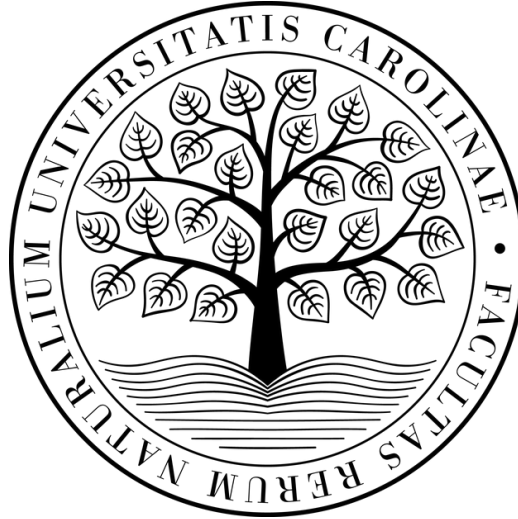


UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Nadezda Bragina

Příprava rekombinantních substrátů pro transpeptidasovou reakci

Production of recombinant substrates for transpeptidase reaction

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Srdečně bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za možnost vypracovat tuto bakalářskou práci v laboratoři Strukturní biochemie imunitního rozpoznávání, za odborné konzultace a nápovědy. Chtěla bych poděkovat Mgr. Ondřeji Skořepovi, Ph.D., Mgr. Barboře Kalouskové, Ph.D. a Bc. Gabriele Chytré za jejich obrovskou trpělivost a ochotu vždycky poskytnout velkou pomoc při provedení experimentů. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat MSc. Shivě Nejadebrahim za konzultace ohledně ligačních reakcí se sortasou a při zpracování a vyhodnocení výsledků těch reakcí. Taky děkuju všem členům laboratoře za předané zkušenosti, vstřícnost a vytvoření přátelské atmosféry.

Abstrakt

Imunoterapie je nadějný přístup k bojování proti rakovině, který k sobě během posledních let začal přitahovat více pozornosti. Hlavní cílem imunoterapie je aktivace a podpoření vlastní imunitní odpovědi organismu vůči maligně transformovaným buňkám. Cytotoxické buňky imunitního systému jsou hlavním zaměřením výzkumu při studiu a navrhnutí nových způsobů boje s rakovinou.

Jako příklad lze uvést NK buňky, což jsou cytotoxické buňky vrozené imunitní odpovědi. Mezi funkce, které tyto buňky plní v těle, patří proces nazývaný imunitním dozorem neboli anglicky „immune surveillance”. NK buňky neustále skenují ostatní tělní buňky a zaútočí na infikované, poškozené nebo mutované buňky. Při rozpoznání cílové buňky, dostává od ní NK buňka aktivační a inhibiční signály. V závislosti na převážením celkové intenzity jednoho z typů signálů, dochází buď k aktivaci NK buňky nebo je cílová buňka ponechána nepoškozená. Po aktivaci mají NK buňky k dispozici několik způsobů působení na cílové buňky: uvolnění efektorových molekul vedoucích k lýzi cílových buněk a interakce a modulace odpovědi ostatních imunitních buněk pomocí chemokinů, cytokinů apod.

Díky tomu jsou NK buňky velmi užitečné v rámci imunoterapie. Jeden ze způsobů jejich zapojení do imunitní odpovědi je v tomto případě pomocí bispecifických fúzních proteinů. Proteinové konstrukty, které jsou v dnešní době testovány, jsou skládány ze dvou částí: jeden fragment má schopnost rozpoznat a navázat se na specifický tumorový receptor, druhý fragment pak nastartuje cytotoxickou aktivitu NK buňky. Takové fúzní proteiny se uplatňují jako spojka mezi tumorovou buňkou a NK buňkou – to umožňuje dostatečné přiblížení NK buňky k nádorové buňce, aby došlo k aktivaci NK buňky.

V rámci této bakalářské práce jsem se pokusila o přípravu dvou fúzních proteinů a jejich využití k ověření transpeptidasové aktivity bakteriálního enzymu sortasy A. První připravený konstrukt byl složen z aktivačního ligandu pro NK buňky (MICA) a signální sekvence pro rozpoznání sortasou A (sekvence aminokyselin LPETG). Druhý připravený konstrukt je bispecifický protein, který mimo aktivačního ligandu pro NK buňky (MICA) a signální sekvence pro rozpoznání sortasou A (sekvence aminokyselin LPETG) má na začátku molekulu nanoprotilátky vůči nádorovému receptoru CD20 (antiCD20). Dále, díky signální sekvenci LPETG bylo možné tyto proteinové konstrukty využít jako substrát pro ligační reakce katalyzované sortasou A. Byla ověřena možnost použití sortasy jako nástroje při značení proteinů a účinnost této reakce.

Klíčová slova: MICA, sortasa A, transpeptidasová reakce, rekombinantní produkce proteinů, HEK293, kapalinová chromatografie, elektroforéza

Abstract

Immunotherapy is a promising tool to combat cancer, that has been attracting more and more attention at itself in the recent years. Its main objective is activating and boosting innate immune response towards malign cellular transformation and growth. This makes cytotoxic cells of the immune system the main targets of research, when studying and inventing new ways to combat cancer.

Such cells of interest are, for instance, NK cells, which are cytotoxic cells of the innate immune response. Amongst their various functions is a process called „immune surveillance”. NK cells constantly scan other body cells, destroying those that are infected, defect or mutated. Upon finding a target cell, NK cell gets several activating and inhibiting signals from said target cell. Depending on which type of signal outweighs in its overall intensity, NK cell activates or leaves the target cell undamaged. When activated, NK cells have several ways to affect the target cell at their disposal: releasing effector molecules that lead to lysis of the target cell and interacting and modulating other immune cells' response towards cancerous formations via chemokines, cytokines and such.

This makes NK cells quite useful in immunotherapy. One possibility how they can be engaged is via certain bispecific fusion proteins. Protein constructs tested nowadays are made up of two parts: first has an ability to recognize and bind to a specific tumor receptor whereas the other activates NK cells' cytotoxic response. These molecules act as a bridge bringing a tumor cell and an NK cell close together, which triggers NK cell's activation.

This bachelor work attempted at preparing two fusion proteins and their subsequent use for the confirmation of transpeptidase activity of a bacterial enzyme sortase A. The first protein construct consisted of an activating ligand for NK cells (MICA) and a signal sequence of amino acids that is recognized by sortase A (sequence of amino acids LPETG). The second prepared protein is a bispecific fusion protein, that, besides including an activating ligand for NK cells (MICA) and a signal sequence of amino acids recognized by sortase A (sequence of amino acids LPETG) in its structure, also has at its beginning a nanobody against the tumor receptor CD20 (antiCD20). The signal sequence LPETG in the structure of both fusion proteins made it possible to use them as substrates for a ligation reaction catalyzed by sortase A. The possibility of sortase A usage as a tool when labeling proteins was confirmed and the efficiency of the reaction was determined.

Keywords: MICA, sortase A, transpeptidase reaction, recombinant protein production, HEK293, liquid chromatography, electrophoresis

Obsah

Seznam zkratek.....	8
1 Úvod.....	10
1.1 Imunoterapie.....	10
1.1.1 Interakce imunitního systému a tumorových buněk.....	10
1.1.2 Klíčové cytotoxické buňky.....	11
1.1.3 Typy imunoterapie.....	12
1.2 NK buňky.....	12
1.2.1 Lokalizace NK buněk v organismu a jejich rozdělení na sub-populace.....	12
1.2.2 Mechanismus působení NK buněk.....	12
1.2.2.1 Aktivační a inhibiční receptory.....	14
1.2.2.2 Ligandy TRAIL a FasL.....	14
1.2.2.3 ADCC.....	14
1.2.3 Faktory ovlivňující aktivitu NK buněk.....	15
1.2.4 Interakce NK buněk s jinými buňkami imunitního systému.....	15
1.3 Imunitní dozor.....	16
1.3.1 Shedding.....	17
1.3.2 Imunoeditace.....	17
1.3.3 Další způsoby potlačení aktivity NK buněk.....	17
1.4 Využití NK buněk v imunoterapii.....	17
1.4.1 Chemoterapie a NK buňky.....	18
1.4.2 Indukce aktivity NK buněk v pacientech.....	18
1.5 MICA/B.....	19
1.5.1 Struktura ligandu MICA/B.....	19
1.5.2 Role ligandu MICA/B v uniknutí imunitnímu dozoru.....	20
1.5.3 Uplatnění ligandu MICA/B v imunoterapii.....	21
1.6 Transpeptidasa sortasa A.....	22
1.6.1 Využití sortasy v biotechnologickém průmyslu.....	23
1.6.2 Mechanismus ligační reakce.....	24
3 Materiál.....	27
3.1 Chemikálie.....	27
3.2 Roztoky a pufry.....	27
3.3 Kultivační média a misky.....	28
3.4 Primery a vektory.....	28
3.5 Enzymy a příslušné pufry.....	29
3.6 Buněčné kultury a linie.....	29
3.7 Přístroje, pomůcky a soupravy.....	30
4 Metody.....	32
4.1 Příprava expresního vektoru.....	32
4.1.1 Restrikční štěpení a linearizace plazmidu.....	32
4.1.2 Amplifikace DNA inzertů metodou PCR.....	32

4.1.3 Elektroforéza v agarosovém gelu.....	33
4.1.4 Izolace DNA z agarosového gelu.....	34
4.1.5 Transformace kompetentních buněk.....	34
4.1.6 PCR z kolonií.....	35
4.1.7 Elektroforéza produktů PCR z kolonií.....	36
4.1.8 Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA.....	36
4.1.9 Sekvence DNA.....	37
4.1.10 Velkoobjemová izolace plazmidové DNA.....	37
4.2 Expres proteinů.....	38
4.2.1 Kultivace buněčné linie HEK293T.....	38
4.2.2 Tranzientní transfekce.....	39
4.2.3 Purifikace proteinů.....	40
4.2.4 Chelatační afinitní chromatografie.....	41
4.2.5 Koncentrování proteinů.....	41
4.2.6 Gelová permeační chromatografie.....	41
4.2.7 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	42
4.3 Ověření aktivity sortasy A.....	42
4.3.1 Příprava reakční směsi.....	42
4.3.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	43
4.3.3 Zobrazení fluorescenčního značení proteinových konstruktů.....	44
4.4 Kvantifikace účinnosti značení pomocí enzymu sortasy.....	44
4.4.1 Příprava reakcí a izolace proteinů z reakčních směsí.....	44
4.4.2 Stanovení míry značení proteinů.....	45
5 Výsledky.....	46
5.1 Příprava rekombinantních vektorů.....	46
5.1.1 Linearizace plazmidu.....	47
5.1.2 Příprava inzerť DNA.....	48
5.1.3 PCR z kolonií a nízkoobjemová produkce plazmidové DNA.....	49
5.1.4 Velkoobjemová produkce plazmidové DNA.....	50
5.2 Produkce proteinů.....	50
5.2.1 Gelové permeační chromatografie.....	50
5.2.2 Výtěžek produkce proteinů.....	52
5.3 Ověření aktivity sortasy A.....	53
5.4 Kvantifikace účinnosti značení pomocí sortasy A.....	55
5.4.1 Výpočet stupně značení.....	57
6 Diskuze.....	58
7 Závěr.....	61
8 Literatura.....	62

Seznam zkratek

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
Amp	ampicilin
APC	buňka prezentující antigen (antigen presenting cell)
APS	peroxodisíran amonný (ammonium persulfate)
B7-H6	nádorový antigen, ligand pro aktivační receptor NKp30
bp	pár bází, jednotka délky DNA (base pair)
CBB	modř Coomassie Brilliant (Coomassie Brilliant Blue)
CD	diferenční skupina (cluster of differentiation)
CTL	cytotoxický T-lymfocyt
Da	jednotka molekulové hmotnosti, Dalton
DC	dendritické buňky (dendritic cells)
dNTPs	směs deoxynukleotidtrifostátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DOL	míra značení (degree of labelling)
FasL	transmembránový protein typu II z rodiny TNF cytokinů
Fc	krystalizovatelný fragment protilátky (fragment crystallizable)
FcR	Fc receptor
hPRL-G129R	antagonista lidského prolaktinu
GzmB	granzym B, proteasa exprimovaná T lymfocyty a NK buňkami
HDAC	histondeacetylase
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
IFN	interferon
IL	interleukin
kb	kilobáze, jednotka délky DNA (kilobase pair)
KIR	rodina receptorů podobných imunoglobulinům exprimovaných na NK buňkách (killer cell immunoglobulin-like receptor)
LAK	cytotoxické buňky aktivované pomocí lymfokinů (lymphokine-activated killer cells)
IPEI	lineární polyethylenimin
Ly49	rodina membránových receptorů podobných lektinům exprimovaných na myších NK buňkách
mAb	monoklonální protilátka (monoclonal antibody)

MHC-I/II	hlavní histokompatibilní komplex třídy I / třídy II (major histocompatibility complex, class I/class II)
MICA/MICB	ligand NK buněčného receptoru NKG2D (MHC class I chain-related molecule A/B)
NK	přírodně zabíječské buňky (natural killer cells)
NKG2	rodina receptorů NK buněk (natural killer group 2)
NKG2D	aktivační receptor NK buněk patřící do NKG2 rodiny receptorů
NKp30	receptor přírodní cytotoxicity o velikosti 30 kDa (natural killer protein 30 kDa)
NKp44	receptor přírodní cytotoxicity o velikosti 44 kDa (natural killer protein 44 kDa)
NKp46	receptor přírodní cytotoxicity o velikosti 46 kDa (natural killer protein 46 kDa)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
Prfl	perforin, protein produkovaný T lymfocyty a NK buňkami
PRLR	prolaktinový receptor (prolactin receptor)
RAET1	rodina ligandů pro aktivaci NK buněk (retinoic acid early transcript 1)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulfate)
TAA	antigeny asociované s nádorem (tumor-associated antigens)
TAMRA	tetramethylrhodamin, červená fluorescenční značka
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
TRAIL	protein uplatňující se při apoptose (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VHH	nanoprotilátka, variabilní doména protilátky velbloudovitých

1 Úvod

1.1 Imunoterapie

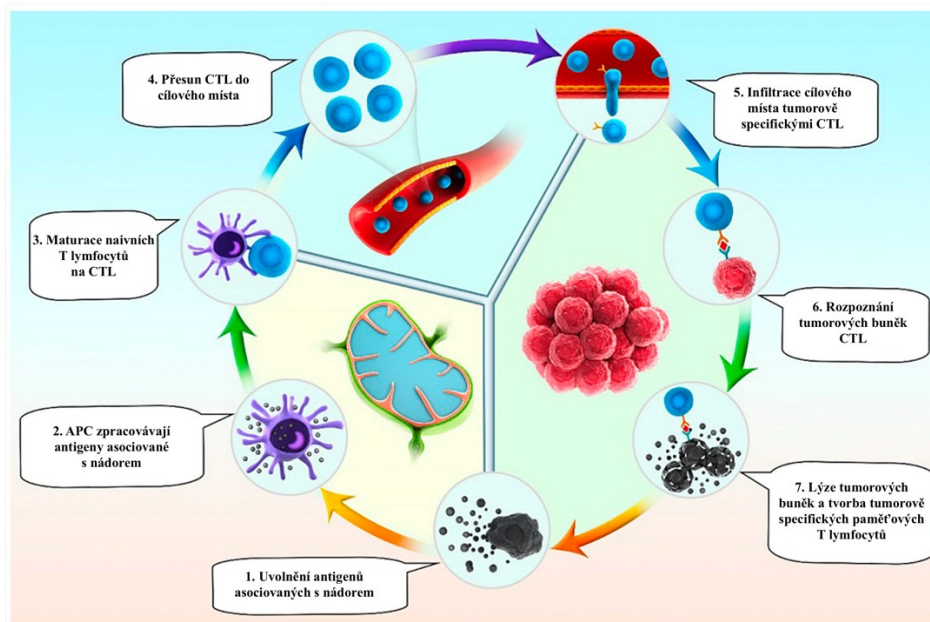
Rakovina je stále jedním z na světě nejvíc rozšířených a všude se vyskytujících onemocnění [1,2]. Během několika posledních desítek let se imunologie stala novým zaměřením ve výzkumu nových způsobů bojování s rakovinou, autoimunitními onemocněními a jinými zdravotními potížemi jako je například alergie. Dá se předpokládat, že takový zájem je podmíněn nadějnými výhodami imunologie oproti tradičním metodám. Ačkoliv chemoterapie a radioterapie se prokázaly účinnými v léčbě rakoviny, míra přežití pacientů s maligními nádory stále zůstává poměrně nízkou. Kromě toho zmíněné metody léčby jsou poměrně invazivní a mají za následek množství vedlejších účinků [3-5].

Podstata imunoterapie spočívá v zapojení vlastního imunitního systému pacienta pomocí uměle vpravených látek do útoku na poškozené tkáně aktivním nebo pasivním způsobem [6]. Během pasivní imunoterapie jsou pacientovi podány hotové imunoaktivní buňky nebo látky, například imunoglobuliny, monoklonální protilátky atd. Při aktivní imunoterapii jsou pacientovi vpraveny látky, které se stávají účinnými po aktivaci v organismu nemocného tak, že se přímo zapojují do imunitních pochodů nebo je nastartují [7]. Je však důležité udržení určité rovnováhy při nastartování imunitní odpovědi, aby imunitní systém dokázal eliminovat nádorové buňky a zároveň nedošlo k nekontrolovatelným zánětlivým autoimunitním procesům [8].

1.1.1 Interakce imunitního systému a tumorových buněk

Podle mnoha provedených studií interakcí imunitního systému a nádorů, byly identifikovány molekuly, které buď zprostředkovávají aktivaci imunitního systému a útok na maligně transformované buňky, nebo jsou využity tumorovými buňkami k úniku. Moderní metody imunoterapie jsou hlavně založeny na principech působení těchto molekul a jejich vzájemných interakcí. Obrázek 1 na straně 11 znázorňuje jednotlivé kroky útoku imunitního systému na nádorové buňky.

Znázorněných sedm kroků je nezbytných k odhalení maligně transformované buňky a jejímu následnému odstranění. Celkový proces imunitní odpovědi je cyklický a dá se na něj dívat takto: tumorové buňky exprimují antigeny asociované s nádorem (anglicky tumor-associated antigens, TAA), které jsou rozpoznány a zpracovány antigen prezentujícími buňkami (anglicky antigen-presenting cells, APC). APC aktivují naivní T lymfocyty, které se transformují na cytotoxické T lymfocyty (anglicky cytotoxic T lymphocytes, CTL).



Obrázek 1: Klíčové kroky imunitní odpovědi, které mohou být zacíleny v rámci nádorové imunoterapie [4].

Aktivované cytotoxické T lymfocyty jsou transportovány krevním řečištěm do ložiska nádoru. CTL infiltrují tumorové mikroprostředí, kde pomocí specifických receptorů na povrchu T buněk odhalují tumorové buňky a zahajují na ně cytotoxický útok. Po zabití postižených buněk vznikají paměťové tumor-specifické T lymfocyty. V krevním řečišti se po cytolyze nádorových buněk objevují další antigeny asociované s nádorem a celý proces může být opakován. Proto v rámci imunoterapie je důležité podpořit, nahradit nebo opravit jeden či více z těchto sedmi kroků pro úspěšné léčení rakoviny [4].

1.1.2 Klíčové cytotoxické buňky

Buňky podílející se na imunitní odpovědi proti maligním buňkám patří jak do vrozené, tak i do adaptivní imunity. Mezi buňky, které jsou využity v několika typech imunoterapie jako aktivní látky nebo jsou v rámci imunoterapie nepřímo ovlivněny podanými látkami, lze vyjmenovat dendritické buňky, NK buňky, $\alpha\beta$ T lymfocyty, aktivované T lymfocyty, cytotoxické T lymfocyty, $\gamma\delta$ T lymfocyty a cytotoxické buňky aktivované pomocí lymfokinů (tzv. LAK, z angl. lymphokine-activated killer cells) [9].

1.1.3 Typy imunoterapie

Dle mechanismu, na jehož podpoření je zaměřen jednotlivý typ imunoterapie, lze vyjmenovat pět hlavních skupin imunoterapie [4]: vakcíny [10], cytokinová imunoterapie [11,12], imunoterapie zabraňující deaktivaci imunoaktivních cytotoxických buněk (tzv. immune checkpoint blockade terapie) [3,13], buněčná imunoterapie [14,15] a imunoterapie malými molekulami [16].

1.2 NK buňky

NK buňky (z angl. natural killer cells), neboli, jak by se dalo přeložit do češtiny, přirození zabijáci, jsou cytotoxické buňky vrozené imunity. NK buňky hrají důležitou roli jak při zahájení vrozené imunitní odpovědi, tak i adaptivní imunitní odpovědi, a to díky svým unikátním aktivačním mechanismům. Během raných stádií obrany organismu vůči virům či nádorům NK buňky plní dvě hlavní funkce: cytotoxické zabití poškozených buněk závislé na mezibuněčném kontaktu a produkce cytokinů pro modulaci další imunitní odpovědi [17].

1.2.1 Lokalizace NK buněk v organismu a jejich rozdělení na sub-populace

NK buňky lze najít v lymfoidních i nelymfoidních tkáních, ačkoliv ve většině tkání NK buňky představují minoritní frakci z celkové populace lymfocytů: u člověka NK buňky tvoří 2 až 18 % bílých krvinek přítomných v periferním krevním řečišti [18].

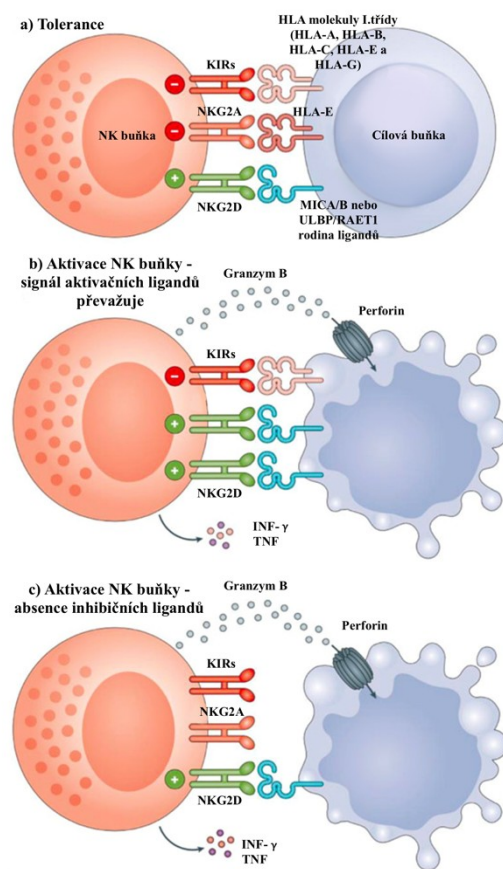
V lidském organismu byly odhaleny dva typy NK buněk. Ve větším počtu jsou přítomny CD56^{dim} NK buňky, jejichž hlavní funkcí je cytotoxický útok na poškozené buňky prostřednictvím perforinu. Tento typ je zastoupen výhradně v periferním krevním řečišti a slezině. Druhý typ tvořící populaci NK buněk v lymfoidních uzlinách je označen jako CD56^{bright}. Tyto buňky postrádají perforin a podílejí se na produkci široké škály Th-1 cytokinů (jako je například IFN- γ) při stimulaci interleukiny (IL)-12, IL-15 and IL-18 [19,20].

1.2.2 Mechanismus působení NK buněk

Teorie vysvětlující, jakým způsobem dokážou NK buňky rozpoznat poškozenou buňku od zdravé tělu vlastní navržená Kärrem, byla označena anglicky jako „missing-self hypothesis“ [21]. NK buňky rozpoznávají a útočí na buňky se sníženou expresí některých ligandů nebo postrádající určité ligandy na svém povrchu. Mezi takovými nejdůležitějšími ligandy patří tělu vlastní hlavní histokompatibilní komplex I. třídy (anglicky major

histocompatibility complex class I, MHC I). MHC I ligandy jsou rozpoznány příslušnými inhibičními receptory na povrchu NK buněk [9]. Další regulace cytotoxické aktivity NK buněk je zprostředkována přítomností určitých aktivačních ligandů na povrchu cílených buněk.

K aktivaci NK buněk dochází, pokud aktivační signály převažují nad inhibičními. Na obrázku 2 na straně 13 jsou znázorněny možné následky interakce NK buněk s ostatními buňkami organismu.



Obrázek 2: Tři hlavní scénáře interakce NK buňky a tělní buňky a) tolerance – inhibiční signály převažují nad aktivačními; b) aktivace cytolytické aktivity NK buňky – aktivační signály převažují nad inhibičními; c) aktivace cytolytické aktivity NK buňky – na povrchu cílové buňky buď nejsou přítomny inhibiční ligandy nebo jejich exprese je snížena.

Po aktivaci NK buňky uvolňují cytotoxické granule obsahující perforin (Prf1) a granzym (GzmB), a dále také uvolňují cytokiny typu Th1 a chemokiny [22].

Hlavní cytotoxická odpověď je umožněna prostřednictvím dvou cytotoxických proteinů perforinu (Prf1) nebo granzymu (GzmB). Tyto proteiny jsou v NK buňkách skladovány v cytotoxických sekrečních granulích. Po rozpoznání poškozené buňky jsou

sekretovány ven z NK buňky a jejich obsah se dostává do jejího těsného okolí. Prf1 umožňuje vstup GzmB do nitra cílové buňky, což následně vede k apoptose [9,17].

1.2.2.1 Aktivační a inhibiční receptory

Aktivační receptory poskytují pozitivní signály NK buňce a tím nastartují cytotoxickou reakci a produkci cytokinů. Mezi aktivační receptory patří NKG2D, NKp46, NKp30 a NKp44 receptory. Za normálních podmínek nejsou jejich příslušné ligandy, MICA/B, RAET1 skupina ligandů nebo B7-H6, přítomny na povrchu buněk nebo jsou exprimovány v malém množství. To naznačuje, že jejich zvýšená produkce signalizuje virovou infekci nebo karcinogenní pochod v postižené buňce [17,19].

Inhibiční receptory na povrchu NK buněk působí antagonisticky vůči aktivačním signálům. Typickými inhibičními receptory jsou KIR (anglicky killer cell immunoglobulin-like receptors), které potlačují aktivaci NK buněk tím, že inhibují reakční dráhy působící stimulačně. KIR interagují s MHC I ligandy na povrchu cílových buněk, které prezentují buňce vlastní proteiny [17,23]. Jiné dva receptory, které se hlavně uplatňují při rozpoznání MHC I ligandů, patří do Ly49 a CD94/NKG2 rodin receptorů [24].

Pro úspěšnou aktivitu NK buněk je nutná přítomnost nejen určitého poměru aktivačních a inhibičních ligandů na povrchu cílových buněk, ale záleží i na počtu příslušných receptorů, které jsou exprimované NK buňkami. Díky široké škále párů ligand-receptor, které se podílejí na modulaci cytotoxické aktivity NK buněk, jsou NK buňky účinný nástroj kontroly stavu tělních tkání [24,25]. Virem infikované nebo nádorové buňky se sníženou nebo chybějící expresí MHC I jsou obvykle úspěšně eliminovány NK buňkami, přestože dokážou uniknout ataku CTL.

1.2.2.2 Ligandy TRAIL a FasL

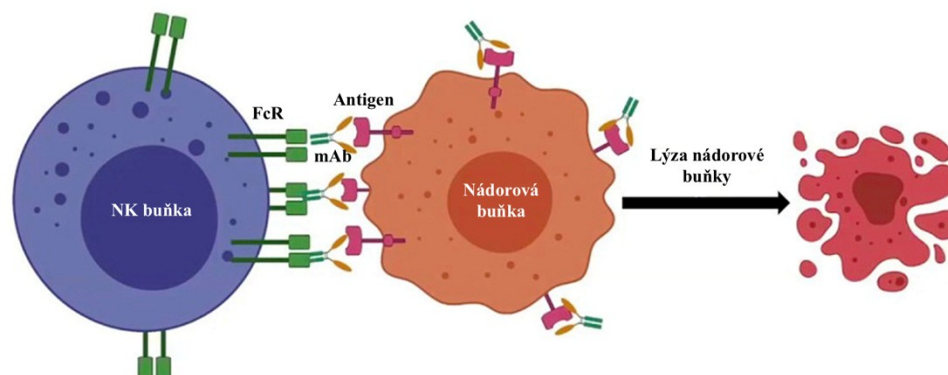
Další způsob, jak NK buňky poškozují odhalené poškozené buňky, je pomocí exprese ligandů, které zahajují apoptosu. Příkladem takového ligandu je TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) nebo FasL [19]. Jejich působení vede ke vzniku signálního komplexu, který následně spouští apoptosu cílové buňky aktivací vnitrobuněčných kaspas [9,17].

1.2.2.3 ADCC

NK buňky exprimující Fc receptor CD16 se podobně jako leukocyty mohou zúčastnit buněčného cytotoxického mechanismu závislého na protilátkách (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) a zaútočit na protilátkami označené buňky (obrázek 3, strana 15). CD16 je málo specifický aktivační Fc receptor, který interaguje

s velkým množstvím antigen-specifických protilátek. CD16 je mimo NK buňky exprimován i monocyty, makrofágy a granulocyty [19,26].

Tento způsob imunitní odpovědi se uplatňuje při monoklonální protilátkové terapii, s využitím takových léků jako trastuzumab (Herceptin®), rituximab (Rituxan®), či anti-EGF mAbs [19].



Obrázek 3: Při imunitní odpovědi typu ADCC odhalí buňky imunitního systému maligně transformované nebo infikované buňky, které jsou označeny protilátkami. NK buňky nesou FcR receptor, který dokáže rozpoznat konstantní fragment protilátky [27].

1.2.3 Faktory ovlivňující aktivitu NK buněk

Cytokiny jsou důležité molekuly proliferace, vývoje, aktivace a nastartování efektorových procesů během imunitní odpovědi. NK buňky nejsou výjimkou a jsou regulovány přítomností různých cytokinů. Intenzita a účinnost jejich cytotoxické činnosti a vlastní cytokinová sekrece je závislá na cytokinovém mikroprostředí, v kterém se NK buňky nacházejí. Mezi cytokiny působící na NK buňky stimulačně se uvádějí IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18 a IL-15. IL-15 je znám jako klíčová molekula při aktivaci zralých NK buněk. IL-2 podporuje proliferaci, cytotoxickou aktivitu a ovlivňuje sekreci dalších cytokinů [20].

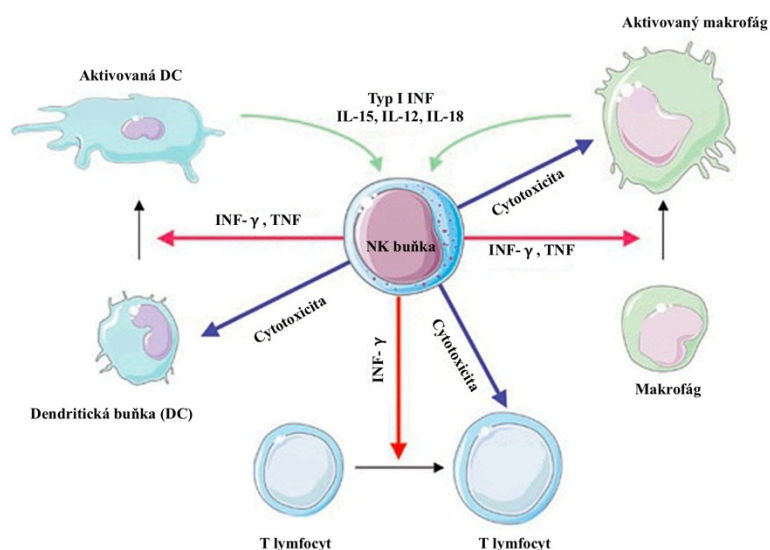
1.2.4 Interakce NK buněk s jinými buňkami imunitního systému

Jiná důležitá funkce NK buněk je propojení vrozené a adaptivní imunitní odpovědi. Obrázek 4 na straně 16 shrnuje způsoby, jak se určité buňky imunitního systému navzájem ovlivňují prostřednictvím chemických látek.

NK buňky mají schopnost ovlivňovat imunitní odpověď skrz vzájemné interakce s dendritickými buňkami [28]. Dendritické buňky (anglicky dendritic cells, DC), což jsou antigen-prezentující buňky, se pak uplatňují během zahájení antigen-specifické imunitní odpovědi a při maturaci T lymfocytů [27]. Na jedné straně aktivované NK buňky produkují cytokiny typu Th1, například IFN- γ a TNF- α , které stimulují maturaci a následnou aktivaci

DC. Mimo jiného, produkce těchto modulačních molekul vede k přesunu efektorové imunitní odpovědi z vrozené na adaptivní imunitu. Na druhé straně, zralé DC produkují interleukiny IL-2 a IL-12, které nastartují produkci IFN- γ NK buňkami, což pozitivní zpětnou vazbou ovlivní přítomné DC [9,15,20].

Přítomnost jiných buněk imunitního systému, jako jsou T lymfocyty a makrofágy, má také potenciál ovlivnit aktivitu NK buněk. V lidském organismu v lymfoidních uzlinách dochází k interakci CD4⁺ T lymfocytů s NK buňkami. Pravděpodobně zde dochází k povzbuzujícímu působení IL-2, který je produkován CD4⁺ T lymfocyty, na NK buňky [29,30].



Obrázek 4: Regulace imunitních pochodů NK buňkami. Zelené šipky – priming NK buněk v krvi rozpuštěnými chemickými faktory. Červené šipky – NK buňky podporují maturaci DC, makrofágů a T lymfocytů pomocí interakce povrchových receptorů a cytokinů. Modré šipky - NK buňky zabíjí nezralé DC, aktivované CD4⁺ T lymfocyty a hyperaktivované makrofágy. Regulační funkce NK buněk jsou kontrolovány tělu vlastními povrchovými ligandy (např. MHC I), inhibičními receptory (např. lidský inhibiční receptor KIR, myši Ly94, lidský a myši CD94-NKG2A) [20].

1.3 Imunitní dozor

V roce 1957 byla Thomasem a Burnetem navržena teorie imunitního dozoru. Podle ní hrají lymfocyty role jakýchsi strážců majících za úkol rozpoznat a zbavit se buněk, které z nějakých důvodů zmutovaly nebo se jinak staly odlišnými od obyčejných buněk. V rámci jedince jsou imunitní systém a nádorové buňky v stálém kontaktu. A tak stejně jako se

buňky imunitního systému snaží odhalit a zabít postižené buňky, maligně transformované buňky vyvinuly různé strategie uniknutí imunitnímu dozoru [31,32].

Mezi způsoby úniku, které využívají nádory, lze vyjmenovat „shedding” – proteolytické odštěpení potenciálních antigenů z buněčného povrchu a imunoeditaci – kdy imunitní systém nechtěně vytváří specifické podmínky, které způsobí a podporují vývoj nádorů.

1.3.1 Shedding

Během mnoha studií nádorových buněk bylo zjištěno, že exprese MHC I molekul nebo jim podobných ligandů je u těchto buněk snížena nebo vůbec potlačena [33,34]. Stojí za zmínění, že ztráta nebo snížení exprese (anglicky se tomuto procesu říká „downregulation“) MHC I molekul se uplatňuje častěji u tumoru ve fázi metastáze, než u primárně vyvinutých tumorů [19]. O tomto procesu bude více diskutováno v odstavci 1.5.2.

1.3.2 Imunoeditace

Dunn and Schreiber navrhli koncept nádorové imunoeditace (angl. immunoediting) [31], která se skládá ze tří fází. Během eliminační fáze jsou tumorové buňky atakovány NK buňkami, CD4⁺ a CD8⁺ cytotoxickými buňkami. Pak následuje fáze rovnováhy mezi imunitním systémem a tumorovými buňkami. Třetí fáze, fáze uniknutí, je charakterizována selekcí nádorů, které dokážou uniknout imunitní destrukci pomocí snížení nebo ztráty exprese tumorových antigenů, zvýšení exprese genu pro přežití a uplatnění rezistence vůči cytotoxicitě. To vše vede ke vzniku imunosupresivního tumorového mikroprostředí [35,36].

1.3.3 Další způsoby potlačení aktivity NK buněk

Tumorové buňky dokážou využít tělní buňky s imunosupresivními funkcemi pro potlačení aktivity NK buněk. Mezi takové regulační buňky řadíme s tumorem asociované makrofágy, myeloidní supresorové buňky a regulační T lymfocyty. Jiná cesta vedoucí k úniku před dozorem NK buněk je vytvoření hypoxického tumorového mikroprostředí, které indukuje produkci rozpustných supresivních faktorů [37-39].

1.4 Využití NK buněk v imunoterapii

Hlavní funkce NK buněk je přímý cytotoxický útok na postižené buňky. Kromě schopnosti přímo atakovat nádorové buňky, vykazují NK buňky několik dalších výhod při

využití během imunoterapie. NK buňky jsou schopné nejen působit jako součást vrozené imunity, ale i aktivovat adaptivní imunitní odpověď. NK buňky jsou zároveň účinné vůči virovým onemocněním, což by bylo výhodné v případech maligních transformací jako důsledek virových infekcí. A NK buňky jsou též schopny zničit tumorové kmenové buňky a jejich ložiska a tím zabránit vzniku rezistence vůči chemoterapii a radioterapii [9].

NK buňky mají potenciál být využity během imunoterapie díky jejich schopnosti rozpoznat a zahájit lýzi velkého množství tumorových buněk i bez předchozího setkání s tímto nebo jiným typem nádorů [40]. Vzhledem k tomu, že NK buňky se primárně nacházejí v krvi, imunoterapie s jejich využitím byla dosud nejvíc účinná proti hematopoetickým maligním transformacím, například proti leukemiím.

Imunoterapie zaměřená na využití NK buněk se obecně skládá ze dvou etap. Během první etapy se provádí *in vitro* zmnožení a aktivace NK buněk, s cílem získat dostatečné množství NK buněk pro účinnou dávku. Druhá etapa spočívá ve zvětšení cytotoxicity NK buněk vůči nádorům *in vivo* a *ex vivo* [41,42].

1.4.1 Chemoterapie a NK buňky

Přestože se imunoterapie rychle rozvíjí [43], chemoterapeutické léčení rakoviny stále převažuje. Chemoterapeutika se hlavně uplatňují při zacházení s pokročilými stádii rakoviny včetně tumorů ve stavu metastase. Pozoruhodné je to, že některá chemoterapeutika dokážou podpořit efektivnost NK buněčné imunoterapie. Obecný mechanismus spolupráce spočívá v indukci specifické nebo obecné buněčné stresové odpovědi podanými látkami [44]. Jako příklad jednoho z takových léků, který pozitivně účinkuje na cytotoxickou aktivitu NK buněk, lze uvést 5-fluoruracil [45]. V roce 2015 bylo zjištěno, že vorinostat (Zolinza®), lék inhibující histondeacetylasy (HDAC), zvětšuje expresi nádorových ligandů MICA/B tak, že usnadňuje genově specifickou acetylaci [46]. Nadějně je, že při podání nízké netoxické dávky léku bude možné se vyhnout systematické toxicitě nebo nežádoucím vedlejším účinkům, které obecně doprovází konvenční chemoterapii.

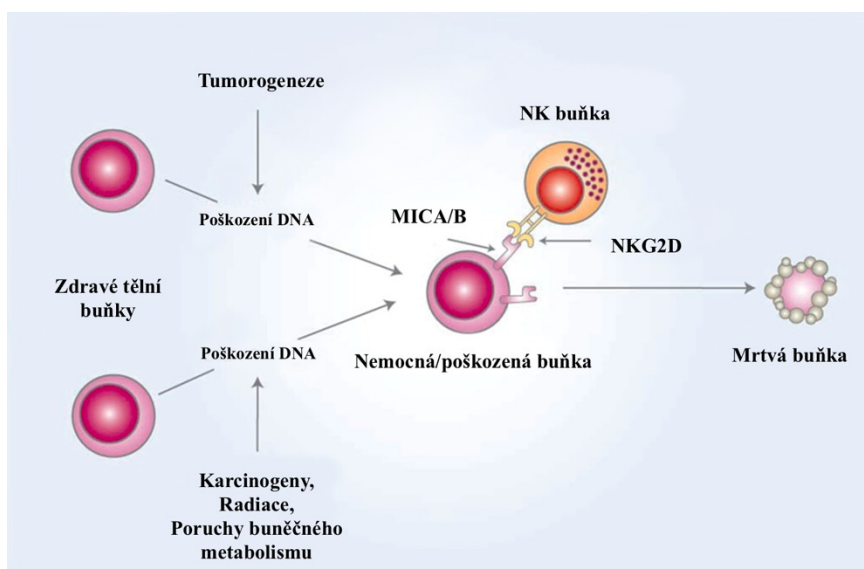
1.4.2 Indukce aktivity NK buněk v pacientech

Interleukin-2 (IL-2) je široce známý a jeden z nejvíc studovaných rozpustných podpůrných faktorů imunitní odpovědi. Hlavní funkce IL-2 zahrnují promoci růstu a proliferaci mnoha imunitních buněk včetně NK buněk a T lymfocytů [47]. V imunoterapii má IL-2 své uplatnění od devadesátých let minulého století ve formě administrace NK buněk spolu s různě velkými dávkami IL-2, samostatně nebo s dalšími aktivovanými

lymfocyty nebo purifikovanými NK buňkami [45,48]. Další studií prokázala, že IL-2 aktivuje NK buňky u pacientů po intenzivní chemoterapii nebo u pacientů postižených akutní myeloidní leukemií [49,50].

1.5 MICA/B

Do skupiny lidských NKG2D aktivujících ligandů patří MICA (major histocompatibility complex class I polypeptide-related sequence A) a MICB (major histocompatibility complex class I polypeptide-related sequence B) [51]. Na povrchu maligně transformovaných buněk se vyskytují ligandy, jejichž exprese je řízena buněčnými stresovými drahami, například při poškození DNA [52,53]. Stav hypoxie, který je charakteristický pro tumorové mikroprostředí, je další možnou příčinou snížené exprese MICA/B [54]. Obrázek 5 znázorňuje interakci buňky, která exprimuje MICA/B ligand, a NK buňky. Na obrázku 6 na straně 20 je zobrazená proteinová struktura komplexu ligandu MICA a dimeru receptoru NKG2D.



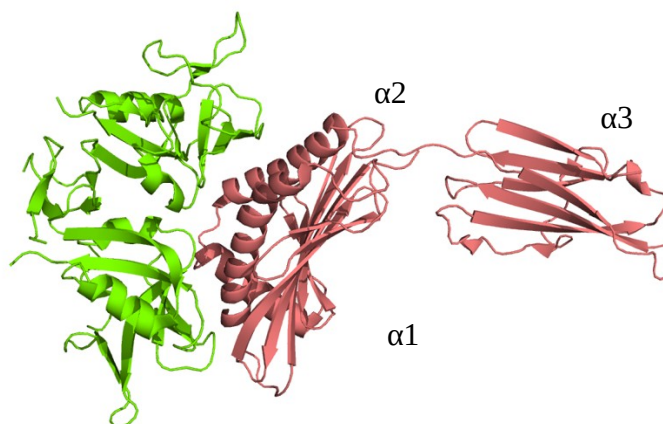
Obrázek 5: Ilustrace situace, kdy dochází k expresi povrchových ligandů MICA/B. Ligand MICA/B aktivuje NKG2D receptory na povrchu NK buňky a tím ji aktivuje. Aktivovaná NK buňka pak cytolyticky zabije poškozenou buňku [53].

1.5.1 Struktura ligandu MICA/B

MICA/B je transmembránový protein s extracelulární doménou, která je tvořená třemi podjednotkami [55]. MICA/B jsou homology klasických MHC I ligandů, neprezentují však antigeny a nevážou β 2-mikroglobulin. Tři podjednotky tvořící

ektodoménu ligandu jsou pojmenovány alfa 1, alfa 2 a alfa 3 (podjednotky jsou vyznačeny na obrázku 6, na straně 20) [56].

Podjednotky alfa 1 a alfa 2 jsou zodpovědné za zprostředkování aktivace NK buněk. Alfa 3 se nachází poměrně blízko buněčné membrány a právě alfa 3 podjednotka je cílem pro „shedding“.



Obrázek 6: Ligand MICA v komplexu s dimerem receptoru NKG2D, MICA je označen červenou barvou, receptor NKG2D je označen zelenou barvou (PDB ID 1HYR, PyMOL 2.5.2) [56].

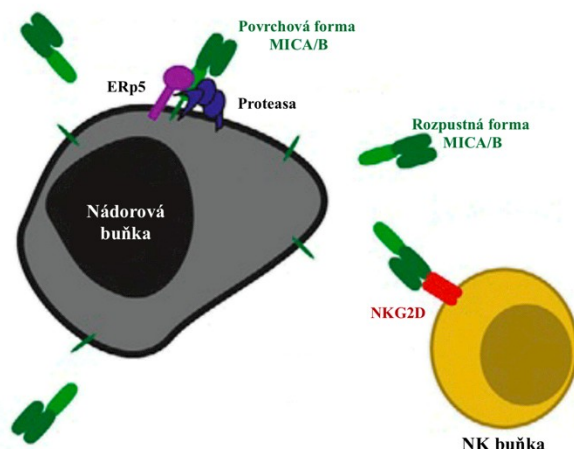
1.5.2 Role ligandu MICA/B v uniknutí imunitnímu dozoru

Tumorové buňky vyvinuly několik způsobů uniknutí imunitnímu dozoru NK buněk, například snížením povrchové exprese MICA/B ligandů nebo proteolytickým odštěpením (shedding) těchto signálních molekul ze svého povrchu [57,58].

Proteolytické odštěpení MICA/B je zahájeno disulfidickou isomerasou ERP5, která způsobuje konformační změnu molekulového komplexu MICA/B a odhalení cílových míst pro další proteolytické štěpení (obrázek 7, strana 21) [59]. Po odštěpení z buněčné membrány se stávají MICA/B rozpustnými proteiny, které nejsou za normálních okolností u zdravých lidí detekovatelné v krevním séru. Předpokládá se, že jiný způsob, jak se tumorové buňky mohou vyhnout cytotoxickému zabíjení NK buňkami, je vyloučení částí cytoplazmatické membrány spolu s aktivačními ligandy MICA/B v podobě exosomů [60].

Takovéto procesy vedou k tomu, že u pacientů postižených rakovinou se prokazatelně zvyšuje koncentrace rozpustného proteinu MICA/B v krevním řečišti [61]. Zvýšená koncentrace rozpustných forem MICA/B nejen hraje roli markerů některých typů epitheliálních karcinomů, jako jsou karcinomy plic, prsu, ledvin, ovaria, prostaty a tlustého

střeva [62], ale i vede ke snížení exprese NKG2D ligandů a následnému zhoršení odpovědi tumorově specifických efektorových buněk imunitního systému [63,64].



Obrázek 7: Ilustrace odštěpení ligandu MICA/B z povrchu mutované buňky s vyznačenými enzymy, které se podílejí na tomto procesu. Vedle je znázorněna interakce rozpustné formy MICA/B a NK buňky [57].

1.5.3 Uplatnění ligandu MICA/B v imunoterapii

Tumorové buňky shazují MICA/B ligandy nebo brání jejich expresi a tím se vyhýbají rozpoznání NK buňkami. Vzhledem k tomu, že některá chemoterapeutika způsobují buněčný stres, který je podmínkou exprese ligandu MICA/B, stojí za ověření, jestli tyto léky mohou indukovat zvýšenou expresi MICA/B. Jak bylo zmíněno v odstavci 1.4.1, jedním ze způsobů indukce je inhibice histondeacetylasy [46,65].

Jiný přístup spočívá v inhibici odštěpení těchto nádorových ligandů. Protilátky specifické vůči proteolytickým místům MICA/B ligandů zabráňují jejich sheddingu [60,66]. Látky potlačující vyloučení exosomů z buněčných membrán jsou také zkoumány jako potenciální léky. Sulfisoxazol, ketotifen, manumycin A a další látky, jejichž hlavní funkce je stabilizace buněčných membrán a inhibice tvorby exosomů, jsou již schválené k léčení rakoviny. V současnosti je testováno jejich možné využití jako součást NK buněčné imunoterapie [60,67].

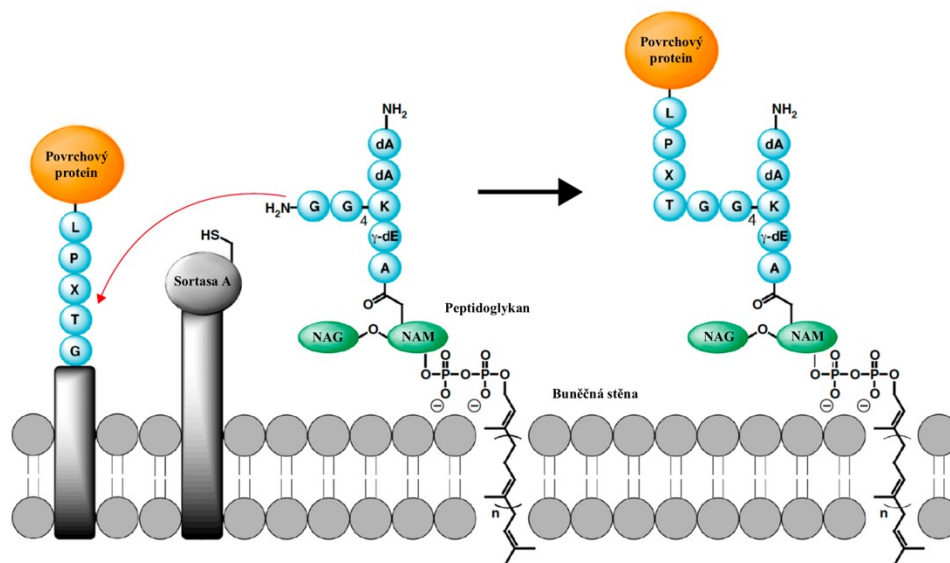
Nádorové ligandy MICA/B by také mohly být součástí bispecifických fúzních proteinů pro aktivaci NK buněk. V roce 2016 tým Southern Wesleyan University a Clemson University připravil fúzní protein, který obsahoval extracelulární doménu MICA ligandu a IL-12. Tým bylo navrženo, že takový protein by mohl aktivovat lidské NK

buňky a další cytotoxické buňky skrz NKG2D receptor a část nesoucí IL-12 by podpořila cytotoxickou aktivitu NK buněk [68].

Jiný design zahrnující MICA ligand do fúzního proteinu byl tvořen extracelulární doménou MICA ligandu a hPRL-G129R, což je antagonist lidského prolaktinu. Takovéto složení proteinového konstrukt bylo navrženo kvůli tomu, že buňky rakoviny prsu využívají prolaktinový receptor (PRLR) a jeho agonistu prolaktin jako růstový faktor. MICA ligand, stejně jako v předchozím případě, by se navázal na příslušný receptor NKG2D. Aktivované NK buňky by zaútočily na PRLR pozitivní nádorové buňky [69].

1.6 Transpeptidasa sortasa A

Sortasa je bakteriální enzym patřící do skupiny transpeptidas a je hojně využívána gram-pozitivními bakteriemi. Bakterie využívají sortasu pro kovalentní připojení různých proteinů k povrchu své buněčné stěny (obrázek 8), což přispívá k jejich virulenci a napomáhá při jejich interakcích s vnějším prostředím, například při adhezi nebo hlídání nutričních faktorů [70]. V současné době je popsáno 3300 sekvencí genů sortasy kódujících různé homology tohoto enzymu u 1098 typů bakterií. Dle jejich primárních sekvencí jsou enzymy děleny do 6 tříd A až F [71].



Obrázek 8: Schéma znázorňující uplatnění zakotvené do cytoplazmatické membrány sortasy při budování bakteriální peptidoglykanové vrstvy či její rozvětvení. Sortasa rozpoznává sekvence LPXTG na C-terminálním konci povrchového proteinu, který je zakotven v membráně pomocí své hydrofobní části (černý čtverec). Sortasa katalyzuje štěpení mezi threoninem a glycinem a pak připojuje k pentaglycinovému zbytku jiného membránového proteinu. Bakterie využívají soratsu k zabudování potřebných proteinů (např. zvyšujících jejich patogenitu) do své buněčné stěny (NAM N-acetylmuramová kyselina, NAG N-acetylglukosamin) [72].

Určité charakteristické rysy v primární sekvenci sortasy jsou zachovány ve všech třídách. Lze vyjmenovat tři: N-terminální sekvenci, která je zodpovědná za transport enzymu přes cytoplazmatickou membránu za pomoci Sec translokony, nepolární segment, který ukotvuje enzym v dvojvrstvě membrány a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu, jejíž aktivní centrum je tvořeno sekvencí His–Cys–Arg. V celku konzervovaný kanonický tvar sortasy je tvořen osmi β -skládanými listy v zákrytové konformaci [73]. Na obrázku 9 na straně 23 je zobrazena struktura tohoto enzymu.



Obrázek 9: Struktura sortasy postrádající membránovou kotvu z modelového organismu *Escherichia coli* zjištěná pomocí metody NMR. Gen pro rekombinantní výrobu enzymu pochází z bakterie *Staphylococcus aureus*. Aminokyseliny tvořící katalytické centrum jsou vyznačeny odlišnými barvami: His120 zeleně, Cys184 modře a Arg197 žlutě (PDB ID 1IJA, PyMOL 2.5.2) [74].

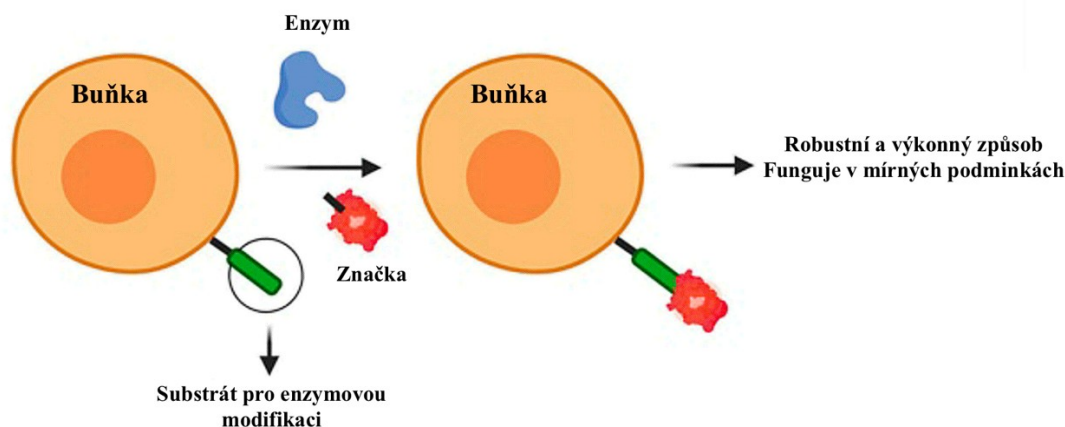
1.6.1 Využití sortasy v biotechnologickém průmyslu

V biotechnologickém průmyslu má význam schopnost bakteriální sortasy vytvořit kovalentní vazbu mezi proteiny. Sortasa je využívána v biologickém inženýrství k provedení ligací s účelem modifikace proteinů, například protilátek, *in vitro* označení proteinů, označení a modifikace proteinů na povrchu buněčných membrán [72]. Tento enzym je považován za velice robustní a specifický.

Modifikace proteinů buněčných membrán se uplatňuje při studiu mezibuněčných interakcí, interakcí buněk s okolím a funkcí a specifity membránově vázaných proteinů. V laboratořích jsou dnes využívány hlavně tři způsoby označení a modifikace cytoplazmatických membrán: genetický, chemický a enzymatický [75]. Mezi výhodami využití sortasy při chemoenzymatickém označení lze mimo jiné vyjmenovat její komerční

dostupnost, možnost produkce s poměrně rozumnými výtěžky a širokou paletu reakcí, které se dá s její pomocí uskutečnit (obrázek 10, strana 24) [76].

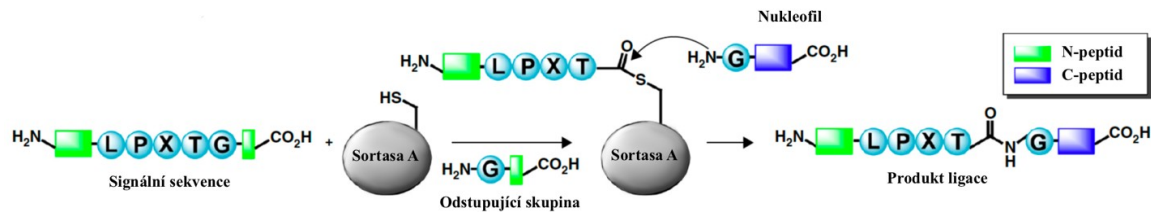
Schopnost enzymu typu sortasa provádět *in vitro* ligace byla studována výzkumným týmem H. Mao spolu s kolegy. Sortasa A se prokázala jako více robustní, spolehlivá a měla větší substrátovou specifitu. Během studia byly provedeny ligace typu peptid-peptid, protein-peptid a protein-protein [77].



Obrázek 10: Schematické zobrazení modifikace cytoplazmatické membrány za využití enzymatického způsobu. Enzymy jsou schopny rozpoznat specifickou sekvenci ve struktuře substrátu a poskytnout pomoc při připojení molekul k buněčnému povrchu [75].

1.6.2 Mechanismus ligační reakce

Sortasa dokáže rozštěpit peptidovou vazbu v určitém místě a následně vytvořit novou za inkorporaci přicházejícího nukleofilu. Na obrázku 11, str. 25 je uvedeno schéma této reakce. Substráty jsou rozpoznány sortasou díky motivu LPXTG na C-terminálním konci (v případě *Staphylococcus aureus*, jiné typy sortas z různých bakterií rozpoznávají stejné nebo velice podobné signální sekvence). Enzym po rozpoznání LPXTG motivu štěpí peptidovou vazbu mezi threoninovým a glycinovým zbytkem tohoto pentapeptidu, cysteinový zbytek Cys184 hraje roli katalytického centra. Vzniklý thioacylový intermediát je pak spojen s N-terminálním oligoglycinovým koncem nukleofilu, což vede ke vzniku nové peptidové vazby [78]. Popsaný princip se uplatňuje jak při zabudování potřebných proteinů do peptidoglykanové buněčné stěny, tak i při zapojení sortasy do ligačního procesu *in vitro* [79].



Obrázek 11: Schematické znázornění mechanismu reakce katalyzované sortasou [72].

Jiné uplatnění sortasy v biotechnologickém průmyslu spočívá ve využití tohoto enzymu při purifikaci proteinů v jednom kroku.

H. Mao byl jedním z prvních, kdo dokázal demonstrovat výhody sortasy jako biotechnologického nástroje. Proteinový konstrukt byl exprimován pomocí pET15b plazmidového vektoru (Novagen) v *E. coli*. Fúzní protein obsahoval N-terminální His₆ značku, SrtA, LPETG sekvenec a cílový protein. K purifikaci byla zvolena metoda chelatační afinitní chromatografie neboli anglicky immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Po zachycení proteinového konstruktu byly přidány ionty Ca²⁺, které vyvolávají štěpení amidové vazby sortasou v motivu LPETG a jako důsledek byl cílový protein uvolněn z kolony s jedním glycinem navíc. Mao aplikoval uvedený způsob purifikace na tři další proteiny (emGFP, p21 and Cre) a ve všech třech případech fúze se SrtA prokazatelně zvýšila výtěžek proteinu při expresi a míra purifikace činila 98 %. Takový fúzní konstrukt se prokázal jako relativně levné i robustné vylepšení k technologii IMAC [80].

2 Cíle práce

- Příprava expresních vektorů dvou rekombinantních proteinů:
 - Upravené rozpustné formy nádorového ligandu MICA obsahující sekvenci aminokyselin LPETG
 - Fúzního proteinu složeného z antiCD20 nanoprotiátky, upravené rozpustné formy nádorového ligandu MICA a sekvence aminokyselin LPETG
- Produkce těchto dvou proteinových konstruktů v lidské buněčné linii HEK293T a jejich purifikace
- Ověření a kvantifikace transpeptidasové aktivity sortasy A

3 Materiál

3.1 Chemikálie

100 bp DNA standard (New England Biolabs, USA)
1 kb DNA standard (New England Biolabs, USA)
2-merkapt ethanol (Sigma, USA)
Agar (Sigma, USA)
Agarosa (Sigma, USA)
Akrylamid (Sigma, USA)
Ampicilin (Roth, Německo)
APS (Serva, USA)
Azid sodný (Serva, USA)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka Chemika, Švýcarsko)
DMSO (Sigma, USA)
GGGK-TAMRA (Thermo Scientific, USA)
dNTPs (Sigma, USA)
GoodView Nucleic Acid Stain (Ecoli, Slovensko)
Kyselina valproová (Sigma, USA)
IPEI 25 kDa (Polysciences, USA)
N,N'-metylenbisakrylamid (Serva, USA)
Penicilin (Sigma, USA)
SDS (Jersey Lab Supply, USA)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)
Streptomycin (Sigma, USA)
TEMED (Serva, USA)
Tris (Roth, Německo)
Trypanová modř (Sigma, USA)
Ostatní běžné chemikálie (Lach-Ner, ČR)

3.2 Roztoky a pufry

AA (30 % akrylamid, 1 % N,N'-metylenbisakrylamid)
Barvicí roztok pro SDS-PAGE (45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 %
Coomassie Brilliant Blue R-250)

Elektrodotový pufr pro SDS-PAGE 10× koncentrovaný (0,25 M Tris, 1,9 M glycin, 1 % SDS, pH 8,3)
Eluční pufr při izolaci DNA z agarosového gelu (5 mM Tris, pH 8,5)
Eluční pufr pro Ni-NTA 1 (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 20 mM imidazol, pH 7,0)
Eluční pufr pro Ni-NTA 2 (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 250 mM imidazol, pH 7,0)
HEPES pufr (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5)
Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE (35 % ethanol, 10 % kyselina octová)
PBS pufr (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5)
PBS-TK pufr (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,0)
TAE pufr (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA)
Tris pufr o pH 6,8 (1,5 M Tris, pH upraveno HCl)
Tris pufr o pH 8,8 (1,5 M Tris, pH upraveno HCl)
Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu 6× koncentrovaný (30 % glycerol, bromfenolová modř v TAE pufru)
Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující 5× koncentrovaný (31,5 mM Tris, 10 % glycerol, 1 % SDS, 0,005 % bromfenolová modř, 10 mM NaN₃, pH 6,8)
Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující 5× koncentrovaný (vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující 5× koncentrovaný s desetinným objemovým podílem 2-merkapt ethanolu)

3.3 Kultivační média a misky

ExCELL293 médium (Sigma, USA)
LB médium (1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH 7,4)
SOB medium (2 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 0,058 % NaCl, 0,019 % KCl, 0,2034 % MgCl₂·6H₂O, 0,2464 % MgSO₄·7H₂O, pH 7,0)
Kultivační misky s LB médiem (LB médium, 1,5 % agar, 100 µg/ml Amp)
Kultivační misky s SOB médiem (SOB médium, 1,5 % agar, 100 µg/ml Amp)

3.4 Primery a vektory

Sekvenační primer pTT_FW
5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

Sekvenační primer pTW5seq_REV

5'-AAGCAGCGTATCCACATAGCG-3'

PCR primer MICA_E24_pTCCsecC

5'-TCTTGGAATTACCGGTGAGCCCCACAGTC-3'

PCR primer VHH_secC_FW

5'-TCTTGGAATTACCGGTATGGCCG-3'

PCR primer MICA_K299_srt_REV

5'-

TGGTGGTGATGGTGGGTACCTGTTTCTGGCAGTTTCCCAGAGGGC-3'

PCR templát pTW5sec_MICA

PCR templát pTW5sec_aCD20_1_MICA

Plazmid pTW5sec_B7-H6_2 (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

Plazmid pTW5sec_p27 (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

Plazmid pTW5sec_aFGF (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

3.5 Enzymy a příslušné pufry

Combi PPP MasterMix (Top-Bio, ČR)

CutSmart pufr (New England Biolabs, USA)

EmeraldAmp GT PCR MasterMix (Takara Bio, Japonsko)

Sortasa A F1 (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

Q5 DNA polymerasa (New England Biolabs, USA)

Q5 GC enhancer (New England Biolabs, USA)

Q5 reakční pufr (New England Biolabs, USA)

Restrikční endonukleasa AgeI-HF (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

Restrikční endonukleasa KpnI-HF (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

3.6 Buněčné kultury a linie

Escherichia coli DH5α (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

Escherichia coli Top10 (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

HEK293T (laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK)

3.7 Přístroje, pomůcky a soupravy

Automatické pipety (Discovery HTL, Polsko)
Automatické pipety (Pipetman Gilson, USA)
Centrifuga Allegra X-30R (Beckman Coulter, USA)
Centrifuga Avanti JXN-26 (Beckman Coulter, USA)
Centrifuga EBA 12R (Hettich, Německo)
Centrifuga Universal 320R (Hettich, Německo)
Centrifugační zkumavky Falcon (VWR, USA)
Centrifugační zkumavky Oak Ridge (Sigma, USA)
Cytometr Corning (CytoSMART Technologies B.V., Nizozemsko)
Filtr pro sterilizaci 0,22 µm (TPP, Švýcarsko)
Sterilní box (Schoeller Instruments, s.r.o., Německo)
HPLC systém ÄKTA basic (GE Healthcare, USA)
Incubátor IR 5000 (LAB system, Praha, ČR)
Incubátor MCO-18 AIC (Sanyo, Japonsko)
Kahan Fuego SCS (VERKON, ČR)
Kolona Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA)
Kolona HiTrap Ni-NTA 5 ml (GE Healthcare, USA)
Koncentrátory Amicon Ultra, MWCO 10000 (Millipore, USA)
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky (P-Lab, ČR)
Mikroskop inverzní AE31 (Motic, Německo)
Mikrostříkačka HAMILTON (Hamilton, USA)
Mikrozkumavka 200 µl (Eppendorf, USA)
Mikrozkumavka 1,5 ml (Eppendorf, USA)
Mix & Go! E. coli Transformation Kit and Buffer Set (Zymo Research, USA)
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Plus (Macherey-Nagel, Německo)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo)
NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit (Macherey-Nagel, Německo)
pH metr φ200 (Beckman Coulter, USA)
Pipetovací nástavec Pipetus (Hirschmann, Německo)
Plastik pro tkáňové kultury (VWR, USA)
Předvážky KB1200-2 (Kern, Německo)
Souprava pro agarosovou elektroforézu Liberty 120 (Biokeystone, USA)
Souprava pro SDS-PAGE (Bio-Rad, Německo)
Spektrofotometr DS-11+ (DeNovix, USA)

Spektrofotometru Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies)
Stericup vakuový filtrační nástavec 0,22 µm (Millipore, USA)
Stolní centrifuga MiniStar Silverline (VWR, USA)
Termoblok LS1 (VLM, Německo)
Termocykler T100 (Bio-Rad, Německo)
Třepačka Celltron (Infors HT, Švýcarsko)
Třepačka Multitron Cell (Infors HT, Švýcarsko)
Třepačka G24 (New Brunswick Scientific, USA)
Biomolekulární skener Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare, USA)
Vodní lázeň WNB 29 (Mettler, Německo)
Vortexový mixer (VELP Scientifica, Itálie)
Zobrazovací systém Alliance Q9 (UVItec, UK)
Zdroj deionizované vody Milli Q (Millipore, USA)
Zdroj stejnosměrného napětí PS 251-2 (E-C Apparatus Corporation)

4 Metody

4.1 Příprava expresního vektoru

4.1.1 Restrikční štěpení a linearizace plazmidu

Jako vektor pro InFusion reakce byl využit plazmid pTW5sec_B7-H6_2. Plazmid byl nejdříve štěpen pomocí restrikčních endonukleas AgeI-HF a KpnI-HF. Tím byl plazmid linearizován a zároveň byl zbaven inzertu B7-H6_2. Reakční směs a kontrolní vzorek o objemu 50 μ l byly připraveny dle tabulky 1. Vzorky byly krátce odstředěny na stolní centrifuze a inkubovány dvě hodiny při 37 °C.

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení plazmidu.

	Zásobní koncentrace	Přidaný objem (μ l)
Reakční směs		
pTW5sec_B7-H6_2	0,92 mg/ml	5,5
Pufr CutSmart	10 \times koncentrovaný	5
AgeI-HF	20 μ g/ml	1
KpnI-HF	20 μ g/ml	1
dH ₂ O	-	37,5
Kontrolní reakce		
pTW5sec_B7-H6_2	0,92 mg/ml	5,5
dH ₂ O	-	44,5

4.1.2 Amplifikace DNA inzertů metodou PCR

Pomocí polymerasové řetězcové reakce (PCR) byly amplifikovány úseky DNA, které pak byly následně využity jako inzerty při InFusion reakci pro vytvoření požadovaných konstruktů. Vhodné sekvence primerů byly navrženy Dr. B. Kalouskovou. Byly připraveny dva inzerty (tabulka 2), reakční směsi o objemu 20 μ l byly připraveny dle tabulky 3, str. 33.

Tabulka 2: Přehled připravených inzertů DNA.

Templátová DNA	Přední primer	Zadní primer
pTW5sec_MICA (vzorek MICA)	MICA_E24_pTCCsecC	MICA_K299_srt_REV
pTW5sec_aCD20_1_MICA(vzorek CLM)	VHH_secC_FW	MICA_K299_srt_REV

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR.

	Zásobní koncentrace	Přidané množství (μl)
Templátová DNA	40 ng/μl	1
Přední primer	5 μl/ml	2
Zadní primer	5 μl/ml	2
Směs deoxynukleotidů dNTPs	10 mM	0,4
Q5 DNA polymerasa	5× koncentrovaný	0,2
Q5 GC enhancer	5× koncentrovaný	4
Q5 reakční pufr	5× koncentrovaný	4
dH ₂ O	-	6,4

Reakční směsi byly krátce odstředěny na stolní centrifuze. Samotná polymerační reakce proběhla v termocykleru dle protokolu pro Q5 DNA polymerasu (tabulka 4). Celkový čas provedení PCR činil přibližně 1 hodinu 40 minut.

Tabulka 4: Shrnutí průběhu PCR.

Krok cyklu	Teplota (°C)	Čas
1	95	3 min
2	95	30 s
3	54	30 s
4	72	1 min
30× opakování kroků 2-4		
5	72	5 min
6	4	

4.1.3 Elektroforéza v agarosovém gelu

Štěpený plazmid a produkty PCR reakce byly následně děleny pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. V případě vzorku plazmidu byly při separaci v agarosovém gelu od sebe odděleny samotný plazmid pTW5sec a inzert B7-H6_2. Pro přípravu 0,75 % agarosového gelu bylo naváženo 0,46 g agarosy a pak rozpuštěno v 65 ml TAE pufru. Směs byla krátce povařena v mikrovlnné troubě během 1,5 min a po zchladnutí do ní bylo přidáno 3 μl barviva GoodView pro zviditelnění DNA. Směs byla přelita do předem připravené aparatury pro agarosovou elektroforézu. Po ztuhnutí byl gel převrstven dH₂O, do elektrodových prostorů byl nalit TAE pufr. K vzorkům plazmidu a produktům PCR byl

přidán 6× koncentrovaný vzorkový pufr. Připravené vzorky a molekulové standardy DNA byly naneseny do jamek v gelu dle tabulky 5.

Tabulka 5: Pořadí vzorků aplikovaných na agarosový gel.

Molekulový standard 100 bp	Štěpený plazmid	Štěpený plazmid	×	Kontrolní reakce	Molekulový standard 1 kb	PCR 1 (vzorek MICA)	PCR 2 (vzorek CLM)
----------------------------	-----------------	-----------------	---	------------------	--------------------------	---------------------	--------------------

Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 180 V. Poté byla DNA vizualizována modrým světlem pomocí snímkovacího systému Alliance Q9. Potřebné proužky DNA byly opatrně vyříznuty pro jejich následnou izolaci z gelu.

4.1.4 Izolace DNA z agarosového gelu

Pro izolaci DNA z agarosového gelu byla využita komerční souprava NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Každý vyříznutý proužek gelu byl přenesen do mikrozkuhavky a převrstven pufrem NT1. Vzorky byly zahřáty v termobloku při teplotě 55 °C až se roztavil gel. Pak byly vzorky přeneseny do 2 ml mikrozkuhovek s kolonkami vázajícími DNA a centrifugovány 1 min při 11000× g. Supernatant byl odstraněn. Poté kolonky s navázanou DNA byly promyty. Nejdříve bylo na kolonky naneseno 600 µl pufru NT3 a vzorky byly znovu centrifugovány 1 min při 11000× g. Promytí vzorků 600 µl pufru NT3 a centrifugace byly provedeny celkem dvakrát. Třetí promytí bylo provedeno 600 µl 70 % ethanolu, vzorky byly znovu centrifugovány 1 min při 11000× g. Dál byly mikrozkuhavky s kolonkami sušeny pomocí centrifugace s otevřenými víčky 2 min při 11000× g. Kolonky byly přemístěny do čistých 1,5 mikrozkuhovek do kterých byla provedena eluce DNA pomocí 30 µl předehřátého elučního pufru AE. Vzorky byly krátce inkubovány při pokojové teplotě a následně odstředěny 1 min při 11000× g. Pomocí spektrofotometru DS-11+ byla stanovena koncentrace DNA v třech získaných vzorcích: linearizovaný plazmid pTW5sec, PCR produkty vzorek CLM a vzorek MICA.

4.1.5 Transformace kompetentních buněk

Transformace kompetentních buněk byla provedena pomocí InFusion reakce, která slouží k vnesení inzertu DNA do plazmidového vektoru. Pro provedení reakce byla využita komerční souprava Ligation-Free Cloning Kit. Byly připraveny dvě reakční směsi: jedna pro inzert kódující MICA a druhá pro inzert kódující fúzní protein aCD20_1_MICA. Reakční směsi byly smíchány tak, že poměr plazmidového vektoru ku inzertu byl 1:4. Do

každé InFusion reakce bylo přidáno 100 μ l štěpeného plazmidu pTW5sec. Množství inzertu, které bylo přidáno do jednotlivých reakcí, bylo spočítáno s korekcí na odlišnou velikost inzertů oproti vektoru (tabulka 6).

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro InFusion reakce.

	MICA		CLM	
	Zásobní konc. (ng/ μ l)	Přidané množství (μ l)	Zásobní konc. (ng/ μ l)	Přidané množství (μ l)
pTW5sec	28,515	3,5	28,515	3,5
inzert	19,356	3,8	13,72	7
InFusion enzym	5 \times	4	5 \times	4
dH ₂ O	-	5,5	-	5,5

InFusion reakce byly inkubovány 30 min při pokojové teplotě. Pro transformaci byly využity kompetentní buňky *E. coli* TOP 10, které byly připraveny dle protokolu k soupravě „Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set“. Kompetentní buňky byly k dispozici v mrazáku. Do každé zkumavky s InFusion reakcí bylo přidáno 100 μ l bakterií, směsi byly pak inkubovány 15 min na ledové lázni. Po uplynutí doby inkubace byly směsi pipetovány na kultivační misky (SOB + Amp). Misky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

4.1.6 PCR z kolonií

Pro amplifikaci DNA obsažené v bakteriálních koloniích byla provedena PCR reakce. Vybrané kolonie na miskách byly vyznačeny M1 až M6 pro vzorek MICA a C1 až C3 pro vzorek CLM. Reakční směsi o objemu 20 μ l byly smíchány v 9 mikrozukmavkách. Do každé zkumavky bylo přidáno 10 μ l 2 \times koncentrované reakční směsi Combi PPP MasterMix (směs polymerasy, nukleotidů a pufru), 2 μ l předního (pTT_FW) a 2 μ l zadního (pTW5seq_REV) sekvenačního primeru a 6 μ l dH₂O. Templát byl přidán tak, že špičkou automatické pipety byla odebrána jedna kolonie bakterií a opakovaným nasáváním byla resuspendována v reakční směsi. PCR byla provedena v termocykleru dle protokolu CPCR_204 (tabulka 7) během přibližně 80 minut.

Tabulka 7: Průběh PCR reakce.

Krok cyklu	Teplota (°C)	Čas
1	95	3 min
2	95	30 s
3	54	30 s
4	72	1 min
20 \times opakování kroků 2-4		
5	72	5 min
6	4	

4.1.7 Elektroforéza produktů PCR z kolonií

PCR z kolonií a následná elektroforéza produktů této PCR byla provedena pro ověření přítomnosti inzertu v plazmidu, tj. úspěšnosti InFusion reakce. Pro elektroforézu byl připraven 1 % agarosový gel stejným způsobem jak bylo popsáno v kapitole 4.1.3. Do vzorků však nebylo přidáno barvivo vzhledem k tomu, že použitý Combi PPP MasterMix již obsahuje barvicí složku. Po proběhnutí elektroforézy byly proužky DNA vizualizovány pomocí UV lampy.

4.1.8 Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA

Pro provedení nízkoobjemové produkce plazmidové DNA byly vybrány kolonie M1 a M2 pro plazmid nesoucí MICA a kolonie C1 a C2 pro plazmid nesoucí konstrukt aCD20_MICA.

Nejdřív byl připraven zásobní roztok média smíšením 20 ml SOB a 20 μ l roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml, pak byl roztok pipetován do čtyř 50 ml zkumavek tak, že v každé bylo 5 ml roztoku. Vybrané kolonie byly odebrány špičkou automatické pipety a špičky byly vloženy do média ve zkumavkách. Zkumavky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C a 200 ot./min.

Následující den byly odstraněny špičky ze zkumavek. Buněčné suspenze byly v centrifuze EBA 12R odstředěny 15 min při 4500 \times g. Pro izolaci plazmidové DNA byla využita komerční souprava NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit. Supernatant byl vylit a buněčná peleta byla resuspendována v 250 μ l pufru A1 s přidanou RNAsou. Dále bylo přidáno 250 μ l lyzačního pufru A2 a zkumavky byly opatrně promíchány převrácením a ponechány stát při pokojové teplotě cca 5 min. Následně bylo přidáno 300 μ l neutralizačního pufru a každá zkumavka byla zase opatrně převrácena až došlo k vymizení modré barvy. Zkumavky byly centrifugovány 5 min při 11000 \times g. Vzniklý supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek s kolonkou a centrifugován 1 min při 11000 \times g. Na membránu kolonky s navázanou DNA bylo poté pipetováno 500 μ l AW pufru, předehřátého na 50 °C a kolonka byla centrifugována 1 min při 11000 \times g. Druhé promytí bylo provedeno pomocí 600 μ l pufru A4, kolonky byly centrifugovány 1 min při 11000 \times g. Po odstranění filtrátu byly kolonky sušeny centrifugací s otevřenými víčky během 2 min při 11000 \times g. Kolonky byly přemístěny do čistých 1,5 ml mikrozkušavek, kam byla následně eluována DNA přidáním 50 μ l pufru AE. Zkumavky byly centrifugovány 1 min při 11000 \times g. V eluovaných roztocích DNA byla na spektrofotometru DS-11+ změřena koncentrace DNA, jako reference byl použit eluční pufr. Změřená koncentrace je uvedena v tabulce 8, str. 37.

4.1.9 Sekvence DNA

Pro každý klon byly připraveny dvě směsi pro sekvenační reakci. Do jedné zkumavky z každého páru byl přidán 1 µl předního primeru pTT_FW, do druhé zkumavky byl přidán 1 µl zadního primeru pTW5seq_REV. Do zkumavek bylo přidáno 200 ng příslušného vzorku plazmidu. Objem každé reakční směsi byl doplněn dH₂O na 8 µl. Pro tři plazmidy bylo připraveno celkem 6 reakčních směsí (tabulka 8). Vzorky byly odeslány do Laboratoře sekvenace DNA PŘF UK. Výsledky sekvenace byly vyhodnoceny pomocí programu SnapGene.

Tabulka 8: Koncentrace plazmidové DNA z nízkoobjemové izolace a příslušné objemy vzorků DNA přidané do sekvenačních reakcí.

Plazmidová DNA	Koncentrace vzorku (ng/µl)	Přidané množství (µl)
pTW5sec_MICA (vzorek M1)	126,00	1,6
pTW5sec_MICA (vzorek M2)	154,85	1,3
pTW5sec_aCD20_1_MICA (vzorek C1)	58,72	3,4

4.1.10 Velkoobjemová izolace plazmidové DNA

Na základě výsledků sekvenace byly pro velkoobjemovou produkci plazmidové DNA vybrány vzorky M1 pro produkci plazmidu pTW5sec_MICA a C1 pro produkci plazmidu pTW5sec_aCD20_1_MICA.

Pro transformaci byly použity kompetentní buňky *E. coli* DH5α. K 45 µl buněčné suspenze bylo přidáno 200 ng plazmidové DNA, směs byla inkubována v ledové lázni 10 min. Další postup transformace byl proveden stejným způsobem jak je popsáno v kapitole 4.1.6. Následující den byly odebrány sterilními špičkami kolonie z kultivačních misek. Do 1 l LB media byl přidán 1 ml roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Médium bylo nalito do dvou 1 l Erlenmayerových baněk po 500 ml a bylo zaočkováno odebranými vzorky bakterií. Suspenze byly třepány přes noc na třepačce při 200 ot./min a 37 °C. Pro provedení velkoobjemové izolace plazmidové DNA byla využita komerční souprava NucleoBond Xtra Maxi Plus.

Po 12 hod kultivace na třepačce byly buněčné suspenze centrifugovány při 4 °C po 15 min, 4500× g. Supernatant byl odstraněn, buněčná peleta byla resuspendována přidáním 15 ml zchlazeného RES pufru do každé zkumavky. Do vzorku pak bylo přidáno 15 ml LYS pufru, suspenze byly opatrně promíchány a krátce inkubovány při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 15 ml neutralizačního NEU pufru a vzorky byly promíchány otáčením

zkumavek do vymizení modré barvy. Po ekvilibraci kolon s filtry pomocí 25 ml EQU pufru na ně byly nanесeny roztoky buněčných lyzátů. Po prokapání vzorků byly kolony s filtry promyty 15 ml EQU pufru a filtry byly z kolon odstraněny. Kolony byly promyty 25 ml WASH pufru, pak byla do čistých centrifugačních zkumavek eluována DNA 15 ml ELU pufru. Do každé zkumavky bylo přidáno 10,5 ml zchlazeného isopropanolu a následně byla DNA centrifugována 30 min při 15000× g a 4 °C. Po odstranění supernatantu byla vysrážená DNA omyta 4 ml 70 % ethanolu a centrifugována 5 min při 15000× g a 4 °C. Supernatant byl slit, DNA byla vysušena a poté rozpuštěna v 1,5 ml elučního AE pufru z komerční soupravy NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit a přenesena do čistých mikrozkušavek. Koncentrace DNA ve vzorcích byly změřeny na spektrofotometru DS-11+, jako reference byl využit eluční pufr.

4.2 Expresse proteinů

4.2.1 Kultivace buněčné linie HEK293T

Kultivace buněčné linie HEK293T byla provedena za asistence Bc. Gabriely Chytré a Mgr. Ondřeje Skořepy, Ph.D. Buněčná linie HEK293T je uchovávána v mrazáku při teplotě -80 °C jako buněčná suspenze o objemu 1 ml a buněčné hustotě 5×10^6 buněk/ml. Součástí buněčné suspenze jsou buňky dané buněčné linie a medium ExCELL293 s přídavkem 10 % DMSO.

Buněčná suspenze byla rozmrazena na vodní lázni o teplotě 37 °C a přenesena do 10 ml media ExCELL293. Poté byla buněčná suspenze 5 min centrifugována při 95× g, supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v 10 ml ExCELL293. Vzniklá suspenze byla přenesena na kultivační misku, která byla inkubována při teplotě 37 °C za 5 % nasycení CO₂.

Buňky byly přeneseny do čtverhranných lahví s průdušnými víčky poté, co se začaly dělit, a byly ponechány růst v inkubátoru s třepačkou při 37 °C, 5 % nasycení CO₂ a 135 ot./min. Každé 3-4 dny byla provedena subkultivace. Část buněčné suspenze byla odebrána a přenesena do jiné čtverhranné láhve s takovým objemem čerstvého media ExCELL293, aby buněčná hustota byla přibližně $0,3 \times 10^6$ buněk/ml. Celkový objem buněčné suspenze tvořil 40 % objemu použité láhve pro zajištění dostatečného provzdušnění buněčné kultury. Kultivace buněčné kultury probíhala dokud nebylo dosaženo potřebného počtu buněk pro tranzientní transfekci.

4.2.2 Tranzientní transfekce

Z láhve s buněčnou kulturou HEK293T bylo odebráno malé množství suspenze pro zjištění počtu buněk. Ke vzorku buněčné suspenze byla přidána trypanová modř v poměru 1:1. Vzniklý roztok byl pipetován do Bürkerovy komůrky a pomocí cytometru Corning bylo spočítáno množství buněk a zjištěna jejich viabilita, která je vyjádřena poměrem počtu živých buněk (živé buňky se neobarví trypanovou modří, zatímco mrtvé se jeví modře) ku celkovému počtu buněk.

$$\text{buněčná hustota} = \frac{\text{počet buněk v komůrce} \times \text{ředění}}{\text{počet velkých čtvců}} \times 10^4$$

Byla provedena tranzientní transfekce plazmidy nesoucími geny dvou proteinových konstruktů, MICA-Srt a CLM-Srt. Z buněčné kultury HEK293T bylo odebráno takové množství suspenze, aby obsahovalo 600 milionů buněk. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při 100× g. Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v takovém objemu ExCELL293 média, aby po přidání transfekční směsi byla výsledná buněčná hustota během transfekce 20×10⁶ buněk/ml. Resuspendované buňky byly nality do čtverhranných láhví vhodného objemu a bylo přidáno potřebné množství transfekční směsi. Každá z transfekčních směsí byla připravena následujícím způsobem: na 1 milion buněk byl použit celkem 1 μg plazmidové DNA (z toho 88 % produkčního plazmidu, 10 % plazmidu pTW5_p27 a 2 % plazmidu pTW5_aFGF). Na celkový požadovaný objem byla směs doplněna puforem PBS-TK, sterilizována filtrací přes 0,22 μm membránu a přidána k buněčné suspenzi, k níž bylo následně přidáno tolik zásobního 10 mg/ml roztoku IPEI, aby hmotnostní poměr plazmidové DNA ku IPEI byl roven 1:3 až 1:4. Optimální poměr DNA: IPEI pro transientní transfekci MICA-Srt byl navrhnout Mgr. Barborou Kalouskovou, Ph.D. Optimální poměr DNA: IPEI pro transientní transfekci antiCD20-1-MICA-Srt navrhla Mgr. Celeste Abreu. V tabulce 9 jsou shrnuty všechny pipetované objemy pro tranzientní transfekci obou konstruktů kýžených rekombinantních proteinů.

Tabulka 9: Přehled přidaných chemikálií a jejich potřebné objemy pro provedení tranzientní transfekce proteinových konstruktů MICA-Srt a antiCD20-l-MICA-Srt.

	MICA-Srt	antiCD20-l-MICA-Srt
Výsledný produkční objem (ml)	400	200
Desetinový objem pro tranzientní transfekci (ml)	40	20
	$V_{\text{ExCELL293}}$ (ml)	34
	$V_{\text{transfekční směs}}$ (ml)	6
	DNA produkčního plazmidu (μl)	379
	pTW5_p27 (μl)	216
	pTW5_aFGF (μl)	3,3
	$V_{\text{ExCELL293}}$ (ml)	5,4
V_{IPEI} (ml)	0,32 (poměr DNA:IPEI 1:4)	0,12 (poměr DNA:IPEI 1:3)
V_{VPA} (ml)	1,6	0,8
V_{ATB} (ml)	4	2

Vzorky byly inkubovány 2 hod na třepače při 37 °C, 5 % nasycení CO₂ a 135 ot./min. Po inkubaci byly vzorky doplněny médiem ExCELL293 na požadovaný celkový objem, bylo přidáno takové množství kyseliny valproové (zásobní koncentrace 0,5 M), aby výsledná koncentrace byla 2 mM, odpovídající množství směsi 100× koncentrovaného zásobního roztoku antibiotik (streptomycin a penicilin). Poté byly buněčné kultury ponechány v inkubátoru na třepače při 37 °C, 5 % nasycení CO₂ a 135 ot./min.

4.2.3 Purifikace proteinů

Expresní plazmidy, které byly využity k tranzientní transfekci proteinových konstruktů obsahují ve svojí nukleotidové sekvenci sekreční signál. Díky tomu byly produkováné proteiny buňkami sekretovány do média. Buněčné kultury byly sklizeny šestý den po transfekci a následně centrifugovány 30 min při 20000× g. Supernatant byl zfiltrován před 0,22 μm filtr a naředěn PBS puforem 1:1. Produkováné proteiny byly poté z takto připravených vzorků izolovány.

4.2.4 Chelatační afinitní chromatografie

Vyrobené proteiny obsahují ve svojí sekvenci histidinovou kotvu. K jejich izolaci ze směsi lze využít chelatační afinitní chromatografii. V tomto případě byla využita kolona obsahující chromatografický nosič Ni-NTA Excel s chelátovanými ionty niklu. Kolona byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic.

Nejdřív byla kolona promyta takovým množstvím 20 % EtOH, aby jeho objem přibližně odpovídal pětinasobku objemu kolony. Následně byla kolona ekvilibrována PBS pufrem při průtoku 5 ml/min. Na kolonu byl nanesen vzorek proteinu a poté byla kolona promyta PBS pufrem při stejném průtoku. Eluce proteinu byla provedena ve dvou etapách. Nejdřív byla provedena preeluce s využitím PBS pufru obsahujícím 20 mM imidazol. Pro samotnou eluci byl použit PBS pufr obsahující 250 mM imidazol a eluce proběhla při průtoku 0,5 ml/min. Po odebrání eluátu obsahujícího protein byla kolona promyta PBS pufrem při průtoku 5 ml/min a uchována v 20 % EtOH.

4.2.5 Koncentrování proteinů

Eluát byl koncentrován pomocí koncentrátorů Amicon Ultra (MWCO 10000). Vzorek byl pipetován do koncentrátoru a centrifugován 10 min při 4000× g. Centrifugace byla zopakována dokud nebylo celé množství eluátu nanášeno na koncentrátor a výsledný objem vzorku nedosáhl 250-500 µl. Získaný vzorek byl přenesen do mikrozkušavky a centrifugován při 20000× g 10 min.

4.2.6 Gelová permeační chromatografie

Pro přečištění vzorku proteinu byla provedena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL, která byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic. Nejdřív byla kolona ekvilibrována pufrem HEPES při průtoku 0,6 ml/min. Nástřiková smyčka byla promyta 5 ml pufru HEPES. Zkoncentrovaný vzorek proteinu byl nanesen na kolonu pomocí injekční stříkačky Hamilton. Chromatografie proběhla při průtokové rychlosti 0,5 ml/min. Protein detekovaný pomocí měření absorbance při 280 nm byl jímán automatickým sběračem po 1 ml frakcích.

Koncentrace jednotlivých frakcí byla změřena na spektrofotometru DS-11+ při 280 nm. Pro výpočet koncentrace byl využit teoretický extinkční koeficient a molekulová hmotnost proteinu, které byly vypočteny na základě aminokyselinové sekvence pomocí nástroje ProtParam (dostupné online <https://web.expasy.org/protparam/>).

4.2.7 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Za účelem kontroly čistoty získaných frakcí byla provedena elektroforéza v uvedena množství chemikálií potřebná pro přípravu dvou 12,5 % rozdělovacích gelů a zaostřovacích gelů.

Tabulka 10: Chemikálie potřebné pro přípravu dvou 12,5 % rozdělovacích a zaostřovacích gelů.

	12,5 % rozdělovací gel	zaostřovací gel
dH ₂ O	2,53 ml	2,1 ml
AA	3,36 ml	0,75 ml
TRIS	2 ml (TRIS 8,8)	0,375 ml (TRIS 6,8)
SDS	80 µl	30 µl
TEMED	4 µl	4 µl
APS	80 µl	30 µl

Rozdělovací gel o tloušťce 0,75 mm byl pipetován mezi dvě sklíčka a převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí gelu byla voda slita a na povrch rozdělovacího gelu byl pipetován zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřeben. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl gel vložen do předem připravené aparatury pro elektroforézu, která byla naplněna elektrodoým pufrem. Hřeben byl vyjmut ze zaostřovacího gelu a do jamek byly pipetovány předem připravené vzorky proteinu a 5 µl standardu Spectra Multicolor. Vzorky byly připraveny tak, že každý obsahoval 1-3 µg proteinu a bylo přidáno takové množství redukujícího pufru, aby byl 1× koncentrovaný. Vzorky pak byly 10 min inkubovány v termobloku při 95 °C a krátce centrifugovány při 20000× g. Elektroforéza probíhala 50 min při napětí 180 V. Gely byly obarveny pomocí barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Následující den byl gel odbarven a vyfocen pomocí zobrazovacího zařízení Alliance Q9.

4.3 Ověření aktivity sortasy A

4.3.1 Příprava reakční směsi

Během této práce byly využity reakční podmínky a molární poměr proteinových substrátů a enzymu, které byly již dříve optimalizovány MSc. Shivou Nejadebrahim. Pro provedení reakce s cílem ověření transpeptidasové aktivity sortasy A tak byl zvolen molární poměr reaktantů 1:1:5 protein-LPETG : enzym SrtA : GGGK-TAMRA, při čemž reakční

směs musela obsahovat 5 µg proteinu značeného signální značkou pro rozpoznání sortasou. V tabulce 11 jsou uvedeny vypočtené objemy jednotlivých složek reakční směsi.

Tabulka 11: Složení reakčních směsí pro reakce katalyzované sortasou A.

	MICA	SrtA	TAMRA	CLM	SrtA	TAMRA
n (mol)	1	1	5	1	1	5
c (µg/µl)	2,7	0,897		1,239	0,897	
M (Da)	33495	17700	729,88	47264	17700	729,88
V (µl)	1,85	2,95	3,73	4,04	2,09	2,64

Zásobní roztok fluorescenční značky GGGK-TAMRA o koncentraci 10 mM byl poskytnut Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D. Roztok byl před použitím naředěn na pracovní koncentraci 200 µM. Do mikrozkušavek bylo pipetováno potřebné množství reaktantů, které bylo doplněno HEPES pufrům na celkový objem 10 µl. Reakční směsi byly inkubovány při 4 °C přes noc.

4.3.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Příprava gelu a aparatury pro elektroforézu byla provedena stejným způsobem, jak je popsáno v odstavci 4.2.7. Vzorky proteinů a enzymu pro kontrolu byly připraveny tak, že každý obsahoval 5 µg proteinu a bylo přidáno takové množství redukujícího či neredukujícího pufru, aby byl 1× koncentrovaný. Vzorky byly inkubovány 10 min v termobloku při 95 °C a krátce centrifugovány při 20000× g. Kontrolní vzorky byly na gel aplikovány v takovém objemu, aby na gel bylo naneseno 5 µg proteinů. Vzorky obsahující produkt ligační reakce byly naneseny na gel v celém objemu. Elektroforéza probíhala při napětí 180 V po dobu asi 60-80 min, dokud veškerý vzorkový pufr nevyputoval z gelu. Připravené vzorky a standard molekulových hmotností Spectra Multicolor byly naneseny do jamek v gelu v pořadí uvedeném v tabulce 12.

Tabulka 12: Pořadí aplikovaných na gel vzorků.

Standard Spectra Multicolor	Srt A neredukující	Protein-LPETG neredukující	Reakční směs neredukující	×	×	Srt A redukující	Protein-LPETG redukující	Reakční směs redukující
-----------------------------	--------------------	----------------------------	---------------------------	---	---	------------------	--------------------------	-------------------------

Následně byly gely zafixovány v odbarvujícím roztoku (doba inkubace 5 min). Po změření fluorescenční odezvy pomocí laserového skeneru Typhoon FLA 7000 byly gely

nabarveny pomocí barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Následující den byly gely odbarveny a vyfoceny pomocí zobrazovacího zařízení Alliance Q9.

4.3.3 Zobrazení fluorescenčního značení proteinových konstruktů

5-Karboxytetramethylrhodamin neboli TAMRA se využívá k označení nukleových kyselin, peptidů a proteinů. Značka TAMRA má excitační maximum při 552 nm a emituje fluorescenční záření s maximem v 578 nm. V této práci byla využita modifikovaná varianta fluorescenční značky, která se skládá z oligopeptidu GGGK a samotné fluorescenční značky TAMRA. Polyglycinový motiv zajišťuje, že TAMRA se stává substrátem pro ligační reakci katalyzovanou transpeptidasou sortasou A. Zachycení fluorescenčního signálu ligačního produktu bylo uskutečněno pomocí laserového skeneru Typhoon FLA 7000 (laboratoř 004 chemické sekce PŘF UK). Pro excitaci bylo využito záření o vlnové délce 532 nm.

4.4 Kvantifikace účinnosti značení pomocí enzymu sortasy

4.4.1 Příprava reakcí a izolace proteinů z reakčních směsí

Za účelem stanovení účinnosti reakce sortasy A byly připraveny dvě reakční směsi se stejným molárním poměrem reaktantů, ale s větším množstvím proteinů. Do každé reakční směsi bylo přidáno 100 μg proteinů. V tabulce 13 jsou uvedeny vypočtené objemy jednotlivých složek reakční směsi.

Tabulka 13: Složení reakčních směsí pro reakce katalyzované sortasou A.

	MICA	SrtA	TAMRA	CLM	SrtA	TAMRA
n (mol)	1	1	5	1	1	5
c ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2,7	0,897		1,239	0,897	
M (Da)	33495	17700	729,88	47264	17700	729,88
V (μl)	37,04	58,91	74,64	80,71	52,89	52,89

Na celkový objem 200 μl byly reakční směsi doplněny HEPES puforem. Reakce byly jinak připraveny stejným způsobem, jak je popsáno v odstavci 4.3.2. Reakční směsi byly inkubovány při 4 $^{\circ}\text{C}$ přes noc. Následující den byly proteiny odděleny z reakční směsi pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL, která byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic. Nejdříve byla kolona při průtoku 0,6 ml/min ekvilibrována HEPES puforem. Nástřiková smyčka byla promyta 5 ml HEPES

pufu. Reakční směsi byly naneseny na kolonu pomocí injekční stříkačky Hamilton. Chromatografie proběhla při průtokové rychlosti 0,75 ml/min. Proteiny detekované pomocí měření absorpance při 280 nm byly jímány do mikrozkušavek po 1 ml frakcích.

4.4.2 Stanovení míry značení proteinů

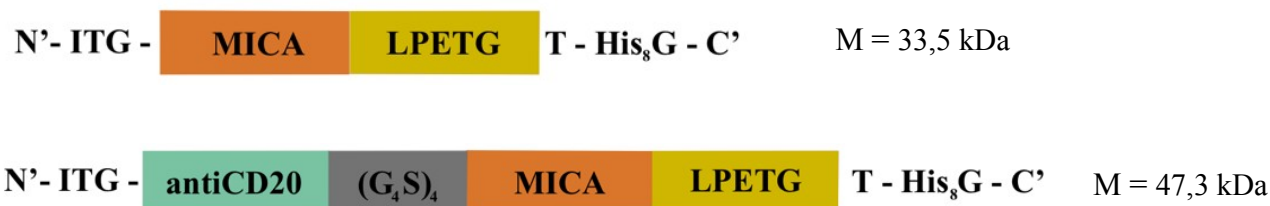
V získaných frakcích proteinů byla změřena absorpance na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS při vlnových délkách 552 nm (excitační maximum fluorescenční značky TAMRA) a 280 nm (absorpční maximum proteinů) v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Jako reference byl využit HEPES pufu. Na základě zjištěných hodnot absorpance, teoretických extinkčních koeficientů proteinů a značky TAMRA byl vypočten tzv. DOL (z anglického „degree of labelling“, neboli míra značení) pro každou reakci.

Teoretický extinkční koeficient značky TAMRA pro 280 nm, který byl využit při výpočtu DOL, byl zjištěn experimentálně. Na přípravu vzorků na měření byl využit předem připravený pracovní roztok GGGK-TAMRA o koncentraci 200 μ M. Ředěním výchozího pracovního vzorku 32 \times a 100 \times byly připraveny vzorky na měření absorpance GGGK-TAMRA o známých koncentracích. Na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS byla poté změřena jejich absorpance v oblasti UV-VIS v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Ze získaných hodnot byl vypočten extinkční koeficient GGGK-TAMRA pro 280 nm.

5 Výsledky

5.1 Příprava rekombinantních vektorů

Jedním z cílů této práce byla příprava expresních vektorů pro konstrukty označené signální sekvencí pro transpeptidasu sortasu A. První připravovaný konstrukt je tvořen z ligandu pro aktivační receptor NK buněk NKG2D, nádorového proteinu MICA se signální sekvencí pro sortasu A. Druhý konstrukt obsahuje navíc ve své struktuře antiCD20 VHH nanoprotilátku. Ligand MICA a nanoprotilátka jsou propojeny pomocí glycin-serinové spojky. Teoretické molekulové hmotností byly vypočteny pomocí on-line nástroje ProtParam. Na obrázku 12 je ukázáno schematické znázornění kýžených rekombinantních proteinů a jejich předpokládané molekulové hmotnosti.



Obrázek 12: Schematické znázornění připravovaných proteinů s krátkým popisem jejich jednotlivých součástí: MICA - aktivační ligand pro NKG2D receptor NK buněk, antiCD20 - nanoprotilátka proti CD20 receptoru B lymfocytů, LPETG - sekvence aminokyselin, kterou rozpoznává sortasa A, His₈G - histidinová kotva tvořená 8 histidinovými zbytky, ukončená glycinem

V aminokyselinové sekvenci každého proteinového konstruktu je na jeho N-konci přítomna signální sekvence, díky které jsou proteiny sekretovány do média. Signální sekvence je při tomto procesu buňkou odštěpena, na N-konci výsledného proteinu však zůstanou tři aminokyseliny ITG. Každý protein má také na svém C-konci histidinovou kotvu zakončenou glycinem, což umožňuje izolaci proteinů z média pomocí chelatační afinitní chromatografie. Na obrázku 13 na následující straně jsou uvedeny aminokyselinové sekvence obou proteinů, které jsou předmětem této bakalářské práce.

N^o - ITG- antiCD20-linker-MICA-Srt_kotva-GTHHHHHHHHG-C'

I

TGMAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGISFSASVMGWYRQAPGKQRELVAYITSGGSTNFADS
VKGRFTISRDNKNTMYLQMNLSKAEDTGVYFCNRPGREISWGQGTQVTVSSGRGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRACKPQGQWAEDVLGNKT
WDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLET
EEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTPPMVNVTIR
SEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVLSHDTQQWGDVLPDGNGT YQTWVATRICQGEEQR
FTCYMEHSGNHS THPVPSGKLPETGTHHHHHHHHG

N^o - ITG -MICA-Srt_kotva-GTHHHHHHHHG-C'

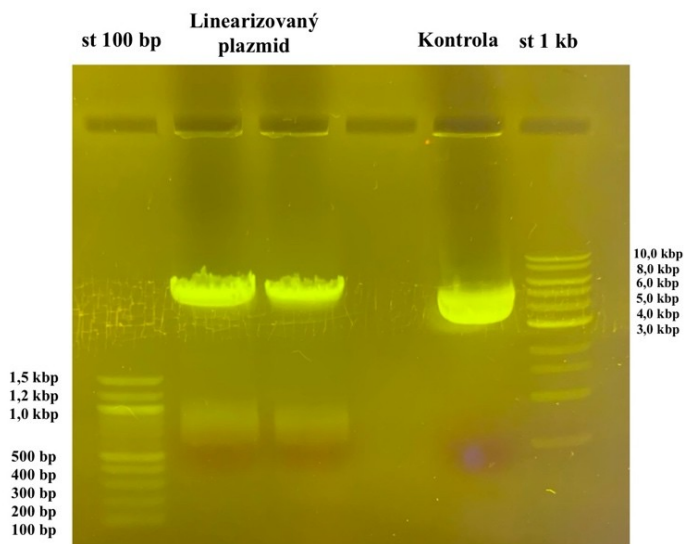
I

TGEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRACKPQGQWAEDVLGNKTWDRETR
DLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNLETEEWTMP
QSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTPPMVNVTIRSEASEG
NITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVLSHDTQQWGDVLPDGNGT YQTWVATRICQGEEQRFTCYME
HSGNHS THPVPSGKLPETGTHHHHHHHHG

Obrázek 13: Připravované proteinové konstrukty a příslušné aminokyselinové sekvence. Modrou barvou jsou vyznačena predikovaná místa N-glykosylace, izoleucin (vyznačený zeleně) je pozůstatek sekrečního signálu, TG je zbytek štěpícího místa pro restrikční endonukleasu AgeI-HF (vyznačeno oranžově), GT je zbytek štěpícího místa pro restrikční endonukleasu KpnI-HF (vyznačeno červeně). Histidinová kotva ukončená glycinem je vyznačena fialově. Žlutě je zvýrazněna signální sekvence rozpoznávaná sortasou A. Šedě je vyznačena glycin-serinová spojka.

5.1.1 Linearizace plazmidu

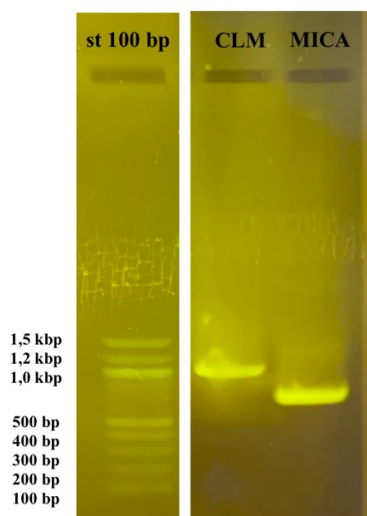
Plazmid pTW5sec_B7-H6_2 využitý k vložení genů obou připravovaných proteinů byl poskytnut Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D. Plazmid pTW5sec_B7-H6_2 byl restrikčně štěpen pomocí endonukleas AgeI-HF a KpnI-HF. Linearizovaný plazmid a inzert B7-H6_2 byly poté od sebe odděleny pomocí agarosové elektroforézy v 0,75 % gelu. Jako kontrola při elektroforéze byl využit neštěpený plazmid pTW5sec_B7-H6_2. Výsledky elektroforézy jsou uvedeny na obrázku 14 na straně 48. Linearizovaný plazmid byl pak izolován z gelu a byla změřena jeho koncentrace (tabulka 6, strana 35).



Obrázek 14: Výsledek agarosové elektroforézy po štěpení plazmidu pTW5sec_B7-H6_2. Elektroforéza v 0,75 % gelu probíhala po dobu 20 min při napětí 180 V. Pořadí vzorků nanesených na gel: standard molekulových hmotností (100 bp), linearizovaný plazmid pTW5sec_B7-H6_2 (k 50 μ l vzorku bylo přidáno 10 μ l 6 \times koncentrovaného vzorkového pufru; při nanášení na gel byl celkový objem rozdělen do dvou drah po 30 μ l), kontrolní vzorek neštěpeného plazmidu, a standard molekulových hmotností (1 kb).

5.1.2 Příprava inzertů DNA

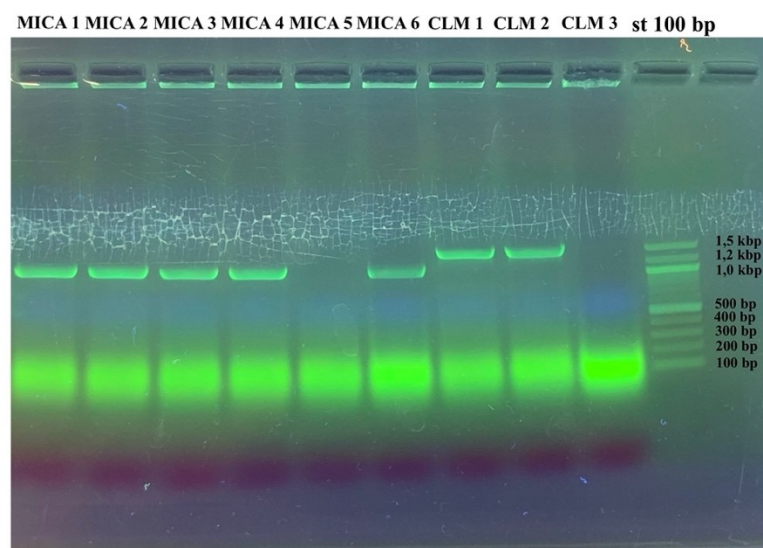
Inzerty DNA byly amplifikovány pomocí PCR. První kóduje protein skládající se z ligandu MICA a peptidové signální sekce pro sortasu A, druhý kóduje fúzní protein obsahující antiCD20 nanoprotílátku, glycin-serinovou spojku, ligand MICA a signální sekce pro sortasu A. Při amplifikaci byly použity takové primery, které zároveň vytvořily vhodné přesahy pro následující InFusion reakci. Produkty PCR byly děleny pomocí agarosové elektroforézy v 0,75 % gelu. Výsledky elektroforézy jsou uvedeny na obrázku 15. Inzerty byly poté izolovány z gelu a byla změřena jejich koncentrace (tabulka 6, strana 35).



Obrázek 15: Výsledek agarosové elektroforézy produktů PCR amplifikace DNA inzertů. Elektroforéza v 0,75 % gelu probíhala po dobu 20 min při napětí 180 V. Pořadí vzorků nanesených na gel: standard molekulových hmotností (100 bp), DNA inzert kódující fúzní protein aCD20_1_MICA_Srt (očekávaná velikost 1296 bp), DNA inzert kódující protein MICA-Srt (očekávaná velikost 882 bp).

5.1.3 PCR z kolonií a nízkobjemová produkce plazmidové DNA

Pro spojení amplifikovaných inzertů konstruktů MICA-Srt a antiCD20_1_MICA-Srt a linearizovaného plazmidového vektoru pTW5sec byla využita InFusion reakce. Byla provedena transformace bakterií, jako selekční marker byl využit ampicilin. Následující den byly odebrány vzorky z každé kolonie a pomocí PCR byla provedena kontrola délky vložených konstruktů. Produkty reakce pak byly děleny pomocí agarosové elektroforézy v 1 % gelu (obrázek 16).



Obrázek 16: Výsledek agarosové elektroforézy produktů PCR z kolonií. Elektroforéza v 1 % gelu probíhala po dobu 20 min při napětí 180 V. Pořadí vzorků nanesených na gel: šest vzorků z kolonií pro konstrukt MICA-Srt (očekávaná velikost PCR produktu 1296 bp), tři vzorky z kolonií pro konstrukt antiCD20_1_MICA-Srt (očekávaná velikost PCR produktu 882 bp) a standard molekulových hmotností (100 bp).

Pro nízkobjemovou produkci plazmidové DNA byl odebrán materiál z kolonií M1, M2 a C1. Každý vzorek byl inkubován v 5 ml živného media s přidáním ampicilinem, následující den byla z narostlých bakteriálních kultur izolována plazmidová DNA. V tabulce 14 je uvedena změřená koncentrace.

Tabulka 14: Koncentrace plazmidové DNA z nízkobjemové produkce.

Plazmidová DNA	Koncentrace vzorku (ng/μl)
pTW5sec_MICA-Srt (vzorek M1)	126,00
pTW5sec_MICA-Srt (vzorek M2)	154,85
pTW5sec_aCD20_1_MICA-Srt (vzorek C1)	58,72

5.1.4 Velkoobjemová produkce plazmidové DNA

Za využití plazmidové DNA vzorků M1 a C1 byla následně provedena velkoobjemová produkce DNA v 500 ml LB media s ampicilinem. V tabulce 15 je uvedena změřená koncentrace.

Tabulka 15: Koncentrace plazmidové DNA z velkoobjemové produkce.

Plazmidová DNA	Koncentrace vzorku (mg/ml)
pTW5sec_MICA-Srt (vzorek M1)	1,86
pTW5sec_aCD20_1_MICA-Srt (vzorek C1)	2,12

5.2 Produkce proteinů

Plazmidy získané po velkoobjemové produkci byly využity na transfekci buněčné linie HEK293T, která dokáže produkovat potřebné proteiny. Proteiny mají na svém N-konci signální sekvenci, díky čemuž jsou exprimovány do média. Sklizení buněk probíhalo na šestý den po transfekci. Buněčné suspenze byly centrifugovány, supernatant obsahující produkováný protein byl zfiltrován a dvakrát zředěn PBS puforem. Nejdříve byla provedena chelatační afinitní chromatografie, získané vzorky pak byly zkoncentrovány a následně přečištěny pomocí gelové permeační chromatografie.

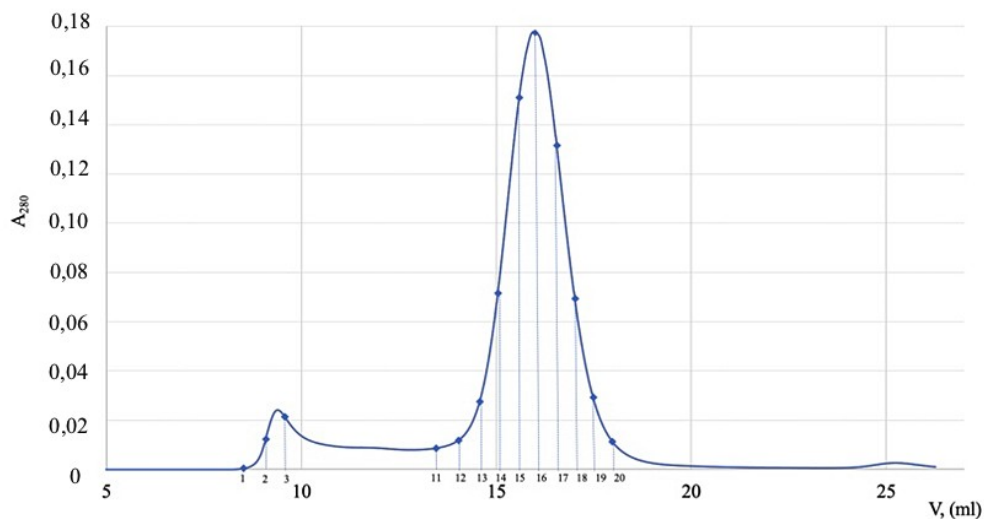
5.2.1 Gelové permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla provedena na koloně Superdex 200 10/300 GL, s průtokem mobilní fáze 0,6 ml/min. Frakce, v kterých byl přítomen cílový protein, byly sbírány automatickým sběračem dle průběhu absorbance při 280 nm, který je znázorněn na následující straně pro oba produkováné proteiny (obrázek 16 a 17, strana 51).

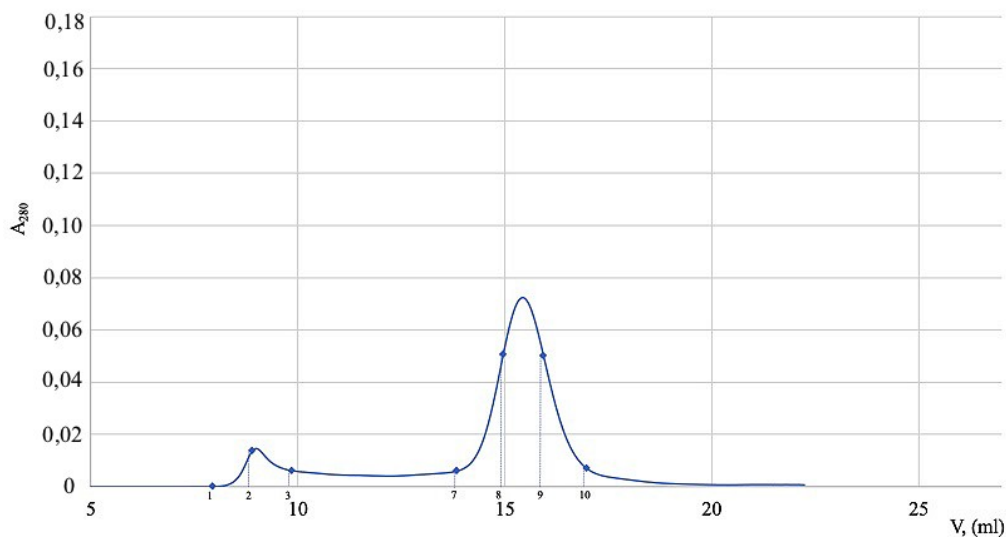
Na chromatogramech je vidět dva elučních píky. První v objemu 8-10 ml se nachází téměř v mrtvém objemu kolony a pravděpodobně odpovídá agregovaným molekulám proteinů. Druhý, hlavní pík při 15 ml pak odpovídá kýženým proteinům v nativním stavu. Eluované frakce odpovídající obou píkům byly odebrány (vyznačeno na chromatogramech, obrázek 16 a 17, strana 51), poté byla změřena koncentrace proteinů v těchto frakcích a pomocí SDS-PAGE bylo zkontrolováno, jestli je v těchto frakcích přítomen potřebný produkováný protein a byla zkontrolována čistota frakcí.

Při porovnání obou chromatogramů, které mají stejné měřítko absorbance při 280 nm, je vidět rozdílnou účinnost produkce jednotlivých proteinových konstruktů buňkami

HEK293T (byť je třeba zvážit, že produkční objem média pro konstrukt aCD20_1_MICA-Srt byl poloviční oproti proteinu MICA-Srt).



Obrázek 16: Eluční chromatogram proteinového konstruktu MICA-Srt. Modrou čarou je zobrazen průběh eluce. Svislými čárkovanými čarami jsou zobrazeny frakce proteinu (objem jednotlivé frakce – 0,5 ml), v kterých byla následně při 280 nm změřena koncentrace proteinu.



Obrázek 17: Eluční chromatogram proteinového konstruktu aCD20_1_MICA-Srt. Modrou čarou je zobrazen průběh eluce. Svislými čárkovanými čarami jsou zobrazeny frakce proteinu (objem jednotlivé frakce – 1 ml), v kterých byla následně při 280 nm změřena koncentrace proteinu.

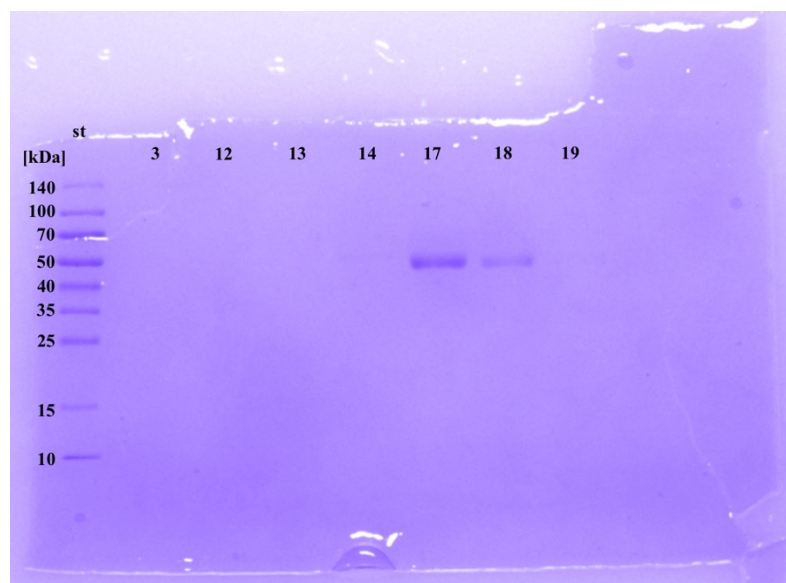
5.2.2 Výtěžek produkce proteinů

Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích odebraných během gelové permeační chromatografie byla změřena při 280 nm na spektrofotometru DS-11+. Absorbance vzorků byla změřena oproti pufru HEPES, který byl využit jako mobilní fáze při gelové permeační chromatografii. Teoretický extinkční koeficient a molekulová hmotnost proteinů byly vypočteny na základě aminokyselinové sekvence pomocí online nástroje ProtParam. Celkové výtěžky jednotlivých proteinů s příslušnými produkčními objemy a výtěžky přepočítané na litr média jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Výtěžky purifikovaných proteinů.

Protein	Získané množství (mg)	Produkční objem (ml)	Množství proteinu v litru média (mg)
MICA-Srt	2,042	400	5,105
antiCD20_1_MICA-Srt	0,495	200	2,475

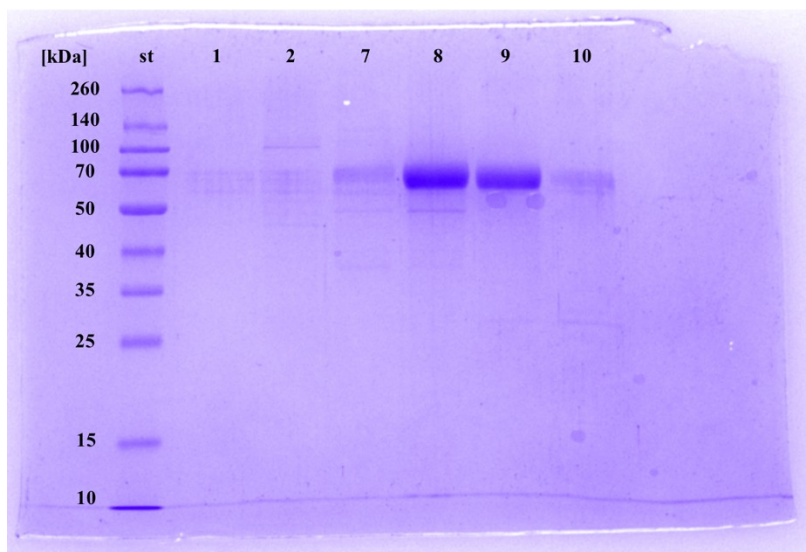
Čistota získaných frakcí byla zkontrolována pomocí elektroforézy v 12,5 % polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného, SDS-PAGE. Množství proteinu naneseného na gel činilo 1-3 µg, ke každému vzorku bylo přidáno potřebné množství 5× koncentrovaného redukujícího pufru. Výsledky elektroforézy v 12,5 % polyakrylamidovém gelu v redukujícím prostředí jsou uvedeny na obrázku 18 a 19 na straně 52-53.



Obrázek 18: SDS-PAGE vybraných frakcí proteinového konstruktu MICA-Srt.

Elektroforéza v 12,5% redukujícím polyakrylamidovém gelu probíhala po dobu 50 min při napětí 180 V. Pořadí vzorků ukázaných na gelu: st – standard molekulových hmotností, frakce 3, 12, 13, 14, 17, 18, 19.

Teoretická molekulová hmotnost bez glykosylace - 33,5 kDa.



Obrázek 19: SDS-PAGE vybraných frakcí proteinového konstruktu aCD20_1_MICA-Srt.

Elektroforéza v 12,5 % redukujícím polyakrylamidovém gelu probíhala po dobu 50 min při napětí 180 V. Pořadí vzorků ukázaných na gelu: st – standard molekulových hmotností a frakce 1, 2, 7, 8, 9, 10.

Teoretická molekulová hmotnost bez glykosylace - 47,3 kDa.

5.3 Ověření aktivity sortasy A

Enzym sortasa A rozpoznává signální sekvenci LPETG na C-terminálním konci jednoho z reakčních partnerů a polyglycinovou sekvenci na N-konci druhého. Po rozštěpení peptidové vazby mezi threoninovým a glycinovým zbytkem v sekvenci LPETG vytvoří sortasa novou kovalentní vazbu mezi vzniklým LPET-zbytkem a glycinem z polyglycinové sekvence druhého proteinu.

V rámci této bakalářské práce byly připraveny dva proteinové konstrukty nesoucí v sobě signální sekvenci LPETG. Jako druhý substrát pro transpeptidasovou reakci byl zvolen fluorescenčně značený peptid GGGK-TAMRA, který má excitační maximum kolem 552 nm.

Nejdříve byly vybrané frakce získané po gelové permeační chromatografii opakovaně zkoncentrovány na koncentraci vhodnou pro provedení reakce (tabulka 17).

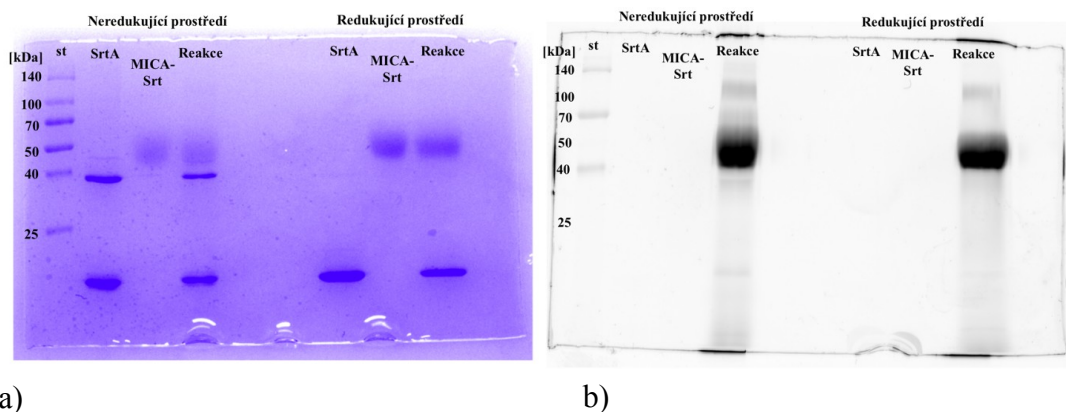
Tabulka 17: Přehled frakcí proteinů vybraných ke zkoncentrování a výsledné koncentrace získaných vzorků. Koncentrace byla změřena na spektrofotometru DS-11+ při 280 nm.

Protein	Frakce	Výsledná koncentrace ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
MICA-Srt	15-18	2,7
antiCD20_1_MICA-Srt	7-10	1,4

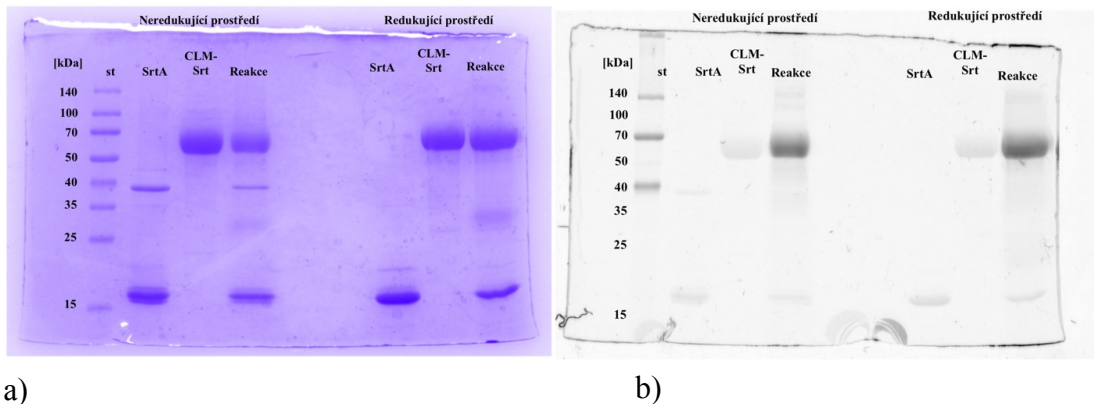
Reakce byly provedeny s molárním poměrem protein-LPETG : sortasa A : GGGK-TAMRA 1 : 1 : 5. Do mikrozkuvek bylo pipetováno potřebné množství složek reakce a

celkový objem byl doplněn na 10 μ l HEPES pufr. Reakce byly inkubovány přes noc v lednici při 4 $^{\circ}$ C. Následující den byla provedena elektroforéza v 12,5 % polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného, v neredukujícím a redukujícím prostředí (obrázek 20a a 21a na straně 54-55). Množství proteinu naneseného na gel činilo 5 μ g; ke každému vzorku bylo přidáno potřebné množství 5 \times koncentrovaného neredukujícího či redukujícího pufru. Na gel bylo aplikováno celé množství reakční směsi. Elektroforéza probíhala tak dlouho, pokud vzorkový pufr a značka GGGK-TAMRA nespotřebovaná během reakce neprošly celým gelem.

Nejdřív byl gel fixován pomocí odbarvovacího roztoku a vyfocen pomocí laserového skeneru Typhoon FLA 7000. Pomocí skeneru byla zachycena fluorescence emitovaná značkou TAMRA. K excitaci fluorescenční značky byla využita metoda Cyp3, která byla založena v ovládacím programu Typhoon FLA 7000. Při této metodě se využívá excitační záření o vlnové délce 532 nm, což byla hodnota nejbližší k excitačnímu maximu značky TAMRA. Odezva fluorescenčně označených proteinů je znázorněna na obrázku 20b a 21b na straně 54-55.



Obrázek 20: Ověření aktivity sortasy A pro MICA-Srt. Elektroforéza v 12,5 % polyakrylamidovém gelu probíhala přibližně po dobu 80 min při napětí 180 V. Pořadí nanesených vzorků: st - standard molekulových hmotností, SrtA - sortasa A, protein MICA-Srt (MICA-LPETG), reakční směs MICA-LPETG + SrtA + GGGK-TAMRA, vzorky v neredukujícím prostředí vlevo, v redukujícím vpravo. a) Gel obarvený modří Coomassie Brilliant Blue R-250. b) Obrázek zachycující fluorescenční signál značky TAMRA z proteinového konstrukt MICA-Srt označeného značkou GGGK-TAMRA.



a)

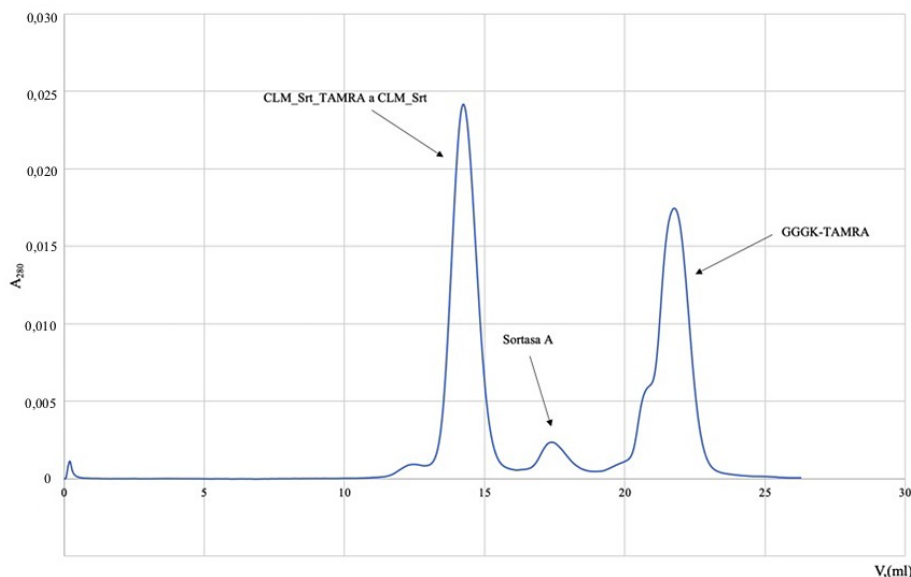
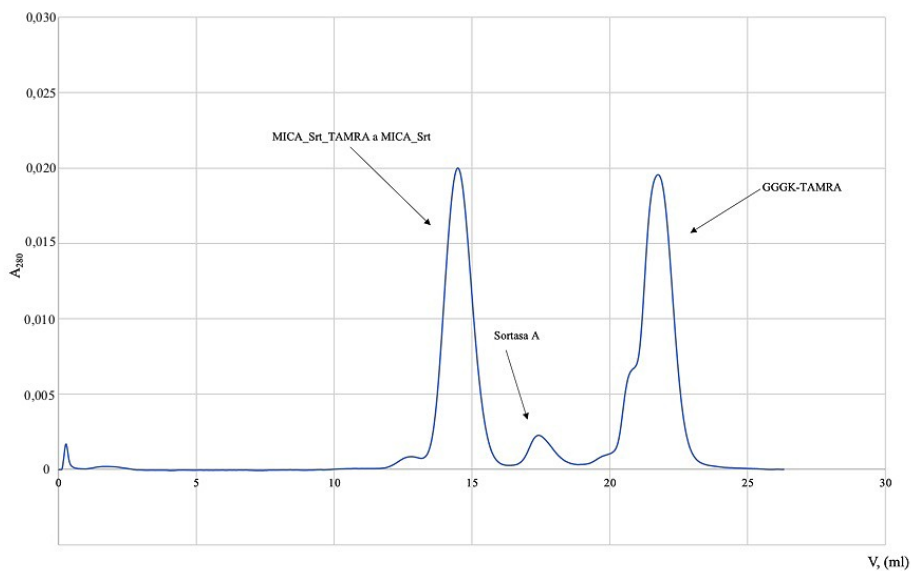
b)

Obrázek 21: Ověření aktivity sortasy A pro antiCD20_1_MICA-Srt. Elektroforéza v 12,5 % polyakrylamidovém gelu probíhala přibližně po dobu 80 min při napětí 180 V. Pořadí nanesených vzorků: st - standard molekulových hmotností, SrtA – sortasa A, fúzní protein antiCD20_1_MICA-Srt (CLM-LPETG), reakční směs CLM-LPETG + SrtA + GGGK-TAMRA, vzorky v neredukujícím prostředí vlevo, v redukujícím vpravo. a) Gel obarvený modří Coomassie Brilliant Blue R-250. b) Obrázek zachycující fluorescenční signál značky TAMRA z proteinového konstruktu CLM-LPETG označeného značkou GGGK-TAMRA.

5.4 Kvantifikace účinnosti značení pomocí sortasy A

Účinnost značení proteinů byla vyjádřena pomocí DOL (z anglického degree of labelling = míra značení). Obecně DOL vyjadřuje, kolik značek je navázáno na protein. V případě mnou připravených proteinů k nim může být sortasou A připojena pouze jedna značka. To znamená, pokud $DOL = 1$, všechny proteiny byly označeny. Pokud je vypočtené číslo menší než 1, jisté množství proteinů zůstalo neoznačeno.

Proteiny nejdřív byly odděleny od sortasy a volné značky TAMRA pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL při průtoku mobilní fáze 0,75 ml/min. Na obrázku 22a) a 22b) na straně 56 je znázorněn průběh separace složek pro každou reakci.



Obrázek 22: a) Eluční chromatogram reakční směsi MICA-Srt + SrtA + GGGK-TAMRA. Modrou čarou je zobrazen průběh eluce jako absorbance při 280 nm. Černými šipkami jsou ukázány separované složky reakce: proteinový konstrukt, enzym a volná značka. První pík odpovídá elučnímu objemu proteinu MICA-Srt a jeho verzi značené TAMRA.

b) Eluční chromatogram reakční směsi CLM-Srt + SrtA + GGGK-TAMRA. Modrou čarou je zobrazen průběh eluce jako absorbance při 280 nm. Černými šipkami jsou ukázány separované složky reakce: proteinový konstrukt, enzym a volná značka. První pík odpovídá elučnímu objemu proteinu CLM-Srt a jeho verzi značené TAMRA.

Na chromatogramech je vidět tři rozdílné píky. To napovídá, že díky dostatečně rozdílné molekulové hmotnosti byly proteiny dobře separovány.

5.4.1 Výpočet stupně značení

V sebraných frakcích proteinů byla změřena absorbance na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS v rozsahu vlnových délek 200-800 nm v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. V tabulce 18 jsou shrnuty naměřené absorbance při 280 nm (oblast absorbance

proteinů) a 552 nm (excitační maximum fluorescenční značky TAMRA), příslušné extinkční koeficienty pro různé vlnové délky a vypočtené koncentrace.

Tabulka 18: Přehled naměřených absorbancí při 280 nm a 552 nm.

	MICA_Srt_TAMRA	CLM_Srt_TAMRA	TAMRA volná ředění 33×	TAMRA volná ředění 100×
A ₂₈₀ , celková	0,13	0,12	0,19	0,06
A ₂₈₀ , protein	0,11	0,10	-	-
A ₅₅₂	0,05	0,04	0,54	0,14
ε ₂₈₀	56295	73380	31500	31500
ε ₅₅₂	-	-	90000	90000
c _{protein} , μM	2,01	1,45	-	-
c _{TAMRA} , μM	0,56	0,44	6	2

K hodnotě absorbance značeného proteinu při 280 nm přispívá hlavně protein, ale při 280 nm absorbuje i značka TAMRA (viz tabulka 18). Proto byl nejdříve vypočten příspěvek značky a ten byl pak odečten od celkové absorbance při 280 nm. Ze vzniklé hodnoty byla vypočtena koncentrace proteinu. Míra značení je pak vyjádřena jako poměr molární koncentrace fluorescenční značky vypočtené z absorbance při 552 ku molární koncentraci proteinu vypočtené z jeho absorbance při 280 nm (po odečtu příspěvku od samotné značky).

$$\text{DOL (MICA_Srt_TAMRA)} = 0,28$$

$$\text{DOL (CLM_Srt_TAMRA)} = 0,30$$

6 Diskuze

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala přípravě expresních vektorů a produkci dvou proteinových konstruktů, MICA-Srt a antiCD20_1_MICA-Srt. S využitím těchto proteinů jsem následně ověřila ligační aktivitu bakteriální transpeptidasy sortasy A.

Oba proteinové konstrukty obsahují ve své struktuře ligand pro aktivační NK buněčný receptor NKG2D, protein MICA, který se typicky vyskytuje na povrchu buněk jako signál poškození DNA nebo kvůli jiným příčinám vedoucím k maligní transformaci. Dále následuje sekvence z pěti aminokyselin LPETG, což je signální sekvence, kterou na cílovém proteinu rozpoznává sortasa A. Proteinový konstrukt antiCD20_1_MICA-Srt navíc na začátku obsahuje antiCD20 nanoprotilátku, cílicí na CD20 receptor na povrchu leukemických B lymfocytů. Protilátka proti CD20 receptoru B lymfocytů rituximab je již úspěšně využívána při léčení non-Hodgkinových lymfomů.

Druhý proteinový konstrukt je tak vlastně bispecifický fúzní protein, přičemž jeho jedna část přitahuje pozornost NK buněk a přispívá k jejich aktivaci (ligand MICA) a druhá část cílí na příslušný komplementární receptor na povrchu maligně transformované buňky. Takový fúzní protein má potenciál k využití při imunoterapeutickém přístupu k léčení rakoviny. A to tak, že by shromáždění bispecifických fúzních proteinů na jednom místě fungovalo jako jakýsi maják pro cytotoxické buňky imunitního systému pomocí amplifikace stresových signálů již přítomných na tumorové buňce. Navíc ne všechny nádorové buňky mají na svých površích přesně definované znaky upozorňující imunitní systém na poškození a kvůli tomu jsou v těle těžko rozpoznatelné. V tomto případě by bispecifický protein tvořený podobnými součástmi (MICA a antiCD20) dovolil buňkám imunitního systému odhalit nádorové buňky navzdory nepřítomnosti potřebných signálních molekul.

Vložení genů pro konstrukty obou kóžených proteinů do vhodného expresního plazmidu bylo provedeno v bakteriálním systému. Jelikož se ligand MICA za jistých okolností vyskytuje v lidském organismu a ve své struktuře obsahuje několik disulfidických můstků a sedm míst N-glykosylace, bakteriální systém není k rekombinantní produkci tohoto proteinu příliš vhodný. K expresi proteinových konstruktů byla proto využita lidská buněčná linie HEK293T, která dokáže poskytnout správnou glykosylaci i sbalení proteinů. Z chromatogramů lze také odvodit, že se oba proteinové konstrukty podařilo získat s relativně nízkým výtěžkem. V diplomové práci Denise Cmuta byly popsány výtěžky pro produkci proteinového konstruktu antiCD20_1_MICA. Výtěžek tohoto fúzního proteinu při produkčním objemu 100 ml činil 54 mg/l, což je 20× vyšší výtěžek než bylo

vyprodukováno proteinu antiCD20_1_MICA-Srt (výtěžek je uveden v tabulce 16 na stránce 52) [81].

Připravené fúzní konstrukty byly využity k ověření transpeptidasové aktivity sortasy A. Jako druhý substrát byl využit peptid obsahující na začátku sekvenci tři glycinů a lysinu, který je modifikován tak, že nese fluorescenční značku TAMRA. Reakce byly provedeny v molárním poměru protein : enzym : GGGK-TAMRA rovném 1:1:5. K zobrazení výsledků reakcí byla využita elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v redukujícím a neredučujícím prostředí (obrázek 20 a 21, strana 54-55). Na obrázku 20b) a 21b) je zachycena fluorescenční odezva poskytnutá značkou TAMRA. Na obou obrázcích v drahách označených jako „reakce“ je přítomen proužek v oblasti kolem 45 kDa pro konstrukt MICA-Srt, resp. 60 kDa pro konstrukt antiCD20_1_MICA-Srt, což prokazuje, že reakce proběhla a tyto proteiny díky transpeptidasové aktivitě sortasy A nyní nesou značku TAMRA. V případě potřeby by šlo značené proteiny z reakční směsi oddělit s pomocí chelatační afinitní chromatografie, neboť jak sortasa A, tak případné nezreagované výchozí proteiny nesou histidinovou kotvu, zatímco proteiny se značkou TAMRA ji již postrádají, neboť od nich byla odštěpena v průběhu transpeptidasové reakce.

Po ověření, že ligační reakce proběhla úspěšně, byla kvantifikována účinnost této reakce. Reakce byly provedeny ve stejném molárním poměru za stejných reakčních podmínek, ale s využitím většího množství výchozích proteinů. Složky reakční směsi byly následně rozděleny pomocí gelové permeační chromatografie. Na obrázku 22a) a 22b) na straně 56 jsou uvedeny chromatogramy zobrazující výsledky separace pro obě reakce. První pík na obou chromatogramech odpovídá směsi značeného a volného proteinu. Eluční objemy obou proteinových konstruktů odpovídají elučním objemům získaným během jejich purifikace (obrázek 16 a 17, strana 51). Druhý pík zřejmě odpovídá sortase A. Poslední pík odpovídá volnému peptidu se značkou TAMRA, který nebyl navázán na protein a do reakce byl přidán v nadbytku. Z chromatogramů je také patrné, že reaktanty využitě pro tuto ligační reakci se liší svou molekulovou hmotností natolik, aby došlo k jejich úplnému rozdělení pomocí gelové permeační chromatografie.

U frakcí obsahujících směs označených a volných proteinových konstruktů byla změřena absorbance při 280 nm (záření této vlnové délky absorbují primárně proteiny, ale k celkové absorbanci přispívá i značka TAMRA) a při 552 nm (při této vlnové délce absorbuje pouze značka TAMRA). Vzhledem k tomu, že připravované proteiny obsahují ve své struktuře pouze jednu signální sekvenci LPETG, mohou být sortasou označeny pouze jednou značkou TAMRA. Z vypočtených hodnot DOL („degree of labelling“ – míra značení) uvedených na straně 57 je vidět, jak velká část proteinů byla označena během reakce. Hodnota DOL pro fúzní protein antiCD20_1_MICA-Srt je mírně vyšší oproti

hodnotě DOL pro MICA-Srt, v obou případech však míra značení dosahuje jen zhruba 30 %. To sice pro transpeptidasovou reakci se sortasou A není nijak neobvyklý výsledek, přesto jsme i na základě předchozí práce a optimalizace provedené MSc. Shivou Nejadebrahim očekávali vyšší účinnost reakce. Pro lepší výtěžek značeného proteinu by tak zřejmě bylo zapotřebí použít do reakce vyšší množství sortasy či ještě vyšší molární přebytek značeného peptidu, resp. akceptoru nesoucího na svém N-konci polyglycinovou sekvenci. Nicméně i tak je zřejmé, že připravené proteiny a sortasu bude možné využít pro přípravu rozličných konjugátů, ať již s dalšími proteiny nebo např. polymerním nosičem.

7 Závěr

- Podařilo se připravit expresní vektory pro proteinové konstrukty MICA-Srt a antiCD20_1_ MICA-Srt
- Proteinové konstrukty byly produkovány v lidské buněčné linii HEK293T a úspěšně purifikovány
- Ligační aktivita transpeptidasy sortasy A byla ověřena provedením reakce s využitím připravených fúzních proteinů a fluorescenčně značeného peptidu GGGK-TAMRA
- Účinnost reakce pro oba proteiny dosáhla zhruba 30 %.

8 Literatura

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, I. Laversanne, A. Jemal, F. Bray, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, 71(3), str. 209–249, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] GBD 2019 Adolescent Young Adult Cancer Collaborators, “The global burden of adolescent and young adult cancer in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” *Lancet Oncol.*, 23(1), str. 27–52, 2022, doi: 10.1016/S1470-2045(21)00581-7.
- [3] P. A. Ascierio, B. Daniele, H. Hammers, V. Hirsh, J. Kim, L. Licitra, R. Nanda, . Pignata, “Perspectives in immunotherapy: meeting report from the ‘Immunotherapy Bridge’, Napoli, November 30th 2016,” *J. Transl. Med.*, 15(1), str. 205, 2017, doi: 10.1186/s12967-017-1309-2.
- [4] B. Zhou, J. Liu, M. Lin, J. Zhu, W. R. Chen, “Recent advances in immunotherapy, immunoadjuvant, and nanomaterial-based combination immunotherapy,” *Coord. Chem. Rev.*, 442, 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2021.214009.
- [5] I. M. Zraik, Y. Heß-Busch, “[Management of chemotherapy side effects and their long-term sequelae],” *Urol. Ausg A*, 60 (7), str. 862–871, 2021, doi: 10.1007/s00120-021-01569-7.
- [6] M. Abbott , Y. Ustoyev, “Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy,” *Semin. Oncol. Nurs.*, 35(5), 2019, doi: 10.1016/j.soncn.2019.08.002.
- [7] G. Lizée, W. W. Overwijk, L. Radvanyi, J. Gao, P. Sharma, P. Hwu, “Harnessing the power of the immune system to target cancer,” *Annu. Rev. Med.*, 64, str. 71–90, 2013, doi: 10.1146/annurev-med-112311-083918.
- [8] D. S. Chen, I. Mellman, “Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle,” *Immunity*, 39(1), str. 1–10, 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- [9] S. Preethy, V.D. Dedeepiya, R. Senthikumar, M. Rajmohan, R. Karthick, H. Terunuma, S.J.K Abraham, “Natural killer cells as a promising tool to tackle cancer —A review of sources, methodologies, and potentials,” *Int. Rev. Immunol.*, 36(4), str. 220–232, 2017, doi: 10.1080/08830185.2017.1284209.
- [10] G. Zhu, F. Zhang, Q. Ni, G. Niu, X. Chen, “Efficient Nanovaccine Delivery in Cancer Immunotherapy,” *ACS Nano*, 11(3), str. 2387–2392, 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b00978.
- [11] B. Mirlekar, Y. Pylayeva-Gupta, “IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy,” *Cancers*, 13(2), 2021, doi: 10.3390/cancers13020167.
- [12] J. Park, S.H. Wrzesinski, E. Stern, M. Look, J. Criscione, R. Ragheb, S.M. Jay, S.L. Demento, A. Agawu, P. Licona Limon, A.F. Ferrandino, D. Gonzalez, A. Habermann, R.A. Flavell, T.M. Fahmy, “Combination delivery of TGF- β inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy,” *Nat. Mater.*, 11(10), 2012, doi: 10.1038/nmat3355.
- [13] P. Sharma, J. P. Allison, “The future of immune checkpoint therapy,” *Science*, 348(6230) str. 56–61, 2015, doi: 10.1126/science.aaa8172.

- [14] S. A. Rosenberg, N. P. Restifo, J. C. Yang, R. A. Morgan, M. E. Dudley, “Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy,” *Nat. Rev. Cancer*, 8(4), 2008, doi: 10.1038/nrc2355.
- [15] C. H. June, R. S. O’Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, “CAR T cell immunotherapy for human cancer,” *Science*, 359(6382), str. 1361–1365, 2018, doi: 10.1126/science.aar6711.
- [16] A. Seth, M. B. Heo, Y. T. Lim, “Poly (γ -glutamic acid) based combination of water-insoluble paclitaxel and TLR7 agonist for chemo-immunotherapy,” *Biomaterials*, 35(27), str. 7992–8001, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.076.
- [17] S. R. Yoon, T.-D. Kim, I. Choi, “Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy,” *Exp. Mol. Med.*, 47(2), 2015, doi: 10.1038/emm.2014.114.
- [18] C. Grégoire, L. Chasson, C. Luci, E. Tomasello, F. Geissmann, E. Vivier, T. Walzer, “The trafficking of natural killer cells,” *Immunol. Rev.*, 220, str. 169–182, 2007, doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x.
- [19] H. Terunuma, X. Deng, Z. Dewan, S. Fujimoto, N. Yamamoto, “Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections,” *Int. Rev. Immunol.*, 27(3), str. 93–110, 2008, doi: 10.1080/08830180801911743.
- [20] E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, S. Ugolini, “Functions of natural killer cells,” *Nat. Immunol.*, 9(5), str. 503–510, 2008, doi: 10.1038/ni1582.
- [21] K. Kärre, H. G. Ljunggren, G. Piontek, R. Kiessling, “Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy,” *Nature*, 319(6055), str. 675–678, 1986, doi: 10.1038/319675a0.
- [22] J. A. Myers, J. S. Miller, “Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 18(2), str. 85–100, 2021, doi:10.1038/s41571-020-0426-7.
- [23] E. Narni-Mancinelli, S. Ugolini, E. Vivier, “Tuning the threshold of natural killer cell responses,” *Curr. Opin. Immunol.*, 25(1), str. 53–58, 2013, doi: 10.1016/j.coi.2012.11.005.
- [24] L. L. Lanier, “NK cell receptors,” *Annu. Rev. Immunol.*, 16, str. 359–393, 1998, doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.359.
- [25] L. L. Lanier, “NK cell recognition,” *Annu. Rev. Immunol.*, 23, str. 225–274, 2005, doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.
- [26] G. Trinchieri N. Valiante, “Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells,” *Nat. Immun.*, 12 (4–5), str. 218–234, 1993.
- [27] Dostupné URL: <https://i.ytimg.com/vi/YgSvZfcuDT0/maxresdefault.jpg> (cit. 05.07.2022).
- [28] E. O. Long, “Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells,” *Immunity*, 26(4), str. 385–387, 2007, doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.001.
- [29] M. A. Degli-Esposti, M. J. Smyth, “Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage,” *Nat. Rev. Immunol.*, 5(2), str. 112–124, 2005, doi: 10.1038/nri1549.
- [30] T. A. Fehniger, M.A. Cooper, G.J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, M.A. Caligiuri “CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity,” *Blood*, 101(8), str. 3052–3057, 2003, doi: 10.1182/blood-2002-09-2876.

- [31] D. Ribatti, “The concept of immune surveillance against tumors. The first theories,” *Oncotarget*, 8(4), str. 7175–7180, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.12739.
- [32] G. P. Dunn, L. J. Old, R. D. Schreiber, “The three Es of cancer immunoediting,” *Annu. Rev. Immunol.*, 22., str. 329–360, 2004, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
- [33] T. Cabrera, M. Angustias Fernandez, A. Sierra, A. Garrido, A. Herruzo, A. Escobedo, A. Fabra, F. Garrido, “High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas,” *Hum. Immunol.*, 50(2), str. 127–134, 1996, doi: 10.1016/0198-8859(96)00145-0.
- [34] R. W. McGilvray, R. A. Eagle, P. Rolland, I. Jafferji, J. Trowsdale, L. G. Durrant, “ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients,” *Int. J. Cancer*, 127(6), str. 1412–1420, 2010, doi: 10.1002/ijc.25156.
- [35] M. W. L. Teng, J. Galon, W.-H. Fridman, M. J. Smyth, “From mice to humans: developments in cancer immunoediting,” *J. Clin. Invest.*, 125(9), str. 3338–3346, 2015, doi: 10.1172/JCI80004.
- [36] J. S. O’Donnell, M. W. L. Teng, M. J. Smyth, “Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 16(3), Art. č. 3, 2019, doi: 10.1038/s41571-018-0142-8.
- [37] I. B. Barsoum, T.K. Hamilton, X. Li, T. Cotechini, E.A. Miles, D.R. Siemens, C.H. Graham, “Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide,” *Cancer Res.*, 71(24), str. 7433–7441, 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2104.
- [38] B. Deng, . Zhu, Y. Wang, T. Liu, Y. Ding, W. Xiao, G. Lu, P. Bo, X. Shen, “Intratumor hypoxia promotes immune tolerance by inducing regulatory T cells via TGF- β 1 in gastric cancer,” *PloS One*, 8(5), p. e63777, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0063777.
- [39] B. Almand, J.I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N. R. English, S. C. Knight, D. P. Carbone, D. I. Gabrilovich, “Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, 166(1), str. 678–689, 2001, doi: 10.4049/jimmunol.166.1.678.
- [40] A. Gillgrass, A. Ashkar, “Stimulating natural killer cells to protect against cancer: recent developments,” *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 7(3), str. 367–382, 2011, doi: 10.1586/eci.10.102.
- [41] M. M. Shenouda, A. Gillgrass, T. Nham, R. Hogg, A.J. Lee, M.V. Chew, M. Shafaei, C. Aarts, D.A. Lee, J. Hassell, A. Bane, S. Dhesy-Thind, A.A. Ashkar, “Ex vivo expanded natural killer cells from breast cancer patients and healthy donors are highly cytotoxic against breast cancer cell lines and patient-derived tumours,” *Breast Cancer Res. BCR*, 19(1), p. 76, 2017, doi: 10.1186/s13058-017-0867-9.
- [42] H. Fujisaki, H. Kakuda, N. Shimasaki, C. Imai, J. Ma, T. Lockey, P. Eldridge, W.H. Leung, D. Campana, “Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy,” *Cancer Res.*, 69(9), str. 4010–4017, 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3712.
- [43] J. B. Hess, K. D. Sutherland, S. A. Best, “Exploring natural killer cell immunology as a therapeutic strategy in lung cancer,” *Transl. Lung Cancer Res.*, 10(6), str. 2788–2805, 2021, doi: 10.21037/tlcr-20-765.

- [44] J. H. Fin, eP. Chen, A. Mesci, D.S.J. Allan, S. Gasser, D. H. Raulet, J.R. Carlyle, “Chemotherapy-induced genotoxic stress promotes sensitivity to natural killer cell cytotoxicity by enabling missing-self recognition,” *Cancer Res.*, 70(18), str. 7102–7113, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1316
- [45] L. Markasz, G. Stuber, B. Vanherberghen, E. Flaberg, E. Olah, E. Carbone, S. Eksborg, E. Klein, H. Skribek, L. Szekely., “Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells,” *Mol. Cancer Ther.*, 6(2), str. 644–654, 2007, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0358.
- [46] H. Yang, P. Lan, Z. Hou, Y. Guan, J. Zhang, W. Xu, X. Tian, C. Zhang, “Histone deacetylase inhibitor SAHA epigenetically regulates miR-17-92 cluster and MCM7 to upregulate MICA expression in hepatoma,” *Br. J. Cancer*, 112(1), str. 112–121, 2015, doi: 10.1038/bjc.2014.547.
- [47] P. Dhupkar, N. Gordon, “Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, 995, str. 33–51, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-53156-4_2.
- [48] H. Törnroos, H. Hägerstrand, C. Lindqvist, “Culturing the Human Natural Killer Cell Line NK-92 in Interleukin-2 and Interleukin-15 - Implications for Clinical Trials,” *Anticancer Res.*, 39(1), str. 107–112, 2019, doi: 10.21873/anticancer.13085.
- [49] N. J. Meropol, G. M. Barresi, T. A. Fehniger, J. Hitt, M. Franklin, M. A. Caligiuri, “Evaluation of natural killer cell expansion and activation in vivo with daily subcutaneous low-dose interleukin-2 plus periodic intermediate-dose pulsing,” *Cancer Immunol. Immunother. CII*, 46(6), str. 318–326, 1998, doi: 10.1007/s002620050493.
- [50] J. M. Wrangle, A. Patterson, C.B. Johnson, D.J. Neitzke, S. Mehrotra, C.E. Denlinger, C.M. Paulos, Z. Li, D.J. Cole, M.P. Rubinstein, “IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy,” *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.*, 38(2), str. 45–68, 2018, doi: 10.1089/jir.2017.0101.
- [51] K. Quirk, S. Ganapathy-Kanniappan, “Is There an Opportunity for Current Chemotherapeutics to Up-regulate MIC-A/B Ligands?,” *Front. Pharmacol.*, 8, str. 732, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00732.
- [52] V. Groh, A. Steinle, S. Bauer, T. Spies, “Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells,” *Science*, 279(5357), str. 1737–1740, 1998, doi: 10.1126/science.279.5357.1737.
- [53] S. Gasser, D. H. Raulet, “The DNA Damage Response Arouses the Immune System,” *Cancer Res.*, 66(8), str. 3959–3962, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4603.
- [54] D. Schilling, F. Tetzlaff, S. Konrad, W. Li, G. Multhoff, “A hypoxia-induced decrease of either MICA/B or Hsp70 on the membrane of tumor cells mediates immune escape from NK cells,” *Cell Stress Chaperones*, 20(1), str. 139–147, 2015, doi: 10.1007/s12192-014-0532-5.
- [55] T. A. Adekiya, R. T. Aruleba, S. Khanyile, P. Masamba, B. E. Oyinloye, A. P. Kappo, “Structural Analysis and Epitope Prediction of MHC Class-1-Chain Related Protein-A for Cancer Vaccine Development,” *Vaccines*, 6(1), str. 1, 2017, doi: 10.3390/vaccines6010001.
- [56] P. Li, D. L. Morris, B. E. Willcox, A. Steinle, T. Spies, R. K. Strong, “Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA,” *Nat. Immunol.*, 2(5), 2001, doi: 10.1038/87757.

- [57] S. Xing, L. Ferrari de Andrade, “NKG2D and MICA/B shedding: a ‘tag game’ between NK cells and malignant cells,” *Clin. Transl. Immunol.*, 9(12), 2020, doi: 10.1002/cti2.1230.
- [58] G. Chitadze, M. Lettau, J. Bhat, D. Wesch, A. Steinle, D. Fürst, J. Mytilineos, H. Kalthoff, O. Janssen, H. Oberg, D. Kabelitz “Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the ‘a disintegrin and metalloproteases’ 10 and 17,” *Int. J. Cancer*, 133(7), str. 1557–1566, 2013, doi: 10.1002/ijc.28174.
- [59] B. K. Kaiser, D. Yim, I. Chow, S. Gonzalez, Z. Dai, H.H. Mann, R.K. Strong, V. Groh, T. Spies, “Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands,” *Nature*, 447(7143), str. 482–486, 2007, doi: 10.1038/nature05768.
- [60] M. Moloudizargari, M. H. Asghari, E. Mortaz, “Inhibiting exosomal MIC-A and MIC-B shedding of cancer cells to overcome immune escape: new insight of approved drugs,” *DARU J. Pharm. Sci.*, 27(2), str. 879–884, 2019, doi: 10.1007/s40199-019-00295-y.
- [61] N. A. Arreygue-Garcia, A. Daneri-Navarro, A. del Toro-Arreola, A. Cid-Arregui, O. Gonzalez-Ramella, L.F. Jave-Suarez, A. Aguilar-Lemarroy, R. Troyo-Sanroman, A. Bravo-Cuellar, V. Delgado-Rizo, T. Garcia-Iglesias, G. Hernandez-Flores, S. Del Toro-Arreola, “Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions,” *BMC Cancer*, 8, str. 16, 2008, doi: 10.1186/1471-2407-8-16.
- [62] V. Groh, R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein, T. Spies, “Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(12), str. 6879–6884, 1999, doi: 10.1073/pnas.96.12.6879.
- [63] V. Groh, J. Wu, C. Yee, T. Spies, “Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation,” *Nature*, 419(6908), str. 734–738, 2002, doi: 10.1038/nature01112.
- [64] A. Labani-Motlagh, P. Israelsson, U. Ottander, E. Lundin, I. Nagaev, O. Nagaeva, E. Dehlin, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson, “Differential expression of ligands for NKG2D and DNAM-1 receptors by epithelial ovarian cancer-derived exosomes and its influence on NK cell cytotoxicity,” *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, 37(4), str. 5455–5466, 2016, doi: 10.1007/s13277-015-4313-2.
- [65] M. A. Dawson, T. Kouzarides, “Cancer epigenetics: from mechanism to therapy,” *Cell*, 150(1), str. 12–27, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.
- [66] L. Ferrari de Andrade, R.E. Tay, D. Pan, A.M. Luoma, Y. Ito, S. Badrinath, D. Tsoucas, B. Franz, K.F. May, C.J. Harvey, S. Kobold, J.W. Pyrdol, C. Yoon, G. Yuan, F.S. Hodi, G. Dranoff, K.W. Wucherpfennig, “Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity,” *Science*, 359(6383), str. 1537–1542, 2018, doi: 10.1126/science.aao0505.

- [67] M. Moloudizargari, E. Mortaz, M. H. Asghari, I. M. Adcock, F. A. Redegeld, J. Garssen, “Effects of the polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA, on hematological malignancies: a systematic review,” *Oncotarget*, 9(14), str. 11858–11875, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24405.
- [68] A. Tietje, X. Yang, X. Yu, Y. Wei, “MICA/IL-12: A novel bifunctional protein for killer cell activation,” *Oncol. Rep.*, 37(3), str. 1889–1895, 2017, doi: 10.3892/or.2017.5375.
- [69] H. Ding, G. W. Buzzard, S. Huang, M. G. Sehorn, R. K. Marcus, Y. Wei, “MICA-G129R: A bifunctional fusion protein increases PRLR-positive breast cancer cell death in co-culture with natural killer cells,” *PloS One*, 16(6), 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0252662.
- [70] O. Schneewind, D. M. Missiakas, “Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 367(1592), str. 1123–1139, 2012, doi: 10.1098/rstb.2011.0210.
- [71] A. W. Jacobitz, M. D. Kattke, J. Wereszczynski, R. T. Clubb, “Chapter Seven - Sortase Transpeptidases: Structural Biology and Catalytic Mechanism,” in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 109, T. Karabencheva-Christova, Ed. Academic Press, 2017, str. 223–264. doi: 10.1016/bs.apcsb.2017.04.008.
- [72] L. Schmohl, D. Schwarzer, “Sortase-mediated ligations for the site-specific modification of proteins,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 22, str. 122–128, 2014, doi: 10.1016/j.cbpa.2014.09.020.
- [73] L. A. Marraffini, H. Ton-That, Y. Zong, S. V. L. Narayana, O. Schneewind, “Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. A conserved arginine residue is required for efficient catalysis of sortase A,” *J. Biol. Chem.*, 279(36), str. 37763–37770, 2004, doi: 10.1074/jbc.M405282200.
- [74] U. Ilangovan, H. Ton-That, J. Iwahara, O. Schneewind, R. T. Clubb, “Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98(11), str. 6056–6061, 2001, doi: 10.1073/pnas.101064198.
- [75] P. Kumari, S. Bowmik, S.K. Paul, B. Biswas, S.K. Banerjee, U.S. Murty, V. Ravichandiran, U. Mohan, “Sortase A: A chemoenzymatic approach for the labeling of cell surfaces,” *Biotechnol. Bioeng.*, 118(12), str. 4577–4589, 2021, doi: 10.1002/bit.27935.
- [76] T. Nuijens, A. Toplak, M. Schmidt, A. Ricci, W. Cabri, “Natural Occurring and Engineered Enzymes for Peptide Ligation and Cyclization,” *Front. Chem.*, 7(829), 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00829.
- [77] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, “Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering,” *J. Am. Chem. Soc.*, 126(9), str. 2670–2671, 2004, doi: 10.1021/ja039915e.
- [78] M. W.-L. Popp, H. L. Ploegh, “Making and breaking peptide bonds: protein engineering using sortase,” *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 50(22), str. 5024–5032, 2011, doi: 10.1002/anie.201008267.

- [79] T. Proft, “Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation,” *Biotechnol. Lett.*, 32(1), str. 1–10, 2010, doi: 10.1007/s10529-009-0116-0.
- [80] H. Mao, “A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins,” *Protein Expr. Purif.*, 37(1), str. 253–263, 2004, doi: 10.1016/j.pep.2004.06.013.
- [81] D. Cmunt, “Příprava fúzních domén lidských imunoreceptorů pro jejich využití v imunoterapii”, 2019