

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Příprava a charakterizace mutantů glykoproteinu CD4 pro funkční a zobrazovací analýzu na T-buňkách

Hugo Kocek

**Praha 2018
Hlavní město Praha**

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie



Příprava a charakterizace mutantů glykoproteinu CD4 pro funkční a zobrazovací analýzu na T-buňkách

Preparation and characterization of CD4 glycoprotein mutants for functional and imaging analysis on T-cells

Autor: Hugo Kocek

Škola: Gymnázium, Praha 7, Nad Štolou 1

Kraj: Hlavní město Praha

Konzultant: Marek Cebecauer, PhD; Mgr. Daniela Glatzová

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne: Podpis:

Poděkování

V první řadě chci poděkovat **Marku Cebecauerovi, PhD** za to, že mi umožnil stát se součástí svého týmu v laboratoři Biofyzikální chemie (*UFCh J.H. AV ČR, v.v.i.*). Jeho rady a připomínky jsou vždy věcné a obohacující. Velmi si vážím času, který si vždy najde, abych s ním mohl prodiskutovat různé články a nápady. Ačkoliv jsem zatím jen středoškolák, přistupuje ke mně vždy jako k ostatním a moc si vážím jeho důvěry.

Obrovský dík patří **Mgr. Daniele Glatzové** za nesmírné množství věnovaného času, úsilí, mnoho rad a odborné vedení nejen v laboratoři, ale také při psaní této práce. Jsem jí nesmírně vděčný za veškeré informace a zkušenosti, které mi předává. V neposlední řadě jí děkuji za důvěru, jež při práci vždy pocítuji a také za to, že se se mnou dělí o své pracovní místo v laboratoři.

Další klíčovou osobou pro tuto práci je **Ing. Květoslava Stejskalová, CSc.**, jež mě představila Marku Cebecauerovi, PhD a přimluvila se za mě, čímž mi otevřela další dveře ve světě vědy, za což jsem jí velmi vděčný!

Dále chci poděkovat **Mgr. Tomáši Chumovi** za pomoc při psaní a za vše ohledně mikroskopie. A také **Mgr. Darině Majovské** za zasvěcení do práce s buňkami.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat **Mgr. Tomáši Brdičkovi, PhD** za to, že mi umožnil pracovat ve své laboratoři Leukocytární signalizace (*UMG AV ČR, v.v.i.*). Práce v této laboratoři je vždy radostí a to hlavně díky přátelskému pracovnímu prostředí, ze které všem děkuji.

Anotace

Ve své práci SOČ se zabývám CD4 receptorem, proteinem na povrchu lidských T buněk. Tento protein je důležitý při vývoji T buněk, hraje roli v jejich aktivaci a také slouží jako receptor pro vstup viru HIV do buňky. CD4 receptor obsahuje řadu potencionálních dimerizačních motivů. Mým úkolem bylo vytvořit mutantní varianty z některých předem pečlivě vybraných motivů a ocharakterizovat je pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie. Během svého výzkumu jsem rutinně pracoval s metodami genového inženýrství (*PCR, gelová elektroforéza, čištění DNA, transformace bakterií, izolace DNA a DNA sekvenace*), naučil jsem se obsluhovat konfokální mikroskop a vyhodnocovat získaná data. Data z konfokální mikroskopie odhalila zajímavé informace ohledně exprese některých vyrobených mutantních variant CD4 receptoru. V budoucnu mám v plánu studovat dimerizaci jednotlivých variant pomocí metody Western blot, a ověřit schopnost jejich vazby na značený HIV glykoprotein gp120 pomocí průtokové cytometrie.

Klíčová slova

CD4; konfokální fluorescenční mikroskopie; dimerizace

Annotation

This project deals with the CD4 receptor, which is a protein found on a subset of T-cells. CD4 is important for a development of T-cells and their activation. CD4 also serves as a receptor for the HIV virus. Receptor CD4 contains sever potential dimerization motifs. My task was to create mutant versions of certain motifs and characterize them by fluorescent confocal microscopy. For this project, I used methods of gene engineering (*i. e. PCR, gel electrophoresis, DNA purification, bacterial transformation, DNA isolation, and sequencing*). Moreover, I learned how to work with confocal fluorescent microscopy and how to evaluate results of confocal microscopy. Data obtained by the microscopy uncovered interesting information concerning an expression of some mutated versions of the CD4 receptor. In future, by the Western blot method, I plan to study dimerization of all the CD4 versions that I have created. In addition, I want to examine binding of these mutants with the HIV's gp120 surface glycoprotein by flow cytometry.

Keywords

CD4; confocal fluorescence microscopy; dimerization

Obsah

ÚVOD	9
1. TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1. Syntéza proteinů a jejich následné osudy	10
1.1.1. Proteosyntéza	10
1.1.2. Post-translační modifikace	10
1.1.3. Skládání proteinů	12
1.1.4. Lokalizace proteinů v buněčných a mimobuněčných strukturách	14
1.1.5. Kontrola kvality proteinů	16
1.1.6. Problémy s mutovanými proteiny	16
1.2. Receptor CD4 a imunitní systém	17
1.2.1. Stavba a struktura CD4	20
1.2.2. Funkce CD4	23
1.3. Fluorescenční proteiny	24
1.3.1. Historie	24
1.3.2. GFP	24
2. MATERIÁLY	26
3. METODY	28
3.1. PCR	28
3.2. Agarózová elektroforéza	29
3.3. Enzymatická restrikce DNA	30
3.4. Ligace DNA	30
3.5. Transformace bakterií	31
3.6. Testování bakteriální kolonií pomocí PCR	31
3.7. Sangerova metoda sekvenace DNA	32
3.8. Izolace plasmidů z bakteriální kultury – Midi-prep	33
3.9. Elektroporace	34
3.10. Konfokální fluorescenční mikroskopie	34
4. CHARAKTERISTIKA PŘIPRAVENÝCH KONSTRUKTŮ A VÝSLEDKY KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE	36
4.1. Mutant CD4 P396A	36
4.2. Mutant CD4 Dim7 (F417V; F418L)	38

4.3.	Mutant CD4 3F (F411V; F417V; F418L)	40
4.4.	Mutant CD4 3G (G403L; G404I; G407V).....	42
4.5.	Combi (P396A; G403L; G404I; G407V)	44
4.6.	Mutant CD4 D4 (K318E; Q344E).....	46
4.7.	Mutant CD4 D2 (C155S; C184S).....	48
5.	ZÁVĚR	50
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
6.1.	Používané odborné články.....	51
6.2.	Internetové zdroje.....	54
7.	ZDROJE OBRÁZKŮ	56
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	61
9.	PŘÍLOHY.....	63
9.1.	Mapa používaného plazmidu	63
9.2.	Používané protokoly.....	64
9.2.1.	PCR pro zavádění mutace	64
9.2.2.	Gelová elektroforéza	66
9.2.3.	Izolace DNA z gelu (kit: Zymoclean™ Gel DNA Recovery)	67
9.2.4.	DOUBLE DIGEST RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ DNA (pro pXJ41CD4 wt EGFP).....	68
9.2.5.	Ligace DNA.....	69
9.2.6.	Transformace bakterií tepelným šokem.....	70
9.2.7.	Testování kolonií bakterií pomocí PCR.....	71
9.2.8.	Izolace plazmidů z bakteriální kultury (kit: NucleoBond® Xtra Midi/Maxi).....	72
9.2.9.	Elektroporace buněk	74
9.2.10.	Příprava ibidi sklíčků na mikroskopii	75
9.3.	Seznam používaných primerů	76

Seznam používaných zkratk

AMK – aminokyselina

bp – z ang. base pair; počet párů bází

CD4 – glykoprotein vyskytující se na povrchu specifických buněk

CD4+ – specifický typ bílých krvinek s CD4 na svém povrchu

dNTPs – deoxynukleotidtrifosfáty

ER – Endoplazmatické retikulum

FRET – z ang. Förster resonance energy transfer; metoda umožňující zkoumání blízkosti určitých molekul

GA – Golgiho aparát

Lck – tyrosin kináza; zprostředkovává fosforylaci

MHC II – Hlavní histokompatibilní komplex II. třídy

PM – Plazmatická membrána

SDS PAGE – gelová elektroforéza určená pro rozdělení proteinů na základě jejich velikosti

TCR – T-buněčný receptor

wt – ang. wild type; v přírodě se vyskytující forma

Fwd primer – jeden ze dvou, kteří společně ohraničují určitou oblast

Rev primer – jeden ze dvou, kteří společně ohraničují určitou oblast

ÚVOD

Tento projekt vznikl pod záštitou **Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR**, v.v.i., pod vedením Marka Cebecauera, PhD. Spolupráce byla navázána s Oddělením leukocytární signalizace, v čele s Mgr. Tomášem Brdičkou, PhD., z **Ústavu molekulární genetiky AV ČR**, v.v.i.

Náš výzkum je zaměřen na receptor **CD4** na povrchu lidských T buněk, jehož funkce je naprosto nezbytná pro vývoj T buněk, hraje roli v jejich aktivaci a také je klíčovým komponentem pro vstup viru HIV do buňky (*Sattentau a Moore, 1993*). Charakterizace toho proteinu a správné pochopení jeho funkce je tedy nezbytné pro vývoj nových způsobů terapie nemoci AIDS, která po infekci virem HIV u lidí propuká a zatím proti ní neexistuje lék.

Cílem této práce bylo vytvoření potenciálních dimerizačních mutantů CD4 a jejich charakterizace. Celkem jsme vytvořili sedm různých konstruktů (*pět s mutací v transmembránové doméně a dva s mutací v extracelulární doméně*). Tyto konstrukty jsme transientně transfekovali do lidské T buněčné linie Jurkat a pomocí konfokální mikroskopie jsme sledovali jejich expresi a lokalizaci v živých buňkách. Mikroskopie těchto mutantních variant byla možná díky fúzi našich proteinů s fluorescenčním proteinem EGFP. Této fúze jsme dosáhli použitím technik rekombinace DNA. Použití konfokální mikroskopie nám umožnilo zobrazit jednotlivé roviny buňky, díky čemuž jsme získali detailní informace o pozorované lokalizaci jednotlivých mutantů.

V blízké budoucnosti budeme sledovat, jak jednotlivé mutace ovlivňují schopnost proteinu vázat obalový protein HIV gp120. Pro tyto účely máme v plánu použít metodu **průtokové cytometrie**. Dimerizační schopnosti CD4 wt a vytvořených mutantů máme v plánu prověřit pomocí metody **Western blot**. Abychom zjistili, jak provedené změny sekvence nativního proteinu D4 ovlivní nanoskopickou lokalizaci na cytoplazmatické membráně, provedeme **mikroskopii s vysokým rozlišením (PALM)**.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Syntéza proteinů a jejich následné osudy

1.1.1. Proteosyntéza

Proteosyntéza je zahájena transkripcí, při níž dochází, v jádře buněk, k přepisu DNA do mRNA a následně k úpravám mRNA jako je přidání 5' čepičky, poly-(A)-konce a sestřih intronů. Takto upravená mRNA je rozpoznána ribozomem a může být zahájena translace. K translaci dochází na ribozomech drsného endoplazmatického retikula, nebo volně v cytoplazmě. Většina nově translatovaných proteinů je post-translačně modifikována (viz. 1.1.2.). [1]

1.1.2. Post-translační modifikace

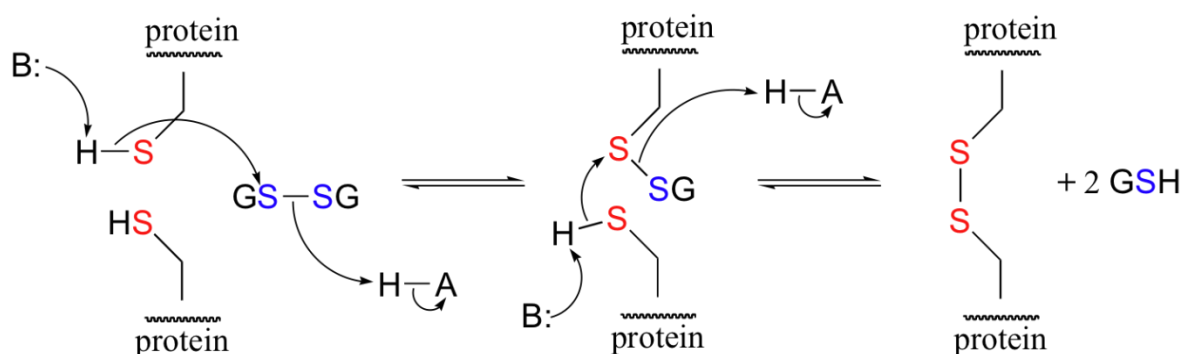
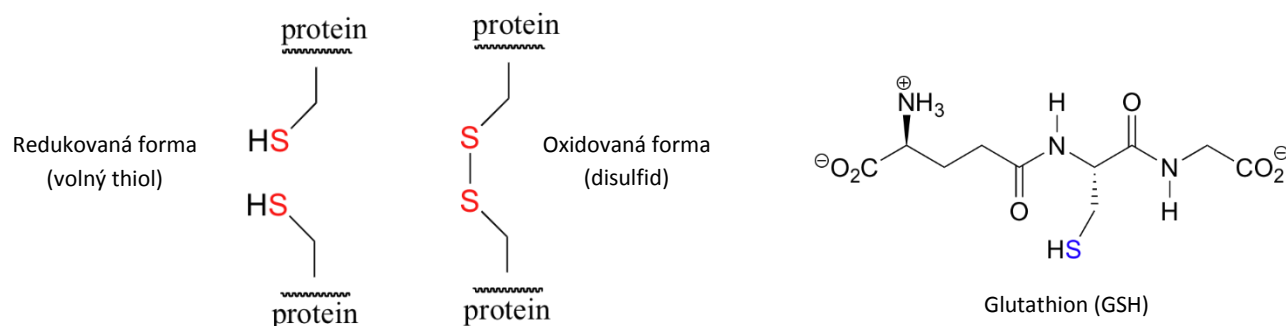
Většina nově vzniklých proteinů potřebuje být dodatečně upravena, aby byly schopné správné funkce. Existuje více než 100 známých kovalentních modifikací, kterými proteiny prochází, aby se staly „funkčními“. Mezi nejtypičtější post-translační modifikace patří fosforylace a glykosylace. [2]

Fosforylace je nejběžnější post-translační modifikace, jež podstupuje zhruba 1/3 všech proteinů. Dochází k připojení fosfátové skupiny PO_4^{3-} na aminokyseliny, které disponují nukleofilní $-OH$ skupinou, jako jsou serin, tyrosin a threonin. Enzymy zajišťující fosforylaci se nazývají kinázy. Tato modifikace je reverzibilní, fosfátová skupina může být pomocí jiného druhu enzymů (*fosfatáz*) zase odstraněna. Defosforylace je významným regulačním prvkem většiny buněčných procesů. [2]

Glykosylace spočívá v připojení sacharidů k proteinům. Probíhá v endoplazmatickém retikulu a golgiho aparátu za pomoci glykosylačních enzymů. Nejčastější typ glykosylace je N-glykosidová vazba na asparginu či argininu a O-glykosidová vazba na $-OH$ skupině serinu, threoninu tyrosinu, hydroxylysinu či hydroxyprolinu. Glykosylace hraje významnou roli v procesu kontroly kvality proteinů (viz 1.1.5.) [2]

Lipidová modifikace proteinů má za úkol zvýšit afinitu bílkovin vůči biomembránám. Rozeznáváme řadu různých modifikací, např.: myristoylaci (*připojení myristátu; C14*), palmitoylaci (*připojení palmitátu; C16; reversibilní*), isoprenylaci či prenylaci (*přidání isoprenoidové skupiny*), glypidace – připojení glykosylfosfatidylinositolové kotvy (*GPI*) přes amidovou vazbu na C-terminální konec. [2]

Vznik **disulfidických můstků** (-S-S-), mezi dvěma cysteiny, pomáhá proteinům získat jejich požadované prostorové uspořádání. V buňce vznikají pouze v endoplazmatické retikulu z důvodu přítomnosti vhodného redoxního prostředí pro oxidaci thiolů. Jako redoxní činidlo obvykle vystupuje glutathion (*GSH*), respektive jeho oxidovaná dimerní forma (*GSSH*). Disulfidové můstky se vyskytují v lumenálních prostorech a v extracelulárních doménách proteinů. Důvodem je fakt, že v buňkách je udržována vysoká hladina *GSH* (*redukční prostředí*) a thioly jsou tak udržovány redukované. [3]



Obrázek 1 – proces vzniku disulfidového můstku [1]

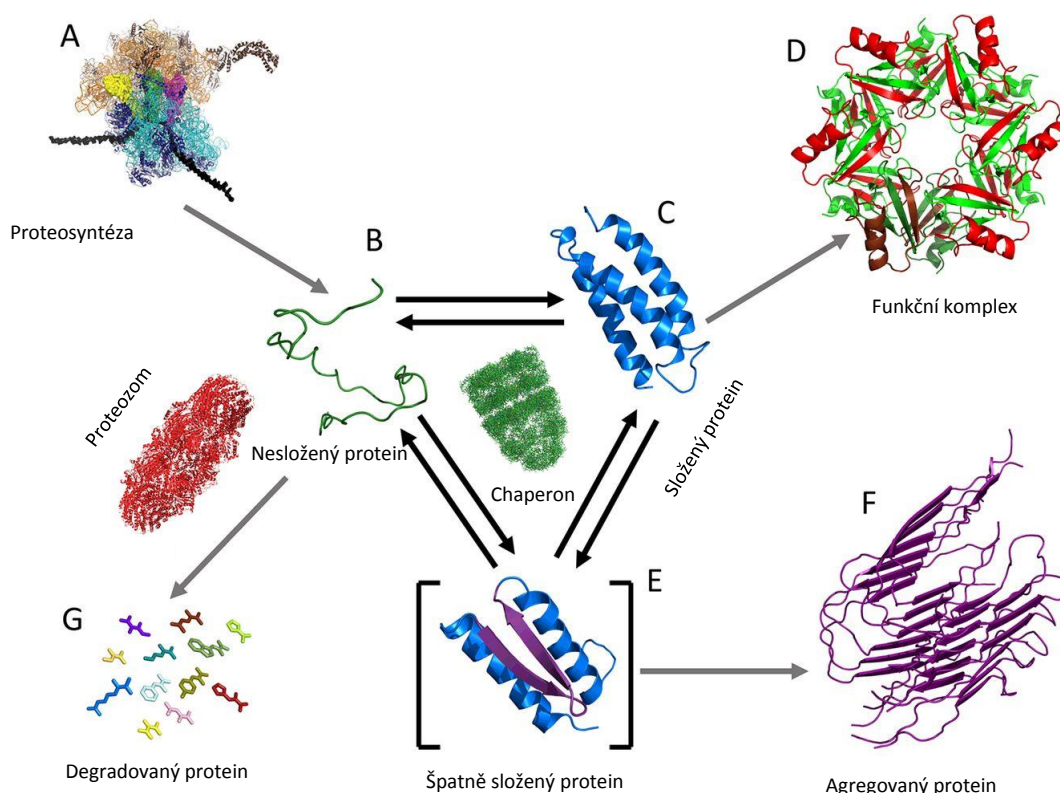
Mezi další relativně běžné úpravy patří **methylace** (přidání $-CH_3$ skupiny; obvykle probíhá na lysinu či argininu), **acetylace** (přidání CH_3CO – residua; může být navázáno na N-konec proteinu či na lysin), **hydroxylace** (připojení $-OH$ skupiny), **proteolýza** (odštěpení části proteinu), **ubiquitinace** (zpravidla se ubiquitin navazuje na proteiny určené k degradaci),... [2]

1.1.3. Skládání proteinů

Pouhá primární struktura proteinu (*tj. pořadí aminokyselin*) neuděluje bílkovinám jejich charakteristické vlastnosti a funkce – klíčová je jejich 3D struktura. Na obrázku č. ZX můžeme vidět schéma skládání proteinů – již v průběhu translace (*mRNA* → *protein*) je nově syntetizovaný protein připojen k chaperonu¹, aby nedocházelo k jeho samovolnému skládání (A). Pokud je nově syntetizovaný protein v pořádku, dochází k jeho složení (C). Tímto dochází ke snížení entropie, protein získává správnou prostorovou konformaci a může se stát součástí většího celku – komplexu (D).

Životnost proteinů, a jejich biologická aktivita, je kontrolována rovnovážným stavem mezi složenou a nesloženou formou proteinu, protože proteazomy štěpí proteiny v jejich nesložené konformaci (G).

Během skládání proteinů může docházet k chybám, a vniká tak protein se špatnou terciální strukturou (E). Takto vzniklé proteiny mohou vést ke vzniku toxických agregátů (F). Avšak tato chyba může být zvrácena – protein je možné zreorganizovat.



Obrázek 2 – proces skládání proteinů [2]

¹ Chaperon – protein zodpovědný za skládání proteinů do jejich správného prostorového uspořádání

1.1.3.1. Chemie struktury proteinů

Za procesem skládání proteinů (viz 3.3.3.) se skrývá řada chemických interakcí a vazeb, které určují, jak se určité oblasti budou chovat a interagovat mezi sebou.

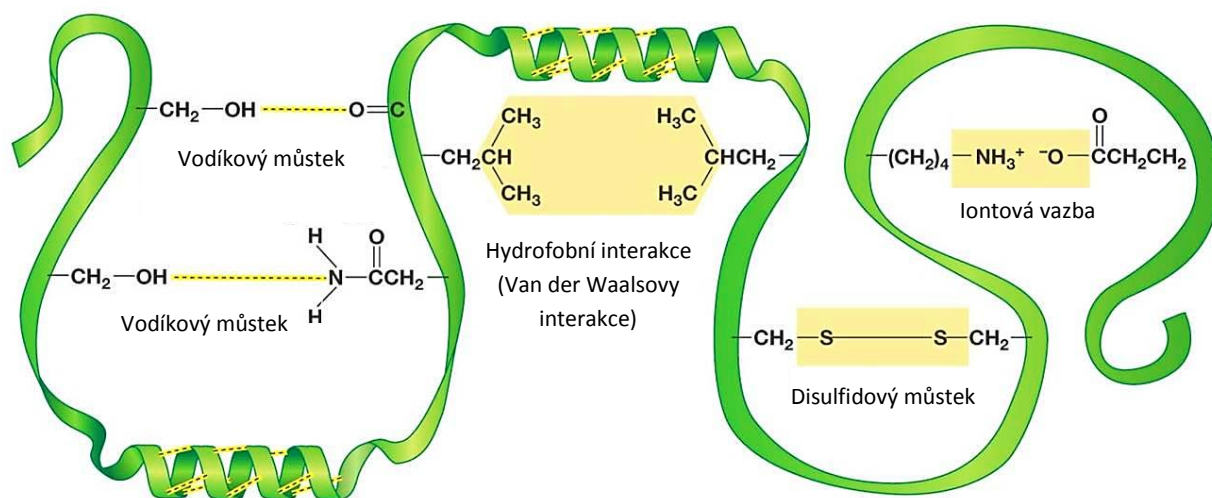
Fakt, že naše buňky jsou tvořeny vodním prostředím, vede k tomu, že aminokyseliny s hydrofobními postranními řetězci (tj. alanin, valin, isoleucin, leucin, methionin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan) budou mít tendenci zanořit se dovnitř proteinu, aby byly „v bezpečí“ bezvodého prostředí. Naopak aminokyseliny s polárním postranním řetězcem budou mít tendenci se „rvát“ k povrchu, aby byly u vody. Mezi jednotlivými hydrofobními zbytky může docházet k **hydrofobním interakcím** (Van der Waalsova intakce).

Další charakteristickou interakcí je vytváření **vodíkových můstků**. Ty vznikají mezi vodíkem a silně elektronegativním prvkem (v případě proteinů to je O a N). Vodíkové můstky stabilizují například strukturu α -helixu.

Aminokyseliny s nabitými postranními řetězci mezi sebou mohou vytvářet **iontové vazby**, kde $-\text{NH}_3^+$ a $-\text{COO}^-$ společně kooperují. Mezi kladně nabitými AMK řadíme arginin, histidin a lysin. Naopak mezi záporně nabitými AMK řadíme kyselinu glutamovou a asparagovou.

Kovalentní vazby mezi sebou mohou vytvářet thioley ($-\text{SH}$), tedy AMK serin. Vznikají tak **disulfidové můstky**, avšak ty v proteinech nezvykají spontánně, ale za účasti činidel (viz 1.1.2.).

Poslední „chemickou silou“, jež může ustalovat strukturu proteinů je **patrová interakce** mezi benzenovými jádry. Ty nacházíme u fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu.



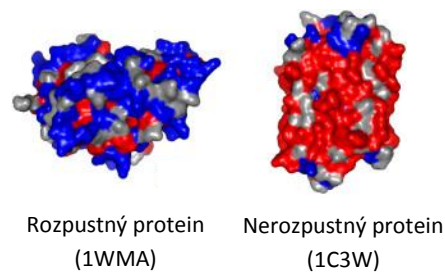
Obrázek 3 – chemické interakce v rámci proteinů [3]

1.1.4. Lokalizace proteinů v buněčných a mimobuněčných strukturách

Poté, co je protein vyroben, musí být dopraven na místo určení. Velmi obecně můžeme rozdělit proteiny podle toho, jaký mají vztah k vodnímu prostředí, na hydrofilní (*rozpuštěné*) a membránové (*s jistou mírou hydrofobicity – ta determinuje protein k lokalizaci v membránách*).

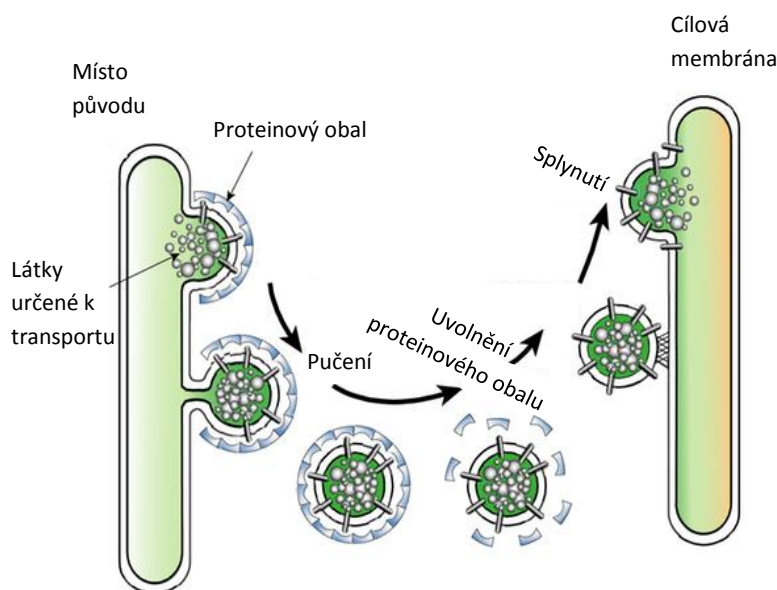
Zaměříme-li se na proteiny cytoplasmatické membrány, jejich cesta začíná na drsném **endoplazmatickém retikulu (1)**, kde jsou syntetizovány a také zde dochází k modifikacím (*např.: glykosylace*). Pomocí tzv. **pučení** (*obr. 5*) membrány ER dochází k odštěpení váčku (**2**), který následně putuje do Golgiho aparátu. Proces pučení je zprostředkováván pomocí proteinového lešení – typicky vytvářeny coatomerními proteiny (*COP*), caveolinem, clathrinem (*Huotari a Helenius, 2011*).

V **Golgiho komplexu (3)** jsou proteiny dále upravovány (*např.: proteolytické štěpení, glykosylace*), přechovávány a postupují od *cis* k *trans* straně. V tomto momentu jsou proteiny připravené být exportovány na místo určení. Pokud se jedná o přesně kontrolovanou a podmíněnou sekreci (*např.: sekrece protilátek*), bavíme se o regulované sekreci. Naopak transport běžných proteinů je označován za **sekreci konstitutivní (5)** (*Huotari a Helenius, 2011*).

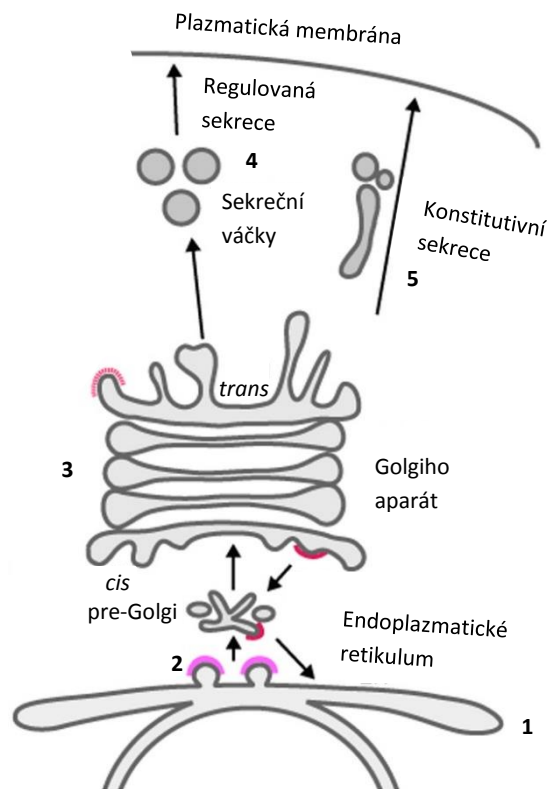


Hydrofilní/hydrofobní/neutrální část

Obrázek 4 – rozdíl mezi rozpuštěným a nerazpuštěným proteinem [4]



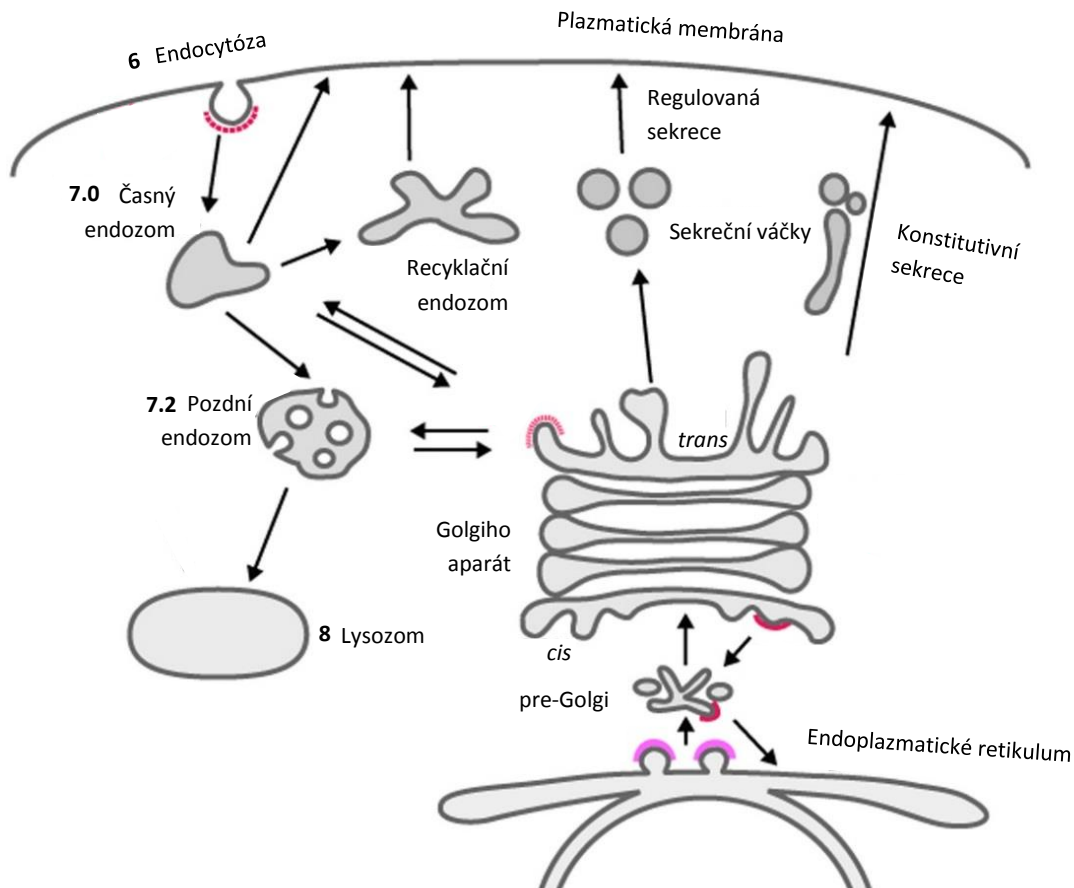
Obrázek 6 – proces vezikulárního transportu [6]



Obrázek 5 – transport proteinů z ER [5]

Endocytóza neboli invaginace cytoplazmatické membrány (6) je proces, jenž umožňuje buňkám regulovat počet membránových receptorů na povrchu a internalizovat extracelulární komponenty. Vzniklý váček následně fúzuje s **časným endozomem** (ČE; 7.0). Pohlcené receptory a lipidy, pokud jsou v pořádku, se navrací zpět na membránu, nebo pod ní mohou čekat na signál pro splynutí. Molekuly, které nejsou určeny k recyklaci, zůstávají v časném endozomu do té doby, dokud se nestane pozdním endozomem (Huotari a Helenius, 2011).

Pozdní endozom (PE; 7.2) vzniká, řadou řadou reakcí, z časného endozomu. Jeho vnitřní prostředí je kyslejší než u ČE ($pH\ 6.8-5.9 \rightarrow pH\ 6.0-4.9$), což vede k vyššímu stupni degradace jeho obsahu. Oddělují se od něj receptory, které se zrecyklují. Pozdní endozom splyne s lysozomem (8), jenž obsahuje spousty lytických molekul. Kyselost v této organelle je opět vyšší než v PE (pH může klesnout až na hodnotu 4.5). Dochází zde k degradaci biopolymerů (Huotari a Helenius, 2011).



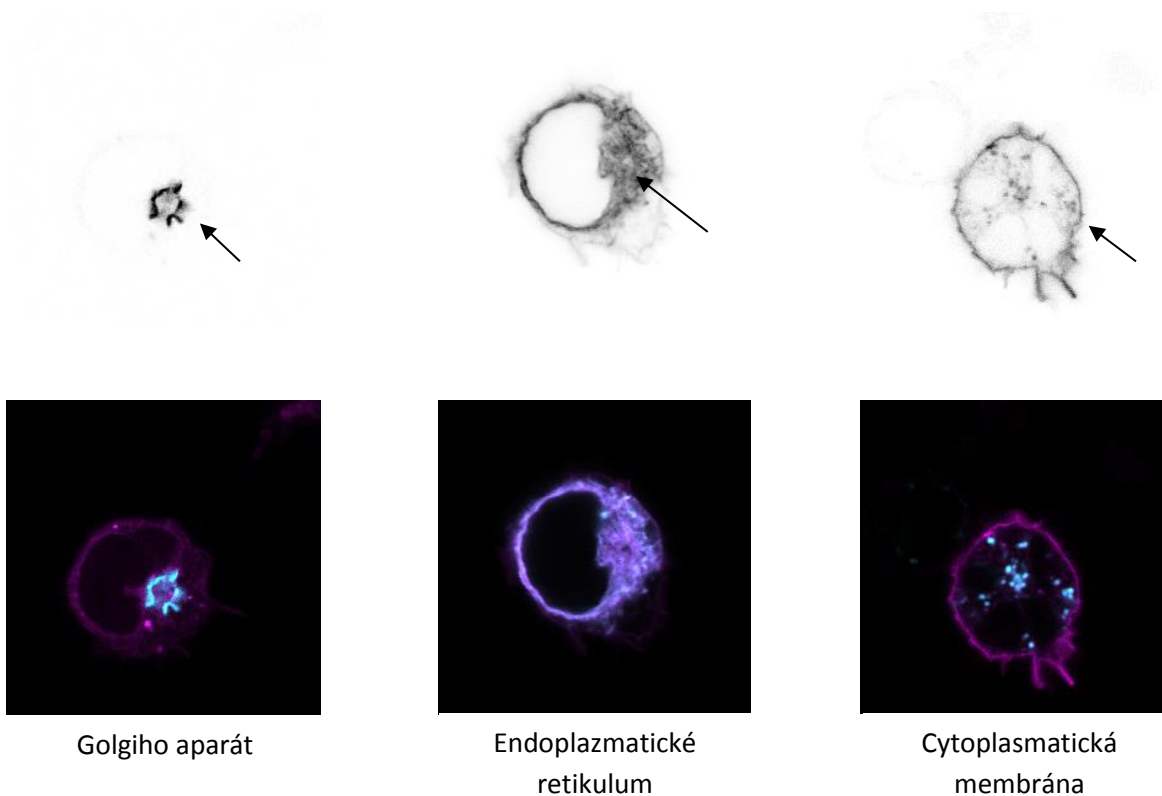
Obrázek 7 – proces recyklace [5]

1.1.5. Kontrola kvality proteinů

Nově syntetizovaný protein je translokován do endoplazmatického retikula, kde se uspořádá do nativní konformace. V ER je silně oxidační prostředí důležité pro vznik disulfidových můstků, které stabilizují nativní strukturu proteinu. Endoplazmatické retikulum je také schopné rozpoznat proteiny, které se nesložily do své správné konformace. Takové proteiny vystavují na svém povrchu hydrofobní sekvence, na které se vážou specifické chaperony a brání jim tak v pokračování sekretorickou drahou. Během každého pokusu o zaujmutí správné konformace je proteinu uštěpnut jeden cukerný zbytek. Pokud jsou proteinu uštěpnuty všechny příslušné cukerné zbytky, je určen k degradaci (*Chen et al, 2011*).

1.1.6. Problémy s mutovanými proteiny

Buňka je velmi chytrá – pokud za účelem cílené mutagenese zasáhneme příliš do struktury proteinu, jenž studujeme, buňka jej vyhodnotí jako chybný a bude zastaven ve své cestě do cílové struktury. Na obrázku níže můžeme vidět, jak vypadají mikroskopické snímky buněk, které zastavily studovaný (*mutovaný*) protein v GA a ER versus sorting wt (*původního*) proteinu na PM.



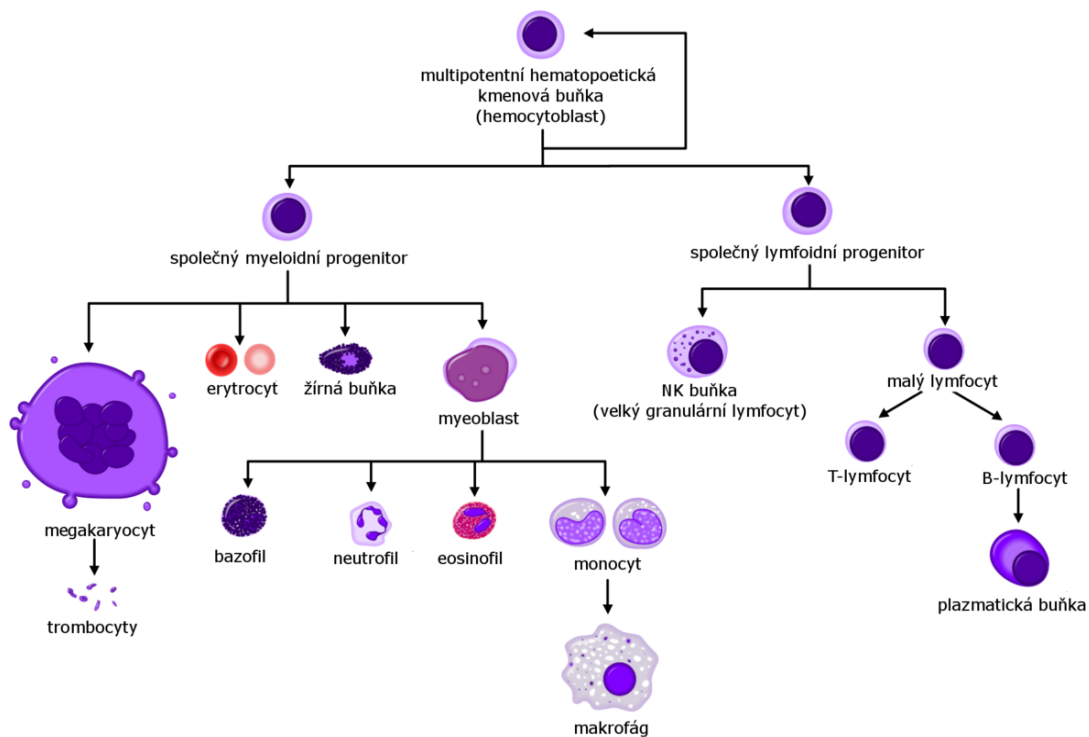
Obrázek 8 – ukázka proteinů, které zůstávají v GA, ER a PM [7]

1.2. Receptor CD4 a imunitní systém

V imunologii označuje CD4 (z ang. *Cluster of Differentiation 4*) glykoprotein vyskytující se na povrchu specifických buněk. Těmito buňkami jsou například monocyty a pomocné T-lymfocyty – označované jako CD4+ (Kazazi et al; 1989). Tyto všechny buňky jsou součástí našeho imunitního systému, jenž nás chrání před určitými nežádoucími vlivy vnitřního (*nádorové buňky*) i vnějšího (*viry, bakterie, ...*) prostředí.

První bojová linie imunitního systému je založena na **vrozené (nespecifické) imunitě** – ta zahrnuje bariéry (*kůže a sliznice*) a jimi produkované antimikrobiální látky, proudění vzduchu, pohyb řasinek, určité buňky vzniklé z myeloidního progenitoru (*makrofágy, granulocyty*) a NK buňky. Není schopná vytvořit si imunitní paměť a s různými antigeny bojuje stejnými mechanismy. [4]

Do druhé linie imunitního systému patří zmiňované T lymfocyty. Jsou jednou ze složek **adaptivní imunity**, společně s B lymfocyty. T i B lymfocyty vznikají z lymfoidního progenitoru a mají několik subtypů. Aktivují se přes specifické antigenní imunoreceptory (*TCR – T-buňky, BCR - B-buňky*) vazbou specifických antigenů. Mají schopnost vytvořit si imunologickou paměť neboli pamatovat si antigeny, se kterými se již setkali (*princip očkování*). [4]

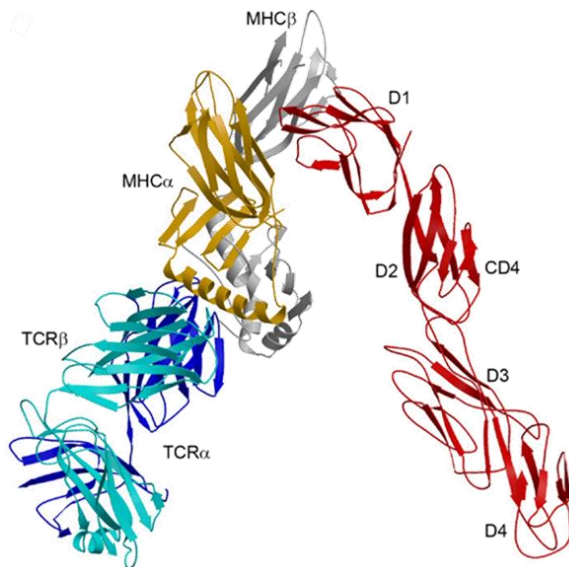


Obrázek 9 – diferenciace hematopoetické buňky [8]

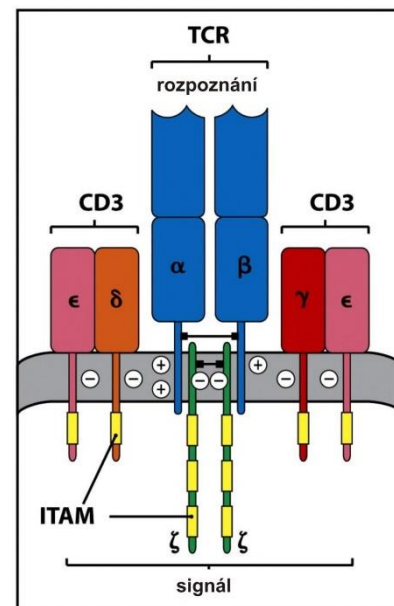
Jak již bylo řečeno, buňky adaptivního imunitního systému rozpoznávají specifické antigeny. Pod pojmem **antigen** se skrývá jakákoliv molekula, která můžeme být navázána na hlavní histokompatibilní komplex neboli **MHC** a následně prezentována T-buněčnému receptoru. [5]

Hlavní histokompatibilní komplex II (*MHC II*) se skládá z řady podjednotek (viz obr. 10). α a β podjednotky souhrnně označujeme jako **TCR** (z ang. *T-buněčný receptor*). Právě TCR soužije k navázání antigenu. Další součástí MHC II je protein **CD3** – jeho podjednotkami jsou: CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ a CD3 ζ . Na proteinech spadajících pod CD3 nacházíme motivy s názvem ITAM, jež jsou úzce spojené s aktivací imunitní odpovědi.

T-buněčný receptor neboli **TCR** se vyskytuje na T-lymfocytech a rozeznává antigen vázaný na MHC II. CD4 také rozpoznává MHC II a váže se na něj společně s TCR (viz obr. 9). [4]

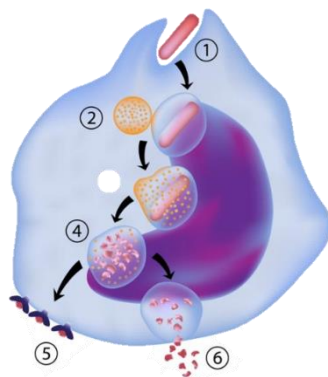


Obrázek 10 – komplex TCR-MHCII-CD4 [9]

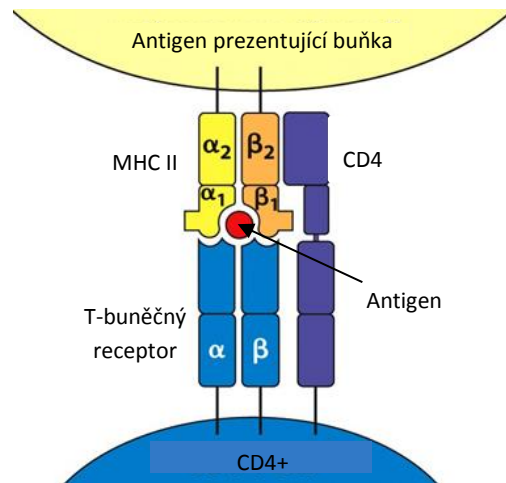


Obrázek 11 – stavba MHC II [10]

Pro navázání antigenu na MHC II je potřeba cílové patogenní struktury **upravit** (viz obr. 11) – například: makrofág pomocí fagocytózy pozře patogen (1), čímž ho uzavře ve fagozomu. Ten následně splyne se lysozome (2; 3) – dojde k trávení a fragmentaci daného patogenu (4). Část těchto fragmentů (*antigenů*) bude prezentována na povrchu buňky pomocí MHC II (5) (viz obr. 12).



Obrázek 12 – proces fagocytózy patogenu a jeho následné zpracování [11]

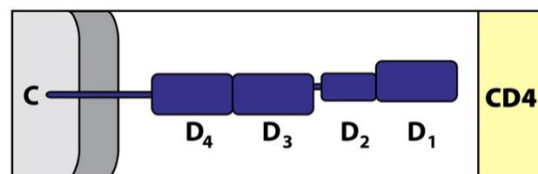


Obrázek 13 – komplex CD4 - MHC II – TCR [12]

1.2.1. Stavba a struktura CD4

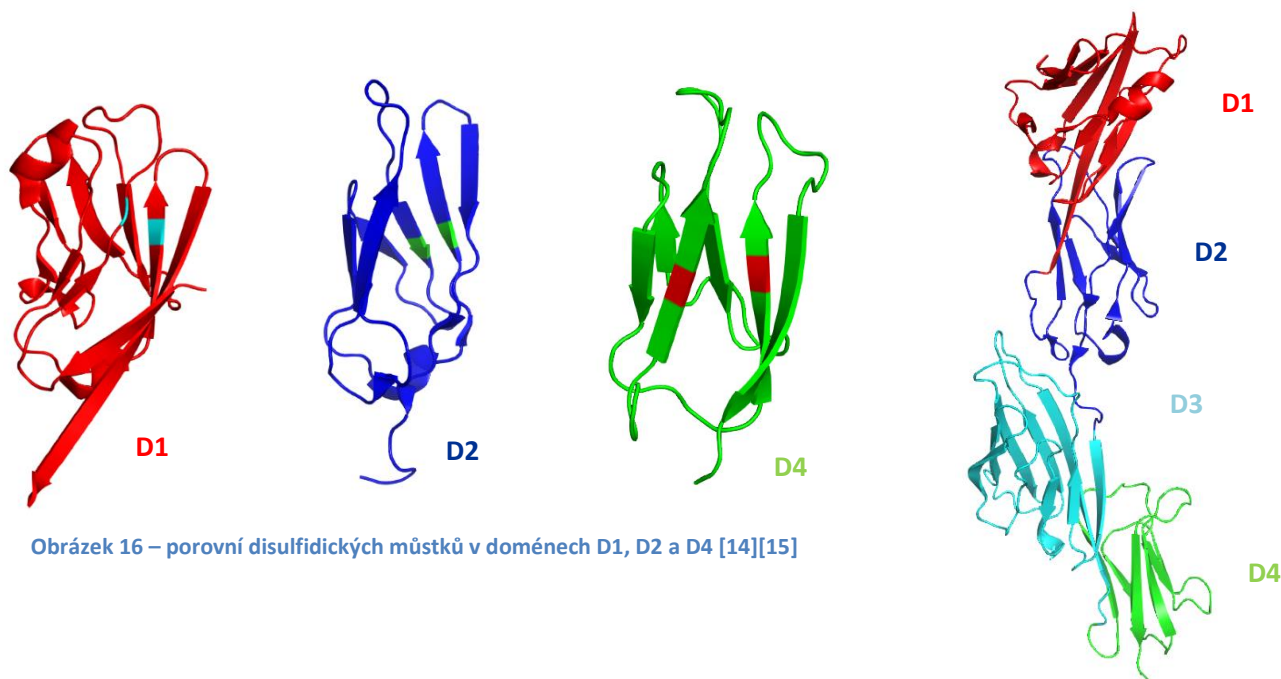
Molekula tohoto receptoru se skládá se ze tří částí – extracelulární (*aminokyseliny 1–371*), transmembránové (*residua 372–395*) a intracelulární (*residua 396–433*) – a jeho molekulární hmotnost činí 55 kDa (*Matthias et al, 2002*).

Extracelulární část CD4 se skládá ze čtyř imunoglobulinových domén (*D1 až D4*), které jsou silně glykosylované, což hraje roli při skládání CD4 a expresi na PM (*Tiffit et al, 1991*). Z funkčního hlediska, HIV využívá pro svůj vstup (*vazbu*) doménu D1 a MHC II interaguje s D1 a D2 (*Moldovan et al, 2002*) (*Matthias et al, 2002*).



Obrázek 14 – stavba CD4 [13]

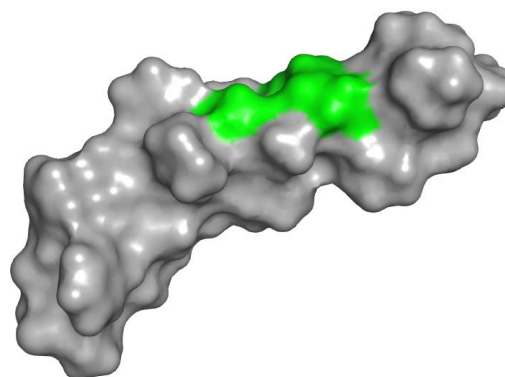
V extracelulární doméně D2 je zajímavý disulfidový můstek **155↔184**, neboť cysteiny, které ho tvoří, leží na **vzájemně přilehlých** protiběžných β -skládaných listech (*viz obr. 15*). Normálně jsou ale cysteiny tvořící disulfidový můstek umístěny v **protilehlé pozici**. Kromě této zvláštnosti je zajímavá i délka samotné vazby (*tj. Ca-Ca: 3.92 Å*), jelikož standardně jsou v imunoglobulinech pozorovány disulfidové vazby o délce *Ca-Ca: 6.6 Å* (*Matthias, 2002*). Výpočty také ukazují, že tento disulfidický můstek přispívá k celkové stabilitě proteinu **minimálně** a biochemická data potvrdila, že CD4 je na povrchu buňky **redoxně aktivní** (*Matthias, 2002*).



Obrázek 16 – porovná disulfidických můstků v doménách D1, D2 a D4 [14][15]

Obrázek 15 – stavba extracelulární domény CD4 [14][15]

Transmembránová doména CD4 vykazuje zajímavý motiv GGxxG, jenž je zachován u velkého množství živočišných druhů (viz tabulka č. 1). Motiv GxxxG se již v minulosti ukázal jako místo důležité pro dimerizaci transmembránových domén (Melnyk et al, 2004). V α -helixu proteinů je jedna otočka tvořena 3,6 aminokyselinami, tudíž jsou tyto GxxxG glyciny relativně nad sebou. Dimerizaci podporuje i fakt, že glycin nedisponuje velkým postranním řetězcem, což je důvodem pro vznik štěrbin, která by tuto dimerizaci mohla umožňovat (Parrish, 2015).

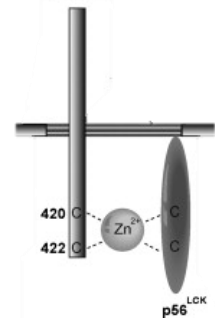


Obrázek 17 – důsledek GGxxG motivu [14]

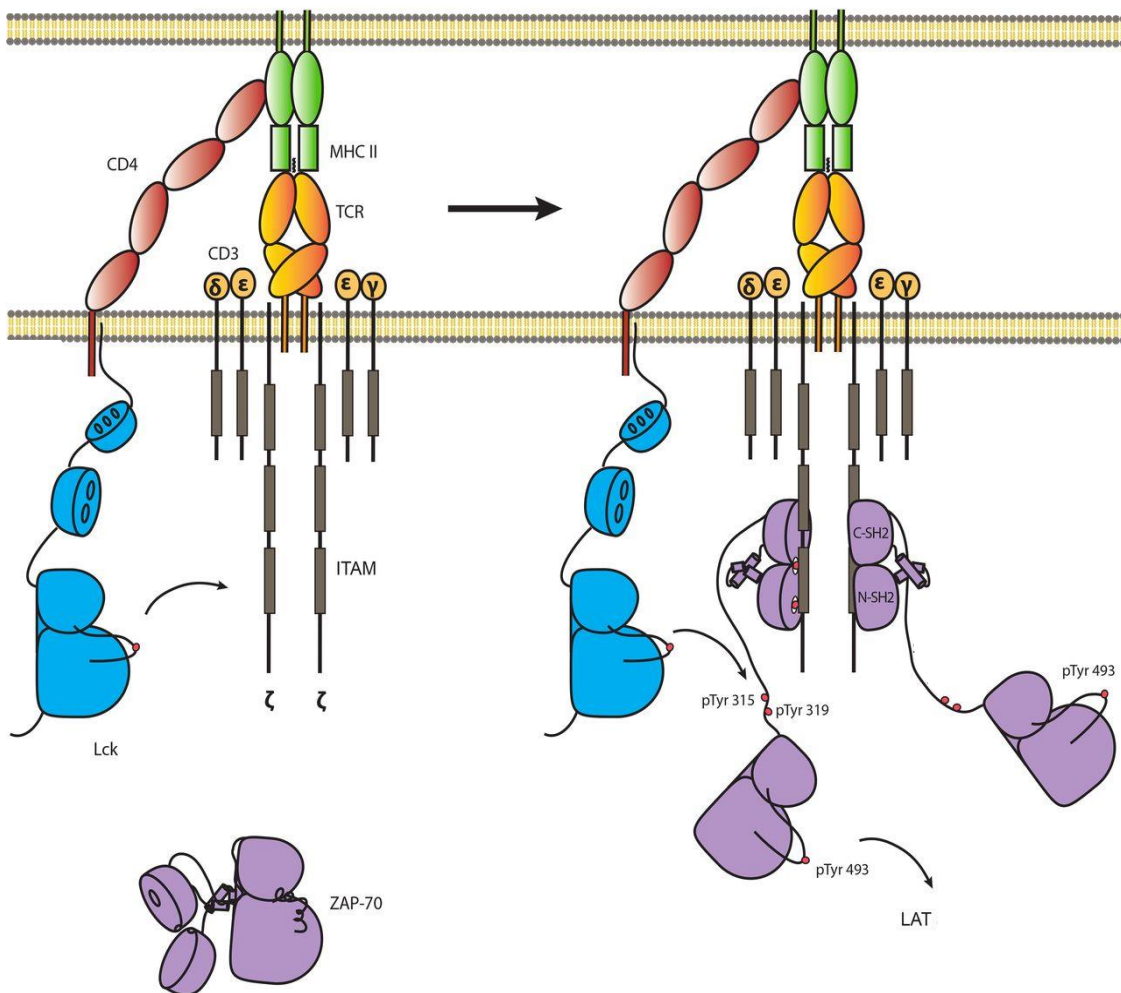
Tabulka 1 - Porovnání sekvencí transmembránových domén CD4 u různých živočichů

Organismus (řád)	Transmembránová doména CD4 s vyznačeným GGxxG motivem
Člověk (primáti)	MALIVLGGVAGLLL FIGLGIFF
Pavián (primáti)	MALIVLGGVAGLLLFTGLGIFFCV
Kotul (primáti)	MVLIVLGGVAGLLAFTGLGIFL
Kůň (lichokopytníci)	LLAAVLGGVAGLLLFTGFFIF CCVKCW
Tur (sudokopytníci)	LLPMVLGGIAGLVLFTVCCAFCVKCW
Pes (šelmy)	FLAITLGGI LGLLLLIGLCVFC
Králík (zajícovci)	LLAGALGGAAGLV LFAGLCIYCCV
Myš (hlodavci)	VFLACVLGGSFGFLGF LGLCILC
Netopýr (letouni)	LLAI VLGA VGGFLI FIGFCIFCCV KCW (GxxxG motiv)
Sysel (hlodavci)	MFLAAIIGGALSFLLLAGLCIFCCV
Běluha (kytovci)	LLAVVLGGITSLLLLAGFCIF

Intracelulární část CD4 hraje klíčovou roli v aktivaci imunitní odpovědi, neboť je na ni koordinačně vázaný zinečnatý kation společně s **Lck** (*tyrosin kináza*) díky motivu dvou cysteinů. Během aktivace TCR je Lck přivedena CD4 do blízkosti fosforylačních motivů ITAM (na CD3 ζ) v intracelulárních doménách komplexu TCR. Dochází k fosforylaci **ITAMů** (po rozpoznání antigenu). Díky tomu může následně dojít k navázání kinázy ZAP70 (3), jenž dále fosforyluje (4) adaptorový protein **LAT** a spouští se tak signální dráha regulující imunitní odpověď (Fournier et al, 2009).



Obrázek 18 – komplex CD4-Lck [16]



Obrázek 19 – proces aktivace imunitní odpovědi [17]

1.2.2. Funkce CD4

Receptor CD4 má zásadní úlohu při vývoji T-lymfocytů. U geneticky modifikovaných myší bez endogenní exprese CD4 je pozorován blok ve vývoji CD4+ buněk a deficit v imunitní odpovědi (*Rahemtulla et al, 1991*). CD4+ T buňky jsou nazývané jako pomocné. Produkují cytokiny, kterými ovlivňují ostatní buňky zapojené do imunitní odpovědi (*Kenway-Lynch et al., 2014*). B-lymfocyty, které produkují protilátky, jsou stimulovány právě CD4+ T buňkami (*Bottomly, 1989*).

Důležitá je také intracelulární interakce CD4 s Lck kinázou, jež fosforyluje T-buněčný receptor (*po rozeznání antigenu*) (viz 1.2.1.) a **zahajuje** tak **imunitní odpověď**. V posledních letech je role CD4 v imunitní odpovědi intenzivně diskutována. Dlouho se myslelo, že CD4 posiluje interakci mezi TCR a MHC II. Nicméně se ukázalo, že interakce CD4 s MHC II je velice slabá a že **nemá** na stabilizaci komplexu velký vliv (*Artyomov, 2010*).

CD4 funguje také jako klíčový receptor pro vstup viru **HIV** do buňky (*Sattentau a Moore, 1993*). Povrchový protein HIV gp120 využívá pro svůj vstup do buněk receptor CD4 společně s CXCR4 a CCR5 na jejich povrchu.

1.3. Fluorescenční proteiny

Fluorescenční proteiny jsou bílkoviny, které mají schopnost být excitovány fotonem o určité vlnové délce a energii opět uvolnit v podobě fotonu s jinou vlnovou délkou. Tato jejich schopnost je široce využívána v molekulární biologii. Díky nim je možné vizualizovat molekuly, orgány či celé buňky. Umožňují nám sledovat genovou expresi či proteinové interakce (*FRET*). Sondy založené na fluorescenčních proteinech nás mohou informovat o pH, koncentraci Ca^{2+} a redoxních stavech prostředí v kterém se vyskytují. [6]

1.3.1. Historie

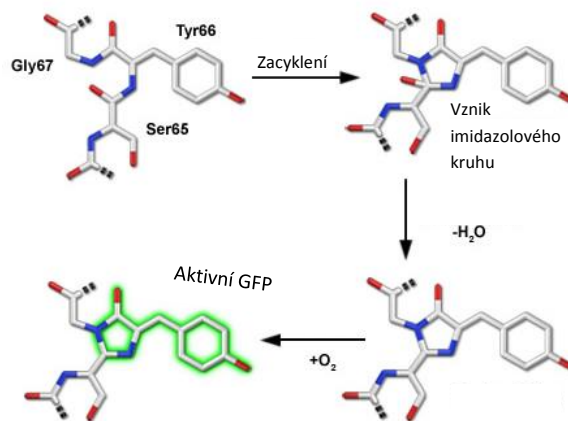
Během 60. let minulého století pracoval Osamu Shimomura s medúzou *Aequorea victoria*, která je schopná bioluminiscence. O. Shimomura jel, společně s Frankem Johnsonem, do laboratoří Friday Harbor (*FHL*) Washingtonské university. Jejich cílem bylo vyvinout protokol pro extrakci „světla emitujících komponentů“ zmiňované medúzy. Zjistili, že obvodový kroužek na spodní straně medúzy obsahuje luminiscenční orgány. Tisíce těchto obvodových kroužků bylo promáčkáno přes jemné síto a z tohoto filtrátu se jim povedlo vyizolovat chemiluminiscenční protein, který byl pojmenován Aequorin. [7]

Aequorea má ovšem druhý fluorescenční protein – a to autofluorescenční zelený protein GFP. Ten je excitován modrým světlem a emituje světlo zelené (*Kanchiswamy et al, 2014*). [7]

Během 70. let 20. století Shimomura a jeho kolegové izolovali čistý GFP a prokázali, že energie emitovaná aequorinu je opravdu absorbovaná GFP. [7]

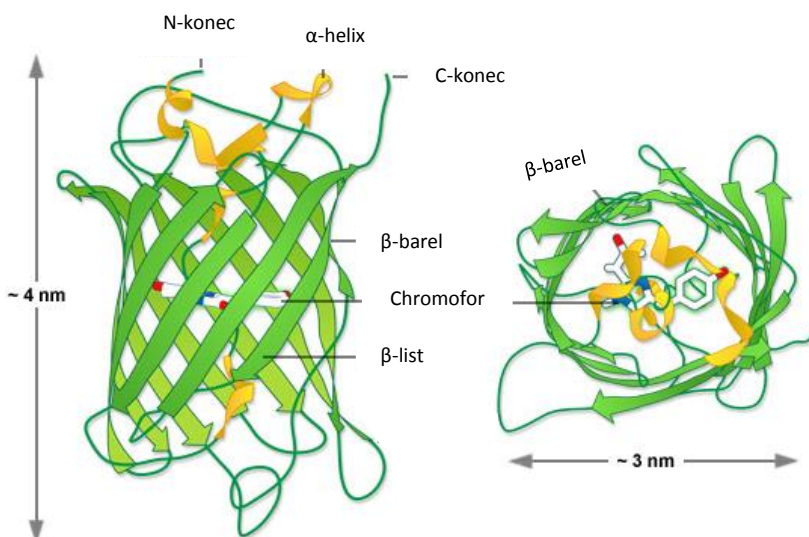
1.3.2. GFP

Zelený fluorescenční protein (z ang. **Green Fluorescent Protein) byl objeven v roce 1962 (*O. Shimomura*) a své jméno obdržel až v roce 1971. Skládá se z 238 aminokyselin a vytváří tzv. β -barel skládající se z 11 β -skládaných listů a jedné α -šroubovice, která je zanořena do nitra barelu (*viz obr. 20*) α -helix má na sobě připojené tři klíčové aminokyseliny (*serin65, tyrosin66 a glycin67*), které společně reagují během formace β -barelu. Vzniká imidazolinový kruh, dále dochází k jeho dehydrataci a nakonec k oxidaci molekulárním kyslíkem. Výsledkem je funkční chromofor *p*-hydroxybenzylideneimidazolonin (*viz obr. 19*) a jako vedlejší produkt vzniká H_2O_2 . Plně funkční nativní GFP má absorpční maximum při 400 nm a emisní vrchol při 505 nm. [8]**



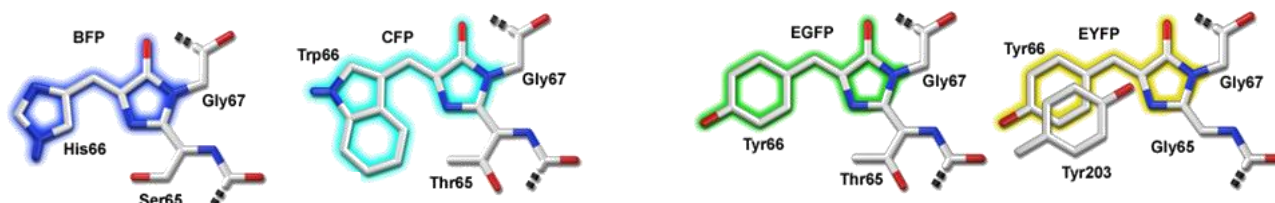
Obrázek 20 – proces vzniku aktivního chromoforu [18]

wtGFP má řadu vlastností, které z něj dělají výborného kandidáta na použití v molekulární biologii. Jedná se o relativně malý a stabilní protein o 27 kDa, ke své funkci nepotřebuje kofaktor, a jak se experimentálně zjistilo, tak ani neinterferuje s buněčnými procesy a umožňuje tak neinvazivní vizualizaci. Avšak každá mince má dvě strany a i wtGFP má své nevýhody – nižší stabilita při nízkém pH, snížená funkčnost při 37 °C a equilibrium mezi jeho monomerní a dimerní verzí. [9]



Obrázek 21 – struktura GFP [18]

Vědcům se povedlo zavést řadu mutací do wtGFP (viz obr. 4) a upravit si ho podle svých potřeb. Mezi nově získané znaky patří zesílení signálu, životnosti a zrušení dimerizace. Různými mutacemi tří aminokyselin chromoforu (*wtGFP* – *Ser65-Tyr66-Gly67*) došlo k posunutí excitačního/emisního spektra a podařilo se tak vytvořit 4 různě barevné varianty wtGFP – tj. modrá (*EBFP* – ang. *Enhanced Blue Fluorescent Protein*), azurová (*ECFP* – ang. *Enhanced Cyan FP*), žlutá (*EYFP* – ang. *Enhanced Yellow FP*) a zelená (*EGFP* – ang. *Enhanced Green FP*). [9]



Obrázek 22 – deriváty wtGFP a jejich barvy [18]

V současné době jsou deriváty wtGFP široce používány, po boku derivátů mRFP-1 (z ang. *Monomeric Red Fluorescent Protein*), k označování sledovaných proteinů při fluorescenční mikroskopii.

2. MATERIÁLY

Tabulka 2 - Souhrn použitých materiálů

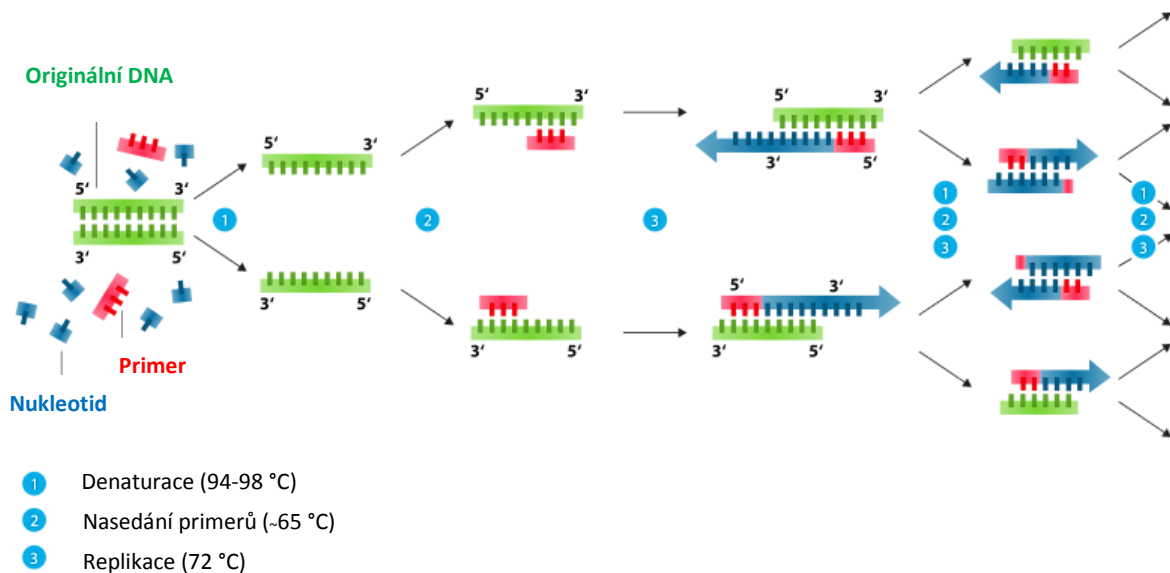
Výrobce	Přístroje
Eppendorf	Centrifuga 5424/5417R/5810R; Thermomixer comfort 1,5 ml; Galaxy 170R CO ₂ inkubátor
ThermoFisher Scientific	Nanodrop ND-1000 spektrofotometr
InVitroGen	Neon Transfection System
Bio-Rad	T100™ Thermal Cycler
Serva	BlueMarine™ 100
Olympus	FLUOVIEW FV1000
Telstar	Laminární box Telstar BIO-II-A
Okolab	Mikroskopický inkubátor
Výrobce	Software
National Instruments	LabVIEW
PyMOL	The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
Adobe	Adobe Photoshop CS3
Výrobce	Komerční kity
Macherey-Nagel	NucleoBond® Xtra Midi / Maxi
Zymo Research	Zyppy Plasmid Miniprep Kit; Zymoclean Gel DNA Recovery

3. METODY

3.1. PCR

Jednou z nejpoužívanějších metod molekulární biologie je PCR (z ang. *Polymerase Chain Reaction*). Je založena na amplifikaci („namnožení“) DNA a představuje metodu s širokým využitím – sekvence DNA, genotypování, zanášení bodových mutací, amplifikace vybraného genu a také se používá pro detekci přítomnosti DNA, např. ve forenzní analýze.

PCR reakce má několik klíčových komponentů. Mezi ně patří DNA polymeráza (např.: *Q5* či *Taq*), nukleotidy (*dNTPs*), DNA templát, primery, pufr a velmi čistá voda (bez nukleáz). Celkový objem jedné reakce je 25 μ l a je připravována ve speciálních PCR zkumavkách na ledu. Samotná reakce je závislá na cyklickém střídání teplot. K tomu je zapotřebí tzv. thermocycler, jenž funguje na základě Peltierova článku, který je schopný rychlého střídání teplot.



Obrázek 23 – proces PCR reakce [19]

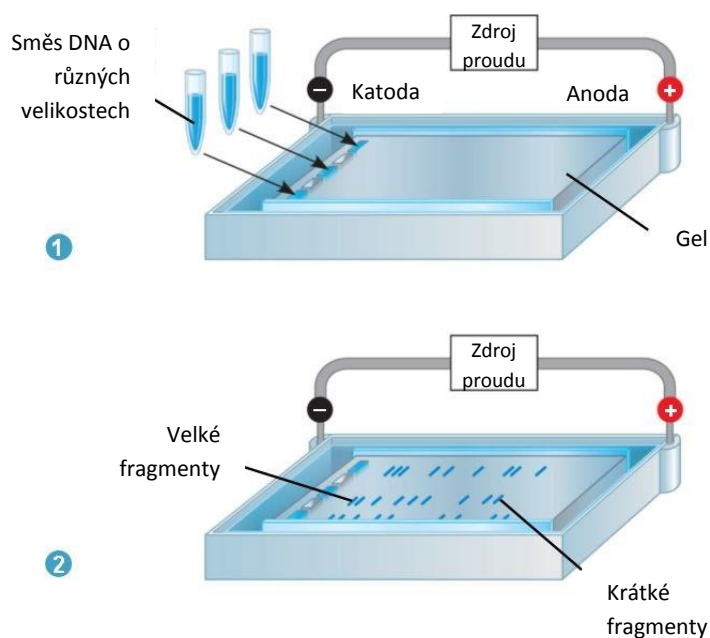
Primery jsou krátké oligonukleotidy (20-25 nt) komplementární k sekvenci amplifikovaného úseku DNA. Při navrhování primerů je nutné dbát na tři věci. **Specifita** primeru je klíčová, proto je nutné, aby jeho sekvence odpovídala pouze jedné vybrané části DNA. Dále je nutné si zkontrolovat (pomocí programu), jestli nedochází k **interakcím** onoho primeru se sebou samým. Posledním důležitým kritériem je jeho tzn. teplota tání, což je teplota, při které primer nasedá na DNA. Tato teplota závisí na délce primeru a množství CG bází. Opět existují online programy, které tuto teplotu umí vypočítat, např.: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

3.2. Agarózová elektroforéza

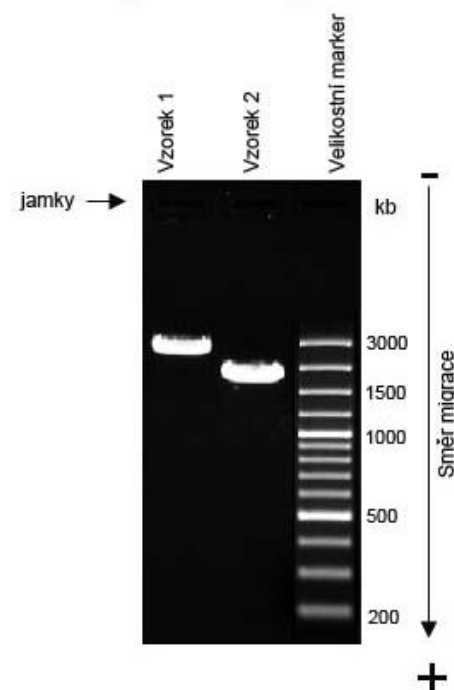
Abychom získali náš požadovaný fragment DNA z PCR reakce, je potřeba ho oddělit od možných nescifických produktů, nespotebovaných nukleotidů a další látek. K tomu se využívá agarózová elektroforéza. Při ní jsou na gel (tj. agar v TEA pufru s interkalačním činidlem) nanášeny vzorky společně s velikostním markerem, jenž slouží pro odhad velikosti fragmentů. Gel je ponořený v elektrolytu (ve stejném elektrolytu v jakém je rozpuštěný agar) a pomocí stejnosměrného proudu dochází k migraci DNA ke kladné elektrodě. Při tuhnutí gelu dochází k vytvoření sítě spletených agarových vláken (procentuální zastoupení agaru ovlivňuje hustotu vláken – větší fragmenty při vysoké hustotě neprolezou; obvykle se používá 1% gel). Důsledkem toho fragmenty DNA cestují rychlostí závislou na své velikosti. [10]

Interkalační činidla (např.: EtBr) se zainkorporávají mezi báze DNA. Pod UV světlem se EtBr excituje a emituje světlo ve viditelném spektru. Díky tomu jsou na gelu vidět shluky fragmentů DNA o stejné velikosti.

DNA o požadované velikosti je z gelu vyříznuta a vyizolována pomocí komerčního kitu.



Obrázek 24 – ukázka gelové elektroforézy [20]



Obrázek 25 – ukázka výsledků gelové elektroforézy [21]

3.3. Enzymatická restrikce DNA

Restrikční endonukleázy jsou nezbytným pomocníkem v genovém inženýrství při klonování vybraného úseku DNA. Ten je pomocí PCR izolován z genomu a zanesen do plazmidu. K tomuto a k dalším metodám se využívají restrikční endonukleázy. Ty mají schopnost štěpit specifická místa DNA – tzv. restrikční místa –, která jsou specifická pro každý enzym. Jedná se o úseky dsDNA 4-6 bp, často jsou palindromatické.

Vzorek DNA a plazmid obsahující příslušná restrikční místa jsou inkubováni s jednou či více endonukleázami v příslušném pufru (*závisí na restrikčních enzymech*) při 37 °C. Čas potřebný k naštěpení DNA závisí na množství DNA a použitého enzymu – bližší informace uvádí výrobce. Štěpení je následováno agarózovou elektroforézou a izolací odpovídajících fragmentů DNA.

Nhe I



Obrázek 26 – restrikční místo
Nhe I [22]

BamH I



Obrázek 27 – restrikční místo
BamH I [23]

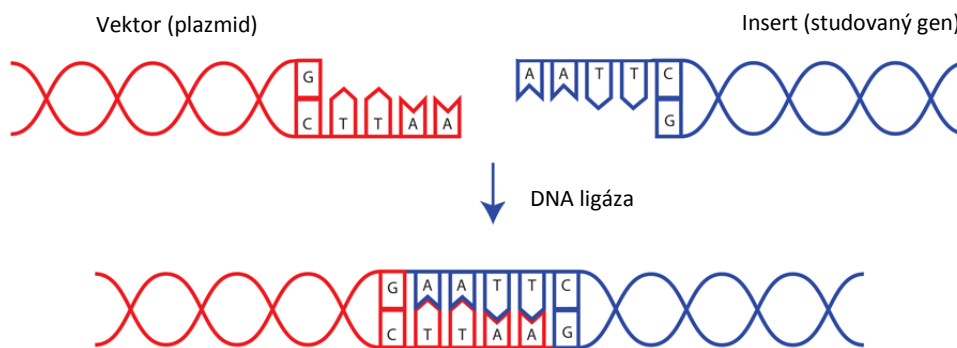
Kpn I



Obrázek 28 – restrikční místo
Kpn I [24]

3.4. Ligace DNA

Po štěpení a izolaci DNA je nutné naštěpený insert s vektorem zaligovat. K tomuto kroku je opět potřeba enzym. DNA ligáza je společně s pufrům s oběma naštěpenými fragmenty DNA inkubována při 16 °C přes noc. Následně provádíme transformaci bakterií (*viz 3.5.*) a testování bakteriálních kolonií (*viz 3.6.*).

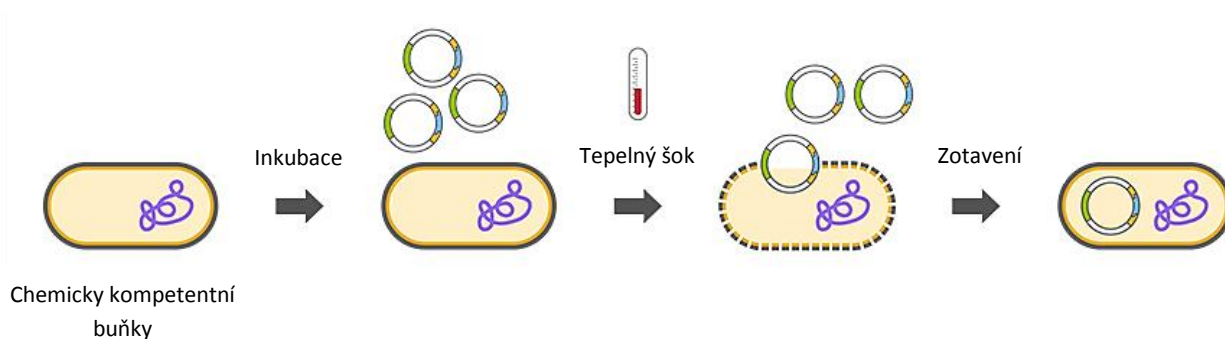


Obrázek 29 – schématická ukázka ligace DNA [25]

3.5. Transformace bakterií

Transformace bakterií je velmi rychlý proces. Chemicky kompetentní bakterie (např.: *E. Coli TOP10*) jsou šetrně rozmrazeny na ledu a následně je jim přidána DNA – 1-10 ng DNA na 50-100 μ l bakterií. Bakterie jsou poté inkubovány 20 minut na ledu. Následuje tepelný šok v podobě 42 °C po dobu 46 vteřin. Ten způsobí rozrušení bakteriální membrány a plasmid se tak může dostat do buňky. Po tomto kroku následuje 5 minut na ledu, přidání 1 ml LB media a 20-60 minut při 37 °C na třepacím termobločku. Posledním krokem je nanesení bakterií na agarovou plotnu a inkubace při 37 °C přes noc. [11]

Plasmid transformovaný do bakterií zpravidla obsahuje gen pro rezistenci na některé antibiotikum. Této rezistenci se využívá při selekci – antibiotikum je obsaženo v agarové plotně, tudíž na ní přežijí jen bakterie, které prošly úspěšně transformací.



Obrázek 30 – proces transformace bakterií tepelným šokem [26]

3.6. Testování bakteriální kolonií pomocí PCR

Fakt, že nám na plotnách úspěšně vyrostly kolonie bakterií neznamená, že došlo ke správnému zaligování insertu do vektoru. Mohlo totiž dojít k zaligování samotného vektoru se sebou samým, nebo mohl být insert zainkorporován v opačném směru (*toto může nastat pouze v případě, pokud byl použit jeden restriční enzym pro dvě štěpná místa*). Popřípadě více inzertů za sebou.

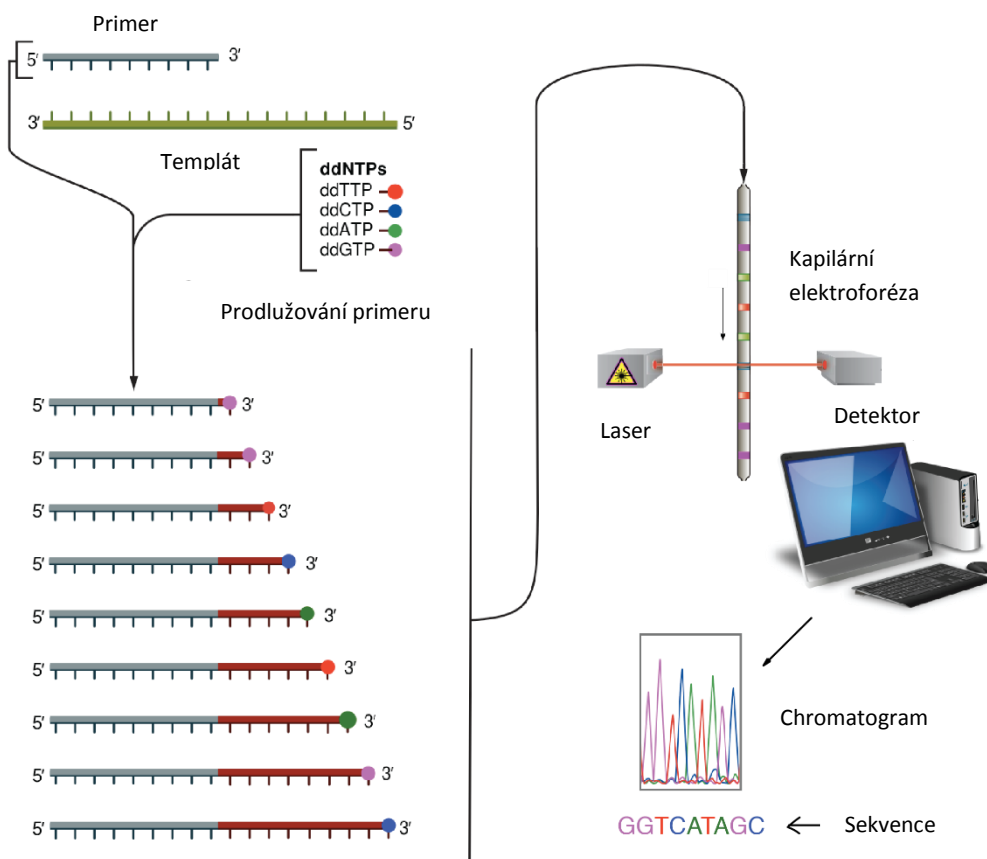
Testování začíná výběrem kolonií – ty se očíslovají, abychom později věděli, která kolonie patří ke kterému výsledku. Následně je nutné namíchat PCR reakci (viz. 5.1.) – lze používat již hotový premix (tj. *předmíchaný komerční PCR roztok obsahující všechny potřebné reaktanty kromě DNA a primerů*), ke kterým stačí přidat DNA a primery. Teplátová DNA je v tomto případě představována samotnou kolonií bakterií – té se jemně dotkneme pomocí špičky od pipety a špičku vložíme do reakční směsi, jemně s ní zamícháme a špičku vyhodíme. Následuje standardní PCR reakce a gelová elektroforéza, jež nás informuje o výsledku.

Pozitivní kolonie jsou kultivovány ve 3 ml LB média po dobu 12 hodin a následně je z nich izolována DNA, např. pomocí komerčních kitů – tzv. mini-prepy. Získanou DNA je nutné následně osekvenovat (viz. 5.7).

3.7. Sangerova metoda sekvenace DNA

Další naprosto klíčovou metodou je sekvenace, jež nám umožňuje odhalit primární strukturu DNA. Sangerova metoda byla vyvinuta v roce 1977 britským biochemikem Fredem Sangerem a jeho kolegy v roce 1977 a v současné době je široce rozšířena. Standardně poskytuje možnost osekvenovat úseky do 1 000 bp, ale my máme úspěšnost až 1300 bp.

Princip této metody je založen na PCR (viz 5.1) a vyžaduje tedy templátovou DNA (*určená k sekvenaci*), DNA polymerázu, primer a nukleotidy dvojího typu. Jedním typem jsou klasické dNTP (*zastoupeny majoritně*) a druhým jsou ddNTP, kterým chybí -OH skupina na 3' uhlíku a jsou označeny fluorescenčními barvivy. Ona chybějící hydroxylová skupina znemožňuje připojení dalšího nukleotidu. Vznikají tak při PCR fragmenty různé velikosti. Následuje kapilární gelová elektroforéza, jejíž výsledky jsou snímány pomocí detektoru. Výsledkem je chromatogram, ze kterého vyplývá sekvence DNA (viz obr. 30).



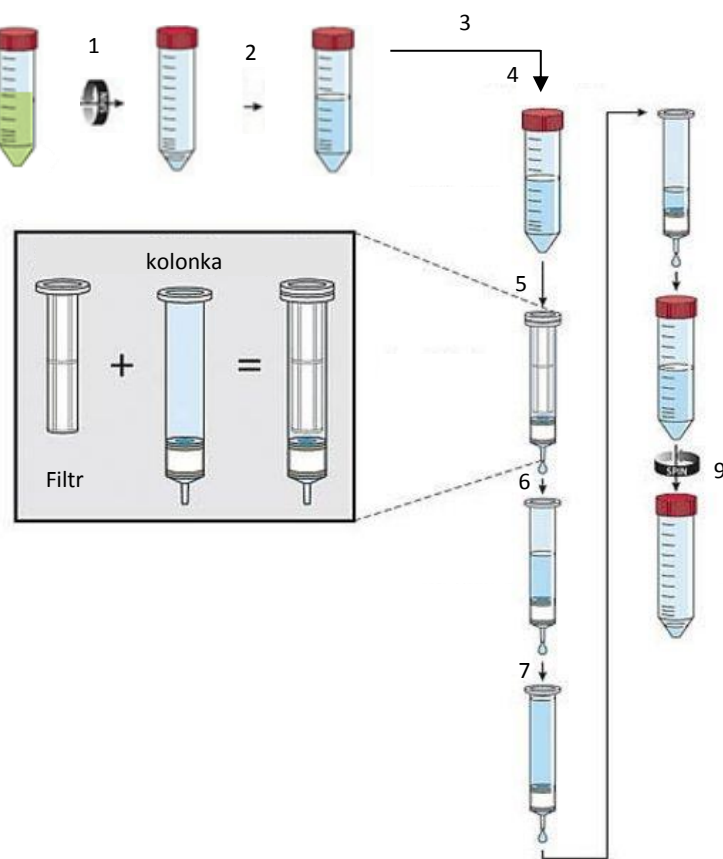
Obrázek 31 – proces sekvenace DNA [27]

3.8. Izolace plasmidů z bakteriální kultury – Midi-prep

Problém s DNA, která byla získána z mini-prepu, je ten, že jí je málo a její čistota není perfektní – přítomnost nukleáz eventuálně povede k degradaci DNA. Pomocí komerčních kitů můžeme izolovat relativně velké množství DNA z bakteriálních kultur.

Nejprve je potřeba transformovat bakterie (*viz* 5.5) a kultivovat je při 37 °C „v třepacím inkubátoru“ po dobu 12 až 14 hodin. Neustále míchání kultury je důležité, neboť zabraňuje sedimentaci bakterií a také je důležité pro přísun kyslíku. Pokud dojde k přemnožení bakterii, pozměňuje se jejich biochemie, což negativně ovlivní výtěžek DNA. Optimální poměr $V_{\text{médium}}:V_{\text{báňka}}$ je 1:20.

Kulturu je nutné po 12-14 hodních stočit (1), abychom se zbavili média, které obsahuje řadu nechtěných látek (*metabolity*). Následuje resuspendace vyniklé paletky v resuspendačním pufru (2), lyzování buněk (3), neutralizace (4) a nanášení suspenze na filtr (5), jenž slouží k zachycení zbytků buněčných membrán – DNA se zachytí dole v kolonce. Kolonku je nutné promýt (6; 7). Posledním krokem je eluce (8), vysrážení DNA z roztoku (9) a závěrečné rozpuštění v super čisté vodě (*bez nukleáz*).

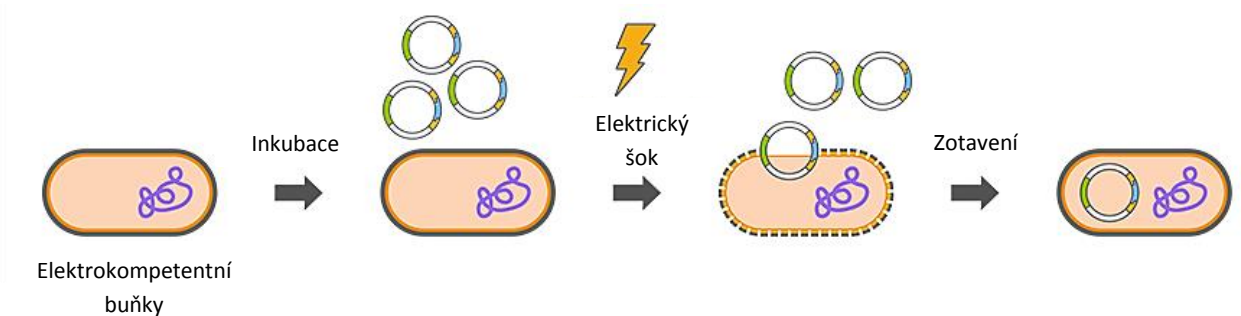


Obrázek 32 – proces izolace plasmidů [28]

3.9. Elektroporace

Metodou, jež umožňuje přenos studovaného plazmidu do buňky, je elektroporace, která využívá vysokého napětí. Výhodou této metody je t, že ji lze aplikovat na široké spektrum buněk.

Začíná se počítáním buněk, jejich stočením a následnou resuspendací v elektroporačním pufru. Následuje přidání DNA ($1 \mu\text{g DNA}/200\ 000$ buněk). Poslední fáze je samotná elektroporace, k níž je potřeba speciální elektroporační aparatura, jež nám umožňuje si nastavit délku a sílu elektrického výboje (např.: $3x$ puls $1325\text{V}/10\text{ms}$). Takto připravené buňky jsou inkubovány při $37\ ^\circ\text{C}$ a 5% koncentraci CO_2 v inkubátoru.



Obrázek 33 – proces elektroporace buněk [29]

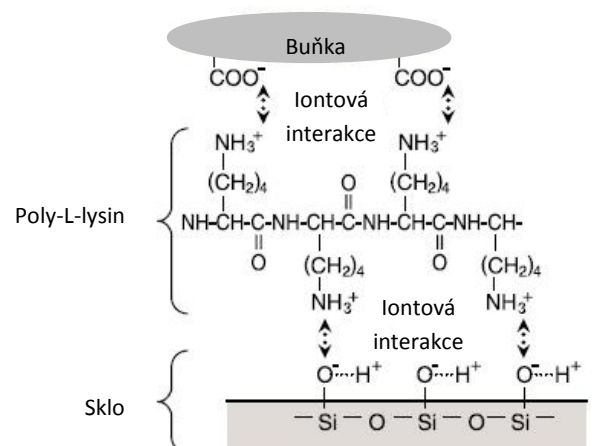
3.10. Konfokální fluorescenční mikroskopie

Před samotnou mikroskopií je nutné buňky upevnit na podložní skličko, aby se zabránilo pohybu živých buněk. Povrch skla je dobré ošetřit polylysinem. Roztok polylysinu se připravuje jeho rozpuštěním v destilované vodě ($1:10$). Aplikuje se na skličko a



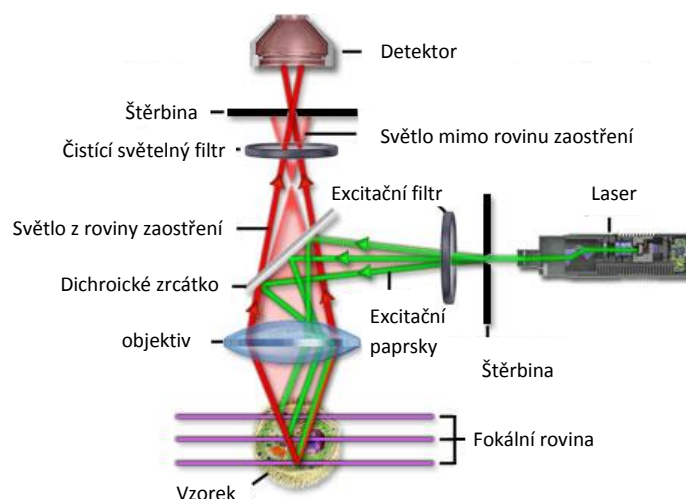
Obrázek 35 – Ibdí sklička [31]

10 minut se nechává inkubovat. Následně se roztok odsaje a skličko se nechá uschnout. Nyní je již možné na něj buňky nakapat a nechat přisednout.



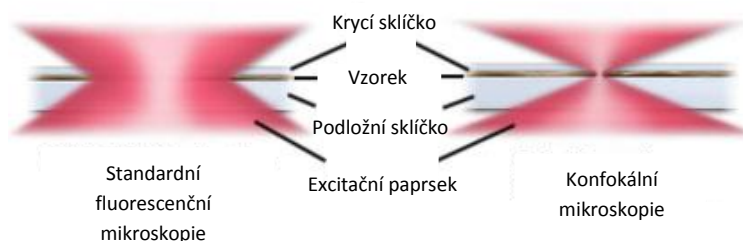
Obrázek 34 – funkce polylysinu [30]

Samotný proces konfokální fluorescenční mikroskopie začíná výběrem laseru o správné vlnové délce (*závisí na excitačním spektru použitého chromoforu – viz 3.3.2.*). Laserový paprsek následně prochází skrz štěrbinu, jež umožňuje průchod jen velmi úzkému paprsku, a následně skrz excitační filtr. Ten je vybrán na základně používaného laseru a umožňuje průchod pouze fotonům s určitou frekvencí. Excitační paprsky jsou následně odkloněny, pomocí dichroického zrcátka, směrem ke vzorku skrz objektiv, jenž zaostří laser do fokální roviny. V tento moment fotony dorazily na místo určení a excitují zde chromofory, které následně uvolní energii v podobě fotonu s nižší energií. Ty opět prochází objektivem, jímž jsou usměrněny, a dichromatickým zrcátkem. Aby se zajistilo, že se do detektoru dostane pouze světlo o určité vlnové délce, prochází čistícím světelným filtrem. Posledním „kontrolním bodem“ je štěrbinu, jež dovolí projít pouze světlu z roviny zaostření. Výsledné „světlo“ dopadá na detektor, jenž vytváří obraz na základě fotonů, které na něj dopadly.



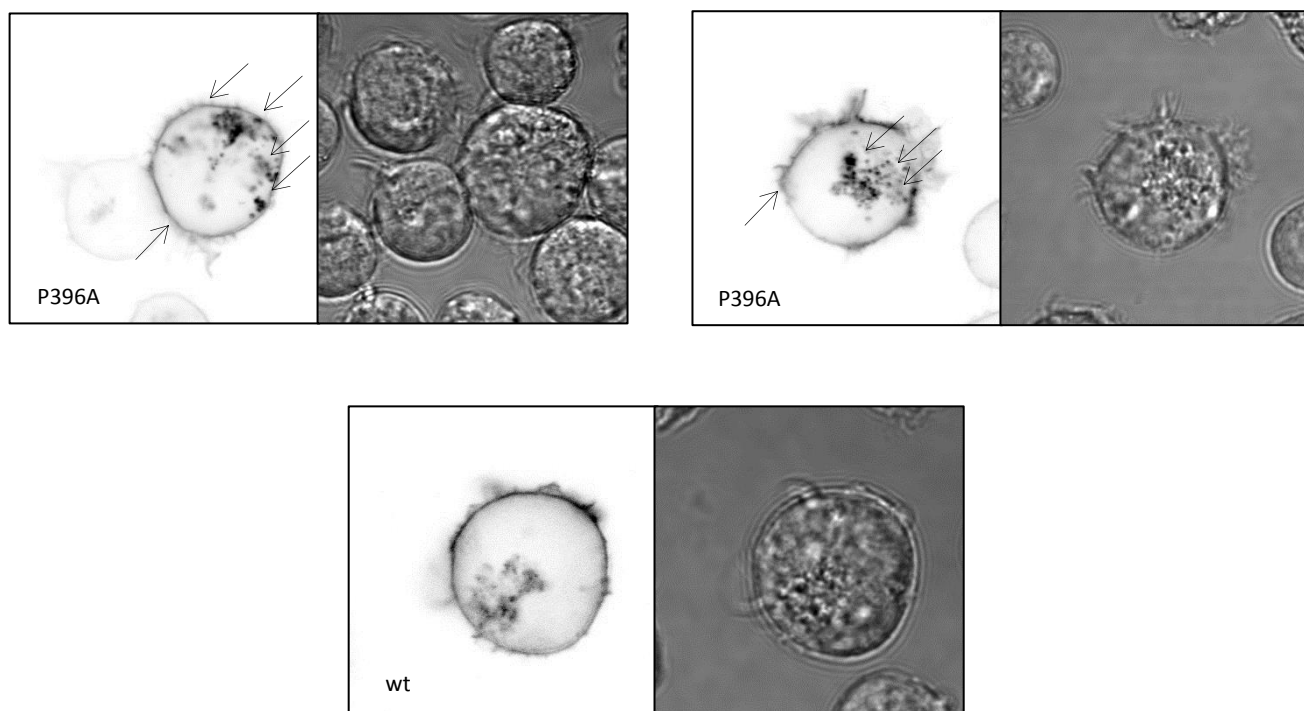
Obrázek 36 – princip konfokálního mikroskopu [32]

Konfokální mikroskopie je výborná v tom, že nám umožňuje pozorovat fluorescenční látky pouze v malém detekčním objemu ($300 \times 300 \times 800 \text{ nm}$). To umožňuje fakt, že zaostřujeme excitační paprsek do fokální roviny vzorku, nikoliv na zadní ohniskovou vzdálenost čočky jako u standardního fluorescenčního mikroskopu.



Obrázek 37 – standardní vs. konfokální mikroskop [32]

Obrázky získané pomocí konfokální mikroskopie ukazují, u CD4 P396A dochází ke zvýšené **recyklaci** – vāčky jsou pravděpodobně recyklační, ale mohlo by se jednat i o lysozomy. Tato hypotéza bude vyvrácena či potvrzena až kolokalizační mikroskopií mutovaného proteinu s markerem lysozomů. Mutovaný protein nezůstává v žádné ze sekrečních organel (tj. *endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát*). Předpokládáme tedy, že protein je na exprimován cytoplazmatickou membrānu, ale mutace ovlivňuje jeho stabilitu na PM.

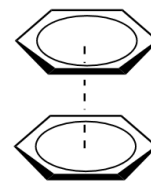


Obrázek 41 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 P396A [36]

4.2. Mutant CD4 Dim7 (F417V; F418L)

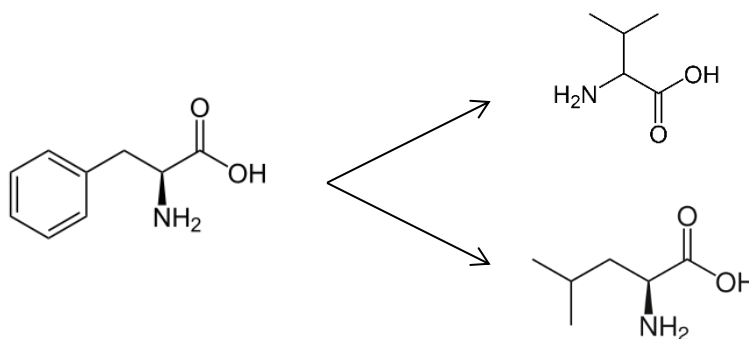
Aminokyseliny s benzenovým jádrem (tj. *fenylalanin, tryptofan a tyrosin*) jsou výjimečné v tom, že mohou stabilizovat struktury pomocí **patrových interakcí**, které vznikají mezi benzenovými jádry. Mohou tak stabilizovat struktury v rámci jednoho či mezi více proteiny.

Konstrukt s pracovním názvem dim7 v sobě skrývá dvě mutace, při nichž došlo k záměně fenylalaninů za aminokyseliny bez aromatického kruhu. Mutace jsou lokalizovány v transmembránové doméně. Domníváme se, že právě výše zmíněné patrové interakce by mohly **stabilizovat** dimerní formu CD4.

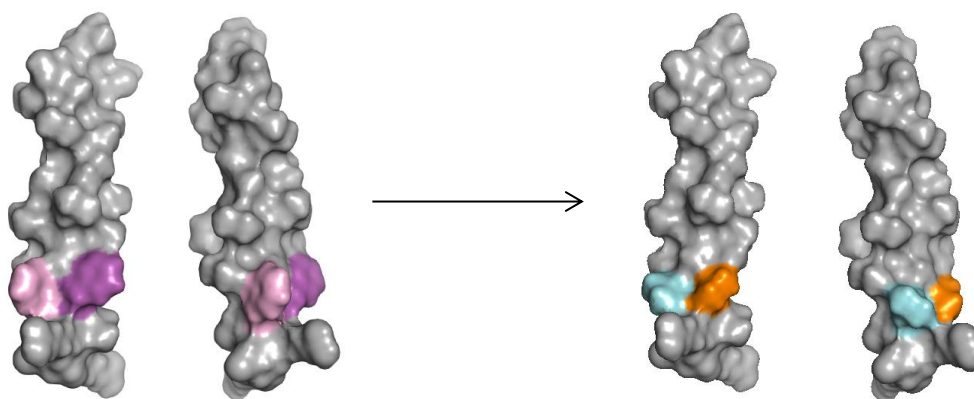


Obrázek 42 - patrové interakce benzenu [37]

CD4 wt	VQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGF FF CVRCR
CD4 dim7	VQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGF VL CVRCR

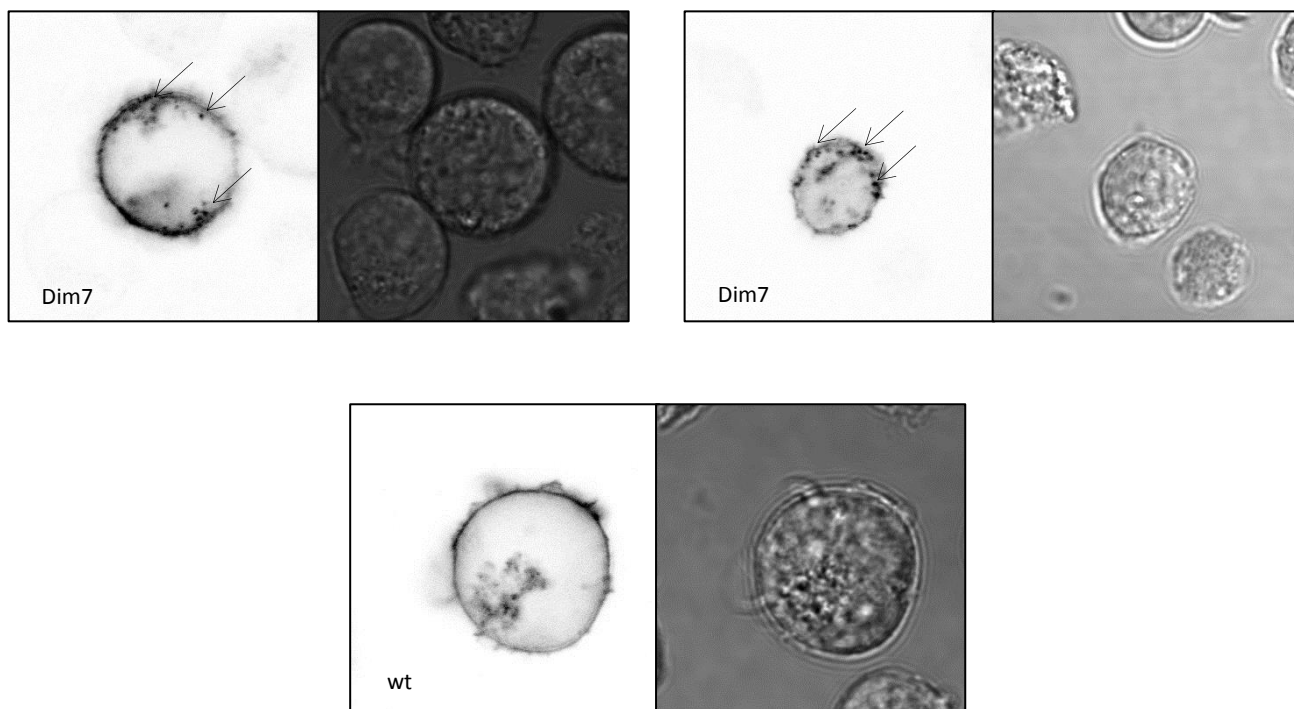


Obrázek 43 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [38] [39] [40]



Obrázek 44 – následky mutací pro 3D strukturu – vlevo: F417 (fialová); F418 (růžová); vpravo: V417 (oranžová); L418 (azurová) [14]

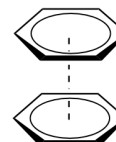
Konfokální mikroskopie odhalila, že ačkoliv se dim7 dostává na cytoplazmatickou membránu, je **zvýšená recyklace** z plazmatické membrány (viz 1.1.4.). Čistě teoreticky je možné, že dim7 není stabilní, a proto je z PM stahován. Stejně jako u předchozí mutace nevidíme intracelulární struktury jako Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum, tudíž není nijak negativně ovlivněna kontrola kvality proteinu (viz 1.1.5.). Nicméně není vyloučeno, že váčky lokalizované pod PM nejsou lysosomy. Toto bude také ověřeno kolokalizační mikroskopií.



Obrázek 45 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 Dim7 [36]

4.3. Mutant CD4 3F (F411V; F417V; F418L)

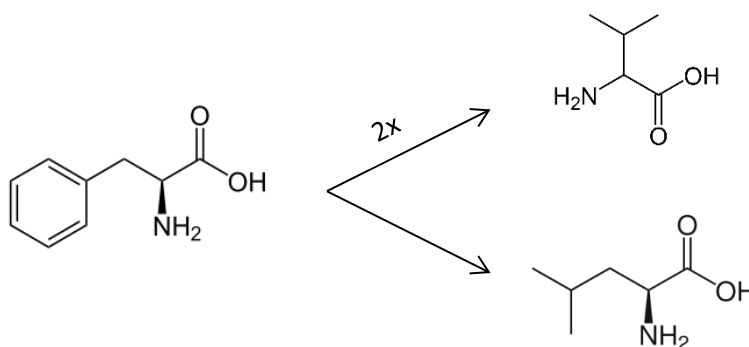
Tento konstrukt se velmi podobá dim7. Liší se od něj jednou mutací v podobě záměny třetího, a posledního, fenylalaninu za aminokyselinu bez benzenového jádra. Logicky předpokládáme, že pokud opravdu dochází k dimerizaci CD4 wt díky těmto patrovým interakcím, tak 3F nám poskytne jasnou informaci zda-li tomu tak je či nikoliv.



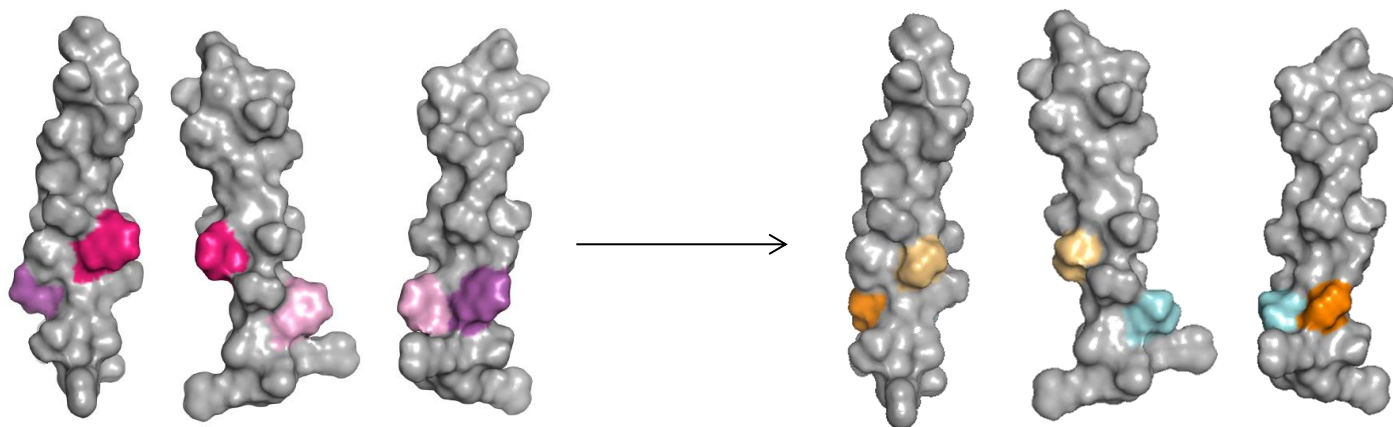
Obrázek 46 – patrové interakce benzenu [37]

CD4 wt VQPMALIVLGGVAGLLL**FIGLGF**CVRRCR

CD4 3F VQPMALIVLGGVAGLLL**VIGLGV**CVRRCR

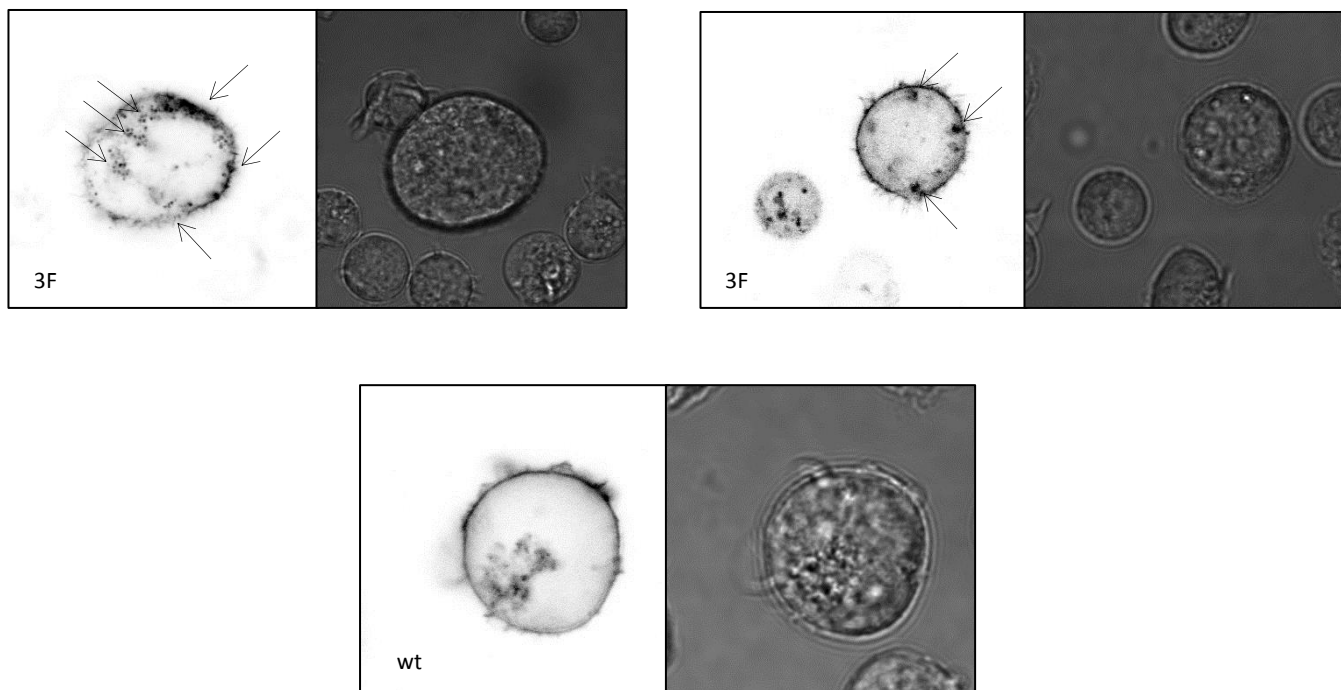


Obrázek 47 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [38] [39] [40]



Obrázek 48 – následky mutací pro 3D strukturu – vlevo: F411 (tmavě růžová); F417 (fialová); F418 (růžová); vpravo: F411 (světle oranžová); F417 (oranžová); F418 (azurová) [14]

Data z mikroskopu ukazují, že dochází k **silné recyklaci** CD4 3F z cytoplazmatické membrány. Nedochozí k zasekávání proteinu na endoplazmatickém retikulu, ani v Golgiho aparátu, ale má zřejmě problémy se stabilitou. Zdá se, že počet váčků je vyšší oproti dim7, ale tyto data nelze zatím kvantitativně vyjádřit. Proto se pokusíme vytvořit analytickou metodu na sledování počtu vezikul.

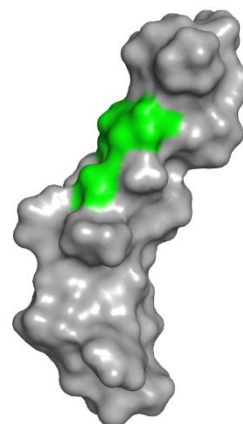


Obrázek 49 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 3F [36]

4.4. Mutant CD4 3G (G403L; G404I; G407V)

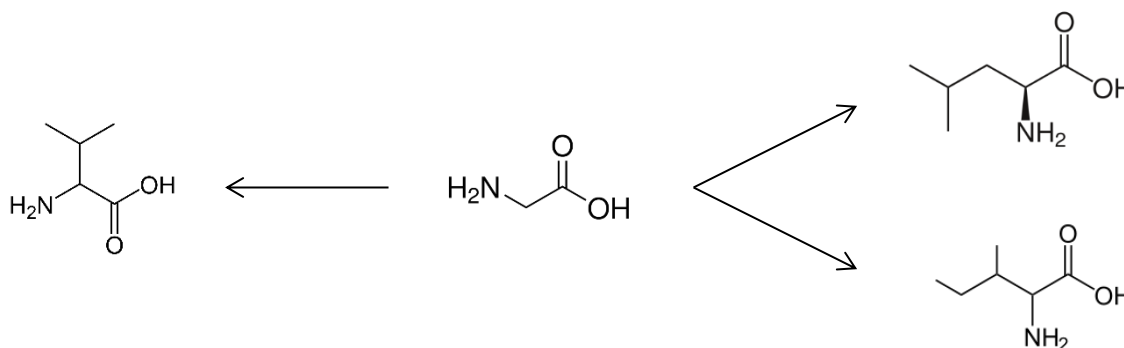
Důvodem pro záměnu tří **glycinů** za aminokyseliny s velkými nepolárními postranními řetězci je fakt, že tyto tři glyciny vytváří ve 3D struktuře transmembránové domény jakýsi žlábek. Právě tento žlábek by mohl potenciálně interagovat se stejnou strukturou na jiné molekule CD4 – zapadly by tak do sebe a vytvářely dimer.

Publikovaný článek již sice vyvrátil předpoklad, že motiv GGxxG stojí za dimerizací CD4 wt, nicméně jejich zkoumaný mutant měl změněnou jen jednu aminokyselinu (*GGxxG na GVxxL*), tudíž je možné, že to nebylo dostatečné, a navíc nezasáhli do motivu **GxxxG**, jenž je u určitých proteinů důležitý pro dimerizaci (*Parrish, 2015*).

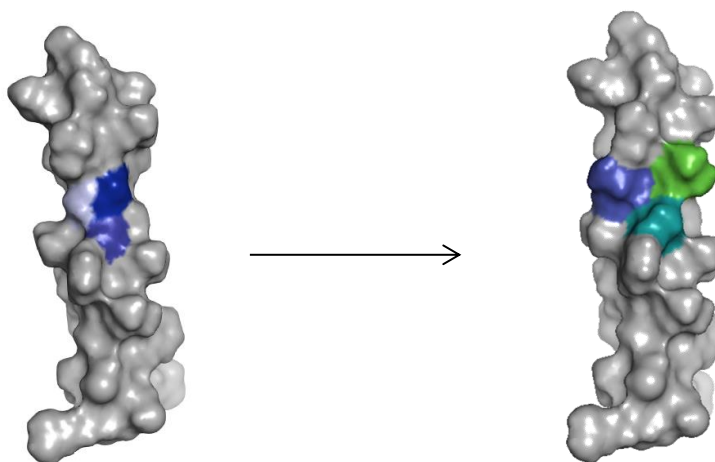


Obrázek 50 – ukázka žlábků v transmembránové doméně [14]

CD4 wt VQPMALIVL**GG**VAG**G**LLLFIGLGFFCVRCR
 CD4 3G VQPMALIVL**LIV**AV**V**LLLFIGLGFFCVRCR

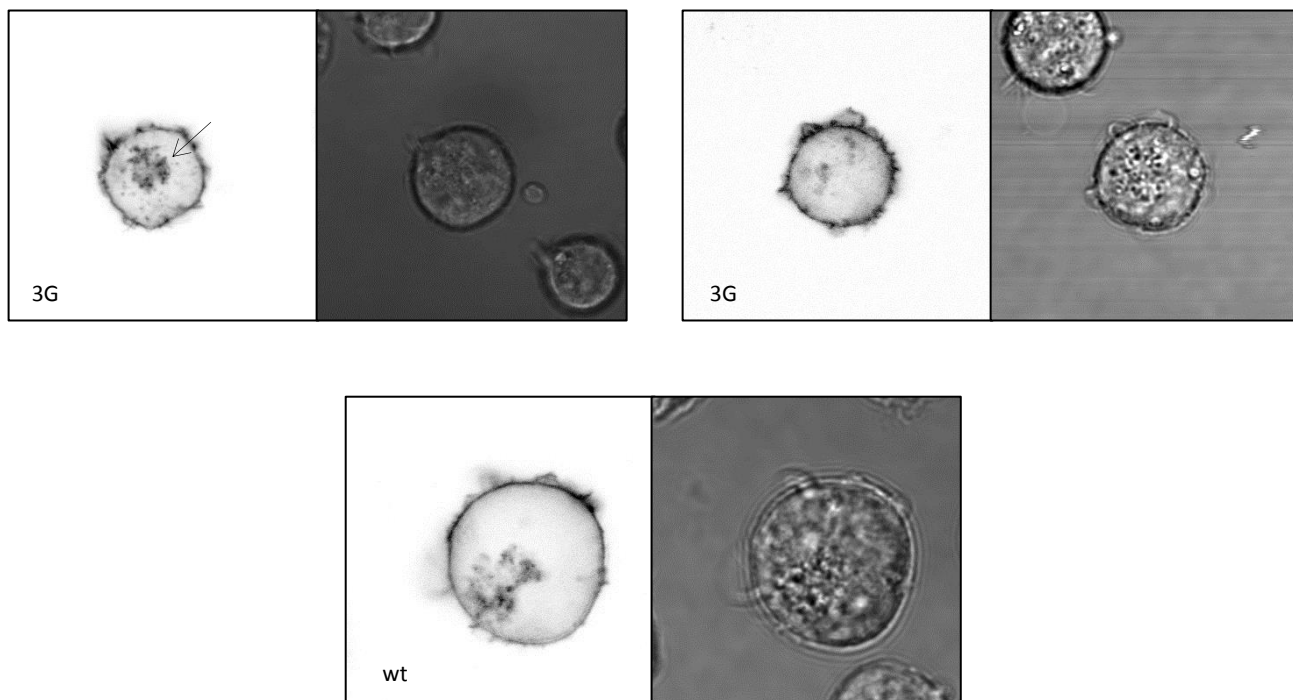


Obrázek 51 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [42] [41] [40] [39]



Obrázek 52 – následky mutací pro 3D strukturu – vlevo: G403 (tmavě modrá); G404 (bledě modrá); G407 (fialová); vpravo: L403 (světle zelená); I404 (fialová); V407 (tmavě zelená) [14]

Konstrukt 3G vykazuje přítomnost mutovaného proteinu jak na cytoplazmatické membráně, tak v Golgiho aparátu. Zhruba u **50 %** pozorovaných buněk docházelo k zastavení mutantů CD4 3G v GA. Musí tedy docházet k problému se sortingem (viz 1.1.5.), bude nutné specifikovat, k jakému problému dochází.



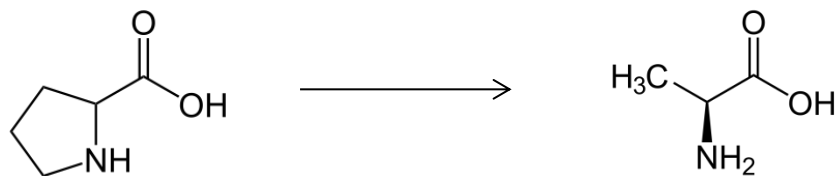
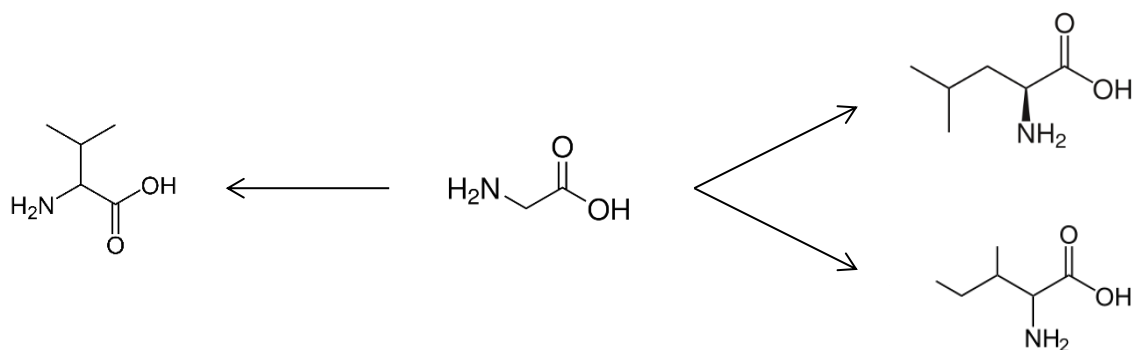
Obrázek 53 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 3G [36]

4.5. Combi (P396A; G403L; G404I; G407V)

Konstrukt combi je spojením konstruktů P396A (viz 4.1.) a 3G (viz 4.4.). Vytvořili jsme ho, jelikož by nám mohl pomoci objasnit, zda onen ohyb způsobený prolinem (P396A; viz 4.1.) mohl napomáhat „zapadnutí žlábků“ do sebe (3G; viz 4.4.). Také si myslíme, že ovlivníme dynamiku celého systému, jelikož prolin je velmi dynamický. (Perálvarez-Marín, et al; 2008)

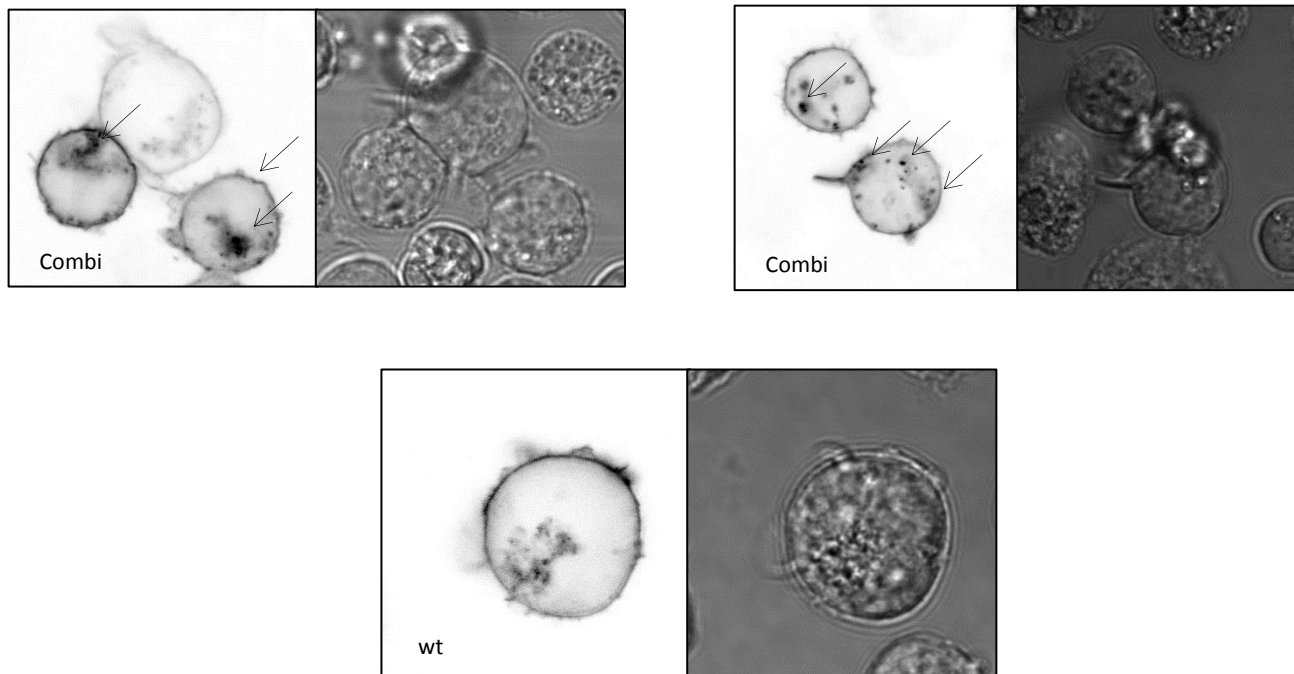
CD4 wt VQ**P**MALIVL**GG**V**A**G LLLFIGLGFFCVRRCR

CD4 kombinaturní VQ**A**MALIVL**L**IV**A**V LLLVIGLGVLCVRRCR



Obrázek 54 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [42] [41] [40] [39] [35] [34]

Konstrukt Combi na rozdíl od 3G vykazuje **silnější** problém s lokalizací na cytoplazmatické membráně – tedy se sortingem (*viz 1.1.5*). Mikroskopické snímky ukazují zastavení CD4 Combi v Golgiho aparátu, sníženou expresi na cytoplazmatické membráně a domníváme se, že je i transportován do lysozomů – to ovšem potvrdí až kolokalizační mikroskopie.



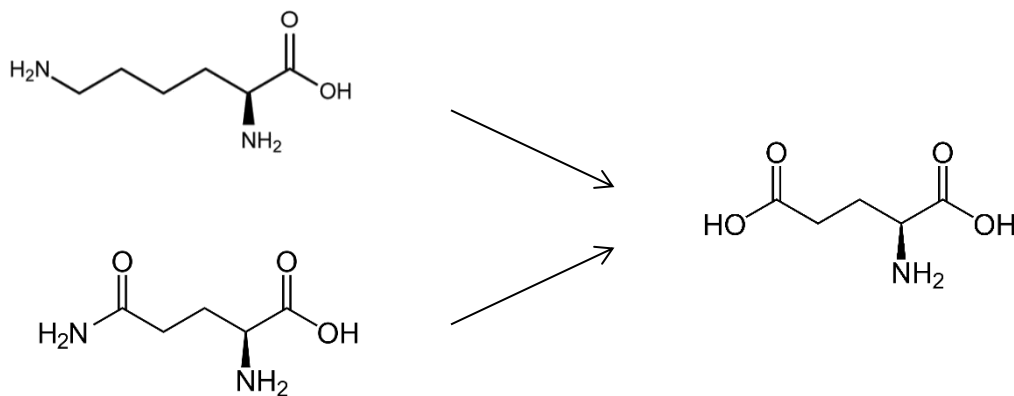
Obrázek 55 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 combi [36]

4.6. Mutant CD4 D4 (K318E; Q344E)

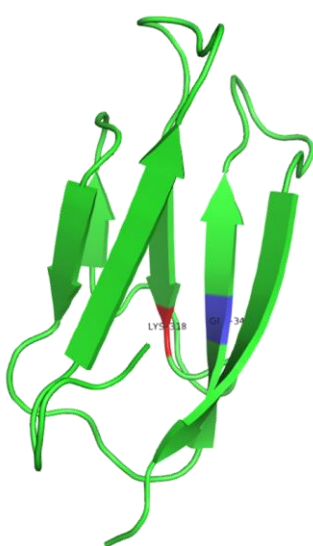
Důležitost K318 a Q344 (v doméně D4) pro funkčnost CD4 vyplývá na povrch při porovnání sekvencí DNA pro CD4 napříč druhy. Například člověk, šimpanz, kočka, králík a myš – tito všichni živočichové mají zachovaná tyto residua v extracelulární doméně CD4 proteinu. (Moldovan, et al; 2002)

Tyto mutace byly převzány z literatury (Moldovan, et al; 2002). Pro naše účely slouží spíše jako pozitivní kontrola, protože by měly zrušit dimerizaci.

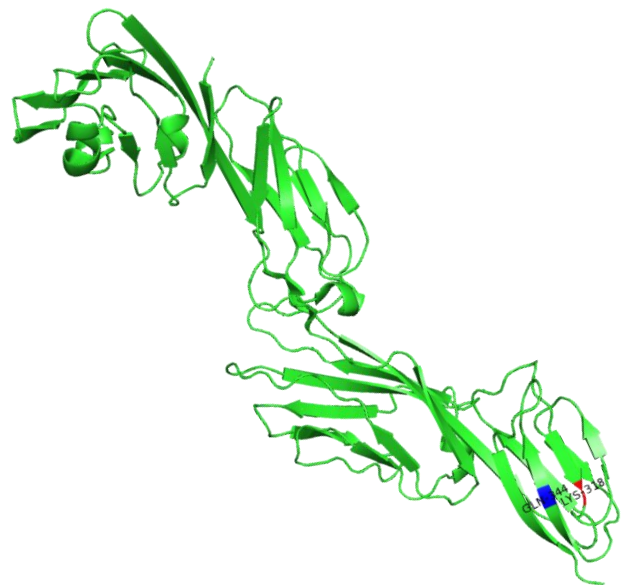
CD4 wt KLMLSL**K**LENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGM**W**Q**CL**LSDSGQVLL
CD4 D4 KLMLSL**E**LENKEAKVSKREKAVWVLNPEAGM**E**CLLSDSGQVLL



Obrázek 56 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [43] [44] [45]

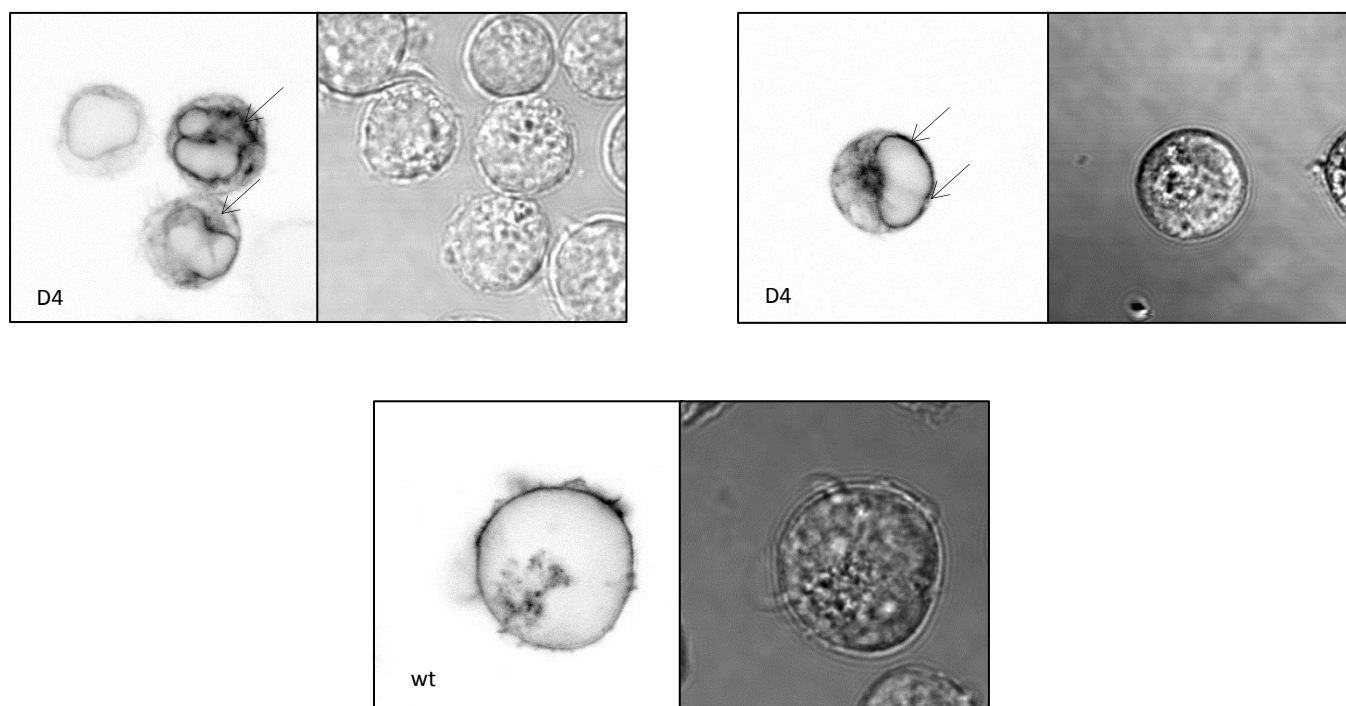


Obrázek 58 – 3D struktura extracelulární domény CD4 D4 [14] [15]



Obrázek 57 – 3D struktura extracelulární domény CD4 [14] [15]

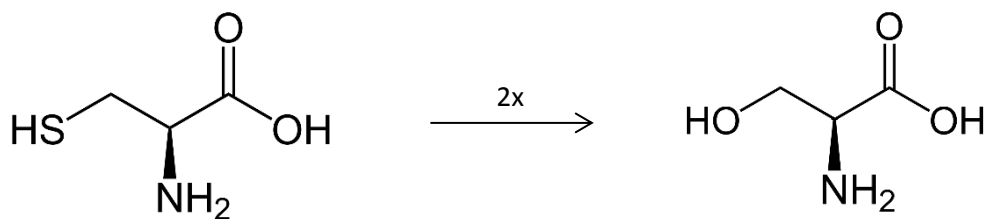
Díky tomu, že tato mutace byla již studována, můžeme porovnat výsledky publikované studie (*Moldovan, et al; 2002*) s našimi. Publikovaná data byla získána pomocí **biochemické** eseje – veškeré postupy a získané informace jsou validní, nicméně absence kombinací různých metod se zde ukázala být na škodu. Zmiňovaná studie informovala o faktu, že provedené mutace (*K318E; Q344E*) **zhoršují** aktivaci CD4 *K318E; Q344E*. Tento fakt vysvětlují **naše** výsledky získané konfokální mikroskopií – exprese na cytoplazmatickou membránu je výrazně **snížená**, neboť dochází k stagnaci proteinu v endoplazmatickém retikulu a v Golgiho aparátu. Aktivace T buněk mohla být potenciálně zhoršená v důsledku malého množství proteinu na membráně, nikoliv zhoršenou funkčností proteinu.



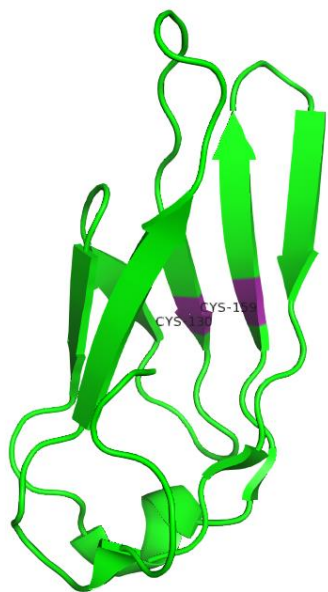
Obrázek 59 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 D4 [36]

4.7. Mutant CD4 D2 (C155S; C184S)

Výměna dvou **cysteinů** za serin byla také inspirována literaturou, neboť výsledky ohledně tohoto konstruktu byly již publikované (*Matthias et al, 2002*). Na „reakci“ níže můžeme vidět, jak se od sebe liší cystein od serinu. Jediné, v čem vidíme rozdíl, je zakončení uhlíkatého skeletu. Seriny **nemohou** vytvářet disulfidické můstky. Nepřidali jsme větší ani menší residuum, které by mohlo způsobovat nechtěné změny.



Obrázek 60 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [46] [47]

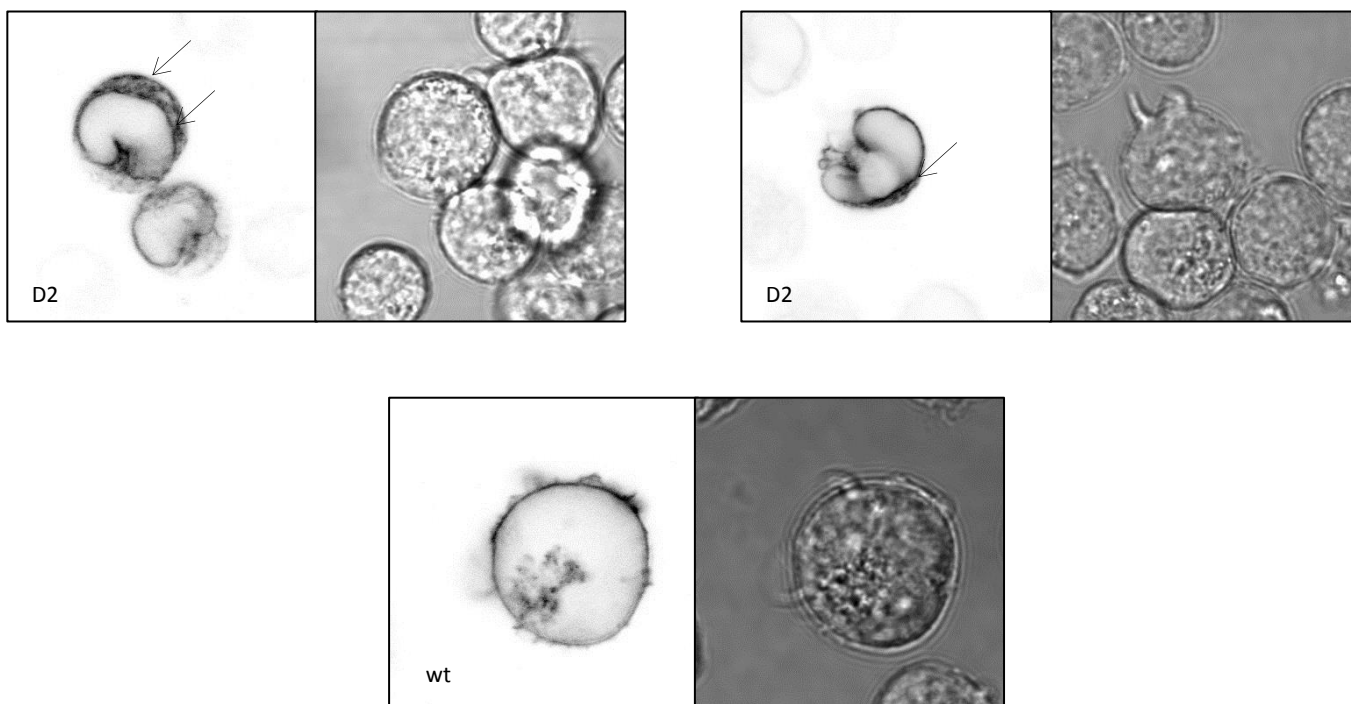


Obrázek 62 – 3D struktura extracelulární domény CD4 D4 [14] [15]



Obrázek 61 – 3D struktura extracelulární domény CD4 D4 [14] [15]

Data ohledně této mutace byly také již publikovány. Na základě biochemických dat došli k závěru, že zrušení disulfidického můstku vede k zrušení dimerizace (*založeno na základě dat z SDS PAGE*), a tím pádem ke snížené aktivaci T buněk (*Matthias et al; 2002*). Data však **nebyla** podložena mikroskopickými snímky. Ty může nabídnout naše práce a s nimi také možný důvod, proč nedocházelo k aktivaci. Naše data jasně ukazují, že mutovaný protein zůstává **zcela** v endoplazmatickém retikulu. Zdá se být vysoce pravděpodobné, že onen disulfidický můstek (155↔184) hraje **klíčovou** roli pro zaujetí nativní struktury CD4 nebo pro zaujetí jakéhosi mezistupně při tvorbě finální struktury.



Obrázek 63 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 D2 [36]

5. ZÁVĚR

V teoretické části práce se věnuji obecně **životu proteinů** v buňce – od proteosyntézy až k jejich recyklaci. Porozumění těmto pochodům je naprosto klíčové, protože interpretace dat získaných konfokální mikroskopií na nich stojí. **Receptor CD4**, jenž je klíčový pro fungování našeho imunitního systému, je též popsán v teoretické části práce, protože celý tento projekt je zaměřen na pochopení fungování tohoto receptoru. Uvedeny jsou jeho funkce, stavba a vývoj názorů na jeho fungování. Porozumění stavbě tohoto proteinu je velmi důležité, neboť se jedná o receptor, jenž je nezbytný pro vstup HIV do buněk a regulaci imunitní odpovědi. Pokud tedy chceme vyvinout nové způsoby terapie pro lidi infikované virem HIV či s poruchami imunity, je nutné plně porozumět tomuto receptoru v jeho nativním prostředí. V neposlední řadě se věnuji **fluorescenčním proteinům**, a především EGFP, jelikož se jedná o nenahraditelné pomocníky při zkoumání proteinů – umožňují nám pozorovat jejich přesnou lokalizaci v živých buňce.

Celá jedna část práce je věnována použitým metodám – metody jsou popsány a vysvětleny za doprovodu ilustračních obrázků.

Práce zatím přinesla zajímavé a nové informace, které mnohdy doplnily již publikované výsledky. Naši prací jsme **objasnili** důvod, proč je v případě konstruktů D2 a D4 pozorována **snížená** aktivace T buněk – publikováno Matthias et al; 2002 a Moldovan, et al; 2002. Mikroskopické snímky všech mutantů nás posunuly dále ve výzkumu a daly nám představu o tom, s čím pracujeme, jak naše „pracovní pole“ vypadá, a hlavně jsou získané snímky podkladem pro náš další výzkum.

Ačkoliv se jedná o obecný závěr, je nutné říci, že **kombinace** mikroskopických, biochemických a funkčně imunologických metod je naprosto **klíčová**, neboť žádná není dokonalá a nepřinese veškeré informace. Dovoluji si říct, že při práci s mutovanými proteiny je téměř nezbytné využít **zobrazovací** metody, neboť záměna „pouhé“ jedné aminokyseliny může vést k razantní změně lokalizace proteinu v buňce.

Veškeré cíle projektu nebyly zatím splněny, nicméně práce na projektu stále probíhají. V nejbližší době nás čeká příprava dalších konstruktů a měření vazby zmutovaných verzí CD4 s gp120 (**HIV**) pomocí průtokové cytometrii (**FACS**). Dále plánujeme provést **kolokalizační** mikroskopii, jež potvrdí, nebo vyvrátí naše předpoklady ohledně recyklace u P396A, dim7, 3F, 3G a combi mutantů. Mikroskopie s vysokým rozlišením (**PALM**) bude provedena na konstruktech, které vykazují přítomnost mutované verze CD4 na cytoplazmatické membráně (*tj. P396A, dim7, 3F, 3G, combi a D4*). V neposlední řadě bude provedena biochemická analýza mutovaných proteinů CD4 (**SDS PAGE a Western blot**), abychom určili, zda mutanti v buňce dimerizují či nikoliv a na základě veškerých dat se budeme rozhodovat o tom, jestli provést komplexní měření **FRET** pro charakterizaci dimerů nebo shluků receptoru CD4 na povrchu T buněk.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

6.1. Používané odborné články

ARTYOMOV, M. N., M. LIS, S. DEVADAS, M. M. DAVIS a A. K. CHAKRABORTY. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, **107**(39), 16916-16921 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1073/pnas.1010568107. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010568107>

BOTTOMLY, K. *Subsets of CD4 T cells and B cell activation* [online]. 1989 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630956>

FOURNIER, Margot, Marion PEYROU, Lucie BOURGOIN, Christine MAEDER, Isabelle TCHOU a Michelangelo FOTI. CD4 dimerization requires two cysteines in the cytoplasmic domain of the molecule and occurs in microdomains distinct from lipid rafts. *Molecular Immunology* [online]. 2010, **47**(16), 2594-2603 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.06.010. ISSN 01615890. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589010004797>

HUOTARI, Jatta a Ari HELENIUS. Endosome maturation. *The EMBO Journal* [online]. 2011, **30**(17), 3481-3500 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1038/emboj.2011.286. ISSN 02614189. Dostupné z: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.286>

CHEN, B., M. RETZLAFF, T. ROOS a J. FRYDMAN. Cellular Strategies of Protein Quality Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2011, **3**(8), a004374-a004374. DOI: 10.1101/cshperspect.a004374. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a004374>

KANCHISWAMY, Chidananda, Mickael MALNOY, Andrea OCCHIPINTI a Massimo MAFFEI. Calcium Imaging Perspectives in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(3), 3842-3859 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.3390/ijms15033842. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/3/3842>

KAZAZI, F., J.-M. MATHIJS, P. FOLEY a A. L. CUNNINGHAM. Variations in CD4 Expression by Human Monocytes and Macrophages and Their Relationship to Infection with the Human Immunodeficiency Virus. *Journal of General Virology* [online]. 1989, **70**(10), 2661-2672 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1099/0022-1317-70-10-2661. ISSN 0022-1317. Dostupné z: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-70-10-2661>

KENWAY-LYNCH, C. S., A. DAS, A. A. LACKNER a B. PAHAR. Cytokine/Chemokine Responses in Activated CD4 and CD8 T Cells Isolated from Peripheral Blood, Bone Marrow, and Axillary Lymph Nodes during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Virology* [online]. 2014, **88**(16), 9442-9457 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1128/JVI.00774-14. ISSN 0022-538X. Dostupné z: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00774-14>

MATTHIAS, Lisa J., Patricia T.W. YAM, Xing-Mai JIANG, Nick VANDEGRAAFF, Peng LI, Pantelis POUMBOURIOS, Neil DONOGHUE a Philip J. HOGG. Disulfide exchange in domain 2 of CD4 is required for entry of HIV-1. *Nature Immunology* [online]. 2002, **3**(8), 727-732 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1038/ni815. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ni815>

MELNYK, Roman A., Sanguk KIM, A. Rachael CURRAN, Donald M. ENGELMAN, James U. BOWIE, Charles M. DEBER, Neil DONOGHUE a Philip J. HOGG. The Affinity of G XXX G Motifs in Transmembrane Helix-Helix Interactions Is Modulated by Long-range Communication. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(16), 16591-16597 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1074/jbc.M313936200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M313936200>

MOLDOVAN, M. C., A. YACHOU, K. LEVESQUE, H. WU, W. A. HENDRICKSON, E. A. COHEN a R. P. SEKALY. CD4 Dimers Constitute the Functional Component Required for T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2002, 1928, **169**(11), 6261-6268. DOI: 10.4049/jimmunol.169.11.6261. ISSN 0022-1767. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.11.6261>

MUNOZ, V. a M. CERMINARA. When fast is better: protein folding fundamentals and mechanisms from ultrafast approaches. *Biochemical Journal* [online]. 2016, **473**(17), 2545-2559 [cit. 2018-03-05]. DOI: 10.1042/BCJ20160107. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BCJ20160107>

PARRISH, Heather L., Caleb R. GLASSMAN, Madeline M. KEENEN, Neha R. DESHPANDE, Matthew P. BRONNIMANN, Michael S. KUHNS a Marek CEBECAUER. A Transmembrane Domain GGxxG Motif in CD4 Contributes to Its Lck-Independent Function but Does Not Mediate CD4 Dimerization. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(7), e0132333- [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1371/journal.pone.0132333. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132333>

PERÁLVAREZ-MARÍN, Alex, Victor A. LÓRENZ-FONFRÍA, Rosana SIMÓN-VÁZQUEZ, Maria GOMARIZ, Inmaculada MESEGUER, Enric QUEROL a Esteve PADRÓS. Influence of Proline on the Thermostability of the Active Site and Membrane Arrangement of Transmembrane Proteins. *Biophysical Journal* [online]. 2008, **95**(9), 4384-4395 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1529/biophysj.108.136747. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000634950878576X>

RAHEMTULLA, A., W. P. FUNG-LEUNG, M. W. SCHILHAM, et al. Normal development and function of CD8 cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* [online]. 1991, **353**(6340), 180-184 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1038/353180a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/353180a0>

SATTENTAU, Q. J. a J. P. MOORE. The Role of CD4 in HIV Binding and Entry. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 1993, **342**(1299), 59-66 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1098/rstb.1993.0136. ISSN 0962-8436. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1993.0136>

6.2. Internetové zdroje

- [1] OPHARDT, Charles. Protein Synthesis. *Virtual Chembook* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/584proteinsyn.html>
- [2] *ThermoFisher: Scientific* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html>
- [3] SODERBERG, Tim. *Redox reactions involving thiols and disulfides* [online]. 2015 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_\(Soderberg\)/16%3A_Oxidation_and_reduction_reactions/16.12%3A_Redox_reactions_involving_thiols_and_disulfides](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_(Soderberg)/16%3A_Oxidation_and_reduction_reactions/16.12%3A_Redox_reactions_involving_thiols_and_disulfides)
- [4] HUMPHREY, John H. a Samuel Scott PERDUE. Immune system. In: *ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/immune-system>
- [5] Antigen. In: *ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/antigen>
- [6] ŠTĚPÁNEK. Fluorescenční proteiny [online]. [cit. 2018-02-18]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/studium/predmety/index.php?do=download&did=25971&kod=NBCM008>
- [7] Richard N. DAY a Michael W. DAVIDSON. Zeiss: Education in Microscopy and Digital Imaging [online]. [cit. 2018-02-18]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>
- [8] ČERNÝ, Jan. Zelený fluorescenční protein. *Vesmír* [online]. 2009 [cit. 2018-02-18]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2009/cislo-4/zeleny-fluorescenci-protein.html>
- [9] NERADIL, Jakub. *Fluorescenční mikroskopie* [online]. 2016 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi8920/um/2016_04_Fluorescenci_zobrazeni_zivych_bunek.txt
- [10] Elektroforetická separace nukleových kyselin. *Lab Guide: Průvodce laboratoří* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
- [11] *ThermoFisher: Scientific* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning->

[center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html](http://center.invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html)

7. ZDROJE OBRÁZKŮ

- [1] SODERBERG, Tim. *Redox reactions involving thiols and disulfides* [online]. 2015 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_\(Soderberg\)/16%3A_Oxidation_and_reduction_reactions/16.12%3A_Redox_reactions_involving_thiols_and_disulfides](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_(Soderberg)/16%3A_Oxidation_and_reduction_reactions/16.12%3A_Redox_reactions_involving_thiols_and_disulfides)
- [2] MUNOZ, V. a M. CERMINARA. When fast is better: protein folding fundamentals and mechanisms from ultrafast approaches. *Biochemical Journal* [online]. 2016, **473**(17), 2545-2559 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1042/BCJ20160107. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BCJ20160107>
- [3] Protein structure. In: *StudyBlue* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.studyblue.com/notes/hh/protein-structure/26783520428603824>
- [4] Differential arrangement of hydrophobic and hydrophilic residues in soluble versus membrane proteins. In: *ResearchGate* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Differential-arrangement-of-hydrophobic-and-hydrophilic-residues-in-soluble-versus_fig11_282270887
- [5] Intracellular trafficking and membrane traffic. In: *WormBook* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: http://www.wormbook.org/chapters/www_intracellulartrafficking.2/membranetraffic_fig1.jpg
- [6] Vesicle formation. In: *The Rye Laboratory* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: http://ryeserv1.tamu.edu/_Media/vesicle_formation_med.png
- [7] Tomáš Chum, 2018
- [8] Hematopoéza. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/66/Hematopoeza.png/1200px-Hematopoeza.png>
- [9] MHC II - TCR complex. In: *Frontiers* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: https://www.frontiersin.org/files/Articles/55589/fimmu-04-00206-HTML/image_m/fimmu-04-00206-g003.jpg
- [10] LAŠŤOVIČKA, Jan. T lymfocyty. In: *DocPlayer* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/docs-images/57/40433804/images/13-0.jpg>

- [11] Phagocytosis. In: *Science-tuition* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://science-tuition.co.uk/wp-content/uploads/2013/10/phagocytosis.jpg>
- [12] Immunology. In: *Memorang* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.memorangapp.com/flashcards/111979/Immunology+-+Block+III/>
- [13] Immunology. In: *Memorang* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.memorangapp.com/flashcards/111979/Immunology+-+Block+III/>
- [14] Vytvořeno autorem práce v The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
- [15] WU, Hao, Peter D. KWONG a Wayne A. HENDRICKSON. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* [online]. 1997, **387**(6632), 527-530 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1038/387527a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/387527a0>
- [16] *CD4-Lck complex* [online]. In: . [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0161589010004797-gr9.jpg>
- [17] CD4+ cell activation. In: *Molecular and cellular biology* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://mcb.asm.org/content/33/11/2188/F1.large.jpg>
- [18] DAY, Richard N. a Michael W. DAVIDSON. *Education in Microscopy and Digital Imaging* [online]. In: . [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>
- [19] PCR. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#/media/File:Polymerase_chain_reaction.svg
- [20] Gel electrophoresis. In: *Dokimi Science* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: http://www.dokimiscience.com/uploads/4/6/9/2/46925269/___942263224.jpg
- [21] Elektroforetická separace nukleových kyselin. In: *Lab Guide* [online]. 2014 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
- [22] Nhe I from *Neisseria mucosa heidelbergensis*. In: *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r5634?lang=en®ion=CZ>
- [23] BamH I from *Bacillus amyloliquefaciens* H. In: *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0260?lang=en®ion=CZ>

- [24] Kpn I from *Klebsiella pneumoniae*. In: *Sigma Aldrich* [online]. 2014 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r1258?lang=en®ion=CZ>
- [25] DNA Ligation. In: *AddGene* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/protocols/dna-ligation/>
- [26] Bacterial Transformation and Competent Cells. In: *ThermoFisher* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html>
- [27] *DNA sequencing* [online]. In: . [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://ka-perseus-images.s3.amazonaws.com/d56c026870bbfee4658a9eaa52daba496d4a58ad.png>
- [28] Midi-prep. In: *ThermoFisher* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/figures/3361.jpg-650.jpg>
- [29] Bacterial Transformation and Competent Cells. In: *ThermoFisher* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html>
- [30] PLL (Poly-L-lusine) coated glass slide. In: *Matsunami glass* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: http://www.matsunami-glass.co.jp/english/life/clinical_g/data14.html
- [31] Ibidi u-Slide 8 well. In: *Applied BioPhysics* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://www.biophysics.com/uSLIDE8well.php>
- [32] PADDOCK, Stephen W., James B. PAWLEY a Thomas J. Introduction to Confocal Microscopy. In: *Molecular expression: Optical Microscopy Primer* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/confocalintroduction.html>
- [33] Why does a proline break an alpha helix?. In: *Quora* [online]. 2017 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.quora.com/Why-does-a-proline-break-an-alpha-helix>
- [34] Prolin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/ff/Prolin_-_Proline.svg/220px-Prolin_-_Proline.svg.png
- [35] L-alanine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/90/L-Alanin - L-Alanine.svg/1200px-L-Alanin - L-Alanine.svg.png>

[36] Autorovy snímky z konfokální mikroskopie

[37] Three representative conformations of the benzene dimer. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Stacking_\(chemistry\)#/media/File:BenzeneDimerGeometries.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Stacking_(chemistry)#/media/File:BenzeneDimerGeometries.png)

[38] L-Phenylalanine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

<https://en.wikipedia.org/wiki/File:L-Phenylalanin - L-Phenylalanine.svg>

[39] Valine. In: *Wiktionary* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

https://fr.wiktionary.org/wiki/valine#/media/File:Valine_simple.png

[40] L-Leucine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4d/L-Leucine.svg/1200px-L-Leucine.svg.png>

[41] Glycine. In: *MpBio* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

<https://www.mpbio.com/images/product-images/molecular-structure/02100570.png>

[42] Isoleucine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/45/Isoleucin - Isoleucine.svg/2000px-Isoleucin - Isoleucine.svg.png>

[43] Lysine. In: *HGH10* [online]. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://www.hgh10.com/wp-content/uploads/2015/04/lysine.jpg>

[44] *Glutamine* [online]. In: . [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: https://cdn-images-1.medium.com/max/1600/1*abOIqIKisSdlNIZyWiRh_Q.jpeg

[45] Glutamic acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/db/L-Glutamins%C3%A4ure - L-Glutamic acid.svg/2000px-L-Glutamins%C3%A4ure - L-Glutamic acid.svg.png>

[46] L-cysteine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-03-23]. Dostupné z:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1a/L-Cystein - L-Cysteine.svg/1200px-L-Cystein - L-Cysteine.svg.png>

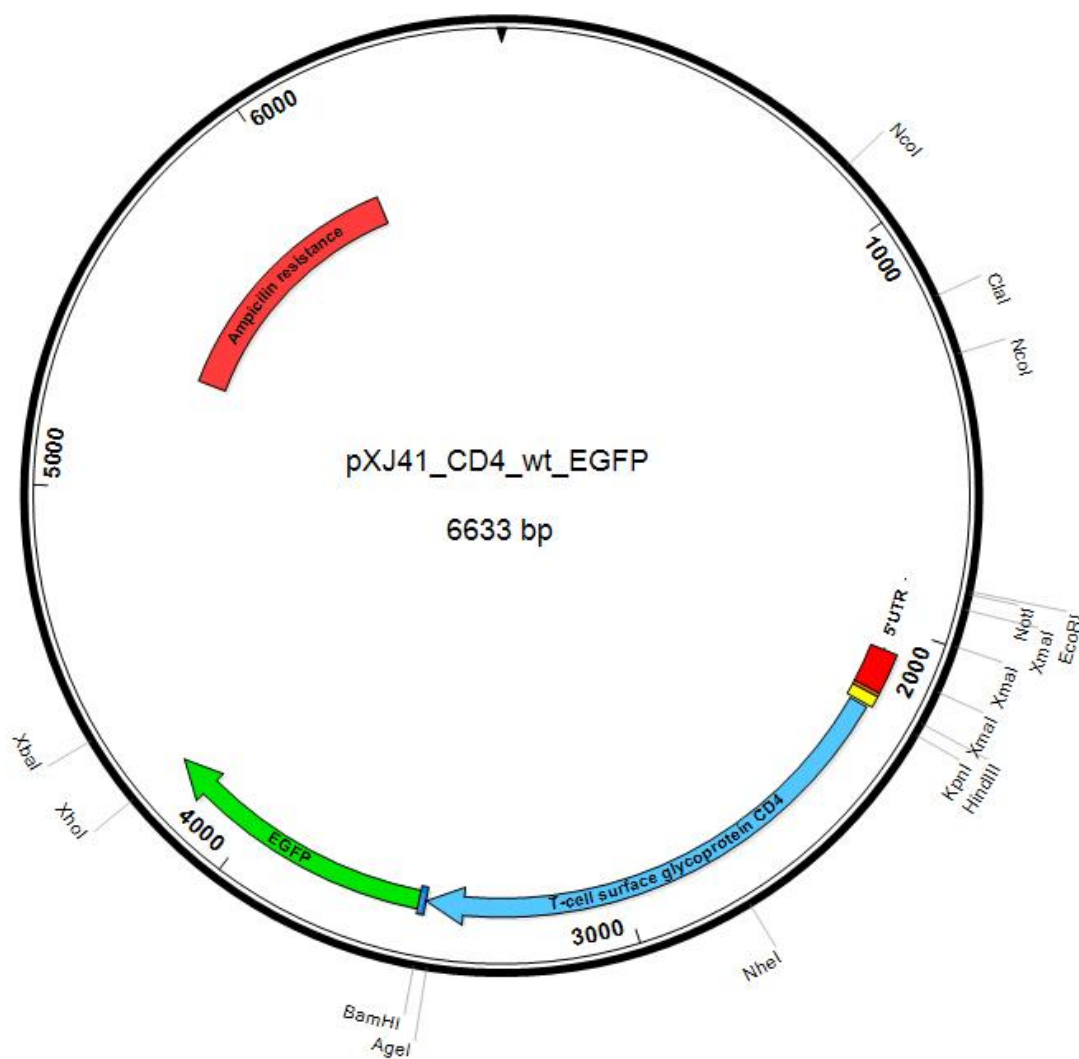
8. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 – proces vzniku disulfidového můstku [1].....	11
Obrázek 2 – proces skládání proteinů [2].....	12
Obrázek 3 – chemické interakce v rámci proteinů [3]	13
Obrázek 4 – rozdíl mezi rozpustným a nerozpustným proteinem [4].....	14
Obrázek 5 – transport proteinů z ER [5].....	14
Obrázek 6 – proces vezikulárního transportu [6].....	14
Obrázek 7 – proces recyklace [5].....	15
Obrázek 8 – ukázka proteinů, které zůstávají v GA, ER a PM [7]	16
Obrázek 9 – diferenciací hematopoetické buňky [8]	17
Obrázek 10 – komplex TCR-MHCII-CD4 [9]	18
Obrázek 11 – stavba MHC II [10].....	18
Obrázek 12 – proces fagocytózy patogenu a jeho následné zpracování [11]	19
Obrázek 13 – komplex CD4 - MHC II – TCR [12]	19
Obrázek 14 – stavba CD4 [13]	20
Obrázek 15 – stavba extracelulární domény CD4 [14][15]	20
Obrázek 16 – porovná disulfidických můstků v doménech D1, D2 a D4 [14][15].....	20
Obrázek 17 – důsledek GGxxG motivu [14].....	21
Obrázek 18 – komplex CD4-Lck [16].....	22
Obrázek 19 – proces aktivace imunitní odpovědi [17].....	22
Obrázek 20 – proces vzniku aktivního chromoforu [18]	24
Obrázek 21 – struktura GFP [18]	25
Obrázek 22 – deriváty wtGFP a jejich barvy [18]	25
Obrázek 23 – proces PCR reakce [19].....	28
Obrázek 24 – ukázka gelové elektroforézy [20]	29
Obrázek 25 – ukázka výsledků gelové elektroforézy [21]	29
Obrázek 26 – restrikční místo Nhe I [22].....	30
Obrázek 27 – restrikční místo BamH I [23].....	30
Obrázek 28 – restrikční místo Kpn I [24]	30
Obrázek 29 – schématická ukázka ligace DNA [25].....	30
Obrázek 30 – proces transformace bakterií tepelným šokem [26].....	31
Obrázek 31 – proces sekvenace DNA [27].....	32
Obrázek 32 – proces izolace plazmidů [28].....	33
Obrázek 33 – proces elektroporace buněk [29]	34
Obrázek 34 – funkce polylysinu [30]	34
Obrázek 35 – I-bidi sklíčka [31].....	34
Obrázek 36 – princip konfokálního mikroskopu [32]	35
Obrázek 37 – standardní vs. konfokální mikroskop [32].....	35
Obrázek 38 – ukázka rozrušení alfa helixu pomocí prolinu [33]	36
Obrázek 39 – grafické zobrazení záměny prolinu za alanin [34][35].....	36

Obrázek 40 – vlevo: P396 (červená); vpravo: P396A (zelená) [14]	36
Obrázek 41 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 P396A [36]	37
Obrázek 42 – patrové interakce benzenu [37].....	38
Obrázek 43 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [38] [39] [40]	38
Obrázek 44 – následky mutací pro 3D strukturu – vlevo: F417 (fialová); F418 (růžová); vpravo: V417 (oranžová); L418 (azurová) [14]	38
Obrázek 45 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 Dim7 [36]	39
Obrázek 46 – patrové interakce benzenu [37].....	40
Obrázek 47 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [38] [39] [40]	40
Obrázek 48 – následky mutací pro 3D strukturu – vlevo: F411 (tmavě růžová); F417 (fialová); F418 (růžová); vpravo: F411 (světle oranžová); F417 (oranžová); F418 (azurová) [14].....	40
Obrázek 49 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 3F [36].....	41
Obrázek 50 – ukázka žlábku v transmembránové doméně [14]	42
Obrázek 51 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [42] [41] [40] [39]	42
Obrázek 52 – následky mutací pro 3D strukturu – vlevo: G403 (tmavě modrá); G404 (bledě modrá); G407 (fialová); vpravo: L403 (světle zelená); I404 (fialová); V407 (tmavě zelená) [14]	42
Obrázek 53 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 3G [36]	43
Obrázek 54 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [42] [41] [40] [39] [35] [34]	44
Obrázek 55 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 combi [36].....	45
Obrázek 56 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [43] [44] [45]	46
Obrázek 57 – 3D struktura extracelulární domény CD4 [14] [15].....	46
Obrázek 58 – 3D struktura extracelulární domény CD4 D4 [14] [15].....	46
Obrázek 59 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 D4 [36]	47
Obrázek 60 – grafické zobrazení mutací, které proběhly [46] [47].....	48
Obrázek 61 – 3D struktura extracelulární domény CD4 D4 [14] [15].....	48
Obrázek 62 – 3D struktura extracelulární domény CD4 D4 [14] [15].....	48
Obrázek 63 – snímky z konfokální mikroskopie mutantu CD4 D2 [36]	49
Tabulka 1 - Porovnání sekvencí transmembránových domén CD4 u různých živočichů []	21
Tabulka 2 - Souhrn použitých materiálů.....	26

9. PŘÍLOHY

9.1. Mapa používaného plazmidu



9.2. Používané protokoly

9.2.1. PCR pro zavádění mutace

ČASOVÁ NÁROČNOST

1 hodina a 30 minut

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Termocyklér
2. Polystyrenová krabice
3. Pipety a špičky
4. PCR zkumavky
5. Stojánek na PCR zkumavky
6. Mikrocentrifuga

CHEMIKÁLIE

1. Led
2. PCR H₂O (16,25 µl/reakce)
3. nukleotidy (0,5 µl/reakce; 10 mM)
4. templatová DNA (1 µl/reakce; 100 ng/µl)
5. vhodné primery (2x 1 µl/reakce; 25 mM)
6. Q5® High-Fidelity DNA polymeráza (0,25 µl/reakce)
7. Q5® 5X reakční pufr (5 µl/reakce)

POSTUP

1. Do polystyrenové krabice dáme led – reakční směs je nutné míchat při nízkých teplotách, aby nedocházelo k degradaci jednotlivých komponentů.
2. Na led umístíme stojánek s PCR zkumavkami, do nichž odpipetuje veškeré chemikálie (krom ledu) – začíná se vodou (je jí nejvíce – je jednodušší pipetovat malé objemy, jako např. 1 µl, do většího objemu tekutiny, nežli do prázdné zkumavky) a končí se polymerázou (je nejdražší, takže pokud se něco pokazí při pipetování ostatní látek, neplýtvá se polymerázou).
3. Zkumavky uzavřeme, cvrnkáním „promícháme“, stočíme na mikrocentrifuze a umístíme do termocykléru, zapneme.

NASTAVENÍ TERMOCYKLÉRU

1. 98 °C, 1:00
2. 98 °C, 0:10
3. Ta (záleží na primeru), 0:30
4. 72 °C, 1:00
5. GOTO step 2, 25x
6. 72 °C, 5:00
7. 15 °C, ∞

POZNÁMKA

Pro zavedení mutace je nutné provést PCR reakci 2x. Po první PCR jsou její produkty rozděleny pomocí gelové elektroforézy, požadovaná DNA je extrahována a následuje druhá PCR reakce, ale s jinými primery (viz. seznam používaných primerů – 1. PCR – 1. zkumavka: specifický Fwd primer + obecný Rev primer a 2. zkumavka: specifický Rev + obecný Fwd; 2. PCR – obecné Rev i Fwd primery)

9.2.2. Gelová elektroforéza

ČASOVÁ NÁROČNOST

15 minut chlazení gelu + 30 minut samotná elektroforéza

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- | | |
|------------------------------|----------------------|
| 1. Zdroj elektrického proudu | 7. Skalpel |
| 2. Nádoba na elektroforézu | 8. UV box |
| 3. Forma na gel s hřebínky | 9. Mikrovlnná trouba |
| 4. Eppendorfová zkumavka | 10. Váhy a váženka |
| 5. Pipety a špičky | 11. Reagenční láhev |
| 6. Fotoaparát | 12. Vodní lázeň |

CHEMIKÁLIE

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Vzorek (PCR produkty, DNA po štěpení) | 5. 1X TAE pufr (200 ml) |
| 2. Barvivo na DNA (cca. 0,5 μ /vzorek) | 6. Agaróza (2 g) |
| 3. Ethidium bromid (10 μ l; 1mg/ml) | 7. Ethanol (70%) |
| 4. 1 Kb DNA ladder/žebříček (10 μ l) | |

POSTUP

1. Pro gelovou elektroforézu je nezbytné mít připravený gel – ten připravíme ze 2 g agarózy ve 200 ml 1X TAE – směs společně vaříme v mikrovlnné troubě, dokud se veškerá agaróza nerozpustí, poté přidáme EtBr a skladuje ve vodní lázni.
2. Připravený gel nalijeme do formy s hřebínky a necháme ho ztuhnout – stačí zhruba 15 minut. Poté hřebínky vyndáme a gel ve formě vložíme do nádoby na elektroforézu (musí být naplněna 1X TAE a gel musí být plně ponořen)
3. Do jamek v gelu (vytvořené hřebínkem) napipetujeme DNA žebříček a vzorky smíchané s barvivem (pokud ještě neobsahují barvivo). Nádoby na elektroforézu připojíme ke zdroji elektrického proudu a nastavíme napětí na 120 V – necháme 25 minut.
4. Gel následně umístíme do UV boxu, vyfotíme, a pokud chceme s DNA dále pracovat, pomocí ethanolu očištěného skalpelu vyřízneme požadované fragmenty DNA a umístíme je do Eppendorfové zkumavky. Zbytek gelu vyhodíme do odpadu určeného pro EtBr.

9.2.3. Izolace DNA z gelu (kit: Zymoclean™ Gel DNA Recovery)

ČASOVÁ NÁROČNOST

20 minut

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Eppendorfová zkumavka
2. Stojánek na Eppendorf zkumavky
3. Kolonka (součást kitu)
4. Pipety a špičky
5. Termobloček
6. Centrifuga

CHEMIKÁLIE

1. ADB pufr (300 µl/vzorek; součást kitu)
2. DNA Wash pufr (400 µl/vzorek; součást kitu)
3. PCR H₂O (12 µl/vzorek)

POSTUP

1. K vyříznutému kousku gelu z elektroforézy přidáme ADB pufr a necháme zahřívát v termobločku na 45 °C, dokud se gel nerozpustí (tj. cca. 5–10 minut).
2. Roztok přepipetujeme do kolonky a stočíme na 10 000 g po dobu 1 minuty. Kolonku promyjeme 200 µl s DNA Wash Buffer – stočíme na 10 000 g po dobu 1 minuty. Omýváme celkem 2x.
3. Kolonku umístíme do Eppendorf zkumavky, přidáme 12 µl vody (nepoužíváme dodávaný DNA Elution Buffer! – neznáme složení a voda funguje dobře), necháme 4 minuty a následně stočíme na 12 000 g po dobu 2 minut.

9.2.4. Double digest restriční štěpení dna (pro pXJ41CD4 wt EGFP)

ČASOVÁ NÁROČNOST

20 minut samotné provedení + inkubace (od 1 hodiny až přes noc)

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Polystyrenová krabice
2. Pipety a špičky
3. Eppendorfová zkumavka
4. Inkubátor/termobloček

CHEMIKÁLIE

1. Led
2. PCR H₂O
3. Vektor (pXJ41CD4 wt EGFP)
4. Restriční enzymy (KpnI, XhoI)
5. Insert (PCR produkt izolovaný z gelu)
6. BamHI-Lsp1109I pufr (10X)

POSTUP – ŠTĚPENÍ INSERTU

1. Na ledu do Eppendorfové zkumavky napipetuje insert (10 µl/reakce), PCR H₂O (7 µl/reakce), enzymy (každý 0,5 µl/reakce) a pufr (2 µl/reakce).
2. Směs zvortexujeme, stočíme a inkubujeme na teplotu optimální pro používané enzymy (pro KpnI s XhoI to je 37 °C). Je možné inkubovat reakci po dobu pouze 1 hodiny, nicméně nemusí dojít k naštěpení veškeré DNA. Umožňuje-li to čas, inkubujeme reakci přes noc.
3. Po dokončení inkubace provedeme gelovou elektroforézu.

POSTUP – ŠTĚPENÍ VEKTORU

1. V podstatě totožný postup jako u štěpení insertu – jen jiné poměry. Na ledu do Eppendorfové zkumavky napipetuje vektor (0,5 µl/reakce; c = 4 µl/µl), PCR H₂O (16,5 µl/reakce), enzymy (každý 0,5 µl/reakce) a pufr (2 µl/reakce).

9.2.5. Ligace DNA

ČASOVÁ NÁROČNOST

20 minut samotné provedení + inkubace (od 1 hodiny až přes noc)

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Polystyrenová krabice
2. Pipety a špičky
3. Eppendorfová zkumavka
4. Termobloček

CHEMIKÁLIE

1. Led
2. PCR H₂O (9 µl/reakce)
3. Produkty štěpení po gelové elektroforéze a pročištění z gelu – tj. insert + vektor
4. T4 DNA ligační pufr (10X; 4 µl/reakce)
5. T4 DNA ligáza (5 U/µL; 1 µl/reakce)

POSTUP – ŠTĚPENÍ INSERTU

1. Na ledu do Eppendorfové zkumavky napipetuje insert (5 µl/reakce), vektor (1 µl/reakce) PCR H₂O, pufr a ligázu.
2. Směs zvortexujeme, stočíme a inkubujeme při 16 °C přes noc.

9.2.6. Transformace bakterií tepelným šokem

ČASOVÁ NÁROČNOST

1 hodina 40 minut

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Termobloček
2. Polystyrenová krabice
3. Eppendorfová zkumavka
4. Pipety a špičky s filtrem

CHEMIKÁLIE

1. Led
2. LB medium (1 ml/vzorek)
3. Kompetentní bakterie
4. DNA (ve formě plasmidu)

POSTUP

1. Bakterie rozmrazíme na ledu (3–5 minut) a přepipetujeme je (50 µl/reakce) špičkou s filtrem (aby nedošlo ke kontaminaci pipety bakteriemi) do Eppendorfové zkumavky.
2. K bakteriím přidáme DNA (1-10 ng/reakce), zvortexujeme, stočíme a necháme 20 minut na ledu.
3. Následuje tepelný šok – zahřívání bakterií na teplotu 42 °C po dobu 46 sekund. Poté jsou vzorky umístěny na 5 minut na led. Nakonec se přidá 1 ml LB média (bez antibiotik) a bakterie jsou inkubovány po dobu 60 minut (nedovoluje-li čas, 30 minut stačí) při 37 °C na termobločku – 1 400 rpm.

MOŽNÉ NÁSLEDNÉ VYUŽITÍ

Nanesení na gelové plotny – Bakterie jsou stáčeny 1 minutu při 20 000 g. Následně je přebytečné médium odsáto, nechává se 50 µl – v těch je paletka resuspendována. Takto získaný „koncentrát“ je za pomoci pipety přenesen na agarovou plotnu (musí být ohřáta na pokojovou teplotu či 37 °C a obsahovat antibiotikum, vůči kterému jsou bakterie rezistentní). Pomocí sterilizované (omyto v ethanolu, vloženo do ohně kahanu a necháno vychladnout!) skleněné „hokejky“ jsou bakterie rozprostřeny po celém povrchu plotny. Bakterie se inkubují přes noc při 37 °C.

Kultivace bakteriální kultury – celý obsah Eppendorfové zkumavky je přepipetován do Erlenmeyerovy baňky obsahující LB médium (50 – 100 ml) a antibiotikum (množství záleží na typu antibiotiku), vůči němuž jsou bakterie odolné. Bakterie se inkubují 12 – 14 hodin při 37 °C a 160 – 220 rpm (podle možností inkubátoru).

9.2.7. Testování kolonií bakterií pomocí PCR

ČASOVÁ NÁROČNOST

1 hodina a 30 minut

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Termocyklér
2. Polystyrenová krabice
3. Pipety a špičky
4. PCR zkumavky
5. Stojánek na PCR zkumavky
6. Mikrocentrifuga

CHEMIKÁLIE

1. PCR H₂O (3 µl/reakce)
2. Vzorek bakteriální kolonie
3. vhodné primery (2x 1 µl/reakce; 25 mM)
4. PPP Master Mix (5 µl/reakce)

POSTUP

1. Do polystyrenové krabice se dát led – reakční směs je nutné míchat při nízkých teplotách, aby nedocházelo k degradaci jednotlivých komponentů.
2. Na led umístíme stojánek s PCR zkumavkami, do nichž odpipetuje PPP Master Mix, vodu a primery – optimální je si připravit roztok pro všechny reakce v jedné větší zkumavce a následně jej rozpipetovat.
3. Do zkumavek (s roztokem) dáme špičky, s nimiž jsme se dotkly vybraných bakteriálních kolonií – tímto způsobem dostáváme do reakce DNA, jež testujeme.
4. Zkumavky uzavřeme, cvrnkáním „promícháme“, stočíme na mikrocentrifuze a umístíme do termocykléru, zapneme.

NASTAVENÍ TERMOCYKLÉRU

1. 98 °C, 1:00
2. 98 °C, 0:10
3. T_a (záleží na kombinaci primerů), 0:30
4. 72 °C, 1:00
5. GOTO step 2, 25x
6. 72 °C, 5:00
7. 15 °C, ∞

9.2.8. Izolace plazmidů z bakteriální kultury (kit: NucleoBond® Xtra Midi/Maxi)

ČASOVÁ NÁROČNOST

2–4 hodiny (záleží na počtu vzorků)

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Kolonka (1/vzorek; součást kitu)
2. Falkony 50 a 15 ml (1/vzorek)
3. Stojánek na falkony
4. Lepenka
5. Eppendorfová zkumavka (1/vzorek)
6. Nanodrop nd-1000 spektrofotometr
7. Centrifuga s úhlovým rotorem
8. Pipetboy a pipety

CHEMIKÁLIE

1. Pufr RES (8 ml/vzorek; součást kitu)
2. Pufr LYS (8 ml/vzorek; součást kitu)
3. Pufr EQU (17 ml/vzorek; součást kitu)
4. Pufr NEU (8 ml/vzorek; součást kitu)
5. Pufr WASH (8 ml/vzorek; součást kitu)
6. Pufr ELU (8 ml/vzorek; součást kitu)
7. Isopropylalkohol (3,5 ml/vzorek)
8. Superčistá voda (200 µl/vzorek)
9. 70 % ethanol (2 ml/vzorek)

POSTUP

1. Bakteriální kulturu přelijeme do 50ml falkony a stočíme v chlazené centrifuze při 4 °C na 5 minut při 8 756 rpm (úhlový rotor). Supernatant se odlije do odpadního kontejneru se Savem a falkonu opět stočíme – stejné nastavení, ale jen po dobu 1 minuty.
2. Paletku resuspendujeme v RES pufru. Přidáme LYS pufr, zavřeme falkonu a otáčíme s ní, aby došlo k dokonalému promíchání. LYS pufr, jenž lyzuje bakterie, nesmí působit déle než 5 minut, neboť poté snižuje výtěžek. Neutralizujeme ho teda NEU pufr – při neutralizaci dojde ke změně zbarvení z modra do bíla.
3. Následně naneseeme suspenzi na kolonku, jež byla navlhčena 12 ml EQU pufru, necháme přefiltrovat. Poté kolonku promyjeme 5 ml EQU pufru a vyndáme filtr.
4. K druhému promytí kolonky je použit WASH pufr. Po promytí je DNA připravena k eluci, takže kolonku přilepíme k 15 ml falkoně a promyjeme ji ELU pufr – DNA se tak uvolní z filtru v kolonce.
5. DNA vysrážíme z roztoku přidáním isopropylalkoholu. Následuje stočení v chlazené centrifuze s úhlovým rotorem při 4 °C na 10 000 g.

6. Supernatant odlijeme, k paletce přidáme ethanol a „přepipetujeme“ ji do Eppendorfové zkumavka. Stočíme při 4 °C na 20 000 g po dobu 5 minut. Supernatant opatrně odsajeme a Eppendorfovou zkumavka necháme vyschnout.
7. Nakonec přidáme superčistou vodu a necháme DNA rozpustit přes noc.
8. Druhý den zvrtejeme roztok a změříme koncentraci DNA pomocí nanodrop nd-1000 spektrofotometru.

9.2.9. Elektroporace buněk

ČASOVÁ NÁROČNOST

30 minut

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Falkona 15ml
2. Pipety a špičky
3. Optický mikroskop
4. Sklíčko na počítání buněk
5. Eppendorfová zkumavka (1/vzorek)
6. Neon Transfection System
7. Kultivační destičky
8. Centrifuga

CHEMIKÁLIE

1. PBS
2. RPMI-1640 (10% FBS; 10 ml/vzorek)
3. Jurkat CD4KO
4. Elektroporační pufr (100 µl/vzorek)
5. DNA (ve formě plasmidu)

POSTUP

1. Nejprve spočítáme koncentraci buněk v kultuře za pomoci sklíčka na počítání buněk a optického mikroskopu.
2. Na jednu elektroporaci je potřeba 200 000 buněk – potřebné množství kultury odpipetujeme do falkony a stočíme buňky při 170 g po dobu 5ti minut.
3. Supernatant odsajeme, přidáme 10 ml PBS (o 37 °C), jemně resuspendujeme buňky (tímto se omývají) a následně je opět stočíme – 170 g, 5 minut.
4. Opět supernatant odsajeme a tentokrát buňky resuspendujeme v elektroporačním pufru.
5. Buňky přepipetujeme do Eppendorfové zkumavky a přidáme DNA – 1 µg. Do zavřené zkumavky párkrát cvrkáme, abychom DNA s buňkami řádně promíchali.
6. Následně buňky nasajeme pomocí Neon pipety a špičky, umístíme do Neon Transfection Systemu a „proženeme“ buňkami 3x puls o 1325V/10ms.
7. Buňky poté napipetujeme do kultivační destičky, přidáme 0,5 ml RPMI-1640 a necháme v inkubátoru minimálně 16 hodin.

9.2.10. Příprava ibidi sklíček na mikroskopii

ČASOVÁ NÁROČNOST

25 minut

PŘÍSTROJE A POMŮCKY

1. Pipety a špičky
2. Ibidi sklíčka
3. Falkona 50ml

CHEMIKÁLIE

1. Voda do tkáňové kultury
2. Poly-L-lysin

POSTUP

1. Vytvoříme 0,1 % roztok poly-L-lysinu a nakapeme ho na sklíčko. Necháme 10 minut „působit“ a následně roztok odsajeme
2. Sklíčko necháme samovolně uschnout.
3. Na takto připravená sklíčka napipetujeme buňky a můžeme mikroskopovat.

9.3. Seznam používaných primerů

P396A

Fwd 5' – GGTCCACCCCGGTGCAGGCAATGG

Rev 5' – AGCACAATCAGGGCCATTGCCTGCAC

3G

Fwd 5' – CAATGGCCCTGATTGTGCTGCTGATCGTCGCCGTCCTCC

Rev 5' – GCCCAATGAAAAGCAGGAGGACGGCGACGATCAGCAGC

Dim7

Fwd 5' – TTTTCATTGGGCTAGGCATCGTCCTCTGTGTC

Rev 5' – GGTGCCGGCACCTGACACAGAGGACGATGCCT

3F

Fwd 5' – GTCGCCGGCCTCCTGCTTGTCATTGG

Rev 5' – AGATGCCTAGCCCAATGACAAGCAGG

D4

D4/1 Fwd 5' – ATGCTGAGCTTGGA ACTGGAGAAC

D4/1 Rev 5' – GTTCTCCAGTTCCAAGCTCAGCAT

D4/2 Fwd 5' – GCGGGGATGTGGGAGTGTCTGCT

D4/2 Rev 5' – CAGCAGACACTCCCACATCCCCGC

D2

D2/1 Fwd 5' – CCCTCAGTGCAATCTAGGAGTCCAAG

D2/1 Rev 5' – CCTTGGACTCCTAGATTGCACTGAGGG

D2/2 Fwd 5' – GGCACCTGGACATCCACTGTCTTGCAG

D2/2 Rev 5' – CTGCAAGACAGTGGATGTCCAGGTGCC

OBECNÉ PRIMERY

Fwd CD4 pXJ41 5' – GGTACCAAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAA

Rev CD4 pXJ41 5' – GGATCCAATGGGGCTACATGTCTTCTGAAACC