

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

*Příprava dimerního leukocytárního
aktivačního antigenu CD69*

Diplomová práce
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Ivana Borovičková

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Karel Bezouška, CSc.
Školitel: Mgr. Daniel Kavan
Laboratoř architektury proteinů
Oddělení imunologie a gnotobiologie MBÚ AV ČR, v.v.i.
Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Karla Bezoušky, CSc. a konzultanta Mgr. Daniela Kavana a že jsem veškerou použitou literaturu řádně ocitovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu a Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i. je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i.

V Praze dne *27.4.2007*.....

Brončová Ivana
.....
podpis

Chtěla bych poděkovat především vedoucímu mé diplomové práce Doc. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. a svému školiteli Mgr. Danielu Kavanovi za poskytnutí cenných rad a dobrého pracovního zázemí. Také děkuji Mgr. Petru Pompachovi, PhD. a RNDr. Petru Novákovi, PhD. za provedení analýz na hmotnostním spektrometru. Dále děkuji všem členům laboratoře architektury proteinů za ochotu kdykoli pomoci. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost v době mého studia.

Obsah

1. Úvod	8
1.1 Imunitní systém a jeho funkce.....	8
1.2 Imunitní mechanismy	8
1.3 Složky imunitního systému.....	9
1.4 Povrchové molekuly buněk imunitního systému	10
1.5 Lektinové receptory	11
1.6 Molekula CD69.....	13
1.6.1 Charakteristika molekuly CD69.....	13
1.6.2 Struktura molekuly CD69	14
1.6.3 Struktura genu molekuly CD69	15
1.6.4 Výskyt molekuly CD69	16
1.6.5 Funkce a vazebné schopnosti molekuly CD69.....	17
1.6.6 Význam molekuly CD69 v medicíně	17
2. Cíl práce	19
3. Seznam použitých přístrojů a materiálu	20
3.1 Seznam přístrojů	20
3.2 Seznam materiálu	21
3.2.1 Chemikálie.....	21
3.2.2 Enzymy.....	23
3.2.3 Vektory	23
3.2.4 Primery	24
3.2.5 Bakteriální kmeny.....	24
3.2.6 Roztoky a média.....	24
4. Metody	29
4.1 Metody pro práci s DNA	29
4.1.1 PCR.....	29
4.1.2 Elektroforéza DNA na agarosovém gelu.....	30
4.1.3 Extrakce DNA z agarosového gelu	30
4.1.4 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami	30
4.1.5 Ligace DNA do vektoru	31
4.1.6 Transformace bakterií plazmidem.....	32
4.1.7 Minipreparativní izolace plazmidu	33
4.1.8 DNA sekvenování.....	33
4.2 Metody pro práci s proteiny	34
4.2.1 Produkce proteinu CD69.....	34
4.2.2 Izolace inkluzních tělísek	34
4.2.3 SDS elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu	35
4.2.4 Barvení polyakrylamidových gelů.....	35
4.2.5 Stanovení koncentrace proteinů	36
4.2.6 Zakoncentrování proteinových vzorků	36
4.2.7 Afinitní chromatografie na Ni-NTA Sepharose.....	37
4.2.8 Štěpení histidinové kotvy	37
4.2.9 Ionexová chromatografie.....	37
4.2.10 Gelová chromatografie.....	38
4.2.11 Chromatografie s obrácenou fází.....	38
4.2.12 Modifikace volné SH skupiny monomerního proteinu.....	38
4.2.13 Hmotnostní spektrometrie	39

5. Výsledky	40
5.1 Bakteriální exprese proteinu hCD69	40
5.2 Dimerizace proteinu hCD69	43
5.3 Štěpení histidinové kotvy	44
5.3.1 Štěpení histidinové kotvy enterokinasou	45
5.3.2 Štěpení histidinové kotvy trypsinem	45
5.4 Příprava nového expresního konstruktů hCD69tr	46
5.5 Štěpení histidinové kotvy trypsinem	50
5.6 Separace histidinové kotvy	51
5.6.1 SP-Sepharosa	51
5.6.2 MONO Q	52
5.7 Separace monomerního proteinu	53
5.8 Strukturní analýza	58
6. Diskuse	60
7. Shrnutí	65
8. Seznam použité literatury	66
9. Přílohy	69

Seznam zkratek

AA	akrylamid
Amp	ampicilin
AcN	acetonitril
AIM	Aktivační indukční molekula (<i>Activation Induction Molecule</i>)
APC	antigen prezentující buňka (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
APS	persíran amonný (<i>Amonium Persulfate</i>)
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bichinolin (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BCR	receptor B lymfocytů (<i>B-Cell Receptor</i>)
bis-AA	N,N'-methylen-bis-akrylamid
bp	pár nukleotidových bází (<i>Base Pair</i>)
BSA	Hovězí sérový albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Cam	chloramfenikol
CBB	Coomasie Brilliant Blue
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CpG	Cytosin-Guanidin
CRDs	domény rozpoznávající sacharidy (<i>Carbohydrate Recognition Domains</i>)
CTLDs	C-koncové lektinové domény (<i>C-Terminal Lectin like Domains</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
DTT	dithiothreitol
EA	Časný aktivační antigen (<i>Early Activation Antigen</i>)
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
EMPB	<i>Eosinophil Major Basic Protein</i>
EP	jednoduchá preparace (<i>Easy Prep</i>)
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>ElectroSpray Ionization</i>)
EtOH	ethanol
FT	Fourierova transformace
GM-CSF	Kolonie stimulující faktor pro granulocyty a monocyty (<i>Granulocyt, Monocyt - Colony Stimulating Factor</i>)
HAc	kyselina octová

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>Hight Performance Liquid Chromatogaphy</i>)
ICR	iontově cyklotronová rezonance (<i>Ion Cyclotron Resonance</i>)
IDD	Integrální membránový protein, chybějící při DiGeorgově syndromu (<i>Integral membrane protein, Deleted in DiGeorge syndrom</i>)
IFN	interferon
LB	Luria-Bertani
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou (<i>Low Density Lipoproteins</i>)
MALDI	desorpce laserem za přítomnosti matrice (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MBP	Protein vázající mannosu (<i>Mannosa Binding Protein</i>)
ME	merkaptoethanol
MeOH	methanol
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (<i>Major Histokompatibility Complex</i>)
MLR	směsná lymfocytární reakce (<i>Mixed Lymphocyte Reaction</i>)
Ni-NTA	Ni-nitrilotrioctová kyselina (<i>Ni-nitrilotriacetic acid</i>)
NK buňky	přirozené zabijedské buňky (<i>Natural Killers cells</i>)
PAP	Protein spojený s pankreatitidou (<i>Pancreatitis-Associated Protein</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMSF	phenylmethylsulphonylfluorid
RNA	ribonukleová kyselina (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RP	obrácená fáze (<i>Reverse Phase</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný
TCR	receptor T lymfocytů (<i>T-Cell Receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin
Tet	tetracyklin
TFA	kyselina trifluoroctová (<i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF	Faktor nekrotizující nádory (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TOF	doba letu (<i>Time Of Flight</i>)
Tris	tris/hydroxymethyl/aminomethan
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

1. Úvod

1.1 Imunitní systém a jeho funkce

Imunitní systém je difúzní orgán, který se podílí na udržování homeostázy organismu. Jeho základní schopností je rozpoznávat vlastní struktury od struktur cizích. Toto umožňují znaky na povrchu buněk, typické pro každého jedince, které se nazývají tkáňové antigeny, v kombinaci s receptory imunitního systému.¹

Nejdůležitějšími vlastnostmi imunitního systému jsou *obranyschopnost* (ochrana před patogenními mikroorganismy a jejich toxickými produkty), *autotolerance* (rozpoznávání vlastních buněk a navození tolerance vůči nim) a *imunitní dohled* (průběžné rozpoznávání a odstraňování buněk starých nebo jinak pozměněných, například vlivem stresu nebo nádorového onemocnění).²

1.2 Imunitní mechanismy

Imunitní mechanismy se rozdělují na dvě složky, *nespecifickou* neboli neadaptivní a *specifickou* neboli adaptivní.

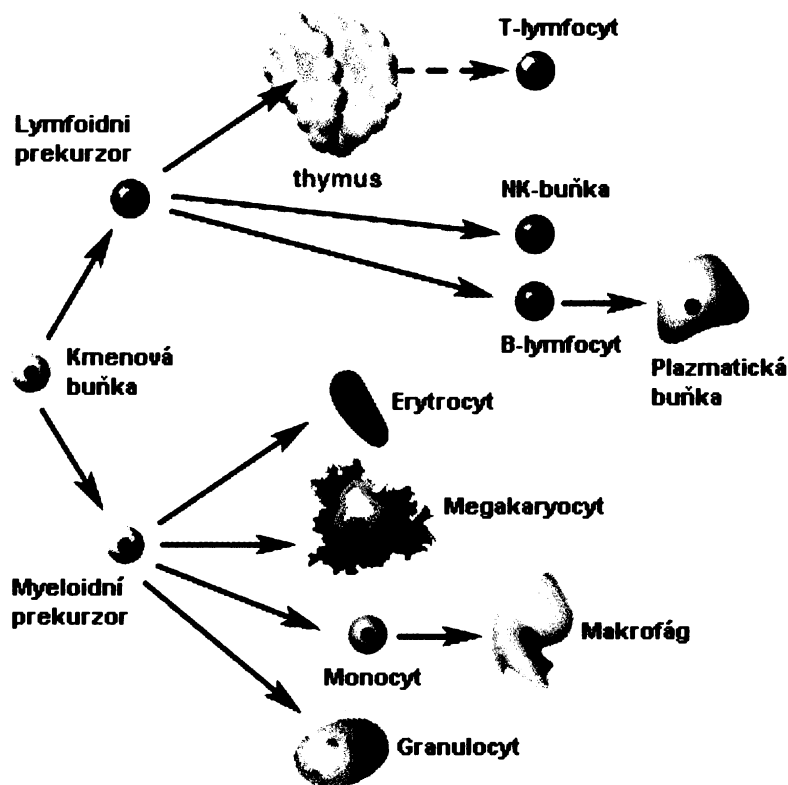
Nespecifické imunitní mechanismy zahrnují mnoho molekul a buněk, které reagují rychle bez předchozí aktivace na povrchové struktury typické pro různé mikroorganismy a dokáží tak eliminovat široké spektrum patogenů.² Receptory nespecifické imunity rozlišují například peptidoglykany, lipopolysacharidy, nemetylované CpG a dvouvláknovou RNA.³ Buněčnými složkami této imunity jsou zejména fagocyty a NK buňky, humorálními složkami jsou například proteiny komplementového systému, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. Kromě toho sem patří také přirozené bariéry jako je neporušený povrch kůže a sliznic, antibakteriální látky a fyziologická mikroflóra na jejich povrchu.

Specifické imunitní mechanismy rozpoznávají konkrétní antigeny pomocí vysoce specifických molekul, kterými jsou protilátky, receptory T a B lymfocytů. Na rozdíl od nespecifických imunitních mechanismů se specifická imunitní reakce rozvíjí několik dní až týdnů a vzniká tzv. imunologická paměť, díky které je reakce na opakované setkání s antigenem rychlejší a silnější.²

1.3 Složky imunitního systému

Imunitní systém je složen z přibližně 10^{12} lymfocytů a dalších buněk, jakými jsou například makrofágy nebo neutrofilní granulocyty, 10^{20} molekul protilátek a z dalších milionů regulačních molekul, jako jsou cytokiny, komplementové proteiny atd. Všechny tyto složky imunitního systému se pohybují volně v krvi a lymfě nebo se sdružují do primárních lymfoidních orgánů (kostní dřeň, thymus, Fabriciova burza u ptáků) a sekundárních lymfoidních orgánů (lymfatické uzliny, slezina, tonsily, apendix a Peyerovy plaky).¹

Bílé krvinky (leukocyty), které tvoří podstatnou část imunitního systému se vyvíjejí v kostní dřeni z pluripotentních kmenových buněk (obr. 1.1). Z nich vznikají dvě buněčné linie, myeloidní a lymfoidní. Mezi buňky myeloidní linie patří monocyty, makrofágy, dendritické buňky, mastocyty, neutrofilní, eosinofilní a bazofilní granulocyty, dále také erythrocyty a trombocyty. Buňkami lymfoidní linie jsou T, B lymfocyty a NK buňky.²



Obr. 1.1: Diferenciační stádia leukocytů

Všechny tyto buňky mají v imunitním systému své specifické funkce, které jsou stručně popsány v tab. 1.1 ^{1, 2}

<i>Buňka</i>	<i>Druh buňky</i>	<i>Funkce</i>	
Granulocyt	Neutrofilní	fagocytóza extracelulárních bakterií	
	Eosinofilní	obrana proti mnohobuněčným parazitům, alergické reakce	
	Basofilní	alergické reakce, anafylaktický šok	
Monocyt		fagocytóza - makrofágy - odstraňování vlastních poškozených buněk, APC	
Lymfocyt	B lymfocyt	produkce protilátek	
	T lymfocyt	T _H	aktivace ostatních buněk imunitního systému
		T _C	likvidace buněk infikovaných virem nebo nádorových buněk
		T _S	potlačení funkcí T a B lymfocytů
NK buňka	likvidace buněk infikovaných virem a nádorových buněk		

tab. 1.1: Funkce buněk imunitního systému^{1, 2}

1.4 Povrchové molekuly buněk imunitního systému

Na povrchu buněk imunitního systému se nachází velké množství různých molekul, které zajišťují jejich rozmanité funkce. Patří sem adhezivní molekuly, antigenně specifické receptory, MHC glykoproteiny, Fc-receptory, komplementové receptory, cytokinové receptory, povrchové enzymy a jejich receptory, receptory pro mikrobiální molekuly a různé transportní proteiny.

Adhezivní molekuly zprostředkují přímý mezibuněčný kontakt, na kterém závisí většina dějů v imunitním systému. Dělí se na několik strukturních skupin, na *integriny*, *imunoglobuliny*, *lektiny* (do této skupiny se řadí molekula CD69) a *muciny*.

Antigenně specifické receptory se nachází na povrchu B lymfocytů (BCR) a T lymfocytů (TCR). Rozeznávají nativní antigeny, případně komplexy MHC glykoproteinů s fragmenty antigenů (v případě TCR). Po vazbě antigenu na receptor je přenesen signál do buňky, což vede k její aktivaci.

MHC glykoproteiny jsou na povrchu všech jaderných buněk organismu a slouží k prezentaci peptidových fragmentů na jejich povrchu. T lymfocyty tyto komplexy rozlišují svými specifickými receptory a reagují na přítomnost abnormálního peptidového fragmentu.

Fc-receptory váží částice opsonizované protilátkami. Mají význam zejména při fagocytóze cizorodých částic, ale některé typy mají i regulační nebo transportní funkce.

Komplementové receptory váží složky komplementu a mají obdobné funkce jako Fc-receptory.

Cytokinové receptory specificky váží molekuly cytokinů a zprostředkují tak jejich regulační funkce.

Povrchové enzymy jsou transmembránové proteiny s enzymovou aktivitou. Jsou to nejčastěji kinasy nebo fosfatasy.

Receptory mikrobiálních molekul mají význam zejména v nespecifické imunitě a umožňují buňkám reagovat na typické struktury na povrchu patogenních mikroorganismů. Patří sem takzvané TLR.

Transportní proteiny zajišťují stejně jako u jiných buněk přenos iontů, živin, produktů metabolismu a mnoha dalších látek dovnitř a ven z buňky.²

Většina povrchových leukocytárních molekul je proteinové, případně glykoproteinové povahy. Podle orientace a ukotvení těchto transmembránových proteinů v plazmatické membráně se rozdělují do několika typů. Typ I má N-konec polypeptidového řetězce umístěn v extracelulární části, typ II je orientován opačně, tedy N-koncem do nitra buňky. Transmembránové proteiny typu III procházejí opakovaně membránou a typ IV je zakotven v membráně pomocí tzv. glykolipidové kotvy.

V dnešní době se pro označování lidských leukocytárních antigenů i pro jejich potkaní a myší homology používá CD názvosloví. Název se skládá ze zkratky CD a příslušného pořadového čísla. Jednotlivé molekuly byly identifikovány pomocí skupin monoklonálních protilátek.⁴

1.5 Lektinové receptory

Lektiny jsou obecně proteiny nebo glykoproteiny neimunoglobulinové povahy, které mají schopnost vázat sacharidy, aniž by došlo ke změně struktury interagujících sacharidových ligandů. Poprvé byly studovány u rostlin, kde byly identifikovány jako velmi toxické komponenty (např. ricin⁵). Na počátku sedmdesátých let minulého století byly poprvé objeveny u obratlovců.⁶

Lektiny mají unikátní biologické vlastnosti, z nichž některé jsou velmi důležité v imunitních procesech, jsou to například:¹

- endocytóza a intracelulární transport glykoproteinů
- rozpoznávání a adheze bakterií na povrch fagocytů při fagocytóze
- vazba bakterií na epitelové buňky hostitele
- regulace vzájemných interakcí buněk imunitního systému
- přirozené zabíjení různých cílových buněk⁷
- vycestování leukocytů do místa zánětu⁷

Všechny tyto funkce jsou založeny na interakcích lektinů s jejich sacharidovými ligandy, proto má vyhledávání přirozených ligandů zásadní význam při objasnění role jednotlivých lektinových receptorů v imunitním systému.

Lektiny jsou často komplexní proteiny, které se skládají z několika funkčně odlišných domén, na vazbě sacharidových ligandů se však podílí pouze některé z nich, označované jako CRDs.

Některé lektiny se nacházejí v endoplazmatickém retikulu, kde se podílejí na správném poskládání glykoproteinů, do této skupiny patří *calnexin* a *calretikulín*. Podobnou funkci mají také živočišné a rostlinné lektiny *L-typu*. Další lektinovou rodinou jsou lektiny *P-typu*, kam patří například receptory pro manosa-6-fosfát, lokalizované v Golgiho aparátu. *Galektiny* mají schopnost propojovat sacharidové struktury na povrchu buněk a v extracelulární matrix. Lektiny, schopné vázat zbytky kyseliny sialové, se označují jako lektiny *I-typu* a podílejí se zejména na mezibuněčné adhezi.⁸ Dalším typem lektinů jsou *annexiny*, které kromě své afinity k lipidům vykazují také schopnost vázat glykosaminoglykany.⁵

Velmi významnou skupinou lektinů, z hlediska imunitního systému, jsou lektiny *C-typu*. Vazba sacharidových ligandů na jejich CRD je závislá na přítomnosti Ca^{2+} , podle této vlastnosti získala celá skupina své označení. CRD zde vytváří podskupinu proteinových domén, které se označují jako domény podobné lektinům C-typu (CTLD). V lidském organismu bylo zatím identifikováno několik stovek proteinů obsahujících tyto domény.⁸ Vyskytují se ve formě rozpustné i membránové a jejich funkcí je hlavně mezibuněčná adheze, komunikace mezi buňkami a buněčná signalizace. Základní rozdělení, vlastnosti a příklady jsou shrnuty v tab. 1.2.^{9,10}

<i>Skupina lektinů C-typu</i>	<i>Charakteristika, příklady</i>
I. Proteoglykany	sekretované; součást extracelulární matrix; mezibuněčná komunikace; adheze; např. aggrekán, neurokan, brevikan
II. Jaterní lektiny	membránové proteiny II. typu; trimery a tetramery; interakce buněk; např. asialoglykoproteinový receptor
III. Kolektiny	sekretované; doména vázající kolagen a CTLD; trimery; např. MBP, plicní surfaktanty
IV. Selektiny	membránové proteiny I. typu; adheze; leukocytární (L-selektin), endoteliální (E-selektin), selektin krevních destiček (P-selektin)
V. Receptory NK-buněk	membránové proteiny II. typu; homo a heterodimery např. CD69, NKR-P1, Ly-49, CD94, NKG2
VI. Receptory makrofágů	membránové proteiny I. typu; 8 CTLD a doména bohatá na cystein; např. manóзовý receptor, DEC-205
VII. Reg lektiny	sekretované; CTLD s krátkým N-koncem; adheze; růstové faktory; např. lithostatin α , PAP
VIII. Jednoduché receptory I. typu	membránové proteiny I. typu; jedna CTLD; vazba extracelulární matrix; např. laylin
IX. Tetranektiny	sekretované; trimery; např. tetranektin, růstový faktor kmenových buněk
X. Polycystiny	membránové proteiny I. typu; regulace buněčného cyklu; adheze; např. polycystin
XI. Atraktiny	membránové proteiny I. typu i sekretované; vývoj CNS; např. atraktin
XII. EMBP lektiny	sekretované; CTLD s kyselým krčkem; obrana proti parazitům; např. EMBP
XIII. IDD lektiny	membránové proteiny I. typu; na N-konci LDL-receptor; vazba extracelulární matrix; signalizace; např. IDD
XIV. Endosialiny	membránové proteiny I. typu; např. endosialin, trombomodulin

tab. 1.2: Rozdělení lektinů C-typu^{9, 10}

1.6 Molekula CD69

1.6.1 Charakteristika molekuly CD69

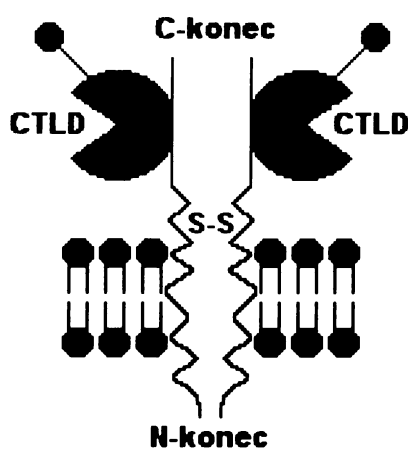
Poprvé byla tato molekula popsána v roce 1986 jako časný leukocytární aktivační antigen, EA-1.¹¹ Později se začala označovat také jako AIM, MLR-3, Leu-23 a CD69.

Nachází se na povrchu většiny hematopoetických buněk, jako jsou lymfocyty, neutrofilní, eosinofilní a basofilní granulocyty, krevní destičky a epidermální Langerhansovy buňky.⁴

Je to membránový glykoprotein typu II a ve své extracelulární doméně obsahuje lektinovou doménu C-typu. Gen, kódující tuto molekulu, je lokalizován v NK genovém komplexu, proto CD69 patří do skupiny V lektinů C-typu. Vyskytuje se jako homodimer spojený disulfidovou vazbou, jehož podjednotky mají přibližnou molekulovou hmotnost 28 až 32 kDa, v závislosti na přítomné glykosylaci extracelulární domény.¹²

1.6.2 Struktura molekuly CD69

Molekula CD69, jak již bylo řečeno, patří mezi transmembránové glykoproteiny typu II s C-lektinovou doménou v extracelulární části. Schéma molekuly CD69 znázorňuje obr. 1.2.



obr. 1.2: Schéma molekuly CD69
(červeně je vyznačena produkovaná část)

Celá molekula je složena ze dvou identických polypeptidových řetězců, spojených disulfidovým můstkem prostřednictvím dimerizačních cysteinů 68.¹³ Jeden řetězec je tvořen 199 aminokyselinami. V intracelulární N-koncové části, obsahující asi 40 aminokyselin, se nachází několik serinových zbytků, které představují potenciální fosforylační místa pro serinové/threoninové kinasy. Extracelulární C-koncová část, obsahující asi 138 aminokyselin, zahrnuje C-lektinovou doménu. Tato doména je tvořena aminokyselinovými zbytky 75-194 a obsahuje N-glykosylaci v pozici 166.¹² Extracelulární a intracelulární doména je spojena krátkým transmembránovým úsekem (asi 21 aminokyselin) a takzvaným krčkem (asi 20 aminokyselin).¹⁴

Molekulová hmotnost jednoho polypeptidového řetězce bez glykosylace je přibližně 22 559 Da. Při analýze vzorků na polyakrylamidovém gelu má redukovaná forma molekulovou hmotnost v rozmezí 28 až 32 kDa a neredukovaná forma, kde je zachován disulfidový můstek mezi podjednotkami, má molekulovou hmotnost v rozmezí 55 až 65 kDa.⁴

Velké pokroky v rozlišení struktury tohoto proteinu přineslo použití metod pro stanovení trojrozměrné struktury molekul, jako jsou krystalizace a rentgenostrukturní analýza, nukleární magnetická rezonance a hmotnostní spektrometrie. Těmito metodami byla většinou analyzována extracelulární část molekuly s C-lektinovou doménou.

Rentgenostrukturní analýza odhalila, že lektinová doména obsahuje dva antiparalelní β -skládané listy a dva α -helixy. Aminokyselinové zbytky valinu 90, glycinu 91, tyrozinu 92, fenylalaninu 131 a tyrozinu 135 vytváří hydrofóbní jádro. Dalším zjištěním byl výskyt tří disulfidových můstků mezi cysteinovými zbytky (85-96, 113-194, 173-186) polypeptidových řetězců. Tyto studie prokázaly blízkou strukturní příbuznost molekuly CD69 s receptory NK buněk CD94 a Ly-49A.^{14, 15}

Podobné výsledky a zejména odhalení vazebných schopností této molekuly poskytly analýzy provedené pomocí hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické rezonance.¹⁶

Kromě toho bylo v této oblasti také velkým přínosem počítačové modelování.¹⁷

1.6.3 Struktura genu molekuly CD69

Gen kódující molekulu proteinu CD69 se nachází v NK genovém komplexu. Tento komplex je lokalizován na lidském chromozómu 12, myším chromozómu 6 a potkaním chromozómu 4.¹⁸ Kromě tohoto genu jsou zde i geny dalších receptorů NK buněk, jako například CD94, NK-RP1, NKG2 a Ly-49. Na rozdíl od genů pro NK-RP1 a Ly-49 není gen kódující molekulu CD69 polymorfní a protein se tedy vyskytuje pouze v jedné variantě.¹²

Klonováním cDNA pro CD69, které bylo poprvé provedeno v roce 1993, byla získána nukleotidová sekvence o délce 1676 bp, která obsahuje jeden otevřený čtecí rámec délky 600 bp.¹⁹

Nukleotidová sekvence genu obsahuje pět exonů, které jsou odděleny pěti introny. První dva exony odpovídají cytoplazmatické a transmembránové doméně. Zbýlé tři exony kódují extracelulární C-lektinovou doménu. Podobné uspořádání genu se vyskytuje i u ostatních transmembránových proteinů typu II.

m-RNA, která vzniká přepisem tohoto genu, je rychle po aktivaci leukocytů degradována, v důsledku přítomnosti degradačních signálů v netranslatovatelném úseku genu na 3' konci.²⁰

1.6.4 Výskyt molekuly CD69

Molekula CD69 se vyskytuje na povrchu většiny buněk hematopoetického původu. Těmito buňkami jsou převážně lymfocyty, aktivované eosinofily¹², aktivované neutrofilů, myeloidní prekurzory v kostní dřeni²¹, CD3+ thymocyty²², monocyty v krevním oběhu²³, epidermální Langerhansovy buňky²⁴ a krevní destičky²⁵.

T lymfocyty, B lymfocyty a NK buňky produkují CD69 dvě až tři hodiny po jejich aktivaci. Tato aktivace je způsobena stimulací TCR u T lymfocytů, stimulací BCR u B lymfocytů a NK buňky jsou aktivovány interleukinem 2, IFN- α , nebo stimulací receptoru CD16 specifickými protilátkami. Bylo prokázáno, že stimulačními faktory jsou také forbolestery a některé mitogeny.¹¹ Lymfocyty exprimující CD69 se vyskytují ve specializovaných lymfoidních tkáních, například v germinálním centru lymfatických uzlin a tonsil a také v místě zánětu.¹² Přečasně je exprimován na povrchu thymocytů, které prošly pozitivní nebo negativní selekcí v thymu, výsledky této studie naznačují, že CD69 může ovlivňovat emigraci thymocytů.²⁶

Myeloidní prekurzory mají molekulu CD69 přítomnou v cytoplazmatické membráně, oproti tomu zralé neaktivované neutrofilů mají tento protein v cytoplazmě a po jejich aktivaci se dostává na povrch buněk.²¹ Přítomnost cytokinů GM-CSF, IFN- γ a IFN- α vyvolává u neutrofilů syntézu nových molekul CD69.²⁷ Tato molekula byla také objevena na povrchu aktivovaných eosinofilů, přítomných v plicích během zánětu²⁸ nebo při astmatu alergického původu.²⁹ Čerstvě izolované basofily produkují poměrně malé množství proteinu CD69, to se však mnohonásobně zvyšuje po jejich aktivaci interleukinem 3.³⁰

CD69 se vyskytuje na povrchu všech monocytů přítomných v periferní krvi a hraje zde zřejmě roli při tvorbě oxidu dusnatého.²³ Další studie prokázala povrchovou expresi proteinu CD69 u aktivovaných makrofágů, aktivace byla provedena působením IFN- γ a bakteriálního lipopolysacharidu.³¹

Testováním kožních preparátů vybranými monoklonálními protilátkami byla odhalena přítomnost molekuly CD69 na povrchu epidermálních Langerhansových buněk. V porovnání s lymfocyty se u těchto buněk vyskytují odlišné glykosylace tohoto proteinu.²⁴

1.6.5 Funkce a vazebné schopnosti molekuly CD69

Přestože dosud nebyl objeven přirozený ligand tohoto proteinu, jeho výskyt na povrchu většiny buněk hematopoetického původu, naznačuje významnou roli v mnoha biologických procesech těchto buněk v různých stádiích jejich vývoje.

Protein CD69 funguje zejména jako signalizační molekula. Vazba monoklonálních protilátek anti-CD69 na povrch lymfocytů vyvolává jejich proliferaci. Stimulace CD69 na povrchu aktivovaných T lymfocytů způsobuje zvýšení hladiny vápníku v cytoplazmě, což má za následek expresi genů kódujících TCR a některé cytokiny. U krevních destiček způsobuje stimulace CD69 aktivaci cytoplazmatické fosfolipázy A, degranulaci a agregaci krevních destiček a tvorbu metabolitů kyseliny arachidonové. Monocyty a neutrofilní granulocyty uvolňují po stimulaci CD69 látky zodpovědné za jejich cytotoxické působení, jako jsou oxid dusnatý a lysozym.

Podle dosud provedených studií je CD69 receptorem pro sacharidové a proteinové ligandy přítomné na povrchu buněk. Těmito látkami nejsou zřejmě bakteriální produkty, ale spíše molekuly na povrchu buněk v místě zánětu a jiného tkáňového poškození.¹²

Vazba sacharidových ligandů je zprostředkována extracelulární C-lektinovou doménou. Pomocí vazebných testů a molekulárního modelování byla prokázána vazba monosacharidových ligandů N-acetyl-glukosaminu a N-acetyl-galaktosaminu do vazebného místa vytvořeného konformační změnou po navázání vápníku na Asp 171, Glu 185 a Glu 187. Dále bylo zjištěno, že tyto ligandy jsou vázány oběma podjednotkami dimerního proteinu zcela nezávisle.³²

Vazebné testy, provedené u kovalentně vázaného dimerního proteinu, neprokázaly vazbu výše zmíněných monosacharidů, stejně jako glukosy, mannosy a fukosy. Stejný protein byl použit také pro testování vazby některých polysacharidů, například heparinu, dextranu, chondroitinsulfátu a fukoidanu. Jediný fukoidan vykazoval slabé vazebné schopnosti.³³

1.6.6 Význam molekuly CD69 v medicíně

Podle některých studií tento protein hraje určitou roli v patogenezi některých chorob. U pacientů s revmatoidní artritidou byla prokázána zvýšená exprese tohoto proteinu na povrchu neutrofilních granulocytů.³⁴ U myši neexprimujících protein CD69 na povrchu neutrofilů se značně snížila zánětlivá odpověď, což naznačuje možné využití této molekuly jako vhodného cíle terapeutického zásahu při revmatoidní artritidě.³⁵

Chronické astma způsobuje zvýšení exprese CD69 na povrchu T lymfocytů, jeho tvorba však klesá při použití vhodné imunoterapie.³⁶

V séru pacientů s chronickou hepatitidou typu C byla nalezena zvýšená hladina protilátek proti molekule CD69, která by mohla být vhodným ukazatelem úspěšné léčby této choroby pomocí IFN- α .³⁷

Autoimunitní onemocnění systémový lupus erythematosus je provázeno zvýšenou tvorbou CD69 na povrchu T lymfocytů v periferní krvi. To vysvětluje určité funkční abnormality T lymfocytů, pozorované u těchto pacientů.³⁸

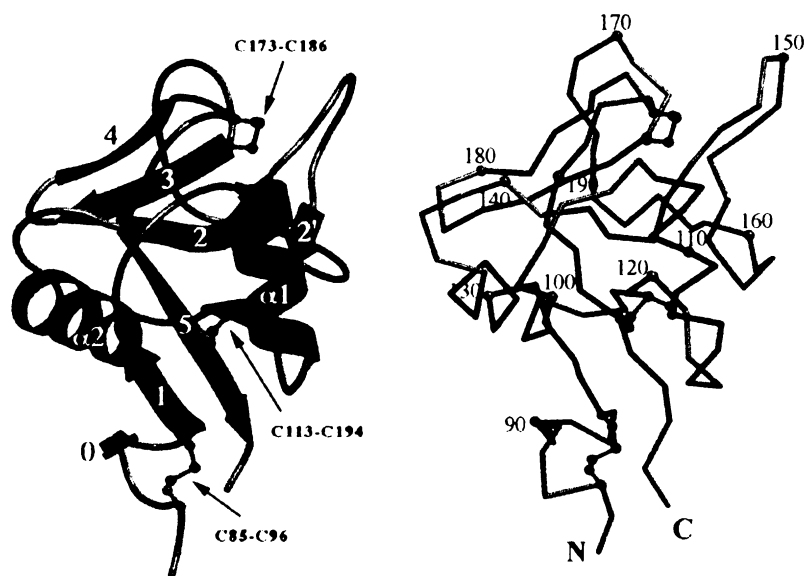
CD69 se zřejmě účastní počáteční fáze vzniku maligních nádorů hematopoetického původu. U buněk těchto nádorů byly objeveny stejné hladiny povrchového CD69 jako u nezralých myeloidních prekurzorů.³⁹

Tato molekula má také význam v transplantační medicíně. Její zvýšené hodnoty byly nalezeny na povrchu T lymfocytů v periferní krvi pacientů po akutním odhojení transplantované ledviny. Stanovení hladiny tohoto proteinu by tedy mohlo být použito jako neinvazivní diagnostická metoda akutního odhojení transplantátu.⁴⁰ Dále bylo objeveno, že zvýšená exprese CD69 u odhojení transplantované ledviny se týká pouze CD8+ T lymfocytů.⁴¹ Podobné výsledky přinesla i studie zabývající se analýzou buněčného infiltrátu z myokardu při odhojení transplantovaného srdce. Také zde byly nalezeny CD8+ T lymfocyty se zvýšenou expresí CD69.⁴²

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je vyprodukovat pomocí metod rekombinantní bakteriální exprese rozpustný fragment molekuly lidského proteinu CD69. Tento fragment začíná glutaminem 65 a končí lysinem 199, zahrnuje tedy celou extracelulární část včetně CTLD. Proto může být vzniklý protein použit pro vazebné testy zaměřené na vyhledávání přirozených ligandů pro CD69 antigen.

Dalším úkolem je vytvořit kovalentní dimer této molekuly, ve kterém jsou jeho podjednotky spojeny pomocí dimerizačních cysteinů 68. Vyprodukovat vzorek tohoto proteinu o dostatečné čistotě a koncentraci, který bude vhodný pro následné strukturální studie, zejména pomocí metod hmotnostní spektrometrie a vazebné testy.



obr. 2.1: Struktura extracelulární části proteinu CD69¹⁴

3. Seznam použitých přístrojů a materiálu

3.1 Seznam přístrojů

Automatické pipety (1-10, 2-20, 20-200, 200-1000 µl)	Gilson, USA
Centrifuga J2-21	Beckman, USA
Centrifuga Shelton Scientific USMC13	Mars Biomedical product, USA
HPLC systém Waters 486	Waters, USA
HPLC systém BioSys 510	Beckman, USA
Chladnička	Zanussi, Itálie
Kolona MONO Q HR 5/5	Pharmacia Biotech, USA
Kolona Superformance cartridge (1,6×13 cm)	Merck, Německo
Kolona Vydac 214TP54	Dionex, USA
Koncentrátor Centricon 30 kDa	Millipore, USA
Koncentrátor Centriprep 30 kDa	Millipore, USA
LAS reader	Fuji, Japonsko
Magnetická míchačka	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Membránové filtry Millex GP	Millipore, USA
Mikrocentrifuga 16M	National Labnet, USA
Mikrotitrační destičky (96 jamek)	NUNC, Dánsko
Mrazicí box (– 80 °C)	Forma Scientific, USA
pH metr φ 200	Beckman, USA
Protein trap	Michrom Bioresources Inc., USA
Předvážky HF1200G	AND, USA
Souprava pro horizontální elektroforézu	Sigma, USA
Souprava pro vertikální elektroforézu	Sigma, USA
Speedvac RC 1010	Jouan, Francie
Destičkový spektrofotometr Safire ²	Tecan, Švýcarsko
Termální cyklátor GeneE	Techne, UK
Termostat Reacti Therm	Pierce, USA
Třepačka na Erlenmayerovy baňky	Gallenkamp Ltd., UK
Třepačka na zkumavky BigGer Bill	Thermolyne, USA

Ultrazvuková sonda Ultrasonic	Cole-Parmer Instrument Co., USA
UV-lampa UVGL-58	UVP, USA
VN regulovatelný zdroj 3 kV, 200 mA	Dílny ČSAV, ČR

3.2 Seznam materiálu

3.2.1 Chemikálie

AcN, HPLC gradient grade	Merck, Německo
Agar	Oxoid, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Amp (použitá koncentrace 150 µg/ml)	Léčiva, ČR
APS	Sigma, USA
Azid sodný	Sigma, USA
Bacto-tryptone	Oxoid, USA
Bacto-yeast extract	Oxoid, USA
BCA	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
BSA	New England Biolabs, USA
Coomasie Brilliant Blue R-250	Sigma, USA
Cystamin	Sigma, USA
Cysteamin	Sigma, USA
Dihydrogenfosforečnan sodný	Sigma, USA
dNTPs	New England Biolabs, USA
DTT	Fluka, Německo
Dusičnan stříbrný	Sigma, USA
EDTA	Fluka, Německo
EtOH pro UV-spektroskopii	Lachner, ČR
Ethidiumbromid	Sigma, USA
Formaldehyd	Sigma, USA
Glycerol	Sigma, USA

Glycin	Penta, ČR
Hydroxid sodný	Lachner, ČR
Cam (použitá koncentrace 35 µg/ml)	Léčiva, ČR
Chlorid hořečnatý	Sigma, USA
Chlorid nikelnatý	Sigma, USA
Chlorid sodný	Lachema, ČR
Chlorid vápenatý	Sigma, USA
IAA	Sigma, USA
IPTG	Serva, USA
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina trifluoroctová	Fluca, Německo
Leupeptin	Sigma, USA
ME	Sigma, USA
Močovina	Serva, USA
N,N'-methylen-bis-akrylamid	Sigma, USA
Ni-NTA Sepharosa	Qiagen, Německo
PMSF	Serva, USA
Pyridin	Fluca, Německo
Sacharosa	Sigma, USA
SDS	Serva, USA
Síran měďnatý (pentahydrát)	Sigma, USA
SP-Sepharosa	Sigma, USA
Superdex 75 HR	Sigma, USA
TEMED	Serva, USA
Tet (použitá koncentrace 12,5 µg/ml)	Léčiva, ČR
Thiosíran sodný	Sigma, USA
Tris	Sigma, USA
Triton X-100	Sigma, USA
Uhličitan draselný	Sigma, USA
X-gal	Serva, USA

Všechny chemikálie byly nejvýše dostupné komerční čistoty (většinou p.a.), pokud není uvedeno jinak.

3.2.2 Enzymy

Restrikční endonukleasy

Ban I (20 U/ml)	New England Biolabs, USA
Hind III (20 U/ml)	Amersham, USA
Kpn I (10 U/ml)	Amersham, USA
Nco I (10 U/ml)	New England Biolabs, USA
Nde I (20 U/ml)	Amersham, USA
Pst I (20 U/ml)	New England Biolabs, USA
Sac I (20 U/ml)	New England Biolabs, USA
Sma I (20 U/ml)	New England Biolabs, USA
Xba I (20 U/ml)	New England Biolabs, USA
Xho I (20 U/ml)	New England Biolabs, USA

Další enzymy

Deep Vent DNA polymerasa M0258S (2,000 U/ml)	New England Biolabs, USA
DNasa (100 U/μl)	Sigma, USA
Enterokinasa	Boehringer, Německo
RNasa (10 mg/ml)	Sigma, USA
T4 DNA ligasa (5 U/μl)	Fermentas, USA
Trypsin	Promega, USA

3.2.3 Vektory

pBSSK+	Invitrogen, USA
pGEM-3Zf(+)	Promega, USA
pRSET B	Invitrogen, USA
dhCD69l	plazmid připravený Mgr. Ľ. Mihókem
Plazmid A	fragment CD69 v pBSSK+
Plazmid B	fragment CD69 v pRSET B

3.2.4 Primery

dhCD69tr Reverse primer 62B2
5'TAG TTA TTG CTC AGC GGT GGC AGC 3' Generi Biotech, ČR

dhCD69tr Forward primer 328L3
5'CTC GAG ACA ATA CAA TTG TCC AGG 3' Generi Biotech, ČR

3.2.5 Bakteriální kmeny

E.coli BL-21(DE3)
B^F dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal λ(DE3) Stratagene, USA

E.coli BL-21(DE3)Gold
B^F ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte Stratagene, USA

E.coli BL-21(DE3)RIL Gold
B^F ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte
[argU ileY leuW Camr] Stratagene, USA

E.coli XL-1 MRF⁺ Blue
recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1
lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] Stratagene, USA

3.2.6 Roztoky a média

LB médium 10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-tryptone,
5 g/l Bacto-yeast extract, pH (7,4)

5% gel pro SDS elektroforézu
(zaostřovací) destilovaná voda (1,4 ml),
30% akrylamidový mix (0,33 ml)
(29 g AA + 1 g bis-AA)
1 M Tris (pH=6,8) (0,25 ml),
10% SDS (0,02 ml), TEMED (0,004 ml),
10% APS (0,02 ml)

15% gel pro SDS elektroforézu
(rozlišovací) destilovaná voda (2,3 ml),
30% akrylamidový mix (5 ml)
(29 g AA + 1 g bis-AA)
1,5 M Tris (pH=8,8) (2,5 ml),
10% SDS (0,1 ml), TEMED (0,004 ml),
10% APS (0,1 ml)

<i>Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu</i>	250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH (8,3)
<i>Marker pro SDS elektroforézu I.</i>	BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), trypsinogen (24 kDa), lysozym (14,3 kDa)
<i>Marker pro SDS elektroforézu II.</i>	BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), trypsinogen (24 kDa), β -laktoglobulin (18,4 kDa), lysozym (14,3 kDa)
<i>Barvicí roztok pro SDS elektroforézu</i>	45% MeOH, 10% HAc, 0,25% CBB R-250
<i>Odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu</i>	35% EtOH, 10% HAc
<i>Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu (redukující)</i>	50 mM Tris-Cl (pH=6,8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 10% glycerol
<i>Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu (neredukující)</i>	50 mM Tris-Cl (pH=6,8), 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 10% glycerol
<i>Roztok pro izolaci inkluzních tělísek I.</i>	25% sacharosa, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 μ M leupeptin, 1 mM PMSF, 0,1% NaN ₃ , pH (7,4)
<i>Roztok pro izolaci inkluzních tělísek II.</i>	0,1% Triton X-100, 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM ME, 0,1% NaN ₃ , 10 μ M leupeptin, 1 mM PMSF, pH (7,4)
<i>Roztok pro izolaci inkluzních tělísek III.</i>	50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM ME, 0,1% NaN ₃ , 10 μ M leupeptin, 1 mM PMSF, pH (7,4)

<i>Pufr A (pro Ni-NTA - afinitní chromatografii)</i>	8 M močovina, 0,5 M NaCl, 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM 2-ME, pH (8,0)
<i>Pufr B (pro Ni-NTA - afinitní chromatografii)</i>	8 M močovina, 0,5 M NaCl, 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM 2-ME, pH (3,6)
<i>Činidlo pro stanovení koncentrace proteinů (Protein assay kit II - BIO-RAD, USA)</i>	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové
<i>Pufr C (skládání dimerního proteinu) - renaturační pufr</i>	50 mM Tris, 2 M močovina, 2 mM CaCl ₂ , 1,34 mM cysteamin, 0,67 mM cystamin, pH (8,2)
<i>Pufr D (skládání dimerního proteinu)</i>	50 mM Tris, 2 M močovina, 2 mM CaCl ₂ , pH (8,2)
<i>Pufr E (skládání dimerního proteinu)</i>	50 mM Tris, pH (8,0)
<i>Pufr F (skládání dimerního proteinu)</i>	50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH (8,0)
<i>Pufr pro enterokinasové štěpení</i>	20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , pH (8,0)
<i>Pufr A (MONO Q)</i>	20 mM Tris, 20 mM NaCl, 1 mM NaN ₃ , pH (8,3)
<i>Pufr B (MONO Q)</i>	20 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM NaN ₃ , pH (8,3)
<i>Pufr A (SP-Sepharosa)</i>	25 mM pyridin, 15 mM NaCl, 1 mM NaN ₃ , pH (6,0)
<i>Pufr B (SP-Sepharosa)</i>	25 mM pyridin, 1 M NaCl, 1 mM NaN ₃ , pH (6,0)

<i>Pufř pro gelovou chromatografii</i>	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM NaN ₃ , pH (8,0)
<i>Pufř A (RP-HPLC)</i>	5% AcN, 0,1% TFA
<i>Pufř B (RP-HPLC)</i>	95% AcN, 0,07% TFA
<i>TAE-pufř</i>	40 mM Tris, 20 mM HAc, 1 mM EDTA, pH (8,0)
<i>Vzorkový pufř pro agarosovou elektroforézu (stop roztok)</i>	50 mM EDTA, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř, pH (8,0)
<i>TermoPol-buffer (New England Biolabs, USA)</i>	20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 0,1% Triton X-100, pH (8,8)
<i>Pufř pro T4 DNA ligasu (New England Biolabs, USA)</i>	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ATP, 10 mM DTT, 25 µg/µl BSA, pH (7,5)
<i>NEB 1 (New England Biolabs, USA)</i>	10 mM bis-Tris-propan-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH (7,0)
<i>NEB 2 (New England Biolabs, USA)</i>	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH (7,9)
<i>NEB 3 (New England Biolabs, USA)</i>	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH (7,9)
<i>NEB 4 (New England Biolabs, USA)</i>	50 mM octan draselný, 20 mM Tris- acetát, 10 mM octan hořčnatý, 1 mM DTT, pH (7,9)
<i>L1 (Jet Quick Spin Column Technique) Genomed, Německo</i>	NaClO ₄ , octan sodný, TBE-solubilizátor

<i>L2 (Jet Quick Spin Column Technique)</i> <i>Genomed, Německo</i>	EtOH, NaCl, Tris-HCl, EDTA
<i>G1 (Jet Quick Spin Column Technique)</i> <i>Genomed, Německo</i>	50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNasa A, pH (8,0)
<i>G2 (Jet Quick Spin Column Technique)</i> <i>Genomed, Německo</i>	200 mM NaOH, 1% SDS
<i>G3 (Jet Quick Spin Column Technique)</i> <i>Genomed, Německo</i>	kyselina octová, guanidin hydrochlorid
<i>Gx (Jet Quick Spin Column Technique)</i> <i>Genomed, Německo</i>	guanidin hydrochlorid
<i>G4 (Jet Quick Spin Column Technique)</i> <i>Genomed, Německo</i>	EtOH, NaCl, EDTA, Tris-HCl
<i>EP-pufr</i>	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 15% sacharosa, 2 mg/ml lysozym, 0,2 mg/ml RNasa, 0,1 mg/ml BSA, pH (8,0)
<i>Ethylmorfolinový pufr</i>	10 mM triethylmorfolin, 50 mM NaCl, pH (8,0)

4. Metody

4.1 Metody pro práci s DNA

4.1.1 PCR

PCR slouží k namnožení (amplifikaci) vybraných DNA sekvencí. Tato reakce využívá teplotně stabilní DNA polymerasu a je řízena krátkými oligonukleotidy (primery), které se párují s templátovou DNA na počátku a na konci amplifikovaného fragmentu. PCR probíhá obvykle v 30 až 35 cyklech, jejichž výsledkem je několik miliard kopií požadované sekvence. Každý cyklus se skládá ze tří fází, které se liší použitou teplotou. První fáze probíhá při teplotě 95 °C a dochází při ní k denaturaci DNA, tedy k oddělení dvouvláknové DNA na dvě molekuly jednovláknové DNA. V další fázi se při nižší teplotě (45 °C, teplota je odvozena z teploty tání použitých primerů a je asi o pět stupňů nižší) vytvoří vazby mezi primery a templátovou DNA. Poslední fáze cyklu (72 °C, teplota závisí na délce amplifikovaného fragmentu) slouží k syntéze úseku DNA mezi primery.⁴³

Reakční směs, použitá v této práci, obsahovala následující složky:

- 20 µl H₂O
- 1,5 µl MgSO₄
- 5 µl 5×TermoPol Buffer B9004S
- 2 µl 10 mM dNTPs
- 10 µl 5 µM Reverse primer
- 10 µl 5 µM Forward primer
- 1 µl 0,1 µg/µl templátové DNA
- 0,4 µl 2 U/ml Deep Vent DNA polymerasy M0258S

Reakční směs byla vložena do vyhřátého termálního cyklátoru s nastaveným teplotním programem. Průběh vlastní PCR je uveden v tab. 4.1

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min)	Poznámka
1	95	2	předdenaturace
5	95	0,5	denaturace
	37	0,5	vazba primerů (anelace)
	72	1	polymerace DNA
30	95	0,5	denaturace
	45	0,5	vazba primerů (anelace)
	72	1	polymerace DNA
1	72	6	polymerace DNA

tab. 4.1: Průběh PCR

PCR produkt byl analyzován pomocí elektroforézy na agarosovém gelu a vzniklý fragment byl po preparativní agarosové elektroforéze extrahován z gelu pro další použití.

4.1.2 Elektroforéza DNA na agarosovém gelu

Elektroforéza DNA na agarosovém gelu slouží k rozdělení DNA fragmentů ve vzorku podle jejich velikosti. DNA se díky svému negativnímu náboji pohybuje v elektrickém poli ke kladné elektrodě, přičemž dlouhé fragmenty postupují v gelu pomaleji než fragmenty kratší.⁴³

Byl připraven 1,5% agarosový gel, rozpuštěním 0,6 g agarosy ve 40 ml TAE pufru. Po jeho vychladnutí byly přidány 2 μ l roztoku ethidiumbromidu o koncentraci 1 mg/ml. Směs se nechá ztuhnout ve speciální vaničce se zasunutým hřebenem, který vytvoří jamky pro aplikaci vzorků. Vzorky se nanášejí na gel ve směsi se Stop roztokem. Vlastní elektroforéza probíhá v elektroforetické vaně naplněné TAE pufrem při napětí 80 V přibližně 90 minut. Rozdělené fragmenty jsou patrné po ozáření UV světlem, protože v agarosovém gelu dochází k interkalaci ethidiumbromidu mezi vlákna DNA.

4.1.3 Extrakce DNA z agarosového gelu

Tento postup byl proveden pomocí kitu firmy Genomed Jet Quick Spin Column Technique (Gel extraction).

Požadovaný fragment DNA se vyřízne z agarosového gelu skalpelem pod kontrolou dlouhovlnným UV zářením (krátkovlnné by mohlo způsobit nežádoucí mutace DNA). Gel se rozpustí v L1 roztoku, jehož množství závisí na hmotnosti gelu (na 100 mg gelu se použije 300 μ l roztoku). Rozpuštění probíhá ve vodní lázni při teplotě 50 °C 15 minut, směs je nutné každé tři minuty důkladně promíchat. DNA se z této směsi získá pomocí mikrokolonky. Mikrokolonka se naplní směsí a provede se centrifugace (1 min, 12000 g). Pomocí 500 μ l roztoku L1 se odstraní z nosiče zbylé nečistoty (centrifugace 1 min, 12000 g) a nakonec se 50 μ l vody uvolní vzorek DNA (centrifugace 2 min, 12000 g).

4.1.4 Štěpení DNA restričními endonukleasami

Restriční endonukleasy jsou enzymy štěpící DNA ve specifických místech. Každá rozeznává jinou nukleotidovou sekvenci (obvykle 4 až 8 bp). Cílové sekvence jsou často palindromické tzn. symetrické podle centrálního bodu. Štěpením mohou vznikat zarovnané, nebo přesahující konce.⁴³

Jednotlivé restriční endonukleasy vyžadují pro štěpení specifické podmínky, které jsou dány použitým pufrům, teplotou, dobou štěpení a přítomností BSA. Informace o optimálních podmínkách pro štěpení u jednotlivých restričních endonukleas (RE), použitých v této práci, poskytuje tab. 4.2⁴⁴

RE	Štěpená sekvence	Množství RE (μl)	Pufr	Teplota (°C)	Čas (h)	BSA (100 μg/ml)
Ban I	G/GYRCC	0,3-0,5	NEB 4	37	1-3	Ne
Hind III	A/AGCTT	0,3-0,5	NEB 2	37	1-3	Ne
Kpn I	GGTAC/C	0,3-0,5	NEB 1	37	1-3	Ano
Nco I	C/CATGG	0,3-0,5	NEB 2	37	1-3	Ne
Nde I	CA/TATG	0,3-0,5	NEB 2	37	1-3	Ne
Pst I	CTGCA/G	0,3-0,5	NEB 2	37	1-3	Ano
Sac I	GAGCT/C	0,3-0,5	NEB 1	37	1-3	Ano
Sma I	CCC/GGG	0,3-0,5	NEB 4	20	1-3	Ne
Xba I	T/CTAGA	0,3-0,5	NEB 2	37	1-3	Ano
Xho I	R/GATCY	0,3-0,5	NEB 2	37	1-3	Ano

tab. 4.2: Podmínky pro štěpení DNA restričními endonukleasami (R - A nebo G, Y - C nebo T)⁴⁴

Štěpení je ukončeno přidáním Stop roztoku, nebo tepelnou inaktivací restriční endonukleasy.

4.1.5 Ligace DNA do vektoru

Ligace je proces, při kterém se DNA vkládá do kruhové molekuly DNA (vektoru). Tento vektor je rozštěpen v určitém místě pomocí restričního enzymu a mezi komplementárními konci vkládané DNA a vektoru se vytvoří pomocí DNA ligasy fosfodiesterové vazby.

V této práci byla provedena ligace DNA (PCR produktu), extrahované z agarosového gelu, do vektoru pBSSK+. Reakční směs obsahovala následující složky:

- 8 μl roztoku extrahované DNA
- 1 μl 1 μg/μl pBSSK+ vektoru
- 1 μl NEB 4
- 0,25 μl 20 mM ATP
- 0,3 μl Sma I
- 0,5 μl 5 U/μl T4 DNA ligasy

Ligace probíhala 4 hodiny při laboratorní teplotě. Vzniklý plazmid byl pracovně pojmenován *plazmid A*.

Ligace DNA do vektoru pRSET B byla provedena tímto způsobem:

- 50 μ l izolované DNA
- 5 μ l vektoru pRSET B otevřeného pomocí enzymů Hind III a Xho I
- 6 μ l pufru pro DNA ligasu
- 1 μ l 5 U/ μ l T4 DNA ligasy

Tato ligace probíhala 12 hodin při laboratorní teplotě. Vzniklý plazmid byl pracovně pojmenován *plazmid B*.

4.1.6 Transformace bakterií plazmidem

Během transformace plazmid proniká do bakteriálních buněk, které mají schopnost tento plazmid naklonovat nebo podle vloženého DNA fragmentu produkovat příslušný protein.

200 μ l bakteriální suspenze bylo smícháno s plazmidem (1 až 10 μ g), tato směs byla inkubována 20 minut na ledu. Dále byly bakterie vystaveny po dobu 45 sekund teplotě 42 °C, při tomto tepelném šoku dojde k vytvoření pórů v bakteriální membráně, kterými se plazmid dostává do cytoplazmy. Pro pomnožení transformovaných bakterií byl přidán 1 ml LB média a byla provedena inkubace 1 hodinu při 37 °C. Jako negativní kontrola slouží 200 μ l bakteriální suspenze bez přidaného plazmidu. Po pomnožení bakterií byla inkubovaná kultura centrifugována (1 min, 6000 g) a resuspendovaný sediment byl naočkován na LB agar s antibiotiky. Po 15 až 24 hodinách při 37 °C se na agaru objeví kolonie transformovaných bakterií.

Pro pomnožení *plazmidu A* byl použit klonovací kmen E.coli XL-1 MRF⁺ Blue, který má výraznější replikační schopnosti. Pro rozlišení kolonií bakterií transformovaných vektorem s vloženou DNA a bez DNA zde byl použit tzv. Blue-White screening. Při této metodě je na LB agar nanesena směs 20 μ l X-gal (50 mg/ml) a 100 μ l IPTG (100 mM). Po zaschnutí tohoto roztoku je možné na agar očkovat. Kolonie obsahující bakterie s vektorem s vloženou DNA jsou bílé, kolonie bakterií s vektorem bez vložené DNA jsou modré. Ligací DNA do vektoru dojde totiž k inaktivaci genu pro β -galaktosidasu, která způsobuje přeměnu X-gal na modře zbarvený produkt.

V případě transformace *plazmidu B* byly použity různé bakteriální kmeny E.coli, lišící se mimo jiné svou rezistencí vůči antibiotikům (BL-21(DE3) - nerezistentní, BL-21(DE3)Gold - rezistentní vůči tetracyklinu, BL-21(DE3)RIL Gold - rezistentní vůči tetracyklinu a chloramfenikolu). Z těchto kmenů byl vybírán nejvhodnější producent proteinu CD69.

4.1.7 Minipreparativní izolace plazmidu

Kolonie transformovaných bakterií byly přeočkovány do 1 ml LB média s antibiotiky. Po 12 hodinové kultivaci při 37 °C bylo 0,7 ml této kultury centrifugováno (2 min, 6000 g). K resuspendovanému sedimentu bylo přidáno 30 µl EP-pufu, po 15 minutové inkubaci na ledu byla tato směs povařena ve vodní lázni 1,5 minuty a následně centrifugována (10 min, 12000 g). Vzniklý supernatant obsahuje plazmid, který může být použit pro další experimenty.

V této práci byl izolovaný *plazmid A* podroben restričnímu štěpení enzymy Sac I a Kpn I a izolovaný *plazmid B* byl štěpen enzymy Hind III a Xho I. Tato restriční štěpení se provádí pro kontrolu správné ligace DNA do vektoru a slouží k výběru vhodné bakteriální kultury pro minipreparativní izolaci plazmidu.

Minipreparativní izolace plazmidu byla provedena pomocí kitu firmy Genomed Jet Quick Spin Column Technique (Plazmid miniprep). Vybrané bakteriální kultury byly pomnoženy v 5 ml LB média s antibiotiky (12 hod, 37 °C) a následně centrifugovány (1 min, 6000 g). Vzniklý sediment byl resuspendován v 250 µl roztoku G1. Poté byla směs opatrně promíchána s 250 µl roztoku G2, přítomný detergent rozruší buněčné stěny a během 5 minutové inkubace se plazmid uvolní do roztoku. Pro neutralizaci směsi bylo přidáno 350 µl roztoku G3 a vzniklá sraženina byla oddělena centrifugací (10 min, 12000 g). Plazmid se získá pomocí mikrokolonky, na jejímž nosiči je během centrifugace směsi zachycen (1 min, 12000 g). Nosič byl následně promyt 500 µl roztoku Gx (centrifugace 1 min, 12000 g) a 500 µl roztoku G4 (centrifugace 1 min, 12000 g). Plazmid se uvolní z nosiče promytím 75 µl vody (centrifugace 2 min, 12000 g).

4.1.8 DNA sekvenování

Stanovení DNA sekvence využívá syntézy částečných kopií sekvenovaného fragmentu pomocí DNA polymerasy. Nově vznikající řetězec je ukončen po dosažení jednoho konkrétního dideoxynukleotidu. Ve čtyřech nezávislých reakcích tak vznikají fragmenty DNA, které se liší svojí délkou o jediný nukleotid. Při této metodě byl použit fluorescenčně značený primer a výsledky byly elektronicky zpracovány.

DNA sekvenování provedl Dr. Jürgen Felsberg (Sektor buněčné a molekulární mikrobiologie, MBÚ AV ČR, v.v.i.)

4.2 Metody pro práci s proteiny

4.2.1 Produkce proteinu CD69

Kolonie transformovaných bakterií byly přeočkovány do 1 ml LB média s antibiotiky. Po 12 hodinové kultivaci při 37 °C za stálého třepání bylo 200 µl z každé kultury rozděleno do dvou zkumavek s 1 ml LB média s antibiotiky (pozitivní a negativní kontrola). Následovala 4 hodinová kultivace za stejných podmínek. Poté bylo do pozitivních kontrol přidáno 100 µl 1 mM IPTG a kultivace probíhala další 3 hodiny. Kultury byly nakonec odstředěny (2 min, 6000 g) a vzniklý sediment resuspendován v 30 µl redukujícího vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Tyto vzorky byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu pro výběr vhodného producenta proteinu.

Bakteriální kmen produkující největší množství proteinu byl použit pro velkoobjemovou produkci v 4×500 ml LB média s antibiotiky. Kultivace této kultury probíhala 20 hodin při 37 °C za stálého třepání, po nárůstu bakterií byla odstředěna (10 min, 12000 g).

4.2.2 Izolace inkluzních tělísek

Bakterie produkují rekombinantní protein CD69 do útvarů oddělených od jejich cytoplazmy, které se označují inkluzní tělíška. Tato tělíška byla z bakterií uvolněna a izolována pomocí následujícího postupu.

Bakteriální buňky získané po velkoobjemové produkci se resuspendují pomocí ultrazvukové sondy ve 4×20 ml roztoku pro izolaci inkluzních tělísek I. (tento roztok obsahuje leupeptin, inhibitor proteáz, který zabraňuje degradaci proteinu). Vzniklá směs byla opakovaně (3×) zmrazena při – 80 °C, rozmrazena a sonikována.

K této směsi bylo dále přidáno 400 µl 1 M MgCl₂, 2 µl DNasy a 5 µl RNasy (přidané enzymy degradují přítomné molekuly DNA a RNA, které by mohly znehodnocovat výsledky dalších postupů). Buněčné struktury se dále narušují sonikací, v tomto kroku je však důležité, aby během sonikace nedošlo k přehřátí směsi a tím k deaktivaci enzymů. Následovala centrifugace při 8000 g 10 minut.

Sediment byl resuspendován v 4×20 ml roztoku pro izolaci inkluzních tělísek II pomocí ultrazvukové sondy a směs byla opět centrifugována při 8000 g 10 minut. Nakonec byl odstraněn přítomný detergent promytím sedimentu v roztoku pro izolaci inkluzních tělísek III (nejprve v 4×20 ml, poté v 4×10 ml).

4.2.3 SDS elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu

SDS elektroforéza je separační metoda vhodná pro dělení molekul proteinů o různé relativní molekulové hmotnosti. SDS je anionogenní tenzid, který rozruší terciární strukturu proteinů a rozvine jejich molekuly do lineárních řetězců. Náboj proteinů je zcela překryt zápornými dodecylsulfátovými anionty, proto se při jejich dělení uplatňuje pouze velikost molekul. Nejmenší molekuly se v gelu pohybují nejrychleji.

Pro analýzu proteinových vzorků byl používán 5% zaostřovací gel a 15% rozlišovací gel. Vzorky, smíchané v poměru 1:1 se vzorkovým pufrům pro SDS elektroforézu, se před nanesením na gel 5 minut povaří ve vodní lázni a zcentrifugují (2 min, 12000 g).

Vlastní elektroforéza probíhá v elektroforetické vaně naplněné elektrodoým pufrům pro SDS elektroforézu. Počáteční podmínky pro zaputování vzorků do rozlišovacího gelu jsou 10 V na 1 cm délky gelu (tzn. 80 V) a 15 mA na jeden gel (tzn. 30 mA). Asi po 15 minutách se napětí zvýší na 150 V a proud na 50 mA.

4.2.4 Barvení polyakrylamidových gelů

Barvení Coomassie Brilliant Blue R-250

Polyakrylamidové gely se barví tímto barvicím roztokem přibližně 15 minut, poté následuje odbarvování v odbarvovacím roztoku. Gely se uchovávají v 1% roztoku HAc.

Barvení stříbrem

Tato metoda je vysoce citlivá a slouží pro znázornění proteinů obsažených ve vzorku ve stopovém množství. Postup tohoto barvení je uveden v tab. 4.3

Čas (min)	Roztok
10	20% EtOH
10	H ₂ O
1	0,02% Na ₂ S ₂ O ₃
< 1	H ₂ O
< 1	H ₂ O
30	0,2% AgNO ₃
< 1	H ₂ O
do zobrazení proteinů	37% formaldehyd, 3% K ₂ CO ₃ , 0,01% Na ₂ S ₂ O ₃
1	2,5% Tris, 5% HAc
< 1 (opakovaně)	H ₂ O
uchovávání	1% HAc

tab. 4.3: Postup při barvení polyakrylamidového gelu stříbrem

4.2.5 Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Principem této metody je barevná změna Coomassie Brilliant Blue po vazbě na zásadité a aromatické aminokyseliny. Intenzita zbarvení je přímo úměrně závislá na koncentraci proteinů ve vzorku. Touto metodou je možné stanovit vzorky s koncentrací od 200 $\mu\text{l/ml}$ do 1,4 mg/ml.⁴⁵ Vlastní stanovení se provádí v 96 jamkových mikrotitračních destičkách, kde se 5 μl vzorku smíchá s 200 μl činidla. Pro kalibraci byly použity standardní roztoky BSA o koncentracích 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml. Výsledná koncentrace byla, po změření absorbance barevného produktu při 595 nm, určena pomocí kalibrační křivky.

Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA

Tato metoda je citlivější než předchozí stanovení. Jejím principem je tvorba komplexů proteinu s Cu^{2+} v alkalickém prostředí a následná redukce Cu^{2+} na Cu^{1+} , doprovázená barevnou změnou. Redukce je způsobena aminokyselinovými zbytky cysteinu, tryptofanu, tyrozinu a také peptidovou vazbou. Množství zredukovaného Cu^{2+} je přímo úměrně závislé na koncentraci proteinu ve vzorku. BCA vytváří v alkalickém prostředí s Cu^{1+} fialový komplex, jehož absorbanci je možné měřit při 562 nm.⁴⁶

Činidlo se před provedením metody připravuje vždy čerstvé, smísením 5 ml BCA a 100 μl 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. K vlastní reakci se používají 96 jamkové mikrotitrační destičky. Reakční směs obsahuje 8 μl vzorku a 160 μl činidla, pro vznik barevného produktu je nutná 30 minutová inkubace při 37 °C. Kalibrace byla provedena pomocí stejných standardních roztoků jako v předchozím případě a výsledná koncentrace se opět určí pomocí kalibrační křivky.

4.2.6 Zakoncentrování proteinových vzorků

Kromě afinitní chromatografie, při které je na kolonu nanesen velký objem vzorku a protein je následně eluován jen v několika malých frakcích, byly v této práci pro zakoncentrování proteinových vzorků používány speciální centrifugační zkumavky Centriprep. Vnitřní část této zkumavky je opatřena membránou z celulosy, která má póry odpovídající velikosti proteinů o molekulové hmotnosti 10 kDa. Během centrifugace (5-30 min, 2700 g) přes membránu procházejí všechny látky o nižší molekulové hmotnosti a proteinový vzorek se tak koncentruje ve spodní části. Tímto způsobem lze získat z původního 15 mililitrového vzorku vzorek o objemu 700 μl .⁴⁷

4.2.7 Afinitní chromatografie na Ni-NTA Sepharose

Tato separační metoda je založena na interakci proteinů produkovaných s histidinovou kotvou (řetězcem šesti histidinů) s komplexy Ni^{2+} a NTA, které jsou součástí stacionární fáze. Pro uvolnění proteinů zachycených na koloně se používá kyselé pH nebo EDTA. V této práci byla afinitní chromatografie použita ve dvou případech.

Izolace CD69 z inkluzních tělísek

Izolovaná inkluzní tělíska byla resuspendována pomocí ultrazvukové sondy ve 20 ml pufru A, nerozpuštěné složky byly odstraněny centrifugací (10 min, 20000 g) a filtrací. Takto připravený vzorek se nanese na kolonu s navázanými Ni^{2+} . Molekuly proteinu vázané na nosič byly uvolněny pufrům B, který má pH 3,6.

Dimerizace proteinu CD69

Vzorek přečištěného proteinu o objemu 10 ml, koncentraci 1 mg/ml a pH 6,2 byl renaturován metodou rychlého naředění. Při této renaturaci se vzorek přikapává konstantní rychlostí 1 ml/min za stálého míchání do 250 ml renaturačního pufru (pufru C). Vzniklý roztok je po filtraci nanesen na Ni-NTA nosič, kde dojde vlivem sterických interakcí ke vzniku kovalentního dimeru spojeného disulfidovým můstkem pomocí Cys 68. Tento protein je následně z kolony uvolněn pufrům F, obsahujícím 50 mM EDTA.³³

4.2.8 Štěpení histidinové kotvy

Histidinová kotva, připojená k N-konci produkovaného proteinu, by mohla být překážkou pro jeho další využití, proto byla enzymaticky odštěpena. K odstranění histidinové kotvy byly v této práci použity dva enzymy. *Enterokinasa*, která štěpí peptidový řetězec za lysinem ve specifické sekvenci Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. Dalším použitým enzymem byl *trypsin* štěpící peptidový řetězec za bazickými aminokyselinami lysinem a argininem, pokud k jejich C-konci není připojen prolin. Štěpení trypsinem může být také inhibováno přítomností velkého množství kyselých aminokyselin. Optimální pH pro jeho působení je 7 až 9.

4.2.9 Ionexová chromatografie

Ionexová chromatografie využívá pro oddělení složek směsi jejich rozdílnou afinitu k nabitým skupinám stacionární fáze. Opačně nabitě molekuly jsou zachyceny kolonou a následně uvolněny změnou elučních podmínek.

Tento krok byl použit k separaci odštěpené histidinové kotvy od vzorku. Nosič MONO Q má schopnost vázat záporně nabitě skupiny. Při pH pufru 8,3 má histidinová kotva ($pI = 6$) na rozdíl od proteinu ($pI = 8$) záporný náboj a váže se tedy pevně na kolonu. Další použitou stacionární fází byla SP-sepharosa, která má schopnost vázat kladně nabitě skupiny. Při pH pufru 6 dochází k vazbě proteinu na nosič, zatímco histidinová kotva je oddělena.

4.2.10 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie je separační metoda, která slouží k oddělování složek směsi o rozdílné molekulové hmotnosti. Velké molekuly putují stacionární fází rychleji než molekuly malé, které pronikají hluboko do pórů gelu a tím je jejich pohyb zpomalen.

V této práci byl jako stacionární fáze použit Superdex 75 HR a gelová chromatografie zde slouží pro oddělení zbytkového neposkládaného monomerního proteinu.

4.2.11 Chromatografie s obrácenou fází

Chromatografie s obrácenou fází, neboli reverzní chromatografie, je separační metoda využívající hydrofóbní interakce proteinu se stacionární fází. Stacionární fáze je modifikována alifatickými alkylovými řetězci, v tomto případě butylovými zbytky, které jsou vhodné pro separaci vysokomolekulárních látek. Proteiny zachycené nosičem jsou uvolněny gradientem organické mobilní fáze.

V této práci byla reverzní chromatografie použita pro oddělení zbytkového neposkládaného monomerního proteinu.

4.2.12 Modifikace volné SH skupiny monomerního proteinu

Monomerní protein CD69 má na rozdíl od dimerního proteinu jednu volnou SH skupinu na Cys 68. Tato SH skupina by měla být přístupná pro modifikaci různými činidly (jodactová kyselina, jodacetamid, N-ethylmaleinimid). Modifikace monomerního proteinu by mohla výrazným způsobem ovlivnit jeho izoelektrický bod a tak umožnit jeho snadnou separaci pomocí ionexové chromatografie.

Vlastní modifikace byla provedena v prostředí ethylmorfolinového pufru se 100 mM koncentrací činidla a 10 μg proteinu při teplotě 50 °C. Po 1 hodině byl vzorek analyzován hmotnostní spektrometrií.

4.2.13 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivá analytická metoda, která po převedení molekul na ionty poskytuje mnoho strukturních informací o měřeném vzorku. Ionty, vznikající v iontovém zdroji, jsou rozděleny v hmotnostním analyzátoru a následně detekovány. Výsledné hmotnostní spektrum je grafem závislosti relativních intenzit jednotlivých iontů na jejich specifickém náboji (m/z).

V této práci byly použity následující techniky hmotnostní spektrometrie.

ESI-FT ICR-MS

Pro ionizaci molekul byl v této metodě použit elektrosprej. Vzorek je aplikován kovovou kapilárou, s vysokým vloženým napětím, do iontového zdroje. Vznikají malé kapičky nesoucí elektrostatický náboj, které se nakonec rozpadnou za vzniku mnohonásobně nabitých iontů.

Ionty se v silném magnetickém poli pohybují po cykloidální trajektorii s určitou cyklotronovou frekvencí. Pomocí Fourierovy transformace se z těchto frekvencí získají m/z jednotlivých iontů. Přesnost této techniky je řádově 0,1 až 1 ppm.

Měření na tomto přístroji provedl RNDr. Petr Novák, Ph.D.

MALDI-TOF-MS

Tato technika využívá pro ionizaci neutrálních molekul ve vzorku, rozpuštěném ve vhodné matrici, krátký laserový puls. Ionizace typu MALDI se používá ve spojení s TOF analyzátozem, jehož principem je měření doby průletu jednotlivých iontů, která slouží k určení jejich m/z . Obecně platí, že malé ionty se pohybují rychleji a dostanou se dříve do detektoru. Přesnost této techniky je řádově 10 až 100 ppm.

V této práci byla metoda MALDI-TOF použita pro měření proteinových vzorků štěpených trypsinem. Tento postup umožňuje přesnější identifikaci a určení struktury sledovaného proteinu.

Měření touto technikou provedl Mgr. Petr Pompach, Ph.D.

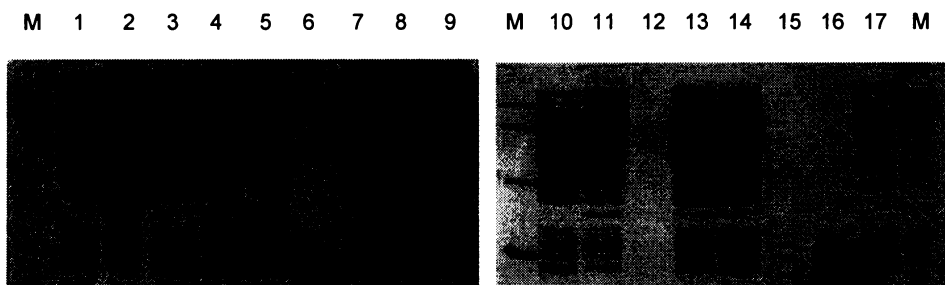
K přípravě vzorků pro měření hmotnostní spektrometrií byla použita speciální mikrocartridge, označovaná také jako protein trap. Po nanesení vzorku je mikrocartridge několikrát propláchnuta 0,1% TFA a protein je následně uvolněn 80% AcN.

5. Výsledky

5.1 Bakteriální exprese proteinu hCD69

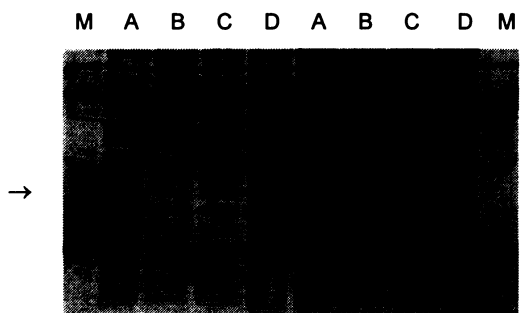
Prvním krokem při produkci proteinu byl výběr vhodného bakteriálního kmene E.coli. Tyto kmeny byly transformovány plazmidem dhCD69l, nesoucím gen pro fragment CD69 s histidinovou kotvou, tento plazmid byl již dříve připraven v naší laboratoři. Po naočkování transformovaných bakterií na LB agar s antibiotiky, vyrostly kolonie na všech miskách s pozitivní kontrolou. To znamená, že kolonie obsahují bakteriální buňky s plazmidem dhCD69l, protože plazmid nese rezistenci na ampicilin.

Produkce byla nejprve provedena v 1 ml LB média s antibiotiky. K pozitivním kontrolám byl přidán 1 mM IPTG, který slouží jako induktor exprese vloženého genu. Produkce hCD69 u jednotlivých bakteriálních kmenů s indukcí a bez indukce byla zhodnocena pomocí SDS elektroforézy (obr. 5.1).



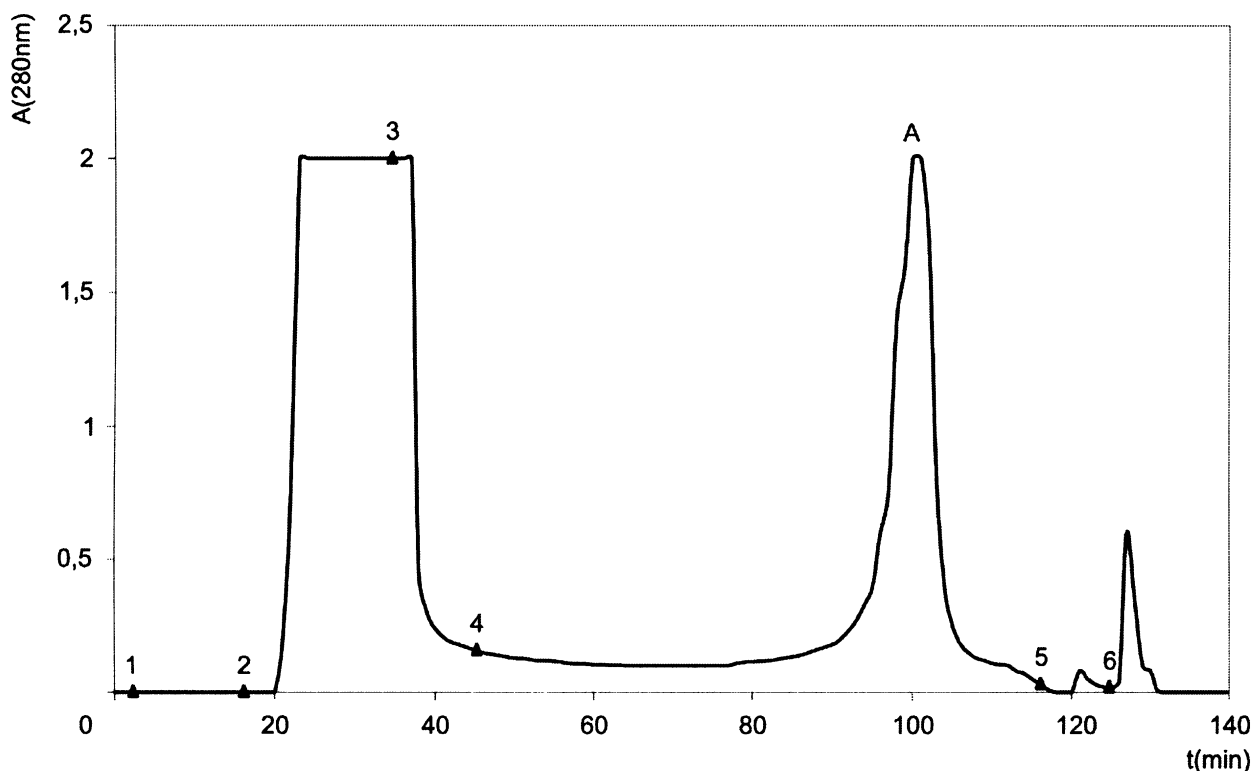
obr. 5.1: SDS elektroforéza (produkce hCD69 v různých bakteriálních kmenech; analýza pěti kolonií z každého kmene; + indukce IPTG, - bez indukce IPTG):
M - marker (66, 45, 24 a 14,3kDa);
1, 2, 7 - BL-21(DE3)+; 3, 6, 9 - BL-21(DE3)Ril Gold+; 4, 5, 8 - BL-21(DE3)Gold+;
10, 13 - BL-21(DE3)+; 11, 14 - BL-21(DE3)Gold+; 12, 15 - BL-21(DE3)Ril Gold+;
16 - R -, 17 - B -

Na záznamu z SDS elektroforézy je patrné, že protein hCD69 produkuje významně pouze bakteriální kmen E.coli BL-21(DE3)Gold a v menším množství také kmen BL-21(DE3). K vyvolání jeho exprese je nutná indukce pomocí 1 mM IPTG. Bakteriální kultury kmene BL-21(DE3)Gold, produkující protein v největším množství, byly vybrány pro velkoobjemovou produkci ve 2 litrech LB média s antibiotiky. Z vypěstovaných bakterií byla izolována inkluzní tělíska. Pro kontrolu odebraných vzorků byla použita SDS elektroforéza (obr. 5.2).



obr. 5.2: SDS elektroforéza (izolace inkluzních tělísek; pravá a levá část - analýza dvou různých kyvet použitých v preparaci);
M - marker (66, 45, 24 a 14,3kDa),
A - suspenze s pufrém pro izolaci inkl. tělísek I,
B - supernatant po přidání DNasy a RNasy,
C - supernatant po přidání pufru pro izolaci inkl. tělísek II,
D - suspenze s pufrém pro izolaci inkl. tělísek III

Izolovaná inkluzní tělíska obsahují produkovaný protein hCD69. Frakce tohoto proteinu byla získána pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA Sepharose (obr. 5.3).



obr. 5.3: Afinitní chromatografie na Ni-NTA (izolace hCD69 z inkluzních tělísek)
1 - promývání pufrém A (2 ml/min), 2 - nanesení vzorku (2 ml/min), 3 - promývání pufrém A (2 ml/min), 4 - gradient pufru B (0 až 100% za 50 minut; 1,5 ml/min),
5 - promývání 50 mM EDTA (3 ml/min), 6 - promývání 50 mM NaOH (3 ml/min),
A - protein hCD69 (odebráno 8 frakcí)

Získané frakce proteinu hCD69 byly zhodnoceny SDS elektroforézou (obr. 5.4).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

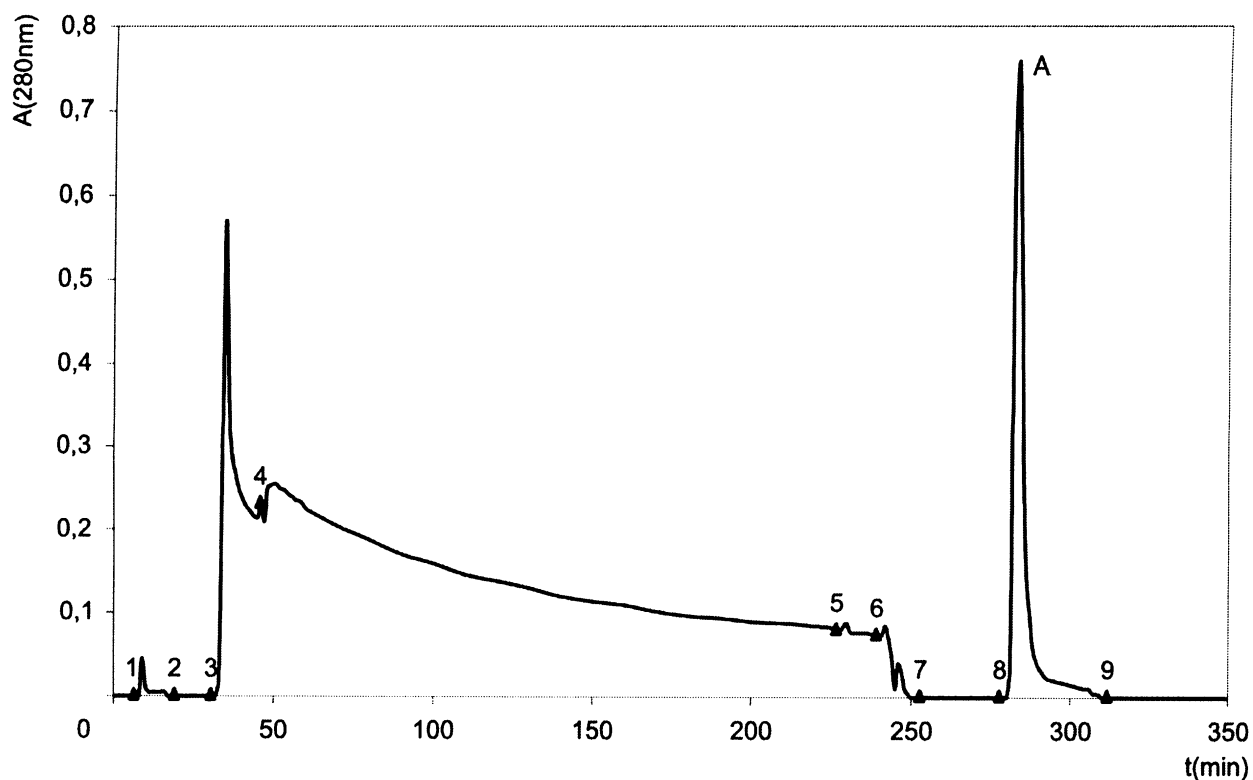


obr. 5.4: SDS elektroforéza frakcí hCD69 z afinitní chromatografie na Ni-NTA; M - marker (66, 45, 24 a 14,3kDa), 1-8 frakce proteinu hCD69 eluované gradientem pufru B z Ni-NTA nosiče

Frakce eluované gradientem pufru B z Ni-NTA nosiče obsahují protein hCD69 bez výrazných nečistot. Frakce byly spojeny, naředěny pufrém A na koncentraci 1 mg/ml a pH bylo upraveno na hodnotu 6,2 pomocí 1 M NaOH. Vzniklý roztok byl rozdělen na 10 ml vzorky, vhodné pro renaturaci a následnou dimerizaci proteinu.

5.2 Dimerizace proteinu hCD69

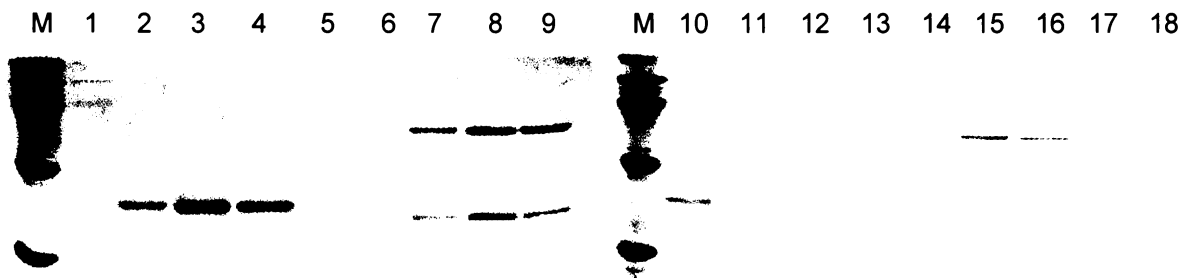
Po renaturaci vzorku proteinu byl vzniklý roztok nanesen na Ni-NTA nosič, kde došlo vlivem sterických interakcí k vytvoření molekul dimerního proteinu (obr. 5.5).



obr. 5.5: Afinitní chromatografie na Ni-NTA (dimerizace hCD69)

1 - promývání 5 mg/ml NiCl₂·6H₂O (2 ml/min), 2 - promývání H₂O (2 ml/min),
3 - promývání pufrem C (2 ml/min), 4 - nanášení vzorku (1,5 ml/min),
5 - promývání pufrem C (1,5 ml/min), 6 - promývání pufrem D (1,5 ml/min),
7 - promývání pufrem E (1,5 ml/min), 8 - uvolnění dhCD69 z nosiče pufrem F
(1,5 ml/min), 9 - promývání H₂O (2 ml/min), A - frakce dimerního hCD69

Frakce uvolněné z nosiče po promytí pufrem F byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy (obr. 5.6). Dimerní protein je spojen pomocí disulfidového můstku, proto byly pro kontrolu správného poskládání připraveny vzorky s redukujícím a neredukujícím vzorkovým pufrem.



obr. 5.6: SDS elektroforéza frakcí dhCD69 s redukujícím a neredukujícím pufrem
M - marker (66, 45, 24 a 14,3kDa), 1-4 a 10-13 - frakce s redukujícím vzorkovým pufrem - monomerní protein, 5+14 - prázdné dráhy, 6-9+15-18 - frakce s neredukujícím vzorkovým pufrem - monomerní a dimerní protein

Podle záznamu z SDS elektroforézy se podařilo poskládat dimerní protein spojený disulfidovým můstkem. Získané vzorky však obsahují také monomerní protein, který je nutné oddělit.

5.3 Štěpení histidinové kotvy

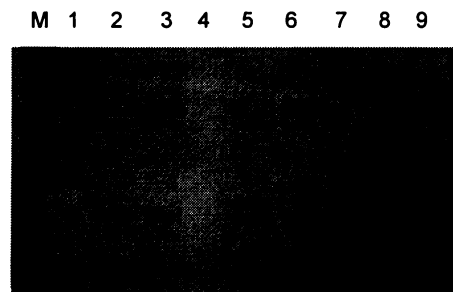
Histidinová kotva připojená k N-konci proteinu byla enzymaticky štěpena pomocí enterokinasy a trypsinu. Potenciální štěpná místa těchto enzymů v aminokyselinové sekvenci vyprodukovaného proteinu znázorňuje obr. 5.7.

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKGSEFQYNC**PGQY**TFSMPSDSHVSSC**SEDWV**
GYQRKCYFISTVKRSWTAQNACSEHGATLAVIDSEKDMN**FLKRY**AGREEHWVGLKKE**PGHPW**
KWSNGKEFNNWFNVTGSDKCVFLKNTEVSSMECEKNLYWICN**KPYK**

obr. 5.7: Aminokyselinová sekvence proteinu hCD69
histidinová kotva - červená+podtržení, štěpné místo pro enterokinasu - zelené,
štěpná místa pro trypsin - modrá

5.3.1 Štěpení histidinové kotvy enterokinasou

0,15 μg enterokinasu, v prostředí pufru pro enterokinasové štěpení (s a bez 100 mM EDTA), bylo štěpeno 15 μg proteinu v 1 μl reakční směsi. Štěpení bylo kontrolováno pomocí SDS elektroforézy za 24, 48 a 72 hodin (obr. 5.8). Vzorky byly připraveny s neredukujícím vzorkovým puftrem.



obr. 5.8: SDS elektroforéza

(štěpení histidinové kotvy enterokinasou)

M - marker (66; 45; 24; 18,4; 14 kDa),

1 - neštěpený hCD69, 2 - po 24 hod s EDTA,

3 - po 24 hod bez EDTA, 5 - po 48 hod s EDTA,

6 - po 48 hod bez EDTA, 8 - po 72 hod s EDTA,

9 - po 72 hod bez EDTA, 4+7 - prázdné dráhy

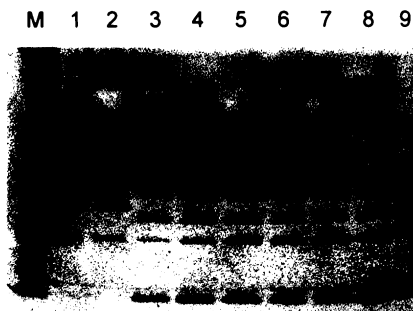
Optimální podmínky pro štěpení enterokinasou jsou poměr enzym/protein 1:100, prostředí enterokinasového pufru obohaceného o 100 mM EDTA a délka štěpení 72 hodin. Tento postup odštěpování histidinové kotvy však není příliš vhodný z hlediska jeho délky a také vysokých pořizovacích nákladů enterokinasu. Proto byly provedeny další pokusy s trypsinem.

5.3.2 Štěpení histidinové kotvy trypsinem

Kontrolní štěpení bylo provedeno s 30 μg proteinu a 0,3 μg trypsinu v 1 μl reakční směsi. V čase t_1 až t_7 , které jsou uvedeny v tab. 5.1, byly odebrány vzorky pro SDS elektroforézu, které byly okamžitě smíchány s neredukujícím vzorkovým puftrem a krátce povařeny ve vodní lázni (obr. 5.9).

Označení	$t(\text{min})$
t_1	15
t_2	30
t_3	60
t_4	120
t_5	180
t_6	240
t_7	300

tab. 5.1: Intervaly odběru vzorků při štěpení trypsinem



obr. 5.9: SDS elektroforéza (štěpení histidinové kotvy trypsinem)
M - marker (66; 45; 24; 18,4; 14 kDa),
1+2 - vzorky neštěpeného proteinu,
3 - t₁ , 4 - t₂ , 5 - t₃ , 6 - t₄ , 7 - t₅ , 8 - t₆ ,
9 - t₇

Podle výsledků z SDS elektroforézy nedošlo při štěpení trypsinem k odštěpení celé histidinové kotvy za lysinem. V tomto místě je zřejmě štěpení blokováno okolními kyselými aminokyselinami. Proto byl navržen pozměněný expresní konstrukt, u kterého by histidinová kotva mohla být snadno odštěpena trypsinem.

5.4 Příprava nového expresního konstruktů hCD69tr

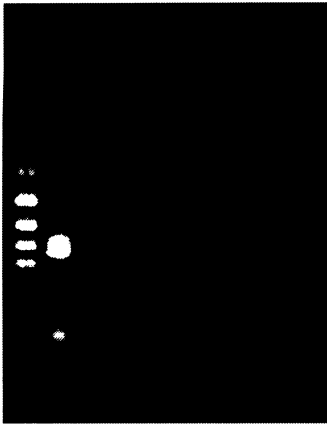
Aminokyselinová sekvence nově připravovaného proteinu CD69, s histidinovou kotvou snadno odštěpitelnou trypsinem, je uvedena na obr. 5.10. Pracovní název této molekuly je hCD69tr.

HMRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPSSRQYNCPGQZTFSMPSDSHVSSCEDW
VGZQRKCFISTVKRSWTS AQNACSEHGATLAVIDSEKDMNFLKRZAGREEHWVGLKKEPGHPW
KWSNGKEFNWVFNVTGSDKCVFLKNTEVSSMECEKNLZWICNKPYK

obr. 5.10: Aminokyselinová sekvence nově připravovaného proteinu hCD69tr
histidinová kotva - červená+podtržení, nově vložené aminokyseliny - kursiva,
štěpná místa pro trypsin - modrá, štěpné místo pro enterokinasu - zelené

Nejprve byla provedena PCR amplifikace příslušného DNA fragmentu, jako templát zde sloužil plazmidový vektor dhCD69l. PCR produkt byl analyzován agarosovou elektroforézou (obr. 5.11).

M 1

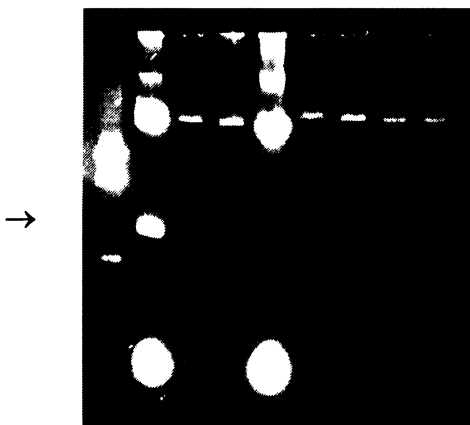


obr. 5.11: Agarosová elektroforéza PCR produktu pro hCD69tr: M - marker (1027, 724, 540, 409, 166 bp), 1 - PCR produkt (618 bp)

Velikost vzniklého PCR produktu odpovídá velikosti navrženého DNA fragmentu, proto byla provedena preparativní elektroforéza, při níž byla DNA extrahována z gelu.

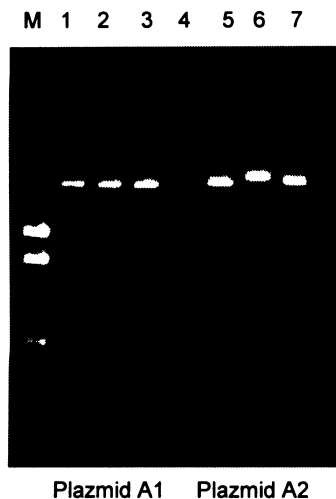
Dalším krokem byla ligace této DNA do vektoru pBSSK+ a následné klonování pomocí bakteriálního kmene *E.coli* XL-1 MRF^c Blue. Výsledky štěpení *plazmidu A*, izolovaného z mililitrových bakteriálních kultur, enzymy Sac I a Kpn I jsou uvedeny na obr. 5.12.

M 1 2 3 4 5 6 7 8



obr. 5.12: Agarosová elektroforéza (štěpení *plazmidu A* z jednotlivých kultur enzymy Sac I a Kpn I) M - marker (1539, 1097, 391, 172 bp), šipka naznačuje polohu vyštěpené DNA, obsahující fragment kódující protein hCD69tr (718 bp)

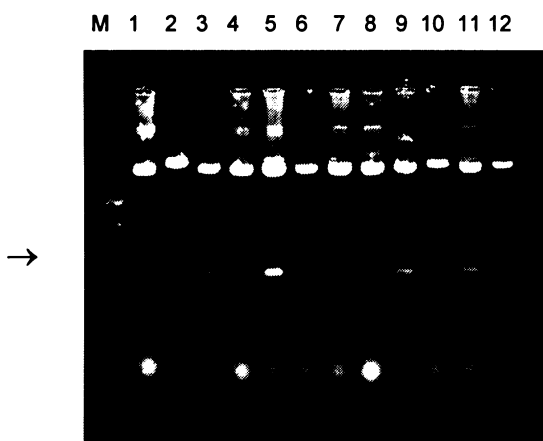
Bakteriální kultury s nejintenzivnější zónou vyštěpené DNA, která obsahuje fragment kódující protein hCD69tr, byly použity pro minipreparativní izolaci plazmidu. Izolovaný plazmid byl štěpen pomocí různých restričních endonukleas (obr. 5.13).



obr. 5.13: Agarosová elektroforéza
(štěpení plazmidů A1 a A2 restričními endonukleasami)
M - marker (1539, 1097, 391, 172 bp);
1, 5 - Xho I (600 bp); 2, 6 - Xho I, Hind III (548 bp);
3, 7 - Xho I, Nco I (270 bp)

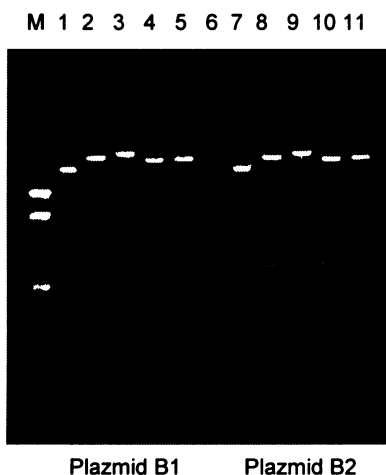
Délky fragmentů odpovídají teoretickým délkám fragmentů, které by měly vzniknout při štěpení *plazmidu A* použitými restričními endonukleasami.

Dalším krokem byla preparativní elektroforéza plazmidu štěpeného enzymy Xho I a Hind III a extrakce vyštěpeného fragmentu z gelu. Získaná DNA byla ligována do otevřeného vektoru pRSET B a vzniklý *plazmid B* byl naklonován stejným způsobem jako v případě *plazmidu A*. Pro výběr vhodné bakteriální kultury pro minipreparativní izolaci plazmidu byla opět provedena jednoduchá preparace v EP-pufu. Štěpení získaného plazmidu enzymy Xho I a Hind III bylo zhodnoceno agarosovou elektroforézou (obr. 5.14).



obr. 5.14: Agarosová elektroforéza
(štěpení plazmidu B z jednotlivých kultur
enzymy Xho I a Hind III)
M - marker (1539, 1097, 391, 172 bp),
šipka naznačuje polohu vyštěpené DNA,
kódující protein hCD69tr (548 bp)

Izolovaný plazmid byl podroben kontrolnímu štěpení různými restričními endonukleasami (obr. 5.15).

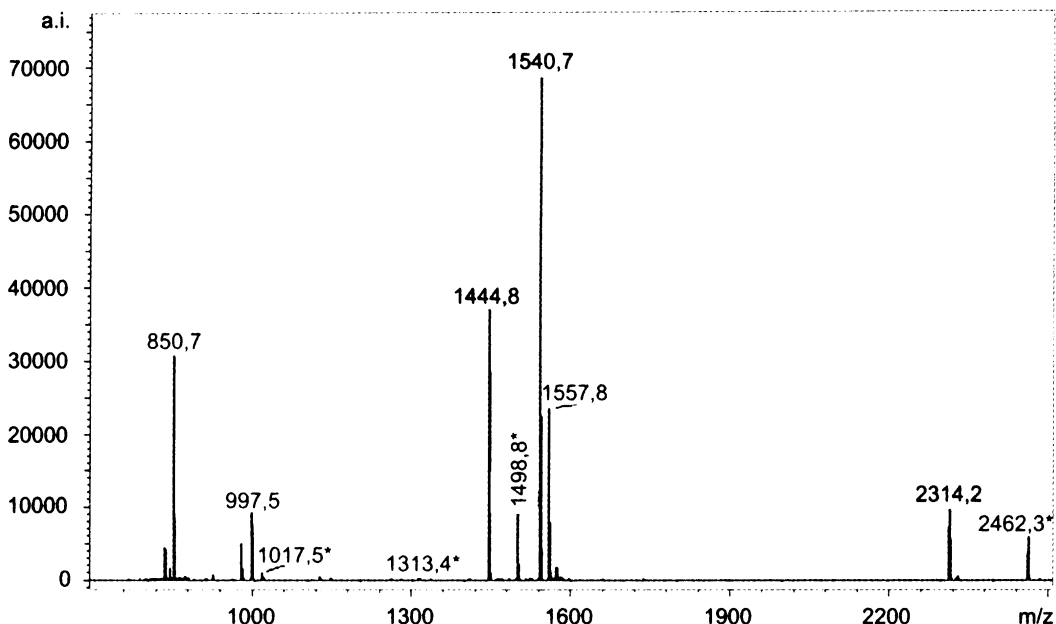


obr. 5.15: Agarosová elektroforéza (štěpení plazmidů B1 a B2 restričními endonukleasami)
M - marker (1539, 1097, 391, 172 bp);
1, 7 - neštěpený plazmid; 2, 8 - Xho I, Hind III (548 bp);
3, 9 - Nco I, Hind III (278 bp); 4, 10 - Xba I, Hind III (570 bp);
5, 11 - Nde I, Hind III (648 bp)

Délky vyštěpených fragmentů odpovídají teoretickým délkám, což naznačuje správnou ligaci DNA kódující protein hCD69tr do vektoru. Pro potvrzení správné nukleotidové sekvence vloženého DNA fragmentu bylo provedeno DNA sekvenování. Tento plazmid byl dále použit pro produkci proteinu hCD69tr pomocí bakteriálního kmene E.coli BL-21(DE3)Gold.

Vzorek vyprodukovaného proteinu, extrahovaný z polyakrylamidového gelu, byl analyzován hmotnostní spektrometrií s použitím techniky MALDI-TOF. Tato metoda prokázala přítomnost požadovaného proteinu ve vzorku, identifikací hmot tryptických štěpů a určením disulfidických můstků po modifikaci SH skupin jodacetamidem (obr. 5.16).

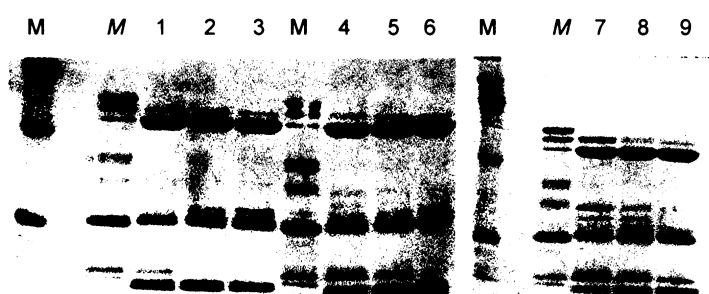
Získaný protein byl přečištěn a dimerizován stejným způsobem jako protein hCD69.



obr. 5.16: Hmotnostní spektrum hCD69tr štěpeného trypsinem a modifikovaného IAA (MALDI-TOF); červeně - peptidy charakteristické pro CD69, * modifikace IAA

5.5 Štěpení histidinové kotvy trypsinem

Štěpení histidinové kotvy trypsinem bylo u nově vzniklého proteinu nejprve optimalizováno s 30 μg proteinu. Trypsin byl použit v poměru 1:100, 1:400 a 1:1000 vůči štěpenému proteinu a štěpení probíhalo 15 (t_1), 30 (t_2) a 60 (t_3) minut při laboratorní teplotě. Odebrané vzorky s neredukujícím vzorkovým pufrem byly zhodnoceny SDS elektroforézou (obr. 5.17).



obr. 5.17: SDS elektroforéza (štěpení histidinové kotvy trypsinem)
M - marker (63, 45, 24 a 14,3kDa),
M - marker (štěpení enterokinasou),
1- t_1 (1:100), 2- t_2 (1:100), 3- t_3 (1:100),
4- t_1 (1:400), 5- t_2 (1:400), 6- t_3 (1:400),
7- t_1 (1:1000), 8- t_2 (1:1000), 9- t_3 (1:1000)

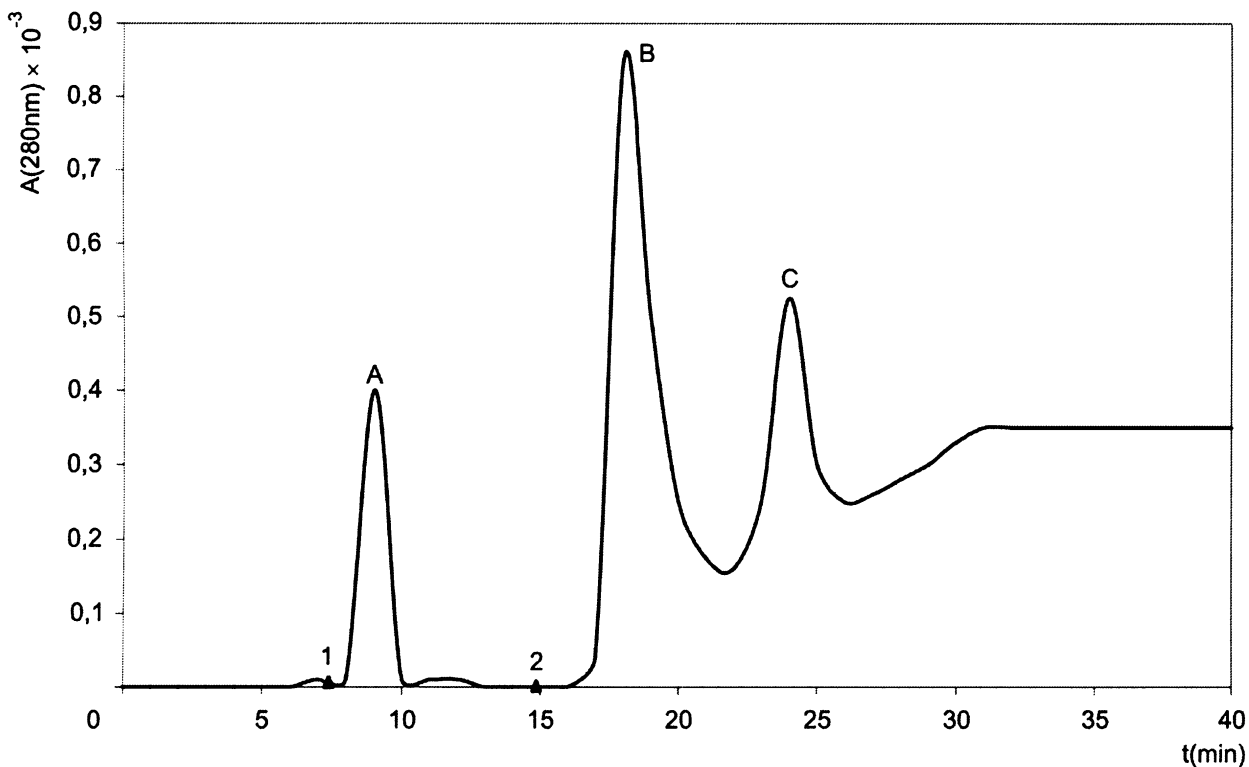
Jako optimální podmínky pro štěpení byl zvolen poměr trypsin/protein 1:1000 a doba 30 minut. Pro zastavení štěpení byl použit 1 mM PMSF, který trypsin deaktivuje.

5.6 Separace histidinové kotvy

Po odštěpení histidinové kotvy trypsinem je nutné tuto kotvu ze vzorku odstranit. Protože histidinová kotva a studovaný protein mají rozdílné hodnoty izoelektrického bodu, mohla být pro separaci použita ionexová chromatografie.

5.6.1 SP-Sepharosa

Výsledný chromatogram po analýze vzorku s 50 μg proteinu (obr. 5.18).

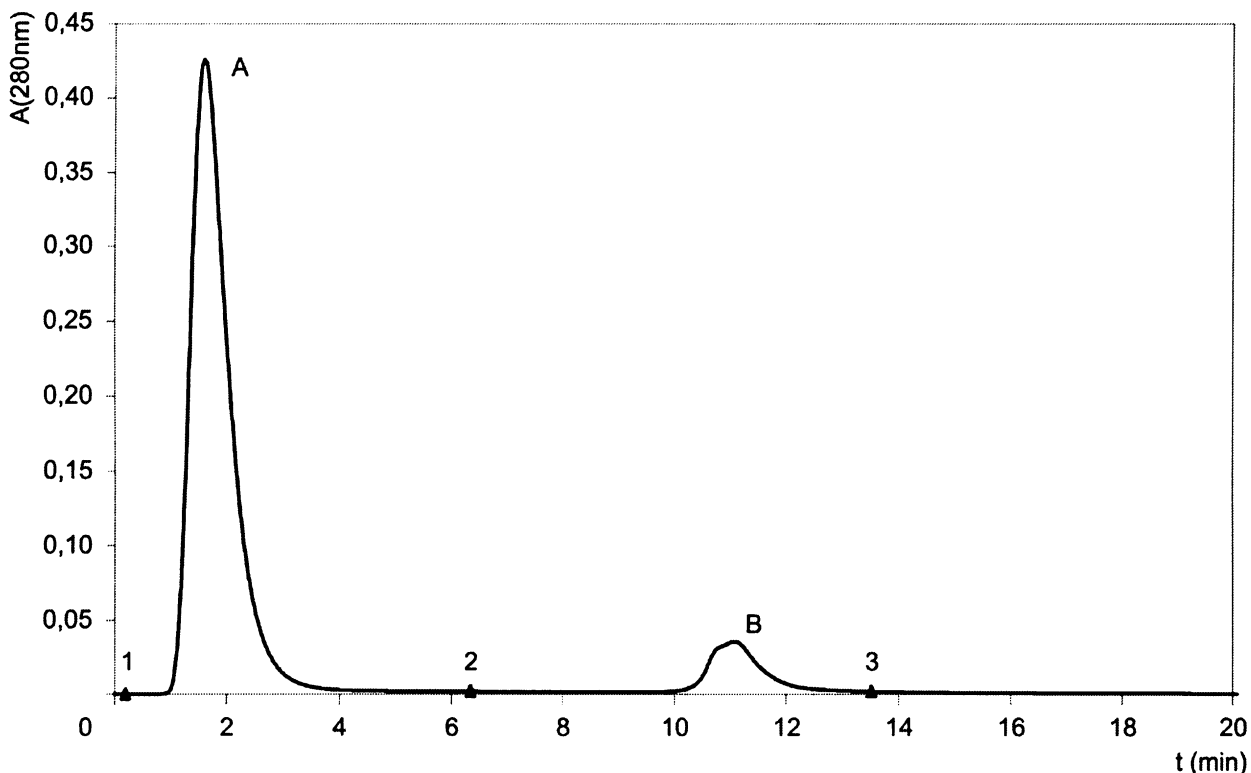


obr. 5.18: SP-Sepharosa (separace histidinové kotvy)

1 - aplikace vzorku (50 μg proteinu), 2 - gradient pufru B (0-100% za 25 min; 1 ml/min),
A - histidinová kotva, B, C - hCD69tr

5.6.2 MONO Q

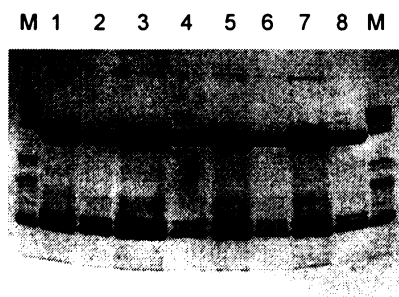
Další použitou chromatografickou technikou, pro oddělování histidinové kotvy, byla ionexová chromatografie na nosiči MONO Q. Průběh chromatografie s 1 mg proteinu naznačuje obr. 5.19.



obr. 5.19: MONO Q (separace histidinové kotvy)

**1 - aplikace vzorku (1 mg proteinu), 2 - pufr B (1 ml/min), 3 - pufr A (1 ml/min),
A - dhCD69, B - histidinová kotva**

Pro separaci histidinové kotvy ze vzorku proteinu byla používána dále jen chromatografie na MONO Q nosiči. Vzorky přečištěné touto metodou byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy (obr. 5.20).



obr. 5.20: SDS elektroforéza (separace histidinové kotvy štěpené trypsinem na MONO Q nosiči),

M - marker (štěpení enterokinasou);

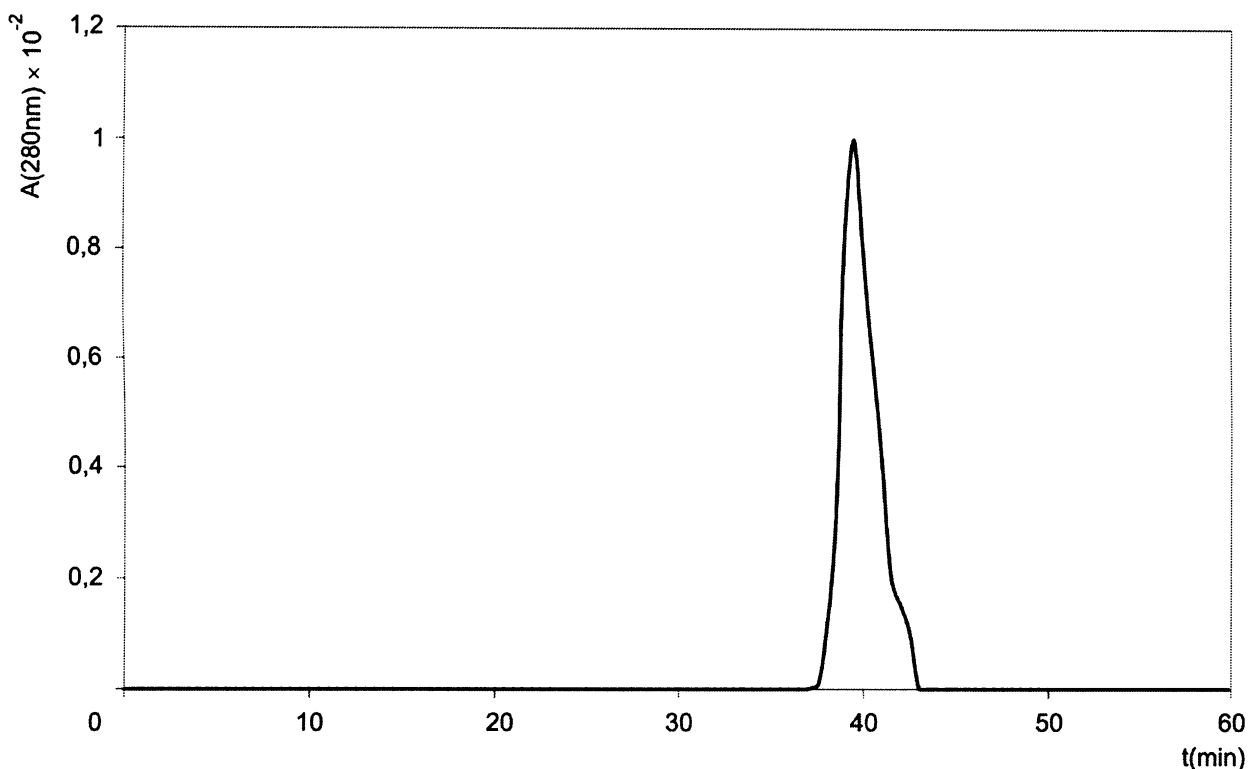
1, 3, 5, 7 - vzorky před separací;

2, 4, 6, 8 - vzorky po separaci

Z výsledného polyakrylamidového gelu je patrné, že vzorky obsahují kromě dimerního proteinu také neposkládaný monomer, který byl dále oddělován.

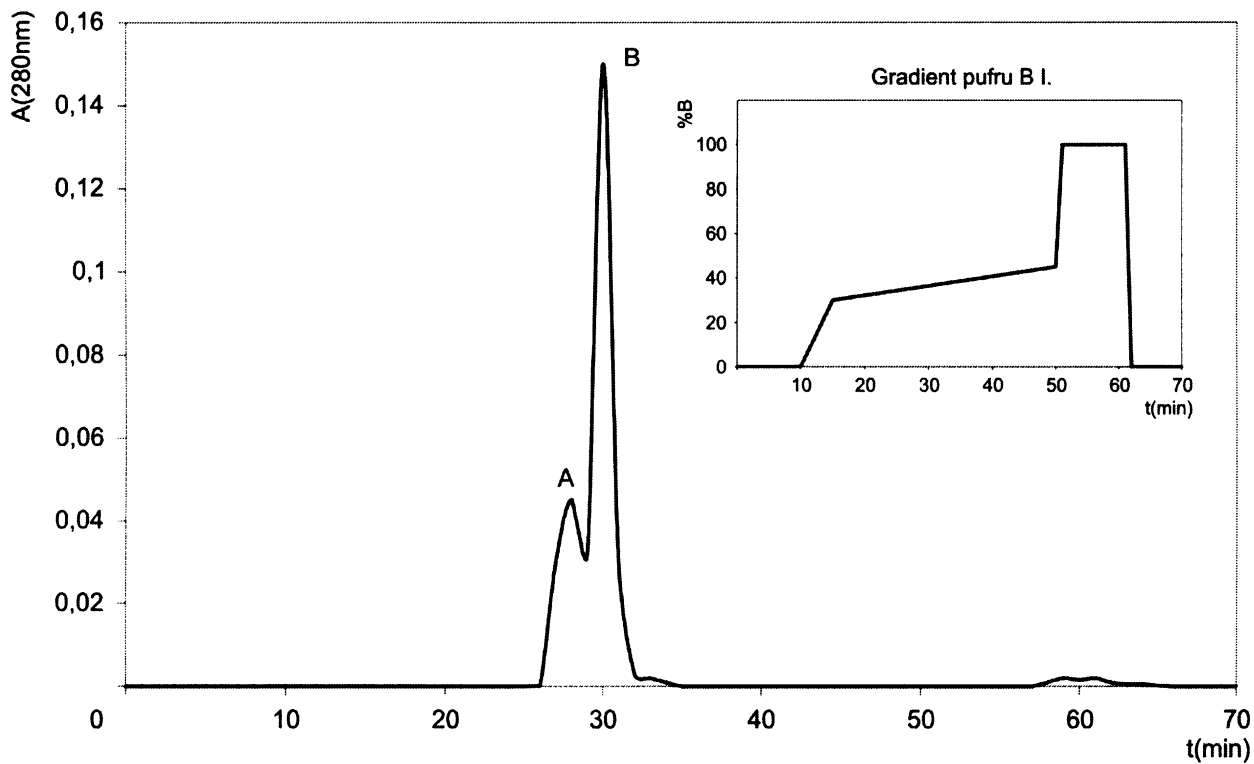
5.7 Separace monomerního proteinu

Jako první metoda pro separaci monomerního a dimerního proteinu byla použita gelová chromatografie. Tímto způsobem se však proteiny nepodařilo oddělit (obr. 5.21).



obr. 5.21: Gelová chromatografie (separace monomerního proteinu; Sephadex 75 HR; 25 μg proteinu; 0,4 ml/min)

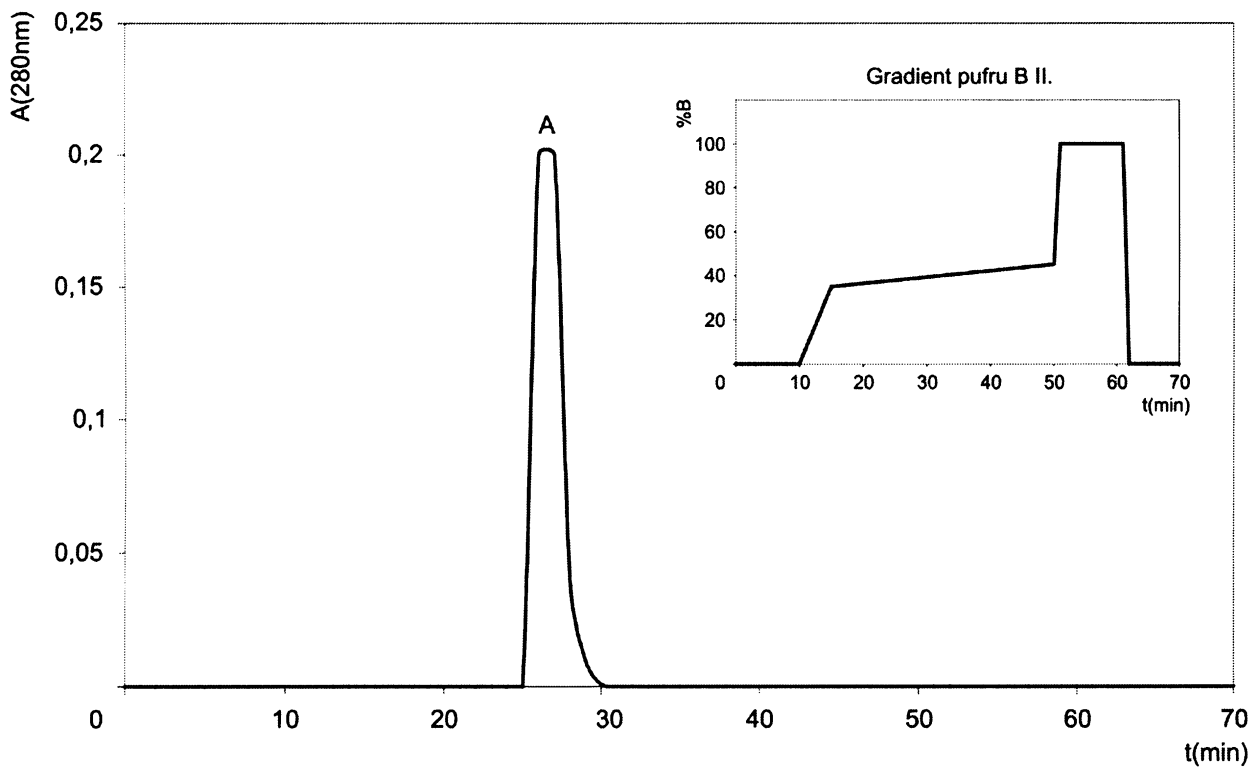
Další možností bylo použití chromatografie s obrácenou fází. Při optimalizaci pracovního postupu byly testovány dva typy kolon (4,5 \times 250 mm; 10 \times 250 mm) a tři průběhy gradientu pufru B. Výsledky tohoto testování s 20 μg proteinu znázorňují obr. 5.22 až 5.27.



obr. 5.22: RP-HPLC (separace monomerného proteinu; gradient pufru B I.; kolona 4,5×250 mm), A - monomer, B - dimer



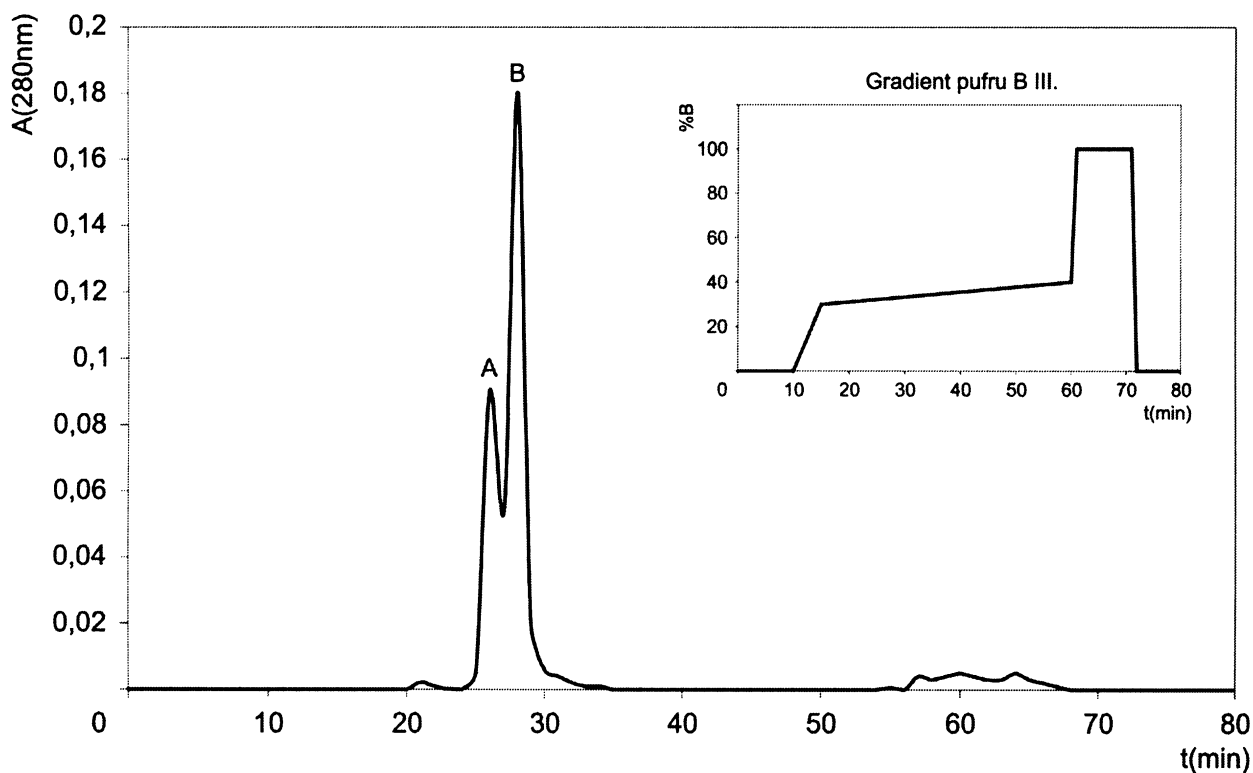
obr. 5.23: SDS elektroforéza (RP-HPLC - separace monomerného proteinu; gradient pufru B I.; kolona 4,5×250 mm), 1 - frakce A, 2 - frakce B



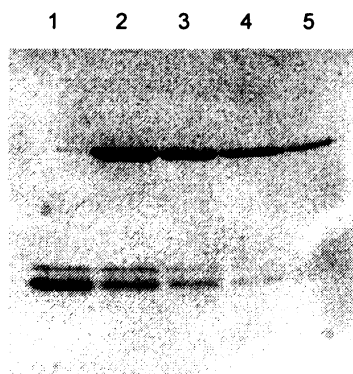
obr. 5.24: RP-HPLC (separace monomerného proteinu; gradient pufu B II.; kolona 4,5×250 mm), A - monomer+dimer



obr. 5.25: SDS elektroforéza (RP-HPLC - separace monomerného proteinu; gradient pufu B II.; kolona 4,5×250 mm), A - frakce A



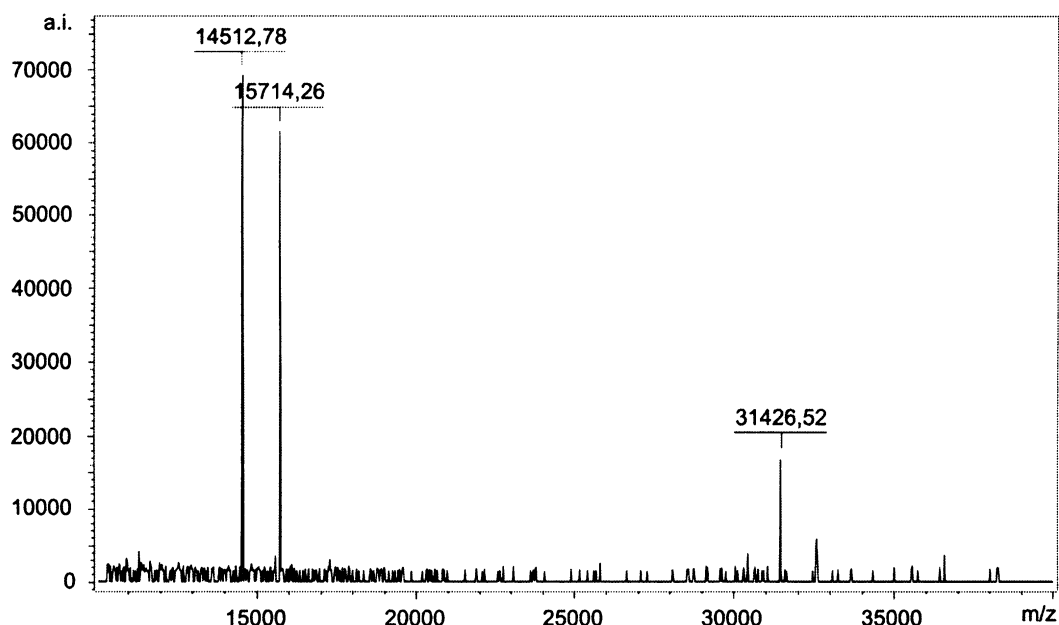
obr. 5.26: RP-HPLC (separace monomerního proteinu; gradient pufru B III.; kolona 4,5×250 mm), A - monomer, B - dimer



obr. 5.27: SDS elektroforéza (RP-HPLC - separace monomerního proteinu; gradient pufru B III.; kolona 4,5×250 mm), 1 - frakce A, 2 - frakce B1, 3 - frakce B2, 4 - frakce B3, 5 - frakce B4

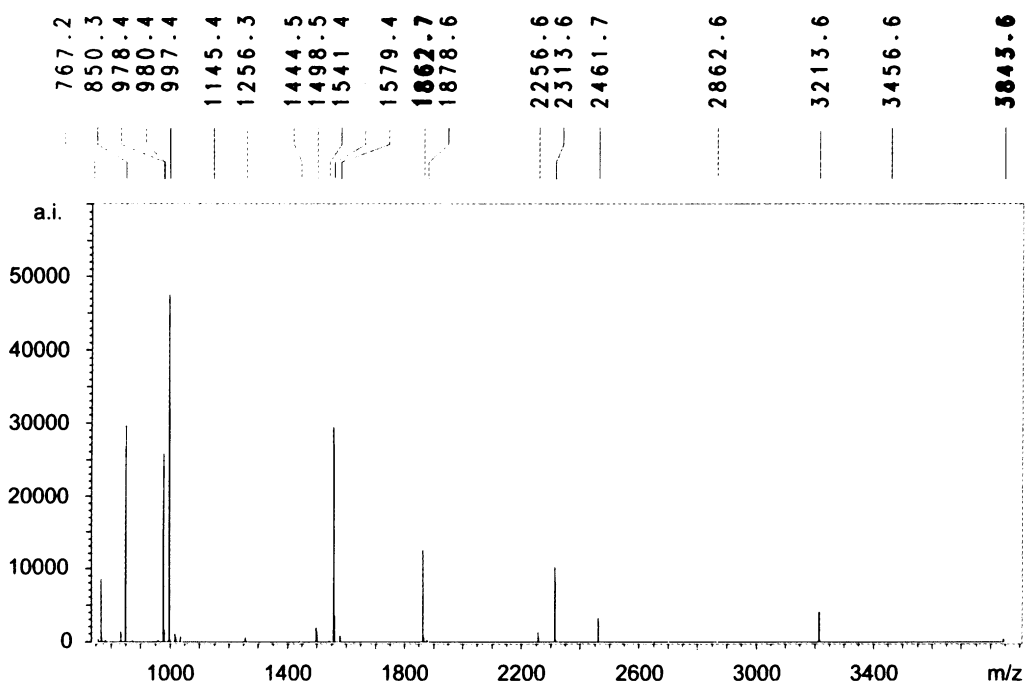
Výsledky separace na koloně 10×250 mm byly obdobné jako na koloně s menším průměrem. Optimální pracovní podmínky, pro oddělování monomerního a dimerního proteinu pomocí RP-HPLC, jsou použití kolony s průměrem 4,5 mm a gradient pufru B I. Touto metodou je však možné získat pouze omezené množství čistého dimerního proteinu.

Vzorky byly po separaci monomerního proteinu analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Podle výsledného spektra stále obsahují stopy monomeru (obr. 5.28), protože hmotnostní spektrometrie s použitím ESI-ICR je vysoce citlivá metoda.



obr. 5.28: Hmotnostní spektrum hdCD69tr (ESI-ICR): 14 512,78 - monomer zkrácený o počáteční sekvenci QYNCPGQZTF, 15 714,26 - monomer, 31 426,52 - dimer

Další možností, jak oddělit monomerní protein a získat tak větší množství čistého dimerního proteinu, je modifikovat jeho volnou SH skupinu a modifikovaný protein separovat pomocí ionexové chromatografie. Modifikaci se však nepodařilo provést, protože při štěpení trypsinem zřejmě došlo k odštěpení N-koncové části monomerního proteinu, která obsahuje cystein 68.



obr. 5.30: Hmotnostní spektrum proteinu hCD69tr štěpeného trypsinem a modifikovaného IAA (MALDI-TOF), měřené za neredukujících podmínek

<i>Trypsické štěpy hCD69tr</i>				
Číslo	AMK	MH+	pI	Sekvence
1	1-30	3458.71	4,34	QYNCPGQYTFSMPSDSHVSSCEDWVG YQR
3	32-39	960.16	9,08	CYFISTVK
5	41-63	2461.58	4,47	SWTSAQNACSEHGATLAVIDSEK
6	64-69	767.92	6,99	DMNFLK
9	75-82	998.13	5,32	EEHWVGLK
11	84-90	850.95	7,82	EPGHPWK
14	109-113	608.80	9,30	CVFLK
15	114-124	1256.38	4,01	NTEVSSMECEK
16	125-135	1444.72	9,26	NLYWICNKPYK
<i>Štěpy spojené disulfidovou vazbou</i>				
1+3		4417.86		
5+16		3843.29		
14+15		1862.17		

tab. 5.2: Hmoty tryptických štěpů proteinu hCD69tr

6. Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit pomocí rekombinantní bakteriální exprese extracelulární fragment proteinu CD69. V naší laboratoři se již několik prací zabývalo studiem tohoto proteinu, ale dosud nebyl produkován v podobě kovalentního dimeru.^{6,13,16,32}

Extracelulární fragment proteinu CD69 zahrnuje celou lektinovou doménu CTLD, proto je vhodný zejména pro vazebné testy a strukturní studie. Vzorek, vytvořený v této práci, by měl sloužit pro porovnání výsledků získaných s monomerní molekulou proteinu CD69 a nekovalentním dimerem.

Pro přípravu kovalentního dimeru bylo nutné nejprve vyprodukovat monomerní protein, obsahující dimerizační cystein 68. Pro následnou purifikaci a dimerizaci tohoto proteinu byl navíc na N-konci opatřen řetězcem aminokyselin bohatým na histidin, takzvanou histidinovou kotvou. Protein byl produkován pomocí třech bakteriálních kmenů *E.coli*, které se liší mimo jiné svou rezistencí na antibiotika (BL-21(DE3), který není rezistentní, BL-21(DE3)Gold, rezistentní na tetracyklin a BL-21(DE3)RIL Gold, rezistentní na tetracyklin a chloramfenikol). Tyto bakteriální kmeny byly transformovány plazmidem dhCD69I, který byl již dříve připraven v naší laboratoři Mgr. Luboslavem Mihókem. Plazmid dhCD69I je založen na vektoru pRSET B a DNA fragment kódující protein CD69 (délky 540 bp) je vložen mezi místa štěpení restrikčními endonukleasami BamH I a Hind III. V transformovaných bakteriích byla indukována produkce proteinu pomocí 1 mM IPTG. Po této indukci produkoval protein CD69 nejlépe bakteriální kmen *E.coli* BL-21(DE3)Gold, který byl následně použit pro produkci ve dvou litrech LB média s antibiotiky. Bakterie produkují protein CD69 do útvarů oddělených od jejich cytoplazmy, do takzvaných inkluzních tělísek, ve kterých se protein nachází v denaturované podobě ve formě sraženiny. Tato tělíška byla v následujícím postupu z bakterií izolována a požadovaný protein byl získán, v poměrně vysoké čistotě, pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA Sepharose. Při použitím pH pufru 8 dojde totiž k vytvoření silné vazby mezi niklem a histidinovou kotvou připojenou k proteinu CD69, snížení pH pufru na hodnotu 3,6 způsobí uvolnění této kotvy z vazby na nikl a protein je eluován z kolony. Tímto způsobem se podařilo získat přibližně 100 mg proteinu.

Pro následnou renaturaci proteinu byly použity vzorky o koncentraci 1 mg/ml, objemu 10 ml a pH 6,2. Vlastní renaturace byla provedena metodou rychlého naředění, při které je připravený vzorek přikapáván konstantní rychlostí 1 ml/min za stálého míchání do 250 ml renaturačního roztoku.

Renaturační roztok obsahuje stabilizující a redoxní složky, navíc jsou jeho pH a osmolarita blízké fyziologickým podmínkám, proto dochází během renaturace k převedení proteinu do přirozené konformace. Celý objem renaturační směsi byl dále aplikován na Ni-NTA Sepharosu, při průchodu stacionární fází dochází ke sterickým interakcím mezi molekulami proteinu a k vytvoření kovalentní vazby mezi dimerizačními cysteiny 68. Pro kontrolu správného poskládání dimerního proteinu byla provedena SDS elektroforéza za redukujících a neredukujících podmínek. DTT, obsažený v redukujícím vzorkovém pufru, způsobí redukci disulfidového můstku a kovalentní dimer se rozpadne za vzniku dvou monomerních podjednotek. Tímto postupem bylo prokázáno nejen správné vytvoření disulfidové vazby v molekule dimerního proteinu, ale také přítomnost neposkládaného monomerního proteinu. Na Ni-NTA Sepharose u těchto molekul zřejmě nemohlo dojít ze sterických důvodů k interakci. Dalším možným vysvětlením je vznik modifikace volné SH skupiny na cysteinu 68 během předešlých postupů, nebo odštěpení N-koncové části proteinu. Monomerní protein je však nutné od dimeru oddělit. Po renaturaci a dimerizaci byl získán vzorek, obsahující směs monomerního a dimerního proteinu s histidinovou kotvou. Množství proteinů v tomto vzorku bylo přibližně 20 mg.

Připojená histidinová kotva by mohla být překážkou pro další využití proteinu, proto byla enzymaticky odštěpována. Jako první enzym pro odstranění histidinové kotvy byla použita enterokinasa, která štěpí peptidový řetězec za lysinem ve specifické sekvenci Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. Při optimalizaci postupu bylo zjištěno, že štěpení probíhá efektivněji v přítomnosti 100 mM EDTA. EDTA má schopnost chelatovat dvojmocné ionty kovů přítomné v reakční směsi. K úplnému odštěpení histidinové kotvy od molekul proteinu enterokinasou došlo až za 72 hodin. Navíc bylo nutné používat poměrně velké množství enzymu (enzym/protein 1:100), což při vysoké ceně enterokinasy značně prodražovalo pracovní postup. Proto byly provedeny další pokusy s trypsinem, který štěpí peptidový řetězec za bazickými aminokyselinami lysinem a argininem, pokud k jejich C-konci není připojen prolin. Štěpení trypsinem však neposkytovalo dobré výsledky, protože při něm nedošlo k odstranění celé histidinové kotvy. Lysin, umístěný na konci histidinové kotvy, je totiž obklopen kyselými aminokyselinami, které mohou inhibovat trypsinové štěpení. Proto byl navržen nový expresní konstrukt s pozměněnou aminokyselinovou sekvencí v místě napojení histidinové kotvy k proteinu CD69. Vložené aminokyseliny prolin a serin by měly umožnit snadné odštěpení histidinové kotvy trypsinem.

Prvním krokem při tvorbě tohoto nového konstruktů, nazvaného pracovně hCD69tr, byla PCR amplifikace. Jako templát byl použit plazmid dhCD69l. *Reverse primer* je komplementární k takzvanému *pRSET B reverse priming site*. *Forward primer* je částečně komplementární k počátku vloženého DNA fragmentu, kódujícího extracelulární část proteinu CD69 a obsahuje navíc štěpné místo pro restriční enzym Xho I. PCR amplifikací bylo vytvořeno několik miliard kopií DNA o délce 618 bp. Vzniklý PCR produkt má na svém 5' konci štěpné místo pro restriční endonukleasu Xho I. Tento restriční enzym však není schopen štěpit DNA na konci řetězce, proto byla nejprve provedena ligace do vektoru pBSSK+. PCR produkt byl po extrakci z agarosového gelu vložen do vektoru v místě štěpeném enzymem Sma I. Toto restriční místo umožňuje vložení jakéhokoli fragmentu DNA se zarovnanými konci. Takto vzniklý plazmid byl pracovně nazván *plazmid A* a pro jeho pomnožení byl použit klonovací kmen *E.coli XL-1 MRF' Blue* s výraznými replikačními schopnostmi. Kolonie bakterií transformované *plazmidem A* byly rozlišeny od ostatních kolonií pomocí Blue-White screeningu. Po pomnožení bakteriální kultury byl produkovaný plazmid izolován a podroben kontrolnímu štěpení různými restričními endonukleasami pro kontrolu správné ligace DNA do vektoru. Protože délky vyštěpených fragmentů odpovídaly jejich teoretickým délkám, byla vložená DNA z plazmidu vyštěpena enzymy Xho I a Hind III a po preparativní elektroforéze extrahována z agarosového gelu.

Vyštěpený DNA fragment byl vkládán do vektoru pRSET B, otevřeného enzymy Xho I a Hind III. Během ligace dojde k vytvoření fosfodiesterových vazeb mezi komplementárními konci DNA řetězců. Takto připravený plazmid byl nazván *plazmid B*. Po jeho naklonování v bakteriích *E.coli XL-1 MRF' Blue* a izolaci byl opět podroben kontrolnímu štěpení různými restričními enzymy. Toto štěpení prokázalo správné vložení DNA fragmentu do vektoru. Pro ověření správnosti vzniklého plazmidu byla navíc provedena jeho sekvenace, která potvrdila shodnou nukleotidovou sekvenci s navrženým plazmidem. *Plazmid B* byl použit pro transformaci bakteriálního kmene *E.coli BL-21(DE3)Gold*, který je vhodný pro produkci proteinu CD69. Vyprodukovaný protein hCD69tr byl identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie. Dále byla provedena produkce ve dvou litrech LB média s antibiotiky, izolace inkluzních tělísek, purifikace proteinu afinitní chromatografií na Ni-NTA Sepharose a dimerizace renaturovaného proteinu, stejným způsobem jako v případě proteinu hCD69.

Následovalo štěpení nově vzniklého proteinu hCD69tr pomocí trypsinu. Při optimalizaci pracovního postupu byly použity různé poměry množství trypsinu vůči množství proteinu a různé dlouhé doby štěpení. Jako nejvhodnější byl zvolen poměr 1:1000 a doba 30 minut. Za těchto podmínek dochází k odštěpení celé histidinové kotvy od většiny molekul proteinu.

Dalším krokem v této práci bylo oddělení odštěpené histidinové kotvy od molekul proteinu. Vhodnou metodou pro tuto separaci je ionexová chromatografie, protože histidinová kotva a studovaný protein mají odlišné hodnoty pI. Nejprve byla provedena separace na SP-Sepharose, která nese záporně nabitě funkční skupiny. Použitý pufr měl pH 6, proto byly molekuly proteinu, na rozdíl od histidinové kotvy, kladně nabitě a došlo tedy k vazbě proteinu na nosič. Další použitou stacionární fází byla MONO Q, která nese kladně nabitě funkční skupiny. V tomto případě bylo pH použitého pufru 8,3. Za těchto podmínek má histidinová kotva záporný náboj a váže se pevně na nosič. Separace na nosiči MONO Q poskytovala lepší výsledky, proto byla použita pro preparativní oddělení histidinové kotvy ze vzorku.

Vzorky proteinu stále obsahovaly směs dimeru a monomeru, proto bylo dalším úkolem je od sebe oddělit. Protože se dimerní a monomerní protein výrazně liší svou molekulovou hmotností, byla jako první metoda pro tuto separaci zvolena gelová chromatografie. Pomocí této metody se však proteiny nepodařilo vůbec oddělit. Je to zřejmě způsobeno tím, že monomerní protein vytváří v roztoku nekovalentní dimery, které mají stejnou molekulovou hmotnost jako studovaný kovalentní dimer. Další možností jak oddělit monomerní a dimerní protein byla chromatografie s obrácenou fází. Tato metoda využívá k separaci molekul jejich hydrofóbní interakce se stacionární fází, které by mohly zamezit vzniku nekovalentních dimerů. Při testování optimálních podmínek byly použity tři různé průběhy koncentrací organické mobilní fáze. V prvním případě, kdy koncentrace AcN roste během 45 minut ze 30 % na 45 %, došlo k oddělení frakce monomeru a dimeru. Při změně koncentrace z 35 % na 45 % za 45 minut nedošlo vůbec k oddělení monomeru a dimeru. S gradientem koncentrace AcN z 30 % na 40 % za 55 minut došlo pouze k částečnému oddělení. Separace na koloně s průměrem 10 mm poskytovala stejné výsledky jako separace na koloně s průměrem 4,5 mm, docházelo zde však k výrazným ztrátám vzorku.

Pomocí chromatografie s obrácenou fází se podařilo získat pouze malé množství čistého dimerního proteinu, které je však dostačující pro provedení vazebných studií.

Pomocí hmotnostní spektrometrie ESI-ICR byly analyzovány vzorky odděleného dimerního proteinu. Přestože na polyakrylamidovém gelu není v této frakci po SDS elektroforéze patrný žádný monomer, vysoce citlivá hmotnostní spektrometrie prokázala jeho přítomnost.

Další možností jak efektivně odstranit monomerní protein a získat tak větší množství čistého dimerního proteinu, je modifikace jeho volné SH skupiny na cysteinu 68 různými činidly, například jodoctovou kyselinou, jodacetamidem, N-ethylmaleinimidem. Tato modifikace by mohla ovlivnit izoelektrický bod monomerního proteinu a umožnit tak jeho snadnou separaci pomocí ionexové chromatografie. Podle výsledků z hmotnostní spektrometrie je však monomerní protein zkrácen o N-koncovou aminokyselinovou sekvenci, která obsahuje cystein 68. Proto se modifikaci nepodařilo provést.

Vzorky byly nakonec podrobeny strukturní analýze pomocí techniky hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Při této metodě je nejprve proteinový vzorek naštěpen trypsinem, dále modifikován jodacetamidem a měřen za redukujících a neredukujících podmínek. Redukcí dochází k rozrušení disulfidových můstků mezi jednotlivými štěpy a volné SH skupiny jsou přístupné modifikaci jodacetamidem. Bez přítomnosti redukčního činidla zůstávají tyto můstky zachovány. Touto metodou byly identifikovány tři disulfidové můstky ve struktuře proteinu hCD69tr a jejich poloha se shoduje s dříve provedenými výzkumy.^{14, 15}

7. Shrnutí

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vyprodukovat rekombinantní molekulu lidského dimerního proteinu CD69. Protein CD69, opatřený na N-konci histidinovou kotvou pro jeho snadnou purifikaci afinitní chromatografií, se podařilo vyprodukovat pomocí bakteriální exprese. Použitý bakteriální kmen *E.coli* BL-21(DE3)Gold ukládá protein do inkluzních tělísek, ze kterých bylo izolováno přibližně 100 mg monomerního proteinu.

Po dimerizaci renaturovaného proteinu byl získán vzorek 20 mg proteinu, který obsahoval směs monomerního a dimerního proteinu s připojenou histidinovou kotvou.

Enzymatické štěpení histidinové kotvy pomocí enterokinasy nebylo příliš efektivní a pokusy s trypsinem nevedly k odstranění celé histidinové kotvy. Proto byl navržen nový expresní konstrukt, který za histidinovou kotvou obsahuje krátkou sekvenci aminokyselin, umožňující snadné odštěpení této kotvy pomocí trypsinu.

U nově vzniklého proteinu, nazvaného hCD69tr, se podařilo histidinovou kotvu úspěšně odštěpit trypsinem (v poměru 1:1000 k množství použitého proteinu). Odštěpená histidinová kotva byla následně oddělena od vzorku pomocí ionexové chromatografie na MONO Q nosiči.

Posledním úkolem byla separace neposkládaného monomerního proteinu. Jako nejvhodnější metoda byla zvolena chromatografie s obrácenou fází, pomocí které se podařilo získat pouze omezené množství čistého dimerního proteinu CD69. Toto množství však bylo dostatečné pro provedení vazebných testů. Vazebné studie prokázaly, že vazebné vlastnosti tohoto proteinu jsou identické s nekovalentním dimerem, který je možné získat ve větším množství.

8. Seznam použité literatury

1. Ferencík, M.: *Imunochemia*, SNTL/Alfa, Bratislava (1989)
2. Hořejší, V.; Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (2002)
3. Vivier, E.; Malissen, B.: *Nat.Immunol* **1**, 17 (2005)
4. Barclay, A.N.; Brown, M.H.; Law, S.K.A.; McKnight, A.J.; Tomlinson, M.G.; Merwe, P.A.: *The Leukocyte Antigen Fact Book*, Harcourt Brace Company Publishers, Great Britain (1997)
5. Hirabayashi, J: *Introduction to Lectin*. Dostupné z URL: www.glykoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA00E.html (20.11.2005)
6. Bezouška, K.: *Collect.Czech.Chem.Commun.* **69**, 535 (2004)
7. Weis, W.I.; Taylor, M.E.; Drickamer, K.: *Immunol.Rev.* **163**, 19 (1998)
8. Dodd, R.B.; Drickamer, K.: *Glycobiology* **5**, 71 (2001)
9. Weis, W.I.: *Nature* **360**, 127 (1992)
10. *Database of human proteins containing C-type lectin-like domain*. Dostupné z URL: www.imperial.ac.uk/reseackch/animalletcins/CTLD/mammals/humandata.html (10.2.2007)
11. Hara, T.; Jung, L.T.K.; Bjorndahl, J.M.; Fu, S.M.: *J.Exp.Med* **164**, 1988 (1986)
12. Testi, R.; D'Ambrosio, D.; De Maria, R.; Santoni, A: *Immun.Today* **10**, 479 (1994)
13. Bezouška, K.; Nepovím, A.; Horváth, O.; Pospíšil, M.; Hamann J.; Feizi T.: *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **208**, 68 (1995)
14. Llera, A.S.; Viedma, F.; Sánchez-Madrid, F.; Tormo, J.: *J.Biol.Chem* **276**, 7312 (2001)
15. Natarajan, K.; Sawicki, M.W.; Margulies, D.H.; Mariuzza, R.A.: *Biochemistry* **39**, 14779 (2000)
16. Pavlíček, J.; Kavan, D.; Pompach, P.; Novák, P.; Lukšan, O.; Bezouška, K.: *Biochem.Soc.Trans.* **32**, 1124 (2004)
17. Bajorath, J.; Aruffo, A.: *J.Biol.Chem.* **269**, 32457 (1994)
18. Sutto, Y.; Yabe, T.; Maenaka, K.; Tokunaga, K.; Tadokoro, K.; Juji T.: *Immunogenetics* **46**, 159 (1997)
19. Hamman, J.; Fiebig, H.; Strauss, M.: *J.Immunol.* **150**, 4920 (1993)
20. Santis, A.G.; Lopez-Cabrera, M.; Hamman, J; Strauss, M.; Sánchez-Madrid, F.: *Eur.J.Immunol.* **24**, 1692 (1994)

21. Gavioli, R; Risso, A.; Smilovich, D.; Baldissaro, I.; Capra, M.C.; Bargellesi, A; Cosulich, M.E.: *Cell.Immunol.* **142**, 186 (1992)
22. Testi, R.; Philips, J.H.; Lanier, L.L.: *J.Immunol.* **141**, 2557 (1988)
23. De Maria, R.; Cifone, M.G.; Trotta, R.; Rippo, M.R.; Festuccia, C.; Santoni, A.; Testi, R.: *J.Exp.Med.* **180**, 1999 (1994)
24. Bieber, T.; Rieger, A.; Stingl, G.; Wanek, P; Strobel, I.: *J. Invest.Dermatol.* **98**, 771 (1992)
25. Testi, R.; Pulcinelli, F.; Frati, L; Gazzaniga, P.P.; Santoni, A.: *J.Exp.Med.* **172**, 701 (1990)
26. Feng, C.G.; Woodside, K.J.; Vance, B.A.; El-Khoury, D.; Canelles, M.; Lee, J.; Gress, R.; Fowlkes, B.J.; Shores, E.W.; Love, P.E.: *Int.Immunol.* **14**, 535 (2002)
27. Atzeni, F.; Shena, M.; Ongari, A.M.; Carrabba, M.; Bonara, P.; Minonzio, F.; Capsoni F.: *Cell.Immunol.* **220**, 20 (2002)
28. Nishikawa, K.; Morii, T.; Jako, H.; Hamada, K.; Saito, S.; Narita, N.: *J.Allergy Clin.Immunol.* **90**, 169 (1992)
29. Julius, P.; Luttmann, W.; Knoechel, B.; Kroegel, C; Matthys, H.; Virchow, J.C.: *Eur.Resp.J* **13**, 1253 (1999)
30. Yoshimura, C.; Yamagouchi, M.; Iikura, M.; Izumi, S.; Kudo, K.; Nagase, H.; Ishii, A.; Walls, A.F.; Ra, C.; Iwata, T.; Igarashi, T; Yamamoto, K.; Hirai, K.: *J.Allergy Clin.Immunol* **109**, 817 (2002)
31. Marcio, R.; Jirillo, E.; Ransijn, A.; Manuel, J.; Corradin, S.B.: *J.Leukoc.Biol.* **62**, 349 (1997)
32. Pavlíček, J.; Sopko, B.; Ettrich, R.; Kopecký, V.; Baumbuk, V.; Man, P.; Havlíček, V.; Vrbacký, M.; Martínková, L.; Křen, V.; Pospíšil, M.; Bezouška, K.: *Biochemistry* **42**, 9295 (2003)
33. Childs, R.A.; Galustian, C.; Lawson, A.M.; Dougan, G.; Benwell, K.; Frankel, G.; Feizi T.: *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **266**, 19 (1999)
34. Atzeni, F.; Del Papa, N.; Sarzi-Puttini, P.; Bertolazzi, F.; Minonzio, F.; Capsoni, F.: *Clin.Exp.Rheum.* **22**, 331 (2004)
35. Murata, K.; Inami, M.; Hasegawa, A.; Kubo, S.; Kimura, M.; Yamashita, M.; Hosokawa H.; Nagao, T.; Suzuki, K.; Hashimoto, K.; Shinkai, H.; Koseki, H.; Taniguchi, M.; Ziegler, S.F.; Nakayama, T.: *Int.Immunol.* **15**, 987 (2003)

36. Huang, J.L.; Ou, L.S.; Tsao, C.H.; Chen, L.C.; Kuo, M.L.: *Ped. Allergy Immunol.* **13**, 426 (2002)
37. Okamoto, N.; Yotsuyanagi, H.; Ooka, S.; Matsui, T.; Kurokawa, M.S.; Suzuki, M.; Iino, S.; Nishioka, A.; Kato, T.: *Intervirology* **46**, 56 (2003)
38. Crispin, J.C.; Martinez, A.; De Pablo, P.; Velasquillo, C.; Alcocer-Varela, J.: *Scand.J.Immunol.* **48**, 196 (1998)
39. Tassone, P.; Turco, M.C.; Tuccillo, F.; Bonelli, P.; Morrone, G.; Cecco, L.; Cerra, M.; Bond, H.; Di Nicola, M.; Gianni, A.M.; Venuta, S.: *Tissue Antigens* **48**, 65 (1996)
40. Karpinski, M.; Rush, D.; Jeffery, J.; Pochinco, D.; Milley, D.; Nickerson, P.: *J. Am. Soc.Nephrol.* **14**, 226 (2003)
41. Posselt, A.M.; Vincenti, F.; Bedolli, M.; Lantz, M.; Roberts, J.P.; Hirose, R.: *Transplantation* **76**, 190 (2003)
42. Santamaria, M.; Marubayashi, M.; Arizon, J.M.; Montero, A.; Concha, M.; Vallez, F.; Lopez, A.; Lopez, F.; Pena J.: *Human Immunol.* **33**, 1 (1992)
43. Alberts, B; Bray, D; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P.: *Základy buněčné biologie*, Espero Publishing, Ústí nad Labem (2005)
44. Katalog firmy New England Biolabs (2002)
45. *Bio-Rad Protein Assay*. Dostupné z URL: www.biorad.com/B2B/BioRad/product.html (26.2.2007)
46. Katalog firmy Sigma Aldrich (2006)
47. Katalog firmy Millipore (2006)
48. Katalog firmy Stratagene (2007)

9. Přílohy

Nukleotidová sekvence proteinu CD69^{19, 20}

```
1 agactcaaca agagctccag caaagacttt cactgtagct tgacttgacc tgagattaac
61 tagggaatct tgagaataaa gatgagctct gaaaattggt tcgtagcaga gaacagctct
121 ttgcatccgg agagtggaca agaaaatgat gccaccagtc cccatttctc aacacgtcat
181 gaagggctct tccaagttcc tgtcctgtgt gctgtaatga atgtggctct catcaccatt
241 ttaatcatag ctctcattgc cttatcagtg ggccaataca attgtccagg ccaatacaca
301 ttctcaatgc catcagacag ccattgttct tcatgctctg aggactgggt tggctaccag
361 aggaaatgct actttatttc tactgtgaag aggagctgga cttcagccca aaatgcttgt
421 tctgaacatg gtgctactct tgctgtcatt gattctgaaa aggacatgaa ctttctaaaa
481 cgatacgcag gttagagagga acaactgggt ggactgaaaa aggaacctgg tcacccatgg
541 aagtggctcaa atggcaaaga atttaacaac tggttcaacg ttacagggtc tgacaagtgt
601 gtttttctga aaaacacaga ggtcagcagc atggaatgtg agaagaatth atactggata
661 tgtaacaaac cttacaaata ataaggaaac atgttcactt attgactatt atagaatgga
721 actcaaggaa atctgtgtca gtggatgctg ctctgtggtc cgaagtcttc catagagact
781 ttgtgaaaaa aaatthtata gtgtcttggg aatthtcttc caacagAAC tatggaaaaa
841 aaggaagaaa tccaggaaa atctgcactg tgggctthta ttgccatgag ctagaagcat
901 cacaggttga ccaataacca tgcccaagaa tgagaagaat gactatgcaa cctttggatg
961 cactttatat tathttgaaT ccagaaataa tgaaataact aggcgtggac ttactatthA
1021 ttgctgaatg actaccaaca gtgagagccc tcatgcatt tgactactg gaaggagtta
1081 gatgttggtA ctagatactg aatgtaaaca aaggaattat ggctggtaac ataggtthtt
1141 agtctaattg aatcccttaa actcaggag cttttataaa tggacaaatg cttatgaaac
1201 taagatthgt aatathtctc tctthttaga gaaatthgcc aatthactth gttaththtc
1261 ccaaaaaaga atgggatgat cgtgtatthA thththtact tctcagctg tagacaggtc
1321 cthttcgatg gtacatatht cthtgcttht ataathcttht atacagtgtc ttacagagaa
1381 aagacataag caaagactat gaggaathatt tgcaagacat agaathgtgt tggaaaatgt
1441 gcaathgtg atgtggcaaa tctctattag gaaathattct gtaathcttca gacctagaat
1501 aathactagtc ttataathagg thtgtgactt tcttaaatca athctathac gtgcaathact
1561 tcaathactc aththaaata ththtatgtg caathaaatg ththtgttg taththtgtg
1621 tcagtacaat tathagctgt ththtatath gtgaaathaa agtagaathA acacaaaaaa
1681 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa
```

Cytoplazmatická doména

Transmembránový úsek

Krček

CTLD

Netranslatovatelná oblast

Potenciální degradační signály

Potenciální polyadenylační signály

Aminokyselinová sekvence proteinu CD69²⁰

1 MSSENCFVAE NSSLHPE■GG ENDATSPHF■ ■RHEGSFQVP VLCAVMNVVF
51 ITILIIALIA LSVGQYNCPG QYTFSMPSDS HVSSCEDWV GYQRKCYFIS
101 TVKRSWTSAQ NACSEHGATL AVIDSEKDMN FLKRYAGREE HWVGLKKEPG
151 HPWKWSNGKE FNNWFNVTGS DKCVFLKNT E VSSMECEKNL YWICKPKPYK

Cytoplazmatická doména AMK 1-38



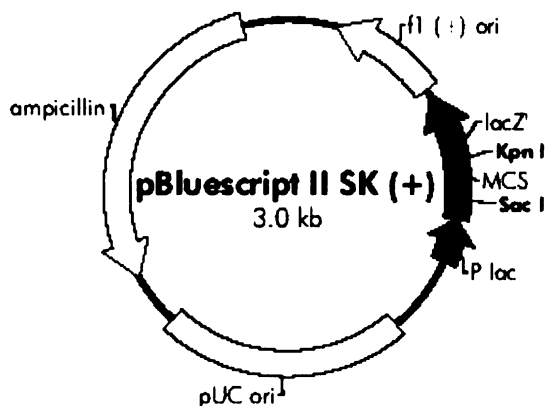
Transmembránový úsek AMK 39-66

Krček AMK 65-84

CTLD AMK 85-196

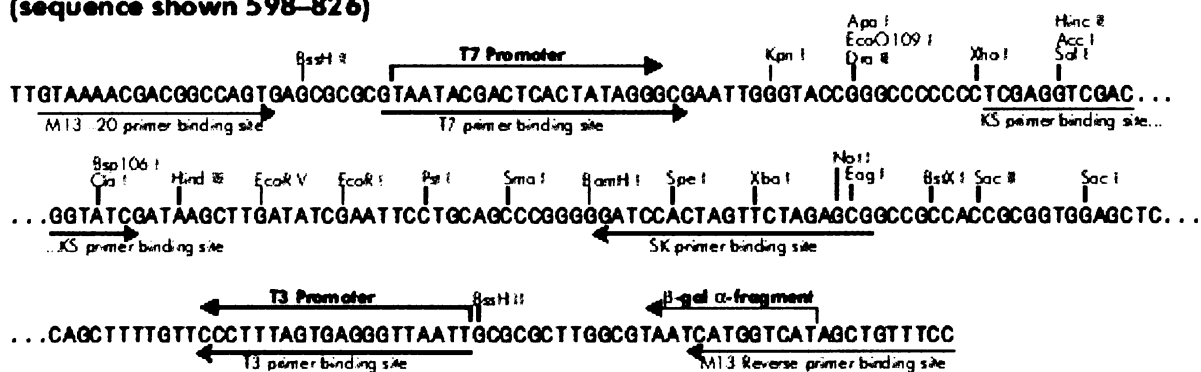
Glykosylační místo

Vektor pBSSK+⁴⁸

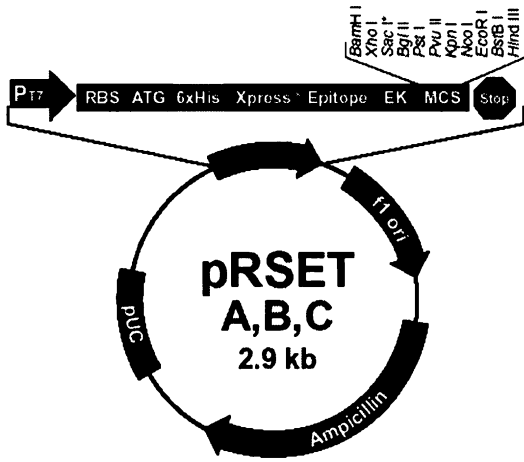


f1 (+) origin 135-441
β-galaktosidasa 460-816
multiple cloning site 653-760
lac promotor 817-938
pUC origin 1158-1825
rezistence na amp (bla) ORF 1976-2833

pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)



Vektor pRSET B⁴⁸



- T7 promotor 20-39
- 6xHis tag 112-129
- Anti-Xpress epitop 169-192
- Multiple cloning site 202-248
- pRSET reverse priming site 295-314
- T7 terminator 256-385
- f1 origin 456-911
- bla promotor 943-1047
- rezistence na ampicilin (*bla*) ORF 1042-1902
- PUC origin 916-2852

```

                T7 promoter                                     RBS
21  AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA

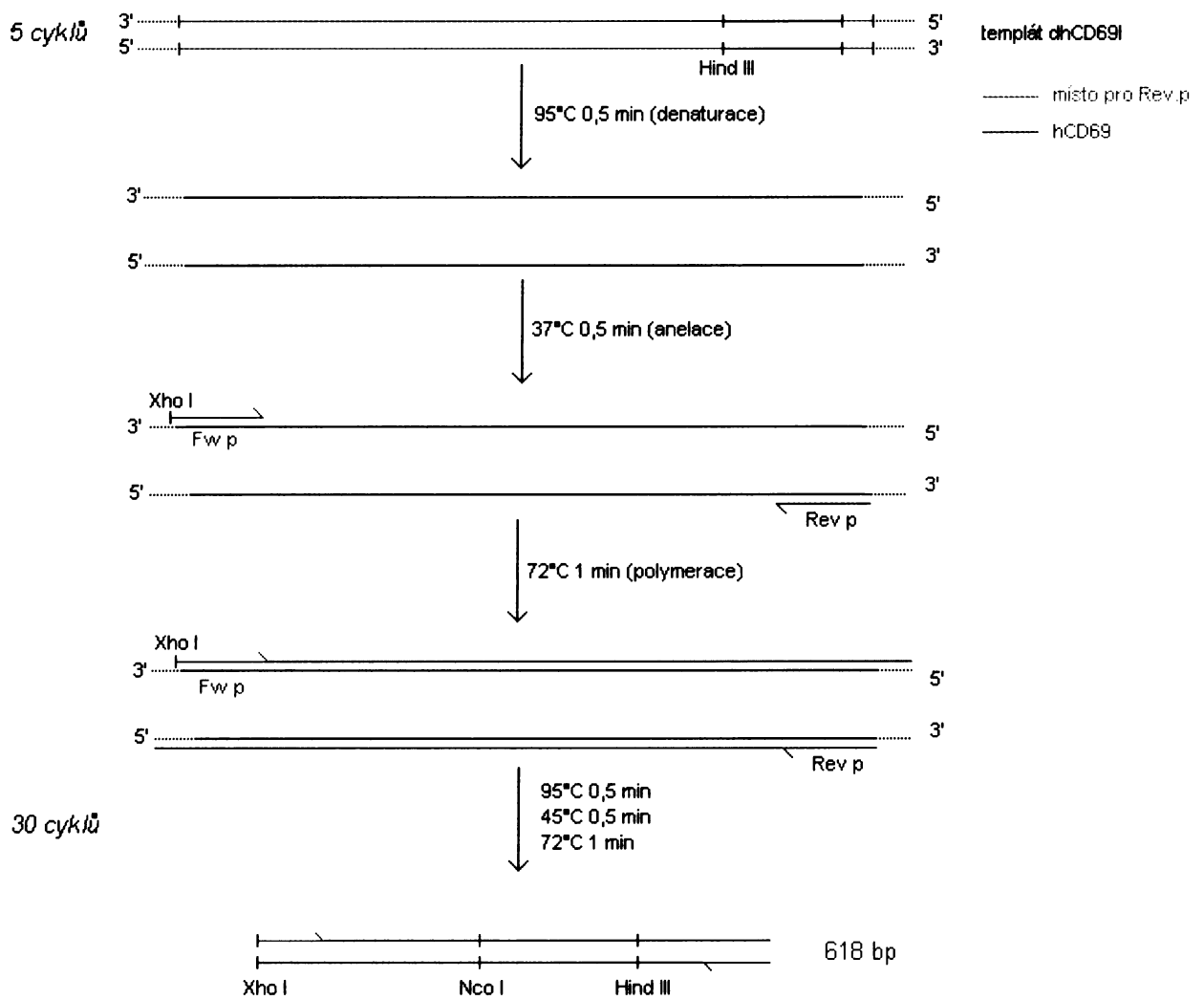
                Polyhistidine (6xHis) region
91  GATATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
    Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala ser Met Thr

                T7 gene 10 leader                Xpress™ Epitope                BamHI                XhoI SacI
148 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CCG AGC TCG
    Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Pro Ser Ser
                EK recognition site                EK cleavage site

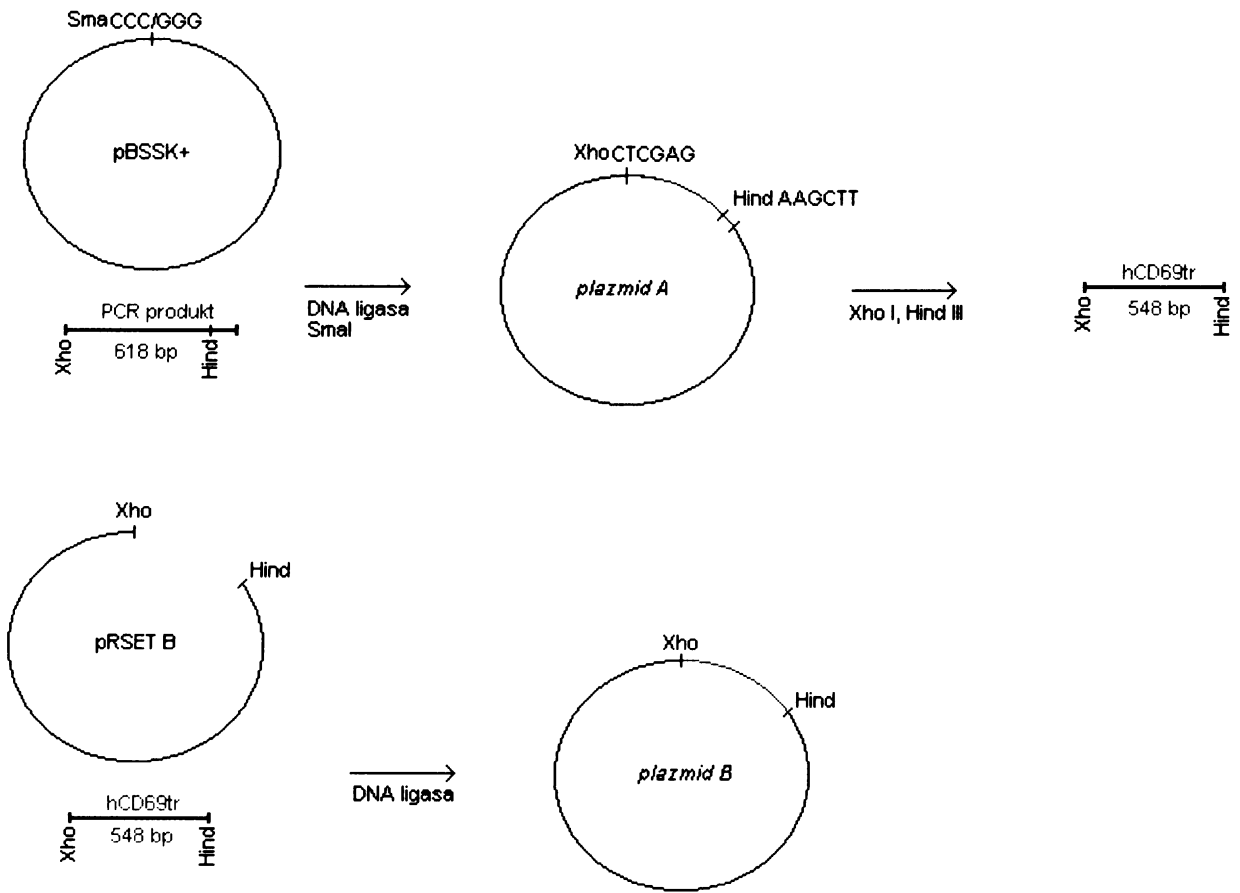
    BglII                PstI PvuII KpnI NcoI EcoRI BstBI HindIII
205 AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT TGA TCOGGCTGCT AACAAAGCCC
    Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala ***

                pRSET reverse priming site
261 GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA
    
```

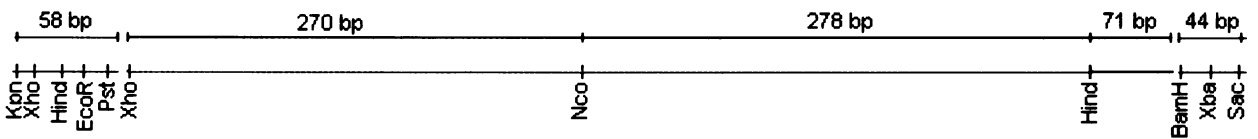

PCR amplifikace



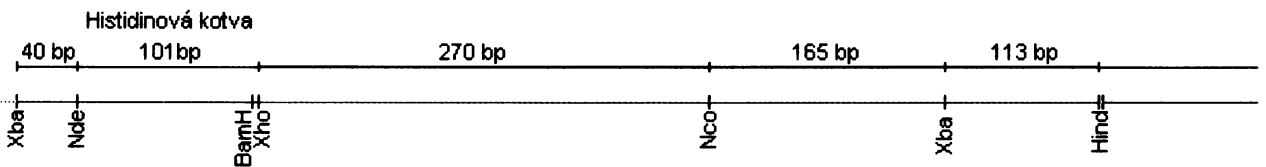
Ligace genu pro hCD69 do vektoru



hCD69tr v pBSSK+ (plazmid A)



hCD69tr v pRSET B (plazmid B)



Sekvence hCD69tr ve vektoru pRSET B

1 ctttagaang agatatacat **atg**cgggggtt ctcatcatca tcatcatcat
51 ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa atgggtcggg atctgtacga
101 cgatgacgat aaggatccga gctcgagaca atacaattgt ccaggccaat
151 acacatttctc aatgccatca gacagccatg tttcttcatg ctctgaggac
201 tgggttggct accagaggaa atgctacttt atttctactg tgaagaggag
251 ctggacttca gcccaaaatg cttgttctga acatgggtgct actcttgctg
301 tcattgattc tgaaaaggac atgaactttc taaaacgata cgcaggtaga
351 gaggaacact gggttggact gaaaaaggaa cctggtcacc catggaagtg
401 gtcaaatggc aaagaattta acaactgggt caacgttaca gggctctgaca
451 agtgtgtttt tctgaaaaac acagagggtca gcagccatgg aatgtgagaa
501 gaatttatac tggatatgta acaaacctta caaa**ta**ataa ggaaacgtgc
551 ggatcctcta gagtcgacct gcaggcaatg atccggctgc taacaaagcc
601 ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa taactagggc
651 tgccggnatt cgatatcaen cttggatccg gctgctaaca agcccgaaag
701 nnagctgant tggctgctgc caccnctga gcaataacnn gcaaaccctt
751 tggggctnct aaacgggctt gagggttttt tctnaaagga gaantntttc
801 cggatttggn ttaanaccga aaaggccccc ccgatcccc tcccannttn
851 cgctanctgn nggcnannng nccgcccngt ncgcccatt aacncgctgg
901 ggggtggtcn cnntagnggn cgnnctgctg ggctnggcc cctctt

Histidinová kotva (101 bp)

hCD69 (412 bp)

Restrikční místa

GGA TCC – BamHI

CTC GAG – Xho I

CCA TGG – Nco I

CAT ATG – Nde I

TCT AGA – Xba I

AAG CTT – Hind III

Aminokyselinová sekvence produkovaného fragmentu

hCD69

1 MRGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KGSEFQYN **C**P GQYTFSMPSD
51 SHVSSCEDW VGYQRKCYFI STVKRSWTS QNACSEHGAT LAVIDSEKDM
101 NFLKRYAGRE EHWVGLKKEP GHPWKWSNGK EFNNWFNVTG SDKCVFLKNT
151 EVSSMECEKN LYWICNKPYK

hCD69tr

1 HMRGSHHHHH HGMASMTGGQ QMGRDLYDDD DKDPSSRQYN **C**PGQZTFSM
51 SDSHVSSCSE DWVGZQRKCZ FISTVKRSWT SAQNACSEHG ATLAVIDSEK
101 DMNFLKRZAG REEHWVGLKK EPGHPWKWSN GKEFNNWFNV TGSDKCVFLK
151 NTEVSSMECE KNLZWICNKP YK

Histidinová kotva

Krček AMK 65-73

CTLD AMK 74-199

Štěpné místo pro enterokinasu

Štěpná místa pro trypsin

dimerizační cystein

<i>Protein</i>	<i>Mr (Da)</i>
hCD69 s His-tag	19 938,11
hCD69 bez His-tag	15 730,62
hdCD69 s His-tag	39 876,22
hCD69 s His-tag	31 461,24

Disulfidové vazby v molekule hCD69tr po štěpení trypsinem za neredukujících podmínek

QYNCys68PGQYTFSMPSDSHVSSCys85SEDWVGYQR

Ⓢ

MH+ 4417.86

Ⓢ

Cys96YFISTVK

SWTSAQNACys113SEHGATLAVIDSEK

Ⓢ

MH+ 3846.29

Ⓢ

NLYWICys194NKPYK

Cys173VFLK

Ⓢ

MH+ 1864.18

Ⓢ

NTEVSSMECys186EK