

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyzikální chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



Bc. Matouš Tulpa

**ROLE N-GLYKOSYLACE V HOMOLIGOMERIZACI RECEPTORU
PŘIROZENÉ CYTOTOXICITY NKp30**

The role of N-glycosylation in homooligomerization of natural
cytotoxicity receptor NKp30

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.

Praha, 2023

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze, 17.05.2023

Matouš Tulpa

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost, ochotu poradit, předávat nové informace a učit mě novým věcem. Dále bych rád poděkoval Mgr. Ondřeji Skořepovi, Ph.D. za časté konzultace, cenné rady a poskytnutí vstupních materiálů pro provedení experimentální části práce. Dále bych chtěl poděkovat všem členům Laboratoře strukturní biochemie imunitního rozpoznávání, jmenovitě Bc. Maxmiliánu Hejlovi, Mgr. Celeste Abreu a Bc. Gabriele Chytré za příjemné a přátelské pracovní prostředí.

ABSTRAKT

NK buňky hrají klíčovou roli v boji proti buňkám, které byly napadeny virem, prvokem nebo podlehly maligní transformaci. Kromě toho také regulují aktivitu a množství dalších buněk imunitního systému. Cílové buňky rozpoznávají pomocí svých aktivačních a inhibičních receptorů, ze kterých přijímají aktivační a inhibiční signály, na nichž je závislá cytotoxická odpověď NK buňky. Mezi signály panuje dynamická rovnováha, která rozhoduje o životě a smrti cílové buňky. Pokud převáží aktivační signály, bude cílová buňka eliminována. Pokud převáží inhibiční signály, pak cytotoxická odpověď nenastane.

Receptor NKp30 patří do superrodiny receptorů podobných imunoglobulinům. Jedná se o důležitý aktivační receptor, který rozpoznává celou řadu ligandů, mezi které patří hemagglutinin viru vakcinie a ektromélie, protein pp65 lidského cytomegaloviru, B7-H6, BAG-6 a galektin-3. Extracelulární doména receptoru NKp30 je za určitých podmínek schopna v roztoku homooligomerizovat. První podmínkou je přítomnost N-glykosylace, druhou podmínkou je přítomnost 15 aminokyselin dlouhé „stalk“ domény, která propojuje ligand vázající doménu s transmembránovým α -helixem. Cílem této práce bylo ověřit, které ze třech dostupných míst N-glykosylace receptoru NKp30 je zodpovědné za jeho homooligomerizaci. Dalším cílem byla biofyzikální charakterizace těchto homooligomerů včetně vyřešení jejich struktury.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňky, NKp30, HEK293T, N-glykosylace, oligomer, oligomerizace

ABSTRACT

NK cells play a key role in the defence against cells that have been infected by a virus, a protozoan or have undergone malignant transformation. In addition, they also regulate the activity and quantity of other cells of the immune system. Target cells are recognized using their activating and inhibitory receptors, from which they receive activating and inhibitory signals, on which the cytotoxic response of NK cells depends. There is a dynamic balance between the signals that determines the life and death of the target cell. If activation signals prevail, the target cell will be eliminated. If inhibitory signals prevail, then a cytotoxic response will not be triggered.

The NKp30 receptor, which belongs to the immunoglobulin-like receptor superfamily, is an important activating receptor that recognizes a number of ligands, including hemagglutinin of vaccinia and ectromelia virus, human cytomegalovirus pp65 protein, B7-H6, BAG-6, and galectin-3. The extracellular domain of the NKp30 receptor is capable of homooligomerization in solution under certain conditions. The first requirement is the presence of N-glycosylation, the second requirement is the presence of a 15 amino acid long "stalk" domain that connects the ligand binding domain with the transmembrane α -helix. The aim of this thesis was to assess which of the three available N-glycosylation sites of the NKp30 receptor is responsible for its homooligomerization. Another aim was the biophysical characterization of these homooligomers, including solving their structure.

KEY WORDS

NK cells, NKp30, HEK293T, N-glycosylation, oligomer, oligomerization

SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
APC	antigen prezentující buňky, z <i>angl.</i> <i>antigen presenting cells</i>
APS	peroxodisíran amonný, z <i>angl.</i> <i>ammonium persulfate</i>
AUC	analytická ultracentrifugace
B7-H6	protein B7, homolog 6
BAG-6	lidský athanogen 6 asociovaný s BCL2, z <i>angl.</i> <i>BCL2-associated athanogene 6</i>
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolylfosfát
bp	počet párů bází, z <i>angl.</i> <i>base pairs</i>
BSA	hovězí sérový albumin, z <i>angl.</i> <i>bovine serum albumin</i>
CBB R-250	barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250
CD	komplex antigenní diferenciační skupiny, z <i>angl.</i> <i>cluster of differentiation</i>
CTLR	receptory podobné lektinům C-typu, z <i>angl.</i> <i>C-type lectin-like receptors</i>
dH ₂ O	deionizovaná voda
DLS	dynamický rozptyl světla, z <i>angl.</i> <i>dynamic light scattering</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z <i>angl.</i> <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty, z <i>angl.</i> <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
ECL	roztok zvyšující chemiluminiscenci, z <i>angl.</i> <i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová, z <i>angl.</i> <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEK293T	lidská embryonální ledvinná linie 293, exprimující mutovanou variantu velkého T antigenu SV40, z <i>angl.</i> <i>human embryonic kidney 293, expressing a mutant version of the SV40 large T antigen</i>
HeLa	nádorové buňky Henrietty Lacksové
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HF	vysoká přesnost, z <i>angl.</i> <i>high fidelity</i>
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z <i>angl.</i> <i>high performance liquid chromatography</i>
IFN- γ	interferon- γ

IgG	imunoglobulin G
Ig-like	označení imunoglobulinům podobných receptorů, z <i>angl. immunoglobulin-like</i>
IL	interleukin
ITAM	aktivační imunoreceptorový motiv založený na tyrosinu, z <i>angl. immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
ITC	izotermální titrační kalorimetrie, z <i>angl. isothermal titration calorimetry</i>
ITIM	inhibiční imunoreceptorový motiv založený na tyrosinu, z <i>angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
kb	počet kilobází
KIR	NK-buněčné imunoglobulinům podobné receptory, z <i>angl. killer immunoglobulin-like receptors</i>
kryo-EM	kryoelektronová mikroskopie
LB	kultivační médium, z <i>angl. lysogeny broth</i>
LBD	ligand vázající doména, z <i>angl. ligand binding domain</i>
IPEI	lineární polyethylenimin
MHC	hlavní histokompatibilní komplex, z <i>angl. major histocompatibility complex</i>
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, z <i>angl. messenger ribonucleic acid</i>
MP	hmotnostní fotometrie, z <i>angl. mass photometry</i>
MWCO	maximální hodnota molekulové hmotnosti, kterou daná membrána propustí, z <i>angl. molecular weight cut off</i>
NBT	barvivo nitrotetrazoliová modř, z <i>angl. nitro-tetrazolium blue</i>
NCR	receptor přirozené cytotoxicity, z <i>angl. natural cytotoxicity receptor</i>
nDSF	nano-diferenční skenovací fluorimetrie
NK	přirozeně zabijácké, z <i>angl. natural killer</i>
NKG2	skupina přirozených zabijáckých receptorů 2, z <i>angl. natural killer group 2</i>
NKp	přirozený zabijácký protein, z <i>angl. natural killer protein</i>
NKp30_Stalk_WT	nemutovaný (přirozený) receptor NKp30 se „stalk“ doménou, z <i>angl. NKp30_Stalk wild-type</i>

NKp30_Stalk_G42	receptor NKp30 se „stalk“ doménou s N-glykosylací zachovanou na Asn-42
NKp30_Stalk_G68	receptor NKp30 se „stalk“ doménou s N-glykosylací zachovanou na Asn-68
NKp30_Stalk_G121	receptor NKp30 se „stalk“ doménou s N-glykosylací zachovanou na Asn-121
NKp30_Stalk_Triple	receptor NKp30 se „stalk“ doménou bez zachované N-glykosylace
NKR-P1	NK buněčný receptor protein 1, z <i>angl. natural killer cell receptor protein 1</i>
PAG	polyakrylamidový gel
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok, z <i>angl. phosphate buffered saline</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce, z <i>angl. polymerase chain reaction</i>
PDB	proteinová databanka
PEG	polyethylenglykol
RNA	ribonukleová kyselina, z <i>angl. ribonucleic acid</i>
RPM	otáčky za minutu, z <i>angl. revolutions per minute</i>
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření, z <i>angl. small-angle X-ray scattering</i>
SDM	místně zaměřená mutagenese, z <i>angl. site-directed mutagenesis</i>
SDS	dodecylsírán sodný, z <i>angl. sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným, z <i>angl. sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	rozměrově-vylučovací chromatografie, z <i>angl. size-exclusion chromatography</i>
SEC-MALS	víceúhlový rozptyl světla spojený s rozměrově-vylučovací chromatografií, z <i>angl. size-exclusion chromatography – multi-angle light scattering</i>
SOB	kultivační médium, z <i>angl. super optimal broth</i>
TAE	pufr, který obsahuje Tris, kyselinou octovou a kyselinou ethylendiamintetraoctovou

TBS	fyziologický roztok pufovaný Tris puftrem, z <i>angl.</i> <i>Tris-buffered saline</i>
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEMED	tetramethylethylendiamin
TK	tkáňové kultury
TNF	faktor nádorové nekrózy, z <i>angl.</i> <i>tumour necrosis factor</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

OBSAH

1. TEORETICKÝ ÚVOD	13
1.1. IMUNITNÍ SYSTÉM – VROZENÁ A ADAPTIVNÍ IMUNITA	13
1.2. NK BUŇKY	14
1.2.1. <i>Receptory NK buněk</i>	15
1.2.1.1. Receptory podobné lektinům C-typu.....	16
1.2.1.2. Receptory podobné imunoglobulinům	16
1.2.2. <i>Receptor přirozené cytotoxicity NKp30</i>	17
1.2.2.1. Ligandy receptoru NKp30	20
1.3. OLIGOMERIZACE PROTEINŮ	21
1.3.1. <i>Interakční rozhraní</i>	22
1.3.2. <i>Skládání oligomerů</i>	22
1.3.3. <i>Oligomerizace proteinů v nemoci a ve zdraví</i>	23
1.3.4. <i>Příklady biofyzikálních metod pro studium oligomerních proteinů</i>	24
1.3.5. <i>Homooligomerizace receptoru přirozené cytotoxicity NKp30</i>	25
2. CÍLE PRÁCE	27
3. POUŽITÝ MATERIÁL.....	28
3.1. PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY	28
3.2. DNA	30
3.2.1. <i>Vektory</i>	30
3.2.2. <i>Primery pro PCR a sekvenaci</i>	30
3.3. BUNĚČNÉ LINIE A BAKTERIÁLNÍ KMENY	31
3.4. ENZYMY	32
3.5. PUFRY PRO ENZYMY	32
3.6. KULTIVAČNÍ MÉDIA	32
3.7. ROZTOKY	32
3.7.1. <i>Roztoky pro elektroforézu</i>	32
3.7.2. <i>Roztoky pro purifikaci a přechovávání proteinů</i>	33
3.7.3. <i>Roztoky pro imunoblot</i>	33
3.7.4. <i>Roztoky pro manipulaci s buňkami</i>	34
3.8. CHEMIKÁLIE	34
4. METODY.....	37
4.1. PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ	37
4.1.1. <i>Polymerázová řetězová reakce</i>	37
4.1.2. <i>Štěpení DNA restrikčními endonukleázami</i>	38
4.1.3. <i>Agarózová elektroforéza</i>	39
4.1.3.1. Příprava agarózového gelu	39
4.1.3.2. Příprava vzorků pro agarózovou elektroforézu.....	39

4.1.4.	<i>Izolace DNA z agarózového gelu</i>	39
4.1.5.	<i>Vložení genu do linearizovaného plazmidu pomocí T4 DNA ligázy</i>	40
4.1.5.1.	Příprava reakční směsi pro ligázovou reakci	40
4.1.5.2.	Ligázová reakce.....	40
4.1.6.	<i>Vložení genu do linearizovaného plazmidu pomocí T4 DNA polymerázy</i>	40
4.1.6.1.	Příprava reakční směsi pro ligázovou reakci	40
4.1.6.2.	Polymerázová reakce.....	41
4.1.7.	<i>Transformace kompetentních buněk</i>	41
4.1.8.	<i>PCR z bakteriálních kolonií</i>	41
4.1.9.	<i>Kultivace bakterií v malém objemu</i>	42
4.1.10.	<i>Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA</i>	42
4.1.11.	<i>Sekvenace DNA</i>	43
4.1.11.1.	Příprava vzorků na sekvenaci DNA.....	43
4.1.12.	<i>Kultivace bakterií ve velkém objemu</i>	43
4.1.13.	<i>Vysokoobjemová izolace plazmidové DNA</i>	43
4.1.14.	<i>Měření koncentrace DNA</i>	44
4.2.	REKOMBINANTNÍ EXPRESE PROTEINŮ.....	44
4.2.1.	<i>Buněčná linie HEK293T</i>	44
4.2.1.1.	Rozmražení buněk	45
4.2.1.2.	Určování počtu buněk.....	45
4.2.1.3.	Pasážování buněk	45
4.2.1.4.	Vysokohustotní tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T	46
4.2.1.5.	Příprava stabilně transfekovaných buněčných linií HEK293T	46
4.2.1.6.	Sklízení buněk	47
4.2.1.7.	Mražení buněk	47
4.2.2.	<i>Purifikace proteinů s histidinovou kotvou</i>	48
4.2.2.1.	Chelatační chromatografie	48
4.2.2.2.	Zkoncentrování proteinů	49
4.2.2.3.	Preparativní rozměrově-vylučovací chromatografie.....	49
4.3.	CHARAKTERIZACE PROTEINŮ	49
4.3.1.	<i>Měření koncentrace proteinů</i>	49
4.3.2.	<i>SDS-PAGE</i>	49
4.3.2.1.	Příprava polyakrylamidového gelu s přídavkem SDS	50
4.3.2.2.	Příprava vzorků na SDS-PAGE	50
4.3.2.3.	Vizualizace proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	50
4.3.3.	<i>Imunoblot</i>	51
4.3.3.1.	Elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu	51
4.3.3.2.	Blokace nitrocelulosové membrány BSA a vazba protilátek.....	51
4.3.3.3.	Chemiluminiscenční a kolorimetrická detekce proteinů s histidinovou kotvou	52
4.3.4.	<i>Analytická rozměrově-vylučovací chromatografie</i>	52
4.3.5.	<i>nano-Diferenční skenovací fluorimetrie</i>	52
4.3.6.	<i>Cirkulární dichroismus</i>	53
4.3.7.	<i>Analytická ultracentrifugace</i>	53

4.3.8.	<i>Víceúhlový rozptyl světla spojený s rozměrově-vylučovací chromatografií</i>	53
4.3.9.	<i>Transmisní elektronová mikroskopie a kryoelektronová mikroskopie</i>	54
5.	VÝSLEDKY	55
5.1.	AMINOKYSELINOVÉ SEKVENCE EXPRIMOVANÝCH PROTEINŮ	55
5.2.	PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ	56
5.2.1.	<i>Příprava genů glykosylačních mutantů receptoru NKp30</i>	56
5.2.2.	<i>Linearizace plazmidu restričními endonukleázami</i>	58
5.2.3.	<i>Příprava zásobního množství plazmidů nesoucích geny jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30</i>	59
5.2.4.	<i>Příprava expresního vektoru nesoucího gen NKp30_Stalk_triple</i>	60
5.2.4.1.	Příprava genu NKp30_Stalk_Triple	60
5.2.4.2.	Příprava zásobního množství plazmidu nesoucího gen NKp30_Stalk_Triple	62
5.2.5.	<i>Příprava plazmidů pro vysokohustotní stabilní transfekce buněčné linie HEK293T</i> 63	
5.3.	REKOMBINANTNÍ EXPRESE A PURIFIKACE GLYKOSYLAČNÍCH MUTANTŮ RECEPTORU NKp30.....	65
5.3.1.1.	NKp30_Stalk_G42	66
5.3.1.2.	NKp30_Stalk_G68	67
5.3.1.3.	NKp30_Stalk_G121	70
5.3.1.4.	NKp30_Stalk_Triple	70
5.4.	TEPLOTNÍ STABILITA GLYKOSYLAČNÍCH MUTANTŮ RECEPTORU NKp30	72
5.5.	CIRKULÁRNÍ DICHROISMUS	73
5.6.	ANALÝZA DYNAMIKY HOMOOLIGOMERIZACE	74
5.6.1.	<i>Schopnost homooligomerů disociovat</i>	74
5.6.2.	<i>Analýza vzniku homooligomerů</i>	75
5.7.	BIOFYZIKÁLNÍ CHARAKTERIZACE HOMOOLIGOMERŮ RECEPTORU NKp30.....	78
5.7.1.	<i>Charakterizace homooligomerů pomocí analytické ultracentrifugace</i>	78
5.7.2.	<i>Charakterizace homooligomerů pomocí víceúhlového rozptylu světla spojeného s rozměrově-vylučovací chromatografií</i>	79
5.7.3.	<i>Charakterizace homooligomerů NKp30_Stalk_WT pomocí transmisní elektronové mikroskopie a kryoelektronové mikroskopie</i>	80
6.	DISKUZE	82
7.	ZÁVĚR	86
8.	SEZNAM LITERATURY	87

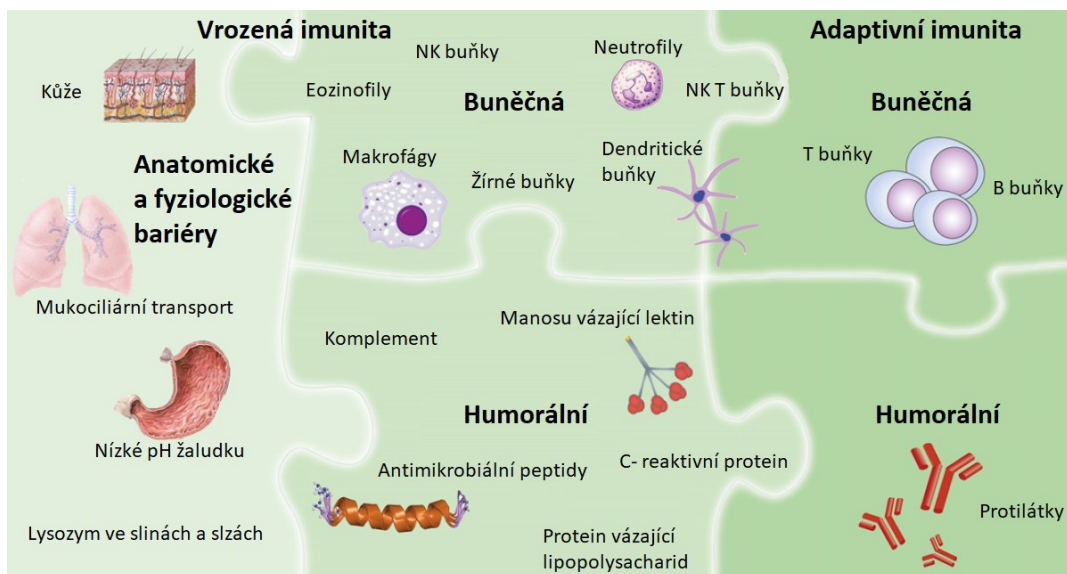
1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. IMUNITNÍ SYSTÉM – VROZENÁ A ADAPTIVNÍ IMUNITA

Imunitní systém nás každodenně chrání jak před nástrahami vnějšího světa, které představují mikroorganismy, tak před námi samými – například před nádorovým onemocněním. Z hlediska specifity lze imunitní systém rozdělit na vrozený (nespecifický) a adaptivní (specifický) [1,2], přičemž určitou část vrozené imunity tvoří anatomické a fyziologické bariéry, jako například kůže či lysozym (Obrázek 1, str. 14) [2,3].

Adaptivní imunitu představuje dokonale organizovaná souhra T a B lymfocytů s antigen prezentujícími buňkami (APC, z *angl. antigen presenting cells*) [4]. Hlavní funkcí T lymfocytů je identifikace a likvidace buněk, které byly napadeny intracelulárním patogenem. B lymfocyty slouží primárně k produkci protilátek [2,4], ale v určitých případech mohou hrát roli APC pro T lymfocyty [2]. Specifitu obou typů lymfocytů zajišťuje jejich schopnost reorganizovat určité úseky deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z *angl. deoxyribonucleic acid*) během svého vývoje. To jim dává možnost získat obrovský repertoár T-buněčných receptorů, či specifických protilátek, které mohou rozpoznávat širokou škálu různých patogenů [1,5].

Oproti tomu se vrozená, nespecifická imunita zaměřuje na vysoce konzervované, typické molekulární struktury, které se vyskytují napříč celým spektrem mikroorganismů [5,6]. Příkladem mohou být bakteriální lipopolysacharidy, peptidoglykan, dvouvláknová ribonukleová kyselina (RNA, z *angl. ribonucleic acid*) a bakteriální DNA [5,7]. Zaměření vrozeného imunitního systému na konzervované struktury přináší zásadní časovou výhodu v boji s infekcí, protože může reagovat okamžitě. Naopak reakce T a B lymfocytů je několik dní opožděná, jelikož musí nejprve dojít k selekci specificky zaměřené populace proti danému patogenu [5]. Vrozená imunita zahrnuje mnoho druhů buněk, antimikrobiální peptidy, proteiny komplementu a další [3]. Mezi nejdůležitější buňky vrozeného imunitního systému patří neutrofilové, které fagocytují a následně zlikvidují daný patogen, během čehož samy zahynou. Dalším příkladem mohou být eozinofily, které hrají důležitou roli především v boji s mnohobuněčnými organismy [1]. Makrofágy a dendritické buňky patří mezi APC, které prezentací antigenu pro T lymfocyty na glykoproteinu hlavní histokompatibilní komplex (MHC, z *angl. major histocompatibility complex*) II. třídy tvoří spojnici mezi vrozeným a adaptivním imunitním systémem [5]. Další funkcí vrozeného imunitního systému je ochrana před vznikem rakoviny, kde sehrávají zásadní roli přirozené zabijácké (NK, z *angl. natural killer*) buňky [8].



Obrázek 1: Stručný přehled jednotlivých segmentů imunitního systému.

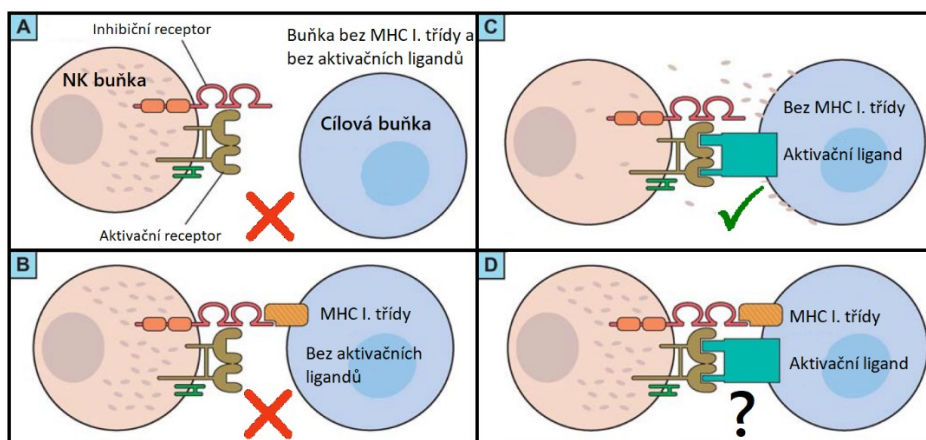
Imunitní systém je rozdělen na vrozenou a adaptivní imunitu, přičemž vrozenou imunitu tvoří anatomické a fyziologické bariéry, dále pak buněčná a humorální složka imunity. Na pomezí vrozené a adaptivní imunity patří NK T buňky a dendritické buňky. Adaptivní imunita je tvořena buněčnou a humorální složkou. Převzato a upraveno z [3].

1.2. NK BUŇKY

NK buňky tvoří třetí největší subpopulaci lymfocytů. Řadí se mezi velké granulární lymfocyty se schopností likvidace buněk, jež mají sníženou nebo chybějící expresi MHC glykoproteinů I. třídy [8,9]. Důležitou roli hrají v boji s buňkami, které podlehly maligní transformaci [8,10]. Základním fenotypickým znakem NK buněk je exprese komplexu antigenní diferenciační skupiny (CD, z *angl. cluster of differentiation*) číslo 56 – CD56 a receptoru přirozený zabijácký protein (NKp, z *angl. natural killer protein*) číslo 46 – NKp46 [8,11-13]. Dalším důležitým znakem je absence exprese CD3 [8,14].

Před uvolněním NK buněk do cirkulace, probíhá jejich vývin v kostní dřeni. Pro jejich správnou maturaci je klíčová přítomnost interleukinu (IL) -15 – IL-15 [15,16]. Z hlediska fenotypu buněčného povrchu lze NK buňky rozdělit na dvě subpopulace s rozličnými funkcemi a vlastnostmi. Subpopulace CD56^{bright}, s vysokou povrchovou hustotou exprese CD56 je dominantně zastoupená v sekundárních lymfatických orgánech, naopak CD56^{dim}, s nízkou povrchovou expresí CD56 se nachází především v kostní dřeni, krvi a slezině [8,17]. Hlavní úlohou CD56^{bright} je produkce cytokinů, a to především interferonu- γ (IFN- γ), přičemž tato populace vykazuje nízkou míru cytotoxicity [8,18]. Naopak buňky CD56^{dim} mají nízkou schopnost produkovat cytokiny, ale vykazují vysokou cytotoxickou aktivitu vůči infikovaným a nádorovým buňkám [8].

O životě a smrti cílové buňky rozhodují signály přijaté z aktivačních a inhibičních receptorů NK buňky. Pokud převáží aktivační signály, bude cílová buňka eliminována a *vice versa* (Obrázek 2) [19]. Úspěšné eliminace cílové buňky dosáhne NK buňka exocytózou váčků, které obsahují perforiny a granzymy, nebo aktivací receptorů smrti pro faktory nádorové nekrózy (TNF, z *angl. tumour necrosis factor*) [20]. V nádorových buňkách se mnohdy kumulují metabolity jako například laktát, který blokuje sekreci IFN- γ a snížením pH zhoršuje cytotoxickou aktivitu NK buněk [10,21]. Snížení cytotoxické aktivity je způsobeno nižší expresí perforinu a granzymů [21]. Vysoké nároky nádorů na nutrienty vytváří prostředí s jejich deficitem, přičemž deplece L-argininu narušuje proliferaci NK buněk a produkci IFN- γ [10,22].



Obrázek 2: Osud cílové buňky po střetu s NK buňkou.

(A) V případě, že cílová buňka nenesie MHC glykoproteiny I. třídy ani aktivační ligandy, pak nedojde k žádné imunitní odpovědi NK buňky. (B) Pokud cílová buňka exprimuje MHC glykoproteiny I. třídy a zároveň neexprimuje žádné aktivační ligandy, pak převáží inhibiční signál a rovněž nedojde k žádné imunitní odpovědi NK buňky. (C) K imunitní odpovědi však dojde, pokud cílová buňka exprimuje aktivační ligandy a zároveň neexprimuje MHC glykoproteiny I. třídy. V tomto případě převáží aktivační signál. (D) V případě, že cílová buňka exprimuje zároveň MHC glykoproteiny I. třídy a aktivační ligandy, pak o osudu cílové buňky rozhodne signál, který převažuje. Převzato a upraveno z [23].

1.2.1. RECEPTORY NK BUNĚK

Regulace funkce NK buněk, podobně jako regulace ostatních buněk vrozeného imunitního systému, nepodléhá jednomu receptoru s vysokou specifitou vůči jednomu antigenu. Rozpoznávání široké škály ligandů je u NK buněk zajištěno expresí mnoha aktivačních a inhibičních receptorů [19,24-26]. Inhibičním receptorům vděčíme za to, že NK buňky rozpoznají „naše já“ a neútočí tak na zdravé buňky a tkáně. Inhibiční receptory signalizují zejména skrze intracelulární inhibiční imunoreceptorový motiv založený na tyrosinu (ITIM, z *angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), který se nachází na cytoplazmatickém konci receptoru [26,27]. Aktivační receptory jsou

nezbytné pro cytotoxickou odpověď NK buňky vůči cílové buňce (Obrázek 2, str. 15) [23]. Signalizace probíhá v závislosti na daném receptoru několika způsoby. První možností je způsob analogický k inhibičnímu, přes intracelulární aktivační imunoreceptorový motiv založený na tyrosinu (ITAM, z *angl. immunoreceptor tyrosine-based activating motif*). Rozdílem je, že ITAM se nenachází na cytoplazmatickém konci receptoru, ale na adaptorových molekulách v blízkosti [26,27]. Další variantou je signalizace za použití adaptorového proteinu DAP-10, který signalizuje skrze fosfatidylinositol-3-kinázovou podjednotku proteinu p85 [26,28]. Třetí možností, kterou využívají některé inhibiční i aktivační receptory je přenos signálu za použití adaptorových proteinů skrze imunoreceptorový motiv „vypínače“ [26,29]. Bez ohledu na aktivační či inhibiční povahu se NK buněčné receptory rozdělují do dvou strukturních superrodin – receptory podobné imunoglobulinům (Ig-like, z *angl. immunoglobulin-like*) a receptory podobné lektinům C-typu (CTLR, z *angl. C-type lectin-like receptors*) [25,26].

1.2.1.1. RECEPTORY PODOBNÉ LEKTINŮM C-TYPU

Mezi aktivační CTLR patří například receptor NKp80 [25,26,30], člen D ze skupiny přirozených zabijáckých receptorů číslo 2 (NKG2, z *angl. natural killer group 2*) – NKG2D [25,26,31]. Aktivační i inhibiční receptory obsahuje rodina heterodimerních receptorů CD94/NKG2, která rozpoznává nestandardní MHC glykoproteiny I. třídy [26,32]. Rodina aktivačních a inhibičních protein 1 NK buněčných receptorů (NKR-P1, z *angl. natural killer cell receptor protein 1*) je rozšířená v myších, nicméně člověk exprimuje pouze jediného člena této rodiny, inhibiční receptor NKR-P1 [25,26,33]. Tento receptor je zajímavý svou schopností tvořit v imunitní synapsi klastry, společně se svým ligandem, transkriptem podobnému lektinům 1 [34].

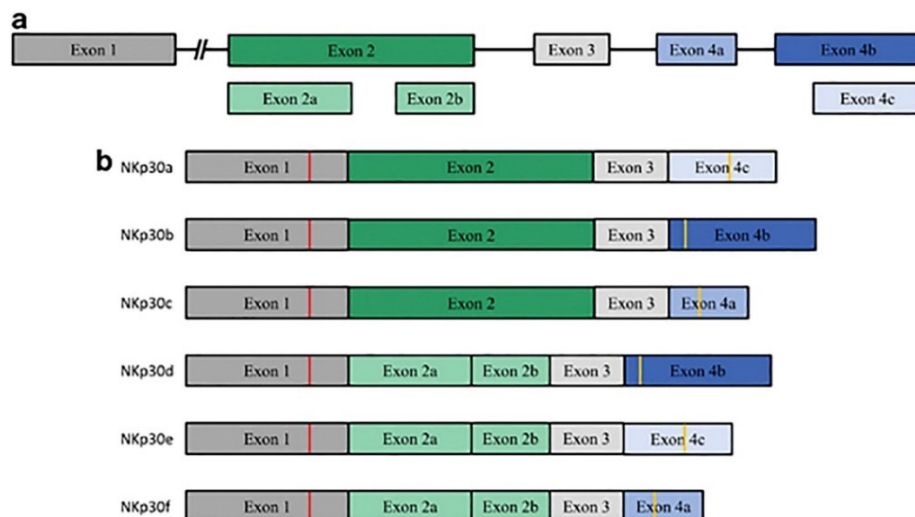
1.2.1.2. RECEPTORY PODOBNÉ IMUNOGLOBULINŮM

Široká rodina NK buněčných, imunoglobulinům podobných receptorů (KIR, z *angl. killer cell immunoglobulin-like receptors*) obsahuje jak aktivační, tak inhibiční receptory, které jsou primárně zodpovědné za rozpoznávání a monitorování MHC glykoproteinů I. třídy [25,26,35]. V myších je tato skupina nahrazena rodinou receptorů Ly49, které patří mezi receptory podobné lektinům C-typu [25,26]. Další rodinu rozpoznávající MHC glykoproteiny I. třídy tvoří leukocytární receptory podobné imunoglobulinům [25]. Receptory přirozené cytotoxicity (NCR, z *angl. natural cytotoxicity receptors*), mezi které patří NKp30, NKp44 a NKp46 byly objeveny ve snaze nalézt receptory, které aktivují NK buňky nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti MHC glykoproteinů I. třídy [12,25,36-38]. NCR výrazně přispívají k vyvolání cytotoxické

odpovědi NK buněk vůči nádorovým buňkám [25,38]. Také se ukázalo, že hrají roli v imunitní odpovědi na různé viry, například influenzy, hepatitidy C a eboly [25,39-41].

1.2.2. RECEPTOR PŘIROZENÉ CYTOTOXICITY NKp30

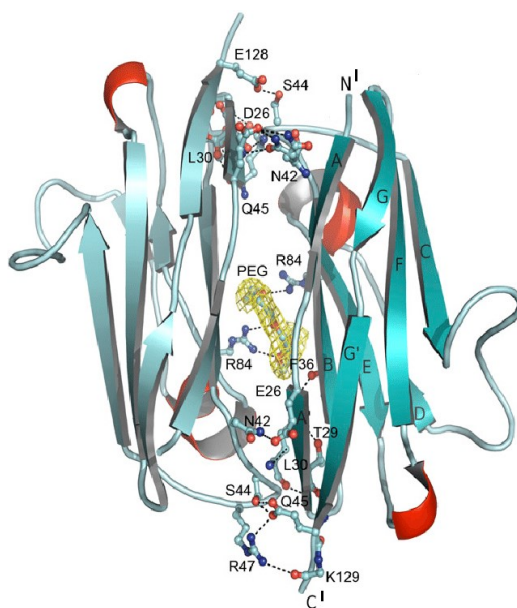
Receptor NKp30 (NCR3 nebo také CD337) je jeden z nejdůležitějších NK buněčných aktivačních receptorů. Je exprimován všemi maturovanými NK buňkami [36,42], ale pod vlivem IL-15 také T lymfocyty pupečnickové krve [42,43], nebo epiteliálními buňkami po stimulaci progesteronem [42,44]. Naopak v případě lidských monocytů, buněčné linie histocytárního lymfomu, Jurkat buněk a promyelocytárních leukemických buněk nebyla pomocí imunoblotu prokázána přítomnost mediátorové RNA (mRNA) receptoru NKp30 [36]. Bylo identifikováno 6 sestříhových variant mRNA receptoru NKp30 (Obrázek 3). Nejvíce exprimovanými jsou varianty NKp30a, NKp30b, a NKp30c, které tento receptor kódují s extracelulární doménou podobnou variabilním doménám imunoglobulinů. Naopak extracelulární domény sestříhových variant NKp30d, NKp30e, a NKp30f jsou podobné konstantním doménám imunoglobulinů [45,46]. Aktivace izoform receptorů NKp30a a NKp30b vede k produkci velkého množství IFN- γ , degranulaci a cytotoxické odpovědi NK buňky. Oproti tomu aktivace NKp30c vede primárně k produkci inhibičního cytokinu IL-10 [46,47]. Funkce izoform receptoru NKp30 z druhé trojice sestříhových variant (d, e, f) dosud studovány nebyly [46].



Obrázek 3: Sestříhové varianty receptoru NKp30.

(a) Organizace exonů genu pro receptor NKp30. (b) Exony 1 a 3 jsou přítomny ve všech jeho sestříhových variantách. Varianty NKp30a-c jsou kódovány exonem 2, zatímco varianty NKp30d-f kóduje exon 2a a exon 2b. Exon 4a kóduje varianty NKp30c a NKp30f, exon 4b pak NKp30b a NKp30d. Posledním exonem kódujícím NKp30a a NKp30e je exon 4c. Start kodony jsou označeny červeným pruhem a stop kodony pak pruhem žlutým. Převzato z [42].

Molekulová hmotnost receptoru NKp30 je přibližně 30 kDa [36]. K prvnímu vyřešení krystalové struktury o rozlišení 1,85 Å (Obrázek 4) byl použit renaturovaný receptor NKp30 exprimovaný v inkluzních těliscích v bakteriích *Escherichia coli* (*E. coli*) [48]. Extracelulární doména receptoru však obsahuje tři N-glykosylační místa: Asn-42, Asn-68 a Asn-121 [49], tudíž vzhledem k povaze expresního systému není receptor NKp30 na obrázku 4 N-glykosylován. Ligand vázající doména (LBD, z *angl. ligand binding domain*) receptoru se skládá z osmi β -skládaných listů, jednoho α -helixu a jednoho 3_{10} helixu. Mezi NCR se NKp30 spíše podobá receptoru NKp44, jehož LBD je podobná variabilním doménám imunoglobulinů, zatímco v případě NKp46 se jedná o LBD podobnou konstantním doménám imunoglobulinů. Hlavním nalezeným strukturním rozdílem mezi receptory NKp30 a NKp44 je interakce mezi listy A a G a přítomnost krátkého α -helixu mezi listy D a E v případě struktury receptoru NKp30. V rámci této struktury byl nalezen homodimer LBD s orientací protomerů otočených vůči sobě o 180° a s více než 20 interagujícími aminokyselinovými rezidui [48].

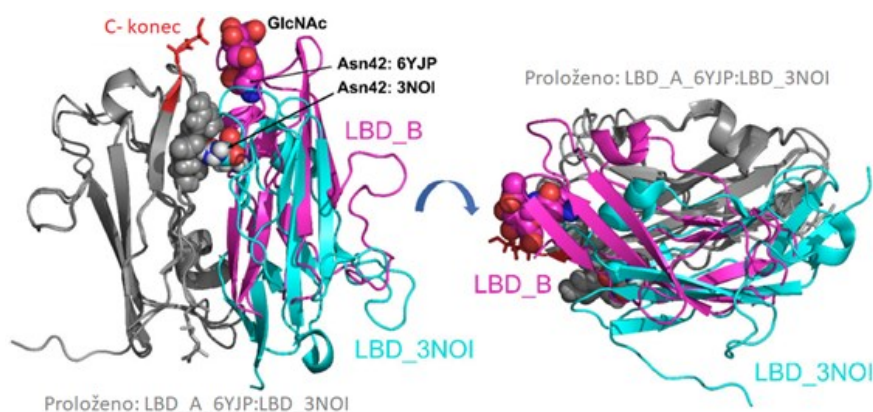


Obrázek 4: Homodimer LBD receptoru NKp30 bez přítomnosti N-glykosylace.

Protomery LBD receptoru NKp30 [kód v proteinové databance (PDB): 3NOI] jsou vůči sobě otočeny o 180°. Receptor se skládá především z β -skládaných listů, nicméně struktura obsahuje také jeden α -helix a jeden 3_{10} helix. Zvýrazněná aminokyselinová rezidua svou interakcí zprostředkovávají homodimerizaci. Mezi dvěma protomery je žlutě zvýrazněn polyethylenglykol (PEG), který byl použit při krystalizaci. Převzato a upraveno z [48].

Homodimer LBD receptoru NKp30, která byla exprimována v lidských buněčných liniích, tedy s N-glykosylací, se však strukturně liší (Obrázek 5, str. 19). I v tomto případě dochází k homodimerizaci s vzájemným otočením dvou protomerů o 180° vůči sobě, nicméně aminokyselinová rezidua jednoho protomeru jsou posunuta

o 9 až 15 Å. Důležitým rozdílem mezi těmito dvěma krystalovými strukturami je fakt, že v případě LBD bez N-glykosylace (3NOI) na obrázku 4 na str. 18, dochází v důsledku interakce s druhým protomerem k přiblížení postranního řetězce N-glykosylačního místa Asn-42 k jiným postranním řetězcům aminokyselin dimerizačního rozhraní. V případě přítomnosti N-glykosylace (6YJP) pak dochází ke sterickému bránění vzniku homodimeru s orientací, kterou zaujímá homodimer s PDB kódem 3NOI. Vzniká tak homodimer, kde se N-glykosylovaný Asn-42 nachází místo interakčního rozhraní v blízkosti C-konce druhého protomeru [50].



Obrázek 5: Porovnání dvou krystalových struktur homodimerů LBD receptoru NKp30.

Pro lepší ilustraci posunu aminokyselinových reziduí o 9-15 Å byly proloženy struktury homodimeru LBD receptoru NKp30 bez N-glykosylace (PDB kód: 3NOI) a homodimeru N-glykosylované LBD receptoru NKp30 (PDB kód: 6YJP). Jeden z protomerů obou struktur byl obarven šedou barvou, načež byly tyto dva protomery přes sebe proloženy tak, aby se co nejlépe překrývaly. Druhý z protomerů ze struktury s PDB kódem 3NOI byl obarven tyrkysovou barvou a druhý protomer ze struktury s PDB kódem 6YJP byl obarven fialovou barvou. Glykosylační místo Asn-42 bylo zvýrazněno i s navázaným N-acetylglukosaminem sférickým modelem. Vlevo je patrný Asn-42, který se v případě struktury s PDB kódem 6YJP nachází v blízkosti C-konce druhého protomeru. Naopak v případě struktury s PDB kódem 3NOI se Asn-42 nachází v dimerizačním rozhraní. Převzato a upraveno z [50].

Propojení extracelulární domény s transmembránovým α -helixem receptoru NKp30 zajišťuje 15 aminokyselin dlouhá „stalk“ doména (¹²⁹KEHPQLGAGTVLLLR¹⁴³) [51]. Ta je mimo jiné zodpovědná za přenos signálu a její přítomnost zvyšuje afinitu k vazbě ligandu [49-51]. Kladně nabitý Arg-143 zajišťuje interakci s adaptorovou molekulou CD3 ζ , čímž aktivuje další signalizaci [36,51]. Při rozpoznání ligandu dojde k zasunutí Arg-143 do membrány, kde dojde k interakci se záporně nabitým Asp CD3 ζ . Mutacemi ve „stalk“ doméně bylo dokázáno, že je tato doména pro přenos signálu klíčová. Mutace K129A, E130A, L140A, L141A a L142A vedly k výraznému snížení schopnosti signalizace tohoto receptoru. Mutace R143A signalizaci kompletně zabránila.

Oproti tomu mutace R143K signalizaci posílala, což potvrzuje, že je kladný náboj postranního řetězce aminokyseliny v poloze 143 důležitý pro přenos signálu [51].

Několik studií se věnuje vlivu přítomnosti či nepřítomnosti N-glykosylace receptoru NKp30 na jeho schopnost vázat ligandy. Studie Hartmann, J. a kol. vedla k závěru, že v případě nepřítomnosti N-glykosylace na Asn-42 v důsledku mutace N42Q nedochází k vazbě ligandu B7 homologu 6 (B7-H6) [49]. Toto zjištění je v rozporu se závěry studie Skořepa, O. a kol., kdy bylo zjištěno, že se B7-H6 váže na endoglykosidázou F1 deglykosylovaný receptor NKp30, a to se srovnatelnou afinitou jako na přirozeně N-glykosylovaný receptor. Tato endoglykosidáza však zanechává na každém N-glykosylačním místě jeden N-acetylglukosamin, tudíž nejsou tyto dvě studie přímo porovnatelné [50]. Publikace Li, Y. a kol. je další studií, která vyvrací důležitost N-glykosylace na Asn-42 receptoru NKp30. Výsledkem této práce je krystalová struktura ligand-receptorového komplexu B7-H6 s NKp30, přičemž byl tento receptor produkován v *E. coli*, tudíž nebyl glykosylovaný [52].

1.2.2.1. LIGANDY RECEPTORU NKp30

Receptor NKp30 interaguje s řadou molekul. Mezi prvními identifikovanými molekulami, které interagují s tímto receptorem patří heparin a heparansulfát, které ale působí pouze jako ko-ligandy. Podmínkou pro jejich interakci je však přítomnost N-glykosylace receptoru NKp30 [53]. Ligandy, které inhibují aktivaci tohoto receptoru jsou zejména virového původu. Patří mezi ně například hemaglutinin viru vakcinie a ektromélie [42,54], nebo pp65 lidského cytomegaloviru, který způsobuje disociaci komplexu receptoru NKp30 s adaptorovou molekulou CD3 ζ [55]. Celulárním, nově objeveným inhibičním ligandem receptoru NKp30 je galektin-3, který je exprimován některými nádorovými buňkami [56].

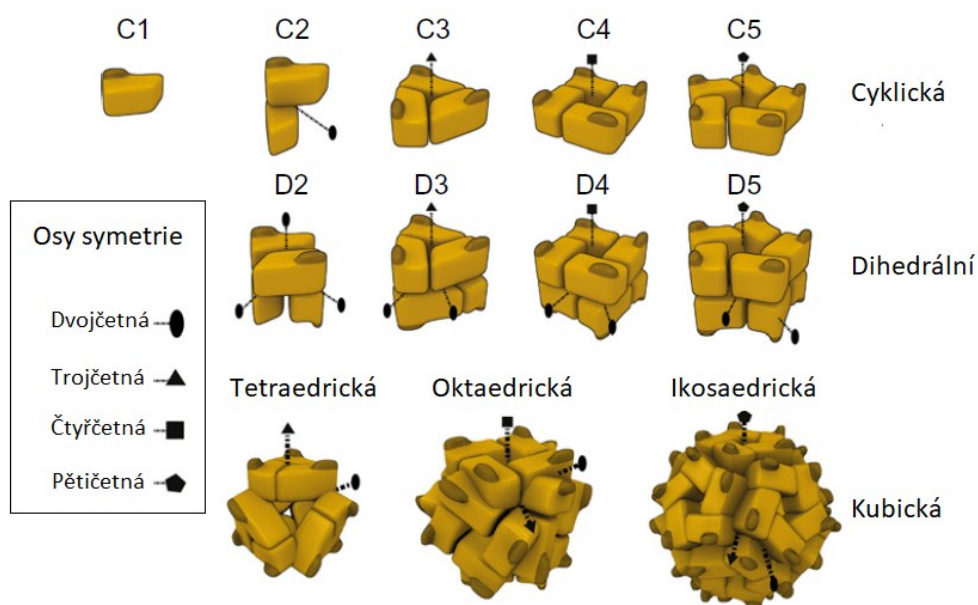
Mezi celulární aktivační ligandy receptoru NKp30 patří lidský athanogen 6 asociovaný s BCL2 (BAG-6, z *angl.* *BCL2-associated athanogene 6*) [57], který se v buňce účastní mnoha procesů: od anti-apoptického působení, přes proteosyntézu, až po sbalování proteinů. Kromě toho byl identifikován na plazmatické membráně dendritických a nádorových buněk [58]. Některé studie však zároveň ukázaly, že může působit i inhibičně [57,59].

Důležitým celulárním ligandem receptoru NKp30 je B7-H6. Strukturně nejpodobnějšími proteiny B7-H6 z rodiny B7 jsou B7-H1 a B7-H3. Jedná se o transmembránový protein, který se skládá ze dvou Ig-like domén, α -helikální transmembránové domény typu I. a C-koncové sekvence homologní ke skupinově

specifickým antigenům. B7-H6 je exprimován některými nádorovými buňkami, zatímco exprese zdravými buňkami potvrzena nebyla, což z něj dělá unikátní tumorový marker [60].

1.3. OLIGOMERIZACE PROTEINŮ

Oligomerní proteiny tvoří více než třetinu všech proteinů v buňce. Skládají se ze dvou a více polypeptidových řetězců, přičemž tyto řetězce mohou být totožné – homooligomery, nebo rozdílné – heterooligomery. Nejzastoupenější skupinou jsou homooligomery s nižším počtem protomerních jednotek. Obecně je většina homooligomerů symetrických – nejčastěji jsou cyklické, dihedrální či kubické (Obrázek 6) [61,62]. Část proteinů se nachází hlavně, nebo výhradně v oligomerním stavu. Tyto proteiny mají obvykle hodnotu rovnovážné disociační konstanty oligomerů, K_D , v nanomolárním řádu. Na druhé straně pak stojí proteiny s nižší schopností oligomerizace, jejichž K_D je v mikromolárním nebo milimolárním řádu. Oligomerizace těchto proteinů je pak závislá především na koncentraci, teplotě a pH [61,63].



Obrázek 6: Příkladů nejčastějších symetrií oligomerních proteinů.

Na obrázku je uveden přehled nejčastějších symetrií oligomerních proteinů počínaje nejjednodušší cyklickou grupou symetrie, až po nejsložitější kubickou grupu symetrie. Na obrázku jsou také vyznačeny jednotlivé rotační osy. Převzato a upraveno z [64].

Oligomerizace proteinů přináší buňce řadu výhod. Například není nutno syntetizovat jeden dlouhý transkript, ale několik kratších, čímž se snižuje pravděpodobnost chyb při transkripci. Další výhodou je, že kromě možnosti alosterické regulace oligomerních proteinů, lze aktivitu či funkci některých proteinů regulovat skrze přechod mezi protomerním a oligomerním stavem daného proteinu. V neposlední řadě

pak oligomerizace zvyšuje stabilitu proteinů a chrání je tak před degradací či denaturací [61].

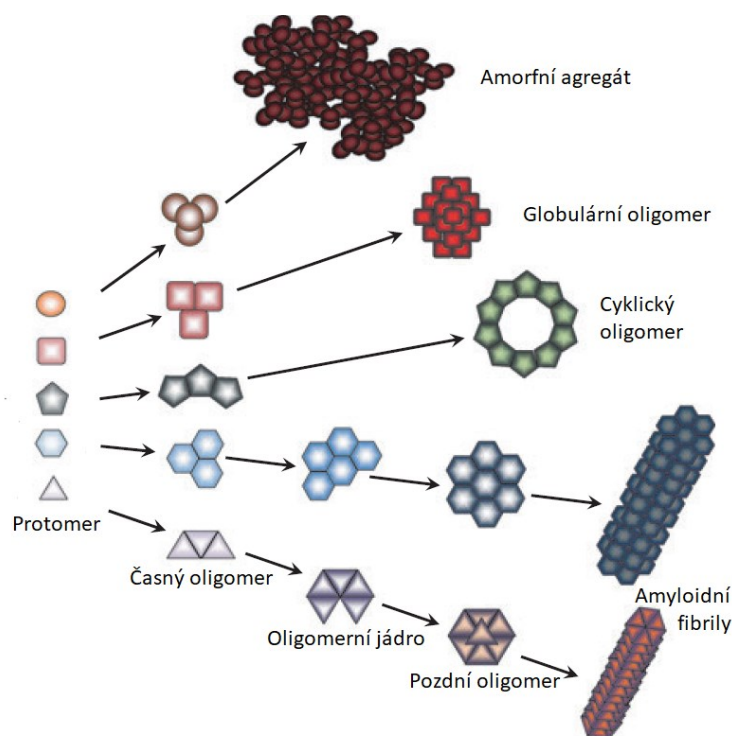
1.3.1. INTERAKČNÍ ROZHRAŇÍ

Síla interakce mezi dvěma protomery závisí zejména na ploše jejich interakčního rozhraní. Plocha interakčního rozhraní obvyklých homodimerů je větší než 1400 \AA^2 [61,65], zatímco plocha tranzientních a slabých interakcí mezi dvěma protomery je menší než 1000 \AA^2 . Nicméně v některých případech může být interakce mezi dvěma protomery silná, i když je plocha interakčního rozhraní malá [63]. V centru interakčního rozhraní se obvykle nachází konzervované polární reziduum, které je zodpovědné za většinu vazebné energie interakce mezi protomery. Interakce je zprostředkována van der Waalsovými silami a vodíkovými vazbami [61,66]. V homooligomerních interakčních rozhraních hraje důležitou roli také hydrofobní efekt, jelikož dvě třetiny všech aminokyselinových reziduí v interakčních rozhraních jsou nepolární [61,65].

1.3.2. SKLÁDÁNÍ OLIGOMERŮ

Po syntéze daného proteinu ribozomem může v případě dvoukrokového mechanismu dojít k vzájemnému kontaktu dvou protomerů, během čehož se oba proteiny složí a nabydou nativní struktury. V případě tříkrokového mechanismu pak skládání a dimerizace probíhá postupně, nikoliv zároveň. V mnoha případech se však skutečný mechanismus nachází někde mezi těmito dvěma extrémy [64]. V případě, že interakční rozhraní dvou protomerů významně zvyšuje stabilitu nativního stavu, pak je vysoce pravděpodobné, že skládání protomerů a dimerizace bude probíhat zároveň [64,65].

Jedním z nejlépe charakterizovaných mechanismů oligomerizace vyššího řádu je homotetramerizace proteinu p53. Skládá se ze dvou kroků: nejprve se dvoukrokovým mechanismem vytvoří ze dvou protomerů homodimer, načež dojde k interakci dvou složených homodimerů, která dá za vznik finálnímu homotetrameru [64,67]. Objevení tohoto mechanismu bylo dosaženo v důsledku existence určitého nastavení interakčních rozhraní jednotlivých protomerů, které spočívá v jejich rozdílných afinitách. Z toho důvodu je preferován vznik homodimeru, který posléze interaguje s druhým homodimerem a vede tak celý proces definovanou cestou, čímž je zabráněno vzniku „slepých cest“ a uvíznutí komplexu v nekompletním stavu [64,68]. V případě vzniku virových kapsid, kdy se jedná o oligomer vysokého řádu (desítky podjednotek) je dobře definovaný mechanismus složení celého komplexu ještě důležitější [64,69]. Oligomerizace vysokého řádu může vyústit ve vznik amorfního agregátu, globulárního oligomeru, cyklického oligomeru či amyloidních fibril (Obrázek 7, str. 23) [70].



Obrázek 7: Schéma oligomerizace vysokého řádu.

Zjednodušené schéma vzniku oligomerů vysokého řádu. Prvním krokem je ve všech případech vznik časného oligomeru, který může vyústit ve vznik amorfního agregátu, globulárního, nebo cyklického oligomeru. V případě vzniku amyloidních fibril vzniká z časného oligomeru oligomerní jádro, které přechází v pozdní oligomer, ze kterého se následně formují amyloidní fibrily. Převzato a upraveno z [70].

1.3.3. OLIGOMERIZACE PROTEINŮ V NEMOCI A VE ZDRAVÍ

Oligomerizace proteinů je v nemalém počtu případů spojena s vážnými onemocněními, jako například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba nebo demence s Lewyho tělísky [70]. Další velkou skupinou onemocnění spojených s oligomerizací proteinů jsou prionová onemocnění, mezi které se řadí například Creutzfeldtova–Jakobova choroba, kuru či fatální familiární insomnie [70-72]. Zmíněné nemoci vznikají v důsledku přeměny původně neškodných, rozpustných proteinů v organizované fibrilární agregáty, které se poté akumulují v tkáních, pro které je daná nemoc charakteristická [70].

Druhou stranou mince jsou případy, kdy je oligomerizace či polymerizace proteinů pro správnou funkci buňky či organismu naprosto esenciální. Aktin a tubulin jsou významné proteiny, které jsou schopny polymerizovat a tvořit tak složky cytoskeletu [73,74]. Většina tyrosinkinázových receptorů podléhá ligandem indukované dimerizaci [75,76]. Příkladem může být homodimerizace receptoru pro epidermální růstový faktor, která reguluje jeho kinázovou aktivitu [77]. Dalším obecným příkladem může být homotrimerizace receptoru pro TNF- β , která nastává po vazbě TNF- β [75,78].

1.3.4. PŘÍKLADY BIOFYZIKÁLNÍCH METOD PRO STUDIUM OLIGOMERNÍCH PROTEINŮ

Základní metodou pro charakterizaci oligomerizujících proteinů je rozměrově-vylučovací chromatografie (SEC, z *angl. size-exclusion chromatography*). Eluční profil interagujících systémů závisí na K_D oligomerů. Pokud je hodnota $K_D < 1 \mu\text{M}$ nebo $K_D > 1 \text{mM}$, pak bude eluční profil obsahovat samostatné píky odpovídající oligomeru nebo protomeru. Pokud bude hodnota K_D ležet někde mezi těmito dvěma extrémy, pak bude rychlost migrace záviset na vlastnostech jak oligomeru, tak protomeru. Eluční profil tohoto systému bude funkcí koncentrace proteinu při nástřiku na kolonu, K_D , délky kolony a její rozdělovací schopnosti [79,80].

Další důležitou technikou je analytická ultracentrifugace (AUC). V rámci této metody lze provádět dva hlavní experimenty: sedimentační rychlost a sedimentační rovnováhu. Experimentem sedimentační rychlost lze změřit sedimentační koeficient jednotlivých sedimentujících složek, s . V případě interagujících systémů je výstupem vážený průměr sedimentačního koeficientu, jelikož je sedimentační rozhraní rozšířeno vlivem difuze a heterogenity vzorku. Důkazem oligomerizace proteinu je zvětšování hodnoty s se zvyšující se koncentrací vzorku. Pomocí experimentu sedimentační rovnováha lze získat molekulovou hmotnost daného proteinu [79]. Kombinací těchto dvou experimentů lze odhadnout míru oligomerizace, popř. asymetrii (celkový tvar) sedimentující částice [79,81].

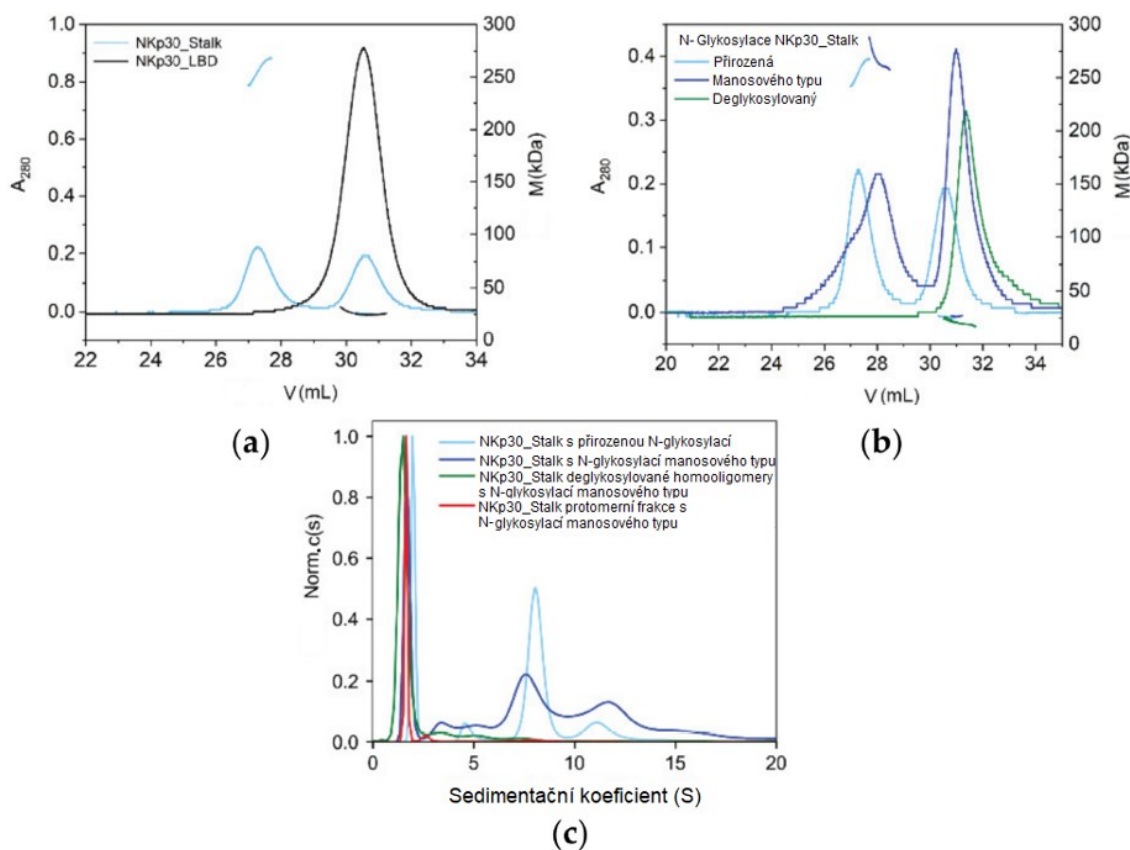
Pomocí dynamického rozptylu světla (DLS, z *angl. dynamic light scattering*) můžeme měřit fluktuace v intenzitě rozptylu, které vznikají kvůli lokálním změnám koncentrace v důsledku Brownova pohybu. Míra fluktuací souvisí s translačním difuzním koeficientem, který je funkcí velikosti a tvaru částice a je nepřímo úměrný hydrodynamickému poloměru, R_H [79,82]. Pomocí DLS lze detekovat změny R_H v důsledku agregace proteinu, či změn jeho konformace [79]. Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS, z *angl. small-angle X-ray scattering*) je další metodou, kterou lze studovat velikost a tvar proteinu v roztoku. Rentgenové záření způsobuje oscilaci elektronů, načež dojde k emisi elektromagnetického záření o shodné vlnové délce s budícím zářením. Intenzita rozptylu lze změřit kvůli rozdílu elektronové hustoty vzorku v roztoku a samotného rozpouštědla. Ačkoli lze z naměřených rozptylových dat namodelovat 3D tvar daného oligomerního proteinu, tak pro studium oligomerizace postačí možnost z rozptylových dat získat molekulovou hmotnost a gyrační poloměr [79,83]. SAXS se hodí zejména pro studium velkých oligomerů [79].

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC, z *angl. isothermal titration calorimetry*) se obvykle používá ke kvantifikaci interakcí mezi dvěma rozdílnými molekulami, nicméně pomocí ITC lze studovat i proces oligomerizace. Pokud připravíme koncentrovaný roztok oligomerního proteinu, kterým následně budeme titrovat pufr, ve kterém se nenachází žádný protein, pak toto zředění původně koncentrovaného vzorku proteinu posune rovnováhu mezi protomerní a oligomerní frakcí směrem k protomeru. Kalorimetr pak změří teplo, které bylo v rámci této disociace uvolněno nebo spotřebováno [79,84].

Kryoelektronová mikroskopie (kryo-EM) je populární metodou, pomocí které lze získat strukturu nejen oligomerních proteinů. Před samotným měřením se obvykle kvalita vzorku ověřuje pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) s negativním kontrastováním, nebo pomocí hmotnostní fotometrie (MP, z *angl. mass photometry*). MP dokáže detekovat změny v rozptylu světla v důsledku nespecifické vazby proteinů na skleněný povrch [85,86]. Nevýhodou je, že tyto dvě metody vyžadují vzorek o nižší koncentraci, než pro kryo-EM. Oligomerní proteiny tak mohou při nižších koncentracích disociovat [86]. V rámci přípravy vzorku na měření se provádí vitrifikace, jejíž správnost je pro úspěšnost měření nezbytná [86]. Nejdůležitějším parametrem pro nejlepší poměr signálu a šumu je tloušťka ledu. Čím je led tenčí, tím je poměr signálu a šumu lepší, nicméně led musí být dost tlustý na to, aby umožnil natočení částice ve všech směrech [87]. Po úspěšné vitrifikaci vzorků a samotném měření je nutno vybrat částice, ze kterých bude později rekonstruována struktura daného oligomeru. V tomto kroku může být problémem tendence proteinu agregovat či vytvářet vícero oligomerních stavů, což zvyšuje heterogenitu vzorku [86]. V současnosti lze pomocí kryo-EM dosáhnout rozlišení 1,2 Å. Toto rozlišení bylo dosaženo při řešení struktury apoferritinu [88].

1.3.5. HOMOOOLIGOMERIZACE RECEPTORU PŘIROZENÉ CYTOTOXICITY NKp30

Za určitých podmínek podléhá receptor NKp30 v roztoku homooligomerizaci. První podmínkou je přítomnost „stalk“ domény [89], druhou pak přítomnost N-glykosylace – ta přitom může být jak komplexní přirozená, tak uniformní manózového typu (Obrázek 8, str. 26) [50]. Studie Herrmann, J. a kol. ukázala, že kromě NKp30 se „stalk“ doménou podléhá homooligomerizaci i samotná LBD receptoru NKp30 [89]. Toto zjištění však nekoresponduje se závěry studie Skořepa, O. a kol., kdy LBD tvořila kromě převládajících protomerů pouze homodimery, nicméně homooligomerizaci nepodléhala (Obrázek 8, str. 26) [50]. Pomocí elektronové mikroskopie s negativním kontrastováním pomocí octanu uranulu byl změřen průměr homooligomerů NKp30, který činil 15 nm [89].



Obrázek 8: Vliv N-glykosylace na homooligomerizaci receptoru NKp30.

(a) Víceúhlový rozptyl světla spojený s rozměrově-vylučovací chromatografií potvrdil, že je pro homooligomerizaci receptoru NKp30 nezbytná přítomnost „stalk“ domény. (b) Víceúhlový rozptyl světla spojený s rozměrově-vylučovací chromatografií ukázal, že deglykosylovaný receptor NKp30 se „stalk“ doménou netvoří homooligomery. (c) Analytická ultracentrifugace rovněž potvrdila, že deglykosylace homooligomerů vede k jejich rozpadu na protomery. Převzato a upraveno z [50].

Oligomerní profil receptoru NKp30 s přirozenou komplexní N-glykosylací a „stalk“ doménou, je ve srovnání s profilem homooligomerů s uniformní N-glykosylací manóзовého typu homogennější. Nejvíce zastoupenými homooligomery receptoru NKp30 s přirozenou komplexní N-glykosylací jsou pravděpodobně homooktamery s vypočtenou molekulovou hmotností přibližně 180 kDa. Druhou nejvíce zastoupenou skupinou jsou pak homohexadekamery s vypočtenou molekulovou hmotností přibližně 320 kDa [Obrázek 8 (c)] [50]. Relativní zastoupení homooligomerní a protomerní frakce je závislé na koncentraci. Při vyšších koncentracích vzorků však nedochází ke zvětšení molekulových hmotností částic, což poukazuje na vznik homooligomerů, nežli na vznik nefunkčních agregátů [89].

2. CÍLE PRÁCE

- Příprava expresních vektorů glykosylačních mutantů NKp30_Stalk_G42, NKp30_Stalk_G68, NKp30_Stalk_G121 a trojitého glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_Triple.
- Exprese jednotlivých glykosylačních mutantů a NKp30_Stalk_Triple v buněčné linii HEK293T.
- Biofyzikální charakterizace exprimovaných proteinů s důrazem na ověření schopnosti jejich homooligomerizace.
 - SEC
 - SDS-PAGE
 - nDSF
 - Cirkulární dichroismus
 - AUC
 - SEC-MALS

3. POUŽITÝ MATERIÁL

3.1. PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY

Analytická ultracentrifuga ProteomeLab XL-I	Beckman Coulter, USA
Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety	Discovery HTL, Polsko
Automatické pipety	Pipetman Gilson, USA
Automatický pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
Automatický sběrač frakcí	Amersham Biosciences, UK
Blokový termostat LS1	VLM, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Avanti JXN-26	Beckman Coulter, USA
Centrifugační kyvety 250 ml	Nalgene, USA
Centrifugační zkumavky Oak Ridge 50 ml	Sigma-Aldrich, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Detektor pro měření indexu lomu RI-501	Shodex, Japonsko
Erlenmeyerovy baňky 2l	Simax, ČSR
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Fluorimetr Prometheus NT.48	NanoTemper, Německo
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
HPLC systém 1260 Infinity II	Agilent Technologies, USA
Inkubátor CO ₂ MCO-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Inkubátor IB-01E	JeioTech, Korea
Kahan Fuego SCS	VERKON, ČR
Kolona Indigo-NTA 5 ml	Cube Biotech, Německo
Kolona HiPrep 26/10 Desalting	Sigma-Aldrich, USA
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 Increase 3,2/300	GE Healthcare, USA
Koncentrátory Amicon Ultra – MWCO 10000	Millipore, USA
Kónické zkumavky 50 ml, 15 ml	VWR, USA
Lahve 1 l, 500 ml, 100 ml	P-LAB, ČR

Lahve čtverhranné s prodyšnými víčky 1 l, 500 ml, 50 ml	P-LAB, ČR
Laminární box Clean Air	PMV, Nizozemsko
MALS systém miniDAWN	Wyatt Technology, USA
Mikrocentrifuga miniStar silverline	VWR, USA
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mikrostříkačka HAMILTON	Hamilton, USA
Mikrozkumavky 1,5 ml	Corning Incorporated, USA
Mikrozkumavky pro PCR 500 µl	Sigma-Aldrich, USA
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
Nitrocelulosoová membrána	Pall, USA
NucleoBond Xtra Maxi	MACHEREY-NAGEL, Německo
Petriho misky	Corning, Německo
pH metr Φ 200	Beckman Coulter, USA
Plastik pro tkáňové kultury	Sigma-Aldrich, USA
Počítačka buněk CytoSmart	Corning, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Souprava pro agarózovou elektroforézu Liberty 120	Biokeystone, USA
Souprava pro izolaci DNA NucleoSpin Plasmid,	MACHEREY-NAGEL, Německo
Souprava pro izolaci DNA NucleoSpin Plasmid, mini kit	MACHEREY-NAGEL, Německo
Souprava pro izolaci DNA NucleoSpin Gel and PCR,	MACHEREY-NAGEL, Německo
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Spektrometr pro cirkulární dichroismus Chirascan Plus	Applied Photophysics, UK
Stříkačkový mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 µm	Carl Roth, Německo
System pro elektropřenos Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, Německo
Termocyklér T100	Bio-Rad, Německo
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Mini Shaking Incubator	MIULAB, Čína
Třepačka Orbi-Safe TS	Gallenkamp, UK
Varič	ETA, ČR

Vodní lázeň	Memmert, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj stejnosměrného proudu EC250-90	E-C Apparatus Corporation, UK
Zobrazovací zařízení Alliance Q9	UVITEC, UK

3.2. DNA

3.2.1. VEKTORY

pCVM_hyPBase	Sanger Institute, UK
pTW5_aFGF	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK, ČR
pTW5_p27	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK, ČR
pTW5sec_AICL	Mgr. Barbora Kalousková, Ph.D., PřF UK, ČR
pTW5sec_NKp30_Stalk_WT	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D., PřF UK, ČR
pTW5sec_NKp30_Stalk_G42,121	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D., PřF UK, ČR
pTW5sec_NKp30_Stalk_G68,121	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D., PřF UK, ČR
pTW5sec_NKp30_Stalk_G42	Bc. Matouš Tulpa, PřF UK, ČR
pTW5sec_NKp30_Stalk_G68	Bc. Matouš Tulpa, PřF UK, ČR
pTW5sec_NKp30_Stalk_G121	Bc. Matouš Tulpa, PřF UK, ČR
pTW5sec_NKp30_Stalk_Triple	Bc. Matouš Tulpa, PřF UK, ČR
pUCT7	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.
pUCT7_NKp30_Stalk_G68	Bc. Matouš Tulpa, PřF UK, ČR
pUCT7_NKp30_Stalk_Triple	Bc. Matouš Tulpa, PřF UK, ČR
PB-RB	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.

3.2.2. PRIMERY PRO PCR A SEKVENACI

Přímý primer pro gen receptoru NKp30 – pTW5sec_INF_FW

5'- TCTTGGAATTACCGGTCTGTGGGTTTCTCAG -3'

Zpětný primer pro gen receptoru NKp30 – pTW5sec_INF_REV

5'- TGGTGGTGATGGTGGGTACCCCGAAGGAGGAGGAC -3'

Přímý primer pro mutaci N68Q – NKp30_N68Q_FW

5'- AGAGGTTTCGTCAAGGAACCCCGG -3'

Zpětný primer pro mutaci N68Q – NKp30_N68Q_REV

5'- CCGGGGTTTCCTTGACGAACCTCT -3'

Přímý primer pro mutaci N121Q – NKp30_N121Q_FW

5'- TGGTACTGGCCAAGGCACTCGTC -3'

Zpětný primer pro mutaci N121Q – NKp30_N121Q_REV

5'- GACGAGTGCCTTGGCCAGTACCA -3'

Přímý primer pro přenos celé expresní kazety mezi plazmidy pTW5sec a pUCT7 – pCT5K_FW

5'- AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGGAGAACTG -3'

Zpětný primer pro přenos celé expresní kazety mezi plazmidy pTW5sec a pUCT7 – pCT5_REV

5'- CTGATCAGCGGGTTTTTCACCCGTGGTGGTGATG -3'

Přímý sekvenační primer pro plazmid pTW5sec – pTT_FW

5'- TGATATTCACCTGGCCCGATCTG -3'

Zpětný sekvenační primer pro plazmid pTW5sec – pTW5seq_REV

5'- AAGCAGCGTATCCACATAGCG -3'

Přímý sekvenační primer pro plazmid pUCT7 – pCT5seq_FW

5'- TCAGATCGCCTGGAGACG -3'

Zpětný sekvenační primer pro plazmid pUCT7 – pCT5seq_REV

5'- GTGGGAGTGGCACCTTCC -3'

3.3. BUNĚČNÉ LINIE A BAKTERIÁLNÍ KMENY

E. coli DH5α

Invitrogen, USA

E. coli TOP 10

Thermo Fisher, USA

HEK293T

A. Radu Aricescu, UK

3.4. ENZYMY

Q5 DNA polymeráza	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleáza AgeI-HF	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleáza KpnI-HF	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleáza NheI-HF	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleáza PmeI	New England Biolabs, USA
RNAza A	Lach-Ner, ČR
T4 DNA ligáza	New England Biolabs, USA
T4 DNA polymeráza	New England Biolabs, USA

3.5. PUFRY PRO ENZYMY

CutSmart pufr pro restrikční endonukleázy	New England Biolabs, USA
NEBuffer r2.1	New England Biolabs, USA
Q5 reakční pufr	New England Biolabs, USA
Q5 enhancer	New England Biolabs, USA
T4 DNA ligáza reakční pufr	New England Biolabs, USA

3.6. KULTIVAČNÍ MÉDIA

ExCell293	Komerční médium (Sigma, USA), doplněn L-glutamin do výsledné 4mM koncentrace
LB + ampicilin	LB médium + ampicilin o výsledné koncentraci 100 µg/ml
LB médium	1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4
SOB médium	2% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgSO ₄ , 10mM MgCl ₂ , pH 7,0
SOB + ampicilin	SOB médium + ampicilin o výsledné koncentraci 100 µg/ml

3.7. ROZTOKY

3.7.1. ROZTOKY PRO ELEKTROFORÉZU

Barvicí roztok pro SDS-PAGE

45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% CBB R 250

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE 10× konc.

0,25M Tris, 1,9M glycin, 1% (w/v) SDS, pH 8,3

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE

35% ethanol, 10% kyselina octová

Pufr TAE pro agarózovou elektroforézu

40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA

Roztok AA pro SDS-PAGE

29% AA, 1% N,N'-methylenbisakrylamid

Vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu

Gel loading dye, Purple (6× konc.) New England Biolabs, USA

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. neredukující

150mM Tris, 50% (v/v) glycerol, 5% (w/v) SDS, 0,025% (w/v) bromfenolová modř, 50mM NaN₃, pH 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. redukující

Vznikl přidáním 100 µl 2-merkptoethanolu k 900 µl 5× konc. neredukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE

3.7.2. ROZTOKY PRO PURIFIKACI A PŘECHOVÁVÁNÍ PROTEINŮ

Eluční pufr	50mM Na ₂ HPO ₄ , 300mM NaCl, 10mM NaN ₃ , 250mM imidazol, pH 7,5
Mobilní fáze pro SEC (HEPES)	10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH 7,5
Octanový pufr	20mM octan sodný, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH 4
PBS	50mM Na ₂ HPO ₄ , 300mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH 7,5
Preeluční pufr	50mM Na ₂ HPO ₄ , 300mM NaCl, 10mM NaN ₃ , 50mM imidazol, pH 7,5
Pufr pro cirkulární dichroismus	10mM Na ₂ HPO ₄ , 50mM NaF, pH 7,5

3.7.3. ROZTOKY PRO IMUNOBLLOT

Blokovací roztok	1% BSA v TBS pufru
ECL1	2,5mM luminol, 0,4mM <i>p</i> -kumarová kys., 100mM Tris, pH 8,8
ECL2	5,4mM H ₂ O ₂ , 100mM Tris, pH 8,8

Králičí polyklonální protilátka proti myššímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou	Sigma-Aldrich, USA
Kozí polyklonální protilátka proti myššímu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatázou	Sigma-Aldrich, USA
Myší monoklonální protilátka proti histidinové kotvě PentaHis	Qiagen, Německo
Přenosový pufr	25mM Tris, 150mM glycin, 10% methanol, pH 8,3
Pufr alkalické fosfatázy	100mM Tris, 150mM NaCl, 1mM MgCl ₂ , 10mM NaN ₃ , pH 9,0
Roztok BCIP	50 mg/ml BCIP v dimethylformamidu
Roztok NBT	50 mg/ml NBT v 70% dimethylformamidu
Roztok sušeného odtučněného mléka (10%) v TBS	
TBS pufr	10mM Tris, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH 7,5
TBS-Tween/Triton pufr	20mM Tris, 500mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100, pH 7,5

3.7.4. ROZTOKY PRO MANIPULACI S BUŇKAMI

PBS-TK	10mM Na ₂ HPO ₄ , 150mM NaCl, 2mM KCl, 10mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,0
Roztok trypanové modři	0,4% trypanová modř v PBS-TK

3.8. CHEMIKÁLIE

1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
AA	Sigma-Aldrich, USA
Agar	Oxoid, UK
Agaróza	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Biotika, SR
APS	Sigma-Aldrich, USA
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Blasticidin	Invivogen, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR

CBB R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
Dimethylsulfoxid pro TK	New England Biolabs, USA
dNTPs	Top-Bio, ČR
Doxycyklin	Serva, USA
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
Ethanol	Lach-Ner, ČR
Ethanol denaturovaný	Lach-Ner, ČR
Fluorid sodný	P-Lab, ČR
Glycerol	Lach-Ner, ČR
Glycin	Lach-Ner, ČR
Good View II	Ecoli, SR
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
Hydroxid sodný	Penta, ČR
Chlorid draselný	Lach-Ner, ČR
Chlorid hořečnatý	Lach-Ner, ČR
Chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
Imidazol	Carl Roth, Německo
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, SR
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner, ČR
Kyselina octová	Lach-Ner, ČR
Kyselina valproová	Sigma-Aldrich, USA
L-glutamin	Sigma-Aldrich, USA
L-glycin	Lach-Ner, ČR

IPEI	Polysciences, USA
Methanol	P-Lab, ČR
N,N'-methylenbisakrylamid	Serva, USA
Octan sodný	Sigma-Aldrich, ČR
PCR voda	Top-Bio, ČR
Proteinový standard Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher, USA
Puromycin	Invivogen, USA
Q5 enhancer	New England Biolabs, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Síran hořečnatý	Penta, ČR
TEMED	Serva, USA
Tris	Carl Roth, Německo
Trypanová modř	Sigma-Aldrich, USA
Trypton	Duchefa, Nizozemsko

4. METODY

4.1. PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ

Vektory nesoucí geny glykosylačních mutantů receptoru NKp30 byly připraveny metodou místně zaměřené mutagenese (SDM, z *angl. site-directed mutagenesis*), pomocí „overlap extension“ polymerázové řetězové reakce (PCR, z *angl. polymerase chain reaction*).

4.1.1. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Pro přípravu dvou úseků genů jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30, byly do mikrozkušavek pro PCR připraveny reakční směsi o celkovém objemu 50 μ l. Jednotlivé reakční směsi obsahovaly 150 ng templátové DNA, 5 μ l přímého primeru o koncentraci 5 μ M, 5 μ l zpětného primeru o koncentraci 5 μ M. Příklad použité templátové DNA a primerů byly uvedeny v tabulce 1. Dále bylo do reakční směsi přidáno 10 μ l Q5 enhanceru, 10 μ l Q5 reakčního pufru, 0,5 μ l směsi deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTPs, z *angl. deoxyribonucleotide triphosphate*) o koncentraci 10mM. Reakční směsi byly doplněny vodou pro PCR na 49,5 μ l, načež bylo přidáno 0,5 μ l DNA polymerázy Q5 o koncentraci 1000 U/ml. Následně byly mikrozkušavky vloženy do termocykléru, kde byl nastaven teplotní program: 5 min při 95 °C, následně proběhlo 30 cyklů: 30 s při 95 °C, 30 s při 55 °C, 1 min při 72 °C. Po třiceti cyklech byla směs ještě 10 min inkubována při 72 °C. Následně byla směs ochlazena na teplotu 4 °C, která byla udržována až do vyjmutí mikrozkušavek z termocykléru.

Tabulka 1: Příklad použitých primerů a templátové DNA pro PCR, k amplifikaci dvou úseků genů glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

X značí číslo Asn v aminokyselinové sekvenci receptoru NKp30, kde byla zachována N-glykosylace. Y značí číslo Asn v aminokyselinové sekvenci receptoru NKp30, kde byla provedena jednonukleotidová mutace, která vedla k změně Asn na Gln.

Glykosylační mutant		Reakce 1	Reakce 2
NKp30_Stalk_GX	Templátová DNA	pTW5sec_NKp30_Stalk_GXY	
	Přímý primer	pTW5sec_INF_FW	NKp30_NYQ_FW
	Zpětný primer	NKp30_NYQ_REV	pTW5sec_INF_REV

Poté byly dva úseky každého z amplifikovaných genů pomocí PCR spojeny. Reakční směsi obsahovaly, kromě templátové DNA a primerů, totožné komponenty ve stejných množstvích, jako při přípravě dvou úseků genů glykosylačních mutantů receptoru NKp30. Příklady použité templátové DNA a primerů byly uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Příklad použitých primerů a templátové DNA pro PCR, ke spojení dvou úseků genů glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

X značí číslo aminokyseliny Asn v sekvenci receptoru NKp30, kde byla zachována N-glykosylace.

Glykosylační mutant		Reakční směs
NKp30_Stalk_GX	Templátová DNA	Ekvimolární směs produktů Reakce 1 a Reakce 2 (Tabulka 1)
	Přímý primer	pTW5sec_INF_FW
	Zpětný primer	pTW5sec_INF_REV

4.1.2. ŠTĚPENÍ DNA RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEÁZAMI

Z plazmidu pTW5sec_AICL byl vyštěpen nežádoucí úsek DNA pomocí restrikčních endonukleáz AgeI s vysokou přesností (HF, z *angl. high fidelity*) a KpnI-HF. Reakční směs byla v mikrozkuhavce připravena smícháním 5 µg plazmidu pTW5sec_AICL, 5 U (0,5 µl) každého z enzymů, 2 µl komerčního pufru CutSmart a sterilní dH₂O, kterou byl roztok doplněn do 20 µl.

Amplifikované geny glykosylačních mutantů receptoru NKp30 byly rovněž štěpeny restrikčními endonukleázami AgeI-HF a KpnI-HF. Reakční směs v mikrozkuhavce obsahovala 0,1 µg daného genu, 2 U (0,2 µl) každého z enzymů, 2 µl komerčního pufru CutSmart a sterilní dH₂O, kterou byl roztok doplněn do 20 µl.

Analogicky jako v případě plazmidu pTW5sec_AICL, byl z plazmidu pUCT7 vyštěpen nežádoucí úsek DNA pomocí restrikčních endonukleáz NheI-HF a PmeI. Reakční směs byla v mikrozkuhavce připravena smícháním 5 µg plazmidu pUCT7, 5 U (0,5 µl) NheI-HF, 10 U (1 µl) PmeI, 2 µl komerčního pufru CutSmart a sterilní dH₂O, kterou byl roztok doplněn do 20 µl.

Reakční směsi byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C po dobu jedné hodiny. Poté byla se vzorky štěpených plazmidů a štěpených genů glykosylačních mutantů receptoru NKp30 provedena agarózová elektroforéza (4.1.3) následovaná izolací DNA z agarózového gelu (4.1.4.).

4.1.3. AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

Pro separaci a ověření přibližného množství párů bází (bp, z *angl. base pairs*) daného vzorku DNA byla používána agarózová elektroforéza. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 180 V po dobu 20 min. Výsledky byly poté vizualizovány zobrazovacím zařízením Alliance Q9.

4.1.3.1. PŘÍPRAVA AGARÓZOVÉHO GELU

Agarózový gel byl připravován v 0,8% koncentraci. Pro jeho přípravu bylo do Erlenmeyerovy baňky odměřeno 70 ml TAE pufru, do kterého bylo přidáno 0,56 g agarózy. Suspenze byla vložena do mikrovlnné trouby, kde byla přivedena k varu, během čehož došlo k rozpuštění agarózy. Po vychladnutí na přibližně 50 °C, byly do roztoku přidány 3 µl interkalačního barviva Good View II. Roztok byl poté nalit do připravené aparatury pro agarózovou elektroforézu, načež do něj byl vložen umělohmotný „hřeben“ pro formování jamek. Po ztuhnutí agarózového gelu byl „hřeben“ vyjmut. Elektrodové prostory byly poté naplněny TAE puffrem, načež byl agarózový gel přelit deionizovanou vodou (dH₂O).

4.1.3.2. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO AGARÓZOVOU ELEKTROFORÉZU

Ke vzorkům DNA o objemu 50 µl bylo přidáváno 10 µl vzorkového pufru pro agarózovou elektroforézu. Do jednotlivých jamek v agarózovém gelu bylo poté pipetováno maximálně 30 µl vzorku. Do dvou jamek bylo také přidáno 5 µl DNA standardů. Do jedné z jamek byl přidán DNA standard s úseky DNA v násobcích 100 bp, do sousední jamky DNA standard s úseky DNA v násobcích 1 kilobáze (kb). Následně byly elektrody připojeny k stejnosměrnému zdroji napětí a elektroforéza byla spuštěna.

4.1.4. IZOLACE DNA Z AGARÓZOVÉHO GELU

Pro izolaci DNA z agarózového gelu byla používána komerční souprava „NucleoSpin Gel and PCR“. Nejprve byla z agarózového gelu vyříznuta oblast, ve které se nacházel kýžený vzorek DNA. Vyříznutý kus gelu byl poté vložen do mikrozkuhavky, kde byl nejprve převrstven roztokem „NTI binding buffer“. Mikrozkuhavka byla poté vložena do blokového termostatu předehřátého na 55 °C, kde byla při této teplotě inkubována až do úplného rozpuštění agarózového gelu. Následně byl roztok převeden na kolonku, která byla vložena do mikrozkuhavky. Centrifugací celého kompletu při 11000 × g a 20 °C po dobu 1 min došlo k úplnému převedení roztoku z kolonky do mikrozkuhavky pod kolonkou, během čehož byla DNA kolonkou zachycena. Roztok byl poté z mikrozkuhavky vylit. Na kolonku bylo poté pipetováno 700 µl promývacího pufru, načež byl celý komplet centrifugován při 11000 × g a 20 °C

po dobu 1 min. Pro vyšší čistotu DNA byl promývací krok ještě jednou zopakován. Pro vysušení kolonky byl celý komplet centrifugován při $11000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 min. Pro úplné vysušení byla kolonka umístěna na 5 min do blokového termostatu předehřátého na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kolonka byla po vyjmutí z blokového termostatu umístěna do čisté mikrokumavky a bylo na ni naneseno $30\text{ }\mu\text{l}$ sterilní dH_2O předehřáté v blokovém termostatu na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, která sloužila jako eluční činidlo. Centrifugací celého kompletu při $11000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 min došlo k eluci DNA.

4.1.5. VLOŽENÍ GENU DO LINEARIZOVANÉHO PLAZMIDU POMOCÍ T4 DNA LIGÁZY

4.1.5.1. PŘÍPRAVA REAKČNÍ SMĚSI PRO LIGÁZOVOU REAKCI

Pro vložení genu jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30 do linearizovaného plazmidu pTW5sec (4.1.2.) byla použita T4 DNA ligáza. Do mikrokumavky byly připraveny reakční směsi pro ligázovou reakci o celkovém objemu $20\text{ }\mu\text{l}$. Reakční směsi obsahovaly $2\text{ }\mu\text{l}$ reakčního pufru pro T4 DNA ligázu, 60 ng linearizovaného plazmidu pTW5sec a 14 ng vkládaného genu. Roztok byl doplněn na $19\text{ }\mu\text{l}$ sterilní dH_2O , načež byl přidán $1\text{ }\mu\text{l}$ roztoku (400 U) T4 DNA ligázy.

4.1.5.2. LIGÁZOVÁ REAKCE

Reakční směs v mikrokumavce byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 min, během čehož došlo k vložení a ligaci daného genu do linearizovaného plazmidu pTW5sec. Následně byla T4 DNA ligáza inaktivována inkubací v blokovém termostatu předehřátém na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min. Roztok byl poté 5 min inkubován na ledové lázni o teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ načež jím byly transformovány kompetentní buňky (4.1.7.).

4.1.6. VLOŽENÍ GENU DO LINEARIZOVANÉHO PLAZMIDU POMOCÍ T4 DNA POLYMERÁZY

4.1.6.1. PŘÍPRAVA REAKČNÍ SMĚSI PRO LIGÁZOVOU REAKCI

Do linearizovaného plazmidu pUCT7 byly vkládány geny jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30 pomocí T4 DNA polymerázy. Do mikrokumavky byla připravena reakční směs, která obsahovala 140 ng linearizovaného plazmidu pUCT7, 30 ng vkládaného genu a $2\text{ }\mu\text{l}$ pufru NEBuffer r2.1., načež byla reakční směs doplněna do konečného objemu $19,75\text{ }\mu\text{l}$ PCR vodou.

4.1.6.2. POLYMERÁZOVÁ REAKCE

V blokovém termostatu byla v mikrozkuhavce připravena vodní lázeň o teplotě 50 °C, kam byla vložena připravená reakční směs. Následně bylo do reakční směsi (4.1.6.1) přidáno (0,75 U) T4 DNA polymerázy (0,25 µl). Polymerázová reakce probíhala při 50 °C po dobu 30 s, načež byla mikrozkuhavka s reakční směsí ihned vložena do ledové lázně o teplotě 0 °C, kde byla inkubována 5 min. Reakční směsí byly poté transformovány kompetentní buňky (4.1.7.).

4.1.7. TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK

Pro transformaci byly používány chemokompetentní buňky *E. coli* – kmeny TOP 10 a DH5α, které byly připraveny Bc. Gabrielou Chytrou. Kompetentní buňky *E. coli* TOP 10 byly používány v případě prvotní transformace daným expresním vektorem, *E. coli* DH5α pak pro transformace sloužící k přípravě zásobního množství daného expresního vektoru.

Mikrozkuhavka s kompetentními buňkami *E. coli* TOP 10 byla vyjmuta z chladicího boxu s teplotou –85 °C, načež byla umístěna do ledové lázně o teplotě 0 °C, kde byly buňky rozmrazeny. Poté bylo k 100 µl buněčné suspenze pipetováno 20 µl reakční směsi plazmidu připraveného ligázovou, nebo polymerázovou reakcí (4.1.5./4.1.6.). Buněčná suspenze byla inkubována v ledové lázni o teplotě 0 °C po dobu 20 min, načež byl proveden tepelný šok, kdy byla mikrozkuhavka umístěna na 30 s do blokového termostatu předehřátého na 42 °C. Po tepelném šoku byla mikrozkuhavka přemístěna zpět do ledové lázně, kde byla při teplotě 0 °C inkubována po dobu 5 min. Poté byla buněčná suspenze pod kahanem pipetována na Petriho misku s agarovou plotnou tvořenou SOB kultivačním médiem (SOB, z *angl. super optimal broth*), agarem o koncentraci 15 g/l s přídatkem ampicilinu o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Buněčná suspenze byla na agarové plotně rozetřena bakteriologickou kličkou, načež bylo vyčkáno, než agarová plotna vyschne. Petriho miska byla poté přesunuta do inkubátoru, kde byla inkubována po dobu 16 hodin při 37 °C.

V případě transformace kompetentních buněk *E. coli* DH5α bylo postupováno analogickým způsobem, s rozdílem, že byly kompetentní buňky transformovány 1 µg izolované plazmidové DNA (4.1.10.), ne reakční směsí plazmidu připraveného ligázovou nebo polymerázovou reakcí.

4.1.8. PCR Z BAKTERIÁLNÍCH KOLONIÍ

Nejprve bylo na agarové plotně vybráno a očíslováno několik bakteriálních kolonií *E. coli* TOP 10, ze kterých byly špičkami odebrány vzorky. V mikrozkuhavkách pro

PCR byly připraveny jednotlivé reakční směsi o celkovém objemu 20 μ l, obsahující 2 μ l přímého a 2 μ l zpětného primeru pro daný gen o 5 μ M koncentracích, 10 μ l komerčního roztoku Combi PPP Master Mix a 6 μ l PCR vody. Takto připraveným roztokem byla promyta špička, kterou byl odebrán vzorek bakteriální kolonie, čímž došlo k uvolnění bakterií do reakční směsi. Špičky byly uchovány pro následné použití při kultivaci bakterií v malém objemu (4.1.9.). Mikrozkušavky byly poté vloženy do termocykléru, kde byl nastaven teplotní program: 5 min při 95 °C, následně proběhlo 20 cyklů: 30 s při 95 °C, 30 s při 55 °C, 1 min při 72 °C. Po třiceti cyklech byla směs ještě 10 min inkubována při 72 °C, načež byla směs ochlazena na teplotu 4 °C, která byla udržována až do vyjmutí mikrozkušavek z termocykléru. Po PCR s bakteriálními koloniemi byla provedena agarózová elektroforéza (4.1.3.). Z výsledků agarózové elektroforézy byly určeny pozitivní kolonie.

4.1.9. KULTIVACE BAKTERIÍ V MALÉM OBJEMU

Do kónické zkumavky o objemu 50 ml bylo odměřeno 5 ml SOB média, do něhož byl přidán ampicilin o výsledné koncentraci 100 μ g/ml. Poté byla do kónické zkumavky vložena špička, kterou byl odebrán vzorek pozitivní kolonie *E. coli* TOP 10. Zkumavka byla poté vložena do orbitální třepačky. Kultivace bakteriální kultury probíhala při 37 °C a 200 otáčkách za minutu (RPM, z *angl. revolutions per minute*) po dobu 16 hodin.

4.1.10. NÍZKOOBJEMOVÁ IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

Kónická zkumavka s buněčnou suspenzí (4.1.9.) byla 15 min centrifugována při 4 °C a 4000 \times g. Po centrifugaci byl odlit supernatant a z bakteriální pelety byla izolována plazmidová DNA pomocí komerční soupravy „NucleoSpin Plasmid, Mini kit“.

Peleta byla nejprve resuspendována na vortexovém mixéru v 250 μ l roztoku „A1“. Suspenze byla následně převedena z kónické zkumavky do mikrozkušavky, kde byla provedena alkalická lýze buněk přidáním 250 μ l roztoku „A2“. Buněčná suspenze byla poté jemně protřepána, načež byla inkubována při 20 °C po dobu 5 min. Roztok „A2“ obsahoval acidobazický indikátor, který byl v alkalickém prostředí zbarvený modře, v neutrálním a kyselém prostředí byl bezbarvý. Následně bylo k buněčné suspenzi přidáno 300 μ l neutralizačního roztoku „A3“, načež byla suspenze opět jemně protřepána, dokud nedošlo k jejímu úplnému odbarvení. Mikrozkušavka byla poté 10 min centrifugována při 20 °C a 20000 \times g, načež byl supernatant převeden na kolonku, která byla vložena do mikrozkušavky. Celý komplet byl poté centrifugován při 11000 \times g a 20 °C po dobu 1 min, během čehož došlo k úplnému převedení roztoku z kolonky do mikrozkušavky pod kolonkou. Plazmidová DNA byla kolonkou zachycena. Roztok byl

poté z mikrozkušavky vylit. Kolonka byla následně promyta 500 μ l roztoku „AW“ a 500 μ l roztoku „A4“. Po jednotlivých promytích byl opět celý komplet centrifugován po dobu 1 min při 11000 \times g a 20 $^{\circ}$ C. Následnou centrifugací při 11000 \times g a 20 $^{\circ}$ C po dobu 2 min proběhlo částečné vysušení kolonky. Pro úplné vysušení byla kolonka umístěna na 5 min do blokového termostatu předehřátého na 70 $^{\circ}$ C. Kolonka byla po vyjmutí z blokového termostatu umístěna do čisté mikrozkušavky a bylo na ni pipetováno 50 μ l sterilní dH₂O předehřáté v blokovém termostatu na 50 $^{\circ}$ C, která sloužila jako eluční činidlo. Centrifugací celého kompletu při 11000 \times g a 20 $^{\circ}$ C po dobu 1 min došlo k eluci DNA.

4.1.11. SEKVENACE DNA

Na sekvenační analýzu byly odesílány vzorky, jež se dle PCR z bakteriálních kolonií (4.1.8.) jevíly jako pozitivní. Sekvence izolované DNA (4.1.10.) byla prováděna v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK, RNDr. Štěpánkou Hrdou. Vzorky použité pro další práci byly vybrány na základě výsledků sekvenace DNA.

4.1.11.1. PŘÍPRAVA VZORKŮ NA SEKVENACI DNA

Pro sekvenaci jednoho úseku DNA byl do dvou PCR mikrozkušavek pipetován roztok plazmidové DNA, nesoucí sekvenci daného genu, v množství odpovídajícímu 200 ng plazmidové DNA. Do první mikrozkušavky byl přidán 1 μ l přímého sekvenačního primeru pro daný plazmid o koncentraci 5 μ M, a do druhé mikrozkušavky 1 μ l zpětného sekvenačního primeru pro daný plazmid o koncentraci 5 μ M. Obě mikrozkušavky byly poté doplněny PCR vodou na celkový objem 8 μ l.

4.1.12. KULTIVACE BAKTERIÍ VE VELKÉM OBJEMU

Pro kultivaci bakterií ve velkém objemu byl používán bakteriální kmen *E. coli* DH5 α , který byl transformován danou plazmidovou DNA (4.1.10.). Špičkou byl z agarové plotny na Petriho misce odebrán vzorek z vybrané bakteriální kolonie, načež byla špička vložena do 2l Erlenmeyerovy baňky s 500 ml LB média, které obsahovalo přídavek ampicilinu o výsledné koncentraci 100 μ g/ml. Erlenmeyerova baňka byla následně vložena do orbitální třepačky, kde byla bakteriální suspenze kultivována při 37 $^{\circ}$ C a 180 RPM, po dobu 16 hodin.

4.1.13. VYSOKOOBJEMOVÁ IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

Buněčná suspenze (4.1.12.) byla po kultivaci rovnoměrně rozlita do dvou 250ml centrifugačních kyvet, kde byla následně centrifugována 15 min při 4 $^{\circ}$ C a 15000 \times g. Supernatant byl po centrifugaci odlit, načež byly k bakteriální peletě přidávány roztoky z komerční soupravy pro izolaci plazmidové DNA „NucleoBond Xtra Maxi“. Nejprve

byla bakteriální peleta resuspendována na vortexovém mixéru v 12 ml roztoku „RES“. Následně byla bakteriální suspenze přelita do 50ml kónické zkumavky, kde bylo k suspenzi přidáno 12 ml roztoku pro alkalickou lýzi buněk. Roztok pro alkalickou lýzi obsahoval acidobazický indikátor, který byl v alkalickém prostředí zbarvený modře, v neutrálním a kyselém prostředí byl bezbarvý. Zkumavka byla poté jemně protřepána, načež byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 min. Následně bylo k buněčnému lyzátu přidáno 12 ml neutralizačního roztoku, načež byla suspenze opět jemně protřepána, dokud nedošlo k jejímu úplnému odbarvení. Součástí soupravy byla také kolonka s vloženým filtračním papírem, která byla ekvilibrována 25 ml ekvilibračního roztoku. Po odkapání ekvilibračního roztoku byl na filtrační papír v kolonce nalit buněčný lyzát, kdy došlo k zachycení nerozpustné frakce filtrem. Po odkapání roztoku z kolonky byla nerozpustná frakce promyta 15 ml ekvilibračního roztoku a po odkapání ekvilibračního roztoku byl filtr se zachyceným nerozpustným lyzátem vyhozen. Na kolonku bylo poté nalito 25 ml promývacího roztoku a po jeho odkapání byla DNA eluována do 50 ml centrifugační zkumavky, přidáním 15 ml elučního roztoku. Přidáním 10,5 ml isopropanolu zchlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a třepáním na vortexovém mixéru došlo k precipitaci DNA. Suspenze byla poté centrifugována při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $20000 \times g$ po dobu 2 h, načež byl odlit supernatant a peleta DNA byla resuspendována v 4 ml 70% ethanolu zchlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suspenze byla poté opět centrifugována při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $20000 \times g$ po dobu 15 min, načež byl odlit supernatant. Následně bylo vyčkáno do úplného odpaření zbytkového ethanolu. Nakonec byla peleta DNA rozpuštěna v 1 ml sterilní dH_2O .

4.1.14. MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA

Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru DS-11+ při vlnové délce 260 nm, za použití aplikace pro měření dvouvláknové DNA. Jako slepý vzorek byla používána sterilní voda.

4.2. REKOMBINANTNÍ EXPRESE PROTEINŮ

4.2.1. BUNĚČNÁ LINIE HEK293T

Glykosylační mutanti receptoru NKp30 byli rekombinantně exprimováni v lidské embryonální ledvinné linii 293, exprimující mutovanou variantu velkého T antigenu SV40 (HEK293T, z *angl. human embryonic kidney 293, expressing a mutant version of the SV40 large T antigen*). Tato buněčná linie byla přizpůsobena pro suspenzní kultivaci a poskytovala komplexní přirozenou N-glykosylaci exprimovaných proteinů. Buněčné linie byly kultivovány v médiu ExCell293 s přidavkem L-glutaminu o výsledné koncentraci 4mM, které bylo vždy před použitím temperováno ve vodní lázni na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kultivace buněčné linie HEK293T probíhala do koncentrace v rozmezí $3 \times 10^6 - 7 \times 10^6$ buněk/ml. Kultivace, transfekce a exprese rekombinantních proteinů probíhala na orbitální třepačce při 135 RPM, 37 °C, v 5% atmosféře CO₂. Jakákoli další manipulace s buněčnou kulturou probíhala v aseptickém prostředí laminárního boxu.

4.2.1.1. ROZMRAŽENÍ BUNĚK

Kryo-zkumavka s alikvotem buněčné linie HEK293T o objemu 1 ml a koncentrací buněk 5 mil./ml byla vyjmuta z chladicího boxu o teplotě -85 °C, načež byla rozmrazena ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Buňky byly zmrazeny v 10% roztoku dimethylsulfoxidu (v/v) v médiu ExCell293. Omytí buněk od dimethylsulfoxidu bylo zajištěno pipetováním alikvotu do 10 ml média ExCell293 ve sterilní 50ml kónické zkumavce a následnou centrifugací při 20 °C po dobu 5 min při 100 × g, načež byl odlit supernatant. Buněčná peleta byla poté resuspendována v 10 ml média ExCell293 a převedena do kultivační lahve o ploše 25 cm², která byla vložena do inkubátoru bez orbitálního třepání, kde byla inkubována při 37 °C a v 5% atmosféře CO₂.

4.2.1.2. URČOVÁNÍ POČTU BUNĚK

Z buněčné kultury HEK293T byl do mikrozukavky odebrán vzorek o objemu 20 µl, ke kterému bylo přidáno 20 µl 0,4% roztoku trypanové modři v PBS-TK, načež byl vzorek pipetou promíchán a ihned pipetován do hemocytometru. Počet buněk byl poté stanoven přístrojem CytoSmart, kde byl nastaven započítávaný limit velikosti buněk v rozmezí 8 µm – 26 µm. Viabilita buněk byla určována automaticky, jako stonásobek poměru počtu živých buněk k celkovému počtu buněk ve vzorku.

4.2.1.3. PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK

Buněčná kultura HEK293T byla pasážována v případě, že koncentrace buněk v živném médiu překročila hodnotu 4 mil./ml [V případě stabilně transfekované buněčné linie pak 2 mil./ml (4.2.1.5.)]. Nejprve bylo do 50ml kónické zkumavky odebráno takové množství buněčné kultury o známé koncentraci buněk, aby počet odebraných buněk odpovídal koncentraci 0,5 mil./ml v konečném zvoleném objemu. Následně byla odebraná buněčná suspenze v kónické zkumavce centrifugována při 20 °C po dobu 5 min při 100 × g, načež byl odlit supernatant. Buněčná peleta byla poté resuspendována v takovém množství kultivačního média ExCell293, aby byla dosažena koncentrace buněk 0,5 mil./ml. Buněčná suspenze byla poté převedena do čisté lahve, která byla vložena do inkubátoru, kde byla orbitální třepačce kultivována. Výsledný objem buněčné kultury byl volen tak, aby byl zvolená lahev zaplněna nanejvýš do 40 %, čímž bylo zajištěno dostatečné provzdušnění.

4.2.1.4. VYSOKOHUSTOTNÍ TRANZIENTNÍ TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293T

Transfekce byla prováděna ve dvou variantách. První varianta transfekce byla prováděna s 800 mil. buněk, druhá pak s 400 mil. buněk. Vysokohustotní tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T probíhala v desetinném objemu následné kultivace pro expresi kýženého proteinu. V případě první, větší varianty transfekce byl nejprve z připravené buněčné kultury o známé koncentraci buněk (4.2.1.2.) odebrán objem buněčné suspenze, který odpovídal požadovanému počtu buněk. Následně byla buněčná suspenze v 50ml kónické zkumavce centrifugována při 20 °C po dobu 5 min při 100 × g, načež byl odlit supernatant. Následně byla buněčná peleta resuspendována ve 32 ml kultivačního média ExCell293, načež bylo přidáno 8 ml sterilního fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS, z *angl. phosphate buffered saline*) pro tkáňové kultury (TK), který obsahoval rozpuštěné plazmidy. Celková hmotnost rozpuštěné plazmidové DNA činila 800 µg, přičemž 88 % hmotnosti tvořil daný produkční plazmid, nesoucí gen pro kýžený glykosylační mutant receptoru NKp30, 10 % hmotnosti DNA tvořil plazmid pTW5_p27 a 2 % hmotnosti DNA tvořil plazmid pTW5_aFGF. Před přidavkem byl roztok obsahující rozpuštěné plazmidy sterilizován filtrací přes stříkačkový mikrofiltr s velikostí pórů 0,22 µm. Následně byl, za stálého třepání, k buněčné suspenzi přidán lineární polyethylenimin (IPEI) v poměru hmotnosti DNA a IPEI 1:4, ve prospěch IPEI. Buněčná suspenze byla poté inkubována v lahvi na orbitální třepače po dobu 90 min. Poté byla suspenze doplněna na celkový objem 400 ml kultivačním médiem ExCell293 a byla přidána kyselina valproová do výsledné koncentrace 2mM, penicilin do výsledné koncentrace 10 U/ml a streptomycin do výsledné koncentrace 1 µg/ml. Exprese daného proteinu poté probíhala v inkubátoru na orbitální třepače po dobu 5 dní.

V případě druhé, menší varianty transfekce byl postup analogický, nicméně množství přidávaných reagensů bylo poloviční.

4.2.1.5. PŘÍPRAVA STABILNĚ TRANSFEKOVANÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ HEK293T

Stabilně transfekované linie HEK293T využívají systém piggyBac [90]. Transfekce byla prováděna s 30 mil. buněk. Vysokohustotní stabilní transfekce buněčné linie HEK293T probíhala ve dvacetinovém objemu následné kultivace pro selekci buněk, které byly úspěšně transfekovány. Nejprve byl z připravené buněčné kultury o známé koncentraci buněk (4.2.1.2.) odebrán objem buněčné suspenze, který odpovídal 30 milionům buněk. Následně byla odebraná buněčná suspenze centrifugována při 20 °C po dobu 5 min při 100 × g v 50ml kónické zkumavce, načež byl odlit supernatant. Následně byla buněčná peleta resuspendována v 1,4 ml kultivačního média ExCell293,

načež bylo přidáno 100 µl PBS-TK, ve kterém byly rozpuštěny plazmidy. Celková hmotnost rozpuštěné plazmidové DNA činila 30 µg, přičemž 80 % hmotnosti tvořil daný produkční plazmid, který nesl gen pro kýžený glykosylační mutant receptoru NKp30, 10 % hmotnosti obsažené DNA tvořil plazmid PB-RB a 10 % hmotnosti DNA tvořil plazmid pCVM_hyPBase. Před přidavkem byl roztok obsahující rozpuštěné plazmidy sterilizován filtrací přes stříkačkový mikrofiltr s velikostí pórů 0,22 µm. Následně byl, za stálého třepání, k buněčné suspenzi přidán IPEI v poměru hmotnosti DNA a IPEI 1:4, ve prospěch IPEI. Buněčná suspenze byla poté inkubována v dvanáctijamkové destičce na orbitální třepačce po dobu 90 min. Poté byla suspenze převedena do lahve a doplněna na celkový objem 30 ml kultivačním médiem ExCell293. Po 48 hodinách byla přidána selekční antibiotika – puromycin do výsledné koncentrace 5 µg/ml a blasticidin do výsledné koncentrace 5 µg/ml. Selektce úspěšně transfekovaných buněk probíhala v několika pasážích (4.2.1.3.), dokud se viabilita buněčné kultury neustálila na hodnotách vyšších, než 97 %.

Po úspěšné selekci transfekovaných buněk byla kultura kultivována v celkovém objemu 200 ml do koncentrace buněk 2 mil./ml, nyní již bez přidavku puromycinu a blasticidinu. Expres rekombinantních proteinů, která byla indukována přidavkem doxycyklinu do výsledné koncentrace 1 µg/ml, probíhala 5 až 7 dní, nebo v závislosti na viabilitě buněčné kultury. Produkce daného proteinu byla ukončena, pokud viabilita kultury klesla pod 70 %.

4.2.1.6. SKLÍZENÍ BUNĚK

Buněčná suspenze byla po kultivaci rovnoměrně rozlita do dvou 250 ml centrifugačních kyvet, kde byla následně centrifugována 10 min při 4 °C a 15000 × g. Supernatant, který byl použit pro následnou purifikaci proteinu s histidinovou kotvou (4.2.2.), byl přefiltrován do čisté lahve přes filtr s velikostí pórů 0,22 µm. Supernatant byl následně zamražen při -20 °C, nebo ihned purifikován. Buněčná peleta byla vyhozena.

4.2.1.7. MRAŽENÍ BUNĚK

Pro přípravu jednoho alikvotu buněčné linie HEK293T určeného k zmražení byl z kultury odebrán ekvivalent, který odpovídal 5 mil. buněk. Odebraná část kultury byla v 50ml kónické zkumavce centrifugována po dobu 5 min při 100 × g, načež byl odlit supernatant. Buněčné peleta byla resuspendována v mrazicí médiu složeného z 900 µl média ExCell293 a 100 µl dimethylsulfoxidu pro TK. Suspenze byla poté převedena do kryo-zkumavky a umístěna do umělohmotné cely, která po následném vložení do mrazicího boxu s teplotou -85 °C zajišťovala optimální rychlost mražení.

4.2.2. PURIFIKACE PROTEINŮ S HISTIDINOVOU KOTVOU

Pro purifikaci exprimovaných proteinů byl proveden několikakrokový protokol, který byl složen z chelatační chromatografie, po které následovalo odsolení. Poté byl vzorek proteinu zkoncentrován a byla provedena preparativní SEC. Pro určení přítomnosti některých proteinů byla použita imunodetekce.

4.2.2.1. CHELATAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou byla k chelatační chromatografii použita kolonka Indigo-NTA 5 ml, za kterou byla při eluci zapojena odsolovací kolona HiPrep 26/10 Desalting. Obě chromatografické kolony byly připojeny k systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, z angl. *high performance liquid chromatography*) systému ÄKTAbasic. Celý chromatografický protokol probíhal při průtoku 5 ml/min, přičemž byla po celou dobu měřena vodivost vodivostním detektorem a absorbance při vlnové délce 280 nm absorbančním detektorem. Kolona pro chelatační chromatografii byla nejprve ekvilibrována 50 ml pufru PBS, načež bylo na kolonku nanášeno zfiltrované kultivační médium (4.2.1.6.), které bylo nejprve zředěno pufrům PBS v poměru 1:1. Poté byla kolonka promývána pufrům PBS, dokud nedošlo k ustálení vodivosti a absorbance při vlnové délce 280 nm. Následně proběhla preeluce, nanesením 50 ml preelučního pufru. Poté byla k HPLC systému připojena odsolovací kolona HiPrep 26/10 Desalting, místo kolony pro chelatační chromatografii, která byla následně ekvilibrována 60 ml pufru HEPES. Po ekvilibraci byla kolonka pro chelatační chromatografii připojena před odsolovací kolonu, načež byl izokraticky nanášen eluční pufr, kdy došlo k uvolnění proteinu zachyceného kolonkou. Roztok proteinu byl jímán do 15ml kónických zkumavek. Kolonka pro chelatační chromatografii byla následně promyta 50 ml octanového pufru a 50 ml pufru PBS, načež byla převedena do 20% roztoku ethanolu. Kolona HiPrep 26/10 Desalting byla promyta 60 ml HEPES pufru, načež byla také převedena do 20% roztoku ethanolu. Obě kolony byly uchovávány při 4 °C, v 20% roztoku ethanolu.

4.2.2.2. ZKONCENTROVÁNÍ PROTEINŮ

Proteiny byly koncentrovány koncentrátorem Amicon Ultra – MWCO 10000 (z angl. *molecular weight cut-off*), jehož membrána zachycuje proteiny s molekulovou hmotností vyšší, než 10 kDa. Roztok proteinu byl pipetován do horní části koncentrátoru. Několikanásobnou centrifugací při 4 °C, 4000 × g, po dobu 15 minut, byl roztok proteinu zkoncentrován do výsledného objemu 300 μl – 500 μl. Během jednotlivých centrifugačních kroků byl roztok proteinu průběžně doplňován a pipetou jemně promíchán. Po zkoncentrování byl roztok proteinu pipetován z koncentrátoru do mikrozkušavky, načež byl použit pro preparativní SEC.

4.2.2.3. PREPARATIVNÍ ROZMĚROVĚ-VYLUČOVACÍ CHROMATOGRAFIE

Pro preparativní SEC byla používána kolona Superdex 200 10/300 GL, která byla připojena k HPLC systému ÄKTAbasic. Nejprve byla kolona ekvilibrována 30 ml pufru HEPES při průtoku 0,5 ml/min. Pufř HEPES zároveň sloužil jako mobilní fáze. Následně byla pětinasobkem svého objemu promyta pufrem HEPES i nástřiková smyčka. Na kolonu byl proveden nástřik koncentrovaného vzorku proteinu (4.2.2.2.) o maximálním objemu 500 μl. Chromatografie byla prováděna izokraticky, při průtoku 0,5 ml/min. Během celé chromatografie byla absorbančním detektorem měřena absorbance při vlnové délce 280 nm a vodivostním detektorem vodivost. Jednotlivé frakce byly jímány do 15ml kónických zkumavek ručně, nebo automatickým sběračem frakcí do mikrozkušavek. Následně byla kolona promyta 30 ml pufru HEPES, načež byla převedena do 20% roztoku ethanolu, ve kterém byla při laboratorní teplotě uchovávána.

4.3. CHARAKTERIZACE PROTEINŮ

4.3.1. MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Koncentrace roztoků proteinů byla měřena spektrofotometrem DS-11+, při vlnové délce 280 nm. Do aplikace ve spektrofotometru byl zadán molární absorpční koeficient proteinu, který byl predikován z jeho aminokyselinové sekvence programem Expassy – ProtParam a jeho relativní molekulová hmotnost [91]. Jako slepý vzorek byl použit pufř HEPES, ve kterém byl daný protein uchován.

4.3.2. SDS-PAGE

Čistota proteinů byla ověřována pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírnanu sodného (SDS-PAGE, z angl. *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*). Elektroforéza probíhala 50 min při stejnosměrném napětí 200 V.

4.3.2.1. PŘÍPRAVA POLYAKRYLAMIDOVÉHO GELU S PŘÍDAVKEM SDS

Pro SDS-PAGE byl připravován 12,5% polyakrylamidový gel (PAG) o tloušťce 0,75 mm, který byl složen z části zaostřovací (horní část PAG) a části rozdělovací (spodní část PAG). Nejprve byla připravena rozdělovací část PAG, kdy bylo v 50ml kádince smícháno 1,27 ml dH₂O, 1,68 ml roztoku akrylamidu (AA) pro SDS-PAGE, 1 ml 1,5M Tris pufru o pH 8,8, 40 µl 10% roztoku dodecylsírany sodného (SDS, z *angl. sodium dodecyl sulphate*) a 2 µl tetramethylethylendiaminu (TEMED). Přídavkem 40 µl 10% roztoku peroxodisírany amonného (APS, z *angl. ammonium persulfate*) byla iniciována polymerizace. Tekutá reakční směs byla poté ihned pipetována mezi dvě elektroforetická skla, načež byla převrstvena vodou a bylo vyčkáno do jejího ztuhnutí.

Následně byl připraven zaostřovací gel, kdy bylo v 50 ml kádince smícháno 1,4 ml dH₂O, 0,5 ml roztoku AA pro SDS-PAGE, 0,25 ml 1M Tris pufru o pH 6,8, 20 µl 10% roztoku SDS, 3 µl TEMED a polymerizace byla iniciována přidáním 20 µl 10% roztoku APS. Voda nad ztuhlým rozdělovacím gelem byla odlita a opatrně vysušena filtračním papírem, načež byla mezi elektroforetická skla reakční směs pipetována. Než došlo k jejímu ztuhnutí, byl mezi elektroforetická skla vložen také plastový „hřeben“, díky čemuž došlo ke vzniku jamek, pro následné pipetování jednotlivých vzorků proteinů. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl „hřeben“ vyjmut a elektroforetická skla s PAG byla umístěna do aparatury pro SDS-PAGE, která byla naplněna elektrodoým pufrem, načež byl i gel tímto pufrem převrstven.

4.3.2.2. PŘÍPRAVA VZORKŮ NA SDS-PAGE

Byly připravovány vzorky proteinů o maximálním objemu 10 µl a obsahu proteinu do hmotnosti 3 µg. Vzorky proteinu (4.2.2.3.) byly smíseny s 5 × koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrem, načež byly vloženy do blokového termostatu předehřátého na 95 °C, kde byly inkubovány po dobu 5 min. Poté byly vzorky centrifugovány při 10000 × g a 20 °C, po dobu 1 min, načež byly pipetovány do jednotlivých jamek PAG. Do jedné z jamek byl také pipetován proteinový standard.

4.3.2.3. VIZUALIZACE PROTEINŮ V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Po dokončení elektroforézy byl PAG vyjmut z elektrodoých skel, načež byl vložen do barvicí lázně pro SDS-PAGE, kde byl barven minimálně 1 h. Následně byl vložen do odbarvovací lázně pro SDS-PAGE, kde byl ve třech krocích odbarvován po dobu minimálně 1 h. Mezi jednotlivými kroky byl odbarvovací roztok pro SDS-PAGE vyměňován. Barvení i odbarvování probíhalo za stálého míchání na orbitální třepačce při 60 RPM a laboratorní teplotě. Fotografie PAG byla pořízena zobrazovacím zařízením Alliance Q9. V případě použití pro imunoblot nebyl PAG barven.

4.3.3. IMUNOBLOT

Pro potvrzení přítomnosti některých proteinů byl použit imunoblot, kdy byly proteiny detekovány chemiluminiscenčně a kolorimetricky.

4.3.3.1. ELEKTROPŘENOS PROTEINŮ NA NITROCELULOVOVOU MEMBRÁNU

Na anodu, tedy na spodní elektrodu kazety elektropřenosového přístroje Trans-Blot Turbo na sebe bylo navrstveno 10ks nastříhaných filtračních papírů o rozměrech 10,5 cm × 8 cm, které byly smočeny v přenosovém pufru, načež na ně byla položena nitrocelulosevá membrána o rozměrech 8 cm × 6 cm a na ni, co nejrychleji po dokončení SDS-PAGE přiložen PAG, který byl převrstven dalšími deseti nastříhanými filtračními papíry, smočenými v přenosovém pufru. Z celého přenosového „sendviče“ byly průběžně válečkem důkladně odstraňovány vzduchové bubliny. Poté byla na horní stranu „sendviče“ přiložena katoda. Následně byla celá kazeta vložena do elektropřenosového přístroje. Elektropřenos probíhal 15 min, při maximálním napětí 25 V a maximálním proudu 2,5 A.

4.3.3.2. BLOKACE NITROCELULOVOVÉ MEMBRÁNY BSA A VAZBA PROTILÁTEK

Po dokončení elektropřenosu byla membrána vyjmuta z elektropřenosové kazety, načež byl na membránu vloženou do Petriho misky aplikován blokovací roztok 1% hovězího sérového albuminu (BSA, z *angl. bovine serum albumin*). Membrána byla v blokovacím roztoku ponechána přes noc v lednici, během čehož došlo k obsazení zbylých vazebných míst nitrocelulosevé membrány, aby bylo zabráněno nespecifickým interakcím protilátek s membránou. Druhý den byla nitrocelulosevá membrána 2× opláchnuta fyziologickým roztokem pufrovaným Tris-pufrem (TBS, z *angl. Tris-buffered saline*) s přídatkem detergentů Tween/Triton a poté 1× samotným TBS pufrem. Každý oplach byl prováděn přibližně 5 minut na orbitální třepačce při 60 RPM v Petriho misce. Poté bylo 5 µl alikvotu myší monoklonální protilátky proti histidinové kotvě PentaHis od firmy Qiagen zředěno do 10 ml 1% BSA v TBS pufru, načež byl tento roztok nalit na membránu. Inkubace probíhala 40 min na orbitální třepačce při 60 RPM a laboratorní teplotě. Poté byla membrána opět opláchnuta analogicky jako po její blokaci. Dále byl připraven roztok sekundárních protilátek pipetováním 5 µl králičí polyklonální protilátky proti myšimu imunoglobulinu G (IgG), konjugované s křenovou peroxidázou a 5 µl kozí polyklonální protilátky proti myšimu IgG, konjugované s alkalickou fosfatázou do 10 ml roztoku 5% sušeného odtučněného mléka v TBS. Tento roztok byl poté nalit na membránu, která byla inkubována v Petriho misce na orbitální třepačce při

60 RPM a laboratorní teplotě po dobu 40 min. Nakonec byla membrána 3× opláchnuta TBS pufrem na orbitální třepačce při 60 RPM a laboratorní teplotě, vždy po dobu 5 min.

4.3.3.3. CHEMILUMINISCENČNÍ A KOLORIMETRICKÁ DETEKCE PROTEINŮ S HISTIDINOVOU KOTVOU

Nejprve byl připraven vyvolávací roztok pro chemiluminiscenci smícháním 2 ml roztoku ECL1 a 2 ml roztoku ECL2 (*z angl. enhanced chemiluminescence*). Poté byl tento roztok nalit na membránu, která byla položena na plastové podložce, načež byla inkubována 1 min při laboratorní teplotě. Následně byl přebytečný roztok z membrány slit na plastovou podložku, která byla následně osušena a vložena spolu s membránou do zobrazovacího zařízení Alliance Q9, jímž byla detekována chemiluminiscence. Po pořízení fotografie chemiluminiscence byla membrána omyta TBS pufrem.

Do 10 ml pufru pro alkalickou fosfatázu bylo přidáno 33 μ l roztoku nitrotetrazoliové modři (NBT, *z angl. nitro-blue tetrazolium*) a 17,5 μ l roztoku 5-bromo-4-chloro-3'-indolylfosfát (BCIP), roztok byl promíchán a nalit na membránu která byla položena na plastové podložce, načež byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Následně byl přebytečný roztok z membrány slit na plastovou podložku, která byla následně osušena a vložena spolu s membránou do zobrazovacího zařízení Alliance Q9, jímž byla vyfocena.

4.3.4. ANALYTICKÁ ROZMĚROVĚ-VYLUČOVACÍ CHROMATOGRAFIE

Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL připojena k HPLC systému ÄKTAbasic byla používána pro analytickou SEC. Nejprve byla kolona při průtoku 0,5 ml/min ekvilibrována 30 ml pufru HEPES, který byl zároveň používán jako mobilní fáze. Následně byla pětinasobkem svého objemu promyta pufrem HEPES i nástřiková smyčka. Na kolonu byl proveden nástřik frakce proteinu z preparativní SEC (4.2.2.3.) o maximálním objemu 500 μ l, přičemž hmotnost proteinu nanášeného na kolonu byla rovna 200 mg. Chromatografie byla prováděna izokraticky, při průtoku 0,75 ml/min. Během celé chromatografie byla absorbančním detektorem měřena absorbance při vlnové délce 280 nm a vodivostním detektorem vodivost. Jednotlivé vzorky proteinů byly postupně analyzovány každých 30 ml eluované mobilní fáze. Po analýze byla kolona převedena do 20% roztoku ethanolu, ve kterém byla při laboratorní teplotě uchovávána.

4.3.5. NANO-DIFERENČNÍ SKENOVACÍ FLUORIMETRIE

Teplotní stabilita proteinů byla měřena pomocí nano-diferenční skenovací fluorimetrie (nDSF). Nejprve byly do mikrozkušavek připraveny vzorky protomerních frakcí (4.2.2.3.) jednotlivých proteinů o koncentraci 1 mg/ml. Poté byly

do mikrozkupek vložený skleněné kapiláry, kdy došlo v důsledku kapilární elevace k nasátí části vzorku do kapiláry. Kapiláry poté byly vloženy do fluorimetru Prometheus NT.48, kde byl nastaven teplotní program postupného zahřívání z výchozí teploty 20 °C na teplotu 95 °C, s teplotním krokem 2 °C/min. Poté byla nastavena síla excitačního laseru 25 %, načež bylo spuštěno měření. Během měření byla zaznamenávána fluorescence vzorků při vlnových délkách 330 nm a 350 nm.

4.3.6. CÍRKULÁRNÍ DICHROISMUS

Pomocí cirkulárního dichroismu bylo ověřeno správné sbalení exprimovaných glykosylačních mutantů receptoru NKp30. Měření bylo provedeno v centru BIOCEV, Dr. Tatsianou Charnavets na přístroji Chirascan Plus. Zkoncentrované vzorky protomerních frakcí proteinů (4.2.2.3.) v pufru HEPES byly převedeny do dvěstěnásobného nadbytku pufru pro cirkulární dichroismus, načež byly zkoncentrovány na koncentraci 0,2 mg/ml (4.2.2.2.), která byla následně použita při měření. Měření bylo prováděno při vlnových délkách od 190 nm do 260 nm v kyvetě s délkou absorpční dráhy 1 mm.

4.3.7. ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE

Schopnost jednotlivých proteinů homooligomerizovat byla ověřována také pomocí AUC. Do mikrozkupek byl v pufru HEPES připraven vzorek proteinu o celkovém objemu 400 µl a takové koncentraci, aby absorbance tohoto vzorku při optické dráze 1,2 cm a daném molárním absorpčním koeficientu odpovídala 1. Molární absorpční koeficient byl predikován na základě aminokyselinové sekvence daného proteinu programem ExPASy – ProtParam [91]. Provedení experimentu zajistil RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D., a to včetně vyhodnocení naměřených dat. Měření byla provedena na analytické ultracentrifuge ProteomeLab XL-I metodou sedimentační rychlosti při teplotě 20 °C a 36000 RPM. Před každým měřením byla provedena ekvilibrace centrifugy, kdy bylo vyčkáno do ustálení teploty. V závislosti na povaze vzorku (předpokládané velikosti sedimentujících částic) bylo provedeno buď 400 skenů s časovým intervalem mezi jednotlivými skeny 3 min, nebo 300 skenů s intervalem 4 min. Při jednotlivých skenech byla měřena absorbance při 280 nm.

4.3.8. VÍCEÚHLOVÝ ROZPTYL SVĚTLA SPOJENÝ S ROZMĚROVĚ-VYLUČOVACÍ CHROMATOGRAFIÍ

Pomocí víceúhlového rozptylu světla spojeného s rozměrově-vylučovací chromatografií (SEC-MALS, z *angl. size-exclusion chromatography – multi-angle light scattering*) byly homooligomery jednotlivých proteinů dále charakterizovány, a to včetně

jejich N-glykosylace. Měření byl provedeno v centru BIOCEV Mgr. Štěpánem Herynkem, který rovněž vyhodnotil naměřená data. Pro měření byla použita kolona Superdex 200 Increase 3,2/300, která byla připojena k HPLC systému 1260 Infinity II, detektor pro měření indexu lomu RI-501 a MALS systém miniDAWN. Průtok mobilní fáze, kterou tvořil pufr HEPES, byl nastaven na 0,15 ml/min. Při vyhodnocení dat byl použit inkrement indexu lomu pro proteiny s hodnotou 0,185 ml/g a pro neproteinovou složku s hodnotou 0,145 ml/g. Jako proteinový standard byl použit BSA. Objem jednotlivých nástríků se pohyboval mezi 1 μ l až 50 μ l, s celkovým obsahem proteinu mezi 50 μ g až 250 μ g.

4.3.9. TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE A KRYOELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

K pokusu o vyřešení struktury homooligomerů plně glykosylovaného receptoru NKp30 byla použita kryo-EM. Měření prováděl Dr. Alexandre Durand a Dr. Nils Marechal na půdě IGBMC Štrasburk. Nejprve bylo TEM s negativním kontrastováním pomocí uranyl acetátu ověřeno, zdali jsou rozměry homooligomerů pro kryo-EM dostatečné. Pro měření byl použit mikroskop Tecnai F20. Následně byly vzorky proteinu na mřížce pro kryo-EM vitrifikovány, načež bylo provedeno měření mikroskopem Titan Krios. Pro dosažení lepšího kontrastu musela být použita fázová destička.

5. VÝSLEDKY

Cílem této práce bylo nejprve připravit expresní vektory nesoucí geny glykosylačních mutantů receptoru NKp30, načež tyto proteiny exprimovat v buněčné linii HEK293T. Dalším krokem byla biofyzikální charakterizace těchto proteinů a posouzení jejich schopnosti homooligomerizovat. Závěrem byla s plně N-glykosylovaným receptorem NKp30 provedena kryo-EM za účelem odhalení trojrozměrné struktury jeho homooligomerů.

5.1. AMINOKYSELINOVÉ SEKvence EXPRIMOVANÝCH PROTEINŮ

Aminokyselinové sekvence nemutovaného typu receptoru NKp30 a jeho jednotlivých glykosylačních mutantů jsou uvedeny na obrázku 9. Plně N-glykosylovaný receptor NKp30 (NKp30_Stalk_WT), který byl připraven Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D., sloužil jako kontrolní protein, jehož experimentální data byly porovnávány se získanými výsledky experimentů pro jednotlivé glykosylační mutanty.

NKp30_Stalk_WT

ITGLWVSQPPEIRTELEGSSAFLPCSFNASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEVRNGTPEFRGRLAPLASSRF
LHDHQAE^HLHIRDV^RRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTGNGTRLVVEKEHPQLGAGTVLLLRGTHHHHHH
HHG

NKp30_Stalk_G42

ITGLWVSQPPEIRTELEGSSAFLPCSFNASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEVRQTPEFRGRLAPLASSRF
LHDHQAE^HLHIRDV^RRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTGQTRLVVEKEHPQLGAGTVLLLRGTHHHHHH
HHG

NKp30_Stalk_G68

ITGLWVSQPPEIRTELEGSSAFLPCSFQASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEVRNGTPEFRGRLAPLASSRF
LHDHQAE^HLHIRDV^RRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTGQTRLVVEKEHPQLGAGTVLLLRGTHHHHHH
HHG

NKp30_Stalk_G121

ITGLWVSQPPEIRTELEGSSAFLPCSFQASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEVRQTPEFRGRLAPLASSRF
LHDHQAE^HLHIRDV^RRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTGNGTRLVVEKEHPQLGAGTVLLLRGTHHHHHH
HHG

NKp30_Stalk_Triple

ITGLWVSQPPEIRTELEGSSAFLPCSFQASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEVRQTPEFRGRLAPLASSRF
LHDHQAE^HLHIRDV^RRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTGQTRLVVEKEHPQLGAGTVLLLRGTHHHHHH
HHG

Obrázek 9: Aminokyselinové sekvence glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

Zelenou barvou je vyznačena aminokyselinová sekvence jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30. Žlutou barvou byly vyznačeny cysteiny, fialovou barvou N-glykosylační místa a tyrkysovou barvou mutované asparaginy N-glykosylačních míst na glutaminy.

Proteiny byly označeny jako „NKp30_Stalk“, což značí přítomnost „stalk“ domény. „WT“ označuje přirozenou N-glykosylaci (receptor NKp30 bez mutací). „G42“, „G68“ a „G121“ značí číslo aminokyseliny Asn v sekvenci receptoru NKp30, kde byla zachována N-glykosylace a „Triple“ pak značí receptor, kde byly mutovány všechny Asn, které by mohly být N-glykosylovány, na Gln, čímž bylo kompletně zabráněno

N-glykosylaci. Molekulová hmotnost NKp30_Stalk_WT predikovaná na základě aminokyselinové sekvence bez N-glykosylací činí 15249 Da. Predikované molekulové hmotnosti dvojitých glykosylačních mutantů a NKp30_Stalk_Triple bez N-glykosylací jsou pak 15277 Da a 15291 Da. Skutečná molekulová hmotnost je však v případě NKp30_Stalk_WT a dvojitých glykosylačních mutantů v důsledku přítomnosti N-glykosylace vyšší. Ve studii Skořepa, O. a kol. byl vliv přítomnosti N-glykosylace receptoru NKp30 na celkovou molekulovou hmotnost proteinu důkladně popsán [50].

5.2. PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ

Byly připravovány expresní vektory nesoucí geny glykosylačních mutantů receptoru NKp30 (Obrázek 9, str. 55). Připravené expresní vektory určené pro vysokohustotní tranzientní transfekci buněčné linie HEK293T byly pojmenovány pTW5sec_NKp30_Stalk_G42, pTW5sec_NKp30_Stalk_G68, pTW5sec_NKp30_Stalk_G121 a pTW5sec_NKp30_Stalk_Triple. Připravené expresní vektory určené pro vysokohustotní stabilní transfekci buněčné linie HEK293T byly pojmenovány pUCT7_NKp30_Stalk_G68 a pUCT7_NKp30_Stalk_Triple.

5.2.1. PŘÍPRAVA GENŮ GLYKOSYLAČNÍCH MUTANTŮ RECEPTORU NKp30

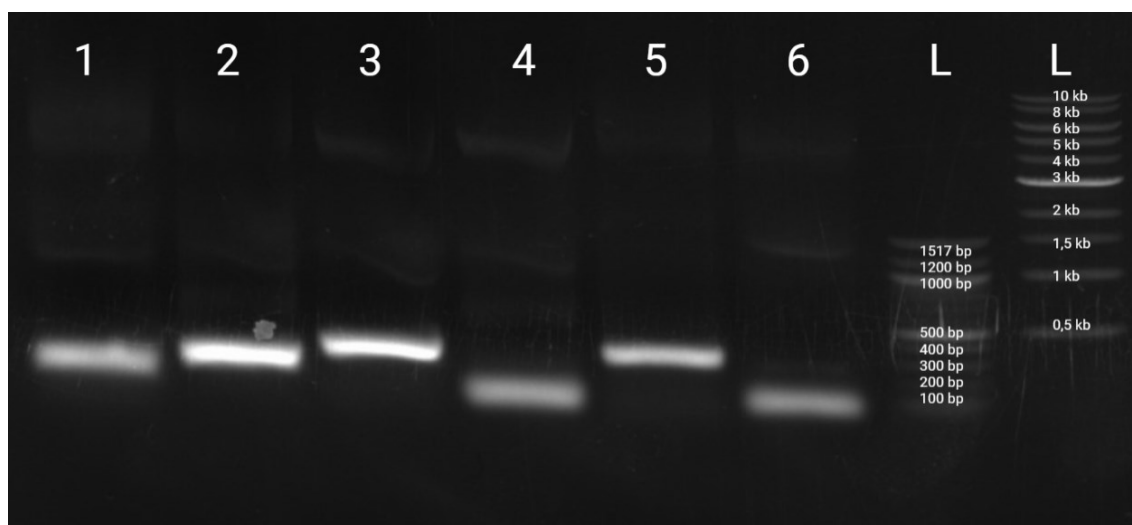
Nejprve byly připraveny dva úseky jednotlivých genů kódující glykosylační mutanty receptoru NKp30 pomocí SDM „overlap extension“ PCR (Tabulka 3). Jako DNA templáty sloužily plazmidy připravené Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D., pTW5sec_NKp30_Stalk_G68,121 a pTW5sec_NKp30_Stalk_G42,121, nesoucí geny pro NKp30_Stalk_G68,121 a NKp30_Stalk_G42,121. Konkrétní použité primery a templátové DNA jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Použité primery a templáty pro PCR k amplifikaci dvou úseků genů glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

Číslo v názvu glykosylačního mutantu následující po „G“ značí číslo Asn v aminokyselinové sekvenci receptoru NKp30, kde byla zachována N-glykosylace. Označení „N121Q“ a „N68Q“ v názvu primeru znamená číslo Asn v aminokyselinové sekvenci receptoru NKp30, kde byla provedena jednonukleotidová mutace, která vedla k změně Asn na Gln.

Glykosylační mutant	---	Reakční směs 1	Reakční směs 2
NKp30_Stalk_G42	Templ. DNA	pTW5sec NKp30 Stalk G42,121	
	Přímý primer	pTW5sec INF FW	NKp30_N121Q_FW
	Zpětný primer	NKp30_N121Q_REV	pTW5sec_INF_REV
NKp30_Stalk_G68	Templ. DNA	pTW5sec NKp30 Stalk G68,121	
	Přímý primer	pTW5sec INF FW	NKp30_N121Q_FW
	Zpětný primer	NKp30_N121Q_REV	pTW5sec_INF_REV
NKp30_Stalk_G121	Templ. DNA	pTW5sec NKp30 Stalk G68,121	
	Přímý primer	pTW5sec INF FW	NKp30_N68Q_FW
	Zpětný primer	NKp30_N68Q_REV	pTW5sec_INF_REV

Poté byla provedena agarózová elektroforéza, načež byly detekovány pruhy, které odpovídaly předpokládané velikosti jednotlivých úseků genů glykosylačních mutantů receptoru NKp30 (Obrázek 10). DNA byla poté z agarózového gelu izolována.



Obrázek 10: Agarózový gel s amplifikovanými dvěma úseky genů jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

Jednotlivé jamky tohoto agarózového gelu byly plněny reakčními směsmi uvedenými v tabulce 3 na str. 56. Do každé jamky byla pipetována pouze jedna reakční směs. Jamky 1 a 2 obsahovaly reakční směs 1 a 2 glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G121. Předpokládaná velikost úseků amplifikovaných v reakční směsi 1 a 2 byla 176 bp a 258 bp. Jamky 3 a 4 obsahovaly reakční směs 1 a 2 glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G42. Předpokládaná velikost úseků amplifikovaných v reakční směsi 1 a 2 byla 335 bp a 99 bp. Jamky 5 a 6 obsahovaly reakční směs 1 a 2 glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G68. Předpokládaná velikost úseků amplifikovaných v reakční směsi 1 a 2 byla 335 bp a 99 bp. Jamky označené písmeny L obsahovaly DNA standardy. Je patrné, že všechny amplifikované úseky genů odpovídají předpokládaným velikostem.

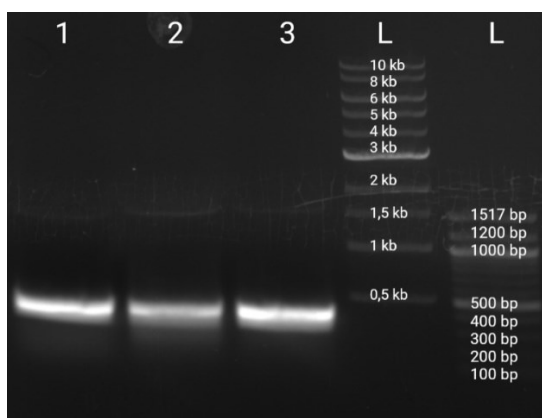
Následně byly dva amplifikované úseky jednotlivých genů pomocí PCR spojeny (Tabulka 4), kdy byla jako templátová DNA použita ekvimolární směs produktů Reakce 1 a Reakce 2 z tabulky 3 na str. 56.

Tabulka 4: Použité primery a templátové DNA pro PCR ke spojení dvou úseků genů glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

Číslo v názvu glykosylačního mutantu následující po „G“ značí číslo Asn v aminokyselinové sekvenci receptoru NKp30, kde byla zachována N-glykosylace.

Glykosylační mutant	---	Reakční směs
NKp30_Stalk_G42 NKp30_Stalk_G68 NKp30_Stalk_G121	Templátová DNA	Příslušná ekvimolární směs produktů Reakce 1 a Reakce 2 (Tabulka 3)
	Přímý primer	pTW5sec_INF_FW
	Zpětný primer	pTW5sec_INF_REV

Následně byla opět provedena agarózová elektroforéza, kdy byly detekovány pruhy odpovídající předpokládaným velikostem jednotlivých genů – 411 bp (Obrázek 11), načež byla DNA z agarózového gelu izolována.

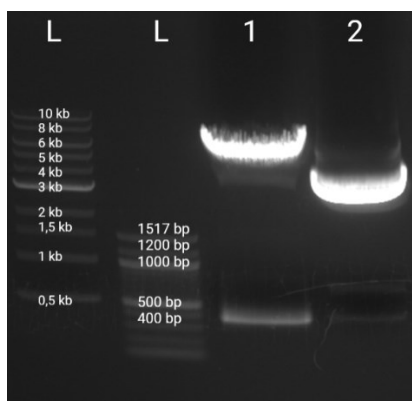


Obrázek 11: Agarózový gel s amplifikovanými geny jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

Do jamek agarózového gelu byly pipetovány reakční směsi uvedené v tabulce 4 na str. 57. Jamka 1 obsahovala amplifikovaný gen glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G121. Jamka 2 obsahovala amplifikovaný gen glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G42 a do jamky 3 byl pipetován amplifikovaný gen glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G68. Jamky označené písmeny L obsahovaly DNA standardy. Všechny amplifikované geny odpovídají předpokládaným velikostem 411 bp.

5.2.2. LINEARIZACE PLAZMIDU RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEÁZAMI

Z plazmidu pTW5sec_AICL byl restrikčními endonukleázami AgeI-HF a KpnI-HF vyštěpen gen „AICL“ o velikosti 367 bp, načež byla provedena agarózová elektroforéza (Obrázek 12).



Obrázek 12: Agarózový gel s linearizovaným plazmidem pTW5sec_AICL.

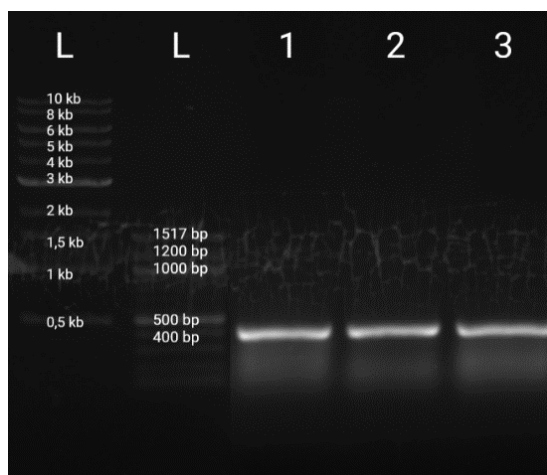
Do jamky 1 byl pipetován restrikčními endonukleázami AgeI-HF a KpnI-HF linearizovaný plazmid pTW5sec_AICL, ze kterého byl vyštěpen gen pro „AICL“ o velikosti 367 bp. Do jamky 2 byl pipetován kontrolní vzorek plazmidu pTW5sec_AICL, který nebyl restrikčními endonukleázami linearizován. Jamky označené písmeny L obsahovaly DNA standardy. Je patrné, že došlo k vyštěpení genu pro „AICL“, jelikož je v dráze 1 patrný pruh o předpokládané velikosti.

Z plazmidu pUCT7 byl restrikcími endonukleázami NheI-HF a PmeI vyštěpen úsek o velikosti 31 bp, načež byla rovněž provedena agarózová elektroforéza (Obrázek 17, str. 64).

Následně byla v obou případech provedena izolace DNA z agarózového gelu.

5.2.3. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLAZMIDŮ NESOUCÍCH GENY JEDNOTLIVÝCH GLYKOSYLAČNÍCH MUTANTŮ RECEPTORU NKp30

Pomocí T4 ligázy byly do linearizovaného plazmidu pTW5sec vloženy připravené geny pro jednotlivé glykosylační mutanty receptoru NKp30. Následně byly takto připravenými expresními vektory transformovány chemokompetentní buňky *E. coli* TOP 10, které byly následně kultivovány v Petriho misce na agarové plotně. Poté byla provedena PCR z bakteriálních kolonií, kde byly detekovány pruhy, jejichž velikost odpovídala předpokládané velikosti jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30 – 411 bp (Obrázek 13). Pro PCR z bakteriálních kolonií byl použit přímý primer pTW5sec_INF_FW a zpětný primer pTW5sec_INF_REV.



Obrázek 13: Agarózový gel s amplifikovanými geny jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30 pomocí PCR s bakteriálními koloniemi.

Do jamky 1 byla pipetována reakční směs PCR z bakteriálních kolonií pro glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G121. Do jamky 2 byla pipetována reakční směs PCR z bakteriálních kolonií pro glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G42 a do jamky 3 byla pipetována reakční směs PCR z bakteriálních kolonií pro glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G68. Do jamek označených písmenou L byly pipetovány DNA standardy. Je patrné, že bakteriální kolonie, ze kterých byly amplifikovány pomocí PCR jednotlivé geny glykosylačních mutantů receptoru NKp30 dané geny obsahovaly, jelikož velikost pruhů odpovídá předpokládané velikosti genů glykosylačních mutantů 411 bp.

Následně byly provedeny kultivace bakterií *E. coli* TOP10, které nesly expresní vektory glykosylačních mutantů, v malém objemu, následované nízkoobjemovými izolacemi plazmidové DNA. Vzorokly takto izolované DNA byly poté odeslány na

sekvenační analýzu do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Sekvenační analýza potvrdila shodu nukleotidových sekvencí jednotlivých vzorků se sekvencemi jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

Poté byly provedeny vysokoobjemové kultivace bakterií *E. coli* DH5 α , které nesly expresní vektory jednotlivých glykosylačních mutantů, následované vysokoobjemovými izolacemi plazmidové DNA, čímž byla získána zásobní množství expresních vektorů.

5.2.4. PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU NESOUCÍHO GEN NKp30_STALK_TRIPLE

Trojité glykosylační mutant receptoru NKp30 (NKp30_Stalk_Triple) byl připravován jako kontrolní protein, jehož výsledky biofyzikálních měření měly být porovnávány s výsledky získanými pro dvojité glykosylační mutanty NKp30_Stalk_G42, NKp30_Stalk_G68 a NKp30_Stalk_G121 a plně N-glykosylovaný NKp30_Stalk_WT.

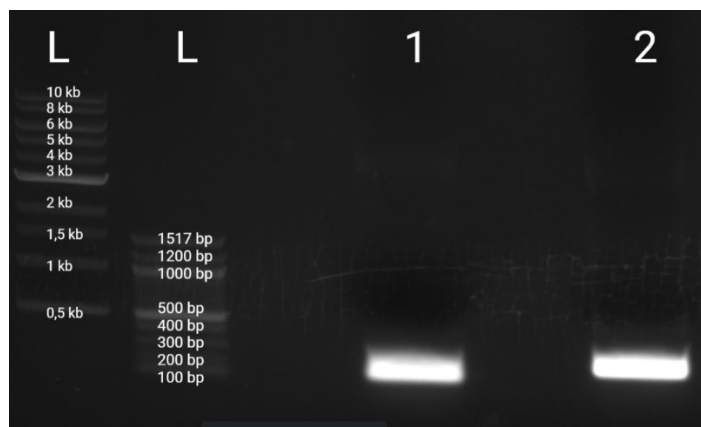
5.2.4.1. PŘÍPRAVA GENU NKp30_STALK_TRIPLE

Příprava genu NKp30_Stalk_Triple probíhala analogicky jako v případě dvojitých glykosylačních mutantů. Nejprve byly amplifikovány dva úseky jeho genu pomocí SDM „overlap extension“ PCR (Tabulka 5). Jako templát sloužil plazmid pTW5sec_NKp30_Stalk_G68. Poté byla provedena agarózová elektroforéza, kde byly detekovány pruhy jejichž velikost odpovídala předpokládané velikosti dvou úseků genu pro trojitého glykosylačního mutantu receptoru NKp30 (Obrázek 14, str. 61). Následně byla provedena izolace DNA z agarózového gelu.

Tabulka 5: Použité primery a templát pro PCR k amplifikaci dvou úseků genu NKp30_Stalk_Triple.

Označení „Triple“ značí receptor, kde byly mutovány všechny Asn na Gln, čímž bylo kompletně zabráněno N-glykosylaci. Označení „N68Q“ v názvu primeru znamená číslo Asn v aminokyselinové sekvenci receptoru NKp30, kde byla provedena jednonukleotidová mutace, která vedla k změně Asn na Gln.

Glykosylační mutant		Reakce 1	Reakce 2
NKp30_Stalk_Triple	Templátová DNA	pTW5sec_NKp30_Stalk_G68	
	Přímý primer	pTW5sec_INF_FW	NKp30_N68Q_FW
	Zpětný primer	NKp30_N68Q_REV	pTW5sec_INF_REV



Obrázek 14: Agarózový gel s amplifikovanými dvěma úseky genu NKp30_Stalk_Triple.

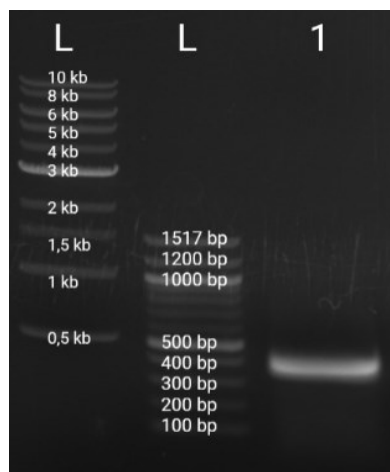
Jamky tohoto agarózového gelu byly plněny reakčními směsmi uvedenými v tabulce 5 na str. 60. Do každé jamky byla pipetována pouze jedna reakční směs. Jamky 1 a 2 obsahovaly reakční směs 1 a 2 trojitého glykosylačního mutanta receptoru NKp30. Do jamek označených písmeny L byly pipetovány DNA standardy. Předpokládané velikosti amplifikovaných úseků genu v jamkách 1 a 2 byly 176 bp a 258 bp. Je patrné, že velikosti pruhů odpovídají předpokládaným velikostem jednotlivých úseků genu trojitého glykosylačního mutanta.

Následně byly dva amplifikované úseky genu pro trojitého glykosylačního mutanta pomocí PCR spojeny (Tabulka 6), kdy byla jako templátová DNA použita ekvimolární směs produktů Reakce 1 a Reakce 2 z tabulky 5 na str. 60. Poté byla opět provedena agarózová elektroforéza, kde byl detekován pruh, jehož velikost odpovídala předpokládané velikosti genu pro NKp30_Stalk_Triple – 411 bp (Obrázek 15, str. 62). Následně byla rovněž provedena izolace DNA z agarózového gelu.

Tabulka 6: Použité primery a templátová DNA pro PCR ke spojení dvou úseků genu NKp30_Stalk_Triple.

Označení „Triple“ značí receptor, kde byly mutovány všechny Asn na Gln, čímž bylo kompletně zabráněno N-glykosylaci.

Glykosylační mutant		Reakční směs
NKp30_Stalk_Triple	Templátová DNA	Ekvimolární směs produktů Reakce 1 a Reakce 2 (Tabulka 5)
	Přímý primer	pTW5sec_INF_FW
	Zpětný primer	pTW5sec_INF_REV



Obrázek 15: Agarózový gel s amplifikovaným genem NKp30_Stalk_Triple.

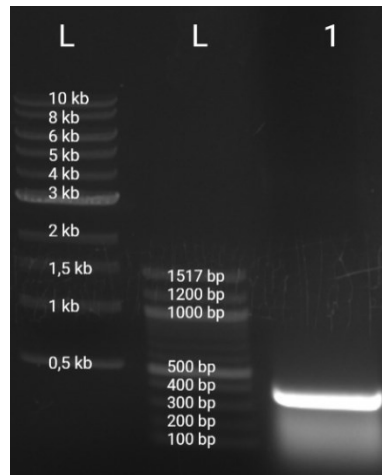
Do jamek agarózového gelu byly pipetovány reakční směsi uvedené v tabulce 6 na str. 61. Jamka 1 obsahovala amplifikovaný gen trojitého glykosylačního mutanta, NKp30_Stalk_Triple. Do jamek označených písmeny L byly pipetovány DNA standardy. Velikost pruhu v dráze 1 odpovídá předpokládané velikosti genu trojitého glykosylačního mutanta, 411 bp.

5.2.4.2. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLAZMIDU NESOUCÍHO GEN NKP30_STALK_TRIPLE

Pomocí T4 ligázy byl do linearizovaného plazmidu pTW5sec vložen připravený gen pro NKp30_Stalk_Triple. Poté byly takto připraveným expresním vektorem transformovány chemokompetentní buňky *E. coli* TOP 10, které byly následně kultivovány v Petriho misce na agarové plotně. Poté byla provedena PCR z bakteriálních kolonií, kde byl detekován pruh, jehož velikost odpovídala předpokládané velikosti NKp30_Stalk_Triple – 411 bp (Obrázek 16, str. 63). Jako přímý primer pro PCR z bakteriálních kolonií byl použit pTW5sec_INF_FW a jako zpětný primer byl použit pTW5sec_INF_REV.

Poté byly provedeny kultivace bakterií *E. coli* TOP10, které byly transformovány připraveným plazmidem pTW5sec_NKp30_Stalk_Triple. Následně byla provedena nízkoobjemová izolace plazmidové DNA, načež byly vzorky izolované DNA odeslány na sekvenační analýzu do Laboratoře sekvenace DNA PŘF UK. Sekvenační analýza potvrdila shodu nukleotidové sekvence genu vloženého do izolovaného plazmidu se sekvencí genu NKp30_Stalk_Triple.

Následně byly provedeny vysokoobjemové kultivace bakterií *E. coli* DH5 α , které byly transformovány izolovaným plazmidem pTW5sec_NKp30_Stalk_Triple. Poté byla provedena vysokoobjemová izolace plazmidové DNA, čímž bylo získáno zásobní množství tohoto plazmidu.



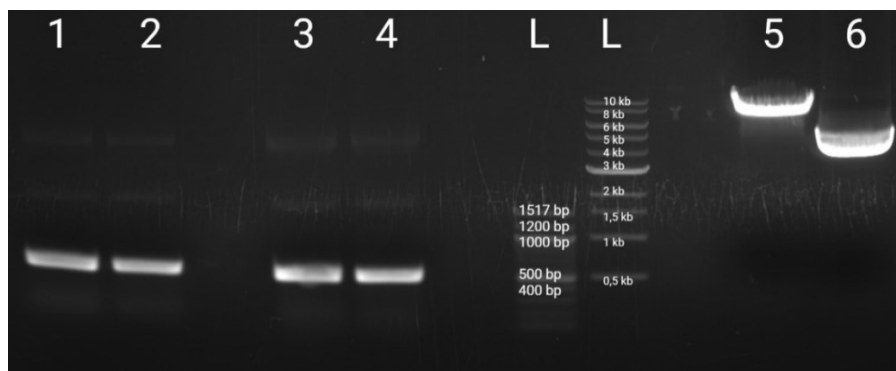
Obrázek 16: Agarózový gel s amplifikovaným genem NKp30_Stalk_Triple pomocí PCR s bakteriálními koloniemi.

Do jamky 1 byla pipetována reakční směs PCR z bakteriálních kolonií pro glykosylačního mutanta NKp30_Stalk_G121. Do jamek označených písmeny L byly pipetovány DNA standardy. Bakteriální kolonie, ze které byl pomocí PCR amplifikován gen trojitého glykosylačního mutanta receptoru NKp30, daný gen obsahovala, jelikož velikost pruhu odpovídá předpokládané velikosti genu trojitého glykosylačního mutanta, která činí 411 bp.

5.2.5. PŘÍPRAVA PLAZMIDŮ PRO VYSOKOHUSTOTNÍ STABILNÍ TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293T

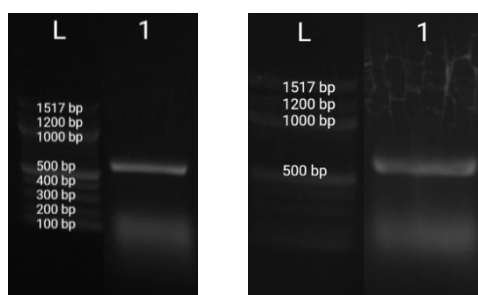
Z důvodu nízkých výtěžků glykosylačních mutantů NKp30_Stalk_G68 a NKp30_Stalk_Triple pomocí tranzientní transfekce buněk HEK293T (5.3.1.2./5.3.1.4.) bylo nutné expresní kazety obou proteinů přenést do linearizovaného plazmidu pUCT7, který umožňuje stabilní transfekci buněčné linie HEK293T využívající systém piggyBac. Tento plazmid byl v minulosti připraven v naší laboratoři úpravou plazmidu PB-T-PAF [90], do jehož expresní kazety byla vložena sekvence UCOE CBX3 [92], která potlačuje umlčování genů. Transfekce tímto plazmidem společně s plazmidy PB-RB [90] a pCVM_hyPBase umožňuje přípravu stabilně transfekovaných buněčných linií s indukovatelnou expresí rekombinantních proteinů [93].

Expresní kazety nesoucí geny těchto proteinů byly amplifikovány pomocí PCR. Poté byla provedena agarózová elektroforéza, kde byly detekovány pruhy odpovídající délkám jednotlivých expresních kazet – 513 bp. Amplifikované geny byly izolovány z agarózového gelu, načež byly pomocí T4 DNA polymerázy vloženy do plazmidu pUCT7, který byl linearizován restrikcími endonukleázami NheI-HF a PmeI (Obrázek 17, str. 64).



Obrázek 17: Agarózový gel s amplifikovanými expresními kazetami genů glykosylačních mutantů NKp30_Stalk_G68 a NKp30_Stalk_Triple a s linearizovaným plazmidem pUCT7. Do jamek 1 a 2 byla pipetována pomocí PCR amplifikovaná expresní kazeta proteinu NKp30_Stalk_G68. Do jamek 3 a 4 pak amplifikovaná expresní kazeta NKp30_Stalk_Triple. Předpokládaná velikost obou amplifikovaných expresních kazet byla 513 bp. Do jamky 5 byl pipetován restrikčními endonukleázami NheI-HF a PmeI linearizovaný plazmid pUCT7, ze kterého byl vyštěpen úsek o velikosti 31 bp. Do jamky číslo 6 byl pipetován kontrolní vzorek plazmidu pUCT7, který nebyl restrikčními endonukleázami linearizován. Jamky označené písmeny L obsahovaly DNA standardy.

Následně byly takto připravenými plazmidy pUCT7_NKp30_Stalk_G68 a pUCT7_NKp30_Stalk_Triple transformovány chemokompetentní buňky *E. coli* TOP 10, které byly poté kultivovány v Petriho misce na agarové plotně. Poté byly provedeny PCR z bakteriálních kolonií, kde byly detekovány pruhy, jejichž velikost odpovídala předpokládané velikosti expresních kazet NKp30_Stalk_G68 a NKp30_Stalk_Triple – 513 bp (Obrázek 18). Jako přímý primer pro PCR z bakteriálních kolonií byl použit pCT5K_FW a jako zpětný primer byl použit pCT5_REV.



Obrázek 18: Agarózový gel s amplifikovaným genem glykosylačních mutantů NKp30_Stalk_G68 (vlevo) a NKp30_Stalk_Triple (vpravo) pomocí PCR s bakteriálními koloniemi.

Do jamek číslo 1 byla pipetována reakční směs PCR z bakteriálních kolonií pro glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G68 (vlevo) a NKp30_Stalk_Triple (vpravo). Do jamek označených písmeny L byly pipetovány DNA standardy. Bakteriální kolonie, ze které byly pomocí PCR amplifikovány expresní kazety NKp30_Stalk_G68 a NKp30_Stalk_Triple, dané expresní kazety obsahovaly, jelikož velikost pruhu odpovídá předpokládané velikosti těchto expresních kazet – 513 bp.

Poté byly provedeny kultivace bakterií *E. coli* TOP10 nesoucích expresní vektory NKp30_Stalk_G68 a NKp30_Stalk_Triple v malém objemu, následované nízkooobjemovými izolacemi plazmidové DNA. Vzorky izolované DNA byly následně odeslány na sekvenační analýzu do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Sekvenační analýza potvrdila shodu nukleotidových sekvencí jednotlivých vzorků se sekvencemi genů pro NKp30_Stalk_G68 a NKp30_Stalk_Triple.

Poté byly provedeny kultivace bakterií, které nesly expresní vektory glykosylačních mutantů, ve velkém objemu, následované vysokoobjemovými izolacemi plazmidové DNA, čímž byla získána zásobní množství expresních vektorů.

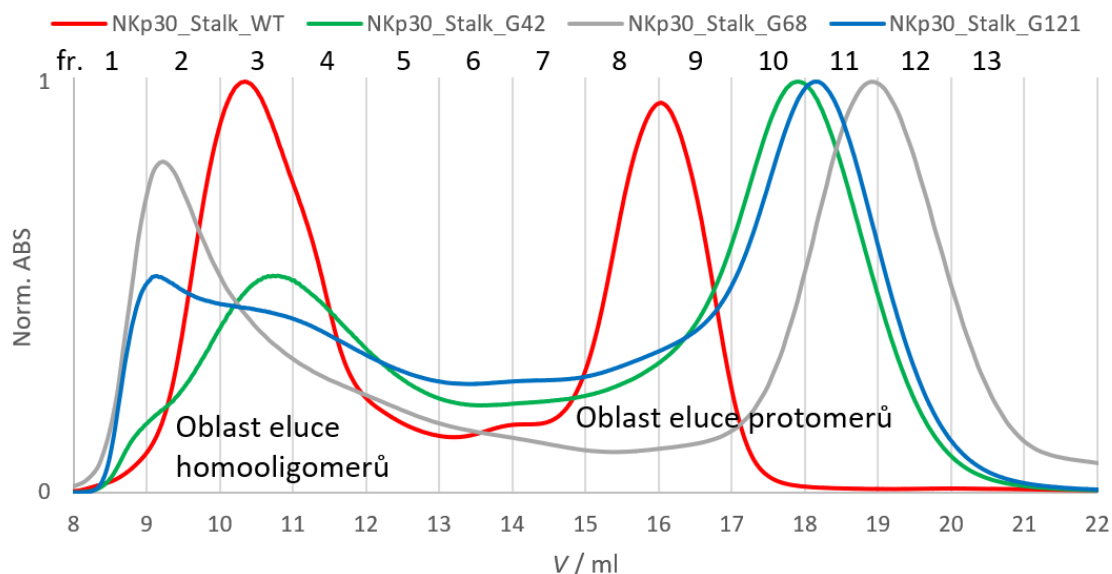
5.3. REKOMBINANTNÍ EXPRESE A PURIFIKACE GLYKOSYLAČNÍCH MUTANTŮ RECEPTORU NKp30

Pro rekombinantní expresi jednotlivých glykosylačních mutantů a NKp30_Stalk_Triple byla použita vysokohustotní tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T příslušnými plazmidy. Po pětidenní kultivaci byly buněčné linie sklizeny. Expresní vektory pTW5sec, které nesly geny jednotlivých glykosylačních mutantů a NKp30_Stalk_Triple, obsahovaly ve své nukleotidové sekvenci signál pro sekreci exprimovaného proteinu do extracelulárního prostoru, v tomto případě tedy do kultivačního média. Z toho důvodu byla při sklizení buněk buněčná peleta po centrifugaci vyhozena, zatímco supernatant byl zfiltrován a purifikován chelatační chromatografií kolonkou Indigo-NTA 5 ml.

Po eluci puforem s obsahem imidazolu a odsolení kolonkou HiPrep 26/10 Desalting byly jednotlivé vzorky purifikovaných proteinů zkoncentrovány koncentrátorem Amicon Ultra – MWCO 10000. Poté byly provedeny preparativní SEC (Obrázek 19, str. 66), za použití kolony Superdex 200 10/300 GL, kdy byly během SEC každého z proteinů jímány frakce o objemu 1 ml, a to od elučního objemu 8 ml. Poté byly změřeny koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích. Následně byla s každým proteinem provedena SDS-PAGE, kdy byly do jednotlivých jamek pipetovány vzorky z najímaných frakcí z preparativní SEC.

Z chromatogramů preparativní SEC s normalizovanou absorbancí na obrázku 19 na str. 66 je patrné, že největší množství oligomerů tvoří NKp30_Stalk_WT. Obdobného elučního profilu NKp30_Stalk_WT bylo dosaženo v publikaci Skořepa, O. a kol. (1.3.5.) [50]. Nejpodobnější eluční profil s NKp30_Stalk_WT má protein NKp30_Stalk_G42. Určité množství homooligomerů také obsahoval vzorek NKp30_Stalk_121, nicméně počáteční tvar křivky zřejmě ovlivnila agregace tohoto

proteinu. Chromatogram odpovídající NKp30_Stalk_G68 je odlišný od zbývajících chromatogramů. Tvar křivky je výrazně ovlivněn agregací proteinu a poloha maxima elučního objemu v oblasti eluce protomerů se od zbylých glykosylačních mutantů výrazně odlišuje. Pomocí SDS-PAGE byla potvrzena přítomnost tohoto proteinu pouze v oblasti eluce protomerů (5.3.1.2.). SDS-PAGE nemutovaného receptoru NKp30 (NKp30_Stalk_WT) nebyla provedena, jelikož přítomnost homooligomerů tohoto proteinu byla potvrzena v publikaci Skořepa, O. a kol. [50].



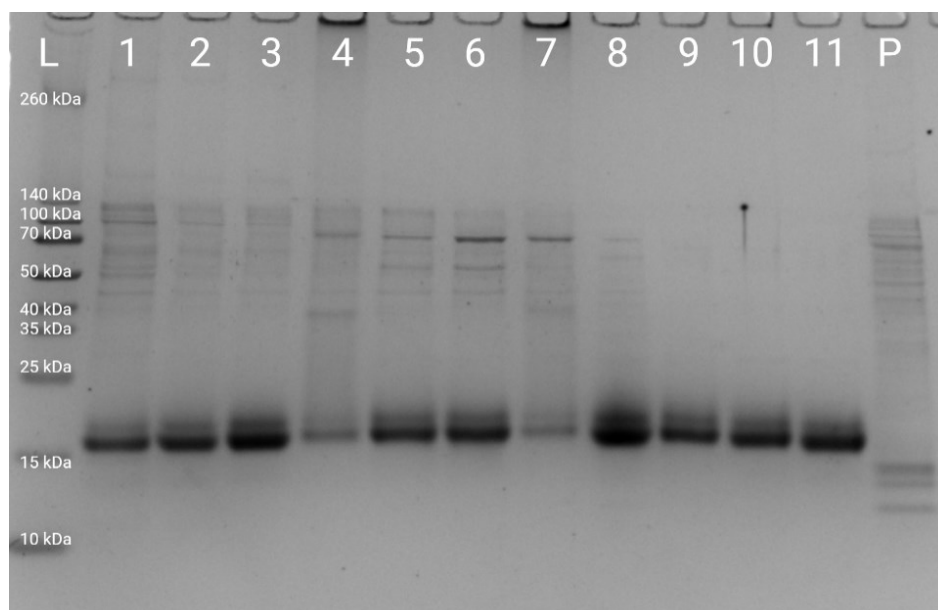
Obrázek 19: Chromatogramy preparativních SEC NKp30_Stalk_WT a jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30.

Jednotlivé proložené chromatogramy preparativní SEC, která byla provedena kolonou Superdex 200 10/300 GL v pufru HEPES, ukazují rozdílnou míru schopnosti analyzovaných proteinů homooligomerizovat. Na ose Y byly vyneseny hodnoty normalizované absorbance při 280 nm (Norm. ABS) a na ose X byl vynesel eluční objem (V). Nejvyšší homooligomerizace byla zaznamenána u nemutovaného receptoru NKp30 – NKp30_Stalk_WT (červená). Velmi podobný eluční profil má pak NKp30_Stalk_G42 (zelená). Agregace zřejmě ovlivnila eluční profil proteinu NKp30_Stalk_G121 (modrá), nicméně i v tomto případě docházelo k homooligomerizaci. Glykosylační mutant NKp30_Stalk_G68 (šedivá) má ve srovnání s ostatními proteiny odlišný eluční profil, kdy SDS-PAGE potvrdila přítomnost malého množství NKp30_Stalk_G68 ve frakcích z oblasti eluce homooligomerů (5.3.1.2.). Svislé čáry oddělují jednotlivé jímané frakce o objemu 1 ml.

5.3.1.1. NKp30_STALK_G42

Glykosylační mutant NKp30_Stalk_G42 byl rovněž úspěšně exprimován pomocí vysokohustotní tranzientní transfekcí buněčné linie HEK293T s výtěžkem 15 mg na litr buněčné suspenze. Po purifikaci a preparativní SEC tohoto proteinu byla provedena SDS-PAGE (Obrázek 20, str. 67), kdy byly vzorky připravovány za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Je patrné, že se protein nacházel v každé z najímaných

frakcí, nicméně ve frakcích číslo 4 a 7 byl obsažen v menším množství. Ve vzorku z buněčné pelety tento protein obsažen nebyl. Z neznámého důvodu je však zejména prvních sedm frakcí znečištěno jinými, neznámými proteiny.

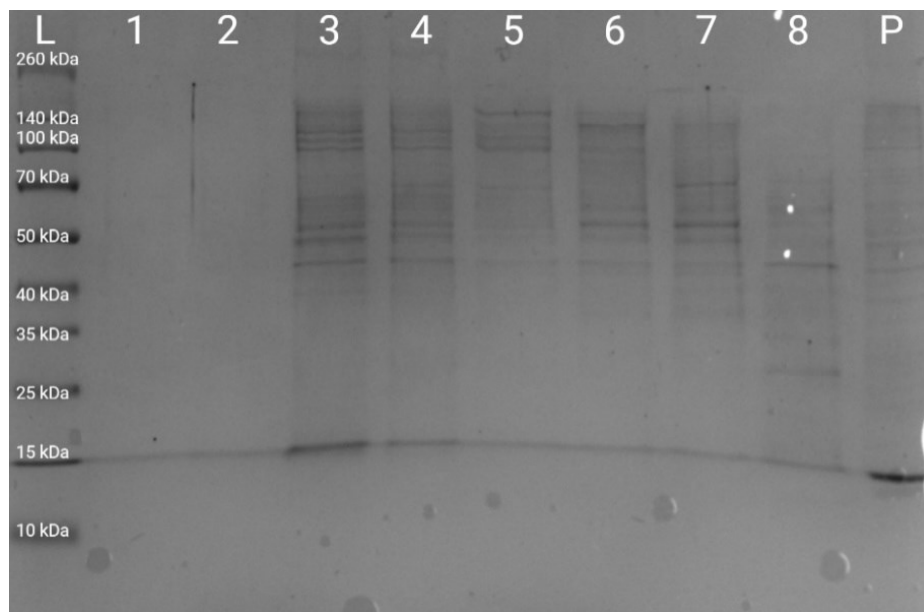


Obrázek 20: SDS-PAGE glykosylačního mutanta NKp30_Stalk_G42.

Do jamky označené písmenem L byl pipetován proteinový standard. Do jamek označených čísly 1 až 11 byly ve shodném číselném pořadí pipetovány jednotlivé frakce preparativní SEC (frakce 1 až 11). Do jamky označené písmenem P byl pipetován vzorek buněčné pelety. Jednotlivé vzorky byly připraveny za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinu NKp30_Stalk_G42 bez N-glykosylace byla přibližně 15,3 kDa. Lze si všimnout, že množství proteinu ve frakcích číslo 4 a 7 je nižší než v případě ostatních frakcí. Frakce 1 až 7 obsahovaly neznámé kontaminující proteiny o vyšších molekulových hmotnostech. Pruhy jednotlivých vzorků frakcí preparativní SEC jsou rozmazané kvůli komplexní N-glykosylaci tohoto proteinu.

5.3.1.2. NKp30_STALK_G68

Produkce glykosylačního mutanta NKp30_Stalk_G68 pomocí vysokohustotní tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T nebyla úspěšná, jelikož výtěžek proteinu byl nižší, než 1 mg na litr buněčné suspenze. Po purifikaci a preparativní SEC tohoto proteinu byla provedena SDS-PAGE (Obrázek 21, str. 68), kdy byly vzorky připravovány za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Ze snímku gelu lze odhadnout, že se protein nacházel pouze v drahách číslo 3, 4, 8 a také v dráze označené písmenem P, tedy v buněčné peletě. Chromatogram preparativní SEC z tohoto druhu produkce proteinu nebyl uveden.

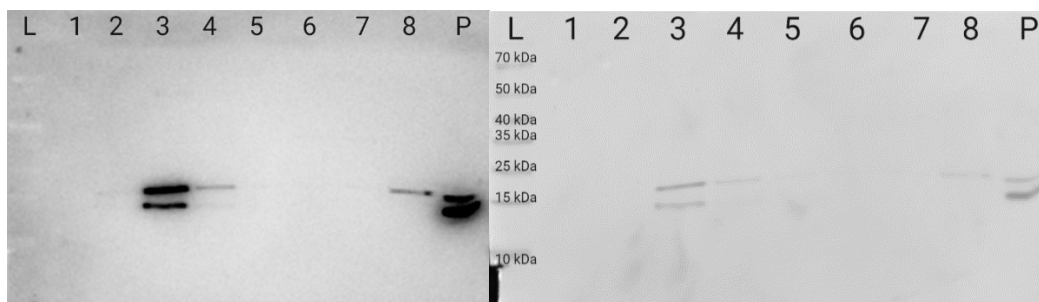


Obrázek 21: SDS-PAGE glykosylačního mutanta NKp30_Stalk_G68.

Do jamky označené písmenem L byl pipetován proteinový standard. Do jamek označených číslicemi 1 až 8 byly pipetovány frakce preparativní SEC, v některých případech byla do jedné jamky pipetována ekvimolární směs několika frakcí najednou, kvůli nízké koncentraci daného proteinu. Do jamek 1 až 4 byly pipetovány vzorky z jednotlivých frakcí 1 až 4 ve shodném číselném pořadí. Do jamky číslo 5 byla pipetována ekvimolární směs frakcí 5 a 6, do jamky číslo 6 a 7 byly pipetovány frakce 7 a 8. Do jamky číslo 8 byla pipetována ekvimolární směs frakcí 9, 10 a 11. Do jamky označené písmenem P byl pipetován vzorek buněčné pelety, kde si lze všimnout přítomnosti kýženého proteinu. Ve frakcích 3 až 8 jsou přítomny neznámé kontaminující proteiny o vyšší molekulové hmotnosti. Je také patrné, že množství proteinu je celkově nízké, jelikož jeho exprese nebyla úspěšná. Jednotlivé vzorky byly připraveny za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinu NKp30_Stalk_G68 bez N-glykosylace byla přibližně 15,3 kDa.

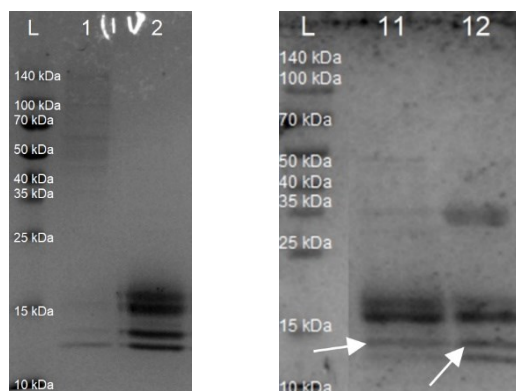
Přítomnost kýženého proteinu byla ověřena imunoblotem s chemiluminiscenční a kolorimetrickou detekcí. Pro elektropřenos na nitrocelulosovou membránu byl použit duplicitní SDS PAG, který byl připravován souběžně s gelem na obrázku 21. Z obrázku 22 na str. 69 je patrné, že se protein NKp30_Stalk_G68 nacházel v drahách 3 a 4, které obsahovaly frakce z preparativní SEC číslo 3 a 4. Dále se nacházel v dráze 8, kam byla pipetována ekvimolární směs frakcí 9, 10 a 11. Přítomnost proteinu byla ve významném množství potvrzena také v buněčné peletě (dráha P), což naznačuje, že protein precipitoval.

Z důvodu nízkého výtěžku tohoto proteinu byl jeho gen vložen do plazmidu pUCT7. Následně byla připravena stabilně transfekovaná buněčná linie HEK293T, načež byla indukována exprese proteinu. Výtěžek činil pouze 2 mg na litr buněčné suspenze. Poté byla provedena SDS-PAGE (Obrázek 23, str. 69).



Obrázek 22: Imunoblot glykosylačního mutanta NKp30_Stalk_G68 s chemiluminiscenční detekcí (vlevo) a s kolorimetrickou detekcí (vpravo).

Snímky nitrocelulosové membrány po imunoblotu. Proteiny byly na membránu přeneseny z SDS PAG, který byl duplikátem gelu na obrázku 21 na str. 68. V dráze označené písmenem L byl přenesen proteinový standard. V drahách označených číslicemi 1 až 8 byly přeneseny frakce preparativní SEC, kdy v některých případech byla do jedné jamky původního SDS PAG pipetována ekvimolární směs několika frakcí najednou. V drahách 1 až 4 byly přeneseny vzorky z jednotlivých frakcí 1 až 4 ve shodném číselném pořadí. V dráze číslo 5 byla přenesena ekvimolární směs frakcí 5 a 6, v dráze číslo 6 a 7 byly přeneseny frakce 7 a 8. V dráze číslo 8 byla přenesena ekvimolární směs frakcí 9, 10 a 11. V dráze označené písmenem P byl přenesen vzorek buněčné pelety. Předpokládaná molekulová hmotnost NKp30_Stalk_G68 bez N-glykosylace byla přibližně 15,3 kDa.



Obrázek 23: SDS-PAGE glykosylačního mutanta NKp30_Stalk_G68 exprimovaného stabilně transfekovanými buňkami HEK293T.

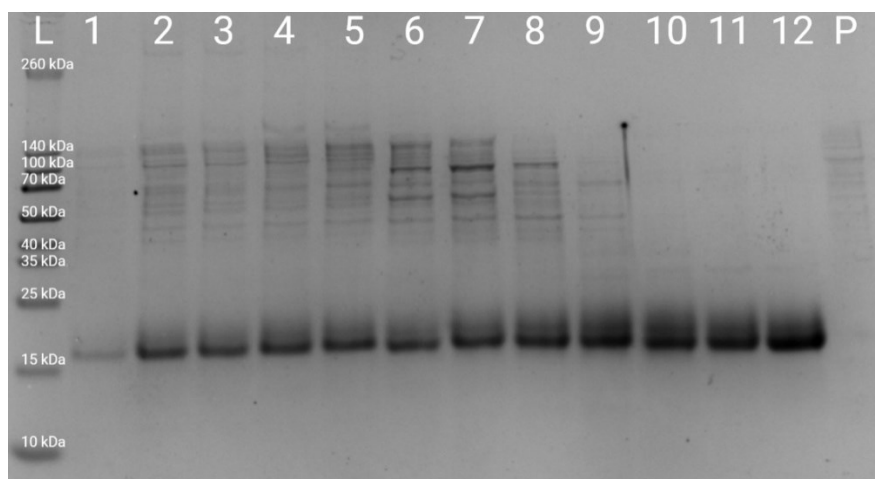
Do jamek označených písmeny L byl pipetován proteinový standard. (Vlevo) Do jamky označené číslicí 1 byl z důvodu nízkých koncentrací jednotlivých frakcí pipetován směsný vzorek frakcí 1 až 9 z preparativní SEC. Do jamky označené číslicí 2 byl pipetován směsný vzorek frakcí 10 až 13. (Vpravo) Do jamek označených čísly 11 a 12 byly pipetovány frakce 11 a 12 z preparativní SEC. Jednotlivé vzorky byly připraveny za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinu NKp30_Stalk_G68 byla bez N-glykosylace přibližně 15,3 kDa. Pruh vzorku frakce 11 a 12 z preparativní SEC je rozmazán kvůli komplexní N-glykosylaci tohoto proteinu. Kýžený protein se v majoritním zastoupení nachází pouze ve frakcích číslo 10 až 13. Kromě pruhu, který přísluší samotnému proteinu se v drahách 2, 11 a 12 nachází také jeden pruh neznámého proteinu navíc (označen šipkou).

Z obrázku 23 je vidět, že se NKp30_Stalk_G68 nachází především ve frakcích 10 až 13 z preparativní SEC (Obrázek 19, str. 66), nicméně je ve frakci 12 znečištěn jinými, neznámými proteiny. NKp30_Stalk_G68 téměř není zastoupen ve frakcích číslo 1 až 9.

Pro další experimenty byla používána frakce číslo 11, jelikož byla méně znečištěna neznámými proteiny.

5.3.1.3. NKp30_STALK_G121

Glykosylační mutant NKp30_Stalk_G121 byl úspěšně exprimován pomocí vysokohustotní tranzientní transfekcí buněčné linie HEK293T s výtěžkem 9 mg na litr buněčné suspenze. Po purifikaci a preparativní SEC tohoto proteinu byla provedena SDS-PAGE, kdy byly vzorky připravovány za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Ze snímku gelu na obrázku 24 je patrné, že se protein nacházel v každé z najímaných frakcí, nicméně ve frakci číslo 1 byl obsažen v menším množství. Ve vzorku z buněčné pelety tento protein obsažen nebyl. Z neznámého důvodu je však zejména prvních devět frakcí významně znečištěno jinými, neznámými proteiny, a to výrazněji než v případě proteinu NKp30_Stalk_G42 (Obrázek 20, str. 67).



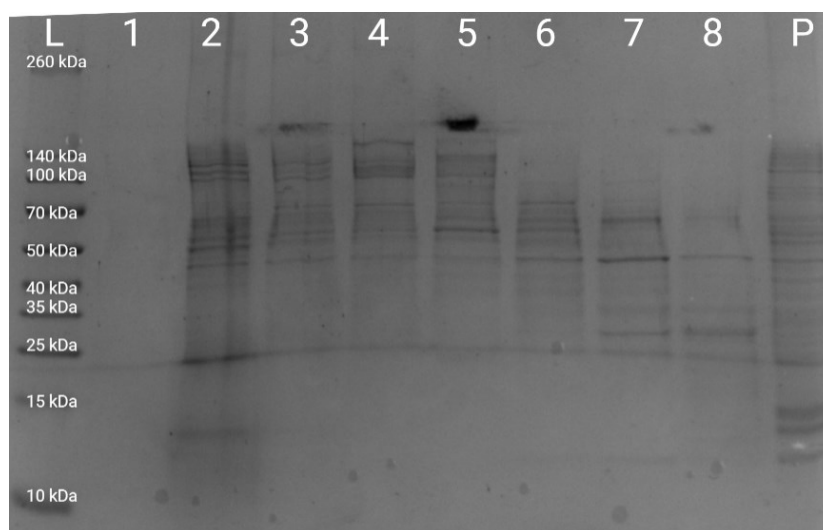
Obrázek 24: SDS-PAGE glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G121.

Do jamky označené písmenem L byl pipetován proteinový standard. Do jamek označených čísly 1 až 12 byly ve shodném číselném pořadí pipetovány jednotlivé frakce preparativní SEC (frakce 1 až 12). Do jamky označené písmenem P byl pipetován vzorek buněčné pelety. Jednotlivé vzorky byly připraveny za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinu NKp30_Stalk_G121 bez N-glykosylace byla přibližně 15,3 kDa. Je patrné, že množství proteinu ve frakci číslo 1 je nižší než v případě ostatních frakcí. Frakce 1 až 9 obsahovaly neznámé kontaminující proteiny o vyšších molekulových hmotnostech. Pruhy jednotlivých vzorků frakcí preparativní SEC jsou rozmazány kvůli komplexní N-glykosylaci tohoto proteinu.

5.3.1.4. NKp30_STALK_TRIPLE

Expese trojitého glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_G68 za použití vysokohustotní tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T také nebyla úspěšná, jelikož výtěžek proteinu byl nižší, než 1 mg na litr buněčné suspenze. Po purifikaci a preparativní SEC tohoto proteinu byla provedena SDS-PAGE (Obrázek 25, str. 71), kdy byly vzorky připravovány za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE.

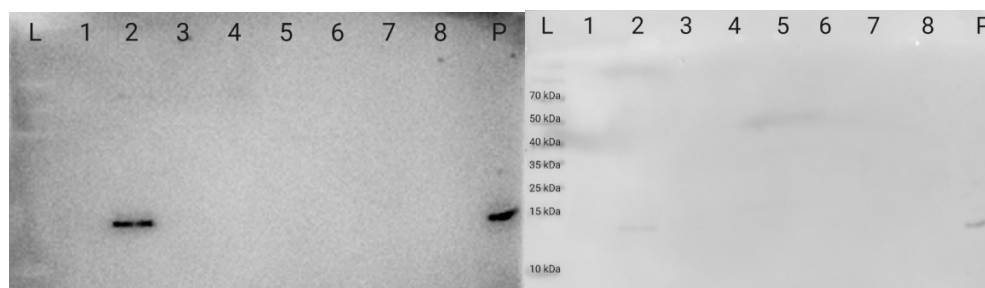
Ze snímku gelu lze odhadnout, že se protein nacházel pouze v dráze číslo 2 a také ve vzorku buněčné pelety, který se nacházel v dráze označené písmenem P. Chromatogram této preparativní SEC nebyl uveden.



Obrázek 25: SDS-PAGE trojitého glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_Triple.

Do jamky označené písmenem L byl pipetován proteinový standard. Do jamek označených číslicemi 1 až 8 byly pipetovány frakce preparativní SEC, v některých případech byla do jedné jamky pipetována ekvimolární směs několika frakcí najednou, kvůli nízké koncentraci daného proteinu. Do jamek 1 až 4 byly pipetovány vzorky z jednotlivých frakcí 1 až 4 ve shodném číselném pořadí. Do jamky číslo 5 byla pipetována ekvimolární směs frakcí 5, 6 a 7. Do jamek číslo 6, 7 a 8 byly pipetovány frakce 8, 9 a 10 ve shodném číselném pořadí. Ve frakcích 2 až 8 jsou přítomny neznámé kontaminující proteiny o vyšší molekulové hmotnosti. Je patrné, že množství proteinu je celkově nízké, jelikož jeho exprese nebyla úspěšná. Do jamky označené písmenem P byl pipetován vzorek buněčné pelety. Jednotlivé vzorky byly připraveny za použití redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinu NKp30_Stalk_Triple byla přibližně 15,3 kDa.

Pomocí imunoblotu s chemiluminiscenční a kolorimetrickou detekcí byla ověřena přítomnost tohoto proteinu. Pro elektropřenos na nitrocelulosovou membránu byl použit duplicitní SDS polyakrylamidový gel, který byl připravován souběžně s gelem na obrázku 25. Na obrázku 26 na str. 72 je vidět, že se NKp30_Stalk_Triple nacházel pouze v dráze 2, která obsahovala frakci číslo 2 z preparativní SEC. Přítomnost proteinu byla potvrzena také v dráze označené písmenem P, tedy v buněčné peletě, což znamená, že protein precipitoval.



Obrázek 26: Imunoblot trojitého glykosylačního mutanta NKp30_Stalk_Triple s chemiluminiscenční detekcí (vlevo) a s kolorimetrickou detekcí (vpravo).

Snímky nitrocelulosové membrány po imunoblotu. Proteiny byly na membránu přeneseny z SDS polyakrylamidového gelu, který byl duplikátem gelu na obrázku 25 na str. 71. V dráze označené písmenem L byl přenesen proteinový standard. V drahách označených číslicemi 1 až 8 byly přeneseny frakce preparativní SEC, kdy v některých případech byla do jedné jamky původního SDS polyakrylamidového gelu pipetována ekvimolární směs několika frakcí najednou. V drahách 1 až 4 byly přeneseny vzorky z jednotlivých frakcí 1 až 4 ve shodném číselném pořadí. V dráze číslo 5 byla přenesena ekvimolární směs frakcí 5, 6 a 7. V dráze číslo 6, 7 a 8 byly přeneseny frakce 8, 9 a 10. V dráze označené písmenem P byl přenesen vzorek buněčné pelety. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinu NKp30_Stalk_Triple byla přibližně 15,3 kDa.

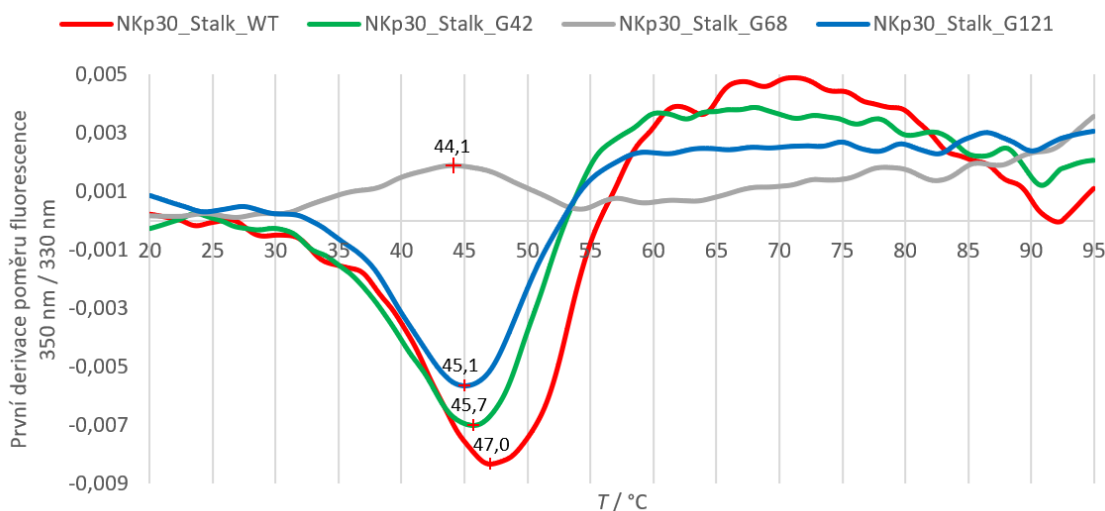
Množství tohoto proteinu je ve srovnání s NKp30_Stalk_G68 ještě nižší (5.3.1.2.). Z důvodu nízkého výtěžku a nestability trojitého glykosylačního mutanta receptoru NKp30 byl jeho gen vložen do plazmidu pUCT7 (5.2.5.). Ani po přípravě stabilně transfekované buněčné linie HEK293T nebylo možné tento protein exprimovat.

5.4. TEPLOTNÍ STABILITA GLYKOSYLAČNÍCH MUTANTŮ RECEPTORU NKp30

Z důvodu nízkého výtěžku proteinu NKp30_Stalk_G68 byla přístrojem Prometheus NT.48 provedena nDSF, aby bylo ověřeno, zdali se teplotní stabilita tohoto proteinu v HEPES pufru výrazně neliší od NKp30_Stalk_WT a zbylých glykosylačních mutantů receptoru NKp30. Na obrázku 27 na str. 73 byly proloženy získané hodnoty prvních derivací poměru intenzit fluorescencí při vlnových délkách 350 nm a 330 nm. V tabulce 7 jsou uvedeny naměřené teploty denaturace pro jednotlivých proteinů.

Tabulka 7: Naměřené teploty denaturace pomocí nDSF v pufru HEPES.

Název proteinu	Teplota denaturace / °C
NKp30_Stalk_WT	47,0
NKp30_Stalk_G42	45,7
NKp30_Stalk_G68	44,1
NKp30_Stalk_G121	45,1



Obrázek 27: nDSF jednotlivých glykosylačních mutantů a NKp30_Stalk_WT.

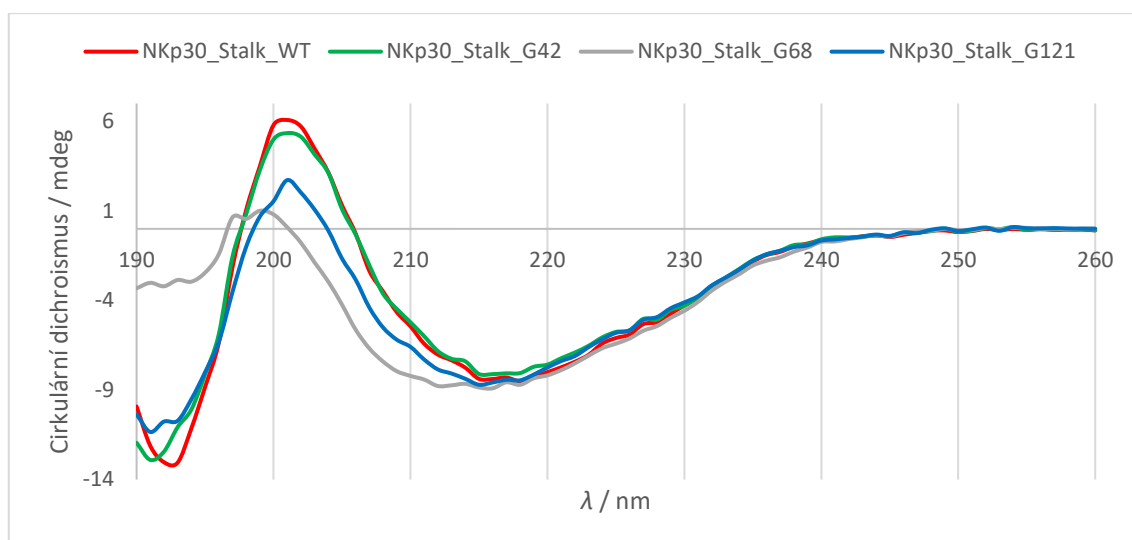
Na obrázku byly proloženy naměřené hodnoty prvních derivací poměru fluorescencí při vlnové délce 350 nm a 330 nm (osa Y) pro jednotlivé protomerní glykosylační mutanty a NKp30_Stalk_WT v pufru HEPES. Měření bylo provedeno přístrojem Prometheus NT.48. Na ose X byla vynesena teplota (T). Nejvyšší teplotní stabilitu vykazuje NKp30_Stalk_WT (červená) s teplotou denaturace 47,0 °C. Nižší teplotu denaturace, 45,7 °C, vykazují NKp30_Stalk_G42 (zelená) a 45,1 °C vykazuje NKp30_Stalk_G121 (modrá). Nejnižší teplotu denaturace, 44,1 °C, pak vykazuje NKp30_Stalk_G68 jehož křivka je zároveň výrazně odlišná od ostatních.

Z obrázku 27 je patrné, že nejvyšší teplotní stabilitu vykazuje NKp30_Stalk_WT. Nejnižší teplota denaturace byla naměřena pro protein NKp30_Stalk_G68, který má zároveň jako jediný výrazně odlišný průběh naměřené křivky první derivace poměru intenzit fluorescencí, což může poukazovat na nesprávné sbalení tohoto proteinu.

5.5. CÍRKULÁRNÍ DICHROISMUS

Pomocí této metody bylo ověřeno správné sbalení jednotlivých glykosylačních mutantů receptoru NKp30. Proteiny byly před měřením převedeny do pufru pro cirkulární dichroismus. Měření provedla Dr. Tatsiana Charnavets přístrojem Chirascan Plus v centru BIOCEV. Naměřené křivky byly proloženy a porovnávány s křivkou odpovídající NKp30_Stalk_WT (Obrázek 28, str. 74).

Na obrázku 28 na str. 74 je vidět, že křivka odpovídající NKp30_Stalk_G42 je velmi podobná křivce NKp30_Stalk_WT, což naznačuje, že je tento protein správně sbalen. Protein NKp30_Stalk_G121 je pravděpodobně také správně sbalen, ačkoli se jeho křivka od zmíněných dvou mírně odlišuje. Nejdlišnější křivka byla naměřena pro protein NKp30_Stalk_G68. Z průběhu této křivky lze soudit, že vznikly elementy sekundární struktury, ale zřejmě dochází ke špatnému sbalení v rámci terciární struktury. Tato pozorování zároveň korelují s výsledky nDSF (5.4.).



Obrázek 28: Cirkulární dichroismus jednotlivých glykosylačních mutantů a NKp30_Stalk_WT.

Na obrázku byly proloženy naměřené křivky cirkulárního dichroismu (osa Y). Na ose X byla vynesena vlnová délka (λ). Experiment byl proveden přístrojem Chirascan Plus. Nejpodobnější průběh křivky s NKp30_Stalk_WT (červená) má křivka odpovídající NKp30_Stalk_G42 (zelená). Mírných odlišností si lze všimnout u křivky odpovídající NKp30_Stalk_G121 (modrá). Výrazně odlišný průběh má však křivka NKp30_Stalk_G68 (šedivá), a to zejména v oblasti vlnových délek 200 nm až 190 nm, což naznačuje, že je protein špatně sbalen v rámci terciární struktury.

Na základě těchto zjištění byly další experimenty prováděny pouze s proteiny NKp30_Stalk_WT, NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121.

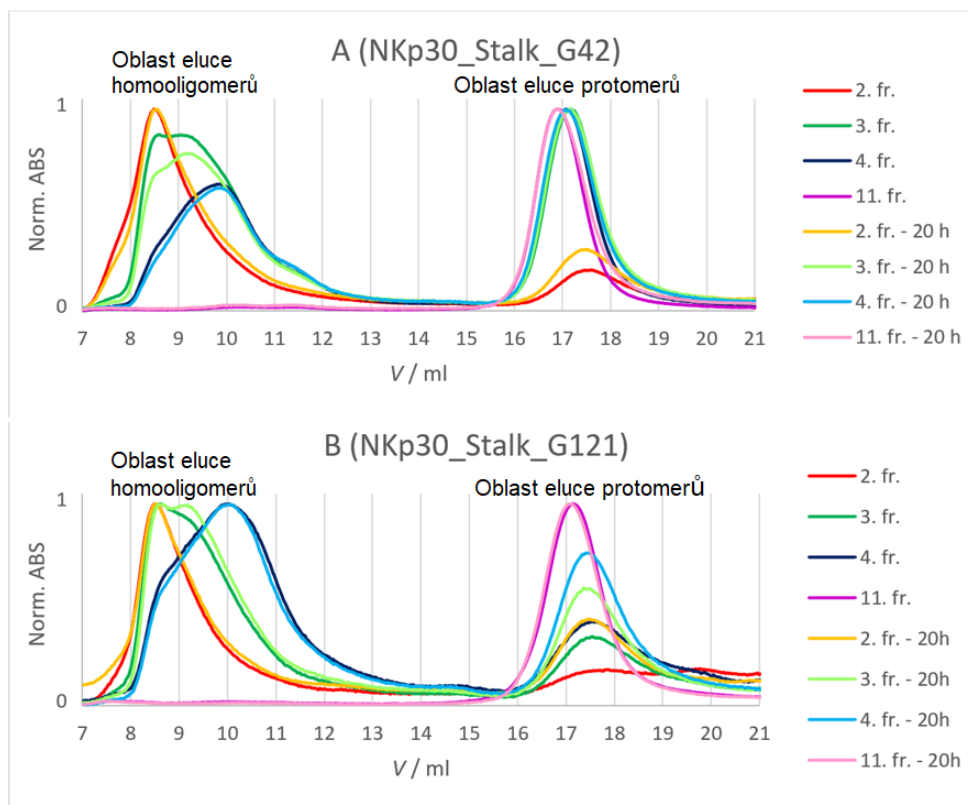
5.6. ANALÝZA DYNAMIKY HOMOOLIGOMERIZACE

5.6.1. SCHOPNOST HOMOOLIGOMERŮ DISOCIOVAT

Důkaz, že proteiny NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121 skutečně homooligomerizují a nejedná se pouze o amorfní agregáty, poskytla analytická SEC. Pro analýzu byly vybrány frakce číslo 2, 3, 4 a 11 z preparativní SEC (Obrázek 19, str. 66), přičemž byla použita kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL. Vzorky byly ze zásobních mikrozkušavek připraveny v duplikátu o původní koncentraci jednotlivých frakcí (přibližně 0,5 mg/ml). První série vzorků z připraveného duplikátu byla analyzována ihned po přípravě. Druhá série vzorků byla inkubována při 4 °C po dobu 20 h, načež byly vzorky také analyzovány.

Proložením chromatografických křivek vzorků frakcí 2, 3 a 4 před a po inkubaci bylo zjištěno, že jak v případě NKp30_Stalk_G42, tak NKp30_Stalk_G121 dochází k rozpadu homooligomerní frakce na protomery (Obrázek 29, str. 75). Rozpad homooligomerů NKp30_Stalk_G42 se jeví jako rychlejší, jelikož došlo k jejich rozpadu ještě před analýzou. Naopak oligomery NKp30_Stalk_G121 se jeví jako stabilnější.

Proložení chromatografických křivek vzorků frakce číslo 11 obou proteinů ukázalo, že během inkubace nedochází ke spontánnímu vzniku homooligomerů.



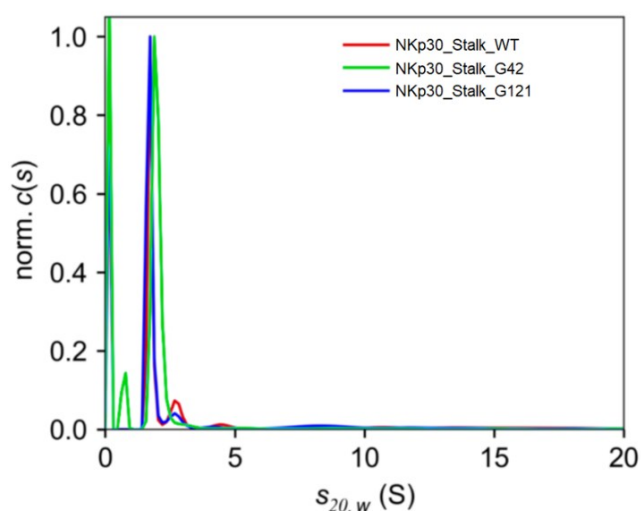
Obrázek 29: Opakované analytické SEC vybraných frakcí z preparativní SEC.

Na ose Y byla vynesena normalizovaná absorbance při 280 nm (Norm. ABS), na ose X byl vynesen eluční objem (V). Pro experiment byla použit pufr HEPES a kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL. (A) Proložené chromatografické křivky vzorků proteinu NKp30_Stalk_G42 před a po dvacetihodinové inkubaci při 4 °C. Ve frakci číslo 2 došlo k nárůstu maxima elučního objemu v oblasti eluce protomerů, což značí rozpad homooligomerů ve frakci číslo 2. Většina homooligomerů se ve frakcích číslo 3 a 4 rozpadla ještě před analýzou, tudíž nebyl zaznamenán nárůst maxima elučního objemu v oblasti eluce protomerů, nicméně v případě frakce 3 byl zaznamenán pokles maxima elučního objemu v oblasti eluce homooligomerů, což značí jejich rozpad. Frakce číslo 4 zůstala po inkubaci téměř nezměněná. V protomerní frakci číslo 11 nedošlo po inkubaci ke vzniku homooligomerů. (B) Proložené chromatografické křivky vzorků proteinu NKp30_Stalk_G121 před a po dvacetihodinové inkubaci při 4 °C. Ve frakci číslo 2, 3 a 4 došlo k nárůstu maxima elučního objemu v oblasti eluce protomerů, což značí rozpad homooligomerů. V protomerní frakci číslo také 11 nedošlo po inkubaci ke vzniku homooligomerů.

5.6.2. ANALÝZA VZNIKU HOMOOLIGOMERŮ

Z výsledků analytické SEC (Obrázek 29) je zřejmé, že v koncentracích okolo 0,5 mg/ml je termodynamická rovnováha posunuta ve prospěch disociace homooligomerů na protomery. Z toho důvodu byly vzorky protomerních frakcí (Obrázek 19, str. 66) proteinů NKp30_Stalk_WT, NKp30_Stalk_G42

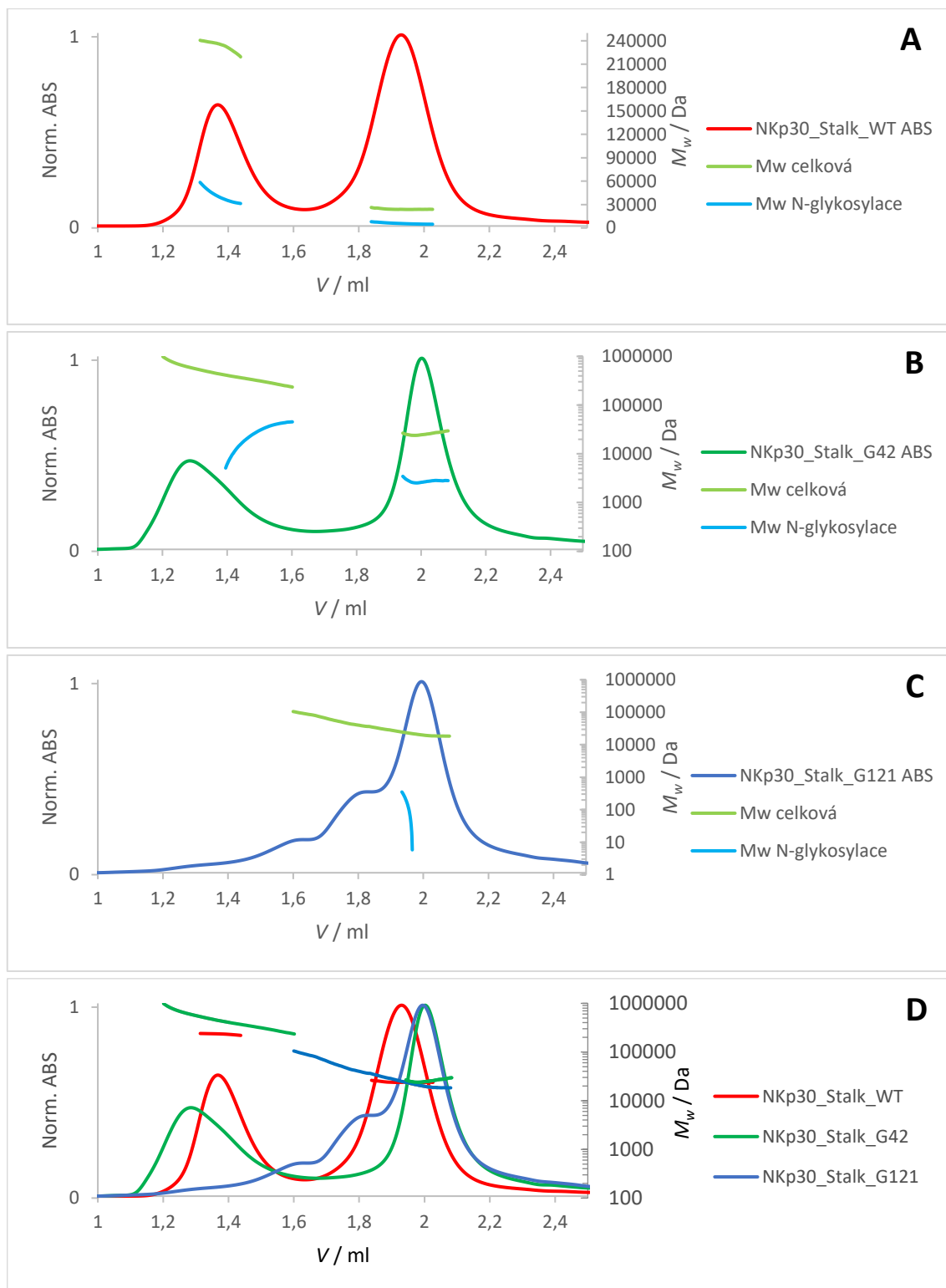
a NKp30_Stalk_G121 zkoncentrovány na přibližně 25 mg/ml, načež byly vzorky zředěny na přibližně 1 mg/ml (4.3.7.) a byla provedena AUC – experiment sedimentační rychlosti. Měření bylo provedeno RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D. včetně vyhodnocení naměřených dat. Pro experiment byla použita analytická ultracentrifuga ProteomeLab XL-I. Z obrázku 30 je vidět, že k vytvoření malého množství homooligomerů došlo ve všech případech, nicméně majoritní část proteinů zůstala v protomerní formě. V případě proteinů NKp30_Stalk_WT a NKp30_Stalk_G121 došlo ke vzniku malého množství homodimerů a homotetramerů, což potvrzuje experiment SEC-MALS (Obrázek 31, str. 77).



Obrázek 30: Analýza vzniku homooligomerů pomocí AUC.

Na ose X byl vynesena normalizovaný sedimentační koeficient. Na ose Y byla vynesena normalizovaná distribuce sedimentačních koeficientů. Vzorky protomerních frakcí proteinů NKp30_Stalk_WT (červená), NKp30_Stalk_G42 (zelená) a NKp30_Stalk_G121 (modrá) byly zkoncentrovány na koncentraci 25 mg/ml. Po následném zředění na přibližně 1 mg/ml byly analyzovány pomocí AUC metodou sedimentační rychlosti. Ve všech případech vzniklo malé množství homooligomerů. V případě NKp30_Stalk_WT a NKp30_Stalk_G121 vzniklo i malé množství pravděpodobně homodimerů a homotetramerů.

Potvrzení, že lze z protomerní frakce vlivem zvýšené koncentrace indukovat vznik homooligomerů, poskytla metoda SEC-MALS (Obrázek 31, str. 77). Měření a vyhodnocení dat provedl Mgr. Štěpán Herynek v centru BIOCEV. Pro tento experiment byly připraveny vzorky protomerních frakcí jednotlivých proteinů, které byly zkoncentrovány přibližně na 35 mg/ml, načež byly analyzovány. Pro experiment byl použit HPLC systém Infinity 1260 II, ke kterému byla připojena kolona Superdex 200 Increase 3,2/300. Měření MALS bylo provedeno přístrojem miniDAWN (4.3.8.).



Obrázek 31: Analýza vzniku homooligomerů pomocí SEC-MALS.

Vzorky protomerních frakcí jednotlivých proteinů byly před analýzou zkoncentrovány na koncentraci přibližně 35 mg/ml. Na osách X byl vynesena eluční objem (V). Oblast eluce homooligomerů je zde v rozmezí přibližně 1,2 ml až 1,6 ml a oblast eluce protomerů je přibližně v rozmezí přibližně 1,8 ml až 2,2 ml. Na primárních osách Y byla vynesena normalizovaná absorbance při 280 nm (Norm. ABS) a na sekundárních osách Y byla vynesena molekulová hmotnost (M_w). (pokračování popisu obrázku na další stránce)

(pokračování popisu obrázku z předchozí stránky)

V chromatogramech A, B a C je světle zelenou barvou vyznačena distribuce celkových molekulových hmotností (M_w celková), světle modrou barvou pak distribuce molekulových hmotností, které odpovídají N-glykosylaci (M_w N-glykosylace). V chromatogramu D byly distribuce celkových molekulových hmotností jednotlivých proteinů vyznačeny barvami shodnými s barvou chromatografické křivky. Pro experiment byl použit pufr HEPES, kolona Superdex 200 Increase 3,2/300 a MALS systém miniDAWN. Na chromatogramech A, B a C byly kromě distribucí celkových molekulových hmotností také vyneseny distribuce molekulových hmotností neproteinových složek, tedy N-glykosylací. (A) Chromatogram, který odpovídá NKp30_Stalk_WT, potvrzuje, že došlo ke vzniku homooligomerů. Distribuce molekulových hmotností homooligomerů se pohybuje v rozmezí 220 – 240 kDa. Předpokládaná molekulová hmotnost protomeru bez N-glykosylací je přibližně 15,2 kDa. (B) Z chromatogramu, který odpovídá NKp30_Stalk_G42 lze rovněž konstatovat, že ke vzniku homooligomerů došlo. Distribuce molekulových hmotností homooligomerů se pohybuje v rozmezí 240 – 900 kDa (toto rozmezí je však značně ovlivněno možnou agregací). Předpokládaná molekulová hmotnost protomeru bez N-glykosylace je přibližně 15,3 kDa. (C) Eluční profil proteinu NKp30_Stalk_G121 se od předchozích dvou proteinů liší. Ke vzniku velkých homooligomerů zde zřejmě nedochází, nicméně naměřené hmotnosti ve vrcholech jednotlivých maxim elučních objemů odpovídají přibližně homodimeru a homotetrameru. Předpokládaná molekulová hmotnost protomeru bez N-glykosylace je přibližně 15,3 kDa. Distribuce molekulové hmotnosti N-glykosylace tohoto proteinu je oproti NKp30_Stalk_G42 výrazně nižší. (D) Proložené chromatogramy jednotlivých proteinů spolu s distribucemi jejich celkových hmotností.

Z chromatogramů na obrázku 31 na str. 77 lze konstatovat, že v případě proteinů NKp30_Stalk_WT a NKp30_Stalk_G42 došlo k homooligomerizaci. Distribuce celkových molekulových hmotností homooligomerů NKp30_Stalk_WT se pohybuje v rozmezí přibližně 220 – 240 kDa. Distribuce molekulových hmotností homooligomerů NKp30_Stalk_G42 se pohybuje v rozmezí přibližně 240 – 900 kDa (toto rozmezí je však značně ovlivněno možnou agregací). Eluční profil proteinu NKp30_Stalk_G121 se od předchozích dvou proteinů výrazně liší. Ačkoli zde ke vzniku větších homooligomerů nedošlo, došlo však ke vzniku homooligomerů s nižší stechiometrií – homodimerů a homotetramerů. Molekulová hmotnost N-glykosylace (M_w N-glykosylace, světle modrá barva křivek) proteinu NKp30_Stalk_G121 ve srovnání s NKp30_Stalk_G42 dosahuje výrazně nižších hodnot, ačkoli se v obou případech jedná o proteiny s jediným N-glykosylačním místem.

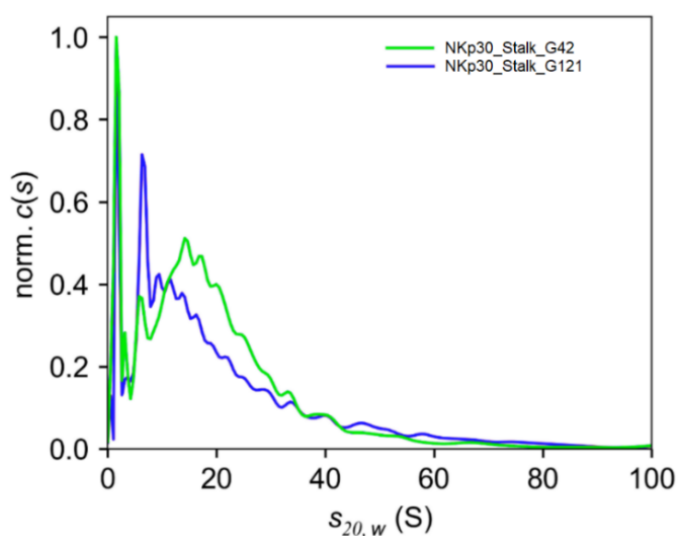
5.7. BIOFYZIKÁLNÍ CHARAKTERIZACE HMOOLIGOMERŮ RECEPTORU NKp30

Pro další charakterizaci homooligomerů jednotlivých proteinů byly použity frakce z oblasti eluce homooligomerů preparativní SEC (Obrázek 19, str. 66).

5.7.1. CHARAKTERIZACE HMOOLIGOMERŮ POMOCÍ ANALYTICKÉ ULTRACENTRIFUGACE

Pro analýzu pomocí AUC metodou sedimentační rychlosti byly z preparativní SEC vybrány frakce číslo 1 až 5 proteinů NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121. Jejich

spojením a následným zkoncentrováním na potřebnou koncentraci byly připraveny vzorky k měření (4.3.7.). Ukázalo se však (Obrázek 32, str. 79), že výběr frakcí, které měly obsahovat homooligomery o nejvyšších molekulových hmotnostech, výsledky experimentu značně ovlivnily, jelikož s největší pravděpodobností obsahovaly agregáty. Určitá část proteinu se však zachovala v nativní homooligomerní formě, s ostrými maximy sedimentačních koeficientů přibližně 8 S. Měření bylo provedeno RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D. včetně vyhodnocení naměřených dat. Pro experiment byla použita analytická ultracentrifuga ProteomeLab XL-I.



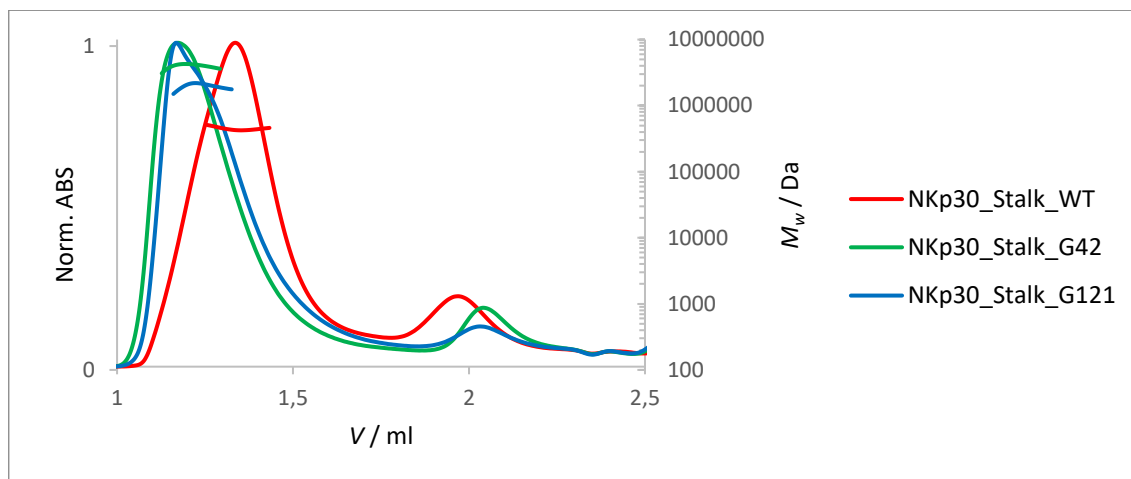
Obrázek 32: Analýza homooligomerů pomocí AUC.

Na ose X byl vynesena normalizovaný sedimentační koeficient. Na ose Y byla vynesena normalizovaná distribuce sedimentačních koeficientů. Vzorky homooligomerních frakcí proteinů NKp30_Stalk_G42 (zelená) a NKp30_Stalk_G121 (modrá) z preparativní SEC byly analyzovány pomocí AUC metodou sedimentační rychlosti. V obou případech si lze všimnout agregace proteinů, která způsobila vysoké hodnoty sedimentačních koeficientů obou proteinů. Nicméně určitá část obou proteinů zůstala v nativní homooligomerní formě s ostrým maximem sedimentačního koeficientu přibližně 8 S.

5.7.2. CHARAKTERIZACE HOOOLIGOMERŮ POMOCÍ VÍCEÚHLOVÉHO ROZPTYLU SVĚTLA SPOJENÉHO S ROZMĚROVĚ-VYLUČOVACÍ CHROMATOGRÁFIÍ

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům získaných pomocí AUC, jelikož byly pro měření použity vzorky z preparativní SEC, které obsahovaly agregované proteiny, byly pro SEC-MALS použity pouze vzorky frakcí číslo 3 až 5. Jednotlivé frakce byly spojeny a zkoncentrovány na koncentraci přibližně 10 mg/ml. Z obrázku 33 na str. 80 je však patrné, že v případě NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121 došlo opět ke vzniku velkých agregátů o molekulových hmotnostech v řádech 10⁶ Da. Protein NKp30_Stalk_WT neagregoval, nicméně však i jeho distribuce molekulových hmotností dosahuje přibližně dvojnásobných hodnot než v případě homooligomerů (~430 kDa),

kteře vznikly z protomerů vlivem zkoncentrování. Lze si rovněž všimnout, že ve všech případech došlo k mírnému rozpadu homooligomerů na protomery. Tento experiment však mohl být ovlivněn znečištěním použitých frakcí z preparativní SEC jinými proteiny (Obrázek 20, str. 67 a obrázek 24, str. 70). Měření a vyhodnocení dat provedl Mgr. Štěpán Herynek v centru BIOCEV. Pro experiment byl použit HPLC systém Infinity 1260 II, ke kterému byla připojena kolona Superdex 200 Increase 3,2/300. Měření MALS bylo provedeno přístrojem miniDAWN (4.3.8.).



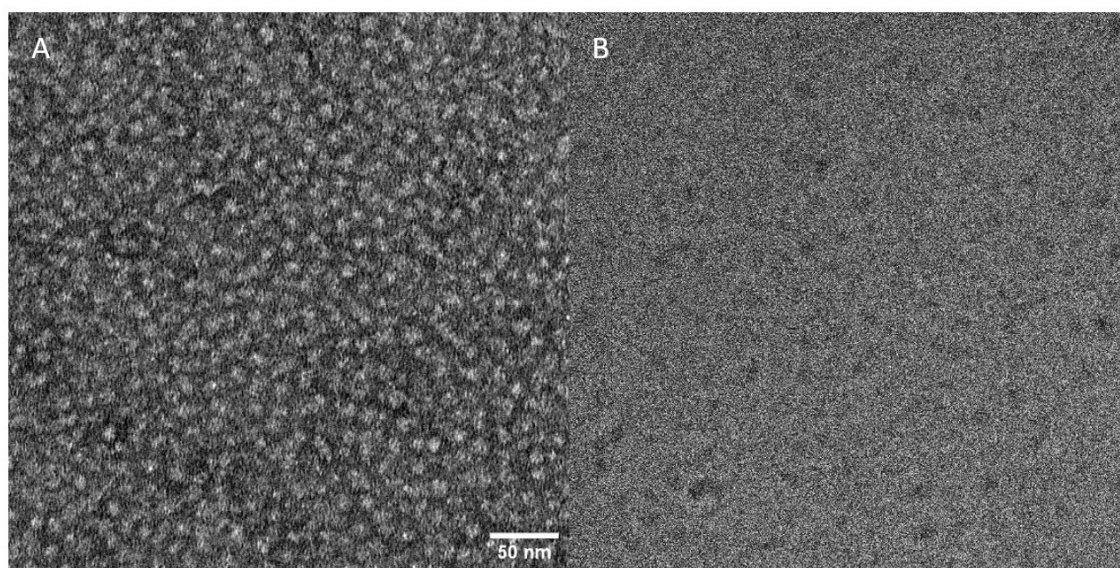
Obrázek 33: Analýza homooligomerů pomocí SEC-MALS.

Vzorky homooligomerních frakcí jednotlivých proteinů použité k analýze vznikly spojením frakcí číslo 3 až 5 z preparativní SEC a následným zkoncentrováním na přibližně 10 mg/ml. Na ose X byl vynesena eluční objem (V). Oblast eluce homooligomerů je zde v rozmezí přibližně 1,2 ml až 1,6 ml a oblast eluce protomerů je přibližně v rozmezí přibližně 1,8 ml až 2,2 ml. Na primární ose Y byla vynesena normalizovaná absorbance při 280 nm (Norm. ABS) a na sekundární ose Y byla vynesena molekulová hmotnost (M_w). Pro experiment byl použit pufr HEPES, kolona Superdex 200 Increase 3,2/300 a MALS systém miniDAWN. Je patrné, že v případě NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121 došlo ke vzniku velkých agregátů o vysokých molekulových hmotnostech. NKp30_Stalk_WT neagregoval, molekulová hmotnost homooligomerů je přibližně 430 kDa. Zároveň ve všech případech došlo k mírnému rozpadu homooligomerů na protomery. Předpokládaná molekulová hmotnost protomeru NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121 bez N-glykosylace je přibližně 15,3 kDa. Předpokládaná molekulová hmotnost protomeru NKp30_Stalk_WT je 15,2 kDa.

5.7.3. CHARAKTERIZACE HOOOLIGOMERŮ NKp30_STALK_WT POMOCÍ TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE A KRYOELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE

Pro zjištění struktury homooligomerů NKp30_Stalk_WT byl proveden pilotní experiment kryo-EM. Měření provedl Dr. Alexandre Durand a Dr. Nils Marechal (IGBMC Štrasburk). Pro tento experiment byla vybrána frakce o objemu 0,2 ml z preparativní SEC (Obrázek 19, str. 66), která odpovídala maximu elučního objemu homooligomerní frakce. Před samotným měřením kryo-EM bylo nutné pomocí TEM s negativním kontrastováním, které bylo zajištěno uranyl acetátem, ověřit, zdali jsou

rozměry homooligomerů pro kryo-EM dostatečné. Pro měření TEM (Obrázek 34 A, str. 81) byl použit mikroskop Tecnai F20. Tento experiment potvrdil, že jsou rozměry tohoto proteinu dostatečné pro kryo-EM. Následně byly vzorky proteinu na speciální mřížce pro kryo-EM vitrifikovány, načež bylo provedeno měření mikroskopem Titan Krios (Obrázek 34 B). Pro dosažení lepšího kontrastu musela být použita fázová destička, nicméně je kontrast pořád nedostatečný. Pro dosažení optimálního kontrastu je třeba optimalizovat podmínky vitrifikace vzorku. Odhadnutý průměr jedné částice je z TEM přibližně 10 nm. Z kryo-EM se pak částice jeví menší, přibližně 7 nm. Lze rovněž soudit, že homooligomery zaujímají kulovitý, tedy poměrně symetrický tvar.



Obrázek 34: TEM (A) a kryo-EM (B) homooligomerní frakce NKp30_Stalk_WT.

(A) Snímek homooligomerů NKp30_Stalk_WT pořízený TEM Tecnai F20, za použití negativního kontrastování uranyl acetátem. Homooligomery jsou kulovitěho, poměrně symetrického tvaru a jejich průměr je přibližně 10 nm. (B) Snímek homooligomerů NKp30_Stalk_WT pořízený kryo-EM Titan Krios, za použití fázové destičky. Kvůli neoptimalizované vitrifikaci vzorku není kontrast dostatečný ani po použití fázové destičky. Průměr homooligomerů je přibližně 7 nm.

6. DISKUZE

Nezbytným úkolem v rámci této práce byla příprava glykosylačních mutantů receptoru NKp30. Podařilo se připravit proteiny NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_121. Protein NKp30_Stalk_G68 (mutace N42,121Q) nebylo možné připravit s dostatečným výtěžkem (2 mg na litr buněčné suspenze) a exprese NKp30_Stalk_Triple (mutace N42,68,121Q) nebyla úspěšná. Měření cirkulárního dichroismu jednotlivých proteinů odhalilo, že se protein NKp30_Stalk_G68 svou strukturou od zbývajících zásadně liší (Obrázek 28, str. 74). K vytvoření sekundárních strukturních elementů došlo, nicméně sbalení může být nedokonalé v rámci terciární struktury. Tuto tezi zároveň podporuje výsledek preparativní SEC a nDSF (Obrázek 19, str. 66 a obrázek 27, str. 73). Maximum elučního objemu protomerní frakce NKp30_Stalk_G68 je vůči dvěma zbývajícím glykosylačním mutantům výrazně posunuto, což poukazuje na odlišný tvar tohoto proteinu. Zároveň se od zbývajících proteinů signifikantně liší jeho průběh křivky první derivace poměru fluorescence při vlnových délkách 350 nm a 330 nm v závislosti na teplotě naměřené pomocí nDSF. Výše výtěžku jednotlivých proteinů pak koreluje charakterem křivky cirkulárního dichroismu. Čím se více křivka cirkulárního dichroismu podobá té, která přísluší NKp30_Stalk_WT, tím vyššího výtěžku bylo dosaženo.

Z těchto poznatků lze konstatovat, že je pro stabilitu a správné sbalení rozpustné formy receptoru NKp30 naprosto esenciální přítomnost alespoň jedné z N-glykosylací, a to buď na Asn-42 nebo na Asn-121. S ohledem na vyšší výtěžek (15 mg na litr buněčné suspenze) a vyšší teplotní stabilitu NKp30_Stalk_G42 (mutace N68,121Q) lze předpokládat, že je N-glykosylace v poloze Asn-42 důležitější, než v poloze Asn-121 (výtěžek NKp30_Stalk_G121: 9 mg na litr buněčné suspenze). Z hlediska stability proteinu je pak nejméně důležitá přítomnost N-glykosylace v poloze Asn-68. Pro porovnání, v publikaci Skořepa, O. a kol. bylo pro protein NKp30_Stalk_WT dosaženo výtěžku 27 mg na litr buněčné suspenze [50]. Nestabilita proteinu NKp30_Stalk_G68 může být však také způsobena samotnou mutací daných aminokyselin. Rezidua, která v dané poloze nejsou přítomna přirozeně, mohou způsobit v důsledku sterického bránění celkové konformační změny proteinu, které mohou vést k jeho nestabilitě nebo neschopnosti nabýt nativní struktury. Kromě toho byl na snímku SDS-PAGE (Obrázek 23, str. 69) proteinu NKp30_Stalk_G68 zaznamenán neočekávaný pruh o podobné molekulové hmotnosti. Může se jednat o tento protein bez N-glykosylace, avšak s přítomností O-glykosylace, která byla predikována programem NetOGlyc-4.0 v poloze Ser-22 se skóre 0,72 [94].

Pomocí preparativní SEC bylo zjištěno, že proteiny NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121 homooligomerizují. Důkaz, že se nejedná o nefunkční agregáty poskytl experiment opakovaných analytických SEC nástřiků s časovým rozmezím 20 h (Obrázek 29, str. 75). V obou případech došlo ke vzniku protomerů, a to i v případě frakcí číslo 2, které obsahovaly proteiny o vysokých molekulových hmotnostech. Není vyloučeno, že frakce nižších elučních objemů neobsahují homooligomery, ale určité množství agregátů, avšak i v tomto případě tato agregace není ireverzibilní a inkubací při nižších koncentracích lze indukovat rozpad agregátů. Podobný experiment byl proveden v rámci práce Tulpa, M. s proteinem NKp30_Stalk_WT, kdy bylo zjištěno, že se jeho homooligomery po 14 h inkubaci při 4 °C nerozpadají [95]. Důležitým rozdílem však je, že vzorek před inkubací obsahoval jak protomery, tak homooligomery, tudíž tyto výsledky nelze porovnávat přímo.

V rámci charakterizace proteinů byla zároveň ověřována jejich čistota pomocí SDS-PAGE. Z obrázků 20 a 24 na str. 67 a 70 si lze všimnout, že jsou zejména frakce nižších elučních objemů kontaminovány neznámými proteiny, kdy se NKp30_Stalk_G121 jeví znečištěnější než NKp30_Stalk_G42. Tento rozdíl může být způsoben vyšší koncentrací NKp30_Stalk_G42 v důsledku jeho vyššího výtěžku, ačkoliv celkové množství kontaminujících proteinů může být totožné. Vzhledem k těmto skutečnostem je relevantnější studovat homooligomery, jejichž vznik byl indukovan zkoncentrováním protomerních frakcí, které téměř kontaminované nejsou. Zajímavým pozorováním je kontrast mezi výsledky experimentů AUC a SEC-MALS zkoncentrovaných protomerních frakcí NKp30_Stalk_WT, NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121. V obou případech byly proteiny zkoncentrovány na vysoké koncentrace. V případě AUC byla výsledná koncentrace přibližně 25 mg/ml, v případě SEC-MALS 35 mg/ml. Tento rozdíl může mít vliv na ochotu proteinů homooligomerizovat, nicméně malé množství homooligomerů ve vzorcích pro AUC může být také způsobeno tím, že je pro experiment nutné koncentrované vzorky proteinů znovu zředit přibližně na 1 mg/ml. Časové nároky na teplotní ekvilibraci centrifugy ProteomeLab XL-I a samotná časová náročnost měření může vyústit v rozpad oligomerů. Oproti tomu SEC-MALS umožňuje přímý nástřik vzorku o vysoké koncentraci na kolonu Superdex 200 Increase 3,2/300, kde sice dojde k jeho zředění, ale vzhledem k nízké časové náročnosti celého experimentu (přibližně 20 min) k rozpadu homooligomerů nedochází.

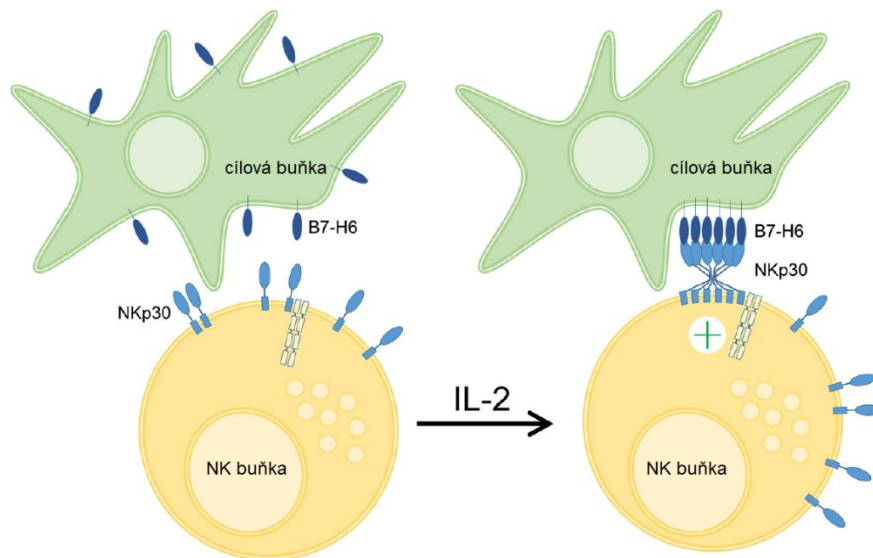
Měření SEC-MALS poskytlo zajímavé výsledky týkající se zejména proteinu NKp30_Stalk_G121, který jako jediný po zkoncentrování tvořil místo velkých homooligomerů homodimery a homotetramery. Toto zjištění podporuje tezi, že je pro vznik větších homooligomerů důležitá přítomnost N-glykosylace na pozici Asn-42, která se nachází v blízkosti interakčního rozhraní homodimeru a zároveň v blízkosti C-konce sousedního protomeru [50]. Tato N-glykosylace může stericky bránit dokonalé interakci protomer-protomer, čímž může dojít k poskytnutí interakčního rozhraní pro interakci s dalším protomerem, kde se situace opakuje, což vyústí ve vznik cyklických homooligomerů. N-glykosylace na pozici Asn-42 tedy umožňuje vznik homodimerů s vhodnou orientací, které tvoří základní stavební jednotku homooligomerů s vyšší stechiometrií. Naopak v nepřítomnosti této N-glykosylace na sebe oba protomery mohou dokonale přisednout, čímž znemožní vznik větších homooligomerů. Homotetramery následně mohou vznikat sekundární, slabší interakcí homodimer-homodimer, což zároveň vysvětluje jejich nižší zastoupení oproti homodimerům.

Pro vyřešení struktury homooligomerů NKp30_Stalk_WT byla provedena kryo-EM, před níž byla provedena TEM s negativním kontrastováním uranyl acetátem. TEM potvrdila, že se jedná o dostatečně velké homooligomery pro řešení struktury pomocí kryo-EM. Také napověděla, že se jedná o poměrně symetrické objekty s průměrem přibližně 10 nm. Samotný experiment kryo-EM dopadl však neúspěšně, vzhledem k neoptimální tloušťce ledu nebylo dosaženo dostatečného kontrastu. Z toho důvodu musí být pro vyřešení struktury homooligomerů optimalizována vitrifikace, načež bude kolegy z IGBMC Štrasburk provedeno řešení struktury metodou „single particle“ analýzy.

Znalost struktury homooligomerů je klíčová, jelikož může prozradit mnoho o možnosti jejich existence na buněčném povrchu. Budou-li molekuly NKp30 v rámci oligomerů orientovány svými „stalk“ oblastmi shodně, pak je tato struktura relevantní, jelikož může existovat i na buněčném povrchu. Znamenalo by to tedy, že se jak v roztoku, tak na buněčném povrchu jedná o stejné homooligomery. Experiment, který by definitivně potvrdil, zdali receptor NKp30 na buněčném povrchu opravdu homooligomerizuje, by byla fluorescenční superrozlišovací mikroskopie. Pro tuto metodu by byla použita buněčná linie, která přirozeně exprimuje receptor NKp30, například NK-92MI, nebo celým konstruktem receptoru NKp30 transfekované HeLa buňky, či transfekovaná buněčná linie HEK293T. Homooligomerizace může hrát důležitou roli v mechanismu aktivace tohoto receptoru. Je-li pro aktivaci důležitá, je pravděpodobné, že jeden z inhibičních ligandů tohoto receptoru, galektin-3 [56], brání

aktivaci tohoto receptoru právě inhibicí homooligomerizace. Těto hypotéze napovídá také fakt, že je na přítomnosti N-glykosylace závislá jak homooligomerizace tohoto receptoru [50], tak schopnost jeho interakce s galektinem-3 [95]. Pokud by se na receptor NKp30 přednostně navázal galektin-3, stericky by bránil další homooligomerizaci, což by vedlo k jeho inhibici.

V rámci této práce bylo potvrzeno, že koncentrace receptoru NKp30 je klíčovým parametrem z hlediska jeho tendence v roztoku homooligomerizovat. V publikaci Herrmann, J. a kol. byl navržen model, který vysvětluje způsob, jakým mohou vznikat homooligomery na buněčném povrchu. V důsledku působení IL-2 na NK buňky dochází ke stimulaci exprese NCR, čímž se zároveň zvyšuje koncentrace receptoru NKp30 na buněčném povrchu, což může vést k jeho následné homooligomerizaci (Obrázek 35) [89].



Obrázek 35: Model vzniku homooligomerů receptoru NKp30 na buněčném povrchu

V případě nepřítomnosti IL-2 je na povrchu NK buněk nízká koncentrace receptoru NKp30. V případě stimulace NK buněk IL-2 dochází k zvýšení jeho exprese, čímž se zvyšuje koncentrace tohoto receptoru na buněčném povrchu a dochází tak k homooligomerizaci. Homooligomerní forma receptoru NKp30 pak interaguje a je aktivována ligandem B7-H6, který je exprimován cílovou buňkou. Převzato a upraveno z [89].

7. ZÁVĚR

- Byly připraveny expresní vektory nesoucí geny glykosylačních mutantů NKp30_Stalk_G42, NKp30_Stalk_G68, NKp30_Stalk_G121 a trojitého glykosylačního mutantu NKp30_Stalk_Triple.
- Proteiny NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121 se úspěšně podařilo připravit tranzientní transfekcí buněčné linie HEK293T. Protein NKp30_Stalk_G68 byl připraven s nízkým výtěžkem metodou stabilní transfekce buněčné linie HEK293T a NKp30_Stalk_Triple se připravit nepodařilo. Proteiny byly dále základně charakterizovány pomocí preparativní SEC, SDS-PAGE, nDSF a cirkulárního dichroismu.
 - Cirkulární dichroismus odhalil strukturní odlišnost NKp30_Stalk_G68. Protein zřejmě nebyl správně sbalen. Pro další experimenty nebyl použit.
- Homooligomery jednotlivých proteinů byly biofyzikálně charakterizovány pomocí analytické SEC, AUC, SEC-MALS, TEM a kryo-EM.
 - Bylo zjištěno, že se homooligomery NKp30_Stalk_G42 a NKp30_Stalk_G121 za nízkých koncentrací rozpadají na protomery. Naopak je za vysokých koncentrací možno indukovat vznik homooligomerů z protomerů proteinů NKp30_Stalk_WT a NKp30_Stalk_G42. Toto pozorování podporuje tezi, že přítomnost N-glykosylace v pozici Asn-42 vede ke vzniku homodimeru s vhodnou orientací protomerů, který následně slouží jako základní stavební jednotka homooligomerů s vyšší stechiometrií.
 - Za vysokých koncentrací vznikají z protomerů NKp30_Stalk_G121 pouze homodimery a homotetramery.
 - Pomocí TEM bylo potvrzeno, že je velikost homooligomerů NKp30_Stalk_WT dostatečná pro měření kryo-EM, zároveň byl odhadnut průměr částic, který činí dle TEM 10 nm. Průměr odhadnutý pomocí kryo-EM činí přibližně 7 nm. Homooligomery se jeví symetrické, kulovitěho tvaru.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Parkin, J.; Cohen, B.: An overview of the immune system. *Lancet* **2001**, 357, 1777-1789.
2. Chaplin, D.: Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2006**, 117, S430-S435.
3. Turvey, S.E.; Broide, D.H.: Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2010**, 125, S24-32.
4. Bonilla, F.A.; Oettgen, H.C.: Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2010**, 125, S33-S40.
5. Medzhitov, R.; Janeway, C.: Innate Immunity. *New England Journal of Medicine* **2000**, 343, 338-344.
6. Janeway, C.A.: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1989**, 54 Pt 1, 1-13.
7. Janeway, C.A.: The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today* **1992**, 13, 11-16.
8. Caligiuri, M.A.: Human natural killer cells. *Blood* **2008**, 112, 461-469.
9. Ljunggren, H.G.; Kärre, K.: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today* **1990**, 11, 237-244.
10. Terren, I.; Orrantia, A.; Vitale, J.; Zenarruzabeitia, O.; Borrego, F.: NK Cell Metabolism and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology* **2019**, 10, 2278.
11. Walzer, T.; Jaeger, S.; Chaix, J.; Vivier, E.: Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Current Opinion in Immunology* **2007**, 19, 365-372.
12. Sivori, S.; Vitale, M.; Morelli, L.; Sanseverino, L.; Augugliaro, R., a kol.: p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *Journal of Experimental Medicine* **1997**, 186, 1129-1136.
13. Lanier, L.L.; Testi, R.; Bindl, J.; Phillips, J.H.: Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *Journal of Experimental Medicine* **1989**, 169, 2233-2238.
14. Ritz, J.; Schmidt, R.E.; Michon, J.; Hercend, T.; Schlossman, S.F.: Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Advances in Immunology* **1988**, 42, 181-211.
15. Vosshenrich, C.A.; Ranson, T.; Samson, S.I.; Corcuff, E.; Colucci, F., a kol.: Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the

- generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *Journal of Immunology* **2005**, *174*, 1213-1221.
16. Mujal, A.M.; Delconte, R.B.; Sun, J.C.: Natural Killer Cells: From Innate to Adaptive Features. *Annual Review of Immunology* **2021**, *39*, 417-447.
 17. Fehniger, T.A.; Cooper, M.A.; Nuovo, G.J.; Cella, M.; Facchetti, F., a kol.: CD56^{bright} 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* **2003**, *101*, 3052-3057.
 18. Cooper, M.A.; Fehniger, T.A.; Turner, S.C.; Chen, K.S.; Ghaheri, B.A., a kol.: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood* **2001**, *97*, 3146–3151.
 19. Bryceson, Y.T.; March, M.E.; Ljunggren, H.G.; Long, E.O.: Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological Reviews* **2006**, *214*, 73-91.
 20. Smyth, M.J.; Cretney, E.; Kelly, J.M.; Westwood, J.A.; Street, S.E., a kol.: Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology* **2005**, *42*, 501-510.
 21. Husain, Z.; Huang, Y.; Seth, P.; Sukhatme, V.P.: Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *Journal of Immunology* **2013**, *191*, 1486-1495.
 22. Lamas, B.; Vergnaud-Gauduchon, J.; Goncalves-Mendes, N.; Perche, O.; Rossary, A., a kol.: Altered functions of natural killer cells in response to L-Arginine availability. *Cellular Immunology* **2012**, *280*, 182-190.
 23. Lanier, L.L.: NK cell recognition. *Annual Review of Immunology* **2005**, *23*, 225-274.
 24. Arnon, T.I.; Markel, G.; Mandelboim, O.: Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Seminars in Cancer Biology* **2006**, *16*, 348-358.
 25. Li, Y.; Mariuzza, R.A.: Structural Basis for Recognition of Cellular and Viral Ligands by NK Cell Receptors. *Frontiers in Immunology* **2014**, *5*, 123.
 26. Pegram, H.J.; Andrews, D.M.; Smyth, M.J.; Darcy, P.K.; Kershaw, M.H.: Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and Cell Biology* **2011**, *89*, 216-224.
 27. Vivier, E.; Daëron, M.: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunology Today* **1997**, *18*, 286-291.
 28. Wu, J.; Song, Y.; Bakker, A.B.; Bauer, S.; Spies, T., a kol.: An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* **1999**, *285*, 730-732.
 29. Veillette, A.: NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunological Reviews* **2006**, *214*, 22-34.

30. Vitale, M.; Falco, M.; Castriconi, R.; Parolini, S.; Zambello, R., a kol.: Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *European Journal of Immunology* **2001**, *31*, 233-242.
31. Jamieson, A.M.; Diefenbach, A.; McMahon, C.W.; Xiong, N.; Carlyle, J., a kol.: The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* **2002**, *17*, 19-29.
32. Borrego, F.; Ulbrecht, M.; Weiss, E.H.; Coligan, J.E.; Brooks, A.G.: Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *Journal of Experimental Medicine* **1998**, *187*, 813-818.
33. Lanier, L.L.; Chang, C.; Phillips, J.H.: Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *Journal of Immunology* **1994**, *153*, 2417-2428.
34. Blaha, J.; Skalova, T.; Kalouskova, B.; Skorepa, O.; Cmunt, D., a kol.: Structure of the human NK cell NKR-P1:LLT1 receptor:ligand complex reveals clustering in the immune synapse. *Nature Communications* **2022**, *13*, 5022.
35. Wagtmann, N.; Biassoni, R.; Cantoni, C.; Verdiani, S.; Malnati, M.S., a kol.: Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* **1995**, *2*, 439-449.
36. Pende, D.; Parolini, S.; Pessino, A.; Sivori, S.; Augugliaro, R., a kol.: Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* **1999**, *190*, 1505-1516.
37. Vitale, M.; Bottino, C.; Sivori, S.; Sanseverino, L.; Castriconi, R., a kol.: NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *Journal of Experimental Medicine* **1998**, *187*, 2065-2072.
38. Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Cantoni, C., a kol.: Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology* **2001**, *19*, 197-223.
39. Mandelboim, O.; Lieberman, N.; Lev, M.; Paul, L.; Arnon, T., a kol.: Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* **2001**, *409*, 1055-1060.
40. De Maria, A.; Fogli, M.; Mazza, S.; Basso, M.; Picciotto, A., a kol.: Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *European Journal of Immunology* **2007**, *37*, 445-455.

41. Fuller, C.L.; Ruthel, G.; Warfield, K.L.; Swenson, D.L.; Bosio, C.M., a kol.: NKp30-dependent cytolysis of filovirus-infected human dendritic cells. *Cellular Microbiology* **2007**, *9*, 962-976.
42. Kruse, P.H.; Matta, J.; Ugolini, S.; Vivier, E.: Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology and Cell Biology* **2014**, *92*, 221-229.
43. Tang, Q.; Grzywacz, B.; Wang, H.; Kataria, N.; Cao, Q., a kol.: Umbilical cord blood T cells express multiple natural cytotoxicity receptors after IL-15 stimulation, but only NKp30 is functional. *Journal of Immunology* **2008**, *181*, 4507-4515.
44. Ponnampalam, A.P.; Gargett, C.E.; Rogers, P.A.: Identification and hormonal regulation of a novel form of NKp30 in human endometrial epithelium. *European Journal of Immunology* **2008**, *38*, 216-226.
45. Neville, M.J.; Campbell, R.D.: A New Member of the Ig Superfamily and a V-ATPase G Subunit Are Among the Predicted Products of Novel Genes Close to the TNF Locus in the Human MHC. *Journal of Immunology* **1999**, *162*, 4745-4754.
46. Pazina, T.; Shemesh, A.; Brusilovsky, M.; Porgador, A.; Campbell, K.S.: Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. *Frontiers in Immunology* **2017**, *8*, 369.
47. Delahaye, N.F.; Rusakiewicz, S.; Martins, I.; Menard, C.; Roux, S., a kol.: Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 700-707.
48. Joyce, M.G.; Tran, P.; Zhuravleva, M.A.; Jaw, J.; Colonna, M., a kol.: Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor NKp30 and identification of its ligand binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 6223-6228.
49. Hartmann, J.; Tran, T.V.; Kaudeer, J.; Oberle, K.; Herrmann, J., a kol.: The stalk domain and the glycosylation status of the activating natural killer cell receptor NKp30 are important for ligand binding. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 31527-31539.
50. Skořepa, O.; Pazický, S.; Kalousková, B.; Bláha, J.; Abreu, C., a kol.: Natural Killer Cell Activation Receptor NKp30 Oligomerization Depends on Its N-Glycosylation. *Cancers* **2020**, *12*, 1998.
51. Memmer, S.; Weil, S.; Beyer, S.; Zoller, T.; Peters, E., a kol.: The Stalk Domain of NKp30 Contributes to Ligand Binding and Signaling of a Preassembled NKp30-CD3 ζ Complex. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291*, 25427-25438.
52. Li, Y.; Wang, Q.; Mariuzza, R.A.: Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *Journal of Experimental Medicine* **2011**, *208*, 703-714.

53. Hershkovitz, O.; Jarahian, M.; Zilka, A.; Bar-Ilan, A.; Landau, G., a kol.: Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology* **2008**, *18*, 28-41.
54. Chisholm, S.E.; Reyburn, H.T.: Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *Journal of Virology* **2006**, *80*, 2225-2233.
55. Arnon, T.I.; Achdout, H.; Levi, O.; Markel, G.; Saleh, N., a kol.: Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nature Immunology* **2005**, *6*, 515-523.
56. Wang, W.; Guo, H.; Geng, J.; Zheng, X.; Wei, H., a kol.: Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 33311-33319.
57. Pogge von Strandmann, E.; Simhadri, V.R.; von Tresckow, B.; Sasse, S.; Reiners, K.S., a kol.: Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* **2007**, *27*, 965-974.
58. Binici, J.; Koch, J.: BAG-6, a jack of all trades in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2014**, *71*, 1829-1837.
59. Binici, J.; Hartmann, J.; Herrmann, J.; Schreiber, C.; Beyer, S., a kol.: A soluble fragment of the tumor antigen BCL2-associated athanogene 6 (BAG-6) is essential and sufficient for inhibition of NKp30 receptor-dependent cytotoxicity of natural killer cells. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 34295-34303.
60. Brandt, C.S.; Baratin, M.; Yi, E.C.; Kennedy, J.; Gao, Z., a kol.: The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine* **2009**, *206*, 1495-1503.
61. Ali, M.H.; Imperiali, B.: Protein oligomerization: how and why. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 5013-5020.
62. Goodsell, D., S.; Olson, A.J.: Structural symmetry and protein function. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2000**, *29*, 105-153.
63. Nooren, I.M.; Thornton, J.M.: Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *325*, 991-1018.
64. Levy, E.D.; Teichmann, S.: Structural, evolutionary, and assembly principles of protein oligomerization. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **2013**, *117*, 25-51.
65. Janin, J.; Miller, S.; Chothia, C.: Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. *Journal of Molecular Biology* **1988**, *204*, 155-164.

66. Bogan, A.A.; Thorn, K.S.: Anatomy of hot spots in protein interfaces. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *280*, 1-9.
67. Mateu, M.G.; Sánchez Del Pino, M.M.; Fersht, A.R.: Mechanism of folding and assembly of a small tetrameric protein domain from tumor suppressor p53. . *Nature Structural & Molecular Biology* **1999**, *6*, 191-198.
68. Powers, E.T.; Powers, D.L.: A perspective on mechanisms of protein tetramer formation. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 3587-3599.
69. Bahadur, R.P.; Rodier, F.; Janin, J.: A dissection of the protein-protein interfaces in icosahedral virus capsids. *Journal of Molecular Biology* **2007**, *367*, 574-590.
70. Uversky, V.N.: Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *FEBS Journal* **2010**, *277*, 2940-2953.
71. Prusiner, S.B.: The prion diseases. *Brain Pathology* **1998**, *8*, 499-513.
72. Johnson, R.T.: Prion diseases. *Lancet Neurology* **2005**, *4*, 635-642.
73. Korn, E.D.: Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiological Reviews* **1982**, *62*, 672-737.
74. Mandelkow, E.; Mandelkow, E.M.: Microtubular structure and tubulin polymerization. *Current Opinion in Cell Biology* **1990**, *2*, 3-9.
75. Lemmon, M.A.; Schlessinger, J.: Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, *19*, 459-463.
76. Ullrich, A.; Schlessinger, J.: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **1990**, *61*, 203-212.
77. Schlessinger, J.: Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends in Biochemical Sciences* **1988**, *13*, 443-447.
78. Banner, D.W.; D'Arcy, A.; Janes, W.; Gentz, R.; Schoenfeld, H., a kol.: Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **1993**, *73*, 431-445.
79. Gell, D.A.; Grant, R.P.; Mackay, J.P.: The detection and quantitation of protein oligomerization. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2012**, *747*, 19-41.
80. Stevens, F.J.; Schiffer, M.: Computer simulation of protein self-association during small-zone gel filtration. Estimation of equilibrium constants. *Biochemical Journal* **1981**, *195*, 213-219.
81. Refining Hydrodynamic Shapes of Proteins: The Combination of Data From Analytical Ultracentrifugation and Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Decay.

82. Van Holde, K.E.; Johnson, W.C.; Ho, P.S.: Principles of Physical Biochemistry. 2. vydání. *Prentice Hall* **2005**.
83. Lipfert, J.; Doniach, S.: Small-angle X-ray scattering from RNA, proteins, and protein complexes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2007**, *36*, 307-327.
84. Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S.A.; Freire, E.: Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods in Molecular Biology* **2004**, *261*, 35-54.
85. Soltermann, F.; Foley, E.D.B.; Pagnoni, V.; Galpin, M.; Benesch, J.L.P., a kol.: Quantifying Protein-Protein Interactions by Molecular Counting with Mass Photometry. *Angewandte Chemie* **2020**, *59*, 10774-10779.
86. Chua, E.Y.D.; Mendez, J.H.; Rapp, M.; Ilca, S.L.; Tan, Y.Z., a kol.: Better, Faster, Cheaper: Recent Advances in Cryo-Electron Microscopy. *Annual Review of Biochemistry* **2022**, *91*, 1-32.
87. Vonck, J.; Mills, D.J.: Advances in high-resolution cryo-EM of oligomeric enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* **2017**, *46*, 48-54.
88. Nakane, T.; Kotecha, A.; Sente, A.; McMullan, G.; Masiulis, S., a kol.: Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature* **2020**, *587*, 152-156.
89. Herrmann, J.; Berberich, H.; Hartmann, J.; Beyer, S.; Davies, K., a kol.: Homo-oligomerization of the activating natural killer cell receptor NKp30 ectodomain increases its binding affinity for cellular ligands. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 765-777.
90. Li, Z.; Michael, I.P.; Zhou, D.; Nagy, A.; Rini, J.M.: Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 5004-5009.
91. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R., a kol.: Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Humana Press* **2005**, 571-607.
92. Muller-Kuller, U.; Ackermann, M.; Kolodziej, S.; Brendel, C.; Fritsch, J., a kol.: A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, 1577-1592.
93. Yusa, K.; Zhou, L.; Li, M.A.; Bradley, A.; Craig, N.L.: A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 1531-1536.
94. Steentoft, C.; Vakhrushev, S.Y.; Joshi, H.J.; Kong, Y.; Vester-Christensen, M.B., a kol.: Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO Journal* **2013**, *32*, 1478-1488.

95. Tulpa, M.: Galektin-3 a jeho interakce s receptorem přirozené cytotoxicity NKp30. *Bakalářská práce, PřF UK, Katedra biochemie 2021.*