

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Klonování myšního aktivačního antigenu mCD69

Cloning of mouse activation antigen mCD69

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Praha 2008

Jakub Ptáček

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

pi.c. 141 b/08 stud
(bioch.)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 1. 9. 2008

.....


Jakub Ptáček

Poděkování

Děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za vedení bakalářské práce a za jeho cenné rady jak při experimentální činnosti, tak při vypracovávání této práce. Dále bych chtěl poděkovat všem členům Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR v.v.i., neboť vždy byli ochotni pomoci radou i činem. Obzvláště bych chtěl poděkovat Branislavu Slávikovi, jenž s námi v laboratoři strávil mnoho času, zaučil nás do práce v laboratoři a se spoustou experimentů pomohl. A v neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům za jejich materiální a morální podporu při studiu.

Obsah

Seznam zkratk.....	- 6 -
1 Úvod.....	- 8 -
1.1 Imunitní systém.....	- 8 -
1.2 Mechanismy imunitního systému	- 8 -
1.2.1 Nespecifické (neadaptivní, vrozené) mechanismy	- 8 -
1.2.2 Specifické (adaptivní) mechanismy.....	- 9 -
1.3 Buňky imunitního systému (imunocyty)	- 9 -
1.4 MHC glykoproteiny	- 11 -
1.4.1 MHC gp I. třídy.....	- 11 -
1.4.2 MHC gp II. třídy	- 12 -
1.5 NK buňky	- 12 -
1.5.1 Rozpoznávací mechanismy NK buněk	- 12 -
1.5.2 Cytotoxicita NK buněk	- 13 -
1.6 Receptory NK buněk.....	- 14 -
1.6.1 Mechanismy působení receptorů NK buněk.....	- 14 -
1.6.2 Geny kódující NK receptory	- 15 -
1.7 Aktivační receptor CD69	- 16 -
2 Cíle práce	- 18 -
3 Materiál	- 19 -
3.1 Přístroje.....	- 19 -
3.2 Enzymy	- 19 -
3.3 Chemikálie	- 20 -
3.4 Roztoky a média	- 21 -

3.5	Vektory	- 21 -
3.6	Bakteriální kmeny	- 22 -
3.7	Primery	- 22 -
4	Experimentální část	- 23 -
4.1	Návrh a syntéza oligonukleotidových primerů	- 23 -
4.2	Příprava RNA z myších slezin	- 23 -
4.3	RT - příprava cDNA	- 23 -
4.4	PCR amplifikace	- 24 -
4.5	Klonování PCR fragmentů	- 25 -
4.6	Transformace kompetentních buněk	- 26 -
4.7	Minipreparace plasmidové DNA	- 26 -
4.8	Kontrola klonování restrikční analýzou	- 26 -
4.9	DNA sekvenování	- 27 -
4.10	Velkoobjemová příprava získané plasmidové DNA	- 27 -
5	Výsledky	- 30 -
5.1	Klonování a amplifikace DNA fragmentu	- 30 -
5.2	Ligace DNA fragmentu do vektoru a kontrola restrikční analýzou	- 31 -
5.3	DNA sekvenace	- 31 -
5.4	Příprava plasmidové DNA	- 32 -
6	Diskuse	- 33 -
7	Závěr	- 34 -
8	Literatura	- 35 -

Seznam zkratek

ADCC	cytotoxicita založená na protilátkách (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
AICL	aktivací indukovaný lektin C typu (activation-induced C-type lectin)
APC	buňka prezentující antigen (antigen presenting cell)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
CRD	doména rozpoznávající sacharid (carbohydrate recognition domain)
DAP12	DNAX-aktivující protein 12 kDa (DNAX-activating protein of 12 kDa)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FcεRIγ	receptor pro Fc fragment IgE, vysoká afinita I, gamma polypeptid
H2	myší MHC
HLA	lidský MHC (human leukocyte antigens)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ITAM	imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu (immunoreceptor tyrosin-based activation motif)
ITIM	imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu (immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif)
KIR	imunoglobulinový zabíječský inhibiční receptor (killer inhibitory receptor)
LAIR	inhibiční receptor asociovaný s leukocyty (leukocyte-associated inhibitory receptor)
LGL	velký granulární lymfocyt (large granular lymphocyte)
LIR	imunoglobulinový receptor leukocytů (leukocyte immunoglobulin-like receptor)
LLT	lektinům podobný transkript (lectin-like transcript)
LRC	genový komplex leukocytárních receptorů (leukocyte receptor complex)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)

MHC gp	MHC glykoproteiny
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NKC	genový komplex NK receptorů (NK complex)
NKG 2	skupina receptorů zabíječských buněk 2 (natural killer group 2)
NKR-P	protein receptoru NK buňky (natural killer cell receptor protein)
PCR	polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RT	reversní transkriptasa
SHIP	inositol polyfosfát 5' fosfatasa obsahující SH2 doménu (SH2 domain containing inositolpolyphosphate 5' phosphatase)
SHP	tyrosinová fosfatasa obsahující SH2 doménu (SH2 domain containing tyrosin phosphatase)
T _C	cytotoxický lymfocyt
T _H	pomocný (helperový) T lymfocyt
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

1 Úvod

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je jeden z nejdůležitějších mechanismů, který udržuje homeostatické prostředí v organismu. Tento systém má za úkol nejprve rozlišit a poté odstranit látky nebo buňky v organismu nežádoucí a organismu škodící. Tuto funkci lze rozdělit na tři základní mechanismy:

- obranyschopnost – rozpoznávání vnějších škodlivin a ochrana proti patogenním mikroorganismům, potenciálně proti jejich toxickým produktům
- autotolerance – rozpoznávání a udržování tolerance vůči vlastním buňkám organismu
- imunitní dohled – rozpoznávání vnitřních škodlivin organismu a jejich odstraňování – hlavně starých, poškozených nebo mutovaných buněk¹

Bez imunitního systému by byl organismus zcela bezbranný vůči veškerým patogenům a toxickým látkám. Proto je jeho správná funkce zcela zásadní pro život jedince a jakákoli jeho porucha je závažným problémem, který může mít pro organismus fatální následky.

Imunitní systém se v zásadě skládá ze dvou složek. Jsou to buněčná imunita, která je zprostředkována imunitními buňkami (imunocyty) a imunita zprostředkovaná molekulami produkovanými buňkami imunitního systému.

1.2 Mechanismy imunitního systému

1.2.1 Nespecifické (neadaptivní, vrozené) mechanismy¹

Tyto mechanismy se označují jako vrozené, poněvadž je má každý organismus geneticky dány a jeho složky jsou v organismu přítomny předem, nezávisle na přítomnosti patogenu v organismu. Tyto mechanismy sestávají z humorální složky, což jsou komplementový systém, lektiny, interferony a další proteiny přítomné v krevním séru a z buněčné složky, do

níž patří zejména makrofágy a NK buňky. Dále je organismus chráněn neimunitními složkami, které lze rozdělit na chemické, mikrobiální a mechanické.

Výhoda nespecifické imunity spočívá v její rychlosti, neboť její složky jsou v organismu již připraveny a na patogen reagují v řádu několika minut. Tato jejich „připravenost“ je ovšem podmíněna tím, že reagují na širokou škálu patogenů pomocí rozpoznávání určitých rysů, které jim jsou společné. Tato jistá nespecifita má ovšem za následek nižší účinnost nespecifické imunity, která by tudíž sama o sobě byla nedostatečná a potřebuje být doplňována dalšími složkami, které již patří do adaptivní imunity.

1.2.2 Specifické (adaptivní) mechanismy

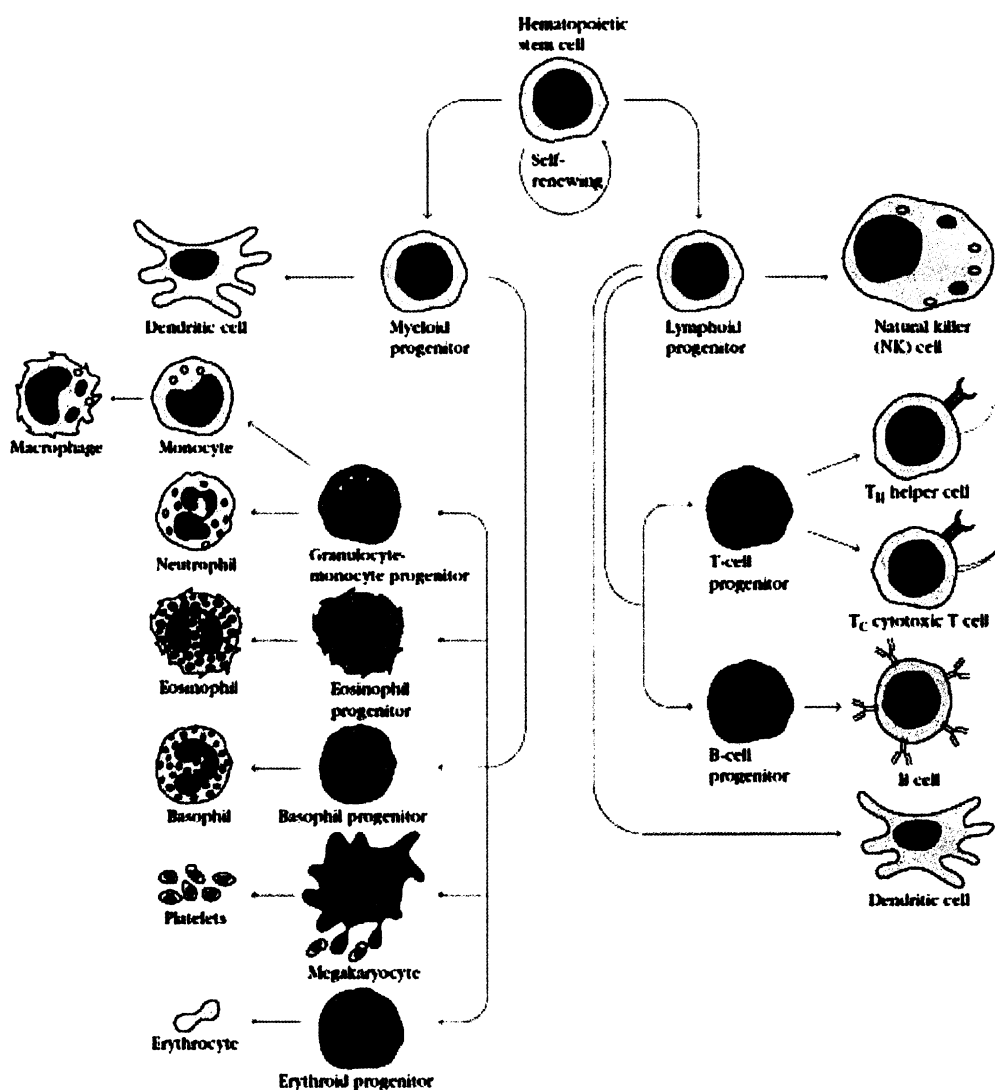
Specifická imunita nastupuje až několik dní po nespecifické a je na jejím nástupu závislá. Její aktivování je podmíněno setkáním nespecifické imunity s antigenem. Stejně jako u vrozené imunity, i adaptivní můžeme rozdělit na humorální (protilátky produkované B lymfocyty) a buněčnou (hlavně T lymfocyty). Poslední, ovšem neméně důležitý rys specifické imunity je imunologická paměť, která je zprostředkována paměťovými buňkami. Ty se vyvíjejí z normálních T a B lymfocytů a zajišťují rychlou a účinnou imunitní odpověď na antigen, který byl v organismu přítomen již dříve.

1.3 Buňky imunitního systému (imunocyty)

Většina buněk imunitního systému vzniká z pluripotentních kmenových buněk přítomných v kostní dřeni. Vývoj těchto buněk se následně dělí na dvě linie – myeloidní a lymfoidní (obr. 1, str. 10) a buňka se při vývoji mění na progenitorovou buňku, která ztrácí možnost dělení.

Z myeloidní linie se diferencují buňky tvořící základ nespecifické imunity, tedy většinou buňky schopné fagocytózy a také producenti cytokinů. Tyto fagocytující buňky slouží při imunologické odpovědi jako buňky prezentující antigen (APC, antigen-presenting cell). Vyvíjejí se zde monocyty (z nich následně makrofágy), tři druhy granulocytů (neutrofilů, bazofilů, eozinofilů) a také dendritické buňky.

Z lymfoidní linie se diferencují lymfocyty B a T a také NK buňky. Lymfocyty B se diferencují v lymfatických uzlinách a vznikají plazmatické buňky produkující protilátky. Při vývoji a diferenciaci lymfocytů T vzniká spousta buněk s náhodnou receptorovou výbavou, ze které se odstraní autoreaktivní klony a prekurzory lymfocytů poté čekají v thymu na setkání s vhodnou APC a poté thymus opouští zralé lymfocyty. Lymfocyty T se dělí na lymfocyty T_H (helperové – pomocné) a T_C (cytotoxické). T lymfocyty jsou také odpovědné za imunologickou paměť, která umožňuje rychlejší a efektivnější imunitní odpověď.



Obr. 1: Vývojové linie imunocytů z pluripotentních kmenových buněk. ²

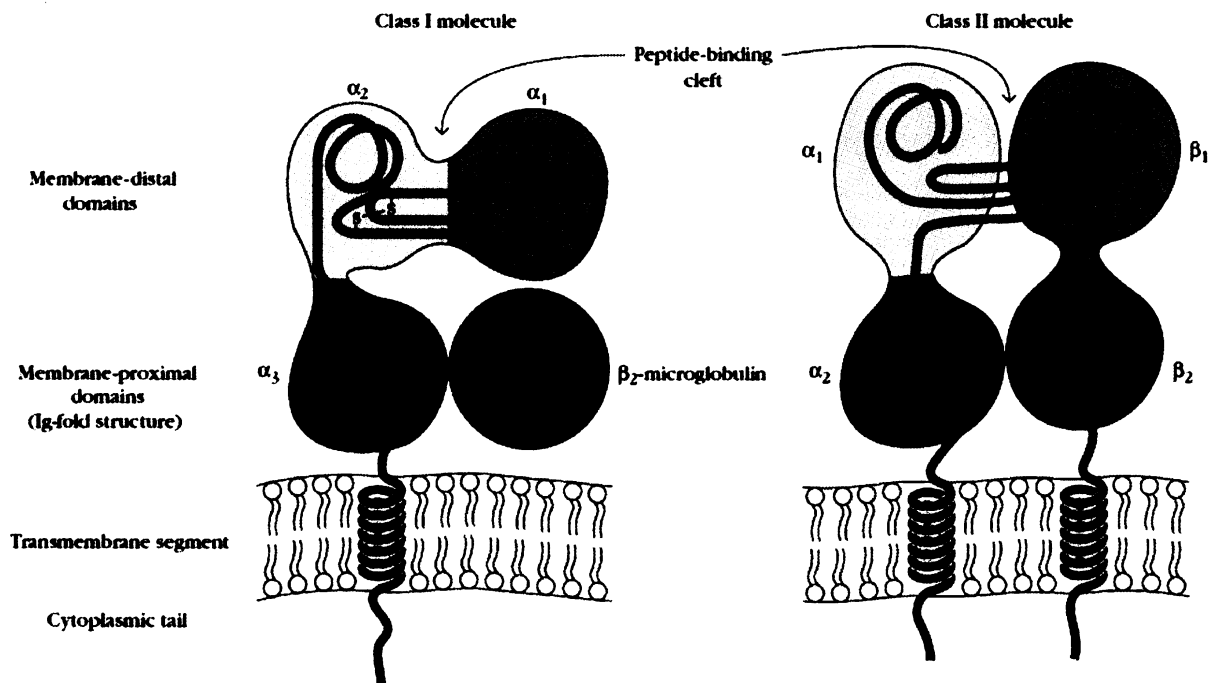
NK buňky mají evolučně nejbližší k T lymfocytům, ovšem do specifické imunity nepatří, neboť nemají receptorovou výbavu pro specifické rozpoznávání antigenů. Z morfolického hlediska se jedná o velké granulární lymfocyty (LGL – large granular lymphocyte). O NK buňkách bude podrobněji pojednáno dále.

1.4 MHC glykoproteiny ¹

MHC (major histocompatibility komplex) je rozsáhlý (až 3500 kb) komplex genů, který obsahuje až 50 genů. U lidí se nazývá HLA komplex (human leukocyte antigens) a je lokalizován na 6. chromozomu, u myši se nazývá H2 komplex a je lokalizován na 17. chromozomu. Tento komplex kóduje skupinu glykoproteinů, které se vyskytují na povrchu prakticky všech buněk organismu. Hlavním úkolem MHC gp je rozlišit buňky organismu vlastní od buněk cizorodých. MHC gp se vyskytují ve dvou hlavních strukturách.

1.4.1 MHC gp I. třídy

MHC glykoproteiny I. třídy se vyskytují na povrchu téměř všech buněk organismu. Strukturně se skládají ze dvou řetězců (obr. 2). První řetězec o velikosti asi 45 kDa je transmembránový a v jeho extracelulární části lze rozlišit tři domény – dvě na N konci (α_1 a α_2), které mezi sebou vytvářejí vazebnou rýhu a třetí doménu - α_3 . Tato třetí doména je podobná poslední doméně (β_2m), obě mají imunoglobulinový charakter a β_2m je nekovalentně navázána na doménu α_3 .



Obr. 2: Struktura MHC molekul I. a II. třídy

Hlavní funkcí MHC gp I je vázat peptidové fragmenty proteinů produkovaných buňkami organismu vlastními¹. Díky tomuto peptidovému fragmentu a hlavně přítomnosti MHC gp I charakteristických pro onen daný organismus jsou imunitní buňky schopné rozlišit buňky organismu vlastní a zachovávat vůči nim toleranci. Tento fragment také udržuje MHC gp I ve stabilní konformaci. Vazebné místo pro peptid má omezenou velikost, neboť je na obou stranách uzavřeno. Peptidy vázající se do tohoto místa mohou mít tedy velikost od osmi do deseti aminokyselin¹.

1.4.2 MHC gp II. třídy

Strukturně se tyto glykoproteiny skládají ze dvou transmembránových, stejně velkých řetězců (obr. 2, str. 11). Tyto řetězce (α a β) se každý skládají ze dvou domén a jsou navzájem nekovalentně spojeny. Mezi N koncovými částmi obou řetězců se nachází vazebná rýha, která ovšem na rozdíl od MHC gp I není uzavřená a může tedy vázat peptidy větší, a to o velikostech 15 – 35 aminokyselin.

MHC gp II se vyskytují pouze na buňkách imunitního systému schopných prezentovat antigen. Peptidové fragmenty pocházejí z proteinů pohlcených buňkou a jsou prezentovány navázané do vazebné rýhy MHC molekuly jako antigen^{1,2}. To je důležité pro T lymfocyty, neboť ty jsou schopny rozpoznat antigen pouze tehdy, je-li v komplexu s MHC molekulou.

1.5 NK buňky

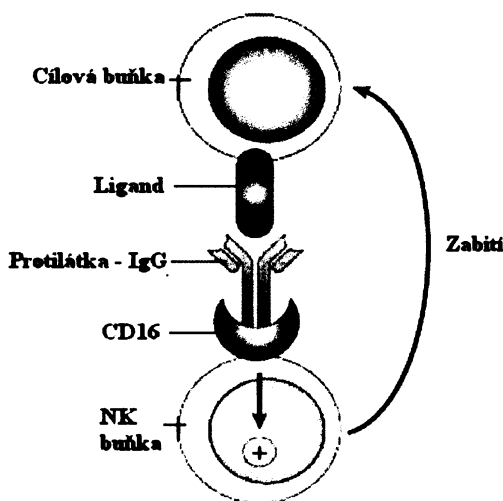
NK buňky se stejně jako T lymfocyty a další buňky imunitního systému vyvíjejí z progenitorových buněk patřících do lymfoidní linie. Označují se jako velké granulární lymfocyty (díky přítomnosti azurofilních granul). Tyto buňky jsou schopné nespecificky rozpoznat a cytotoxicky zabít nádorové, virově infikované nebo opsonizované buňky. Také jsou odpovědné za odmítnutí štěpu při transplantacích^{1,3}.

1.5.1 Rozpoznávací mechanismy NK buněk

NK buňky rozpoznávají buňky, které mají zabít, mechanismem označovaným jako „missing-self“⁴ při kterém NK buňky hledají buňky s abnormální expresí MHC gp I⁵. Některé virem nakažené nebo nádorové buňky cíleně potlačují expresi MHC gp I na svém povrchu,

aby se tak vyhnuly rozpoznání a zabití T lymfocyty. Takovéto buňky jsou ovšem cílem NK buněk, neboť ty pomocí svých nespecifických receptorů poznají buňku, která má abnormálně málo těchto molekul a cytotoxickými mechanismy ji zabijí. Normální buňky s velkým množstvím MHC gp I na povrchu neaktivují NK buňky, naopak vytvářejí inhibiční signály.

Kromě tohoto mechanismu NK buňky rozpoznávají buňky opsonizované protilátkami třídy IgG. Rozpoznání probíhá prostřednictvím receptoru CD16, který je z hlediska své podstaty Fc-receptorem, tedy se při setkání NK buňky s opsonizovanou buňkou váže na Fc část protilátky IgG a tím se aktivuje buněčná cytotoxicita (Obr.3). Tato cytotoxicita je označována jako buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC)¹. Mezi další stimulační receptory patří například NKR-P1 nebo CD69.



Obr. 3: Vazba receptoru CD16 na Fc část IgG při ADCC. ⁵

To, zda bude NK buňka aktivována či inhibována, závisí na vazbách jejích receptorů na povrchové molekuly cílové buňky. Tato vazba je zprostředkována celou řadou různých aktivačních a inhibičních receptorů a na celkové sumaci těchto signálů závisí, zda budou cytotoxické mechanismy buňky aktivovány či nikoli.

1.5.2 Cytotoxicita NK buněk¹

Po aktivaci NK buňky se spouští cytotoxické mechanismy. V cytoplazmě NK buňky jsou přítomny cytotoxické granule, které v okamžiku kontaktu buněk vylijí svůj obsah do tzv. synaptické štěrbině mezi oběma buňkami. Granule obsahují dvě složky. První složkou je perforin, což je protein, který se začlení do membrány cílové buňky, v ní zpolymeruje a

vytvoří malý pór v membráně. Někdy jsou tyto póry samy o sobě schopny způsobit smrt cílové buňky osmotickou lýzou, ale většinou slouží pouze k tomu, že se skrze ně do buňky dostane druhá složka granulí – granzymy. Tyto enzymy spouštějí kaskádu reakcí, která ve výsledku vyvolá apoptotickou smrt cílové buňky.

1.6 Receptory NK buněk

Receptory jsou na buněčném povrchu exprimovány po celou dobu vývoje buňky a množství a druh receptorů závisí na mnoha různých faktorech. NK buňky na svém povrchu exprimují dva druhy receptorů – stimulační (aktivační) a inhibiční^{5,6}.

1.6.1 Mechanismy působení receptorů NK buněk

Stimulační receptory NK buněk obsahují velmi krátkou intracelulární část, která postrádá signál přenášející motiv. Místo toho disponují nabitou transmembránovou doménou. Tato doména nekovalentně asociuje s tzv. adaptorovými proteiny (mezi nejdůležitější patří DAP12, FcεRIγ, CD3ζ), které ve své sekvenci obsahují ITAM motiv (sekvence Asp/Glu-X-X-Tyr-X-X-Leu-Ile-X₆₋₈-Tyr-X-X-Leu/Ile). Tyto molekuly zajišťují signální funkci a jsou také většinou potřebné pro optimální povrchovou expresi receptorů. Po vazbě ligandu na receptor asociující s adaptorem dochází k fosforylaci tyrosinu v ITAM, aktivaci tyrosin-protein kinas a dalšímu přenosu signálu pomocí řady fosforylací, který v konečném důsledku vede k aktivaci NK buňky a spuštění cytotoxických mechanismů^{5,7}.

Spouštění cytotoxicity se vysvětluje modelem, podle kterého se po navázání ligandu na receptor fosforyluje tyrosin proteinu Vav1, čímž se přeuspořádají aktinová vlákna cytoskeletu a vzniká imunologická synapse⁸.

Oproti aktivačním receptorům, inhibiční mají delší intracelulární část, která obsahuje motiv ITIM (Ile/Val/Leu/Ser-X-Tyr-X-X-Leu/Val). Navázání ligandu na receptor vede k fosforylaci tyrosinu v ITIM, což aktivuje některé fosfatasy (jako např. SHP1, SHP2 nebo SHIP), které ruší fosforylační dráhy vedoucí k aktivaci cytotoxicity – tedy tuto aktivaci inhibují⁹.

1.6.2 Geny kódující NK receptory

Geny pro NK receptory a to jak inhibiční tak aktivační jsou uspořádány do dvou genových komplexů. Do NKC – NK genového komplexu a do LRC – komplexu leukocytárních receptorů.

1.6.2.1 NKC a do něj patřící rodiny receptorů

U lidí se nachází na chromozomu 12p12-13, u myši na chromozomu 6 a u potkanů na chromozomu 4. Tento komplex kóduje receptory z nadrodiny lektinových receptorů typu C (označení C poukazuje na potřebu vázat Ca^{2+} ion kvůli vazebné aktivitě receptoru), což jsou transmembránové receptory II. typu (N konec je orientován do intracelulárního prostoru)^{5,10}. Tuto nadrodinu můžeme dále dělit na rodiny receptorů.

Geny pro receptory **rodiny Ly49** a jejich uspořádání umožňují velkou diversifikaci⁹, ovšem jen u některých živočišných druhů (u myši bylo nalezeno mnoho genů, kdežto u člověka pouze jeden)^{5,7}. Předpokládá se, že to je způsobeno podobností rodiny Ly49 s rodinou KIR, což by mohlo způsobovat problémy v případě přítomnosti obou rodin receptorů zároveň¹⁰. Receptory této rodiny se vyskytují jako homodimery⁴, váží ligandy typu MHC gp I, a některé receptory NK buňku aktivují, jiné naopak inhibují⁵.

Receptory **rodiny NKG2** jsou transmembránové receptory typu II tvořící heterodimery s CD94⁵. Mezi aktivační receptory patří např. NKG2C nebo E, mezi inhibiční NKG2A. Poněkud odlišným se ukazuje NKG2D, který jednak tvoří homodimery a jednak vykazuje daleko menší shodu v aminokyselinové sekvenci než ostatní receptory této rodiny. Dalším odlišným receptorem je NKG2F, neboť v transmembránové části obsahuje motiv podobný ITIM a v extracelulární části neobsahuje C-lektinům podobnou doménu CTLD.

Mezi receptory **rodiny molekul příbuzných s CD69** patří (kromě CD69) lidský aktivací indukovaný lektin typu C (AICL), lidský lektinům podobný transkript 1 (LLT1) a myši C lektinům příbuzný protein (Clr)^{13, 14, 15}. Tyto receptory se vyskytují hlavně na aktivovaných NK buňkách.

Poslední důležitou skupinou receptorů je **rodina NKR-P1** skládající se z pěti forem: NKR-P1A, B, C, D a F. U lidí se vyskytuje pouze forma F, kdežto u hlodavců se vyskytují formy B a D, které jsou inhibiční a obsahují ITIM motiv a formy C a F, které jsou aktivační a

obsahují nabitou transmembránovou část^{9,16}. Receptory NKR-P1 se označují jako kostimulační receptory, neboť interagují s Clr molekulami, transmembránovými molekulami II. typu, čímž vlastně zesilují signál z jiných stimulačních receptorů⁹.

1.6.2.2 LRC a rodina receptorů KIR

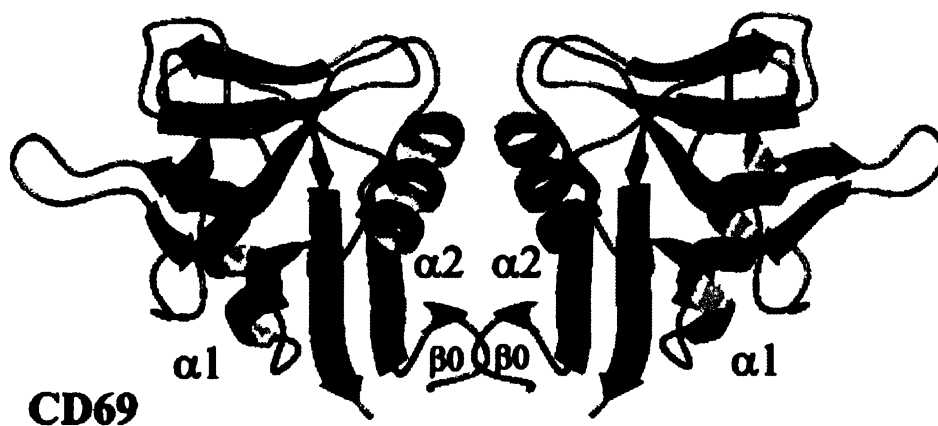
U lidí se nacházejí na chromozomu 19q13.4, u myši na chromozomu 7 a u potkanů na chromozomu 1^{11,12}. Receptory kódované tímto komplexem patří do imunoglobulinové nadrodiny receptorů. Rodiny těchto receptorů se také dají rozdělit na aktivační a inhibiční. Mezi inhibiční receptory rozpoznávající MHC gp I patří rodina KIR – imunoglobulinům podobné receptory zabíječských buněk, rodina LIR – imunoglobulinům podobné receptory leukocytů a LAIR – imunoglobulinům podobné receptory spojené s leukocyty¹⁰. Rodiny aktivačních receptorů jsou např. NKp46, NKp44 a NKp30¹⁷ a také již zmiňovaný receptor CD16 (viz kapitola 1.5.1 a obr. 3, str. 13).

Asi nejvýznamnější je **rodina KIR**, jejíž geny byly nalezeny pouze u člověka, do níž patří receptory jsou transmembránové receptory I. typu (N-konec je orientován extracelulárně). Obsahují extracelulární imunoglobulinové domény (dvě nebo tři) a buď dlouhou (s jedním nebo dvěma ITIM motivy) nebo krátkou (bez ITIM motivů, ale s nabitým lysinovým zbytkem) cytoplazmatickou doménu⁹.

1.7 Aktivační receptor CD69

Receptor CD69 se označuje jako časný aktivační antigen leukocytů, neboť jeho exprese se zvyšuje záhy po aktivaci buňky. Vyskytuje se na povrchu mnoha druhů buněk: např. B lymfocytů, T lymfocytů, NK buněk a dalších. Hlavní funkcí této molekuly je přenášet aktivační signál do buňky a také se účastní proliferace.

Receptor CD69 patří do rodiny lektinů, což znamená, že je schopen specificky a reverzibilně vázat sacharidové struktury¹⁸. V nadrodině lektinů patří do rodiny C-lektinů, které se vyznačují (a také se podle toho nazývají) tím, že ke své vazebné aktivitě potřebují ionty Ca²⁺. Jako všechny C-lektiny je to transmembránový protein II. typu, který je ještě navíc glykosylovaný. V extracelulární části obsahuje sacharid rozpoznávající doménu (CRD)¹⁹.



Obr. 4: Prostorová struktura extracelulární části dimerní molekuly CD69²⁰.

Strukturně se jedná o homodimer, jehož podjednotky jsou mezi sebou spojeny cystinovým můstkem. Podjednotky mohou být různě velké, což je zapříčiněno rozdílnou mírou glykosylace²¹. Každá podjednotka se skládá z cytoplazmatické, transmembránové a extracelulární části (obr. 4). Extracelulární část lze ještě rozdělit na můstek a globulární C-
lektinovou doménu. V oblasti můstku se vyskytuje cystein Cys 68, který je zodpovědný za intermolekulární vazbu s druhou podjednotkou dimeru. V této oblasti také dochází k již zmiňované glykosylaci molekuly. Každá podjednotka obsahuje šest dalších cysteinů, které vytvářejí tři intramolekulární cystinové můstky a pomáhají tak vytvářet prostorovou strukturu molekuly.

Ligand, který by byl specifický pro molekulu CD69 ještě nebyl nalezen, ale s určitou afinitou se na CRD doménu mohou vázat některé sacharidové zbytky, vápenaté ionty a též oligopeptidy.

2 Cíle práce

- Na základě dostupných literárních údajů navrhnout oligonukleotidové primery vhodné pro klonování a amplifikaci receptoru CD69 myších přirozených zabíječských buněk.
- Izolovat celkovou mRNA ze slezin myší kmene BalbC/BL6 a použít ji pro PCR amplifikační reakci výše uvedeného receptoru.
- Klonovat PCR produkt do plasmidového vektoru, získaný insert sekvenovat a sekvenci srovnat s bioinformatickými databázemi.
- Získaný vektor s insertem kódujícím receptor CD69 připravit v preparativním množství a ověřit jeho čistotu.

3 Materiál

3.1 Přístroje

Automatické pipety	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga VSMC-13	Shelton Scientific, USA
Centrifuga stolní Spectrofuge 16M	Edison, USA
Ledovač UBE 50-35	Ziegra, Německo
Luminiscenční analyzátor LAS-1000 CH	Fuji photo film, Japonsko
Mrazicí box (-20 °C)	Zannusi, Itálie
Mrazicí box (-80 °C) Bio Freezer	Forma scientific, USA
pH-metr Φ 200	Beckman, Německo
Předvážky HF-1200 G	AND, USA
Souprava pro agarosovou elektroforesu	Sigma, USA
Termocykler	Eppendorf, Německo
Termostat BT 120M	Lab. přístroje Praha, ČR
Třepačka	VELP Scientifica, Itálie
UV lampa UVGL-58	Science Company, USA
Vortex	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí BM 551	Tesla, ČR

3.2 Enzymy

EcoR I	New England Biolabs, USA
Lysozym	Fluka, Švýcarsko
Platinum Taq polymerasa	Invitrogen, USA
RNasa	Sigma, USA
RT SuperScript™ III	Invitrogen, USA

3.3 Chemikálie

Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Jersey Lab Supply, USA
Ampicilin	Jersey Lab Supply, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	New England Biolabs, USA
DMSO	Sigma, USA
DNA ladder (100 bp)	New England Biolabs, USA
dNTP	Fermentas, Kanada
DTT	Sigma, USA
EDTA	Fluka, Švýcarsko
Ethanol	Lachema, ČR
Ethidium bromid	Jersey Lab Supply, USA
Glycerol	Sigma, USA
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Lachema, ČR
Chlorid vápenatý	Lachema, ČR
Chloroform	Lachema, ČR
IPTG	Sigma, USA
Isopropylalkohol	Lachema, ČR
Kanamycin	Jersey Lab Supply, USA
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, ČR
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Kyselina octová	Lachema, ČR
Octan sodný	Sigma, USA
Síran hořečnatý	Lachema, ČR
Sacharosa	Lachema, ČR
Tetracyklin	Léčiva, ČR
Tris	Serva, USA
Tris-Cl	Serva, USA
Triton X-100	Sigma, USA
Trypton	Oxoid, Anglie
X-Gal	Serva, USA

3.4 Roztoky a média

Agarosový gel 1%	0,5 g agarosy; 50 ml TAE pufru; 2 μ l ethidiumbromidu
EcoRI pufr	50 mM TrisCl, pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; 0,02% Triton X-100; 0,1 mg/ml BSA
EP (lyzační pufr)	0,5 ml 1 M TrisCl pH 8,0; 0,1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 7,5 g sacharosy; 100 mg lysozymu; 10 mg pankreatické RNasy; 5 mg BSA; destilovaná voda do 50 ml
LB agar	1,5% agar v LB médiu
LB agar s kanamycinem	100 μ l kanamycinu na 100 ml LB agaru
LB médium	1% bacto-tryptone; 0,5% kvasničného hydrolyzátu; 1% NaCl; ddH ₂ O
LB médium s kanamycinem	70 μ l kanamycinu na 100 ml LB média
PCR pufr	Thermo Pol Buffer 10x: 10 mM KCl; 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM Tris-HCl; 2mM MgSO ₄ ; 0,1% Triton-X100, pH 8,8
roztok I	50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)
roztok II	147,2 g KAc, 57,5 ml ledové HAc, H ₂ O do 500 ml
Salt solution (TOPO cloning kit)	1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl ₂
S.O.C. médium	2% trypton; 0,5% kvasničný extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM glukosa
Stop roztok (loading buffer)	bromfenolová modř; 50% glycerol; ethanol; TE pufr
TE pufr	10 mM TrisCl, pH 7,5; 0,5 mM EDTA
TAE pufr	40 mM Tris; 20 mM CH ₃ COOH; 1 mM EDTA

3.5 Vektory

pCR[®] 2.1 – TOPO, 3.9 kb

Invitrogen, USA

3.6 Bakteriální kmeny

Escherichia coli, TOP10

Invitrogen, USA

3.7 Primery

CD69 FW: 5'-GCCATATGGGCTTGTACGAGAAGTTGGAA-3'

CD69 REV: 5'-GCAAGCTTCATTATCTGGAGGGCTTGCTGCAGAC-3'

oba Generi Biotech, ČR

Oligo(dT)12-18 Primer

Invitrogen, USA

4 Experimentální část

4.1 Návrh a syntéza oligonukleotidových primerů

Oligonukleotidové primery byly navrženy na základě imunologických publikací popisujících klonování a sekvenování myšního receptoru CD69²². Na základě nukleotidové sekvence tohoto receptoru byly zvoleny následující primery sloužící pro amplifikaci globulární domény:

- forward primer: 5'-GCCATATGGGCTTGTACGAGAAGTTGGAA-3'
- reverse primer: 5'-GCAAGCTTCATTATCTGGAGGGCTTGCTGCAGAC-3'

Oba navržené primery byly syntetizovány firmou Generi-Biotech v Hradci Králové.

4.2 Příprava RNA z myších slezin

Celková RNA byla připravena ze slezin čerstvě odebraných z myší kmene BALBc/BL6 s použitím RNA blue kitu (TOP BIO, Praha) přesně dle návodu poskytnutého výrobcem. Postup je založen na upravené metodě podle Chomczynského a Sacchi²³ založené na denaturaci veškerých bílkovin ve vzorku silně denaturujícími roztoky guanidin isothiokyanátu a 2-merkптоethanolu a následné extrakci nukleových kyselin fenolem a chloroformem, během níž jsou proteiny extrahovány do spodní, modře zabarvené fáze, DNA zůstává na rozhraní a RNA v horní vodné fázi. Z ní je poté precipitována 2-propanolem. Čistota a intaktnost získané RNA byla ověřena denaturující agarosovou elektroforesou v přítomnosti 5% formaldehydu, po elektroforetické separaci byl gel fotografován a byl sledován poměr obou ribosomálních RNA.

4.3 RT - příprava cDNA

Syntéza cDNA se provádí reverzní transkripcí pomocí reverzní transkriptasy SuperScript III (Invitrogen). Do sterilní mikrozkušavky zbavené nukleas bylo napipetováno 1 μ l 50 μ M oligo(dT)₁₂₋₁₈, 5 μ l RNA (1 μ g/5 μ l), 1 μ l 10 mM směsi dNTP a 6 μ l sterilní destilované vody. Po dobu 5 minut byla zkumavka zahřívána při teplotě 65 °C a následně po dobu 1 minuty

inkubována na ledu. Následovala krátká centrifugace, přidání 1 µl 0.1 M DTT, 4 µl 5X First-Strand Buffer™ (Invitrogen), 1 µl RNaseOUT™ (inhibitor RNas, Invitrogen) a 1 µl SuperScript™ III RT (reverzní transkriptasa, Invitrogen). Reakční směs byla opatrně promíchána, inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut a poté při teplotě 50 °C po dobu 60 minut. Reakce byla ukončena zahřátím směsi na 70 °C po dobu 15 minut.

4.4 PCR amplifikace

Získaná cDNA byla okamžitě využita pro PCR amplifikační reakci provedenou pomocí výše uvedené dvojice oligonukleotidových primerů a Platinum Taq DNA polymerasy (Invitrogen) s využitím technologie „Hot Start“. Podstatou této technologie je zablokování aktivního centra použité DNA polymerasy proteinovým inhibítorem, k jehož disociaci dojde až v okamžiku první denaturace v termálním cyklátoru. Výhodou tohoto postupu je nižší úroveň nespecifického nasedání primeru a tudíž vyšší výtěžek specifického produktu. V našem případě bylo provedeno běžných 30 cyklů PCR amplifikace dle standardního protokolu dodávaného výrobcem s půlminutovým nasedáním primerů při 62 °C a minutovou polymerací při 72 °C. Termální profil, který byl použit v cyklátoru je uveden v Tab. 1.

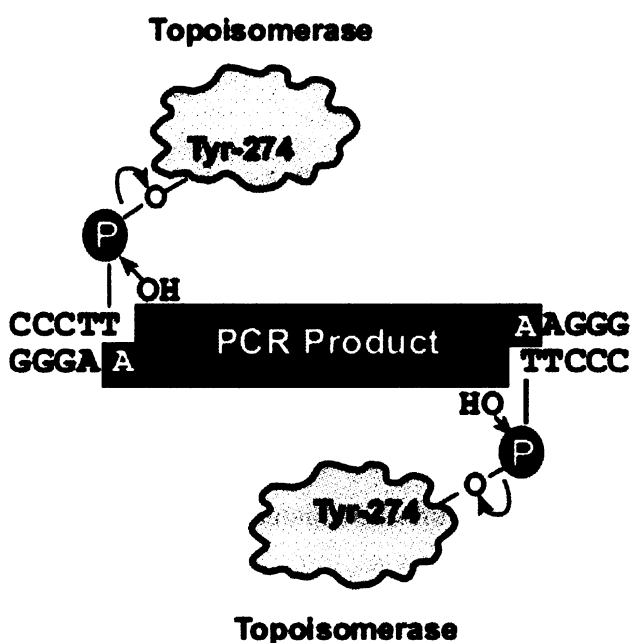
Tab. 1: Termální profil pro PCR amplifikaci

Krok č.	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95 °C	2 min	1
2	95 °C	30 s	30
3	62 °C	30 s	
4	72 °C	1 min	
5	72 °C	10 min	1
6	4 °C	-	1

5 µl výsledné PCR směsi bylo poté analyzováno agarosovou elektroforesou v 1% agarosovém gelu obsahujícím pufr TAE (Tris-Acetat-EDTA²⁴) a ethidium bromid. Po skončení elektroforesy (poté co bromfenolová modř obsažená ve vzorkovém pufru doputovala asi do dvou třetin délky gelu) byl gel nafocen pomocí videokamery a transiluminátoru při vlnové délce 254 nm.

4.5 Klonování PCR fragmentů s použitím soupravy TOPO TA Cloning

K ligaci PCR fragmentů do klonovacího vektoru byl použit kit TOPO TA Cloning od firmy Invitrogen (USA). Výhodou tohoto kitu je velká rychlost ligace (5 minut oproti několika hodinám nutným k ligaci standardními postupy) a také velká účinnost, ze které plyne malá spotřeba PCR fragmentů. Tento postup využívá série tzv. TA vektorů obsahujících jeden koncový nespárovaný thymidylový zbytek, který se páruje s adenylovým zbytkem na konci PCR fragmentu vzniklým nespécifickou adicí prováděnou většinou běžných termostabilních DNA polymeras. Pro výrazné urychlení ligačního procesu je navíc u TOPO kitů ještě na konci vektoru umístěna Topoisomerasa I pocházející z viru *Vaccinia*, který jako DNA vazebný protein napomáhá zachycení a účinné ligaci PCR produktu (obr. 5).



Obr. 5: Princip ligace PCR produktu do TA vektoru při použití soupravy TOPO TA Cloning firmy Invitrogen²⁵.

V našem případě byl dodržen postup popsáný výrobcem, kdy bylo smícháno po 1 μ l PCR fragmentu, roztoku solí a TOPO vektoru (poslední dva dodávané s kitem) se 3 μ l ddH₂O. Tato směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a poté ihned přemístěna na led. Následovala okamžitá transformace kompetentních buněk.

4.6 Transformace kompetentních buněk

Transformace byla provedena metodou tepelného šoku, což spočívá v tom, že k buňkám *E. coli* kmene TOP10 byly přidány 2 μ l ligační směsi a po 20-ti minutové inkubaci na ledu následoval teplotní šok po dobu 30 s při teplotě 42 °C a poté okamžité zchlazení na ledu. Poté bylo přidáno 250 μ l S.O.C. média o laboratorní teplotě a experiment pokračoval inkubací po dobu 1 hodiny při 37 °C. Směs byla centrifugována při 2000 g 2 minuty a peleta resuspendována ve 100 μ l LB média. Tato suspenze buněk byla poté natřena na LB agarovou misku s kanamycinem, na kterou bylo s předstihem (30 minut předem) rozetřeno 100 μ l 100 mM IPTG a 20 μ l X-Gal rozpuštěného v DMSO (50 mg/ml). Tyto misky byly inkubovány při 37 °C do druhého dne. Přítomnost insertu v plasmidu byla ověřena tzv. „blue-white selekcí“, kdy modré kolonie značí přítomnost plasmidu bez vloženého insertu, kdežto bílé obsahují požadovaný insert zaligovaný v plasmidu. Tyto bílé kolonie byly sterilními párátky přeneseny do zkumavek s 1 ml tekutého LB média s kanamycinem a ponechány inkubovat na třepačce do druhého dne.

4.7 Minipreparace plasmidové DNA

Isolace plasmidové DNA byla provedena metodou tzv. „Easyrepu“ podle publikované metody²⁶. 0,8 ml transformované bakteriální kultury bylo centrifugováno 30 s při 6000 rpm, peleta resuspendována ve 30 μ l lyzačního EP pufru, suspenze povařena po dobu 90 s a poté na deset minut zchlazena na ledu. Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 4 °C a 12000 rpm. Takto bylo získáno 30 μ l supernatantu obsahujícího plasmidovou DNA.

4.8 Kontrola klonování restrikční analýzou

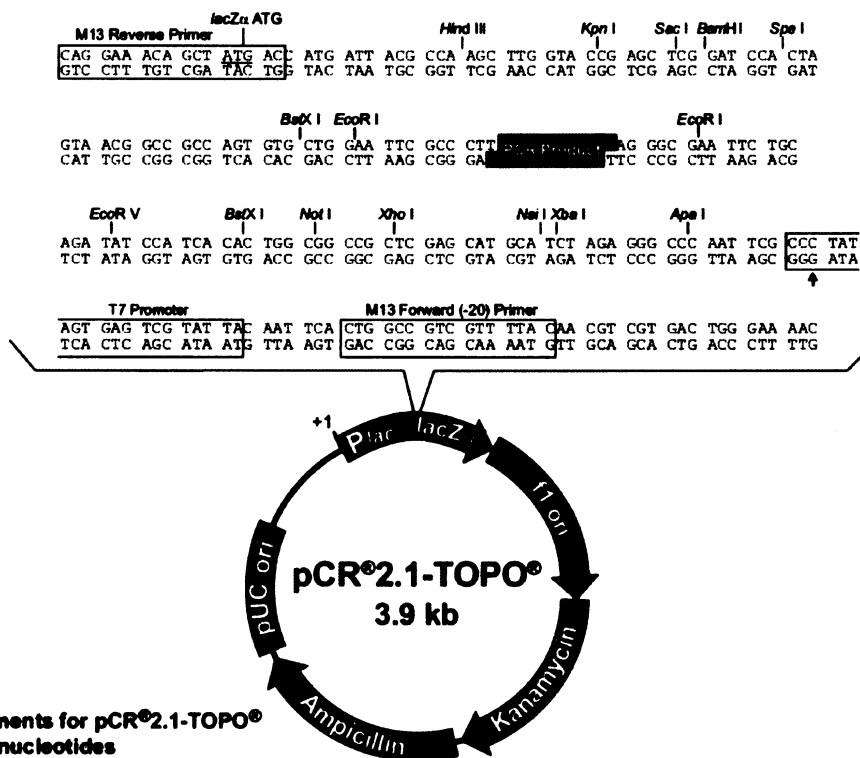
9 μ l vzorku obsahujícího plasmidovou DNA bylo použito k restrikčnímu štěpení pomocí 1 μ l restrikční endonukleasy EcoR I. Štěpení probíhalo 1 hodinu při teplotě 37 °C a bylo ukončeno přidáním 2 μ l vzorkového pufru pro agarosovou elektroforesu. Výsledek byl analyzován pomocí agarosové elektroforesy (viz kap. 4.4). Takto byly vybrány pozitivní bakteriální klony obsahující plasmid s insertem o správné délce a část těchto kultur byla rozetřena na misky s LB agarem a kanamycinem a ty byly inkubovány přes noc při 37 °C. Zbytek byl smíchan s glycerolem (20% objemu) a dále uchováván v mrazáku při -20 °C.

4.9 DNA sekvenování

Misky s narostlými koloniemi pozitivních klonů byly předány do DNA sekvenační laboratoře MBÚ AV ČR v.v.i. Dr. Jurgenu Felsbergovi, který zajistil přípravu plasmidové DNA s použitím purifikačního kitu firmy Genomed a dále DNA sekvenování insertů v obou směrech zahájené z míst specifických primerů obsažených v klonovacím vektoru, M13 forward a M13 reverse primeru (obr. 6 na následující straně). K vlastnímu sekvenování byla použita Sangerova dideoxynukleotidová metoda v provedení vhodném pro automatický DNA sekvenátor firmy Applied Biosystems ABI Prism 3100. Výsledky sekvenování jsou zaslány ve formě úplných chromatogramů (soubory *.ab1), k jejichž vyhodnocení byl využit volně dostupný program Chromas verze 1.45 (Griffith University, Southport, Queensland, Austrálie). Pro vyhodnocení získaných sekvencí byl pomocí výše uvedeného programu vytvořen textový soubor, který byl poté přeložen do aminokyselinových sekvencí pomocí programu Translate dostupného na www.expasy.org. Získané aminokyselinové sekvence čtené po obou vlákních ve všech třech čtecích rámcích byly prohlédnuty a sekvence s nejdelším čtecím rámcem zadána do programu BLAST dostupného na www.ncbi.nlm.nih.gov. Nakonec byly k nalezeným aminokyselinovým sekvencím dohledány nukleotidové sekvence a bylo provedeno srovnání experimentální sekvence s nejbližší sekvencí odečtenou z databází.

4.10 Velkoobjemová příprava získané plasmidové DNA

Po vyhodnocení DNA sekvencí všech pozitivních klonů byla kultura (zamražená s glycerolem) obsahující plasmidovou DNA s insertem co nejvíce se blížícím požadovanému receptoru natřena na Petriho misku obsahující LB agar s kanamycinem, inkubována přes noc a dvě získané kolonie byly pěstovány v 1 ml kapalného LB média s kanamycinem. 2-ml ml kapalné kultury bylo zaočkováno 200 ml média LB s ampicilinem a kultura byla třepána v 1 l Erlenmayerových baňkách v bakteriální třepačce přes noc. Ráno byla kultura centrifugována ve 250 ml kyvetách při 2000 g 20 minut při 4 °C. Supernatant byl oddělen a usazené bakterie byly resuspendovány ve 20 ml glukosového roztoku I a přeneseny do 35 ml centrifugačních kyvet. Následovala centrifugace při 8000 rpm po dobu 10 minut a při 4 °C. K peletě bylo přidáno 3,5 ml glukosového roztoku s 5 mg/ml lysozymu, peleta resuspendována vortexem a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Bylo přidáno 7 ml 1% roztoku SDS v 0,2 M NaOH (čerstvě připraveného).



Comments for pCR^{2.1}-TOPO[®]
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

Obr. 6: Schéma klonovacího vektoru pCR2.1-TOPO včetně popisu důležitých sekvencí a sekvence polylinkeru²⁵.

Směs byla lehce promíchána a následovala 10-ti minutová inkubace na ledu. Bylo přidáno 5,2 ml roztoku II, razantně promícháno a inkubováno 10 minut na ledu. Následovala 30-ti minutová centrifugace při 12000 rpm a 4 °C. 15 ml supernatantu bylo přeneseno do nové kyvety a precipitováno při laboratorní teplotě 10-ti ml isopropylalkoholu po dobu 15 minut. Roztok byl centrifugován při 12000 rpm, 20 °C a po dobu 30 minut. Supernatant byl vylit, peleta opláchnuta trochou 70% ethanolu a sušena na vzduchu asi 10 minut. Peleta byla rozpuštěna dlouhým vortexováním v 0,4 ml TE a přidáno k ní 10 µl RNasy (10 mg/ml). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 30 minut, přidání 150 µl TE a 550 µl fenolu (syceného Tris-Cl kvůli neutralizaci fenolu), vortexování a 5-ti minutová centrifugace na stolní centrifuze. Vrchní vodná fáze (cca 500 µl) byla přepipetována do nové zkumavky a přidáno k ní 250 µl fenolu a 250 µl chloroformu. Následovalo vortexování a 5-ti minutová centrifugace na stolní centrifuze. Vrchní vodná fáze (cca 450 µl) byla opět přepipetována,

přidáno k ní 450 μl chloroformu a poté opět následovalo vortexování a 5-ti minutová centrifugace na stolní centrifuze. Vrchní vodná fáze byla odebrána (cca 400 μl), přidáno 40 μl (1/10 objemu) NaAc (pH 5,2) a 2,5x násobek objemu 96% ethanolu. Zamícháno a precipitováno 30 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovala centrifugace 10 minut při 12000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl vylit, peleta omyta 70% ethanolem a usušena na vzduchu přes noc. Peleta byla rozpuštěna ve 160 μl TE, přidáno 40 μl 4 M HCl a 200 μl 13% PEG, precipitováno 1 hodinu ve vodě s ledem, opět centrifugováno 10 min při 12000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Peleta následně rozpuštěna ve 130 μl TE. Následovala extrakce nejprve fenolem, poté chloroformem s fenolem 1:1 a nakonec pouze chloroformem (postup stejný jako při předchozí extrakci). Poté byla přidána 1/10 objemu NaAc a 2,5 násobek objemu 96% ethanolu a následovala precipitace při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Následovala centrifugace 20 minut při 12000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a peleta byla poté v sušičce vysušena dosucha, rozpuštěna v 55 μl TE. Koncentrace a čistota plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky²⁴. Nakonec byla koncentrace plasmidové DNA upravena na hodnotu 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a vzorky plasmidů byly zmrazeny a uchovávány pro další použití při -20°C .

5 Výsledky

5.1 Klonování a amplifikace DNA fragmentu

Celková RNA byla připravena z 5 ks myších slezin získaných z laboratorních myší kmene BALBc/BL-6 dle návodu uvedeného v metodické sekci, resp. v literatuře²³. Vzhledem k tomu, že kontrola této RNA gelovou elektroforesou prokázala dobrou kvalitu izolovaného preparátu a minimální degradaci, bylo možné přistoupit k provedení RT-PCR reakcí. Tyto reakce, přestože jsou velmi běžné a rutinní, neprobíhaly úplně bez problémů. Při reverzní transkripci izolované RNA do cDNA pomocí reverzní transkriptasy Superscript II se žádné problémy nevyskytly. Pro následující PCR reakce byla použita v laboratoři běžně používaná Deep Vent DNA polymerasa, ovšem pomocí této polymerasy vznikaly DNA fragmenty různých velikostí, převážně nespecifické a malé koncentrace, jak bylo posouzeno na základě agarosové elektroforesy produktů (obr. 7A). Možnost, že by to mohlo být způsobeno špatnou kvalitou nebo malým množstvím použité RNA, se podařilo vyvrátit použitím Platinum Taq DNA polymerasy a techniky „Hot start“. Při této amplifikaci již vznikaly DNA fragmenty specifitější a ve větším množství (obr. 7B).



Obr. 7: Analýza DNA fragmentů amplifikovaných pomocí RT-PCR protokolu pomocí primerů specifických pro mCD69. Pro analýzu byl použit 1% agarosový gel v přítomnosti pufru TAE a ethidiumbromidu a DNA byla detekována pod UV zářením na transiluminátoru při vlnové délce 254 nm. Na obou stranách gelu byl nanesen DNA marker, tzv. žebřík s intervalem 100 pb. Šipkou jsou označeny PCR produkty vzniklé amplifikací s teplotou nasedání primerů 62 °C. Na fotografii vlevo je produkt první PCR amplifikace, na fotografii vpravo produkt PCR amplifikace produktu amplifikace z levé části obrázku.

Ovšem i při použití této polymerasy musela být experimentálně optimalizována teplota nasedání primerů. Pro dané primery vyhovovala nejvíce teplota 62 °C. Při této teplotě byly na elektroforeogramu viditelné pásy značící přítomnost fragmentů požadované délky, ovšem kvůli relativně nízké koncentraci i čistotě byla provedena PCR amplifikace z tohoto PCR produktu, kdy již bylo docíleno požadované čistoty (viz obr. 7 na předchozí straně).

5.2 Ligace DNA fragmentu do vektoru a kontrola restriční analýzou

Se získanými DNA fragmenty byla provedena ligace do plasmidového vektoru pomocí komerčně dostupného kitu TOPO TA Cloning Kit firmy Invitrogen. Ačkoliv je v použitém kitu ligace PCR fragmentu do vektoru velmi účinná, je přesto třeba vyloučit neproduktivní transformanty (vzniklé například zavřením vektoru „do sebe“). Jako první krok byla použita selekce tzv. modrých a bílých kolonií na médiu s chromogenním substrátem. Tato selekce je založená na tom, že insert vložený do vektoru přeruší v tomto vektoru gen pro enzym β -galaktosidasu. Bakteriální kolonie obsahující insert tedy již nejsou schopné produkovat enzymaticky aktivní galaktosidasu, nejsou tedy schopné enzymaticky štěpit chromogenní substrát a jeví se na Petriho misce s agarem jako bílé, kdežto kolonie obsahující plasmid bez insertu jsou modré. Ve druhém kroku potom byla u několika vybraných bílých kolonií ověřována přítomnost a velikost insertu restriční analýzou. Toto kritérium je již mnohem přesnější a umožňuje vybrat klony vhodné pro DNA sekvenování insertu. I tato analýza potvrdila přítomnost insertu a pozitivní kolonie tedy mohly být namnoženy na misce s LB agarem a předány k sekvenaci.

5.3 DNA sekvenace

Klony vhodné pro sekvenování byly na miskách s LB agarem odevzdány k sekvenaci do Laboratoře DNA sekvenování MBÚ AV ČR v.v.i. Dr. Jurgenu Felsbergovi. Plasmid byl purifikován kitem k tomu určeným a sekvenován automatickým sekvenátorem ABI Prism 3100 od firmy Applied Biosystems. Sekvenace probíhala Sangerovou dideoxynukleotidovou metodou na obou vláknech s použitím primerů M13 Forward a M13 Reverse (obr. 6, str. 28). Na základě výsledného chromatogramu byla sekvence (obr. 8 na následující straně) porovnána s databází (viz kap. 4.9). Ve čtyřech místech požadované sekvence nebyl sekvenátor schopen nukleotid určit, avšak po prohlédnutí chromatogramu

nukleotidy na základě příslušných píků doplněny a toto doplnění se shodovalo se sekvencí zjištěnou z databází.

NNNNNNNNNNCNNGGNNNNNNNAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTG ██████ GCCCTTGC ██████ GGCTTGACGAG
AAGTTGGAATCATCTGACCACCATGTTGCTACCTGCAAGAATGAGTGGATTCATACAAGAGGACATGTTACTTC
TTCTCCACCACAACCAAGAGTTGGGCCTTGGCCCAACGCTCTTGTTCTGAAGATGCTGCTACTCTTGCTGTAATT
GATTCAGAAAAGGACATGACGTTTCTGAAGCGATATTCTGGTGAAC TGGACATTGGATTGGGCTGAAAAATGAA
GCTAATCAGACATGGAAATGGGCAAATGGCAAAGAATTTAACAGCTGGTTCAACTGACGGGGTCTGGGAGGTGC
GTGTCCGTGAACCACAAAAATGTTACCGCTGTGGACTGTGAGGCAAAC TCCACTGGGTCTGCAGCAAGCCCTCC
AGATAATG ██████ GCAAGGGC ██████ TGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGG
GCCCAATTGCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCC
TGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCGCAGCATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAC
CGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACNCNCCTGTAGCGGCGCATTAAGCNCGGCG
GGTGTGGTGGTTACNCGCAGCGNGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTNCN
TCCTTTCTCGNCACGTTTCGCCNGCTTTCCCCGTCNAGCTCNNAATCGGGNGGCTCCCTTTNANGGNTCCGANTNN
GNGCTTNANNGNNNCTCGACCCNAAAACTTGANTAGGGTGATGGTNCACGNNGNGNNNCATCNNCNTNATAGA
NNNTTTTTTCGNCNTTTGACNNNGNNNNCANGNNCTNTNANNNNNGANNNNNNNNNNNNNACTGGGNNCNCNNTN
NNNNNTATCNNNNNNCNTNNNNNTNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNCNANTNNNCNTNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNTNNNNNNNNNNNTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNN

Obr. 8: Výsledek sekvenace: Podtržená tučná sekvence je požadovaný fragment DNA, zeleně jsou označena restrikční místa EcoR I a modře restrikční místa Hind III a Nde I (v tomto pořadí). Žlutě jsou označeny již dříve zmiňované neurčené nukleotidy, které byly doplněny na základě chromatogramu.

5.4 Příprava plasmidové DNA

Poslední fází experimentální práce bylo namnožení získaných plasmidů, aby mohly být použity pro další práci. Postupem popsáním v kapitole 4.10 se podařilo připravit cca 400 µg plasmidové DNA o vysoké čistotě - poměr A_{260}/A_{280} byl 1,992 - která je k dispozici pro další pokračování projektu.

6 Diskuse

Cílem mé práce bylo získat konstrukt kódující receptor myších leukocytů CD69, který by dále mohl být použit pro přípravu této molekuly. V Laboratoři architektury proteinů byly již dříve připraveny molekuly CD69 lidské a také potkaní. Ovšem protože většina pokusů na laboratorních zvířatech prováděných v imunologii, farmakologii a dalších oborech je prováděna na myších modelech, bylo třeba získat i myší molekulu CD69, neboť použití tzv. heterologních proteinů (například lidský CD69 zkoumaný na myším modelu) může vést ke zkresleným výsledkům.

Jako výchozí materiál jsem ve svých experimentech nepoužíval vysoce CD69 pozitivní nabohacené buňky, neboť je obtížné je získat, ale vycházel jsem z běžné myší sleziny. Předpokládal jsem totiž, že vzhledem k univerzální a částečně konstitutivní expresi této molekuly na povrchu leukocytů bude v tomto materiálu myší CD69 též přítomna, což se nakonec potvrdilo.

Co se týče experimentů, tak při PCR amplifikaci bylo po počátečních neúspěšných experimentech přistoupeno ke změně používané Deep Vent DNA polymerasy na Platinum Taq polymerasu. S touto polymerasou již byla amplifikace úspěšná a po optimalizaci reakčních podmínek, zejména teploty nasedání primerů, se podařilo získat požadovaný, velmi čistý DNA fragment. Při klonovacích experimentech nebyly bezbarvé kolonie vždy pozitivní a to i přes různé používané komerční materiály. Získání pozitivních kolonií si tedy vyžádalo opakované experimenty. Nakonec se podařilo získat pozitivní klon P61, jehož sekvenování ukázalo přítomnost správné DNA sekvence a také to, že v průběhu PCR amplifikace a klonování nedošlo k žádným mutacím.

S použitím mnou získaného materiálu pokračovali další členové laboratoře (Daniel Kavan a Jiří Nepožitek) v dalších experimentech s cílem klonovat insert do expresního vektoru a zahájit produkci a skládání CD69 proteinu. V době sepisování mé bakalářské práce začaly být první proteinové preparáty k dispozici. Tyto budou společně s mnou získaným materiálem používány pro další výzkum v Laboratoři architektury proteinů.

7 Závěr

1. Z myších slezin byla získána celková RNA.
2. Metodou RT-PCR byl připraven fragment DNA kódující receptor CD69.
3. Fragment byl zaligován do rekombinantního plasmidu a tímto plasmidem byly transformovány kompetentní buňky *E. coli*.
4. Insert byl sekvenován a tím byla ověřena jeho sekvence v plasmidu.
5. Byl připraven rekombinantní plasmid obsahující insert, který kóduje myší CD69 a byla ověřena jeho čistota.

8 Literatura

- 1 Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. Triton, Praha (2002)
- 2 Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J.: *Immunology*, 5th Edition. W.H. Freeman and Company, New York (2003)
- 3 Hao, L., Klein, J., Nei, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3192-3197 (2006)
- 4 Parham, P.: *NK cell receptors: Curr. Biol.*, 10: R195-R197 (2000)
- 5 Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F. M.: *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 304 – 316 (2003)
- 6 Colonna, M., Moretta, A., Vély, F., Vivier, E.: *Immunol. Today*, 21: 428-431 (2000)
- 7 Backstrom, E., Kristensson, K., Ljunggren, H. G.: *Scand. J. Immunol.* 60, 14-22 (2004)
- 8 Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N., Long, E. O.: *Mol. Cell. Biol.* 23, 6291-6299 (2003)
- 9 Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225-274 (2005)
- 10 Kelley, J., Walter, L., Trowsdale, J.: *PLoS Genet.* 1, 129-139 (2005)
- 11 Wende, H., Colonna, M., Ziegler, A., Voltz, A.: *Mamm. Genome* 10, 154-160 (1999)
- 12 Martin, A. M., Kulski, J. K., Witt, C. S., Pontarotti, P., Christiansen, F. T.: *Trends Immunol.* 23, 81-88 (2002)
- 13 Hamann, J., Montgomery, K. T., Lau, S., Kucherlapati, R., van Lier, R. A.: *Immunogenetics* 45, 295-300 (1997)
- 14 Boles, K. S., Barten, R., Kumaresan, P. R., Trowsdale, J., Mathew, P. A.: *Immunogenetics* 50, 1-7 (1999)
- 15 Plougastel, B., Dubbelde, C., Yokoyama, W. M.: *Immunogenetics* 53, 209-214 (2001)
- 16 Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M. J., Retier Bihl, F., Braud, V. M.: *J. Immunol* 175, 7791-7795 (2005)
- 17 Bléry, M., Olcese, L., Vivier, E.; *Hum. Immunol.* 61, 51-64 (2000)
- 18 Sharon N.: *Trends Biochem. Sci.* 18, 221-226 (1993)
- 19 Bezouška, K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 535-563 (2004)
- 20 Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: *Biochemistry* 39, 14779-14786 (2000)
- 21 Gerosa, F., Tommasi, M., Scardoni, M., Accolla, R. S., Pozzan, T., Libonati, M., Tridente, G., Carra, G.: *Mol. Immunol.* 28, 159-168 (1991)
- 22 Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F. et. al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903 (2002)

- 23 Chomczynski, P., Sacchi, N.: *Anal. Biochem.* 162, 156-159 (1987).
- 24 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
- 25 Invitrogen Corporation: TOPO TA Cloning[®]: Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products, User Manual, Version U (2006)
- 26 Berghammer, H., Auer, B.: „Easypreps“: fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* 14, 524-528 (1993)

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

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka