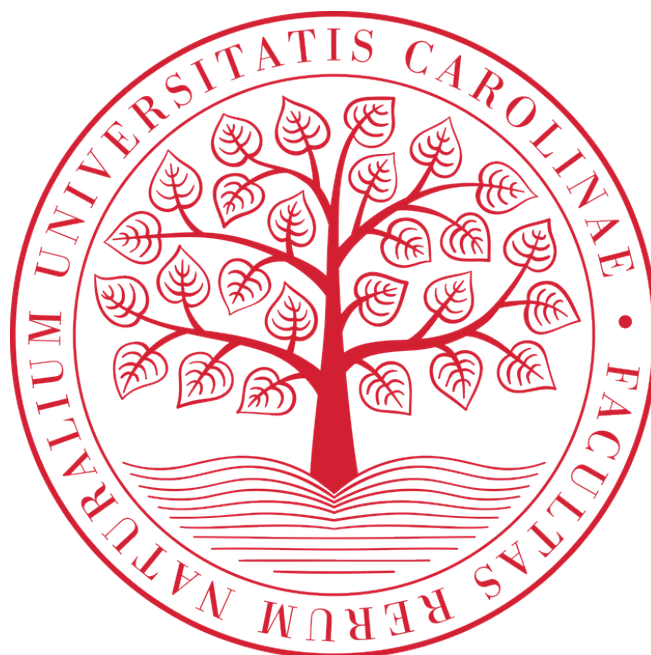


UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Alžbeta Runová

Příprava receptoru AICL ve fúzi s Fc fragmentem lidského IgG

**Preparation of receptor AICL in fusion with Fc fragment
of human IgG**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha 2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Praze dne 21. 5. 2018

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za cenné rady a odborné konzultace. Také děkuji Mgr. Janu Bláhovi, PhD. za poskytnutí vstupního materiálu a pomoc při experimentální práci. Velké díky patří Mgr. Barboře Kalouskové za trpělivost a doprovázení celou prací a ochotu kdykoliv poradit. V neposlední řadě děkuji Vojtěchovi Haničincovi za jazykovou korekturu, celému kolektivu laboratoře 204 a své rodině a přátelům za neustálou podporu během studia.

ABSTRAKT

NK buňky (z angl. „natural killer cells“, přirozeně zabíječské buňky) jsou jedním ze základních prvků vrozené imunity. Hrají klíčovou roli v obraně proti virem infikovaným, nádorovým nebo jinak stresovaným buňkám. NK buňky mají na svém povrchu aktivační receptory spouštějící cytotoxické mechanismy vedoucí k apoptóze cílové buňky a inhibiční receptory zajišťující buněčnou toleranci. Rovnováha signálů NK buněčných receptorů určuje výslednou reakci NK buňky s cílovou buňkou.

Mezi receptory podobné lektinům typu C patří aktivační receptor NKp80 a jeho ligand AICL. AICL je myeloidně specifický aktivační receptor exprimovaný na nádorových buňkách. Komplex NKp80:AICL podporující cytolýzu maligních myeloidních buněk je studován v souvislosti s imunoterapií nádorových onemocnění.

Tato bakalářská práce popisuje přípravu vektorů obsahujících geny kódující expresní konstrukty AICL a následnou produkci proteinů v linii lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK293S GnTI). Expresní konstrukty obsahují část extracelulární domény AICL, zásahové místo pro TEV proteasu a Fc fragment. Byly připraveny dva různé konstrukty – jeden obsahující nativní sekvenci AICL a druhý mutaci C87S.

(Práce je psaná v českém jazyce)

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňka, AICL, NKp80, rekombinantní exprese, HEK293S

ABSTRACT

Natural killer cells (NK cells) are one of the basic elements of innate immunity. They play a key role in immune response against virus-infected, cancerous or otherwise stressed cells. NK cells express surface activating and inhibitory receptors. Activating receptors trigger cytotoxic mechanisms that lead to the target cell's apoptosis. Inhibitory receptors provide cellular tolerance. The balance between these receptor signals determines the resultant NK cell response to the target cell.

C-type lectin-like receptors include the activating receptor NKp80 and its ligand AICL. AICL is a myeloid-specific activating receptor expressed on tumor cells. The NKp80:AICL complex that assists in the cytolysis of malignant myeloid cells is being studied in the context of cancer immunotherapy.

This bachelor thesis describes the preparation of vectors containing genes encoding AICL expression constructs, and the subsequent production of proteins in the human embryonic renal cell line (HEK293S GnTI). The expression constructs contain the extracellular domain of AICL, TEV protease site and Fc fragment. Two different constructs were prepared – one containing the native AICL sequence and the other carrying C87S mutation.

(The thesis is written in Czech)

KEY WORDS

NK cell, AICL, NKp80, recombinant expression, HEK293S

SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
ACT	adoptivní buněčná terapie, z angl. adoptive cell therapy
AICL	receptor z rodiny CLEC2, z angl. activation-induced C-type lectin
APS	peroxodisíran amonný, z angl. ammonium persulfate
CD	označení povrchových molekul, z angl. cluster of differentiation
CLEC2	rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu, z angl. C-type lectin domain family 2
CTLA-4	protein asociovaný s cytotoxickými T-lymfocyty, z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein
CTLD	doména podobná lektinům C-typu, z angl. C-type lectin-like domain
CTLR	receptor obsahující CTLD, z angl. C-type lectin-like receptor
DC	dendritické buňky, z angl. dendritic cells
DTT	dithiothreitol
dH ₂ O	deionizovaná voda
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Fas	receptor indukující apoptózu, člen rodiny receptoru TNF
FasL	ligand receptoru Fas
Fc	část molekuly protilátky, z angl. fragment crystallizable
GnTI	buňky deficientní na N-acetylglukosaminyltransferasu I
GSH	glutathion
HEK293	označení linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293, z angl. human embryonic kidney cell line 293
Hemi-ITAM	poloviční imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv ITAM
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z. angl. high-performance liquid chromatography
INF- γ	interferon γ , jeden z cytokinů
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv, z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
KACL	receptor z rodiny CLEC2, z angl. keratinocyte-associated C-type lectin
KLRF	rodina receptorů NK buněk podobný lektinům C-typu, z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily F
LB	kultivační médium, z angl. lysogeny broth
LLT1	receptor z rodiny CLEC2, z angl. lectin-like transcript 1
IgG	imunoglobulin G
IPEI	lineární polyethylenimin
MHC gp I	glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy, z angl. major histocompatibility complex glycoprotein class I
MWCO	propustnost membrány proteinových koncentrátorů, z angl. molecular weight cut off
NK	přirozený zabíječ, z angl. natural killer
NKC	NK genový komplex, z angl. NK gene complex
NKp30	receptor NK buněk o velikosti 30 kDa, z angl. NK cell protein 30 kDa
NKp65	receptor NK buněk o velikosti 65 kDa, z angl. NK cell protein 65 kDa
NKp80	receptor NK buněk o velikosti 80 kDa, z angl. NK cell protein 80 kDa
NKRP1	rodina receptorů NK buněk podobný lektinům C-typu, z angl. NK cell receptor protein 1
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok, z angl. phosphate buffered saline
PCR	polymerasová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
PDB	databáze proteinových struktur, z angl. protein data bank
SDS	dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
SDS PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsíranu sodného
TEMED	tetramethylethylendiamin
TNF	faktor nádorové nektrózy, z angl. tumor necrosis factor
TRAIL	ligand související s TNF vyvolávající apoptózu, z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD.....	10
1.1	IMUNITNÍ SYSTÉM.....	10
1.1.1	DRUHY IMUNITNÍCH MECHANISMŮ.....	10
1.2	PŘIROZENÉ ZABÍJEČSKÉ BUŇKY.....	10
1.2.1	CYTOTOXICKÉ MECHANISMY PŘIROZENÝCH ZABÍJEČSKÝCH BUNĚK.....	11
1.3	RECEPTORY PŘIROZENÝCH ZABÍJEČSKÝCH BUNĚK.....	11
1.4	RODINA RECEPTORŮ NKRP1.....	13
1.4.1	RECEPTOR-LIGANDOVÝ KOMPLEX NKp80:AICL.....	15
1.5	PROTINÁDOROVÁ IMUNITA.....	17
1.5.1	MOŽNOSTI PROTINÁDOROVÉ IMUNOTERAPIE.....	17
1.5.2	ADOPTIVNÍ BUNĚČNÁ TERAPIE.....	17
1.5.3	NÁDOROVÁ VAKCINACE.....	18
1.5.4	INHIBICE KONTROLNÍHO BODU.....	18
1.5.5	IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA NK RECEPTORECH.....	19
2	CÍLE PRÁCE.....	21
3	MATERIÁL.....	22
3.1	PŘÍSTOJE A POMŮCKY.....	22
3.2	CHEMIKÁLIE.....	23
3.3	ENZYMY.....	24
3.4	PUFRY A ROZTOKY.....	24
3.5	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	25
3.6	VEKTORY.....	25
3.7	BUNĚČNÉ LINIE A BAKTERIÁLNÍ KMENY.....	25
3.8	PCR A SEKVENČNÍ PRIMERY.....	25
4	METODY.....	26
4.1	PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU.....	26
4.1.1	LINEARIZACE VEKTORU.....	26
4.1.2	AMPLIFIKACE TEMPLÁTU POMOCÍ PCR REAKCE.....	26
4.1.3	ELEKTROFORÉZA V AGAROSOVÉM GELU.....	27
4.1.4	EXTRAKCE DNA Z AGAROSOVÉHO GELU.....	27
4.1.5	STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA.....	27
4.1.6	SPOJENÍ AMPLIFIKOVANÉHO GENU A LINEARIZOVANÉHO PLASMIDU.....	28

4.1.7	TRANSFORMACE BUNĚK PLASMIDOVOU DNA.....	28
4.1.8	PCR Z KOLONÍ.....	28
4.1.9	NÍZKOOBJEMOVÁ PRODUKCE A IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA.....	29
4.1.10	SEKVENOVÁNÍ DNA	29
4.1.11	VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE A IZOLACE ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLASMIDOVÉ DNA	30
4.2	KULTIVACE A TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293S GnTI	30
4.3	PURIFIKACE PROTEINŮ	32
4.3.1	AFINITNÍ CHROMATOGRFIE	32
4.3.2	ZKONCENTROVÁNÍ PROTEINŮ	32
4.3.3	GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE	32
4.3.4	STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ	33
4.3.5	SDS-PAGE.....	33
4.3.6	ŠTĚPENÍ TEV PROTEASOU.....	34
5	VÝSLEDKY	35
5.1	SEKVENCE EXPRESNÍCH KONSTRUKTŮ	35
5.2	PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ	36
5.3	PRODUKCE A PURIFIKACE KONSTRUKTŮ AICL	39
6	DISKUZE.....	44
7	ZÁVĚR	46
8	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	47

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém patří k základním mechanismům udržení homeostázy a integrity organismu tím, že ho chrání proti škodlivinám zevního i vnitřního původu¹. Tato funkce se projevuje jako obranyschopnost proti patogenním mikroorganismům a jejich produktům, autotolerance vůči vlastní tkáni a imunitní dohled (průběžně odstraňuje poškozené nebo některé jinak pozměněné buňky).

1.1.1 DRUHY IMUNITNÍCH MECHANISMŮ

Imunitní mechanismy je možné rozdělit do dvou základních kategorií, a to vrozené (neadaptivní) a získané (adaptivní)². Obě jsou reprezentovány jak buněčnými, tak humorálními složkami.

Vrozené mechanismy jsou založené na molekulách a buňkách, které jsou účinné proti různým patogenům tím, že reagují na strukturní nebo funkční rysy, které jsou patogenům společné¹.

Buněčné neadaptivní mechanismy jsou tvořeny především fagocytujícími buňkami (neutrofilny, makrofágy) a cytotoxickými přirozenými zabíječskými (NK, z angl. „natural killer“) buňkami². Mezi humorální složky vrozené imunity patří komplementový systém, který je tvořen přibližně 20 bílkovinami, které jsou aktivovány různými cestami a mohou přímo ničit patogeny nebo je prezentovat jiným částem imunitního systému³.

Adaptivní mechanismy jsou antigenně specifické, reagují na každou cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátky, antigenně specifické receptory T a B lymfocytů)¹. Buněčné mechanismy jsou založené na T a B lymfocytech, humorální na protilátkách.

1.2 PŘIROZENÉ ZABÍJEČSKÉ BUŇKY

NK buňky jsou jedním ze základních prvků vrozené imunity, hrají klíčovou roli v obraně proti virem infikovaným nebo nádorovým buňkám¹. NK buňky jsou morfologicky velké granulární lymfocyty vyvíjející se v kostní dřeni ze společného lymfoidního progenitoru, které na rozdíl od T a B lymfocytů nemají antigenně specifické receptory.

1.2.1 CYTOTOXICKÉ MECHANISMY PŘIROZENÝCH ZABÍJEČSKÝCH BUNĚK

Hlavními cytotoxickými nástroji NK buněk jsou povrchové receptory FasL (z angl. „first apoptosis signal receptor ligand“, ligand receptoru prvního apoptického signálu) a TRAIL (z angl. „TNF-related apoptosis-inducing ligand“, ligand související s TNF vyvolávající apoptózu), cytotoxické granule obsahující perforin a granzymy a vylučování prozánětlivých cytokinů, jako je např. interferon gama (IFN- γ), podporující další obranné mechanismy organismu⁴.

FasL a TRAIL zprostředkovávají zabíjení maligních buněk NK buňkami⁵. Zatímco dráha zprostředkovaná perforinem může potenciálně zabít jakoukoliv cílovou buňku, dráhy zprostředkované FasL a TRAIL jsou závislé na expresi jejich příslušných receptorů na povrchu cílových buněk².

Perforin má schopnost zanořit se do membrány cílové buňky a tam spontánně polymerovat, čímž vytváří v membráně pór, který naruší její semipermeabilitu, což vede k buněčné smrti. Granzymy jsou proteolytické enzymy, které napomáhají působení perforinů a poškozují děje uvnitř cílové buňky¹.

IFN- γ je pleiotropní cytokin důležitý pro imunitní dohled nad nádory, zlepšuje imunogenicitu nádorových buněk, snižuje jejich proliferaci, přímo indukuje jejich apoptózu a inhibuje angiogenezi⁶. IFN- γ také aktivuje makrofágy, čímž zvyšuje jejich mikrobicidní aktivitu a pomocné T lymfocyty regulující další imunitní odpovědi organismu⁷.

1.3 RECEPTORY PŘIROZENÝCH ZABÍJEČSKÝCH BUNĚK

Receptory NK buněk se dělí na 2 základní typy, aktivační a inhibiční⁸. Oba typy jsou tvořeny receptory, které se na základě struktury dělí na receptory imunoglobulinové a receptory podobné lektinům typu C.

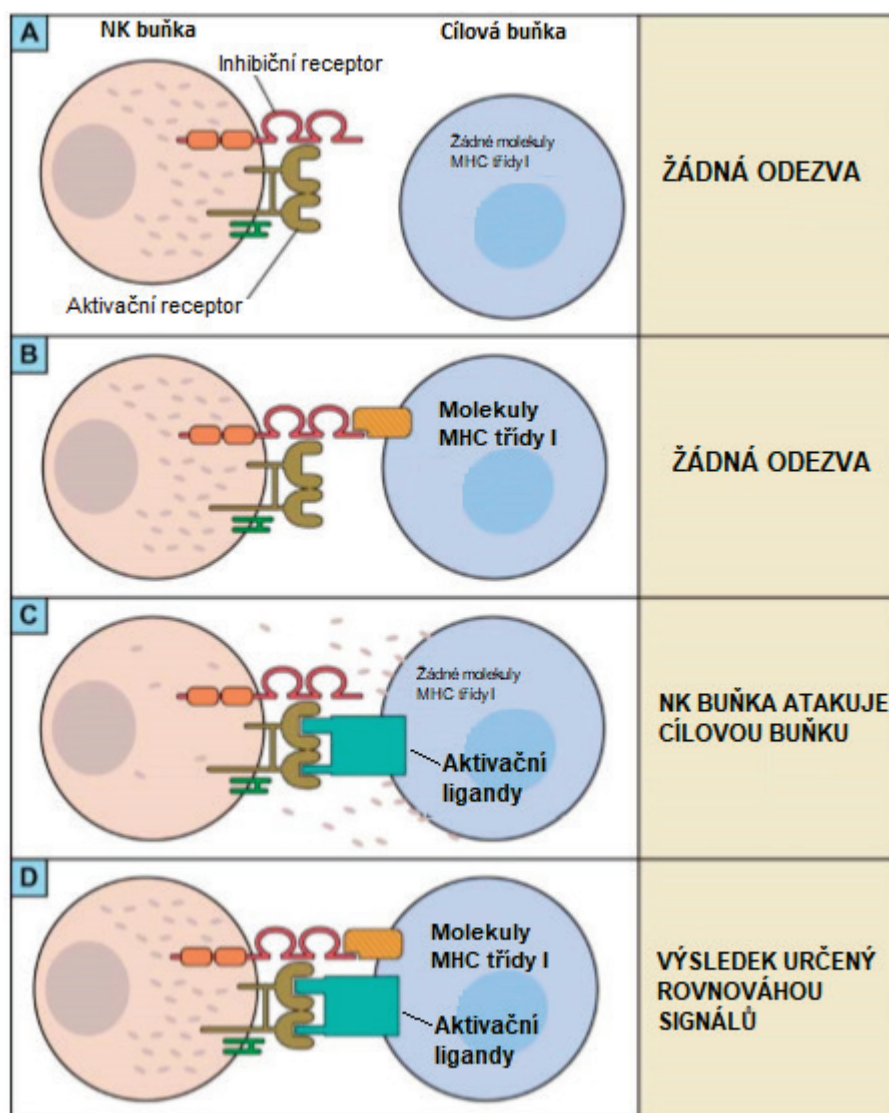
Aktivační receptory rozeznávají buněčné povrchové molekuly typicky exprimované na buňkách infikovaných virem a intracelulárními bakteriemi, stejně jako buňky stresované poškozením DNA a maligní transformací⁹. Aktivační receptory na NK buňkách mají signalizační podjednotky, které obsahují v cytoplasmatických řetězcích imunoreceptorové tyrosinové aktivační motivy (ITAM, z angl. „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“)⁸. ITAM se fosforylují na tyrosinových zbytcích, když receptory rozpoznávají

jejich aktivační ligandy. Fosforylované ITAM vážou cytoplasmatické proteinkinasy a podporují jejich aktivaci. Tyto enzymy fosforylují a tím aktivují jiné substráty v několika dalších signalizačních dráhách, případně vedou k exocytóze cytotoxických granulí a produkci IFN- γ^3 .

Mezi stimulační receptory patří i Fc receptor CD16 (z angl. „cluster of differentiation 16“, klastr diferenciacie 16)¹⁰. Setká-li se NK buňka s buňkou, která je opsonizována protilátkami třídy IgG, naváže se prostřednictvím receptoru CD16 na jejich Fc části. To pak způsobí agregaci receptorů a přenesení signálů, které aktivují cytotoxické mechanismy, což je fenomén zvaný buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách.

Inhibiční receptory NK buněk, které blokují signalizaci aktivačních receptorů, jsou specifické pro MHC molekuly I. třídy, které jsou exprimovány na zdravých buňkách¹¹. Proto exprese MHC I. třídy s normálním fenotypem chrání zdravé a tělu vlastní buňky před ničením NK buňkami. Inhibiční receptory obsahují ve svých cytoplasmatických doménách imunoreceptorové tyrosinové inhibiční motivy (ITIM, z angl. „immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif“). Když inhibiční receptory vážou molekuly MHC I. třídy, dochází k fosforylaci ITIM na jejich tyrosinových zbytcích. Fosforylované ITIM vážou cytoplasmatické proteinové tyrosin fosfatasy a podporují jejich aktivaci. Tyto fosfatasy odstraňují fosfátové skupiny z tyrosinových zbytků různých signalizačních molekul, čímž působí proti působení ITAM a blokují aktivaci NK buněk prostřednictvím aktivačních receptorů.

Při interakci s cílovými buňkami exprimujícími ligandy pro inhibiční i aktivační receptory je výsledná reakce NK buňky s cílovou buňkou závislá na tom, jestli převáží aktivační nebo inhibiční signály⁹. Také množství aktivačních a inhibičních receptorů na NK buňkách a množství ligandů na cílové buňce, stejně jako kvalitativní rozdíly v signálech, určují rozsah odezvy NK buněk. Selhání NK buněk reagovat na potenciální cíl, které také umožňuje tolerovat zdravé buňky neexprimující molekuly MHC I. třídy (jako například erytrocyty), může být způsobeno buď aktivní inhibicí zprostředkovanou inhibičními receptory, nebo alternativně nepřítomností aktivačních signálů dostatečných k iniciování odpovědi (viz. Obr. 1, str. 13)⁸.



Obr. 1: Grafické znázornění setkání NK buňky s potenciální cílovou buňkou a možné výsledky této interakce. V případě A cílová buňka neexprimuje molekuly MHC I. třídy a ani žádné aktivační ligandy, proto uniká pozornosti NK buněk a nedochází k nimi zprostředkované imunitní odpovědi. V případě B cílová buňka exprimuje molekuly MHC I. třídy, což poskytuje inhibiční signály a k odezvě nedochází. NK buňka atakuje cílovou buňku v případě C, kdy aktivační ligandy způsobí odpověď NK buňky. V posledním případě D je výsledek interakce NK buňky s cílovou buňkou daný rovnováhou inhibičních signálů způsobených přítomností molekul MHC I. třídy a aktivačních signálů daných aktivačními ligandy přítomnými na cílové buňce⁸.

1.4 RODINA RECEPTORŮ NKRP1

Mezi receptory podobné lektinům typu C (CTLR, z angl. „C-type lectin-like receptor“) patří rodina NK buněčných receptorových proteinů 1 (NKRP1, z angl. „NK cell receptor protein 1“), která reguluje NK-buněčnou funkci a je schopná rozpoznat ligandy na nádorových buňkách¹². Ze strukturního hlediska jsou lidské NKRP1 receptory transmembránové proteiny II. typu obsahující N-terminální cytoplasmatickou doménu,

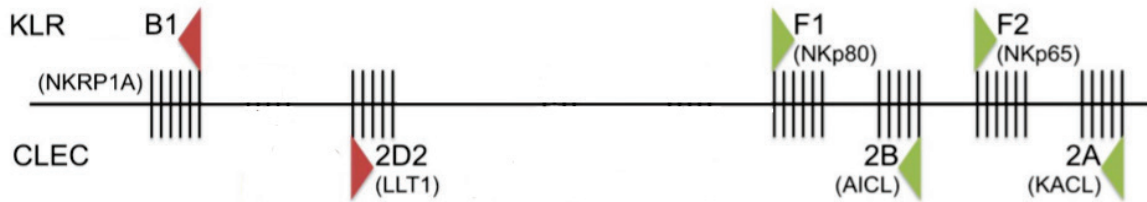
transmembránovou oblast a doménu podobnou lektinům typu C (CTLD, z angl. „C-type lectin-like domain“), která je spojena stonkem s transmembránovým segmentem¹³. Několik členů rodiny NKRP1 se na buněčném povrchu vyskytuje ve formě homodimerů vázaných disulfidickým můstkem, ve kterých cysteiny v oblasti stonků zprostředkovávají intermolekulární disulfidické vazby¹⁴.

Do rodiny NKRP1 patří například lidské receptory NKp80 (z angl. „NK cell protein 80 kDa“, NK buněčný protein 80 kDa), NKp65 (z angl. „NK cell protein 65 kDa“, NK buněčný protein 65 kDa) a NKRP1A (z angl. „NK cell receptor protein 1 A“, NK buněčný receptorový protein 1 A). Jejich ligandy AICL (z angl. „activation-induced C-type lectin“, aktivací indukovaný lektin typu C), KACL (z angl. „keratinocyte-associated C-type lectin“, lektin typu C asociovaný s keratinocytem) a LLT1 (z angl. „lectin-like transcript 1“, lektinu podobný transkript 1) jsou součástí CLEC2 proteinové rodiny (z angl. „C-type lectin receptor 2“, C-lektinový receptor 2). Receptory NKRP1 rodiny, jejich ligandy a vliv jejich vzájemné interakce na NK buňky jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1: Členové rodiny receptorů NKRP1, jejich ligandy a vliv na NK buňky.

Receptor	NKp80	NKp65	NKRP1A
Gen	<i>KLRF1</i> (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1)	<i>KLRF2</i> (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 2)	<i>KLRB1</i> (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1)
Ligand	AICL	KACL	LLT1
Gen	<i>CLEC2B</i> (z angl. C-type lectin domain family 2, member B)	<i>CLEC2A</i> (z angl. C-type lectin domain family 2, member A)	<i>CLEC2D</i> (z angl. C-type lectin domain family 2, member D)
Vliv na NK buňky	AKTIVACE	AKTIVACE	INHIBICE

Receptory z NKRP1 rodiny a jejich ligandy jsou navzájem propojeny v geneticky konzervované oblasti NK genového komplexu (NKC, z angl. „NK gene complex“) na lidském chromozomu 12 (viz. Obr. 2)¹⁵.



Obr. 2: Znárodnění lokalizace genů pro receptory z rodiny NKRP1 a jejich ligandy na lidském chromozomu 12¹².

1.4.1 RECEPTOR-LIGANDOVÝ KOMPLEX NKp80:AICL

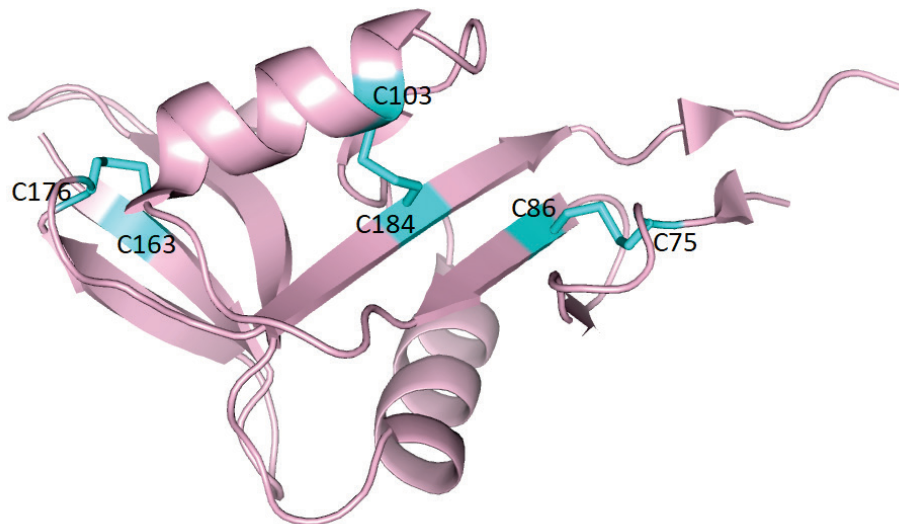
Jak NKp80, tak AICL jsou transmembránové homodimerní proteiny II. typu. Jejich příslušné geny, *KLRF1* (z angl. „killer cell lectin-like receptor F1“, lektinu podobný receptor F1 zabíječských buněk) a *CLEC2B* (z angl. „C-type lectin domain family 2, member B“, člen B 2. rodiny domén lektinů C typu), jsou od sebe vzdáleny pouze 7 kb v telomerickém regionu NKC na lidském chromozomu 12¹⁶.

NKp80 je exprimován prakticky na všech lidských NK buňkách, ale také na podskupinách lidských CD8 (z angl. „cluster of differentiation 8“, klastr diference 8) T buněk efektorové paměti, které se vyznačují vysokou expresí cytotoxických efektorových molekul, jako jsou perforin a granzymy a zvýšenou sekrecí IFN- γ ¹⁷. Narozdíl od běžné signální dráhy aktivačních receptorů NKp80 signalizuje prostřednictvím tzv. hemi-ITAM alternativní sekvence na N-konci své cytoplasmatické domény¹⁸.

AICL je myeloidně specifický aktivační receptor, ligand NKp80, exprimovaný na nádorových buněčných liniích hematopoetického a nehematopoetického původu a primárních lidských jaterních karcinomech¹⁹. AICL se také vyskytuje u NK buněk. Většina NK-buněčného AICL je intracelulárně kolokalizována s giantinem, což je protein tvořící součást Golgiho komplexu. Po expozici zánětlivým cytokinům NK buňky exprimují AICL na svém povrchu, což je činí citlivějšími vůči NKp80-zprostředkované cytolyze²⁰.

Většina CTLR a jejich ligandy obsahuje šest cysteinů v oblasti CTLD. Výjimku tvoří AICL, LLT1 a KACL. Během předchozí práce v naší laboratoři bylo pozorováno, že sudý počet cysteinů zvyšuje stabilitu proteinů v důsledku správné tvorby intracelulárních disulfidických vazeb a usnadňuje sbalení proteinů, což dokázali ve své

práci Mgr. Jiří Nový při práci s receptorem AICL²¹ a Mgr. Jan Bláha, Ph.D. při práci s receptorem LLT1 se zavedenou mutací H176C²² (viz. Obr. 3). U receptoru KACL párování cysteinů není narušováno, ale obsahuje pouze 2 disulfidické vazby. AICL disponuje sedmi cysteiny v aminokyselinové sekvenci CTLD, a proto byla náplní této práce také manipulace s AICL se zavedenou mutací C87S (viz. Obr. 4).



Obr. 3: Struktura receptoru LLT1. Receptor LLT1 (PDB kód struktury 4QKG) s vyznačenými disulfidy C75-C86, C103-C184 a C163-C176, C176 byl vytvořen cílenou mutací H176²³.

LLT1	49	VCGMVAALSIRA-----NCHQEPSVCLQAACPESW	79
KACL	37	IITTVCIIMIATW-----SKHAKP-----VACSGDW	62
AICL	17	TTNIITLIVKLTR-----DSQS-----LCPYDW	39
NKRP1A	51	LVLVVTGLSVSVTSLIQ-----KSSIEKCSVDIQQSRNKTTTERPGLLNCPIYW	98
NKp65	44	LIFIMTGIDLKFWH-----KKMDFSQNVNVSSLSGHNYLCPNDW	82
NKp80	59	ILLVSQGVLLKCKQKGCSCSNATQYEDTGDLKVNNGTRRNISNKDLCASRSADQTVLCQSEW	118
LLT1	80	IGFQRKCFYFSDDTKNWTSSQRFCDSDQADLAQVESFQELNLLR-YKG-PSDHWIGLSR	137
KACL	63	LGVRDKCFYFSDDTRNWTASKIFCSLQKAELAQIDTQEDMEFLKR-YAG-TDMHWIGLSR	120
AICL	40	IGFQNKCYYSKEEGDWNSSKYNCSLQHADLTIIDNIEEMNFLRR-YKC-SSDHWIGLKM	97
NKRP1A	99	QQLREKCLLFSHTVNPWNNSLADCSKESLLLIIRDKDELIHTQNLIRDKAILFWIGLNF	158
NKp65	83	LLNEGKCYWFSTSFKTWKESQRDCTQLQAHLLVIQNLDELEFIQNSLKP-GHFGWIGLYV	141
NKp80	119	LKYQKCYWFSNEMKSWSDSYVYCLERKSHLLIIHQLEMAFIQKNLRQ-LNYVWIGLNF	178
LLT1	138	-EQGQPWKWING-TEWTRQFPILG---AGECAYLNKDGASSARFYTERKWI ¹³⁸ CSKSDIHV-	191
KACL	121	-KQGD ¹²¹ SWKWTNG-TTFNGWFEIIG---NGSFAFLSADGVHSSRGFIDIKWICS ¹²¹ KPKYFL-	174
AICL	98	-AKNRTGQWVDG-ATFTKSF ⁹⁸ GMRG---SEGCAYLSDDGAATARC ⁹⁸ YTERKWI ⁹⁸ CRKRIH---	149
NKRP1A	159	SLSEKNWKWINGSFLNSNDLEIRGDAKENS ¹⁵⁹ CISISQTSVYSEYCS ¹⁵⁹ TEIRWIC ¹⁵⁹ QKELTPVR	118
NKp65	142	TFQGNLMMWIDEHFLVPELFSVIGPTDDRS ¹⁴² CAVITGNWVYSEDCS ¹⁴² SSTFKGIC ¹⁴² QRDAILTH	201
NKp80	179	TSLKMTWTWVDGSPIDSKIFFIKGPAKENS ¹⁷⁹ CAAIKESKIFSET ¹⁷⁹ CSSVFKWIC ¹⁷⁹ QY-----	232

Obr. 4: Srovnání částí aminokyselinových sekvencí několika CTLR. Zvýrazněny jsou konzervované cysteiny, C87 proteinu AICL a H176 proteinu LLT1. Ke srovnání byl použit program ClustalW²⁴, sekvence proteinů byly získány z databáze UniProt²⁵ pod kódy Q9UHP7 (LLT1), 6UVW9 (KACL), Q92478 (AICL), Q12918 (NKRP1A), D3W0D1 (NKp65) A Q9NZS2 (NKp80).

Interakce komplexu NKp80:AICL podporuje cytolýzu maligních myeloidních buněk zprostředkovanou NK buňkami. Navíc je zapojena do vzájemné aktivace NK buněk a monocytů v přítomnosti proinflamačních cytokinů v místech zánětu, což naznačuje možnou roli komplexu NKp80:AICL při imunitním dohledu nehematopoetických nádorů²⁶.

1.5 PROTINÁDOROVÁ IMUNITA

K maligní transformaci buněk může dojít v důsledku selhání různých mechanismů regulace buněčného dělení a chování buněk. Imunitní editace nádoru je proces, kdy imunitní systém a nádor vzájemně interagují a ovlivňují se⁴. Zahrnuje tři fáze: eliminaci, rovnováhu a únik. Během fáze eliminace efektory z imunitního systému neustále odstraňují nové vyvíjející se nádorové buňky. Někdy se však imunitnímu systému nepodaří zcela zbavit všech vzniklých transformovaných buněk a nastává dynamická rovnováha, kde nové klony nádorů přenášejí mutace, které je činí odolnějšími vůči imunitnímu útoku. Proto během rovnovážné fáze imunitní systém sice dokáže kontrolovat celkový růst nádoru, ale nedokáže jej zcela eliminovat. Výsledkem této fáze může být dlouhodobá dynamická rovnováha mezi aktivní imunitní odpovědí a nádorovou populací. Úniková fáze je stav, kdy je již imunitní systém zahlcen velmi agresivními nádory, které rostou nekontrolovaně a dochází k rozvoji onemocnění²⁷.

1.5.1 MOŽNOSTI PROTINÁDOROVÉ IMUNOTERAPIE

Cílem protinádorové terapie je využít imunitní mechanismy ke spuštění, znovunastolení nebo posílení protinádorové imunitní reakce¹. Cílí také na inhibiční mechanismy nádorových buněk.

1.5.2 ADOPTIVNÍ BUNĚČNÁ TERAPIE

Adoptivní buněčná terapie (ACT, z angl. „adoptive cell therapy“) je léčba, která využívá T lymfocyty pacienta s nádorovým onemocněním. Tyto T lymfocyty vykazující protinádorovou aktivitu jsou expandované *in vitro* a zpátky podané pacientovi často spolu s vhodnými růstovými faktory, které stimulují přežití a expanzi T lymfocytů²⁸. ACT využívající lymfocyty infiltrující nádor je v současné době neúčinnější léčbou

pacientů s metastatickým melanomem a může zprostředkovat regrese nádorů u 50% pacientů²⁹.

1.5.3 NÁDOROVÁ VAKCINACE

Jeden z prvních přístupů aktivace T buněk proti tumorovým antigenům je nádorová vakcinace³⁰. T buňky mají schopnost rozpoznat cílové antigeny ve formě peptidů v komplexu s povrchovými MHC molekulami. Protože imunogenetické peptidy mohou být odvozeny z proteinů v každém buněčném kompartmentu, v podstatě jakýkoliv protein má potenciál být rozpoznán T buňkami jako tumorspecifický antigen.

Mezi úspěšné imunitní efekторы patří $CD4^+$ (z angl. „cluster of differentiation 4“, klastr diference 4) a $CD8^+$ T lymfocyty vyvolávající silnou protinádorovou odezvu³¹. Dále se využívají dendritické buňky (DC, z angl. „dendritic cells“), které prostřednictvím prezentace antigenů interagují s T lymfocyty³². DC buňky iniciují a regulují T buněčnou imunitu a jsou tak klíčem k optimalizaci mnohých typů vakcín. Cílem DC vakcinace je indukovat nádorově specifické efektorové T buňky, které mohou snížit velikost nádoru a indukovat imunologickou paměť pro zabránění návratu tumorů. Nejprve dochází k dodání nádorově specifických antigenů na DC buňky, a to kultivací pacientových DC *ex vivo* s nádorově specifickým antigenem, a poté podání těchto buněk zpátky pacientovi.

1.5.4 INHIBICE KONTROLNÍHO BODU

Další způsob vyvolání protinádorové imunitní odpovědi je inhibice kontrolního bodu (z angl. „checkpoint inhibition“), který spočívá v namíření monoklonálních protilátek proti inhibičním receptorům, pomocí kterých nádorové buňky negativně regulují T lymfocyty a unikají jejich pozornosti³³.

Jednou z nejznámějších molekul využívaných v této terapii je inhibiční receptor CTLA-4 (z angl. „cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4“, antigen 4 asociovaný s cytotoxickým T lymfocytem), který negativně reguluje počáteční fázi aktivace T buněk. Podávání protilátek proti CTLA-4 vede ke zrušení inhibiční signalizace a k potlačení nádorů, které má za následek vytvoření imunity vůči sekundární expozici nádorovým buňkám³⁴.

1.5.5 IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA NK RECEPTORECH

Imunoterapie založená na manipulaci s NK buněčnou cytotoxicitou představuje slibný přístup k léčbě rakoviny. Indukce cytotoxicity NK buněk často vyžaduje zapojení aktivačních receptorů³⁵. V souladu s tím byly navrženy potenciální terapeutické možnosti pro zvýšení cytotoxicity NK buněk buď snížením inhibičních, nebo zvýšením aktivačních signálů.

Jednou z cest je zvýšení NK buněčné protinádorové cytotoxicity protilátkově zprostředkovaným maskováním inhibičních receptorů³⁶, ale také použitím interferujících sekvencí RNA cílených na transkripty inhibičních receptorů, které negativně regulují jejich expresi³⁷.

Indukovaná exprese ligandu receptoru NKp30 (z angl. „NK cell protein 30 kDa“, NK buněčný protein 30 kDa), B7-H6 (z angl. „B7 homolog 6“), usnadňuje eliminaci stresovaných buněk NK buňkami. Fúzní protein vytvořený z ektodomény B7-H6 a fragmentu protilátky 7D8 rozpoznávající antigen CD20 (z angl. „cluster of differentiation 20“, klastr diference 20) exprimovaný na povrchu CD20⁺ B-buněčných lymfomů a leukemických buňkách, se současně váže na antigen CD20 a NKp30, čímž aktivuje lidské NK buňky a způsobuje degranulaci. Fúzní protein B7-H6_7D8 indukuje zabíjení buněčných linií odvozených z lymfomů, stejně jako čerstvých nádorových buněk od pacientů s chronickou lymfocytární leukemií³⁷.

Obdobně pro cílení efektorových T buňek byl vytvořený chimérický protein na bázi NKp30 obsahující CD28 (z angl. „cluster of differentiation 28“, klastr diference 28) signalizační domény s transmembránovými doménami z CD28. CD28 je exprimovaný na T buňkách a poskytuje kostimulační signály pro jejich aktivaci. Chimérický NKp30 exprimující T buňky reagují na B7-H6⁺ nádorové buňky produkcí IFN- γ (viz. 1.2.1, str. 11), který aktivuje další imunitní mechanismy organismu, což způsobuje zabíjení B7-H6⁺ nádorových buněk. ACT (viz. 1.5.2, str. 17) s využitím chimérických T buněk exprimujících NKp30 také inhibuje růst myšího B7-H6⁺ lymfomu *in vivo*³⁸.

Pro zvýšení rozpoznání nádorových buněk byly extracelulární domény ligandů aktivačních NK receptorů NKp30 a NKp80 (tj. B7-H6, AICL) fúzovány k rekombinantní protilátce tvořené lehkým a těžkým řetězcem variabilní oblasti imunoglobulinu, namířenému proti HER2 (z angl. „human epidermal growth factor receptor 2“, receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor), který je exprimován různými nádory,

například rakoviny prsu. Vzniklé komplexy spouští NK-buněčné zabíjení těchto nádorových buněk³⁹.

Fúzní protein vytvořený z receptoru NKp80 a Fc fragmentu protilátky, NKp80-Fc, účinně zesiluje antileukemické účinky NK buněk prostřednictvím indukce buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách a podporuje apoptózu leukemických buněk v počátečním stadiu, ale také degranulaci a cytotoxicitu NK buněk v pozdním stadiu⁴⁰.

2 CÍLE PRÁCE

- Příprava expresních vektorů pro produkci proteinu AICL ve fúzi s Fc fragmentem lidského IgG
- Produkce fúzních konstruktů AICL ve stabilně transfekovaných liniích HEK293S GnTI
- Štěpení fúzních konstruktů pro získání proteinu AICL

3 MATERIÁL

3.1 PŘÍSTOJE A POMŮCKY

Automatické pipety Discovery	HTL, PL
Automatické pipety Pipetman	Gilson, US
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, US
Centrifuga EBA 12R	Hettich, DE
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	Sigma, US
Elektroforetická souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone, US
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, DE
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, CH
Filtry centrifugační 0,1 µm Ultrafree-MC	Millipore, US
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, US
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, US
Inkubátor, CO ₂ MC0-18 AIC	Sanyo, JP
Inkubátor IR 1500	LABsystem Praha, CZ
Kahan Fuego SCS	VERKON, CZ
Kolona HiTrap MabSelect SuRe (5 ml)	GE Healthcare, US
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, US
Koncentrátory Amicon Ultra (MWCO 10000)	Millipore, US
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-Lab, CZ
Laminární box BIO 126	LABOX, CZ
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, US
Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact	Optimo Moulinex, FR
Mikrozkumavka 200 µl	Eppendorf, US
Mikrozkumavka 1,5 ml	Eppendorf, US
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, JP
Nucleobond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, DE
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, DE
NucleoSpin Plasmid (NoLid)	Macherey-Nagel, DE
Plastik pro tkáňové kultury	Sigma, US
Předvážky KB1200-2	Kern, DE

Quick-Fusion Cloning Kit	Bioutil, US
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, US
Termoblok LS1	VLM, DE
Termocykler T100	Bio-Rad, DE
Třepačka Celltron	Infors HT, CH
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, CH
Vortexový mixér	VELP Scientifica, IT
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	UVItec, UK
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, US
Zdroj napětí EC 250-90	Apparatus Corporation, UK

3.2 CHEMIKÁLIE

2-merkptoethanol	Sigma, US
Agarosa	Sigma, US
Akrylamid	Sigma, US
Ampicilin (100 mg/ml)	Biotika, SK
APS	Serva, US
Azid sodný	Serva, US
Bromfenolová modř	Lachema, CZ
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, CZ
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, CH
Cysteamine	Fluka Chemika, CH
Dithiothreitol	Serva, US
Doxycyklin	Serva, US
dNTPS (10 mM)	Top-Bio, CZ
EDTA	Jersey Lab Supply, US
Geneticin G416	Thermo Scientific, US
Goodview II	Ecoli, SK
IPEI (25 kDa)	Polysciences, US
Isopropanol	Lach-Ner, CZ
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, SK
L-Glutathion redukovaný	Fluka Chemika, CH

PCR H ₂ O	Top-Bio, CZ
Puromycin	Serva, US
SDS	Jersey Lab Supply, US
Standard pro agarosovou DNA elektroforézu 1 kb	New England Biolabs, US
Standard pro agarosovou DNA elektroforézu 100 bp	New England Biolabs, US
Standard pro SDS-PAGE	Thermo Fisher, US
TEMED	Serva, US
Tris	Sigma, US
Ostatní běžné chemikálie (nejméně čistoty p.a.)	Lach-Ner, CZ

3.3 ENZYMY

Infusion enzym a pufr	Biotool, US
Polymerasa Q5 a pufr	New England Biolabs, US
Restrikční endonukleasa NheI a PmeI	New England Biolabs, US
RNAsa A	Sigma, US

3.4 PUFRY A ROZTOKY

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

Cutsmart pufr pro štěpení plasmidů (50 mM octan draselný, 20 mM Tris acetát, 10 mM octan hořečnatý, 100 µg/ml BSA, pH 7,9), New England Biolabs, US

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

Eluční citrátový pufr (0,1 M citrát sodný, 0,15 M NaCl, 10 mM NaN₃, pH 3,0)

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

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)

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)

Roztok AA pro SDS-PAGE (29% akrylamid, 1% N,N' methylenbisakrylamid)

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

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

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× konc. 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× konc. redukující (vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný naředěný desetinným podílem 2-merkaptoethanolu)

3.5 KULTIVAČNÍ MÉDIA

ExCell 293 – komerční médium (Sigma, US), před použitím doplněno o L-glutamin (výsledná koncentrace 4 mM)

Freestyle F17 – hotové komerční médium (Gibco Invitrogen, US), před použitím doplněno o L-glutamin (do koncentrace 4 mM) a Pluronic F-68 (do koncentrace 0,1%)

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

3.6 VEKTORY

pUT7

Mgr. Jan Bláha, Ph.D. Katedra biochemie PřF UK

pYD5_N1

Mgr. Jan Bláha, Ph.D. Katedra biochemie PřF UK

Plasmid PBase a PB-RN

Mgr. Barbora Kalousková Katedra biochemie PřF UK

3.7 BUNĚČNÉ LINIE A BAKTERIÁLNÍ KMENY

E. coli DH5α

Thermo Scientific, US

HEK293S GnTI

ATCC, US

3.8 PCR A SEKVENČNÍ PRIMERY

pYC5K_FW 5' AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGAGACAGAC 3'

pYC5_REV 5' CTGATCAGCGGGTTTTTCGGGGGATCAGGTACC 3'

pCT5seq_FW 5' TCAGATCGCCTGGAGACG 3'

pCT5seq_REV 5' GTGGGAGTGGCACCTTCC 3'

4 METODY

4.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU

4.1.1 LINEARIZACE VEKTORU

Linearizace vektoru (plasmidu) byla provedena pomocí restrikčních endonukleas *NheI* a *PmeI*. Reakční směs o celkovém objemu 50 μ l byla připravena tak, že bylo přidáno 10 \times koncentrované BSA, 10 \times koncentrovaný reakční pufr *Cutsmart*, 20 U *PmeI*, 20 U *NheI* a 5 μ g plasmidu pUT7. Reakční směs byla doplněna dH₂O do výsledného objemu 50 μ l a následně inkubována 60 minut při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo naštěpení plasmidu zkontrolováno agarosovou elektroforézou (viz. 4.1.3, str. 27).

4.1.2 AMPLIFIKACE TEMPLÁTU POMOCÍ PCR REAKCE

Templát byl amplifikován metodou PCR (z angl. „polymerase chain reaction“, polymerasová řetězová reakce). Do 200 μ l mikrozkušavky bylo přidáno 40 ng templátu, 5 \times koncentrovaný Q5 reakční pufr, 5 \times koncentrovaný GC enhancer, 0,25 μ l 10 mM směsi deoxynukleotidtrifosfátů, přímý a reverzní primer o výsledné koncentraci 0,5 μ M, 7 μ l dH₂O a nakonec 0,5 U Q5 DNA polymerasy. Následně byla mikrozkušavka umístěna do termocykleru, kde byly nastaveny teploty jednotlivých kroků reakce a počet cyklů (viz. Tab. 2). Teplota nasedání primerů byla určena pomocí online kalkulátoru New England Biolabs⁴¹. Po ukončení reakce byla velikost produktu ověřena agarosovou elektroforézou.

Tab. 2: Teplotní profil PCR reakce.

Program	Teplota/ °C	Čas/ s	Počet cyklů
1	95	180	1
2	95	30	30
	63	30	
	72	60	
3	72	300	1

4.1.3 ELEKTROFORÉZA V AGAROSOVÉM GELU

Do Erlenmayerovy baňky bylo připraveno 65 ml agarosového gelu. Pro přípravu 1% gelu bylo naváženo 0,65 g agarosy, která byla rozpuštěna v 65 ml TAE pufru. Směs byla minutu vařena v mikrovlnné troubě, dokud se agarosa zcela nerozpustila. Po mírném vychladnutí roztoku byly přidány 3 μ l barviva Good View II a směs byla vylita do elektroforetické aparatury s hřebenem. Po ztuhnutí byl gel převrstven 200 ml dH₂O, hřeben vyjmut a do prostoru jednotlivých elektrod bylo přidáno 65 ml a 180 ml TAE pufru. K PCR produktu byl přidán 6 \times koncentrovaný vzorkový pufr a tato směs byla pipetována do jamky v gelu. Do další jamky bylo pipetováno 5 μ l standardu molekulových hmotností. Elektrody byly připojeny ke zdroji a elektroforéza probíhala 20 minut při napětí 200 V. Poté byl gel prosvícen UV lampou a vyfotografován.

4.1.4 EXTRAKCE DNA Z AGAROSOVÉHO GELU

K extrakci DNA z agarosového gelu byla použita komerční sada PCR clean-up Gel extraction⁴². Proužek v gelu byl vyříznut a umístěn do 1,5 ml mikrozkušavky. Gel byl převrstven roztokem NT1 a inkubován při 50 °C přibližně 15 minut, dokud se zcela nerozpustil. Směs byla následně pipetou přenesena na kolonku a centrifugována 1 minutu při 11000 \times g a pokojové teplotě. K promytí kolony bylo přidáno 600 μ l roztoku NT3 a směs byla centrifugována při stejných podmínkách. Tento krok byl opakován ještě jednou. Poté byla směs centrifugována za stejných podmínek pro vysušení kolonky. 20 μ l elučního roztoku Tris pH 8,5 předehřátého na 50 °C bylo pipetováno na kolonku a inkubováno 1 minutu. Poté byl roztok centrifugován při 11000 \times g a pokojové teplotě 1 minutu, a nakonec byla spektrofotometricky změřena koncentrace DNA (viz. 4.1.5).

4.1.5 STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA

Koncentrace byla stanovována spektrofotometricky při 260 nm. Jako referenční vzorek byl použit roztok Tris pH 8,5. Spektrofotometr stanovil koncentraci na základě empirického vztahu, podle kterého má dvouvláknová DNA o koncentraci 50 μ g/ml při 260 nm absorbanci 1. Čistota DNA byla stanovena jako poměr absorbancí při 260 a 280 nm, který má za předpokladu, že je DNA čistá, hodnotu přibližně 1,8-2,0.

4.1.6 SPOJENÍ AMPLIFIKOVANÉHO GENU A LINEARIZOVANÉHO PLASMIDU

Spojení genu a plasmidu bylo prováděno pomocí tzv. Infusion reakce⁴³. Do 500 μl mikrozkušavky bylo přidáno 100 ng plasmidu a takové množství insertu, aby byl molární poměr vektor:insert 1:2. Množství insertu bylo vypočteno podle vztahu:

$$2(\text{délka } I / \text{délka } V) m(V) = m(I) \quad (1)$$

kde *délka I* je délka insertu [kb], *délka V* délka vektoru [kb], *m(V)* hmotnost vektoru [ng] a *m(I)* hmotnost insertu [ng]. Poté byl přidán 5 \times koncentrovaný Infusion pufir, 0,5 μl Infusion enzymu a roztok byl doplněn dH_2O do celkového objemu 10 μl . Následně byla směs inkubována 30 minut při teplotě 50 $^\circ\text{C}$.

4.1.7 TRANSFORMACE BUNĚK PLASMIDOVOU DNA

Na transformaci byly využity kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5- α , které byly uchovávány při -80 $^\circ\text{C}$. Před transformací byly inkubovány 10 minut na ledu. K 20-100 ng plasmidové DNA bylo přidáno 30-100 μl alikvotu kompetentních buněk a směs byla inkubována na ledu po dobu 15 minut. Následně byla směs natřena na předem připravené agarosové misky, obsahující ampicilin o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Misky byly inkubovány přes noc při 37 $^\circ\text{C}$.

4.1.8 PCR Z KOLONIÍ

Pro přípravu vzorků na PCR z kolonií bylo do 200 μl mikrozkušavek pipetováno 6 μl dH_2O . Z agarosové misky byla odebrána špičkou kolonie, která byla resuspendována v dH_2O a špička byla odhozena do 50 ml zkumavky obsahující 5 ml LB média s ampicilinem o výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Zaočkované médium bylo použito pro nízkoobjemovou produkci plasmidové DNA. Do mikrozkušavky byl následně přidán 2 \times koncentrovaný Combi PPP Master Mix a přímý a reverzní primer o výsledné koncentraci 0,5 μM . Mikrozkušavka byla umístěna do termocykleru, kde byly nastaveny jednotlivé teplotní cykly (viz. Tab. 3, str. 29). Produkt PCR z kolonií byl analyzován agarosovou elektroforézou (viz. 4.1.3, str. 27).

Tab. 3: Teplotní profil PCR z kolonií.

Program	Teplota/ °C	Čas/ s	Počet cyklů
1	95	180	1
2	95	30	20
	54	30	
	72	60	
3	72	300	1

4.1.9 NÍZKOOBJEMOVÁ PRODUKCE A IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA

Z agarosového gelu byla setřena špičkou kolonie, která byla resuspendována v destilované vodě a špička byla odhozena do 50 ml zkumavky obsahující 5 ml LB média s ampicilinem o výsledné koncentraci 100 µg/ml, která byla inkubována přes noc na třepačce při 37 °C. Pro izolaci plasmidové DNA byla použita komerční souprava Plasmid DNA purification⁴⁴. Buněčná suspenze byla centrifugována při 3900× g a pokojové teplotě po dobu 5 minut, vzniklá peleta byla resuspendována v 250 µl roztoku A1 a přenesena do 1,5 ml zkumavky. Následně bylo přidáno 250 µl roztoku A2, který umožnil lyzaci buněk. Směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 300 µl roztoku A3 neutralizujícího lyzát. Vzniklá směs byla centrifugována 10 minut při 11000× g a pokojové teplotě a následně byl supernatant nanesen na kolonku a centrifugován 1 minutu při stejných podmínkách. Pro promytí bylo na kolonku přidáno 500 µl AW roztoku, inkubováno 1 minutu při 50 °C, poté centrifugováno při 11000× g a pokojové teplotě 1 minutu, a nakonec bylo na kolonku pipetováno 600 µl roztoku A4 a centrifugováno při stejných podmínkách. Na závěr bylo přidáno 50 µl elučního roztoku AE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5), inkubováno 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugováno 1 minutu při 11000× g do čisté 1,5 ml zkumavky. Koncentrace plasmidové DNA ve výsledné směsi byla změřena spektrofotometricky (viz. 4.1.5, str. 27).

4.1.10 SEKVENOVÁNÍ DNA

Do 200 µl mikrozukavky bylo pipetováno 200 ng DNA, přímý a reverzní primer o výsledné koncentraci 0,5 µM a směs byla doplněna dH₂O do celkového objemu 8 µl. Sekvence vzorků DNA proběhla v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK.

4.1.11 VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE A IZOLACE ZÁSObNÍHO MNOŽSTVÍ PLASMIDOVÉ DNA

Nejprve byla provedena transformace kompetentních buněk plasmidovou DNA (viz. 4.1.7, str. 28). Narostlé kolonie byly resuspendovány v 2 ml LB média a směs byla přenesena do Erlenmayerových baněk o objemu 2 l s 500 ml LB média s ampicilinem o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Baňky byly třepány na třepačce přibližně 16 hodin při 37 °C. Druhý den byl obsah baněk přelit do kyvet a centrifugován 30 minut při 3900× g a pokojové teplotě. Pelety byly resuspendovány v TES pufru na vortexové míchačce, přeneseny do 50 ml zkumavek a centrifugovány 10 minut při 4 °C a 3900× g. K izolaci plasmidové DNA byla použita komerční sada Plasmid DNA purification⁴⁵. Peleta byla resuspendována v 9 ml RES pufru s RNasou A o výsledné koncentraci 66,7 mg/l a směs byla opět míchána na vortexové míchačce. Poté bylo přidáno 9 ml lyzačního roztoku LYS a směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Mezitím byla kolona s filtrem ekvilibrována 25 ml ekvilibračního roztoku EQU. Po 5 minutách bylo ke směsi přidáno 9 ml neutralizačního roztoku NEU a směs byla nalita na kolonu. Po protečení směsi byl filtr odstraněn a kolona byla dvakrát promyta 25 ml promývacího roztoku WASH. Nakonec byla pod kolonu umístěna 50 ml zkumavka a na kolonu bylo přivedeno 15 ml elučního roztoku ELU. DNA byla přečištěna precipitací. K eluátu bylo pipetováno 10,5 ml isopropanolu o pokojové teplotě a výsledná směs byla promíchána na vortexové míchačce a pomocí stříkačky o objemu 30 ml převedena po kapkách přes polypropylénový filtr, který zachytil plasmidovou DNA. Pomocí stříkačky byl filtr promyt 4 ml 70% ethanolu a pak vysušen opakovaným prohnáním vzduchu. Z filtru byla DNA eluována do 1,5 ml zkumavky 1 ml elučního roztoku (5 mM Tris/HCl, pH 8,5) pomocí stříkačky o objemu 1 ml. Koncentrace plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky (viz. 4.1.5, str. 27).

4.2 KULTIVACE A TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293S GnTI

Kultivaci a transfekci buněčné linie HEK293S GnTI prováděla Mgr. Barbora Kalousková. Kultivace buněčné linie HEK293S GnTI probíhala ve čverhranných lahvích s prodyšným víčkem při 37 °C a třepání 135 ot./min v atmosféře 5% CO₂. Jako kultivační médium byl použit ExCELL293. Jednou za 3-4 dny probíhala subkultivace. Pomocí

hemocytometru byla prováděna kontrola buněčné hustoty a případné kontaminace. Část buněčné suspenze byla doplněna kultivačním médiem tak, aby výsledná hustota buněk činila $0,2 \cdot 10^6$ - $0,3 \cdot 10^6$ buněk/ml. Objem původní suspenze činil maximálně 10% objemu. Pro dostatečné provzdušnění tvořila suspenze maximálně 40% objemu čtverhranné láhve.

Pro produkci proteinů byl využit tzv. piggyBac systém, který umožňuje připravit stabilně transfekované buňky obsahující tetracyklinový transaktivátor, který se po přidání doxycyklinu jako induktoru váže na promotor a indukuje expresi cílového genu⁴⁶.

Buněčná linie HEK293S GnTI byla kotransfekována třemi plasmidy, a to pUT7 (nositel rezistence na puromycin obsahující námi vkládaný gen), PB-RN (nositel rezistence na geneticin a induktoru tetracyklinového transaktivátoru) a pomocný plasmid PBase obsahující gen pro piggyBac transposasu zprostředkovávající integraci daných genů do chromosomu.

Buněčná suspenze HEK293S GnTI byla centrifugací po dobu 5 minut při $95 \times g$ a pokojové teplotě převedena do čerstvého média ExCELL293 o výsledném objemu 1,2 ml, přičemž výsledná koncentrace byla $23,5 \cdot 10^6$ buněk/ml. K této buněčné suspenzi, která byla umístěna do jedné jamky na 12-jamkové destičce bylo přidáno 300 μ l sterilního DNA transfekčního mixu v PBS-TK (obsahujícího 24 μ g pUT7_AICLWT/ pUT7_AICL Δ , 3 μ g PB-RN a 3 μ g PBase) a IPEI v poměru DNA:IPEI 1:4. Buněčná suspenze na destičce byla inkubována po dobu 4 hodin při 37°C a třepání 135 ot./min v atmosféře 5% CO₂. Po inkubaci byla suspenze převedena do 100 ml čtverhranné lahve s prodyšným víčkem a doplněna médiem ExCELL293 na 30 ml a ponechána v inkubátoru při 37°C a třepání 135 ot./min v atmosféře 5% CO₂.

Pro selekci stabilních linií byl 48 hodin po transfekci přidán puromycin o výsledné koncentraci 5 μ g/ml a geneticin o výsledné koncentraci 50 μ g/ml. Každý třetí den byly buňky přepočítány a centrifugací po dobu 5 minut při $95 \times g$ a pokojové teplotě převedeny do čerstvého média ExCELL293 s opětovným přidáním antibiotik o stejné výsledné koncentraci. Po obnovení růstu a viability buněk byla rezistentní stabilně transfekovaná polyklonální linie rozpěstována do objemu 300 ml suspenze. Po dosažení buněčné hustoty $3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^6$ buněk/ml byl přidán doxycyklin o výsledné koncentraci 1 μ g/ml. Pátý den po indukci nebo když klesla viabilita pod 40% byla produkce sklizena centrifugací po dobu 30 minut při $10000 \times g$ a pokojové teplotě, zfiltrována přes 0,22 μ m filtr a uchována při -20°C.

4.3 PURIFIKACE PROTEINŮ

4.3.1 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Jako první krok purifikace byla prováděna afinitní chromatografie pomocí HPLC systému ÄKTAbasic⁴⁷ a kolony HiTrap MabSelect SuRe⁴⁸ o objemu 5 ml obsahující imobilizovaný protein A, který vykazuje afinitu k Fc fragmentu purifikovaného proteinu. Médium bylo zfiltrováno a poté 2× vyředěno PBS pufrem. Následně byla kolona ekvilibrována PBS pufrem. Poté bylo vyředěné médium nanášeno na kolonu rychlostí 4,5 ml/min. Následně byla kolona promyta PBS pufrem a navázaný protein eluován citrátovým pufrem o pH 3,0 rychlostí 2,5 ml/min. Eluát byl neutralizován přidávkem 100 µl 1,5 M roztoku Tris pH 8,8 na 1 ml eluátu. Výsledné pH bylo zkontrolováno pH papírkem. Nakonec byla kolona regenerována 0,5 M roztokem NaOH a převedena do 20% ethanolu, ve kterém byla uchovávána.

4.3.2 ZKONCENTROVÁNÍ PROTEINŮ

Po afinitní chromatografii byl eluát centrifugován v koncentrátoru Amicon Ultra (MWCO 10000) při 3900× g a 18 °C opakovaně po dobu 3-8 minut, dokud objem zkoncentrované směsi nebyl menší než 500 µl. Aby se předešlo srážení, byl mezi jednotlivými centrifugacemi zkoncentrovaný roztok promíchán pipetou. Takto připravený vzorek byl centrifugován v 1,5 ml zkumavce 5 minut při 30000× g a následně využit na gelovou permeační chromatografii.

4.3.3 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Gelová permeační chromatografie byla prováděna pomocí kolony Superdex 200 10/300 GL⁴⁹ a HPLC systému ÄKTAbasic⁴⁷. Nejprve byla kolona ekvilibrována HEPES pufrem. Následně byla nástřiková smyčka o objemu 1 ml promyta také HEPES pufrem. Vzorek byl nanesen do nástřikové smyčky. Chromatografie probíhala při průtoku 0,5 ml/min. Eluát byl sbírán v 0,5 ml frakcích. Nakonec byla kolona promyta 1M AcOH, 0,5M NaOH a poté převedena do 20% ethanolu. Koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích byla stanovena spektrofotometricky (viz. 4.3.4, str. 33).

4.3.4 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Koncentrace proteinů byla stanovována spektrofotometricky při 280 nm. Jako referenční vzorek byl použit HEPES pufr. Pro výpočet koncentrace byl zadán teoretický extinční koeficient a molekulová hmotnost daného proteinu.

4.3.5 SDS-PAGE

Čistota proteinů byla určována pomocí elektroforézy v 12,5% polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Nejprve byl připraven rozdělovací gel, který byl následně převrstven dH₂O. Po zatuhnutí byla voda odstraněna a rozdělovací gel byl převrstven zaostřovacím gelem, do kterého byl zasunut hřeben. Gely pro elektroforézu byly připraveny podle Tab. 4. Z každé chromatografické frakce daného proteinu bylo odebráno vždy 15 µl do 1,5 ml zkumavky, přičemž do každé byl přidán 5× koncentrovaný redukující nebo 5× koncentrovaný neredukující vzorkový pufr. Takto připravené vzorky byly umístěny do vroucí lázně na 10 minut a následně centrifugovány při 20000× g 3 minuty. Gely byly umístěny do elektroforetické aparatury naplněné elektrodoým pufrém. Vzorky a standard molekulových hmotností byly pipetovány do jamek gelu. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V, dokud se čelo elektroforézy nedostalo na konec gelu. Následně byly gely barveny barvicím roztokem minimálně 30 minut, poté několikrát promyty odbarvovacím roztokem do odbarvení pozadí, a nakonec naskenovány.

Tab. 4: Složení roztoků pro přípravu jednoho gelu pro SDS elektroforézu.

Složení gelů	12,5% Rozdělovací gel	Zaostřovací gel
AA (30%) /ml	1,675	0,25
dH ₂ O /ml	1,265	0,7
10% SDS /µl	40	10
10% APS /µl	40	10
TEMED /µl	2	1,5
TRIS pH 8,8 /ml	1	X
TRIS pH 6,8 /ml	X	0,125

4.3.6 ŠTĚPENÍ TEV PROTEASOU

Pro získání čistého proteinu bez Fc fragmentu bylo provedeno štěpení TEV proteasou v hmotnostních poměrech TEV proteasa:protein 1:10, 1:30 nebo 1:100, které probíhalo při 30°C po dobu 3 hodin v prostředí různých redukčních činidel (DTT, cysteamin, L-glutathion) o různé koncentraci (pro zjištění optimálních podmínek štěpení). Jednotlivé vzorky byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz. 4.3.5, str. 33).

5 VÝSLEDKY

5.1 SEKVENCE EXPRESNÍCH KONSTRUKTŮ

Obsahem této práce je příprava proteinu AICL, obsahujícího C87 (dále AICLWT) a také proteinu AICL Δ , obsahujícího mutaci C87S. Důvodem přípravy mutované formy AICL Δ je zvýšená stabilita proteinu obsahujícího sudý počet cysteinů, které mohou vytvářet intracelulární disulfidické vazby se správným zapojením CTLD (viz. 1.4.1, str. 15). Naproti tomu AICLWT může navíc vytvářet kovalentní homodimer, díky lichému systému C87. Přítomnost Fc fragmentu o molekulové hmotnosti 26 kDa v expresní kazetě je využita při purifikaci proteinu, jelikož Fc fragment vykazuje afinitu k proteinu A, který je imobilizován na afinitní koloně (viz. 4.3.1, str. 32). Štěpící místo pro TEV proteasu umožňuje získat čistý protein AICL (S31-H149) o očekávané molekulové hmotnosti 14 kDa (viz. Obr. 5 a 6). Předpokládaná molekulová hmotnost obou proteinových konstruktů AICL (Fc_AICLWT, Fc_AICL Δ) je pro monomer 41 kDa. Uvedené molekulové hmotnosti jsou pouze orientační, jelikož skutečná molekulová hmotnost může být větší kvůli predikované N-glykosylaci.

```
MMTKHKKCFIIVGLITTNIIITLIVKLTRDSQSLCPYDWIGFQNKCYIFSKEEGDWNSSKYNCSSTQHADLTIIDN  
IEEMNFLRRYKSSDHWIGLKMARNRTGQWVDGATFTKSFGMRGSEGCAYLSDDGAATARCYTEWKWICRKRIG
```

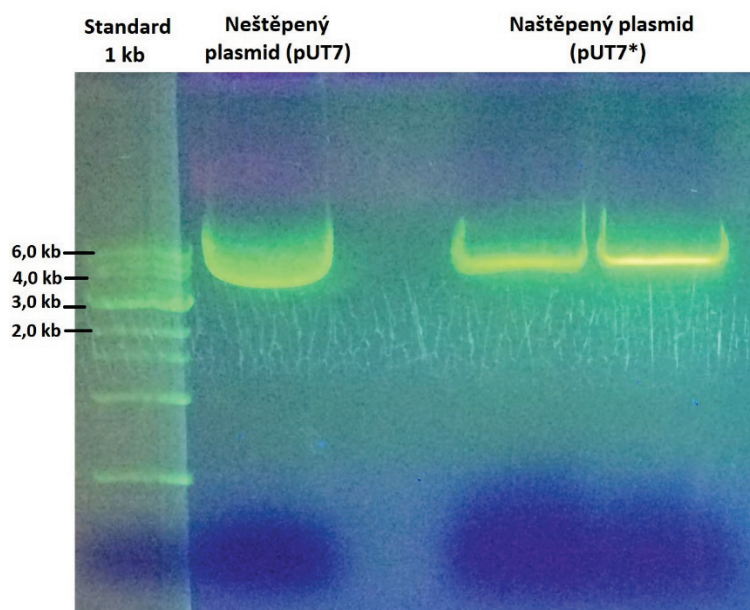
Obr. 5: Aminokyselinová sekvence receptoru AICL. Znázorněna je cytoplasmatická doména, transmembránová část, extracelulární část, cysteinu a predikovaná místa N-glykosylace. Aminokyselinová sekvence byla získána z databáze UniProt pod kódem Q92478²⁵.

```
METDITLLWVLLLWVPGSTGAGSTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKASGAGSTTENLYFQGTGQSLSLCPYDWIGFQNKCYIFSKEEGDWNSSKYNCS  
QHADLTIIDNIEEMNFLRRYKSSDHWIGLKMARNRTGQWVDGATFTKSFGMRGSEGCAYLSDDGAATARCYTE  
KWICRKRIGT
```

Obr. 6: Aminokyselinová sekvence konstruktů obsahujícího AICL. Znázorněny je sekreční signál, Fc fragment navázaný na N-konci AICL, štěpící místo pro TEV proteasu, AICL (S31-H149). Zvýrazněný je cystein C87, který je obsažen pouze v konstruktu AICLWT. Konstrukt AICL Δ obsahuje mutaci C87S.

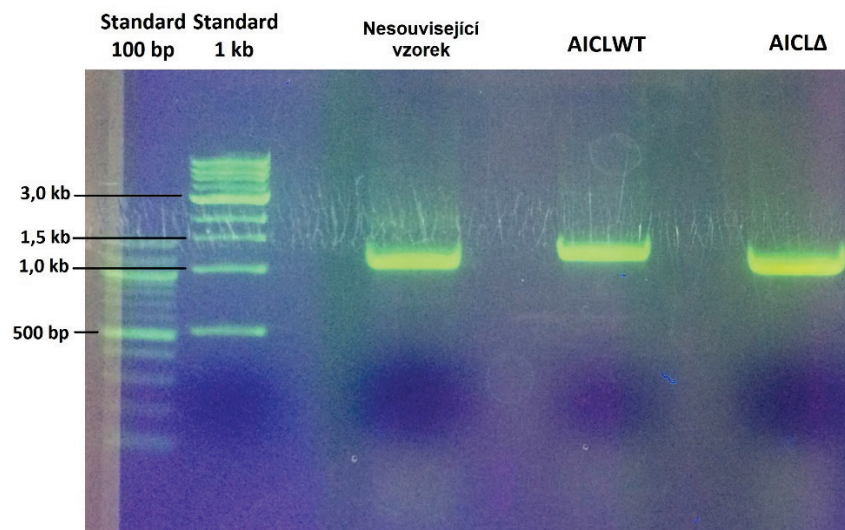
5.2 PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ

Vektor pUT7 byl nejprve linearizován pomocí štěpení restrikními endonukleasami PmeI a NheI. Úspěšnost linearizace byla ověřena agarosovou elektroforézou (viz. Obr. 7), na základě které byla potvrzena očekávaná velikost linearizovaného plasmidu, která činí přibližně 6 kb.



Obr. 7: Agarosová elektroforéza štěpení plasmidu pUT7. Předpokládaná velikost linearizovaného plasmidu byla 6 kb.

Pro amplifikaci insertu PCR reakcí byl použit plasmid pYD5_I1WT obsahující expresní kazetu s genem pro AICLWT a plasmid pYD5_I1Δ s genem pro AICLΔ, které byly již dříve připraveny, Q5 polymerasa a primery pYC5_REV a pYC5K_FW. Přítomnost produktů PCR reakce byla ověřena agarosovou elektroforézou (viz. Obr. 8, str. 37). Amplifikované inserty a plasmid byly následně vyříznuty a extrahovány z agarosového gelu (viz. 4.1.4, str. 27) do 20 μl elučního pufru. Následně byla změřena koncentrace DNA v jednotlivých eluátech (viz. 4.1.5, str. 27) a výsledky jsou shrnuty v Tab. 5, str. 37.

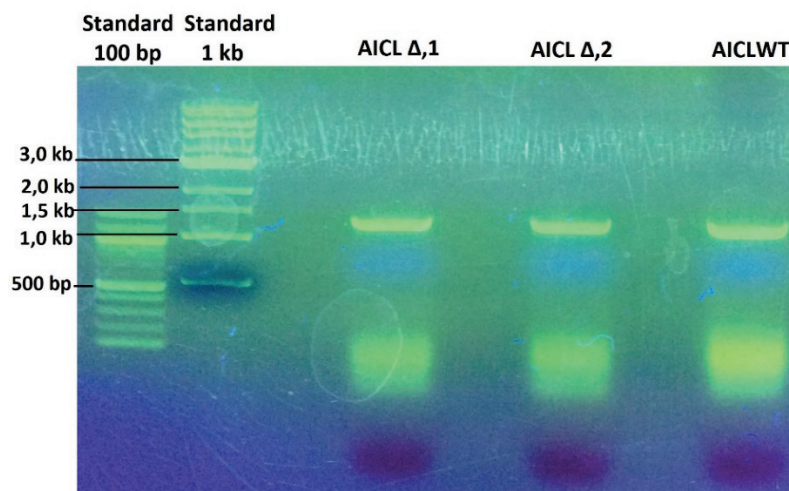


Obr. 8: Agarosová elektroforéza PCR reakce s templátem pYD5 obsahujícím gen pro AICLWT a stejným plasmidem s genem pro AICL Δ . Předpokládaná velikost amplifikovaných konstruktů byla 1,1 kb.

Tab. 5: Koncentrace DNA vzorků extrahovaných z agarosového gelu.

Vzorek	Koncentrace DNA / ng/ μ l
Naštěpený plasmid pUT7*	65,6
Insert AICLWT	11,5
Insert AICLΔ	30,8

Na vnesení insertů do plasmidů byla využita Infusion reakce (viz. 4.1.6, str. 28), která byla provedena vždy s 100 ng plasmidu a 36 ng insertu (na základě vztahu (1), str. 28). Produkty Infusion reakce byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α , které byly rozetřeny na agarosové misky s ampicilinem a inkubovány přes noc při 37 °C (viz. 4.1.7, str. 28). K selekci klonů obsahujících vektor s insertem byla provedena PCR z kolonií (viz. 4.1.8, str. 28) za použití primerů pCT5seq_REV a pCT5seq_FW. Po provedení reakce byly vzorky analyzovány agarosovou elektroforézou (viz. 4.1.3, str. 27). Obr. 9, str. **Chyba! Záložka není definována.**8 ukazuje, že v případě plasmidu obsahujícího gen pro AICLWT byly obě analyzované kolonie pozitivní a pro plasmid s genem pro AICL Δ byla jedna analyzovaná kolonie taky pozitivní.



Obr. 9: Agarosová elektroforéza PCR z kolonií. Na obrázku jsou kolonie odebrané po transformaci buněk *E. coli* DH5 α plasmidem pUT7_AICLWT a pUT7_AICL Δ . Všechny kolonie analyzované PCR z kolonií jsou pozitivní.

Ze všech pozitivních kolonií byla provedena nízkoobjemová produkce a izolace plasmidové DNA (viz. 4.1.9, str. 29). Koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích je uvedena v Tab. 6. Pro ověření správnosti konstruktů byla provedena sekvenace DNA, která potvrdila správné vložení insertů do plasmidů (viz. 4.1.10, str. 29).

Tab. 6: Koncentrace plasmidové DNA získané nízkoobjemovou produkcí a izolací.

Vzorek	Koncentrace DNA / ng/ μ l	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
pUT7_AICLWT	139,5	2,10
pUT7_AICL Δ 1	137,3	2,25
pUT7_AICL Δ 2	125,1	1,88

Po transformaci kompetentních buněk *E. coli* DH5 α (viz. 4.1.7, str. 28) byla z jednoho vzorku pro každý konstrukt provedena velkoobjemová produkce a izolace plasmidové DNA (viz. 4.1.11, str. 30). Naměřené koncentrace a čistotu plasmidové DNA shrnuje Tab. 7.

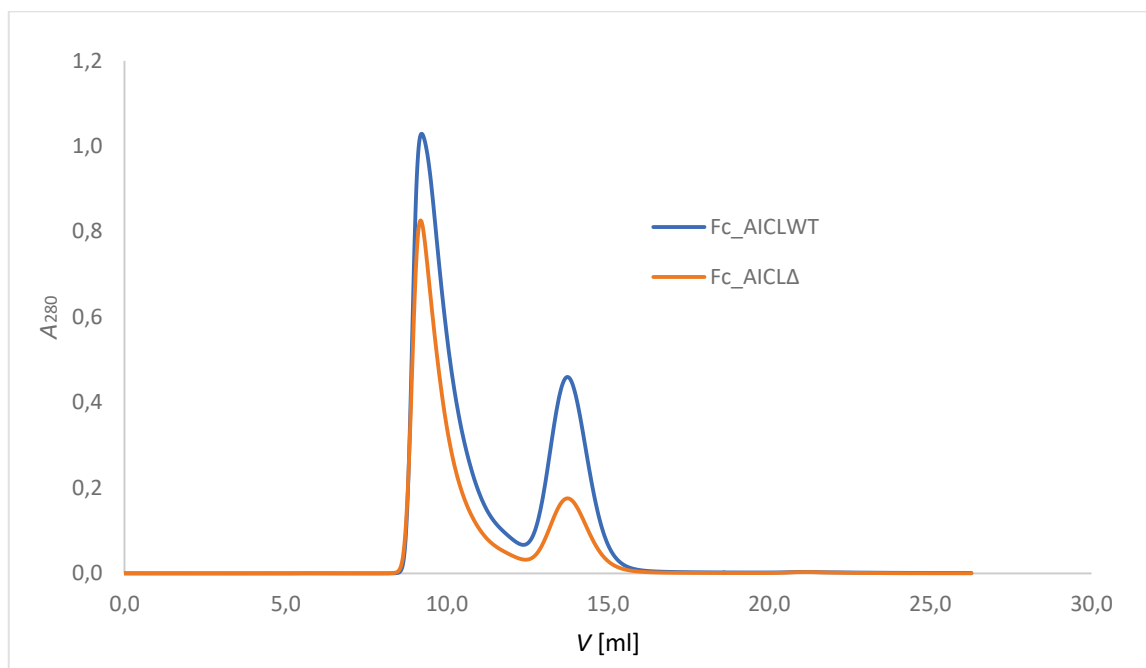
Tab. 7: Koncentrace plasmidové DNA získané velkoobjemovou produkcí a izolací.

Vzorek	Koncentrace DNA / μ g/ μ l	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
pUT7_AICLWT	1,47	1,91
pUT7_AICL Δ	2,84	1,99

5.3 PRODUKCE A PURIFIKACE KONSTRUKTŮ AICL

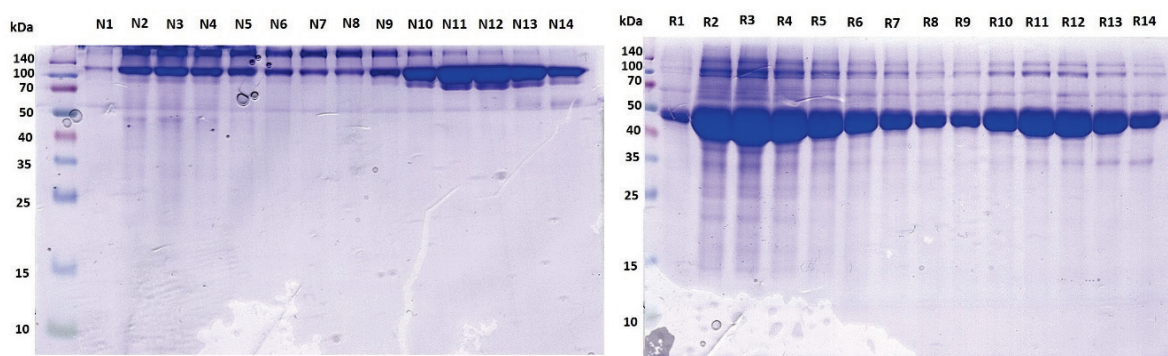
Pro produkci obou konstruktů AICL byla použita buněčná linie HEK293S GnTI. Tato linie umožňuje tvorbu proteinů s jednotnou homogenní manosovou glykosylací typu GlcNAc₂Man₅⁵⁰. Protože předchozí produkce stejných proteinových konstruktů s využitím transienční transfekce nebyla úspěšná, byly konstrukty vloženy do plasmidu pUT7 umožňujícího tvorbu stabilních linií v systému piggyBac.

Po transfekci sadou plasmidů pro systém piggyBac byly buňky selektovány směsí antibiotik (geneticin, 50 µg/ml a puromycin, 5 µg/ml). Po selekci byly buňky expandovány do větších objemů (300 ml) a vyšších buněčných hustot ($3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^6$ buněk/ml). Produkce proteinů byla indukována přidáním doxycylinu do koncentrace 1 µg/ml. Po 5 dnech byly produkce sklizeny a purifikovány pomocí afinitní chromatografie (viz. 4.3.1, str. 32), s použitím kolony HiTrap MabSelect SuRe⁴⁸ obsahující imobilizovaný protein A vykazující afinitu k Fc fragmentu, který je obsažen v expresní kazetě obou konstruktů AICL. Eluáty zkoncentrované na přibližně 250 µl byly v dalším kroku purifikovány pomocí gelové permeační chromatografie (viz. 4.3.3, str. 32) na koloně Superdex 200 10/300 GL⁴⁹. Průběh gelové permeační chromatografie pro oba konstrukty je znázorněn na Obr. 10.

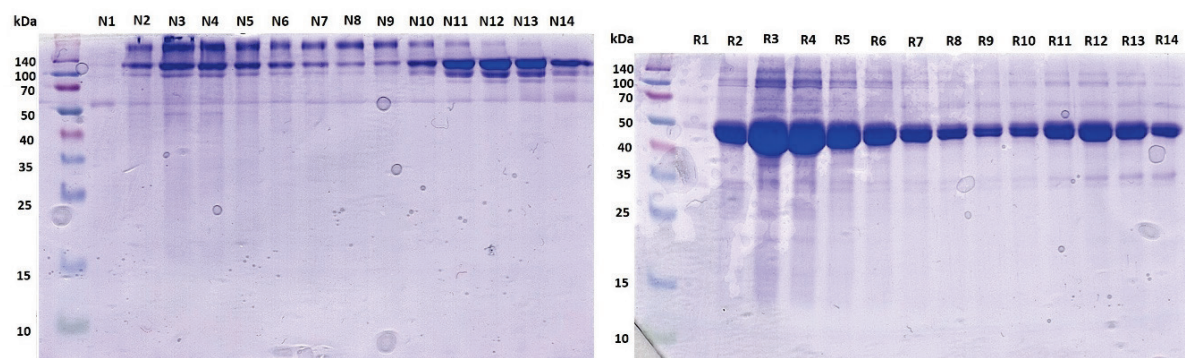


Obr. 10: Gelová permeační chromatografie AICL po afinitní chromatografii. Kolona Superdex 200 10/300 GL. Nesražený proteinový konstrukt má absorpční maximum při elučním objemu přibližně 14 ml, čemuž odpovídá druhý vrchol u obou konstruktů AICL.

Všechny získané frakce obou konstruktů byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz. 4.3.5, str. 33) v redukujícím a neredukujícím prostředí (viz. Obr. 11 pro AICLWT a viz. Obr. 12 pro AICL Δ). Jednotlivé frakce nesraženého proteinu (frakce 9-14 u AICLWT viz. Obr. 11 a frakce 10-14 u AICL Δ viz. Obr.12) byly smíchány a zkoncentrovány (hodnoty koncentrace proteinů po zkoncentrování jsou uvedeny v Tab. 8, str.41).



Obr. 11: SDS-PAGE konstruktů AICLWT. 12,5% gel, v první dráze je standard molekulových hmotností, nalevo se nachází gel s frakcemi v neredukujícím prostředí (N1-N14), napravo gel s frakcemi v redukujícím prostředí (R1-R14). U obou gelů frakce 1-8 představují sražený proteinový konstrukt vycházející v mrtvém objemu kolony, frakce 9-14 představují žádaný konstrukt Fc_AICLWT o očekávané velikosti monomeru 41 kDa a dimeru 82 kDa.

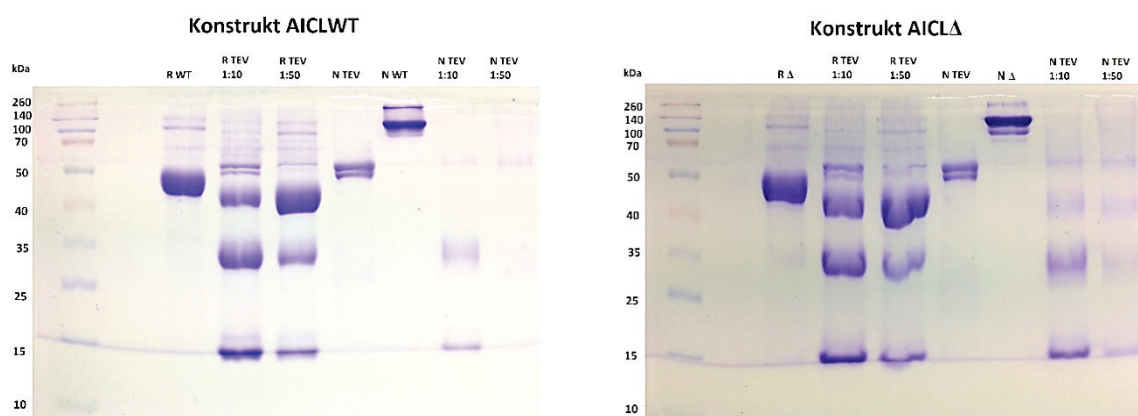


Obr. 12: SDS-PAGE konstruktů AICL Δ . 12,5% gel, v první dráze je standard molekulových hmotností, nalevo se nachází gel s frakcemi v neredukujícím prostředí (N1-N14), napravo gel s frakcemi v redukujícím prostředí (R1-R14). U obou gelů frakce 1-9 představují sražený proteinový konstrukt vycházející v mrtvém objemu kolony, frakce 10-14 představují žádaný konstrukt Fc_AICL Δ o očekávané velikosti monomeru 41 kDa a dimeru 82 kDa.

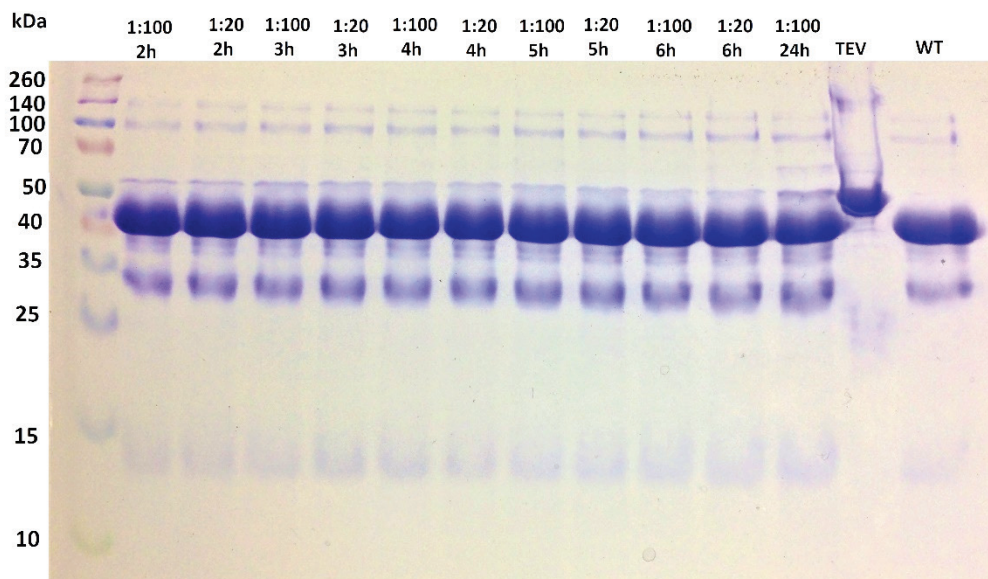
Tab. 8: Koncentrace zkoncentrovaných proteinových konstruktů po gelové permeační chromatografii.

Vzorek	Koncentrace proteinu/ mg/ml	Objem/ ml	Množství/ mg
Konstrukt AICLWT	1,20	0,66	0,79
Konstrukt AICLΔ	1,35	0,56	0,76

Po zkoncentrování nesražených frakcí bylo provedeno štěpení nově připravenou TEV proteasou obsahující 0,5mM DTT v poměrech TEV:protein 1:20 a 1:50 pro ověření aktivity TEV proteasy a odštěpení Fc fragmentu od konstruktů AICL. Jak ukazuje záznam SDS elektroforézy, u obou konstruktů byla získána monomerní forma AICL (viz. Obr. 13). Jelikož bylo potřeba připravit AICL bez Fc fragmentu v neredukujícím prostředí (DTT přítomné v roztoku TEV proteasy by zredukovalo intramolekulární i intermolekulární disulfidy v AICL a informace o struktuře by nebyla kompletní), byla provedena optimalizace štěpení AICLWT s TEV proteasou bez redukčního činidla v poměrech TEV:protein 1:20 a 1:100 po dobu 2 až 24 hodin, pro zjištění optimální doby štěpení a množství TEV proteasy. Jak ukazuje Obr. 14, str. 42, doba štěpení neměla vliv na získané množství AICL. Neštěpený vzorek obsahuje malé množství AICL srovnatelné se štěpenými vzorky, což značí, že TEV proteasa nebyla schopná poštěpit konstrukty bez přidavku redukčního činidla.



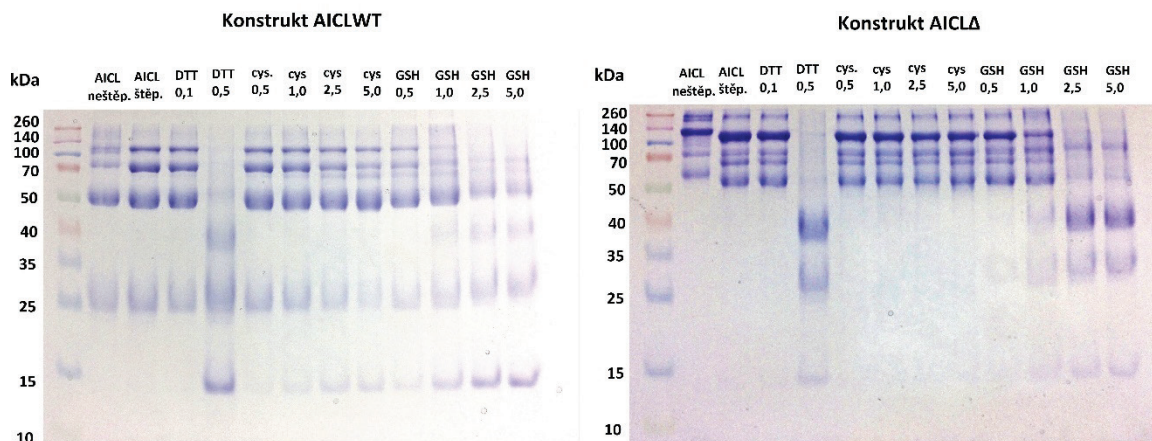
Obr. 13: SDS-page konstruktů AICLWT a AICLΔ po štěpení TEV proteasou s přidavkem 0,5 mM DTT. 12,5% gel, v první dráze je standard molekulových hmotností, ke vzorkům v 3.-5. dráze byl přidán redukující vzorkový pufr a ke vzorkům v 6.-9. dráze neredukující vzorkový pufr. V 3. a 7. dráze se nachází neštěpený vzorek, v 6. TEV proteasa a v ostatních dráhách štěpené konstrukty s různými poměry TEV proteasy. Ve všech štěpených vzorcích pozorujeme monomerní AICL o velikosti 14 kDa a odštěpený Fc fragment o velikosti 26 kDa.



Obr. 14: SDS-PAGE konstrukt AICLWT po štěpení TEV proteasou. 12,5% gel, v první dráze je standard molekulových hmotností, ke všem vzorkům byl přidán redukující vzorkový pufr. Štěpení probíhalo bez přidavku redukčního činidla k TEV protease v poměrech TEV:protein 1:20 a 1:100 po dobu 2 až 24 hodin. V poslední dráze se nachází neštěpený vzorek AICL.

Jelikož štěpení s TEV proteasou bez přidavku redukčního činidla nebylo úspěšné, byly ke vzorkům na štěpení přidány různé koncentrace několika redukčních činidel, aby bylo zjištěno, jaká nejmenší koncentrace redukčního činidla je potřebná pro úspěšné štěpení TEV proteasou. Cílem bylo štěpit ve slabě redukčním prostředí, aby se Fc fúzní konstrukt naštěpil, ale nedošlo k rozpojení všech disulfidů.

K jednotlivým vzorkům obsahujícím TEV proteasu a proteinový konstrukt v poměru 1:30 byla přidána redukční činidla dithiothreitol (DTT), cysteamin (cys.) a redukovaný L-glutathion (GSH) v různých koncentracích. Po štěpení, které probíhalo 3 hodiny při 30°C, byla pro analýzu vzniklých produktů provedena elektroforéza v prostředí SDS (viz. 4.3.5, str. 33), jejíž záznam je zobrazen na Obr. 15, str. 43.



Obr. 15: SDS-PAGE proteinových konstruktů AICL v přítomnosti redukčních činidel. 12,5% gely, v první dráze je standard molekulových hmotností, ke všem vzorkům obsahujícím 5 μg proteinu byl přidán neredukující vzorkový pufr. U obou gelů je ve 2. dráze neštěpený proteinový konstrukt AICL, ve 3. dráze proteinový konstrukt AICL pouze s TEV proteasou a v dalších dráhách proteinový konstrukt AICL s TEV proteasou a příslušným redukčním činidlem o dané koncentraci v mM.

Z SDS elektroforézy (viz. Obr. 15) je zřejmé, že se zvyšující se koncentrací redukčních činidel se daří protein štěpit a můžeme pozorovat stále patrnější proužek o velikosti 14 kDa, který představuje protein AICL. Zároveň je patrné, že protein při skladování ve 4 °C postupně degraduje a některé části fúzního konstruktů se rozpadají, což je vidět porovnáním záznamů SDS elektroforéz hned po zkoncentrování proteinových konstruktů (viz. Obr. 13, str.41) a po delší době při optimalizaci podmínek štěpení TEV proteasou s přidavkem redukčních činidel (viz. Obr. 15), což také svědčí o nestabilitě konstruktů.

6 DISKUZE

Cílem této práce byla příprava mutované a nemutované formy proteinu AICL. Geny kódující proteiny AICLWT a AICL Δ ve fúzi s lidským IgG byly amplifikovány a vloženy do plasmidů, kterými byly následně transformovány bakterie *E. coli* pro přípravu zásobního množství plasmidů. Dále byla pomocí systému piggyBac vytvořena stabilní linie odvozená od linie HEK293S GnTI, která indukovatelně produkovala tyto proteiny.

Na průběhu gelové permeační chromatografie obou proteinů (viz. Obr. 10, str. 39) je možné pozorovat 2 vrcholy, přičemž první se nachází v mrtvém objemu kolony, což naznačuje, že se pravděpodobně jedná o sražený, resp. špatně sbalený protein. Čistota a kvalita jednotlivých frakcí byla zkontrolována pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí (viz. Obr. 11 a 12, str. 40). Záznam z SDS-PAGE pro frakce z prvního vrcholu ukazuje, že část proteinu v neredukujícím prostředí ani nezaputovala do gelu, což potvrzuje předpoklad o sraženém proteinu. Druhý vrchol odpovídá svým elučním objemem kovalentnímu dimeru konstruktu Fc_AICL o přibližné velikosti 82 kDa, jehož přítomnost potvrzuje také SDS-PAGE v neredukujícím prostředí. Kovalentní dimer je tvořen v důsledku fúze s Fc fragmentem, který obsahuje cysteiny přirozeně se podílející na tvorbě tohoto kovalentního dimeru v lidském IgG. Všechny zredukované frakce obou vrcholů ukazují přítomnost monomeru Fc_AICL o očekávané velikosti 41 kDa.

Zkoncentrované frakce obou nesražených proteinů skladované při 4°C byly směsí agregátu o velikosti přibližně 120 kDa, kovalentního dimeru Fc_AICL (82 kDa) a monomeru Fc_AICL (41 kDa) u mutované i nemutované formy, přičemž nemutovaná forma obsahovala navíc odštěpený Fc fragment (viz. Obr. 15, str. 43). Štěpení proteinových konstruktů TEV proteasou bylo provedeno s přidavkem 0,5 mM DTT, čímž se podařilo Fc_AICL naštěpit a získat monomerní AICL o velikosti 14 kDa jak v mutované, tak v nemutované formě (viz. Obr. 13, str.41). Jelikož bylo potřeba získat AICL s přirozeným zapojením disulfidů, další štěpení bylo prováděno bez redukčního činidla, a to různě dlouhou dobu pro optimalizaci doby štěpení. Záznam SDS elektroforézy (viz. Obr. 14, str. 42) provedené po štěpení ukazuje, že se proteinový konstrukt AICL za daných podmínek naštěpit nepodařilo, a proto byla provedena optimalizace množství redukčního činidla potřebného k naštěpení konstruktů (viz. Obr. 15, str. 43). Samotný protein byl získán jenom v přítomnosti vyšších koncentrací redukčních činidel. Na základě získaných výsledků je pravděpodobné, že došlo ke špatnému zapojení disulfidických

vazeb, a to mezi cysteiny Fc fragmentu a AICL. Tak mohlo dojít ke znepřístupnění štěpícího místa pro TEV proteasu, která není schopna daný konstrukt štěpit bez přídavku redukčního činidla. V redukujícím prostředí, kde dochází ke štěpení všech disulfidických vazeb, je štěpící místo pro TEV proteasu přístupné, a je tedy možné získat čistý protein AICL.

Pro špatné zapojení disulfidů svědčí i fakt, že se protein srážel a během gelové permeační chromatografie vycházel z kolony v mrtvém objemu (viz. Obr. 10, str.39) a při delším skladování postupně degradoval a rozpadal se (viz. rozdíl drah obsahující pouze vzorek konstrukt AICL hned po purifikaci - Obr. 13, str. 41 a po skladování při 4 °C - Obr. 15, str. 43). Ani mutace C87S, která přinesla zlepšení stability proteinu v systému *E. coli*, zlepšení stability u produktů savčí buněčné linie nepřinesla (nepozorujeme výraznější rozdíl v chování obou konstruktů).

Připojení Fc fragmentu zvýšilo výtěžek produkce proteinového konstruktu (což bylo zjištěno na základě zkušeností s expresí proteinu AICL v naší laboratoři), ale je potřeba počítat s tím, že pouze 1/3 hmotnosti Fc_AICL je skutečně AICL, jelikož zbytek je tvořen Fc fragmentem.

Další možností pro přípravu AICL je pravděpodobně pouze úprava expresního konstrukt. Pokud by byl zachován koncept fúzního proteinu, protože připojení Fc fragmentu výtěžek opravdu zvýšilo, bylo by nutné vybrat jinou značku. Možností by bylo například umístit modifikovaný Fc fragment na C-konec AICL s delecí cysteinů v pantové oblasti. Tato oblast by byla blízko samotného konstrukt AICL, a proto by se cysteiny Fc fragmentu mohly teoreticky při oxidaci zapojovat s cysteiny AICL. Jako jiná značka se nabízí například manosu vázající protein, glutathion S-transferasa, zelený fluorescenční protein a další.

7 ZÁVĚR

- Byly připraveny expresní vektory pro mutovanou i nemutovanou formu proteinu AICL ve fúzi s Fc fragmentem IgG
- Ve stabilní linii HEK293S GnTI se podařilo produkovat oba fúzní konstrukty AICL
- Při štěpení TEV proteasou bylo zjištěno pravděpodobně nesprávné zapojení disulfidů v konstruktech
- Podařilo se nalézt podmínky pro štěpení fúzních konstruktů AICL pomocí TEV proteasy v redukujícím prostředí

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- (1) Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špíšek, R. *Základy imunologie*; Stanislav Juhaňák - Triton: Praha, 2017.
- (2) Jílek, P. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*; Grada: Praha, 2014.
- (3) Gargani, Y. *Haematology and Immunology*; Elsevier - Health Sciences Division: Philadelphia, 2015.
- (4) Vivier, E.; Di Santo, J.; Moretta, A. *Natural Killer Cells*; Springer International Publishing: Cham, 2016.
- (5) Smyth, M. J.; Hayakawa, Y.; Takeda, K.; Yagita, H. New Aspects of New Aspects of Natural-Killer Cell Surveillance and Therapy of Cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2002, 2 (11), 850–861.
- (6) Street, S. E. A.; Trapani, J. A.; MacGregor, D.; Smyth, M. J. Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon Gamma. *J. Exp. Med.* 2002, 1 (196), 129–134.
- (7) Paul, W.; Seder, R. Lymphocyte Responses and Cytokines. *Cell* 1994, 76 (2), 241–251.
- (8) Lanier, L. L. NK Cell Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23 (1), 225–274.
- (9) Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. *Basic Immunology : Functions and Disorders of the Immune System*; Elsevier/Saunders: Philadelphia, 2014.
- (10) Lanier, L. L. Natural Killer Cell Receptor Signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 2003, 15 (3), 308–314.
- (11) Long, E. O. Negative Signalling by Inhibitory Receptors: The NK Cell Paradigm. *Immunol. Rev.* 2008, 224 (1), 70–84.
- (12) Kirkham, C. L.; Carlyle, J. R. Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems. *Front. Immunol.* 2014, 5 (6), 1–16.
- (13) Rozbeský, D.; Ivanova, L.; Hernychová, L.; Grobárová, V.; Novák, P.; Černý, J. Nkrp1 Family, from Lectins to Protein Interacting Molecules. *Molecules* 2015, 20 (2), 3463–3478.
- (14) Giorda, R.; Rudert, W.; Vavassori, C.; Chambers, W.; Hiserodt, J.; Trucco, M. NKR-P1, a Signal Transduction Molecule on Natural Killer Cells. *Science* (80-). 1990, 249 (4974), 1298–1300.
- (15) Iizuka, K.; Naidenko, O. V; Plougastel, B. F. M.; Fremont, D. H.; Yokoyama, W.

- M. Genetically Linked C-Type Lectin-Related Ligands for the NKR-P1 Family of Natural Killer Cell Receptors. *Nat. Immunol.* 2003, 4 (8), 801–807.
- (16) Hamann, J.; Montgomery, K. T.; Lau, S.; Lier, A. W. Van. AICL: A New Activation-Induced Antigen Encoded by the Human NK Gene Complex. *Immunogenetics* 1997, 45 (5), 295–300.
- (17) Kuttruff, S.; Koch, S.; Kelp, A.; Pawelec, G.; Rammensee, H.; Dc, W.; Kuttruff, S.; Koch, S.; Kelp, A.; Pawelec, G.; et al. NKp80 Defines and Stimulates a Reactive Subset of CD8 T Cells NKp80 Defines and Stimulates a Reactive Subset of CD8 T Cells. *Blood* 2009, 113 (2), 358–369.
- (18) Dennehy, K. M.; Klimosch, S. N.; Steinle, A. Cutting Edge: NKp80 Uses an Atypical Hemi-ITAM To Trigger NK Cytotoxicity. *J. Immunol.* 2011, 186 (2), 657–661.
- (19) Akatsuka, A.; Ito, M.; Yamauchi, C.; Ochiai, A.; Yamamoto, K.; Matsumoto, N. Tumor Cells of Non-Hematopoietic and Hematopoietic Origins Express Activation-Induced C-Type Lectin, the Ligand for Killer Cell Lectin-like Receptor F1. *Int. Immunol.* 2010, 22 (9), 783–790.
- (20) Klimosch, S. N.; Bartel, Y.; Wiemann, S.; Steinle, A. Genetically Coupled Receptor–ligand Pair NKp80-AICL Enables Autonomous Control of Human NK Cell Responses. *Blood* 2013, 122 (14), 2380–2389.
- (21) Nový, J. *Příprava a studium lidského NK buněčného receptoru AICL*; PŘF UK Praha, 2015.
- (22) Bláha, J. *Příprava a studium lidského lymfocytárního receptoru LLT1*; PŘF UK Praha, 2012.
- (23) Skálová, T.; Bláha, J.; Harlos, K.; Dušková, J.; Koval', T.; Stránský, J.; Hašek, J.; Vaněk, O.; Dohnálek, J. Four Crystal Structures of Human LLT1, a Ligand of Human NKR-P1, in Varied Glycosylation and Oligomerization States. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2015, 71 (3), 578–591.
- (24) ClustalW Server, ExPaSy – Bioinformatics resource portal <https://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html> (cit. 04-04-2018).
- (25) Databáze UniProt <http://www.uniprot.org/> (cit. 04-04-2018).
- (26) Welte, S.; Kuttruff, S.; Waldhauer, I.; Steinle, A. Mutual Activation of Natural Killer Cells and Monocytes Mediated by NKp80-AICL Interaction. *Nat. Immunol.* 2006, 7 (12), 1334–1342.

- (27) Dunn, G. P.; Old, L. J.; Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol* 2004, 22 (1), 329–360.
- (28) Hinrichs, C. S.; Rosenberg, S. A. Exploiting the Curative Potential of Adoptive T-Cell Therapy for Cancer. *Immunol. Rev.* 2014, 257 (1), 56–71.
- (29) Rosenberg, S. A.; Restifo, N. P.; Yang, J. C.; Morgan, R. A.; Dudley, M. E. Adoptive Cell Transfer: A Clinical Path to Effective Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2008, 8 (4), 299–308.
- (30) Topalian, S. L.; Weiner, G. J.; Pardoll Suzanne L Topalian, D. M. Cancer Immunotherapy Comes of Age. *J. Clin. Oncol.* 2011, 29 (36), 4828–4836.
- (31) Pardoll, D. M.; Topalian, S. L. The Role of CD4 + T Cell Responses in Antitumor Immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 1998, 10 (5), 588–594.
- (32) Palucka, K.; Banchereau, J. Cancer Immunotherapy via Dendritic Cells. *Nat. Rev. Cancer* 2012, 12 (4), 265–277.
- (33) Farkona, S.; Diamandis, E. P.; Blasutig, I. M. Cancer Immunotherapy: The Beginning of the End of Cancer? *BMC Med.* 2016, 14.
- (34) Leach, D. R.; Krummel, M. F.; Allison, J. P. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science (80-)*. 1996, 271 (5256), 1734–1736.
- (35) Raulet, D. H. Interplay of Natural Killer Cells and Their Receptors with the Adaptive Immune Response. *Nat. Immunol.* 2004, 5 (10), 996–1002.
- (36) Binyamin, L.; Alpaugh, R. K.; Hughes, T. L.; Lutz, C. T.; Campbell, K. S.; Weiner, L. M. Blocking NK Cell Inhibitory Self-Recognition Promotes Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in a Model of Anti-Lymphoma Therapy. *J. Immunol.* 2008, 180 (9), 6392–6401.
- (37) Valerius, P.; Humpe, A.; Gramatzki, M.; Thomas Repp, M.; J van de Winkel, J. G.; H I Parren, P. W.; Kellner, C.; Maurer, T.; Hallack, D.; Repp, R.; et al. Mimicking an Induced Self Phenotype by Coating Lymphomas with the NKp30 Ligand B7-H6 Promotes NK Cell Cytotoxicity. *J. Immunol.* 2012, 189 (10), 5037–5046.
- (38) Zhang, T.; Wu, M.-R.; Sentman, C. L. An NKp30-Based Chimeric Antigen Receptor Promotes T Cell Effector Functions and Antitumor Efficacy In Vivo. *J. Immunol.* 2012, 189 (5), 2290–2299.
- (39) Peipp, M.; Derer, S.; Lohse, S.; Staudinger, M.; Klausz, K.; Valerius, T.; Gramatzki, M.; Kellner, C. HER2-Specific Immunoligands Engaging NKp30 or NKp80 Trigger NK-Cell-Mediated Lysis of Tumor Cells and Enhance Antibody-Dependent Cell-

- Mediated Cytotoxicity. *Oncotarget* 2015, 6 (31), 32075–32088.
- (40) Deng, G.; Zheng, X.; Zhou, J.; Wei, H.; Tian, Z.; Sun, R. Generation and Preclinical Characterization of an NKp80-Fc Fusion Protein for Redirected Cytolysis of Natural Killer (NK) Cells against Leukemia. *J. Biol. Chem.* 2015, 290 (37), 22474–22484.
- (41) New England Biolabs. Tm Calculator <https://tmcalculator.neb.com/#!/main> (cit. 22-03-2018).
- (42) Machery-Nagel. *PCR Clean-up Gel Extraction User Manual*; Düren, 2011.
- (43) Bimake.com. *Quick-Fusion Cloning Kit*; Houston, 2013.
- (44) Macherey-Nagel. *Plasmid DNA Purification NucleoSpin® Plasmid (NoLid)*; Düren, 2012.
- (45) Macherey-Nagel. *Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Maxi Plus*; Düren, 2013.
- (46) 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.* 2013, 110 (13), 5004–5009.
- (47) General Electric Company. *Unicorn™ 6.4 for ÄKTAexplorer and ÄKTApurifier Addendum*; Chicago, 2014.
- (48) General Electric Company. *HiTrap™ MabSelect SuRe*; Chicago, 2006.
- (49) General Electric Company. *Superdex 75 10/300 GL and Superdex 200 10/300 GL*; Chicago, 2002.
- (50) Reeves, P.; Callewaert, N.; Contreras, R.; Khorana, H. Structure and Function in Rhodopsin: High-Level Expression of Rhodopsin with Restricted and Homogeneous N-Glycosylation by a Tetracycline-Inducible N-Acetylglucosaminyltransferase I-Negative HEK293S Stable Mammalian Cell Line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 99 (21), 13419–13424.

