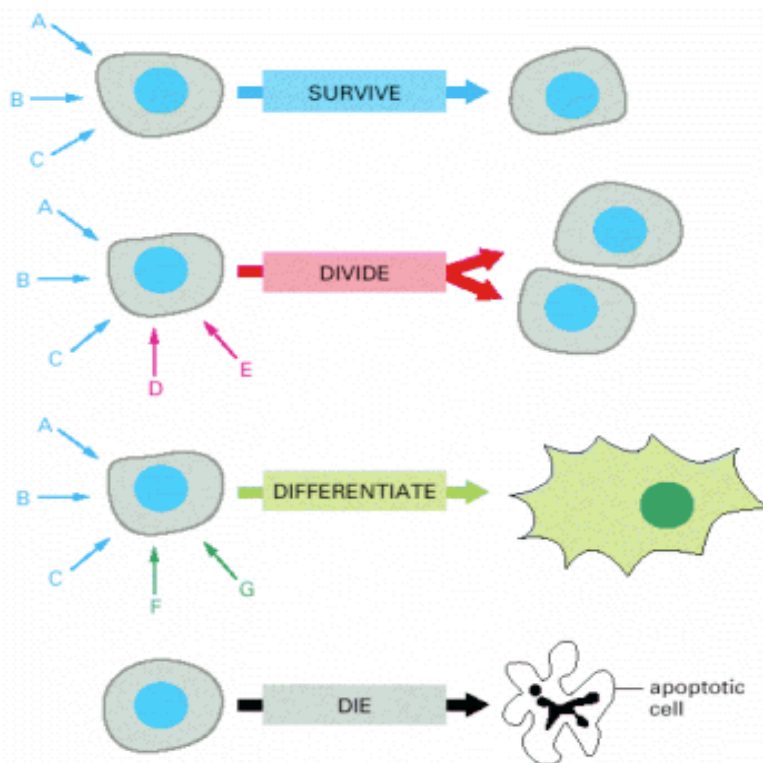
transkripční faktory. Ca^{2+} se rovněž váže na kalmodulin a tím ho také aktivuje. Výsledek je i v tomto případě stejný – aktivace transkripčních faktorů.

O něco jednodušší situace je v případě receptorů asociovaných s kinázami skupiny Jak. Jak kinázy po navázání ligandu (růstového faktoru) na receptor také agregují a dochází k jejich aktivaci (cross-fosforylaci) a k fosforylaci proteinů Stat. Je-li protein Stat fosforylován, vytvoří dimer a tím je mu umožněno přejít do jádra, kde působí jako transkripční faktor. Různé receptory přitom využívají různé Jak kinázy a aktivují různé Stat proteiny, čímž je zajištěna vysoká komplexita.

Každá kináza je schopná fosforylovat větší počet substrátů, a tak je signál během své cesty skrz buňku mnohanásobně amplifikován. Z toho vyplývá, že růstové faktory mohou být aktivní i při velmi malých koncentracích, což je jedna z jejich důležitých vlastností.

Růstové faktory mají jak pleiotropní (viz výše), tak epistatický charakter (na dané vlastnosti se podílí více faktorů dohromady). Je zde tedy velmi složitá síť vzájemných interakcí, které mohou mít velmi široké účinky. Aktivované vnitrobuněčné signální molekuly mohou jak přímo, tak nepřímo (regulací genové exprese) měnit složení v cytoskeletu nebo mohou regulovat nejrůznější metabolické dráhy. Dále může dojít k vzestupu G1-cdk cyklínů, což umožní buňce proliferovat. Může dojít k expresi zcela nových membránových proteinů, takže vznikne zcela nový buněčný typ, atd. V neposlední řadě může být aktivována signální kaskáda, která buňku donutí podstoupit programovanou buněčnou smrt – apoptózu. (Obr. 1.1.)

Vysoká komplexita a složitost celého systému přináší mnoho výhod a jen díky této složitosti se eukaryotické buňky mohly vyvinout do dnešní podoby. Někdy má ale tato složitost i své nevýhody. Často se stává, že některý člen signální kaskády selže. Přestože biologické systémy mají mnoho stupňů volnosti, těchto stupňů není nekonečně mnoho. Po překročení určité prahové hodnoty, systém přestane plnit své funkce a tehdy může dojít ke vzniku nádorového bujení.



Obr. 1.1.

Mnohobuněčné eukaryotické buňky jsou závislé na signálech, které dostávají zvenčí. Tyto signály fungují společně a regulují tak chování buněk. Aby buňka přežila, musí dostávat signály k přežití (modré šípky). Další signály potřebuje k proliferaci (červené šípky) nebo k diferenciaci (zelené šípky). Pokud buňka nedostává ani jeden z těchto signálů, je to impuls k apoptóze.

Zdroj: Alberts et. al., Molecular biology of the cell, Obr. 15-8

1.4. Kuře - modelový organismus

V naší laboratoři je hojně využívaným modelovým organismem kuře, neboli kur domácí (*Gallus gallus*). Kuře je jedním z osvědčených modelů molekulární a vývojové biologie. Jedná se o ptačího zástupce z kmene obratlovců, který je využíván hlavně díky nenákladnému chovu, rychlému vývoji, vysoké životnosti buněk (life span) *in vitro*, velkému vajíčku, možnosti *in ovo* technik a v neposlední řadě díky bohatým poznatkům o tomto organismu samotném. V dnešní době již známe celou sekvenci kuřecího genomu a příprava kompletních genomových knihoven je v pokročilé fázi. Kuře je nejhojněji využívaným modelovým organismem z třídy ptáků. Porovnáním kuřecího genomu s genomem savcím či rybím lze zjistit řadu evolučních souvislostí mezi těmito organismy. Předpokládá se, že poslední společný předek savců a ptáků žil před 310-ti miliony let a jednalo se o zástupce z třídy plazů. Z evolučního hlediska se jedná o relativně krátkou dobu, a tak u kuřat můžeme najít řadu konservovaných genů, které se vyskytují rovněž například u savců. Mezi tyto geny patří i geny pro různé proteiny, účastníci se nejrůznějších signálních drah, mimo jiné i geny pro růstové faktory. Díky tomu jsme schopni studovat účinky například myších růstových faktorů na kuřecích buňkách nebo naopak, a tak můžeme mnohdy dospět k zajímavým výsledkům.

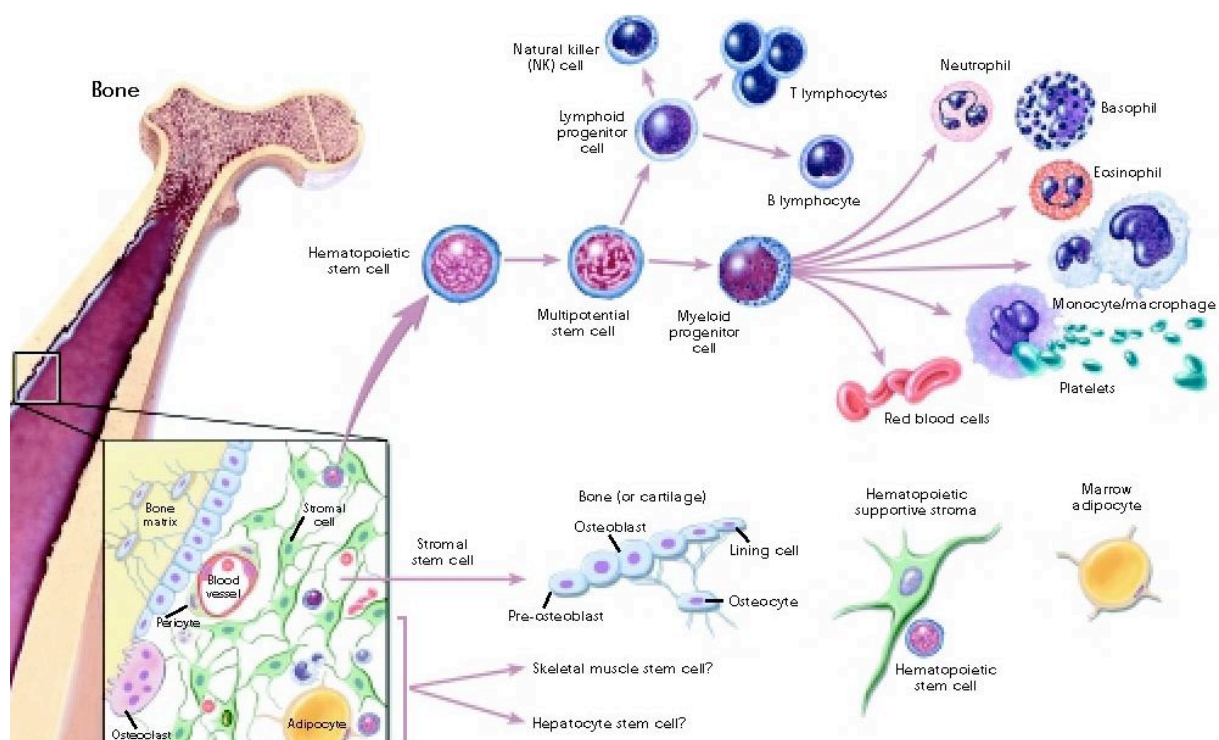
1.5. Krvetvorba

Krvetvorba neboli hematopoéza je proces tvorby krevních buněčných komponent. Tento děj se v organismech odehrává v kostní dřeni a v lymfatických tkáních, které jsou dvojího typu – primární (opět kostní dřeň, dále brzlík a Fabriciova burza u ptáků) či sekundární (slezina, lymfatické uzliny a jejich organizované shluky v dýchací a trávicí soustavě). Všechny krevní buňky se vyvíjejí z multipotentních hematopoetických kmenových buněk, pro něž je charakteristická adhezivní molekula CD34. Ve vyvíjejícím se embryu dochází ke krevní formaci nejprve v agregátech krevních buněk, nazývaných krevní ostrůvky (blood islands) ve žloutkovém vaku. Postupně tuto úlohu přebírá slezina, játra a kostní dřeň. Kostní dřeň se nakonec stává hlavním místem krvetvorby v organismu a obsahuje jak myeloidní, tak lymfoidní progenitorové buňky.

Z myeloidních progenitorů vznikají tyto buněčné linie. Jsou to trombocyty, monocyty (dendritické buňky a makrofágy), erytrocyty a granulocyty (neutro-, eosino-, bazofily).

Na druhou stranu z lymfoidních progenitorů vznikají NK buňky a prekurzory T-, B-lymfocytů. Ty se po patřičné stimulaci mohou proměnit ve zralé efektorové buňky. Lymfoidní prekurzory vznikají v thymu a v kostní dřeni a poté jsou krevním řečištěm unášeny do sekundárních lymfoidních orgánů, kde probíhá jejich zrání a diferenciaci, nebo zůstávají v thymu a diferencují se přímo na místě. (Obr. 1.2.)

Krevní buňky se diferencují pod vlivem růstových faktorů a cytokinů, které na ně působí. Působení bývá většinou lokální a parakrinní. Aby buňka byla schopna na jednotlivý cytokin vyvolat odpověď, musí být vybavena jeho receptorem. Receptory cytokinů mají často promiskuitní charakter. Na buňku v určitou chvíli obvykle působí celá řada signálů najednou. Buňka všechny tyto signály mimořádně složitým způsobem analyzuje a vyhodnocuje, poté vyvolává odpověď. Vždy jde o součet jednotlivých pozitivních a negativních vstupů a o rozhodnutí, které signály převažují. Dnes již známe mnoho kombinací konkrétních růstových faktorů, které jsou schopné vyvolat konkrétní odpověď.



Obr. 1.2. Diferenciace hematopoetických a mesenchymálních buněk v kostní dřeni
 Zdroj: National Institutes of Health – Stem cell, Stem cells basics, picture 2.

2. Cytokiny LIF a GM-CSF

Cytokiny jsou základní regulační molekuly imunitního systému, tkáňové hormony, které jsou buňkami imunitního systému syntetizovány a které mezi těmito buňkami zprostředkovávají komunikaci. Cytokiny mají vlastnosti podobné (totožné) růstovým faktorům – jsou pleiotropní, působí kaskádovitě (jeden cytokin ovlivňuje tvorbu druhého) a jsou do určité míry redundantní (jeden může být nahrazen druhým). Celý cytokinový systém vytváří takzvanou cytokinovou síť. Jedná se o spolupůsobení nejrůznějších cytokinů pomocí synergistických a antagonistických interakcí, které se vzájemně doplňují.

Cytokiny jsou buňkami většinou volně sekretovány do svého okolí (působení endo-, para-, autokrinní), známe však i jejich membránové protějšky. Membránové cytokiny bývají řazeny mezi adhezivní molekuly a v membráně bývají zakotveny krátkou sekvencí 20-ti hydrofobních aminokyselin.

Ve své práci jsem se zaměřil na dva cytokiny – granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) a leukemia inhibitory factor (LIF). Oba tyto proteiny jsou podle své primární i prostorové struktury řazeny mezi hematopoetiny. Charakteristickým rysem hematopoetinů je sdílení 4 α -helikálních úseků. Podle své funkce jsou LIF a GM-CSF řazeny mezi cytokiny s aktivitou růstových faktorů hematopoetických buněk. LIF se však mimoto uplatňuje v celé řadě dalších funkcí - od nidace vajíčka uvnitř dělohy počínaje, přes ovlivňování osteocytů, ovlivňováním nervových buněk konče.

2.1. LIF

2.1.1. Úvod

Leukemický inhibiční faktor (LIF) je polyfunkční glykoprotein, který je exprimován v celé řadě tkání. LIF byl poprvé objeven u myši (muLIF) v roce 1987, jako jeden z faktorů přítomných v mediu Krebs II ascites tumour cells (2). LIF byl spolu s G-CSF a GM-CSF identifikován jako protein schopný *in vitro* terminálně diferencovat nediferencované M1 myeloidní leukemické buňky v makrofágy (2) a terminovat tak jejich sebe obnovovací proces. Na druhou stranu však bylo prokázáno, že LIF (narozdíl od CSFs) neovlivňuje a nestimuluje proliferaci normálních granulocyte/macrophage progenitorů. Poté co byl muLIF separován z

Krebsova media, byla určena jeho krátká aminokyselinová sekvence, pomocí které byl mLIF nakonec vyklonován z myších T-lymfocytů do kvasinkového expresního systému, kde byl dále zkoumán.

O rok později (v roce 1988) se za pomoci hybridizační sondy, připravené z myší cDNA, podařilo naklonovat i lidský LIF (huLIF). Zjistilo se, že mezi oběma orthology je vysoký stupeň homologie (78%) a že hLIF a muLIF mají, až na některé případy, také podobné biologické vlastnosti. Je však zarážející, že studie prokazující vliv huLIF(u) na lidské M1 leukemické buňky (podobně jako je tomu u myší) zatím nebyla provedena.

Zpočátku se usuzovalo, že nově objevený LIF bude jeden z dalších regulátorů hematopoetických buněk s mimořádnou schopností ovlivňovat některé druhy myeloidních leukemií. V počátečních studiích se prokázalo, že LIF společně s IL-3 je *in vitro* schopný indukovat diferenciaci megakaryocytů (3). Po injekci proteinu LIF do myši byl pozorován až dvojnásobný vzestup hladiny megakaryocytů a krevních destiček (4). Mezi další takto indukované změny patřilo: vzestup sedimentace červených krvinek a zvýšený poměr mezi vápníkem–albuminem v krevním séru ve prospěch vápníku .

O něco později (v roce 1997) byl LIF označen, mimo jiné, jako kostimulační faktor, který společně s ligandem FkL-2 dokáže stimulovat myeloidní kmenové buňky v makrofágy (5). Dále byly u proteinu LIF dokumentovány některé aktivity, týkající se stimulace proliferace některých hematopoetických buněčných linií - human factor-dependent hematopoetic cell line u lidí (DA) a factor-dependent murine leukemic cell line (GB2) u myší (6,7).

Jakkoli jsou všechny tyto aktivity zajímavé, nepřinesly žádný větší význam pro *in vitro* pěstování hematopoetických kmenových buněk a zdá se, že ani *in vivo* nejsou tyto aktivity proteinu LIF příliš významné. Na první pohled je tedy název „leukemický inhibiční faktor“ v tomto směru poněkud zavádějící, na druhou stranu, díky tomuto pojmenování se LIF, jako jedna z mála molekul, vyhnul typickému cytokinovému CD či IL názvosloví.

Jak již bylo řečeno, LIF je vysoce pleiotropním proteinem. Od doby, co byl poprvé v roce 1987 klonován, uplynul sotva jeden rok a vědci u muLIF objevili jednu z jeho nejdůležitějších funkcí. Zjistilo se, že muLIF dokáže ovlivňovat embryonální kmenové buňky - Williams (8) a Smith (9), 1988.

2.1.2. LIF a embryonální kmenové buňky

Blastocysta savců se skládá ze dvou vrstev buněk – z trofoektodermy, který se později vyvíjí v placentu, a z inner cell mass (ICM). Z ICM se vyvíjí všechny tři zárodečné listy plus extra-embryonální obaly. Jinými slovy, buňky ICM jsou totipotentní (viz. výše). Pokud jsou tyto buňky pěstovány *in vitro* bez příslušných exogenních signálů, postupně ztratí svůj diferenciační potenciál a spontánně se diferencují v široké spektrum buněčných linií. Pokud jsou však pěstovány na tzv. feeder layers (vrstvě živých buněk, obvykle fibroblastů) nebo jsou-li pěstovány v médiu podmíněným těmito buňkami, svůj diferenciační potenciál neztratí a mohou být udržovány v nediferencovaném stavu po libovolný počet generací. Faktor odpovědný za udržení pluripotence ES buněk byl dříve označován jako diferenciační inhibiční faktor (DIA). Jak se podařilo Williamsovi (8) a Smithovi (9) zjistit, DIA je jak funkčně, tak strukturně totožný s proteinem LIF. Díky tomuto poznatku a díky rekombinantnímu muLIF mohou být myší ES buňky již po 18 let pěstovány bez feeder layer a kultivace je tak mnohem méně náročná.

Schopnost udržet ES buňky v nediferencovaném stavu nám umožňuje provádět na těchto buňkách nejrůznější experimenty a genetické manipulace. Homologní rekombinací například můžeme mutovat jednotlivé geny a takto modifikované ES buňky lze poté injikovat do vyvíjející se blastocysty. Protože ES buňky se mohou diferencovat v libovolné buněčné linie, výsledkem jsou organismy, které mohou být chimerní jak v somatické, tak v germinální linii. Během devadesátých let bylo takto vyprodukováno mnoho transgenních myší, nesoucích nejrůznější mutace a knock-out(y) v jednotlivých genech. Myš byla až donedávna jediným organismem, u kterého byla transmise ES buněk do zárodečné linie úspěšná.

Co se týče aktivity proteinu LIF na ES buňky u jiných druhů, ukázalo se, že LIF bohužel není esenciální pro sebeobnovu ES buněk primátů, včetně člověka (10), a co víc, ES buňky kultivované s živným médiem a samotným LIF(em) se až donedávna u žádného jiného druhu než u myši nepodařilo vůbec vypěstovat. V roce 2004 však japonští vědci poprvé naklonovali kuřecí ortholog proteinu LIF (chLIF) a dokázali, že chLIF má v případě ES buněk stejné vlastnosti jako muLIF (11).

Není naprosto zřejmé, proč organismus využívá tak rozporuplnou molekulu, jakou LIF je. Je zvláštní, že LIF na jedné straně indukuje nediferencované leukemické buňky a na straně druhé udržuje kmenové buňky v nediferencovaném stavu. Jaké to organismu přináší výhody? Proč si evoluce místo jednoho pleiotropního proteinu nevytvořila proteinů více? Je možné, že se v tomto případě LIF ocitl v jakési slepé uličce evoluce, ze které již není cesty zpět.

2.1.3. Nadexprese a knock-out(y)

Kromě injekce samotného LIF proteinu do organismu (viz. výše) byly rovněž zkonstruovány různé kmeny myší, které buďto nadexprimovaly LIF (12) nebo ho zcela postrádaly (13).

Nadexprese proteinu LIF byla provedena injekcí speciálně připravených buněk, schopných nadprodukovat LIF (12). Tyto buňky se usídlily v kostní dřeni a ve slezině, kde vytvořily stabilní populace. Mezi nejzávažnější změny patřil prudký úbytek váhy, což se zhruba po dvou měsících projevilo vážnou kachetickou chorobou s následkem smrti. U myší byla před úmrtím pozorována vysoká hypermotilita. Při pitvě byly nalezeny tyto abnormality: neobvykle prodloužené hlavice dlouhých kostí; vápennaté usazeniny v játrech, srdci a v kosterních svalech; ztráta veškeré tukové tkáně; atrofie thymu; ztráta corpu lutea ve vaječnicích a ztráta spermatocytů z seminoforních kanálků ve varlatech. Pokud byla vytvořena linie myší, které exprimovaly LIF specificky v T-buňkách (LIF byl umístěn za promotor specifický pro T-buňky), došlo k zajímavé inverzi: na rozdíl od normálního stavu bylo v lymfatických žlázách nalezeno mnoho nezralých (CD4+, CD8+) T-lymfocytů, kdežto v thymu byla místo toho nalezena centra, ve kterých se vyvíjeli B-lymfocyty (14).

Rovněž knock-out(y) genu pro LIF přinesly velice zajímavé výsledky (13). Z myší blastocysty byly nejprve vyizolovány ES buňky a v těchto buňkách byl homologní re-kombinací knock-out(ován) LIF pomocí inzerce jiného genu. Takto modifikované ES buňky byly injikovány do vyvíjející se blastocysty. Díky tomu vznikly chimerní heterozygotní jedinci, ze kterých byly připraveni (nakříženi) homozygoti pro mutovanou LIF alelu. Tito jedinci se zpočátku jevily zcela normálně, ale záhy se zjistilo, že homozygotní samičky nejsou schopny otěhotnět. Bylo provedeno mnoho dalších pokusů a výsledek je tento: pro vývoj blastocysty sice LIF potřebný není, ale je esenciální pro její zahnízdění uvnitř dělohy. LIF musí být produkován žlázami endometria dělohy, a to přesně čtvrtý den po oplození. Pokud v tuto chvíli není přítomný, blastocysta je schopna přežít ještě další 2-3 dny, pokud se však LIF do této doby neobjeví, nidace se neuskuteční. U heterozygotních samiček se zahnízdění blastocysty ukázalo být v pořádku.

Kromě této funkce LIF(u) byly nalezeny i další, které se projevily u knock-out(ovaných) jedinců. Například byly v nepřítomnosti proteinu LIF pozorovány anatomické abnormality v hippokampu (15). či zvýšený počet čichových sensorických neuronů (16; viz dále).

2.1.4. Další významné funkce

Po sekvenaci kódující sekvence pro LIF mnozí vědci došli k zajímavému závěru. Zjistili, že molekuly, na kterých doposud pracovali, jsou ve skutečnosti LIF. Tímto způsobem se přišlo na desítky dalších funkcí tohoto glykoproteinu. V některých případech zde LIF hraje významnější roli, v některých případech roli méně významnou a jako pomocníci mu slouží jiné růstové faktory.

2.1.4.1. LIF a nervový systém

Nervový systém je dalším z míst s mimořádně vysokým uplatněním proteinu LIF. Působí zde na velké spektrum buněk a má zde mnoho funkcí.

Neuronální kmenové buňky a CNS:

Nervový systém se během embryogeneze u obratlovců zakládá z ektodermu, z neuronálních kmenových buněk (centrální nervový systém, CNS) a z buněk neurální lišty (periferní nervový systém, PNS). Během vývoje CNS se neuronální kmenové buňky diferencují a ztrácejí svůj diferenciační potenciál. Až donedávna se myslelo, že tyto buňky v dospělém organismu nejsou přítomny. V minulých letech však byly nalezeny, a to zejména v hipokampu a mezi čichovými senzoryckými nervy (olfactory receptor neurons, ORN). ORN se od té doby staly důležitým modelem pro studium neuronálních kmenových buněk. I v případě těchto buněk se prokázalo uplatnění proteinu LIF.

Čichový epitel se skládá z několika druhů buněk. Mimo jiné to jsou: zralé ORN, nezralé ORN a progenitory ORN (SC). ORN jsou neustále během života zhruba každých 40 dnů vlivem buněčného stárnutí či poranění obměňovány a nahrazovány svými progenitory z basální vrstvy. Poté, co se progenitorová buňka diferencuje v nezralý neuron, začíná putovat apikálně k epiteliální vrstvě, přičemž její věk a její zralost lze odhadnout podle její pozice. Na povrch epitelu mají přístup pouze zralé neurony. Tento systém zaručuje rychlou a dynamickou sebe obnovu ORN. Ukázalo se, že k udržení ORN v nediferencovaném stavu je esenciální právě LIF (16). Ten zde působí přes STAT3 transkripční faktor a tím ovlivňuje transkripci dalších genů. LIF je uvolňován zralými ORN a působí jak autokrinně, tak parakrinně. Pokud některý zralý ORN zemře, dojde k lokálnímu snížení koncentrace LIF(u), což umožní, aby dozrála nová sensorická buňka, schopná opět produkovat LIF, čímž dojde

k opětovnému ustálení jeho lokální koncentrace. Mimo to byla v nedávné době publikována další práce prokazující, že LIF podporuje také proliferaci ORN progenitorů (17).

Poslední funkcí proteinu LIF, týkající se neuronálních kmenových buněk, je jeho schopnost udržovat spolu s bFGF a EGF tyto buňky v nediferencovaném stavu (18). Neuronální kmenové buňky byly vyizolovány z předního mozku lidského embrya a byly *in vitro* kultivovány po dobu jednoho roku. Během této doby si dokázaly podržet svůj diferenciační potenciál a na konci byly schopny se diferencovat v oligodendrocyty, astrocyty i v neurony.

V CNS LIF dále působí na oligodendrocyty. Onemocnění multiple sclerosis je způsobeno autoimunním útokem proti oligodendrocytům. LIF na oligodendrocyty působí přímo a zabraňuje tak jejich smrti. Tato pozorování však zatím byla provedena jen na zvířecích modelech (19).

V neposlední řadě, co se CNS týče, je receptor pro LIF přítomen na povrchu Purkyňových buněk v mozečku (20). Má se za to, že zvýšená hladina proteinu LIF má za následek snížení počtu vápník vázajících proteinů (calcium binding proteins) na těchto buňkách (20). Tím by se dala vysvětlit vysoká motilita myší, které nadexprimovali LIF.

Jak v CNS, tak v PNS má LIF význam při regeneraci a obraně. V místě poranění je LIF produkován gliovými buňkami a tak účinkuje na neurony, glie a na makrofágy. Na ty má hlavně chemotaktické účinky (21).

PNS

Také v periferní nervové soustavě má LIF svůj vliv. Sensorická ganglia PNS vznikají z buněk neurální lišty. Postupem embryogeneze tyto buňky migrují a usazují se v dorzálních kořenech míšních, kde se díky LIF(u) diferencují v sensorickou linii (22). Pokud byly buňky neurální lišty vyizolovány a byl k nim *in vitro* přidán LIF, přeměnily se v sensorické neurony. LIF je navíc nutný jako signál k přežití.

V roce 1989 byl LIF rozpoznán jako protein identický s „cholinergic neuronal differentiation factor“, faktor který je odpovědný za diferenciaci adrenergických neuronů autonomního nervového systému v neurony cholinergní (23).

2.1.4.2. LIF a kostní tkáň

V kostní tkáni má LIF dvě, naprosto protichůdné funkce. Za prvé pomáhá odbourávat kostní tkáň, a to tím, že zvyšuje resorpci vápníku a zvyšuje počet osteoklastů (24). Za druhé LIF zvyšuje počet osteoblastů a tím pomáhá kostní tkáň zvětšovat (25).

2.1.4.3. Endokrinní funkce

LIF je hlavní regulátor ACTH v hypofýze (26), inhibuje produkci prolactinu a růstového hormonu (27), podporuje diferenciaci primordiálních folikulů ve folikuly primární (28), snižuje produkci testosteronu v Leydigových buňkách (29), podporuje proliferaci primordiálních zárodečných buněk a podílí se na diferenciaci spermatocytů (30).

2.1.4.4. Ostatní funkce

Spolu s TGF β 2 LIF indukuje diferenciaci mesenchymálních buněk v glomeruly(31). LIF stimuluje proliferaci svalových satelitních buněk (32) a způsobuje hypertrofii srdečního svalu (33). Dále LIF stimuluje proliferaci myších melanocytů (34), podporuje proliferaci žírných buněk (35), blokuje transport lipidů do adipocytů (36) a tím při zvýšených dávkách u testovaných myší způsobuje kachetickou chorobu (viz výše) a nakonec indukuje jaterní buňky k produkci sérových proteinů akutní fáze (dříve byl takto LIF znám pod názvem Hepatocyte-stimulating factor III; (37)

Výčet všech těchto funkcí jistě není kompletní a v budoucnu bude třeba hodně úsilí, aby se tento seznam zkompletoval a doplnil. Také je třeba zmínit, že většina těchto pokusů byla provedena hlavně na myších, případně lidských a kuřecích buňkách. Jen málo se toho tedy ví o funkcích proteinu LIF u jiných organismů. Byli sice provedeny některé pokusy s ovčímí a prasečímí LIF orthology, ale v zásadě to byli jen pilotní studie. Dále je potřeba se v budoucnu ještě podrobněji zaměřit na signalizační dráhy, jichž se LIF účastní. Musí zde existovat velmi složitá síť regulací různých signalizačních kaskád, bez čehož nelze objasnit tak mimořádně pleiotropní chování tohoto proteinu. Mnoho práce ohledně těchto regulací a signalizačních kaskád již bylo vykonáno, a tak se nyní pokusím o krátké shrnutí dosavadních poznatků.

2.1.5. Rodina IL-6 a signalizace

LIF je společně s IL-6, IL-11, oncostatinem M (OSM), ciliary neurotrophic factor(em) (CNTF) a kardiotrofinem-1 (CTF1) zařazován do rodiny IL-6. Hlavním společným rysem této rodiny je sdílení receptoru gp130. Dalším společným rysem těchto cytokinů je jejich vzájemná redundantnost.(Tab. 2.1.)

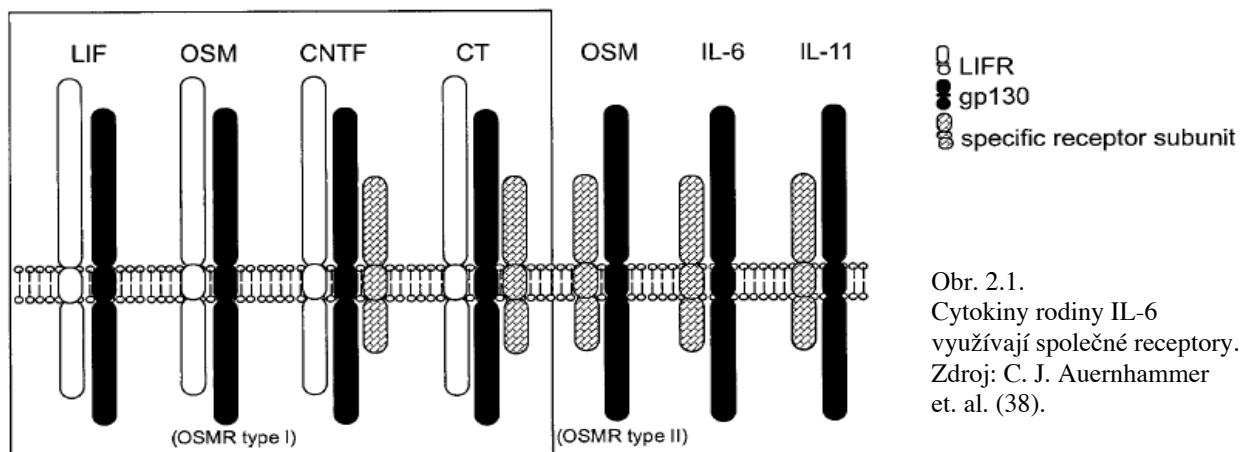
Tabulka 2.1.

Cytokine-mediated effect	IL-6	IL-11	LIF	OSM	CNTF	CT-1
Maintenance of ES cell pluripotentiality	-/+	-	+	+	+	+
Macrophage differentiation in M1 cells	+	-	+	+	-/+	+
Growth promotion of myeloma cells	+	+	+	+	+	nd
Promotion of thrombopoiesis	+	+	+	+	nd	nd
Induction of hepatic acute phase proteins	+	+	+	+	+	+
Induction of ACTH secretion <i>in vivo</i>	+	+	+	+	+	+
Induction of ACTH secretion <i>in vitro</i>	-/+	+	+	+	nd	nd
Neural differentiation	+	+	+	+	+	+
Induction of bone loss/osteoclast formation	+	+	+	+	nd	nd
Induction of cardiac hypertrophy <i>in vitro</i>	-/+	+	+	+	+/-	+

Tato tabulka znázorňuje překrývající se funkce cytokinů IL-6 rodiny. Zdroj C. J. Auernhammer et. al. (38).

Tento fakt se dá vysvětlit, podíváme-li se podrobněji na receptory, přes které je zprostředkována odpověď na tyto molekuly. Všechny tyto faktory využívají gp130 jako vysoko afinitní receptor a jeden až dva další receptory, které obvykle slouží jako nízkoafinitní receptory a pomocí kterých je zajištěna relativní specifita ligandu. Velkou roli zde přitom hraje receptor pro protein LIF – LIFR neboli gp190, který je zde značně promiskuitní. Kromě proteinu LIF ho využívají rovněž OSM, CNTF a CT (38). OSM navíc může LIFR vyměnit za OSM receptor (OSMR). IL-6 a IL-11 využívají kromě gp130 své receptory, avšak nikoli LIFR. (Obr. 2.1.)

Receptory cytokinů IL-6 rodiny tedy nejenže zprostředkovávají podobné odpovědi, ale rovněž do těchto odpovědí zapojují i totožné signální dráhy (39). Způsob, kterým určitá buněčná linie odpoví na navázání určitého ligandu (například proteinu LIF) závisí jednak na prostředí ve kterém se daná buňka nachází, jednak na jejím dosavadním stavu a zároveň na aktuálních signálech, které jak zvenčí, tak zevnitř dostává. Tímto způsobem se například liší svou odpovědí na leukemický inhibiční faktor ES a M1 leukemické buňky (40).



Gp130 a LIFR nejčastěji do své signalizace zapojují Jak-Stat dráhu (Jak1, Jak2 a Tyk2; 44), někdy však také dochází ke stimulaci některých dalších drah pomocí tyrozin kinázi Hck skupiny Src (41). LIF byl prokázán, že aktivuje Shc (41), Ras (41), Raf-1 (42), MAP kinázovou dráhu (43) i Erk1 a Erk2 dráhu (41). Schopnost proteinu LIF indukovat MAPK dráhu je pravděpodobně pro určitý buněčný typ specifická a je pravděpodobně pro odlišení různých aktivit LIF(u) esenciální (41). To, která Jak-Stat dráha se aktivuje je rovněž pro různé buňky specifické.

Po navázání proteinu LIF na nízkoafinitní LIFR dochází k vazbě na vysokoafinitní (gp130) receptor a tím ke vzniku heterodimeru. Tento heterodimer aktivuje Jak kinázovou aktivitu (Jak1, Jak2), čímž jsou oba receptory nafosforylovány. Fosforylací receptorů se vytvoří tzv. „docking sites“, do kterých se váží SH2 domény proteinu Stat (Stat1, Stat3, Stat5a). Stat proteiny jsou poté fosforylovány a dimerizují, čímž se stávají aktivními transkripčními faktory. Je třeba zmínit, že samotný heterodimer gp130 + LIFR nemá kinázovou aktivitu (44).

Účinky proteinu LIF mohou být regulovány na několika úrovních. Na nejvyšší úrovni tato regulace u myši probíhá pomocí rozpustné (soluble) formy LIFR (s-LIFR). Tato rozpustná forma má s formou membránovou totožnou extracelulární doménu, postrádá však doménu transmembránovou a cytosolickou. S-LIFR volně cirkuluje v tělních tekutinách a vycytává tak LIF z těla. Tato inhibice je důležitá pro lokální působení LIF(u) a chrání tak organismus proti jeho působení na nepatřičných místech. Během těhotenství u myši byl například zaznamenán prudký nárůst hladiny s-LIFR, což bylo způsobeno zvýšením lokální produkce LIF(u) uvnitř dělohy (45). Další možnost jak regulovat působení proteinu LIF spočívá v inhibici vlastní Jak-Stat dráhy. Poté, co je aktivována Jak1 kináza, dojde také k fosforylaci Shp-2 fosfatázy. Ta se váže na intracelulární doménu gp130 a defosforyluje ji

(46), čímž zaniká vazebné místo („docking site“) pro Stat. Podobným způsobem fungují i nedávno objevené SOCS proteiny (supressors of cytokine signaling; (47), které se zřejmě váží na katalytické domény Jak kináz, čímž je inaktivují. V neposlední řadě může být Jak-Stat dráha inhibována pomocí proteinů PIAS („protein inhibitors of activated STAT“). PIAS se přímo váží na Stat1, Stat3 a blokuje tak jejich vazbu na DNA (48,49).

2.2. GM-CSF

2.2.1. Úvod

GM-CSF je glykoprotein, který spolu s proteinem LIF a mnoha dalšími cytokiny patří do skupiny hematopoetinů. GM-CSF vytváří vlastní rodinu, do které mimo jiné patří IL-3 a IL-5. Proteiny této skupiny mají podobné vlastnosti a jsou mezi sebou značně redundantní a jejich funkce se překrývají. Dále mezi sebou až na jednu výjimku (viz dále) sdílejí β c receptorovou podjednotku. Stejně jako ostatní hematopoetiny jsou i zástupci GM-CSF rodiny charakterizováni čtyřmi α helixy v terciální struktuře.

GM-CSF byl poprvé vypurifikován v roce 1977, z média myších plicních buněk (50). Tato purifikace však byla, co se kvantitativně týče, poměrně neúčinná a protein byl získán pouze v minimálním množství a tak nebylo umožněno jeho podrobnější studium. To se odehrálo až v letech 1984 až 1986, kdy se podařilo vyizolovat jeho kódující cDNA a kdy byl aktivní rekombinantní GM-CSF pomocí bakteriálních, kvasinkových a savčích expresních systémů poprvé vyprodukován. GM-CSF byl charakterizován jako faktor selektivně stimulující diferenciaci makrofágů a granulocytů (51,52). Během tohoto období byl vyizolován i lidský GM-CSF (53) a byli provedeny první klinické testy na pacientech s poruchou krvetvorby. Od této doby se tento cytokin využívá k terapii jedinců s nízkým počtem bílých krvinek a k regeneraci organismu po nádorové chemoterapii – GM-CSF takto přímo pomáhá snižovat riziko infekcí.

GM-CSF může být na mnoha místech glykosylován, tato glykosylace však není (podobně jako u mnoha dalších cytokinů) nutná a dokonce se ukázalo, že v bakteriích produkováný neglykosylováný GM-CSF je stabilnější a má vyšší aktivitu (54). Co se týče strukturních vlastností, muGM-CSF má molekulovou hmotnost 16,1 kDa a 151 aminokyselin, huGM-CSF má 16,2 kDa, 144 aminokyselin.

2.2.2. Funkce

GM-CSF je podobně jako LIF pleiotropní molekulou, i když ne v tak velké míře. Bylo popsáno mnoho zajímavých aktivit (jak *in vivo*, tak *in vitro*), až na jednu se však žádná pro organismus neukázala jako esenciální. GM-CSF je v těle pod vlivem různých stimulů syntetizován několika buněčnými typy (55). Jsou to T-, B-lymfocyty, makrofágy, žírné buňky, endoteliální a mezoteliální buňky, fibroblasty, osteoblasty nebo nádorové buňky, z toho T buňky a makrofágy jsou stimulovány přímo protizánětlivými stimuly. GM-CSF není v detekovatelném množství přítomen v krvi a proto působí spíše lokálně podle parakrinního a autokrinního modelu. GM-CSF stimuluje proliferaci a maturaci myeloidních buněčných progenitorů, a to hlavně neutrofilů, eosinofilů a monocytů (53,56,57). Dále byla prokázána schopnost stimulovat proliferaci erythroid burst-forming units (BFU-E, progenitory erytrocytů; (58), stimulovat diferenciaci multinukleárních osteoklastů (59) a nakonec byl GM-CSF společně s proteinem LIF identifikován jako faktor odpovědný za diferenciaci M1 myeloidních leukemických buněk (2,60). Vedle stimulace a maturace nezralých progenitorů GM-CSF rovněž posiluje diferenciaci nejruznějších funkcí zralých buněk. Jeho nejvýznamnější aktivitou v tomto směru je zřejmě aktivace neutrofilů (56,61,62). V první řadě funguje GM-CSF pro tyto buňky jako signál přežití, dále podporuje jejich degranulaci, inhibuje jejich migraci, podporuje oxidativní metabolismus a produkci superoxidu, tvorbu LBT4, ovlivňuje tvar cytoskeletu a ovlivňuje expresi a aktivitu (afinitu) membránových receptorů - hlavně receptoru pro chemotaktický peptid fMLP, pocházející z bakteriálních proteinů. Aktivace tohoto receptoru vede k chemotaxi a ke stimulaci fagocytózy, přičemž GM-CSF je odpovědný za zvýšenou citlivost těchto buněk na fMLP (63). Dále je již po dlouhou dobu známo, že GM-CSF zvyšuje „antibody-dependent cell mediated cytotoxicity“ (ADCC) proti nádorovým buňkám (64). Obecně by se tedy dalo říci, že GM-CSF zvyšuje schopnost monocytů, eosinofilů a neutrofilů destruovat a fagocytovat cizorodé objekty.

Na druhou stranu je GM-CSF spojován rovněž s mnohými patologickými procesy, například s rozvojem některých myeloidních leukémií (bylo nalezeno jeho autokrinní vylučování těmito buňkami) a jeho receptor je syntetizován několika druhy nehematopoetických nádorů (55). GM-CSF byl navíc nalezen v synoviální tekutině pacientů s rheumatoidní artritidou, a tak se předpokládá, že zde může napomáhat destrukci tkáně, která je spojena s tímto onemocněním (65).

2.2.3. Nadexprese a knock-out(y)

Nadexprese byla dosažena dvěma způsoby. A) Byly vytvořeny transgenní myši nadexprimující GM-CSF (66). Tyto myši se ukázaly být slepé, vlivem akumulace makrofágů v oku. Dále byl nalezen nadbytek makrofágů v příčně pruhovaných svalech. B) Byly vytvořeny retrovirové expresní vektory exprimující GM-CSF a tyto vektory byly insertovány do kostní dřeně myši (67). Nadexprese měla za následek fatální myeloproliferativní onemocnění, které však překvapivě nebylo zhoubné.

Myši, které měly knockout(ován) gen pro GM-CSF byly životaschopné a ferttilní, avšak měly vadu plic (68). Ukázalo se, že tyto myši měly defekt v surfaktantových proteinech a lipidech, konkrétně, že makrofágy v plicích byly těmito surfaktanty naplněny. Plíce těchto myší byly rovněž ve zvýšené míře prostoupeny bakteriálními a houbovými infekcemi, GM-CSF je tedy esenciální pro funkci makrofágů na tomto místě. Na druhou stranu GM-CSF není esenciální pro funkci imunitního systému v rámci celého organismu. GM-CSF zde nehraje centrální roli, to však nikterak nepopírá jeho důležitost. Jeho funkce pravděpodobně mohou být zastoupeny řadou dalších cytokinů, je však otázkou, jak by se tato redundantnost projevila v jiných než laboratorních podmínkách. GM-CSF je zřejmě zásadní pro rychlý a pohotový průběh imunitní odpovědi.

2.2.4. Receptory a signalizace

Receptor pro GM-CSF se skládá ze dvou podjednotek, z podjednotky α ($GMR\alpha$ (69) a z podjednotky β (β_c ; (70). $GMR\alpha$ tvoří nízkoafinitní ligand-specifickou část receptoru a v převážné většině případů není součástí vnitrobuněčné signální dráhy, zatímco β_c podjednotka detekovatelně neváže GM-CSF a funguje jednak jako vysokoafinitní konvertor receptoru, jednak jako součást vnitrobuněčné signální kaskády (70). β_c je společná podjednotka také pro IL-3 a IL-5, přičemž u IL-3 se u myší našla ještě druhá, pro muIL-3 specifická, β podjednotka (β_{IL-3} (71). Je zajímavé, že na komplex $GMR\alpha/\beta_c$ se kromě GM-CSF rovněž může vázat jak IL-3, tak IL-5 (72), což zdá se vysvětluje překrývající se funkce těchto cytokinů. Obě podjednotky patří do skupiny cytokinových receptorů typu I (71). Pro tuto skupinu jsou v extracelulární části charakteristické dva motivy. Prvním motivem je vysoce konzervovaná sekvence WSXWS, druhým motivem je sada několika konzervovaných

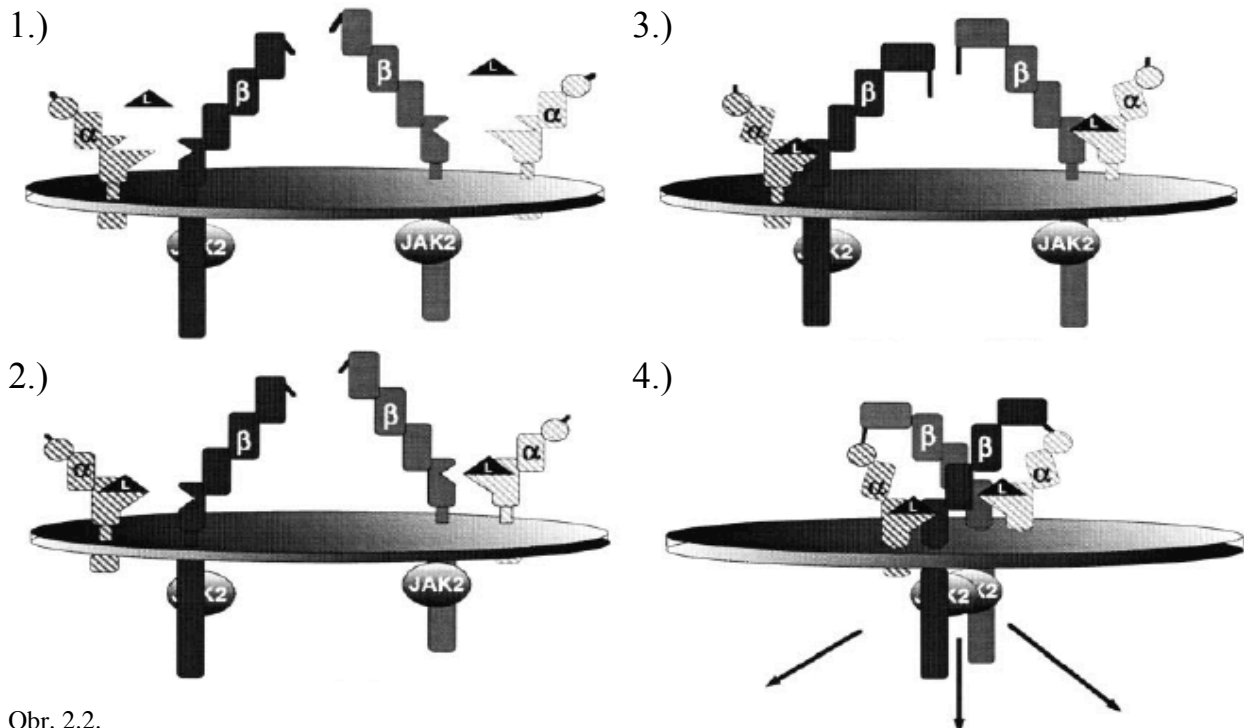
cysteinů. βc podjednotka pak v intracelulární doméně nese několik tyrozinů, které jsou důležité pro transdukcii signálu.

GM-CSF se nejprve váže na $GMR\alpha$ s nízkou afinitou a tento komplex je poté βc podjednotkou přeměněn na komplex vysokoafinitní (70). U cytokinových receptorů typu I je po aktivaci receptoru častým jevem dimerizace receptorového komplexu. Rovněž pro komplex GM-CSF, $GMR\alpha$ a βc (v poměru 1:1:1) byl na základě několika různých pokusů a studií vytvořen model, ve kterém receptorový komplex dimerizuje v poměru 2:2:2 a vytváří tak aktivní formu (73). Ačkoli se GM-CSF detekovatelně neváže na βc (viz. výše), zřejmě má až tři vazebná místa. První místo slouží pro vazbu α podjednotky, druhé pro vazbu podjednotky β a třetí zřejmě interaguje s druhým vysokoafinitním komplexem, komplexem GM-CSF: $GMR\alpha$: βc . (Obr. 2.2.)

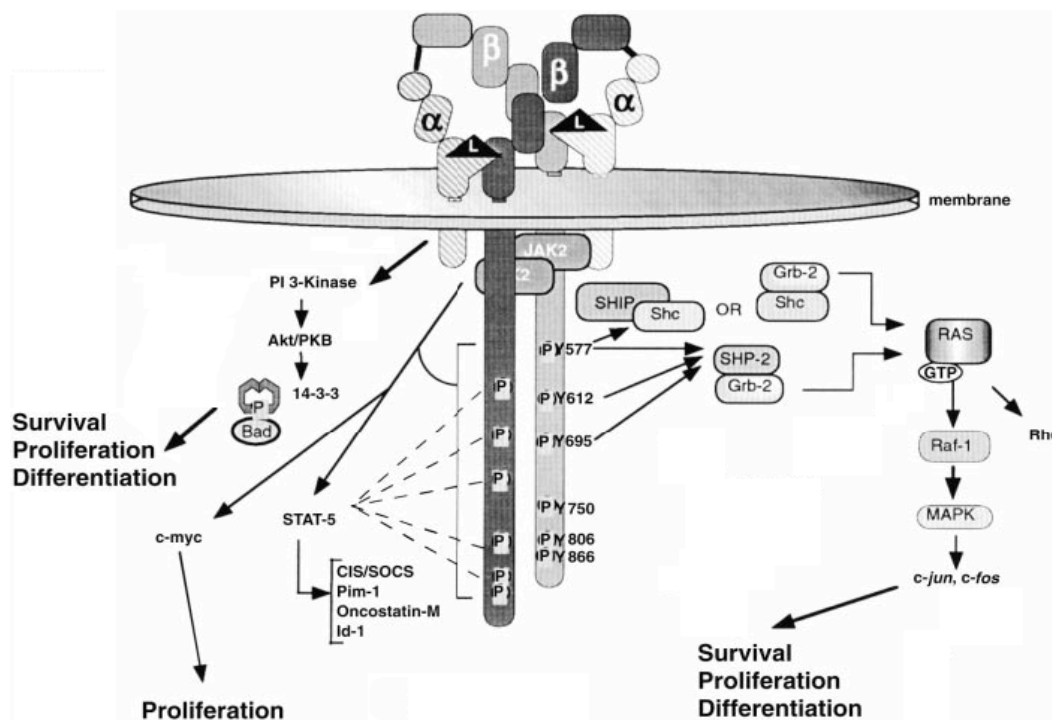
Po vzniku aktivního dimerového komplexu je signál předán do buňky. Přestože βc podjednotka nemá vlastní kinázovou aktivitu, je asociována s tyrozin kinázami skupiny Jak (73-76) a dochází podobně jako u proteinu LIF k zapojení Jak/Stat dráhy. Mimo to bylo identifikováno i zapojení ras-MAP kinázová dráhy a inositol 3-fosfát kinázové dráhy (74,75). Po dimerizaci je Jak2 kináza aktivována, fosforyluje několik tyrozinů na βc podjednotce a tyto fosforylované tyroziny poté slouží jako vazebná místa pro SH2 nebo PTB (phosphotyrosine binding) domény různých proteinů (77). V první řadě se na tyto místa váže protein Stat5, který je následně Jak2 kinázou fosforylován, dimerizuje a je translokován do jádra. Dále se na tyroziny βc mohou vázat různé adaptorové proteiny svými PTB doménami, které aktivují MAP kinázovou dráhu. Mezi tyto proteiny například patří adaptorový protein Shc nebo Grb2 (73,77). Jak MAP kinázová, tak Jak/Stat(ová) dráha může být regulována fosfatázami SHP2 a SHIP. Co se týče zapojení PI3 kinázové dráhy, bylo prokázáno, že PI3 kináza se přímo neváže na βc a zatím není zcela jasné, který protein se na přenosu informace podílí. Zcela nový náhled na tuto otázku přinesla nedávno provedená studie (78), v níž autoři dokázali, že PI3 kináza se váže na α podjednotku a tím aktivuje PI3 kaskádu, v níž dochází k fosforylaci PIP na PI-3,4 bisfosfát, molekulu z řady druhých posílů (second messengers), která dále reguluje aktivitu různých kináz a dalších proteinů. (Pro přehled receptorové signalizace viz. Obr. 2.3.)

Na závěr je třeba zmínit, že u βc podjednotky bylo pomocí různě zkrácených βc mutant identifikováno několik vysoce konzervovaných oblastí (boxů) s různou aktivitou (73). Box 1 je označován jako oblast odpovědná za buněčnou proliferaci. Tato oblast je nejbližší transmembránové doméně a je asociována s Jak2 kinázou. Box 2 zřejmě posiluje proliferační signály boxu 1, pro jeho aktivitu však není nutný. Poslední konzervovaný motiv intracelulární

domény je box 3. Ten je odpovědný za signály potřebné k přežití, které buňka prostřednictvím GM-CSF dostává.



Obr. 2.2. Obrázek zachycuje předpokládaný model aktivace receptoru pro GM-CSF, IL-3 a IL-5. 1)+2) Vazba ligandu; 3) Tvorba heteromeru 1:1:1; 4) Vznik aktivního komplexu 2:2:2, viz text. Zdroj: Guthridge MA, et. al. (73).



Obr. 2.3. Přehled signalizace GM-CSF receptorového komplexu. Zdroj: Obrázek byl převzat a upraven podle Guthridge MA, et. al. (73).

3. Cíl práce

Cílem této práce je připravit rekombinantní proteiny chLIF a chGM-CSF a přitom si osvojit některé metody molekulární biologie. Tyto proteiny budou využity ke studiu procesů krvetvorby a neuronální diferenciace v rámci diplomové práce.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

Pro experimentální část mé bakalářské práce byl použit tento materiál:

4.1.1. Bakteriální buňky

Escherichia coli TOP10 {F- mcrA -(mrr-hsdRMS-mcrBC) _80lacZ_M15 _lacX74 recA1 araD139 -(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG}. Tento kmen byl pořízen od firmy Invitrogen a jeho hlavní výhodou je rychlá kultivace, snadná izolace plazmidové DNA a možnost modré/bílé selekce díky C-koncovému fragmentu lacZ genu uvnitř genomu.

Escherichia coli BL21(DE3)-RIL {B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal l (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]}. Tyto bakterie ve svém genomu nesou gen pro T7 RNA polymerázu bakteriofága T7 a jsou určeny především pro efektivní expresi genů z T7 p r o m o t o r u .

Prokaryotické a eukaryotické organismy využívají rozdílných translačních aparátů, mimo jiné se mezi sebou liší svými tRNA, a proto další výhodou tohoto kmene jsou v genomu integrované geny pro některé eukaryotické tRNA (arginin, isoleucin a leucin).

4.1.2. Živné půdy a média pro bakteriální buňky

Kompletní bohatá půda: 1% trypton, 1% kvasničný extrakt, 0,5% casaminoacids, 0,5% glukosa, 84 mM Na₂HPO₄, 16 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂

LB medium: 1% trypton, 1% kvasničný extrakt, 1% NaCl

LB agar: 1,5% agar v LB

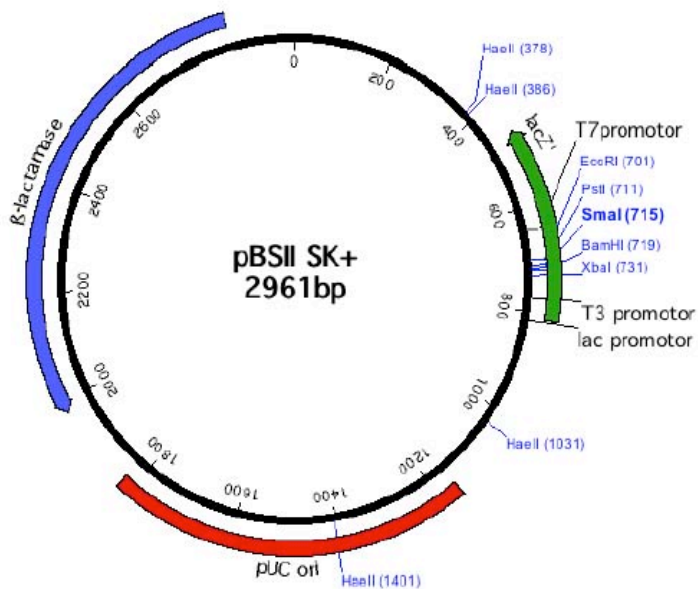
4.1.3. Eukaryotické tkáně a buňky

Jak tkáně pro izolaci RNA, tak buňky kostní dřeně byly získány z kuřat (*Gallus gallus*), kmene Brown Leghorn C/E gs (79).

4.1.4. Vektory

pBSII SK+

Hlavní výhodou tohoto vektoru (Stratagene) je možnost vysokého namnožení v bakteriální buňce díky tzv. pUC origin. Dále tento vektor obsahuje gen pro β -laktamázu, odpovědný za rezistenci transformovaných bakterií vůči ampicilinu, a lacZ' gen, který je umístěn za lac promotorem, kódující α -fragment proteinu pro β -galaktosidasu. Pokud je do média přidán chromogenní substrát (například x-gal), oba fragmenty β -galaktosidasy jsou aktivovány a x-gal je štěpen na modrý produkt. Toho se využívá pro selekci pozitivních klonů nesoucí klonovaný gen. Vložení insertu do kódující sekvence N-terminální části lacZ' genu totiž dochází k inaktivaci lacZ' a pozitivní klony jsou proto bílé. (Obr. 4.1.)

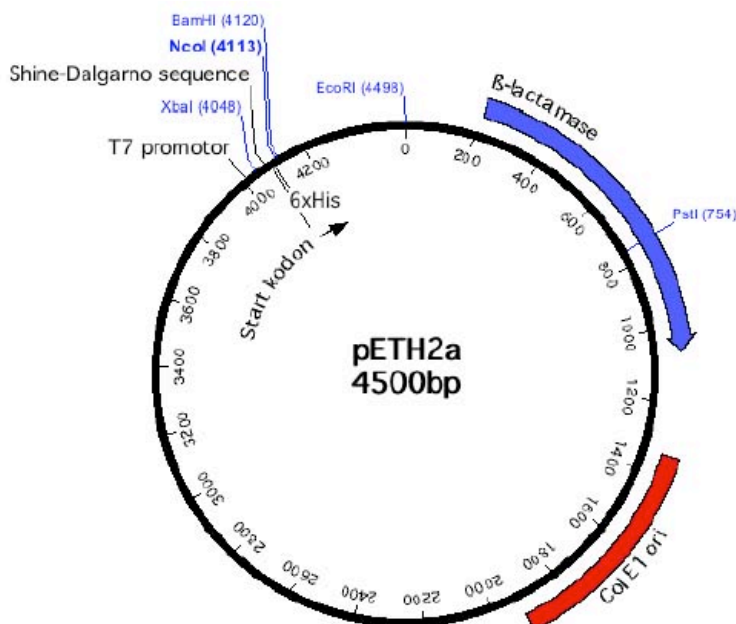


Obr. 4.1.
Mapa vektoru pBSII SK+
Klonovací SmaI restrikční místo označeno tučně. Vložení genu do tohoto místa dochází k inaktivaci genu lacZ'.

pETH2a

Vektor pETH2a poskytl Dr. M. Busslinger (IMP, Vídeň) a jedná se o expresní vektor, který je založen na vektorech série pET (80). Tyto vektory umožňují selektivní transkripci cílové DNA polymerázou bakteriofága T7 z T7 promotoru.

K práci byl použit 5' defosforylovaný vektor, který byl rozštěpen restriční endonukleázou BamH1. Stejně jako pBSK SKII+ i tento vektor nese β -laktamázový gen. Dále je za start kodonem, umístěna krátká sekvence, kódující 6 histidinů. Vložením libovolného genu ve čtecím rámci za tuto sekvenci vznikne produkt s modifikovaným N-koncem. Tento produkt je vhodný k detekci anti-His protilátkou a lze jej snadno purifikovat metodou afinitní chromatografie. (Obr.4.2.)



Obr. 4.2.
Mapa vektoru pETH2a

4.1.5. Enzymy

Všechny použité enzymy pochází od firem Promega, New England Biolabs, Boehringer Ingelheim, Roche, Finnzymes, Pharmacia, Amersham, Fermentas, Invitrogen a Stratagene.

4.1.6. Oligonukleotidy

Primery LIF-13, LIF-14 a GM-CSF-1, GM-CSF-2 byly syntetizovány firmou Metabion.

4.1.7. Protilátky

Monoclonal Anti-polyHistidine antibody: Myší monoklonální protilátka proti motivu 6-His od firmy Sigma.

Anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate: Sekundární protilátka proti myším Ig, konjugovaná s křenovou peroxidázou od firmy Amersham, jako součást soupravy ECL™.

4.1.8. Soupravy pro molekulární biologii

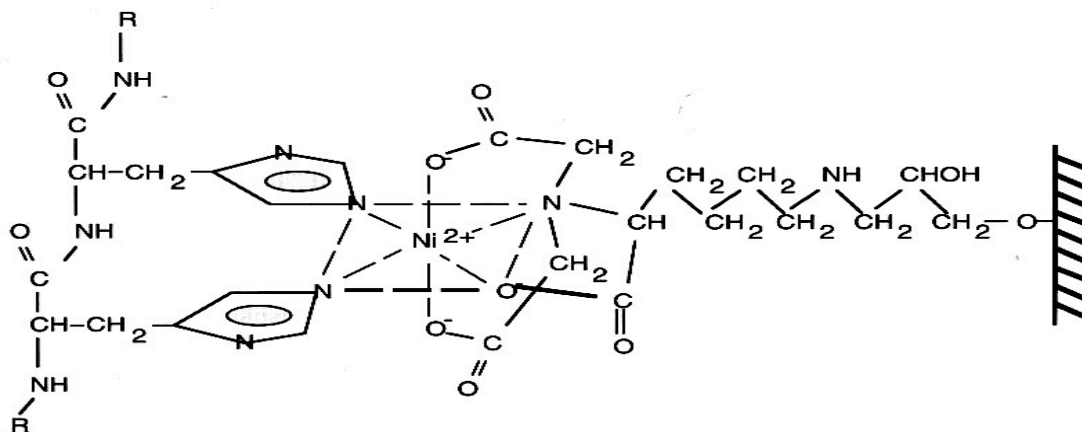
ECL™: Souprava pro detekci bílkovin pomocí protilátek od firmy Amersham. Obsahuje sekundární protilátky s kovalentně navázanou peroxidázou, rozeznávající králičí nebo myší primární protilátky, a roztoky se substrátem a katalyzátory pro ECL (enhanced chemiluminescence) reakci. Peroxidáza štěpí peroxid vodíku, čímž vznikají volné radikály. Tyto radikály reagují s kumarovou kyselinou a dochází k luminiscenci.

Sekvenační souprava Big Dye™: Tento kit (Applied Biosystems – Perkin Elmer) slouží k sekvenaci DNA dideoxy terminační metodou. Barva Big Dye obsahuje DNA polymerázu, pufr, prekursory nukleotidů (dNTP) a dideoxynukleotidy (ddNTP), které jsou označeny různými fluorescenčními barvami. Dideoxynukleotidy mohou být s určitou pravděpodobností inkorporovány do vznikajícího vlákna DNA a po inkorporaci terminují polymerační reakci. Tímto způsobem vznikne mnoho různě dlouhých fragmentů, které jsou na 3' konci označeny jednou ze čtyř barev. DNA sekvence je určena podle elektroforetického rozdělení těchto fragmentů.

Bradford Reagent (Bio-Rad) : Roztok podle Bradfordové pro kvantitativní stanovení proteinů obsahující Coomassie Brilliant Blue G 250 (81).

4.1.9. Materiál pro afinitní chromatografii

Pro purifikaci proteinu byl použit kit (Qiagen), obsahující Ni²⁺-NTA agarosu – imobilizované niklové ionty navázané na agarosu. Proteiny obsahující sekvenci šesti až desíti histidinů jsou schopny se s vysokou afinitou na tyto konjugáty vázat a tím mohou být separovány (82). (Obr. 4.3.)



Obr. 4.3.

Model vazby Ni^{2+} -NTA agarosy na skupinu sousedících histidinů. Zdroj: Qiagen, The QIAexpressionist, May 1991.

4.1.10. Pufry a další chemikálie pro práci s nukleovými kyselinami

TEG: 25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM glukosa

0,5x TE: 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 8,0

TE + RNasa: 50 μg ribonukleázy A v 1 ml 0,5xTE

1xPBS : 150 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4

SDS-NaOH: 1% SDS, 0,2 M NaOH

Fenol-chloroform: Objemový poměr 1:1. Fenol ekvilibrován 0,1 M Tris pH 8,0

1x TBE: 89 mM Tris, 89 mM H_3BO_3 , 2 mM EDTA, pH 8,3

Agarosový gel (2%): 1 g agarosy v 50 ml TBE + 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromid

10x BFB: 500 μl glycerolu, 200 μl 0,5M EDTA, 50 μl 1M Tris pH 8, 250 μl H_2O , 1% bromfenolová modř

TSR Template Supression Reagent – denaturační pufr obsahující formamid (Applied Biosystems-Perkin Elmer)

4.1.11. Pufry pro proteinovou elektroforézu za denaturujícími podmínkami

5x vzorkový (lyzační) pufr: 60 mM Tris pH 6,8, 25% glycerol, 2% SDS, 14,4 mM 2-merkaptoethanol, 0,1% bromfenolová modř

Separační gel: 10-15% akrylamid (+ N, N'-metylenbisakrylamid, 75AA:2BIS), 375 mM Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfát amonný, 0,07% TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethyldiamin)

Zaostřovací gel: 5% akrylamid (+ N, N'-metylenbisakrylamid), 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,075% persulfát amonný, 0,1% TEMED

Pufr pro SDS-PAGE: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS; pH 8,3

4.1.12. Pufry pro přenos bílkovin na membránu a specifickou detekci bílkovin („Western-blotting“)

Přenášecí pufr: 20 mM Tris, 153,6 mM glycin, 20% methanol; pH 8,3

TBS: 10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl

Blokovací roztok: 5g odtučněné sušené mléko, 95ml TBS

4.1.13. Roztoky pro afinitní chromatografii

Roztok A: 6 M guanidine hydrochloride, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-merkaptoethanol; pH 8,0

Roztok B: 8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-merkaptoethanol; pH 8,0

Roztok B: 8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-merkaptoethanol; pH 6,3

Roztok E: 8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM β-merkaptoethanol; pH 4,5

Dialyzační pufr: PBS; pH 7,5

4.2. Metody

4.2.1. Práce s nukleovými kyselinami

4.2.1.1. Izolace RNA

Po odběru tkáně byl materiál homogenizován a zpracován v reagentu TRIzol (Invitrogen; (83)). Tento roztok kromě fenolu obsahuje guanidin isothiokyanát (kyselé pH). Během homogenizace buněk TRIzol udržuje integritu RNA, zatímco rozrušuje buňky a jednotlivé buněčné kompartmenty. RNA po centrifugaci zůstává ve vodné fázi a je vysrážena isopropanolem. Na závěr byla spektrofotometricky stanovena její koncentrace.

4.2.1.2. Syntéza 1. vlákna cDNA (complementary DNA)

Metodou reverzní transkripce bylo nasyntetizováno 1.vlákno cDNA. Reakce byla namíchána v následujícím poměru:

RNA	5 µg
5x M-MuLV-buffer	5 µl
10 mM dNTP	3 µl
0,5 M p(dN) ₆	0,5 µl
Rnasin	1 µl
M-MuLV reverzní transkriptáza	1 µl (200 U)
H ₂ O	doplnit do 25 µl

Nejprve byly namíchány veškeré komponenty (premix), kromě p(dN)₆ a RNA, poté byly jednotlivé složky následovně smíchány:

1.	RNA+ H ₂ O (celkem 11 µl)	5 min 68°C, led
2.	+0,5 µl p(dN) ₆	5 min 68°C, led
3.	+premix (13,5 µl)	1 h 37°C, 10 min 95°C

Takto připravená cDNA může být skladována v -20°C.

PCR

Pro polymerázovou řetězovou reakci byla po optimalizaci zvolena polymeráza Phusion™ (Finnzymes). Jedná se o vysoce kvalitní rekombinantní enzym s vysokou procesivitou, robustností a přesností, vzniklý fúzí několika enzymů.

Reagencie byly namíchány na ledu podle následujícího vzoru:

cDNA	cca. 0,5µg
5x Phusion™ HF buffer	5 µl
10 mM dNTP	5 µl
50 µM primery	0,25 µl (každý)
Phusion™ polymeráza	0,25 µl (0,5 U)
H ₂ O	doplňit do 25 µl

a vlastní amplifikace proběhla na termocycleru PTC-200 (MJ Research) podle následujícího programu:

Děj	Teplota	Doba trvání	
Počáteční denaturace	98°C	1 min, 30 s	
Denaturace	98°C	30 s	} 40x
Annelace	65°C	30 s	
Elongace	72°C	30 s	
Dokončení elongace	72°C	5 min	

Sekvenace

Sekvence klonovaných nukleových kyselin byly v průběhu práce kontrolovány a ověřovány pomocí sekvenačního kapilárního přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer vybaveného softwarem pro analýzu dat ABI PRISM 310 Collection (Perkin Elmer). DNA byla před vlastní sekvenací přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí a zbavena tak veškeré kontaminující RNA a proteinů. Nakonec byla spektrofotometricky stanovena její koncentrace. Sekvenační reakce byla namíchána pomocí komerční soupravy Big Dye™ následujícím způsobem:

DNA k sekvenování	1 µg
Primer	1 pmol
Premix (BigDyeTerminator)	2 µl
H ₂ O	doplňit do 10 µl

Reakce byla připravena na ledu a zkumavka poté vložena do termocycleru, kde byl spuštěn následující program:

Děj	Teplota	Doba trvání	
Počáteční denaturace	96°C	1 min	
Denaturace	96°C	20 s	} 24x
Annelace	45-60°C	5 s	
Elongace	60°C	4 min	

Po ukončení bylo k obsahu zkumavek přidáno: 10 μ l 3 M octanu sodného, 80 μ l H₂O, 1 μ g glykogenu. a 270 μ l 96%EtOH. Zkumavka byla centrifugována při 4°C 15 min na stolní centrifuze při 14000 rpm. Pelet byl opláchnut v 500 μ l 70% ethanolu, 2 min centrifugován při 14000 rpm, vysušen a rozpuštěn ve 25 μ l TSR. Poté byla DNA 5 min denaturován při 95°C a přenesena do sekvenačního přístroje.

Analytická izolace plasmidové DNA („miniprep“) alkalickou metodou (84)

Plazmidová DNA byla izolována z 1,5 ml bakteriální kultury TOP 10 nebo BL21(DE3)-RIL pěstované 12 hodin na orbitálním inkubátoru při 37°C a 200-250 rpm. Bakterie byly pěstovány v LB mediu s ampicilinem o koncentraci 0,1 mg/ml. Bakteriální pelet vzniklý centrifugací buněk ve stolní centrifuze (2 min, 14000 rpm) byl resuspendován v 50 μ l TEG(u) a promíchán na vortexu. Poté bylo přidáno 50 μ l denaturačního roztoku (2% SDS a 0,2M NaOH) a směs byla opět promíchána na vortexu. Po přidání 50 μ l neutralizačního roztoku (3MK 5MAc) a po intenzivním protřepání byla směs inkubována 2 min při laboratorní teplotě, poté byla doplněna 150 μ l fenol-chloroformu, intenzivně promíchána na vortexu a centrifugována 3 min při 14000 rpm. Supernatant byl přenesen do nových zkumavek, doplněn 0,7x objemem isopropanolu, promíchán na vortexu, ponechán 2 min při laboratorní teplotě a následně centrifugován 3 min při 14000 rpm. Pelet byl po centrifugaci opláchnut 70% omývacím ethanolem, vysušen, resuspendován v 25 μ l TE + RNasa a inkubován 2h při 37°C.

Štěpení restrikčními endonukleázami

Pro analytické účely bylo štěpení prováděno v 10 μ l celkového objemu restrikční směsi. Na naštěpení 1 μ g DNA byly použity 2 U enzymu. Do reakce byl přidán 1 μ l 10x koncentrovaného pufru, obsahující hlavně hořečnaté a jiné dvojmocné kationty, které jsou nezbytné pro vlastní enzymatickou reakci.

Pro preparativní účely byl objem reakční směsi zvětšován podle množství štěpené DNA. Teplota použitá při inkubaci a typ pufru odpovídaly doporučením výrobců daných enzymů. Doba štěpení se pohybovala v rozmezí 1-12 hodin.

Ligace

Výsledný objem ligační směsi byl 15 μ l. Směs obsahovala 1 μ l T4 DNA ligasy (New England Biolabs, 10 U/ μ l) a 1 μ l 10x koncentrovaného ligačního pufru (NEB), obsahující kromě různých iontů také ATP, coby zdroj energie pro ligasu.

Množství a molární poměr vektoru a inzertu se u jednotlivých reakcí lišily, obecně byl dodržován přibližně 10-ti molární přebytek inzertu oproti vektoru. Ligace probíhala přes noc při 16°C.

Purifikace DNA – odstranění proteinů (fenol-chloroformová extrakce)

Roztok DNA (obvykle po enzymatických reakcích jako je štěpení restrikcními endonukleázami, či štěpení RNA ribonukleázou A) byl doplněn 90 μ l H₂O. Ke směsi bylo přidáno 15 μ l 5M NaAc pH 7, vše bylo promícháno a dále bylo přidáno 100 μ l fenol-chloroformu. Po intenzivním protřepání a centrifugaci 3 min při 14000 rpm byla odebrána vodná fáze, ke které bylo přidáno 100 μ l chloroformu. Zkumavka byla promíchána na vortexu a centrifugována stejně jako v předchozím kroku. Po přidání 250 μ l 96% ethanolu a protřepání byla směs inkubována 2 min při laboratorní teplotě a následně centrifugována 5 min při 14000 rpm. Pelet byl opláchnut 70% ethanolem, vysušen a rozpuštěn v 15 μ l 0,5x TE.

Elektroforéza nukleových kyselin v agarosovém gelu

Elektroforéza byla prováděna v horizontálním uspořádání v agarosovém gelu. Pro analytické účely byla použita obyčejná agarosa, pro účely preparativní agarosa nízkotající. Agarosový gel byl připraven krátkým povařením agarosy v 60 ml 1xTBE pufru. Hustota gelu se pohybovala v rozmezí 1 – 2,5%, v závislosti na velikosti dělených fragmentů. Po povaření a úplném rozpuštění agarosy v pufru byl přidán ethidium bromid v množství 0,5 μ g/ml umožňující vizualizovat přítomnou DNA v UV světle. Nanášené vzorky byly smíchány s 1/10 objemu 10x koncentrovaného vzorkového pufru. Elektroforéza trvala 60-90 minut při laboratorní teplotě s vloženým napětím 5-10 V/cm.

Izolace fragmentu z agarosového gelu

Po elektroforetické separaci fragmentů nukleových kyselin v nízkotajícím agarosovém gelu byla část gelu obsahující požadovaný fragment vyříznuta skalpelem a přenesena do centrifugační mikrozukavky. Do této zkumavky bylo přidáno 500 μ l 0,5x TE pufru a během

10 min při teplotě 68°C došlo k úplnému rozpuštění agarosy. Směs byla krátce vortexována a k takto získanému roztoku bylo přidáno 0,5 ml fenolu. Po důkladném protřepání a centrifugaci (3 min 14000 rpm) byla do nové zkumavky odebrána vodná fáze a bylo přidáno 0,5ml směsi fenol-chloroform. Směs byla opětovně vortexována a centrifugována jako v předchozím kroku a po odebrání vodné fáze bylo přidáno 0,5 ml chloroformu, 1μg glykogenu a 50μl NaAc. Po protřepání a centrifugaci (viz. výše) byl k vodné fázi přidán 1ml 96% ethanolu. Zkumavka byla 10 min centrifugována při 14000 otáčkách za minutu a 4°C. Pelet byl poté 2x opláchnut 70% ethanolem, vysušen a rozpuštěn v 10 μl TE.

Spektrofotometrické stanovení koncentrace nukleových kyselin

Měření absorbance bylo provedeno v křemíkové kyvetě na přístroji SpectraMax (Molecular Devices) a byly měřeny absorbance při 230, 260 a 280 nm. Použité koeficienty pro hodnocení kvality a kvantity dvouřetězcové DNA byly následující:

$A(260)=1$ odpovídá koncentraci 50 μg/ml čisté dvouřetězcové DNA nebo 40 μg/ml jednořetězcové RNA, ve vodném roztoku

$A(260\text{nm})/A(280\text{nm})=1,8$; pokud je nižší, obsahuje preparát zbytky proteinů

$A(260\text{nm})/A(230\text{nm})=2,2$; pokud je nižší, obsahuje preparát zbytky aromatických sloučenin, pravděpodobně stopy fenolu

Transformace bakterií

100 μl čerstvě rozmražené suspenze transformačně kompetentních bakterií *Escherichia coli* kmene TOP10 nebo BL21(DE3)-RIL bylo přidáno k 10 μl ligační směsi a suspenze byla přenesena do transformační zkumavky. Po inkubaci na ledu byly buňky vloženy na 1 min do vodní lázně s teplotou 42°C. Poté byly ochlazeny na ledu a po přidání 0,9 ml LB media byly inkubovány za stálého třepání 40 min v 37°C. Po uplynutí této doby byly bakterie přeneseny do mikrozukavky, lehce zcentrifugovány na stolní centrifuze (4000 rpm, 1 min) a pelet byl resuspendován v 100-200 μl LB media. Sterilní skleněnou „hokejkou“ byla suspenze rozetřena na agarovou plotnu (průměr 10 cm) obsahující antibiotikum ampicilin. Pokud byla prováděna modrá/bílá selekce, bylo na plotny před rozetřením rovněž přidáno 10μl 100mM IPTG a 40μl chromogenního substrátu x-gal. Nakonec byly buňky na plotně inkubovány 12-16 hodin při 37°C.

4.2.2. Práce s proteiny

Expres proteinů v bakteriích *Escherichia coli*

Transformační zkumavka(y) s 1 ml LB media a ampicilinem o koncentraci 0,1 mg/ml byly inokulovány bakteriální kolonií nebo bakteriemi z konzervy (bakteriální suspenze v 50% glycerolu zamražená na -80°C) kmene BL21(DE3)-RIL, nesoucí příslušný expresní plazmid. Zkumavky se třepaly na třepačce při 37°C a 250 rpm po dobu 12 hodin. Poté bylo odebráno 50-200 µl, kterými byla inokulována 50 ml zkumavka (Falcon) s 10 ml LB media a ampicilinem (0,1mg/ml). Kultivace probíhala na třepačce (250 rpm) při 37°C. Během této kultivace byla průběžně měřena absorbance kultury při 600 nm. Ve chvíli, kdy absorbance dosáhla hodnoty OD 0,6, byl odebrán 1ml alikvot, který později sloužil jako neindukovaná kontrola (-) a ke zbytku bylo přidáno 10µl 1M IPTG. Kultivace dále pokračovala stejným způsobem další 2 hodiny. Na konci byl ze zbylých 9ml odebrán další 1ml alikvot (+) a zbytek byl centrifugován na centrifuze Heraeus (15 min, 4600 rpm).

Alikvoty (-) a (+) byly centrifugovány (1min, 14000rpm) a resuspendovány v lyzačním pufru. Poté byly po dobu 5-ti minut povařeny v 95°C a zamraženy v -20°C.

Proteinová elektroforéza za denaturačních podmínek

Proteinové vzorky byly analyzovány SDS polyakrylamidovou elektroforézou za denaturujících podmínek (SDS-PAGE(85)). Tato metoda umožňuje dělení proteinů v závislosti na velikosti, což ve většině případů odpovídá dělení podle molekulové hmotnosti. Prováděna byla na aparatuře Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System (Bio Rad). Deskové gely měly rozměry 8,6 x 6,8mm a tloušťku 0,75 nebo 1 mm. Používán byl 15% dělicí gel, zaostřovací gel byl vždy 5%. Elektroforéza probíhala při laboratorní teplotě za konstantního proudu 20mA na jeden gel.

Imunodetekce bílkovin („Western blotting“)

Pro identifikaci proteinů rozdělených na SDS polyakrylamidovém gelu bylo po jejich přenosu na nitrocelulosovou membránu využito specifické detekce protilátkami (86), Western blotting. Elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu byl prováděn na přístroji IMM Semi-Dry Blotter (The W.E.P. company, Inc). Nitrocelulosová membrána byla s gelem a s filtračními papíry (Whatman) inkubována 5 min

v blotovacím pufru a vložena mezi 2x4 filtrační papíry (stejných rozměrů jako membrána a gel) a dvě deskové uhlíkové elektrody blotéru. Ze „sendviče“ byly odstraněny bublinky a byl aplikován konstantní proud $2,5 \text{ mAcm}^{-2}$ po dobu 1,5 hodiny. Celý postup probíhal při laboratorní teplotě.

Po přenosu proteinů na nitroceluloseovou membránu byla vazebná místa na membráně vysycena blokovacím roztokem po dobu 1 hodiny. Poté byla membrána inkubována 2 hodiny s primární protilátkou v TBS pufru. Po trojnásobném 5 min opláchnutí v TBS byla aplikována sekundární protilátka s kovalentně vázanou peroxidázou v TBS po dobu 1 hodiny. Membrána byla znovu promyta v TBS a inkubována 5 min s roztoky 1 a 2 pro ECL obsahující luminol. Při reakci peroxidazy se substrátem dochází k luminiscenci, která byla zachycena na rentgenový film.

Purifikace proteinu metodou afinitní chromatografie pomocí Ni^{2+} -NTA agarosy

Proteiny s 6-ti histidiny na N-konci byly purifikovány podle protokolu od firmy Qiagen.

Zcentrifugovaný bakteriální pelet (8ml) byl resuspendován v 1ml pufru A. Směs byla poté krátce promíchána na vortexu a ponechána po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Dále byla směs centrifugována (5 min, 14000 rpm) a byl odebrán supernatant, ke kterému bylo přidáno 50 μl Ni^{2+} -NTA agarosy 2x promyté v pufru A. Obsah zkumavky byl inkubován za pomalého otáčení (10 rpm) 40 min při pokojové teplotě. V tomto kroku se his-tagované proteiny navázaly na Ni^{2+} -NTA agarosu.

Následně byla směs centrifugována (5 min, 6000 rpm) a pelet byl postupně opláchnut těmito pufrů: ještě 1x pufr A (1ml), dále 1x pufr B (1 ml), 2x pufr C (po 1 ml) a nakonec byl protein v kolonce eluován 500 μl pufru E. Mezi jednotlivými promývacími kroky byla směs pokaždé krátce centrifugována a supernatant byl uchován.

Koncentrace proteinu byla stanovena metodou podle Bradfordové (81; viz dále). β -merkaptoethanolem redukované cysteinové můstky byly reoxidovány L-cystinem a nakonec byl protein přenesen do dialyzační membrány, kde byl 12 hodin dialyzován proti 1xPBS (pH7,5).

Kvantifikace proteinů podle Bradfordové

Ke kvantitativnímu stanovení proteinů byla použita metoda podle Bradfordové. Roztok určený ke kvantifikaci obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue G 250, které v přítomnosti proteinů (aminokyselin s aromatickými postranními řetězci) posunuje absorpční maximum ze 465 nm na 595 nm. Jako standard byly použity vodné roztoky obsahující různé koncentrace BSA.

100 μ l zásobního roztoku bylo odměřeno do několika jamek v mikrotitrační destičce a do těchto jamek byly přidány po 5 μ l měřené vzorky včetně standardů s jednotlivými koncentracemi BSA. Následovala 5-ti minutová inkubace při laboratorní teplotě a poté byla proti blanku (samotný zásobní roztok) změřena absorbance při 595 nm. Koncentrace byla stanovena na základě kalibrační křivky (BSA byl použit jako standard).

5. Výsledky

5.1. Homologie

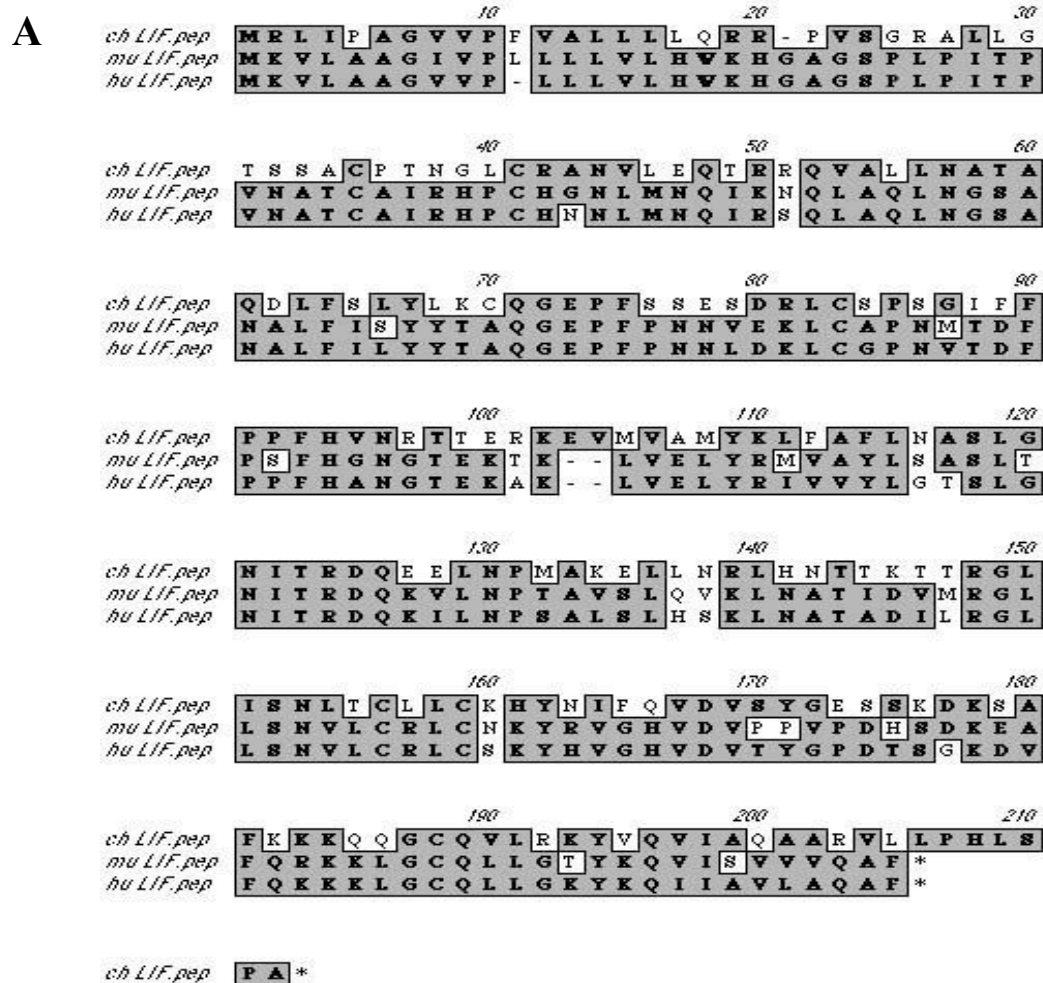
GM-CSF a LIF, narozdíl od jiných růstových faktorů, vykazují nízkou homologii se svými savčími orthology (myš, člověk). (Tab. 5.1., Obr. 5.1.)

Pro účely práce s kuřecími buňkami proto není možné savčí proteiny využít, a tak bylo důležité oba proteiny připravit.

	chLIF x muLIF	chLIF x huLIF	chGM-CSF x muGM-CSF	chGM-CSF x huGM-CSF
Identita	40%	42%	25%	22%
Homologie	59%	60%	44%	45%

Tabulka 5.1. Identity označují procentuelní zastoupení identických aminokyselin, homologie označují procentuelní zastoupení podobných aminokyselin.

Homologie mezi kuřecími a savčími orthology proteinů LIF a GM-CSF



B

<i>chGM-CSF.pep</i>	M L A Q L T I L L A L G V L C S P - A P T - I T Y S C C	10	20	30
<i>muGM-CSF.pep</i>	M V L Q F L L F L G I - V V C S F S A P T R S P A S V I R P			
<i>huGM-CSF.pep</i>	M V L Q S L L L L G T - V A C S I S A P G R S P S P S T Q P			
<i>chGM-CSF.pep</i>	Y K V Y T I L E E I T S H L E - - S T A A T A G - - - L	40	50	60
<i>muGM-CSF.pep</i>	W K H V D A I K E A L S L L N - - D M P A M E N E D V D I			
<i>huGM-CSF.pep</i>	W E H V N A I Q E A R R L L N L S R D T A A E M N E T V E V			
<i>chGM-CSF.pep</i>	S S V F M D I R D K T C L R N N L K I F I E S L K T N G I E	70	80	90
<i>muGM-CSF.pep</i>	V S K E F S I Q R P I C V Q T R L K V Y Q Q G L Q G N F I K			
<i>huGM-CSF.pep</i>	I S E M F D L Q E P T C L Q I R L E L Y K Q G L R G S L I K			
<i>chGM-CSF.pep</i>	E E S G I V F Q L N R V H E C E R L F S N I T P T P Q V P D	100	110	120
<i>muGM-CSF.pep</i>	L K G - - A L N M M A S H Y Q K - - - N C P P I P E I - -			
<i>huGM-CSF.pep</i>	L K G - - P L T M M A S H Y K Q - - - H C P P I P E T - -			
<i>chGM-CSF.pep</i>	K E C R T A Q V S R E K F K E A L K T F F I Y L S D V L P E	130	140	150
<i>muGM-CSF.pep</i>	- D C E T Q V T I F E D F I D N L K G F L F D I P F D C W K			
<i>huGM-CSF.pep</i>	- S C A T Q T I T F E S F K E N L K D F L L V I P F D C W E			
<i>chGM-CSF.pep</i>	E K D C I *	160	170	180
<i>muGM-CSF.pep</i>	P V Q K			
<i>huGM-CSF.pep</i>	P V Q E			

Obr. 5.1.

Porovnání aminokyselinové sekvence kuřecích, myších a lidských proteinů (A) LIF, (B) GM-CSF. Šedé rámečky označují homologie, viz text.

5.2. Design primerů

V první fázi bylo nutné navrhnout pro LIF a GM-CSF primery, které by bylo možné použít pro RT-PCR. Pro tento účel byla prohledána databáze GenBank na serveru www.ncbi.nlm.nih.gov, kde byly pro oba proteiny byly nalezeny kódující sekvence (chGM-CSF Acc. No.: CF258055, chLIF Acc. No.: XM_425293).

Maturované proteiny GM-CSF a LIF mají na N-konci signální peptid (Obr. 5.2.), byly proto navrženy takové primery, které hybridizují ve čtecím rámci až za touto signální sekvencí. Primery byly určeny pro účely klonování do BamHI restrikčního místa, na 5` konci jsou tedy vybaveny krátkou linkerovou sekvencí s tímto restrikčním místem (podtrženo).

LIF-13

5' CGGGGATCCCGCGCTGCTGGGGACGAGCTCTGCGT 3`

LIF-14

5' CGGGGATCCTCACGCGGGGCTGAGGTGAGGTAGGA 3`

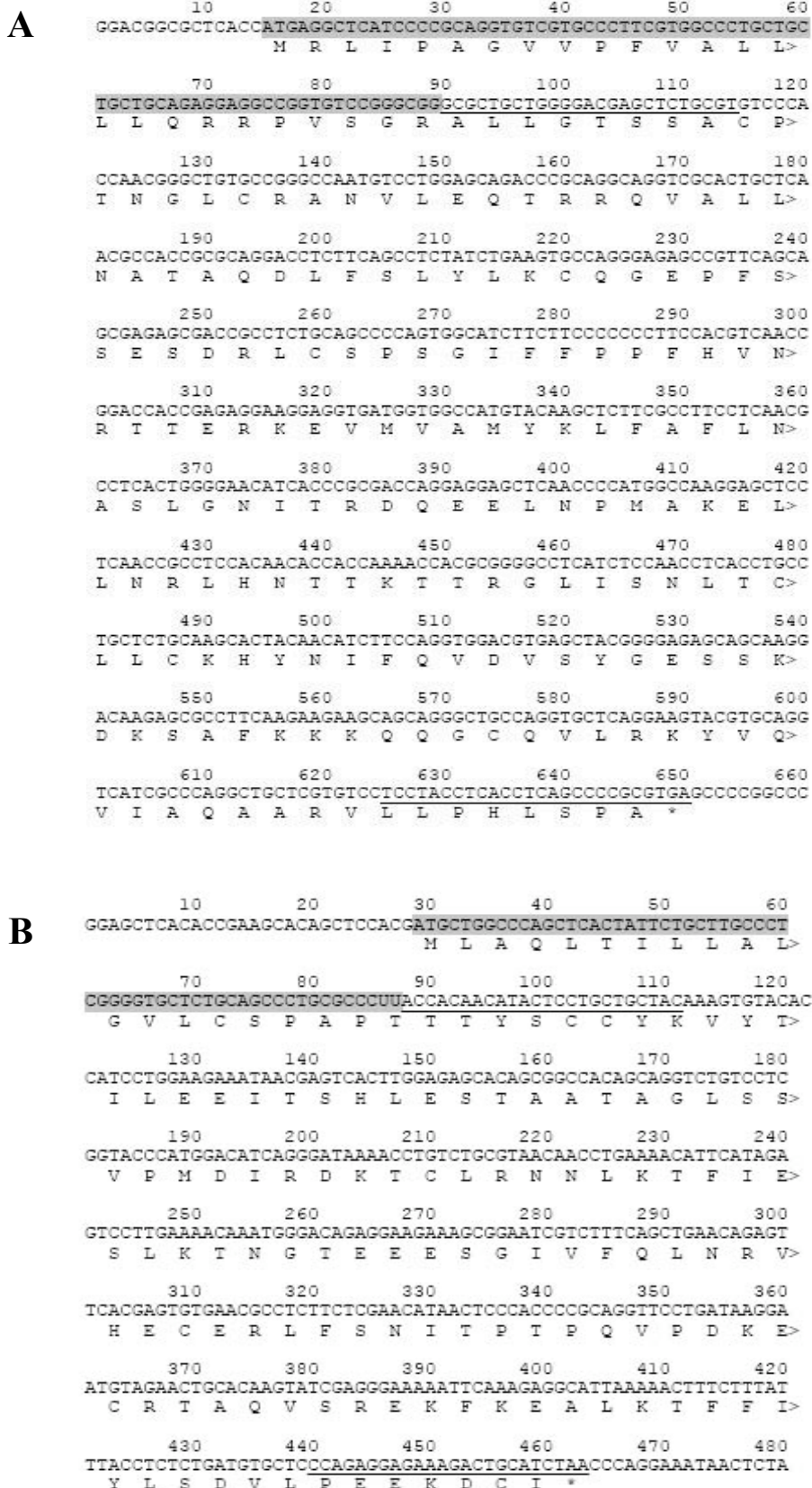
GM-1

5' CGGGGATCCACCACAACATACTCCTGCTGCTAC 3`

GM-2

5' CGGGGATCCTTAGATGCAGTCTTTCTCCTCTGG 3`

DNA sekvence a primární struktura proteinů chLIF a chGM-CSF



Obr 5.2.

Kódující DNA sekvence a sekvence aminokyselin (A) proteinu chLIF, (B) proteinu chGM-CSF. Signální peptid označen šedě, místa pro vazbu primerů jsou podtržena.

5.3. Reverzní transkripce (viz Metody 4.2.1.)

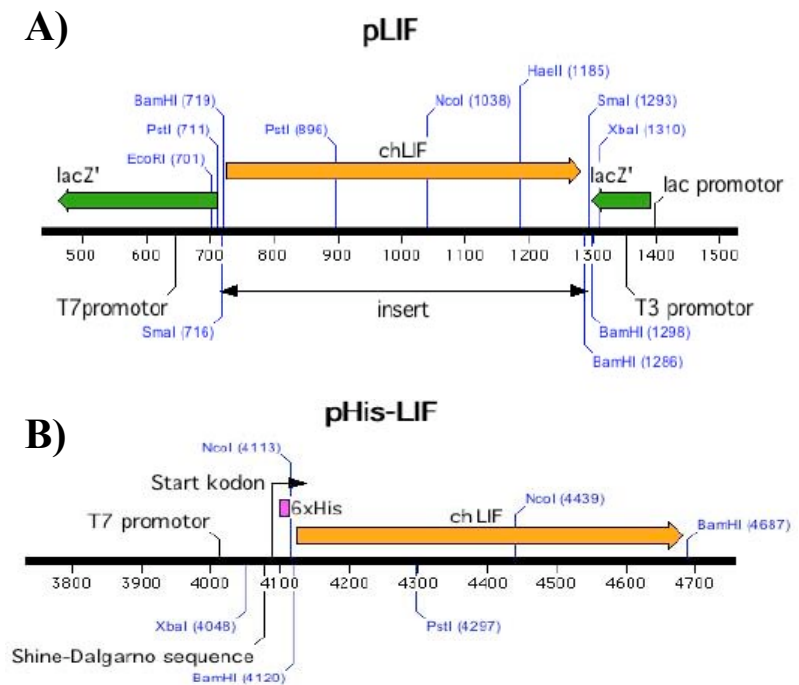
Dalším důležitým bodem byl výběr tkáně, ve které dochází k expresi GM-CSF a proteinu LIF. Nakonec byly pro izolaci RNA vybrány tyto tkáně: játra, brzlík, slezina a srdce. Tkáně byly homogenovány v TRIzolu a celková RNA byla purifikována. Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 0,6-2 µg/µl. Metodou reverzní transkripce bylo poté nasyntetizováno 1. vlákno cDNA.

5.4. Klonování – chLIF (viz Metody 4.2.1.)

Nejprve bylo provedeno několik pilotních PCR reakcí, po kterých se po optimalizaci podařilo z brzlíkové cDNA LIF amplifikovat. (Obr.5.4.a) PCR produkt s tupými konci byl poté oddělen na nízkotající agarose, vyříznut a purifikován. Vzhledem k nízkému výtěžku byl tento purifikovaný produkt reamplifikován. Po reamplifikaci byl opět elektroforeticky oddělen (Obr.5.4.b), vyříznut a purifikován. LIF byl nakonec ligován do SmaI restrikčního místa vektoru pBSII SK+. Takto vzniklý produkt (pBS-chLIF (označen jako pLIF), Obr.

5.3.a) byl transformován do bakterií kmene TOP10. Na agarosových plotnách s ampicilinem druhý den vyrostlo 16 bílých kolonií. Z 6-ti těchto kolonií byla izolována plazmidová DNA a restrikčním štěpením restrikázou BamHI byla ověřena přítomnost insertu. (Obr.5.4.c)

Čtyři pozitivní vzorky byly sekvenovány a byl vybrán jeden klon, jež obsahoval neporušenou kódující sekvenci proteinu LIF bez mutací.



Obr 5.3.

Mapy částí vektorů (A) pLIF a (B) pHis-LIF s vloženými inserty.

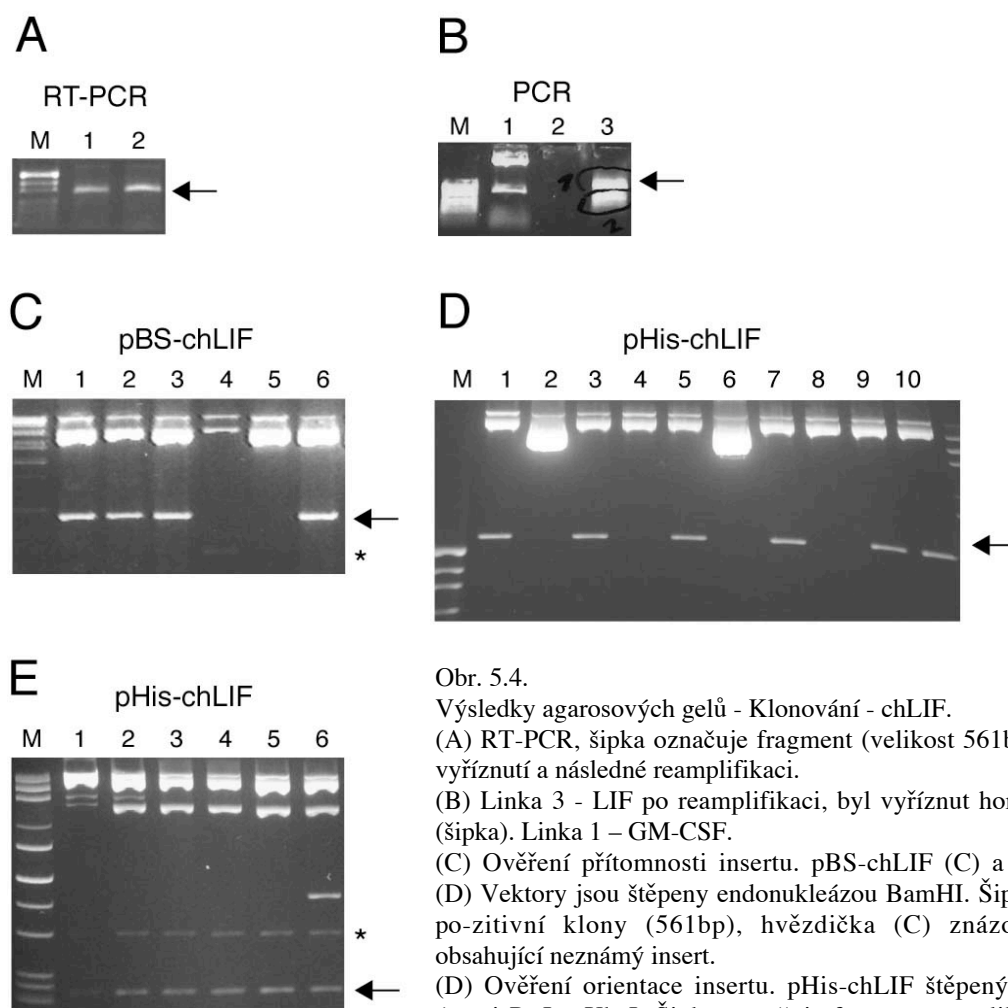
(A) chLIF je vložen do SmaI restrikčního místa a může být vystřižen endonukleázou BamHI. LacZ' gen označen zeleně.

(B) chLIF je vložen do BamHI restrikčního místa a může být touto endonukleázou rovněž vystřižen. Sekvence kódující 6 histidinů označena růžově.

Zbytek vyizolované plazmidové DNA z tohoto klonu byl proto opět rozštěpen (endonukleáza BamHI) a po elektroforéze v nízkotající agarose byl fragment vyříznut a purifikován. Purifikovaný fragment byl ligován s defoforylovaným expresním vektorem pETH2a do BamHI restrikčního místa a ligační produkt (pHis-chLIF (pHis-LIF), Obr. 5.3.b) byl transformován do bakterií BL21(DE3)-RIL. Bakterie byly rozetřeny na agarosové plotny s ampicilinem a byly kultivovány. Celkem vyrostlo deset kolonií a ze všech těchto kolonií byla vyizolována plazmidová DNA. Poté byla nejprve ověřena přítomnost insertu (endonukleáza BamHI, 6 pozitivních klonů; Obr.5.4.d) a následně byla ověřena orientace insertu restrikčními endonukleázami PstI a XbaI. (Obr.5.4.e) Velikosti očekávaných fragmentů byly následující:

+ orientace insertu	3294 bp
	1524 bp
	249 bp
- orientace insertu	3294 bp
	1303 bp
	470 bp

Po elektroforéze se ukázalo, že všechny vzorky obsahovaly insert ve správné orientaci a ve vektoru bylo zároveň identifikováno další PstI/XbaI restrikční místo. Dva vzorky byly sekvenovány. Kódující sekvence i sekvence T7 promotoru byly v pořádku, a proto kolonie, ze kterých byly tyto dva vzorky izolovány, byly proto zamrazeny na -80°C a uchovány pro další použití.



Obr. 5.4.

Výsledky agarosových gelů - Klonování - chLIF.

(A) RT-PCR, šipka označuje fragment (velikost 561bp) určený k vyříznutí a následné reamplifikaci.

(B) Linka 3 - LIF po reamplifikaci, byl vyříznut horní fragment (šipka). Linka 1 – GM-CSF.

(C) Ověření přítomnosti insertu. pBS-chLIF (C) a pHis-chLIF (D) Vektory jsou štěpeny endonukleázou BamHI. Šipka označuje po-zitivní klony (561bp), hvězdička (C) znázorňuje klon obsahující neznámý insert.

(D) Ověření orientace insertu. pHis-chLIF štěpený endonukleázami PstI a XbaI. Šipka označuje fragment o velikosti 249bp, hvězdičkou označen neznámý fragment o velikosti 400bp.

5.5. Klonování – chGM-CSF (viz Metody 4.2.1.)

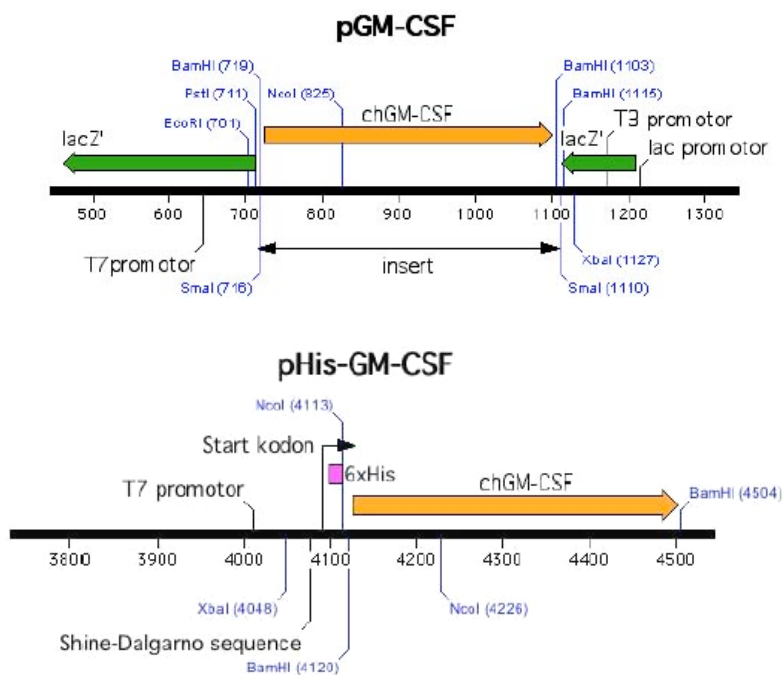
GM-CSF byl pomocí PCR reakce amplifikován z brzlíkové cDNA (Obr. 5.6.a), jako v případě genu pro LIF. PCR produkt s tupými konci byl po elektroforéze v nízkotající agarose, vyříznut a purifikován. Dále byl GM-CSF ligován do SmaI restrikčního místa vektoru pBSII SK+. Takto vzniklý produkt (pBS-chGM-CSF (pGM-CSF), Obr. 5.5.a) byl transformován do bakterií kmene TOP10. Na agarosových plotnách s ampicilinem druhý den vyrostlo 20 bílých kolonií. Z šesti těchto kolonií byla izolována plazmidová DNA a restrikčním štěpením endonukleázou BamHI byla ověřena přítomnost insertu. (Obr.5.6.b) Tři pozitivní vzorky byly sekvenovány a byl vybrán jeden klon, s neporušenou a správnou GM-CSF kódující sekvencí.

Zbytek vyizolované plazmidové DNA z tohoto klonu byl rozštěpen (endonukleáza BamHI) a po elektroforéze v nízkotající agarose byl fragment z této agarosy vyříznut a purifikován. Purifikovaný fragment byl ligován s defoforylovaným expresním vektorem pETH2a do BamHI restrikčního místa a ligační produkt (pHis-chGM-CSF (pHis-GM-CSF),

Obr. 5.5.b) byl transformován do bakterií BL21(DE3)-RIL. Bakterie byly rozetřeny na agarosové plotny s ampicilinem a byly kultivovány. Celkem vyrostlo sto kolonií a z šesti těchto kolonií byla vyizolována plazmidová DNA. Poté byla ověřena přítomnost insertu (endonukleáza BamHI), přičemž všechny vzorky se ukázaly být pozitivní. Následně byla ověřena orientace insertu restrikční endonukleázou NcoI. (Obr.5.6.c) Velikosti očekávaných fragmentů byly následující:

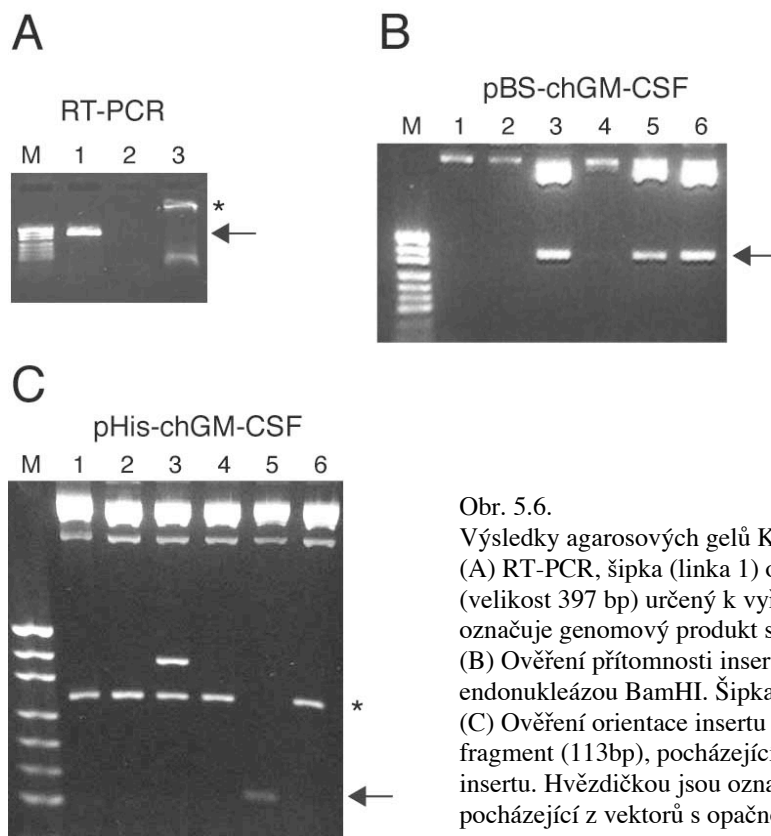
+ orientace insertu	4387 bp 113 bp
- orientace insertu	4215 bp 285 bp

Po elektroforéze v 2,5% agarosovém gelu byl z těchto šesti vzorků vybrán jeden pozitivní klon. (Obr. 2c) Zbytek plasmidové DNA tohoto klonu byl sekvenován a sekvence se ukázala být v pořádku. Tento klon (označen pHis-chGM-CSF plus) byl zamražen na -80°C a uchován pro další použití. Rovněž byl zamražen jeden klon s opačnou (minus) orientací insertu, jako kontrola.



Obr. 5.5.

Mapy částí vektorů (A) pGM-CSF a (B) pHis-GM-CSF s vloženými inserty. (A)chGM-CSF je vložen do SmaI restrikčního místa a může být vystřížen endonukleázou BamHI. LacZ' gen označen zeleně. (B)chGM-CSF je vložen do BamHI restrikčního místa a může být touto endonukleázou rovněž vystřížen. Sekvence kódující 6 histidinů označena růžově.



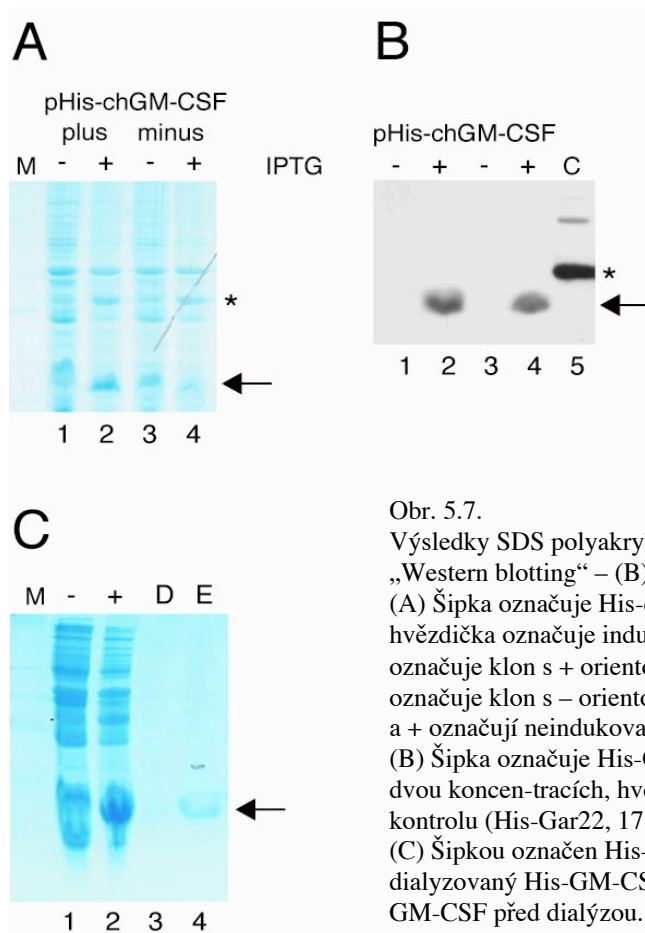
Obr. 5.6.
 Výsledky agarosových gelů Klonování – chGM-CSF.
 (A) RT-PCR, šipka (linka 1) označuje GM-CSF fragment (velikost 397 bp) určený k vyříznutí. Hvězdička (linka 3) označuje genomový produkt s nesestříženými introny.
 (B) Ověření přítomnosti insertu. pBS-chLIF štěpený endonukleázou BamHI. Šipka označuje pozitivní klony (397 bp).
 (C) Ověření orientace insertu pHis-chGM-CSF. Šipka označuje fragment (113bp), pocházející z vektoru se správnou orientací insertu. Hvězdičkou jsou označeny fragmenty (285bp), pocházející z vektorů s opačnou orientací insertu.

5.6. Expresse GM-CSF (viz Metody 4.2.2.)

Klony pHis-chGM-CSF plus a minus byl kultivován do OD 0,6. Poté bylo přidáno IPTG a po dvouhodinové kultivaci byly připraveny lyzáty, které byly analyzovány na 15% SDS polyakrylamidovém gelu. (Obr. 5.7.a)

Na gelu nebyl chGM-CSF jednoznačně identifikován, proto byl proveden „Western blotting“. GM-CSF byl detekován anti-histidinovou protilátkou (Obr. 5.7.b). Poté byl GM-CSF purifikován pomocí Ni²⁺-NTA agarosy, byla změřena jeho koncentrace (0,223 μg/μl) a byl dialyzován. Purifikovaný a dialyzovaný GM-CSF byl spolu s celkovými lyzáty analyzován na 15% SDS polyakrylamidovém gelu. (Obr.5.7.c)

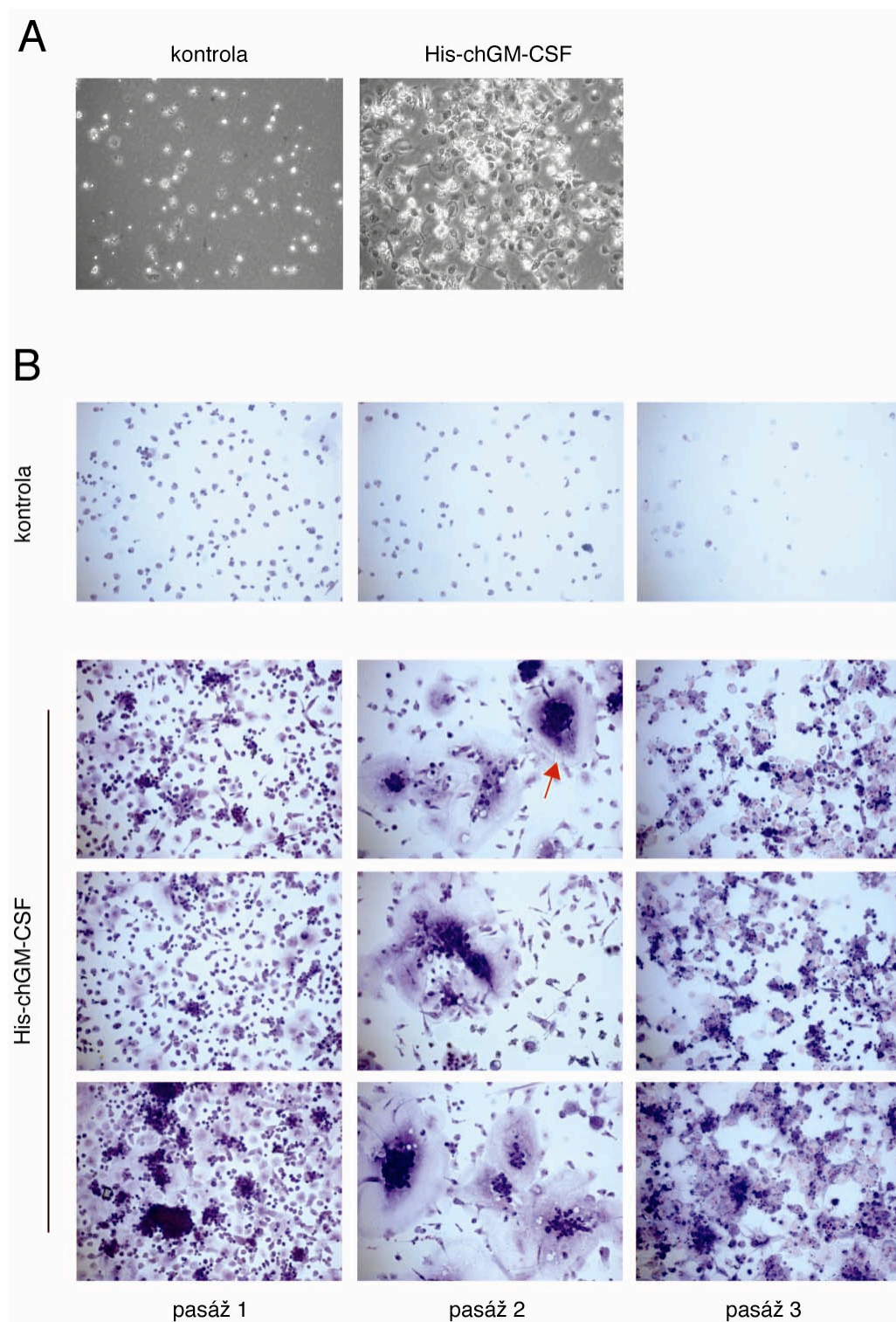
GM-CSF během dialýzy vyprecipitoval, ale částečně se ho podařilo rozpustit, tudíž mohla být *in vitro* ověřena jeho aktivita.



Obr. 5.7.
 Výsledky SDS polyakrylamidových gelů – (A, C) a „Western blotting“ – (B)
 (A) Šipka označuje His-chGM-CSF (15,5kDa), hvězdička označuje indukující se β -laktamasu. „Plus“ označuje klon s + orientovaným insertem, „minus“ označuje klon s – orientovaným insertem. Symboly – a + označují neindukované/indukované bakterie.
 (B) Šipka označuje His-GM-CSF (15,5 kDa) ve dvou koncentracích, hvězdička v lince C označuje kontrolu (His-Gar22, 17 kDa).
 (C) Šipkou označen His-GM-CSF, v linii D je dialyzovaný His-GM-CSF, v linii E je eluovaný GM-CSF před dialýzou.

5.7. Ověření biologické aktivity rekombinantního chGM-CSF

Aktivita purifikovaného His-chGM-CSF byla ověřena v pilotním experimentu za použití progenitorových buněk izolovaných z kuřecí kostní dřeně (87). Předběžné výsledky (Obr.5.8.a) ukazují že His-chGM-CSF je aktivní *in vitro* a naznačují, že bude důležitým nástrojem pro studium myeloidní diferenciace. Pozorovali jsme totiž kromě zesílené podpory proliferace nezralých progenitorů (v kooperaci s SCF, stem cell factor(87) zvláště více-stupňovou diferenciaci progenitorů na makrofágy, dendritické buňky a také osteoklasty (Obr. 5.8.b).



Obr. 5.8.

In vitro aktivita kuřecího rekombinantního GM-CSF.

Progenitorové buňky z kostní dřeně, kultivované 3 dny v přítomnosti His-chGM-CSF a SCF (stem cell factor), kontrola jen v přítomnosti SCF.

(A) Fotografie adherentních buněk byly pořízeny ve fázovém kontrastu.

(B) Progenitorové suspenzní buňky viz. (A) byly každý 3. den přeneseny na novou misku a zbylé adherentní buňky byly barveny May-Grunwald-Giemsa. Šipka označuje multinukeovaný osteoklast.

6. Souhrn a výhledy

Cílem mé bakalářské práce bylo připravit rekombinantní proteiny chGM-CSF a chLIF. Během práce jsem se setkal s řadou problémů, které se většinou podařilo překonat. Bylo identifikováno nové restrikční místo na vektoru pETH2a a v budoucnu bude potřeba tento vektor osekvenovat. Protein His-chLIF se podařilo naklonovat do expresního vektoru pETH2a a sekvence byla zkontrolována. Podařilo se připravit rekombinantní chGM-CSF a jeho biologická aktivita byla ověřena v prvním pilotním experimentu. Protein His-chGM-CSF tedy může být už nyní využit při studiu buněčné diferenciaci.

Cíl mé diplomové práce bude spočívat v těchto krocích:

- 1) Dokončit přípravu rekombinantního proteinu chLIF.
- 2) Připravit protein His-chIL-6 analogicky jako byl připraven protein His-chGM-CSF.
- 3.) Připravit fúzní proteiny „hyper chLIF“ a „hyper chIL-6“. Tyto konstrukty budou fúzovány s extracelulárními doménami α -receptorových podjednotek IL-6R a LIFR. V minulosti již byl připraven lidský a myší hyper IL-6 a ukázalo se, že tento fúzní produkt je schopný aktivovat ko-receptor gp130 i při velmi nízkých koncentracích a má mnoho nových biologických aktivit (88). Bude proto výzvou, připravit podobné konstrukty (spolu s proteinem chLIF) i u kuřat.

7. Literatura

1. Scintu, F. et al. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci* 7, 14 (2006).
2. Gearing, D. P. et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo J* 6, 3995-4002 (1987).
3. Metcalf, D., Hilton, D. & Nicola, N. A. Leukemia inhibitory factor can potentiate murine megakaryocyte production in vitro. *Blood* 77, 2150-3 (1991).
4. Metcalf, D., Nicola, N. A. & Gearing, D. P. Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice. *Blood* 76, 50-6 (1990).
5. Metcalf, D. Murine hematopoietic stem cells committed to macrophage/dendritic cell formation: stimulation by Flk2-ligand with enhancement by regulators using the gp130 receptor chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11552-6 (1997).
6. Moreau, J. F. et al. Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 336, 690-2 (1988).
7. Laabi, Y., Metcalf, D., Mifsud, S. & Di Rago, L. Differentiation commitment and regulator-specific granulocyte-macrophage maturation in a novel pro-B murine leukemic cell line. *Leukemia* 14, 1785-95 (2000).
8. Williams, R. L. et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-7 (1988).
9. Smith, A. G. et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-90 (1988).
10. Thomson, J. A. et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7844-8 (1995).
11. Horiuchi, H. et al. Chicken leukemia inhibitory factor maintains chicken embryonic stem cells in the undifferentiated state. *J Biol Chem* 279, 24514-20 (2004).
12. Metcalf, D. & Gearing, D. P. Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5948-52 (1989).
13. Stewart, C. L. et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-9 (1992).
14. Shen, M. M. et al. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *Embo J* 13, 1375-85 (1994).
15. Bugga, L., Gadiant, R. A., Kwan, K., Stewart, C. L. & Patterson, P. H. Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J Neurobiol* 36, 509-24 (1998).
16. Moon, C. et al. Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9015-20 (2002).
17. Kim, E. J. et al. Leukemia inhibitory factor is a proliferative factor for olfactory sensory neurons. *Neuroreport* 16, 25-8 (2005).
18. Carpenter, M. K. et al. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol* 158, 265-78 (1999).
19. Butzkueven, H. et al. LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat Med* 8, 613-9 (2002).
20. Morikawa, Y. et al. Expression of interleukin-6 receptor, leukemia inhibitory factor receptor and glycoprotein 130 in the murine cerebellum and neuropathological effect of leukemia inhibitory factor on cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 100, 841-8 (2000).
21. Sugiura, S. et al. Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur J Neurosci* 12, 457-66 (2000).
22. Murphy, M., Reid, K., Hilton, D. J. & Bartlett, P. F. Generation of sensory neurons is stimulated by leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3498-501 (1991).
23. Yamamori, T. et al. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 246, 1412-6 (1989).
24. Reid, L. R. et al. Leukemia inhibitory factor: a novel bone-active cytokine. *Endocrinology* 126, 1416-20 (1990).
25. Dazai, S. et al. Leukemia inhibitory factor enhances bone formation in calvarial bone defect. *J Craniofac Surg* 11, 513-20 (2000).

26. Chesnokova, V., Kariagina, A. & Melmed, S. Opposing effects of pituitary leukemia inhibitory factor and SOCS-3 on the ACTH axis response to inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E1110-8 (2002).
27. Tomida, M. et al. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 inhibit secretion of prolactin and growth hormone by rat pituitary MtT/SM cells. *Cytokine* 14, 202-7 (2001).
28. Nilsson, E. E., Kezele, P. & Skinner, M. K. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 188, 65-73 (2002).
29. Mauduit, C. et al. Leukemia inhibitory factor antagonizes gonadotropin induced-testosterone synthesis in cultured porcine leydig cells: sites of action. *Endocrinology* 142, 2509-20 (2001).
30. Piquet-Pellorce, C., Dorval-Coiffec, I., Pham, M. D. & Jegou, B. Leukemia inhibitory factor expression and regulation within the testis. *Endocrinology* 141, 1136-41 (2000).
31. Barasch, J. et al. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell* 99, 377-86 (1999).
32. Spangenburg, E. E. & Booth, F. W. Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C204-11 (2002).
33. Murata, M. et al. Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, enhances L-type Ca²⁺ current and [Ca²⁺]_i transient in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31, 237-45 (1999).
34. Hirobe, T. Role of leukemia inhibitory factor in the regulation of the proliferation and differentiation of neonatal mouse epidermal melanocytes in culture. *J Cell Physiol* 192, 315-26 (2002).
35. Tanaka, T., Morita, E., Mihara, S., Kanno, M. & Yamamoto, S. Identification of leukemia inhibitory factor as a potent mast cell growth-enhancing factor produced by mouse keratinocyte cell line, KCMH-1. *Arch Dermatol Res* 293, 18-25 (2001).
36. Mori, M., Yamaguchi, K. & Abe, K. Purification of a lipoprotein lipase-inhibiting protein produced by a melanoma cell line associated with cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 1085-92 (1989).
37. Baumann, H. & Wong, G. G. Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. *J Immunol* 143, 1163-7 (1989).
38. Auernhammer, C. J. & Melmed, S. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev* 21, 313-45 (2000).
39. Boulton, T. G., Stahl, N. & Yancopoulos, G. D. Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem* 269, 11648-55 (1994).
40. Starr, R. et al. Distinct roles for leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain and gp130 in cell type-specific signal transduction. *J Biol Chem* 272, 19982-6 (1997).
41. Ernst, M., Oates, A. & Dunn, A. R. Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 271, 30136-43 (1996).
42. Schiemann, W. P. & Nathanson, N. M. Raf-1 independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by leukemia inhibitory factor in 3T3-L1 cells. *Oncogene* 16, 2671-9 (1998).
43. Schiemann, W. P. & Nathanson, N. M. Involvement of protein kinase C during activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by leukemia inhibitory factor. Evidence for participation of multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 269, 6376-82 (1994).
44. Kodama, H. et al. Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 81, 656-63 (1997).
45. Layton, M. J. et al. A major binding protein for leukemia inhibitory factor in normal mouse serum: identification as a soluble form of the cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8616-20 (1992).
46. Stofega, M. R., Wang, H., Ullrich, A. & Carter-Su, C. Growth hormone regulation of SIRP and SHP-2 tyrosyl phosphorylation and association. *J Biol Chem* 273, 7112-7 (1998).
47. Starr, R. et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-21 (1997).
48. Chung, C. D. et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-5 (1997).
49. Liu, B. et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626-31 (1998).
50. Burgess, A. W., Camakaris, J. & Metcalf, D. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J Biol Chem* 252, 1998-2003 (1977).
51. Sparrow, L. G., Metcalf, D., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. & Burgess, A. W. Purification and partial amino acid sequence of asialo murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 292-6 (1985).

52. Gough, N. M. et al. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Nature* 309, 763-7 (1984).
53. Gasson, J. C. et al. Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science* 226, 1339-42 (1984).
54. Burgess, A. W. et al. Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 69, 43-51 (1987).
55. Gasson, J. C. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77, 1131-45 (1991).
56. Arai, K. I. et al. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 59, 783-836 (1990).
57. Metcalf, D. et al. Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 67, 37-45 (1986).
58. Donahue, R. E. et al. Demonstration of burst-promoting activity of recombinant human GM-CSF on circulating erythroid progenitors using an assay involving the delayed addition of erythropoietin. *Blood* 66, 1479-81 (1985).
59. Miyamoto, T. et al. Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood* 98, 2544-54 (2001).
60. Smith, A., Metcalf, D. & Nicola, N. A. Cytoplasmic domains of the common beta-chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. *Embo J* 16, 451-64 (1997).
61. Weisbart, R. H., Golde, D. W., Clark, S. C., Wong, G. G. & Gasson, J. C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* 314, 361-3 (1985).
62. Kaufman, S. E., DiPersio, J. F. & Gasson, J. C. Effects of human GM-CSF on neutrophil degranulation in vitro. *Exp Hematol* 17, 800-4 (1989).
63. Weisbart, R. H., Golde, D. W. & Gasson, J. C. Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors. *J Immunol* 137, 3584-7 (1986).
64. Vadas, M. A., Nicola, N. A. & Metcalf, D. Activation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human neutrophils and eosinophils by separate colony-stimulating factors. *J Immunol* 130, 795-9 (1983).
65. Williamson, D. J., Begley, C. G., Vadas, M. A. & Metcalf, D. The detection and initial characterization of colony-stimulating factors in synovial fluid. *Clin Exp Immunol* 72, 67-73 (1988).
66. Lang, R. A. et al. Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell* 51, 675-86 (1987).
67. Johnson, G. R., Gonda, T. J., Metcalf, D., Hariharan, I. K. & Cory, S. A lethal myeloproliferative syndrome in mice transplanted with bone marrow cells infected with a retrovirus expressing granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Embo J* 8, 441-8 (1989).
68. Stanley, E. et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5592-6 (1994).
69. Gearing, D. P., King, J. A., Gough, N. M. & Nicola, N. A. Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Embo J* 8, 3667-76 (1989).
70. Hayashida, K. et al. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9655-9 (1990).
71. Bazan, J. F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6934-8 (1990).
72. Woodcock, J. M. et al. The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor exists as a preformed receptor complex that can be activated by GM-CSF, interleukin-3, or interleukin-5. *Blood* 90, 3005-17 (1997).
73. Guthridge, M. A. et al. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 16, 301-13 (1998).
74. Sato, N., Sakamaki, K., Terada, N., Arai, K. & Miyajima, A. Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *Embo J* 12, 4181-9 (1993).
75. Hiraguri, M. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-5 activate mitogen-activated protein kinase through Jak2 kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 100, S45-51 (1997).
76. Okuda, K., Smith, L., Griffin, J. D. & Foster, R. Signaling functions of the tyrosine residues in the beta chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood* 90, 4759-66 (1997).

77. Pawson, T. & Scott, J. D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-80 (1997).
78. Dhar-Mascareno, M., Pedraza, A. & Golde, D. W. PI3-kinase activation by GM-CSF in endothelium is upstream of Jak/Stat pathway: role of alphaGMR. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 551-6 (2005).
79. Hložek, I., Sovová, V. in *Vet. Med. (Praha)* 468-500 (1968).
80. Rosenberg, A. H. et al. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-35 (1987).
81. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54 (1976).
82. Hochuli, E. Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* 444, 293-302 (1988).
83. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9 (1987).
84. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23 (1979).
85. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5 (1970).
86. Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203 (1981).
87. Bartunek, P. et al. Avian stem cell factor (SCF): production and characterization of the recombinant His-tagged SCF of chicken and its neutralizing antibody. *Cytokine* 8, 14-20 (1996).
88. Jones, S. A. & Rose-John, S. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim Biophys Acta* 1592, 251-63 (2002).