

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Tereza Nepokojová

**Příprava fúzních ligandů a ověření jejich vazby na
NK buněčné receptory**

Preparation of fusion ligands and evaluation of their binding to NK cell receptors

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 všechny použité zdroje jsem řádně citovala.

V Praze dne 25. 5. 2018

Poděkování

Chtěla bych zde poděkovat RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za odborné rady a připomínky k této bakalářské práci. Dále mé velké díky patří Mgr. Barboře Kalouskové za velkou pomoc při experimentální části této práce, za trpělivost, ochotu s čímkoliv pomoci a konzultace. Tímto také děkuji celému kolektivu laboratoře 204 za ochotu s čímkoliv pomoci a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Nakonec také děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Abstrakt

NK buňky (z angl. natural killers – „přirození zabíječi“) jsou důležitou součástí přirozené imunity. Na svém povrchu nesou komplexní skupinu receptorů, které používají různé signalizační motivy k aktivaci nebo k inhibici. NK buňky jsou schopny cíleně zabít aberantní buňky, tedy virové, infikované a nádorové buňky, pomocí speciálních cytotoxických mechanismů, kterými vyvolají apoptózu. Mezi aktivační receptory patří také receptory NKG2D, rozeznávající ligand MICA, a NKp30, který rozeznává ligand B7-H6.

Pro imunitní systém člověka je tedy přirozené, že rakovinné buňky jsou ničeny pomocí NK buněk. Současné terapeutické cíle v léčbě nádorových onemocnění se zaměřují především na posilování vlastní přirozené schopnosti těla bojovat proti rakovině a je k tomu využíváno právě NK buněk.

Vedle NK buněk jsou také nejen k léčbě rakoviny hojně využívány protilátky. Z velké části se jedná o monoklonální protilátky, avšak v současné době začínají být hojně využívány také fragmenty protilátek.

Tato práce pojednává o přípravě tří bifunkčních fúzních proteinů: B7-H6-L-aHER2, MICA-L-aHER2 a aHER2-L-MICA, které obsahují imunoligandy aktivačních receptorů NK buněk a VHH fragment antiHER2 protilátky, v linii lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293T. Proteiny byly úspěšně připraveny a dále byla ověřena vazba na NK buněčný receptor pomocí analytické gelové permeační chromatografie.

Klíčová slova: NK buňka, protilátka, MICA, NKG2D, HER2, B7-H6, bifunkční fúzní protein, HEK293T

Abstract

Natural killer cells (NK cells) are an important part of innate immunity. On their surface they express a complex group of receptors that use different signalling motifs to activate or inhibit NK cell cytotoxic activity. NK cells are capable to kill aberrant cells (namely, viral, infected, and tumour cells) by using special cytotoxic mechanisms to trigger apoptosis. The activating receptors recognize tumour or stress-induced ligands, e.g., NKG2D receptor recognizes the MICA ligand and NKp30 recognizes the B7-H6 ligand.

Therefore for human immune system it is only natural that cancer cells are destroyed by NK cells. The current therapeutic goals in the treatment of cancer are primarily focused on strengthening the body's own natural ability to fight with cancer and one possible way is stimulation of NK cells to win this deadly fight.

In addition to NK cells, antibodies are also widely used for the treatment of cancer, as well as other immune-related disorders. Most of them are monoclonal antibodies, but antibody fragments are getting attention and are being tested more and more in recent years.

This work describes the preparation of three bifunctional fusion proteins: B7-H6-L-aHER2, MICA-L-aHER2, and aHER2-L-MICA, which contain immunoligands for the activating receptors of NK cell and VHH fragment of antiHER2 antibody, in the human embryonic kidney cell line HEK293T. The proteins were successfully prepared and their binding to the NK cell receptor was verified by analytical gel permeation chromatography.

Key words: NK cells, antibody, MICA, NKG2D, HER2, B7-H6, bifunctional fusion protein, HEK293T

(The thesis is written in Czech)

Seznam zkratek

ADCC	Cytotoxická reakce závislá na protilátkách, z angl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
APS	Peroxodisíran amonný, z angl. ammonium persulfate
B7-H6	Ligand pro NKp30 z rodiny B7
C doména	Konstantní doména protilátky
CD16	Označení pro FcR γ III receptor
CD56	Označení pro neurální buněčnou adhezivní molekulu
CD94-NKG2A	Heterodimer proteinů CD94 a NKG2A z rodiny receptorů lektinového C-typu
cDNA	DNA syntetizovaná podle RNA v reakci katalyzované enzymem reverzní transkriptázou
CDR	Hypervariabilní oblasti variabilních domén, z angl. complementarity-determining region
DAP	Adaptérový protein, z angl. death associated protein
dH ₂ O	Deionizovaná voda
dNTPs	Deoxynukleotidtrifosfáty
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor, z angl. epidermal growth factor receptor
FASL	Společně s TRAIL se podílí na indukci apoptózy, z angl. Fas-ligand
Fc fragment	Část molekuly protilátky složená z těžkých řetězců, z angl. fragment crystallizable
Fr	Méně variabilní oblasti variabilní domény, z angl. framework
GM-CSF	Růstový hormon pro granulocytární řadu leukocytů a makrofágy, z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H řetězec	Těžký řetězec protilátky
HAMA	Člověkem produkované anti-myší protilátky, z angl. human anti-mouse antibodies

HCAbs	Molekula imunoglobulinu velbloudů a lam, z angl. heavy chain-only antibodies
HEK293T	Buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293, z angl. human embryonic kidney 293, transformovaná T antigenem viru SV40
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonová kyselina
HER2	Receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor, z angl. human epidermal growth factor receptor 2
HLA	Lidský leukocytární antigen, z angl. human leukocyte antigen
HLA-E	Molekula HLA třídy I s omezeným polymorfismem
IFN γ	Cytokin interferon gama
Ig	Imunoglobulin
IgG	Imunoglobulinová protilátka třídy G
IL-2	Cytokin interleukin 2
ILT2	Receptor patřící mezi KIR, z angl. human inhibitory receptors Ig-like transcript 2
ITAM	Imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv, z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
KIR	Inhibiční imunoglobulinové receptory, z angl. killer-cell immunoglobulin-like receptor
KRAS	Gen, který působí jako přepínač v buněčné signalizaci, z angl. Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homologue
L řetězec	Lehký řetězec protilátky
LB	Kultivační médium, z angl. lysogeny broth
IPEI	Lineární polyethylenimin
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex, Major histocompatibility complex
MHC gp třídy I	Hlavní histokompatibilní glykoproteinový komplex třídy I, z angl. major histocompatibility complex glycoprotein class I

MICA	Stresem indukovaný antigen, z angl. MHC class I polypeptide-related sequence A
NCR	Receptory přirozené cytotoxicity, z angl. natural cytotoxicity receptors
NFAT	Proteinový komplex, z angl. nuclear factor of activated T-cells
NK buňky	„Přirozeně zabíječské“ buňky, z angl. natural killer cells
NKG2D	Homodimerní aktivační receptor, z angl. natural killer gene 2D
NKp30	Receptor NK buněk o velikosti 30 kDa, z angl. natural killer cell protein 30 kDa
NKp44	Receptor NK buněk o velikosti 44 kDa, z angl. natural killer cell protein 44 kDa
NKp46	Receptor NK buněk o velikosti 46 kDa, z angl. natural killer cell protein 46 kDa
NKR	Receptory NK buněk, z angl. natural killer cell receptors
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok, z angl. phosphate buffered saline
PCR	Polymerasová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
RTK	Receptor tyrosinová kinasa, z angl. receptor tyrosine kinase
scFv	Jednořetězový fragment protilátky, z angl. single-chain fragment variable
SDS	Dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsíranu sodného
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TNF	Cytokin z rodiny TNF, z angl. tumor necrosis factor
TNF α	Faktor nekrózy nádorů, z angl. tumor necrosis factor alpha
TRAIL	Proteinový ligand, který indukuje apoptózu, z angl. TNF-related apoptosis inducing ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V doména	Variabilní doména protilátky
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor, z angl. Vascular endothelial growth factor

VH doména Variabilní oblast těžkých řetězců
VHH Fragment protilátky
VL doména Variabilní oblast lehkých řetězců

Obsah

1	Teoretický úvod	12
1.1	Imunitní systém.....	12
1.2	NK buňky	12
1.2.1	Biologie NK buněk	12
1.2.2	Cytotoxické nástroje NK buněk.....	14
1.3	Receptory NK buněk.....	14
1.3.1	Inhibiční receptory	14
1.3.2	Aktivační receptory.....	15
1.4	Využití protilátek v klinické praxi	18
1.4.1	Imunoglobulin G, IgG	19
1.4.2	Fragment protilátky scFv.....	20
1.4.3	Fragment lamí protilátky VHH.....	20
1.4.4	Využití monoklonálních protilátek v onkologii.....	21
1.5	Imunoterapie pomocí NK buněk.....	24
2	Cíle práce	25
3	Materiál a metody	26
3.1	Materiál.....	26
3.1.1	Pomůcky a přístroje.....	26
3.1.2	Chemikálie.....	27
3.1.3	Bakteriální kmeny a buněčné linie.....	27
3.1.4	Vektory	27
3.1.5	PCR primery	28
3.1.6	Roztoky.....	28
3.1.7	Kultivační média	29
3.2	Metody.....	30
3.2.1	Linearizace vektoru.....	30

3.2.2	Amplifikace inzertů pomocí PCR reakce	30
3.2.3	Elektroforéza v agarosovém gelu.....	31
3.2.4	Extrakce DNA z agarosového gelu	31
3.2.5	Vnesení genu do linearizovaného plazmidu	32
3.2.6	Transformace plazmidové DNA	32
3.2.7	Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA a PCR z kolonií.....	32
3.2.8	Sekvenování DNA	34
3.2.9	Velkoobjemová produkce plazmidové DNA.....	34
3.2.10	Kultivace buněčné linie HEK293T	35
3.2.11	Produkce proteinů v tranzientně transfekovaných buňkách HEK293T	35
3.2.12	Sklizení produkce.....	36
3.2.13	Afinitní chromatografie.....	36
3.2.14	Zkoncentrování proteinů a gelová permeační chromatografie	36
3.2.15	SDS-PAGE	36
3.2.16	Analytická gelová permeační chromatografie	37
4	Výsledky	39
4.1	Sekvence připravovaných fúzních proteinů	39
4.2	Příprava expresních vektorů	41
4.3	PCR reakce pro inserty	41
4.4	Vnesení genu do linearizovaného plazmidu a PCR z kolonií.....	42
4.5	Velkoobjemová produkce plazmidové DNA.....	44
4.6	Produkce fúzních proteinů v linii HEK293T	44
4.7	Studium interakce fúzních proteinů a NK buněčných receptorů	47
5	Diskuse	50
6	Závěr.....	52
7	Seznam použité literatury	53

1 Teoretický úvod

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je složitá síť specializovaných buněk, tkání, molekul a jejich vzájemných interakcí, které vznikly během fylogenetického vývoje organismu. Jedná se o jeden ze základních homeostatických mechanismů organismu, jehož funkcí je ochrana proti látkám škodlivým pro organismus, vnitřního i zevního původu. Projevy této funkce lze popsat jako obranyschopnost (schopnost systému rozpoznat vnější škodlivé látky a chránit tak organismus proti patogenním organismům a jejich toxickým produktům), autotolerance (schopnost systému rozpoznat organismu vlastní tkáně a udržovat toleranci vůči nim) a imunitní dohled (schopnost systému rozpoznat vnitřní škodlivé látky, systém průběžně odstraňuje staré, poškozené a pozměněné, mutované, buňky) [1,2].

Mechanismy účinku imunitního systému lze rozdělit na specifické (adaptivní) a nespecifické (neadaptivní) [2]. Tyto mechanismy spolu vzájemně kooperují. Neadaptivní mechanismy jsou evolučně starší a jsou zajišťovány hlavně složkami buněčnými (NK buňky a fagocytující buňky) a humorálními (komplementový systém, lektiny, interferony a sérové proteiny). Tyto mechanismy jsou účinné proti mnoha různým patogenům a reagují na strukturní nebo funkční rysy, které jsou jim společné. Adaptivní mechanismy jsou antigenně specifické, tedy identifikují cizorodé látky pomocí vysoce specifických molekul. K úplnému rozvoji specifické imunitní reakce je třeba několik dnů a charakteristikou těchto reakcí je imunologická paměť. Naproti tomu nespecifické reakce probíhají téměř okamžitě. Specifická imunita je zajišťována především T-lymfocyty a B-lymfocyty.

1.2 NK buňky

1.2.1 Biologie NK buněk

NK buňky (z angl. natural killer cells – „přirození zabíječi“) jsou důležitou součástí přirozené imunity a tvoří jednu z hlavních subpopulací lymfocytů [2]. Morfologicky se jedná o velké granulární lymfocyty, které na rozdíl od T- a B-lymfocytů nemají antigenně specifické receptory. NK buňky jsou tedy schopny rychlé odpovědi bez předchozí senzitivace³. Aktivované NK buňky produkují řadu cytokinů a chemokinů.

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, které působí pomocí specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj [2]. Většina cytokinů působí pleiotropně a často v kaskádě [3]. Lze je klasifikovat do několika skupin, např. na interleukiny, což je heterogenní skupina, která reguluje především rozličné

aspekty vývoje a aktivaci leukocytů. Další skupinou jsou chemokiny. Jedná se o molekuly s chemickou aktivitou. A dále interferony, které jsou důležitou složkou neadaptivních antivirových obranných mechanismů a regulátorů imunity. Chemokiny a cytokiny vedou k autokrinní a parakrinní aktivaci buněk podílejících se na imunitní reakci. Takto mohou NK buňky regulovat přirozenou i získanou imunitní odpověď. Ony samy jsou však také pozitivně i negativně regulovány buňkami imunitního systému a zároveň i poškozenými nebo nádorovými buňkami.

NK buňky se nacházejí ve všech tělních kompartmentech [3]. Jejich zastoupení je v různých orgánech odlišné. Zvýšené počty můžeme najít v lymfatických orgánech (až desetkrát vyšší hodnoty než v periferní krvi), v játrech, plicích nebo slezině. NK buňky v periferní krvi mají poločas života kratší než 10 dnů [4]. Jsou neustále doplňovány diferenciací z hematopoetických kmenových buněk. Během tohoto intervalu musí nezralé NK buňky absolvovat „vzdělávací“ proces, který vede ke schopnosti rozeznávat a tolerovat látky tělu vlastní („self“), ale také rozeznat to, co je organismu nevlastní („non-self“). Buňky se stávají funkčně kompetentní až poté, co se setkají s tělu vlastními molekulami HLA (např. HLA-C1, -C2, -Bw4) během procesu „licencování“ („licensing“). Přibližně 10-20 % NK buněk zůstává „nelicencovaných“. Tyto buňky neobsahují receptory, které rozpoznávají vlastní MHC a mají tedy sníženou reaktivitu, avšak mohou se aktivovat pomocí endogenních cytokinů. Tento problém nastává například po transplantacích, kdy dochází k odmítnutí štěpu.

Na povrchu NK buněk lze najít řadu molekul, které plní funkci receptorů pro cytokiny a chemokiny a také adhezivních molekul, podle kterých lze NK buňku identifikovat a určit, do jaké subpopulace patří [3]. Podle toho, zda exprimují CD56 (označení pro neurální buněčnou adhezivní molekulu) nebo CD16 (označení pro Fc γ III receptor), lze rozlišit dvě hlavní subpopulace NK buněk, a to subpopulace CD56^{+dim}CD16⁺ a CD56^{+bright}CD16^{dim/-}. Liší se mírou cytotoxicity. Zatímco CD56^{+dim} vyvolávají cytotoxicitu, CD56^{+bright} řídí sekreci cytokinů.

1.2.2 Cytotoxické nástroje NK buněk

NK buňky jsou schopny cíleně zabíjet aberantní buňky, tedy virové, infikované a nádorové buňky [4]. Buňky jsou eliminovány v procesu apoptózy. Eliminace těchto buněk probíhá dvěma různými mechanismy, a to pomocí dráhy „receptoru smrti“ a dráhy závislé na cytotoxických granulích [5].

V prvním případě dochází k aktivaci dráhy pomocí TNF (z angl. tumour necrosis factor), TRAIL (z angl. TNF-related apoptosis inducing ligand) a FasL (z angl. Fas ligand), které jsou exprimovány na NK buňkách a interagují s ligandy na cílových buňkách [5]. Interakce s receptory umožňuje vytvoření signalizace pomocí tzv. „death-inducing signaling“ komplexu, což vede k apoptóze.

Ve druhém případě je eliminace zprostředkována cytotoxickými molekulami (perforiny a proteázami zvanými granzymy), které jsou uloženy v sekrečních lysozomech [4]. Jedná se o specializované exocytické organely, které jsou známé také jako lytické granule. Rozpoznání cílových buněk indukuje tvorbu lytické imunologické synapse mezi NK buňkou a cílovou buňkou. Dochází k polarizované exocytóze sekrečních lysozomů, tedy uvolnění cytotoxického obsahu v lytické synapsi, což vede k apoptóze v cílové buňce.

Podstatná role, kterou hraje sekreční lysozomální exocytóza při cytotoxické funkci NK buněk, je zdůrazněna imunitními poruchami [5]. Ty jsou způsobeny mutací kritických složek exocytózy. Ztráta exocytické aktivity NK buněk má hluboké imunologické následky.

1.3 Receptory NK buněk

Receptory NK buněk (NKR, z angl. natural killer cell receptors) dělíme zejména na inhibiční a aktivační [6]. Jedná se o komplexní skupinu receptorů, které používají různé signalizační motivy ke stimulaci aktivace nebo k inhibici. NK buňka musí zůstat tolerantní ke zdravé tkáni a naopak eliminovat nádorové či stresované buňky, čehož je docíleno právě řízením aktivity NK buněk pomocí aktivačních a inhibičních receptorů. Schéma dynamické rovnováhy mezi aktivačními receptory je uvedeno na Obr. 1, str. 16.

1.3.1 Inhibiční receptory

Inhibiční receptory rozeznávají MHC gp třídy I (z angl. major histocompatibility complex glycoprotein class I) [2]. U člověka je hlavním histokompatibilním systémem komplex HLA (z angl. human leukocyte antigen). Jedná se o rozsáhlý komplex genů, které determinují povrchové molekuly umístěné v plazmatické membráně buněk [6]. V důsledku nedostatečné interakce receptorů s molekulami MHC gp třídy I, tedy nedostatečné

inhibice, může dojít k usmrcení cílových buněk [7]. Toto může nastat, pokud cílové buňky exprimují nedostatečné množství molekul MHC gp třídy I, což se stává často během nádorové transformace nebo infekce určitými viry. Inhibici lze popsat také jako toleranci buněk těla vlastních, tedy specifickou ztrátu imunitní odpovědi na vlastní antigeny.

Z hlediska struktury jsou inhibiční receptory děleny do dvou skupin. První skupinou jsou imunoglobulinové receptory, které se nazývají KIR (z angl. killer cell immunoglobulin-like receptor) a druhou skupinou jsou receptory podobné lektinům C-typu (CTLR, z angl. C-type lectin-like receptors) [7]. KIR rozpoznávají různé alelické skupiny HLA-A, -B nebo -C molekul. Například ILT2 (patřící mezi KIR) je schopen rozpoznat velké množství alel HLA třídy I. Naproti tomu CD94-NKG2A (heterodimer, jehož obě části patří do rodiny receptorů podobných lektinům C-typu) rozpoznává HLA-E, což je molekula HLA třídy I s omezeným polymorfismem. Společnou charakteristikou různých typů inhibičních receptorů HLA třídy I je to, že v cytoplazmatické části mají strukturní motiv obsahující konzervovanou sekvenci aminokyselin S/I/V/LxYxxI/V/L (kde x značí jakoukoliv aminokyselinu), neboli ITIM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), který je zodpovědný za aktivaci SHP-1 a SHP fosfatáz [7,8]. Tyto fosfatázy deaktivují aktivační signalizační kaskádu iniciovanou aktivačními receptory.

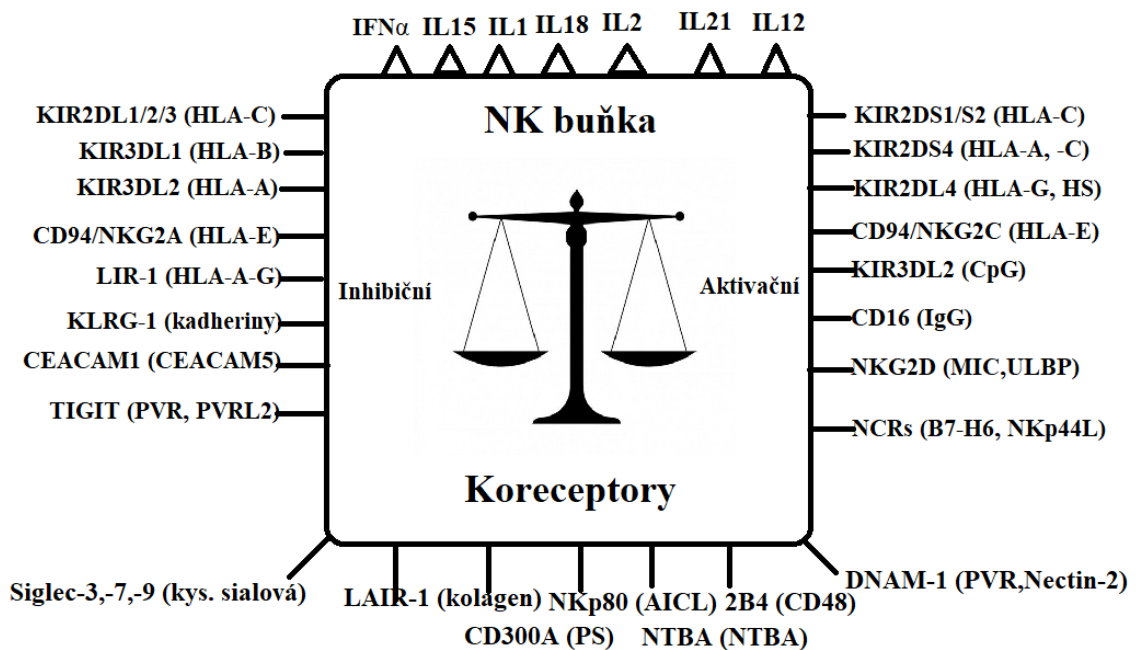
1.3.2 Aktivační receptory

NK buňky vybavené aktivačními receptory se přímo podílejí na usmrcování transformovaných buněk [9]. Z hlediska struktury je lze rozdělit na imunoglobulinům podobné receptory, kam patří receptory přirozené cytotoxicity (NCR, z angl. natural cytotoxicity receptors) a receptory podobné lektinům C-typu, kam patří například NKG2D. Aktivační NKR umožňují NK buňkám reagovat na škodlivé buňky bez předchozí senzitivace antigenem.

Receptory přirozené cytotoxicity rozpoznávají struktury na povrchu nejrůznějších buněk [10]. Mezi tyto receptory patří receptory NKp30, NKp44 a NKp46. Povrchová hustota NCR koreluje s velikostí cytolytické aktivity proti cílovým buňkám. Na rozdíl od NKp30 a NKp46, které jsou exprimovány na aktivovaných NK buňkách i NK buňkách v klidovém stavu, je NKp44 selektivně exprimován pouze aktivovanými NK buňkami [11]. Exprese NKp44 je regulována stimulací některých NK buněk IL-2. IL-2 je cytokin ze skupiny interleukinů, který je růstovým faktorem pro NK buňky, a také má vliv i na produkci IFN γ . Tímto lze částečně vysvětlit zvýšenou cytotoxicitu NK buněk vystavených působení IL-2.

Pro některé aktivační receptory je charakteristická sekvence aminokyselin YxxL/Ix₍₆₋₈₎YxxL/I (kde x značí jakoukoliv aminokyselinu), neboli ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif) [9], který je ke kratší intracelulární doméně receptoru vázán nekovalentně v tzv. signalizačním adaptoru DAP12 [11]. ITAM se nacházejí v koncových sekvencích důležitých buněčných signalizačních molekul. Tyrosinové zbytky v těchto motivech jsou po interakci receptorů s jejich ligandy fosforylovány a tvoří vazebná místa pro jiné proteiny zapojené do dané buněčné signalizace.

Jeden z neúčinnějších mechanismů aktivace NK buněk je stimulace pomocí Fc fragmentu protilátky a receptoru CD16 v procesu nazývaném buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC, z angl. antibody dependent cellular cytotoxicity). Protilátky se vážou na povrchu buňky na receptor CD16 a vyvolávají vzestup koncentrace intracelulárního vápníku, aktivaci NFAT (z angl. nuclear factor of activated T-cells), produkci cytokinů (IFN γ , GM-CSF) a následnou degranulaci [11].

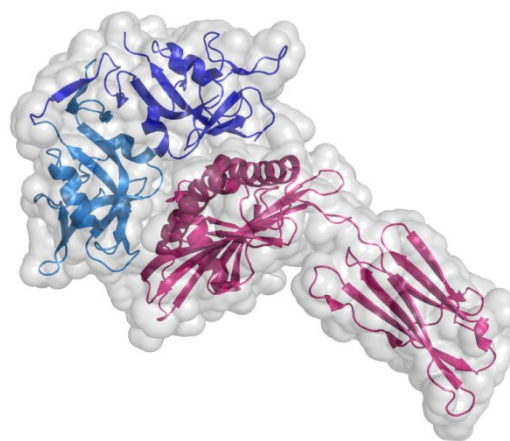


Obr. 1: Schéma dynamické rovnováhy mezi aktivačními a inhibičními receptory NK buněk a zobrazení jednotlivých receptorů s příslušnými ligandy. Po kontaktu buněk NK s cílovými buňkami NK buňky integrují signály z povrchových receptorů. Reaktivita NK buňky je závislá na rovnováze aktivačních a inhibičních signálů. Převzato a upraveno [12].

1.3.2.1 Aktivační receptor NKG2D

Jedná se o homodimerní receptor podobný lektinům C-typu [13]. Každý monomer NKG2D je spojen s dimerem aktivačního adaptoru DAP-10. Toto spojení je zajišťováno iontovou interakcí kladně nabitého argininu přítomného v transmembránovém segmentu NKG2D a záporně nabitých asparagových kyselin v obou transmembránových oblastech dimeru DAP-10 [14], který po navázání ligandu přenáší signál do nitra buňky [15]. Signalizační podjednotky DAP-10 jsou ve vývoji vysoce konzervované a spojují se s velkou řadou receptorů v hematopoetických buňkách. Receptory asociované s DAP-10 rozpoznávají jak ligandy kódované hostitelem, tak ligandy kódované mikrobiálními patogeny, což hraje důležitou roli v nespecifických imunitních reakcích. Molekula NKG2D rozpoznává několik různých ligandů. Předpokládá se, že tato schopnost je způsobena jediným vazebným místem v receptoru s postranními řetězci, které vykazují omezenou flexibilitu.

Jeden z ligandů pro NKG2D je MICA (z angl. MHC class I polypeptide-related chain A) [16]. Gen pro MICA je lokalizován mezi geny pro TNF α a HLA-B a obsahuje dlouhé otevřené čtecí rámce pro molekuly MHC třídy I se třemi odlišnými extracelulárními doménami (α 1, 2 a 3), transmembránový segment a cytoplazmatický úsek, z čehož je každý kódovaný odděleným exonem [17]. Proteinovým produktem je glykoprotein, který je exprimován na povrchu buněk a funguje jako stresem indukovaný antigen. Krystalová struktura lidského ligandu MICA v komplexu s receptorem NKG2D je uvedena na Obr. 2.

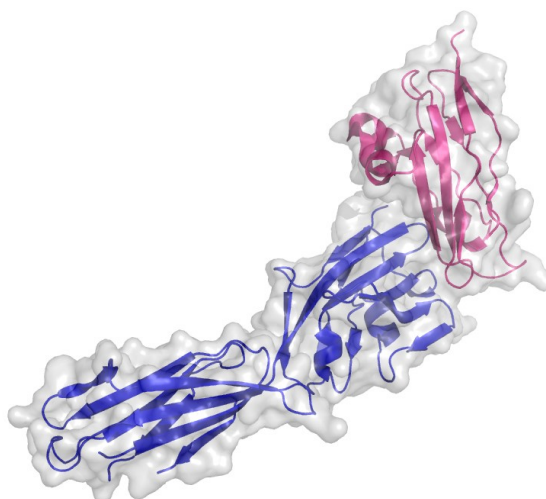


Obr. 2: Krystalová struktura lidského ligandu MICA v komplexu s receptorem NKG2D. Modře je vyznačen dimerní NKG2D receptor, růžovou je označen jeho ligand MICA. Obr. byl vytvořen v programu PyMol (PDB kód 1HYR).

1.3.2.2 Aktivační receptor NKp30

NKp30 je řazen mezi imunoglobulinům (Ig) podobné receptory [18]. Jedná se o transmembránový glykoprotein typu I složený z extracelulární Ig-podobné domény, která je spojena krátkou oblastí, složenou ze šesti zbytků, s transmembránovým segmentem a cytoplazmatickou doménou. Ig-podobná doména NKp30 je tvořena dvouvrstvým β -sendvičem. Dále tento receptor obsahuje dva α -helixy ($\alpha 1$ a $\alpha 2$).

Ligandem pro NKp30 je protein B7-H6, který je členem rodiny B7 [18]. Společným znakem této rodiny je, že extracelulární část tvoří vzhledem k membráně distální doména podobná Ig typu V a k membráně proximální doména podobná Ig typu C. B7-H6 je exprimován na nádorových, nikoliv však na zdravých buňkách. Krystalová struktura NKp30 navázaná na ligand B7-H6 je uvedena na Obr. 3.



Obr. 3: Krystalová struktura komplexu receptoru NKp30 a jeho ligandu B7-H6. Modře je vyznačen receptor NKp30, růžovou je označen jeho ligand B7-H6. Obr. byl vytvořen v programu PyMol (PDB kód 3PV6).

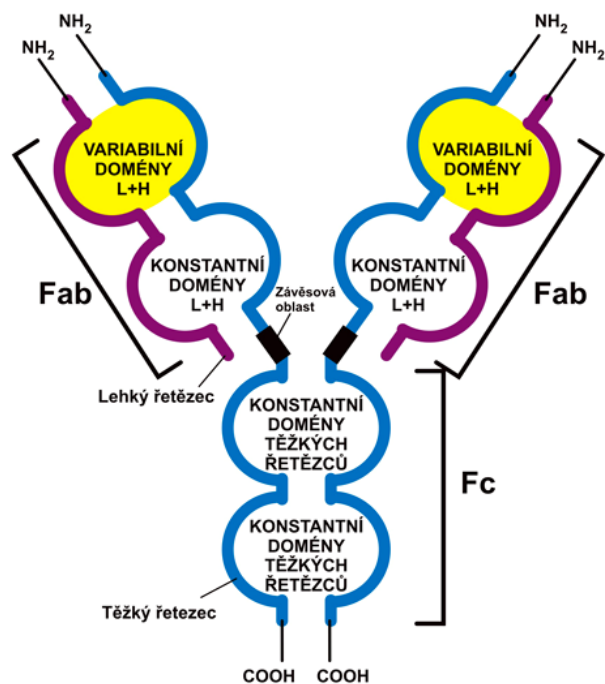
1.4 Využití protilátek v klinické praxi

Protilátky a jim příbuzné proteiny jsou jednou největších a nejrychleji rostoucích tříd proteinových léčiv [19]. Z velké většiny se jedná o monoklonální protilátky, avšak v současné době začínají být hojně využívány také fragmenty protilátek. Fragmenty protilátek mají různou strukturu. Jsou menší než nativní protilátky a postrádají Fc fragment. Jejich menší velikost může zlepšit jejich přístup do tkání a jejich roztoky nejsou

tolik viskózní. Vzhledem ke strukturálním, fyziologickým a farmakologickým vlastnostem poskytují fragmenty protilátek nové biofarmaceutické příležitosti.

1.4.1 Imunoglobulin G, IgG

Molekula imunoglobulinu je tvořena jednotkou ve tvaru písmena Y [19]. Skládá se ze dvou lehkých (L) řetězců a dvou těžkých (H) řetězců spojených pomocí disulfidových vazeb, což umožňuje flexibilitu celé molekuly. Každý řetězec L obsahuje jednu variabilní (V) a jednu konstantní (C) doménu, zatímco každý H řetězec obsahuje jednu doménu V a tři C domény. Variabilní domény protilátky, které se nachází na N-terminálních koncích řetězců, jsou zodpovědné za vazbu k antigenu. Díky tomu, že se liší složením aminokyselin, zajišťují variabilitu a specifitu protilátek. Molekuly imunoglobulinu jsou tedy bivalentní molekuly schopné vázat dva podobné antigeny. Všechny VH a VL domény obsahují tři „hypervariabilní“ oblasti tvořící smyčky, tzv. CDR (z angl. complementarity determining region), které vykazují vyšší proměnlivost sekvencí. Zbývající oblasti domén VH a VL jsou méně variabilní a zahrnují Fr oblasti (z angl. framework), které strukturálně podporují CDR smyčky [19,20]. Schéma struktury IgG je znázorněno na Obr. 4.

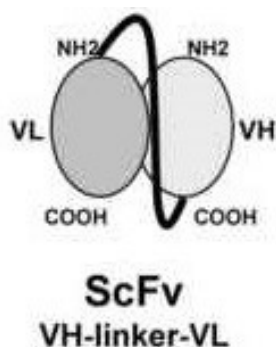


STRUKTURA MONOMERU IMUNOGLOBULINU

Obr. 4: Struktura molekuly imunoglobulinu [21].

1.4.2 Fragment protilátky scFv

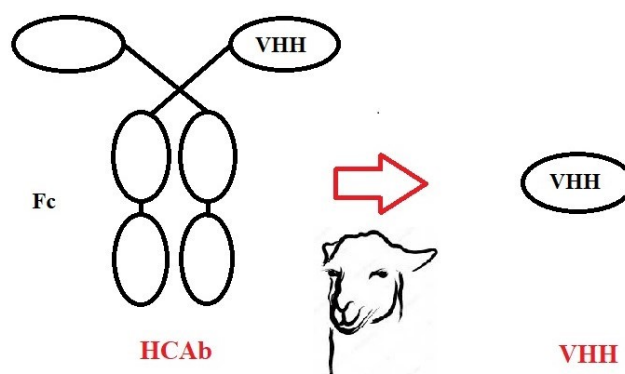
Fragment protilátky nazývaný scFv (z angl. single-chain fragment variable), je tvořen z variabilních oblastí těžkých (VH) a lehkých (VL) řetězců, které jsou spojeny dohromady flexibilní peptidovou spojkou [22]. Délka flexibilní spojky použité pro spojení obou domén je rozhodující pro správné skládání polypeptidového řetězce. Neměla by ovlivňovat schopnosti domén se skládat a nesmí poškodit místo vázající antigen. Správná délka spojky byla odhadnuta na 3.5 nm (35 Å). Kromě délky spojky hraje také roli sekvence aminokyselin. Spojka musí obsahovat hydrofilní sekvenci, aby se zabránilo interakcím uvnitř peptidu nebo mezi variabilními doménami v průběhu skládání proteinu. V dnešní době se nejčastěji používají konstrukty obsahující glycinové a serinové zbytky, které zajišťují linkeru pružnost, společně se zbytky kyseliny glutamové a lysinovými zbytky, které zajišťují zvýšení rozpustnosti. Schéma struktury scFv je znázorněno na Obr. 5.



Obr. 5: Struktura molekuly scFv [23].

1.4.3 Fragment lamí protilátky VHH

Fragment protilátky VHH („single domain antibody“ či „nanobody“) je inspirován protilátkami velbloudů a lam [24]. Struktura molekuly imunoglobulinu (označované HCAs, z angl. heavy chain-only antibodies) se u těchto zvířat od klasické molekuly imunoglobulinu liší tím, že vedle konzervovaného Fc fragmentu obsahuje pouze těžké řetězce složené z jedné variabilní domény (VH). Fragment protilátky VHH je tvořen variabilní oblastí těžkého řetězce (VH) [25]. Jakožto molekula s jednou doménou je VHH protilátka exprimována v buňce bez nutnosti uspořádání do složité kvartérní struktury. Na rozdíl od úplného HCAs imunoglobulinu je VHH protilátka stabilnější a odolnější. Schéma struktury HCAs a VHH je znázorněno na Obr. 6, str. 21.



Obr. 6: Schéma struktury molekuly HCAb a VHH. Převzato a upraveno [26].

1.4.4 Využití monoklonálních protilátek v onkologii

Výhoda využití monoklonálních protilátek v léčbě onkologických onemocnění je v zacílení na cílovou strukturu, což umožňuje zamezit poškození okolní zdravé tkáně [27]. Terapeutické využití protilátek bylo podmíněno snížením jejich imunogenicity. Současná onkologie využívá jak nekonjugované protilátky zaměřené proti cílovému proteinu, tak i konjugované systémy. Protilátky lze konjugovat s efektorovými složkami (např. toxiny, cytokiny, cytostatiky, radionuklidy) a použít je jako transportní systém k cílové buňce. Mezi farmakologické vlastnosti monoklonálních a rekombinantních protilátek patří vysoká specifita pro nádorové antigeny, nízká zkřížená reaktivita s normálními somatickými buňkami, vysoká čistota a ekonomicky schůdná velkoobjemová produkce, možnost předurčit antigenní specifitu, ovlivnění efektorové funkce protilátky a možnost navázání toxinu, cytostatika, radionuklidu nebo cytokinu. Mikroprostředí nádoru a jeho vaskularizace vytvářejí poměrně významnou bariéru pro vstup neporušených makromolekul. Větší molekuly bílkovin obtížněji pronikají do nádorové tkáně. Z těchto důvodů byla provedena řada studií na chemicky nebo geneticky připravených fragmentech protilátek.

V počátečních studiích byly využívány monoklonální protilátky (imunoglobuliny), které byly produkovány hybridomovou technologií [27]. Tyto proteiny byly cizorodé (získané z myši). Důsledkem aplikace myších monoklonálních protilátek nemocnému bylo vyvolání imunitní odpovědi a produkce anti-myších protilátek, nazývaných HAMA (z angl. human anti-mouse antibodies). Tvorba lidských protilátek a imunokomplexů znemožňovala vazbu na nádorový antigen. Tím docházelo k urychlení eliminace léčiva z

krevního oběhu a mohlo docházet k anafylaxi či sérové nemoci. Z těchto důvodů bylo věnováno rozsáhlé úsilí na přípravu lidských monoklonálních a chimerních či humanizovaných myších protilátek. Princip přípravy chimerních protilátek spočívá v propojení hybridomové a DNA rekombinantní technologie, kdy se nejprve získá hybridomovou technologií myší monoklonální protilátka proti nádorovému antigenu, a následně se z hybridomové linie produkující protilátku s příslušnou specifitou připraví RNA a z ní reverzní transkripcí cDNA. Dále jsou amplifikovány úseky genů myšího imunoglobulinu, které kódují hypervariabilní domény. Tato část genetické informace nahradí hypervariabilní domény lidského imunoglobulinu. Geny, které kódují humanizovanou monoklonální protilátku, jsou poté vloženy do vhodné savčí buňky, ve které jsou rekombinantně exprimovány. Výsledná protilátka tedy obsahuje variabilní úsek kódující antigenní specifitu z myší monoklonální protilátky a konstantní úseky z lidského imunoglobulinu.

1.4.4.1 Příklady protilátek využívaných k léčbě nádorových onemocnění

1.4.4.1.1 Bevacizumab

K léčbě nádorových onemocnění se používá například bevacizumab, což je humanizovaná myší monoklonální protilátka typu IgG1 cílená proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF) [28]. Působí tedy jako inhibitor angiogeneze, tvorby cév nebo cévám podobných útvarů v nádoru. Všechny druhy rakovinné tkáně potřebují zásobování krví, aby mohly přežít a růst [29]. Pokud není nádorová tkáň dostatečně zásobena krví, růst se zastavuje a nádor odumírá. Angiogeneze u dospělých jedinců probíhá pouze u nádorových onemocnění nebo jiných patologických jevů. Z tohoto důvodu je inhibice angiogeneze vhodným mechanismem léčby nádorů a léčiva, která takto působí, nepoškozují okolní zdravé tkáně.

1.4.4.1.2 Cetuximab

Cetuximab je chimerní myší monoklonální protilátka typu IgG1, která je cílená proti receptoru EGFR/HER-1 [28]. Aktivací tohoto receptoru dochází také k aktivaci KRAS (z angl. Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homologue), což je krátký peptid vážící GTP, který se účastní transdukce signálu v buňce a stimuluje řadu dalších intracelulárních proteinů, což vyvolává proliferaci, potlačení apoptózy a angiogenezi. Afinita cetuximabu na EGFR receptor je až 10× vyšší než u endogenních ligandů a jeho vazbou dochází

k inhibici receptoru. Studie ukázaly, že cetuximab nefunguje u lidí, jejichž rakovinné buňky tlustého střeva mají genetickou k-ras mutaci (přibližně 40 % pacientů) [30].

1.4.4.1.3 Trastuzumab

Trastuzumab je humanizovaná myší monoklonální protilátka proti receptoru podtypu HER-2 [28]. HER-2 je transmembránový glykoprotein patřícího do rodiny receptorů epidermálního růstového faktoru (EGFR/HER). Obsahuje doménu vázající extracelulární ligand a intracelulární receptorovou tyrosinkinasovou (RTK) doménu. Zvýšení jeho exprese nebo konstitutivní aktivace může spustit proces nádorového bujení včetně angiogeneze a tvorby metastáz. Trastuzumab se váže na HER-2, čímž zastaví růst a dělení rakovinných buněk [31]. Touto protilátkou se léčí časně rakoviny prsu, pokročilé rakoviny prsu a pokročilé rakoviny žaludku.

1.4.4.1.4 Rituximab

Další často terapeuticky používanou protilátkou je rituximab, což je chimerní myší monoklonální protilátka typu IgG1 [28]. Váže se na receptor CD20, což je transmembránový neglykosylovaný fosfoprotein, který je exprimován na povrchu B-lymfocytů a také na aktivovaných, paměťových a nádorových B buňkách (avšak nevyskytuje se na plazmatických B lymfocytech). Protilátka se váže na všechny receptory CD20, které touto vazbou „označí“ pro buňky imunitního systému, které je poté najdou a zabijí [32]. Nízká exprese povrchových molekul CD20 je spojována s chronickou lymfocytární leukémií. Naproti tomu vysoká genová exprese povrchové molekuly CD20 je běžná u tzv. non-Hodgkin lymfomů (rakovina lymfatických uzlin).

1.4.4.1.5 Ofatumumab

Další protilátka rozeznávající CD20, která se rovněž využívá k léčbě chronické lymfocytární leukémie a non-Hodgkin lymfomů, je ofatumumab [28]. Jedná se o plně lidskou protilátku typu IgG1. Váže proximální membránový epitop molekuly CD20 a indukuje aktivaci metabolických cest, které vedou k cytotoxicitě závislé na komplementu a následné lýze nádorových buněk. Ofatumumab indukuje lýzu buněk, které vykazují vysokou i nízkou expresi CD20 a také buněk, které vykazují vysokou hladinu exprese ochranných molekul komplementu. Vazba ofatumumabu také umožňuje aktivaci NK buněk a navození buněčné smrti prostřednictvím ADCC.

1.4.4.1.6 Ibritumomab tiuxetan

Ibritumomab tiuxetan je příkladem konjugované myší monoklonální protilátky [28]. Jde o rituximab konjugovaný s chelátem radioaktivního ^{90}Y [33]. Váže se na antigen CD20, který se nachází na B buňkách. Využívá se k léčbě některých typů non-Hodgkin lymfomu [34]. Jedná se tedy o radioterapeutikum, které je díky konjugaci se specifickou protilátkou cíleně distribuováno do nádoru.

1.5 Imunoterapie pomocí NK buněk

Průběhu historie léčby rakoviny dominovaly především cytotoxické léky a chemoterapie [35]. Tyto tradiční způsoby léčby rakoviny jsou úspěšné v zabíjení rakovinných buněk, avšak způsobují také poškození zdravé tkáně a mají tím pádem vážné vedlejší účinky. Pro imunitní systém člověka je přirozené, že rakovinné buňky jsou ničeny pomocí NK buněk. Současné imunoterapeutické metody se zaměřují především na posilování vlastní přirozené schopnosti těla bojovat proti nemocem a rakovině.

Ve většině případů jsou NK buňky pacientům podávány infuzí [5]. NK buňky jsou aktivovány *in vitro* a/nebo *in vivo* pomocí IL-2. Nemoci pacientů, stav choroby, infuze NK buněk a počet infuzí NK buněk se liší studii od studie. Avšak veškeré publikované studie se shodují, že infuze NK buněk jsou bezpečné a dobře snášené. Zatímco pro myeloidní malignity jsou ve většině studií užívané NK buňky od haploidentických dárců s ohledem na soulad KIR-HLA-I, u nemyeloidních malignit jsou používány NK buňky buď autologní, nebo alogenní a jsou expandovány *in vitro*.

Rozvoj biotechnologie umožnil vytvoření různých rekombinantních fúzních proteinů jako nové třídy bioterapeutik [36]. Jedinečnost fúzních proteinů spočívá v jejich schopnosti spojit dvě nebo více proteinových domén, což poskytuje příležitosti k vytváření nových kombinací funkcí. Bifunkční fúzní proteiny, které jsou konstruované fúzováním genů dvou proteinů dohromady, kombinují funkce rodičovských proteinů, aby se zlepšily jejich farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti, nebo kvůli zavedení nových přístupů k poskytování nebo cílení léčivých přípravků. V článku, který byl publikován v roce 2015, je popsán návrh a následná syntéza bifunkčních fúzních proteinů B7-H6:HER2-scFv a AICL:HER2-scFv (kde znak : značí glycin-serinovou spojku) [37]. Uvedené proteiny obsahují imunoligandy aktivačních receptorů NK buněk a fragmenty protilátek scFv, které se váží na HER-2. Tyto bifunkční proteiny mají zvýšit rozpoznávání nádorových buněk, aktivaci NK buněčných receptorů a spuštění degranulace.

2 Cíle práce

- Příprava expresních vektorů pro fúzní proteiny B7-H6-L-aHER2, MICA-L-aHER2 a aHER2-L-MICA.
- Exprese daných fúzních proteinů v buňkách HEK293T.
- Studium interakce fúzních proteinů a NK buněčných receptorů.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Pomůcky a přístroje

- Automatické pipety Pipetman, Gilson, USA
- Centrifuga Allegra X-22R, Beckman Coulter, USA
- Centrifuga EBA 12R, Hettich, Německo
- Centrifugační zkumavky Oak Ridge, Sigma, USA
- Elektroforetická souprava Liberty 120, Biokeystone, USA
- Filtry pro sterilizaci 0,22 μm , TPP, Švýcarsko
- Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid, USA
- High-Speed Plasmid Mini Kit, Geneaid, USA
- HPLC systém Agilent 1200, Agilent, USA
- HPLC systém ÄKTA basic, GE Healthcare, USA
- Inkubátor CO₂ MC0-18 AIC, Sanyo, Japonsko
- Inkubátor IR 1500, LABsystem Praha, ČR
- Kahan Fuego SCS, VERKON, ČR
- Kolona Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare, USA
- Kolona Superdex 200 Increase 3.2/300, GE Healthcare, USA
- Kolona HiTrap Talon Crude 5 ml, GE Healthcare, USA
- Koncentrátor Amicon Ultra (MWCO 10000), Millipore, USA
- Lahve čtverhranné s prodyšnými víčky, P-Lab, ČR
- Laminární box Labox BIO 126, LABOX, ČR
- Mikrocentrifuga Ministar Silverline, VWR, USA
- NucleoBond Xtra Maxi Kit, Macherey-Nagel, Německo
- Předvážky KB1200-2 Kern, Německo
- Souprava SDS-PAGE, Bio-Rad, Německo
- Spektrofotometr DS-11+, DeNovix, USA
- Termoblok LS1, VLM, Německo
- Termocykler T100, Bio-Rad, Německo
- Třepačka Celltron, Infors HT, Švýcarsko
- Třepačka Multitron Cell, Infors HT, Švýcarsko

- UV prosvěcovací lampa 300 nm, Ultra-Lum, USA
- UV prosvěcovací lampa 312 nm, UVIttec, UK
- Vortexový mixér, VELP Scientifica, Itálie
- Zdroj deionizované vody Milli Q, Millipore, USA
- Zdroj napětí EC 250-90, EC Apparatus Corporation, UK

3.1.2 Chemikálie

- 100 bp DNA standard, New England Biolabs, USA
- 1 kb DNA standard, New England Biolabs, USA
- Agarosa, Sigma, USA
- Akrylamid, Sigma, USA
- Ampicilin, Biotika, SR
- APS, Serva, 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, Slovensko
- Isopropanol, Lach-Ner, ČR
- Kyselina valproová, Sigma, USA
- IPEI 25 kDa, Polysciences, USA
- Pufr NEB1, New England Biolabs, USA
- PCR H₂O, Top-Bio, ČR
- Standard pro SDS-PAGE, Thermo Scientific, USA
- SDS, Jersey Lab Supply, USA
- TEMED, Serva, USA

3.1.3 Bakteriální kmeny a buněčné linie

- *E. coli* DH5- α , Invitrogen, USA
- HEK293T, Dr. Radu Aricescu, University of Oxford, UK

3.1.4 Vektory

- pTW5sec_AICL, Mgr. Barbora Kalousková, Katedra biochemie PŘF UK

3.1.5 PCR primery

- B7H6_linker_REV
5'CCGCCAGATCCTCCGCCTCCCAGGGTAAAGTTGCTCCTCAAG3'
- mB7H6_C_FW
5'TCTTGGAATTACCGGTGATCTGAAAGTA3'
- aHER2_linker_FW
5'GTTCTGGTGGTGGTGGATCTATGGCGGAAGTGCA3'
- aHER2_secN_REV
5' TGGTGGTGGTGGTGGGTACCGCTACTCACAGTTACCTG3'
- MICA_linker_REV
5'CCGCCAGATCCTCCGCCTCCTTTCCCAGAGGGCAC3'
- MICA_E24_pTCCsecC_FW
5'TCTTGGAATTACCGGTGAGCCCCACAGTC3'
- MICA_linker_FW
5'GTTCTGGTGGTGGTGGATCTGAGCCCCACAGTCT3'
- MICA_K299_pTCCsecN_REV
5'TGGTGGTGGTGGTGGGTACCTTTCCCAGAGGGCA3'
- aHER2_linker_REV
5'CCGCCAGATCCTCCGCCTCCGCTACTCACAGTTACCTG3'
- aHER2_secC_FW
5'TCTTGGAATTACCGGTATGGCGGAAGTGCA3'

3.1.6 Roztoky

- Barvicí směs pro SDS-PAGE: 45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% CBB R-250
- Elektrodotový pufr pro SDS-PAGE 10× konc.: 0,25M Tris, 1,9M glycin, 1% (w/v) SDS, pH 8,3
- Eluční pufr pro TALON: 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, 0,25M imidazol, pH 7,0
- MES pufr: 20mM MES, 100 mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 5,0
- HEPES pufr: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 7,5
- Odbarvovací roztok na SDS-PAGE: 35% ethanol, 10% kyselina octová
- PBS: 50mM Na₂HPO₄, 1M NaCl, 10mM NaN₃, pH 7,5
- PBS-TK: 10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH 7,0

- Roztok AA pro SDS-PAGE: 29% akrylamid, 1% N,N' methylenbisakrylamid
- Roztok IPEI: 10 mg/ml IPEI v PBS-TK
- Roztoky pro izolaci zásobního množství plazmidu:
 - Resuspendační pufr: 50mM Tris-HCl, 100 µg/ml RNAsa A, pH 8,0
 - Lyzační pufr: 0,2M NaOH, 1% SDS
 - Neutralizační pufr: 3,1M CH₃COOK, pH 5,5
 - Ekvilibrační pufr: 0,1M CH₃COONa, 0,6M NaCl, 0,15% Triton X-100, pH 5,0
 - Promývací pufr: 0,1M CH₃COONa, 825mM NaCl, pH 5,0
 - Eluční pufr: 100mM Tris-HCl, 1,25M NaCl, pH 8,5
- TAE pufr pro agarosovou elektroforézu: 40mM Tris, 20mM CH₃COOH, 1mM EDTA
- TES pufr: 10mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 8,0
- Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu: 30% glycerol, bromfenolová modř v TAE
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný neredukující: 31,5mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10mM NaN₃, pH 6,8
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný redukující: k 900 µl 5× koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru bylo přidáno 100 µl 2-merkptoethanolu

3.1.7 Kultivační média

- ExCELL 293: komerční médium (Sigma, USA), před použitím doplněno o L-glutamin do výsledné 4mM koncentrace
- LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4

3.2 Metody

3.2.1 Linearizace vektoru

K linearizaci vektoru byly použity restriční endonukleasy KpnI a AgeI. Do reakční směsi o celkovém objemu 50 μ l bylo pipetováno 36,2 μ l dH₂O, 5 μ l pufru NEB1 a 5 μ l BSA (10 μ g/ μ l). Dále bylo pipetováno takové množství plazmidu, aby jeho celkové množství ve směsi bylo 5 μ g. Poté byly přidány obě endonukleasy, a to 2 μ l KpnI (10 U/ μ l) a 1 μ l AgeI (20 U/ μ l). Reakční směs byla poté inkubována 1 hodinu při 37 °C.

3.2.2 Amplifikace inzertů pomocí PCR reakce

K namnožení inzertů DNA byla použita metoda PCR (z angl. polymerase chain reaction, polymerasová řetězová reakce). Do mikrozkušavky byly pipetovány roztoky, jak je uvedeno v Tab. 1. Do každé zkumavky byla pipetovaná dH₂O, reakční pufr, templátová DNA, příslušné primery (výsledná koncentrace 500 nM), roztok směsi dNTPs a polymerasa Q5. Pipetované množství templátové DNA ve směsi bylo vždy 40 ng. Po smíchání byly vzorky centrifugovány na stolní minicentrifuze přibližně 20 sekund, aby nebyly ve vzorku přítomné bubliny. Zkušavky se vzorky byly poté umístěny do termocykleru, na kterém byly nastaveny délky, opakování, teploty jednotlivých cyklů a objem zkumavky (uvedeno v Tab. 2, str. 31). Po posledním cyklu byly mikrozkušavky se vzorky vyjmuty a byla s nimi provedena elektroforéza v agarosovém gelu.

Tab. 1: Složení reakce pro PCR

1) B7H6-L		2) L- aHER2		3) MIC-A-L		4) L- MIC-A		5) aHER2-L	
Templát pTW5sec_mB7H6-2	1 μ l (4 ng)	Templát pET C-tag_aHER2	0,4 μ l (40 ng)	Templát MICA_ORF	4 μ l (40 ng)	Templát MICA_ORF	4 μ l (40 ng)	Templát pET C-tag_aHER2	0,4 μ l (40 ng)
Přední primer - mB7H6_C_FW	2 μ l	Přední primer - aHER2_linker_FW	2 μ l	Přední primer - MICA_E24_pTCCsecC_FW	2 μ l	Přední primer - MICA_linker_FW	2 μ l	Přední primer - aHER2_secC_FW	2 μ l
Reverzní primer - B7H6_linker REV	2 μ l	Reverzní primer - aHER2_secN REV	2 μ l	Reverzní primer - MICA_linker_REV	2 μ l	Reverzní primer - MICA_ORF	2 μ l	Reverzní primer - aHER2_linker REV	2 μ l
Q5	0,25 μ l	Q5	0,25 μ l	Q5	0,25 μ l	Q5	0,25 μ l	Q5	0,25 μ l
Pufr	4 μ l	Pufr	4 μ l	Pufr	4 μ l	Pufr	4 μ l	Pufr	4 μ l
dNTPs	0,25 μ l	dNTPs	0,25 μ l	dNTPs	0,25 μ l	dNTPs	0,25 μ l	dNTPs	0,25 μ l
dH ₂ O	6,5 μ l	dH ₂ O	6,5 μ l	dH ₂ O	6,5 μ l	dH ₂ O	6,5 μ l	dH ₂ O	6,5 μ l
Enhancer	4 μ l	Enhancer	4 μ l	Enhancer	4 μ l	Enhancer	4 μ l	Enhancer	4 μ l

Tab. 2: Průběh PCR reakce v termocykleru

VZOREK 1)			VZORKY 2)-5)		
krok cyklu	Teplota/ °C	Čas/ s	krok cyklu	Teplota/ °C	Čas/ s
1	95	300	1	95	300
2	95	30	2	95	30
3	65	30	3	54	30
4	72	60	4	72	60
5	30 × opakování kroku 2 -4		5	30 × opakování kroku 2 -4	
6	72	600	6	72	600
7	4	∞	7	4	∞

3.2.3 Elektroforéza v agarosovém gelu

V Erlenmayerově baňce byl připraven 1,5% agarosový gel, a to rozpuštěním 0,98 g agarosu v 65 ml TAE pufru krátkým povařením v mikrovlnné troubě. Poté, co gel zchladl natolik, že na baňce bylo možné udržet ruku, byly přidány 3 μ l barvy Good View. Gel byl nalit do připravené elektroforetické aparatury a byl vložen hřeben. Po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřeben a gel byl převrstven 200 ml dH₂O. Do míst pro elektrody bylo nalito 180 ml TAE pufru. Vzorky pro elektroforézu byly připraveny přidáním příslušného množství 6× koncentrované barvy Gel Loading Dye k plazmidu, 3 μ l k linearizovanému plazmidu a 4 μ l k vzorkům po PCR reakci. Vzorky byly nanесeny do jamek gelu. Rovněž bylo pipetováno do jamek také 5 μ l 100 bp a 1 kb standardů velikosti DNA molekul. Elektroforéza probíhala po dobu 20 minut při 200 V. Po proběhnutí elektroforézy byl gel vložen na UV prosvětlovací lampu a vyfotografován.

3.2.4 Extrakce DNA z agarosového gelu

Pod slabou UV lampou byly dané proužky fragmentů DNA vyříznuty z gelu a vloženy do mikrozkuavek. K extrakci byla použita komerční souprava NucleoSpin® Gel and PCR clean-up. Do mikrozkuavky bylo k danému fragmentu DNA pipetováno 500 μ l Binding pufru a roztoky byly inkubovány při 50 °C po dobu 10 minut (dokud se nerozpustila veškerá agarosa). Poté byl veškerý objem rozpuštěného gelu pipetován do kolonek umístěných do mikrozkuavek a ty byly centrifugovány 30 sekund při 24 °C a 11000 × g. Dále bylo do kolonky pipetováno 600 μ l Wash pufru a mikrozkuavky byly opět centrifugovány 30 sekund při 24 °C a 11000 × g. Tento krok byl proveden 2×. Poté byla provedena centrifugace 1 minutu při 24 °C a 11000 × g bez přidávání jakéhokoliv roztoku, aby membrána vyschla. Na závěr byla provedena eluce pomocí 20 μ l Tris pufru o pH 8,0, který byl předem přehřátý na 60 °C. Mikrozkuavky byly centrifugovány

1 minutu při 24 °C a 11000 × g. V eluátech byla spektrofotometricky změřena koncentrace DNA.

3.2.5 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu

Vnesení genu do linearizovaného plazmidu se provádí tzv. Infusion reakcí. Molární poměr komponent insert : štěpený plazmid : glycin-serinová spojka v reakční směsi byl 2 : 1 : 10. Byly spočítány báze v jednotlivých fragmentech DNA a přepočítány na hmotnosti. Z těchto údajů a proměřených koncentrací bylo zjištěno, jaké bude připravované složení reakční směsi. Složení pipetovaných směsí je uvedeno v Tab. 3. Reakční směsi byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C. Poté byla provedena transformace do Z-kompetentních buněk *E. coli* DH5- α [38].

Tab. 3: Složení reakčních směsí pro Infusion reakci.

A) B7H6-L-aHER2 + p*		B) MICA-L-aHER2 +p*		C) aHER2-L-MICA +p*	
1) B7H6_linker_REV	2,2 μ l (28 ng)	3) MICA_linker_REV	1,4 μ l (35 ng)	5) aHER2_linker_REV	0,53 μ l (16 ng)
L (Spojka)	1,2 μ l (1,2 ng)	L (Spojka)	1,2 μ l (1,2 ng)	L (Spojka)	1,2 μ l (1,2 ng)
2) aHER2_linker_FW	0,4 μ l (16 ng)	2) aHER2_linker_FW	0,4 μ l (16 ng)	4) MICA_linker_FW	5 μ l (35 ng)
p* (štěpený plazmid)	5 μ l (100 ng)	p* (štěpený plazmid)	5 μ l (100 ng)	p* (štěpený plazmid)	5 μ l (100 ng)
dH ₂ O	6,2 μ l	dH ₂ O	7 μ l	dH ₂ O	3,27 μ l
Infusion reakční pufr	4 μ l	Infusion reakční pufr	4 μ l	Infusion reakční pufr	4 μ l
Infusion enzym	1 μ l	Infusion enzym	1 μ l	Infusion enzym	1 μ l

3.2.6 Transformace plazmidové DNA

Jako kompetentní buňky pro transformaci byly použity buňky *E. coli* DH5- α . Alikvot bakterií byl ponechán 10 minut při 0 °C, aby rozmrzl, jelikož byl skladován hluboce zamražen (teplota přibližně -80°C). 30–100 μ l bakteriálního alikvotu bylo smícháno s plazmidovou DNA, získanou pomocí Infusion reakce a inkubováno na ledu asi 10 minut. Poté byla bakteriální suspenze rozetřena na misky s ampicilinem (koncentrace 100 μ g/ml). Misky byly přes noc inkubovány při 37 °C.

3.2.7 Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA a PCR z kolonií

Byly vybrány 4 kolonie z každé misky a opatrně nabrány na sterilní špičku. Každá špička byla promyta 6 μ l dH₂O do sterilní mikrozkušavky a poté byla umístěna do 50 ml zkumavky. Do zkumavky se špičkou bylo přidáno 5 ml LB media 5 μ l ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Poté byly zkumavky ponechány 12 hodin na třepačce při 200 ot./min a 37 °C. Do mikrozkušavek s vodou a oplachem ze špičky bylo přidáno 10 μ l EmeraldAmp GT PCR Master Mixu, 2 μ l předního primeru pTT_FW a 2 μ l reverzního primeru pTW5sec_REV. Poté byly vzorky vloženy do termocykleru a byly nastaveny

jednotlivé cykly tak, jak je uvedeno v Tab. 4. Dále byl připraven 1,5% agarosový gel stejným způsobem, jako je uvedeno v podkapitole 3.2.3, str. 31. Jelikož EmeraldAmp GT PCR Master Mix již obsahuje barvu, bylo vždy 20 μ l vzorku rovnou pipetováno do jamek gelu. Dále bylo do gelu rovněž pipetováno 5 μ l 100 bp standardu molekulových hmotností. Elektroforéza probíhala po dobu 20 minut při 200 V. Po proběhnutí elektroforézy byl gel vložen na UV prosvětlovací lampu a vyfotografován. Pomocí PCR z kolonií bylo zjištěno, jestli bylo vložení fragmentů do plazmidu úspěšné.

Tab. 4: Průběh PCR reakce v termocykleru

krok cyklu	Teplota/ °C	Čas/ s
1	95	300
2	95	30
3	54	30
4	72	60
5	20 × opakování kroku 2 -4	
6	72	600
7	4	∞

Poté, co byly zkumavky ponechány přes noc na třepačce, z nich byly vyjmuty špičky a suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut při 4500 \times g. Tímto způsobem byla získána bakteriální peleta. K nízkoobjemové izolaci DNA byla použita komerční souprava NucleoSpin® Plasmid Miniprep kit. Peleta byla resuspendována ve 250 μ l resuspendačního pufru A1, který obsahuje RNAsu. Pomocí automatické pipety byla vzniklá suspenze přenesena do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky. Poté bylo přidáno 250 μ l lyzačního pufru A2, který způsobil alkalickou lýzu. Mikrozkušavka byla jemně promíchána otáčením a poté byla ponechána stát při laboratorní teplotě 2-3 minuty. Dále bylo pipetováno 300 μ l neutralizačního pufru A3. Suspenze byla velmi opatrně promíchána. Poté byly suspenze centrifugovány 5 minut při 24 °C a 20000 \times g. Supernatanty byly přeneseny na kolonky, které byly vloženy do 2 ml sběrných zkumavek, a vše bylo centrifugováno 1 minutu při 24 °C a 11000 \times g. Poté bylo přidáno 600 μ l Wash pufru a zkumavky s kolonkami byly centrifugovány 1 minutu při 24 °C a 11000 \times g. Kolonky byly prosušeny tím, že byly centrifugovány naprázdno 2 minuty při 24°C a 11000 \times g. Poté, co byly kolonky předány do čistých mikrozkušavek, bylo přidáno 20 μ l Elution pufru AE a vše bylo centrifugováno 1 minutu při 24 °C a 11000 \times g. Dalším krokem bylo proměření koncentrací DNA.

3.2.8 Sekvenování DNA

Bylo připraveno 12 vzorků na sekvenaci, vždy čtyři vzorky pro jeden konstrukt. K jednotlivým vzorkům byl vždy přidán buď 1 μ l přímého primeru pTT_FW nebo 1 μ l reverzního primeru pTW5sec_REV. Dále byl každý vzorek zředěn vodou tak, aby se koncentrace DNA pohybovala kolem 200 ng v daném vzorku. Celkový objem reakce byl 8 μ l. Vzorky byly odeslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA ve výzkumném centru BIOCEV.

3.2.9 Velkoobjemová produkce plazmidové DNA

Po sekvenaci, kdy bylo zjištěno, zda se fragmenty DNA správně vložily do plazmidu, byl vždy vybrán jeden vzorek, tedy A B a C. Byla provedena transformace do Z-kompetentních buněk *E. coli* DH5- α (viz podkapitola 3.2.6). Do 2 l Erlenmayerových baňek bylo připraveno 0,5 l LB média a smícháno s 0,5 ml ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Poté byla vybrána 1 kolonie z každé misky, která byla opatrně nabrána na sterilní špičku. Špička byla vhozena do 2l Erlenmayerovy baňky. Baňky byly ponechány na třepačce přes noc při 37 °C a 200 otáček/min. Poté byly suspenze centrifugovány 20 minut při 20°C a 3900 \times g. Pelety byly resuspendovány ve 20 ml TES pufru pomocí vortexového mixéru. Vzniklá suspenze byla centrifugována 10 minut při 20 °C a 3900 \times g. K izolaci plazmidů byla použita komerční souprava NucleoBond Xtra Plasmid Midiprep, resp. Maxiprep. Peleta byla resuspendována na vortexovém mixéru v 9 ml resuspendačního pufru, který byl předem smíchán s 90 μ l RNAsy (koncentrace 60 μ g/ml). Poté bylo přidáno 9 ml lyzačního pufru a suspenze byla opatrně promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 9 ml neutralizačního pufru a suspenze byla opět opatrně promíchána (dokud se neodbarvila) a centrifugována 5 minut při 20 °C a 3900 \times g. Kolona byla smočena 25 ml ekvilibračního pufru. Supernatant byl smíchán s 9 ml ekvilibračního pufru, přefiltrován přes dvojitý skládaný filtr a poté nanesen na kolonu. Poté, co veškerý roztok prokapal, byla kolona promyta 25 ml promývacího pufru. Do 50 ml zkumavky byla provedena eluce 15 ml elučního pufru a k eluátu bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu. Roztok byl promíchán na vortexovém mixéru. Poté byl roztok natažen do injekční stříkačky a pomalu protlačen přes NucleoBond Finalizer filtr. Filtr byl promyt 4 ml 70% ethanolu. Dále byl filtr sušen protlačováním vzduchu pomocí injekční stříkačky. Eluce byla provedena pomocí elučního pufru, který byl natažen do injekční stříkačky a protlačen 5 \times přes filtr. Poté bylo provedeno měření koncentrace DNA pro neředěný a pro 100 \times zředěný vzorek.

3.2.10 Kultivace buněčné linie HEK293T

Kultivace i následná transfekce buněk byla prováděna pod dohledem Mgr. Barbory Kalouskové v místnosti pro tkáňové kultury. Buněčné kultury byly uchovávány v kryozkumavkách při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto zmražené alikvotní podíly buněčné suspenze o objemu 1 ml měly buněčnou hustotu $5 \cdot 10^6$ b/ml. Suspenze byla co nejrychleji rozmrazena ve vodní lázni předehřáté na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přenesena do 10 ml média ExCELL 293 s L-glutaminem. Centrifugací (5 minut při $95 \times g$ a $21\text{ }^{\circ}\text{C}$) byly buňky opláchnuty od supernatantu obsahujícího kryoprotektant (10% DMSO). Buněčná peleta byla resuspendována v 10 ml kultivačního média a přenesena na 10 cm Petriho misku. Buňky byly kultivovány v inkubátoru MC0-18 AIC (Sanyo, Japonsko) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 5% CO_2 . Poté, co se buňky začaly dělit, byly přeneseny do 30 ml čtverhranné lahve a umístěny na třepačku Celltron v inkubátoru. Dále probíhala kultivace při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 135 ot./min v 5% CO_2 .

Jednou za 3–4 dny probíhala subkultivace. Pomocí hemocytometru byla prováděna kontrola buněčné hustoty a nepřítomnosti kontaminací. 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 a zároveň objem původní suspenze činil maximálně 10 % výsledného objemu kultury. Pokud došlo k překročení této hodnoty, suspenze byla centrifugována 5 minut při $95 \times g$ a $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ a peleta byla následně resuspendována v kultivačním médiu. Z důvodu dostatečného provzdušnění tvořila suspenze vždy maximálně 40 % objemu čtverhranné lahve. Takto byly buňky kultivovány až do dosažení plné viability a potřebného počtu buněk pro transfekci.

3.2.11 Produkce proteinů v tranzientně transfekovaných buňkách HEK293T

Buněčná suspenze HEK293T byla centrifugací (5 minut při $95 \times g$ a $21\text{ }^{\circ}\text{C}$) převedena do čerstvého média. Buňky byly resuspendovány v takovém objemu čerstvého média, aby výsledná koncentrace po přidání DNA transfekčního mixu byla $20 \cdot 10^6$ b/ml. Transfekční mix obsahoval 88 % plazmidu pTW5sec s vloženým fúzním proteinem, 10 % plazmidu pTW5_p27 a 2 % plazmidu pTW5_aFGF rozpuštěných v PBS TK. Na $1 \cdot 10^6$ b/ml byl použit 1 μg DNA. Transfekční mix byl zfiltrován přes $0,22\text{ }\mu\text{m}$ filtr k buněčné suspenzi. Na závěr byl přidán IPEI v poměru 4:1 k DNA. Lahev byla umístěna na 4 hodiny na třepačku v inkubátoru (135 ot./min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5 % CO_2). Poté byla buněčná suspenze zředěna médiem na hustotu $2 \cdot 10^6$ b/ml, byly přidány antibiotika (do koncentrace 60 $\mu\text{g/ml}$ penicilinu a 10 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinu) a kyselina valproová (výsledná koncentrace 2 mM).

3.2.12 Sklizení produkce

Buňky byly sklizeny centrifugací šestý den po transfekci nebo když klesla viabilita kultury pod 40 %. Medium s proteiny produkovanými buňkami HEK293T bylo centrifugováno 30 minut při 15°C a 11000 × g a následně bylo zfiltrováno přes filtr o velikosti pórů 0,22 μm. Poté byl filtrát zamrazen (-20 °C), protože purifikace byla provedena až v následujících dnech.

3.2.13 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie byla prováděna na kolonách Talon, které byly nabitě kobaltnatými ionty. Protein se na kolonu vázal pomocí histidinové kotvy. Kolona byla ekvilibrována do PBS pufru a průtok byl nastaven na 5 ml/min. Poté, co byl nanesen vzorek kultivačního média zředěného 1:1 s PBS pufrem a kolona byla promyta PBS pufrem, byl průtok nastaven na 2,5 ml/min. Proteiny byly eluovány pomocí PBS pufru s 250mM imidazolem a frakce byly sbírány do zkumavek. Poté, co byla ukončena eluce, byla kolona promyta MES pufrem, PBS, dH₂O a převedena do 20% ethanolu.

3.2.14 Zkoncentrování proteinů a gelová permeační chromatografie

Proteiny byly zkoncentrovány pomocí koncentrátorů Amicon ultra (velikost pórů 10 kDa). Membrána kolonky koncentrátoru byla nejprve smočena 2 ml PBS. Poté byly do kolonek nanášeny vzorky. Koncentrátory s nanesenými částmi vzorků byly centrifugovány 5 minut při 15 °C a 4000 × g. Toto bylo opakováno, dokud nebyl nanesen celý objem vzorku a objem v kolonce koncentrátoru nebyl snížen pod 500 μl.

Gelová permeační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300 GL. Kolona byla ekvilibrována HEPES pufrem, kterým byla promyta i nástřiková smyčka. Pomocí injekční stříkačky byl do nástřikového ventilu nanesen vzorek a průtok byl nastaven na 0,6 ml/min. Frakce byly jímány do předem připravených sterilních mikrozkušavek. Poté, co proběhla chromatografie, byla kolona promyta 0,5M hydroxidem sodným a 1M kyselinou octovou a poté převedena do dH₂O a 20% ethanolu.

3.2.15 SDS-PAGE

Pomocí SDS elektroforézy v 12,5% polyakrylamidovém gelu byla ověřena čistota získaných proteinů. Byly připraveny 3 gely, pro každý protein jeden. Složení gelu je uvedeno v Tab. 5, str. 37. Nejprve byl připravován separační gel. Gely byly pipetovány mezi předem připravená skla upevněná ve stojáncích a převrstveny dH₂O. Poté,

co separační gely ztuhly, byla dH₂O slita ze separačních gelů a na gely byl pipetován zaostřovací gel, do nějž byl vložen hřeben.

Ze sbíraných frakcí bylo vybráno 7 frakcí o nejvyšší koncentraci proteinu a z těch byly připraveny vzorky pro SDS elektroforézu. Vzorek každé frakce byl připraven jak v redukujícím, tak v neredukujícím vzorkovém pufru. Složení vzorků pro SDS elektroforézu je uvedeno v Tab. 6. Takto připravené vzorky byly inkubovány 10 minut při 100°C a poté byly centrifugovány 4 minuty při 23 °C a 20000 × g.

Do jamek gelu bylo vždy pipetováno 5 μl standardu a do dalších jamek 10 μl vzorku. Elektroforéza probíhala 50 minut při napětí 200 V. Po ukončení elektroforézy byly gely vloženy do barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 a ponechány přes noc na míchačce. Další den byly gely odbarveny pomocí odbarvovacího roztoku.

Tab. 5: Složení gelů pro SDS elektroforézu – množství na 3 gely

Zaostřovací gel		Separační gel – 12,5%	
dH ₂ O	0,75 ml	dH ₂ O	3,8 ml
AA	0,375 ml	AA	5,03 ml
pufr (pH 6,8)	30 μl	pufr (pH 8,8)	3 ml
SDS	30 μl	SDS	120 μl
APS	30 μl	APS	120 μl
TEMED	4 μl	TEMED	6 μl

Tab. 6: Složení vzorků pro SDS elektroforézu

A)		B)		C)	
Frakce (9 - 15)	1 μl	Frakce (9 - 15)	1,5 μl	Frakce (11-17)	1 μl
HEPES pufr	9 μl	HEPES pufr	8,5 μl	HEPES pufr	9 μl
5 × konc. redukující/neredukující pufr	5 μl	5 × konc. redukující/neredukující pufr	5 μl	5 × konc. redukující/neredukující pufr	5 μl

3.2.16 Analytická gelová permeační chromatografie

Měření analytických profilů gelové permeační chromatografie provedl Nikul Khunti, PhD. na HPLC systému Agilent 1200 s použitím kolony Supradex 200 Increase 3.2/300 na synchrotronu Diamond ve Velké Británii. Jako mobilní fáze byl použit HEPES pufr. Proteiny NKG2D a NKp30 byly již dříve připraveny v laboratoři RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. Bezprostředně po chromatografii následovalo ještě měření rozptylu rentgenového záření do malých úhlů (SAXS, z angl. small-angle X-ray scattering; výsledky nejsou součástí této práce). Na kolonu bylo nanášeno vždy 50 μl vzorku. Vzorky byly připraveny,

jak je uvedeno v Tab. 7 (vzorky imunoligandů s NK receptory byly připraveny v molárním poměru 1:1).

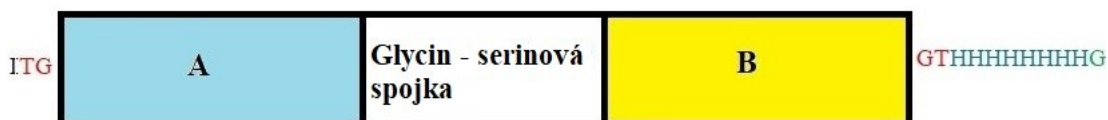
Tab. 7: Složení vzorků pro analytickou gelovou permeační chromatografii

č.	označení	popis	Celková koncentrace proteinu
1	BLH	B7-H6-linker-aHER2	5 mg/ml
2	BLHL	B7-H6-linker-aHER2 + NKp30 (molárně 1:1)	10 mg/ml
3	LBD	NKp30	5 mg/ml
4	MLH	MICA-linker-aHER2	5 mg/ml
5	HLM	aHER2-linker-MICA	5 mg/ml
6	MLHN	MICA-linker-aHER2 + NKG2D (molárně 1:1)	10 mg/ml
7	HLMN	aHER2-linker-MICA + NKG2D (molárně 1:1)	10 mg/ml
8	NKG	NKG2D	5 mg/ml

4 Výsledky

4.1 Sekvence připravovaných fúzních proteinů

Konstrukty připravovaných fúzních proteinů B7-H6-L-aHER2, MICA-L-aHER2 a aHER2-L-MICA (kde L značí glycin-serinovou spojku a aHER2 značí fragment antiHER2 protilátky) byly navrženy obdobně jako v publikacích z roku 2012 [39] a 2015 [37], avšak s obměnou fragmentu protilátky. Zatímco v těchto publikacích byly využity fragmenty scFv, připravované konstrukty obsahovaly fragment VHH [40]. Konstrukty proteinů byly zároveň navrženy tak, aby na svém C-konci nesly histidinovou kotvu. Obecné schéma konstruktů je uvedeno na Obr. 7. V tabulkách 8 – 11 pod Obrázkem 7 jsou uvedeny konkrétní sekvence ligandů, protilátek a glycin-serinové spojky ve fúzních proteinech.



Obr. 7: Schéma připravovaných konstruktů. A značí sekvenci ligandu nebo protilátky, která se nachází na N-konci proteinu. B značí sekvenci ligandu nebo protilátky, která se nachází na C-konci proteinu. Černé I znázorňuje pozůstatek po sekvenci sekrečního signálu, červeně jsou vyznačeny sekvence restričních míst a modře je znázorněna sekvence histidinové kotvy, zeleně je znázorněn glycin.

Tab. 8: Sekvence ligandu B7-H6

A: B7-H6 D25-L246, C212S	
Sekvence nukleotidů	GATCTGAAAAGTAGAGATGATGGCAGGGGGGACTCAGATCACACCCCTGAATGACAATGTCACCA TATTCTGCAATATCTTTTATTCCCAACCCCTCAACATCACGTCTATGGGTATCACCTGGTTTTGGA AGAGTCTGACGTTTGACAAAGAAGTCAAAGTCTTTGAATTTTTGGAGATCACCAAGAGGCATTC CGACCTGGAGCCATTGTGTCTCCATGGAGGCTGAAGAGTGGGGACGCCTCACTGCGGCTGCCTG GAATCCAGCTGGAGGAAGCAGGAGAGTACCGATGTGAGGTGGTGGTCACCCCTCTGAAGGCACA GGGAACAGTCCAGCTTGAAGTTGTGGCTTCCCCAGCCAGCAGATTGTTGCTGGATCAAGTGGGCA TGAAAGAGAATGAAGACAAATATATGTGTGAGTCAAGTGGGTTCTACCCAGAGGCTATTAATAT AACATGGGAGAAGCAGACCCAGAAGTTTCCCCATCCCATAGAGATTTCTGAGGATGTCATCACT GGTCCCACCATCAAGAATATGGATGGCACATTTAATGCTACTAGCAGCTTGAAGCTGAACTCCTC TCAGGAAGACCCTGGGACTGTCTACCAGTGTGTGGTACGGCATGCGTCCTTGCATACCCCTTGA GGAGCAACTTTACCCTG
Sekvence aminokyselin	DLKVEMMAGGTQITPLNDNVTFICNIFYSQLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGDHQEAFRPG AIVSPWRLKSGDASLRLPGIQLEEEAGEYRCEVVVTPLKAQGTQVQLEVVASPARLLLDQVGMKENED

	KYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHIEISEDVITGPTIKNMDGTFNVTSSLKLNSSQEDPGTVYQC VVRHASLHTPLRSNFTL
--	---

Tab. 9: Sekvence ligandu MICA

A, B: MICA E24-K299; K148E	
Sekvence nukleotidů	GAGCCCCACAGTCTTCGTTATAACCTCACGGTGTCTGCTGGGATGGATCTGTGCAGTCAGGGTT TCTCACTGAGGTACATCTGGATGGTCAGCCCTTCTGCGCTGTGACAGGCAGAAATGCAGGGCAA AGCCCCAGGGACAGTGGGCAGAAGATGTCCTGGGAAATAAGACATGGGACAGAGAGACCAGAG ACTTGACAGGGAACGGAAAGGACCTCAGGATGACCCTGGCTCATATCAAGGACCAGAAAGAAG GCTTGCATTCCCTCCAGGAGATTAGGGTCTGTGAGATCCATGAAGACAACAGCACCAGGAGCTC CCAGCATTCTACTACGATGGGGAGCTTCTCTCCAAAACCTGGAGACTGAGGAATGGACAA TGCCCCAGTCTCCAGAGCTCAGACCTTGGCCATGAACGTCAGGAATTTCTTGAAGGAAGATGCC ATGAAGACCAAGACACACTATCACGCTATGCATGCAGACTGCCTGCAGGAACTACGGCGATATC TAAATCCGGCGTAGTCTGAGGAGAACAGTGCCCCCATGGTGAATGTCACCCGCAGCGAGGC CTCAGAGGGCAACATTACCGTGACATGCAGGGCTTCTGGCTTCTATCCCTGGAATATCACACTGA GCTGGCGTCAGGATGGGGTATCTTTGAGCCACGACACCAGCAGTGGGGGGATGCTCTGCCTGA TGGGAATGGAACCTACCAGACCTGGGTGGCCACCAGATTGCGCAAGGAGAGGAGCAGAGGTT ACCTGCTACATGGAACACAGCGGGAATCACAGCACTCACCTGTGCCCTCTGGGAAA
Sekvence aminokyselin	EPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCDRQKCRAPQGGWAEDVLGNKTWDRETRD LTGNKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGLFLSQNLETEEWTPQSS RAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNI TVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVLSHDTQQWGDVLPDNGTYQTWVATRICQGEQRFTCYMEH SGNHSTHPVPSGK

Tab. 10: Sekvence VHH fragmentu antiHER2 protilátky

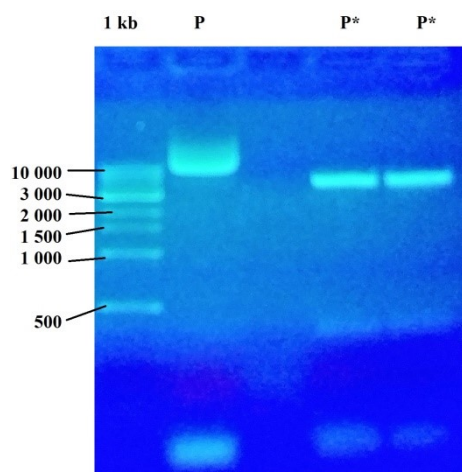
A, B: aHER2	
Sekvence nukleotidů	ATGGCGGAAGTGCAGCTGCAGGCTTCCGGGGGAGGATTTGTGCAGCCGGGGGGTTCATTGCGAC TGAGCTGCGCCGCATCCGGAGCAACATCAAACATCAGTAACATGGGCTGGTTTCGTGAGGCCCT GGCAAGGAGAGAGATTTCGTTCCGCCATCTCCCGTGCAGAATCGCGTCTCTGTATTACGCTGA CAGCGTAAAGGAAGATTTACAATTAGCCGGGATAACTCCAAAACACGGTCTATCTCCAGATG AACAGCCTCAGGGCCGAGGACACAGCTACGTATTACTGTGCATATATGCCTCTGGTTTCGTCACAA GGCATACTGGGGACAGGGGACGCAGGTAACCTGTGAGTAGC
Sekvence aminokyselin	MAEVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGATSNISNMGWFRQAPGKEREVSAISRPLYYADSV KGRFTISRDNKNTVYLQMNLSRAEDTATYCYMPLVRHKAYWQGTQVTVSS

Tab. 11: Sekvence glycin-serinové spojky

Glycin-serinová spojka	
Sekvence nukleotidů	GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGCGGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCC
Sekvence aminokyselin	GGGGSGGGSGGGSGGGGS

4.2 Příprava expresních vektorů

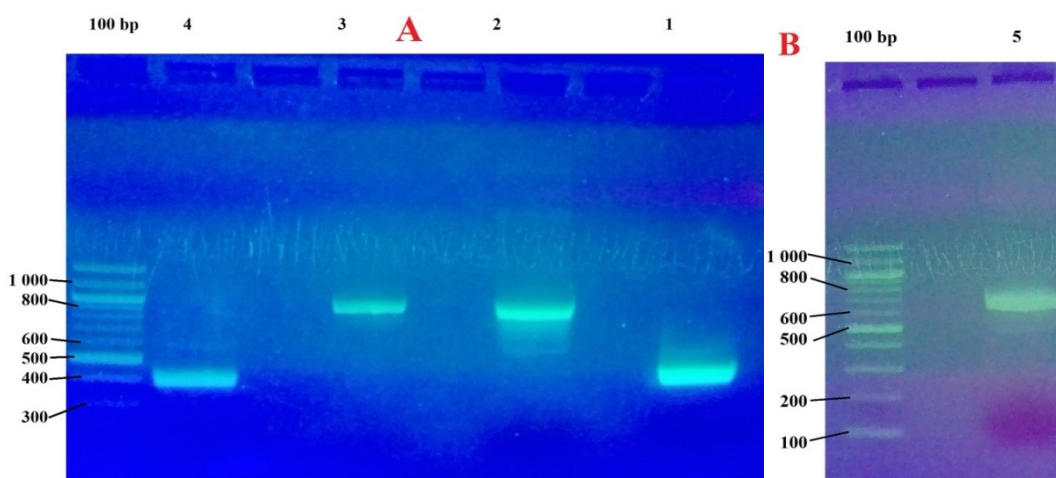
K linearizaci plazmidu pTW5sec_AICL byly použity endonukleasy KpnI a AgeI. Zda linearizace proběhla úspěšně, bylo zjištěno pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. Výsledek elektroforézy je uveden na Obr. 8, str. 41.



Obr. 8: Agarosová elektroforéza linearizovaného plazmidu. V první dráze zleva je možné pozorovat 1kb standard. V dráze označené P je možné pozorovat neštěpený plazmid pTW5sec_AICL a v drahách označených P* linearizovaný plazmid.

4.3 PCR reakce pro inserty

Dále byly zmnoženy jednotlivé geny pro dané části fúzních proteinů pomocí PCR reakce. Složení reakčních směsí pro dané PCR reakce je popsáno v Tab. 1, str. 30. Velikost fragmentů byla rovněž ověřena elektroforézou v agarosovém gelu. Výsledek elektroforézy je uveden na Obr. 9.



Obr. 9: Agarosová elektroforéza PCR produktů. Na obrázku A (vlevo) je zleva možné pozorovat 100 bp standard, dále v dráze označené číslem 1 PCR produkt L-aHER2, v dráze označené číslem 2 MICA-L, v dráze označené číslem 3 L-MICA a v dráze označené číslem 4 aHER2-L. Na obrázku B (vlevo) je zleva možné pozorovat 100 bp standard a dále v dráze označené číslem 5 PCR produkt B7-H6-L.

Poté byly tyto zmnožené úseky DNA extrahovány z gelu a byla změřena jejich koncentrace, aby mohla být ve správném poměru namíchána směs pro ligační reakci. Koncentrace jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 12: Koncentrace PCR produktů po extrakci z gelu. Jako referenční roztok byl použit eluční pufr.

Měřený vzorek	Koncentrace / ng.μl ⁻¹
Linearizovaný plazmid	20
B7-H6-L	13
L-aHER2	41
MICA-L	26
L-MICA	7
aHER2-L	30

4.4 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu a PCR z kolonií

Pro vnesení genu do plazmidu byla zvolena metoda komplementárních přesahů. Všechny DNA inserty měly konce navržené tak, aby po přidání Infusion enzymu vznikly jednovláknové komplementární přesahy. Takto spojený plazmid byl vložen do bakterie, která DNA opraví a namnoží.

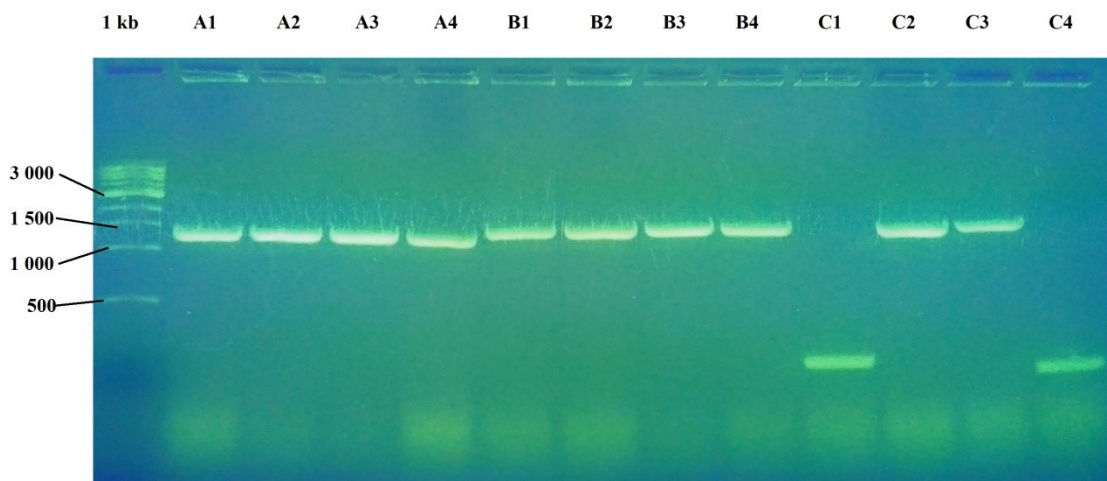
Pro tuto reakci bylo důležité zvolit vhodný molární poměr. Pro směs inzert : glycin-serinová spojka : linearizovaný plazmid byl zvolen poměr 2 : 10 : 1. Pomocí změřených koncentrací a znalosti velikosti jednotlivých komponent byly spočítány pipetované objemy. Přepočty jsou uvedeny v Tab. 13. Poté byly do reakční směsi pipetovány 2 μl Infusion enzymu, 4 μl Infusion pufru a vše bylo doplněno na objem 20 μl. Ligační reakce probíhala 2 hodiny při teplotě 37 °C.

Tab. 13: Různé vyjádření poměrů jednotlivých komponent ligační reakce

Komponenta	Velikost v párech bází	Molární poměr	Poměr ve femtomolech	Poměr v nanogramech	Pipetovaný objem
Linearizovaný plazmid	5000 bp	1	31 fmol	100,00 ng	5,0 μl

B7-H6-L	703 bp	2	62 fmol	28,29 ng	2,2 μ l
MICA-L	868 bp	2	62 fmol	34,93 ng	1,4 μ l
L-MICA	868 bp	2	62 fmol	34,93 ng	5,0 μ l
L-aHER2	403 bp	2	62 fmol	16,22 ng	0,4 μ l
aHER2-L	403 bp	2	62 fmol	16,22 ng	0,53 μ l
L	60 bp	10	310 fmol	12,07 ng	1,2 μ l

Celý objem ligační směsi byl transformován do Z-kompetentních buněk *E. coli* DH5- α a vzniklá suspenze byla natřena na misky s LB agarem, který obsahoval antibiotikum ampicilin. Misky byly inkubovány přes noc při 37°C. Poté byly na každé misce vybrány 4 kolonie a byla provedena PCR z kolonií (viz podkapitola 3.2.7, str. 32). Byly použity specifické primery pTT_FW a pTW5sec_REV. Vzorky byly posléze vyhodnoceny pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. Výsledek elektroforézy je uveden na Obr. 10.



Obr. 10: Agarosová elektroforéza PCR z kolonií. V první dráze zleva je 1 kb standard. Písmeno A značí konstrukt B7-H6-L-aHER2, písmeno B konstrukt MICA-L-aHER2 a písmeno C konstrukt aHER2-L-MICA. Dále jsou za písmeny vždy uvedena čísla, která značí číslo kolonie odebrané po transformaci buněk *E. coli* DH5- α .

Vždy byly vybrány dvě pozitivní kolonie, ze kterých byla provedena nízkoobjemová příprava plazmidové DNA (viz podkapitola 3.2.7, str. 32). Poté byly proměřeny koncentrace jednotlivých připravených DNA konstruktů. Výsledky měření koncentrací jsou uvedeny v Tab. 14.

Tab. 14: Koncentrace jednotlivých DNA konstruktů po nízkoobjemové přípravě plazmidové DNA. Jako referenční roztok byl použit eluční pufr.

Měřený vzorek	Koncentrace / ng.μl ⁻¹
BLH1	960
BLH3	860
MLH2	574
MLH4	840
HLM2	790
HLM3	660

Ze získaných vzorků DNA konstruktů byly připraveny vzorky na sekvenaci, čímž bylo ověřeno, zda se jednotlivé komponenty správně vložily do plazmidu.

4.5 Velkoobjemová produkce plazmidové DNA

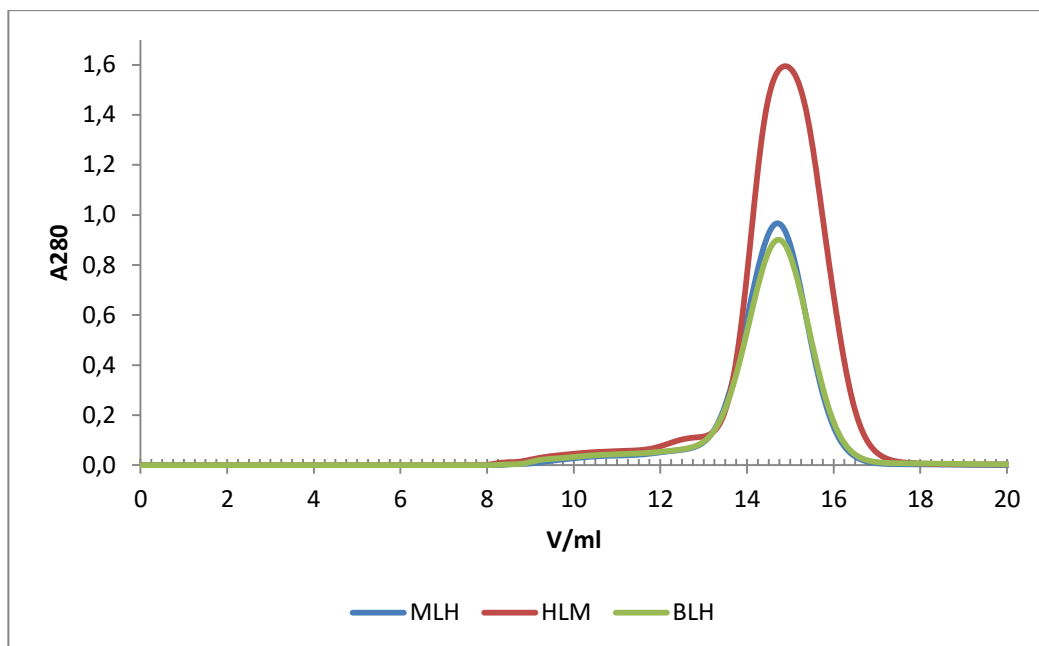
Poté, co bylo pomocí sekvenace ověřeno, že se konstrukty do plazmidu vložily správně, byl vybrán vždy jeden vzorek každého konstruktu, se kterým byla provedena velkoobjemová produkce (viz podkapitola 3.2.9, str. 34). Poté byla změřena koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích (měřeno proti elučnímu pufru). Výsledky měření koncentrací jsou uvedeny v Tab. 15.

Tab. 15: Koncentrace jednotlivých DNA konstruktů po velkoobjemové přípravě plazmidové DNA. Jako referenční roztok byl použit eluční pufr.

Měřený vzorek	Koncentrace / ng×μl ⁻¹
BLH1	3486
MLH4	1488
HLM2	3035

4.6 Produkce fúzních proteinů v linii HEK293T

K produkci proteinů byla zvolena buněčná linie HEK293T. Tato buněčná linie byla transfekována připravenými expresními vektory. Poté byly transfekované buňky týden inkubovány v objemu 200 ml při 37 °C. Produkce byly sklizeny a purifikovány pomocí afinitní chromatografie na kolonách Talon na základě koordinační vazby histidinové kotvy na Co²⁺ ionty. Eluát byl zkoncentrován přibližně na 500 μl a byla provedena gelová permeační chromatografie. Byla použita kolona Superdex 200 10/300 GL. Průběh chromatografie je pro jednotlivé proteiny znázorněn na Obr. 11, str. 45.



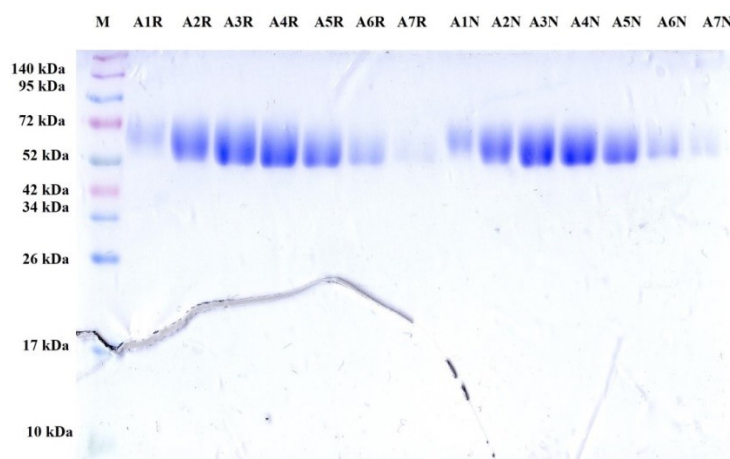
Obr. 11: Průběh gelové permeační chromatografie pro proteiny produkované v buňkách HEK293T. Zeleně je znázorněn eluční vrchol pro protein B7-H6-L-aHER2 (BLH), modře je znázorněn eluční vrchol pro protein MICA-L-aHER2 (MLH) a červeně je znázorněn eluční vrchol pro protein aHER2-L-MICA (HLM). Kolona Superdex 200 10/300 GL.

Z každé gelové permeační chromatografie bylo sebráno 9 frakcí po 0,5 ml, v nichž byla spektrofotometricky při 280 nm změřena koncentrace. Koncentrace jsou uvedeny v Tab. 16.

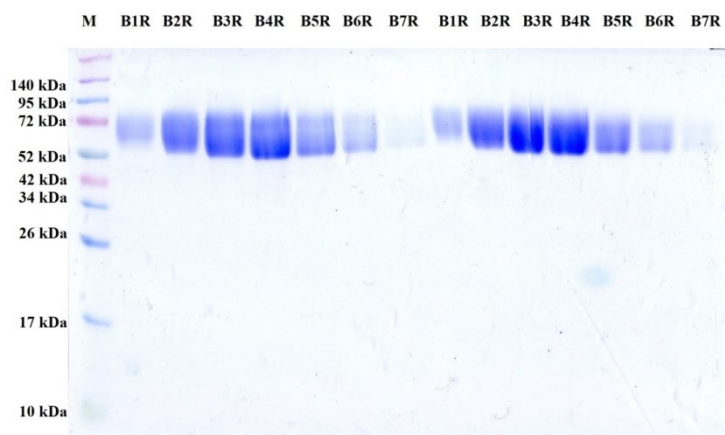
Tab. 16: Koncentrace purifikovaných fúzních proteinů. Jako referenční roztok byl použit HEPES pufr.

Frakce	Koncentrace proteinu/ ng.μl ⁻¹		
	BLH	MLH	HLM
1	0,216	0,139	0,250
2	0,420	0,319	0,417
3	1,112	0,772	1,570
4	2,384	1,897	4,321
5	3,419	2,818	6,613
6	3,559	2,745	6,349
7	2,236	1,689	4,444
8	1,097	0,810	2,189
9	0,458	0,333	0,958
Celkem mg	7,451	5,761	13,556

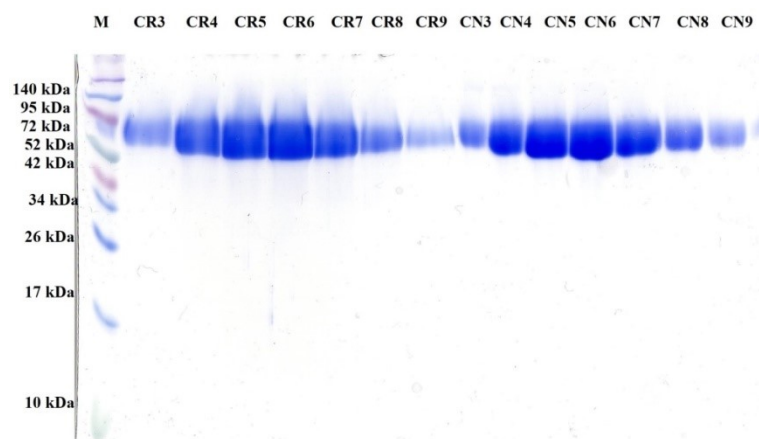
Bylo vybráno 7 nejkonzentrovanejších frakcí a byla provedena SDS elektroforéza v 12,5% polyakrylamidovém gelu. Vzorky pro SDS elektroforézu byly připraveny jak v redukujícím, tak neredukujícím pufru. Výsledek elektroforézy pro jednotlivé fúzní proteiny je znázorněn na Obr. 12, Obr. 13 a Obr. 14, str. 47.



Obr. 12: SDS elektroforéza proteinu B7-H6-L-aHER2 (A) produkovaného v buňkách HEK293T. V první dráze zleva je možné vidět standard, který je označen písmenem M. Do prvních sedmi drah zleva byly pipetovány vzorky v redukujícím (R) pufru a ve zbylých sedmi byly pipetovány vzorky v neredukujícím (N) pufru. Číslo značí sbíranou frakci.



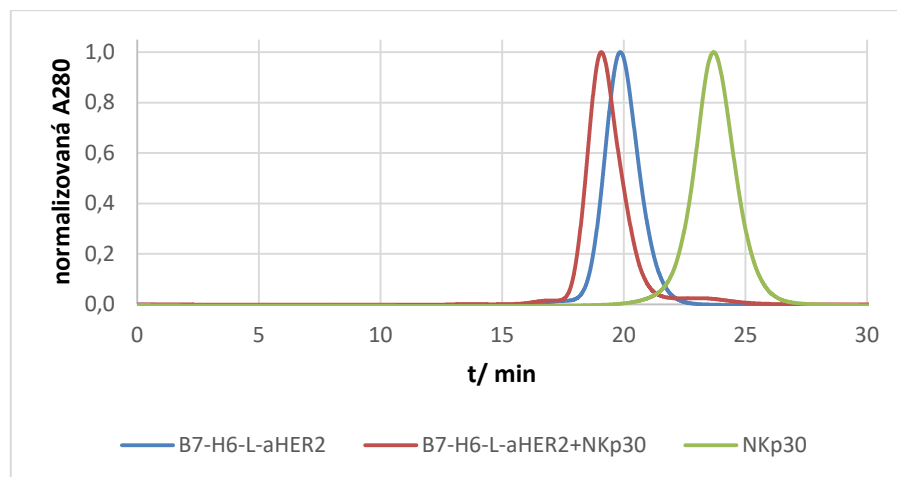
Obr. 13: SDS elektroforéza proteinu MICA-L-aHER2 (B) produkovaného v buňkách HEK293T. V první dráze zleva je možné vidět standard, který je označen písmenem M. Do prvních sedmi drah zleva byly pipetovány vzorky v redukujícím (R) pufru a ve zbylých sedmi byly pipetovány vzorky v neredukujícím (N) pufru. Číslo značí sbíranou frakci.



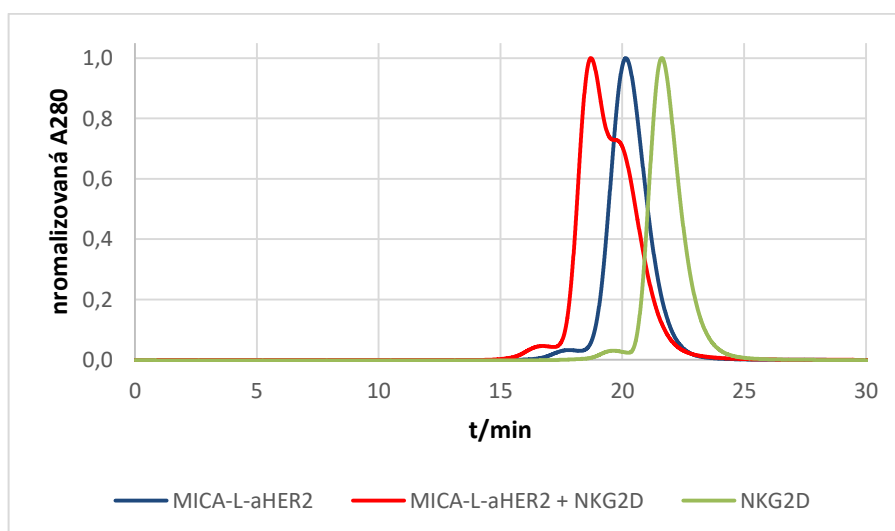
Obr. 14: SDS elektroforéza proteinu aHER2-L-MICA (C) produkovaného v buňkách HEK293T. V první dráze zleva je možné vidět standard, který je označen písmenem M. Do prvních sedmi drah zleva byly pipetovány vzorky v redukujícím (R) pufru a ve zbylých sedmi byly pipetovány vzorky v neredukujícím (N) pufru. Číslo značí sbíranou frakci.

4.7 Studium interakce fúzních proteinů a NK buněčných receptorů

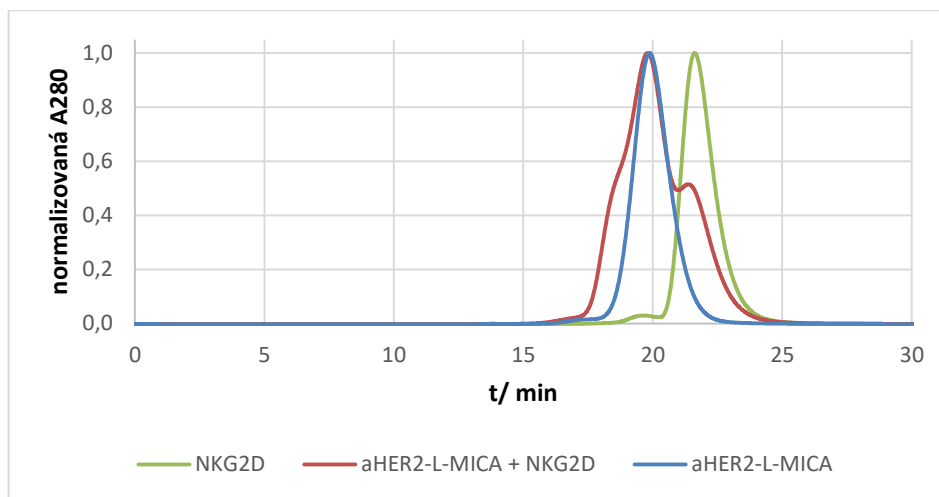
Interakce připravených proteinů a NK buněčných receptorů byla zkoumána pomocí analytické gelové permeační chromatografie. Chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 Increase 3.2/300. Vždy byla nejprve provedena chromatografie s NK buněčným receptorem, poté s fúzním proteinem a nakonec s fúzním proteinem interagujícím s NK buněčným receptorem. Na základě porovnání elučních objemů a tvarů elučních vrcholů lze usuzovat, zda daný fúzní protein s NK buněčným receptorem interaguje. Chromatogramy pro jednotlivé proteiny jsou uvedeny na Obr. 15, str. 48, na Obr. 16, str. 48 a na Obr. 17, str. 49. V Tab. 17, str. 49 jsou uvedené predikované molekulové hmotnosti.



Obr. 15: Srovnání elučních profilů z gelové permeační chromatografie proteinu B7-H6-L-aHER2, NK buněčného receptoru NKp30 a jejich směsi. Modře je vyznačen eluční vrchol pro fúzní protein, zeleně pro receptor NKp30 a červeně pro jejich ekvimolární směs.



Obr. 16: Srovnání elučních profilů z gelové permeační chromatografie proteinu MICA-L-aHER2, NK buněčného receptoru NKG2D a jejich směsi. Modře je vyznačen eluční vrchol pro fúzní protein, zeleně pro NK buněčný receptor a červeně pro jejich ekvimolární směs.



Obr. 17: Srovnání elučních profilů z gelové permeační chromatografie proteinu aHER2-L-MICA, NK buněčného receptoru NKG2D a jejich směsi. Modře je vyznačen eluční vrchol pro fúzní protein, zeleně pro NK buněčný receptor a červeně pro jejich ekvimolární směs.

Tab. 17: Tab. s predikovanými molekulovými hmotnostmi

č.	označení	popis	Predikovaná molekulová hmotnost
1	BLH	mB7H6-linker-aHER2	40,9 kD
2	BLHL	mB7H6-linker-aHER2 + NKp30 (molárně 1:1)	54,1 kDa
3	LBD	NKp30	17,5 kDa
4	MLH	MICA-linker-aHER2	47,8 kDa
5	HLM	aHER2-linker-MICA	47,8 kDa
6	MLHN	MICA-linker-aHER2 + NKG2D (molárně 1:1)	65,3 kDa
7	HLMN	aHER2-linker-MICA + NKG2D (molárně 1:1)	65,3 kDa
8	NKG	NKG2D	17,4 kDa

5 Diskuse

Účelem této práce byla příprava fúzních proteinů B7-H6-L-aHER2, MICA-L-aHER2 a aHER2-L-MICA v buněčné linii HEK293T a následné zkoumání interakce těchto fúzních proteinů a příslušných NK buněčných receptorů.

Všechny tři geny se povedlo vložit do plazmidů a poté byly všechny proteiny úspěšně produkovány v buněčné linii HEK293T. Jak si je možné všimnout na chromatogramu na Obr. 11, str. 45, protein B7-H6-L-aHER2 a MICA-L-aHER2 se produkovaly ve srovnatelné míře, zatímco protein aHER2-L-MICA, který má NK buněčný ligand na C-konci proteinu, byl produkován v daleko větší míře.

Interakce připravených proteinů a NK buněčných receptorů byla zkoumána pomocí analytické gelové permeační chromatografie. V každém chromatogramu je viditelný samostatný nástřik pro daný fúzní protein, pro daný NK buněčný receptor a pro směs fúzního proteinu s NK buněčným receptorem. Molární poměr mezi NK buněčným receptorem a daným proteinem byl vždy 1:1. Pro protein v interakci s daným NK buněčným receptorem by měl být viditelný eluční vrchol s nižším retenčním časem, jelikož velikost komplexu je větší než velikost jednotlivých složek.

Na chromatogramu pro protein B7-H6-L-aHER2 (Obr. 15, str. 48) je pro protein v interakci s NK buněčným receptorem vidět symetrický vrchol, který má nižší retenční čas než vrcholy pro NKp30 a samostatný fúzní protein. Lze tedy usuzovat, že tento protein velmi dobře interaguje s NK buněčným receptorem. Na chromatogramu pro protein MICA-L-aHER2 (Obr. 16, str. 48) je vrchol pro protein v interakci s NK buněčným receptorem již nesymetrický. Ovšem lze usuzovat, že většina proteinu s NK buněčným receptorem reagovala. Zvlnění vrcholu v části, která se překrývá s vrcholem pro samostatný fúzní protein, poukazuje na nenavázaný protein. Až po prohlédnutí tohoto chromatogramu jsme si uvědomily, že vzorky, které obsahovaly NK buněčný ligand MICA a jeho receptor NKG2D, byly namíchány ve špatném stechiometrickém poměru, jelikož NKG2D tvoří homodimery a s MICA interaguje jako celý homodimer (Obr. 2, str. 17). Správný stechiometrický poměr by tedy měl být 1:2 (fúzní protein : monomer NKG2D). Na chromatogramu pro protein aHER2-L-MICA (Obr. 17, str. 49) je vrchol pro fúzní protein v interakci s NK buněčným receptorem rovněž nesymetrický a jeho velká část včetně vrcholu se překrývá s vrcholem pro samostatný fúzní protein. V přední části vrcholu je viditelné mírné zvlnění, z čehož lze usuzovat, že se jedná o fúzní protein tvořící

komplex s NK buněčným receptorem. Naproti tomu zvlnění druhé části píku poukazuje na nenavázaný NK buněčný receptor. Jelikož je zde obdobný problém se stechiometrickým poměrem (poměr fúzní protein : monomerní NK buněčný receptor byl 1:1 namísto 1:2), lze tvrdit, že tento fúzní protein s NK buněčným receptorem interaguje opravdu špatně.

Z těchto získaných informací lze vyvozovat, že nativnější struktura fúzního proteinu, který obsahuje NK buněčný ligand MICA a fragment VHH antiHER2 protilátky, bude v případě, pokud se NK buněčný ligand nachází na N-konci proteinu a fragment protilátky na C-konci proteinu. Vysvětlením může být, že MICA je na C-konci zanořený do membrány a přirozeně asociuje s proteiny v cytoplazmě. Proto není vazba na NK buněčný receptor narušena, pokud je na C-konci připojen na glycin-serinovou spojku.

Zajímavé je, že i když byl protein aHER2-L-MICA produkován buňkami v daleko větším množství, účinněji interagoval s NK buněčným receptorem protein MICA-L-aHER2. Lze tedy usuzovat, že je tento konstrukt stabilnější, avšak stabilita v tomto případě nekoreluje se schopností proteinu se vázat na daný NK buněčný receptor. Proto, i když se protein produkuje v menším množství, pro další práci bude využit konstrukt MICA-L-aHER2, jelikož je pro dané účely rozhodující právě schopnost interagovat s NK buněčným receptorem. Pozorování učiněná s pomocí gelové permeační chromatografie budou dále ověřována přímým měřením afinity jednotlivých fúzních proteinů k daným receptorům, např. pomocí metody rezonance povrchového plazmonu.

V této práci je popsána příprava daných konstruktů a ověření vazby na příslušný NK buněčný receptor. Dalším krokem bude ověření vazby z druhé strany, tedy na HER2⁺ buněčnou linii. Předmětem další práce s připravenými konstrukty bude jejich další charakterizace a budou využívány jako kontrolní molekuly.

6 Závěr

- Byly úspěšně připraveny expresní vektory pro fúzní proteiny B7-H6-L-aHER2, MICA-L-aHER2 a aHER2-L-MICA.
- Dané fúzní proteiny byly úspěšně produkovány v buňkách HEK293T.
- Pomocí analytické gelové permeační chromatografie byla ověřena interakce fúzních proteinů a NK buněčných receptorů.

7 Seznam použité literatury

1. Ferencík, M. (2005) *Imunitní systém: informace pro každého* (Grada Publishing a.s., Praha).
2. Hořejší, V. (2013) *Základy imunologie* (Triton, Praha).
3. Kopecký J., Kopecký O. (2010) NK buňky, chemokiny a chemokinové receptory. *Klin. Onkol.* **23**, 5–9.
4. Topham, N.J., Hewitt, E.W. (2009) Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* **128**, 7–15.
5. Martín-Antonio, B., Suñe, G., Perez-Amill, L., Castella, M., Urbano-Ispizua, A., (2017) Natural Killer Cells: Angels and Devils for Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–17.
6. Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., Kershaw, M.H. (2011) Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 216–24.
7. Moretta, L., Moretta, A. (2004) Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* **23**, 255–59.
8. Barrow, A.D., Trowsdale, J., (2006) You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1646–53.
9. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (2012) URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Immunoreceptor_tyrosine-based_activation_motif&oldid=511847411 [navštíveno 22. března 2018].
10. Knorr, D.A., Bachanova, V., Verneris, M.R., Miller, J.S. (2014) Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Semin. Immunol.* **26**, 161–72.
11. Hudspeth, K., Silva-Santos, B., Mavilio, D. (2013) Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells. *Front. Immunol.* **4**.
12. Leung, W. (2014) Infusions of Allogeneic Natural Killer Cells as Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3390–3400.
13. Smyth, M.J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W.M., Hayakawa, Y. (2005) NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J. Exp. Med.* **202**, 583–88.
14. Garrity, D., Call, M.E., Feng, J., Wucherpfennig, K.W. (2005) The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 7641–46.
15. Lanier, L.L. (2009) DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 150–60.
16. MICA MHC class I polypeptide-related sequence A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100507436#gene-expression> [navštíveno 23. března 2018].
17. Gambelungho, G., Ghaderi, M., Cosentino, A., Falorni, A., Brunetti, P., Falorni, A., Sanjeevi, C.B. (2000) Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes. *Diabetologia* **43**, 507–14.

18. Li, Y., Wang, Q., Mariuzza, R.A. (2011) Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *J. Exp. Med.* **208**, 703–14.
19. Rodrigo, G., Gruvegård, M., Van Alstine, J.M. (2015) Antibody Fragments and Their Purification by Protein L Affinity Chromatography. *Antibodies* **4**, 259–77.
20. Protilátky | LabGuide.cz – Průvodce laboratoří URL: <http://labguide.cz/protilatky/> [navštíveno 27. března 2018].
21. Soubor:IMUNOGLOBULIN.png – WikiSkripta URL: <https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:IMUNOGLOBULIN.png> [navštíveno 25. března 2018].
22. Ahmad, Z.A., Yeap, S.K., Ali, A.M., Ho, W.Y., Alitheen, N.B.M., Hamid, M. (2012) URL: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2012/980250/> [navštíveno 27. března 2018].
23. Recombinant Antibody Engineering - Antibodies - Fossil Hunters URL: <https://www.fossilhunters.xyz/antibodies/recombinant-antibody-engineering.html> [navštíveno 27. března 2018].
24. Maass, D.R., Sepulveda, J., Pernthaner, A., Shoemaker, C.B. (2007) Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J. Immunol. Methods* **324**, 13–25.
25. VHH antibody properties URL: <https://www.hybribody.com/contenu/synthetic-vhh-library-menu/take-advantage-of-vhh-antibody-properties> [navštíveno 27. března 2018].
26. Nanobodies URL: http://www.invivosaglik.com/nanobodies_63_en.html [navštíveno 27. března 2018].
27. Cwierotka, K., Hajdúch, M., Trojanec, R., Špačková, M., Mud.K. (2005) Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klin. Farmakol. Farm.* **18**, 165–70.
28. Farsa, O., (2013) Terapeutické monoklonální protilátky v léčbě a ve vývoji. *Chem. listy* **107**, 464–70.
29. Bevacizumab (Avastin) | Cancer in general | Cancer Research UK URL: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/bevacizumab> [navštíveno 22. dubna 2018].
30. Cetuximab (Erbix) | Cancer in general | Cancer Research UK URL: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/cetuximab> [navštíveno 22. dubna 2018].
31. Trastuzumab (Herceptin) | Cancer information | Cancer Research UK URL: [http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/trastuzumab?_adal_sd=find.cancerresearchuk.org.1524407403091&_adal_ca=so%3DGoogle%26me%3Dorganic%26ca%3D\(not%2520set\)%26co%3D\(not%2520set\)%26ke%3D\(not%2520set\).1524407403091&_adal_cw=1524406385323.1524407403091&_adal_id=7fef723b-95c2-405e-b6dc-b9ac902f628e.1524406385.2.1524407401.1524406385.baaa5fd2-cfd4-4013-b772-baaf2d75d065.1524407403091&_ga=2.66311982.1491677350.1524406385-768765051.1524406385](http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/trastuzumab?_adal_sd=find.cancerresearchuk.org.1524407403091&_adal_ca=so%3DGoogle%26me%3Dorganic%26ca%3D(not%2520set)%26co%3D(not%2520set)%26ke%3D(not%2520set).1524407403091&_adal_cw=1524406385323.1524407403091&_adal_id=7fef723b-95c2-405e-b6dc-b9ac902f628e.1524406385.2.1524407401.1524406385.baaa5fd2-cfd4-4013-b772-baaf2d75d065.1524407403091&_ga=2.66311982.1491677350.1524406385-768765051.1524406385) [navštíveno 22. dubna 2018].
32. Rituximab (Mabthera) | Cancer in general | Cancer Research UK URL: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/rituximab> [navštíveno 22. dubna 2018].

33. What is ZEVALIN? | ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan) URL: <http://www.zevalin.com/patient/is-zevalin-right-for-you/what-is-zevalin> [navštíveno 22. dubna 2018].
34. NCI Dictionary of Cancer Terms URL: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms> [navštíveno 2. dubna 2018].
35. Cancer Immunotherapy Natural Killer „NK“ Cells Therapy URL: <https://stemcellthailand.org/natural-killer-cells-nk-cell-cancer/> [navštíveno 3. dubna 2018].
36. Chen, X., Zaro, J.L., Shen, W.-C. (2012) Pharmacokinetics of recombinant bifunctional fusion proteins. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **8**, 581–95.
37. Peipp, M., Derer, S., Lohse, S., Staudinger, M., Klausz, K., Valerius, T., Gramatzki, M., Kellner, C. (2015) HER2-specific immunoligands engaging NKp30 or NKp80 trigger NK-cell-mediated lysis of tumor cells and enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Oncotarget* **6**, 32075–88.
38. Z-Competent™ E. Coli Transformation | Transformation (Genetics) | Bacteria URL: [https://www.scribd.com/document/147444609/Z-Competent™-E-Coli-Transformation](https://www.scribd.com/document/147444609/Z-CompetentTM-E-Coli-Transformation) [navštíveno 25. května 2018].
39. Kellner, C., Maurer, T., Hallack, D., Repp, R., Winkel, J.G.J. van de, Parren, P.W.H.I., Valerius, T., Humpe, A., Gramatzki, M., Peipp, M. (2012) Mimicking an Induced Self Phenotype by Coating Lymphomas with the NKp30 Ligand B7-H6 Promotes NK Cell Cytotoxicity. *J. Immunol.* **189**, 5037–46.
40. Djender, S., Schneider, A., Beugnet, A., Crepin, R., Desrumeaux, K.E., Romani, C., Moutel, S., Perez, F., de Marco, A. (2014) Bacterial cytoplasm as an effective cell compartment for producing functional VHH-based affinity reagents and Camelidae IgG-like recombinant antibodies. *Microb. Cell Fact.* **13**, 1–10.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka