

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Bc. Jana Houserová**

**Studium interakce receptoru NKp46 s adhesinem Epa1**

Study of the interaction of receptor NKp46 with adhesin Epa1

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: *RNDr. Ondřej Vaněk, PhD.*

Konzultant: *Mgr. Barbora Kalousková*

Praha, 2020

## **Prohlášení**

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

V Praze, 14.8.2020

Podpis:

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli, RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D., za odborné konzultace spojené s touto prací. Dále bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Barboře Kalouskové za cenné rady, pomoc při návrhu experimentů a při jejich vyhodnocení a za ochotu kdykoliv pomoci. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Denisu Cmuntovi za pomoc při měření průtokové cytometrie a Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu za pomoc při měření termoforézy. Také děkuji Mgr. Ondřeji Skořepovi a RNDr. Janu Bláhovi, Ph.D. a dalším bývalým i současným členům laboratoře 204 za příjemné a inspirativní pracovní prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za velkou podporu během celé doby studia.

Tato práce byla podpořena z projektu BIOCEV (ERDF CZ.1.05/1.1.00/02.0109), Grantovou agenturou České republiky (18-10687S), Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (LTC20078 v rámci programu COST CA15126) a Univerzitou Karlovou (GA UK 1436020).

## Abstrakt

Jednou ze složek nespecifického imunitního dohledu organismu jsou NK buňky (z angl. natural killer cells, přirozeně zabíječské buňky). Úkolem NK buněk je vyvolat apoptosu u cílových buněk (například buněk rakovinných či virově infikovaných). Cílové buňky jsou rozpoznávány pomocí povrchových receptorů. NK buňky mají na svém povrchu aktivační a inhibiční receptory.

Mezi aktivační receptory patří receptor přirozené cytotoxicity NKp46. Jedním z několika dosud popsaných ligandů tohoto receptoru je adhesin Epa1 (z angl. epithelial adhesin 1) kvasinky *Candida glabrata*. Neschopnost těla spustit imunitní odpověď a bránit se kvasinkové infekci způsobuje vážné komplikace u pacientů s hematologickým onemocněním, tzv. invazivní kandidózy. NK buňky se začínají využívat také v rámci imunoterapie nádorů, konkrétně bispecifické fúzní proteiny, které se jednou částí váží na receptor NK buňky a druhou částí na nádorový antigen.

Tato práce se zaměřuje na přípravu rekombinantního proteinu NKp46. Pro studium vlivu O-glykosylace na vazbu ligandu byl připraven mutant glykosylačního místa NKp46 T225A. Proteiny byly produkovány stabilně transfekovanými liniemi HEK293S GnTI<sup>-</sup> a HEK293T.

Protein Epa1 byl produkován v expresním systému *E. coli* a poté purifikován. Schopnost vazby proteinu Epa1 a laktosy byla ověřena pomocí dvou měření v roztoku (termoforézy a izotermální kalorimetrie). Pro studium interakce proteinu NKp46 s proteinem Epa1 byly navrženy bispecifické fúzní varianty ligandu Epa1 obsahující nanoprotlátka cílící na receptor HER2.

Vazba Epa1 a fúzních proteinů Epa1 na povrch buněk byla ověřována pomocí průtokové cytometrie. Pro studium vazby byly využity transfekované linie HEK293T produkující receptor NKp46 a NKp46 T225A, buněčná linie NK92MI a buněčná linie SK-BR3 produkující receptor HER2 na svém povrchu. Specifickou vazbu variant proteinu Epa1 na povrch buněk se nepodařilo naměřit.

**Klíčová slova:** NK buňka, NKp46, Epa1, fúzní protein, nanoprotlátka, HER2, HEK293

## Abstract

One of the key components of the innate immune system are natural killer (NK) cells. The task of these cells is to induce apoptosis in target cells (e.g., cancer or virally infected cells). The target cells are identified by their interaction with surface receptors of the NK cells. On the surface of the NK cells, there are activating and inhibiting receptors. One of the activating receptors is the natural cytotoxicity receptor NKp46. Several ligands of this receptor have been identified, one of them being the epithelial adhesin Epa1 of yeast *Candida glabrata*. The invasive candidiasis caused by this yeast is a feared complication for patients with haematological diseases. The use of the NK cells in immunotherapy includes bispecific fusion proteins which can bind to the NK receptor with one part and to tumour antigen with the other part.

This work focuses on recombinant preparation of the NKp46 protein. To facilitate a study of the effects of O-glycosylation on the binding of the ligands, a mutation of the glycosylation site NKp46 T225A was prepared. A stably transfected HEK293S GnT1<sup>-</sup> and HEK293T cells had been prepared and these proteins were then extracellularly secreted.

The Epa1 protein had been produced in *E. coli* bacterial expression system and purified. The binding ability of the Epa1 protein and lactose was verified by two measurements in solution (thermophoresis and isothermal titration calorimetry). Recombinant bispecific fusion proteins (that consist of the Epa1 protein and a nanobody-targeting tumour antigen HER2) were prepared to allow the study of the interactions of the NKp46 and the Epa1 proteins.

The ability of the Epa1 and bispecific fusion proteins to bind to the surface of cells was verified by flow cytometry. The following lines were used in the process: the HEK293T transfected lines producing NKp46 and NKp46 T225A receptors, the NK92MI cell line, and the SK-BR3 cell line producing the HER2 receptor. Unfortunately, attempts to measure the specific binding of the Epa1 protein variants on the surface of the cells were not successful.

**Key words:** NK cells, NKp46, Epa1, fusion protein, nanobody, HER2, HEK293

# Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Použité zkratky .....	9
1 Úvod .....	12
1.1 Imunitní systém.....	12
1.1.1 Nespecifické imunitní mechanismy.....	12
1.1.2 Specifické imunitní mechanismy.....	13
1.1.3 Imunitní dohled nad bakteriemi, plísněmi a viry .....	14
1.1.4 Imunitní dohled nad nádory .....	15
1.1.5 NK buňky.....	19
1.1.6 Receptory NK buněk .....	22
1.1.7 Receptory přirozené cytotoxicity.....	23
1.1.8 Receptor NKp46 .....	25
1.2 Adhesin Epa1 .....	27
1.2.1 Struktura Epa1 .....	28
1.3 Interakce receptoru NKp46 a adhesinu Epa1 .....	29
2 Cíle práce.....	30
3 Materiál.....	31
3.1 Použité chemikálie .....	31
3.2 Enzymy .....	32
3.3 Pufry a roztoky .....	32
3.4 Použité přístroje .....	33
3.5 Buněčné kmeny a linie .....	34
3.6 Kultivační média .....	35
3.7 Plasmidy.....	35

3.7.1	Vektory a kotransfekční plasmidy .....	35
3.7.2	Templáty pro PCR .....	35
3.8	Oligonukleotidy.....	35
3.8.1	Primery pro PCR.....	36
3.8.2	Sekvenační primery .....	36
3.9	Soupravy .....	36
4	Metody.....	37
4.1	Příprava rekombinantních vektorů.....	37
4.1.1	Štěpení restrikčními enzymy .....	37
4.1.2	Elektroforéza v agarosovém gelu .....	37
4.1.3	Měření koncentrace a čistoty DNA .....	37
4.1.4	Polymerasová řetězová reakce.....	38
4.1.5	Polymerasová řetězová reakce s komplementárními přesahy .....	38
4.1.6	Izolace z agarosového gelu .....	39
4.1.7	Vnesení genu do linearizovaného plasmidu .....	39
4.1.8	Transformace kompetentních buněk.....	39
4.1.9	PCR z kolonií.....	40
4.1.10	Nízkoobjemová izolace plasmidové DNA .....	40
4.1.11	Sekvenace DNA.....	41
4.1.12	Velkoobjemová izolace plasmidové DNA .....	41
4.2	Produkce proteinů v bakteriálním expresním systému .....	42
4.3	Práce s buněčnou linií HEK293S GnT <sup>-</sup> a HEK293T.....	43
4.3.1	Určování buněčné hustoty .....	43
4.3.2	Kultivace buněčných linií .....	43
4.3.3	Transientní transfekce linie HEK293 .....	43
4.3.4	Příprava stabilně transfekovaných linií HEK293 .....	44
4.3.5	Produkce proteinů ve stabilních liniích .....	45

4.4	Purifikace proteinů .....	45
4.4.1	Chelatační afinitní chromatografie .....	45
4.4.2	Afinitní chromatografie na laktosové koloně .....	46
4.4.3	Koncentrování proteinů .....	46
4.4.4	Gelová permeační chromatografie.....	46
4.4.5	Dialýza.....	47
4.4.6	Výměna pufru .....	47
4.4.7	Měření koncentrace proteinů .....	47
4.4.8	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	47
4.4.9	Elektropřenos proteinů.....	48
4.4.10	Imunodetekce.....	49
4.5	Studium struktury proteinů a jejich interakcí v roztoku.....	49
4.5.1	Hmotnostní spektrometrie.....	49
4.5.2	Izotermální mikrotitrační kalorimetrie.....	49
4.5.3	Termoforéza s využitím vnitřní fluorescence proteinů.....	50
4.5.4	Termoforéza pro analýzu interakce NKp46 s Epa1 .....	51
4.6	Studium vazby proteinů na buněčný povrch.....	51
4.6.1	Příprava linií exprimujících na svém povrchu NKp46 .....	51
4.6.2	Kultivace linie NK92MI .....	52
4.6.3	Kultivace linie SK-BR3 .....	52
4.6.4	Průtoková cytometrie.....	52
5	Výsledky.....	54
5.1	Příprava expresních vektorů.....	54
5.1.1	Příprava plasmidu pro expresi rozpustného NKp46WT a NKp46M.....	54
5.1.2	Příprava plasmidů pro vytvoření linií exprimujících na svém povrchu NKp46WT a NKp46M .....	56
5.1.3	Příprava vektorů pro expresi fúzních proteinů Epa1 .....	56



5.2	Produkce proteinů .....	60
5.2.1	Produkce NKp46WT a NKp46M .....	60
5.2.2	Výběr produkčního systému pro fúzní protein Epa1 .....	63
5.2.3	Produkce fúzních proteinů Epa1 .....	65
5.2.4	Produkce Epa1 .....	68
5.3	Studium struktury a interakce proteinů v roztoku.....	71
5.3.1	Hmotnostní spektrometrie.....	71
5.3.2	Izotermální mikrotitrační kalorimetrie.....	72
5.3.3	Termoforéza s detekcí vnitřní fluorescence tryptofanu .....	74
5.3.4	Termoforéza pro analýzu interakce NKp46 s Epa1 .....	75
5.4	Studium vazby proteinů na buněčný povrch.....	76
5.4.1	Příprava linií exprimujících na svém povrchu receptor NKp46.....	76
5.4.2	Studium vlivu O-vázané glykosylace NKp46 na threoninu 225 na vazbu Epa1 .....	78
5.4.3	Vazba proteinu Epa1 na receptor NKp46 vyskytující se na povrchu NK buněčné linie NK92MI .....	79
5.4.4	Interakce Epa1 fúzních proteinů s linií exprimující HER2 receptor .....	80
6	Diskuse .....	81
7	Závěr.....	88
8	Literatura .....	89

## Použité zkratky

AA	akrylamid, prop-2-enamid
ADCC	cytotoxická odpověď závislá na protilátkách (z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity)
aFGF	kyselý růstový faktor fibroblastů (z angl. acidic fibroblast growth factor)
APC	antigen prezentující buňky (z angl. antigen presenting cells)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
ATP	adenosintrifosfát
BCR	receptory B-lymfocytů (z angl. B-cell receptor)
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BiKE	bispecifické protilátky přitahující NK buňky (z angl. bi-specific killer engagers)
bp	pár bází DNA (z angl. base pair)
CBB	modř Coomassie brilliant (z angl. Coomassie brilliant blue)
CD	diferenciační skupina (z angl. cluster of differentiation)
DAMP	molekulární vzor asociovaný s poškozením (z angl. damage associated molecular pattern)
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
dNTPs	deoxynukleotidtrifosfáty
EBV	virus Epstein-Barrové
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFR	receptor epidermálních růstových faktorů (z angl. epidermal growth factor receptor)
EPA	skupina epiteliálních adhesinů (z angl. epithelial adhesion protein)
Epa1	epiteliální adhesin 1
FSC-A	rozptyl v přímém směru (z angl. forward scatter area)
Fv	variabilní fragment protilátky (z angl. fragment variable)
GPI-CWP	skupina proteinů buněčné stěny závislé na glykosylfosfatidylinositolu (z angl. glycosylphosphatidylinositol-dependent cell wall proteins)
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk (z angl. human embryonic kidney cells 293)
HER2	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. epidermal growth factor receptor)
HLA	antigen lidského leukocyty (z angl. human leukocyte antigen)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)

IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
ILC	vrozené lymfoidní buňky (z angl. innate lymphoid cells)
iNOS	indukovatelná syntetasa oxidu dusnatého (z angl. inducible nitric oxide synthase)
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
ITAM	imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrosinu (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITC	izotermální mikrotitrační kalorimetrie (z angl. isothermal microtitration calorimetry)
ITIM	imunoreceptorový inhibiční motiv na bázi tyrosinu, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)
KIR	zabíječský receptor z imunoglobulinové rodiny (z angl. killer-cell immunoglobulin-like receptor)
LILR	receptor leukocytů podobný imunoglobulinům (z angl. leukocyte Ig-like receptor)
LIR	receptor z imunoglobulinové rodiny na povrchu lymfocytů (z angl. leukocyte Ig-like receptors)
LRC	region na chromozomu 19q13.4 kódující imunoglobulinové receptory (z angl. leukocyte receptor complex)
IPEI	lineární polyethylenimin
mAb	monoklonální protilátka (z angl. monoclonal antibody)
MHC gp	glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu (z angl. major histocompatibility complex glycoprotein)
NBT	roztok modrého barviva (z angl. nitro blue tetrazolium chloride)
NCR	receptory přirozené cytotoxicity (z angl. natural cytotoxicity receptor)
NKC	region na chromozomu 12p13.1 kódující lektinům C-typu podobné receptory (z angl. natural killer complex)
NKG2	rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu (z angl. natural killer group 2)
NKp30	transmembránový NK buněčný receptor o velikosti 30 kDa
NKp44	transmembránový NK buněčný receptor o velikosti 44 kDa
NKp46	transmembránový NK buněčný receptor o velikosti 46 kDa
NKT	přirozeně zabíječské T lymfocyty (z angl. natural killer T cells)
PAMP	molekulární vzor asociovaný s patogenem (z angl. pathogen associated molecular pattern)

PSA	prostatický specifický antigen
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PMSF	fenylmethan sulfonylfluorid (z angl. phenylmethane sulfonyl fluoride)
sIgA	sekretovaný imunoglobulin A
scFv	jednovláknový variabilní fragment protilátky (z angl. single-chain fragment variable)
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulphate)
SSC-A	rozptyl v bočním směru (z angl. side scatter area)
TAA	antigeny asociované s nádory (z angl. tumour-associated antigens)
TCR	receptor T-lymfocytů (z angl. T-cell receptor)
TLR	receptor podobný genu Toll (z angl. Toll-like receptors)
TriKE	trispécifická protilátka přitahující NK buňky (z angl. tri-specific killer engagers)
TSA	antigeny specifické pro nádory (z angl. tumour-specific antigens)
TEMED	tetramethylethylendiamin (z angl. tetramethylethylenediamine)
Th	pomocný T-lymfocyt (z angl. helper T-cell)
TNF	faktor nekrotizující nádory (z angl. tumour necrosis factor)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
(v/v)	objemový zlomek
(w/v)	hmotnost/objem
(w/w)	hmotnostní zlomek

# 1 Úvod

## 1.1 Imunitní systém

Imunitní systém patří mezi regulační mechanismy organismu. Hlavní funkcí imunitního systému je obranyschopnost organismu, zahrnující rozpoznání a ochranu před patogenními organismy a toxickými látkami. Další funkcí je autotolerance, která zaručuje rozpoznání organismu vlastních tkání a toleranci systému vůči nim. Poslední funkcí je imunitní dohled, který rozpoznává vnitřní škodliviny, např. staré, poškozené či mutované buňky [1]. Rozpoznání je zprostředkováno na základě látek nazývaných antigeny. Tyto látky mohou být různého původu – cizorodé látky (exoantigeny) nebo antigeny vlastní organismu (autoantigeny). Exoantigen, který spustí patologickou imunitní reakci se nazývá alergen. Z hlediska chemického složení jsou antigeny nejčastěji makromolekuly, které jsou buď rozpustné nebo přítomné na buněčném povrchu. Jedná se o proteiny, komplexní polysacharidy, lipidy nebo lipoproteiny. Imunitnímu systému také pomáhají neimunitní obranné mechanismy. Jedná se o mechanické (pohyb řasinek nebo tekutiny v močových cestách), chemické (enzymy, mastné kyseliny nebo kyselé pH žaludku) a mikrobiální (nepatogenní flóra) mechanismy [1].

Imunitní systém reaguje na cizorodé nebo vlastní látky systémem mechanismů. Podle evolučního stáří a přítomnosti v organismu se mechanismy dělí na vrozené (neadaptivní) a antigenně specifické (adaptivní). Oba tyto mechanismy zahrnují jak buněčné, tak humorální složky [2].

### 1.1.1 Nespecifické imunitní mechanismy

Vrozené mechanismy jsou evolučně starší a vyskytují se v menší či větší míře u všech organismů. Mechanismus účinku je postaven na přítomnosti molekul a buněk, které reagují na antigeny podle strukturních a funkčních rysů. Mezi buněčné zástupce vrozené imunity se řadí fagocytující buňky (dendritické buňky, neutrofilní granulocyty, makrofágy) a přirozeně cytotoxické buňky (NK buňky – z angl. natural killer cells). Humorální složky jsou zastoupeny komplementovým systémem, interferony, lektiny či sérovými proteiny [1]. Buňky nespecifické imunity rozpoznávají strukturní motivy na povrchu patogenních buněk (např. mikroorganismů). Tyto konzervované struktury se nazývají PAMP (z angl. pathogen associated molecular pattern). Příkladem těchto struktur mohou být lipopolysacharidy, peptidoglykany, glukany nebo manany. Dále umí buňky nespecifické imunity rozeznávat

molekuly, které jsou za normálního stavu uvnitř buněk, např. ATP, kyselinu močovou, nukleotidy či intracelulární molekuly. Tyto molekuly se do extracelulárního prostoru dostávají z poškozených buněk z důvodu poškození membrány či nekrózy. Těmto molekulám se souhrnně říká DAMP (z angl. damage associated molecular pattern). Při porovnání rychlosti zásahu jsou vrozené mechanismy rychlejší, reagují v řádech minut [1,3].

### 1.1.2 Specifické imunitní mechanismy

Antigenně specifická imunita je známá u obratlovců a je evolučně mladší. Mechanismus reakcí je založen na specifických molekulách tzv. protilátkách. Tyto protilátky patří do humorálních mechanismů. Pro spuštění adaptivních mechanismů je třeba součinnost s vrozenými mechanismy imunity, které po setkání s určitým antigenem iniciují rozvoj těchto mechanismů. Plný rozvoj adaptivní imunity je v řádu několika dní až týdnů, ale tyto mechanismy poskytují organismu imunitní paměť. Během této doby dojde k diferenciaci imunitních buněk pod přímým vlivem antigenů, až vzniknou zralé vysoce specifické efektorové buňky [1].

Kooperace vrozené a adaptivní imunity je klíčová pro rozvoj účinných mechanismů. Většina buněk imunitního systému se tvoří z kmenových buněk, které se po celý život v malém množství udržují v kostní dřeni. Následným dělením a diferenciací vznikají dvě linie: myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie diferenciací dále vznikají trombocyty, dendritické buňky, makrofágy, neutrofilové, eozinofily a bazofily. Dendritické buňky, monocyty a makrofágy, které jsou součástí nespecifické imunity jsou velmi důležité jako buňky prezentující antigen (APC, z angl. antigen presenting cells) pro T-lymfocyty. Z druhé linie lymfoidní vznikají diferenciací T a B lymfocyty a ILC buňky (z angl. innate lymphoid cells), mezi které se řadí také NK buňky [1,4].

Pro rozpoznání antigenu buňkami imunitního systému jsou důležité molekuly, které se nacházejí na povrchu buněk nebo jsou buňkami imunitního systému sekretovány. Na povrchu T a B lymfocytů se nacházejí antigenně specifické receptory (TCR, BCR). Na povrchu buněk se nacházejí MHC glykoproteiny I a II. třídy (z angl. major histocompatibility complex), u člověka jsou konkrétními zástupci těchto glykoproteinu molekuly HLA (z angl. human leukocyte antigen), dále se na povrchu buněk nacházejí receptory pro koncovou část imunoglobulinu (Fc část) tzv. Fc receptory. Buňkami jsou dále sekretovány kostimulační molekuly, imunoglobuliny, cytokiny aj. [3,4].

### 1.1.3 Imunitní dohled nad bakteriemi, plísněmi a viry

Během evoluce jsou organismy ve stálém kontaktu s ostatními organismy. Zvláštní skupinou jsou komenzální nebo saprofytické organismy, které se během evoluce staly součástí organismu hostitele a zabezpečují v organismu výživu či detoxikaci. Potenciální patogeny jsou pro organismu infekční a mohou u jedince vyvolat onemocnění. Průnik patogenů do organismu spouští nespecifické a později specifické mechanismy imunity. Patogenní organismy mohou v organismu způsobovat různé druhy infekcí: lokalizované či difúzní, inaparentní, benigní až těžké, akutní nebo chronické. První linií obrany proti patogenním mikroorganismům jsou tělesné povrchy pokryté slizniční imunitou [1,5].

Extracelulární bakterie jsou eliminovány opsonizací složkami komplementu, lektiny a protilátkami. Díky přítomnosti komplementu se k cílovým bakteriím dostávají neutrofilní granulocyty a makrofágy. Pohlcené bakterie jsou zlikvidovány mikrobicidními systémy, například NADPH-oxidasami nebo lysozomálními peptidy. V pozdější fázi jsou stimulované také antigenně specifické složky imunity, a to B lymfocyty. Do likvidace patogenů se zapojují také cytokiny (IL-2, IL-3 či TNF), které indukují zvýšení teploty a spouští syntézu proteinů akutní fáze v hepatocytech. B a T lymfocyty produkují celou řadu protilátek, především IgM a IgG1. Velký význam v boji proti bakteriím a plísním má IL-17, který produkují  $CD4^+$  lymfocyty Th17. Při obraně proti intracelulárním parazitům (mykobakteriím, kvasinkám či plísním) makrofágy a dendritické buňky při pohlcení patogenu produkují IL-12, který diferencuje prekurzory Th lymfocytů. Tyto lymfocyty následně produkují IFN- $\gamma$ . Cytokiny dále indukují enzym iNOS (indukovatelná syntetasa oxidu dusnatého), který je zodpovědný za produkci oxidu dusnatého z argininu. Oxid dusnatý působí baktericidně. Intracelulární paraziti jsou nebezpeční zejména pro osoby s poruchami imunitního systému [6].

Hlavní mechanismy při boji s virovými patogeny zaujímají interferony a NK buňky. Infikované buňky a dendritické buňky indukují produkci INF- $\alpha$  a INF- $\beta$  (souhrnně interferony I), které inhibují replikaci viru. Makrofágy při kontaktu s viry začínají produkovat IL-12, který je silným aktivátorem NK buněk. Dalšími mechanismy obrany jsou protilátky IgA, které snižují adhezi virů na epitel sliznic. Při proniknutí viru do krevního oběhu jsou hlavní imunitní mechanismy zastoupeny neutralizačními protilátkami IgG a IgM. Pro diferenciaci T lymfocytů jsou důležité fragmenty virových částic, které jsou prezentovány na povrchu buňky v komplexu s MHC gp I [6].

Mikroorganismy používají mechanismy, jak uniknout imunitní odpovědi hostitelského organismu. Jedná se především o vstup do buněk a integrace do genomu. Takto schování dokážou patogeny v buňce přežít dlouho dobu, v této době jsou latentní. Tuto strategii využívají například herpetické viry. Dále mohou patogeny měnit varianty povrchových molekul, potlačovat expresi MHC gp I, potlačovat prezentaci antigenu, potlačovat zánětlivé reakce či inhibovat komplement. Mohou také štěpit protilátky sIgA (sekreční imunoglobulin A) nebo využívat cytokiny k vytvoření optimálního životního prostředí pro replikaci [1].

#### **1.1.4 Imunitní dohled nad nádory**

Malígní transformace buněk je nejčastěji spojena s mutacemi onkogenů a anti-onkogenů. Tyto geny ve zdravé buňce kódují proteiny zodpovědné za buněčnou signalizaci, regulaci buněčné adhezivity, transkripční faktory nebo jsou zodpovědné za apoptosu. Mutace v těchto genech vede k abnormálnímu dělení buněk, úniku z tkáňové lokalizace, což vede k rozšíření do jiných tkání. Tyto transformované buňky jsou tělu vlastní a jakákoliv změna by měla znamenat odpověď imunitního systému, přesto však tyto buňky mohou imunitnímu systému uniknout - buď jsou příliš málo rozdílné od normálních buněk nebo mohou aktivně útočit na imunitní systém a tím ho paralyzovat [7].

##### **1.1.4.1 Protinádorové mechanismy**

Na začátku 20. století již začaly vznikat myšlenky o mechanismu rozpoznání nádorového bujení imunitním systémem. Americký chirurg W. Coley pozoroval ústup nádorového bujení v přítomnosti bakteriálního onemocnění. V padesátých letech vzrostl zájem o studium nádorového bujení. S pomocí nových myších modelů s vyřazenými (tzv. knock-out) vybranými geny byla potvrzena role vrozené imunity v boji s nádory (například absence IFN- $\gamma$  nebo perforinů zvyšuje citlivost k chemicky indukovaným tumorům) [6]. Dále bylo pozorováno, že pacienti se sníženou imunitou v důsledku transplantací nebo onemocnění AIDS mají větší incidenci nádorů vyvolaných chemickým působením.

V posledních letech výzkum prokázal duální roli imunitního systému, kdy sehrává roli eliminace nádorového bujení, nicméně také podporuje nádor při růstu a šíření [8]. U pacientů s poruchami adaptivní imunity často vzrůstá riziko virově indukovaného



nádorového bujení nebo virových onemocnění, která posléze mohou vyústit v některých buňkách až k malignímu poškození buněk.

#### **1.1.4.2 Imunitní editace**

Imunitní editace shrnuje děje a mechanismy, při kterých se dostává do kontaktu imunitní systém s populací nádorových buněk. Nádorové buňky s imunitním systémem interagují, mění svoje vlastnosti a ovlivňují se navzájem. Díky interakci nádorových buněk s imunitním systémem může nastat stav, kdy maligní buňky ztrácí imunogenicitu a tím se snižuje až úplně mizí imunitní odpověď organismu. Tato ztráta imunogenicity je dána selekčním tlakem imunitního systému. Imunitní editace se dělí na 3 fáze: eliminaci, rovnováhu a únik [1].

V první fázi jsou imunitní mechanismy schopné eliminovat maligní buňky. Nádorové buňky umírají tzv. imunogenní buněčnou smrtí, v důsledku hypoxie nebo zvýšeného výskytu špatně syntetizovaných, popřípadě špatně poskládaných proteinů. Na svém povrchu začínají exprimovat molekuly, které zejména dendritické buňky rozpoznají jako nebezpečné a imunitní systém tyto buňky zlikviduje. Tyto molekuly mohou být exprimovány na buněčném povrchu, jedná se například o kalretikulin nebo proteiny teplotního šoku, popřípadě mohou být tyto molekuly rozpustné a jsou uvolňovány do okolí buňky (například ATP nebo kyselina močová). Po rozpoznání jsou aktivovány klasické mechanismy imunitní odpovědi, jak nespecifické, tak specifické. Nádory exprimující molekuly, na základě kterých mohou být nádory v první fázi zlikvidovány, způsobují onemocnění s příznivějším průběhem [7,8].

Druhá fáze imunitní editace je spojena s ustanovením rovnováhy mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem. Imunitní systém dokáže omezeně kontrolovat růst těchto buněk. Z hlediska času je tato fáze nejdelší, z klinického hlediska zůstávají nádory nedagnostikované. V této fázi může v organismu nastat kompletní eliminace nádorových buněk, popřípadě ustanovení rovnováhy mezi populací nádorových buněk a imunitní odezvou. Může ale také nastat útlum imunitního systému způsobený mutacemi nebo dalšími genetickými změnami v nádorové tkáni, oslabením imunitního systému či stárnutím organismu a v tomto stádiu nádorové buňky unikají dozoru imunitního systému a dochází k rozvoji onemocnění.

### 1.1.4.3 Nádorové antigeny

Imunitní systém rozpoznává maligní buňky na základě antigenů, které jsou vystavovány na buněčných površích. Jedná se o antigeny specifické pro nádory (TSA, z angl. tumour-specific antigens) a antigeny asociované s nádory (TAA, z angl. tumour-associated antigens) [1].

Do skupiny TSA patří proteiny, které se na zdravých buňkách nevyskytují, jedná se například o komplexy MHC gp I s abnormálními fragmenty buněčných proteinů – mohou to být proteiny, které vznikly v buňce abnormálním štěpením normálních produktů nebo nové proteiny, které buňka díky své malignitě produkuje (neoantigeny). Další příkladem TSA mohou být komplexy MHC gp I s fragmenty onkogenních virů, tento typ proteinů se objevuje při maligní transformaci způsobené virem, jako například papilomaviry nebo virem EBV. Buňky také tvoří abnormálně vypadající glykoproteiny, takovou změnou je například odlišná sialylace.

Narozdíl od TSA se TAA antigeny na zdravých buňkách vyskytují, ale u maligních buněk se mění jejich četnost, časová či místní exprese. Rozpustné formy antigenů mohou být stanovovány v krvi a tím se stávají důležitými pomocnými markery při diagnostice maligních onemocnění. Nejznámější TAA jsou onkofetální antigeny, které se u zdravých buněk vyskytují pouze v embryonálním období a jejich přítomnost v pozdějším věku je známkou maligních transformací. Patří sem  $\alpha$ -fetoprotein, který je produkován při hepatocelulárním karcinomu nebo neoembryonální antigen produkováný při karcinomu tlustého střeva. Další TAA protein je HER2/neu. Tento receptor růstového faktoru epiteliálních buněk je silně exprimován při některých karcinomech mléčné žlázy. Mezi další zástupce TAA patří PSA (prostatický specifický antigen), které je důležitým markerem pro screening karcinomu prostaty nebo melanomové antigeny, které jsou silně exprimovány melanomovými buňkami [7].

#### 1.1.4.4 Receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2

Receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2 (HER2, z angl. human epidermal growth factor receptor 2) je 185 kDa transmembránový glykoprotein, který patří do rodiny receptorů epidermálních růstových faktorů (EGFR, z angl. epidermal growth factor receptor) s tyrosin-kinasovou aktivitou. Gen pro HER2 receptor je umístěn na 17 chromozomu (17q12). Jedná se o protoonkogen, u kterého bylo pozorováno, že hraje důležitou roli při vývoji a progresi agresivních nádorů prsu. Díky tomu se stal důležitým onkologickým markerem. Bylo pozorováno, že receptor HER2 je nadměrně exprimován u 10 – 35 % prsních karcinomů [9, 10]. Karcinomy prsu, které vykazují zvýšenou produkci HER2 receptoru patří mezi agresivnější a mají horší prognózu a vyšší mortalitu [11]. Vazbou ligandu vznikají homodimery a heterodimery (s ostatními HER receptory na membráně, např. HER1, HER3 nebo HER4) tohoto receptoru a spouští se signalizační dráha, která ovlivňuje diferenciaci, buněčnou proliferaci či inhibici apoptosy buňky. V *in vitro* podmínkách bylo pozorováno, že receptor HER2 zvyšuje produkci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), významného angiogenního faktoru, který hraje roli při invazivitě karcinomu [12].

Pro léčbu HER2 pozitivního karcinomu prsu se využívá monoklonální protilátka trastuzumab (obchodní název Herceptin), cílicí na receptor HER2. Tato léčba se stala standardem u HER2 pozitivních pacientů. V kombinaci s protilátkou trastuzumab je podávána také protilátka pertuzumab, která blokuje tvorbu heterodimerů s ostatními HER receptory. Pro léčbu je také využívána mAb bevacizumab, která se váže na VEGF a brání tak jeho vazbě na receptory. Tím je potlačována tvorba nových cév v blízkosti nádoru a tedy možnost jeho růstu a tvorby metastáz [13].

Na základě poznatků o úniku nádorových buněk imunitnímu dohledu byly navrženy různé fúzní proteiny, které by mohly pomoci při léčbě nádorů s pomocí cílené NK buněčné cytotoxické odpovědi. Konkrétní využití fúzních proteinů v imunoterapii je tvorba bi-specifických (BiKE, z angl. bi-specific killer engagers) nebo tri-specifických protilátek (TriKE, z angl. tri-specific killer engagers). Nejedná se o protilátky plné délky, ale jsou to malé molekuly, které obsahují jednu variabilní část (jeden těžký a jeden lehký řetězec), která je spojena s jednou nebo dvěma variabilními částmi jiné protilátky [14]. BiKE obsahují fragment jedné protilátky rozeznávající antigen a fragment druhé, která cílí například na receptor NK buněk. V minulosti byl již připraven např. fúzní protein obsahující B7-H6 ligand pro aktivační receptor NKp30 (patřící do rodiny NCR receptorů) a jednořetězcový

variabilní fragment (scFv, z angl. single-chain fragment variable) protilátky proti receptoru lidského epidermálního růstového faktoru 2 (HER2), nebo fúzní protein s AICL, ligandem pro receptor NKp80, opět s variabilním fragmentem protilátky proti HER2. Tyto fúzní proteiny aktivují NK buňky a tím napomáhající eliminaci HER2-pozitivních buněk karcinomu prsu. V kombinaci s používanými protilátkami trastuzumab a cetuximab a fúzního proteinu B7-H6, byla pozorována zvýšená účinnost léčby [15]. Dále byly vyrobeny bispecifické protilátky obsahující scFv doménu specifickou na receptor CD16 a druhou scFv cílicí na antigen CD33, marker akutní myeloidní leukemie [16]. Příkladem TriKE je protilátka skládající se z scFv proti CD19, CD22 a CD16 [17].

### 1.1.5 NK buňky

NK buňky (z angl. natural killer cells) jsou buňky nespecifické imunity. Poprvé byly pospány v roce 1975 jako lymfocyty, které umí spouštět cytotoxickou odpověď bez předchozí stimulace a ve velmi krátké době. Z hlediska jejich vývoje se jedná o granulární lymfocyty, které se diferencují z kmenových buněk z lymfoidní linie. Diferenciací této linie vznikají B a T lymfocyty a ILC buňky, mezi které patří i NK buňky. Na rozdíl od B a T lymfocytů nemají antigenně specifické receptory [18]. NK buňky jsou schopny spouštět cytotoxickou odpověď bez předešlé aktivace. Sekretují také celou řadu cytokinů, např. IFN- $\gamma$  nebo TNF- $\alpha$ , mají tedy i imunomodulační funkci.

NK buňky zabíjejí virově napadené buňky a nádorové buňky. Důležitá je také jejich role v době těhotenství, kdy jsou přítomny v placentě speciální NK buňky a ochraňují plod před infekcemi. Díky vlastnostem kombinujícím nespecifickou a specifickou imunitu se NK buňky někdy řadí na hranici mezi specifickou a nespecifickou imunitou [19,20].

Lidské NK buňky kolují v krvi okolo 2 týdnů, podobná doba byla pozorována také u myši [21, 22]. Z hlediska zastoupení mezi lymfocyty zauímají minoritní frakci, procentuální zastoupení velmi závisí na typu tkáně [23]. NK buňky se v lidském organismu vyskytují ve dvou subtypech CD56<sup>dim</sup> a CD56<sup>bright</sup>, přičemž asi 90% NK buněk jsou CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, které jsou cytotoxické a produkují perforiny a IFN- $\gamma$ . Na povrchu tohoto subtypu se nachází větší množství NK receptorů imunoglobulinového typu a Fc- $\gamma$  receptor III (CD16). Oproti druhému subtypu ale mají sníženou expresi CD56. Zbytek NK buněk, které se z velké části nachází v lymfatických uzlinách a mandlích, jsou CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>. Tento subtyp má nižší schopnost cytotoxicity (díky tomu se označují CD16<sup>-</sup>), ale produkuje cytokiny [24].

Oba subtypy na svém povrchu exprimují receptor NKG2D, který rozpoznává stresem indukované ligandy podobné MHC I gp, konkrétně MICA a MICB.

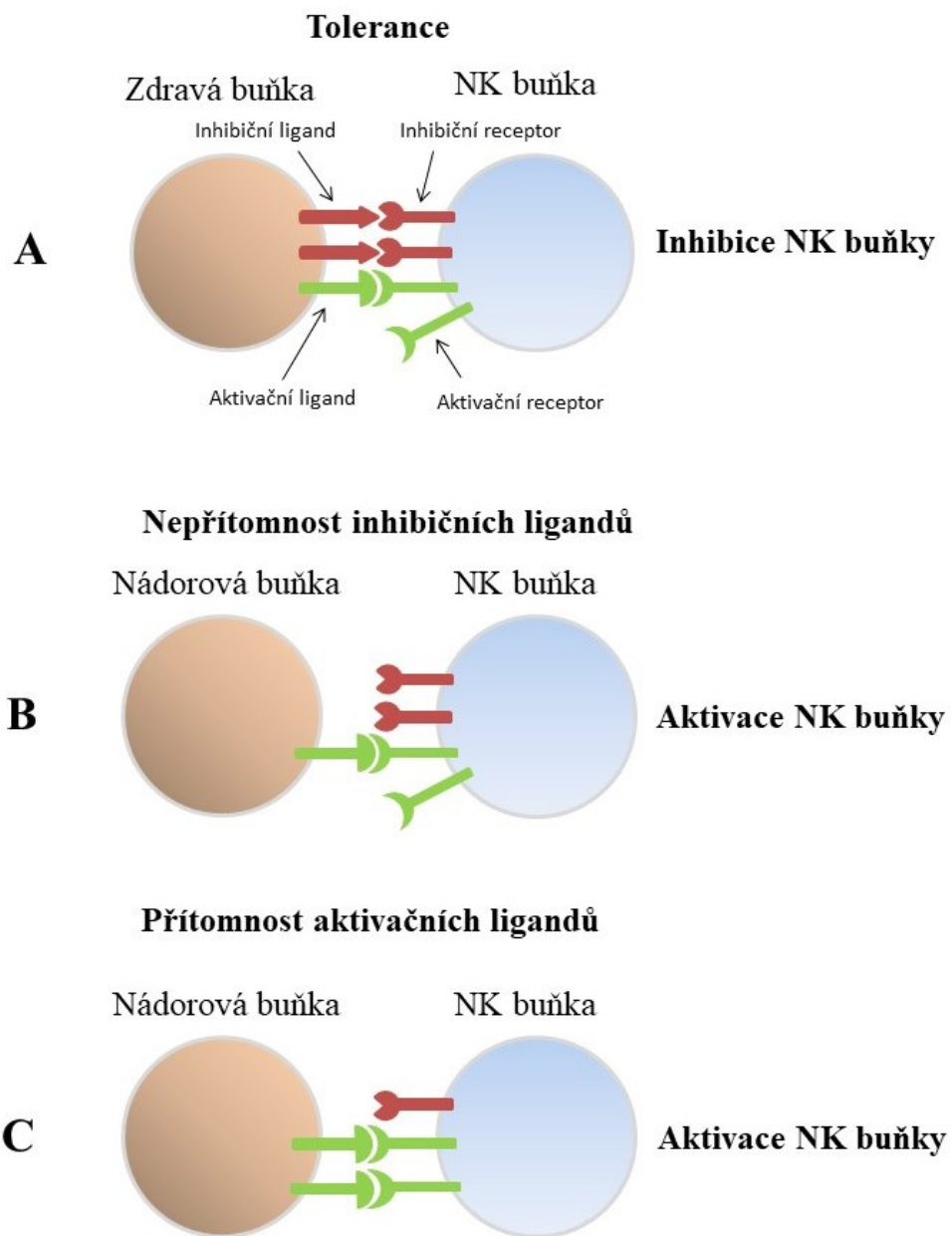
### **1.1.5.1 Mechanismus imunitního dohledu NK buněk**

Mechanismus rozpoznání poškozených, virem napadených či nádorových buněk je založen na přítomnosti MHC I gp na povrchu zdravých buněk. Tyto povrchové proteiny jsou ligandy inhibičních receptorů na povrchu NK buněk, NK receptorů. NK receptory se dělí na dvě základní skupiny, a to na aktivační a inhibiční. Spuštění cytotoxické odpovědi je silně kontrolováno na základě aktivačních a inhibičních signálů [1, 24].

Zdravá buňka má na svém povrchu MHC gp I s peptidovými fragmenty, které jsou produkovány zdravými buňkami. Vystavování peptidových fragmentů na povrchu je důležité pro kontrolu imunitním systémem [25]. Při kontaktu NK buňky se zdravou buňkou inhibiční receptory vyšlou signály k toleranci buňky a NK buňka nespouští cytotoxickou odpověď (Obr. 1A, str. 21) [26].

Snížení počtu MHC gp I využívají nádorové a virově napadené buňky pro únik před Tc lymfocyty. Snížení počtu ligandů pro inhibiční receptory vyvolá stav „missing-self“ a dochází k narušení rovnováhy aktivačních a inhibičních signálů, převáží aktivační a spouští se cytotoxické mechanismy (Obr. 1B, str. 21). Může ale nastat situace, kdy aktivační signály převáží inhibiční, a to na základě výskytu aktivačních ligandů na povrchu kontrolované buňky, v tomto případě NK buňka spouští cytotoxicitu. Zvýšená exprese aktivačních ligandů může nastat v případě buněčného stresu nádorové či infikované buňky. Tomuto stavu se říká „stress induced-self“ (Obr. 1C, str. 21)

Přesto že NK buňky patří na základě své cytotoxické odpovědi mezi nespecifickou imunitu, bylo popsáno, že některé buňky mohou vyžadovat další signály pro efektivní eliminaci maligních buněk. NK buňky mohou být stimulovány antigen prezentujícími buňkami, jako jsou dendritické buňky, monocyty nebo makrofágy. Dalšími signály pro spuštění odpovědi je přítomnost IFN- $\gamma$  nebo přítomnost cytokinů. Mezi cytokiny důležité pro diferenciaci a aktivaci NK buněk, patří např. IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 a IL-21 [27].



**Obr. 1 Schéma interakcí receptorů NK buněk s ligandy.**

- A) Nedochozí ke spuštění cytotoxické odpovědi. Zdravá buňka má na svém povrchu dostatek MHC gp I. a díky tomu převládají inhibiční signály.
- B) Nádorová buňka snižuje expresi MHC gp I, díky tomu převládají aktivační signály a NK buňka spouští cytotoxickou odpověď, jedná se o „missing-self“ mechanismus.
- C) NK buňka spouští cytotoxickou odpověď díky převaze aktivačních signálů, díky přítomnosti aktivačních ligandů na povrchu nádorové buňky, jedná se o „stress induced-self“ mechanismus, převzato a upraveno [28].

### 1.1.6 Receptory NK buněk

NK buněčné receptory se dělí na dvě základní skupiny: aktivační a inhibiční. Aktivační receptory jsou v intracelulární části asociovány s proteinkinasami, přičemž inhibiční receptory ruší signalizační dráhy vytvořené aktivačními receptory cytoplazmatickými fosfatasami. Ligandy inhibičních receptorů jsou MHC gp I. Na povrchu buněk se nenachází univerzální receptor, který by dokázal vázat všechny typy a alelické formy, ale vyskytuje se zde více inhibičních receptorů, kdy každý z receptorů váže jiné strukturní skupiny. Tyto receptory rozeznávají polymorfní determinanty HLA-A, HLA-B a HLA-C. Díky těmto receptorům dostává NK buňka inhibiční signály a ostatní NK buňky toleruje, tomuto mechanismu se říká licencování NK buněk [28].

Na základě molekulární struktury můžeme NK receptory dělit na receptory C lektinového a imunoglobulinové typu. Do každé ze skupin patří aktivační i inhibiční receptory. Geny pro tyto receptory se nacházejí ve dvou velkých komplexech. Receptory C-lektinového typu jsou kódovány v NKC (z angl. natural killer complex) na chromozomu 12p13.1 a imunoglobulinové receptory v LRC (z angl. leukocyte receptor complex) na chromozomu 19q13.4 [29].

Mezi receptory C-lektinového typu patří receptory rodiny NKG2 (z angl. natural killer group 2) např. NKG2-A/C/E/F/H, receptory CD94, rodina receptorů Ly49 nebo rodina receptorů NKR-P1 [30].

Mezi imunoglobulinové receptory patří rodina receptorů přirozené cytotoxicity (NCR, z angl. natural cytotoxicity receptor), kam patří receptory NKp30, NKp44 a NKp46. Dále receptory skupiny KIR (z angl. killer-cell immunoglobulin-like receptor), například KIR2DS1, KIR2DL2 nebo KIR3DL2 a receptory skupiny LIR (z angl. leukocyte Ig-like receptors).

Další receptory NK buněk zprostředkovávají a stimulují cytotoxickou odpověď. Mezi tyto stimulační receptory patří například Fc receptor CD16, který váže protilátky IgG, které se vyskytují na cílové buňce. Na receptor CD16 se protilátky váží svými Fc částmi a po vazbě NK buňka spouští cytotoxické mechanismy. Takto spuštěný mechanismus se nazývá cytotoxická odpověď závislá na protilátkách (ADCC, angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity) [31]. Skupina receptorů podobných genu Toll (TLRs, z angl. toll-like receptors) je skupina receptorů, které upozorňují na přítomnost cizích popřípadě nebezpečných struktur. NK buňky mají na svém povrchu receptory TLR3, TLR4 a TLR9,

kteřé rozpoznávají virové nukleové kyseliny a bakteriální lipopolysacharidy. TLR receptory nedokáží samy spustit NK buněčnou cytotoxickou odpověď, ale tvoří kostimulační signály.

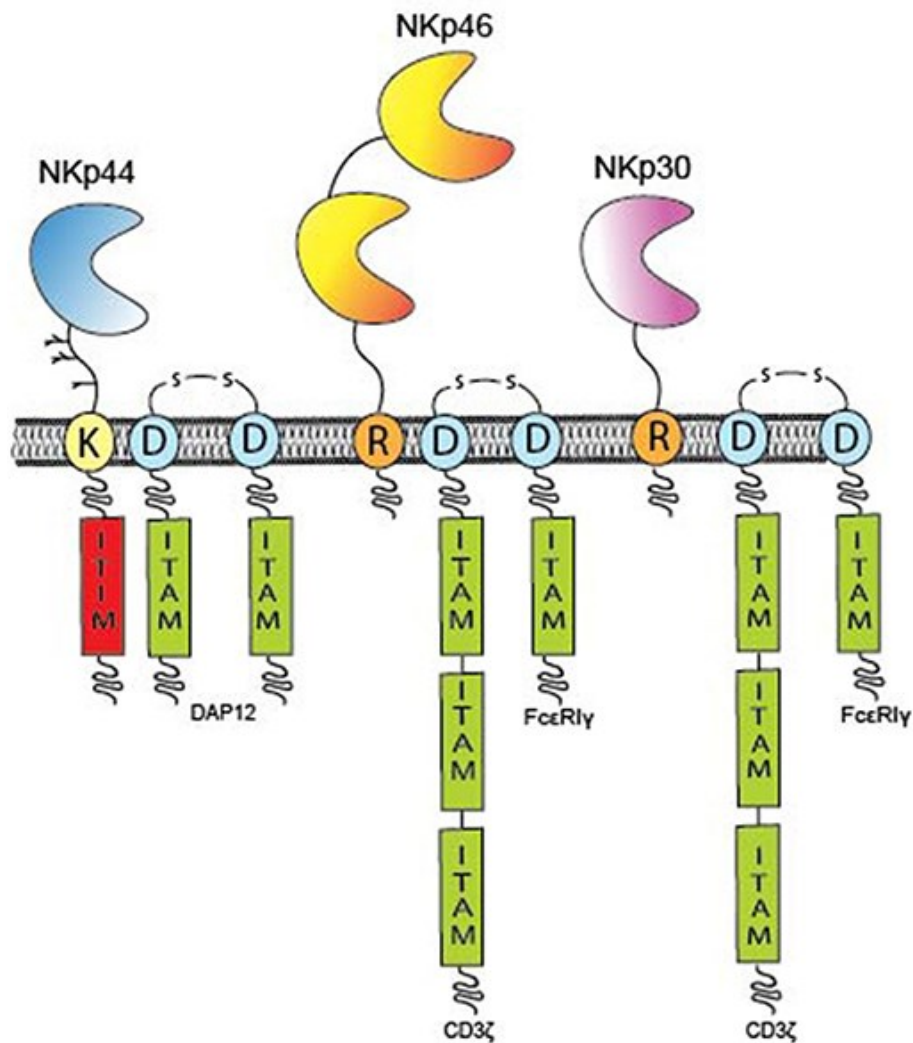
### 1.1.7 Receptory přirozené cytotoxicity

Mezi receptory podobné imunoglobulinům patří rodina receptorů přirozené cytotoxicity (NCR, z angl. natural cytotoxicity receptor). To této skupiny patří 3 membránové receptory NKp30 (NCR3, CD337), NKp44 (NCR2, CD336) a NKp46 (NCR1, CD335). Tyto receptory byly popsány již v 90. letech jako jedny z prvních receptorů, které nerozpoznávají MHC molekuly jako své ligandy. Jejich funkcí je regulace cytotoxické odpovědi a sekrece cytokinů. Tyto receptory se řadí mezi transmembránové proteiny typu I, mají C-konec umístěn intracelulárně, jejich řetězec prochází přes membránu pouze jednou. V extracelulární části obsahují jednu (NKp30 a NKp44), popřípadě 2 (NKp46) imunoglobulinu podobné domény (Obr. 2, str. 24).

Transmembránová část obsahuje i nabitou aminokyselinu, která asociuje s aktivačními motivy ITAM (imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrosinu, z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif) v případě receptoru NKp30, NKp46. Podobným motivem je signální motiv ITIM (imunoreceptorový inhibiční motiv na bázi tyrosinu, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), který mobilizuje tyrozínové a inositol-lipidové fosfatasy a poskytuje inhibiční signály [32, 33]. Motiv ITIM asociuje přes aminokyselinu lysinu s receptorem NKp44.

V dalších letech byl výzkum směřován na identifikaci ligandů těchto receptorů a popis biologické role při imunitním dohledu nad maligními a infikovanými buňkami v různých tkáňových mikroprostředích. Ligandy těchto receptorů mohou být molekuly exprimované na buněčném povrchu, sekretované molekuly, ale také molekuly začleněné do extracelulární matrix. U receptoru NKp44 je popsáno několik ligandů, mezi aktivační patří například hemagglutinin a neuraminidasa viru chřipky, viru Newcastleké nemoci a Sendai viru. Mezi inhibiční ligandy patří například Syndecan-4. Receptor NKp30 má také několik popsaných ligandů, například hemagglutinin, který spouští inhibiční signály, nebo B7-H6 a galectin-3, které jsou aktivačními ligandy [32].





### Obr. 2 Receptory přirozené cytotoxicity

Receptor NKp44 obsahuje jednu extracelulární doménu a přes lysin asociuje v transmembránové části s motivem ITIM a přes aspartát asociuje s motivem ITAM obsaženým v signalizačním adaptoru molekul DAP12. Receptor NKp46 obsahuje dvě extracelulární domény a v transmembránové části obsahuje arginin, který asociuje s aspartátem motivu ITAM signalizačních adaptorů jako jsou molekuly CD3 $\zeta$  a Fc $\gamma$ R $\gamma$ . Receptor NKp30 obsahuje jednu extracelulární doménu a v intracelulární části pomocí argininu asociuje s motivy ITAM na stejných signalizačních adaptorech jako receptor NKp46. Převzato z [32].

### 1.1.8 Receptor NKp46

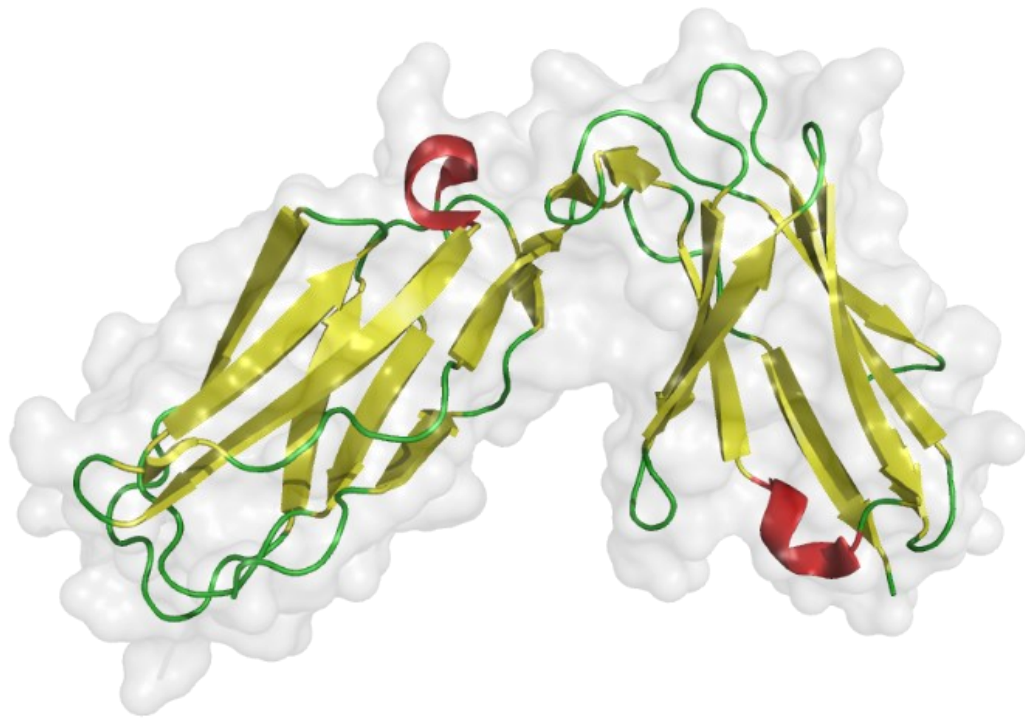
Receptor NKp46 (také označován NCR1, z angl. natural cytotoxicity receptor 1) je transmembránový receptor o velikosti 46 kDa. Gen kódující tento receptor se nachází v komplexu receptorů leukocytů, konkrétně na chromozomu 19q13.4. Jako jediný z rodiny NCR receptorů se vyskytuje i na povrchu NK buněk myší, psů, šimpanzů, krav či krys, exprese NKp30 a NKp44 byla popsána pouze u člověka. Myší ortolog NCR1, se nachází na chromozomu 7 [34]. Receptor NKp46 je exprimován na všech NK buňkách CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> i na CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, jak aktivovaných, tak neaktivovaných. Receptor je také exprimován maligními NK buňkami, NKT buňkami (přirozeně zabijácké T lymfocyty, z angl. natural killer T cells) i T lymfocyty.

Receptor NKp46 má několik identifikovaných ligandů, patří mezi ně molekuly, které se vyskytují při virových, bakteriálních a kvasinkových onemocněních. Mezi ligandy virových onemocnění patří hemaglutinin viru chřipku a neštovic, hemagglutin-neuraminidasa chřipkového viru, viru Newcastleské nemoci a Sendai viru. Dalšími ligandy jsou (DBL)-1  $\alpha$  doména membránového proteinu červených krvinek prvoka *Plasmodium falciparum* nebo vimentin produkovaný *Mycobacterium tuberculosis*. Dále je popsána interakce s dosud neidentifikovanými ligandy produkovanými *Fusobacterium nucleatum* nebo pankreatickými  $\beta$  buňkami. Mezi jeho popsané ligandy patří také epiteálních adhesiny produkované kvasinkou *Candida glabrata*. Vazba se všemi dosud popsanými ligandy spouští aktivační signální dráhy NK buňky [32].

#### 1.1.8.1 Struktura NKp46

Jedná se o transmembránový protein, který má 3 oblasti – intracelulární, transmembránovou a extracelulární. Svoji strukturou je podobný imunoglobulinům a je charakteristický díky dvěma extracelulárním doménám podobným Ig-C2 doménám (cca 190 aminokyselin). Domény zaujímají prostorovou konformaci do tvaru písmene V svírajícího úhel 85°. Tato konformace je velmi podobná konformacím D1D2 domén u receptorů skupiny KIR a LILR (receptory leukocytů podobné imunoglobulinům, z angl. leukocyte Ig-like receptor), které jsou vzdáleně evolučně příbuzné [35]. Obě Ig-domény jsou tvořeny 2 antiparalelními  $\beta$  skládanými listy. Mezi  $\beta$  skládanými listy se v obou Ig-doménách vyskytují krátké alfa helixy (Obr. 3, str. 26) [36]. Extracelulární domény jsou spojeny pomocí přibližně 40 aminokyselin dlouhého flexibilního krčku

s transmembránovým úsekem. Cytoplazmatická část receptoru neobsahuje aktivační motiv, ale receptor ve své transmembránové části obsahuje kladně nabitý zbytek argininu, který asociuje s negativně nabitým zbytkem aspartátu, nacházejícím se v transmembránové doméně signálních molekul CD3 $\zeta$  či Fc receptoru  $\gamma$  (FcR $\gamma$ ) [32]. Ty hrají důležitou roli v signalizaci aktivační odpovědi NK buněk pomocí aktivace katalytické domény rozpustných tyrosinových kinas.



**Obr. 3 Extracelulární část receptoru NKp46.** Žlutě jsou vyznačeny  $\beta$ -skládané listy, červeně  $\alpha$ -helixy a zeleně jsou znázorněny další části řetězce. Struktura byla zobrazena pomocí programu PyMol [37] podle struktury s PDB kódem 1OLL [36].

## 1.2 Adhesin Epa1

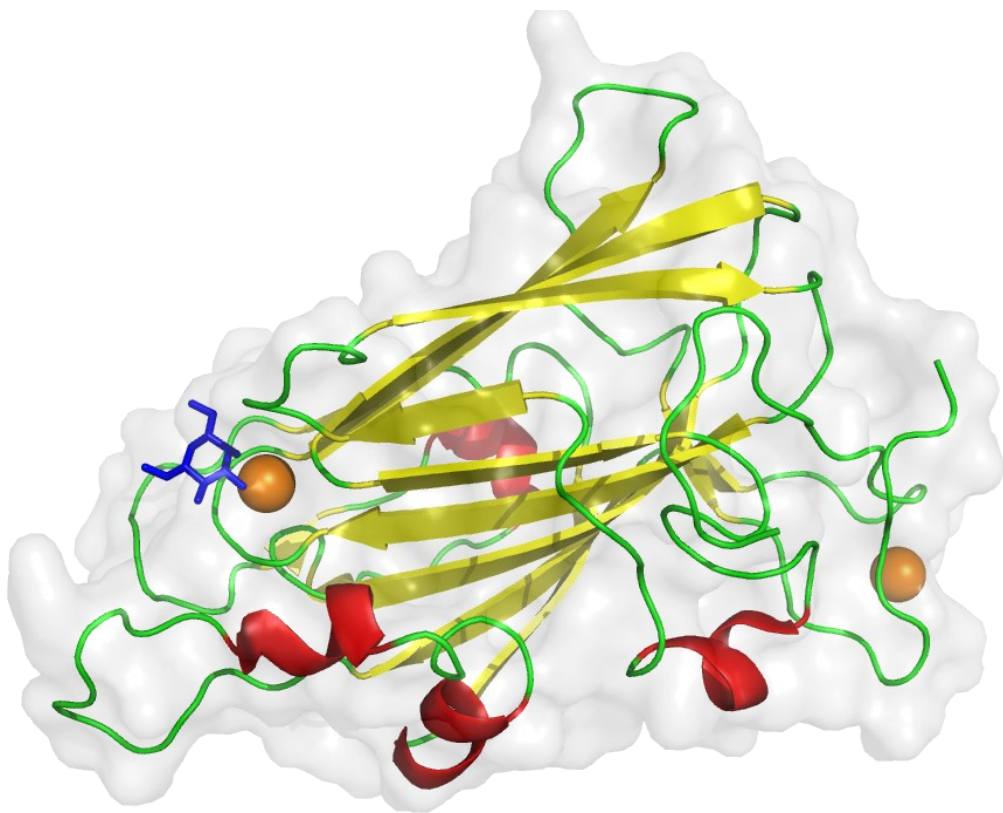
Protein Epa1 je adhesin vyskytující se na povrchu kvasinek *Candida glabrata*. Jedná se o 112 kDa glykoprotein. *C. glabrata* patří do třídy *Saccharomycetes* rodu *Candida*. Tento rod kvasinek se v těle hostitele může chovat jako komenzál, ale může být také původcem kandidových infekcí [37]. Znamější zástupce rodu *Candida* je *Candida albicans*, která způsobuje ústní a genitální kvasinkové infekce. Kandidózy jsou častou komplikací u pacientů se sníženou imunitou, např. po transplantacích, chemoterapii, popřípadě při infekci virem HIV. *C. glabrata* je druhým nejčastějším původcem kandidóz po *C. albicans*. Velký nárůst četnosti kandidóz a zvětšení spektra druhů kvasinek je přisuzován použití antifungálních léků a nárůstu počtů transplantací.

Prvním krokem při kolonizaci dané tkáně je adheze. Kvasinková buňka je schopna zachytit se na površích, např. epitelu a endotelu, nicméně jsou pozorovány také adheze na nebiologický materiál, jako například plast, cévní a močové katetry a další lékařské materiály. Tyto adheze patří mezi časté komplikace během nemocniční péče [38, 39]. Adheze je umožněna díky přítomnosti povrchových proteinů, tzv. adhesinů, které jsou schopny vázat sacharidové zbytky [40, 41].

Tyto adhesiny patří do skupiny proteinů buněčné stěny závislých na glykosylfosfatidylinositolu (GPI-CWP, z angl. glycosylphosphatidylinositol-dependent cell wall proteins). N-koncová doména zajišťuje rozpoznávání a vazbu cukerných zbytků a C-koncová část, která je ke zbytku proteinu připojena dlouhým řetězcem aminokyselin bohatých na serin a threonin, je silně glykosylována [42, 43]. C-koncová část obsahuje hydrofobní aminokyseliny, které jsou v endoplazmatickém retikulu nahrazeny GPI kotvou [44]. Adhesin Epa1 patří do rodiny EPA (z angl. epithelial adhesion proteins), společně s dalšími 22 adhesiny. Z této skupiny byly zatím nejvíce popsány adhesiny Epa1, Epa6 a Epa7. Ligand vázající doména adhesinů této skupiny má přibližně 300 aminokyselin a byla charakterizována jako konzervovaná doména antraxového ochranného antigenu (PA14). Adheze je významně snížena v přítomnosti laktosy a N-acetylaktosamidu [38].

### 1.2.1 Struktura Epa1

Struktura proteinu Epa1 je tvořena  $\beta$ -sandwich strukturou s antiparalelními  $\beta$ -skládanými listy po 6 a 4 vlákních. Tato struktura je u všech adhesinů EPA konzervovaná, ale liší se smyčkami, které mají různé sekvence a délky. V struktuře je také aktivně zapojen ion  $\text{Ca}^{2+}$ , který je vázán na postranní řetězce aspartátu (Obr. 4). Toto místo je velice konzervované a je tvořeno povrchovou smyčkou D cis D [45]. Obě koncové části jsou propojeny disulfidovými můstky C50-C179 a C180-C262.



**Obr. 4 Struktura Epa1.** Žlutě jsou vyznačeny  $\beta$ -skládané listy, červeně  $\alpha$ -helixy a zeleně jsou znázorněny další části řetězce. Oranžově jsou znázorněny atomy  $\text{Ca}^{2+}$  a modře galaktosa. Struktura byla zobrazena pomocí programu PyMol [37] podle struktury s PDB kódem 4A3X [45].

### 1.3 Interakce receptoru NKp46 a adhesinu Epa1

Ligandem strukturně podobných adhesinů Epa1, Epa6 a Epa7, patřících do skupiny EPA, jsou glykany obsahující terminální galaktosu. Epa1 váže laktosu a N-acetylglukosamin, ale nebyla pozorována vazba dalších cukerných zbytků obsahující glukosu nebo manosu. S využitím senzoru s 260 různými imobilizovanými glykany byla nejsilnější vazba pozorována u glykanů majících terminální galaktosu vázanou pomocí  $\beta$ 1-3 nebo  $\beta$ 1-4 vazby, a to konkrétně N-acetylgalaktosamin (GalNAc) a N-acetylglukosamin (GlcNAc). Byla pozorována také slabší vazba u galaktosy vázané pomocí  $\alpha$ 1-3 nebo  $\alpha$ 1-4 vazby. V případě rozvětveného glykanu, který obsahuje zbytek fukosy nebyla vazba pozorována. Jedním z vysvětlení může být blokáce přístupu adhesinu Epa1 tímto fukosovým zbytkem [38, 46]. V dalších studiích bylo ukázáno, že vazba na hemaglutinin je závislá na sialové kyselině.

*In vivo* byla pozorována vazba rozpustné formy receptoru NKp46 a jeho myšího ortologu NCR1 na buňky *C. glabrata*. U ostatních kmenů *Candida* nebyla vazba pozorována [47]. Interakce receptoru NKp46 s ligandem na *C. glabrata* vede k sekreci IL-2 a ke spuštění antifungální aktivity NK buněk. Dalším experimentem bylo vyřazení (tzv. knock-out) myšího NCR1 receptoru (kmen myši NCR1<sup>-/-</sup>). Po kvantifikaci životaschopných *C. glabrata* bylo pozorováno výrazné zvýšení počtu životaschopných kvasinek při infekci myšího kmene NCR1<sup>-/-</sup>. Při porovnání byla zjištěna významně vyšší cytolytická aktivita NK buněk u přirozeného NCR1 oproti kmeni NCR1<sup>-/-</sup>. Dalším znakem aktivace NK buněk byla zvýšená hladina exprese CD107 na povrchu buněk. CD107 je marker degranulace NK buněk a při porovnání byla zaznamenána výrazně nižší četnost u NCR1<sup>-/-</sup> oproti NCR1 myším [47].

Další studie popisují vliv konkrétní O-glykosylace na vazbu receptoru NKp46 s ostatními ligandy. Tato vazba probíhá na vysoce konzervovaném threoninu na pozici 225 (T225) nesoucím O-glykosylaci. Glykosylace na T225 je konzervována i u myšího NCR1 [48]. Receptor NKp46 má predikované dvě O-vázané glykosylace na threoninech 125 a 225 a jednu N-vázanou glykosylaci na asparaginu 216. Všechna tato místa se nachází na imunoglobulinové doméně bližší membráně. Na threoninu 225 byla pozorována glykosylace Neu5Ac- $\alpha$ (2,3)-Gal. Při mutaci ostatních glykosylačních míst (threoninu 125 za alanin a asparaginu 216 za alanin) nebyl pozorován efekt na vazebnou interakci. Při mutaci threoninu 225 za alanin byl pozorován pokles vazby na infikované buňky. Glykosylace na threoninu 225 na NKp46 se tedy zdá být zásadní pro vazbu hemaglutinin [49].

## 2 Cíle práce

- Příprava proteinu NKp46 a ověření jeho struktury
- Příprava ligandu Epa1 a fúzních variant tohoto proteinu s nanoprotiátkou
- Ověření vazby proteinu Epa1 na receptor NKp46 v závislosti na přítomnosti O-vázané glykosylace na T225

## 3 Materiál

### 3.1 Použité chemikálie

100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkaptoethanol	Sigma, USA
Agar	Sigma, USA
Agarosa	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
AlexaFluor 647	Thermo Scientific, USA
Antibiotika (ampicilin, doxycyklin, penicilin, streptomycin)	Biotika, SR
APS	Serva, USA
Azid sodný	Serva, USA
BDP 650/665 x NHS ester	Lumiprobe, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
BSA	Sigma, USA
Combi PPP Master Mix	Top – Bio, ČR
Coomassie Brilliant Blue (R-250)	Fluka Chemika, Švýcarsko
DNA vzorkový pufr	New England Biolabs, USA
dNTPs 10 mM	Top – Bio, ČR
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
Goodview II	Ecoli, SR
IPTG	Sigma, USA
Isopropanol	Lach – Ner, ČR
Kozí polyklonální protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou	Sigma, USA
Králičí polyklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou	Sigma, USA
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, SR
Kyselina valproová	Sigma, USA
L-glutamin	Sigma, USA
IPEI	Polysciences, USA
Myší monokl. protilátka PentaHis	Qiagen, Německo
Myší monokl. protilátka NKp46	R&D Systems, USA
Pluronic F-127	NanoTemper, Německo
PMSF v ethanolu 100 mM	Thermo Scientific, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Sušené odtučněné mléko	Lactino, ČR



TEMED	Serva, USA
Tris	Sigma, USA
Trypanová modř	Sigma, USA
Trypton	Oxoid, UK
Tween-20	Sigma, USA
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, ČR

### 3.2 Enzymy

AgeI-HF	New England Biolabs, USA
EmeraldAmp GT PCR MasterMix	Takara Bio, USA
Endo F1	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK
KpnI	New England Biolabs, USA
Leupeptin 1 µg/ml	Sigma, USA
Lysozym 100 mg/ml	Sigma, USA
NcoI	New England Biolabs, USA
Pepstatin 1 µg/ml	Thermo Scientific, USA
PmeI	New England Biolabs, USA
Q5 Polymerasa, pufr, GC enhancer	New England Biolabs, USA
Quick Fusion, pufr	Bioutil, USA
RNAsa A 100 ng/ml	Lach-Ner, ČR

### 3.3 Pufry a roztoky

**AP pufr** (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0)

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

**Bikarbonátový pufr** (1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5)

**BCIP roztok** (50 mg/ml v dimethylformamidu)

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

**ECL2** (5,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM Tris, pH 8,8)

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

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

**FACS barvicí roztok** (PBS TK, 0,1% želatina, 0,05% NaN<sub>3</sub>)

**HEPES pufr** (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5)

**HEPES-TK pufr** (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5)

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

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

**PBS pufr** (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5)

**PBS-TK** (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0)

**PBS pufr s 1M NaCl** (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,0)

**Pufir 1** (50 mM Tris, 1 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 8,0)  
**Pufir 2** (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 200 mM laktosa, pH 8,0)  
**Roztok IPEI** (10 mg/ml IPEI v PBS-TK)  
**Síran hořčnatý** (100 mM, New England Biolabs, USA)  
**TAE pufir pro agarosovou elektroforézu** (40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA)  
**TBS pufir** (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5)  
**TBS-Tween/Triton** (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100, pH 7,5)  
**TE pufiru** (50Mm Tris, pH 8,5)  
**TES pufir** (10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 8,0)  
**Tris pufir (pH 6,8)** (1 M Tris, pH upraveno HCl)  
**Tris pufir (pH 8,8)** (1,5 M tris, pH upraveno HCl)  
**Vzorkový pufir pro agarosovou elektroforézu** (30% glycerol, bromfenolová modř v TAE)  
**Vzorkový pufir pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný neredukující** (31,5 mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8)  
**Vzorkový pufir pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný redukující** (vzorkový pufir pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný naředěný desetinným podílem 2-merkapt ethanolu)

### 3.4 Použité přístroje

Analytické váhy AND HA – 180M	A&D, Japonsko
Aparatura pro elektropřenos	Bio Rad, Německo
Automatické pipety	Pipetman Gilson, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifuga Allegra X – 22R	Beckman Coulter, USA
Elektroforetická souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone, USA
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE	Bio – Rad, Německo
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
Inkubátor IR 5000	LABsystem Praha, ČR
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Kapiláry Standard Monolith NT.LabelFree	NanoTemper, Německo
Monolith NT.115 Standard	NanoTemper, Německo
Kolona HiTrap desalting 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona HisTrap Excel 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona Lactose Sepharose	Galab Technologies, Německo
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona Talon 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona ZORBAX Eclipse Plus	Agilent Technologies, USA

Koncentrátor Amicon Ultra (MWCO 10000)	Millipore, USA
Láhve čtyřhranné s prodyšným víčkem	P-LAB, ČR
Laminární box Labox BIO 126	LABOX, ČR
MicroCal iTC200	Malvern Panalytical, USA
Mikrocentrifuga Ministar Silverline	VWR, USA
Mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 μm	TPP, Švýcarsko
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mikrostříkačka HAMILTON	Hamilton, USA
Mikrozkumavka 200 μl	Eppendorf, US
Mikrozkumavka 1,5 ml	Eppendorf, USA
Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact	Optimo Moulinex, Francie
Monolith NT.115	NanoTemper, Německo
Monolith NT.LabelFree	NanoTemper, Německo
pH metr	Beckman Coulter, USA
Plastik pro tkáňové kultury	Sigma, USA
Průtokový cytometr BD LSR II	BD Biosciences, USA
Rotační vakuová odparka CentriVap DNA	Labconco, USA
Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette	Thermo Scientific, USA
Spektrometr solariX XR 12T FT-ICE	Bruker Daltonics, USA
Spektrofotometr DS-11	DeNovix, US
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler T100	Bio – Rad, Německo
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka G24	New Brunswick Scientific, USA
Ultrazvuková sonda SONOPLUS	Bandelin, Německo
Vortexový mixér	Velp Scientifica, Itálie
Zdroj napětí 251–2	Sigma, USA

### 3.5 Buněčné kmeny a linie

<i>Escherichia coli</i> TOP10	Thermo Scientific, USA
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Thermo Scientific, USA
<i>Escherichia coli</i> SHuffle	Thermo Scientific, USA
HEK293S GnTI <sup>-</sup>	CRL-3022 <sup>TM</sup> , ATCC
HEK293T	CRL-3216 <sup>TM</sup> , prof. Radu Aricescu, UK
NK92MI	Mgr. Jakub Rohlena, PhD., Biocev
SK-BR3	Laboratoř molekulární terapie, BTÚ AV ČR

## 3.6 Kultivační média

**alphaMEM** (bez nukleotidů doplněný o suplementy (1,5 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM L-Gln, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 0,3mM myoinositol, 0,1mM merkaptoethanol, 0,02mM kyselina folová, 12,5% FBS – fetální hovězí sérum, 12,5% HS – koňské sérum).

**DMEM High Glucose** (komerční médium – Sigma (USA) s 20% FBS, 2 mM L-glutaminem, 100 U/ml penicilinem, 100 µg/ml streptomycinem)

**ExCell 293** (komerční médium - Sigma (USA),před použitím doplněno o L-glutamin do výsledné koncentrace 4 mM)

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

**SOB médium** (2% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>)

## 3.7 Plasmidy

### 3.7.1 Vektory a kotransfekční plasmidy

Plasmid pOPINE	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK
Plasmid pTW5sec	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK
Plasmid pUT7	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK
pTW5_p27	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK
pTW5_aFGF	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK

### 3.7.2 Templáty pro PCR

NKp46_ORF	Sino Biological, Čína, HG12302-G
pOPINE_Epa1	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK
pTW5sec_NKp46_C48S	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK
pTW5sec_MLH	Bc. Tereza Nepokojová, katedra biochemie PřF UK [50]
pTW5sec_HLM	Bc. Tereza Nepokojová, katedra biochemie PřF UK [50]

## 3.8 Oligonukleotidy

Všechny oligonukleotidové sekvence byly objednány u společnosti Sigma (USA).

### 3.8.1 Primery pro PCR

aHER2\_secC\_FW: 5'-TCTTGAATTACCGGTATGGCGGAAGTGC-3'

aHER2\_secN\_REV: 5'-TGTTGGTGATGGTGGGTACCGCTACTCACAGTTACCTG-3'

aHER2\_pOPINE\_REV: 5'-TGATGGTGATGGTGATGTTTGCTACTCACAGTTAC-3'

Epa1\_linker\_FW: 5'-CTGATTAGCTATGATAGCAGTGGAGGCGGAGGAT-3'

Epa1\_linker\_REV: 5'-ATCCTCCGCCTCCACTGCTATCATAGCTAATCAG-3'

Epa1\_pTW5sec\_REV: 5'-TGTTGGTGATGGTGGGTACCACTGCTATCATAGCT  
AATCA-3'

Epa1\_pOPINE\_REV: 5'-TGATGGTGATGGTGATGTTTACTGCTATCATAGCT-3'

Linker\_Epa1\_FW: 5'-GGTGGTGGTGGATCTACCAGCAGCAATGATATTA-3'

Linker\_Epa1\_REV: 5'-CTAATATCATTGCTGCTGGTAGATCCACCACCAC-3'

NKp46\_full\_FW: 5'-AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGTCTTCCACACTCCC-3'

NKp46\_full\_REV: 5'-CTGATCAGCGGGTTTTCAAAGAGTCTGTGTGTTCA-3'

NKp46\_T225A\_FW: 5'-CACCTGAAGACCCCGCCTTTCCTGACACTT-3'

NKp46\_T225A\_REV: 5'-AAGTGTCAGGAAAGGCGGGGTCTTCAGGTG-3'

pOPIN\_Epa1\_FW: 5'-GGAGATATACCATGG ACCAGCAGCAATGATATTAG-3'

pOPIN\_aHER2\_FW: 5'-GGAGATATACCATGGATGGCGGAAGTG-3'

pTW5sec\_Epa1\_FW: 5'-TCTTGAATTACCGGTACTAGCAGCAATGATATTAGC-3'

### 3.8.2 Sekvenační primery

pCHK5\_FW: 5'-AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGGGATCCTT-3'

pCH5\_REV: 5'-CTGATCAGCGGGTTTTTAGTGATGGTGATGGTGGTG-3'

pCT5seq\_FW: 5'-TCAGATCGCCTGGAGACG-3'

pCT5seq\_REV: 5'-GTGGGAGTGGCACCTTCC-3'

pOPINEF\_seq\_FW: 5'-GGACCGAAATTAATACGACTC-3'

pTT\_REV: 5'-TATGTCCTTCCGAGTGAGAG-3'

## 3.9 Soupravy

Nucleospin® gel and PCR clean-up

NucleoSpin® Plasmid

NucleoBond® Xtra Midi / Maxi

Mix & Go! *E. coli* Transformation

Kit and Buffer Set

Macherey – Nagel, Německo

Macherey – Nagel, Německo

Macherey – Nagel, Německo

Zymo Research, USA

## **4 Metody**

### **4.1 Příprava rekombinantních vektorů**

#### **4.1.1 Štěpení restrikčními enzymy**

Štěpení probíhalo ve 20  $\mu$ l reakční směsi, která obsahovala 3  $\mu$ g nenaštěpeného plasmidu, 2  $\mu$ l 10 $\times$  koncentrovaného reakčního pufru NEBuffer 2.1 a příslušné množství restrikčních endonukleas. Na 1  $\mu$ g plasmidu bylo použito 5 U restrikční endonukleasy. Do celkového množství 20  $\mu$ l byla pipetována dH<sub>2</sub>O. Reakční směs byla inkubována při 37 °C přes noc. Výsledek štěpení byl ověřen pomocí agarosové elektroforézy.

#### **4.1.2 Elektroforéza v agarosovém gelu**

Pro přípravu 1% agarosového gelu bylo naváženo 0,65 g agarosy. Agarosa byla rozpuštěna v 65 ml TAE zahřátím v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí roztoku byly přidány 3  $\mu$ l barviva GoodView. Připravený roztok byl nalit do elektroforetické aparatury a vložen hřebec pro tvorbu jamek. Po ztuhnutí gelu byl gel převrstven 200 ml dH<sub>2</sub>O, prostor elektrod byl naplněn TAE puftrem. Vzorke obsahující DNA a 10 $\times$  zředěný vzorkový pufr byly pipetovány do jamek. Do první jamky bylo pipetováno 3  $\mu$ l standardu. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji napětí (200 V) a doba trvání elektroforézy byla 20 min. Pomocí UV lampy byl ověřen výsledek analýzy, v případě preparativní elektroforézy byl gel prosvícen lampou s modrým světlem.

#### **4.1.3 Měření koncentrace a čistoty DNA**

Měření koncentrace a čistoty DNA probíhalo při 260 nm pomocí spektrofotometru. Spektrofotometr při každém měření odečetl absorbanci slepého vzorku, pro výpočet koncentrace byl využit empirický vztah, kdy absorbance 1,0 odpovídá koncentraci 50  $\mu$ g/ml dvouřetězcové DNA. Pro určení čistoty byla změřena absorbance i při 280 nm. Poměr absorbancí při 260 a 280 nm se u čisté DNA pohybuje mezi 1,8 – 2,0.

#### 4.1.4 Polymerasová řetězová reakce

20  $\mu$ l reakční směs v 200 $\mu$ l mikrozkušavce pro PCR reakci obsahovala 40 ng DNA, 2  $\mu$ l přímého a zpětného primeru (o výsledné koncentraci 500 nM), dále obsahovala 0,5  $\mu$ l směsi deoxynukleotid trifostátů (o výsledné koncentraci 0,125 mM), 4  $\mu$ l reakčního pufru, 4  $\mu$ l aditiva GC enhancer a 0,2  $\mu$ l Q5 polymerasy (celkově 0,4 U) a dH<sub>2</sub>O do celkového objemu 20  $\mu$ l. Reakční směs byla 30 s centrifugována a poté umístěna do termocyklieru. Časový a teplotní program je uveden v Tab. 1. Teplota nasedání se pro různé primery lišila, byla vypočítaná na základě jejich nukleotidové sekvence dle doporučení výrobce Q5 polymerasy [51]. Pro ověření velikosti PCR produktů byla použita agarosová elektroforéza.

**Tab. 1 Časový a teplotní program PCR reakce**

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

#### 4.1.5 Polymerasová řetězová reakce s komplementárními přesahy

Pro spojení více fragmentů DNA byla využita PCR reakce s komplementárními přesahy, umožňující spojit několik fragmentů nebo vnést mutaci. Byly navrženy dvě sady primerů, první nasedající na začátku a na konci DNA insertu, druhá nasedající v místě spojení a tvořící přesah. Ve dvou oddělených PCR reakcích byly nejprve amplifikovány jednotlivé fragmenty, které byly následně izolovány z agarosového gelu. V následující PCR reakci bylo jako templát použito po 15 ng od každého z fragmentů a byly použity primery nasedající pouze na začátku a na konci finálního insertu. Takto spojený insert DNA byl izolován z gelu a vložen do linearizovaného vektoru.

#### 4.1.6 Izolace z agarosového gelu

Izolace DNA z agarosového gelu byla prováděna pomocí komerční soupravy Nucleospin® gel and PCR clean-up [52]. Z agarosového gelu byl vyříznut kousek obsahující požadovanou DNA. K tomuto gelu byl pipetován NT1 (na 100 mg gelu 200  $\mu$ l roztoku). Směs byla zahřívána při 50 °C do úplného rozpuštění gelu. Roztok byl pipetován na centrifugační kolonku a poté centrifugován 30 s při 11000  $\times$  g. Filtrát byl odstraněn a kolonka byla promyta roztokem NT3. Následně byla kolonka vysušena centrifugováním 1 min při 11 000  $\times$  g. Poté bylo pipetováno 30  $\mu$ l předehřátého elučního TE pufru (5mM Tris, pH 8,5) na kolonku. Po 1 minutě inkubace byla kolonka centrifugována 1 min při 11000  $\times$  g. Eluát byl jímán do čisté 1,5ml mikrozkušavky.

#### 4.1.7 Vnesení genu do linearizovaného plasmidu

Do 200 $\mu$ l mikrozkušavky bylo pipetováno 10  $\mu$ l reakční směsi. Reakční směs obsahovala 100 ng linearizovaného vektoru a takové množství DNA insertu, aby molární poměr byl 1:2 (vektor : insert). Dále bylo přidáno 0,5  $\mu$ l enzymu QuickFusion, 2  $\mu$ l 5 $\times$  koncentrovaného pufru pro tento enzym a dH<sub>2</sub>O do celkového objemu 10  $\mu$ l. Reakční směs byla inkubována při 37 °C 1 hodinu. Tato směs byla poté použita k transformaci kompetentních buněk.

#### 4.1.8 Transformace kompetentních buněk

V případě použití Z – kompetentních buněk, které byly předpřipraveny pomocí soupravy Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set [53] bylo k 50  $\mu$ l suspenze požadovaného kmene *E. coli* přidáno 100 – 1000 ng požadovaného plasmidu, směs byla inkubována 10 min na ledu a poté pipetována na předehřátou bakteriologickou kultivační misku s 1% agarem v LB médiu s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml a rozetřena bakteriologickou hokejkou.

Při nízké efektivitě transformace byl do protokolu přidán tzv. teplotní šok. Buňky byly nejprve inkubovány s plasmidovou DNA 10 min na ledu, poté 45 s při 42 °C v termobloku a opět 5 min na ledu. Ke směsi bylo přidáno 1 ml nahřátého LB médi a celá směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Následně byla směs centrifugována 1 min při 4000  $\times$  g a 20 °C. Většina supernatantu byla odstraněna a ve zbylém byla buněčná peleta resuspendována. Tato suspenze byla poté pipetována na předehřátou bakteriologickou



kultivační misku s 1% agarem v LB médiu s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml a rozetřena hokejkou. Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

#### **4.1.9 PCR z kolonií**

Kolonie narostlé na bakteriologické kultivační misce byly pomocí špičky setřeny a resuspendovány v 6 µl sterilní dH<sub>2</sub>O ve 200µl mikrozkuhavce, následně bylo špičkou očkováno 5 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml. K 6 µl sterilní dH<sub>2</sub>O bylo přidáno 10 µl reakční směsi Combi PPP Master Mix a 2 µl přímého a 2 µl zpětného primeru, které odpovídají danému templátu a vektoru. Koncentrace primerů ve směsi byla 500 nM. Mikrozkuhavka byla centrifugována na stolní centrifuze 20 s a poté umístěna do termocykleru. Teplotní schéma odpovídá schématu PCR reakce (viz 4.1.4, str. 38), pouze na počátku byl přidán krok 5 minut při 95 °C a druhý krok byl opakován pouze 20×. Teplota nasedání primerů byla zvolena podle použitých primerů. Po PCR reakci byla úspěšnost ověřena pomocí agarosové elektroforézy.

#### **4.1.10 Nízkoobjemová izolace plasmidové DNA**

Zaočkovaná 50ml zkumavka s 5 ml LB média a ampicilinem byla uzavřena víčkem, ale nebylo dotaženo, aby mohlo docházet k výměně plynů. Zkumavka byla inkubována přes noc při 37 °C a 200 ot./min. Plasmidová DNA byla izolována pomocí soupravy NucleoSpin® Plasmid [54]. Přes noc narostlá kultura byla centrifugována 5 min při 3900 × g při 20 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 250 µl A1 pufru s přidanou RNAsou. K suspenzi bylo přidáno 250 µl pufru A2. Směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 300 µl A3 pufru. Roztok byl centrifugován 5 min při 11000 × g při 20 °C. Supernatant byl pipetován na kolonku, která byla centrifugována 1 min při 11000 × g. Filtrát byl odstraněn, na kolonku bylo pipetováno 500 µl AW pufru a byla opět centrifugována za stejných podmínek. Filtrát byl odstraněn, na kolonku bylo pipetováno 600 µl A4 pufru a opět centrifugován za stejných podmínek. Poté byl filtrát odstraněn a kolonka byla centrifugována 2 min při 11000 × g a 20 °C. Plasmidová DNA byla eluována 50 µl elučního AE pufru (5mM Tris, pH 8,5) předeřátého na 70 °C a centrifugací 2 min při 11000 × g a 20 °C. Před elucí byla kolonka přenesena do čisté 1,5ml mikrozkuhavky.

#### 4.1.11 Sekvence DNA

Sekvence byly provedeny v Laboratoři sekvence DNA ve výzkumném centru BIOCEV. Pro jednotlivé plasmidy byly vždy připraveny 2 vzorky, každý obsahoval 300 ng plasmidu, 1  $\mu$ l jednoho odpovídajícího primeru a dH<sub>2</sub>O do celkového objemu 8  $\mu$ l. Výsledek sekvence byl porovnán s předpokládanou sekvencí.

#### 4.1.12 Velkoobjemová izolace plasmidové DNA

Nejprve byla provedena transformace kompetentních buněk (viz 4.1.8, str. 39). Následující den byly narostlé bakteriální kolonie na bakteriologické kultivační misce resuspendovány v 2 ml LB médiu a touto suspenzí bylo očkováno 500 ml LB média v 2 l Erlenmayerově baňce. K médiu byl přidán ampicilin o výsledné koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Erlenmayerova baňka byla umístěna na třepačku a zde byla směs inkubována přes noc při 37 °C a 200 ot./min. Následující den byla bakteriální kultura centrifugována 20 min při 3900  $\times$  g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 20 ml TES pufru a dále centrifugována 10 min při 3900  $\times$  g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn a plasmidová DNA byla z pelety izolována pomocí soupravy NucleoBond® Xtra Maxi [55].

Peleta byla resuspendována v 18 ml RES pufru s RNAsou o výsledné koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Poté bylo přidáno 9 ml LYS pufru a směs byla promíchána a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 9 ml NEU pufru a opět byla směs promíchána. Mezitím byla ekvilibrována přiložená kolonka 25 ml EQ1 pufru. Neutralizovaný buněčný lysát byl přefiltrován přes skládaný filtrační papír a filtrát poté nanesen na ekvilibrovanou kolonku. Po protečení filtrátu kolonou byla kolonka promyta 20 ml WASH pufru. Eluce plasmidové DNA byla provedena 15 ml ELU pufru do čisté zkumavky. DNA byla přečištěna precipitací přidáním 10,5 ml vychlazeného isopropanolu. Roztok byl centrifugován 30 min při 20000  $\times$  g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla opláchnuta 4 ml 70% ethanolu. Následně byl roztok centrifugován 5 min při 20000  $\times$  g a 4 °C. Peleta DNA byla vysušena a poté resuspendována v 1 ml TE pufru.

## 4.2 Produkce proteinů v bakteriálním expresním systému

Plasmidovou DNA byl transformován kmen kompetentních buněk *E. coli* SHuffle (viz 4.1.8, str. 39). Následně byly buňky natřeny na bakteriologickou kultivační misku s LB médiem a ampicilinem (100 µg/ml) a poté inkubovány při 37 °C přes noc. Druhý den byla v laminárním boxu setřena z bakteriologické misky špičkou jedna kolonie a špička byla vhozena do připravené 50ml zkumavky s 5 ml LB média a ampicilinem o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Tato buněčná kultura byla inkubována přes noc při 37 °C a 200 ot./min. Další den bylo 1 ml této buněčné kultury očkováno 500 ml LB média v 2 l Erlenmayerově baňce s ampicilinem o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Erlenmayerova baňka byla přesunuta na třepačku, kde byla inkubována při 37 °C a 200 ot./min. Každou hodinu byly odebírány vzorky a spektrofotometricky měřena optická hustota při 600 nm proti čistému LB médiu. Inkubace probíhala do doby, než měla kultura optimální optickou hustotu (dle samostatné předchozí optimalizace 2,0 v případě proteinu Epa1, 0,6 v případě fúzních proteinů). Poté bylo k buněčné kultuře pipetováno indukční činidlo IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid) do výsledné koncentrace 300 µM. Protein Epa1 byl produkován 48 hodin při teplotě 12 °C. Fúzní proteiny byly produkovány při 25 °C přes noc. Buněčná kultura byla sklizena centrifugováním při 3900 × g 20 min a 20 °C. Supernatant byl odstraněn, peleta byla resuspendována v TES pufru a poté centrifugována při 3900 × g, 10 min a 20°C. Supernatant byl opět odstraněn a peleta byla zamrazena při -20 °C.

Pro izolaci proteinu byla peleta resuspendována v 40 ml resuspendačního pufru pro daný protein, dále bylo přidáno 25 µl 100 mg/ml lysozymu, 40 µl 1 µg/ml pepstatinu, 1 µg/ml 40 µl leupeptinu, 40 µl 10 µg/ml RNasy, 2 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub>. Poté byla buněčná suspenze homogenizována za pomoci ultrazvukové sondy. Sonikace probíhala po dobu 4 × 1 minuty při výkonu 40 W. Po každé sonikaci byla buněčná kultura chlazená na ledu. Homogenizovaná suspenze byla centrifugována při 28000 × g, 20 min a 20 °C. Supernatant byl následně filtrován pomocí 0,22 µm filtru. Výsledný roztok byl 1:1 zředěn resuspendačním pufrům a nanesen na příslušnou kolonu pro purifikaci proteinu (viz 4.4.2, str. 46).

### **4.3 Práce s buněčnou linií HEK293S GnTI<sup>-</sup> a HEK293T**

Pro práci byly vybrány linie odvozené od lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293T (linie exprimující proteiny s komplexní glykosylací) a HEK293S GnTI<sup>-</sup> (linie exprimující proteiny s homogenní glykosylací manosového typu). Práce s buněčnými liniemi probíhala ve speciální striktně aseptická místnosti, a kde probíhala práce pouze s tkáňovými kulturami. Samotná manipulace s buněčnými kulturami byla prováděna v laminárním boxu. Kultivace probíhala ve čtverhranných lahvích s prodyšným víčkem umístěných na třepačce při 135 ot./min v inkubátoru (37°C, atmosféra obohacená 5% CO<sub>2</sub>).

#### **4.3.1 Určování buněčné hustoty**

Pro určení buněčné hustoty bylo ze čtverhranné láhve s narostlou buněčnou kulturou odebráno 20 µl buněčné suspenze do sterilní mikrozskumavky. K suspenzi přidáno 160 µl roztoku 0,4% trypanové modři v PBS-TK. Směs byla pomocí pipety promíchána a poté byl roztok pipetován mezi sklíčka hemocytometru. Pod mikroskopem byly spočítány všechny buňky ve vyznačeném prostoru a následně byl jejich počet vynásoben objemovým faktorem 10000 (faktor vychází z objemu počítací komůrky) a ředícím faktorem 9×. Takto určená buněčná hustota odpovídá počtu milionů buněk v ml suspenze. Dále byl určen podíl živých a mrtvých buněk.

#### **4.3.2 Kultivace buněčných linií**

Kultivace buněčných linií probíhala v komerčním médiu ExCELL293 s přidaným 4 mM L-glutaminem. Subkultivace probíhala každé 3–4 dny a to odebráním části buněčné suspenze do čisté čtverhranné láhve a doplněním čerstvým ExCELL293 médiem na buněčnou hustotu 0,3 milionů buněk/ml. K dostatečnému provzdušnění buněčné suspenze byly čtyřhranné láhve naplněny pouze do 40 % celkového objemu.

#### **4.3.3 Transientní transfekce linie HEK293**

HEK293 buňky byly ve vysoké hustotě chemicky transfekovány 25kDa lineárním polyethyleniminem (IPEI). Před transfekcí byl příslušný objem buněčné kultury centrifugován při 95 × g, 5 min a 20 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v čerstvém ExCELL293 médiu, tak aby výsledná hustota byla 20 milionů

buněk/ml. Transfekční mix byl připraven vyředěním DNA (1 µg DNA na 1 milion buněk) do PBS-TK pufru, obsahoval 88 % (w/w) expresního plasmidu, 10 % (w/w) plasmidu pTW5\_p27, který nese gen pro inhibitor cyklin dependentních kinas p27, a 2 % (w/w) plasmidu pTW5\_aFGF, který nese gen pro aFGF (kyselý růstový faktor fibroblastů). Tyto dva pomocné plasmidy pomáhají prodloužit produkci proteinu zpomalením buněčného dělení a zvýšením viability kultury.

Transfekční mix byl sterilně zfiltrován a poté přidán k buněčné suspenzi. Dále byl pipetován roztok IPEI tak, aby hmotnostní poměr DNA:IPEI byl 1:4 pro HEK293S GnT<sup>-</sup> a 1:3 pro HEK293T. Směs byla inkubována 1,5 hodiny při 37 °C a 135 ot./min. Po inkubaci byla buněčná suspenze 10× zředěna čerstvým kultivačním médiem. Dále byl k suspenzi pipetován roztok kyseliny valproové do výsledné 2 mM koncentrace a 100× koncertovaný roztok antibiotik (zásobní koncentrace 6 mg/ml penicilinu, 1 mg/ml streptomycinu).

#### **4.3.4 Příprava stabilně transfekovaných linií HEK293**

Transfekce buněčné linie byla provedena s použitím piggyBac systému [56]. Buněčná linie HEK293S GnT<sup>-</sup> byla transfekována 3 plasmidy – produkčním plasmidem, PB-RN a PBase. Buněčná suspenze obsahující 30 milionů buněk byla centrifugována v 50ml zkumavkách 5 min při 95 × g a 20 °C. Buněčná peleta byla resuspendována v 1,2 ml média ExCELL293, výsledná buněčná hustota byla 23,5 milionů buněk/ml. Buněčná suspenze byla přenesena do jamky 12 jamkové mikrokultivační destičky. K buněčné suspenzi bylo přidán DNA transfekční mix, který obsahoval 30 µg DNA – 24 µg produkčního plasmidu, 3 µg PB-RN a 3 µg PBase. Poté byl přidán IPEI v hmotnostním poměru DNA:IPEI 1:4. Destička byla umístěna do inkubátoru a inkubována na třepačce 1,5 hodiny při 37 °C, 135 ot./min a 5 % CO<sub>2</sub>. Po 4 hodinách byla buněčná suspenze přenesena do čtyřhranné láhve o objemu 100 ml a suspenze byla naředěna do výsledného objemu 30 ml čerstvým médiem ExCELL293. Buněčná suspenze byla inkubována 48 hodin na třepačce při 37 °C, 135 ot./min a 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaci byla k buněčné suspenzi pipetována selekční antibiotika – puromycin o výsledné koncentraci 5 µg/ml a G418 o výsledné koncentraci 50 µg/ml.

V případě transfekce buněčné linie HEK293T byly buňky transfekovány 3 plasmidy - produkčním plasmidem, PB-RB a PBase. IPEI byl přidán v hmotnostním poměru DNA:IPEI 1:3. Postup transfekce byl shodný s předešlou transfekcí. Lišil se pouze přidáním selekčních antibiotik. K buněčné suspenzi byl pipetován puromycin o výsledné

koncentraci 5 µg/ml a blastocidin o výsledné koncentraci 5 µg/ml. Stabilní linie byly kultivovány za stejných podmínek, jako mateřské linie. Každé tři dny byly buňky spočítány (viz 4.3.1, str. 43), centrifugovány 5 min při 95 × g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v čerstvém ExCELL293 médiu do výsledného objemu 30 ml a k buněčné suspenzi byla pipetována selekční antibiotika. Ve chvíli, kdy buňky opět ve fázi růstu a jejich viabilita opět dosáhla 100 %, byla buněčná suspenze rozdělena na několik alikvotů, které byly zmrazeny s přidavkem 10% DMSO při -80 °C.

### **4.3.5 Produkce proteinů ve stabilních liniích**

Linie byly dále subkultivovány ve větších objemech, Když buněčná suspenze dosáhla hustoty 3–5 milionů buněk/ml v 300 ml média bylo k suspenzi pipetováno indukční antibiotikum doxycyklin o výsledné koncentraci 1 µg/ml. Kultura byla po indukci kultivována dalších 5 dnů a poté sklizena. Pokud byl protein produkován do média, byla buněčná suspenze centrifugována při 20000 × g 30 min a 18 °C. Supernatant byl poté filtrován pomocí filtru s póry o velikosti 0,22 µm. V případě pozdější izolace proteinu byl filtrát zmrazen při -20 °C. V případě proteinu, který byl produkován intracelulárně, byla buněčná suspenze centrifugována při 100 × g 10 min. Supernatant byl opatrně odstraněn a peleta byla zamrazena při -20 °C pro pozdější izolaci. Izolace probíhala stejně jako v případě bakteriální produkce proteinu (viz. 4.2, str. 42).

## **4.4 Purifikace proteinů**

### **4.4.1 Chelatační afinitní chromatografie**

Proteiny nesoucí na svém C-konci histidinovou kotvu byly purifikovány pomocí chelatační afinitní chromatografie. Pro purifikaci byly využity kolonky obsahující kobaltnaté ionty – HiTrap Talon crude 5 ml (GE Healthcare, USA) popřípadě nikelnaté ionty – HisTrap Excel 5 ml (GE Healthcare, USA) a HPLC systém ÄKTA. Eluce probíhala zvýšenou koncentrací imidazolu. V případě potřeby byl pro vyšší čistotu purifikovaného proteinu vložen před eluci ještě krok tzv. předeluce, kdy byla použita nižší koncentraci imidazolu k uvolnění nespecificky vázaných proteinů.

Kolonky byly nejprve ekvilibrovány PBS pufrem a poté byl na kolonku nanesen roztok proteinů, který byl ředěn 1:1 PBS pufrem. Ekvilibrace i nanášení vzorku probíhala rychlosti

5 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona propláchnuta PBS pufrem a poté byl protein eluován isokraticky pufrem s imidazolem rychlostí 2,5 ml/min. Průběh eluce byl sledován pomocí měření absorbance při 280 nm a vodivosti.

#### **4.4.2 Afinity chromatografie na laktosové koloně**

Pro purifikaci proteinu Epa1 vázajícího laktosu, byla využita kolona s imobilizovanou laktosou (Galab Technologies, Německo). Kolona byla připojena k HPLC systému ÄKTA. Kolona byla ekvilibrována pufrem 1, poté byl na kolonu nanesen roztok proteinu. Ekvilibrace i nanášení vzorku probíhalo rychlostí 5 ml/min. Poté byla kolona promyta pufrem 1 a protein byl isokraticky eluován pufrem 2, který obsahoval laktosu rychlostí 2,5 ml/min. Průběh eluce byl sledován pomocí měření absorbance při 280 nm a vodivosti.

#### **4.4.3 Koncentrování proteinů**

Pro koncentrování proteinů byly využity koncentrátoři Amicon Ultra (MWCO 10 000, Merck Millipore, USA). Koncentrátor byl naplněn roztokem proteinu a poté centrifugován při  $3900 \times g$ , dokud nebylo dosaženo požadované koncentrace či snížení objemu. Během centrifugace byl roztok několikrát promíchán, abychom se předešli srážení proteinu ve vzniklém koncentračním gradientu. Roztok proteinu byl následně centrifugován v čisté mikrozkuhavce 10 min při  $20000 \times g$ .

#### **4.4.4 Gelová permeační chromatografie**

Dalším krokem purifikace proteinů byla gelová permeační chromatografie. K HPLC systému ÄKTA basic byla připojena kolona Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, USA). Kolona byla ekvilibrována HEPES pufrem. Stejným pufrem byla také promyta 2ml nástřiková smyčka. Koncentrovaný vzorek proteinů byl pomocí mikrostríkačky a šesticestného ventilu nanesen na kolonu. Chromatografie probíhala za konstantního průtoku 0,5 ml/min. Průběh eluce byl sledován pomocí měření absorbance při 280 nm a vodivosti. Jednotlivé frakce byly sbírány pomocí automatického sběrače frakcí do čistých mikrozkuhovek.

#### **4.4.5 Dialýza**

Pro dialýzu vzorků po afinitní chromatografii byla použita dialyzační kazeta Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette (Thermo Scientific, USA) o objemu 8 ml. Eluovaný vzorek byl pipetován do kazety. Kazeta byla umístěna do 1,8 l dialyzačního pufru a inkubována při laboratorní teplotě za stálého míchání. Dialyzační roztok byl dvakrát vyměněn, vždy po dvou hodinách a po poslední výměně byla dialyzační kazeta inkubována přes noc při teplotě 4 °C.

#### **4.4.6 Výměna pufru**

Výměna pufru probíhala pomocí kolony HiTrap desalting 5 ml (GE Healthcare, USA), která byla připojena k HPLC systému ÄKTA. Kolona byla ekvilibrována finálním pufrům při průtoku 5 ml/min. Stejným pufrům byla také promyta 2 ml nástřiková smyčka. Roztok proteinu byl pomocí mikrostřičky a šesticestného ventilu nanesen na kolonu. Eluované frakce byly jímány po 1 ml.

#### **4.4.7 Měření koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometricky při 280 nm. Pro měření bylo použito 2  $\mu$ l vzorku proti slepému vzorku pufru. Pro vypočtení koncentrace byla do spektrofotometru DS-11 (DeNovix, USA) zadána hodnota teoretického extinkčního koeficientu při 280 nm a molekulová hmotnost spočítaná na základě primární sekvence nástrojem ProtParam [57].

#### **4.4.8 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Pro kontrolu čistoty proteinových frakcí byla využita elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS PAGE). Pro kontrolu proteinů o molekulové hmotnosti větší než 40 kDa byl připraven 10% rozdělovací gel, pro menší proteiny byl připraven 12,5% gel. Složení jednotlivých gelů je uvedeno v Tab. 2, str. 48.



**Tab. 2 Příprava gelů pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu**

	<b>Množství pro 10% rozdělovací gel (μl)</b>	<b>Množství pro 12,5% rozdělovací gel (μl)</b>	<b>Množství pro zaostřovací gel (μl)</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1600	1265	700
<b>30% AA</b>	1330	1675	250
<b>Tris (pH 8,8)</b>	1000	1000	-
<b>Tris (pH 6,8)</b>	-	-	125
<b>10% SDS</b>	40	40	10
<b>10% APS</b>	40	40	10
<b>TEMED</b>	2	2	1,5

Roztok rozdělovacího gelu byl pipetován mezi dvě skla elektroforetické soupravy a poté převrstven vodou. Po ztuhnutí byl gel převrstven zaostřovacím gelem, do kterého byl vložen hřeben. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byla skla přenesena do elektroforetické soupravy pro SDS elektroforézu. Vzorky proteinů byly připraveny pipetováním 12-20 μl roztoku proteinu a příslušného množství 5× koncentrovaného vzorkového pufru (neredukujícího nebo redukujícího). Vzorky byly zahřívány v termobloku po dobu 10 minut při 95 °C. Poté byly centrifugovány 2 min při 20000 × g. Do první jamky bylo pipetováno 5 μl standardu molekulových hmotností a poté byly do jednotlivých jamek pipetovány vzorky proteinů. Elektroforetická souprava byla připojena ke zdroji napětí, elektroforéza probíhala 45-60 min při 200 V. Elektroforéza byla ukončena, když bylo elektroforetické čelo 0,5 cm před koncem gelu. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut ze skel a barven přes noc barvicím roztokem. Druhý den byl odbarvován odbarvovacím roztokem. Po úplném odbarvení byl gel naskenován.

#### **4.4.9 Elektropřenos proteinů**

Elektropřenos probíhal v aparatuře, která byla složená ze dvou elektrod, mezi kterými bylo vloženo 10 obdélníků filtračního papíru, dále nitrocelulosaová membrána, polyakrylamidový gel a dalších 10 obdélníků filtračního papíru. Filtrační papíry byly smočeny v přenosovém pufru. Elektropřenos probíhal 15 min při 25 V a až 2,5 A. Po přenosu probíhala imunodetekce.

#### **4.4.10 Imunodetekce**

Membrána byla po elektropřenosu vyjmuta z aparatury a přes noc blokována roztokem 1% BSA v TBS pufru. Druhý den byla 2× opláchnuta roztokem TBS-Tween/Triton a 1× TBS pufrem. Poté byla membrána přenesena do 50ml zkumavky s 10 ml 1% BSA v TBS-pufru. Do roztoku bylo přidáno 2  $\mu$ l myší monoklonální protilátky proti histidinové kotvě. Zkumavka byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě v rotátoru. Po inkubaci byla membrána ve zkumavce opláchnuta stejným způsobem jako po blokaci a přenesena do čisté 50ml zkumavky. Bylo přidáno 10 ml 10% sušeného odtučněného mléka v TBS pufru s 2  $\mu$ l králičí polyklonální protilátky proti myšimu IgG konjugované s křenovou peroxidasou. Inkubace probíhala 1 hodinu za stejných podmínek. Po inkubaci byla membrána 3× opláchnuta TBS pufrem a byla provedena kolorimetrická detekce. K membráně bylo přidáno 20 ml AP pufru s 66  $\mu$ l NBT a 33  $\mu$ l BCIP. Po proběhnutí reakce byla membrána opláchnuta dH<sub>2</sub>O a ponechána oschnout a naskenována.

### **4.5 Studium struktury proteinů a jejich interakcí v roztoku**

#### **4.5.1 Hmotnostní spektrometrie**

Analýzu zapojení disulfidických můstků provedl RNDr. Tomáš Ječmen, PhD. z Katedry biochemie PřF UK. Pro analýzu disulfidických můstků byly proteiny nejdříve deglykosylovány ENDO F1 a následně separovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za neredukujících podmínek, pro každý vzorek vždy dvě dráhy. Byly vyříznuty odpovídající proužky, jeden z dvojice byl před modifikací cysteinů značen jodacetamidem a štěpen trypsinem a redukován pomocí TCEP, druhý nikoliv. Směs peptidů byla analyzována buďto přímo pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie nebo po odsolení a separaci na analytické koloně s reverzní fází ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, USA) nebo pomocí ESI-qTOFtandemové hmotnostní spektrometrie. Data byla zpracována softwarem DataAnalysis 4.4 [58].

#### **4.5.2 Izotermální mikrotitrační kalorimetrie**

Pro studium interakce proteinu Epa1 s laktosou bylo použito měření izotermální mikrotitrační kalorimetrie v Centru molekulární struktury BIOCEV s odborným dohledem Tatsiany Charnavets, PhD. na přístroji MiroCal iTC200 (Malvern Panalytical, USA). Měření

probíhalo v pufru HEPES TK pH 7,5 s 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Nejprve bylo provedeno kontrolní měření tepelného přídávku pufr-pufr a ligand (laktosa)-pufr. Pro měření interakce bylo použito 220 μl 120 μM roztoku Epa1, které bylo titrováno 40 μl 1,2 mM roztoku laktosy. První přídavek 0,4 μl následovalo 18 přídávků o objemu 2 μl, trvajících 4 s a s časovým odstupem 150 s. Měření probíhalo při 25 °C a za stálého míchaní 750 ot./min. Vyhodnocení dat provedl Mgr. Ondřej Skořepa v programech Nitpic [59], Sedphat [60] a data byla vizualizována pomocí programu Gussi [61].

### **4.5.3 Termoforéza s využitím vnitřní fluorescence proteinů**

Pro studium schopnosti proteinu Epa1 vázat laktosu byla využita termoforéza s využitím vnitřní fluorescence proteinů. Měření probíhalo na přístroji Monolith NT.LabelFree (NanoTemper, Německo) v Centru molekulární struktury BIOCEV za pomoci Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu. Před přípravou vzorků byly roztoky proteinu Epa1, laktosy a všechny použité pufrы centrifugovány 5 min při 10 000 × g a 4 °C. Do patnácti PCR mikrozkušavek bylo pipetováno 10 μl HEPES TK pufru s 0,1 % (v/v) polymeru Pluronic F-127. Mikrozkušavka číslo 1 obsahovala pouze 10 μl 20 mM roztoku laktosy v HEPES pufru. Do druhé mikrozkušavky s 10 μl HEPES TK pufru s 0,1 % (v/v) polymeru Pluronic F-127 bylo pipetováno 10 μl 20 mM roztoku laktosy v HEPES pufru. Roztok byl promíchán a poté bylo 10 μl roztoku pipetováno do třetí mikrozkušavky. Tímto způsobem bylo pokračováno až do 16. mikrozkušavky. 10 μl z poslední mikrozkušavky bylo odstraněno. Do všech mikrozkušavek bylo pipetováno 10 μl roztoku 20 μM proteinu Epa1 a poté byly mikrozkušavky centrifugovány za stejných podmínek. Následně byly naplněny termoforetické kapiláry Standard Monolith NT.LabelFree (NanoTemper, Německo) a vloženy do přístroje. Před měřením interakce bylo provedeno měření vnitřní fluorescence proteinu Epa1, roztoku laktosy a pufru. Měření interakce probíhalo při 40% MST výkonu a 30% LED síle excitace fluoroforu.

Pro sběr dat byl použit program NT.Control Software [61] a analýzu dat provedla Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu v programu PALMIST [63].

#### **4.5.4 Termoforéza pro analýzu interakce NKp46 s Epa1**

Studium interakce proteinu NKp46 a Epa1 v roztoku byly studovány pomocí termoforézy. Protein NKp46WT byl značen fluorescenční značkou AlexaFluor 647. K roztoku proteinu NKp46 o koncentraci 1 mg/ml byl přidán bikarbonátový pufr (pH 8,5) v poměru 1:9 (pufr : roztok proteinu) a poté byla přidána fluorescenční značka AlexaFluor 647 NHS ester v molárním poměru 1:2 (roztok proteinu : AlexaFluor 647). Směs byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě za stálého míchání na třepačce při 50 ot./min ve tmě. Přecistění roztoku proteinu probíhalo na odsolovací koloně HiTrap (GE Healthcare, USA).

Měření probíhalo na přístroji Monolith NT.115 (NanoTemper, Německo) v Centru molekulární struktury BIOCEV za pomoci Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu. Před přípravou vzorků byly všechny roztoky proteinu a použité pufrы centrifugovány 5 min při  $10\,000 \times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mikrozkuřavka číslo 1 obsahovala 10  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  roztoku proteinu Epa1. Do patnácti PCR mikrozkuřavek bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  HEPES TK pufru s 0,05% (v/v) Tween-20. Do druhé mikrozkuřavky s 10  $\mu\text{l}$  HEPES TK pufru s 0,05% (v/v) Tween-20 bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  roztoku proteinu Epa1. Roztok byl promíchán a poté bylo 10  $\mu\text{l}$  roztoku pipetováno do třetí mikrozkuřavky. Tímto způsobem bylo pokračováno až do 16. mikrozkuřavky. 10  $\mu\text{l}$  z poslední mikrozkuřavky bylo odstraněno. Do všech mikrozkuřavek bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  roztoku 200 nM značeného proteinu NKp46 a poté byly mikrozkuřavky centrifugovány za stejných podmínek. Následně byly naplněny termoforetické kapiláry Monolith NT.115 Standard (NanoTemper, Německo). Měření interakce probíhalo při 30% MST výkonu a 20% síle excitace fluoroforu.

Pro sběr dat byl použit program NT.Control Software [62] a analýzu dat provedla Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu v programu PALMIST [63].

## **4.6 Studium vazby proteinů na buněčný povrch**

### **4.6.1 Příprava linií exprimujících na svém povrchu NKp46**

Pro přípravu stabilně transfekovaných linií HEK293T byl použit systém piggyBac a stejný postup jako pro přípravu linií pro sekretované proteiny (viz 4.3.4, str. 44), plasmid pUT7 nesoucí expresní konstrukt obsahoval gen pro receptor NKp46 v celé jeho přirozené délce, a to ve variantě s mutací T225A nebo bez ní. Každé 3 dny byly buňky subkultivovány

do čerstvého média s antibiotiky. Expresce receptorů na buněčném povrchu byla indukována doxycyklinem. Pro stanovení optimální koncentrace doxycyklinu bylo provedeno kontrolní měření průtokovou cytometrií.

#### **4.6.2 Kultivace linie NK92MI**

Buňky linie NK92MI byly kultivovány suspenzně v 5 ml média v lahvích pro tkáňové kultury s plochou dna 25 cm<sup>2</sup>. Lahve byly uzavřené prodyšným víčkem a umístěné v inkubátoru MCO 18 AIC při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Základem kultivačního média byl alphaMEM. Každé 3-4 dny byla vyměněna polovina média. Láhev byla postavena vzpřímeně tak, aby shluky živých buněk mohly klesnout na dno a mohlo být odpipetováno svrchní médium. Následně byla kultura doplněna příslušným objemem čerstvého kompletního média. V případě potřeby byly buňky kultivovány v 15 ml média v lahvích s plochou dna 75 cm<sup>2</sup>.

#### **4.6.3 Kultivace linie SK-BR3**

SK-BR3 buňky jsou adherentní linií. Kultivace buněčných liniích probíhala v 5 ml média DMEM High Glucose v kultivačních lahvích s modifikovaným povrchem určených pro tkáňové kultury s plochou dna 25 cm<sup>2</sup>. Lahve byly uzavřené prodyšným víčkem a inkubace probíhala v inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Subkultivace probíhala každé 3–4 dny nebo při dosažení 80% konfluence. Z kultivační lahve bylo odebráno médium a buňky byly opláchnuty 0,5 ml trypsinizačního roztoku. Poté byl k buňkám přidán 1 ml trypsinizačního roztoku na dobu 5 min pro uvolnění buněk ode dna lahve. Suspenze buněk byla poté neutralizována 5 ml kompletního média a centrifugována v 15ml zkumavce 5 min při 95 × g a 20 °C. Supernatant byl z většiny odstraněn a peleta byla resuspendována v jeho zbylém objemu. Do 5 ml čerstvého média bylo poté přidáno takové množství resuspendovaných buněk, aby počáteční konfluence byla 20-30 %.

#### **4.6.4 Průtoková cytometrie**

Pro studium interakce proteinu Epa1 a imunoligandů Epa1\_antiHER2 a antiHER2\_Epa1 byly tyto proteiny značeny fluorescenční značkou BDP 650/665 NHS. Tato fluorescenční značka obsahuje reaktivní skupinu N-hydroxysukcinimid, která reaguje s primárními aminy. K roztoku proteinu o koncentraci 2,5 mg/ml byl přidán bikarbonátový pufr (pH 8,5)

v poměru 1:9 (pufr : roztok proteinu) a poté byla přidána fluorescenční značka BDP 650/665 NHS v molárním poměru 1:8 (roztok proteinu : BDP 650/665). Směs byla inkubována 4 hod při laboratorní teplotě za stálého míchání na třepačce při 50 ot./min. Přečištění roztoku proteinu probíhalo na odsolovací koloně HiTrap (GE Healthcare, USA). Poté byla změřena koncentrace proteinu (při 280 nm) a koncentrace fluorescenční značky (při 650 nm). Poměrem koncentrací byl vypočítán stupeň značení.

Ověření přítomnosti receptoru NKp46 na povrchu buněčných linií bylo provedeno pomocí měření průtokové cytometrie. Stabilně transfekované linie byly pipetovány do 6jamkové destičky po 1 ml buněčné suspenze. K buněčné suspenzi byl pipetován roztok doxycyklinu v dané koncentraci podle prováděného experimentu. Destička byla umístěna do inkubátoru a inkubována přes noc při 37 °C, 135 ot./min a 5 % CO<sub>2</sub>. Druhý den byla buněčná suspenze pipetována do 1,5ml zkumavky a centrifugována 5 min při 300 × g. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 1 ml FACS barvicím pufru. Suspenze byla opět centrifugována stejným způsobem. Poté byl oplach opakován ještě jednou. Po druhém oplachu byla peleta resuspendována ve 40 µl pufru. K každé buněčné suspenzi byla pipetován 1 µl myší monoklonální protilátky proti NKp46. Směs byla inkubována 30 minut na ledu. Po inkubaci byla suspenze 2 opláchnuta stejným způsobem. Po poslední oplachu byla peleta resuspendována v 300 µl FACS barvicího pufru. Jako negativní kontrola byla použita netransfekovaná linie buněk HEK293T.

Měření probíhalo v Laboratoři cytometrie PřF UK na přístroji BD LSQR II s excitačním laserem 637 nm a emisním filtrem 670/30 nm a bylo provedeno Mgr. Denisem Cmuntem.

Indukované stabilně transfekované linie HEK293T byly centrifugovány 5 min při 95 × g. Buněčná peleta byla resuspendována v FACS barvicím pufru a pipetovány na 96jamkovou destičku s kulatým dnem. K buněčné suspenzi byly pipetovány fluorescenčně značené proteiny o výsledné koncentraci 5–100 µg/ml. Inkubace probíhala 1 hodinu na ledu. Poté byly buňky 3× opláchnuty FACS barvicím pufrům a poté resuspendovány v 100 µl pufru. Měření probíhalo v Laboratoři cytometrie PřF UK na přístroji BD LSQR II s excitačním laserem 637 nm a emisním filtrem 670/30 nm a bylo provedeno Mgr. Barborou Kalouskovou. Získaná data byla vyhodnocena v programu FlowJo [64].

## 5 Výsledky

### 5.1 Příprava expresních vektorů

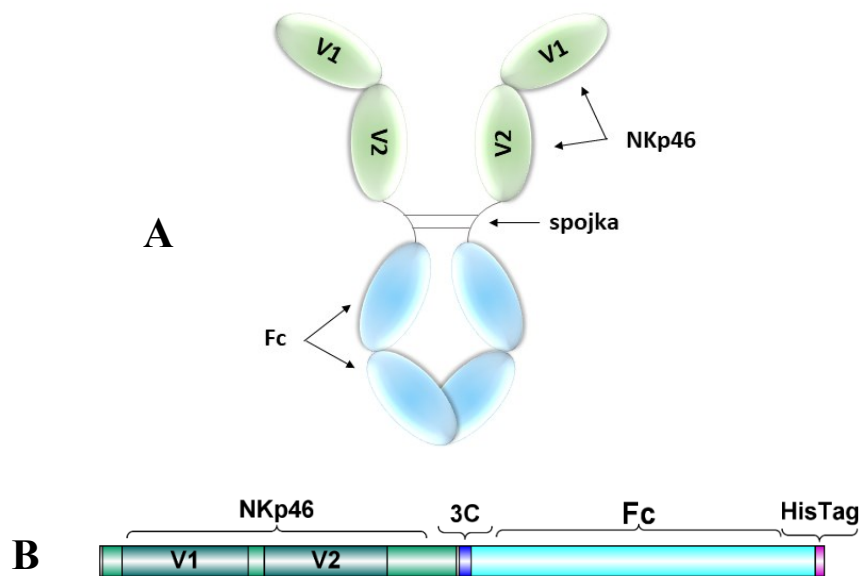
#### 5.1.1 Příprava plasmidu pro expresi rozpustného NKp46WT a NKp46M

Tato práce navazuje na bakalářskou práci Bc. Jany Houserové [65], která popisuje produkci kratšího konstruktů extracelulární části proteinu NKp46 (Q22 – G213). Na obrázku 5 na straně 55 je uvedena aminokyselinová sekvence receptoru NKp46. Při produkci proteinu nebyl výtěžek dostačující, proto byl konstrukt prodloužen (Q22 – R258) a vnesena mutace lichého cysteinu 48 za serin (pro větší stabilitu). Tuto mutaci provedl Mgr. Štěpán Herynek a výsledný konstrukt klonoval do plasmidu pTW5sec umožňující extracelulární produkci proteinu v liniích HEK293. Produkce měla nízké výtěžky, proto byl konstrukt klonován do vektoru pHLsecFcHis, obsahující Fc fragment na C-konec. Na obrázku 6 na straně 55 je schéma konstruktů a na obrázku 7 na straně 55 je uvedena jeho aminokyselinová sekvence. Konstrukt obsahuje před Fc fragmentem místo pro štěpení 3C proteasou. Výtěžky nebyly stále dostatečné, tak bylo přistoupeno ke změně expresního systému za expresi ve stabilně transfekovaných liniích za pomoci systému piggyBac.

Gen pro konstrukt NKp46 (Q22 – R258) byl včetně Fc fragmentu IgG amplifikován z plasmidu pHLsecFcHis s pomocí primerů pCHK5\_FW a pCH5\_REV nesoucích přesahy umožňující jeho následné vložení do vektoru pUT7. Plasmid pUT7 byl linearizován pomocí restričních endonukleas NheI a PmeI. Amplifikovaný insert a linearizovaný vektor byly spojeny pomocí tzv. QuickFusion reakce (tento konstrukt je v dalším textu uveden jako NKp46WT). Pro studium vlivu O-glykosylace na threoninu 225 byla provedena mutace threoninu za alanin (tento konstrukt je v dalším textu uveden jako NKp46M). Tato mutace byla provedena PCR s komplementárními přesahy (viz 4.1.5, str. 38) za pomoci mutačních primerů NKp46\_T225A\_FW a NKp46\_T225A\_REV a pCHK5\_FW a pCH5\_REV. Výsledný plasmid byl vložen pomocí QuickFusion reakce do linearizovaného plasmidu pUT7. Přítomnost mutace a sekvence plasmidů byla kontrolována pomocí sekvenace DNA. Plasmidem byly transformovány bakterie *E. coli* TOP10. Dále byla provedena PCR z kolonií a z pozitivních klonů byla připravena nízkoobjemové produkce DNA. Každý konstrukt byl použit pro velkoobjemovou produkci plasmidové DNA (Tab. 3, str. 56).

MSSTLPALLCVGLCLSQRISAQQQTLPKPFIWAEPHFMVPKEKQVTI**C**QGNYGAVEYQLHFEGL  
 FAVDRPKPPERINKVKFYIPDMNSRMAGQYS**C**IYRVGELWSEPSNLLDLVVTEMYDTPTLSVHPPG  
 EVISGEKVTFY**C**RLDTATSMFLLLKEGRSSHVQRGYGVQAEFPLGPVTTAHRGTYR**C**FGSYNNHA  
 WSPFSEPVKLLVTGDIENTSLAPEDP**T**FPADTWGTYLLTTTETGLQKDHALWDHTAQNLLR**M**GLAFL  
 VLVALVWFVLEDWLSRKRTREERASRASTWEGRRRLNTQTL

**Obr. 5 Aminokyselinová sekvence receptoru NKp46.** Oranžovým písmem je zvýrazněna signální část, černým písmem je zvýrazněna extracelulární část, zeleným písmem je vyznačena transmembránová část a modře je zvýrazněna intracelulární část. Červeně jsou vyznačeny cysteiny, které jsou zapojeny do disulfidických můstků 49 – 98 a 144 – 190. Tyrkysově jsou podbarvené aminokyseliny, které byly mutovány, lichý cystein 48 a v konstruktu NKp46M i threonin 225. Potrženy jsou dvě imunoglobulinové domény 34 – 118 a 129 – 211. Žlutě je vyznačena sekvence expresního konstruktů.



**Obr. 6 Schéma konstruktů NKp46 s Fc fragmentem.**

- A) Schéma dimeru konstruktů, V1 a V2 jsou dvě extracelulární domény proteinu NKp46 (zeleně), modře vyznačeny dvě domény Fc fragmentu IgG.  
 B) Schéma monomeru konstruktů NKp46WT

ETGQQQTLPKPFIWAEPHFMVPKEKQVTI**S**CQGNYGAVEYQLHFEGLFAVDRPKPPERINKVKFY  
 IPDMNSRMAGQYS**C**IYRVGELWSEPSNLLDLVVTEMYDTPTLSVHPPGPEVIVISGEKVTFY**C**RLDTAT  
 SMFLLLKEGRSSHVQRGYGVQAEFPLGPVTTAHRGTYR**C**FGSYNNHAWSPFSEPVKLLVTGDIEN  
 TSLAPEDP**T**FPADTWGTYLLTTTETGLQKDHALWDHTAQNLLR**G**TLEVLVFGQPKS**C**DKTHT**C**PP**C**PAP  
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT**C**VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**C**KVSNKALPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS  
 LT**C**LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS**C**SVMHE  
 ALHNHYTQKSLSLSPGK**HHHHHHH**

**Obr. 7 Aminokyselinová sekvence expresního konstruktů NKp46 s Fc fragmentem.** Žlutě je zvýrazněna extracelulární část receptoru NKp46, zeleným písmem je sekvence rozpoznávaná 3C proteasou, modrým písmem je vyznačena sekvence Fc fragmentu. Pro purifikaci proteinu sekvence obsahuje sekvenci 8 histidinů, podbarveno zeleně. Tyrkysově jsou podbarvena místa mutací, cystein 48 byl nahrazen serinem a v konstruktu NKp46M je threonin 225 nahrazen alaninem. Červeně jsou vyznačeny cysteiny, které jsou zapojeny do disulfidických můstků. Bez zvýraznění jsou pozůstatky sekrečního signálu a klonovacích míst.



**Tab. 3 Koncentrace plasmidové DNA z velkoobjemové produkce plasmidů NKp46**

Plasmid	Koncentrace (ng/μl)
pUT7_NKp46WT	514
pUT7_NKp46M	730

### 5.1.2 Příprava plasmidů pro vytvoření linií exprimujících na svém povrchu NKp46WT a NKp46M

Pro přípravu celého receptoru NKp46 byl využit komerční plasmid NKp46\_ORF. Tento plasmid obsahuje gen pro celý receptor NKp46, který byl amplifikován pomocí PCR a vložen do vektoru pUT7, který byl linearizován pomocí endonukleas NheI a PmeI. Dále byl připraven mutant receptoru NKp46 T225A pomocí PCR s komplementárními přesahy za pomoci mutačních primerů NKp46\_T225A\_FW a NKp46\_T225A\_REV a pCHK5\_FW a pCH5\_REV. Amplifikované inserty byly pomocí QuickFusion reakce vloženy do linearizovaného vektoru pUT7 a plasmidem byly transformovány bakterie *E. coli* TOP10. Dále byla provedena PCR z kolonií a z pozitivních klonů byla izolována plasmidová DNA. Po ověření správnosti vložených genů pomocí sekvenace DNA, byly zvolené klony použity k velkoobjemové produkci plasmidové DNA (Tab. 4)

**Tab. 4 Koncentrace plasmidové DNA z velkoobjemové produkce plasmidů NKp46 ORF**

Plasmid	Koncentrace (ng/μl)
pUT7_NKp46WT ORF	530
pUT7_NKp46M ORF	660

### 5.1.3 Příprava vektorů pro expresi fúzních proteinů Epa1

Pro přípravu fúzních proteinů Epa1 s antiHER2 nanoprotiátkou byl využit plasmid pOPINE\_Epa1, který byl připraven během bakalářské práce Bc. Jany Houserové [65]. Na obrázku 8 na straně 57 je uvedena aminokyselinová sekvence proteinu Epa1 a na obrázku 9 na straně 57 je uvedena aminokyselinová sekvence expresního konstruktu Epa1.

Nanoprotilátka proti nádorovému antigenu HER2 byla izolována pomocí fágového displeje v laboratoři docenta Aria de Marca na univerzitě Nova Gorica ve Slovinsku a následně sekvenována [66]. Fúzní proteiny byly připraveny ve dvou uspořádáních – protein Epa1 na N-konci a antiHER2 nanoprotilátka na C-konci fúzního proteinu (konstrukt ELH) a obráceně (konstrukt HLE). Protein a nanoprotilátka byly spojeny glycin-serinovou spojkou. Oba konstrukty obsahovaly na C-konci histidinovou kotvu. Aminokyselinové sekvence obou konstruktů jsou uvedeny na obrázcích 10 a 11 na stranách 57 a 58.

```
MILNPALFLNKVCVIYTTLILLLLLTNGGYATSSNDISLASKDPTTFPLGCSPDITTPKKGLSMELY
SYDFRKKGSYPCWDAAYLDPNYPRTGYKSHRLLAKVDGVTGNINFYHATKGCTPQLGHLPASINY
PKPLTMTNFTMLLYGYFRPKVTGFHTFTI SADDLLFVNFGAGNAFDCCRRDSSADHFGNYQAYAIW
GSKTAKDELTVHLDAGVYYPIRLFYNNREYDGALSFTFKTESNENTVSDFSEYFFSLDDTEEGCPG
LISYDSSCASVKTSKIIGIDYHTETPNENLVPITKTIYHLGIPCTGTTTTPLCGSGFYDPLANKCV
TINTSSTSSVTKTTSHTTSKEVFSHSSISSQKTLIPKSI P SPYGPISQSIPTEMETSSEISSEY
AFSDVISTPSHSPYTKKHSSLNSSSYTSTVIHSLTSYSISQGIFSTSLSEQNITSKSSTDKFSTAT
SMSNNITQSSIIISQFSTNNENYTTTSMHTSSDKISTETLNNISITTTTILFNSNSTILKNNTTII
SSDKDTHYHPVNPTIVCSTNKTEIICASITQPSISNSNNHWSSSVLKFNSTTVRSTLPSSAGSNET
SINVPFSSSTESNTSTSSSTSTSNSKMRSTLPSSAGSNETSISVPFSSSTESNTSTSSSTSTSNSKM
VRSTLPSSAGSNETSINVPFSSSTESNTSTSSSTSTSNSKTVRSTPFSSAGIIMTSLSQRNKKSASS
YASSNSKCYNTADSCRKVHSTPSYLLTSSYTSEGVDYDCSLVSTKLKINDTNCVNNKHTTKSCLKT
SVTTTTIPTLEIKTARKSSNTIGLHSYPTSSPNKSISSAPIIGYISSFKTIKTASPSYQTSDLTTI
TTITSLNPNPGSTAVENTHESNDKSRKTSSNDISSKHSVIKETKDAVESSNKSHQNTLKCSSIIIA
SSSHNSYESLGGTTLTLTLSKVYSPQNNDTLPFLEISEVNPSRVTLPESKMMQYLTSTEERNKTA
RNTIATNIVSISTFHFEGEGNAIRMGYTQLLLMLLIGIIVMNIQT
```

**Obr. 8 Aminokyselinová sekvence proteinu Epa1.** Červeným písmem je zvýrazněna signální část, černě je vyznačen řetězec Epa1. Žlutě je podbarvena část odpovídající expresnímu konstrukt.

```
MTSSNDISLASKDPTTFPLGCSPDITTPKKGLSMELYSYDFRKKGSYPCWDAAYLDPNYPRTGYKS
HRLLAKVDGVTGNINFYHATKGCTPQLGHLPASINYPKPLTMTNFTMLLYGYFRPKVTGFHTFTI
SADDLLFVNFGAGNAFDCCRRDSSADHFGNYQAYAIWGSKTAKDELTVHLDAGVYYPIRLFYNNRE
YDGALSFTFKTESNENTVSDFSEYFFSLDDTEEGCPGLISYDSSKHHHHHH
```

**Obr. 9 Aminokyselinová sekvence expresního konstrukt Epa1.** Žlutě je označen začátek a konec sekvence (threonin 31 – serin 271), která je shodná s genem Epa1. Červeně jsou zvýrazněny cysteiny, které jsou zapojeny do disulfidických můstků 50 – 179, 78 – 119 a 180 – 262. Pro purifikaci proteinu sekvenace obsahuje sekvenci 6 histidinů, podbarveno zeleně.

```
ETGTSSNDISLASKDPTTFPLGCSPDITTPKKGLSMELYSYDFRKKGSYPCWDAAYLDPNYPRTGY
KSHRLLAKVDGVTGNINFYHATKGCTPQLGHLPASINYPKPLTMTNFTMLLYGYFRPKVTGFHTF
TISADDLLFVNFGAGNAFDCCRRDSSADHFGNYQAYAIWGSKTAKDELTVHLDAGVYYPIRLFYNN
REYDGALSFTFKTESNENTVSDFSEYFFSLDDTEEGCPGLISYDSSGGGGSGGGSGGGSGGGGS
MAEVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGATSNI SNMGWFRQAPKEREFSVAISRASRPLYYADS
VKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSRAEDTATYYCAYMPLVRHKAYWGQGTQVTVSSGTHHHHHHHH
```

**Obr. 10 Aminokyselinová sekvence expresního konstrukt ELH produkovaného v linii HEK293.** Žlutě je vyznačena expresní část proteinu Epa1 shodná s genem Epa1. Zeleně je vyznačena Gly-Ser spojka a modře antiHER2 nanoprotilátka. Pro purifikaci proteinu sekvenace obsahuje 8 histidinů, podbarveno zeleně, bez zvýraznění jsou pozůstatky sekrečního signálu a klonovacích míst.

```

ETGMAEVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGATSNISNMGWFRQAPGKEREFVSAISR AESRPLY
ADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNLSRAEDTATYYCA YMPLVRHKAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGG
GGGGGGGGGGSTSSNDISLASKDPTTFPLGCSPDITTPKKGLSMELYSYDFRKKGSYPCWDAAYL
DPNYPRTGYKSHRLLAKVDGVTGNINFYHATKGCTPQLGHL PASYNYPKPLTMTNFTMLLYGYFR
PKVTGFHTFTISADDL L FVNFGAGNAFDCCRRDSSADHFGNYQAYAIWGSKTAKDELTVHLDAGVY
YPIRLFYNNREYDGALSFTFKTESNENTVSD FSEYFFSLDDTEEGCPGLISYDSSGT HHHHHHHH

```

**Obr. 11 Aminokyselinová sekvence expresního konstruktů HLE produkovaného v linii HEK293.** Modře je vyznačena antiHER2 nanoprotilátka a zeleně Gly-Ser spojka. Žlutě je vyznačena expresní část proteinu Epa1 shodná s genem Epa1. Pro purifikaci proteinu sekvence obsahuje 8 histidinů, podbarveno zeleně, bez zvýraznění jsou pozůstatky sekrečního signálu a klonovacích míst.

### 5.1.3.1 Příprava expresních vektorů pro produkci Epa1 fúzních proteinů v savčím expresním systému HEK293

Fúzní proteiny byly klonovány do vektoru pTW5sec umožňujícím sekretovanou expresi buňkami HEK293T. Plasmid pOPINE\_Epa1, který byl již připraven v rámci bakalářské práce, byl použit pro amplifikaci insertu do vektorů pTW5sec, konkrétně primery pTW5sec\_Epa1\_FW a Epa1\_spojka\_REV (insert 1) a spojka\_Epa1\_FW a Epa1\_pTW5sec\_REV (insert 2). Fúzní proteiny se spojkou (obsahující 4× sekvenci GGGGGS) a antiHER2 nanoprotilátkou byly v laboratoři připraveny již dříve [50], proto pro amplifikaci plasmidu spojka\_antiHER2 a antiHER2\_spojka byl použit plasmid pTW5sec\_MICA\_spojka\_antiHER2 a pTW5sec\_antiHER2\_spojka\_MICA.

Pro amplifikaci byl použity primery Epa1\_spojka\_FW a antiHER2\_pTW5sec\_REV (insert 3) a pTW5sec\_aHER2\_FW a spojka\_Epa1\_REV (insert 4). Poté byly spojeny inserty 1 a 3 a dále 2 a 4 pomocí PCR s komplementárními přesahy. Takto vzniklé inserty Epa1\_spojka\_antiHER2 (dále ELH) a antiHER2\_spojka\_Epa1 (dále HLE) byly vloženy do linearizovaného plasmidu pTW5sec, který byl linearizován restrikčními endonukleasami AgeI a KpnI. Plasmidem byly transformovány bakterie *E. coli* TOP10. Dále byla provedena PCR z kolonií a z pozitivních klonů byla izolována plasmidová DNA.

Po ověření správnosti vložených genů pomocí sekvenace DNA byly zvolené klony použity k velkoobjemové produkci plasmidové DNA (Tab. 5, str. 59). Na základě výsledků pokusů na jiných fúzních proteinech s protilátkou antiHER2 průběžně probíhajících v laboratoři 204, bylo přistoupeno k mutaci na antiHER2, konkrétně asparaginu 32 za glutamin, kdy tato mutace ruší glykosylační místo a tím zlepšuje afinitu nanoprotilátky. Tyto mutované plasmidy jsou označovány jako ELHmut, resp. HLEmut.

**Tab. 5 Koncentrace plasmidové DNA z velkoobjemové produkce plasmidů fúzních konstruktů Epa1**

Plasmid	Koncentrace (µg/µl)
pTw5sec_ELH	0,5
pTw5sec_HLE	0,5
pTw5sec_ELHmut	2,2
pTw5sec_HLEmut	1,9

### 5.1.3.2 Příprava expresních vektorů pro produkci Epa1 fúzních proteinů v *E. coli* nebo intracelulárně v savčích buňkách HEK293

Protein Epa1 byl standardně produkován v expresním systému *E. coli*, z toho důvodu byly plasmidy fúzních proteinů vloženy také do vektoru pOPINE, který umožňuje bakteriální expresi, ale i intracelulární expresi buňkami HEK293T. Pro amplifikaci byly využity již připravené plasmidy pro fúzní proteiny Epa1 pTW5sec\_Epa1\_spojka\_antiHER2 a pTW5sec\_antiHER2\_spojka\_Epa1. Pro vložení do linearizovaného vektoru pOPINE byly amplifikovány inserty s přesahy shodnými s vektorem pOPINE.

Konkrétně se jednalo o primery pOPINE\_Epa1\_FW anti HER2\_pOPINE\_REV (insert 5) a pOPINE\_antiHER2\_FW a Epa1\_pOPINE\_REV (insert 6). Takto amplifikované inserty byly vloženy do linearizovaného vektoru pOPINE, který byl linearizován restrikcí NcoI a PmeI. Plasmidem byly transformovány bakterie *E. coli* TOP10. Dále byla provedena PCR z kolonií a z pozitivních klonů byla izolována plasmidová DNA. Po ověření správnosti vložených genů pomocí sekvenace DNA byly zvolené klony použity k velkoobjemové produkci plasmidové DNA (Tab. 6).

**Tab. 6 Koncentrace plasmidové DNA z velkoobjemové produkce plasmidů fúzních proteinů Epa1 pro bakteriální produkci**

Plasmid	Koncentrace (ng/µl)
pOPINE_ELH	365
pOPINE_HLE	493

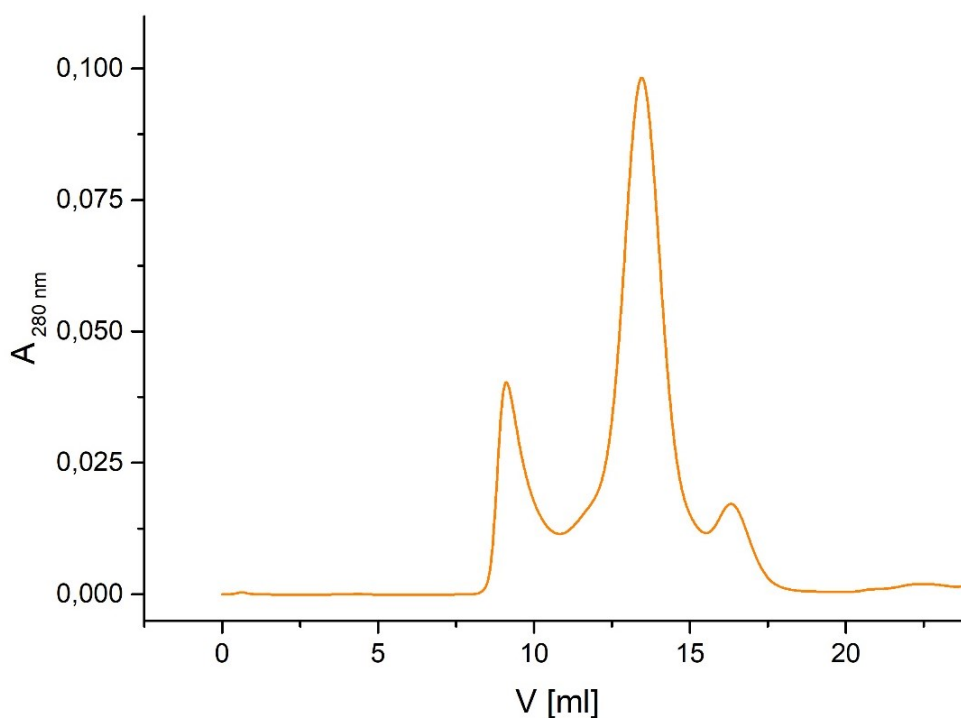
## 5.2 Produkce proteinů

### 5.2.1 Produkce NKp46WT a NKp46M

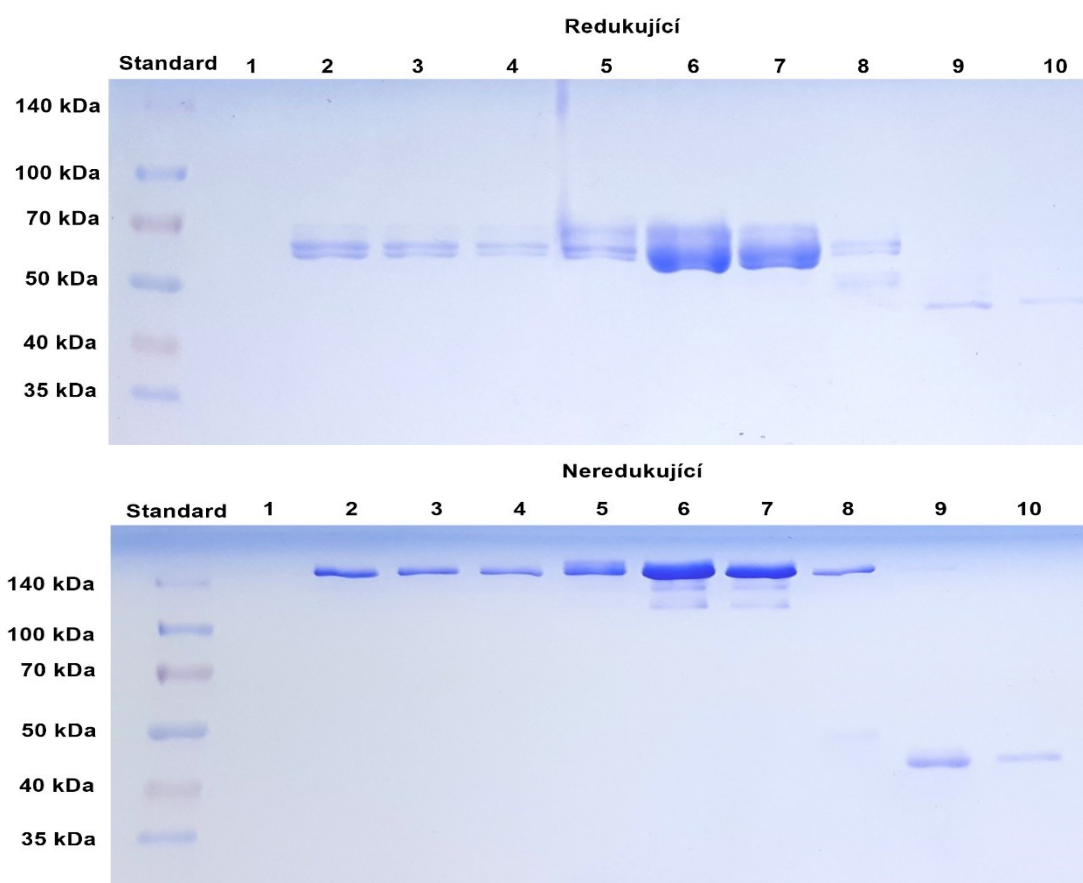
Pro produkci extracelulární části receptoru NKp46 byl zvolen savčí expresní systém HEK293. Z důvodu malých výtěžků při použití transientních expresí bylo přistoupeno k přípravě stabilně transfekovaných linií. Proteiny byly produkovány v linii HEK293S GnTI<sup>-</sup> a linii HEK293T. Pro transfekce byl použit systém piggyBac (viz 4.3.4, str. 44). Po indukci doxycyklinem byly buňky kultivovány 5 dnů a poté byly sklizeny. Obě varianty proteinů mají na svém N-konci sekreční signál a byly tedy sekretovány do média. Médium bylo centrifugováno a filtrováno. Pro purifikaci proteinů bylo médium ředěno 1:1 PBS pufrem. Prvním krokem purifikace byla afinitní chromatografie na koloně HisTrap Excel (GE Healthcare, USA). Při purifikacích se protein v prostředí 200 mM imidazolu srážel, proto byl eluát ihned odsolen. Poté byl roztok proteinu koncentrován na objem 500  $\mu$ l a nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA). Mobilní fází byl pufr HEPES TK a průtok nastaven na 0,5 ml/min. První testovací purifikace probíhala z produkce NKp46WT z linie HEK293S GnTI<sup>-</sup> o objemu 100 ml (Obr. 12, str. 61). Čistota jednotlivých frakcí byla ověřena pomocí SDS elektroforézy (Obr. 13, str. 61). Další varianty proteinů byly produkovány v objemu 300 ml. Purifikace probíhaly za stejných podmínek. Průběh gelové permeační chromatografie jednotlivých proteinů je na obrázku 14 na straně 62.

Produkové proteiny se během purifikace částečně srážely. V chromatogramech se vyskytoval eluční vrchol v objemu 13 ml, což odpovídá dimeru daného proteinu. Proteinu NKp46WT produkovaný v linii HEK293S GnTI<sup>-</sup> měl znatelný i druhý eluční vrchol v elučním objemu 16 ml. U ostatních variant proteinu se tento vrchol neobjevoval. Pro kontrolu čistoty frakcí byla provedena u každé varianty protein SDS elektroforéza všech frakcí. Na obrázku 15 na straně 62 je souhrnná elektroforéza všech variant proteinu.

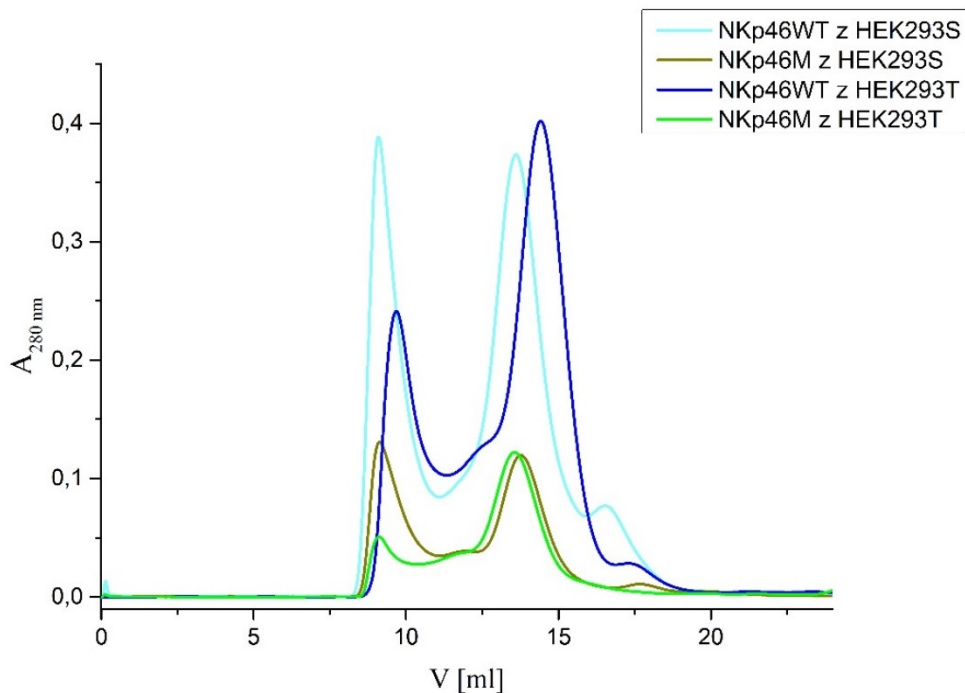
Molekulová hmotnost a extinkční koeficient byly spočítány pomocí online kalkulátoru ProtParam [57]. Molekulová hmotnost proteinu NKp46 je 54867,15 Da a extinkční koeficient je 79925 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Molekulová hmotnost proteinu NKp46 T225A je 54837,13 Da a extinkční koeficient je stejný. Při porovnání jednotlivých chromatogramů je zřejmé, že přirozené varianty proteinů se lépe produkovaly. Jednotlivé výtěžky přepočítané na 1 litr produktového média jsou uvedeny v tabulce Tab. 7 na straně 63.



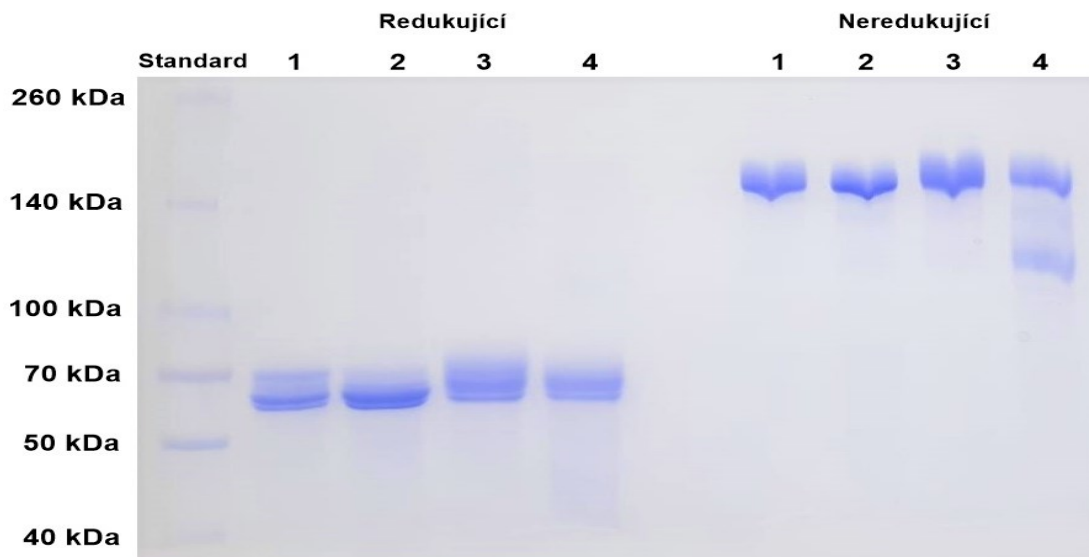
**Obr. 12 Gelová permeační chromatografie zkušební produkce proteinu NKp46WT.** Produkce ze 100 ml kultury HEK293S GnTI. Kolona Superdex 200 10/300 GL, sbírány frakce 11-17 ml.



**Obr. 13 SDS elektroforéza frakcí z gelové permeační chromatografie po zkušební produkci NKp46WT.** 12,5% gel, očekávaná velikost monomeru proteinu NKp46WT je 54,9 kDa a dimeru 109,8 kDa (bez glykosylace).



**Obr. 14** Gelové permeační chromatografie proteinů NKp46WT a NKp46M z produkci v liniích HEK293S GnTI- a HEK293T. Produkce proteinů v objemu média 300 ml. Kolona Superdex 200 10/300 GL, sbírány frakce 12-16 ml.



**Obr. 15** SDS elektroforéza proteinů NKp46 z gelových permeační chromatografií. 10% gel, očekávané velikosti monomerů proteinu NKp46 jsou 54,9 kDa a dimeru 109,8 kDa (bez glykosylace). Pořadí vzorků: (1) NKp46WT z HEK293S GnTI-, (2) NKp46M z HEK293S GnTI-, (3) NKp46WT z HEK293T, (4) NKp46M z HEK293T.

**Tab. 7 Výtěžky purifikace proteinů NKp46 a NKp46M**

<b>Protein</b>	<b>Množství v 1 litru média (mg)</b>
NKp46WT z HEK293S GnTI <sup>-</sup>	9
NKp46M z HEK293S GnTI <sup>-</sup>	2,4
NKp46WT z HEK293T	8,3
NKp46M z HEK293T	2,2

Výtěžky pro protein NKp46WT se zdají být relativně vysoké, je třeba si však uvědomit, že 2/3 hmotnosti proteinu tvoří Fc fragment a nikoliv extracelulární doména NKp46. Z tohoto důvodu je potřeba expresi, ale především purifikaci ještě dále optimalizovat a aby byl protein stabilní a finální výtěžky byla dostatečné pro další měření.

### **5.2.2 Výběr produkčního systému pro fúzní protein Epa1**

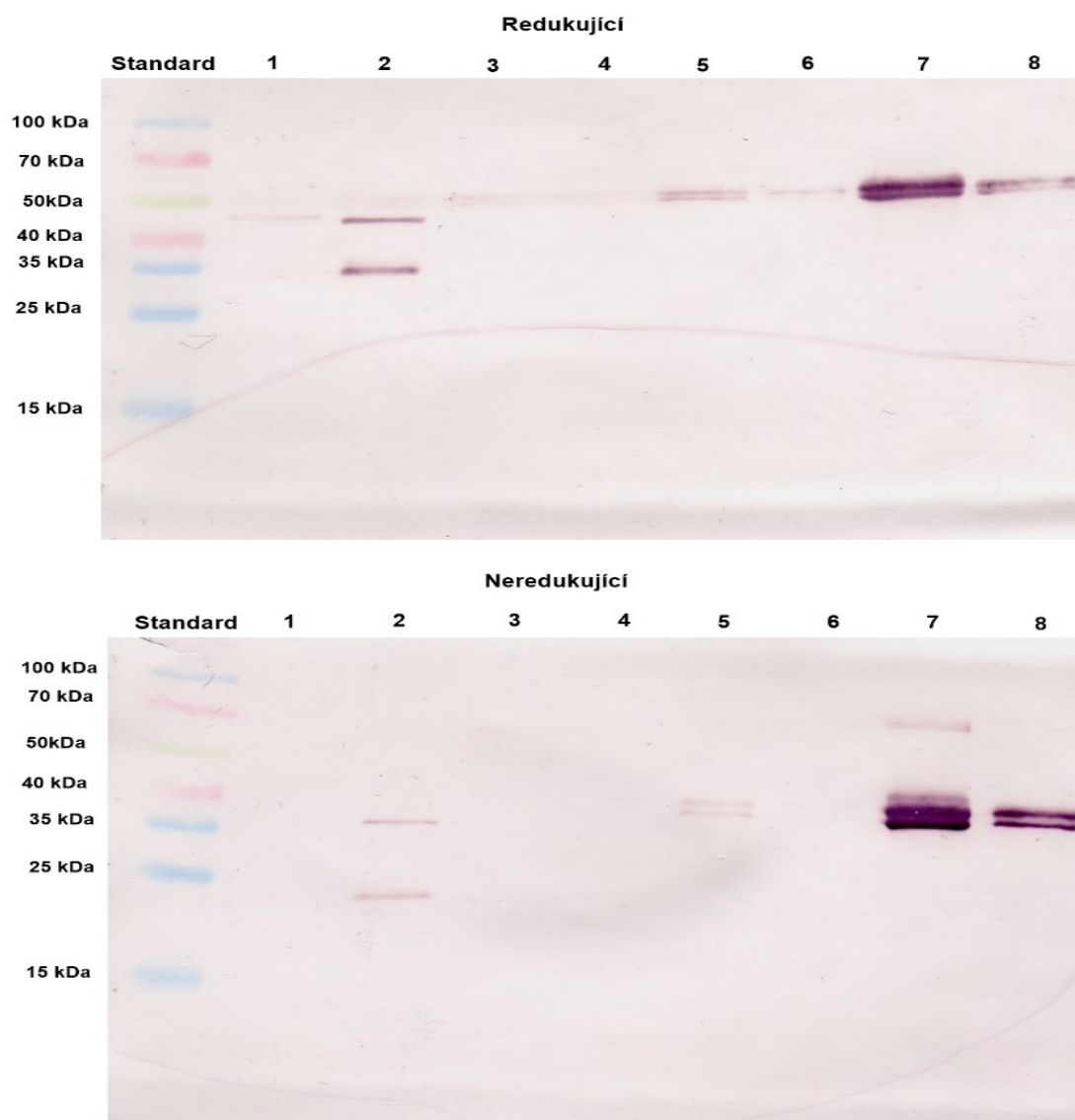
Protein Epa1 je standardně produkován v expresním systému *E. coli* SHuffle, produkce v HEK293T linii nebyla úspěšná. Fúzní protein však může mít jiné vlastnosti, proto byl vyzkoušen jak expresní systém HEK293T pro intracelulárně produkováný i sekretovaný protein, tak i *E. coli* SHuffle. Konstrukty ELH a HLE byly proto vloženy do vektoru pTW5sec, který umožňuje extracelulární produkci v HEK293T a dále do vektoru pOPINE, který umožňuje produkci v bakteriálních buňkách *E. coli*, ale také intracelulární produkci v HEK293T. Při produkci v *E. coli* SHuffle bylo postupováno stejně jako v případě produkce proteinu Epa1 (viz 4.2, str. 42), produkce byla provedena ve 40 ml média.

Plasmidem pOPINE\_ELH/HLE a pTW5sec\_ELH/HLE byly transfekovány buňky HEK293T a po 6 dnech byly produkce sklizeny (viz 4.3.3, str. 43). Produkce v HEK293T měly také objem 40 ml média.

K purifikaci proteinů byl použit 1 ml média, případně peleta získaná z 1 ml média. Purifikace proteinů probíhala pomocí afinitní chromatografie na magnetických kuličkách s imobilizovanými ionty Ni<sup>2+</sup>. Proteiny byly eluovány pufrům PBS s 200 mM imidazolem. Pro kontrolu byla provedena také izolace z buněčné pelety extracelulární produkce. S eluovanými proteiny byla provedena SDS elektroforéza, poté elektropřenos a imunodetekce histidinové kotvy (Obr. 16, str. 64).



Zkušební produkce měly stejný objem, proto lze výsledky imunodetekce přímo porovnat. Na základě tohoto pokusu bylo rozhodnuto o produkci fúzních proteinů extracelulárně v HEK293T. Molekulová hmotnost fúzních proteinů je 42850,38 Da a extinkční koeficient je  $62730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [57].



**Obr. 16 Imunodetekce testovacích produkcí fúzních proteinů ELH a HLE.**

Očekávaná velikost fúzních proteinů je 42,9 kDa (bez glykosylace)

(1) ELH z *E. coli*; (2) HLE z *E. coli*

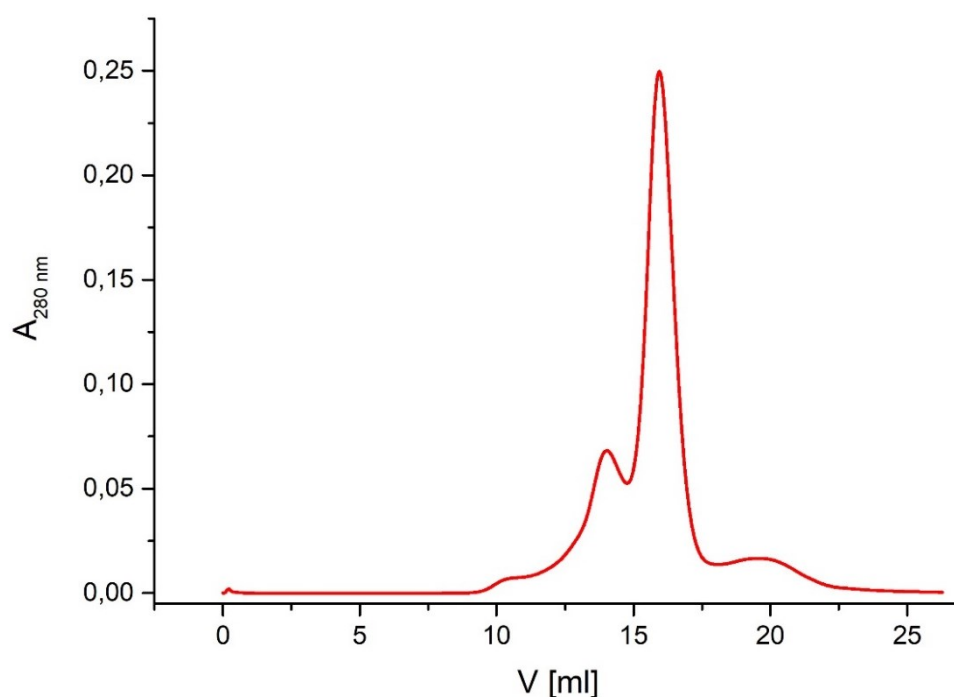
(3) ELH intracelulární HEK293T; (4) HLE intracelulární HEK293T

(5) ELH peleta extracelulární HEK293T; (6) HLE peleta extracelulární HEK293T

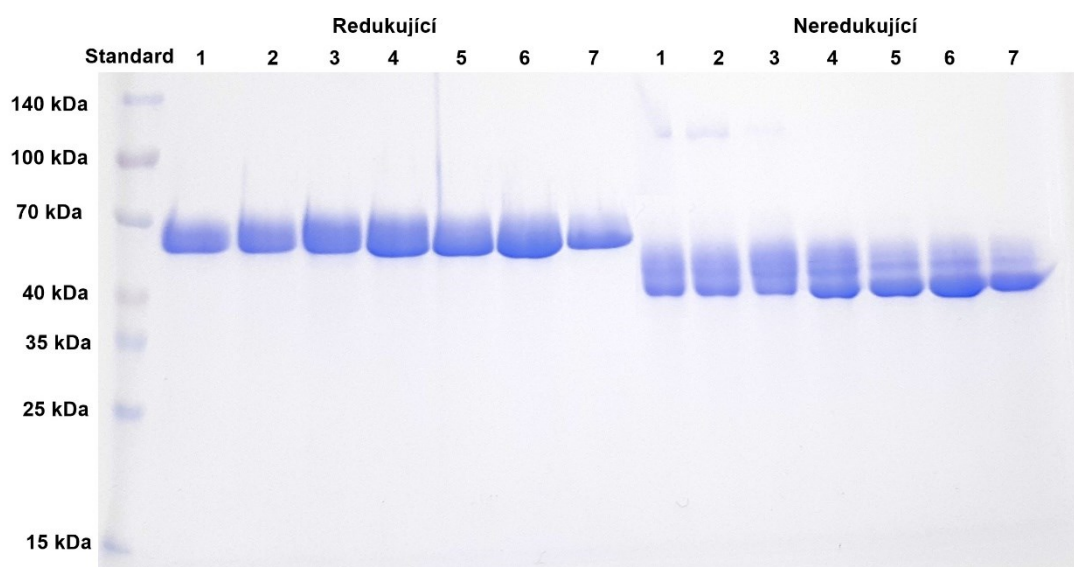
(7) ELH médium extracelulární HEK293T; (8) HLE médium extracelulární HEK293T

### 5.2.3 Produkce fúzních proteinů Epa1

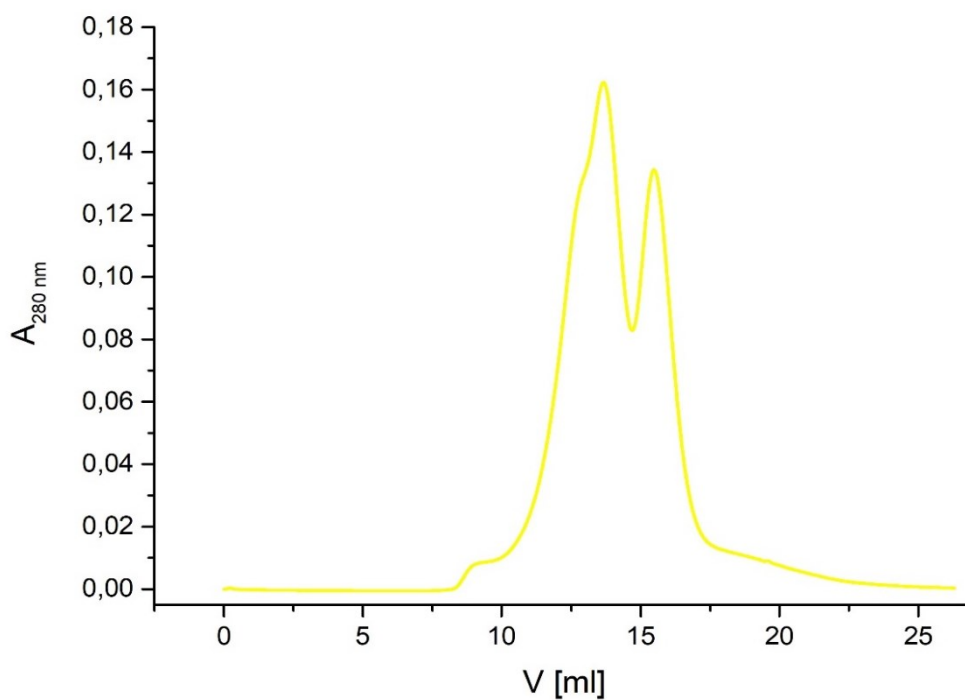
Na základě porovnání výtěžku produkcí z jednotlivých expresních systémů byl vybrán expresní systém HEK293T. Pro další produkce byly použity plasmidy s mutovanou antiHER2 nanoprotilátkou. Plasmidem pTW5sec\_ELHmut, resp. pTWs5sec\_HLEmut, byly transfekovány buňky HEK293T. Po 6 dnech produkce bylo 400 ml média sklizeno centrifugací. Prvním purifikačním krokem byla chelatační afinitní chromatografie na koloně HiTrap Excel (GE Healthcare, USA). Při purifikacích se protein v prostředí 200 mM imidazolu srážel, proto byl eluát ihned odsolován. Odsolený eluát byl koncentrován na objem 500  $\mu$ l a poté nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA). Frakce byly sbírány po 1 ml. Frakce odpovídající elučnímu objemu proteinu byly spojeny, koncentrovány a naneseny na kolonu Superdex Increase 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA, Obr. 17, str. 65 a Obr. 19, str. 66). Frakce byly sbírány po 0,5 ml. U proteinu ELHmut se vyskytoval eluční vrchol v objemu 16 ml, což odpovídá velikosti daného proteinu a malý vrchol v objemu 13 ml. U proteinu HLEmut se vyskytoval menší eluční vrchol v objemu 16 ml, což odpovídá velikosti danému proteinu a větší vrchol v objemu 12,5 ml. Kontrola čistoty frakcí byla provedena pomocí SDS elektroforézy (Obr. 18, str. 66 a Obr. 20, str. 67). Na základě SDS elektroforézy lze předpokládat, že eluční vrchol při 12,5 ml, respektive 13 ml, může odpovídat kovalentnímu dimeru. Molekulová hmotnost fúzních proteinů je 42850,38 Da a extinkční koeficient je  $62730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [57].



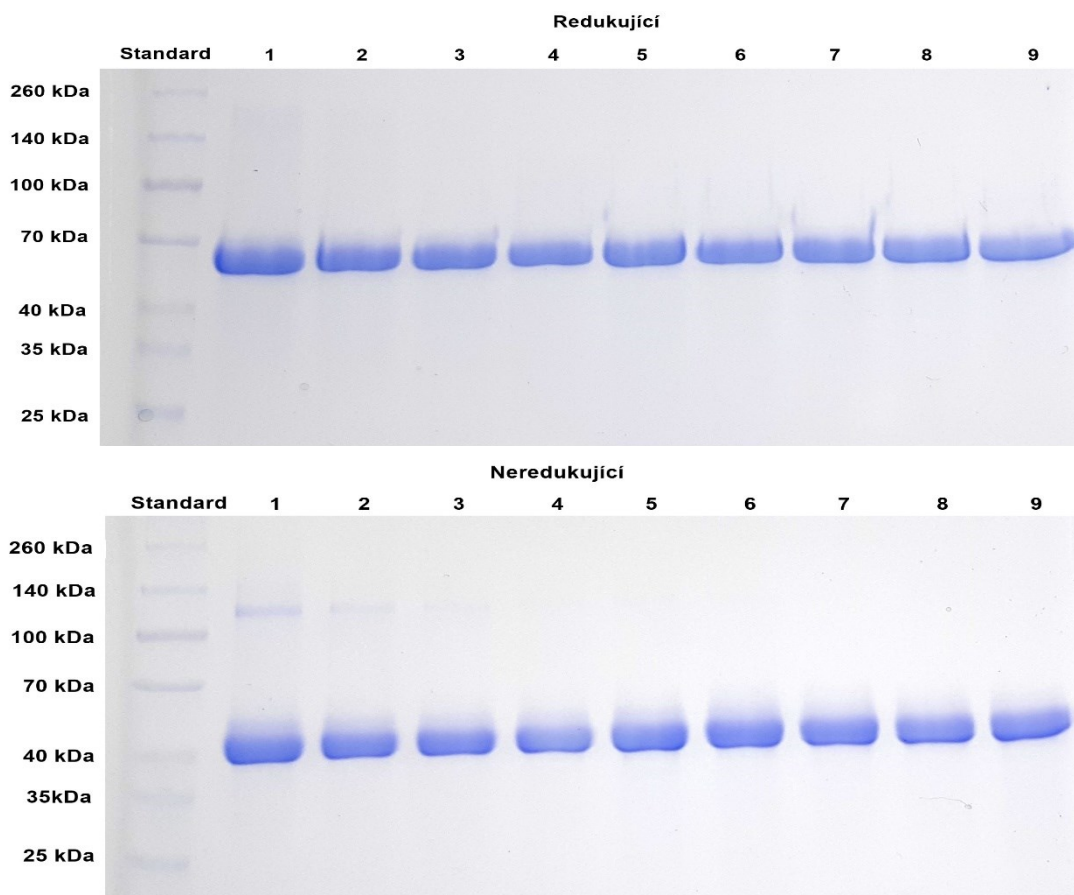
**Obr. 17 Gelová permeační chromatografie proteinu ELHmut.** Kolona Superdex Increase 200 10/300 GL, sbírány frakce 11 – 17 ml.



**Obr. 18 SDS elektroforéza frakcí z gelové permeační chromatografie proteinu ELHmut.** 12,5% gel, očekávaná velikost proteinu ELHmut je 42,9 kDa (bez glykosylace)



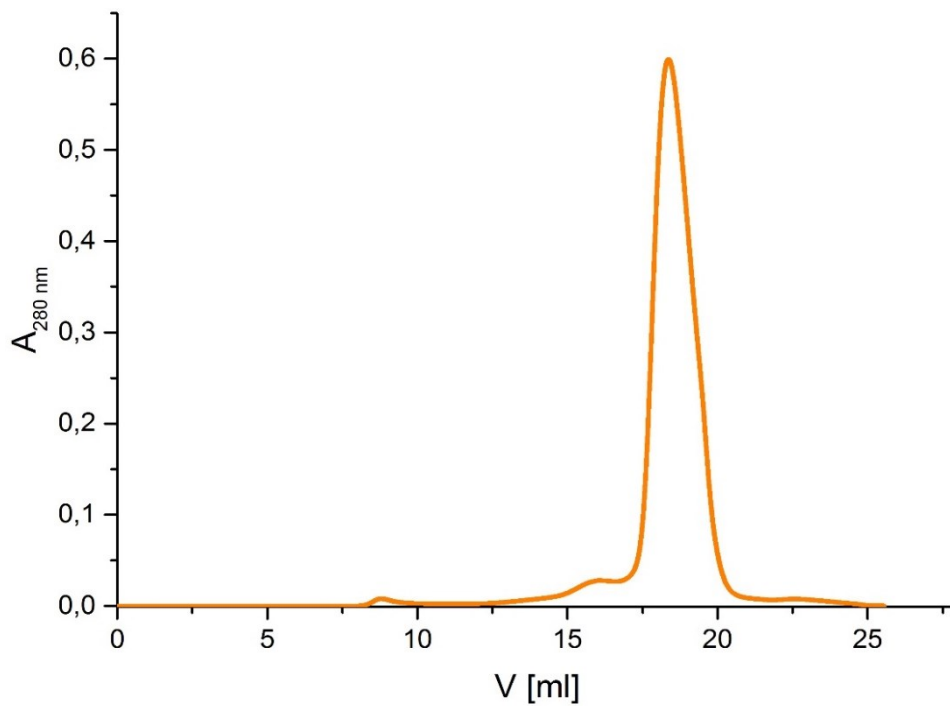
**Obr. 19 Gelová permeační chromatografie proteinu HLEmut.** Kolona Superdex Increase 200 10/300 GL, sbírány frakce 11 – 18 ml.



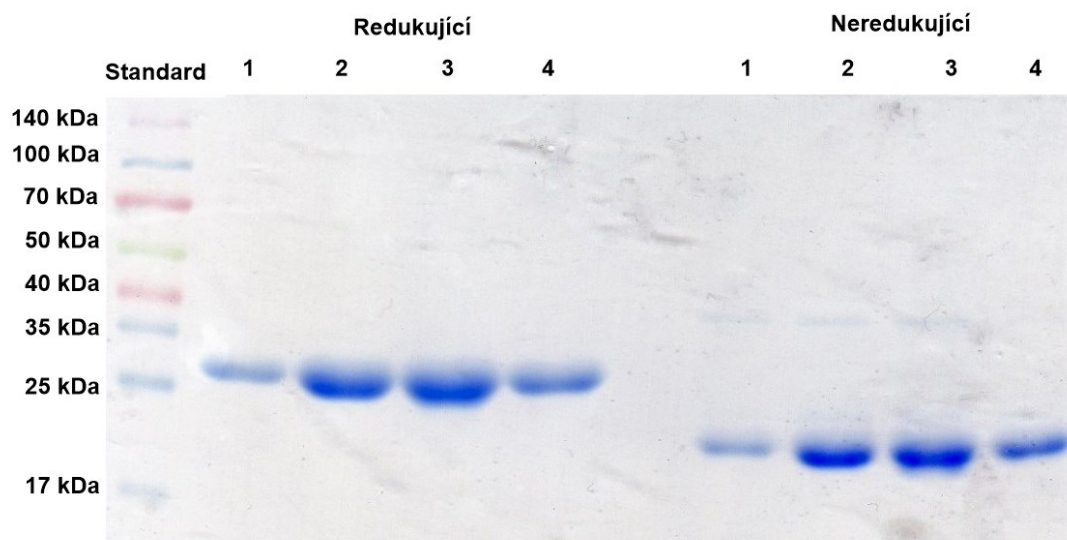
**Obr. 20 SDS elektroforéza frakcí z gelové permeační chromatografie proteinu HLEmut. 12,5% gel, očekávaná velikost proteinu HLEmut je 42,9 kDa (bez glykosylace).**

## 5.2.4 Produkce Epa1

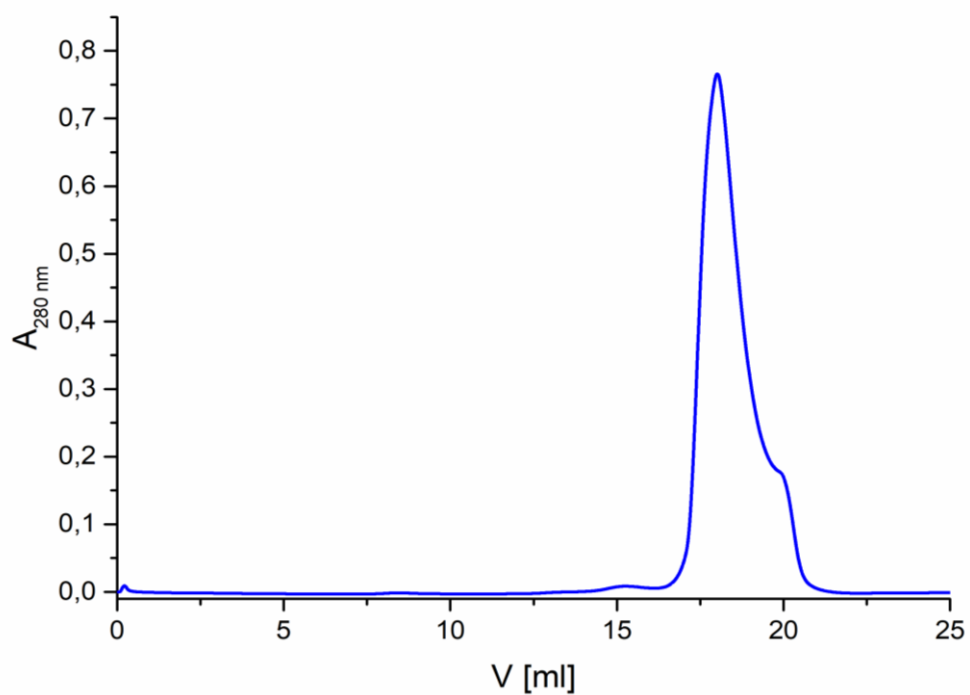
Výběr expresního kmene *E. coli* byl optimalizován v rámci bakalářské práce Bc. Jany Houserové [65]. Pro produkci byl vybrán kmen *E. coli* SHuffle, který dokáže lépe skládat proteiny s více disulfidickými vazbami. Buňky *E. coli* SHuffle byly transformovány plasmidem pOPINE\_Epa1, produkce proteinu probíhala za snížené teploty (viz 4.2, str. 42). Prvním purifikačním krokem byla afinitní chromatografie na laktosové koloně. Zředěné medium bylo nanášeno na kolonu průtokem 5 ml/min a poté eluováno pufrům s 200 mM laktosou. Následující kroky měly za cíl odstranit navázanou laktosu vyvázáním  $\text{Ca}^{2+}$  iontů přidávkem EDTA a pomocí gelové filtrace převést protein do finálního pufru (HEPES s 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , Obr. 21, str. 69). Z gelové filtrace byly sbírány frakce po 1 ml. Pro kontrolu čistoty frakcí byla provedena SDS elektroforéza (Obr. 22, str. 69). Na základě dat z ITC poukazujících na nízké množství kompetentní frakce proteinu Epa1 (interakce s laktosou nebyla vůbec pozorována, data tedy nejsou prezentována) byl pozměněn purifikační postup a po afinitní chromatografii na koloně s imobilizovanou laktosou následovala dialýza (viz 4.4.5, str. 47). Dialyzovaný roztok proteinu byl koncentrován a nanášen na kolonu Superdex Increase 200 10/300 GL a byla provedena gelová permeační chromatografie (Obr. 23, str. 70). Mobilní fází byl HEPES TK z důvodu následujících plánovaných pokusů na buněčných liniích. Pro kontrolu čistoty frakcí byla provedena SDS elektroforéza (Obr. 24, str. 70). Molekulová hmotnost Epa1 je 28189,33 Da a extinkční koeficient je  $41175 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [57].



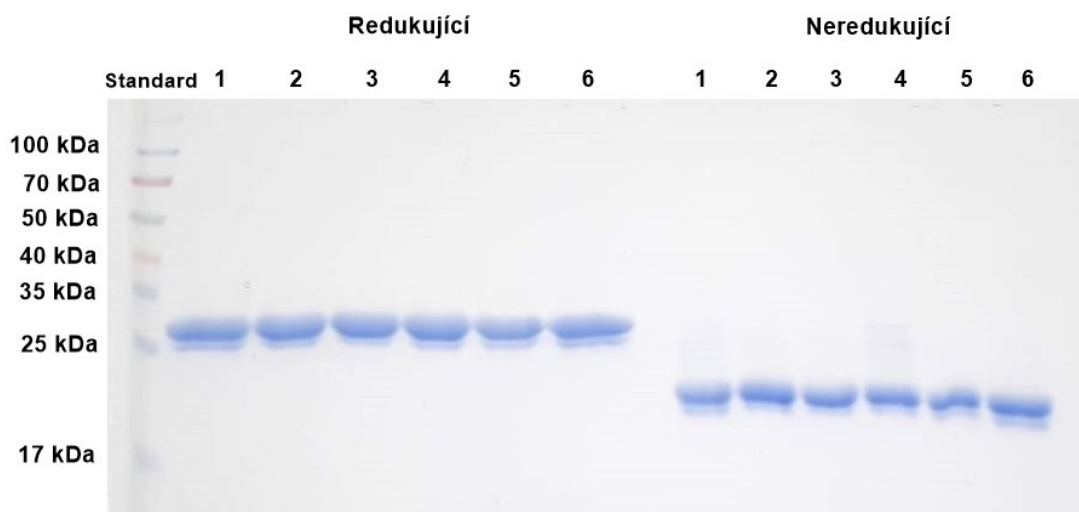
**Obr. 21** Gelová permeační chromatografie proteinu Epa1. Kolona Superdex 200 10/300 GL, sbírány frakce 16–20 ml.



**Obr. 22** SDS elektroforéza frakcí z gelové permeační chromatografie. 12,5% gel, očekávaná velikost proteinu Epa1 je 28,2 kDa



**Obr. 23** Gelová permeační chromatografie proteinu Epa1 po dialýze. Kolona Superdex Increase 200 10/300 GL, sbírány frakce 17 – 21 ml.



**Obr. 24** SDS elektroforéza frakcí z gelové permeační chromatografie po dialýze. Nanáška 2,5  $\mu\text{g}$  proteinu, 12,5% gel. Očekávaná velikost proteinu Epa1 je 28,2 kDa

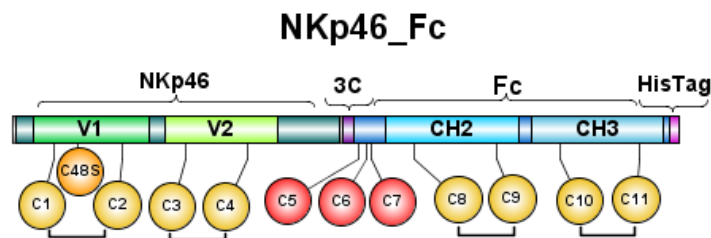
## 5.3 Studium struktury a interakce proteinů v roztoku

### 5.3.1 Hmotnostní spektrometrie

Mapování disulfidických můstků pomocí hmotnostní spektrometrie provedl RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D. z Katedry biochemie PřF UK. Frakce proteinu NKp46WT produkovaného v linii HEK293S GnTI<sup>-</sup> přečištěná gelovou filtrací byla nejprve separována SDS elektroforézou, proužky obsahující protein byly následně vyříznuty a zpracovány. Protein byl štěpen trypsinem, tryptické štěpy byly přečištěny na koloně s reverzní fází, separovány, ionizovány elektrosprejem a analyzovány hmotnostním spektrometrem. Z fragmentačního spektra byly identifikovány fragmenty spojené disulfidovou vazbou. Na obrázku 25 jsou uvedené disulfidové můstky v sekvenci proteinu a na obrázku 26 je znázorněno schéma těchto zapojení.

```
ETGQQQTLPKPFIWAEPHFMPVPEKQVTISC1QGNYGAVEYQLHFEGSLFAVDRPKPPERINKVKF  
YIPDMNSRMAGQYSC2IYRVGELWSEPSNLLDLVVTEMYDTPTLSVHPGPEVISGEKVTFYC3RLDT  
ATSMFLLLKEGRSSHVQRGYGKVQAEFPLGPVTTAHRGTYRC4FGSYNNHAWSPSEPVKLLVTGD  
IENTSLAPEDPTFPDWTWGTYLLTTETGLQKDHALWDHTAQNLLRC5GTLEVLC6FQGPKSC7DKTHTC8PP  
C9PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVC10VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC11KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  
TKNQVSLTC12LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SC13SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKC14HHHHHHH
```

**Obr. 25** Mapování disulfidických můstků proteinu NKp46WT s Fc fragmentem. Žlutě je zvýrazněna extracelulární část receptoru NKp46, zeleným písmem je sekvence rozpoznávaná 3C proteasou, modrým písmem je vyznačena sekvence Fc fragmentu a zeleně je podbarvena sekvence histidinové kotvy. Červeně jsou vyznačeny cysteiny, které mohou tvořit intramolekulární vazby. Stejnými barvami jsou podbarveny cysteiny spojené disulfidovým můstkem.



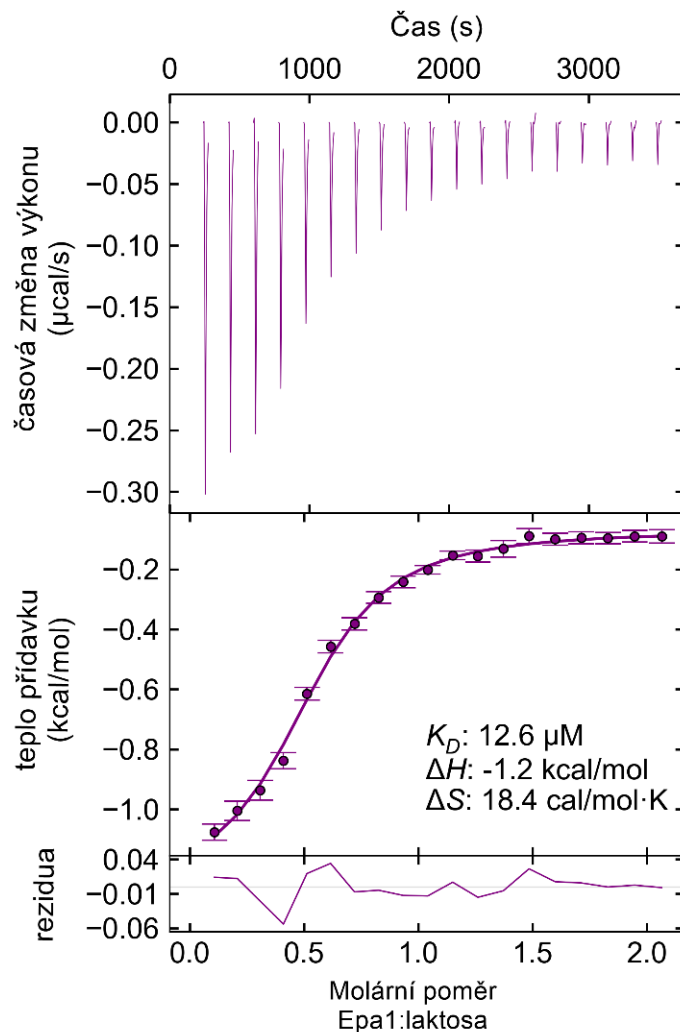
**Obr. 26** Schématické znázornění zapojených disulfidů ve struktuře proteinu NKp46WT s Fc fragmentem. V1 a V2 jsou extracelulární domény proteinu NKp46. CH2 a CH3 jsou domény Fc fragmentu. 3C je místo pro štěpení 3C proteasou.



Ve fragmentačním spektru se podařilo přímo identifikovat peptidy vzniklé spojením C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> a C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>. Ty odpovídají zapojení disulfidů v imunoglobulinových doménách. Zapojení disulfidu C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> se nepodařilo potvrdit přímo, protože hmota odpovídajícího peptidu byla nad rozsah měření. Zároveň však nebyly přítomné peptidy odpovídající zapojení s jinými cysteiny (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> nebo C<sub>7</sub>), proto lze toto zapojení nepřímo potvrdit. Cysteiny C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> a C<sub>7</sub> se nachází v tzv. pantové oblasti molekuly IgG a jsou zodpovědné za tvorbu kovalentního dimeru celého konstruktů s Fc fragmentem IgG.

### **5.3.2 Izotermální mikrotitrační kalorimetrie**

Pomocí izotermální mikrotitrační kalorimetrie (ITC, z angl. isothermal microtitration calorimetry) byla ověřena schopnost proteinu Epa1 vázat laktosu. Tímto měřením byla ověřována schopnost adhesinu vázat laktosu po různě zvolených purifikačních krocích. V prvním purifikačním kroku byl využit roztok laktosy k eluci proteinu z laktosové kolony (viz 4.4.2, str. 46). K eluovanému proteinu byl přidán roztok EDTA o výsledné koncentraci 10 mM k vyvázání vápenatých iontů z aktivního místa proteinu, a tím uvolnění navázané laktosy. Po gelové permeační chromatografii byl protein koncentrován. S koncentrovaným proteinem proběhlo měření ITC. Z výsledků bylo zřejmé, že přidáním roztoku EDTA se nepodařilo vázanou laktosu z aktivního místa odstranit. Na základě těchto měření byl změněn purifikační postup a po eluci roztokem laktosy byl roztok proteinu dialyzován proti pufru bez laktosy. S takto dialyzovaným roztokem proteinu bylo opět provedeno měření ITC. Pro měření bylo použito 300  $\mu$ l 120  $\mu$ M roztoku Epa1 (odpovídá koncentraci 3,4 mg/ml) a 60  $\mu$ l 1,2 mM roztoku laktosy. Výsledek měření je na obrázku 27 na straně 73.

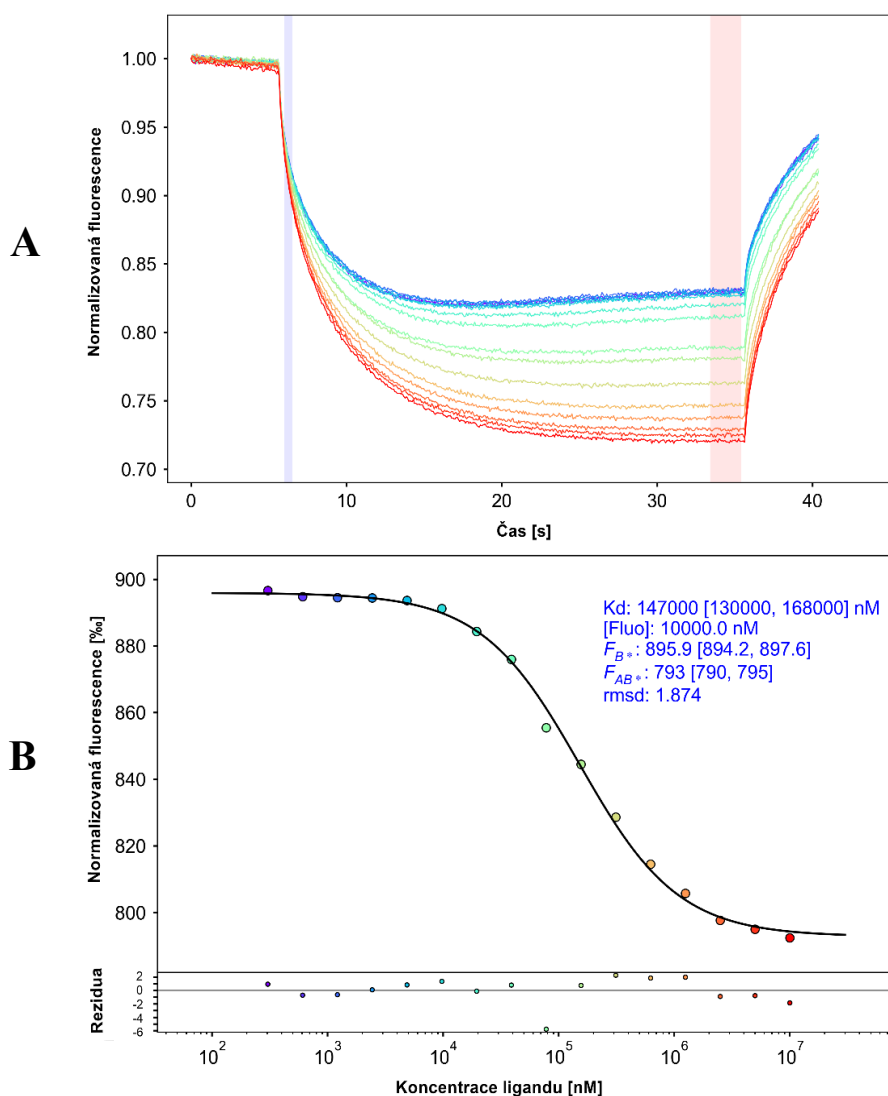


**Obr. 27 Izotermální mikrotitrační kalorimetrie interakce Epa1 a laktosy.** Titrace  $120 \mu\text{M}$  roztoku proteinu Epa1 pomocí  $1,2 \text{ mM}$  roztoku laktosy.

Naměřená hodnota disociační konstanty  $12,6 \mu\text{M}$  je pouze přibližná, titrační křivka není úplná a proto nelze data spolehlivě vyhodnotit. K naměření celé křivky by bylo nutné protein Epa1 více zkoncentrovat, což bylo kvůli srážení problematické. Interakci Epa1 s laktosou však lze potvrdit a naměřená přibližná hodnota disociační konstanty v mikromolárním řádu je v souladu s očekáváním.

### 5.3.3 Termoforéza s detekcí vnitřní fluorescence tryptofanu

Pomocí termoforézy s detekcí vnitřní fluorescence tryptofanu byla ověřena schopnost proteinu Epa1 vázat laktosu. Pro tuto metodu nebylo zapotřebí protein fluorescenčně značit. Protein Epa1 obsahuje ve své struktuře dvě aromatické aminokyseliny, konkrétně dva tryptofany. Nejprve byl naměřen tzv. cap scan k ověření úrovně fluorescence všech kapilár, měření interakce probíhalo celkem v 16 kapilárách. Koncentrace proteinu Epa1 byla 10  $\mu\text{M}$ , koncentrace laktosy se pohybovala v ředící řadě od 10 mM až po 305,2 nM. Ke všem vzorkům byl přidán HEPES pufr TK s 0,1% (v/v) polymerem Pluronic F-127. K měření byl nastaven 40% MST výkon a 30% LED síla excitace fluoroforu. Výsledky měření jsou na obrázku 28.



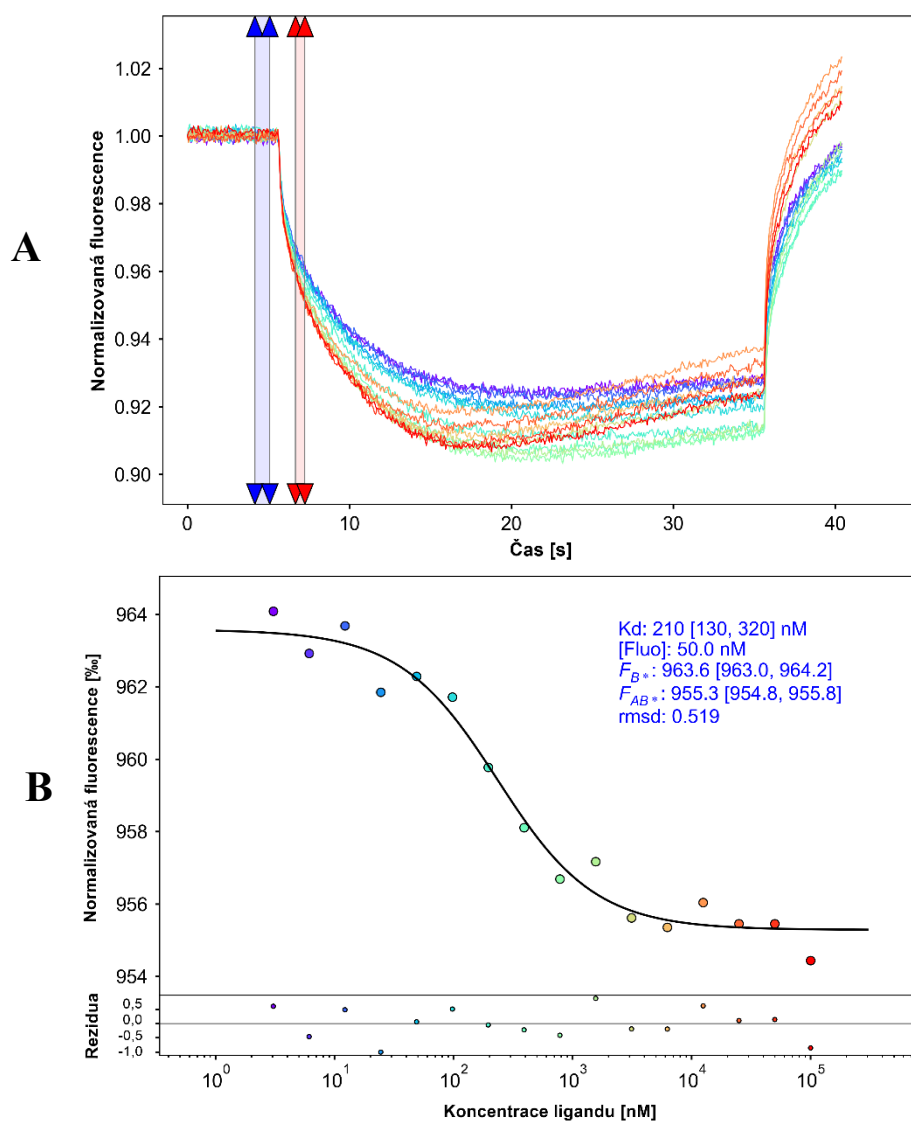
**Obr. 28** Termoforéza s detekcí vnitřní fluorescence tryptofanu proteinu Epa1 a jeho ligandu laktosy. Koncentrace proteinu Epa1 byla 10  $\mu\text{M}$ .

A. Průběh MST měření interakce proteinu s ligandem laktosou. Měření probíhalo s 40% MST výkonem a 30% LED silou excitace fluoroforu.

B. Závislost podílu normalizovaných hodnot fluorescence na koncentraci laktosy.

### 5.3.4 Termoforéza pro analýzu interakce NKp46 s Epa1

Pro studium interakce proteinu NKp46WT a Epa1 bylo využito měření termoforézy. Protein NKp46 byl fluorescenčně značen a protein Epa1 byl titrován. Počáteční koncentrace byly 200 nM roztok značeného proteinu Nkp46 fluorescenční značkou AlexaFluor 647 a 100  $\mu$ M roztok proteinu Epa1. Měření interakce probíhalo v 16 kapilárách. K všem vzorkům byl přidán HEPES pufr TK s 0,05% (v/v) Tween-20. K měření byl nastaven 30% MST výkon a 20% síla excitace fluoroforu. Výsledky měření jsou na obrázku 29.



**Obr. 29** Termoforéza interakce proteinu NKp46 a proteinu Epa1.

Koncentrace proteinu NKp46 byla 200 nM.

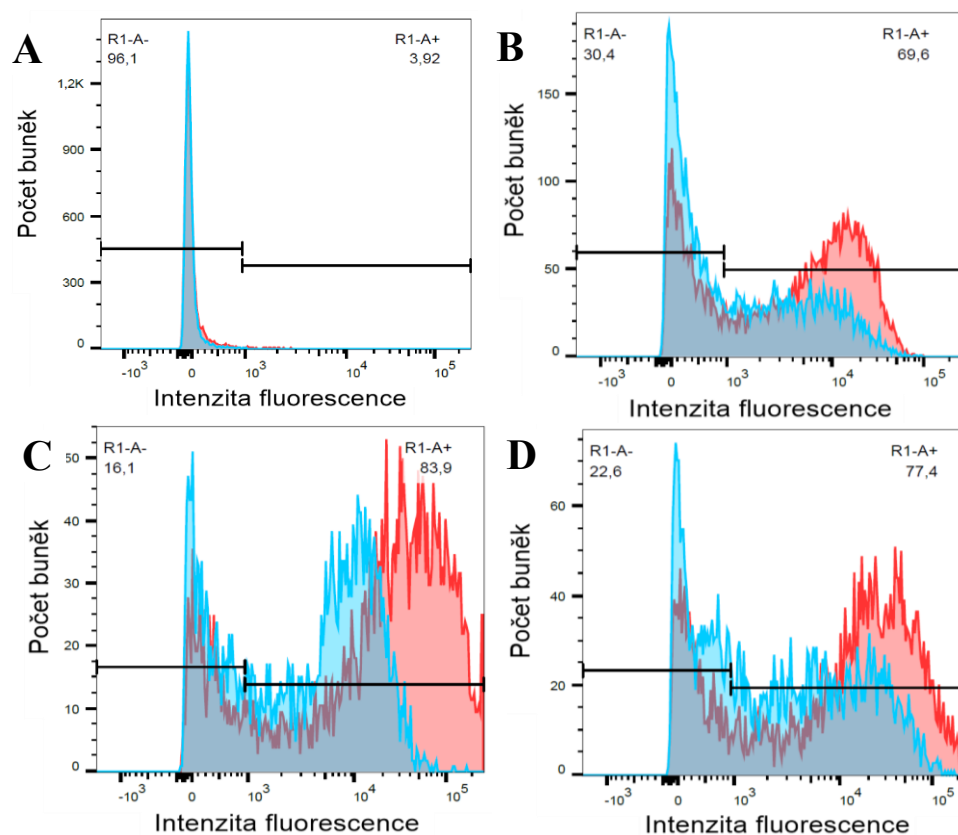
A. Průběh MST měření interakce proteinu s ligandem laktosou. NKp46 s proteinem Epa1. Měření probíhalo s 30% MST výkonem a 20% LED silou excitace fluoroforu.

B. Závislost podílu normalizovaných hodnot fluorescence na koncentraci Epa1.

## 5.4 Studium vazby proteinů na buněčný povrch

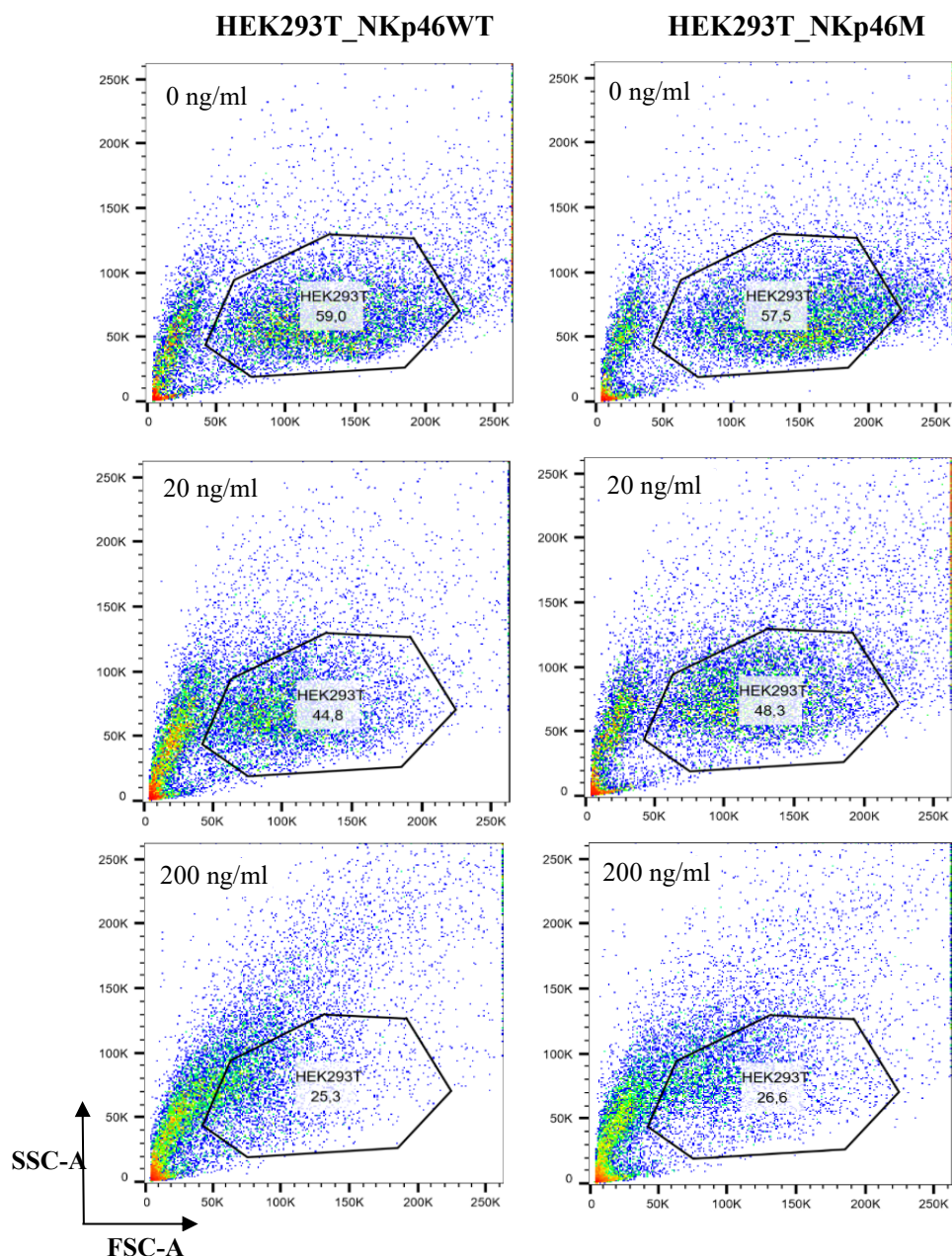
### 5.4.1 Příprava linií exprimujících na svém povrchu receptor NKp46

Průtokovou cytometrií bylo provedeno ověření přítomnosti receptoru NKp46WT a NKp46M na povrchu stabilně transfekované buněčné linie HEK293T (viz 4.6.1, str. 51). Stabilní buněčné linie byly den před analýzou inkubovány s indukčním činidlem doxycyklinem o výsledné koncentraci 20, 100 a 200 ng/ml. Přítomnost receptoru byla ověřena vazbou myší monoklonální protilátky proti NKp46 značené fluoroforem APC. Výsledky průtokové cytometrie jsou na obrázku 30.



**Obr. 30** Ověření přítomnosti receptoru NKp46 na povrchu buněčné linie HEK293T při různých koncentracích indukčního činidla doxycyklinu. Přítomnost receptoru NKp46 na povrchu buněk byla ověřena primární antiNKp46 protilátkou značenou APC, červená značí linii s přirozenou variantou NKp46, modrou je vyznačen mutant. A – 0 ng/ml, B – 20 ng/ml, C – 100 ng/ml, D – 200 ng/ml

Při porovnání výsledků průtokové cytometrie je zřejmé, že při vyšších koncentracích doxycyklinu se zvyšuje granularita buněk a zároveň se zmenšuje jejich velikost (Obr. 31, str. 77). Pro další měření byly buňky indukovány doxycyklinem o koncentraci 20 ng/ml.

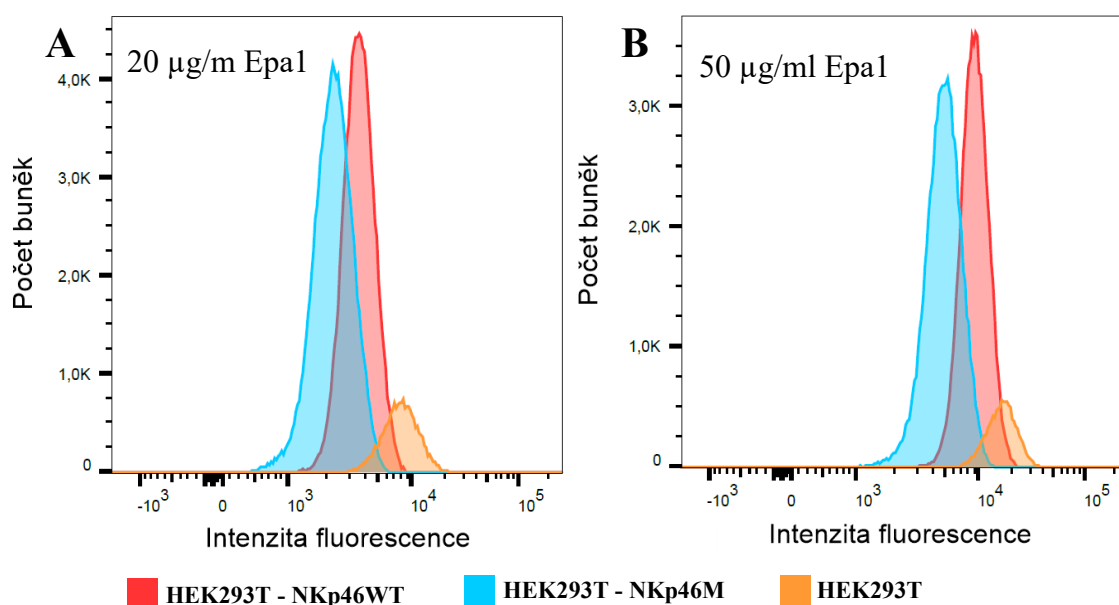


**Obr. 31** Analýza veľkosti buniek a jejich granularity pomocou prútokovej cytometrie. Ľavý sloupec HEK293T\_NKp46WT indukované doxycyklinom v koncentráciách 0, 20 a 200 ng/ml. Pravý sloupec HEK293T\_NKp46M indukované doxycyklinom v koncentráciách 0, 20 a 200 ng/ml. FSC-A (z angl. forward scatter area) značí veľkosť buniek a SSC-A (z angl. side scatter area) značí granularitu buniek.

Každá z línii expimovala receptor v iné miere. Mutovaná varianta sa expimovala hŕe, čož je v souladu s daty získanými pro sekretovaný protein. Pro porovnaní vazby proteinu Epa1 na lnie expimující receptor NKp46 by bylo nutné buďto indukovať každou z línii jinou koncentrací doxycyklinu, nebo signál normalizovať na zastoupení NKp46 na buněčném povrchu ověřeném protilátkou antiNKp46.

#### 5.4.2 Studium vlivu O-vázané glykosylace NKp46 na threoninu 225 na vazbu Epa1

Pomocí průtokové cytometrie byla ověřována schopnost proteinu Epa1 vázat se na buněčnou linii HEK293T s receptorem NKp46WT a NKp46M na buněčném povrchu. Pro studium interakce byly stabilní buněčné linie indukovány doxycyklinem o výsledné koncentraci 20 ng/ml. Protein Epa1 byl značen fluorescenční značkou BDP 650/665, stupeň značení byl 0,8. Negativní kontrolou byla netransfekovaná buněčná linie HEK293T. Při pokusu byly buňky inkubovány s fluorescenčně značeným proteinem o koncentracích 20 µg/ml a 50 µg/ml (Obr. 32).

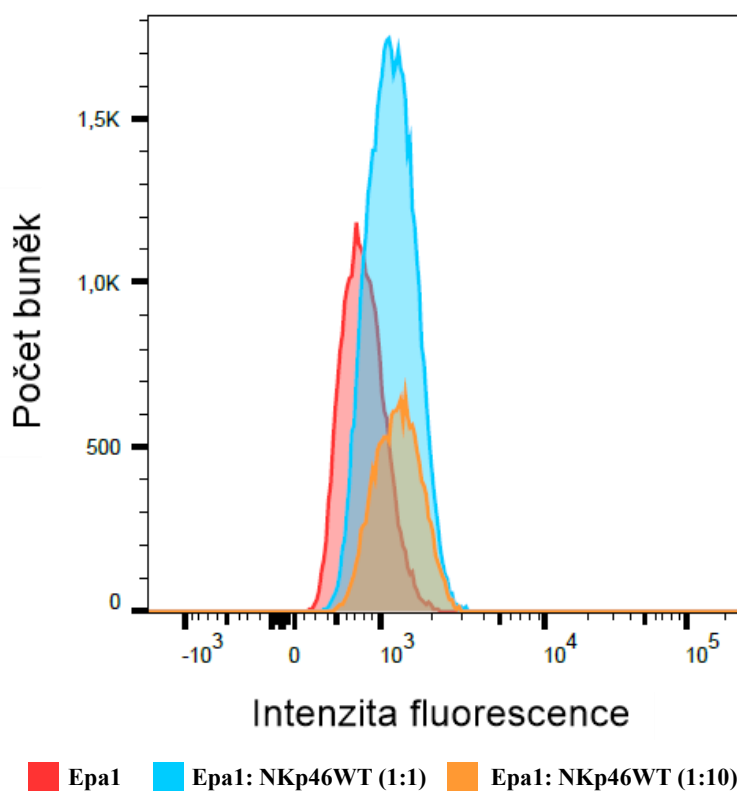


**Obr. 32** Vazba značeného proteinu Epa1 na buněčné linie měřena průtokovou cytometrií. Graf ukazuje distribuci počtu buněk v závislosti na intenzitě fluorescence. A – 20 µg/ml, B – 50 µg/ml

Z porovnání histogramů intenzit fluorescence vazby značeného proteinu Epa1 na povrch buněk HEK293T je zřejmé, že protein se váže jak na linie exprimující obě varianty receptoru NKp46 (tedy receptor bez mutace a s mutovaným threoninem 225), tak i na samotnou netransfekovanou linii HEK293T, která receptor NKp46 neexprimuje. Tento výsledek lze nejspíše přičíst schopnosti lektinů, mezi které Epa1 patří, vázat sacharidy na povrchu buněk. Schopnost specificky rozeznávat receptor NKp46 na povrchu buněk se nám tak pro rekombinantní fluorescenčně značený protein Epa1 prokázat nepodařilo.

### 5.4.3 Vazba proteinu Epa1 na receptor NKp46 vyskytující se na povrchu NK buněčné linie NK92MI

Pro ověření vazby na přirozeně se vyskytující receptor NKp46 byla využita buněčná linie NK92MI, na jejíž povrchu je receptor NKp46 přítomen (ověřeno antiNKp46 protilátkou, data nejsou prezentována). Buňky NK92MI byly inkubovány s fluorescenčně značeným proteinem Epa1 o koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  a dále v přítomnosti či bez přítomnosti rozpustné varianty receptoru NKp46WT. Při pokusu blokace proteinu Epa1 rozpustným proteinem NKp46WT produkovaným v buněčné linii HEK293T byly použity molární poměry (Epa1 : NKp46) 1:1 a 1:10 (Obr. 33).



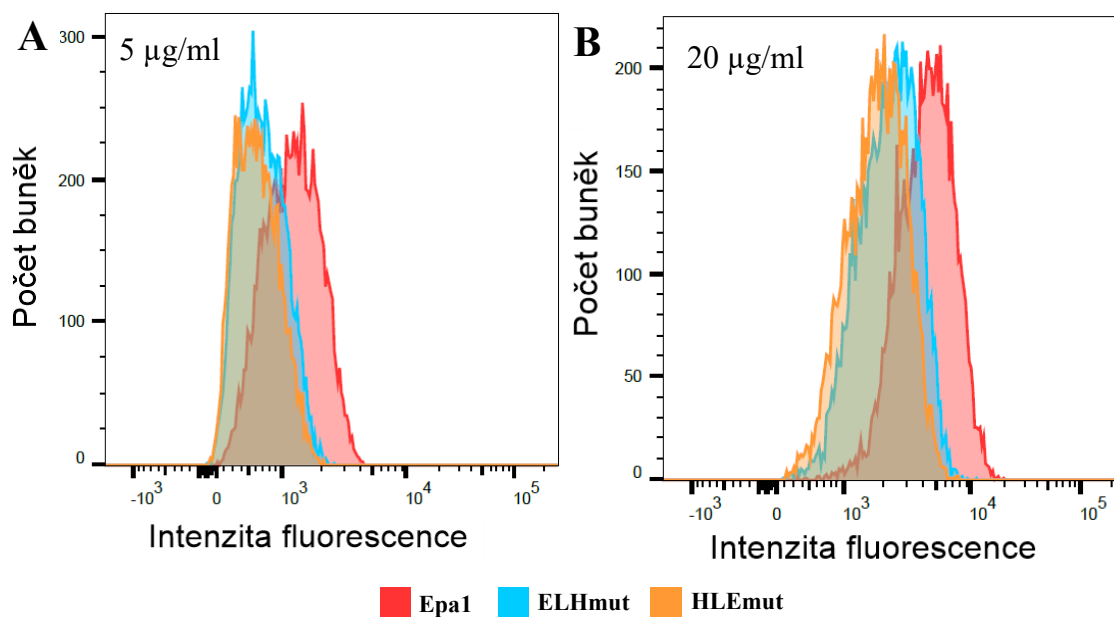
**Obr. 33** Vazba značeného proteinu Epa1 na buněčnou linii NK92MI měřena průtokovou cytometrií v přítomnosti rozpustného proteinu NKp46WT. Graf ukazuje distribuci počtu buněk v závislosti na intenzitě fluorescence.

Z obrázku 33 je zřejmé, že k blokaci vazby Epa1 na buněčný povrch rozpustným receptorem NKp46WT nedochází. Není tak zřejmé, zda je signál specifický a Epa1 se ve všech podmínkách váže na receptor NKp46 na povrchu NK92MI nebo se jedná o vazbu na sacharidy přítomné na povrchu buňky.



#### 5.4.4 Interakce Epa1 fúzních proteinů s linií exprimující HER2 receptor

Dále byla ověřována schopnost vazby fúzních proteinů Epa1\_antiHER2mut (ELHmut) a antiHER2\_Epa1mut (HLEmut) na HER2<sup>+</sup> buněčnou linií SK-BR3. Fúzní proteiny byly značeny fluorescenční značkou BDP 650/665, stupeň značení byl pro oba fúzní proteiny roven 1,0. Buňky byly inkubovány s fúzními proteiny o koncentracích 5 a 20 µg/ml. Výsledky měření jsou na obrázku 34.



**Obr. 34** Vazba značených proteinů Epa1, ELHmut a HLEmut na buněčnou linii SK-RB3 měřena průtokovou cytometrií. Graf ukazuje distribuci počtu buněk v závislosti na intenzitě fluorescence. A – 5 µg/ml, B – 20 µg/ml

Z histogramu intenzit fluorescence na obrázku 34 je patrné, že na linii SK-BR3 se váže i samotná Epa1, jde patrně o nescifickou interakci s buněčným povrchem, protože Epa1 je lektin. Fúzní varianty proteinu Epa1 se však neváží na buněčný povrch lépe, což by odpovídalo vazbě nanoprotilátky antiHER2 na HER2 receptor ve velké míře exprimovaný na linii SK-BR3 [67].

## 6 Diskuse

Cílem této práce byla příprava proteinu NKp46 a jeho ligandu Epa1, ověření jejich vzájemné specifické interakce. Optimalizaci expresního konstruktu NKp46 bylo věnováno značené úsilí, protože pro strukturní studie je potřeba získat protein v dostatečném množství a čistotě. Protein byl produkován v expresním systému lidských ledvinných embryonálních buněk HEK293S GnTI<sup>-</sup>, proteiny produkované v tomto systému mají homogenní N-vázanou glykosylaci manosového typu, kterou lze v případě potřeby odštěpit. Protein si tedy zachovává glykosylaci (v extracelulární části NKp46 je jedno predikované místo pro N-vázanou glykosylaci), ale je i zároveň vhodný pro strukturní studie. Původní konstrukt Q22-G212, produkováný během bakalářské práce Bc. Jany Houserové [65], byl prodloužen na Q22-R258, lichý cystein 48 byl vyměněn za serin a konstrukt byl rozšířen o Fc fragment na C-konci, připojený štěpicím místem pro 3C proteasu. Fc fragment má stabilizační funkci a také tvoří kovalentní dimer, což reprezentuje pravděpodobné uspořádání na buněčném povrchu [68, 69]. Výtěžky transienčních produkcí v linii HEK293S GnTI<sup>-</sup> tohoto konstruktu NKp46 však stále nebyly dostatečné, proto byl tento konstrukt NKp46 s Fc fragment (NKp46WT) vložen do expresního vektoru pUT7 umožňujícího tvorbu stabilně transfekované linie. To vedlo ke zvýšení výtěžku produkce rozpustné formy NKp46.

Interakce NKp46 a Epa1 byla popsána jako závislá na O-vázané glykosylaci na threoninu 225 [48]. Pro studium vlivu O-glykosylace na threoninu 225 byl připraven konstrukt NKp46M obsahující mutaci na místě threoninu 225 za alanin. Oba tyto konstrukty byly použity pro transfekci linie HEK293S GnTI<sup>-</sup> i linie HEK293T exprimující proteiny s přirozenou komplexní glykosylací. Celkem tedy byly připraveny 4 stabilně transfekované linie produkující varianty receptoru NKp46 s Fc fragmentem, přirozená forma proteinu (NKp46WT), protein s mutací T225A (NKp46M), obě varianty v HEK293 linii jak s přirozenou, tak i s homogenní glykosylací.

Během purifikace však docházelo ke srážení proteinů, a to u všech konstruktů. Proteiny byly purifikovány pomocí histidinové kotvy. Purifikace byla částečně optimalizována odsolením eluovaných roztoků ihned po chelatační afinitní chromatografii, čímž byl odstraněn imidazol přítomný po eluci v roztoku. Toto odsolení částečně snížilo podíl sraženého proteinu v celkovém množství purifikovaného proteinu, což bylo dostačující pro následnou práci.

Srážení proteinu mohlo být způsobeno také použitým pufrům. K optimalizaci by bylo vhodné pozměnit složení pufrů, například zvýšit pH pufru, popřípadě zvolit jiný typ kolony

chelatační chromatografie, kdy je protein eluován při nižší koncentraci imidazolu (například vyměnit kolonu s nikelnatými ionty za kolonu Talon s ionty kobaltnatými). Dále by bylo možné využít přítomnost Fc fragmentu pro afinitní purifikaci na koloně obsahující vázaný protein A. Při této chromatografii je však protein eluován kyselým pH, což také může narušit stabilitu purifikovaného proteinu.

Při porovnání celkových výtěžků je zřejmé, že nemutovaná varianta proteinu se lépe produkuje jak v linii HEK293S GnT1<sup>-</sup> tak i HEK293T (Obr. 14, str. 62). Produkce mutované varianty mohla být ovlivněna mutací, která zasáhla do nativní struktury proteinu. Mutací byl nahrazen threonin za alanin, lišící se o jeden uhlík a OH skupinu. Právě chybějící hydrofilní aminokyselina mohla způsobit nižší stabilitu proteinu. Výtěžky daných variant proteinu z obou linií HEK293 jsou srovnatelné (Tab. 7, str. 63).

Během testovací produkce proteinu NKp46WT v linii HEK293S GnT1<sup>-</sup> byly na chromatogramu pozorovány eluční vrcholy v objemu 13 ml a 16 ml. Kontrola čistoty frakcí byla provedena pomocí SDS elektroforézy. Frakce odpovídající prvnímu píku měly v neredukujícím prostředí velikost odpovídající kovalentnímu dimeru (cca 110 kDa) a v redukujícím prostředí měly velikost odpovídající monomeru (cca 55 kDa). Frakce odpovídající druhému píku měly v neredukujícím i v redukujícím prostředí stejnou velikost (cca 43 kDa), která ale neodpovídala velikostí monomeru proteinu NKp46 (Obr. 12, str. 61). Další varianty proteinu byly produkovány v objemu 300 ml. U ostatních variant nebyl druhý pík v 16 ml na chromatogramu zřetelný. V případě testovací produkce proteinu NKp46WT se tedy mohlo jednat o degradační proteolytický fragment proteinu NKp46WT.

Pomocí 3C proteasy bylo provedeno štěpení konstruktů s cílem odštěpení Fc fragmentu. Štěpení však nebylo úspěšné. Štěpení 3C proteasou mohlo být neúspěšné díky pozici Fc fragmentu v blízkosti krčku proteinu NKp46. Toto štěpící místo mohlo být pro 3C proteasu nepřístupné. Pro další experimenty byl tedy Fc fragment na proteinu NKp46 ponechán. Kvůli přítomnosti sraženiny a problémům při štěpení 3C proteasou bylo hmotnostní spektrometrií ověřeno zapojení disulfidických můstků. Konstrukt NKp46WT obsahuje celkem 11 cysteinů, první čtyři jsou v sekvenci NKp46 a jsou zapojeny v rámci dvou imunoglobulinových domén (Obr. 26, str. 71). Tři cysteiny jsou v pantové části Fc fragmentu a měly by být zodpovědné za spojení kovalentního dimeru celého expresního konstruktů. Poslední čtyři jsou v zapojeny ve dvou imunoglobulinových doménách Fc fragmentu. Zapojení cysteinů v imunoglobulinových doménách bylo potvrzeno,

zbývající tři cysteiny v pantové oblasti jsou zodpovědné za tvorbu intermolekulárních dimerů (Obr. 25, str. 71).

Pro studium interakce proteinu NKp46 s proteinem Epa1 byly navrženy také bispecifické fúzní varianty ligandu Epa1. Na základě zkušeností z laboratoře bylo přistoupeno k přípravě fúzního proteinu s nanoprotiátkou cílící receptor HER2 a to na N i C konci Epa1 (konstrukty označené jako ELH a HLE). Protein Epa1 byl v rámci bakalářské práce Bc. Jana Houserové produkován v expresním systému *E. coli*, produkce v savčím expresním systému poskytovala jen velmi nízké výtěžky. Proto byl konstrukt vložen do několika vektorů a na základě expresního testu byly vybrány jako nejlepší expresní systém linie HEK293T sekretující proteiny do média (Obr. 16, str. 64). Toto poznání bylo poměrně překvapivé, protože samotný protein Epa1 se v systému HEK293 produkoval velice špatně. Konstrukt byl ještě modifikován o mutaci v sekvenci nanoprotiátky, která ruší nežádoucí glykosylační motiv a zvyšuje afinitu k receptoru HER2 (konstrukty označené jako ELHmut a HLEmut). Nanoprotiátka antiHER2 tedy zvyšuje rozpustnost Epa1 v savčím expresním systému.

Správné sbalení a biologickou aktivitu Epa1 v rámci fúzních proteinů by bylo potřeba ověřit např. izotermální termoforézou, kdy by byla změřena disociační konstanta pro interakci s laktosou a tato hodnota by byla porovnána s hodnotami pro samotnou Epa1.

Během purifikace proteinů opět docházelo k částečnému srážení proteinů, což bylo znovu vyřešeno přidáním odsolovacího purifikačního kroku po afinitní chromatografii. Výtěžky obou produkcí ELHmut i HLEmut jsou srovnatelné. Při produkci jiných proteinů obsahujících protiátku antiHER2 se ukázalo, že se lépe produkovaly proteiny s protiátkou na N-konci [67]. Tento trend nebyl v případě fúzních proteinu Epa1 pozorován. Na chromatogramu ELHmut je pozorován hlavní pík v elučním objemu 16 ml. Hlavními píky předchází menší pík v objemu 14 ml (Obr. 17, str. 65). Na SDS elektroforéze odpovídá velikost všech frakcí v neredukujícím prostředí proteinu ELHmut (42,9 kDa) s různým počtem glykosylací. V redukujícím prostředí proužky odpovídají větší velikosti, než je očekávaná velikost proteinu. Tento posun je pravděpodobně způsoben nižší pohyblivostí proteinu díky rozvolnění disulfidických můstků (Obr. 18, str. 66) a nepřímo tak dokazuje, že disulfidické můstky jsou v produkovaném proteinu uzavřeny. Chromatogram HLEmut je opět tvořen 2 píky s elučními objemy 13 a 16 ml. Na SDS elektroforéze se opět jeví jako jeden protein s velikostí odpovídající HLEmut (42,9 kDa). Píky v menším elučním objemu mohou znamenat, že protein tvoří kovalentní dimer. Tvorba dimeru nebyla pro samotný

protein Epa1 v roztoku pozorována, respektive byla, ale pouze v jeho krystalové struktuře, kde byla popsána jako artefakt a pouhý krystalový kontakt [45].

Produkce samotného proteinu Epa1 byla optimalizována oproti bakalářské práci Bc. Jany Houserové [65]. Pro zvýšení výtěžku probíhala indukce exprese v buňkách *E. coli* při vyšší optické hustotě, konkrétně 2,0. Produkce probíhala 2 dny při 12 °C. Následná purifikace proteinu probíhala na afinitní laktosové koloně. Protein byl eluován roztokem laktosy. Laktosa použitá pro eluci však zůstávala navázaná na protein, což byl problém pro následná měření. Laktosa tedy byla vyvázána přidáním EDTA (odstranění vápenatých iontů, které jsou nezbytné pro vazbu laktosy) a následným odsolením. Pro kontrolu zachování schopnosti proteinu Epa1 vázat laktosu i po procesu odstranění a znovu navázání vápenatých, bylo provedeno měření pomocí izotermální mikrotitrační kalorimetrie, kdy byl roztok Epa1 titrován přídatky laktosy. Výsledek měření ukázal, že pouze 10% proteinu Epa1 je schopno ve svém aktivní místě vázat laktosu. Toto zjištění ukazuje, že po purifikačních krocích stále většina proteinu Epa1 obsahuje v místě vazby navázanou laktosu.

Na základě tohoto měření bylo přistoupeno ke změně purifikačního procesu. Po afinitní chromatografii byl protein intenzivně dialyzován. K dialýze byl použit HEPES TK pufr bez laktosy a vápenatých iontů. Další měření kalorimetrie ukázalo zvýšení kompetentní frakce proteinu Epa1 a potvrdilo schopnost produkovaného proteinu vázat cukerné zbytky. Bohužel se nepodařilo naměřit celou interakční křivku. Protože publikovaná afinita proteinu Epa1 a laktosy je nízká (cca 32  $\mu\text{M}$  [45]), bylo potřeba provádět měření s koncentrovaným proteinem, Epa1 se však při koncentracích nad 7 mg/ml sráží. Z naměřených dat lze disociační konstantu pouze hrubě odhadnout, jako přibližně 13  $\mu\text{M}$  (Obr. 27, str. 73).

Následně byla interakce Epa1 s laktosou ověřována pomocí termoforézy s detekcí vnitřní fluorescence proteinů. Tato metoda nepotřebuje fluorescenčně značené proteiny, využívá fluorescence aromatických aminokyselin. Zároveň není třeba mít protein ve vysoké koncentraci, takže odpadá problém se srážením Epa1 ve vyšších koncentracích. Naměřená disociační konstanta byla však řádově nižší, pouze 160  $\mu\text{M}$  (Obr. 28, str. 74).

Fluorescenčně značené proteiny Epa1, ELHmut a HLEmut byly použity pro studium vazby proteinu Epa1, popřípadě fúzních proteinů na povrch buněk. Pro studium interakce proteinu Epa1 s receptorem NKp46 na povrchu buněk byly připraveny dvě stabilně transfekované linie HEK293T produkující receptor NKp46WT plné délky a jeho T225A mutovanou verzi. Produkce proteinu byla indukována doxycyklinem. K určení optimální koncentrace indukčního činidla byla provedena titrace doxycyklinu a následně byla

přítomnost receptoru NKp46 ověřena vazbou antiNKp46 protilátky s fluorescenční značkou. Bylo pozorováno, že při vyšších koncentracích doxycyklinu se zvyšuje množství receptoru NKp46 na povrchu buněk (Obr. 30, str. 76), ale tím se také mění velikost a granularita buněk (Obr. 31, str. 77). Změna velikosti a růst granularity značí, že buňky nebyly zcela zdravé a zvýšené množství receptoru na jejich povrchu mohlo ovlivnit jejich stav. Měření vazby byla tedy provedena na buňkách indukovaných nízkou koncentrací doxycyklinu a zároveň tedy i relativně nízkým, i když detekovatelným, množstvím NKp46.

Pro detekci specifity vazby proteinu Epa1 by bylo vhodné mít buněčnou linii, která má na svém povrchu receptor NKp46 ve výrazném nadbytku, jelikož Epa1 se jako lektin váže na povrchu buněk a signál specifické vazby se může ztratit ve vysokém pozadí. K těmto pokusům by bylo možné připravit jinou stabilně transfekovanou linii buněk např. buněk HeLa. Jiná buněčná linie by mohla lépe snášet větší množství receptoru NKp46 na povrchu.

Pro další pokusy byly buněčné linie HEK293T indukovány nejnižší koncentrací doxycyklinu (20 ng/ml). Při těchto koncentracích bylo množství „zdravých“ buněk dostatečné a zároveň byl na jejich povrchu receptor stále detekovaný.

Výhodou stabilních linií je v tomto případě snadnější manipulace, transfekce se provádí pouze jednou a po selekci jsou buňky k dispozici pro jednotlivá měření. Při použití systému piggyBac je navíc exprese indukovatelná doxycyklinem a potřebné množství proteinu na povrchu buněk lze titrovat dle potřeby.

Pro ověření vazby proteinu Epa1 na receptor NKp46 byl využit fluorescenčně značený protein Epa1 a indukovaná linie HEK293T NKp46WT a NKp46M. Při porovnání výsledků měřených průtokovou cytometrií (Obr. 32, str. 78) je zřejmé, že se protein Epa1 váže na všechny studované linie. Epa1 se váže i na linii buněk HEK293T, která receptor NKp46 neexprimuje. Epa1 je tedy aktivní lektin, který váže sacharidy na povrchu buněk a nelze proto říci, zda také váže NKp46 či nikoliv. Na základě tohoto výsledku tedy nelze porovnat vliv O-glykosylace na vazbu Epa1 na receptor obsahující O-glykosylaci a na mutovaný receptor. Nelze však ani vyloučit, že ke specifické vazbě Epa1 na receptor NKp46 dochází, protože může být pouze překryta vysokým signálem nesespecifických interakcí.

Vazba na povrch NK buněk byla ověřována na linii NK92MI, která na svém povrchu receptor NKp46 exprimuje. Pro určení specifity vazby byl navržen pokus, kdy rozpustná forma NKp46 v nadbytku měla vyvázat přidávaný protein Epa1. Experiment byl navržen v uspořádání s pouze proteinem Epa1, s Epa1 a rozpustným NKp46WT (v molárním poměru 1:1) a s Epa1 a rozpustným NKp46WT (v molárním poměru 1:10) (Obr. 33, str. 79).

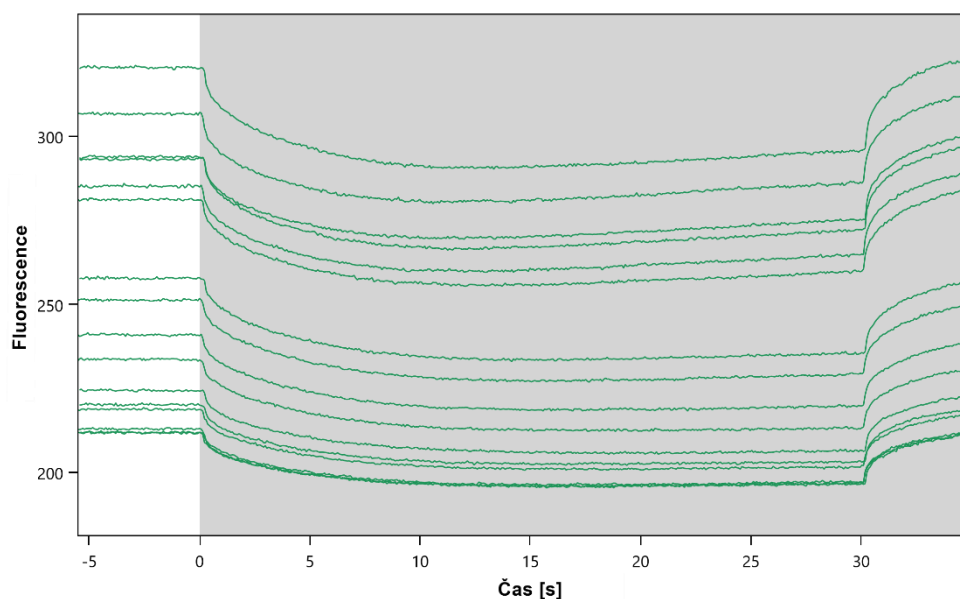
Předpokládaná kompetice se nepotvrdila. Rozpustná forma NKp46 mohla být nekompetentní k vazbě Epa1 nebo se mohla vázat na povrch buněk také, a to Fc fragmentem na receptor CD16. Vazba na jiný receptor mohla zkreslit výsledek tohoto pokusu. Pro blokaci vazby Epa1 na receptor NKp46 by bylo možné použít značenou protilátku, která by po vazbě na receptor bránila vazbě Epa1. Zároveň však také nelze vyloučit, že Epa1 má vyšší afinitu k cukerným zbytkům, než k samotnému receptoru. Úroveň nespecifické interakce s buněčným povrchem proto může být ve všech podmínkách silná, avšak pouze specifická interakce s receptorem NKp46 spouští odpověď NK buněk.

K ověření vazby fúzních proteinů proteinu Epa1 byla využita buněčná linie SK-BR3. Tato buněčná linie karcinomu prsu je HER2 pozitivní, tj. exprimuje na svém povrchu velké množství receptoru HER2. Buňky byly inkubovány s fluorescenčně značenými fúzními proteiny ELHmut a HLEmut a samotným značeným proteinem Epa1. Při porovnání intenzity fluorescence bylo patrné, že všechny proteiny se vázaly s podobným signálem jako samotný Epa1, který neobsahuje nanoprotilátku proti HER2 (Obr. 34, str. 80). V signálu nebyla detekovatelná vazba na HER2 nad rámec nespecifické vazby Epa1 na povrch buněk. Tato specifická vazba mohla být skryta v signálu nespecifické interakce s buněčným povrchem.

Během diplomové práce byly úspěšně připraveny všechny varianty receptoru NKp46 s Fc fragmentem, přirozená forma proteinu (NKp46WT), protein s mutací T225A (NKp46M), obě varianty jak s přirozenou tak i s homogenní glykosylací. Pro další experimenty by bylo vhodné ověřit přítomnost O-glykosylace na přirozené formě proteinu například diferenční hmotnostní spektrometrií – v časovém rámci diplomového projektu se však již tyto výsledky získat nepodařilo.

Pro studium interakce rozpustné formy proteinů NKp46 a Epa1 bylo provedeno měření termoforézy (Obr. 29, str. 75). Měření byla několikrát opakována se stejným výsledkem, při použití vyšších koncentrací Epa1 není průběh termoforézy standardní a dochází k nárůstu fluorescence (oranžové a červené křivky, Obr. 29A, str. 75). Získanými daty se podařilo proložit interakční křivku a orientačně určit hodnotu disociační konstanty. Během měření se měnila intenzita fluorescence, což naznačuje, že se v průběhu vazby mění konformace proteinu (Obr. 35, str. 87).

Tato změna fluorescence může být ale také spojena s tvorbou oligomerů. Tvorba dimerů a následně i klastrů proteinu NKp46 na buněčném povrchu již byla popsána [68, 69] a toto chování je možným vysvětlením, proč selhalo standardní vyhodnocení dat z termoforézy, tedy z důvodu velké komplexity vzorku, kdy je doména NKp46 navíc vázána na Fc fragment, tvoří dimer a navíc může ještě měnit konformaci (například při interakci se soudními dimery).



**Obr. 35** Změna fluorescence v čase během měření termoforézy interakce proteinu NKp46 a proteinu Epa1. 30% MST výkonem a 20% LED silou excitace fluoroforu.

Toto měření budou následovat další experimenty s cílem vysvětlit, k čemu při interakci dochází a následně ověřit vliv O-glykosylace na vazbu v roztoku.

Produkcí a purifikací proteinu Epa1 se podařilo optimalizovat a výtěžek 7 mg z jednoho litru bakteriální produkce je pro další experimenty dostačující. Schopnost vazby laktosy byla potvrzena pomocí dvou měření interakcí v roztoku (termoforéza a izotermální mikrotitrační kalorimetrie). Další experimenty budou směřovat k popisu vazby Epa1 na povrch buněk. Bude připravena stabilně transfekovaná linie buněk HeLa a pro blokaci vazby Epa1 na receptor bude využita fluorescenčně značená antiNKp46 monoklonální protilátka.



## 7 Závěr

- Podařilo se připravit expresní konstrukty proteinu NKp46 v přirozené formě a proteinu NKp46 s mutací T225A.
- Pro obě varianty proteinu byly připraveny stabilně transfekované linie HEK293S GnTI<sup>-</sup> a HEK293T, a všechny varianty proteinu byly produkovány.
- Podařilo se optimalizovat produkci a purifikaci proteinu Epa1, a ověřit jeho schopnost vazby laktosy v roztoku pomocí izotermální mikrotitrační kalorimetrie a termoforézy s využitím vnitřní fluorescence tohoto proteinu.
- Byly připraveny expresní vektory pro přípravu fúzních proteinů Epa1 s antiHER2 nanoprotiátkou, a oba fúzní proteiny byly úspěšně produkovány.
- Specifickou vazbu variant proteinu Epa1 na povrch buněk exprimujících přirozenou či mutovanou formu receptoru NKp46 se nepodařilo ověřit.

## 8 Literatura

- 1 Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T. a Špíšek, R. *Základy imunologie* 6. vydání, Praha, TRITON (2017).
- 2 Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. a Roitt, I. M. Innate immunity. V *Roitt's Essential Immunology* 13. vydání., New York, Wiley-Blackwell (2017).
- 3 Sompayrac, L. An overview. V *How The Immune System Works* 5. vydání., Londýn, John Wiley & Sons (2016).
- 4 Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. a Roitt, I. M. Specific acquired immunity. V *Roitt's Essential Immunology* 13. vydání, New York, Wiley-Blackwell (2017).
- 5 Sompayrac, L. The Intestinal Immune System. V *How The Immune System Works* 5. vydání, Londýn, John Wiley & Sons (2016).
- 6 Braciale, T. J. a Hahn, Y. S. Immunity to viruses. *Immunol Rev* **255**, 5–12 (2013).
- 7 Gonzalez, H., Hagerling, C. a Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* **32**, 1267–1284 (2018).
- 8 Klener, P. jr. a Klener, P. Nádor jako důsledek selhání imunologického dohledu. V *Principy systémové protinádorové léčby*, Praha, Grada (2013).
- 9 Barh, D. a Gunduz, M. Diagnostic a Prognostic Markers of Breast Invasive Lesions. V *Noninvasive Molecular Markers in Gynecologic Cancers*, New York, CRC Press (2015).
- 10 Bofin, A. M., Ytterhus, B., Martin, C., O'Leary, J. J. a Hagmar, B. M. Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* **122**, 110–119 (2004).
- 11 Slamon, D., Clark, G., Wong, S., Levin, W., Ullrich, A. a McGuire. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. **235**, 177–82 (1987).
- 12 Meric, F., Hung, M.-C., Hortobagyi, G. N. a Hunt, K. K. HER2/neu in the management of invasive breast cancer. *J Am Coll Surg* **194**, 488–501 (2002).
- 13 Vykoukalová, E. Cílená léčba při léčbě rakoviny prsu. *17. ročník sympózia Onkologie v gynekologii a mammologii* (2012).
- 14 Felices, M., Lenvik, T. R., Davis, Z. B., Miller, J. S. a Vallera, D. A. Generation of BiKEs and TriKEs to improve NK cell-mediated targeting of tumor cells. *Methods Mol Biol* **1441**, 333–346 (2016).
- 15 Peipp, M., Derer, S., Lohse, S., Staudinger, M., Klausz, K., Valerius, T., Gramatzki, M. a 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* **6**, 32075–32088 (2015).
- 16 Wiernik, A., Foley, B., Zhang, B., Verneris, M. R., Warlick, E., Gleason, M. K., Ross, J. A., Luo, X., Weisdorf, D. J., Walcheck, B., *et al.* Targeting Natural Killer cells to Acute Myeloid Leukemia *in vitro* with a CD16x33 bispecific killer cell engager (BiKE) and ADAM17 inhibition. *Clin Cancer Res* **19**, 3844–3855 (2013).

- 17 Gleason, M. K., Verneris, M. R., Todhunter, D. A., Zhang, B., McCullar, V., Zhou, S. X., Panoskaltsis-Mortari, A., Weiner, L. M., Vallera, D. A. a Miller, J. S. Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol Cancer Ther* **11**, 2674-2684 (2012).
- 18 Yang, C., Li, Y., Yang, Y. a Chen, Z. Overview of Strategies to Improve Therapy against Tumors Using Natural Killer Cell. *J Immun Res* (2020).
- 19 Vivier, E., Di Santo, J. a Moretta, A. Transcriptional Control of NK cells . V *Natural Killer Cells*, Cham, Springer (2016).
- 20 Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M. a Ugolini, S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* **331**, 44–49 (2011).
- 21 Zhang, Y., Wallace, D. L., de Lara, C. M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., Griffin, G. E., Taylor, G. P., Tough, D. F., Beverley, P. C. L., *et al.* *In vivo* kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* **121**, 258–265 (2007).
- 22 Walzer, T., Bléry, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S. H., Jaeger, S., André, P., Gauthier, L., Daniel, L., *et al.* Identification, activation, and selective *in vivo* ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 3384–3389 (2007).
- 23 Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E. a Walzer, T. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* **220**, 169–182 (2007).
- 24 Cooper, M. A., Fehniger, T. A. a Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **22**, 633–640 (2001).
- 25 Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. a Shlomchik, M. J. Antigen Presentation to T Lymphocytes. V *Immunobiology - The Immune System in Health and Disease* 5. vydání., New York, Garland Science, (2001).
- 26 Vivier, E. Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science* **306**, 1517–1519 (2004).
- 27 Degli-Esposti, M. A. a Smyth, M. J. Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immuno*, **5**, 112–124 (2005).
- 28 Locatelli, F., Pende, D., Mingari, M. C., Bertaina, A., Falco, M., Moretta, A. a Moretta, L. Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Front Immunol* **4**, 15 (2013).
- 29 Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A. S., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., *et al.* Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**, 657-662 (2009).
- 30 Bellora, F., Castriconi, R., Dondero, A., Carrega, P., Mantovani, A., Ferlazzo, G., Moretta, A. a Bottino, C. Human NK cells and NK receptors. *Immunol Lett* **161**, 168-173 (2014).
- 31 Chester, C., Fritsch, K. a Kohrt, H. E. Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **6**, 601 (2015).

- 32 Barrow, A. D., Martin, C. J. a Colonna, M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol* **10**, 909 (2019).
- 33 Fantl, W. J., Johnson, D. E. a Williams, L. T. Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. *Annual Rev Biochem.* **62**, 453–481 (1993).
- 34 Biassoni, R., Pessino, A., Bottino, C., Pende, D., Moretta, L. a Moretta, A. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* **29**, 1014–1020 (1999).
- 35 Foster, C. E., Colonna, M. a Sun, P. D. Crystal Structure of the Human Natural Killer (NK) Cell Activating Receptor NKp46 Reveals Structural Relationship to Other Leukocyte Receptor Complex Immunoreceptors. *J Biol Chem* **278**, 46081–46086 (2003).
- 36 Ponassi, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Pesce, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M. a Bordo, D. Structure of the human NK cell triggering receptor NKp46 ectodomain. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 317–323 (2003).
- 37 Dranginis, A. M., Rauceo, J. M., Coronado, J. E. a Lipke, P. N. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 282–294 (2007).
- 38 Cormack, B. P., Ghori, N. a Falkow, S. An Adhesin of the Yeast Pathogen *Candida glabrata* Mediating Adherence to Human Epithelial Cells. *Science* **285**, 578–582 (1999).
- 39 Kojic, E. M. a Darouiche, R. O. *Candida* Infections of Medical Devices. *Clin Microbiol Rev* **17**, 255–267 (2004).
- 40 Janderová, B. a Bendová, O. *Úvod do biologie kvasinek*, Praha, Karolinum (1999).
- 41 Nather, K. a Munro, C. A. Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **285**, 137–145 (2008).
- 42 Sundstrom, P. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**, 461–469 (2002).
- 43 Frieman, M. B., McCaffery, J. M. a Cormack, B. P. Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a  $\beta$ 1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol.* **46**, 479–492 (2002).
- 44 Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. a Klis, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 373–383 (1999).
- 45 Ielasi, F. S., Decanniere, K. a Willaert, R. G. The epithelial adhesin 1 (Epa1p) from the human-pathogenic yeast *Candida glabrata*: structural and functional study of the carbohydrate-binding domain. *Acta Crystallogr D Bio. Crystallogr* **68**, 210–217 (2012).
- 46 Zupancic, M. L., Frieman, M., Smith, D., Alvarez, R. A., Cummings, R. D. a Cormack, B. P. Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* **68**, 547–559 (2008).
- 47 Vitenshtein, A., Charpak-Amikam, Y., Yamin, R., Bauman, Y., Isaacson, B., Stein, N., Berhani, O., Dassa, L., Gamliel, M., Gur, C., *et al.* NK cell recognition of *Candida glabrata* through binding of NKp46 and NCR1 to fungal ligands Epa1, Epa6, and Epa7. *Cell Host Microbe* **20**, 527–534 (2016).
- 48 Glasner, A., Roth, Z., Varvak, A., Miletic, A., Isaacson, B., Bar-On, Y., Jonjic, S., Khalaila, I. a Mandelboim, O. Identification of putative novel O-glycosylations in the NK killer receptor Ncr1 essential for its activity. *Cell Discov* **1**, 15036 (2015).

- 49 Arnon, T. I., Achdout, H., Lieberman, N., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Katz, G., Bar-Ilan, A., Bloushtain, N., Lev, M., Joseph, A., *et al.* The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* **103**, 664–672 (2004).
- 50 Nepokojová, T. Příprava fúzních ligandů a ověření jejich vazby na NK buněčné receptory, Praha, Univerzita Karlova (2018).
- 51 NEB Tm Calculator, New England Biolabs.
- 52 NucleoSpin gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel.
- 53 Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set, Zymo research.
- 54 Macherey-Nagel. NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel.
- 55 NucleoBond Xtra - plasmid Midiprep, Maxiprep kits, Macherey-Nagel.
- 56 Li, Z., Michael, I. P., Zhou, D., Nagy, A. a Rini, J. M. Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 5004–5009 (2013).
- 57 ProtParam, ExPASy Server.
- 58 DataAnalysis 4.4, Bruker.
- 59 Scheuermann, T. H. a Brautigam, C. A. High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: new features of NITPIC. *Methods* **76**, 87–98 (2015).
- 60 Zhao, H., Piszczek, G. a Schuck, P. SEDPHAT – a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods* **76**, 137–148 (2015).
- 61 Brautigam, C. A. Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data. *Meth Enzymol* **562**, 109–133 (2015).
- 62 NT. Control Software, NanoTemper.
- 63 Palmist, MBR Software Fabrik.
- 64 FlowJo v10, FlowJo LLC., Ashland.
- 65 Houserová, J. Rekombinantní exprese proteinu NKp46 a jeho ligandu Epa1, Praha, Univerzita Karlova (2018).
- 66 Djender, S., Schneider, A., Beugnet, A., Crepin, R., Desrumeaux, K. E., Romani, C., Moutel, S., Perez, F. a de Marco, A. Bacterial cytoplasm as an effective cell compartment for producing functional VHH-based affinity reagents and Camelidae IgG-like recombinant antibodies. *Microb Cell Facto* **13**, 140 (2014).
- 67 Cmunt, D. Příprava fúzních domén lidských imunoreceptorů pro jejich využití v imunoterapii, Praha, Univerzita Karlova (2019)
- 68 Jaron-Mendelson, M., Yossef, R., Appel, M. Y., Zilka, A., Hadad, U., Afergan, F., Rosental, B., Engel, S., Nedvetzki, S., Braiman, A., *et al.* Dimerization of NKp46 Receptor Is Essential for NKp46-Mediated Lysis: Characterization of the Dimerization Site by Epitope Mapping. *J Immunol* **188**, 6165–6174 (2012).
- 69 Hadad, U., Thauland, T. J., Martinez, O. M., Butte, M. J., Porgador, A. a Krams, S. M. NKp46 Clusters at the Immune Synapse and Regulates NK Cell Polarization. *Front Immunol* **6**, 495 (2015).

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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka