

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Jana Houserová

Rekombinantní exprese proteinu NKp46 a jeho ligandu Epa1
Recombinant expression of protein NKp46 and its ligand Epa1

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Ondřej Vaněk, PhD.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18.5.2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za cenné odborné rady a konzultace při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Kalouskové za pomoc při experimentální části a za konzultace spojené s touto prací. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala kolektivu laboratoře 204 za přátelské a příjemné pracovní prostředí. Také bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu během celé doby mého studia.

Abstrakt

NK buňky (z angl. natural killer cells – „přirozené zabijácké“ buňky) jsou buňky nespecifické imunity a hrají důležitou roli v imunitní odpovědi organismu. Tyto buňky jsou schopny spouštět cytotoxické mechanismy při kontaktu s infikovanými, stresovanými či nádorovými buňkami. Spuštění mechanismů závisí na přítomnosti aktivačních a inhibičních ligandů na povrchu buněk. Na povrchu NK buněk jsou aktivační a inhibiční receptory, které po vazbě na příslušné ligandy vysílají signál NK buňce.

Jeden z aktivačních receptorů NK buněk je NKp46. Jedná se o receptor ze skupiny NCR (z angl. natural cytotoxicity receptor – receptory přirozené cytotoxicity). Tento receptor má mnoho ligandů a jedním z nich je adhesin Epa1 z kvasinky *Candida glabrata*. Tato práce se zaměřuje na přípravu plasmidů a produkci extracelulární části receptoru NK buněk NKp46 a jeho ligandu adhesinu Epa1. Interakce receptoru a jeho ligandu bude zkoumána později.

Plasmidy obsahující geny NKp46 a Epa1 byly úspěšně připraveny a ověřeny DNA sekvenací. Protein NKp46 byl produkován v eukaryotickém expresním systému buněčné linie HEK293S GnTI. Byla připravena stabilně transfekovaná linie HEK293S GnTI buněk a protein NKp46 byl následně extracelulárně sekretován a izolován z kultivačního média pomocí chelatační afinitní chromatografie a následně purifikován pomocí gelové permeační chromatografie. Protein Epa1 byl produkován v bakteriálním expresním systému *Escherichia coli* a následně izolován z buněčného lyzátu rovněž pomocí kombinace chelatační afinitní a gelové permeační chromatografie.

Klíčová slova

NKp46, Epa1, NK buňka, rekombinantní exprese, HEK293

Abstract

Natural killer cells (NK cells) are cells of innate immunity that play an essential role in the immune response of an organism. In contact with infected, stressed or tumour cells, the NK cells can trigger cytotoxic mechanisms. The initiation of mechanisms depends on the presence of activating or inhibitory ligands on the surface of the cells. On the surface of the NK cells, there are activating and inhibiting receptors that upon binding their respective ligands send a signal to the NK cell. One of the activating mechanisms is the decrease of expression in MHC gp I molecules on the surface of the infected cells. This molecule is a ligand of the inhibiting receptors.

One of the activating receptors of NK cells is NKp46. This receptor belongs to the natural cytotoxicity receptor (NCR) family. NKp46 has many ligands, one of them being the adhesin Epa1 of yeast *Candida glabrata*. This thesis aims at preparing plasmids and producing extracellular domains of the NKp46 receptor and its ligand adhesin Epa1. The interaction of NKp46 and its ligand Epa1 remains to be the subject of future research.

Plasmids containing NKp46 and Epa1 genes were successfully prepared and verified by DNA sequencing. The NKp46 protein was produced in eukaryotic expression system of HEK293S GnTI⁻ cell line. A stably transfected HEK293S GnTI⁻ cells had been prepared, and the NKp46 protein was then extracellularly secreted and isolated from cultivation medium using immobilized metal affinity chromatography and then purified using gel permeation chromatography. The Epa1 protein had been produced in the *Escherichia coli* bacterial expression system after which it was isolated from cell lysate similarly by the combination of immobilized metal affinity chromatography and gel permeation chromatography.

Key words

NKp46, Epa1, NK cell, recombinant expression, HEK293

Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Použité zkratky	8
1. Úvod.....	9
2. Cíle práce	10
3. Přehled problematiky	11
3.1. Imunitní systém.....	11
3.1.1. Nespecifické imunitní mechanismy.....	11
3.1.2. Specifické imunitní mechanismy.....	11
3.2. Přirozeně zabijácké buňky	11
3.2.1. Mechanismus aktivace	12
3.2.2. Význam NK buněk	13
3.3. Receptory NK buněk.....	14
3.3.1. Receptory přirozené cytotoxicity.....	15
3.3.2. Receptor přirozené cytotoxicity NKp46	17
3.4. Adhesin Epa1 z <i>Candida glabrata</i>	18
3.4.1. Struktura Epa1	19
3.5. Interakce NKp46 s Epa1	20
3.6. Imunoterapie	20
3.6.1. Buněčná imunoterapie	20
3.6.2. NK buňky v imunoterapii	21
4. Výsledky	23
4.1. Příprava plasmidů obsahující geny pro proteiny NKp46 a Epa1	23
4.2. Produkce NKp46 v expresním systému HEK293.....	27
4.3. Produkce Epa1 v bakteriálním expresním systému	30
5. Diskuze.....	35
6. Experimentální část.....	38
6.1. Materiál	38
6.1.1. Použité chemikálie	38

6.1.2. Enzymy	38
6.1.3. Pufry a roztoky	39
6.1.4. Použité přístroje	40
6.1.5. Buněčné kmeny a linie	41
6.1.6. DNA vektory	41
6.1.7. PCR a sekvenační primery	41
6.1.8. Soupravy	41
6.2. Metody	42
6.2.1. Štěpení restrikčními enzymy	42
6.2.2. Elektroforéza v agarosovém gelu	42
6.2.3. Měření koncentrace a čistoty DNA	42
6.2.4. PCR	42
6.2.5. Izolace z agarosového gelu	43
6.2.6. Vnesení genu do linearizovaného plasmidu	43
6.2.7. Transformace kompetentních buněk	44
6.2.8. PCR z kolonií	44
6.2.9. Nízkoobjemová izolace plasmidové DNA	45
6.2.10. Sekvence DNA	45
6.2.11. Velkoobjemová izolace plasmidové DNA	46
6.2.12. Produkce proteinů v bakteriálním expresním systému	46
6.2.13. Produkce proteinů ve stabilně transfekované linii HEK293S GnTI	47
6.2.14. Chelatační afinitní chromatografie proteinů	48
6.2.15. Koncentrování proteinů	48
6.2.16. Gelová permeační chromatografie	48
6.2.17. Měření koncentrace proteinů	49
6.2.18. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	49
6.2.19. Elektropřenos proteinů na membránu	50
6.2.20. Imunodetekce proteinů s histidinovou kotvou	50
7. Závěr	51
8. Literatura	52

Použité zkratky

AA	akrylamid
ADCC	buněčně zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátkách (z angl. antibody dependent cellular cytotoxicity)
APS	peroxosíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
dH ₂ O	deionizovaná voda
dNTPs	deoxynukleotidtrifosfáty
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
Epa1	epiteliální adhesin z kvasinky <i>Candida glabrata</i> (z angl. epithelial adhesin)
HA	hemaglutinin
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních buněk ledvin (z angl. human embryonic kidney cells 293)
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HMPV	lidský metapneumovirus
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
IFN γ	interferon γ
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
ITAM	imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrosinu
MHC gp	glykoprotein hlavní histokompatibilního komplexu (z angl. major histocompatibility complex glycoprotein)
NCR	receptory přirozené cytotoxicity (z angl. natural cytotoxicity receptor)
NK	přirozený zabíječ (z angl. natural killer)
NKp30	receptor NK buněk o velikosti 30 kDa (z angl. natural killer protein 30 kDa)
NKp44	receptor NK buněk o velikosti 44 kDa (z angl. natural killer protein 44 kDa)
NKp46	receptor NK buněk o velikosti 46 kDa (z angl. natural killer protein 46 kDa)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PMSF	fenylmethan sulfonylfluorid (z angl. phenylmethane sulfonyl fluoride)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulfate)

1. Úvod

Imunitní odpověď organismu je tvořena specifickými a nespecifickými mechanismy. Specifické mechanismy jsou založeny na specifické odpovědi proti cizorodé látce. Tyto mechanismy se v organismu tvoří celý život, každé setkání imunity s infekčním onemocněním dává možnost uložení odpovědi do imunologické paměti. Druhým mechanismem imunitní odpovědi jsou nespecifické mechanismy, které se v organismu vyskytují již od narození. Mezi nespecifické mechanismy kromě mnoha dalších patří NK buňky (z angl. natural killer cells – „přirozené zabijácké“ buňky). Tyto buňky jsou schopny spustit cytotoxický mechanismus na základě styku s cílovou buňkou. Na každé buňce se vyskytují molekuly, které mohou sloužit jako ligandy receptorů NK buněk. Na povrchu NK buněk se vyskytují aktivační a inhibiční receptory, tyto receptory interagují s ligandy na povrchu ostatních buněk. Pokud je buňka infikovaná, ve stresu či nádorová, její povrchové molekuly nebo jejich množství se změny. Tyto změny mezi zdravými a pozměněnými buňkami umí NK buňka zaregistrovat. Studium interakcí receptorů NK buněk s jejich ligandy je důležité pro imunoterapii.

Tato práce se zaměřuje na přípravu plasmidové DNA a produkci dvou proteinů. Prvním proteinem je aktivační receptor NKp46 ze skupiny NCR (z angl. natural cytotoxicity receptor – receptory přirozené cytotoxicity), kam patří také další dva receptory NKp30 a NKp44. Receptor NKp46 má mnoho popsaných ligandů, jedním z nich je adhesin Epa1 z kvasinky *Candida glabrata*, která je druhým nejběžnějším kvasinkovým patogenem na světě a je častým původcem invazivních kandidóz. Proteiny zodpovědné za zprostředkování adhesních interakcí *C. glabrata* s buňkou jsou adhesiny. Druhým produkovaným proteinem v rámci této práce je právě tento adhesin, Epa1.

2. Cíle práce

- Příprava expresních vektorů umožňujících expresi extracelulární domény receptoru NKp46 a proteinu Epa1
- Produkce proteinu Epa1 v bakteriálním expresním systému *E. coli*
- Produkce proteinu NKp46 v expresním systému HEK293

3. Přehled problematiky

3.1. Imunitní systém

Imunitní systém je souhrn mechanismů, které zajišťují integritu organismu rozpoznáváním škodlivých látek od neškodlivých. Škodliviny mohou být vnitřního i vnějšího původu. Hlavními funkcemi imunitního systému je obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. Látky, které imunitní systém rozeznává, se nazývají antigeny. Antigeny mohou být z vnějšího prostředí (exoantigeny), jedná se většinou o infekční mikroorganismy, jejich produkty nebo antigeny tělu vlastní (autoantigeny), například odumřelé buňky. Imunitní mechanismy se dělí na dvě základní skupiny: nespecifické (neadaptivní) a antigenně specifické (adaptivní)¹. Organismus má kromě imunitní obrany také neimunitní obranu, která je tvořena mechanickými, chemickými a mikrobiálními částmi (nepatogenní flóra)².

3.1.1. Nespecifické imunitní mechanismy

Nespecifické mechanismy jsou vrozené a jsou tvořeny molekulami a buňkami, které se v průběhu života obnovují. Nespecifické mechanismy jsou tvořeny buněčnými a humorálními složkami. Mezi buněčné složky patří fagocytující buňky a NK buňky (z angl. natural killer cells - „přirozené zabijácké buňky“). Humorální složka je tvořena interferony, lektiny a jinými sérovými proteiny. Na rozdíl od specifické imunity nemá nespecifická imunita imunologickou paměť¹.

3.1.2. Specifické imunitní mechanismy

Odpovědi specifické imunity trvají okolo 4-5 dnů, oproti nespecifické imunitě jsou pomalejší, ale jejich účinek je přizpůsoben povaze antigenu. Specifické mechanismy reagují specificky proti cizorodé látce. Tyto mechanismy jsou adaptivní, jsou získávané během celého života. Každé setkání specifické imunity s konkrétním infekčním onemocněním dává imunitě možnost uložení odpovědi na tento antigen do imunologické paměti. Díky imunologické paměti můžeme využívat vakcinaci. Mechanismy specifické imunity jsou také humorální a buněčné. Humorální jsou zprostředkovány pomocí protilátek a buněčné pomocí T a B lymfocytů².

3.2. Přirozeně zabijácké buňky

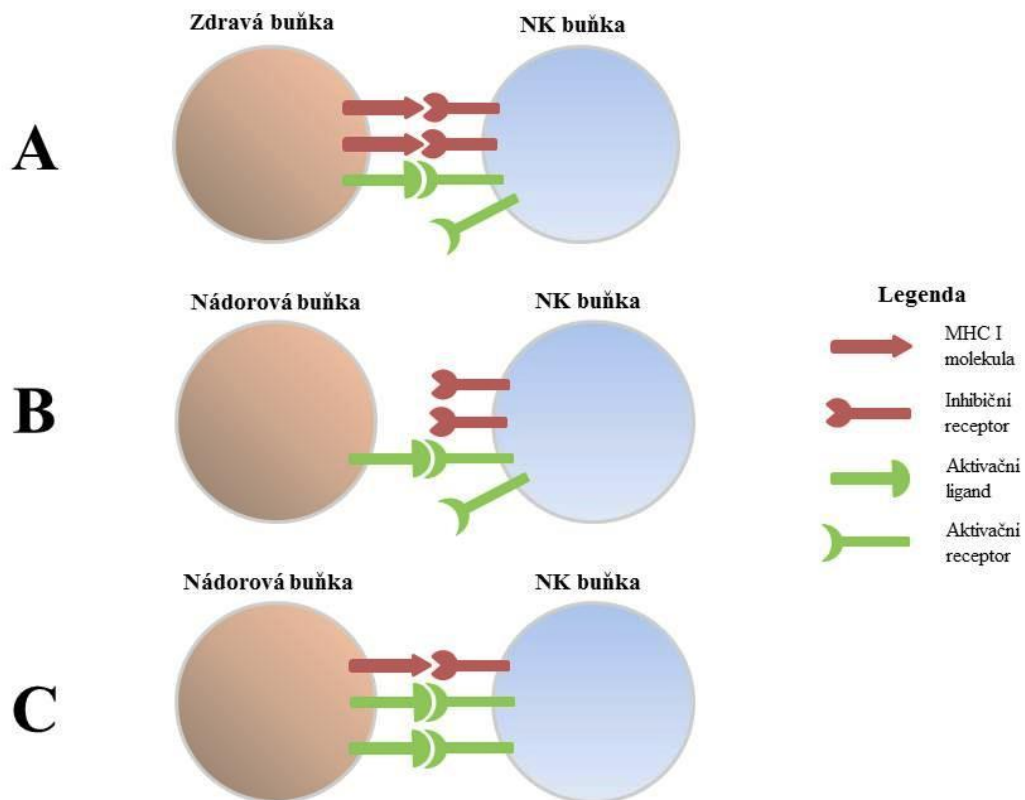
NK buňky (z angl. natural killer cells - „přirozené zabijácké buňky“) jsou velké granulární lymfocyty. Tvoří 10-15 % všech lymfocytů. Dalšími typy granulárních lymfocytů jsou T a B lymfocyty, které mají oproti NK buňkám antigenně specifické receptory. NK buňky jsou součástí nespecifické imunity, patří mezi její buněčné mechanismy^{1,2}. NK buňky byly popsány v polovině 70. let minulého století, jako důležitá součást imunitní odpovědi proti virovým a nádorovým onemocněním³. Vznikají diferenciací hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. V organismu putují různými tkáněmi, včetně sekundárních lymfatických orgánů. Výzkum myších NK

buněk a jejich cytotoxických mechanismů *in vitro* poskytuje neocenitelný zdroj při pochopení a popisování mechanismů NK buněk *in vivo* ⁴.

3.2.1. Mechanismus aktivace

K rozlišení mezi zdravými a abnormálními buňkami slouží NK buňkám povrchové receptory (NK receptory). Tyto receptory jsou ukotvené v membráně a vážou se na ligandy, které se nacházejí na cílových buňkách ¹. NK receptory se dělí na dvě skupiny: aktivační a inhibiční. Aktivace cytotoxických mechanismů je kontrolována rovnováhou inhibičních a aktivačních signálů ⁵. Důležitou roli v toleranci buňky NK buňkou je převaha inhibičních signálů (viz Obr. 1, str. 13). Každá zdravá buňka má na svém povrchu MHC glykoproteiny I. třídy (z angl. major histocompatibility complex glycoprotein, dále MHC gp I. třídy) ^{1,4}. MHC gp I. je ligandem inhibičních receptorů. Základní funkcí MHC gp I. třídy je navázání peptidového fragmentu produkovaného buňkou a jeho vystavení na povrchu buňky. Pokud má buňka na svém povrchu vystavený peptidový fragment, je rozpoznatelná pro Tc lymfocyty (cytotoxické T lymfocyty). Charakteristickým povrchovým znakem Tc lymfocytů je receptor je CD8 ⁶.

V případě, že se na povrchu buňky sníží množství MHC gp I. třídy, dojde k narušení rovnováhy aktivačních a inhibičních signálů a dojde k aktivaci cytotoxických mechanismů NK buněk (viz Obr. 1, str. 13). Tento stav je nazýván „missing-self“. K absenci MHC gp I. třídy dochází u nádorových buněk či buněk infikovaných některými viry. Toto snížení slouží k obraně především před Tc lymfocyty. Cytotoxické mechanismy jsou spuštěny také v případě převahy aktivačních ligandů na povrchu buňky. Zvýšená exprese těchto proteinů probíhá v důsledku buněčného stresu infikované nebo nádorové buňky. Aktivační signály převáží inhibiční a spustí se cytotoxický mechanismus nazývaný „stress induced-self“.



Obr. 1: Aktivace NK buňky interakcí aktivačních a inhibiční receptorů s ligandy ⁷.

- A) Nedochází k aktivaci, zdravá buňka má na svém povrchu dostatek MHC gp I. třídy a nemá nadbytek aktivačních ligandů. NK buňka zdravou buňku toleruje.
- B) NK buňka spouští cytotoxickou odpověď, nádorová buňka nemá na své povrchu MHC gp I. třídy – missing-self mechanismus.
- C) NK buňka spouští cytotoxickou odpověď, na povrchu nádorové buňky je více aktivačních ligandů - stress induced-self mechanismus

3.2.2. Význam NK buněk

NK buňky se primárně nacházejí v periferním krevním řečišti, kostní dřeni a slezině. Dále se nacházejí také v lymfatických uzlinách a dalších orgánech například v játrech, plicích, slinivce břišní či děloze. V místech zánětu tvoří první obrannou linii ⁸. Dále NK buňky v organismu reagují na zánětlivé signály v počáteční fázi virové infekce, což vede k proliferaci, tvorbě cytokinů a cytolytické aktivitě, která může snížit zátěž organismu způsobenou virem ⁹.

NK buňky často interagují s jinými leukocyty a tím mohou mít dlouhodobé účinky na počet a kvalitu paměťových T lymfocytů ^{2,9}. Schopnost NK buněk ovlivňovat odpovědi T lymfocytu je zprostředkována přímými a nepřímými interakcemi. Přímé jsou zprostředkovány produkcí cytokinů. Aktivované NK buňky produkují širokou škálu cytokinů a chemokinů. Jeden z cytokinů je IFN- γ , který hraje důležitou roli při

potlačení výskytu viru v počáteční fázi infekce¹⁰. Nepřímé interakce jsou reciproční interakce s dendritickými buňkami, makrofágy, T lymfocyty a endotelovými buňkami¹¹.

Specifická skupina NK buněk se vyskytuje v děloze během prvního trimestru těhotenství. NK buňky zaujímají v děloze 50-90 % ze všech lymfoidních buněk. NK buňky vylučují IL-8, vaskulární endoteliální růstový faktor, faktor 1 odvozený od stromálních buněk a protein 10 indukovaný IFN- γ . Tyto látky pomáhají remodelaci a budování tkání plodu. NK buňky v placentě nevykazují cytotoxickou aktivitu, ale pomáhají imunotoleranci matky k plodu¹².

3.3. Receptory NK buněk

Receptory NK buněk se dělí na 2 skupiny – aktivační a inhibiční. Aktivační receptory rozeznávají mnoho ligandů a pro některé z nich nejsou stále známy ligandy. Takovými ligandy mohou být například virové proteiny, které se nacházejí na povrchu infikovaných buněk. Aktivační receptory poskytují NK buňkám signály, díky kterým aktivuje NK buňky cytotoxické mechanismy. Aktivační receptory mají jiné signalizační motivy v intracelulárních částech oproti inhibičním. Fungují na základě asociace s proteinkinázami¹⁰. Inhibiční aktivita funguje na základě asociace s cytoplazmatickými fosfatázami, které ruší signalizační dráhy zahájené aktivačními receptory.

Podle molekulární struktury lze receptory NK buněk dělit na imunoglobulinové receptory a receptory podobné C-lektinům. Obě skupiny obsahují inhibiční i aktivační receptory (viz Tab. 1, str. 15).

Tab. 1: Přehled receptorů na základě jejich struktury^{10,13}. Molekulární struktura neurčuje aktivitu. Oba strukturní typy mohou mít aktivační i inhibiční aktivitu. Ke každému NK receptoru jsou uvedeny příklady jejich ligandů. HA (hemagglutinin), HN (neuraminidáza).

Imunoglobulinové receptory		
Zástupci	Příklad ligandů	Aktivita
CD16	IgG	Aktivační
ILT2 (CD85)	HLA-A,B,C,G, UL18	Inhibiční
KIR2DS1	HLA-C2	Aktivační
KIR2DL2,3, KIR3DL2	HLA-C1, HLA-A	Inhibiční
NKp30	virový HA	Inhibiční
	B7H6, BAT3	Aktivační
NKp44	virový HA	Aktivační
	PCNA	Inhibiční
NKp46	virový HA a HN, heparin, vimentin, Epa1	Aktivační

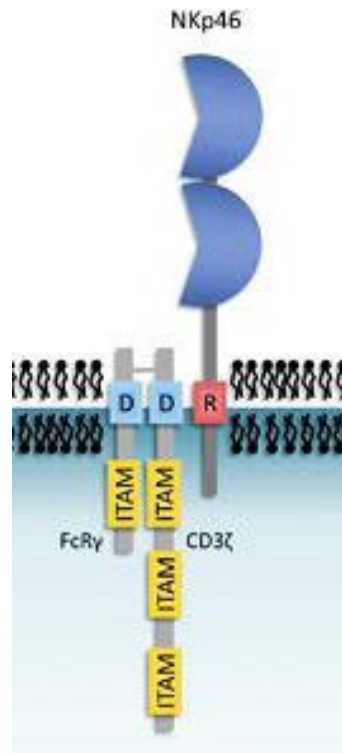
Receptory strukturně podobné C-lektinům		
Zástupci	Příklad ligandů	Aktivita
CD94/NKG2C, CD94/NKG2E	HLA-E	Aktivační
Ly49, Ly49D,H, CD94/NKG2A	HLA-E	Inhibiční
NKG2D	MICA, MICB	Aktivační

3.3.1. Receptory přirozené cytotoxicity

Receptory přirozené cytotoxicity (NCR, z angl. natural cytotoxicity receptor) je skupina 3 membránových receptorů NK buněk. Skupina obsahuje NKp30 (také NCR3, CD337), NKp44 (také NCR2, CD336) a NKp46 (také NCR1, CD335). NCR patří do skupiny imunoglobulinových receptorů a byly popsány v 90. letech 20. století. Receptory jsou popsány jako lidské NK receptory, receptor NKp46 je navíc přítomen i u dalších savců. Všechny receptory jsou aktivačními, nicméně NKp30 a NKp44 mohou být i inhibičními (viz Tab. 1, str. 15). I přesto, že patří do stejné skupiny, každý receptor se liší svou aminokyselinovou sekvencí a také svou strukturou. Všechny NCR

receptory jsou transmembránové proteiny, které mají jednu (NKp30 a NKp44) nebo dvě (NKp46) extracelulární imunoglobulinové domény, jak ukazuje schéma (viz Obr. 2, str. 16) ¹³. NKp46 a NKp30 se vyskytují na všech NK buňkách v organismu, ale receptor NKp44 se vyskytuje pouze na aktivovaných NK buňkách ¹⁴.

NCR receptory jsou schopny rozeznávat široké spektrum ligandů, například virové, parazitické, bakteriální nebo buněčné ¹³. Prvními popsányi ligandy NCR receptorů byly virové proteiny. Prvními popsányi ligandy byly hemagglutinin (HA) a neuraminidáza (HN), které jsou ligandy pro NKp46 a NKp44. Hemagglutinin a neuraminidáza se vyskytují na povrchu virů, například chřipky ¹⁵. NCR receptory jsou schopny vázat všechny druhy HA a HN, například viru Sendai, viru Newcastleké choroby či viru kravských neštovic. Interakce HA a NKp30 nevede k aktivaci NK buněk. Mezi buněčné ligandy patří například B7-H6, PCNA vyskytující se na nádorových buňkách nebo heparin. Bakteriálními ligandy jsou zatím neznámé ligandy bakterie *Fusobacterium nucleatum* a proteiny buněčných stěn mykobakterií.



Obr. 2: Schéma receptoru NKp46 ¹³. Receptor NKp46 má dvě extracelulární domény pro vazbu ligandu. V transmembránové části má kladně nabitou aminokyselinu arginin, která interaguje s adaptorovými molekulami obsahujícími aktivační sekvenci ITAM. Tyto molekuly přenášejí aktivační signál do NK buněk.

3.3.2. Receptor přirozené cytotoxicity NKp46

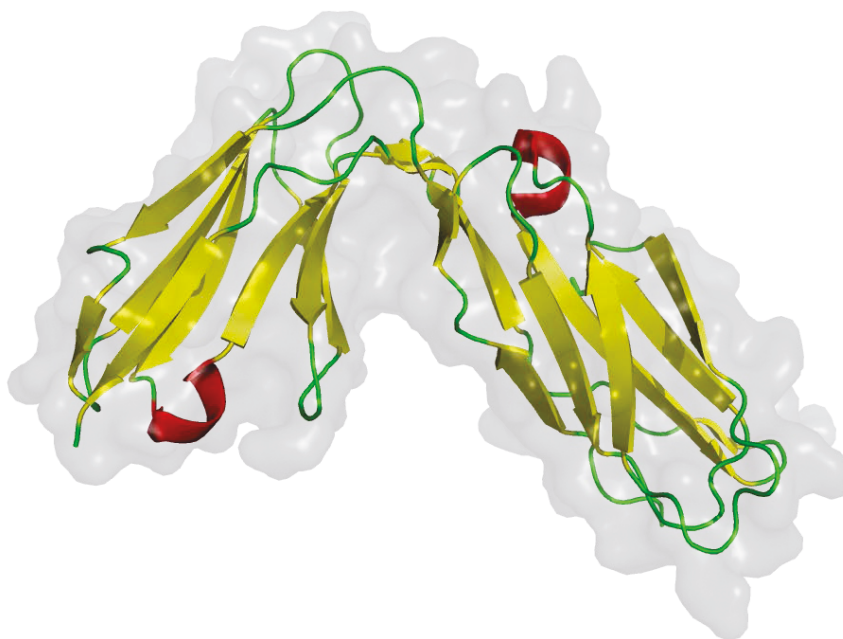
NKp46 (také nazýván NCR1 nebo CD335) je jeden z NCR receptorů. Tento receptor byl popsán jako první ze skupiny NCR. Jako jediný z NCR se vyskytuje u lidí, myši (NCR1 analog) a dalších savců. Díky přítomnosti u myši je hojně využíván při studiu *in vivo*. Bylo popsáno, že myši, které nemají receptor NCR1, jsou náchylnější k onemocnění chřipkou¹⁶.

Ligandy receptoru NKp46 jsou HA, HN, pFEMP1 z *Plasmodium falciparum*, neznámý ligand z *Fusobacterium nucleatum* a adhesiny z *Candida glabrata*. Receptor NKp46 také váže intracelulární vláknitý cytoskeletální protein vimentin, který je exprimován na povrchu monocytů infikovaných *Mycobacterium tuberculosis*¹⁷. Tato bakterie způsobuje většinu případů tuberkulózy. Bylo prokázáno, že receptor NKp46 a myši analog NCR1 rozpoznávají neznámý ligand, který se nachází na buňce infikované lidským metapneumovirem (HMPV, z angl. human metapneumovirus). Virus HMPV, který byl objeven v roce 2001, způsobuje akutní infekce respiračního traktu u dětí po celém světě¹⁸.

Lidský i myši receptor NKp46 (NCR1) usnadňují sekreci IFN- γ z intratumorálních NK buněk. Díky této zprostředkované sekreci IFN- γ dochází k zvýšení tvorby extracelulárního proteinu fibronektinu 1 (FN1) v nádorech. Tato zvýšená tvorba FN1 vede ke změně stavby primárního nádoru a díky tomu se snižuje tvorba metastáz¹⁹.

3.3.2.1. Struktura NKp46

Receptor NKp46 je glykoprotein o velikosti 46 kDa. Patří mezi imunoglobulinové receptory. Gen proteinu NKp46 se nachází na lidském chromosomu 19q13.42. V tomto místě jsou zakódované geny pro KIR a LIR receptory²⁰. Extracelulární část je tvořena 2 imunoglobulinovými doménami, D1 a D2, které jsou spojeny pomocí kloubové části (tvořené peptidovým řetězcem), která je velmi flexibilní. Domény jsou upořádané do konformace písmene V a svírají úhel 85°. Domény jsou tvořeny β skládanými listy, které jsou antiparalelní. V obou doménách se vyskytují krátké úseky mezi β skládanými listy ve formě α helixů (viz Obr. 3, str. 18). Domény navzájem obsahují pouze 22 % stejných aminokyselinových sekvencí. I přes to jsou si obě domény velmi podobné. V cytoplasmatické části chybí tyrozinové signální motivy, ale obsahuje kladně nabitou aminokyselinu arginin, která se podílí na stabilizaci pomocí asociace s řetězcem CD3 ζ a Fc ϵ RI γ ²⁰.



Obr. 3: Extracelulární část lidského proteinu NKp46. Ve struktuře proteinu jsou zvýrazněny části ve formě α -helixu (červeně), β -skládaného listu (žlutě) a zbylé části řetězce (zeleně). Struktura proteinu byla zobrazena pomocí programu PyMol²¹ dle struktury PDB ID 1OLL²⁰.

3.4. Adhesin Epa1 z *Candida glabrata*

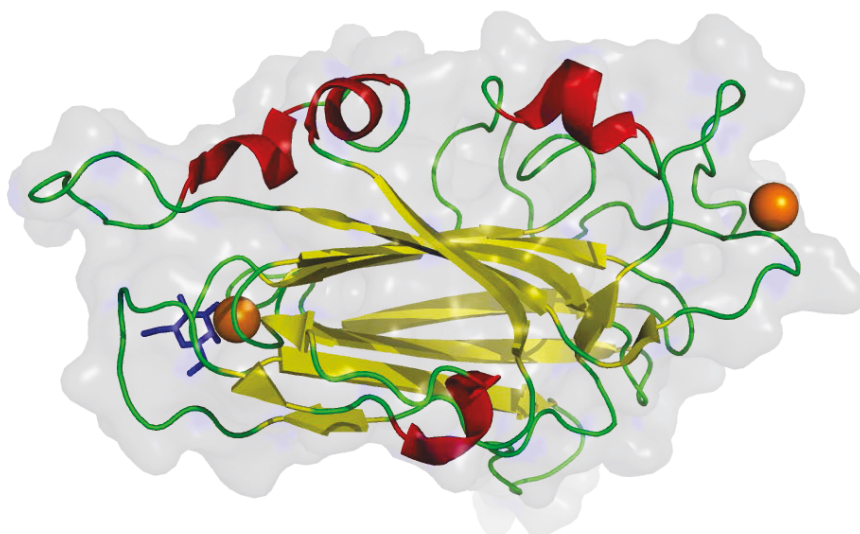
Epa1 je povrchový protein strukturně podobný lektinům („lectin-like“) vyskytující se u kvasinky *Candida glabrata*, která je druhým nejběžnějším kvasinkovým patogenem hned po *Candida albicans*. Je také druhým nejčastějším původcem invazivní kandidózy na celém světě²². Invazivní kandidóza je obávaná komplikace u hematologických pacientů a u pacientů po transplantaci kostní dřeně. Fylogeneticky jsou *C. glabrata* a *C. albicans* zcela odlišné²³. V posledních letech stoupá počet kmenů *C. glabrata* resistantních vůči antifungálním lékům²⁴.

První fází kvasinkové infekce *C. glabrata* je adheze kvasinkové buňky na povrch hostitelské buňky. Bílkoviny zodpovědné za zprostředkování adhezních interakcí se nazývají adhesiny. Jsou to povrchové proteiny buněčných stěn kvasinek²². Protein Epa1 patří do skupiny EPA (z angl. epithelial adhesin), která v závislosti na kmeni obsahuje 17 nebo 23 adhesinů²³. Nejvíce popsané adhesiny ze skupiny EPA jsou Epa1, Epa6 a Epa7, které poskytují adhezi k lidským epiteliálním buňkám²⁵. Adhesinové proteiny mají N-koncovou oblast pro adhezi (doména A), velký centrální segment, který obsahuje různý počet glykosylovaných epitopů bohatých na serin a threonin (doména B), a C-koncovou část, která nese glykosylfosfatidylinositolovou kotvu (GPI) pro připojení k membráně. Tyto proteiny se označují GPI-zakotvené adhesiny. V genomu *C. glabrata* je více než 60 sekvencí kódujících GPI-zakotvené adhesiny²⁵.

3.4.1. Struktura Epa1

Epa1 je glykoprotein o velikosti 112 kDa. Je zodpovědný za více než 95 % adheze *C. glabrata* k epiteliálním buňkám hostitele *in vivo*²⁶. Adhese zprostředkovaná Epa1 se snižuje v přítomnosti laktosy a N-acetyllaktosaminu, ale nesnižuje se v přítomnosti sialovaných derivátů těchto disacharidů²³. Epa1 preferuje sacharidové struktury s koncovou galaktosovou jednotkou, která je spojena pomocí 1-3 nebo 1-4 glykosidické vazby na glukosu, galaktosu nebo jejich N-acetylované deriváty^{22,27}. Epa1 specificky váže disacharid Gal β 1-3GalNAc. Tento disacharid je jedna z hlavních složek struktury O-glykanů lidských mucinů. Též je znám jako Thomsen-Friedenreich antigen (TF antigen), který je asociován s nádory²⁸.

N-koncová oblast Epa1 se nazývá PA14 doména. Tato doména se také například vyskytuje v bakteriálních toxinech. N-koncová oblast má lektinovou aktivitu závislou na vápníku. Sekundární struktura je tvořena 2 antiparalelními β -skládanými listy, které jsou tvořeny 6 a 4 vlákny (viz Obr. 4, str. 19). C- a N-koncové oblasti jsou k centrální oblasti připojeny dvěma disulfidovými můstky, jedním mezi Cys50 a Cys179 a druhým mezi Cys180 a Cys262. Toto uspořádání poskytuje kompaktní tvar a blokuje přístup k prostoru mezi 2 centrálními β -skládanými listy²⁶.



Obr. 4: Struktura Epa1. Ve struktuře jsou zvýrazněny části proteinu ve formě α -helixu (červeně), β -skládaného listu (žlutě), zbylé části řetězce (zeleně), ionty Ca^{2+} (oranžově) a galaktosa (modře). Struktura proteinu byla zobrazena pomocí programu PyMol²¹ dle struktury PDB ID 4A3X²⁶.

3.5. Interakce NKp46 s Epa1

Epa1, Epa6 a Epa7 jsou adhesiny a mají tedy významnou vazbu ke glykanům. Vazebná interakce NKp46 a hemagglutininového proteinu závisí na sialylované O-glykosylaci na NKp46. V *C. glabrata* adhesiny vázající glykany zprostředkovávají připojení buňky k hostitelské buňce. Ve studii z roku 2016 použili pro testování 612 glykanových struktur. Jeden z testovaných glykanů – Neu5Ac α 2-6-(Gal β 1-3)-GalNAc byl velmi podobný glykosylaci na NKp46. Nejsilnější vazbu měl protein Epa1. Potvrzení proteinů EPA jako ligandů NKp46 bylo provedeno *in vivo* pomocí delece genů pro Epa1, Epa6 a Epa7 v *C. glabrata*. Delece těchto proteinů vedla ke ztrátě vazby NKp46 na *C. glabrata*. Myši, kterým chyběl NCR1 receptor, nebyly schopny bojovat se systémovou infekcí *C. glabrata*²⁹.

3.6. Imunoterapie

Léčebné metody imunoterapie využívají obranné mechanismy imunitního systému. Imunoterapie se dělí na aktivní a pasivní. Aktivní imunoterapie funguje na základě podávání upravených antigenních produktů nádorů. Přítomnost těchto látek nastartuje protinádorovou reakci imunitního systému. Pasivní imunoterapie spočívá v aplikaci hotových protilátek nebo aktivovaných bílých krvinek do organismu.

Překážkou aktivní imunoterapie je velká podobnost nádorových buněk zdravým buňkám, tudíž odpověď imunitního systému nemusí být nastartována³⁰. Reakce imunitního systému na nádorové buňky je dána přítomností nádorově specifických povrchových antigenů. Tyto antigeny se dělí na 2 skupiny: TSA (z angl. tumour-specific antigen - antigeny specifické pro nádory) a TAA (z angl. tumour-associated antigen - antigeny asociované s nádory). Do skupiny TSA patří povrchové proteiny, které se na normálních zdravých buňkách nevyskytují, například komplexy MHC gp I. třídy s abnormálními fragmenty buněčných proteinů nebo s fragmenty proteinů onkogenních virů. Do skupiny TAA patří povrchové proteiny, které se nacházejí i na zdravých buňkách, odlišností je jejich množství či exprese v jiném místě. Tyto antigeny mohou sloužit k diagnostickým účelům. Do této skupiny patří například onkofetální antigeny. Tyto antigeny jsou přítomny na embryonálních buňkách, ale v postnatálním období mizí, ale na některých nádorových buňkách se znovu objevují. Příkladem je antigen HER 2/neu, který se v malém množství vyskytuje na zdravých epiteliálních buňkách, ale na karcinomech prsních žláz je přítomen ve velkém množství¹.

3.6.1. Buněčná imunoterapie

Jednou z metod imunoterapie založené na buněčně zprostředkovaných mechanismech je adoptivní buněčná terapie. Je to forma imunoterapie, při které dojde k odebrání a izolaci T lymfocytů z lymfatických uzlin nebo nádorové tkáně. Odebrané T lymfocyty se namnoží *ex vivo*, případně se upraví a poté se vrací pacientovi v podobě nitrožilní infuze^{1,31}.

Dalším typem imunoterapie je vakcinace. Cílem vakcinace je aktivace T lymfocytů proti nádorovým antigenům. Účinná imunoterapie vyžaduje použití vhodných cílových antigenů, optimalizaci interakce buňkou prezentující antigen a T lymfocyty. Bylo zjištěno, že vakcinace je méně účinná proti onemocněním, které mají lépe rozvinutou strategii obrany proti imunitnímu systému hostitele. Nicméně byly vyvinuty vakcíny proti lidským papilomavirům způsobujícím rakovinu děložního čípku či Epstein-Barrově viru, který způsobuje Burkittův lymfom nebo Hodgkinovu chorobu. Dalším je T-buněčný lymfotropní virus 1 způsobující leukémii T lymfocytů a lymfomy³².

Nová forma imunoterapie je terapie pomocí onkolytických virů (z angl. oncolytic virus therapy - OV imunoterapie). Tato metoda využívá vlastnost některých nepatogenních nebo mírně patogenních virů lyzovat nádorové buňky. Mezi tyto viry patří například ptačí Newcastle virus nebo virus spalniček. Po aplikaci viru do organismu, se virus replikuje uvnitř nádorových buněk a zničí je. Výhoda této metody je velká specifita k nádorovým buňkám. Nevýhoda spočívá v rychlé odpovědi imunitního systému na přítomnost viru. Často je vir zničen ještě před průnikem do nádorové buňky. Toto je možné obejít přímou aplikací viru do nádorové tkáně nebo jsou do genomu viru vneseny geny pro faktor indukovaný hypoxií. Tyto viry se aktivují pouze v hypoxickém prostředí uvnitř solidního nádoru^{1,33}.

3.6.2. NK buňky v imunoterapii

Během vývoje NK buněk v kostní dřeni prochází NK buňka několika stádií. Během dozrávání se NK buňky rozdělí do dvou skupin: CD56^{bright} a CD56^{dim}. CD56^{bright} jsou nezralé NK buňky, které později produkují IFN γ . CD56^{dim} jsou zralé NK buňky a později hrají důležitou roli v cytotoxicitě. NK buňky jsou poté distribuovány po celém těle³⁴. Aktivace NK buněk je přísně regulovaný proces. Na rozdíl od T lymfocytů NK buňky rychle uvolňují zánětlivé cytokiny a zabíjejí bez předchozí imunizace. Každá zdravá buňka exprimuje na svém povrchu molekuly HLA třídy I. (z angl. human leukocyte antigene). Tyto proteiny jsou ligandy inhibičních receptorů na NK buňkách např. KIR nebo CD94/NKG2A. Nádorovým buňkám se změnil povrchové znaky. Některé nádorové buňky ztratí schopnost exprimovat na svém povrchu HLA třídy I. a v důsledku stresu se na povrchu začnou exprimovat jiné proteiny. V případě ztráty HLA třídy I. na povrchu nemají inhibiční receptory NK buněk ligandy pro své inhibiční receptory, převáží aktivační signál a buňka je NK buňkou zabita. V případě přítomnosti jiných proteinů na povrchu nádorové buňky se mohou tyto proteiny spárovat s aktivačními receptory. Na povrchu maligních buněk se vyskytují proteiny A/B příbuzné MHC třídy I (MICA, MICB), proteiny vázající UL16 (ULBPs). Oba tyto ligandy váže aktivační receptor NKG2D. Dále se mohou na povrchu nádorových buněk vyskytovat B7-H6 a BAT3 (transkript 3 asociovaný s HLA-B), tyto ligandy váže receptor NKP30. Maligní buňky nevystavují na svém povrchu pouze ligandy pro aktivační receptory. Jejich ochranou před imunitní odpovědí NK buněk je produkce inhibičních ligandů na svém povrchu. Těmito ligandy mohou být například PD-1 nebo Gal-9³⁵.

Aktivované NK buňky mohou zabít cílovou buňku pomocí dvou mechanismů: přímou cytotoxicitou a buněčně zprostředkovanou cytotoxicitou. Přímá cytotoxicita probíhá pomocí sekrečních lysozomů – perforiny a granzymy. Perforiny perforují membránu cílové buňky a granzymy indukují apoptosu. ADCC (z angl. antibody dependent cellular cytotoxicity - buněčně zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátkách) je druhým typem cytotoxicity a je závislá na protilátkách. Fc oblast na imunoglobulinu G (IgG) je ligandem pro receptor CD16 na NK buňkách³⁶. NK buňky hrají klíčovou roli v první linii imunitní odpovědi organismu. Díky tomu se imunoterapie zaměřuje právě na ně. Imunoterapie má několik přístupů, jak pracovat s NK buňkami, například využít cytokiny, protilátky a adoptivní přenos NK buněk, aktivaci, zvýšení počtu a cílení NK buněk na poškozené buňky.

Cytokiny podporují proliferaci a funkci NK buněk. Jedna z možností aktivace NK buněk je přímá aplikace cytokinů do organismu, tím se zvýší počet cytokinů v organismu a NK buňky jsou aktivované přímo *in vivo*. Druhou možností je inkubace NK buněk *in vitro* v přítomnosti cytokinů, tím dojde k expanzi a aktivaci NK buněk a tyto buňky jsou následně vráceny do organismu.

Imunoterapie pomocí protilátek se zaměřuje na cílení NK buněk na cílovou buňku. V klinických studiích se testují monoklonální protilátky například anti-CD20, anti-GD2, anti-Her2 nebo anti-EGFR. Dále se testují bispecifické nebo trispecifické protilátky, například BiTE nebo TriTE. Tyto protilátky jsou schopné vázat více různých antigenů na cílové buňce³⁷.

NK buňky mohou být získány z periferních krevních mononukleárních buněk. Získané NK buňky lze dále použít podle záměru imunoterapie – separaci, expanzi nebo aktivaci NK buněk. NK buňky lze izolovat s vysokým stupněm čistoty v klinických podmínkách v přítomnosti anti-CD3⁺ protilátek, které jsou spojeny s magnetickými kuličkami. Cílem je odstranění CD3⁺ buněk (T lymfocytů) a obohacení CD56⁺ buněk (NK buněk)³⁸. Dalším krokem je namnožení NK buněk, k němu musí být NK buňky stimulovány pomocí přídatku interleukinu 2 (IL-2)³⁹. Jiné metody spočívají v kontaktu NK buněk s transformovanými lymfoblastoidními buňkami⁴⁰. Dalším typem regulace NK buněk je blokáda inhibičních signálů, které jsou zprostředkovány pomocí KIR receptorů. Monoklonální protilátka 1-7F9 se naváže na receptory KIR a tím zabrání tvorbě inhibičních signálů⁴¹.

4. Výsledky

4.1. Příprava plasmidů obsahující geny pro proteiny NKp46 a Epa1

Cílem práce byla příprava a exprese extracelulární části proteinu NKp46 a jeho ligandu Epa1. Na Obr. 5 str. 23 a Obr. 6 str. 24 jsou uvedeny sekvence genů a sekvence aminokyselin těchto proteinů. Pro přípravu expresních plasmidů obsahujících příslušné geny bylo potřeba určit délku proteinů, které budou vhodné pro expresi a pozdější studium interakce těchto proteinů. NK receptor NKp46 obsahuje extracelulární doménu, která je zodpovědná za interakci s ligandem, proto stačilo navrhnout konstrukt zahrnující tuto extracelulární část, a ne celý protein. Expresní konstrukt NKp46 je uveden na Obr. 7, str. 25. Pro expresní konstrukt proteinů Epa1 byl vybrán úsek podle publikované práce, ve které se podařilo tuto část proteinu Epa1 připravit a vykrytalizovat²⁶. Expresní konstrukt Epa1 je uveden na Obr. 8, str. 25. Oba konstrukty byly navrženy tak, aby na svém C-konci nesly histidinovou kotvu. Výsledná velikost proteinů byla vypočítána pomocí online kalkulátoru ProtParam⁴². Protein NKp46 produkovaný v této práci má teoretickou molární hmotnost 23266,48 Da (bez posttranslačních modifikací) a protein Epa1 má teoretickou molární hmotnost 28189,30 Da.

```
ATGAGCAGCACCCCTGCCGGCGCTGCTGTGCGTGGGCTGTGCCCTGAGCCAGCGCATTAGCGCGCAGCAGCAGACCCTG
CCGAAACCGTTTTATTGGGCGGAACCGCATTATTTATGGTGCCGAAAGAAAAACAGGTGACCATTGTGCTGCCAGGGCAAC
TATGGCGCGGTGGAATATCAGCTGCATTTTGAAGGCAGCCTGTTTTCGGTGGATCGCCCCGAAACCGCCGGAACGCATT
AACAAAGTGAAATTTTATATTCGGATATGAACAGCCGCATGGCGGGCCAGTATAGCTGCATTTATCGCGTGGGCGAA
CTGTGGAGCGAACCGAGCAACCTGCTGGATCTGGTGGTGACCGAAATGTATGATACCCCCGACCCTGAGCGTGCATCCG
GGCCCGGAAGTGATTAGCGGCGAAAAAGTGACCTTTTATTGCCGCTGGATACCGCGACCAGCATGTTTCTGCTGCTG
AAAGAAGCCCGCAGCAGCCATGTGCAGCGCGCTATGGCAAAGTGCAGCGGAATTCCGCTGGGCCCCGGTGACCACC
GCGCATCGCGGCACCTATCGCTGCTTTGGCAGCTATAACAACCATGCGTGGAGCTTTCCGAGCGAACCGGTGAAACTG
CTGGTGACCGCGGATATTGAAAACACCAGCCTGGCGCGGAAGATCCGACCTTTCCGGCGGATACCTGGGGCACCTAT
CTGCTGACCACCGAAACCGGCTGCAGAAAGATCATGCGCTGTGGGATCATACCGCGCAGAACCTGCTGCGCATGGC
CTGGCGTTTTCTGGTGCTGGTGGCGCTGGTGTGGTTTCTGGTGGAAAGATTGGCTGAGCCGCAACGCACCCGCGAACGC
GCGAGCCGCGCGAGCACCTGGGAAGGCCGCCGCCCTGAACACCCAGACCC

MSSTLPALLCVGLCLLSQRISAQQQLPKPFIWAEPHFMPVPEKQVTICQGNYGAVEYQLHFEGLFAVDRPKPPERI
NKVKFYIPDMNSRMAGQYSCIYRVGELWSEPSNLLDLVVTEMYDTPTLSVHPGPEVISGEKVTIFYCRLDTATSMFLLL
KEGRSSHVQRGYGKVOAEFPLGPVTTAHRGTYRCFGSYNNHAWSPSEPVKLLVTGDIENTSLAPEDPTFPADTWGTY
LLTTETGLQKDHALWDHTAQNLLRMGLAFLVLVALVWFLVEDWLSRKRTRERASRASTWEGRRRLNTQTL
```

Obr. 5: Sekvence receptoru NKp46. První je uvedena sekvence nukleotidů kódující gen NKp46. Druhá je uvedena sekvence aminokyselin receptoru. Zeleným písmem je zvýrazněn signální peptid, černým písmem je zvýrazněna extracelulární část proteinu, červeným písmem je vyznačena transmembránová část a modrým písmem cytoplazmatická část. Žlutě podbarvené aminokyseliny značí začátek a konec navrženého expresního konstruktů.

ATGATTTTGAATCCAGCTTTGTTTTGAATAAATGTGTTTGTATTATACTACTTTGATTTTGGTTGTTGTTGACTAAT
 GGTGGTTATGCTACTTTCATCAAATGATATTTTCATTTGGCTTCAAAGATCCAACACTTTTCCATTTGGGTTGTTCCACCA
 GATATTACTACTCCAAAAAAGGTTTGTCAATGGAATGTGTTTATCATATGATTTTTAGAAAAAAGGTTTCATATCCATGT
 TGGGATGCTGCTTATTTGGATCCAAATATCCAAGAACTGGTTATAAATCACATAGATTGTTGGCTAAAAGTTGATGGT
 GTTACTGGTAATATTAATTTTTATTATCATGCTACTAAAGGTTGTACTCCACAATTTGGGTCATTTGCCAGCTTCATAT
 AATTATCCAAAACCATTGACTATGACTAATTTTACTATGTTGTTGTATGGTTATTTAGACCAAAAGTTACTGGTTTT
 CATACTTTTACTATTTTCACTGATGATTTGTTGTTGTTAATTTTGGTGTCTGGTAAATGCTTTTTGATGTTGTAGAAAG
 GATTCATCAGCTGATCATTTTGGTAATTATCAAGCTTATGCTATTTGGGGTTCAAAAACCTGCTAAAGATGAATTGACT
 GTTCATTTGGATGCTGGTGTATATCAAAATGAAAATACTGTTTTCAGATTTTTTCAGAAATTTTTTTTCATTGGATGATACTGAAGAA
 ACTTTTTAAAACCTGAATCAAATGAAAATACTGTTTTCAGATTTTTTCAGAAATTTTTTTTCATTGGATGATACTGAAGAA
 GGTGTGTCAGGTTTGAATTCATATGATTCATCATGTGCTTCAGTTAAAACTTCAAAAATTTATTGGTATTGATTATCAT
 ACTGAAACTCCAAATGAAAATTTGGTTCCAATTACTAAAACCTATTTATCATTTGGGTATTCCATGTACTGGTACTACT
 ACTACTCCATTGTTGGTTCCAGTTTTTATGATCCATTGGCTAAATAATGTGTTACTATTAATATTCATCAACTTCA
 TCAGTTACTAAAACCTTCCACATACTACTTCAAAAAGAGTTTTCATTTTCATTCATCAATTTTCATCAAAAAAATTTG
 ATTTCAAAAATCAATTCATCACCATATGGTCCAATTAATCACAATCAATTCCAACTGAAATGGAACCTTCATCAGAA
 ATTTTCATCATCAGAATATGCTTTTTTCAGATGTTATTTCAACTCCATCAGATTCCACATTAACAAAAACATTCATCA
 TTGAATTCATCATATATACTTCAACTGTTTATTTCATTGATTCATATTTCAATTTCAACAAGGTTATTTTTTCAACT
 TCATTGTCAGAACAAAATATTACTTCAAAATCATCAACTGATAAATTTTCAACTGCTACTTCAATGTCAAAATAATATT
 ACTCAATCATCAATTTATTTTCACAATTTTCAACTAATAATGAAAATTTATACTACTACTTCAATGCATACTTTCATCA
 GATAAAAATTTCAACTGAAACTTTGAATAATTTCAACTACTACTTCAATTTTGTGTTTTCAAAATTCATCAACTATT
 TTGAAAAATAACTACTACTATTATTTTCATCAGATAAAGATACTCATTATCATCCAGTTAATCCAACCTATTGTTTGTTC
 ACTAATAAAAACGAAATTTTGTGCTTCAATTTACTCAACCATCAATTTCAAATTCAAATAATCATTGGTCATCATCA
 GTTTTGAAATTTAATTTCAACTACTGTTAGATCAACTTTGCCATCATCAGCTGGTTCAAATGAAACTTCAATTAATGTT
 CCATTTTCATCATCAACTGAATCAAATACTTCAACTTTCATCAACTTCAACTTCAAATTCAAAATGGTTAGATCAACT
 TTGCCATCATCAGCTGGTTCAAATGAAACTTCAATTTTCAGTTCCATTTTCATCATCAACTGAATCAAATACTTCAACT
 TCATCAACTTCAACTTCAAATTCAAAATGGTTAGATCAACTTTGCCATCATCAGCTGGTTCAAATGAAACTTCAAT
 AATGTTCCATTTTCATCATCAACTGAATCAAATACTTCAACTTTCATCAACTTCAACTTCAAATTCAAAACCTGTTAGA
 TCAACTCCATTTTCATCAGCTGGTATTATTGACTTTCATTGTCACAAAGAAATAATAAATCAGCTTCATCATATGCT
 TCATCAAATAAATGTTATAAATACTGCTGATTCATGATAGAAAGTTTCATTCAACTCCATTAATTTGTTGACTTCA
 TCATATACTTCAAGAGGTTGATTATGATTGTTTCACTTCAACTAAATGAAAATTAATGATACTAATTAATGTT
 AATAATAAACATACTACTAAATCATGTTTGAAACTTTCAGTTACTACTACTATTTCAAATTTGAAATTTAAAACCTGCT
 AGAAAATCATCATCAAATACTATTGGTTTGCATTCATATCCAACCTTCATCACCAAAATAAATCAATTTTCATCAGCTCCA
 ATTATTGGTTATATTTTCATCATTTAAAACCTATTAAAACCTGCTTCCACATCATATCAAACCTTTCAGATTTGACTACTATT
 ACTACTATTACTTTCATTGAATAATCCAGGTTCAACTGCTGTTGAAAATACTCATGAATCAAATGATAAATCAAGAAAA
 ACTTCATCAAATGATATTTTCATCAAACATTCAGTTATTAAGAAACTAAAGATGCTGTTGAATCATCAAATAAATCA
 CATCAAACCTAATACTTTGAAATGTTTCATCAATTTATTTGCTTTCATCATCATAAATCATTGATGATGATGGTGGT
 ACTACTTTGACTTTGACTTTTGTCAAAAAGTTTATTCACCACAAAATAATGATACTTTGCCATTTTTGAAAATTTTCAGAA
 GTTAATCCATCAAGAACTGTTTTGCCAGAATCATCAAATAATGATGCAATATTTGACTTCAACTGAAGAAAGAAATAAA
 ACTGCTAGAAATACTATTGCTACTAATATTGTTTCAATTTCAACTTTTCATTTTGAAGGTGAAGGTAATGCTATTAGA
 ATGGGTTATACTCAATTTGTTGTTGATGTTGATTGTTATTATTGTTATGAATATTGGTACT

MILNPALFLNKVCIIYTTLLILLLLTNGGYA^TSSNDISLASKDP^TTFPLGCSPI^TTPKKGLSMELYSYDFRKKGSYPC
 WDAAYLDPNYPR^TGYKSHRLLAKVDGVTGNINFYHATK^GCTPQLGHLPASYNYPKPLTMTNFTMLLYGYFRPKVTGF
 HTFTISADLLFVNFAGNAFDCRRDSSADHFGNYQAYAIWGSKTAKDELTVHLDAGVYYP^IRLFYNNREYD^GALSF
 TFKTESNENTVSD^FSEYFFSLDDTEEGCPGLISYDS^SCASVKTSKIIGIDYHTE^TPNENLVPI^TKTIYHLGIPCTGTT
 TPLCGSGFYDPLANKCVTINTSSTSSVTKTTSHTTSKEVSHSSISSQKTLIPKSI^PSPYGP^IKSQSIPT^EMET^SSE
 ISSSEYAFSDVI^TPSHSPYTKHSSLN^SSSYTSVIHSLTSY^SISQGI^FSTSLSE^QNITSK^SSD^KFSTAT^SMS^NNI
 TQSSIIISQFSTNNENYTTTSMHTSSDKISTETL^NNSISTTT^SILF^SNSSTIL^KNN^TTISSDKD^THYHPV^NPTIV^CS
 TNKTEI^ICASIT^QPSIS^NSN^NHWSSV^LKFNST^TVRST^LPSSAG^SNETS^IINV^PFSS^STES^NTST^STST^SNS^KMVR^ST
 LPSSAG^SNETS^ISV^PFSS^STES^NTST^STST^SNS^KMVR^STLPSSAG^SNETS^IINV^PFSS^STES^NTST^STST^SNS^KT^VR
 ST^PFSSAG^IIM^TSL^SQR^NNKS^SASSY^ASSNS^KYNT^ADS^RKV^HST^PSYLL^TSSY^TSEG^VDY^DCS^LVST^KLKIND^TNC^V
 NNKHTTK^SCL^KTSV^TTTI^PTL^EIK^TARK^SSSNT^IGL^HSY^PTSS^PNKS^ISSA^PIIGY^ISS^FK^TIK^TAS^PSY^QTS^DLT^TI
 T^TIT^SL^NNP^GSTAV^ENT^HES^NDK^RK^TSS^ND^ISS^KH^SVI^KET^KDA^VESS^NKS^HQ^TN^LK^CSSII^IASS^SH^SNY^ESL^G
 T^LL^TL^TL^SK^VY^SQ^NND^TL^PFL^EI^SEV^NPS^RTV^LPE^SSK^MQ^YL^TSTE^ER^NK^TAR^NT^IAT^NIV^SI^STF^HFE^GE^GNA^IR
 MGY^TQ^LLL^LM^LI^GI^VM^NI^GT

Obr. 6: Sekvence proteinu Epa1. První je uvedena sekvence nukleotidů kódující gen Epa1. Druhá je uvedena sekvence aminokyselin proteinu. Zeleným písmem je zvýrazněn signální peptid, černým písmem je zvýrazněn vlastní protein. Žlutě podbarvené aminokyseliny značí začátek a konec expresního konstruktů.

```

ATTACCGGT CAGCAGCAGACTCTCCAAAACCGTTCATCTGGGCGGAGCCCCATTTTCATGGTTCCAAAGGAAAAGCAA
GTGACCATCTGTTGCCAGGAAATATGGGGCTGTTGAATACCAGCTGCACTTTGAAGGAAGCCTTTTGGCCGTGGAC
AGACAAAACCCCTGAGCGGATTAACAAAGTCAAATTTACATCCCGGACATGAACTCCCGCATGGCAGGGCAATAC
AGCTGCATCTATCGGGTTGGGGAGCTCTGGTCAGAGCCAGCAACTTGCTGGATCTGGTGGTAACAGAAATGTATGAC
ACACCCACCCCTCTCGGTTTCATCCTGGACCCGAAGTGATCTCGGGAGAGAAGGTGACCTTCTACTGCCGTCTAGACACT
GCAACAAGCATGTTCTTACTGCTCAAGGAGGGAAGATCCAGCCAGTACAGCGCGGATACGGGAAGGTCCAGGCGGAG
TTCCCCCTGGGCCCTGTGACCACAGCCACCGAGGGACATAACCGATGTTTTGGCTCCTATAACAACCATGCCTGGTCT
TTCCCCAGTGAGCCAGTGAAGCTCCTGGTCACA GGC GGTACC CACCATCACCACCATCACCACCA GGG

ITGQQQTLPKPFIWAEPHFMPKEKQVTICCGNYGAVEYQLHFEGSLFAVDRPKPPERINKVKFYIPDMNSRMAGQY
SCIYRVGELWSEPSNLLDLVVTEMYDTPTLSVHPGPEVISGEKVTFYCRLDTATSMFLLLKEGRSSHVQRGYGKVVQAE
FPLGPVTTAHRGTYRCFGSYNNHAWSPSEPVKLLVTGGT HHHHHHHHG

```

Obr. 7: Expresní konstrukt receptoru NKp46. První je uvedena sekvence nukleotidů a druhá je uvedena sekvence aminokyselin. Žlutě podbarvené aminokyseliny značí začátek a konec části proteinu, která je shodná s genem NKp46. Pro pozdější purifikaci proteinu byla do sekvence vložena sekvence pro 8 histidinů, podbarveno zeleně.

```

ATGACCAGCAGCAATGATATTAGCCTGGCAAGCAAAGATCCGACCACCTTTCCGCTGGGTTGTAGTCCGGATATTACC
ACACCGAAAAAAGGTCTGAGCATGGAACGTATAGCTATGACTTTCGTAAAAAAGGTAGCTATCCGTGTTGGGATGCA
GCATATCTGGATCCGAATTATCCGCGTACCAGTTATAAAAGCCATCGTCTGCTGGCAAAAGTTGATGGTGTGACCGGT
AATATCAACTTCTATTACCATGCAACCAAAGGTTGACACCGCAGCTGGGTCATCTGCCTGCAAGCTATAACTATCCG
AAACCGCTGACCATGACCAACTTACCATGCTGCTGATGGTTATTTCCGTCGAAAGTTACCGGTTTTCATACCTTT
ACCATTAGCGCAGATGATCTGCTGTTGTTAATTTGGTGCAGGCAATGCCTTTGATTGTTGCTGCTGATAGCAGC
GCAGATCATTTTGGTAATTATCAGGCATATGCAATCTGGGGTAGCAAAACCGCAAAGATGAACTGACCGTTCATCTG
GATGCCGGTGTATTATCCGATTCGCTGTTTTATAACAACCGGAATATGATGGTGCAGTGGTTCACCTTTAAA
ACCGAAAGCAATGAAAACACCGTGAAGGATTTTAGCGAATATTTCTTTAGCCTGGATGATACCGAAGAAGGTTGTCG
GGTCTGATTAGCTATGATAGCAGTAAA CATCACCATCACCATCAC

MTSSNDISLASKDPPTFFPLGCSPTITPKKGLSMELYSYDFRKKGSYPCWDAAYLDPNYPRTGYKSHRLLAKVDGVTG
NINFYYHATKGT PQLGHLPASYNYPKPLTMTNFTMLLYGYFRPKVTGFHTFTISADDLLFVNFAGNAFDCRRDSS
ADHFGNYQAYATWGSKTAKDELTVHLDAGVYYP IRLFYNNREYDGA LSFTFKTESNENTVSDFSEYFFSLDDTEEGCP
GLISYDSSK HHHHHH

```

Obr. 8: Expresní konstrukt proteinu Epa1. První je uvedena sekvence nukleotidů a druhá je uvedena sekvence aminokyselin. Žlutě podbarvené aminokyseliny značí začátek a konec části proteinu, která je shodná s genem Epa1. Pro pozdější purifikaci proteinu byla do sekvence vložena sekvence pro 6 histidinů, podbarveno zeleně. Modře podbarvené jsou cysteiny, které tvoří disulfidické můstky.

Gen kódující NKp46 byl již dříve vložen Bc. Štěpánem Herynkem do vektoru pTW5sec⁴³. Z důvodu neúspěšné transientní exprese byl gen kódující NKp46 v rámci této práce vložen do plasmidu pUT7 umožňujícím tvorbu stabilně transfekovaných linií systémem piggyBac⁴⁴. Pomocí primerů pTTK5-Fw a pCT5-Rev byl gen kódující NKp46 amplifikován z plasmidu pTW5sec_NKp46. S amplifikovaným genem byla provedena agarosová elektroforéza. Amplifikovaný gen byl vyříznut z gelu a izolován. Amplifikovaný gen byl vložen do linearizovaného plasmidu pUT7, který byl linearizován pomocí restrikčních endonukleas PmeI a NheI. Gen Epa1 byl použit ze zásobního roztoku (komerční syntetický gen) a plasmid pOPINE byl linearizován pomocí restrikčních endonukleas PmeI a NcoI. U vzorků vektoru a insertů byla změřena koncentrace DNA v eluátech (viz Tab. 2, str. 26).

Tab. 2: Koncentrace DNA v eluátech

Vzorek	c [ng/μl]
NKp46	155
Epa1	10
pUT7*	40
pOPINE*	24

Následně bylo provedeno vnesení genů do linearizovaných plasmidů obsahujících resistenci na ampicilin. Gen kódující protein Epa1 byl vložen do linearizovaného plasmidu pOPINE a gen kódující NKp46 do plasmidu pUT7. Připravenými vektory byly transformovány kompetentní bakteriální buňky *Escherichia coli* DH5α. Buňky byly rozetřeny na předehřátou kultivační misku a inkubovány při 37 °C přes noc. Druhý den byla provedena PCR z kolonií.

Z pozitivních kolonií byla následně provedena nízkoobjemová izolace plasmidové DNA (viz 6.2.9). Naměřené koncentrace jsou uvedeny v Tab. 3. Pomocí sekvenční analýzy bylo potvrzeno úspěšné vnesení genů do plasmidů. Pro sekvenaci byly připraveny vzorky plasmidové DNA s primery dle Tab. 4.

Tab. 3: Koncentrace plasmidové DNA získané z nízkoobjemové izolace

Vzorek	c [ng/μl]
pUT7_NKp46	825
pOPINE_Epa1	278

Tab. 4: Složení vzorků pro sekvenční analýzu

Označení	Vzorek	Primer
JAH1	pUT7_NKp46	pCT5seq_FW
JAH2	pUT7_NKp46	pCT5seq_REV
JAH3	pOPINE_Epa1	pOPINE_seq_FW
JAH4	pOPINE_Epa1	PTT_REV

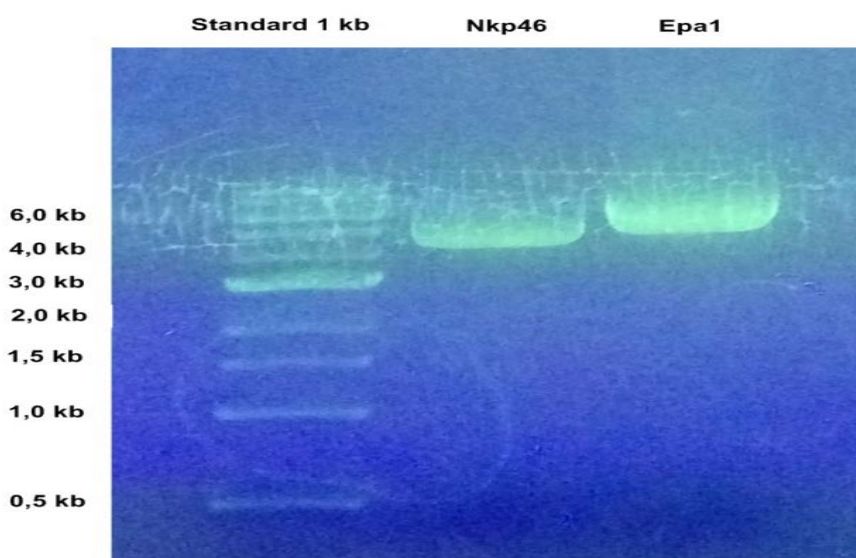
Vzorky získané z nízkoobjemové přípravy DNA, jejichž správnost byla ověřena DNA sekvenací, byly použity k transformaci kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli* DH5α. Buňky byly natřeny na předehřátou kultivační a inkubovány při

37 °C přes noc. Druhý den byla provedena velkoobjemová izolace plasmidové DNA. Koncentrace plasmidové DNA z velkoobjemové izolace jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Koncentrace plasmidové DNA získané z velkoobjemové izolace

Vzorek	c [ng/μl]
pUT7_NKp46	895
pOPINE_Epa1	1930

Po velkoobjemové izolaci DNA byla provedena agarosová elektroforéza pro kontrolu velikosti a čistoty plasmidové DNA (viz Obr. 9).

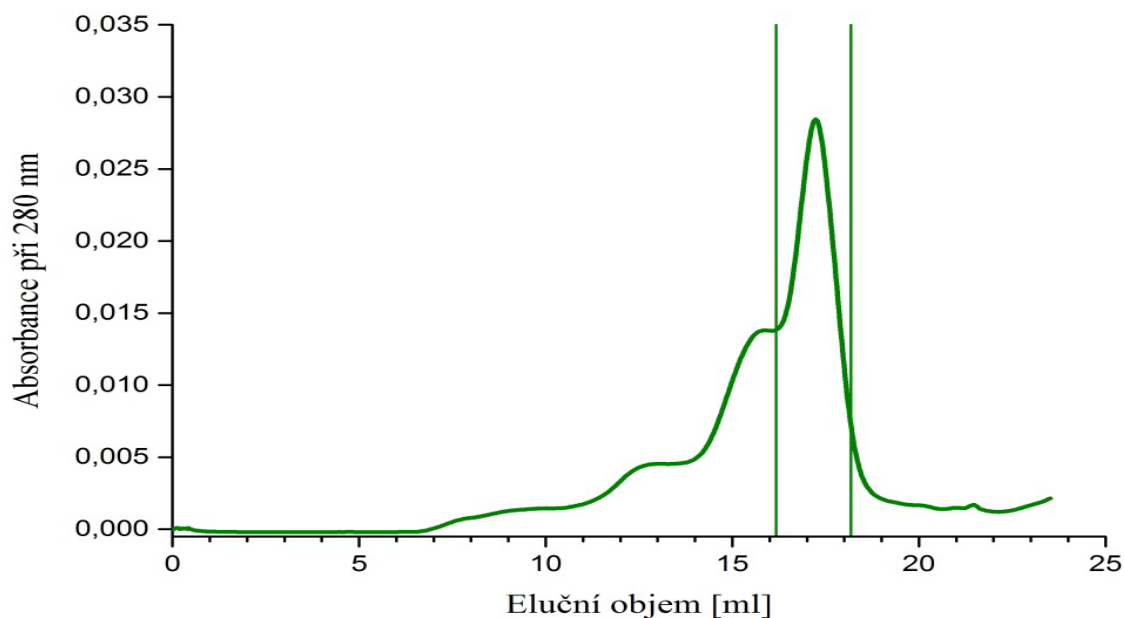


Obr. 9: Agarosová elektroforéza po velkoobjemové izolaci DNA. V první dráze je 1 kb standard, v druhé dráze je plasmid pUT7_NKp46 a v třetí je plasmid pOPINE_Epa1.

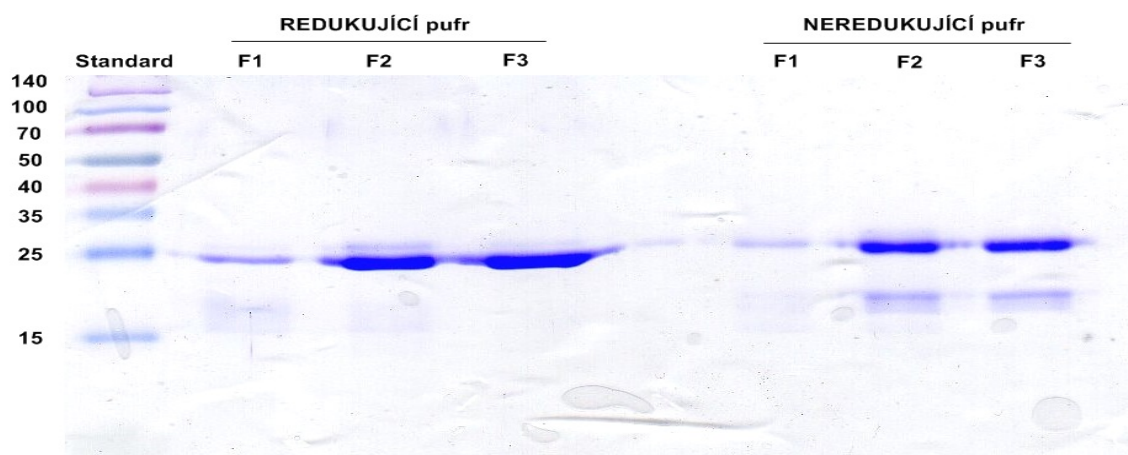
4.2. Produkce NKp46 v expresním systému HEK293

Plasmidem pUT7_NKp46, který obsahuje sekreční signál umožňující expresi proteinů s následnou sekrecí do kultivačního média, byly transfekovány buňky HEK293S GnTI. Z buněk byla selekcí na příslušná antibiotika vytvořena stabilní linie. Pro produkci NKp46 byla tato stabilní linie kultivována ve větším objemu média, exprese proteinu byla indukována přidávkem doxycyklinu a po inkubaci byly buňky sklizeny centrifugací. Médium bylo po centrifugaci uchováno při -20 °C. Následně byla provedena chelatační afinitní chromatografie na koloně Talon. Eluát byl koncentrován na objem 500 μl a nanesen na kolonu pro gelovou permeační chromatografii (viz Obr. 10, str. 28). Frakce byly sbírány po 1 ml. Byla změřena koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích, jejich celkové množství ve frakcích bylo 0,359 mg. Frakce byly

analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (viz Obr. 11, str. 28). Pro měření koncentrace byl pomocí online kalkulátoru ProtParam⁴² vypočítán teoretický extinkční koeficient a teoretická hmotnost proteinu. Extinkční koeficient při 280 nm byl vypočítán jako $31650 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a teoretická hmotnost proteinu byla vypočítána jako 23266,48 Da.



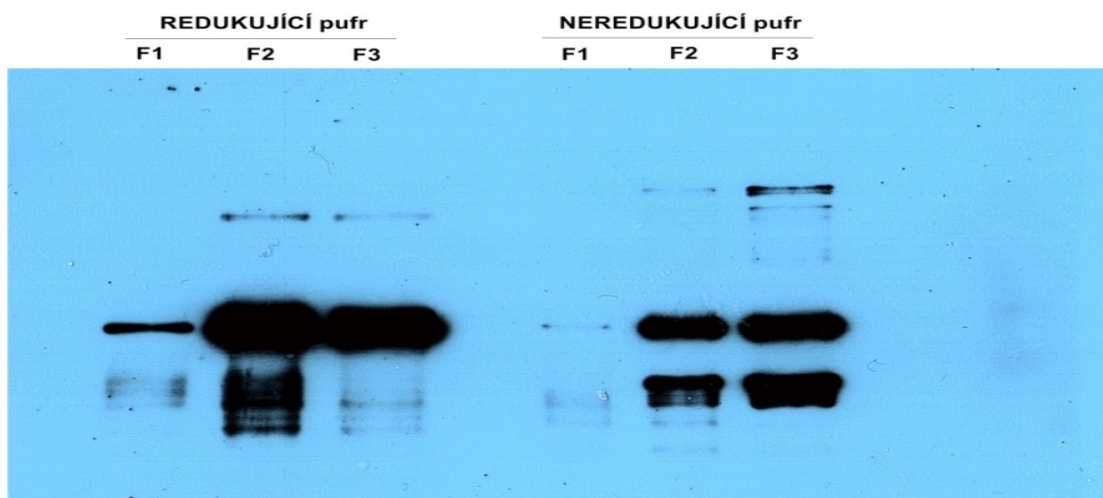
Obr. 10: Gelová permeační chromatografie NKp46. Kolona Superdex 200 10/300. Svislé čáry označují začátek a konec sbírání frakcí.



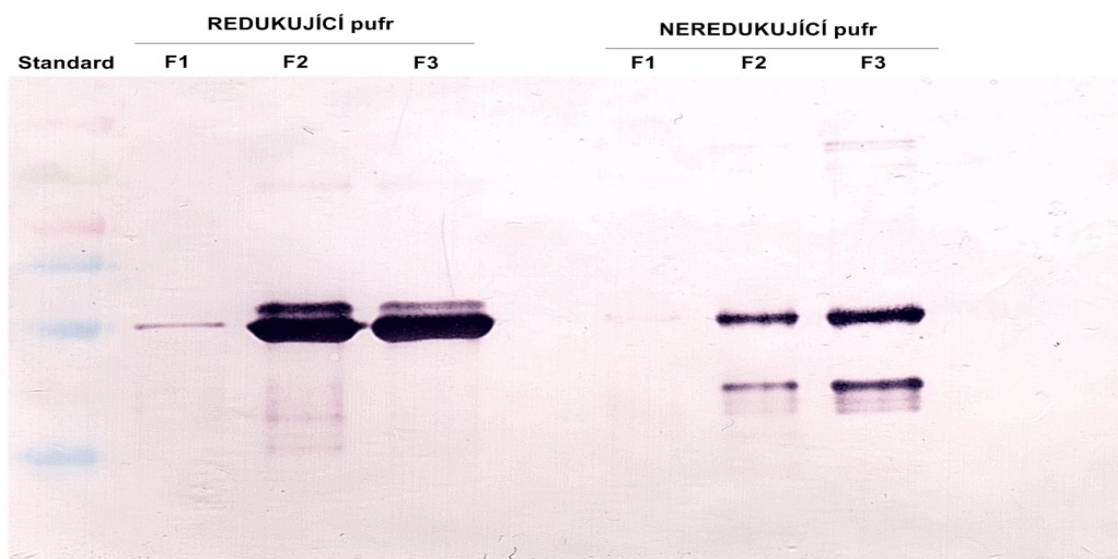
Obr. 11: Analýza frakcí NKp46 z gelové permeační chromatografie. 12,5% polyakrylamidový gel v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufru. Vzorky frakcí F1 - F3v redukujícím a neredukujícím pufru.

Pro identifikaci proteinu NKp46 byla provedena imunodetekce histidinové kotvy. S frakcemi byla provedena $2\times$ elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS, jeden gel byl nabarven barvicím roztokem a druhý gel byl využit na elektropřenos

na membránu a imunodetekci proteinů s histidinovou kotvou. Detekce byla provedena chemiluminiscenčně a následně kolorimetricky (viz Obr. 12 a Obr. 13).



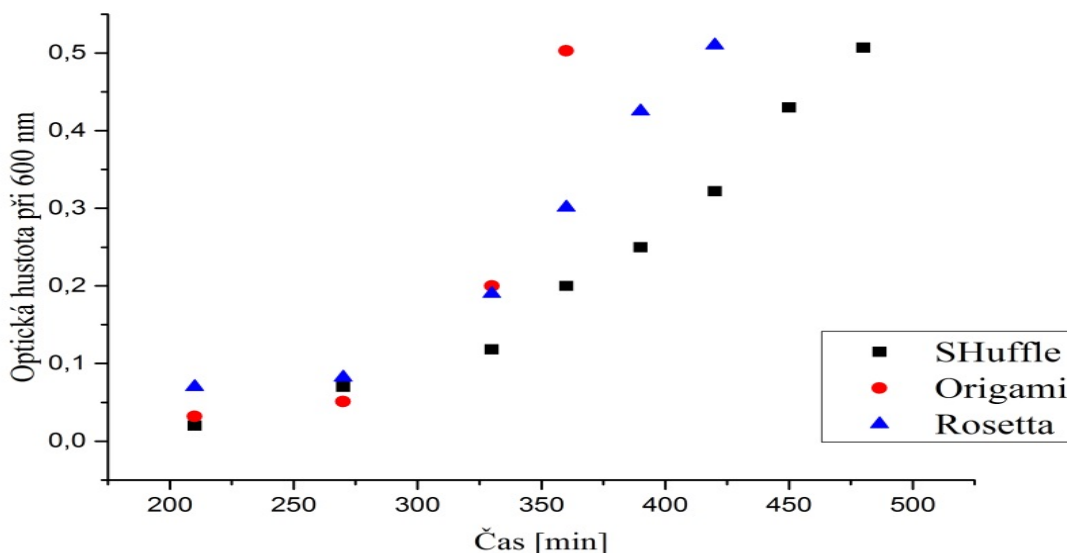
Obr. 12: Chemiluminiscenční imunodetekce histidinové kotvy proteinu NKp46. Vzorky frakcí F1 – F3 v redukujícím a neredukujícím pufru.



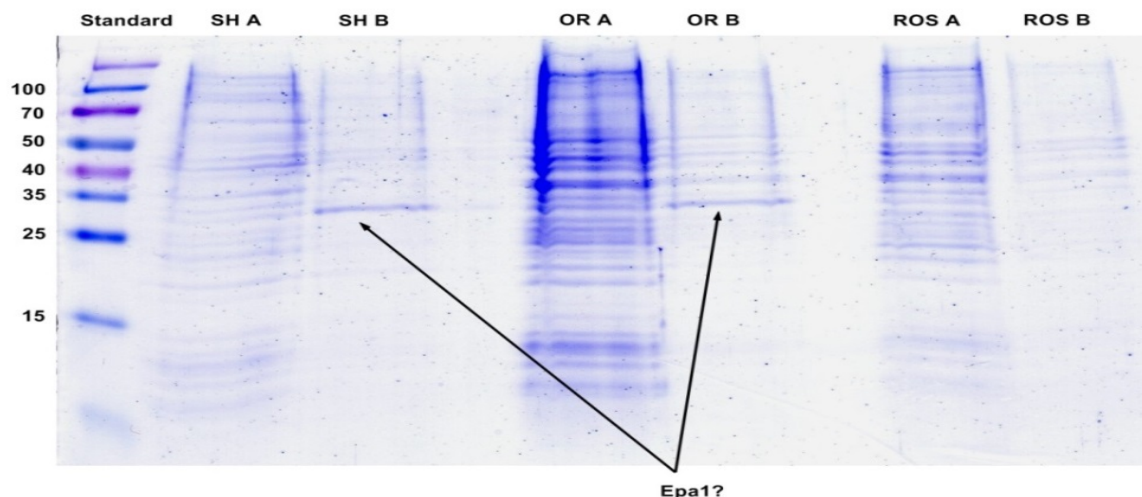
Obr. 13: Kolorimetrická imunodetekce histidinové kotvy proteinu NKp46. Vzorky frakcí F1-F3 v redukujícím a neredukujícím pufru.

4.3. Produkce Epa1 v bakteriálním expresním systému

Pro produkci proteinu Epa1 byl zvolen bakteriální systém *E. coli*. Plasmidem pOPINE_Epa1 byly transformovány buňky *E. coli* SHuffle, *E. coli* Origami (DE3) a *E. coli* Rosetta gami 2 (DE3). K 50 μ l suspenze kompetentních buněk bylo přidáno 1 μ g DNA plasmidu. Získanými koloniemi transformovaných buněk bylo inokulováno kultivační médium. Produkce byly inkubovány při 37 °C, dokud optická hustota při 600 nm (OD_{600}) nedosáhla hodnoty 0,5. Naměřené hodnoty optické hustoty a růstové křivky při 600 nm jsou uvedeny na Obr. 14. Po dosažení OD_{600} 0,5 bylo ke kultuře přidáno indukční činidlo IPTG. Po indukci byly kultury inkubovány na třepače 48 hodin při 12 °C, následně byly sklizeny centrifugací a promyty TES pufrem. Před inkubací a před sklizením byly odebrány vzorky. Se vzorky byla následně provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (Obr. 15, str. 31).



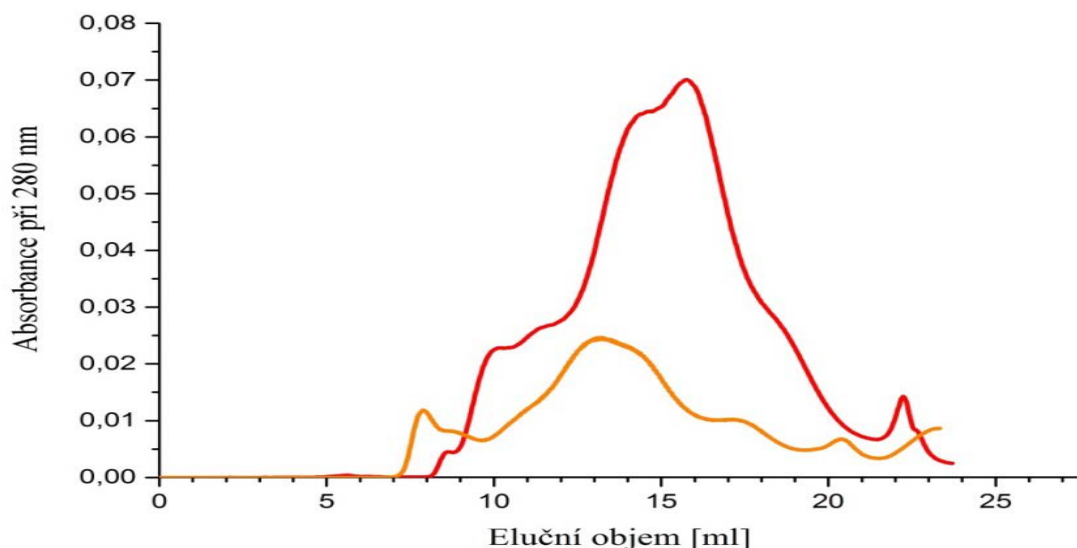
Obr. 14: Růstová křivka bakteriálních kultur *E. coli* SHuffle, Origami a Rosetta pro produkci Epa1. Při optické hustotě 0,5 byla provedena indukce IPTG



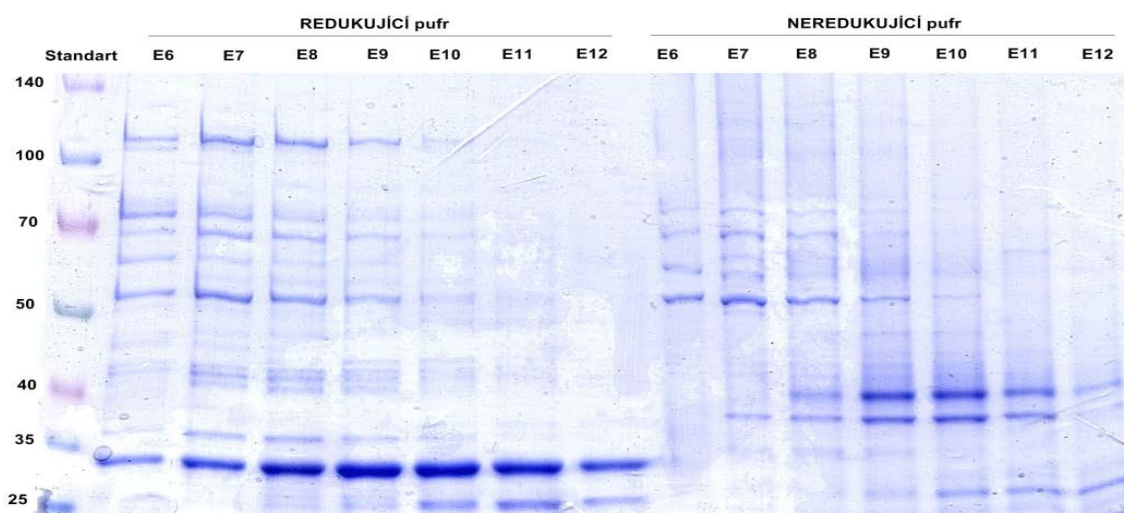
Obr. 15: Bakteriální exprese proteinu Epa1. 15% SDS elektroforéza vzorků odebraných před a po indukci v redukujícím pufru. V dráze 1 je standard molekulových hmotností (kDa). V dráze SH A a SH B, byly pipetovány vzorky z kultury E. coli SHuffle (A -- před indukci, B -- po indukci (před sklizením)). V dráze OR A a OR B, byly pipetovány vzorky z kultury E. coli Origami (A – před indukci, B – po indukci (před sklizením)). V dráze ROS A a ROS B, byly pipetovány vzorky z kultury E. coli Rosetta (A – před indukci, B – po indukci (před sklizením)). Šípky ukazují proužky, které jsou výraznější než ostatní v dráze vzorků odebraných po indukci. Velikostně by mohly odpovídat monomeru proteinu Epa1 (28,2 kDa). V dráze ROS B není vidět žádný výraznější proužek.

Z pelet bakteriálních kultur *E. coli* SHuffle a *E. coli* Origami byly připraveny vzorky na chelatační afinitní chromatografii. Bakteriální pelety *E. coli* Rosetta nebyly dále používány pro purifikaci proteinu, z důvodu absence proužku Epa1 na SDS elektroforéze.

Následovala chelatační afinitní chromatografie na koloně Talon. Eluát byl koncentrován na objem 500 μ l. Poté byla provedena gelová permeační chromatografie. Frakce byly sbírány po 1 ml. Další experimenty byly prováděny s frakcemi z kultury SHuffle na základě porovnání chromatogramů z gelové permeační chromatografie (viz Obr. 16, str. 32). Ve frakcích byla změřena koncentrace proteinů, celkové množství proteinu ve frakcích bylo 1,256 mg. S vybranými frakcemi byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (viz Obr. 17, str. 32). Pro měření koncentrace byl pomocí online kalkulátoru ProtParam⁴² vypočítán teoretický extinkční koeficient a teoretická hmotnost proteinu. Extinkční koeficient při 280 nm byl vypočítán jako 41175 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a teoretická hmotnost proteinu byla vypočítána jako 28189,30 Da.

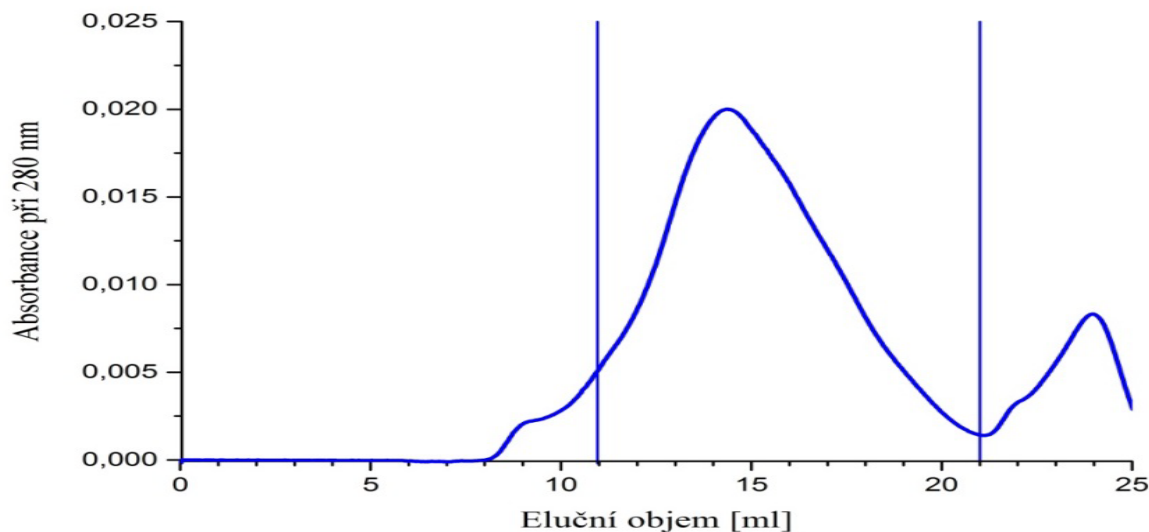


Obr. 16: Gelové permeační chromatografie Epa1 z kultur E. coli SHuffle a Origami po chelatační afinitní chromatografii. Kolona Superdex 200 10/300. Červená křivka zobrazuje vzorek z produkce v kmeni SHuffle a oranžová křivka v kmeni Origami.

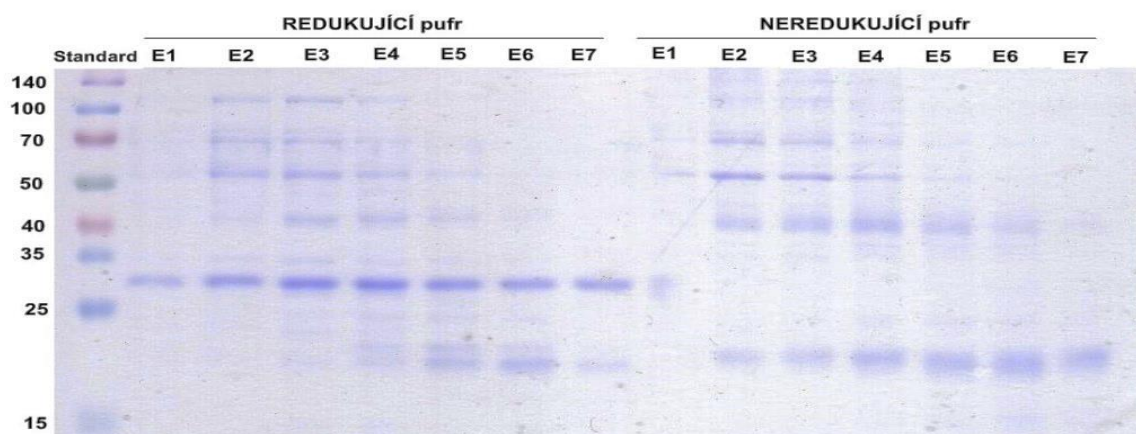


Obr. 17: Analýza frakcí Epa1 z bakteriální kultury E.coli SHuffle z gelové permeační chromatografie. 12,5 % polyakrylamidový gel v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufru. Vzorky frakcí E6-E12 v redukujícím a neredukujícím pufru.

Vzhledem k absenci proužku Epa1 o očekávané velikosti na SDS elektroforéze v neredukujícím prostředí byly spojeny frakce 6-12 z gelové permeační chromatografie kultury SHuffle a k roztoku byl přidán merkaptoethanol, aby výsledná koncentrace byla 2,5 mM. Tento postup byl prováděn v publikované práci, podle které byla vybrána část genu Epa1 pro amplifikaci a vnesení do plasmidu²⁶. Cílem bylo částečné rozvolnění disulfidů, které mohly být špatně zapojené a umožnění nového zapojení. Roztok byl koncentrován a byla provedena gelová permeační chromatografie (viz Obr. 18, str. 33). Z frakcí byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (viz Obr. 19, str. 33) a změřena koncentrace ve frakcích, celkové množství proteinu ve frakcích bylo 0,313 mg. Po redukci není stále vidět na SDS elektroforéze proužek o velikosti Epa1 v neredukujícím prostředí.

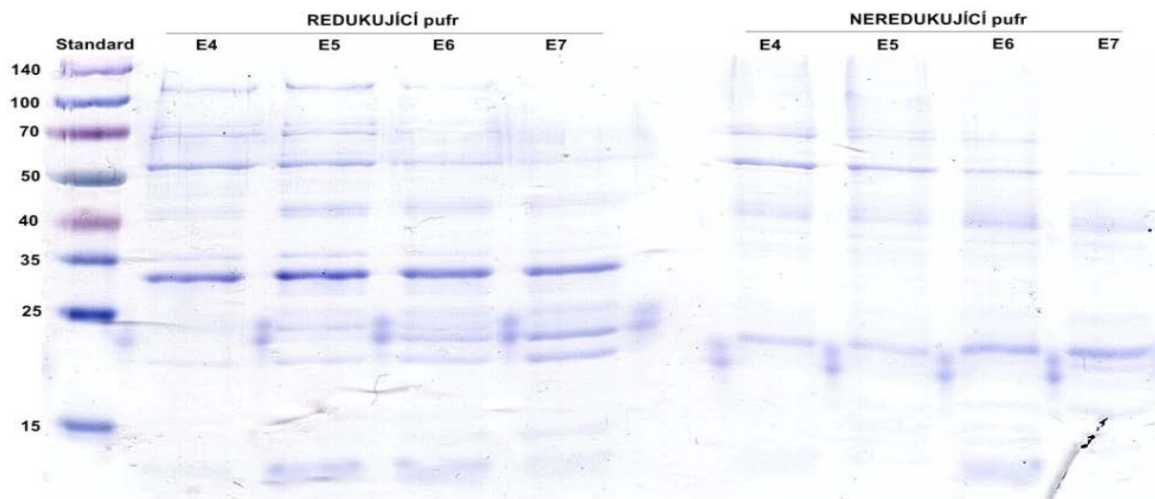


Obr. 18: Gelová permeační chromatografie Epa1 z kultury E. coli SHuffle po redukci 2,5 mM merkaptoethanolem. Kolona Superdex 200 10/300. Svislé čáry označují začátek a konec sbírání frakcí.

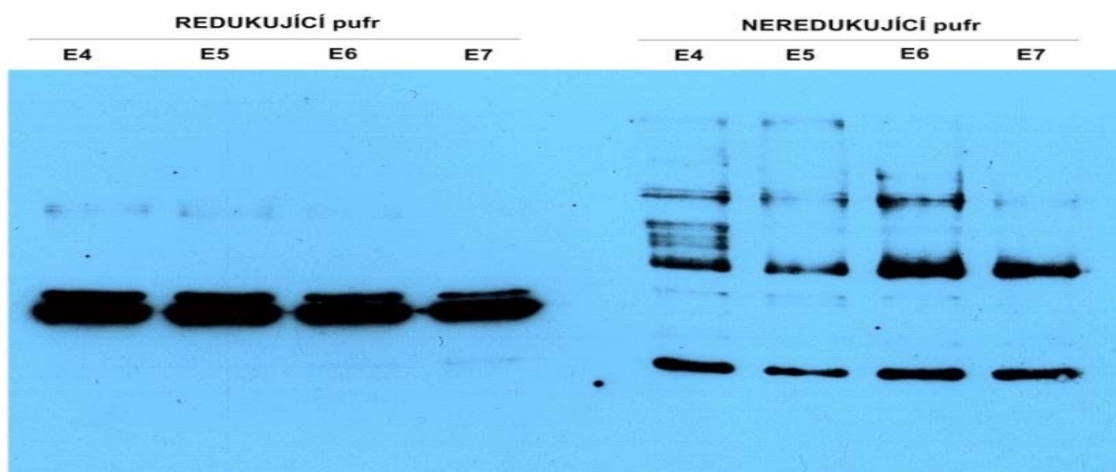


Obr. 19: Analýza frakcí Epa1 z bakteriální kultury E. coli SHuffle z gelové permeační chromatografie po redukci 2,5 mM merkaptoethanolem. 12,5% polyakrylamidový gel v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufru. Vzorky frakcí E1-E7 v redukujícím a neredukujícím pufru.

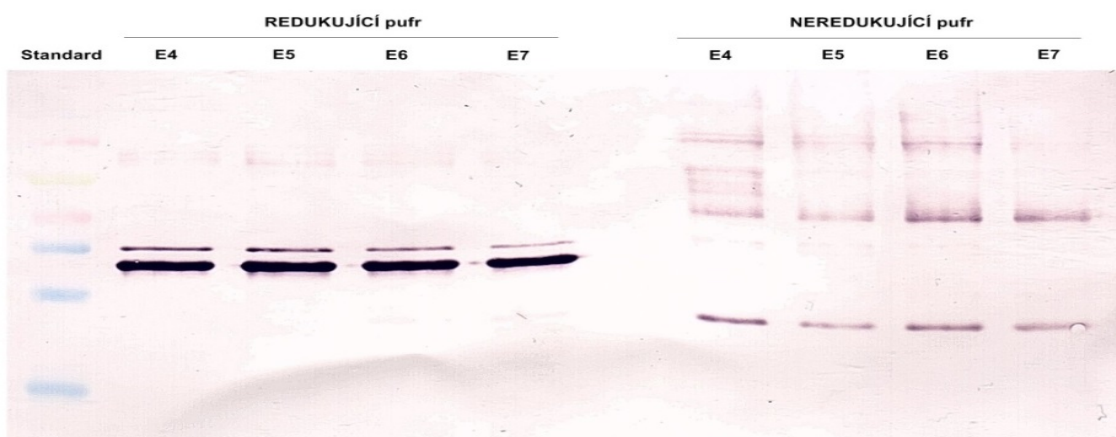
Pro identifikaci proužku odpovídajícímu proteinu Epa1, byla s vybranými frakcemi provedena imunodetekce histidinové kotvy. S vybranými frakcemi byla provedena 2× elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS, jeden gel byl nabarven barvicím roztokem (viz Obr. 20, str. 34) a druhý gel byl využit na elektropřenos na membránu a imunodetekci proteinů s histidinovou kotvou. Detekce byla provedena chemiluminiscenčně a následně kolorimetricky (viz Obr. 21 a Obr. 22, str. 34).



Obr. 20: Analýza vybraných frakcí Epa1 z bakteriální kultury *E. coli* SHuffle z gelové permeační chromatografie po redukci 2,5 mM merkaptoethanolem. 12,5% polyakrylamidový gel v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufru. Vzorky frakcí E4-E7 v redukujícím a neredukujícím pufru.



Obr. 21: Chemiluminiscenční imunodetekce histidinové kotvy proteinu Epa1. Vzorky frakcí E4-E7 v redukujícím a neredukujícím pufru.



Obr. 22: Kolorimetrická imunodetekce histidinové kotvy proteinu Epa1. Vzorky frakcí E4-E7 v redukujícím a neredukujícím pufru.

5. Diskuze

Geny kódující proteiny NKp46 a Epa1 byly amplifikovány a úspěšně vloženy do linearizovaných vektorů obsahujících ampicilinovou resistenci. Těmito plasmidy byly následně transformovány bakteriální buněčné kultury, ze kterých bylo izolováno zásobní množství plasmidů pUT7_NKp46 a pOPINE_Epa1. Plasmidy byly použity pro produkci příslušných proteinů.

Protein NKp46 byl produkován v eukaryotickém expresním systému buněčné linie HEK293S GnTI. Savčí expresní systém byl zvolen kvůli predikovaným místům N-glykosylace. Pro strukturní studie je potřeba mít protein pokud možno v nativním stavu, tedy se všemi posttranslačními modifikacemi. Již dříve nebyla produkce s využitím transienční transfekce úspěšná, proto byl konstrukt NKp46 vložen do plasmidu umožňující tvorbu stabilně transfekovaných linií systémem piggyBac⁴⁴. Tento systém umožňuje selekci stabilně transfekovaných linií a navíc je produkce proteinu indukovatelná přidáním doxycyklinu. Protein byl buňkami sekretován do média. Ani tentokrát nebyl, z neznámého důvodu, výtěžek produkce vysoký. Byly to řádově desítky mikrogramů, což pro strukturní studie a případně krystalizaci nestačí.

Ve frakcích po chelatační afinitní chromatografii a gelové permeační chromatografii bylo pomocí imunodetekce histidinové kotvy detekováno více forem proteinu NKp46 (viz Obr. 12 a Obr. 13, str. 29). V redukujícím prostředí byl protein NKp46 přítomen ve dvou formách. Proužek o vyšší molární hmotnosti může být glykosylovaná forma proteinu NKp46. Proužek o nižší molární hmotnosti může být neglykosylovaná forma. V neredukujícím prostředí se vyskytuje proužek o výrazně nižší hmotnosti. Tyto výsledky budou dále analyzovány, ale rozdíl mezi redukujícím a neredukujícím prostředím naznačuje, že problém může být v zapojení disulfidů v rámci dvou imunoglobulinových domén.

Na základě nízkého výtěžku produkce ze stabilně transfekovaných linií a nově publikovaných prací se nabízí řešení úpravou expresního konstruktů. Stávající konstrukt (Obr. 7, str. 25) byl navržen podle známé krystalové struktury (PDB 1HKF). Nový konstrukt bude prodloužen na C-konci. Zároveň bude na C-konec přidáno místo pro C3 proteasou a Fc fragment. Prodloužený konstrukt NKp46 by měl být stabilnější a Fc fragment sám o sobě by měl pomoci skládání proteinu při expresi. Pro studium vazby receptoru NKp46 a ligandu Epa1 bude nutné připravit receptor nejenom s homogenní glykosylací (exprese v HEK293S GnTI), ale také s přirozenou glykosylací savčího typu (exprese v linii HEK293T) a bez glykosylace (exprese v HEK293S GnTI a deglykosylace endoglykosydasou). Poté bude možné porovnat vazbu proteinu Epa1 na přirozeně glykosylovanou, homogenně glykosylovanou a deglykosylovanou formu proteinu NKp46 a určit roli glykosylace v této vazbě.

Protein Epa1 byl produkován v bakteriálním expresním systému *E. coli*. Produkce probíhala ve 3 kmenech *E. coli* – SHuffle, Origami a Rosetta. Indukce kultur byly provedeny při $OD_{600} = 0,5$. Při porovnání SDS elektroforózy před a po indukci byly pro další experimenty použity pouze produkce z kmenu SHuffle a Origami, protože

u kultury Rosetta nebyl vidět rozdíl v přítomnosti proteinů před a po indukci. Z bakteriálních kultur SHuffle a Origami byla provedena purifikace proteinu a při porovnání chromatogramu bylo dále pokračováno pouze s frakcemi z kultury SHuffle. Frakce z produkce SHuffle byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy a ve všech frakcích bylo zjištěno značné množství nečistot, což může souviset s produkcí v bakteriálním systému a nedostatečnou specifickou purifikací.

Na SDS elektroforéze v redukujícím prostředí byl zjištěn proužek velikostí odpovídající konstruktu Epa1. V neredukujícím prostředí však detekované proužky neodpovídaly očekávaným molekulovým hmotnostem. To naznačuje možnost špatného zapojení disulfidů a pospojování proteinových fragmentů. Proto byly vybrané frakce spojeny a bylo k nim přidáno redukční činidlo merkaptoethanol. Poté byla provedena další gelová permeační chromatografie. Cílem této manipulace bylo zredukovat disulfidy a poté je nechat během chromatografie převedením do pufru bez redukčního činidla opět oxidovat a spojit se, což by mohlo pomoci správnému zapojení. Frakce z gelové permeační chromatografie byly opět analyzovány pomocí SDS elektroforézy. Ani po přidání redukčního činidla před gelovou permeační chromatografií nebyly na gelu v neredukujícím prostředí přítomny proužky odpovídající očekávané velikosti proteinu Epa1. Navíc byl proveden imunoblot s detekcí pomocí histidinové kotvy (viz Obr. 21 a Obr. 22, str. 34), aby bylo možné s přesností odlišit různé formy proteinu Epa1 od bakteriálních proteinů.

V redukujícím prostředí jsou vidět proužky o dvou molekulových hmotnostech. Může se jednat o rozdíl způsobený proteolýzou na N-konci o velikosti cca deseti aminokyselin. Proteolýza musela probíhat u N-konce, protože protein je detekován imunodetekcí, která detekuje histidinovou kotvu, která je na C-konci proteinu. V neredukujícím prostředí se vyskytuje více proužků o větších velikostech, tomu by mohly odpovídat oligomery tohoto proteinu. Proužek o velikosti 20 kDa by mohl odpovídat monomeru, který má vyšší pohyblivost díky zapojení disulfidových můstků oproti jeho očekávané pohyblivosti a velikosti 28,2 kDa. Při porovnání výskytu oligomerů v jednotlivých frakcích, můžeme vidět větší zastoupení oligomerů ve frakci E4 oproti frakci E7 (viz Obr. 21 a Obr. 22, str. 34). Jednou z možností optimalizace je použití jiného nosiče pro afinitní chromatografii, například nosiče s imobilizovanou laktosou. Tím by bylo možné také eliminovat nečistoty ve vzorku. Navíc by odpadla nutnost používat pro purifikaci histidinovou kotvu, která sama o sobě může mít negativní vliv na stabilitu proteinu.

Dále je možné optimalizovat výtěžek zvětšením biomasy buněk produkujících protein. Produkce probíhá při 12 °C, aby se protein produkoval pomalu a správně se skládal. To však není optimální teplota pro bakteriální buňky a výsledná biomasa je malá, obsahuje tedy i málo proteinu. Proto by bylo pro další produkci vhodné indukovat expresi proteinu při větší optické hustotě buněčné kultury, aby počáteční množství buněk produkujících protein bylo vyšší.

Tato práce je pouze začátkem dané studie. Struktura komplexu NKp46:Epa1 stále není známá a pro pochopení některých patologických procesů je velmi důležitá. Bude tedy následovat optimalizace produkce obou proteinů. V případě NKp46 bude zkoumána exprese jiného konstruktů obsahující navíc stabilní kotvu v systému HEK293S GnTI. Protein Epa1 bude exprimován v systému *E. coli*, avšak s vyšší počáteční biomasou a použitím specifické afinitní chromatografie. Až bude k dispozici dostatečné množství proteinu s dostatečnou čistotou, bude tato práce pokračovat studiem interakce obou proteinů.

6. Experimentální část

6.1. Materiál

6.1.1. Použité chemikálie

2-merkapt ethanol (Sigma, USA)

Agarosa (Sigma, USA)

Akrylamid (Sigma, USA)

Ampicilin 100 mg/ml (Biotika, SR)

APS (Serva, USA)

Azid sodný (Serva, USA)

Bromfenolová modř (Lachema, ČR)

BSA (Sigma, USA)

Combi PPP Master Mix (Top – Bio, ČR)

Coomassie Brilliant Blue (R-250) (Fluka Chemika, Švýcarsko)

dNTPS 10 mM (Top – Bio, ČR)

EDTA (Jersey Lab Supply, USA)

Goodview II (Ecoli, SR)

IPTG (Sigma, USA)

Isopropanol (Lach – Ner, ČR)

Kozí polyklonální protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatásou (Sigma, USA)

Králičí polyklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidásou (Sigma, USA)

Kvasničný extrakt (Imuna Pharm, SR)

Leupeptin 1 µg/ml (Sigma, USA)

Myší monoklonální protilátka PentaHis (Qiagen, Německo)

Pepstatin 1 µg/ml (Thermo Scientific, USA)

PMSF v ethanolu 100 mM (Thermo Scientific, USA)

SDS (Jersey Lab Supply, USA)

Standard pro agarosovou DNA elektroforézu 1 kb (New England Biolabs, USA)

Standard pro agarosovou DNA elektroforézu 100 bp (New England Biolabs, USA)

Sušené odtučněné mléko (Lactino, ČR)

TEMED (Serva, USA)

Tris (Sigma, USA)

Ostatní běžné chemikálie (Lach-Ner, ČR)

6.1.2. Enzymy

QuickFusion enzym a pufr (Biotool, USA)

Lysozym 100 mg/ml (Sigma, USA)

Polymerasa Q5 a pufr (New England Biolabs, USA)

Restrikční endonukleasa PmeI (New England Biolabs, USA)

Restrikční endonukleasa NcoI (New England Biolabs, USA)

Restrikční endonukleasa NheI (New England Biolabs, USA)

RNAasa A 100 ng/ml (Lach-Ner, ČR)

6.1.3. Pufry a roztoky

AP pufr (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaN₃, pH 9,0)

Barvicí roztok pro SDS-PAGE (45% methanol, 10% kys. octová, 0,25% CBB R 250)

BCIP roztok (50 mg/ml v dimethylformamidu)

ECL1 (2,5 mM luminol, 0,4 mM p-kumarová kys., 100 mM Tris, pH 8,8)

ECL2 (5,4 mM H₂O₂, 100 mM Tris, pH 8,8)

Elektrodový pufr (0,025 M Tris, 0,19 M glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3)

Elektropřenosový pufr (25 mM Tris, 150 mM glycin, 10% methanol, pH 8,3)

ExCell 293 (komerční médium, před použitím doplněno o L-glutamin o výsledné koncentraci 4 mM; Sigma-Aldrich, USA)

LB – médium (1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4)

Mobilní fáze pro gelovou permeační chromatografii (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5)

NBT roztok (50 mg/ml v 70% dimethylformamidu)

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE (35% ethanol, 35% kys. octová)

PBS pufr (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5)

PBS-TK (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,0)

PBS pufrem s 1M NaCl (50 mM Na₂HPO₄, 1 M NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,0)

Roztok IPEI (10 mg/ml IPEI v PBS-TK)

Síran hořečnatý (100 mM, New England Biolabs, USA)

TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA)

TBS pufr (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5)

TBS-Tween/Triton (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100, pH 7,5)

TE pufru (50Mm Tris, pH 8,5)

TES pufr (10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 8,0)

Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu (30% glycerol, bromfenolová modř v TAE)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný neredukující (31,5 mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN₃, pH 6,8)

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný redukující (vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný naředěný desetinným podílem 2-merkптоethanolu)

6.1.4. Použité přístroje

Analytické váhy AND HA – 180M (A&D, Japonsko)
Aparatura pro elektropřenos (Bio Rad, Německo)
Centrifuga EBA 12R (Hettich, Německo)
Centrifuga Allegra X – 22R (Beckman Coulter, USA)
Elektroforetická souprava pro agarosovou elektroforézu (Biokeystone, USA)
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE (Bio – Rad, Německo)
Inkubátor IR 5000 (LABsystem Praha, ČR)
Inkubátor MC0-18 AIC (Sanyo, Japonsko)
Kolona Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA)
Kolona Talon 5 ml (GE Healthcare, USA)
Koncentrátor Amicon Ultra (MWCO 10000) (Millipore, USA)
Laminární box Labox BIO 126 (LABOX, ČR)
Mikrocentrifuga Ministar Silverline (VWR, USA)
Mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 μm (TPP, Švýcarsko)
Mikrozkumavka 200 μl (Eppendorf, USA)
Mikrozkumavka 1,5 ml (Eppendorf, USA)
Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact (Optimo Moulinex, Francie)
Rotační vakuová odparka CentriVap DNA (Labconco, USA)
Spektrofotometr DS-11 (DeNovix, USA)
Termoblok LS1 (VLM, Německo)
Termocykler T100 (Bio – Rad, Německo)
Třepačka Celltron (Infors HT, Švýcarsko)
Třepačka Multitron Pro (Infors HT, Švýcarsko)
Třepačka G24 (New Brunswick Scientific, USA)
Ultrazvuková sonda SONOPLUS (Bandelin, Německo)
Vortexový mixér (Velp Scientifica, Itálie)
Zdroj napětí 251 – 2 (Sigma, USA)

6.1.5. Buněčné kmeny a linie

Escherichia coli DH5 α (Thermo Scientific, USA)

Escherichia coli SHuffle (Thermo Scientific, USA)

Escherichia coli Origami (DE3) (Thermo Scientific, USA)

Escherichia coli Rosetta (DE3) (Thermo Scientific, USA)

HEK293S GnTI⁻

6.1.6. DNA vektory

Plasmid pOPINE

Plasmid pUT7

6.1.7. PCR a sekvenační primery

pCT5K-FW

5'-AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGGAGAACTG-3'

pCT5-REV

5'-CTGATCAGCGGGTTTTACCCGTGGTGGTGATG-3'

pOPINE_seq_FW

5'-GGACCGAAATTAATACGACTC-3'

pTT_REV

5'-TATGTCCTCCGAGTGAGAG-3'

pCT5seq_FW

5'-TCAGATCGCCTGGAGACG-3'

pCT5seq_REV

5'-GTGGGAGTGGCACCTTCC-3'

6.1.8. Soupravy

Nucleospin® gel and PCR clean-up (Macherey – Nagel, Německo)

NucleoSpin® Plasmid (Macherey – Nagel, Německo)

NucleoBond® Xtra Midi / Maxi (Macherey – Nagel, Německo)

Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set (Zymo Research, USA)

6.2. Metody

6.2.1. Štěpení restrikčními enzymy

Do reakční směsi, o celkovém objemu 20 μl , byl pipetován takový objem roztoku nenaštěpeného plasmidu, který obsahoval 3 μg tohoto plasmidu. Dále bylo přidáno 2 μl 10 \times koncentrovaného reakčního pufru NeBuffer 2.1 a 5 U příslušné restrikční endonukleasy na 1 μg plasmidu. Reakční směs byla poté doplněna dH_2O . Samotné štěpení probíhalo 2 h při 37 $^\circ\text{C}$.

6.2.2. Elektroforéza v agarosovém gelu

Agarosový gel byl připraven povařením agarosy v TAE pufru. Pro 1% gel bylo naváženo 0,65 g agarosy a bylo přidáno 65 ml TAE pufru. Roztok byl zahříván v mikrovlnné troubě, dokud se všechna agarosa nerozpustila. Když roztok zchladl, ale ještě neztuhl, bylo do něj přidáno 3 μl barviva GoodView. Po promíchání byl roztok nalit do připravené aparatury a byl do něj umístěn hřeben, tvořící jamky. Po ztuhnutí gelu byl hřeben vyjmut a gel byl zalit 200 ml dH_2O a do prostoru elektrod byl nalit TAE pufr. Ke vzorku DNA byl přidán takový objem vzorkového pufru, aby byl pufr 10 \times zředěný. Do první jamky bylo pipetováno 3 μl standardu molekulové hmotnosti. Do dalších jamek byly pipetovány vzorky DNA. Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 200 V. Výsledek byl ověřen pomocí UV lampy.

6.2.3. Měření koncentrace a čistoty DNA

Měření koncentrace DNA bylo prováděno spektrofotometricky při 260 nm. Slepým vzorkem byl eluční pufr z nízkoobjemové přípravy plasmidové DNA. Pro měření bylo použito 2 μl vzorku. Spektrofotometr pro výpočet koncentrace používá empirický vztah, kdy dvouřetězcová DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ má při 260 nm absorbanci 1,0. Čistota vzorků byla určena z poměru absorbancí při 260 a 280 nm, čisté DNA odpovídá poměr mezi 1,8 – 2,0.

6.2.4. PCR

PCR reakce (z angl. polymerase chain reaction - polymerasová řetězová reakce) byla prováděna v mikrozkušavkách o objemu 200 μl , reakční směs měla objem 20 μl . Do reakční směsi byl pipetován takový objem roztoku templátu DNA, který odpovídal 40 ng DNA. Poté bylo pipetováno po 2 μl přímého a zpětného primeru, odpovídajících danému templátu, resp. požadovanému amplikonu. Výsledná koncentrace primerů byla 500 nM. Dále bylo přidáno 0,25 μl roztoku deoxynukletotid trifostátů, 4 μl reakčního pufru a 0,2 μl polymerasy Q5 a takové množství dH_2O , aby byl celkový objem reakční směsi 20 μl . Po smíchání všech složek byla reakční směs centrifugována (30 s) na stolní centrifuze, z důvodu odstranění bublinek z roztoku. Mikrozkušavka s reakční směsí byla umístěna do termocykleru a byl spuštěn program. Časový a teplotní program je uveden v Tab. 6. Pro amplifikaci genu NKp46 byla zvolena teplota nasedání primerů 67 $^\circ\text{C}$. Velikost PCR produktů byla ověřena na agarosovém gelu.

Tab. 6: Časový a teplotní program PCR reakční směsi

Krok	Teplota	Doba trvání
1.	95 °C	5 min
2. (30 opakování)	95 °C	30 s
	teplota nasedání primerů	30 s
	72 °C	1 min
3.	72 °C	8 min
4.	4 °C	

6.2.5. Izolace z agarosového gelu

Pro izolaci DNA z agarosového gelu byla použita komerčně dostupná souprava Nucleospin® gel and PCR clean-up⁴⁵. Agarosové gely, které byly použity k izolaci DNA byly vystaveny UV záření pouze minimálně, aby bylo zabráněno poškození vzorku. Z agarosového gelu byl vyříznut kousek obsahující požadovaný vzorek. Ke gelu bylo přidáno 200 µl roztoku NTI na 100 mg gelu, směs byla zahřívána 10 min při 50 °C. Roztok byl pipetován do 2ml mikrokumavky s kolonkou zachytávající DNA. Roztok byl centrifugován 30 s při 11000 × g. Filtrát byl odstraněn a na kolonku bylo pipetováno 700 µl NT3 pufru a centrifugováno 30 s při 11000 × g. Filtrát byl odstraněn a kolonka byla vysušena centrifugací 1 min při 11000 × g. Kolonka byla přemístěna do nové 1,5ml mikrokumavky a DNA byla eluována přidáním 30 µl TE pufru. Po přidání přehřátého TE pufru byla inkubována 1 min při 50 °C a následně centrifugována 1 min při 11000 × g.

6.2.6. Vnesení genu do linearizovaného plasmidu

Reakce byla prováděna v 10 µl reakční směsi. Do mikrokumavky bylo pipetováno takové množství roztoku linearizovaného plasmidu, který obsahoval 100 ng DNA. Dále bylo pipetováno takové množství roztoku insertu, který obsahoval 25 ng DNA. Množství linearizovaného plasmidu a insertu bylo vypočítáno, aby byl molární poměr 2:1.

$$[0,01 \times \text{délka linearizovaného plasmidu v bp}] \text{ ng}$$

$$[0,02 \times \text{délka insertu v bp}] \text{ ng}$$

Poté bylo přidáno 0,5 µl enzymu QuickFusion⁴⁶, 2 µl 5× koncentrovaného pufru pro tento enzym a dH₂O do celkového objemu 10 µl. Reakční směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Směs byla použita k transformaci *E. coli* DH5α.

6.2.7. Transformace kompetentních buněk

K 50 μ l suspenze požadovaného kmene kompetentních buněk *E. coli* v 1,5ml mikrozkušavce bylo přidáno 100-1000 ng plasmidu. Směs byla inkubována 10 min na ledu, poté byla umístěna na 45 s do termobloku temperovaného na 42 °C. Mikrozkušavka se suspenzí byla opět umístěna na 5 min na led. Poté bylo ke směsi přidáno 1 ml LB média a směs byla inkubována 1 hod při 37 °C. Po inkubaci byla směs centrifugována 1 min při 4000 \times g při 20 °C. Poté byla většina supernatantu odstraněna a peleta byla resuspendována ve zbylém supernatantu. Suspenze byla pipetována na předehřátou bakteriologickou kultivační misku s 1% agarem v LB mediu s ampicilinem o koncentraci 100 μ g/ml. Suspenze byla rozetřena sterilní bakteriologickou kličkou. Po vsáknutí suspenze do pevného média byla miska inkubována přes noc při 37 °C.

V případě použití Z-kompetentních buněk, připravených pomocí soupravy „Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set“⁴⁷ bylo k 50 μ l suspenze buněk v 1,5ml mikrozkušavce přidáno 100–1000 ng plasmidu a směs byla inkubována 10 min na ledu. Poté byla suspenze pipetována na předehřátou bakteriologickou kultivační misku s 1% agarem v LB mediu s ampicilinem o koncentraci 100 μ g/ml. Suspenze byla rozetřena sterilní bakteriologickou kličkou. Po vsáknutí suspenze do pevného média byla miska inkubována přes noc při 37 °C.

6.2.8. PCR z kolonií

Do 0,2ml PCR mikrozkušavky bylo pipetováno 6 μ l sterilní dH₂O. Z bakteriologické kultivační misky, na které přes noc narostly kolonie, byla špičkou pipety setřena kolonie bakterií. Špička byla nasazena na pipetu a 2-3 \times promyta připravenou sterilní dH₂O, poté byla špička vhozena do 50ml zkumavky s 5 ml LB média a 5 μ l ampicilinu o výsledné koncentraci 100 μ g/ml (pro nízkoobjemovou produkci). Do 0,2ml PCR mikrozkušavky s resuspendovanou kolonií bylo přidáno 10 μ l reakční směsi Combi PPP Master Mix a po 2 μ l přímého a zpětného primeru, odpovídajících danému templátu, resp. požadovanému amplikonu. Výsledná koncentrace primerů byla 500 nM. Mikrozkušavka s reakční směsí byla centrifugována 20 s na stolní centrifuze a poté byla umístěna do termocyklu. Časový a teplotní program je uveden v Tab. 7, str. 45. Teplota nasedání primerů při PCR z kolonií pUT7_NKp46 byla zvolena 67 °C a pro pOPINE_Epa1 byla zvolena 52 °C. Po PCR byla ověřena úspěšnost pomocí agarosové elektroforézy.

Tab. 7: Časový a teplotní program reakční směsi PCR z kolonií

Krok	Teplota	Doba trvání
1.	95 °C	5 min
2. (20 opakování)	95 °C	30 s
	teplota nasedání primerů	30 s
	72 °C	1 min
3.	72 °C	8 min
4.	4 °C	

6.2.9. Nízkoobjemová izolace plasmidové DNA

Zkumavka o objemu 50 ml obsahující médium inokulované bakteriální kolonií byla uzavřena víčkem, které však nebylo úplně dotaženo, aby mohlo docházet k výměně plynů. Zkumavka byla inkubována na třepačce při 37 °C a 200 ot./min přes noc. K izolaci plasmidové DNA byla použita souprava NucleoSpin® Plasmid⁴⁸. Kultura narostlá přes noc byla centrifugována 5 min při 39000 × g při 20 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 250 µl A1 pufru s přídáním RNAasou. Suspenze byla přenesena do 1,5ml mikrozukavky a bylo přidáno 250 µl A2 pufru. Roztok byl promíchán a byl inkubován 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 300 µl A3 pufru. Po promíchání byl roztok centrifugován 5 min při 11000 × g při 20 °C. Supernatant byl pipetován na kolonku, která byla součástí soupravy. Následně byl roztok centrifugován 1 min při 11000 × g při 20 °C. Filtrát byl odstraněn a na kolonku bylo pipetováno 500 µl AW pufru a centrifugováno při stejných podmínkách. Následně bylo na kolonku pipetováno 600 µl A4 pufru a opět centrifugováno. Po odstranění filtrátu byla kolonka centrifugována 2 min při 11000 × g 20 °C. Eluce byla provedena pipetováním 50 µl AE pufru předehřátého na 70 °C a centrifugací za stejných podmínek byl filtrát převeden do 1,5ml mikrozukavky.

6.2.10. Sekvence DNA

Pro každý připravený plasmid byly připraveny dvě 0,2ml PCR mikrozukavky se vzorky na sekvenaci. Do každé mikrozukavky bylo pipetováno 300 ng plasmidové DNA, 1 µl roztok jednoho primeru (do 1. zkumavky primer nasedající na 3'-konec a do 2. zkumavky primer nasedající na 5'-konec templátové DNA). Dále byla pipetována sterilní dH₂O do celkového objemu 8 µl. Sekvence byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA ve výzkumném centru BIOCEV. Výsledky sekvenace byly porovnány s předpokládanou sekvencí.

6.2.11. Velkoobjemová izolace plasmidové DNA

V laminárním boxu bylo do 2l Erlenmayerovy baňky přidáno 500 ml LB média a 500 μ l roztoku ampicilinu, výsledná koncentrace byla 100 μ g/ml. Den předem byla provedena transformace kompetentních buněk (viz 6.2.7). Bakteriální kolonie narostlé na pevném živném agarovém médiu byly resuspendovány v 2 ml LB média pomocí sterilní kličky. Vzniklá suspenze byla pipetována do 2l Erlenmayerovy baňky s LB médiem a ampicilinem. Erlenmayerovy baňky s roztokem byly inkubovány při 37 °C přes noc na třepačce při 200 ot./min. Druhý den byly bakteriální kultury centrifugovány 20 min při 3900 \times g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn a pelety byly resuspendovány v 20 ml TES pufru a centrifugovány 10 min při 3900 \times g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn. Pro izolaci plasmidové DNA byla použita souprava NucleoBond® Xtra Midi / Maxi⁴⁹. Bakteriální peleta byla resuspendována v 18 ml RES pufru a bylo přidáno takové množství RNasy, aby výsledná koncentrace byla 0,1 mg/ml. Dále bylo přidáno 9 ml LYS pufru a opatrně promíchán otáčením dnem vzhůru. Roztok byl inkubován 5 min při 20 °C. Poté bylo přidáno 9 ml NEU pufru a opatrně promíchán otáčením dnem vzhůru, dokud nebyl roztok bezbarvý. Poté byl roztok přefiltrován přes filtr, který byl součástí soupravy nebo přes skládaný filtr. Filtr byl umístěn nad kolonou, která byla součástí soupravy. Před filtrováním byl filtr i kolona promyta EQ1 puftrem, poté byl na kolonu nanesen neutralizovaný buněčný lyzát. Po prokapání roztoku kolonou, byla kolona promyta 25 ml WASH pufru. Eluce byla provedena pomocí 15 ml ELU pufru. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu a důkladně promícháno na vortexové míchačce. Roztok byl centrifugován 30 min při 20000 \times g a 4 °C. Supernatant byl opatrně odstraněn a bylo přidáno 5 ml 70% ethanolu. Roztok byl centrifugován 5 min při 20000 \times g a 4 °C. Supernatant byl opatrně odstraněn a peleta byla vysušena na vakuové odparce. Peleta byla rozpuštěna v 1 ml TE pufru.

6.2.12. Produkce proteinů v bakteriálním expresním systému

Kompetentní buňky *E. coli* požadovaného kmene transformované plasmidem (viz 6.2.7) byly natřeny na pevném živném agarovém médiu s ampicilinem a inkubovány přes noc při 37 °C. V laminárním boxu bylo do 50ml zkumavek přidáno 5 ml LB média a roztoku ampicilinu, výsledná koncentrace byla 100 μ g/ml. Pomocí špičky byla setřena jedna kolonie z živného agarového média a špička byla vhozena do připravené 50ml zkumavky. Zkumavka byla inkubována na třepačce při 37 °C a 200 ot./min přes noc. Následující den bylo do 2l Erlenmayerovy baňky převedeno 500 ml LB média a takové množství ampicilinu, aby výsledná koncentrace byla 100 μ g/ml. Toto médium bylo naočkováno 1 ml narostlé kultury z 50 ml zkumavky. Inkubace probíhala na třepačce při 37 °C a 200 ot./min. Během inkubace byly odebírány vzorky a byla měřena optická hustota buněčné suspenze spektrofotometricky při 600 nm oproti čistému médiu. Inkubace probíhala, dokud suspenze neměla optickou hustotu (OD₆₀₀) 0,5. Následně byl odebrán vzorek suspenze (vzorek A), který byl uchován. Do 2l Erlenmayerovy baňky bylo napipetováno takové množství indukčního činidla IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid), aby výsledná koncentrace byla 300 μ M.

Inkubace probíhala na třepačce 2 dny při 12 °C a 200 ot./min. Po inkubaci byl odebrán vzorek suspenze (vzorek B). Buněčná suspenze byla centrifugována 20 min při 3900 × g. Poté byl supernatant opatrně odstraněn a peleta byla resuspendována v 20 ml TES pufru. Opět byla centrifugována 10 min při 3900 × g. Supernatant byl opatrně odstraněn a peleta byla uchována při -20 °C. Buněčná peleta byla resuspendována v 40 ml PBS s 1M NaCl a bylo přidáno 25 µl roztoku lysozymu (100 mg/ml), 40 µl roztoku PMSF (100mM), 40 µl roztoku leupeptinu (1µg/ml), 40 µl roztoku pepstatinu (1µg/ml), 40 µl roztoku RNAsy (10 µg/ml) a 2 µl roztoku MgSO₄ (100mM). Homogenizace byla prováděna pomocí ultrazvukové sondy 4 × 1 min při výkonu sondy 40 W. Buněčná suspenze byla uchovávána a homogenizována na ledu. Po homogenizaci byl odebrán vzorek suspenze (vzorek C). Buněčná suspenze byla centrifugována 10 min při 28000 × g a 20 °C. Po centrifugaci byl odebrán vzorek pelety (vzorek D). Supernatant byl pomocí injekční stříkačky a filtru o velikosti pórů 0,22 µm zfiltrován. Poté byl odebrán vzorek filtrátu (vzorek E). Filtrát byl naředěn 1:1 PBS puftrem s 1M NaCl. Tento vzorek byl poté nanesen na kolonu Talon.

6.2.13. Produkce proteinů ve stabilně transfekované linii HEK293S GnTI-

Transfekci a subkultivace buněčné linie prováděla Mgr. Barbora Kalousková v místnosti pro tkáňové kultury. Pro transfekci buněčné linie byl použit piggyBac systém⁴⁴. Buňky z buněčné linie HEK293S GnTI byly kotransfekovány 3 plasmidy – pUT7_NKp46, PB-RN a PBase. Výsledkem této kotransfekce jsou stabilně transfekované buňky, které po indukci doxycyklinem produkují požadovaný protein.

Pro transfekci byly použita buněčná suspenze HEK293S GnTI. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při 95 × g a 20 °C. Buněčná peleta byla resuspendována v mediu ExCELL293 ve výsledném objemu 1,2 ml. Hustota buněk byla 23,5·10⁶ b/ml. Buněčná suspenze byla pipetována do 1 jamky 12 jamkové mikrokultivační destičky. Do jamky bylo přidáno 300 µl sterilního DNA transfekčního mixu v PBS-TK. Tento transfekční mix obsahoval 3 plasmidy – pUT7_NKp46 (24 µg), PB-RN (3 µg) a PBase (3 µg). Dále bylo přidáno 96 µg IPEI. Destička byla inkubována na třepačce 4 hodiny při 135 ot./min, 37 °C a 5% CO₂.

Po inkubaci byla buněčná suspenze přenesena do 100ml čtyřhranné láhve s prodyšným víčkem. K buněčné suspenzi bylo přidáno médium ExCELL293 do výsledného objemu 30 ml a poté byla inkubována na třepačce 48 hodin při 135 ot./min, 37 °C a 5% CO₂. Po inkubaci byla k buněčné suspenzi přidána antibiotika - puromycin o výsledné koncentraci 5 µg/ml a G418 o výsledné koncentraci 50 µg/ml. Buněčná suspenze byla inkubována na třepačce za stejných podmínek. Každý třetí den byly buňky spočítány a centrifugovány 5 min při 95 × g a 20 °C. Buněčná peleta byla resuspendována v čerstvém mediu ExCELL293 do celkového objemu 30 ml a opět přidána selekční antibiotika. Když byly buňky opět ve fázi růstu a jejich viabilita dosáhla opět 100 %, byla buněčná suspenze rozdělena na několik alikvotů, které byly zamrazeny na -80 °C. Z těchto alikvotů byly poté buňky po rozmražení subkultivovány.

Když buněčná suspenze dosáhla hustoty $3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^6$ b/ml a potřebného objemu (300 ml v 1l čtverhranné láhvi) bylo přidáno indukční antibiotikum doxycyklin o výsledné koncentraci 1 μ g/ml. Po pěti dnech od indukce byly buňky sklizeny. Buněčná suspenze byla centrifugována 30 min při $10000 \times g$ a 20°C . Protein byl sekretován buňkami do média, proto bylo centrifugované medium přefiltrováno a zmrazeno při -20°C a použito pro izolaci proteinu.

6.2.14. Chelatační afinitní chromatografie proteinů

Proteiny produkované v rámci této práce obsahují histidinovou kotvu, proto bylo možné využít chelatační afinitní chromatografie s kolonou Talon. Kolona Talon byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic. Kolona byla ekvilibrována PBS pufrem (v případě afinitní chromatografie proteinů z bakteriální exprese PBS pufrem s 1M NaCl). Pro nanášení vzorku na kolonu byl nastaven průtok 5 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona promyta PBS pufrem (PBS pufrem s 1M NaCl) při průtoku 5 ml/min. Eluce byla provedena pomocí PBS pufru s 250 mM imidazolem. Pro eluci byl nastaven průtok 2,5 ml/min. Kolona byla následně regenerována. Kolona byla převedena do MES pufru, poté do dH_2O a následně byl nosič regenerován pomocí roztoku CoSO_4 . Po regeneraci byla kolona převedena nejprve do dH_2O a poté do 20% ethanolu, ve kterém byla uchovávána.

6.2.15. Koncentrování proteinů

Proteinové vzorky byly koncentrovány pomocí koncentrátorů Millipore Amicon Ultra MWCO 10000. Vzorek proteinu byl pipetován do koncentrátoru a centrifugován 7 min při $3900 \times g$ a 15°C . Filtrát byl odstraněn, koncentrovaný vzorek byl pomocí pipety promíchán, bylo přidáno další množství vzorku a opět centrifugováno při stejných podmínkách. Postup byl opakován, dokud nebyl vzorek koncentrován na požadovaný objem.

6.2.16. Gelová permeační chromatografie

Chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300, která byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic. Chromatografická kolona byla převedena do HEPES pufru. Nanášený vzorek měl objem maximálně 500 μ l. Před nanesením byl centrifugován 5 min při $20000 \times g$. Před nanesením vzorku byla 1ml nástřiková smyčka promyta HEPES pufrem. Zkoncentrovaný vzorek byl nanesen do nástřikové smyčky. Chromatografie byla prováděna při průtoku 0,5 ml/min. Frakce byly sbírány po 1 ml do 1,5ml mikrozkuvek, detekce byla prováděna spektrofotometricky při 280 nm.

6.2.17. Měření koncentrace proteinů

Měření koncentrace proteinů bylo prováděno spektrofotometricky při 280 nm. Slepým vzorkem byl HEPES pufr. Pro měření bylo použito 2 μ l vzorku. Měření bylo vždy provedeno třikrát, z naměřených hodnot byl pro výslednou koncentraci použit průměr z těchto měření. V případě odlehlého měření bylo toto měření vyřazeno. K vypočtení koncentrace byla zadána molekulová hmotnost proteinu a jeho teoretický extinkční koeficient při 280 nm.

6.2.18. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Pro kontrolu čistoty jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsiranu sodného (SDS, z angl. sodium dodecylsulphate). Elektroforéza probíhala ve dvou gelech – v zaostřovacím a rozdělovacím. Množství chemikálií pro 12,5% a 15% rozdělovací gel je uvedeno v Tab. 8. Připravený roztok byl pipetován mezi dvě skla elektroforetické aparatury a převrstven dH_2O . Po zatuhnutí gelu byla voda odstraněna a byl pipetován zaostřovací gel. Do gelu byl zasunut hřeben. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byl hřeben vyjmut a elektroforetická souprava s gely byla přesunuta do elektroforetické vany a ta byla po rysku naplněna elektrodoým pufrem. Ke 12-20 μ l vzorku bylo přidáno takové množství 5 \times koncentrovaného vzorkového pufru (redukujícího nebo neredukujícího), aby ve výsledné směsi byl 1 \times koncentrovaný. Vzorky byly umístěny do termobloku a 10 min zahřívány při 100 $^{\circ}C$. Následně byly centrifugovány 2 min při 11000 \times g a 20 $^{\circ}C$. Do první jamky gelu bylo pipetováno 3 μ l standardu molekulových hmotností. Do dalších jamek byly pipetovány analyzované vzorky. Elektroforéza probíhala 45-60 min při 200 V. Elektroforéza byla ukončena, když elektroforetické čelo bylo přibližně 0,5 cm před koncem gelu. Po ukončení byly gely opatrně vyjmuty z elektroforetické aparatury a barveny barvicím roztokem minimálně 30 minut. Poté byly odbarveny pomocí odbarvovacího roztoku do úplného odbarvení pozadí gelů. Poté byly gely naskenovány a uchovávány v dH_2O s 20% ethanolem.

Tab. 8: Množství chemikálií pro přípravu rozdělovacího a zaostřovacího gelu

Rozdělovací gel			Zaostřovací gel	
	12,5%	15%		
dH₂O	1,265 ml	0,9 ml	dH₂O	0,7 ml
30% AA	1,675 ml	2 ml	30% AA	0,25 ml
Tris (pH 8,8)	1 ml	1 ml	Tris (pH 6,8)	0,125 ml
10% SDS	40 μ l	40 μ l	10% SDS	10 μ l
10% APS	40 μ l	40 μ l	10% APS	10 μ l
TEMED	2 μ l	2 μ l	TEMED	1,5 μ l

6.2.19. Elektropřenos proteinů na membránu

Pro elektropřenos byla připravena aparatura složená ze dvou elektrod, mezi které bylo umístěno 10 obdélníků filtračního papíru a nitrocelulosoá membrána smočených v přenosovém pufru. Na nitrocelulosoá membránu byl umístěn polyakrylamidový gel ihned po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsiranu sodného (viz 6.2.18). Na gel bylo umístěno dalších 10 obdélníků filtračního papíru smočených v přenosovém pufru. Aparatura byla uzavřena a umístěna do aparatury pro elektropřenos. Elektropřenos probíhal 15 min při 25 V a až 2,5 A.

6.2.20. Imunodetekce proteinů s histidinovou kotvou

Po elektropřenosu byla membrána blokována pomocí 1% BSA v TBS pufru přes noc. Následně byla membrána opláchnuta 2× TBS-Tween/Triton puftrem a 1× TBS puftrem, každý oplach trval 5 minut. Membrána byla umístěna do 50ml zkumavky a do zkumavky bylo přidáno 10 ml 1% BSA v TBS s 2 µl myší monoklonální protilátky proti histidinové kotvě PentaHis. Inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě za stálého otáčení na rotátoru. Po inkubaci byla membrána opláchnuta 2× TBS-Tween/Triton puftrem a 1× TBS puftrem, každý oplach trval 5 minut. Následně byl připraven roztok 10 ml 10% sušeného odtučněného mléka v TBS s 2 µl králičí polyklonální protilátky proti myšimu IgG konjugované s křenovou peroxidasou a 1 µl kozí polyklonální protilátky proti myšimu IgG konjugované alkalickou fosfatasou. Roztok byl nalit na membránu a inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě a za stálého míchání na rotátoru. Po inkubaci byla membrána opláchnuta 3 × TBS puftrem. Následně byla provedena chemiluminiscenční a kolorimetrická detekce.

Chemiluminiscenční detekce byla prováděna pomocí 4 ml vyvolávacího roztoku, který obsahoval 2 ml roztoku ECL1 a 2 ml ECL2. Membrána byla umístěna na plastovou podložku a rovnoměrně zalita vyvolávacím roztokem. Membrána byla inkubována 1 min. Poté byl přebytečný roztok odstraněn a podložka zabalena do potravinářské folie. Podložka byla umístěna fotografické kazety. Na podložku byly postupně umísťovány fotografické papíry, které byly exponovány 1, 3 a 5 minut. Následně byly filmy umístěny do lázně s fotografickou vývojkou a poté do lázně s ustalovačem. Poté byly filmy opláchnuty dH₂O a ponechány oschnout. Takto byly připraveny tři fotografie lišící se délkou expozice.

Kolorimetrická detekce probíhala po chemiluminiscenční detekci. Membrána byla opláchnuta TBS puftrem. Do 10 ml AP pufru bylo přidáno 66 µl roztoku NTB a 33 µl roztoku BCIP. Tento roztok byl nalit na membránu. Po proběhnutí reakce byla membrána opláchnuta dH₂O a ponechána oschnout. Membrána byla po oschnutí naskenována.

7. Závěr

Byly připraveny vektory umožňující expresi extracelulární domény proteinu NKp46 a proteinu Epa1. Protein NKp46 byl produkován v eukaryotickém expresním systému lidské buněčné linie HEK293S GnTI⁻ a jeho přítomnost byla potvrzena imunodetekcí histidinové kotvy. Protein Epa1 byl produkován v bakteriálním expresním systému *E. coli* kmenu SHuffle.

8. Literatura

- (1) Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špišek, R. *Základy Imunologie*, 5th ed.; TRITON: Praha, 2013.
- (2) Delves, P. J.; Martin, S. J.; Burton, D. R.; Roitt, I. M. *Roitt's Essential Immunology*, 12th ed.; Wiley-Blackwell, 2012.
- (3) Bellora, F.; Castriconi, R.; Dondero, A.; Carrega, P.; Mantovani, A.; Ferlazzo, G.; Moretta, A.; Bottino, C. Human NK Cells and NK Receptors. *Immunol. Lett.* **2014**, *161* (2), 168–173.
- (4) Cooper, M. A.; Fehniger, T. A.; Caligiuri, M. A. The Biology of Human Natural Killer-Cell Subsets. *Trends Immunol.* **2001**, *22* (11), 633–640.
- (5) Vivier, E. Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science* **2004**, *306* (5701), 1517–1519.
- (6) Charles A Janeway, J.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J. The Generation of T-Cell Receptor Ligands. **2001**.
- (7) Koziejowska, K.: NK Cells applications in immuno-oncology [online]. [cit. 2018-3-22]. Dostupné z: <http://www.stream.wum.edu.pl/en/knowledge-base/96-nk-cells-applications-in-immuno-oncology>.
- (8) Van Kaer, L.; Shi, F.-D.; Ljunggren, H.-G.; La Cava, A.; Van Kaer, L. Organ-Specific Features of Natural Killer Cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11* (10), 658–671.
- (9) Cook, K. D.; Waggoner, S. N.; Whitmire, J. K. NK Cells and Their Ability to Modulate T Cells during Virus Infections. *Crit. Rev. Immunol.* **2014**, *34* (5), 359–388.
- (10) Paul, S.; Lal, G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2017**, *8*.
- (11) Perricone, R.; Perricone, C.; De Carolis, C.; Shoenfeld, Y. NK Cells in Autoimmunity: A Two-Edg'd Weapon of the Immune System. *Autoimmun. Rev.* **2008**, *7* (5), 384–390.
- (12) Vacca, P.; Moretta, L.; Moretta, A.; Mingari, M. C. Origin, Phenotype and Function of Human Natural Killer Cells in Pregnancy. *Trends Immunol.* **2011**, *32* (11), 517–523.
- (13) Kruse, P. H.; Matta, J.; Ugolini, S.; Vivier, E. Natural Cytotoxicity Receptors and Their Ligands. *Immunol. Cell Biol.* **2014**, *92* (3), 221–229.
- (14) Vitale, M.; Bottino, C.; Sivori, S.; Sanseverino, L.; Castriconi, R.; Marcenaro, E.; Augugliaro, R.; Moretta, L.; Moretta, A. NKp44, a Novel Triggering Surface Molecule Specifically Expressed by Activated Natural Killer Cells, Is Involved in Non-Major Histocompatibility Complex-restricted Tumor Cell Lysis. *J. Exp. Med.* **1998**, *187* (12), 2065–2072.
- (15) Babon, J. A. B.; Cruz, J.; Orphin, L.; Pazoles, P.; Co, M. D. T.; Ennis, F. A.; Terajima, M. Genome-Wide Screening of Human T-Cell Epitopes in Influenza A Virus Reveals a Broad-Spectrum of CD4+ T Cell Responses to Internal Proteins, Hemagglutinins and Neuraminidases. *Hum. Immunol.* **2009**, *70* (9), 711–721.

- (16) Gazit, R.; Gruda, R.; Elboim, M.; Arnon, T. I.; Katz, G.; Achdout, H.; Hanna, J.; Qimron, U.; Landau, G.; Greenbaum, E.; et al. Lethal Influenza Infection in the Absence of the Natural Killer Cell Receptor Gene *Ncr1*. *Nat. Immunol.* **2006**, *7* (5), 517–523.
- (17) Garg, A.; Barnes, P. F.; Porgador, A.; Roy, S.; Wu, S.; Nanda, J. S.; Griffith, D. E.; Girard, W. M.; Rawal, N.; Shetty, S.; et al. Vimentin Expressed on Mycobacterium Tuberculosis-Infected Human Monocytes Is Involved in Binding to the Nkp46 Receptor. *J. Immunol.* **2006**, *177* (9), 6192–6198.
- (18) Diab, M.; Glasner, A.; Isaacson, B.; Bar-On, Y.; Drori, Y.; Yamin, R.; Duev-Cohen, A.; Danziger, O.; Zamostiano, R.; Mandelboim, M.; et al. NK-Cell Receptors Nkp46 and NCR1 Control Human Metapneumovirus Infection. *Eur. J. Immunol.* **2017**, *47* (4), 692–703.
- (19) Glasner, A.; Levi, A.; Enk, J.; Isaacson, B.; Viukov, S.; Orlanski, S.; Scope, A.; Neuman, T.; Enk, C. D.; Hanna, J. H.; et al. Nkp46 Receptor-Mediated Interferon- γ Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. *Immunity* **2018**, *48* (1), 107-119.e4.
- (20) Ponassi, M.; Cantoni, C.; Biassoni, R.; Conte, R.; Spallarossa, A.; Pesce, A.; Moretta, A.; Moretta, L.; Bolognesi, M.; Bordo, D. Structure of the Human NK Cell Triggering Receptor Nkp46 Ectodomain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309* (2), 317–323.
- (21) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.
- (22) Zupancic, M. L.; Frieman, M.; Smith, D.; Alvarez, R. A.; Cummings, R. D.; Cormack, B. P. Glycan Microarray Analysis of *Candida Glabrata* Adhesin Ligand Specificity. *Mol. Microbiol.* **2008**, *68* (3), 547–559.
- (23) Cormack, B. P.; Ghori, N.; Falkow, S. An Adhesin of the Yeast Pathogen *Candida Glabrata* Mediating Adherence to Human Epithelial Cells. *Science* **1999**, *285* (5427), 578–582.
- (24) Alexander, B. D.; Johnson, M. D.; Pfeiffer, C. D.; Jiménez-Ortigosa, C.; Catania, J.; Booker, R.; Castanheira, M.; Messer, S. A.; Perlin, D. S.; Pfaller, M. A. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida Glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2013**, *56* (12), 1724–1732.
- (25) de Groot, P. W. J.; Kraneveld, E. A.; Yin, Q. Y.; Dekker, H. L.; Gross, U.; Crielgaard, W.; de Koster, C. G.; Bader, O.; Klis, F. M.; Weig, M. The Cell Wall of the Human Pathogen *Candida Glabrata*: Differential Incorporation of Novel Adhesin-like Wall Proteins. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7* (11), 1951–1964.
- (26) Ielasi, F. S.; Decanniere, K.; Willaert, R. G. The Epithelial Adhesin 1 (Epa1p) from the Human-Pathogenic Yeast *Candida Glabrata*: Structural and Functional Study of the Carbohydrate-Binding Domain. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68* (3), 210–217.
- (27) Diderrich, R.; Kock, M.; Maestre-Reyna, M.; Keller, P.; Steuber, H.; Rupp, S.; Essen, L.-O.; Mösch, H.-U. Structural Hot Spots Determine Functional Diversity of the *Candida Glabrata* Epithelial Adhesin Family. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (32), 19597–19613.

- (28) Dippold, W.; Steinborn, A.; Meyer zum Büschenfelde, K. H. The Role of the Thomsen-Friedenreich Antigen as a Tumor-Associated Molecule. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *88*, 255–257.
- (29) Vitenshtein, A.; Charpak-Amikam, Y.; Yamin, R.; Bauman, Y.; Isaacson, B.; Stein, N.; Berhani, O.; Dassa, L.; Gamliel, M.; Gur, C.; et al. NK Cell Recognition of *Candida Glabrata* through Binding of NKp46 and NCR1 to Fungal Ligands Epa1, Epa6, and Epa7. *Cell Host Microbe* **2016**, *20* (4), 527–534.
- (30) Žaloudík, J: Imunoterapie – léčba nástroji imunity [online]. [cit. 2018-3-25] Dostupné z: <http://www.onko.cz/lekar-imunoterapie-lecba-nastroji-imunity/>.
- (31) Farkona, S.; Diamandis, E. P.; Blasutig, I. M. Cancer Immunotherapy: The Beginning of the End of Cancer? *BMC Med.* **2016**, *14*, 73–73.
- (32) Waldmann, T. A. Immunotherapy: Past, Present and Future. *Nat. Med.* **2003**, *9* (3), 269–277.
- (33) Kaufman, H. L.; Kohlhapp, F. J.; Zloza, A. Oncolytic Viruses: A New Class of Immunotherapy Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (9), 642–662.
- (34) Freud, A. G.; Yu, J.; Caligiuri, M. A. Human Natural Killer Cell Development in Secondary Lymphoid Tissues. *Semin. Immunol.* **2014**, *26* (2), 132–137.
- (35) Fang, F.; Xiao, W.; Tian, Z. NK Cell-Based Immunotherapy for Cancer. *Semin. Immunol.* **2017**, *31*, 37–54.
- (36) Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S. Functions of Natural Killer Cells. *Nat. Immunol.* **2008**, *9* (5), 503–510.
- (37) Carotta, S. Targeting NK Cells for Anticancer Immunotherapy: Clinical and Preclinical Approaches. *Front. Immunol.* **2016**, *7*.
- (38) Iyengar, R.; Handgretinger, R.; Babarin-Dorner, A.; Leimig, T.; Otto, M.; Geiger, T. L.; Holladay, M. S.; Houston, J.; Leung, W. Purification of Human Natural Killer Cells Using a Clinical-Scale Immunomagnetic Method. *Cytotherapy* **2003**, *5* (6), 479–484.
- (39) Alici, E.; Sutlu, T.; Björkstrand, B.; Gilljam, M.; Stellan, B.; Nahi, H.; Quezada, H. C.; Gahrton, G.; Ljunggren, H.-G.; Dilber, M. S. Autologous Antitumor Activity by NK Cells Expanded from Myeloma Patients Using GMP-Compliant Components. *Blood* **2008**, *111* (6), 3155–3162.
- (40) Berg, M.; Lundqvist, A.; McCoy, P.; Samsel, L.; Fan, Y.; Tawab, A.; Childs, R. Clinical-Grade Ex Vivo-Expanded Human Natural Killer Cells up-Regulate Activating Receptors and Death Receptor Ligands and Have Enhanced Cytolytic Activity against Tumor Cells. *Cytotherapy* **2009**, *11* (3), 341–355.
- (41) Romagné, F.; André, P.; Spee, P.; Zahn, S.; Anfossi, N.; Gauthier, L.; Capanni, M.; Ruggeri, L.; Benson, D. M.; Blaser, B. W.; et al. Preclinical Characterization of 1-7F9, a Novel Human Anti-KIR Receptor Therapeutic Antibody That Augments Natural Killer-mediated Killing of Tumor Cells. *Blood* **2009**, *114* (13), 2667–2677.
- (42) Kalkulátor ProtParam [online]. Dostupné z: <https://web.expasy.org/protparam/>.
- (43) Herynek, Š.; Vaněk, O.; Hloučová, K.; Univerzita, K. Rekombinantní Příprava Jaderného Antigenu Proliferujících Buněk (PCNA), 2017.

- (44) Li, Z.; Michael, I. P.; Zhou, D.; Nagy, A.; Rini, J. M. Simple PiggyBac Transposon-Based Mammalian Cell Expression System for Inducible Protein Production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (13), 5004–5009.
- (45) Oficiální návod výrobce k produktu NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up. Macherey-Nagel [online]. [cit. 2017-11-03]. Dostupné z: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSgelPCR.pdf.
- (46) Oficiální návod výrobce k produktu Quick-Fusion Cloning. Biotool [online]. [cit. 2018-3-11]. Dostupné z: <http://file.biotool.com/downloads/Biotool-Quick-Fusion-Cloning-Kit-B2261x.pdf>.
- (47) Oficiální návod výrobce k produktu Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set. Zymo Research [online]. cit [2018-3-11]. Dostupné z: <https://www.zymoresearch.com/mix-go-e-coli-transformation>.
- (48) Oficiální návod výrobce k produktu NucleoSpin Plasmid. Macherey-Nagel [online]. [cit 2018-3-11]. Dostupné z: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf.
- (49) Oficiální návod výrobce k produktu NucleoBond Xtra - plasmid Midiprep, Maxiprep kits. Macherey-Nagel [online]. [cit 2018-3-11]. Dostupné z: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/SP_NBXtra_LargeConstructs.pdf.

