

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Příprava rekombinantních proteinů DS47 a  
IDGF3 v bakulovirovém expresním systému  
a jejich funkční testy na buňkách  
*Drosophila melanogaster in vitro***

Diplomová práce

**Bc. Lenka Rouhová**

Školitel: Prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2017

Rouhová, L, 2017: Příprava rekombinantních proteinů DS47 a IDGF3 v bakulovirovém expresním systému a jejich funkční testy na buňkách *Drosophila melanogaster in vitro* [Production of *Drosophila* proteins DS47 and IDGF3 in baculoviral expression system and their functional tests on *Drosophila melanogaster* cells *in vitro*. Mgr. Thesis in Czech] - 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

The aim of this work was the production of two *Drosophila* growth factor proteins, DS47 and IDGF3. The cDNAs encoding the two proteins were cloned into a baculovirus transfer vector and used for the recombination with bacmid form of baculovirus maintained in *Escherichia coli*. The recombinant baculoviral DNA was transfected to insect cells. Baculovirus- infected cells produced recombinant His-tagged proteins which were purified from growth media by nickel-agarose affinity chromatography. The function of recombinant proteins was verified by in-vitro growth/survival tests.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 19.4.2017

.....  
Lenka Rouhová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Michalu Žurovcovi za umožnění této práce a cenné rady. Dále děkuji všem členům naší laboratoře, kteří byli vždy ochotni pomoci mi zvládnout potřebné dovednosti, zvláště Mgr. Václavu Brožovi, bez jehož rad bych se při své práci neobešla. Zvláštní dík pak patří mé rodině za podporu během celé doby mého studia.

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Chitinase-like" proteiny.....	1
1.2. Proteinová rodina IDGF.....	2
1.3. Bakulovirový expresní systém .....	4
<b>2. Materiály a metody .....</b>	<b>6</b>
2.1. Použité organismy .....	6
2.2. Editace konstruktů.....	6
2.3. Klonování .....	6
2.4. Transformace teplotním šokem .....	8
2.5. PCR .....	9
2.6. Štěpení restrikčními enzymy .....	9
2.7. Další enzymatické reakce při klonování .....	10
2.8. Precipitace DNA .....	10
2.9. Transfekce .....	10
2.10. Zvýšení titru bakulovirových částic .....	11
2.11. Příprava rekombinantního proteinu.....	11
2.12. Izolace .....	12
2.13. Odstranění imidazolu z roztoku rekombinantních proteinů a jejich zakoncentrování. ....	13
2.14. Kvantifikace Bradfordovou metodou.....	13
2.15. SDS-PAGE.....	14
2.16. Western blot .....	15
2.17. Cytometrický test přežívání buněk Cl.8+.....	16
2.18. Kultivace buněk.....	16
2.19. Složení pufrů .....	18
<b>3. Cíle práce .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>21</b>
<b>5. Diskuse.....</b>	<b>36</b>
5.1. Izolace proteinů .....	36
5.2. Funkce proteinů DS47 a IDGF3.....	37
5.3. Využití rekombinantních proteinů.....	38

<b>6. Závěr.....</b>	<b>40</b>
<b>7. Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>41</b>
<b>8. Seznam literatury .....</b>	<b>42</b>

# 1. Úvod

## 1.1. "Chitinase-like" proteiny

Proteiny z rodiny IDGF (Imaginal Disc Growth Factors) patří do širší rodiny 18-glykosyl hydroláz a svou strukturou se podobají chitinázám, z nichž se pravděpodobně vyvinuly. Protože však narozdíl od nich postrádají schopnost štěpit glykosidovou vazbu, jsou označovány jako tzv. "Chitinase-like" proteiny (CLP) (Badariotti et al., 2006). Přes ztrátu enzymatické aktivity si CLP zachovaly schopnost rozpoznávat a vázat cukerné motivy, což jim pravděpodobně umožnilo získat novou funkci (Varela et al., 2002).

Přítomnost CLP byla popsána u celé řady evolučně velmi vzdálených živočichů včetně člověka. Ke ztrátě katalytické funkce u chitináz zřejmě docházelo během evoluce opakovaně, přesto však si proteiny z rodiny 18-glykosyl hydroláz zachovaly 15-25% identitu v aminokyselinové sekvenci a i mezi nezávisle vzniklými CLP byly pozorovány známky konvergentní evoluce (Varela et al., 2002; Badariotti et al., 2006).

Ačkoliv hmyzí proteinová rodina IDGF patrně nemá společného předka s vývojovou větví, do které patří nejen savčí, ale například i měkkýší CLP, byly mezi nimi nalezeny podobnosti v lokalizaci exprese a funkci (Badariotti et al., 2006; Brož et al, 2017; Kzhyshkowska et al, 2007). Příkladem mohou být proteiny IDGF2 *Drosophila melanogaster* a lidský YKL-40. Oba tyto proteiny stimulují proliferaci, působí proti apoptóze a mají roli ve vrozené imunitě (Brož et al, 2017; Areshkov et al., 2012; Lee et al, 2012).

U člověka jsou známy čtyři CLP - již zmíněný YKL-40, dále YKL-39, SI-CLP (stabilin-interacting chitinase-like protein) a oviductin, který kromě konzervované Glyco\_18 domény obsahuje i dlouhý region s četnými O-glykosylačními místy. Až na oviductin, který byl nalezen pouze v epitelu vejcovodu, jsou lidské CLP mimo jiné exprimovány v některých imunitních buňkách, zejména makrofázích. Jejich výskyt je také často spojený s některými patologickými stavy (Kzhyshkowska et al, 2007).

Nejlépe prozkoumaným lidským CLP je YKL-40. Je o něm známo, že stimuluje proliferaci synoviálních buněk (tj. buněk vnitřní výstelky kloubu) a kožních i plicních fibroblastů prostřednictvím aktivace signálních drah fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K) a mitogenem aktivovaných protein kináz (MAPK) (Recklies et al., 2002). Kromě toho YKL-40 indukuje migraci buněk vaskulární hladké svaloviny (Kzhyshkowska et al, 2007), stimuluje diferenciaci makrofágů a inhibuje apoptózu T-buněk a makrofágů (Lee et al., 2012). Jeho zvýšená exprese byla pozorována v souvislosti s celou řadou chorob, jako jsou chronické záněty, infekční onemocnění a nemoci související s přestavbou tkání, např. astma

nebo cirhóza jater (Lee et al., 2012). Dále bylo zvýšené množství YKL-40 nalezeno i v několika typech pevných nádorů, jimž pravděpodobně zvyšuje životaschopnost a přispívá k jejich schopnosti tvořit metastázy. Je proto velmi nadějným potenciálním markerem pro predikci postupu choroby i cílem léčby (Hamilton et al., 2015).

Velmi podobný proteinu YKL-40 je další z lidských CLP, YKL-39. Jejich identita na úrovni aminokyselinové sekvence dosahuje více než 50 %, ale oproti YKL-40 není YKL-39 glykosylován (Kzhyshkowska et al, 2007). Stejně jako YKL-40 indukuje YKL-39 fosforylaci MAPK ERK1/2, ale narozdíl od YKL-40, působení YKL-39 vede k inhibici proliferace buněk HEK 293 a U373 (Areshkov et al., 2012). Zvýšená exprese YKL-39 byla zjištěna spolu s YKL-40 u lidí trpících revmatoidní artritidou a samostatně u pacientů s osteoartritidou (Kzhyshkowska et al, 2007).

Dalším z lidských CLP je SI-CLP. Je ligandem multifunkčního receptoru stabilin-1 (Kzhyshkowska et al, 2007) a hojně se vyskytuje v bronchoalveolární tekutině pacientů s chronickými záněty dýchacích cest (Xiao et al., 2014). U myšího modelu kolagenem indukované artritidy bylo prokázáno, že SI-CLP indukuje zánětlivou odpověď a jeho "knockout" naopak výskyt zánětů snižuje (Xiao et al., 2014).

Nejmenší příbuznost s ostatními lidskými CLP vykazuje oviductin. Tento protein produkováný epitelem savčích vejcovodů interaguje s zona pellucida oocytů po ovulaci a napomáhá oplození (Yang et al., 2015).

Byla nalezena spojitost mezi lidskými CLP a různými patologickými stavy, ale přesný molekulární mechanismus fungování těchto vysoce konzervativních proteinů nebyl doposud objasněn. Protože hmyzí CLP vykazují značnou funkční podobnost těm lidským, je pravděpodobně, že alespoň některé poznatky získané studiem modelového organismu *Drosophila melanogaster* budou velmi univerzálně aplikovatelné.

## **1.2. Proteinová rodina IDGF**

Rodina IDGF má u *Drosophila melanogaster* šest členů, IDGF1-5 a DS47 (též IDGF6), mezi nimiž je vysoký stupeň homologie (kolem 50 %). Nejbazálnějším z nich je IDGF5, jehož kódující sekvence leží na chromozomálním ramenu 2R, a ostatní se dělí do dvou evolučních větví. Jednu tvoří blízké příbuzné IDGF1-3, které jsou kódovány na chromozomálním ramenu 2L v těsném klastru. Ve druhé větvi jsou IDGF4 a DS47, jejichž geny však leží na různých chromozomech, konkrétně na X a 2R v tomto pořadí (Badariotti et al., 2006; Žurovcová & Ayala, 2002).

Proteiny z rodiny IDGF jsou sekretované glykoproteiny, které jsou poměrně hojně zastoupeny v hemolymfě *Drosophila melanogaster* a jsou ve větší či menší míře produkovány po celý život (Kawamura et al, 1999; Kirkpatrick et al., 1995). Společným znakem, který byl pozorován u většiny proteinů IDGF (kromě IDGF2) je vliv na tvorbu kutikuly (Pesch et al., 2016). Jednotliví členové rodiny se mezi sebou liší lokalizací i intenzitou exprese, přičemž nejsilněji exprimované jsou IDGF4 a DS47 (Kawamura et al, 1999; Fisher et al., 2012).

Nejprozkoumanějším proteinem z rodiny IDGF je IDGF2, u něhož je známa krystalická struktura (Varela et al, 2002). Jeho fyziologická koncentrace v hemolymfě je přibližně 19 ng/μl a stoupá po septickém i aseptickém zranění (Brož et al., 2017; Vierstraete et al., 2004). Podobně byl zaznamenán nárůst exprese IDGF2 během regenerace imaginálních disků (Blanco et al., 2010) a v hemocytech proliferujících po indukované expresi onkogenu Ras (Asha et al., 2003). V pokusech s tkáňovými kulturami bylo prokázáno, že protein IDGF2 indukuje u buněčné linie Cl.8+ expresi genů účastnících se zejména vrozené imunity a morfogeneze, ale i dalších procesů včetně detoxikace. S tím zřejmě souvisí i pozorování, že tento protein chrání buňky před toxickými účinky vysokých koncentrací adenosinu (Ado) a xenobiotik jako jsou rotenon či resverotrol (Brož et al. 2017).

Jedním ze dvou proteinů, kterými se ve své práci zabývám, je DS47. Byl prvním objeveným členem rodiny IDGF a je v hemolymfě *Drosophila melanogaster* hojně zastoupen (Kirkpatrick et al., 1995). Je o něm známo, že množství jeho transkriptu klesá v reakci na chlad (MacMillan et al., 2016). Koncentrace proteinu DS47 v hemolymfě se naopak zvyšuje zatímco indukovanou expresí proteinu PEBP 1 (phosphatidylethanolamine-binding protein 1), o kterém bylo zjištěno, že zvyšuje množství imunitních proteinů v hemolymfě (Reumer et al., 2009). Zároveň byl pozorován pokles množství prekursoru proteinu DS47 v hemolymfě po zranění spojeném s infekcí *Micrococcus luteus* (Vierstraete et al., 2004). Přesná funkce DS47 v organismu nebo molekuly, se kterými interaguje, však zatím nejsou známy.

O IDGF3, druhém proteinu, na který se má práce zaměřuje, je dostupných více informací než o DS47. Na transkripční úrovni bylo prokázáno, že exprese IDGF3 se zvyšuje po poranění a bakteriální infekci (De Gregorio et al, 2001; Buchon et al., 2009). S tím souvisí i poznatek, že protein IDGF3 je nezbytný pro koagulaci hemolymfy, což je pravděpodobně důležité při obraně před entomopatogenními hlísticemi (Kučerová et al., 2016). Kromě srážení hemolymfy je IDGF3 zodpovědný za negativní regulaci signálních drah Wnt a Jak-STAT po infekci hlísticemi a za indukci exprese některých imunitních genů,



jako je například antimikrobiální peptid Drosomycin (Kučerová et al., 2016). Mimo svou funkci ve vrozené imunitě pak IDGF3 ovlivňuje také vývoj a reprodukci (Kučerová et al., 2016), ale molekulární mechanismus jeho působení nebyl dosud objasněn.

Podle doposud známých informací je mezi členy proteinové rodiny IDGF částečný funkční překryv, ale existují mezi nimi i rozdíly. U žádného z nich pak není znám mechanismus jejich působení. Vytvoření rekombinantních proteinů z této rodiny může být v tomto směru velkým přínosem, protože poskytují mnoho možností ve studiu jejich funkce. Výzkum byl v naší laboratoři úspěšně zahájen s rekombinantním proteinem IDGF2 (Brož et al., 2017), ale pro objasnění funkce CLP u *Drosophila melanogaster* je třeba věnovat pozornost i dalším proteinům z rodiny IDGF.

### 1.3. Bakulovirový expresní systém

Bakulovirový expresní systém je jedním z nejvyužívanějších způsobů přípravy rekombinantních proteinů. Využívá kulturu hmyzích buněk, které jsou infikovány rekombinantním bakulovirem kódujícím sekvenci požadovaného proteinu pod silným virovým promotorem. Ve srovnání s jinými systémy pro produkci rekombinantních proteinů má výhody i nevýhody, a proto vhodnost jeho využití závisí na konkrétním účelu, pro který je rekombinantní protein syntetizován.

Bakuloviry patří mezi DNA viry a s genomem dosahujícím až velikosti 220 kbp jsou nezvykle velké. Napadají výhradně bezobratlé, zejména pak hmyz řádu *Lepidoptera*. Právě druhy specializované na hmyzí řád *Lepidoptera* jsou využívány pro syntézu rekombinantních proteinů (Geisse et al., 1996; van Oers, 2011).

Pro využití bakulovirů k expresi rekombinantních proteinů je zásadní skutečnost, že v nejpozdnější fázi bakulovirové infekce dochází k velmi silné expresi dvou proteinů, polyhedrinu a P10. Tyto dva proteiny jsou potřebné pro šíření bakuloviru v populaci živočichů, ale pro infekci buněk v kultuře jsou postradatelné. Díky tomu mohly být jejich geny nahrazeny sekvencí kódující libovolný protein za využití silného promotoru, jenž zajistí intenzivní expresi (van Oers, 2011).

Kromě toho bakulovirového existují i další systémy pro expresi rekombinantních proteinů, které se mezi sebou liší kvantitou a kvalitou izolovaného proteinu i časovou a finanční nákladností. Například *Escherichia coli* je schopná syntetizovat velké množství proteinu rychle, jednoduše a levně. Oproti bakulovirům má ale velmi omezené možnosti skládání cizorodých proteinů a posttranslačních modifikací. Expresní systém založený na kvasince *Pichia pastoris* dokáže podobně jako *E. coli* rychle vyprodukovat mnoho proteinu s

nízkými náklady a snadnou kultivací a ve srovnání s bakterií poskytuje více možností posttranslačních modifikací a o něco lepší skládání proteinu. Problémem však je struktura cukerných řetězců, která se liší od glykanů tvořených v systémech, které využívají hmyzí nebo savčí buňky (Brondyk, 2009).

Podobné klady a zápory jako bakulovirový expresní systém mají systémy využívající savčí buňky. Jsou často používány pro syntézu lidských proteinů, protože poskytují veškeré posttranslační modifikace, které jsou potřebné pro jejich správnou funkci, a jsou velmi spolehlivé při jejich skládání. Jejich nevýhodou je vysoká cena médií pro kultivaci buněk a složitější optimalizace (Brondyk, 2009). Bakulovirový expresní systém je v mnoha ohledech s těmi savčími srovnatelný. Má oproti nim však výhodu v jednodušší kultivaci hmyzích buněk, které nepotřebují atmosféru CO<sub>2</sub> a rostou v médiu bez séra (van Oers, 2011). Při produkci savčích proteinů je u něj nevýhodou odlišná struktura cukerných struktur při N-glykosylaci (Brondyk, 2009), ale pro přípravu hmyzích glykoproteinů je díky tomu ideální.

Bakulovirový expresní systém zdá být nejvhodnější pro syntézu drozofilích proteinů DS47 a IDGF3. Protože proteiny z rodiny IDGF mají poměrně složitou strukturu a jsou navíc glykosylované (Varela et al., 2002), je pravděpodobné, že použitím *E. coli* nebo *P. pastoris* by nebylo možné vytvořit funkční protein. Oproti těmto jednodušším a levnějším systémům proto kombinace bakuloviru s hmyzími buňkami dává mnohem vyšší šanci na vytvoření rekombinantního proteinu, který bude *in vitro* fungovat stejně jako přirozený protein *in vivo*.



vyštěpen restričními enzymy (popsáno v kapitole 2.6.) a vložen do vektoru pFastBac, což již proběhlo s vysokou účinností. Tímto rekombinantním vektorem pFastBac byly transformovány bakterie *E. coli* DH10Bac, které obsahují bakmid (vektor, který se může amplifikovat jak v *E. coli*, tak v hmyzích buňkách) a jsou schopny provést rekombinaci mezi bakmidovou sekvencí a s ní homologními místy ve vektoru pFastBac. Byly nalezeny kolonie s úspěšně inkorporovanými sekvencemi DS47 a IDGF3, z nichž mohly být po amplifikaci izolovány bakmidy.

Po amplifikaci genu a editaci konců byl produkt PCR purifikován pomocí sady "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche) podle návodu výrobce. DNA byla kvantifikována spektrofotometricky (Nanodrop 2000, Thermo Scientific)

Kvůli zamezení vzniku prázdných vektorů pBlueScript SK+ při ligaci tupých konců byl vektor defosforylován a před ligací přečištěn pomocí sady "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche). Protože však 5' konce produktu PCR nejsou kvůli syntetickým primerům fosforylovány, bylo před ligací nutné vkládané konstrukty fosforylovat (složení reakčních směsí všech enzymatických reakcí uvedeno v kapitole 2.7.).

Fosforylované produkty PCR byly odděleny od templátových plazmidů pomocí elektroforézy s použitím 0,8% gelu z agarózy s nízkým bodem tání. Fragment o správné velikosti byl separován v bločku gelu, s nímž byl rozpuštěn při teplotě 68 °C a čtyřikrát naředěn, aby směs po zchlazení znovu neztuhla. Tato směs pak byla přímo použita do ligační reakce. Stejným způsobem byly separovány i fragmenty DS47 a IDGF3 vyštěpené z vektoru pBlueScript SK+ a vektor pFastBac naštěpený odpovídajícími restričními enzymy.

Ligované plazmidy byly použity k transformaci buněk *E. coli* metodou teplotního šoku (postup níže v kapitole 2.4.). Transformované kolonie byly vysévány na plotnu s agarovým LB médiem. Několik narostlých kolonií bylo přeočkováno na novou plotnu a opět kultivováno (podrobnosti uvedeny v kapitole 2.18.). Poté z nich byla sterilní špičkou odebrána část, která po rozmíchání v 50 µl autoklávované ddH<sub>2</sub>O a 5 minutách zahřátí na 95 °C posloužila jako templát pro PCR kontrolu.

Pro ověření přítomnosti konstruktů v plazmidu pBlueScript SK+ byly použity stejné primery jako k editaci konstruktů (Tab. I), protože kvůli ligaci přes tupé konce nebyla známa orientace vloženého fragmentu ve vektoru. Při kontrole vložení konstruktů do vektoru pFastBac pak byl použit editační "Reverse" primer (Tab. I) v kombinaci s primerem "Polyhedrin Fw" (Tab. II) nasedajícím v sekvenci vektoru. U vektoru pFastBac byla přítomnost požadované sekvence kromě kontroly pomocí PCR navíc ověřena i Sangerovým sekvenováním (firma GATC). Pro ověření úspěšné rekombinace mezi pFastBac a bakmidem

v buňkách DH10Bac pak byly při PCR použity primery "pUC/M13 Fw" a "pUC/M13 Rv" (Tab. II).

Tab. II: Primery k testování transformovaných bakteriálních kolonií.

Název primeru	Sekvence (od 5'konce k 3'konci)
Polyhedrin Fw	ATAATTAAAATGATAACCATCTC
pUC/M13 Fw	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
pUC/M13 Rv	AGCGGATAACAATTTACACACAGG

Když byla nalezena pozitivní kolonie, bylo jí zaočkováno tekuté LB médium (podrobnosti uvedeny v kapitole 2.18.) a z napěstovaných bakterií byl izolován plazmid či bakmid. Vektory pBlueScript SK+ a pFastBac byly amplifikovány ve 20 ml kultury a izolovány pomocí sady "High Pure Plasmid isolation Kit" (Roche) podle návodu výrobce. Rekombinantní bakmidy byly amplifikovány ve 100 ml kultury a k jejich izolaci byla použita sada "QIAGEN Plasmid Midi Kit" (QIAGEN).

#### **2.4. Transformace teplotním šokem**

Pro transformaci bylo použito 100 µl suspenze kompetentních buněk a 10 µl ligační směsi. Kompetentní buňky, které byly skladovány zmrazené při teplotě -80 °C, byly pomalu rozmrazeny na ledu. Po přidání DNA byla zkumavka s buňkami inkubována 20 minut na ledu, poté byla na 40 s ponořena do vodní lázně o teplotě 42 °C a nakonec asi 1 minutu chlazená na ledu.

Po teplotním šoku byly bakterie přemístěny do prodyšně uzavřené skleněné zkumavky s 550 µl tekutého LB média bez antibiotik a 45 minut třepány rychlostí 200 otáček/s za teploty 37 °C. Následně byla buněčná suspenze v objemech 100 µl, 200 µl a 300 µl nanesena na tři plotny s tuhým LB médiem obsahujícím selekční antibiotikum.

Při transformaci buněk DH10Bac bylo v protokolu uděláno několik změn. K transformaci byly použity dvě koncentrace plazmidu, 5 ng/100 µl buněk a 500 ng/100 µl buněk. Místo 45 minut byly bakterie inkubovány v médiu bez antibiotik 4 hodiny a poté byla jejich suspenze naředěna 10×, 100× a 1000×. Na plotny s agarovým LB médiem bylo napipetováno po 100 µl od všech ředění i neředěné suspenze. Protože u bakterií DH10Bac byla slabě rozlišitelná modrobílá selekce, byly plotny s narostlými koloniemi ponechány týden ve tmě v lednici, aby byl nahromaděním barevného produktu rozdíl mezi modrými a bílými koloniemi zvýrazněn.

## 2.5. PCR

PCR byla použita k modifikaci 5' a 3' konce genu a následně pro kontrolu bakteriálních kolonií při klonování fragmentu.

Složení PCR reakce pro editaci konstruktů: 5 µl templátu, 3 µl "Forward" primeru (5 µM, Generi Biotech), 3 µl "Reverse" primeru (5 µM, Generi Biotech), 1 µl polymerázy "Pfusion" (Thermo Scientific), 10 µl pufru "5X Phusion® HF Reaction Buffer" (New England BioLabs), 1 µl dNTP (10 mM, Thermo Scientific), 1,5 µl DMSO (Thermo Scientific), autoklávovaná ddH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu reakce na 50 µl.

Složení PCR reakce pro testování bakteriálních kolonií: 1 µl templátu, 0,6 µl "Forward" primeru (5 µM), 0,6 µl "Reverse" primeru (5 µM), 5 µl komerční PCR směsi "DreamTaq" (Thermo Scientific), autoklávovaná ddH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu reakce na 10 µl.

Při reakci PCR bylo po úvodní 1 minutě zahřátí na 94 °C provedeno 30 cyklů denaturace na 30 s při 94 °C, nasedání primerů na 30 s při 57 °C a elongace na 120 s při 72 °C. Po proběhnutí 30 cyklů následovalo 5 minut dodatečné elongace při 72 °C

## 2.6. Štěpení restrikčními enzymy

Restrikčními enzymy byla obvykle štěpena všechna vyizolovaná plazmidová DNA. Proto byla níže uvedená složení reakčních směsí vždy přepočítána na konkrétní množství štěpené DNA.

Protože při štěpení sekvence DS47 a vektoru pFastBac pro jeho vložení byla použita kombinace restrikčních enzymů EcoRI a HindIII, které potřebují odlišné reakční pufrы, bylo nutné štěpení provést odděleně. Po naštěpení enzymem HindIII tedy byla DNA přečištěna precipitací (postup popsán v kapitole 2.8.) a až poté štěpena EcoRI.

### HindIII:

Složení reakční směsi na 1 µg DNA: 1 µg DNA, 1 µl pufru "NEBuffer 2" (New England BioLabs), 0,5 µl (množství pro větší objemy reakce, minimálně 1 µl) enzymu HindIII (New England BioLabs), autoklávovaná ddH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu reakce na 10 µl.

Směs byla inkubována přes noc v 37 °C.

### EcoRI a KpnI:

Složení reakční směsi na 1 µg DNA: 1 µg DNA, 1 µl pufru "10X FastDigest Buffer" (Thermo Scientific), 0,5 µl (množství pro větší objemy reakce, minimálně 1 µl) enzymu EcoRI FD nebo KpnI FD (oba Thermo Scientific), autoklávovaná ddH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu reakce na 10 µl.

Směs byla inkubována 30 minut v 37 °C.

## **2.7. Další enzymatické reakce při klonování**

### Fosforylace:

Složení směsi pro 1 µg DNA: 1 µl T4 polynukleotid kinázy (Thermo Scientific), 1 µg DNA, 6 µl pufru "10X reaction buffer A for T4 Polynucleotide Kinase" (Thermo Scientific), 2 µl ATP (25 mM, Epicentre), autoklávovaná ddH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu reakce na 60 µl.

### Defosforylace:

Složení směsi pro 1 µg DNA: 2 µl SAP fosfatázy (TaKaRa), 6 µl pufru "SAP Buffer" (TaKaRa), 1 µg DNA, autoklávovaná ddH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu reakce na 60 µl.

### Ligace:

Složení směsi: 50-80 ng rozštěpeného vektoru, 200-320 ng vkládaného fragmentu, 2 µl T4 DNA ligázy (New England BioLabs), 2 µl ligačního pufru "10X Buffer for T4 DNA Ligase with 10 mM ATP" (New England BioLabs), autoklávovaná ddH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu reakce na 20 µl.

Při použití DNA v agaróze s nízkým bodem tání nebylo možné DNA kvantifikovat, a proto byly fragmenty do reakce dávkovány objemově. Do 20 µl reakce byly směsi DNA s agarózou (rozpuštění a ředění popsány v kapitole 2.3.) použity v objemu 2 µl u vektoru a 8 µl u vkládaného fragmentu.

Směs byla inkubována přes noc při teplotě 18 °C při ligaci tupých konců a při teplotě 16 °C v případě ligace kohezivních konců.

## **2.8. Precipitace DNA**

K roztoku DNA bylo přidáno 10 % objemu 3M octanu sodného, 1 µl glykogenu a 300 % objemu vychlazeného etanolu. Směs byla nechána 1 hodinu v -80 °C a poté centrifugována 20 minut na 16 100 × g (maximum přístroje) při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 900 µl 70% etanolu. Po vysušení byl pak pelet rozpuštěn v 30 µl autoklávované ddH<sub>2</sub>O.

## **2.9. Transfekce**

Bakmidem obsahujícím genový konstrukt byly transfekovány buňky Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) pomocí transfekčního reagensu METAFECTENE PRO (Biontex). Transfekční směs byla připravena tak, že 6 µl transfekčního činidla bylo opatrně rozmícháno ve 100 µl pufru PBS a odděleně byly ve stejném objemu PBS naředěny 3 µg DNA. Poté byl roztok

DNA opatrně vmíchán do roztoku transfekčního činidla a směs byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě.

Do 6-jamkové misky byly nasazeny 2 ml suspenze buněk Sf9 v transfekčním médiu (složení v kapitole 2.18.) o koncentraci přibližně 500 000 buněk/ml a k nim byla přidána transfekční směs. S touto byly buňky inkubovány 5 hodin při teplotě 28 °C a pak bylo transfekční médium vyměněno za standardní kultivační médium (složení uvedeno v kapitole 2.18.).

Po 5 dnech inkubace v 27 °C bylo sklizeno médium obsahující virové částice. Médium bylo centrifugováno 5 minut při 1000 otáček/min. a získaný supernatant byl uchován jako "P1 stock".

### **2.10. Zvýšení titru bakulovirových částic**

"P2 stock", který obsahuje přibližně 10× vyšší počet virových částic než "P1 stock", byl připraven infekcí buněk Sf9 "P1 stockem".

Nejprve byla provedena titrace. Pomocí Bürkerovy komůrky byla spočtena koncentrace buněk Sf9 v suspenzi. Tato suspenze byla rozdělena do jamek 6-jamkové misky po 2 ml a infikována "P1 stockem" v objemech 0,1 µl, 1 µl a 10 µl na jamku. Po 3 dnech inkubace v 27 °C byl vyhodnocen vzhled buněk a přibližně určen objem použitého "P1 stocku", při kterém byla četnost infekce ("Multiplicity of Infection" - MOI) optimální (MOI = 0,1). Při této hodnotě MOI vykazují všechny buňky příznaky infekce, ale ještě nedochází k jejich rozpadu. Objem "P1 stocku", který byl podle vzhledu buněk vyhodnocen jako nejvhodnější, byl pak použit pro výpočet titru virového "stocku" podle vzorce: **objem inokula (ml) = (MOI (počet virových částic/buňku) × počet buněk)/titr virového stocku (počet virových částic/ml)**.

Díky známému titru virového "stocku" bylo možné určit správné množství inokula pro přípravu "P2 stocku". Stejným způsobem jako při titraci byly infikovány buňky Sf9 v 50 ml média a po 3 dnech bylo médium sklizeno a centrifugováno 5 minut při 1000 otáček/min. Supernatant byl uchován pro infekci buněk "High Five".

### **2.11. Příprava rekombinantního proteinu**

Rekombinantní protein byl syntetizován buňkami "High Five". Nejprve byl proveden test schopnosti "P2 stocku" indukovat expresi rekombinantního proteinu. Buňky "High Five" byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a infikovány "P2 stockem" získaným při titraci (popsána v předchozí kapitole) v objemech 1 µl, 5 µl, 10 µl a 20 µl. Po 3 dnech inkubace při



teplotě 28 °C bylo médium z těchto buněk analyzováno pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE) (postup uveden v kapitole 2.15.).

Po úspěšném testu "P2 stocku" z titrace byl připraven nový "P2 stock" ve větším objemu (postup popsán v předchozí kapitole). Podobně jako při prvním testu byla nejdříve v Bürkerově komůrce spočítána koncentrace suspenze buněk "High Five". Tyto buňky pak byly infikovány ve 24-jamkové misce nově připraveným "P2 stockem" v objemech 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl a 20 µl. Po 3 dnech inkubace ve 28 °C bylo sebráno médium, které bylo opět analyzováno SDS-PAGE. Podle výsledku SDS-PAGE bylo zvoleno množství inokula na počet buněk tak, aby byl výtěžek proteinu co nejvyšší a zároveň spotřeba "P2 stocku" a s ní spojená kontaminace fetálním bovinním sérem (FBS) co nejmenší.

Pro přípravu proteinu byly buňky "High Five" namnoženy na 10-15 konfluentně porostlých velkých misek (průměr 10 cm). Po odmytí z misek byla určena koncentrace buněčné suspenze a bylo k ní přidáno odpovídající množství "P2 stocku".

Infikované buňky byly rozděleny na bakteriologické misky po 8-10 ml suspenze a inkubovány při teplotě 28 °C po dobu 3 dnů. Po uplynutí této doby bylo médium z těchto buněk sklizeno a centrifugací (nejprve 5 min, 1000 otáček/min, 4 °C, pak 30 min, 5000 otáček/min, 4 °C) zbaveno zbytků buněk.

Poté bylo médium obsahující rekombinantní protein 1-2 dny dialyzováno v průběžně vyměňovaném vazebném pufru (složení uvedeno v kapitole 2.19.), aby z něj byly před izolací odstraněny malé organické molekuly a aby do něj byl dodána koncentrace imidazolu důležitá pro vyšší specifitu izolace. Pro dialýzu byla užitá dialyzační membrána SERVAPOR o velikosti pórů 12-14 kDa a průměru 29 mm (SERVA), která byla před použitím podle návodu výrobce zbavena těžkých kovů a glycerolu.

## **2.12. Izolace**

Dialyzované médium obsahující rekombinantní proteiny bylo za stálého otáčení nádoby inkubováno s agarózou s navázanými částicemi niklu "Ni-NTA Agarose" (MCLAB) minimálně 1 hodinu při teplotě přibližně 4 °C, aby se histidinová kotva rekombinantního proteinu navázala na ionty niklové agarózy.

Po inkubaci média s niklovou agarózou byla směs nanášena na kolonku "Pierce Centrifuge Column" (Thermo Scientific) umístěnou v chladničce s teplotou přibližně 4 °C, která zachytila agarózu s navázaným rekombinantním proteinem. Z média, které proteklo kolonkou, byl odebrán vzorek pro kontrolu správného navázání rekombinantního proteinu na agarózu.

Agaróza s rekombinantním proteinem byla pak promyta dvěma objemy kolonky promývacím pufrem, aby byly odstraněny nespecificky navázané proteiny z média. I z proteklého promývacího pufru byl odebrán vzorek pro ověření dostatečné pevnosti vazby rekombinantního proteinu na niklové ionty agarózy.

Po promytí byl rekombinantní protein z niklové agarózy uvolněn pomocí elučního pufru (složení uvedeno v kapitole 2.19.). Roztok protékající kolonkou byl odebírán do zkumavek za vzniku jednotlivých frakcí o objemu 300-500  $\mu$ l.

### **2.13. Odstranění imidazolu z roztoku rekombinantních proteinů a jejich zakoncentrování**

U frakcí eluovaného rekombinantního proteinu byla pomocí spektrofotometru (Eppendorf) změřena absorbance při vlnové délce 280 nm kvůli předběžnému určení koncentrace proteinu. Jako slepý vzorek byl použit eluční pufr s vysokou koncentrací imidazolu, což způsobovalo záporné hodnoty absorbance u prvních frakcí, ve kterých byly obsaženy zbytky promývacího pufru v kolonce.

Poté byly rekombinantní proteiny zbaveny imidazolu z elučního pufru pomocí dialýzy v pufru PBS. K dialýze byla užita membrána SERVAPOR o průměru 6 mm a velikosti pórů 12-14 kDa (SERVA). Dialýza probíhala při teplotě přibližně 4 °C v 3-5 l pufru, který byl dvakrát nebo třikrát po několika hodinách vyměněn.

Nejsilnější frakce byly dialyzovány samostatně a poté rovnou uskladněny v teplotě -80 °C, slabší byly spojeny do jedné a po dialýze zakoncentrovány centrifugačním filtrem Centricon (Millipore) o velikosti pórů 10 kDa podle návodu výrobce.

Izolované, purifikované a případně zkoncentrované rekombinantní proteiny byly rozděleny do zkumavek po 100  $\mu$ l a zamrazeny při teplotě -80 °C. Část byla použita pro kvantifikaci Bradfordovou metodou a ověření, že byl skutečně izolován správný protein.

### **2.14. Kvantifikace Bradfordovou metodou**

Vzorek proteinu byl 50 $\times$  naředěn (4  $\mu$ l vzorku + 196  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O) a 150  $\mu$ l roztoku bylo napipetováno na 96-jamkovou destičku spolu se stejnými objemy třech opakování ředící řady standardu. Jako standard byl použit bovinní sérový albumin o počáteční koncentraci 0,1 mg/ml, který byl v ředící řadě 2 $\times$  ředěn v každém z 8 po sobě jdoucích ředění.

Do každé jamky s roztokem proteinu bylo přidáno 150  $\mu$ l Bradfordova činidla a následná změna barvy byla kvantifikována spektrofotometricky (SpectraMax 350PC, Molecular Devices) při vlnové délce 595 nm.

Průměrné hodnoty naměřených absorbancí třech opakování standardu byly použity k sestrojení přímky vyjadřující závislost absorpce na koncentraci proteinu. Dosazením naměřené absorpance vzorku rekombinantního proteinu do rovnice této přímky pak byla vypočtena jeho koncentrace.

## **2.15. SDS-PAGE**

Separace proteinů byla prováděna vertikální elektroforézou na 10% polyakrylamidovém separačním gelu s přibližně 1 cm vysokou vrstvou "stacking" gelu v lázni 1× SDS-PAGE pufru (složení uvedeno v kapitole 2.19.).

Vzorky byly smíchány s 20 % svého objemu 6× nanášecího pufru obsahujícího barvivo bromfenolovou modř a inkubovány 5 minut při teplotě 95 °C, aby došlo k denaturaci proteinů. 20 µl vzorku bylo napipetováno do jamek gelu.

Nejprve bylo použito napětí 6 V/cm, aby se proteiny zviditelněné bromfenolovou modří ve "stacking" gelu "zaostřily" do jednoho úzkého pruhu. Pro rozdělování proteinů v separačním gelu bylo napětí zvýšeno na 10 V/cm. Separace byla zastavena po úniku pruhu bromfenolové modři z gelu.

Po skončení separace byl polyakrylamidový gel použit buď na analýzu metodou Western blot (postup v následující kapitole) nebo obarven "Coomassie Brilliant Blue". Při barvení "Coomassie Brilliant Blue" byl gel inkubován v barvicí a posléze odbarvující lázni (složení uvedeno v kapitole 2.19.) několik hodin nebo přes noc při pokojové teplotě za stálého třepání. Při odbarvování byly ke gelu do odbarvujícího roztoku přidány papírové ubrousky pro vychytání vymytého barviva.

### Příprava separačního gelu:

V kádince bylo smícháno 6,25 ml dH<sub>2</sub>O, 5 ml 30% roztoku směsi akrylamidu s N,N'-methylenbisakrylamidem v poměru 29:1 a 3,75 ml separačního pufru. Krátkým varem v mikrovlnné troubě byly odstraněny vzduchové bubliny. Po zchlazení byla přidána polymerační činidla: 112 µl persulfátu amonného (APS) a 11,25 µl TEMEDu. Výsledná směs byla krátce promíchána zakroužením kádinkou a rychle napipetována mezi skla aparatury na vertikální elektroforézu. Pro rychlejší tuhnutí gelu a zamezení tvorbě nerovností na hladině byla polymerující směs překryta vrstvou izopropanolu, který byl po ztuhnutí gelu odmyt.

### Příprava "stacking" gelu:

V kádince bylo smícháno 4,5 ml dH<sub>2</sub>O, 1,05 ml 30% roztoku směsi akrylamidu s N,N'-methylenbisakrylamidem v poměru 29:1 a 1,88 ml "stacking" pufru. Směs byla zahřána v

mikrovlnné troubě, aby krátkým varem došlo k odstranění vzduchových bublin. Po zchlazení byla přidána polymerační činidla: 30  $\mu$ l APS a 10  $\mu$ l TEMEDu. Po rychlém promíchání zakroužením kádinkou byla směs ihned napipetována na vrstvu separačního gelu tak, aby hladina sahala až k okraji výřezu ve vnitřním skle aparatury. Do výřezu ve vnitřním skle aparatury pak byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek.

## 2.16. Western blot

Nylonová transferová membrána "Immobilion-P" (Millipore) byla namočená v metanolu a pak opláchnuta v  $dH_2O$ . V lázni 1 $\times$  transferového pufru pak byla membránou překryt polyakrylamidový gel se separovanými proteiny a vložen mezi dva tvrdé filtrační papíry a dvě drátěnky. Takto seskládaný sendvič byl umístěn do transferové aparatury tak, aby gel byl blíže katodě a membrána anodě.

Přenos proteinů na membránu probíhal 2 hodiny při napětí 50 V/cm za stálého míchání v ledem chlazené lázni 1 $\times$  transferového pufru.

Po přenosu proteinů byla membrána za stálého třepání inkubována minimálně 1 hodinu při cca 4 °C v 1 $\times$  PBS s detergentem TWEEN 20 a 10 % FBS jako zdrojem proteinů pro blokování membrány.

Po blokování byla membrána třikrát po 5 minutách na třepačce promyta směsí 1 $\times$  PBS + TWEEN 20. Promytá membrána byla ponořena do roztoku primární protilátky ředěné v poměru 1:2000 ve směsi 1 $\times$  PBS + TWEEN 20 + 10 % FBS. Protilátka proti DS47 i IDGF3 byla králičí. S primární protilátkou byla membrána inkubována minimálně 1 hodinu při teplotě přibližně 4 °C za stálého třepání.

Po odstranění primární protilátky byla membrána opět třikrát po 5 minutách promyta směsí 1 $\times$  PBS + TWEEN 20. Poté byla za stálého třepání inkubována minimálně 30 minut při pokojové teplotě s roztokem sekundární protilátky (kozí) konjugované s křenovou peroxidázou (ředění 1:5000).

Membrána s navázanou sekundární protilátkou byla naposledy třikrát po 5 minutách promyta za stálého třepání směsí 1 $\times$  PBS + TWEEN 20. Poté byla sekundární protilátka zviditelněna substrátem "SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate" (Thermo Scientific) podle návodu výrobce. Snímek membrány se zviditelněným proteinem byl pořízen pomocí přístroje "LAS-3000 Imager" (Fujifilm).

### **2.17. Cytometrický test přežívání buněk Cl.8+**

Buňky Cl.8+ v minimálním médiu (složení uvedeno v kapitole 2.18) buď bez dalších přísad nebo s 30 $\mu$ M koncentrací adenosinu (Ado) byly na 24-jamkové misce ošetřeny rekombinantními proteiny DS47 a IDGF3 o různých koncentracích. V těchto podmínkách byly buňky inkubovány 18 hodin při teplotě 25 °C. Jako kontrola bylo použito kompletní médium (složení uvedeno v kapitole 2.18.).

Po této inkubaci byly buňky obarveny tetrametylrodamin metylesterem (TMRE), který barví funkční mitochondrie na základě jejich membránového potenciálu. Pro obarvení všech vzorků na 24-jamkové misce byl použit 1  $\mu$ l TMRE naředěný minimálním médiem kvůli rovnoměrnému rozdělení mezi všechny vzorky. S TMRE byly buňky inkubovány 30 minut.

Pro měření průtokovým cytometrem (NovoCyte, Acea Biosciences), byly buňky po odstranění média s TMRE spláchnuty ze dna jamky proudem pipety do 200  $\mu$ l minimálního média. Protože nadměrné pipetování buňky poškozuje, bylo médium při uvolňování buněk pipetováno nahoru a dolů maximálně osmkrát. Buněčná suspenze byla přefiltrována sítkem pro tkáňové kultury (BD Falcon) kvůli odstranění zbytků buněk tvořících větší shluky.

Průtokový cytometr byl nastaven tak, že nabíral 50  $\mu$ l buněčné suspenze, která přístrojem procházela rychlostí 14  $\mu$ l/min. U každého vzorku bylo pro analýzu použito 12 000 událostí, pro něž byla nastavena kritéria tak, aby byly z analýzy vyloučeny drobnější zbytky rozpadlých buněk.

Data získaná průtokovým cytometrem pak byla zpracována softwarem NovoExpress. Takto určené poměry živých a mrtvých nebo umírajících buněk v závislosti na podmínkách pak byly převedeny do grafické podoby pomocí programu Microsoft Excel 2000 (Microsoft).

### **2.18. Kultivace buněk**

#### *E. coli*:

Po transformaci byly buňky vysévány na misky s agarovým LB médiem, které byly použity i při následném přeočkování pro namnožení bakterií kvůli otestování na přítomnost žádoucí sekvence. Pro izolaci plazmidů a bakmidů byly buňky pěstovány v tekutém LB médiu.

Složení agarového LB média: 3 g peptonu (Duchefa Biochemie), 3g NaCl (PENTA), 1,5 g kvasničného extraktu (Duchefa Biochemie), 4,5 g agaru (SERVA), 300 ml dH<sub>2</sub>O.

Složení tekutého LB média: 3 g peptonu, 3g NaCl, 1,5 g kvasničného extraktu, 300 ml dH<sub>2</sub>O.

Agarové i tekuté LB médium bylo tepelně upraveno 20 minutami autoklávování. Po vychladnutí na rukou snesitelnou teplotu byla do agarového LB media přidána antibiotika a ještě před ztuhnutím bylo médium rozlito na bakteriologické misky. Do tekutého LB média byla antibiotika přidávána vždy až před použitím.

Pro selekci transformantů a udržení plazmidů pOT2, pBlueScript SK+ a pFastBac v bakteriální populaci byla využita ampicilinová rezistence. Koncentrace ampicilinu v agarovém i tekutém LB médiu byla 150 µg/ml média.

Buňky DH10Bac byly selektovány na přítomnost bakmidu pomocí kombinované rezistence ke směsi antibiotik kanamycinu (50 µg/ml), gentamicinu (7 µg/ml) a tetracyklinu (10 µg/ml).

Bakterie byly vždy kultivovány přes noc při teplotě 37 °C. V tekutém LB médiu byly buňky navíc třepány rychlostí 200 otáček/s.

Pro předběžné určení pozitivních kolonií u plazmidu pBlueScript SK+ a rekombinantních bakmidů byla použita modrobílá selekce. Na povrch ploten s agarovým LB médiem bylo rozetřeno 50 µl 2% roztoku indikátoru X-Gal v dimethylformamidu. U bakterií kmenu DH5α nebylo nutné použít IPTG.

Při identifikaci rekombinantních bakmidů v buňkách DH10Bac byl do média přidán induktor IPTG (40 µg/ml). Kvůli nižší intenzitě barevné reakce byl kromě 50 µl 2% roztoku na povrchu ploten přidán X-Gal navíc i do média (300 µg/ml).

#### Buňky Sf9:

Kultivace buněk Sf9 probíhala v teplotě 28 °C a bylo k ní používáno médium "TMN-FH" (Sigma-Aldrich) o pH 6,2, obsahující 10 % FBS 1% koncentraci antibiotik penicilinu a streptomycinu.

Během transfekce byly buňky Sf9 inkubovány v médiu "TMN-FH" bez antibiotik a pouze 1,5% koncentrací FBS.

Pro přípravu bakulovirových částic by podle protokolu mělo být používáno médium bez FBS. Protože však buňky bez FBS v médiu hůře rostou, bylo zvoleno médium, které FBS obsahovalo, ale ve snížené koncentraci (1,5 %) oproti běžnému médiu. Kromě obsahu FBS mělo médium pro přípravu virových částic stejné složení jako standardní kultivační médium.

#### Buňky "High Five":

Buňky "High Five" byly pěstovány za teploty 28 °C v médiu "EX-CELL 405 Serum-Free Medium for Insect Cells" (Sigma-Aldrich) bez přídavku FBS. Médium obsahovalo směs antibiotik penicilin + streptomycin o koncentraci 1 %.

### Buňky Cl.8+:

Buňky Cl.8+ byly pěstovány při teplotě 25 °C v kompletním médiu, které se skládalo z média "Shields and Sang M3 Insect Medium" (Sigma-Aldrich) o koncentraci podle návodu výrobce, doplněného KHCO<sub>3</sub> (0,25 g/500 ml média), 2,5 % drozofilího extraktu, 2 % FBS a 1 % antibiotikové směsi penicilin + streptomycin. pH média bylo upraveno na hodnotu 6,5-6,6.

Pro experimenty s rekombinantními proteiny bylo používáno minimální médium, které bylo složeno z média "Shields and Sang M3 Insect Medium" (United States Biological) s dodaným argininem (0,5 g/l) a L-lysinem (0,85 g/l).

### **2.19. Složení pufřů**

#### 50× TAE pufr:

484 g Trisu  
114,2 ml ledové kyseliny octové  
200 ml 0,5M EDTA o pH 8,0  
dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 2 l

#### 10× vazebný pufr:

292,2 g NaCl  
156,1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
přibližně 15 g NaOH (pH se dodatečně upraví po naředění)  
dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 2 l

#### 1× vazebný pufr:

10× vazebný pufr byl naředěn na koncentraci 1× a byl do něj přidán imidazol do koncentrace 10 mM (0,68 g/l). pH 1× pufru bylo upraveno na hodnotu 8 pomocí roztoku NaOH.

#### 1× promývací pufr:

10× vazebný pufr byl naředěn na koncentraci 1× a byl do něj přidán imidazol do koncentrace 20 mM (1,36 g/l). pH 1× pufru bylo upraveno na hodnotu 8 pomocí roztoku NaOH.

#### 1× eluční pufr:

10× vazebný pufr byl naředěn na koncentraci 1× a byl do něj přidán imidazol do koncentrace 250 mM (17 g/l). pH 1× pufru bylo pomocí roztoku HCl / NaOH upraveno na hodnotu 7,5.

#### 10× PBS:

80 g NaCl  
2 g KCl  
2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O  
7,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O

dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 1 l

pH je pomocí HCl / NaOH upraveno na 7,4

#### 10× SDS-PAGE pufr:

30,3 g Trisu  
144 g glycinu  
10 g SDS  
dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 1 l

6× nanášecí pufr:

250 mM TrisHCl

10% SDS

30% glycerol

5% β-merkaptoetanol

0,02% bromfenolová modř

dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 100 ml

Roztok pro barvení "Coomassie Brilliant Blue":

5% metanol

7,5% ledová kyselina octová

0,1% "Coomassie Brilliant Blue"

dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 500 ml

Roztok pro odmytí "Coomassie Brilliant Blue" z gelu:

5% metanol

7,5% ledová kyselina octová

dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 1 l

"Stacking" pufr:

1,0 M Trisu

2% SDS

dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 1 l

pH je pomocí HCl upraveno na 6,8

Separáčnı pufr:

1,5 M Trisu

2% SDS

dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 1 l

pH je pomocí HCl upraveno na 8,8

10× transferový pufr:

30,3 g Trisu

144 g glycinu

dH<sub>2</sub>O pro doplnění objemu na 1 l

Při přípravě 1× transferového pufru byl celkový objem 1 l, do kterého byl kromě dH<sub>2</sub>O přidán i metanol v objemu 200 ml.

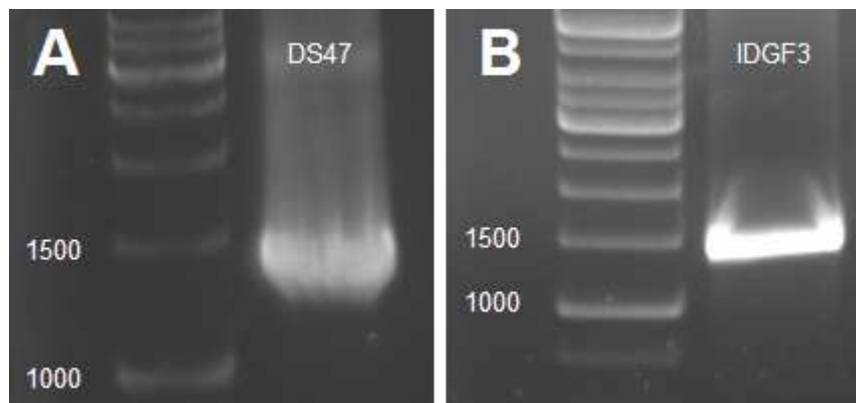


### **3. Cíle práce**

- 1) Příprava expresních konstruktů
- 2) Příprava rekombinantních bakulovirů
- 3) Exprese a izolace rekombinantních proteinů
- 4) Testy rekombinantních proteinů na buňkách *Drosophila melanogaster*

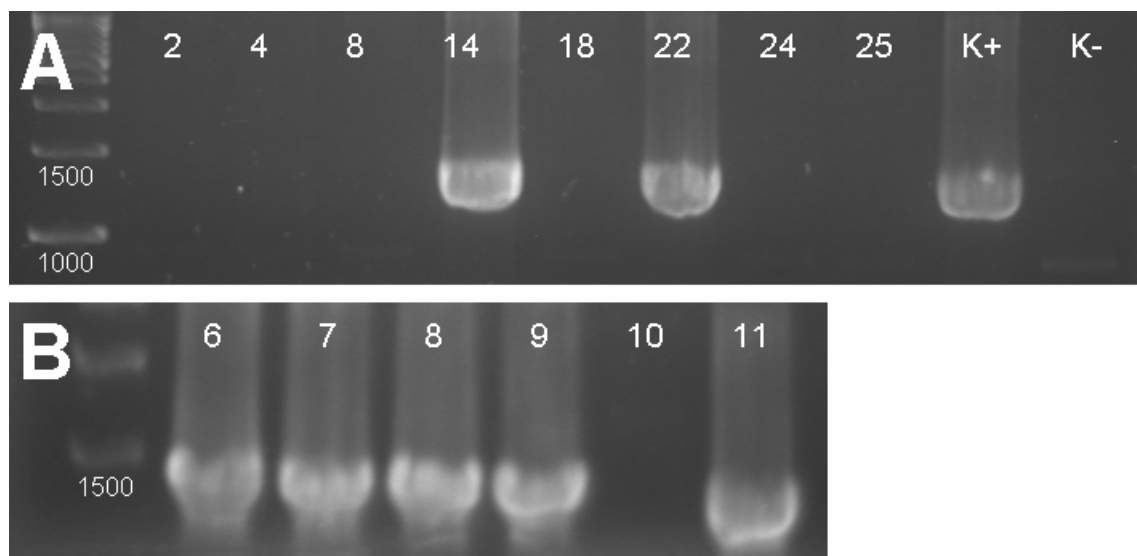
## 4. Výsledky

Fragmenty obsahující příslušné sekvence genů byly amplifikovány PCR a na koncích upraveny pro klonování (Obr. 1)



Obr. 1: Produkty PCR s primery pro editaci konstruktů. A – DS47; B - IDGF3.

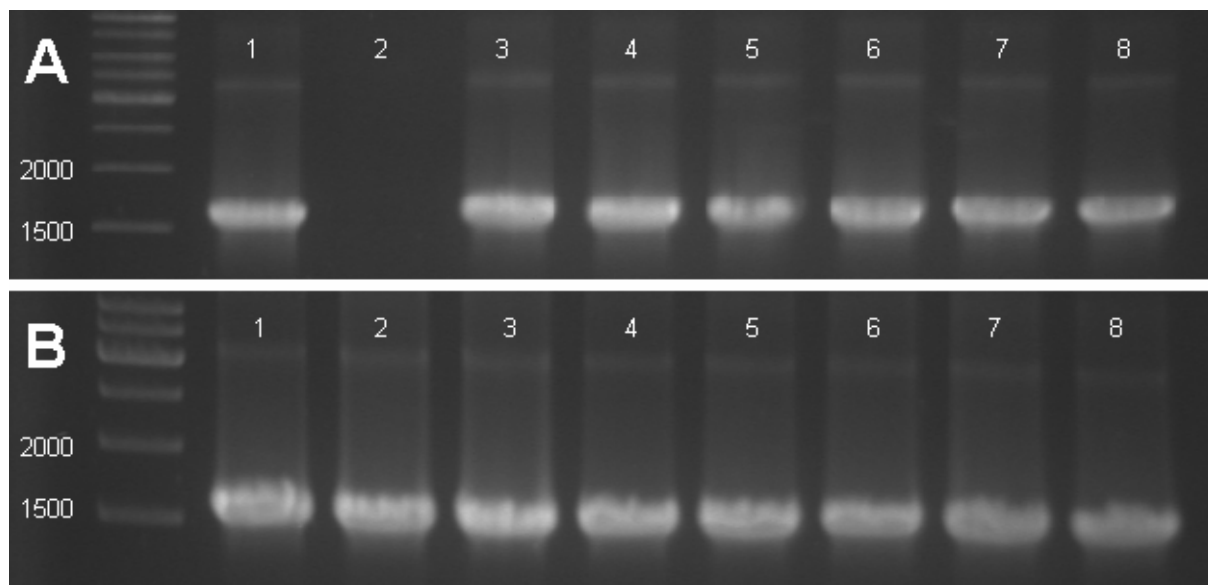
Produkty PCR byly kvůli fenotypické selekci nejprve vloženy do plazmidu pBlueScript SK+ pomocí ligace tupých konců. Takto vzniklými rekombinantními plazmidy byly transformovány bakterie *E. coli* DH5a. Po prvotní selekci podle barvy kolonií byla přítomnost vložených fragmentů ověřena reakcí PCR s použitím editačních primerů (Obr. 2).



Obr. 2: Výsledky PCR kontroly *E. coli* DH5a transformovaných rekombinantním plazmidem pBlueScript SK+ obsahujícím sekvence klonovaných genů. A – DS47: 2, 4, 8, 18, 24, 25 - negativní kolonie; 14, 22 - pozitivní kolonie; K+ - pozitivní kontrola - PCR z DS47 v plazmidu pOT2; K- - negativní kontrola - PCR z plazmidu pBlueScript SK+ bez vložené sekvence. B – IDGF3: 6-9, 11 – pozitivní kolonie; 10 – negativní kolonie

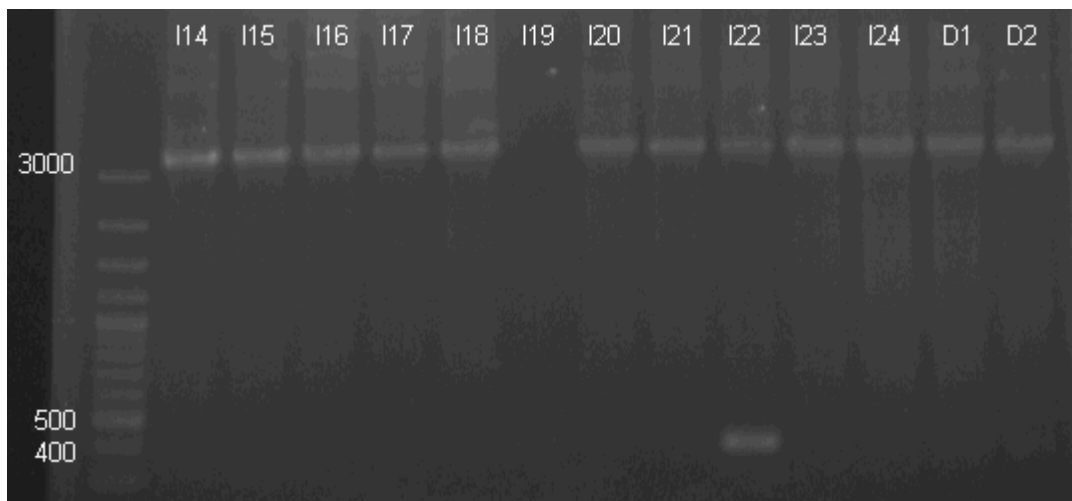
U obou klonovaných genů byly nalezeny kolonie, ve kterých se PCR amplifikoval fragment odpovídající velikosti - 1401 bp u DS47 a 1362 bp u IDGF3. Pozitivní kolonie (kolonie č. 14 u DS47 a č. 11 u IDGF3) bakterií byly kultivovány a byl z nich izolován rekombinantní plazmid pBlueScript SK+ obsahující požadovaný gen.

Izolovaný plazmid byl rozštěpen restrikcími enzymy odpovídajícími restrikcími místům lemužícím sekvenci genu. Stejnými restrikcími enzymy byl rozštěpen i plazmid pFastBac. Fragmenty štěpené DNA byly odděleny elektroforézou na gelu z agarózy s nízkým bodem tání, z něhož byly separovány konstrukty genů a linearizované vektory pFastBac. Bločky agarózy byly rozpuštěny, naředěny a úspěšně ligovány za vytvoření rekombinantních plazmidů pFastBac. Přítomnost genu byla zjištěna pomocí PCR s použitím "Forward" primeru z plazmidu a "Reverse" z vložené sekvence (Obr. 3).



Obr. 3: Výsledky PCR z bakteriálních kolonií (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) transformovaných plazmidem pFastBac za použití primerů z vloženého fragmentu s klonovaným genem a z plazmidu pFastBac. A – DS47: 2 - negativní kolonie; 1, 3-8 - pozitivní kolonie. B – IDGF3: 1-8 – pozitivní kolonie.

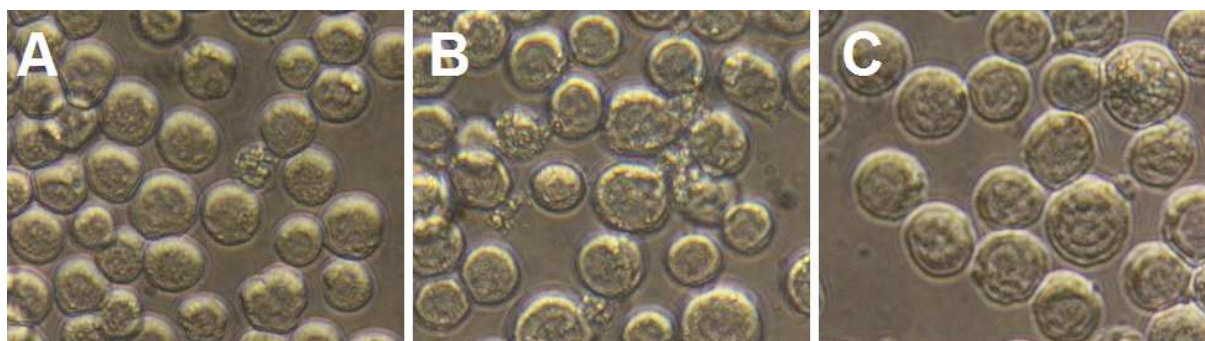
Byly získány bakteriální kolonie pozitivní pro geny DS47 i IDGF3, které byly dále kultivovány (kolonie č. 1 u obou genů) a byly z nich získány rekombinantní plazmidy pFastBac. Tyto plazmidy byly použity k transformaci bakterií *E. coli* DH10 Bac<sup>TM</sup>, v nichž proběhla rekombinace, díky které se sekvence genů dostaly do bakmidu. Narostlé kolonie byly otestovány pomocí PCR s použitím primerů "pUC/M13 Forward" a "pUC/M13 Reverse" (Obr. 4). Předpokládaná délka fragmentu vzniklého u bakterií, ve kterých neproběhla rekombinace, byla přibližně 300 bp, zatímco z pozitivních kolonií měly u obou klonovaných genů reakcí PCR vzniknout fragmenty o délce zhruba 3500 bp.



Obr. 4: PCR z kolonií *E. coli* DH10 Bac™ s primery pUC/M13 Forward a pUC/M13 Reverse. I14-I24 – bakterie obsahující sekvenci IDGF3 (u I19 neproběhla reakce PCR, I22 obsahuje směs pozitivních a negativních buněk); D1, D2 – bakterie obsahující sekvenci DS47 (obě pozitivní).

U obou klonovaných genů byly nalezeny pozitivní kolonie, které byly dále kultivovány. Z takto kultivovaných buněk *E. coli* DH10 Bac™ byly pak izolovány rekombinantní bakmidy.

Bakmidy obsahující upravené kódující sekvence genů DS47 a IDGF3 byly použity k transfekci buněk Sf9 na 6-jamkové misce. 5 dní po transfekci bakmidem byly na buňkách pozorovány známky bakulovirové infekce - kvůli bloku apoptózy zvětšený objem a výrazněji granulární vzhled oproti neinfikovaným buňkám, který je způsoben pučením virových částic (Obr. 5). Médium z těchto buněk bylo sebráno a uloženo jako "P1 stock".



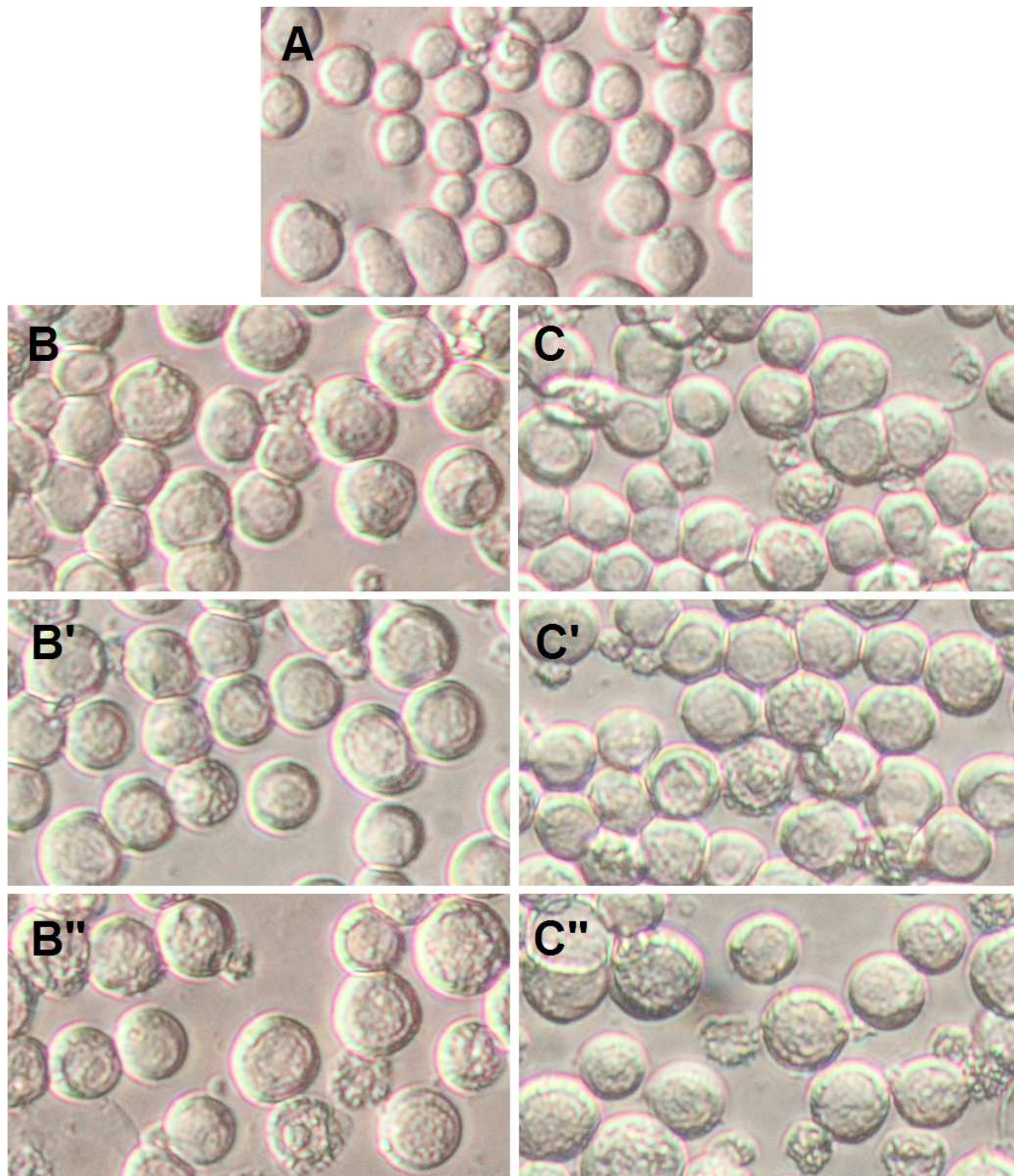
Obr. 5: Buňky Sf9 5. den po transfekci bakmidy obsahujícími konstrukt pro syntézu proteinů DS47 a IDGF3 (zvětšení 200×). Transfekované buňky mají oproti netransfekovaným větší objem a jejich povrch je na pohled "drsnější". Jde o projev infekce bakulovirem, který v buňce blokuje apoptózu a poté ji jeho částice opouští pučením. A – netransfekované buňky (negativní kontrola); B – DS47; C – IDGF3.

"P1 stock" byl pak použit pro zvýšení titru bakulovirových částic. Na 6-jamkové misce jím byly infikovány buňky Sf9 v koncentracích 0,1  $\mu$ l, 1  $\mu$ l a 10  $\mu$ l na 800 000 buněk. Po 3 dnech od infekce byl vyhodnocen vzhled buněk (Obr. 6) a určena koncentrace P1, při které dochází k požadované četnosti infekce buněk (MOI = 0,1). Při této hodnotě MOI dochází k tomu, že většina buněk nebo všechny vykazuje známky virové infekce, tedy že má zvětšený objem a více granulární vzhled než neinfikované buňky, ale ještě nedochází k rozpadu buněk.



Titr virového P1 stocku byl pomocí vzorce:  $\text{objem inokula [ml]} = (\text{MOI [počet virových částic na buňku]} \times \text{počet buněk}) / \text{titr virového stocku [počet virových částic/ml]}$  stanoven jako 80 000 000 virů/ml.

Médium z buněk infikovaných "P1 stockem" bylo sebráno a uloženo jako "P2 stock".

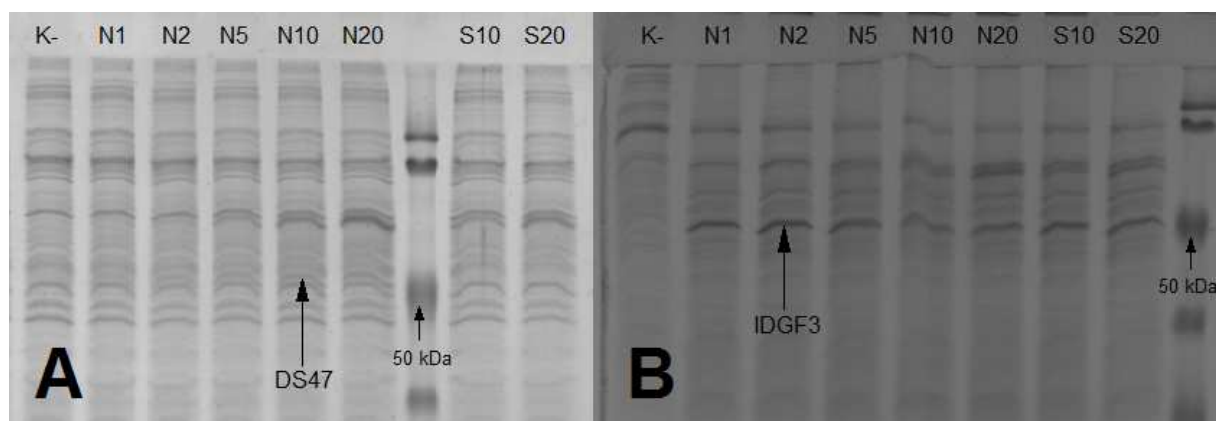


Obr. 6: Buňky Sf9 infikované "P1 stockem" (zvětšení 200x). V každé jamce bylo 800 000 buněk, které byly infikovány různými objemy "P1 stocku". Podle vzhledu buněk byla hledána optimální koncentrace "P1 stocku" pro amplifikaci virových částic, tedy taková, při které mají všechny buňky oproti neinfikované kontrole zvětšený objem a hrubší povrch, ale zároveň ještě nedochází k jejich lyzi. A – neinfikovaná kontrola; B – DS47 (B - 0,1 μl "P1 stocku", B' - 1 μl "P1 stocku", B'' - 10 μl "P1 stocku"); C – IDGF3 (C - 0,1 μl "P1 stocku", C' - 1 μl "P1 stocku", C'' - 10 μl "P1 stocku").

"P2 stockem" byly následně na 24-jamkové destičce infikovány buňky "High Five", aby byla zjištěna jeho schopnost iniciovat syntézu rekombinantního proteinu. Objemy použitého "P2 stocku" byly 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l a 20  $\mu$ l na přibližně 600 000 buněk. Po 3 dnech inkubace ve 28 °C bylo z buněk odebráno médium a analyzováno SDS-PAGE.

Protože v médiu buněk "High Five" infikovaných "P2 stockem" bylo možné potvrdit přítomnost rekombinantních proteinů, mohla být zahájena příprava k jejich syntéze ve větším objemu a následné izolaci. Nejprve byl získán větší objem (přibližně 50 ml) "P2 stocku" infikací buněk Sf9 "P1 stockem" o koncentraci 1  $\mu$ l na 800 000 buněk.

Tento nový "P2 stock" byl znovu otestován na buňkách "High Five", aby mohla být určena optimální koncentrace pro co nejefektivnější produkci rekombinantních proteinů. Buňky byly před rozdělením do jamek 24-jamkové misky spočítány v Bürkerově komůrce, aby při pozdější infekci mohl být určen nejvhodnější poměr mezi počtem buněk a množstvím bakulovirového "P2 stocku". Při testování syntézy proteinu DS47 byla koncentrace buněčné suspenze 420 000 buněk na jamku, zatímco u IDGF3 to bylo 320 000 buněk na jamku. Testovaný "P2 stock" byl použit v objemech 1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l a 20  $\mu$ l na jamku. Jako kontrola posloužil již dříve vyzkoušený "P2 stock" v množstvích 10  $\mu$ l a 20  $\mu$ l na jamku. Přítomnost a přibližné množství rekombinantního proteinu byly zjištěny pomocí SDS-PAGE (Obr. 7).



Obr. 7: SDS-PAGE z média buněk "High Five" infikovaných "P2 stockem". A - protein DS47 (koncentrace buněk byla 420 000 na jamku); B - protein IDGF3 (koncentrace buněk byla 320 000 na jamku); K- - negativní kontrola (neinfikované buňky), N1-N20 - buňky infikované nově připraveným "P2 stockem" v objemech 1-20  $\mu$ l, S10 a S20 - buňky infikované již vyzkoušeným "P2 stockem" v objemech 10  $\mu$ l a 20  $\mu$ l. U proteinu DS47 (A) je vidět vliv koncentrace "P2 stocku" na množství vzniklého proteinu. S proteinem IDGF3 (B) se závislost množství exprimovaného proteinu na koncentraci inokula nalézt nepodařilo.

Po určení optimální koncentrace inokula pro expresi rekombinantních proteinů byly rozpěstovány buňky "High Five" do velkého množství. U DS47 bylo získáno zhruba 250 ml suspenze buněk "High Five" o koncentraci 1 240 000 buněk/ml, která byla infikována "P2

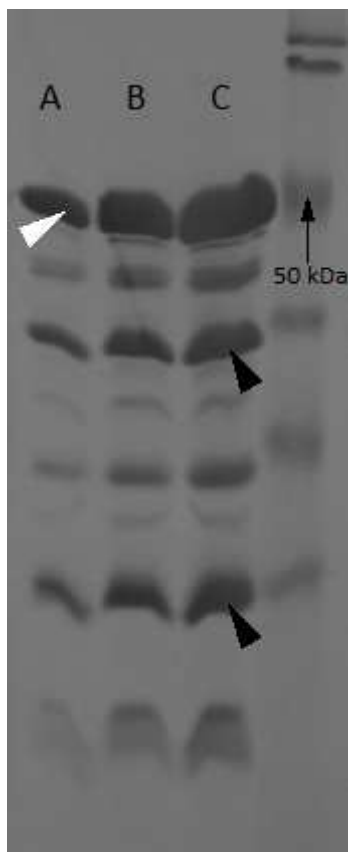
stockem" o koncentraci 10  $\mu$ l na 420 000 buněk. V případě IDGF3 byla kvantifikace "P2 stocku" pro infekci buněk "High Five" komplikovanější, protože při testování jeho účinnosti nebyla pozorována závislost množství rekombinantního proteinu na koncentraci virových částic. Odhadem byla zvolena koncentrace 2  $\mu$ l "P2 stocku" na 320 000 buněk. Touto koncentrací "P2 stocku" bylo infikováno přibližně 150 ml suspenze buněk "High Five" o koncentraci 640 000 buněk/ml. Protože množství izolovaného proteinu IDGF3 nebylo příliš velké, byla provedena druhá izolace. Při ní bylo použito asi 200 ml suspenze buněk "High Five" o koncentraci 740 000 buněk/ml. Množství "P2 stocku" pro infekci bylo oproti první izolaci ztrojnásobeno.

U proteinu DS47 byly dialýzou v PBS zbaveny imidazolu 3 frakce, které byly podle spektrofotometrického měření koncentrace proteinů nejsilnější (Obr. 8). Při první izolaci IDGF3 byla dialýzou v PBS zbavena imidazolu nejsilnější frakce (frakce 1A - Tab. III) a směs těch ostatních (frakce 1B - Tab. III), která byla po dialýze zakoncentrována pomocí ultrafiltrace. Ve druhé izolaci IDGF3 měly podle výsledků spektrofotometrie všechny frakce nízkou koncentraci (v žádné frakci hodnota absorbance nepřesáhla 0,5), a proto byly spojeny dohromady, dialyzovány a zakoncentrovány pomocí centrifugačního filtru (frakce 2A - Tab. III).

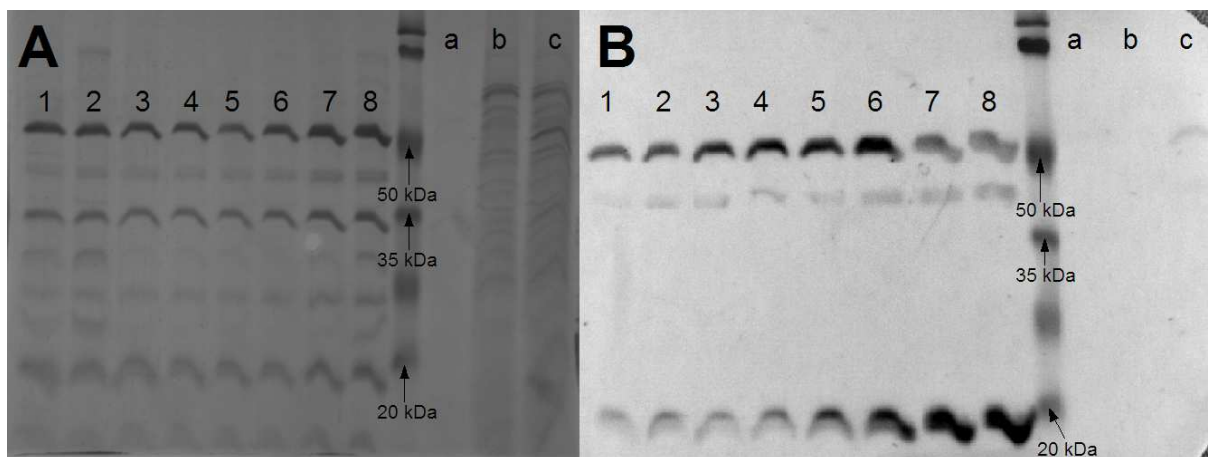
Izolované proteiny byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a metody Western blot, aby bylo potvrzeno, že byl skutečně izolován požadovaný protein (Obr. 9, Obr. 10). U proteinu DS47 byly pro Western blot (Obr. 9B) použity pouze frakce, které nebyly dialyzovány, ale podle uspořádání pruhů na SDS-PAGE obsahovaly stejné proteiny jako dialyzované frakce (Obr. 8).

Na fotografiích polyakrylamidových gelů s izolovaným DS47 je jasně patrný větší počet pruhů než jeden (Obr. 8, Obr. 9A). Podle velikosti dvou pruhů (označené černými trojúhelníky na Obr. 8), z nichž jeden je barven protilátkou (Obr. 9B), lze odvodit, že protein DS47 je v určitém místě proteolyticky štěpen. Další méně výrazné pruhy představují pravděpodobně proteiny nespecificky vázané na niklovou agarózu při izolaci. Jeden z těchto pruhů byl viditelný i při detekci protilátkou (Obr. 9B), takže není zcela vyloučené ani méně časté štěpení proteinu v jiném místě.

Srovnáním směsi média z buněk "High Five" před a po průtoku kolonkou (Obr. 9A - dráhy b, c) lze vyvodit, že protein byl na niklovou agarózu úspěšně navázán a nedošlo k žádné větší ztrátě. Ani ve vzorku z promývacího pufru po průtoku kolonkou (data neukázána) nebyl žádný protein pozorován. To znamená, že účinnost izolace byla velmi vysoká.



Obr. 8: SDS-PAGE dialyzovaných frakcí (A, B, C) izolovaného proteinu DS47. Bílým trojúhelníkem je označen nedegradovaný protein, černé trojúhelníky rozštěpený protein DS47. Ostatní pruhy tvoří neidentifikované proteiny.

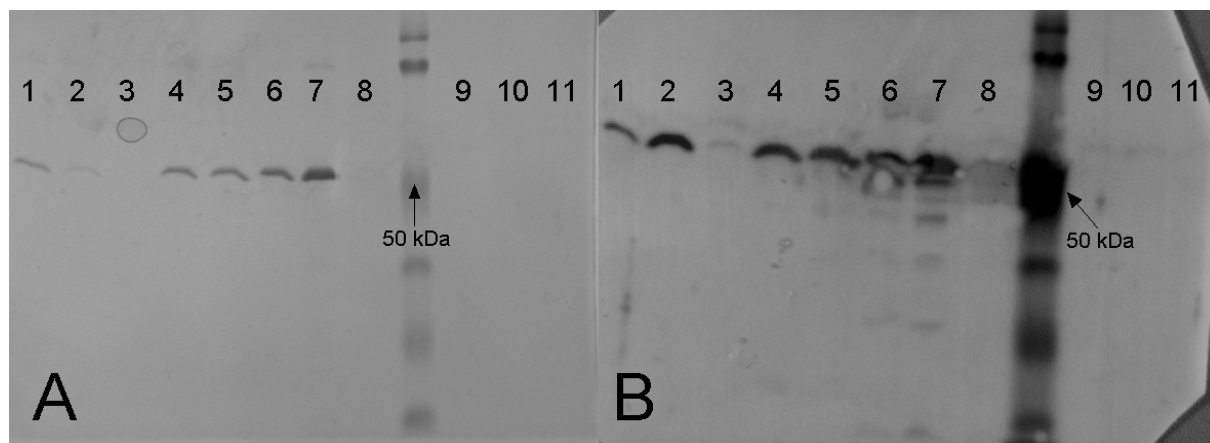


Obr. 9: Izolovaný protein DS47. A - polyakrylamidový gel barvený "Coomassie Brilliant Blue"; B - Western blot (překryv snímku bioluminiscence a fotografie ve viditelném světle); 1-8 - nedialyzované frakce izolovaného proteinu, a - rekombinantní protein IDGF2, b - médium z buněk "High Five", které při izolaci protéklo kolonkou, c - směs vazebné agarózy s médiem z buněk "High Five" před průtokem kolonkou. Na snímku barveného polyakrylamidového gelu (A) je vidět více pruhů, z nichž některé při Western blotu (B) vázaly protilátku proti DS47. Z toho vyplývá, že protein byl zřejmě částečně degradován. Při srovnání média z buněk "High Five" s vazebnou agarózou (c) a téhož média po průchodu kolonkou (b) je vidět, že rekombinantní protein DS47 byl na agarózu úspěšně navázán a při nanášení na kolonku nedošlo k žádné ztrátě.



Protein IDGF3 byl oproti DS47 získán ve velmi čisté formě téměř bez degradace, ale výtěžek byl nižší. SDS-PAGE ukazuje jeden pruh o správné velikosti (Obr. 10A) a Western blot potvrzuje, že se skutečně jedná o protein IDGF3 (Obr. 10B).

Pomocí SDS-PAGE a Western blotu byly analyzovány i médium a promývací pufr, které při izolaci protekly kolonkou, a kapalina odstraněná při zakoncentrování proteinu filtrem (Obr. 10 - dráhy 9, 10, 11). V žádném z těchto vzorků nebyl protein IDGF3 nalezen, což znamená, že při izolaci ani při zakoncentrování nedocházelo k žádné výraznější ztrátě



Obr. 10: Izolovaný protein IDGF3. A - polyakrylamidový gel barvený "Coomassie Brilliant Blue"; B - Western blot (překryv snímku bioluminiscence a fotografie ve viditelném světle); 1-5 - nedialyzované frakce izolovaného proteinu, 6 – nezakoncentrovaná frakce rekombinantního proteinu IDGF3 (frakce 1A), 7 - zakoncentrovaná frakce proteinu IDGF3 (frakce 1B), 8 - směs vazebné agarózy s médiem z buněk "High Five" před průtokem kolonkou, 9 – promývací pufr proteklý kolonkou, 10 - médium z buněk "High Five", které při izolaci proteklo kolonkou, 11 – kapalina proteklá filtrem při zakoncentrování. Narozdíl od barveného gelu (A), na snímku Western blotu (B) je patrných několik slabších pruhů. Pravděpodobně jde o degradační produkty, jejichž podíl je ale v celkovém množství proteinu zanedbatelný. Ve vzorcích promývacího pufru (9) a média z buněk "High Five" (10), které při izolaci protekly kolonkou, nebyl přítomen žádný protein. Stejně tak nebyl žádný protein ani v tekutině, která protekla filtrem při zakoncentrování. To znamená, že při izolaci ani při zakoncentrování nedošlo k žádné větší ztrátě proteinu.

Koncentrace purifikovaných frakcí izolovaných proteinů byla určena Bradfordovou metodou (Tab. III)

Tab. III: Výtěžky izolací DS47 a IDGF3. Koncentrace purifikovaných frakcí DS47 a IDGF3 byly změřeny Bradfordovou metodou.

Protein	Izolace	Frakce	Koncentrace [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Objem proteinového roztoku [ $\mu\text{l}$ ]
DS47	1	A	0,04	~1000
		B	0,31	~900
		C	0,63	~1300
IDGF3	1	A	0,02	~400
		B	0,16	~400
	2	A	0,40	~400

Výsledky funkčního testu proteinů jsou uvedeny pouze v nezkrácené verzi této práce.

## 5. Diskuse

### 5.1. Izolace proteinů

Klonováním v bakteriích *E. coli* byly získány rekombinantní konstrukty cDNA z DS47 a IDGF3 pro tvorbu rekombinantních bakulovirů. Ve tkáňových kulturách hmyzích buněk pak byly připraveny bakuloviry, které byly použity k expresi rekombinantních proteinů DS47 a IDGF3.

Bakulovirovým expresním systémem syntetizované proteiny DS47 a IDGF3. byly izolovány a purifikovány. Podle jejich velikosti zjištěné SDS-PAGE (Obr. 8, Obr. 9A, Obr. 10A) a pomocí protilátky (Obr. 9B, Obr. 10B), bylo potvrzeno, že byly skutečně izolovány požadované proteiny. Těmito metodami bylo rovněž prokázáno, že nedošlo k žádné výrazné ztrátě proteinu při navazování na niklovou agarózu a při promývání kolonky (Obr. 9 - dráha b, Obr. 10 - dráhy 9, 10, 11).

Výtěžky izolací byly proměnlivé (Tab. III). Zatímco protein DS47 byl izolován v tak velkém množství (absorbance několika frakcí v  $\lambda = 280$  nm přesáhla hodnotu 0,5 a u některých frakcí byla absorbance dokonce vyšší než 2,0), že ho nebylo potřeba koncentrovat, koncentrace proteinu IDGF3 byla v obou izolacích nižší, a proto musel být protein zakonzentrován. Pro zefektivnění izolace v budoucnu bude zřejmě nutná důkladnější optimalizace spočívající v přesnějším určení množství použitého virového "P2 stocku" a doby infekce. Rovněž bude důležité získat více zkušeností s určování stádia bakulovirové infekce podle vzhledu buněk "High Five".

Oproti proteinu IDGF3, který byl získán téměř všechen v intaktní formě a jen se zanedbatelným množstvím příměsí (Obr. 10), u DS47 došlo k částečné degradaci a spolu s ním bylo izolováno několik dalších proteinů. Po pruhu odpovídajícím velikosti neštěpeného proteinu DS47 (Obr. 8, označený bílým trojúhelníkem) byly nejvýraznější dva pruhy (Obr. 8, označené černými trojúhelníky), z nichž jeden byl barven protilátkou proti DS47 (Obr. 9B). Součet velikostí těchto dvou fragmentů přibližně odpovídá velikosti intaktního proteinu. Pravděpodobně se jedná o proteolytické štěpení DS47 mezi Phe na 189. aminokyselinové pozici a Ser na pozici 190, které dá vznik dvěma fragmentům o velikostech 21 kDa a 30 kDa (včetně histidinové kotvy). Toto místo přerušení peptidového řetězce lze predikovat díky tomu, že proteolytické štěpení v odpovídajícím místě sekvence mezi aminokyselinami Phe a Thr bylo popsáno u proteinu IDGF2 (Varela et al., 2002). Této částečné degradaci proteinu DS47 by se při příští izolaci zřejmě dalo zamezit použitím inhibitorů proteáz. Existuje však i

možnost, že proteolytické štěpení má funkční význam (Vierstraete et al., 2004). V budoucnu bude třeba věnovat této hypotéze bližší pozornost.

Kromě dvou fragmentů, které jsou pravděpodobně produktem štěpení proteázou, byly ve frakcích izolovaného DS47 nalezeny ještě další proteiny, jejichž podíl v celkovém složení frakce však již není tak výrazný (Obr. 8, neoznačené pruhy). Jeden z těchto proteinů byl dokonce značen protilátkou (Obr. 9B). V tomto případě může jít buď o štěpení proteázou v jiném místě než u dvou nejvýraznějších degradačních produktů nebo o nescifickou vazbu protilátky. Další pruhy na proteinovém gelu (Obr. 8), které protilátka nedetekovala, pravděpodobně přísluší proteinům nescificky vázaným na niklovou agarózu. Této nescifické vazbě by mohlo být zabráněno zvýšením koncentrace imidazolu ve vazebném a promývacím pufru, ale je zde riziko ztrát izolovaného proteinu kvůli předčasnému uvolnění z kolonky.

Proteiny DS47 i IDGF3 se podařilo izolovat aniž by jejich funkce byla narušena. Důkazem je koncentraci úměrný vliv těchto proteinů na přežívání buněk Cl.8+ v nepříznivých podmínkách, který byl zjištěn průtokovým cytometrem a barvením TMRE (Obr. 12, Obr. 13, Obr. 15, Obr. 16).

## **5.2. Funkce proteinů DS47 a IDGF3**

Tato část diskuse je přístupná pouze v nezkrácené verzi této práce.

## **5.3. Využití rekombinantních proteinů**

Izolované rekombinantní proteiny nabízejí celou škálu možných aplikací, zkoumání jejich vlivu na buňky *in vitro* je jen jednou z nich. S purifikovaným rekombinantním proteinem je možné hledat proteiny či jiné organické molekuly, které s ním interagují, nebo ho využít jako standard při kvantifikaci tohoto proteinu *in vivo* v závislosti na různých situacích. V případě, že se podaří získat velké množství proteinu v dostatečné čistotě, je také možné určit jeho krystalovou strukturu.

Experimenty s vlivem proteinů DS47 a IDGF3 na buněčnou kulturu již byly zahájeny a první získaná data působí velmi povzbudivě, zvláště u IDGF3. Série experimentů *in vitro* již byla naší laboratoří provedena s rekombinantním proteinem IDGF2 (Brož et al., 2017) a její rozšíření o další dva členy proteinové rodiny IDGF by mělo přispět k objasnění role těchto proteinů v organismu. Protože oproti některým druhům hmyzu, které mají jen jeden protein IDGF, má *Drosophila melanogaster* šestičlennou proteinovou rodinu (Huang et al., 2006), jejíž členové mají přinejmenším částečně rozdělené funkce, bude nutné tyto proteiny mezi sebou porovnat a určit jejich rozdíly i společné rysy.

Proteiny z rodiny IDGF jsou schopny vázat cukerné struktury, což je pravděpodobně molekulárním mechanismem jejich funkce (Varela et al., 2002). Z toho důvodu je důležité zjistit jejich vazebnou specifitu. U proteinu IDGF2 již naše laboratoř získala data týkající se jím vázaného oligosacharidu (nepublikovaná data), se kterými by bylo možné informace o vazebné specifitě příbuzných proteinů porovnat.

Dalším využitím rekombinantních proteinů je kvantifikace proteinu v organismu. Proteiny IDGF jsou hojně přítomny hemolymfě a jsou známy změny jejich transkripce v reakci na různé podněty. Při použití rekombinantního proteinu o známé koncentraci jako standardu lze stanovit fyziologickou koncentraci příslušného proteinu. Stejně tak je možné učít případnou změnu exprese v definovaných podmínkách na proteinové úrovni. Tím lze získat i informace, které by byly nezjistitelné analýzou mRNA, protože k regulaci genové exprese dochází nejen na transkripční, ale i na translační úrovni.

Rekombinantní proteiny jsou velmi cenným nástrojem při studiu funkce proteinů. Existuje celá řada metod při nichž lze rekombinantní protein využít, ať už jde o sledování efektů na buněčnou kulturu, zkoumání interakcí s jinými organickými molekulami či kvantifikaci. Získání rekombinantních proteinů DS47 a IDGF3 poskytlo mnoho možností pro budoucí výzkum proteinové rodiny IDGF.

## 6. Závěr

Podařilo se připravit expresní konstrukty, které obsahovaly sekvence kódující proteiny DS47 a IDGF3. Tyto konstrukty byly použity k vytvoření rekombinantních bakulovirů nezbytných pro expresi proteinů.

Díky rekombinantním bakulovirům byly úspěšně získány rekombinantní proteiny DS47 a IDGF3. Tato metoda se ukázala jako vhodná pro izolaci funkčního proteinu v množství dostačujícím pro využití v experimentech, ačkoliv pro zvýšení její efektivity bude zapotřebí pečlivější optimalizace.

Funkce izolovaných proteinů byla otestována na buněčné linii Cl.8+, která se již dříve osvědčila při obdobných experimentech s rekombinantním proteinem IDGF2 (Brož et al., 2017). Prvotní experiment poskytl velmi slibné výsledky, které však ještě musí být potvrzeny jeho opakováním. Data získaná prvním z řady experimentů s rekombinantními proteiny naznačují, že oba zvyšují životaschopnost buněk v nepříznivých podmínkách. Zvláště u IDGF3 byl pozorován velmi silný efekt.

Kromě studia vlivu DS47 a IDGF3 *in vitro* jsou s rekombinantními proteiny plánovány další experimenty. Mimo jiné je to určení specifity jejich cukr vázajícího místa a kvantifikace těchto proteinů *in vivo*. Lze tedy říci, že izolace rekombinantních DS47 a IDGF3 byla důležitým krokem ve výzkumu proteinů z rodiny IDGF, kterému se naše laboratoř věnuje.

## 7. Seznam použitých zkratek

Ado - adenosin

APS - persulfát amonný

CLP - "Chitinase-like" protein

DMSO - dimethylsulfoxid

FBS - fetální bovinní sérum

IDGF - "Imaginal Disc Growth Factor" (růstový faktor imaginálních disků)

IPTG - Izopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid

MAPK - mitogenem aktivovaná protein kináza

MMP - mitochondriální membránový potenciál

MOI - "Multiplicity of Infection" (četnost infekce)

PAGE - polyakrylamidová gelová elektroforéza

PCR - "Polymerase Chain Reaction" (polymerázová řetězová reakce)

SDS - dodecylsírán sodný

TMRE - tetrametylrodamin metylester

## 8. Seznam literatury

- Areshkov, P. O.; Avdieiev, S. S.; Balynska, O. V.; Leroith, D.; Kavsan, V. M. (2012): Two Closely Related Human Members of Chitinase-like Family, CHI3L1 and CHI3L2, Activate ERK1/2 in 293 and U373 Cells but Have the Different Influence on Cell Proliferation; *International Journal of Biological Sciences*; 8 (1); 39-48.
- Badariotti, F.; Kypriotou, M.; Lelong, C.; Dubos, M.P.; Renard, E.; Galera, P.; Favrel, P. (2006): The phylogenetically conserved molluscan Chitinase-like protein 1 (*Cg-Clp1*), homologue of human *HC-gp39*, stimulates proliferation and regulates synthesis of extracellular matrix components of mammalian chondrocytes; *The Journal of Biological Chemistry*; 281; 29583-29596.
- Blanco, E.; Ruiz-Romero, M.; Beltran, S.; Bosch, M.; Punset, A.; Serras, F.; Corominas, M. (2010): Gene expression following induction of regeneration in *Drosophila* wing imaginal discs. Expression profile of regenerating wing discs.; *BMC Developmental Biology*; 10; 94.
- Brondyk, W.H. (2009): Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein; *Methods in Enzymology*; 463; 131-147.
- Brož, V.; Kučerová, L.; Rouhová, L.; Fleischmannová, J.; Strnad, H.; Bryant, P. J.; Žurovec, M. (2017): *Drosophila* imaginal disc growth factor 2 is a trophic factor involved in energy balance, detoxification, and innate immunity; *Scientific Reports*; 7; 43273.
- Buchon, N.; Broderick, N.A.; Poidevin, M.; Pradervand, S.; Lemaitre, B. (2009): *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation; *Cell Host & Microbe*; 5 (2); 200-211.
- De Gregorio, E.; Spellman, P.T.; Rubin, G.M.; Lemaitre, B. (2001): Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays; *PNAS*; 98 (22); 12590-12595.
- Fisher, B.; Weiszmann, R.; Frise, E.; Hammonds, A.; Tomancak, P.; Beaton, A.; Berman, B.; Quan, E.; Shu, S.; Lewis, S.; Rubin, G.; Barale, C.; Laguertas, E.; Quinn, J.; Ghosh, A.; Hartenstein, V.; Ashburner, M.; Celniker, S.; (2012): BDGP insitu homepage <http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>
- Geisse, S.; Gram, H.; Kleuser, B.; Kocher, H.P. (1996): Eukaryotic Expression Systems: A Comparison; *Protein Expression and Purification*; 8; 271-282.
- Hamilton, G.; Rath, B.; Burghuber, O. (2015): Chitinase-3-like-1/YKL-40 as marker of circulating tumor cells; *Translational Lung Cancer Research*; 4 (3); 287-291.
- Huang, Z.; Hunter, W.B.; Cleland, C.A.; Wolinsky, M.; Lapointe, S.L.; Powell, C.A. (2006): A new member of the growth-promoting glycoproteins from diapreps root weevil (Coleoptera: Curculionidae); *Florida Entomologist*; 89 (2); 223-232.
- Kawamura, K.; Shibata, T.; Saget, O.; Peel, D.; Bryant, P.J. (1999): A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells; *Development*; 126 (2); 211-219.
- Kučerová, L.; Brož, V.; Arefin, B.; Maaroufi, H.O.; Hurychová, J.; Strnad, H.; Žurovec, M., Theopold, U. (2016): The *Drosophila* Chitinase-Like Protein IDGF3 Is Involved in Protection against Nematodes and in Wound Healing; *Journal of Innate Immunity*; 8 (2); 199-210.

- Kzhyshkowska, J.; Gratchev, A.; Goerdt, S. (2007): Human Chitinases and Chitinase-Like Proteins as Indicators for Inflammation and Cancer; *Biomarker Insights*; 2; 128-146.
- Lee, C. G.; Dela Cruz, C. S.; Ma, B.; Ahangari, F.; Zhou, Y.; Halaban, R.; Sznol, M.; Elias, J. A. (2012): Chitinase-like Proteins in Lung Injury, Repair, and Metastasis; *Proceedings of the American Thoracic Society*; 9 (2); 57-61.
- MacMillan, H.A.; Knee, J.M.; Dennis, A.B.; Udaka, H.; Marshall, K.E.; Merritt, T.J.; Sinclair, B.J. (2016): Cold acclimation wholly reorganizes the *Drosophila melanogaster* transcriptome and metabolome.; *Scientific Reports*; 6; 28999.
- Pesch, Y.Y.; Riedel, D.; Patil, K.R.; Loch, G.; Behr, M. (2016): Chitinases and Imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects; *Scientific Reports*; 6; 18340.
- Pirkmajer, S.; Chibalin, A.V. (2011): Serum starvation: *caveat emptor*; *American Journal of Physiology - Cell Physiology*; 301 (2); C272-C279.
- Recklies, A.D.; White, C.; Ling, H. (2002): The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways; *Biochemical Journal*; 365; 119-126.
- Reumer, A.; Bogaerts, A.; Van Loy, T.; Husson, S.J.; Temmerman, L.; Choi, C.; Clynen, E.; Hassan, B.; Schoofs, L. (2009): Unraveling the protective effect of a *Drosophila* phosphatidylethanolamine-binding protein upon bacterial infection by means of proteomics; *Developmental and Comparative Immunology*; 33 (11); 1186-1195.
- Van Oers, M.M. (2011): Opportunities and challenges for the baculovirus expression system; *Journal of Invertebrate Pathology*; 107; 3-15.
- Varela, P. F.; Llera, A. S.; Mariuzza, R. A.; Tormo, J. (2002): Crystal Structure of Imaginal Disc Growth Factor-2; *The Journal of Biological Chemistry*; 277; 13229–13236.
- Vierstraete, E.; Verleyen, P.; Sas, F.; Van den Bergh, G.; De Loof, A.; Arckens, L.; Schoofs, L. (2004): The instantly released *Drosophila* immune proteome is infection-specific; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 317; 1052–1060.
- Xiao, W.; Meng, G.; Zhao, Y.; Yuan, H.; Li, T.; Peng, Y.; Zhao, Y.; Luo, M.; Zhao, W.; Li, Z.; Zheng, X. (2014): Human Secreted Stabilin-1–Interacting Chitinase-like Protein Aggravates the Inflammation Associated With Rheumatoid Arthritis and Is a Potential Macrophage Inflammatory Regulator in Rodents; *Arthritis & Rheumatology*; 66; 1141–1152.
- Yang, X.; Zhao, Y.; Yang, X.; Kan, F. W. K. (2015): Recombinant Hamster Oviductin Is Biologically Active and Exerts Positive Effects on Sperm Functions and Sperm-Oocyte Binding; *PLoS ONE*; 10 (4); e0123003.
- Žurovcová, M.; Ayala, F. J. (2002): Polymorphism patterns in two tightly linked developmental genes, *Idgf1* and *Idgf3*, of *Drosophila melanogaster*; *Genetics*; 162 (1); 177-188.