

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Anna Dvorská

PŘÍPRAVA A STUDIUM KOMPLEXU POTKANÍCH NK
BUNĚČNÝCH RECEPTORŮ NKR-P1B A CLRb

Preparation and studies of complex of rat NK cell receptors
NKR-P1B and Clrb

Bakalářská práce

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

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24. května 2012.

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali s přípravou práce nebo mě jakkoli podporovali během jejího vytváření. Zejména pak chci poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za podnětné rady, čas strávený odbornými konzultacemi a jeho trpělivost. Dále Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracování bakalářské práce v jeho laboratoři a všem členům laboratoře 204 (hlavně Mgr. Petře Celadové, Bc. Janu Bláhovi). Děkuji RNDr. Tereze Skálové, Ph.D. za možnost provádění krystalizace na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.

V neposlední řadě děkuji také svým rodičům a přátelům za jejich podporu v době mého studia.

OBSAH:

SEZNAM ZKRATEK	- 6 -
1. ÚVOD	- 8 -
2. TEORETICKÝ ÚVOD	- 9 -
2.1 Imunitní systém.....	- 9 -
2.1.1 Buňky imunitního systému	- 9 -
2.1.1.1 T- lymfocyty	- 9 -
2.1.1.2 NKT buňky.....	- 10 -
2.2 NK buňky	- 11 -
2.2.1 Buněčné rozeznávání NK buněk	- 11 -
2.2.1.1 Glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC gp).....	- 12 -
2.2.3 Receptory NK buněk	- 12 -
2.2.4 Rodina receptorů rNKR-P1	- 13 -
2.2.5 Rodina receptorů Clr.....	- 14 -
2.2.6 Zkoumaný systém: NKRP1B WAG, NKRP1B SD, Clrb WAG, RCTL	- 14 -
2.3 Expresní systém	- 15 -
2.4 Proteinová krystalografie	- 17 -
2.4.1 Krystalizace.....	- 17 -
2.4.2 Faktory ovlivňující krystalizaci.....	- 19 -
2.4.3 Metody krystalizace	- 19 -
2.4.4 Očkovací techniky.....	- 20 -
3. CÍLE PRÁCE	- 20 -
4. MATERIÁL	- 22 -
4.1 Pomůcky a přístroje	- 22 -
4.2 Chemikálie	- 23 -
4.2.1. Enzymy	- 24 -
4.2.2. Bakteriální kmeny a buněčné linie	- 24 -
4.2.3. Vektory	- 24 -
4.2.4. Primery pro PCR	- 24 -
4.2.5. Roztoky a média	- 25 -
5. METODY	- 27 -
5.1 Delece pHLsec-FcHis_C1, pHLsecFcHis_W1, pHLsecFcHis_S1, pHLsecFcHis_R2 ..	- 27 -
5.1.1 PCR amplifikace I.....	- 27 -
5.1.2 Agarosová elektroforéza	- 27 -
5.1.3 Izolace z agarosového gelu	- 27 -
5.1.4 PCR amplifikace II.....	- 28 -
5.1.5 Restrikční štěpení plazmidu	- 28 -
5.1.6 Restrikční štěpení PCR-produktu	- 28 -
5.1.7 Ligace.....	- 28 -
5.1.8 Transformace I.....	- 29 -
5.1.9 PCR z kolonií	- 29 -

5.1.10 „Miniprep“	29
5.1.11 Ověření koncentrace pomocí Spektrofotometru NanoVue Plus	30
5.1.12 Sekvenování	30
5.1.13 Transformace II.	30
5.1.14 „Maxiprep“	30
5.2 Příprava proteinu pYD5_C1, W1, S1 a ΔpHLsec-FcHis_C1, W1, S1, R1	31
5.2.1 Kultivace HEK293S buněčné linie	31
5.2.1.1 Rozmražení buněčných linií	31
5.2.1.2 Suspenzní kultivace.....	31
5.2.1.3 Určení buněčné hustoty	32
5.2.2 Expresní test	32
5.2.2.1 Transfekce ve 12ti jamkové destičce	32
5.2.2.2 SDS-PAGE	32
5.2.2.3 Elektropřenos proteinu na membránu	33
5.2.2.4 Imunodetekce	33
5.2.3 Velkoobjemová produkce	34
5.3 Purifikace proteinů	35
5.3.1 Afinitní chromatografie	35
5.3.2 Zkoncentrování proteinů	35
5.3.3 Gelová permeační chromatografie.....	35
5.3.4 Stanovení koncentrace proteinů	36
5.3.5 Štěpení TEV proteasou.....	36
5.3.6 Chelatační chromatografie	36
5.3.7 Deglykosylace proteinu rClrb	37
5.4 Charakterizace proteinu - analytická ultracentrifugace	37
5.4.1 Metoda sedimentační rychlosti	37
5.5 Strukturní studium rClrb - Proteinová krystalizace	37
6. VÝSLEDKY PRÁCE	38
6.1 Příprava a studium pYD5_C1, pYD5_W1, pYD5_S1	39
6.1.1 Příprava zásobního množství plazmidu	39
6.1.2 Velkoobjemová produkce v HEK293S GnTI ⁻ linií.....	41
6.1.3 Purifikace proteinů	41
6.1.4 Deglykosylace rClrb	43
6.1.5 Analýza tvorby komplexu rClrb - NKR-P1B pomocí analytické ultracentrifugy.....	44
6.1.6 Krystalizace proteinu rClrb	46
6.2 Delece ve vektoru pHLsec-FcHis	47
6.2.1 Vytvoření deletovaného Fc fragmentu.....	48
6.2.2 PCR z kolonií	50
6.2.3 Expresní test plazmidů pHLsec-ΔFcHis.....	51
7. DISKUZE.....	53
8. ZÁVĚR	56
9. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	57

SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátce („ <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> “)
APS	peroxysíran amonný („ <i>ammonium persulfate</i> “)
ATC	antigen prezentující buňka („ <i>antigen presenting cells</i> “)
bp	pár bází (jednotka délky řetězce DNA, „ <i>base pair</i> “)
BSA	hovězí sérový albumin („ <i>bovine serum albumin</i> “)
CBB R-250	barva Coomassie Brilliant Blue R-250
CD	označení povrchových molekul leukocytů („ <i>cluster of differentiation</i> “)
CHO	buněčná linie z vaječníků křečička čínského („ <i>Chinese hamster ovary</i> “)
Clr _b	rodina proteinů obsahujících podobný motiv jako lektiny typu C („ <i>C-type lectin related b</i> “), viz též Oci _l
CTLD	doména podobná lektinům C-typu („ <i>C-type lectin-like domain</i> “)
DAP12	12kDa protein aktivující DNAX („ <i>DNAX-activating protein of 12 kDa</i> “)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina („ <i>deoxyribonucleic acid</i> “)
dNTPs	směs deoxynukleotidtrifosfátů
DTT	1,4-dithiothreitol
ECL	zesílená chemiluminiscence („ <i>enhanced chemiluminescence</i> “)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ExCELL293	komerční kultivační médium
F17	komerční kultivační médium
Fc	část molekuly protilátky („ <i>Fragment crystallizable</i> “)
FcεR1γ	vysokoafinitní receptor pro IgE („ <i>Fc epsilon receptor type I gamma chain</i> “)
GAM	sekundární polyklonální protilátka při imunodetekci („ <i>goat anti mouse antibody</i> “)
HEK	lidské embryonální ledvinné buňky („ <i>human embryonic kidney</i> “)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HPLC	vysokouúčinná kapalinná chromatografie („ <i>high-performance liquid chromatography</i> “)
HRP	křenová peroxidasa („ <i>horseradish peroxidase</i> “)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv („ <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> “)
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv („ <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> “)
kbp	jednotka délky řetězce DNA, 1000 bp („ <i>kilo base pair</i> “)
KIR	zabíječské receptory imunoglobulinové povahy („ <i>killer-cell immunoglobulin-like receptors</i> “)
LB	Luria Bertani médium
lPEI	lineární polyethylenimin
mAb	monoklonální protilátka („ <i>monoclonal Antibody</i> “)
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
MHC gp I	glykoproteiny třídy I hlavního histokompatibilního komplexu („ <i>major histocompatibility complex type I glycoproteins</i> “)

NK	přirozený zabíječ („ <i>natural killer</i> “)
NKC	NK genový komplex („ <i>natural killer gene complex</i> “)
NKR-P1B	rodina C-lektinových receptorů NK buněk („ <i>natural killer cell receptor - protein 1B</i> “)
NKT	NKT-lymfocyty („ <i>natural killer T cells</i> “)
Oc1l	lektin inhibující formaci osteoklastů („ <i>Osteoclast inhibitory lectin</i> “), viz též Clr
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCR	polymerázová řetězová reakce („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PVDF	polyvinylidendifluorid
RCMV	potkaní cytomegalovirus
RCTL	gen C-lektinového typu potkaního cytomegaloviru („ <i>RCMV C-type lectin-like</i> “)
SDS	dodecylsulfát sodný
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza („ <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> “)
TAE	tris-acetátový pufr s EDTA
TBS	Tris pufovaný fyziologický roztok („ <i>Tris-buffered saline</i> “)
T _C	cytotoxický T lymfocyt („ <i>T cytotoxic cell</i> “)
TCR	T-buněčný receptor („ <i>T-cell receptor</i> “)
TEMED	NNN'N'-tetramethylethylendiamin
TES pufr	pufr obsahující Tris, EDTA a chlorid sodný
TEV	virus tabákové mozaiky („ <i>Tobacco Etch Virus</i> “)
T _H	pomocný T lymfocyt („ <i>T helper cell</i> “)
TK	tkáňové kultury
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. ÚVOD

Přirození zabíječi nebo-li NK buňky hrají důležitou roli v nespecifické imunitě organismů. Jejich jedinečnou schopností je zabít některé nádorové a virově infikované buňky bez předchozí senzitivace antigenem.¹ Tato práce se zabývá přípravou a studiem komplexu potkaních NK buněčných inhibičních receptorů NKR-P1B („natural killer cell receptor - protein 1B“) a jeho ligandem Clrb („C-type lectin-related ligand b“). Pro rekombinantní přípravu rozpustné formy těchto dvou lektinových receptorů potkaních NK buněk byla použita tranzientní transfekce linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 s jednoduchou glykosylací. Nativní formy receptorů - disulfidicky vázané homodimery - byly připraveny jako několik různých typů fúzních konstruktů s IgG-Fc (s pomocí vektorů jako ΔpHLsec-FcHis či pYD5), které po odštěpení TEV proteasou poskytují čistě dimerní formu extracelulární části receptorů bez afinitní kotvy. Komplex byl charakterizován pomocí analytické ultracentrifugace. Bylo zjištěno, že lépe tvoří komplex dvojice rNKR-P1B WAG a rClrb než rNKR-P1B SD a rClrb. Strukturní studium rClrb bylo zahájeno metodou krystalizace proteinů.

Klíčová slova:

NK buňka, HEK293, receptor, NKR-P1, Clrb, krystalizace

Keywords:

NK cell, HEK293, receptor, NKR-P1, Clrb, crystallization

2. TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu.¹ Udržuje celistvost organismu rozpoznáváním toho, co je pro nás škodlivé a co není, ať už jsou škodliviny z vnějšku (obranyschopnost) nebo se tvoří uvnitř (autotolerance a imunitní dohled).¹ Náš obranný mechanismus má evolučně starší část „nespecifickou“ nebo-li „neadaptivní“ vrozenou imunitu a vývojově mladší „antigeně specifickou“ (adaptivní).^{1,2} Ta původní je složena z buněčné a humorální složky. Nespecifický buněčný systém je založen jak na fagocytujících buňkách, tak na přirozeně cytotoxických buňkách, které prezentují přirození zabíječi tzv. NK buňky („natural killers cells“).¹ Tuto imunitu vlastní takřka všichni mnohobuněční živočichové, dokáží díky ní zničit škodliviny během několika minut.^{1,2} Oproti tomu adaptivní je výsadou obratlovců a aktivuje se až po setkání s antigenem, reaguje na cizorodé látky velice specificky a zachovává si imunologickou paměť.¹

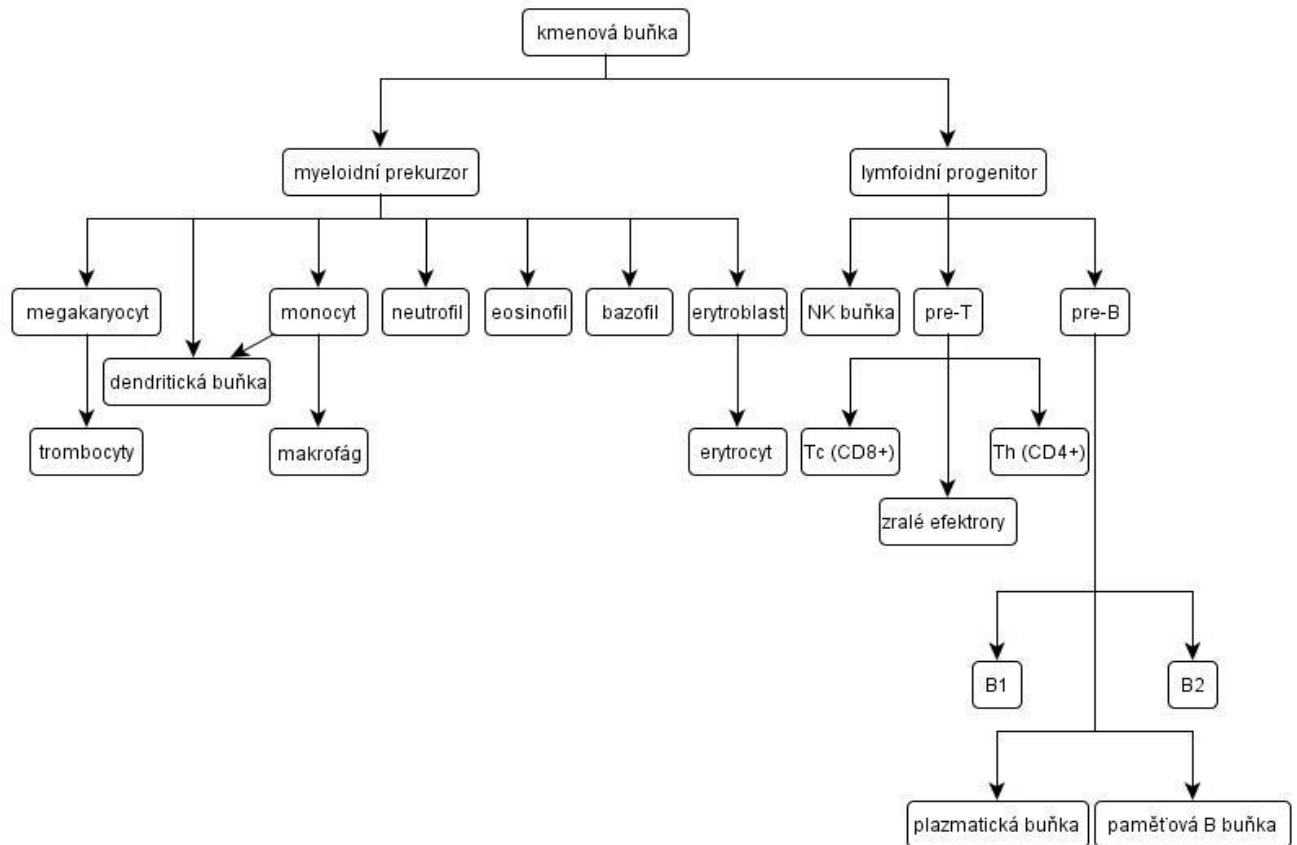
2.1.1 Buňky imunitního systému¹

Většinu buněk imunitního systému tvoří bílé krvinky (leukocyty), veškeré leukocyty pocházejí z kmenových buněk nalézajících se v kostní dřeni. Díky různým faktorům se diferencují během svého života na různé typy leukocytů (viz. Obr. 2.1, str. 10). Jejich menší množství se poté udržuje dělením. Vznikají dvě základní linie: myeloidní a lymfoidní. Pro tuto práci je důležité, že z lymfoidní části se diferencují NK buňky, lymfocyty B a T. NK buňky jsou vývojově bližší lymfocytům T než B.

2.1.1.1 T-lymfocyty

Hlavní rolí T-lymfocytů je zprostředkovat buněčně antigeně specifické reakce či imunitní reakce s protilátkou.¹ Existuje jich několik typů na základě exprese povrchových molekul, sekrece cytokinů a funkčních vlastností.¹ Základními typy jsou Th s CD4 receptory, jenž rozeznávají buňky na základě interakce s MHC gp II (glykoproteiny třídy II hlavního histokompatibilního komplexu), s funkcemi převážně pomocnými a regulačními a Tc s CD8 receptory, jenž rozeznávají buňky na základě interakce MHC gp I, s cytotoxickou funkcí.^{1,3} Oba typy spolu spolupracují, Th lymfocyty označí nakažené buňky a Tc je zničí.³ Antigenní peptidy vázané v komplexu s MHC glykoproteiny I. či II. třídy na buňkách prezentujících antigen jsou u T-lymfocytů rozpoznávány pomocí svých TCR receptorů („T-cell receptor“).¹ Povaha

antigenu určuje výsledek dané reakce, kterým může být zaprvé rozvoj převážně buněčného (zánětlivého) typu odpovědi založeného na subpopulacích Th1 a Th17 a následné aktivaci makrofágů, neutrofilů nebo Tc, nebo zadruhé spolupráce Th2 s B-lymfocyty při produkci protilátek.¹



Obr. 2.1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky.

Vznikají 2 hlavní linie – myeloidní a lymfoidní. Z lymfoidní vznikají NK buňky a různé typy T- a B-lymfocytů. Z myeloidní vznikají tři druhy granulocytů (neutrofilů, eosinofilů, bazofilů), megakaryocyty, erytroblasty a dendritické buňky.¹

2.1.1.2 NKT buňky

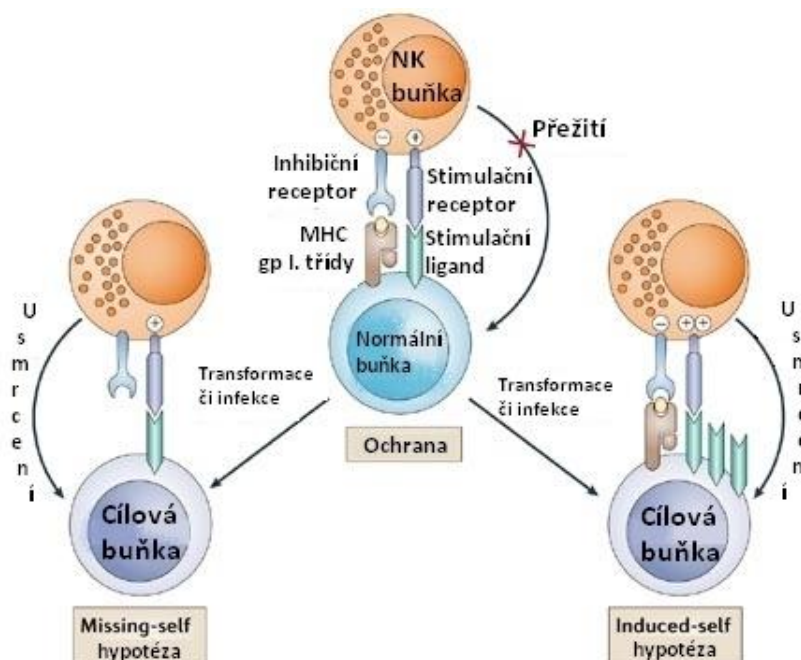
Přechodem mezi T-lymfocyty a NK buňkami je zvláštní typ buněk NKT-lymfocyty.¹ Díky TCR typu $\alpha\beta$ se podobají T-lymfocytům, ale vlastní i stimulační či inhibiční receptory charakteristické pro NK buňky.¹ NKT-lymfocyty rozeznávají komplexy CD1d s (glyko)lipidy mikrobiálního nebo vlastního původu.¹ Komplexy CD1d se velmi podobají MHC gp I. třídy, skládají se z podobného α transmembránového řetězce a β_2m , jsou však mnohem méně polymorfní a většinou se specializují na vazbu zvláštních ligandů.¹ Tyto buňky jsou bohatým zdrojem cytokinů a mají pravděpodobně důležité regulační funkce.¹

2.2 NK buňky

Přirození zabíječi nebo-li NK buňky jsou součástí vrozeného imunitního systému. Jsou schopny urychleně zabít cílové buňky infikované virem, nádorové či vystavené stresu.^{1,5} Morfologicky jsou to velké granulární lymfocyty, nemají však na rozdíl od T- a B-lymfocytů antigenně specifické receptory.¹ NK buňky se vyvíjí v kostní dřeni a nachází se v periferních lymfoidních tkáních a krvi.^{4,5}

2.2.1 Buněčné rozeznávání NK buněk

NK buňky rozeznávají buňky, jež mají na sobě abnormálně málo MHC gp I.¹ Nádorové buňky se totiž brání napadení Tc buňkami (cytotoxické T-lymfocyty) tak, že potlačují povrchovou expresi MHC gp I.¹ Avšak jiné nástroje cytotoxicity mají NK buňky do značné míry komplementární k Tc lymfocytům.¹



Obr. 2.2: Rovnováha mezi aktivačními a inhibičními signály určuje výslednou odpověď NK buněk.⁵

Normální cílové buňky jsou chráněny před zabitím NK buňkami, pokud přijímaný signál od aktivačních ligandů je vyvážený s inhibičním, který interaguje s vlastními MHC molekulami I. třídy. Pokud díky transformaci či infekci ztrácí cílové buňky vlastní MHC molekuly třídy I, pak aktivačním signálům dodaných do cílové buňky nevytváří odpor inhibiční signály a dojde k lyzi buňky (tzv. „missing-self“ hypotéza). Transformace či infekce mohou také vyvolávat expresi stimulačních ligandů tak, že inhibiční signál je mnohonásobně překonán aktivačním (tzv. „induced-self“ hypotéza). Z mnoha výzkumů vyplývá, že obě rozpoznávání fungují současně, aby byla správně rozlišena buňka napadená virem či nádorová od zdravé.⁵

NK buňky mohou přímo způsobit lyzi cílové buňky či se podílet na regulaci, např. jsou významní výrobci interferonu γ (IFN γ), který ovlivňuje odpověď T-lymfocytů.⁵ Avšak na rozdíl od B- a T-lymfocytů nedominuje pouze jeden antigenní receptor, ale výslednou reakci určuje rovnováha stimulačních a inhibičních receptorů na povrchu NK buněk.^{5,7} Existují dvě hypotézy (Obr. 2.2, str. 11) o tom, jak jsou buňky nakažené virem či jinak transformované zničeny NK buňkou: první předpokládá, že nakažené buňky přijdou o své MHC glykoproteiny I.třídy (známé jako „missing-self“ hypotéza), a druhá tvrdí, že je vyvolána exprese stimulačních ligandů tak silná, že inhibiční signál je mnohonásobně překonán aktivačním (tzv. „induced-self“ hypotéza).^{5,7,8}

2.2.1.1 Glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC gp)

MHC glykoproteiny I. třídy se nacházejí na všech jaderných buňkách organismu a II. třídy za fyziologických okolností jen na antigen prezentujících buňkách (APC - „antigen presenting cells“, např. dendritické buňky, B-lymfocyty a další).^{1,6} MHC gp I. třídy se skládají z transmembránového řetězce α , k němuž je nekovalentně asociován β_2 -mikroglobulin. α řetězec je složen ze tří domén, dvě N-terminální α_1 a α_2 vytvářející vazebné místo pro peptidy.^{1,6} Třetí doména α_3 a β_2m jsou svou strukturou podobné doménám imunoglobulinovým.^{1,6}

2.2.3 Receptory NK buněk

Existují dvě rodiny NK buněčných receptorů dělicích se podle struktury, imunoglobulinová superrodina a rodina C-lektinového typu.^{1,7,8} Z pohledu buněčné odpovědi se na povrchu nacházejí dva typy receptorů, aktivační a inhibiční.¹ Receptory na povrchu NK buněk rozeznávají své ligandy a díky nim je signál veden dovnitř buněk.⁵

Inhibiční receptory rozpoznávají MHC gp I a tlumí cytotoxické mechanismy NK buňky.¹ NK buňka však nedokáže rozeznat všechny různorodé typy MHC gp I.¹

Receptory C-lektinového typu tvoří zpravidla dimery spojené disulfidickými můstky.⁸ Tato skupina byla nalezena jak u myších NK buněk (např. Ly-49), tak u lidských (heterodimer CD94/NKG2A), dokonce i u kuřat (velice podobný heterodimer CD94/NKG2).^{1,8,9}

Receptory imunoglobulinové rodiny KIR („Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors“) vytváří zpravidla pouze monomery.^{1,8} Doposud byly nalezeny

jen na lidských NK buňkách. Jejich inhibiční aktivita je založena na asociaci s cytoplazmatickými fosfatázami, které ruší signály aktivačních receptorů přenášené pomocí protein kináz.^{1,7} KIR jsou pojmenovány podle počtu domén, pokud mají 3, tak vlastní dlouhý cytoplazmatický konec, jenž obsahuje tyrosin, který je ústřední součástí inhibičního motivu ITIM, zatímco krátký řetězec se dvěma doménami má potenciální aktivační funkci.^{7,8}

Stimulační receptory jsou schopny rozeznávat struktury na povrchu různých typů buněk (např. proteinů MHC).¹ Mnoho aktivačních receptorů má podobné extracelulární domény jako inhibiční bez motivu ITIM, avšak v transmembránové doméně obsahují aminokyselinové zbytky, díky kterým dokáží tvořit multimerní komplex s adaptorovými molekulami obsahujícími imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv ITAM.⁸ Díky těmto signálům je NK buňka schopna se aktivovat a zahájit cytotoxickou odpověď vůči cílové buňce.¹ NK buňky exprimují několik adaptorových proteinů obsahujících ITAM, je to zejména membránový protein DAP12, který může být fosforylován a může komunikovat s protein tyrosin-kinasami Syk a ZAP-70, což vede ke spuštění signalizačních kaskád a následné buněčné aktivaci. Dalším důležitým adaptorovým proteinem je FcεRγ, který spojuje receptor s γ-řetězcí protilátky IgE prostřednictvím receptoru CD16 a naváže se na jejich Fc fragment.^{1,8} Tímto způsobem dojde k přenesení signálu a následné degranulaci.¹ Takovéto aktivační receptory se podílí na ději zvaném cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC).^{1,13}

2.2.4 Rodina receptorů rNKR-P1

Jednou z prvních popsaných rodin receptorů na NK buňkách jsou NKR-P1 receptory, které byly poprvé objeveny roku 1977 na myších buňkách.^{10,13} NKR-P1B je disulfidicky vázaný homodimer transmembránového typu II a obsahuje doménu podobnou lektinům C-typu.¹⁴ Potkaní systém NKR-P1 – Clr je v porovnání s myším ještě rozmanitější.¹¹ Počet receptorů je redukován ze šesti myších NKR-P1 na čtyři potkaní, zatímco počet ligandů se zvýšil z osmi na jedenáct potkaních Clr.¹¹ Geny pro tyto receptory jsou sdruženy v tzv. NK genovém komplexu (NKC), který se nachází na chromozomu 6 u myši, obdobně na chromozomu 4 u potkanů a na 12. chromozomu u lidí.¹⁴ Proteiny, které kódují jsou značeny jako NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1F a NKR-P1G.¹⁴ První dva se nacházejí na centromerním konci NKC, druhé dva na telomerním konci. Každá dvojice sestává z jednoho aktivačního (NKR-P1A, NKR-P1F) a jednoho inhibičního (NKR-P1B a NKR-P1G) receptoru.^{11,14} Genetická

vazba NKR-P1 a Clr umožňuje stabilní koevoluci funkčního páru receptor – ligand podobné specifity, tato funkce může ovlivnit vývoj odolnosti a citlivosti k patogenům.¹¹

Ačkoli prvotní studie naznačovaly vazbu vápníku, a myslelo se, že NKR-P1 je C-lektinového typu.¹² Pozdější analýzy vazbu nepotvrdily, proto se v současné době v literatuře zpravidla píše o doméně podobné lektinům C-typu CTLD.¹²

2.2.5 Rodina receptorů Clr

Receptory rodiny NKR-P1B podobné C-lektinovému typu se nacházejí jak na NK buňkách tak na NKT buňkách. Ligand pro inhibiční myši NKR-P1B a NKR-P1D je inhibiční lektin osteoklastu Ocil nebo-li Clrb.¹⁴ Jedná se o transmembránový protein II. typu, který je podobný C-lektinům a je složen z 207 aminokyselin. Výskyt Ocil na myších nádorových buněčných liniích zabraňuje buněčnému zabíjení NK buňkami, je tedy podobný MHC glykoproteinům I.třídy, hraje s inhibičními receptory hlavní roli při jiné formě „missing-self“ hypotézy.¹⁴ Avšak inhibice může být blokována monoklonálními protilátkami (mAb) specifickými pro Ocil.¹⁴ Ligand je tvořen na normálních hematopoetických buňkách (až na erytrocyty).¹⁴ V současné době jsou známy dva myší ligandy pro receptory rodiny NKR-P1, Clrb je ligand pro inhibiční NKR-P1B i NKR-P1D a Clrg je ligand pro aktivační NKR-P1F.^{14,15} U potkanů je známo 10 ligandů receptorů NKR-P1 rodiny a to např. Clr11, jenž může interagovat jak s inhibičním receptorem NKR-P1B, tak s aktivačním NKR-P1A. Avšak číslování převyšuje 10 (existuje i Clr11), neboť Clr8 je pouze fragment.¹⁶

2.2.6 Zkoumaný systém: NKR-P1B WAG, NKR-P1B SD, Clrb WAG, RCTL¹⁵

O cytomegaloviru je známo, že kóduje několik genových produktů, jejichž funkcí je rozvrátit imunitní rozpoznávání založené na MHC. Jedním z genů potkaního cytomegaloviru (RCMV) je gen C-lektinového typu RCTL („RCMV C-type lectin-like“), který je homologní s Clr ligandy pro receptory NKR-P1. Velikost RCTL je 20 kDa.¹⁷ Po odstranění Clrb z povrchu buněk napadených virem RCMV zaujme jeho místo falešný virový ligand RCTL imitující Clrb, čímž se virus brání NK buněčné cytotoxické odpovědi. RCTL a Clr jsou v extracelulárních částech homologní, u myši z 50 % s mClrb, z 48 % s mClrg, u potkana dokonce z 60 % s rClrb (viz. Obr. 2.3, str. 15). Avšak cytoplazmatická doména byla zkrácena a změněna. Expresi RCTL lze detekovat už po třech hodinách od infekce cílové buňky.¹⁵

Závisí však na hostitelském inhibičním receptoru rNKR-P1B a na jeho morfologii, zda rozpozná Clrb od RCTL - tím se podstatně liší potkaní kmeny SD, BN a F344 od kmenů BS, PVG a WAG.¹⁵ Po průzkumu reakcí na RCTL a Clrb bylo zjištěno, že rNKR-P1B WAG rozpoznává Clrb i RCTL, narozdíl od rNKR-P1B SD, které je dokáže rozlišit - váže pouze Clrb.¹⁵

```

rClrb-WAG  MSAKKASQPM LN TTGSLQEGEMGKMFHGKCLRIVSPESPALYCCYGVIMVLSVAVVALS 60
RCTL      -----MAHEDYIRFASVDSNTKLYCCYVVIFLLTVVITLS 36

rClrb-WAG  VALSVKMT PQISTINTYAA CP RNWIGVG RC FYFSEYAS WTFSQTFCKAQEAELARFDT 120
RCTL      TILSAQRSIDPPIVHNYAICPKDWIGLTDTCY YFSNSTTNWTFQAQTLCKGNNSNLAHFNT 96

rClrb-WAG  EEELNFLSRYKGSFDYWIGLHRESSEHPWKWDNTQY YSLSIRGVERYAYLNDIGISSA 180
RCTL      EEQYNFLSRYKGNFDYWIGIHRESSEHPKWADNTTYNSLSIRGVEKYAYLNDLGISSA 156

rClrb-WAG  RVYADKRWS SRLNSYSLQCKTPPFSPM 207
RCTL      RVYADKRWS CSKS-TDSLRCQLCST-- 180

```

modře konstrukt C1 (Val₆₅ – Met₂₀₇)

zeleně konstrukt R2 (His₅₁ a Thr₁₈₀)

```

rNKR P1B-WAG  MDTAVVYADLHLARTGEPKHKSPPSLSPDTCQCPRWHLRALKLGCACLILLVLSVIGLGV 60
rNKR P1B-SD   MDTAVVYADLHLARTGEPKREPPPSLSPDTCQCPRWHLRALKLGCACLILLVLSVIGLGV 60

rNKR P1B-WAG  LVLTL LQKPLIQNSPADVQENRTKT TDSPTKLC PKDWHSHQDKCFHVSQAPNTWIKSLA 120
rNKR P1B-SD   LVLTL LQKPLIQNSPADVQENRTKT TDSPAKLC PKDWHSHQDKCFHVSQTSITWKGS LA 120

rNKR P1B-WAG  DCGGKGATLLLIQDQEELRFLRLTKGKDRSFWIGLYTLPDKNWKWINSSTLNSDVL SI 180
rNKR P1B-SD   DCGGKGATLLLVQDQEELRFLRLTKRIS SSSFWIGLSYTL SDEKWKWINGSTLNSDAL NI 180

rNKR P1B-WAG  FGDTRQNSC ASISQDKVLSESCDS DNLIWICQKELKCECMNGS 223
rNKR P1B-SD   TGDTEKDS CASVSQDKVLSESCDS DNLIWICQKELKRESTC NDS 223

```

modře konstrukt W1 (Val₇₈ – Ser₂₂₃)

zeleně konstrukt S1 (Val₇₈ – Ser₂₂₃)

Obr. 2.3: Sekvence proteinů rNKR-P1B konstruktů W1 a S1, rClrb konstruktů C1 a RCTL konstruktů R2.

Hnědě značené aminokyseliny spouští kaskádu inhibičních reakcí, dále je znázorněna transmembránová část, v konstruktech jsou znázorněna potenciální místa N-glykosylace a cysteiny zodpovědné za tvorbu disulfidických můstků a dimerizaci.

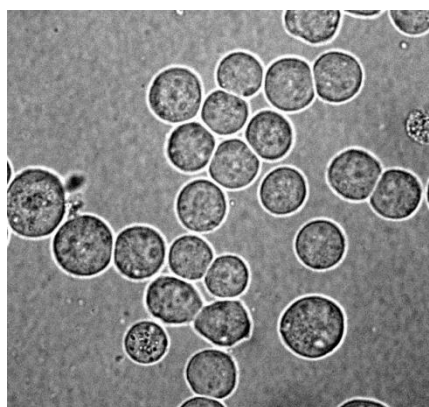
2.3 Expresní systém

V současnosti se pro rekombinantní expresi proteinů používá mnoho expresních systémů, od bakterií a kvasinek přes rostlinné a hmyzí buňky až po savčí (např. CHO - buňky z vaječníku křečička čínského, HEK293 - lidské embryonální buňky 293).²³

Bakteriální systémy jsou výhodné z mnoha různých důvodů, především proto, že exprese proteinů v bakteriích (zejména *Escherichia coli*) je mnohem levnější a rychlejší než v eukaryotických systémech.^{18,23} Oproti tomu dražší a pomalejší eukaryotické systémy jsou nezbytné pro získání celé řady bílkovin, které vyžadují pro správné skládání a funkci posttranslační modifikace (např. glykosylaci).^{18,22,23} Dalšími používanými bakteriemi jsou *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori* a další.^{19,20} Z kvasinek se nejčastěji používá *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*.²¹

Savčí buňky v suspenzní kultuře se nedávno ukázaly při transienční transfekci jako velice užitečné pro získání rekombinačních proteinů. Pro tento účel jsou nejčastěji používány speciálně přizpůsobené buněčné linie HEK293 či CHO.^{22,23} Místo transienční transfekce je sice s ohledem na výtěžek vhodnější tvorba stabilně transfekovaných linií, ta je ale mnohem těžší a časově náročnější.²² Oproti produkci v hmyzích buňkách infikovaných bakuloviry je transienční transfekce savčích linií mnohem rychlejší, jelikož není potřeba získat rekombinantní virus.^{22,23} Zatímco CHO buňky jsou standardem pro tvorbu stabilních linií, pro transienční transfekci je přednostně používána linie HEK293, a to jednak díky rychlé a levné transfekci běžně dostupným polyethyleniminem, a dále díky tomu, že i když jsou CHO buňky efektivně transfekované, výtěžek je při jejich transienční transfekci často 2-5 krát nižší ve srovnání s PEI transfekovanými HEK buňkami.²²

U linie HEK293 (viz. Obr. 2.4) se běžně používají 3 varianty: HEK293T, exprimující SV40 virový T-antigen; HEK293E, exprimující EBNA1 antigen a HEK293S GnTI s jednoduchou a homogenní glykosylací.²⁴

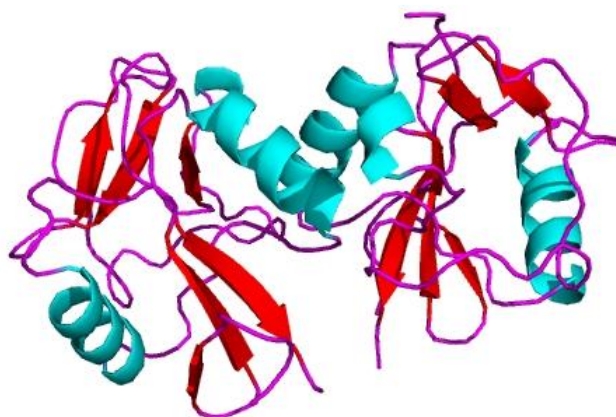


Obr. 2.4: Buňky HEK293 zachycené fluorescenčním mikroskopem.

(RNDr. Jan Svoboda, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i)

2.4 Proteinová krystalografie

Proteinová krystalografie se rozvinula už v druhé polovině 19. století.²⁵ V dnešní době lze krystalizovat proteiny, nukleové kyseliny či viry i ribozomy.²⁵ Společným cílem strukturních genomických center je rozluštění trojrozměrných struktur (např. NKR-P1B SD na Obr. 2.5) pro co nejvíce rekombinantních proteinů odvozených od známých genomových sekvencí.²⁶ Rentgenová krystalografie je hlavní metodou pro získání informací o atomovém rozlišení velkých makromolekul (> 35 kDa). K získání kvalitních krystalografických dat jsou zapotřebí synchrotrony, citlivé rentgenové detektory a další.²⁶ Výhody použití synchrotronového záření pro proteinovou krystalografii bílkovin jsou rychlý sběr dat, mohou se použít menší krystaly než u běžných rentgenových přístrojů, existuje možnost měření při více vlnových délkách.²⁷



Obr. 2.5: První vyřešená krystalová struktura rNKR-P1B SD.

Struktura kovalentního dimeru rNKR-P1B. Červeně jsou znázorněny β -listy, modře α helixy.²⁸

2.4.1 Krystalizace

Prvním a velice důležitým krokem krystalografie je krystalizace proteinu. Růst krystalů makromolekul je založen na trpělivosti, vytrvalosti a díky velkému počtu proměnných na přístupu pokus-omyl.²⁵ Molekuly se v krystalu uspořádávají v přesném pravidelném pořadí (viz. Obr. 2.6, str. 18).²⁵

K určování počátečních krystalizačních podmínek už nám dnes napomáhají krystalografické databáze či soupravy komerčních roztoků.²⁵ Tyto soupravy jsou dostupné pro všechny krystalizační metody, ať pro visící či sedící kapku, dialýzu, a další.²⁵ Zlepšení můžeme dosáhnout systematickou změnou, kdy měníme nejdůležitější proměnné jako koncentraci srážedla nebo proteinu, pH a teplotu aj.²⁵ Jakmile se objeví i velice malé krystaly začíná zdlouhavý proces optimalizace,

kdy se postupně upravují různé faktory a hledá se optimální podmínka.²⁵



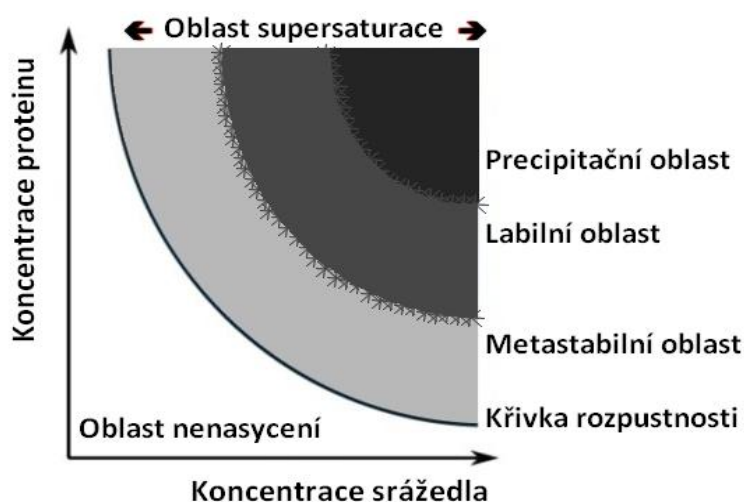
Obr. 2.6: Krystaly rClrb WAG (vlevo), rNKR-P1B SD (vpravo).

rClrb WAG, konstrukt s histidinovou kotvou, produkce v HEK293E s přidavkem kifunensinu, difrakce do 4 Å; rNKR-P1B SD bez kotvy, produkce v HEK293S, difrakce do 2.3 Å (krystaly RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D.).

Krystalizace bílkovin probíhá ve dvou odlišných, ale neoddělitelných krocích (nukleaci a růstu krystalů) tehdy, je-li systém v přesyceném stavu.²⁵ Na nukleaci velice záleží, neboť nám dává základ uspořádání celého krystalu.²⁵ Z hlediska statistického existují formy kapalně fáze, které lépe charakterizují dané procesy.²⁵ Přesycený stav je nerovnovážný, množství proteinu je nad rámec limitu rozpustnosti, dosažení rovnováhy se obnoví až vznikem pevných částic, jako jsou krystaly nebo precipitát.²⁵ U přesyceného stavu musí roztok snížit schopnost rozpouštět bílkovinu, vztah mezi rozpouštědlem a rozpouštěnou látkou musí podporovat vznik pevného skupenství, např. změnou pH, změnou chemické činnosti (přidání soli).²⁵ Pevná látka se nevyvíjí spontánně při překročení saturačního limitu, je třeba dostat se do labilní oblasti, která je ideální pro tvorbu krystalizačních jader.²⁵ Naopak v metastabilní oblasti probíhá již jen růst stávajícího krystalu (viz. Obr. 2.7).²⁵

Obr. 2.7: Fázový diagram popisující oblasti krystalizace proteinu.²⁴

Jedná se o závislost koncentrace proteinu na koncentraci srážedla.



2.4.2 Faktory ovlivňující krystalizaci²⁹

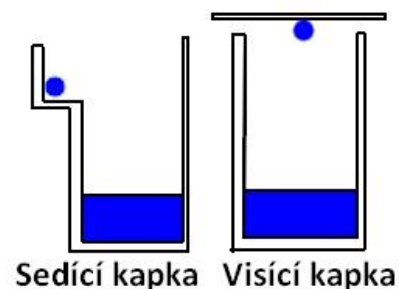
Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují krystalizaci proteinů, a mnoho z nich je shrnuto v Tab. 2.4. Ty mohou mít vliv na pravděpodobnost výskytu krystalů, nukleaci, rychlost růstu krystalů a nakonec i na velikost a kvalitu krystalu. Vliv pH a teploty, či koncentrace dalších srážedel jsou velice významné. Dalším důležitým parametrem je koncentrace bílkoviny, u níž se mohou hodnoty lišit od 1 mg/ml až do 100 mg/ml. Ostatní podmínky mohou být méně důležité, ale často právě hrají rozhodující roli. Přítomnost nebo nepřítomnost ligandů či inhibitorů, různých solí a pufrů, teploty nebo přítomnosti detergentů, to vše jsou relevantní úvahy. Mezi méně důležité parametry patří gravitace, elektrické a magnetické pole nebo viskozita.

Tab. 2.4: Faktory fyzikální, chemické a biochemické povahy ovlivňující krystalizaci²⁵

Fyzikální	Chemické	Biochemické
Teplota/ kolísání teploty	pH	Čistota proteinu
Povrch	Typ srážedla	Ligandy, inhibitory, efekторы
Metodika	Koncentrace srážedla	Agregační stav proteinu
Gravitace	Iontová síla	Post-translační modifikace
Tlak	Specifické ionty	Zdroj proteinu
Čas	Stupeň přesycení	Proteolýza/hydrolyza
Vibrace (akustické vlny)	Reduktivní/oxidativní prostředí	Chemické modifikace
Elektrostatické /magnetické pole	Koncentrace proteinu	Genetická modifikace (mutace)
Dielektrické vlastnosti roztoku	Ionty kovu	Vlastní symetrie proteinu
Viskozita roztoku	Neproteinové nečistoty	Stabilita proteinu
Míra ustanovení rovnováhy	Detergenty	Isoelektrický bod
Homogenita krystalizačních zárodků		Historie a stáří vzorku

2.4.3 Metody krystalizace²⁹

Mezi techniky krystalizace patří difúze par, metoda mikrodávek a dialyzační metody. Nejpoužívanější metoda je difúzní, která zahrnuje mj. metodu visící a sedící kapky (viz. Obr. 2.8). V tomto případě jsou kapky a rezervoár o větším objemu v uzavřeném systému, kde dochází k difúzi vodních par z kapky obsahující roztok proteinu do rezervoáru, ve kterém je ve vysoké koncentraci přítomno srážedlo. V důsledku snížení objemu kapky se zvyšuje koncentrace proteinu v kapce a systém přechází do přesyceného stavu. V metodě mikrodávek jsou proteiny přímo smíchány



Obr. 2.8: Schéma sedící a visící kapky.

s krystalizačním činidlem, které vytváří přesycený stav a ke krystalizaci dojde po inkubaci. Oproti tomu při dialyzační metodě není krystalizační činidlo přímo smíchané s proteinem, ale k přesycení dochází postupně díky více koncentrovanému roztoku odděleného polopropustnou membránou.

2.4.4 Očkovací techniky

Technika očkování („seeding“) se používá v případech, kdy prvotní krystalizační experimenty vedou ke vzniku krystalického precipitátu, mikrokrytalů resp. porušených krystalů.^{30,31} Očkování lze s výhodou použít jak ke zjištění krystalizačních podmínek vedoucích k získání prvních krystalů, tak i pro optimalizování těchto podmínek a získání větších a kvalitnějších krystalů. Jednou z používaných metod je „cross-seeding“ (očkování příbuzným krystalem), kdy jsou jako krystalizační zárodky použity krystaly příbuzné molekuly. Další metodou, která používá již předem narostlé krystaly je tzv. „streak seeding“ (proužkové očkování).^{30,31} V této metodě se pracuje s vláknem (např. koňská žíně či kočičí vous), na kterém se zachytí fragmenty krystalů a přenesou se do předpřipraveného krystalizačního pokusu (kapky) jako krystalizační zárodky takovým způsobem, že se tahem vytvoří čára, podél které pak rostou krystaly proteinu.^{30,31} Další metody používané k produkci jsou nazývány „microseeding“ a „macroseeding“.^{30,31} Uvedené očkovací techniky se liší tím, že jedna jako krystalizační zárodky používá mikrokrystaly neboli očkovací roztok („seed stock“), kdy jsou krystaly rozdrceny na malé části a ve druhé se na očkování používají celé krystaly jako tzv. makrozrna a pozoruje se, zda krystal vložený do nového krystalizačního pokusu (kapky) dále poroste.^{30,31}

3. CÍLE PRÁCE

- a.* Příprava fúzních konstruktů receptorů NKR-P1B a Clrb
- b.* Purifikace dimerních forem těchto receptorů pomocí afinitní a HPLC chromatografie
- c.* Charakterizace receptorů biofyzikálními metodami
- d.* Strukturní studium rClrb pomocí proteinové krystalizace

4. MATERIÁL

4.1 Pomůcky a přístroje

Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad	<i>New Brunswick Scientific, USA</i>
Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Analytické váhy	<i>AND, USA</i>
Aparatura pro filtraci	<i>Sigma, USA</i>
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	<i>H+P Labortechnik GmbH, Německo</i>
Automatické pipety Discovery	<i>HTL, Polsko</i>
Automatické pipety Pipetman	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga EBA 12 R	<i>Hettich, Německo</i>
Centrifuga Universal 320R	<i>Hettich, Německo</i>
Čtečka mikrotitračních destiček Sunrise	<i>Tecan, Rakousko</i>
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	<i>Corning, Německo</i>
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570 (16,1 MPix)	<i>SONY, Japonsko</i>
Fotoaparát SP-500 UZ (6 MPix)	<i>Olympus, Japonsko</i>
Fotografický film MEDIX XBU	<i>Foma Bohemia, ČR</i>
Hemocytometr	<i>INCYTO, Korea</i>
High-Speed Plasmid Mini Kit ³²	<i>Geneaid, USA</i>
HPLC systém ÄKTAbasic	<i>Amersham Biosciences, Švédsko</i>
Inkubátor, CO ₂ pro tkáňové kultury, 18AIC	<i>Sanyo, Japonsko</i>
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit ³³	<i>Genomed, Německo</i>
Kahan Fuego SCS	<i>VERKON, ČR</i>
Kahan	<i>závod Votice, ČR</i>
Kolona Hitrap MabSelect SuRe	<i>GE Healthcare, Švédsko</i>
Kolona s Talonem	<i>Merck, Německo</i>
Kolona Superdex 200 10/300 GL	<i>Tricorn, Švédsko</i>
Koncentrátory	<i>Millipore, USA</i>
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	<i>Schott Duran, Německo</i>
Laminární box Clean Air Technik B.V.	<i>PMV a Telstar company, Belgie</i>
Lednice 225 R (4 °C)	<i>Calex, ČR</i>
Membrána pro elektropřenos BioTrace	<i>Pall Corporation, USA</i>
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	<i>VWR, USA</i>
Mikroskop inverzní AE31	<i>Motic, Německo</i>
Mrazicí box (-20 °C)	<i>Calex, ČR</i>
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	<i>Sanyo, Japonsko</i>
pH metr ino Lab	<i>Schoeller, Německo</i>
Pipetovací nástavec Midiplus	<i>Biohit, USA</i>
Plastik pro tkáňové kultury	<i>Corning, Německo</i>
Předvážky KB1200-2	<i>Kern, Německo</i>
PureLink TM HiPure Plasmid DNA ³⁴	<i>Invitrogen, USA</i>
Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	<i>Savant, USA</i>
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Biokeystone Co, USA</i>
Souprava pro elektropřenos	<i>Biometra, Německo</i>
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Spektrofotometr NanoVue Plus	<i>GE Healthcare, UK</i>

Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler 0,5 ml x 20	Techne, UK
Termocykler 0,2 ml x 25	Techne, UK
Termostat LS1	VLM, Německo
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	Gallenkamp, UK
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, Švýcarsko
UV/Vis spektrometr UV2 Series	Unicam, UK
UV prosvěcovací lampa (254/300/365 nm)	Ultra-Lum, USA
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	UVItec, UK
Vařič	ETA, ČR
Vodní lázeň	Memmert, Německo
Vodní lázeň TW2	Julabo, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí EC 250-90	EC Apparatus Corporation, UK
Zdroj napětí PS 251-2	Sigma, USA

4.2 Chemikálie

Aditive Screen TM – HR2 428	Hampton Research, USA
Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Ampicilin 100 mg/ml	Biotika, SR
APS	Serva, USA
Azid sodný	Serva, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
BSA	New England Biolabs, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
DMSO	Finnzymes, Finsko
DNA marker 1 kb Plus GeneRuler	Fermentas, Kanada
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, ČR
DTT	Serva, USA
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
ExCELL293 médium	Sigma, USA
Freestyle F17 médium	Gibco Invitrogen, USA
L-glutamin	Sigma, USA
GAM IgG protilátka konjugovaná s HRP	Abcam, UK
GoodView	Ecoli, Slovensko
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, ČR
lineární PEI 25 kDa	Polysciences, USA
2-merkaptóethanol	Sigma, USA
MgSO ₄ , 100 mM	New England Biolabs, USA
Nosič pro chromatografii Talon	Clontech, USA
PCR H ₂ O	Top-Bio, ČR
Penicillin G Sodium	Duchefa Biochemie, Nizozemsko
Penta-His protilátka	Qiagen, Německo
Pluronic F-68	Sigma, USA
PPP master mix	Top-Bio, ČR
Protein-A-agarosa	Sigma, USA

SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Streptomycin sulfate	<i>Serva, USA</i>
Sušené odtučněné mléko LAKTINO	<i>PROMIL, ČR</i>
Talon	<i>Clontech, USA</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
ThermoPol Reaction Buffer, 10 × konc.	<i>New England Biolabs, USA</i>
Tris	<i>Roth, Německo</i>
Triton X-100	<i>Serva, USA</i>
Trypanová modř	<i>Sigma, USA</i>
Trypton N1	<i>Organo Technie, Kanada</i>
Tween 20	<i>Sigma, USA</i>
Ustalovač	<i>Kodak, USA</i>
Vývojka	<i>Kodak, USA</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

4.2.1. Enzymy

Deep Vent DNA polymerasa	<i>New England Biolabs, USA</i>
Endo Hf	<i>New England Biolabs, USA</i>
KpnI	<i>New England Biolabs, USA</i>
RNasa A	<i>Serva, USA</i>
T4 DNA ligasa	<i>New England Biolabs, USA</i>
XhoI	<i>New England Biolabs, USA</i>

4.2.2. Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>E. coli DH5a</i>	<i>RNDr. Marek Ingr, Ph.D., Praha, ČR</i>
<i>HEK293S GnTI</i>	<i>Americká sbírka buněčných linií (ATCC)</i>

4.2.3. Vektory

pHLsec (1 µg/µl)	<i>A. Radu Aricescu, Oxford, UK</i>
pHLsec-FcHis (1 µg/µl)	<i>A. Radu Aricescu, Oxford, UK</i>
pYD5 (1 µg/µl)	<i>Dr. Yves Durocher, Montreal, Kanada</i>

4.2.4. Primery pro PCR

FcHis_FW1	
5' - GCACCT GAACTCCTGGGGGG - 3'	
FcHis_FW2	
5'-AAAAAAGGTACCCTGGAGGTGCTGTTCCAGGGCCCCGCACCTGAACTCCTGGGGGG - 3'	
FcHis_REV	
5'-TTTTTCTCGAGTCAGTGATGATGGTGATGGTGATGATGGTGATGTTTACCCGG - 3'	
pHLsec_FW	
5' - GCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATC - 3'	
pHLsec_REV	
5' - CACCAGCCACCACCTTCTGATAG - 3'	

4.2.5. Roztoky a média

AA: 29% akrylamid, 1% N,N'-metylen-bis-akrylamid

Citrátový pufr: 100mM citrát sodný, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 3

ExCELL293 médium: zakoupeno hotové médium (*Sigma*, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsl. konc. 4 mM)

Freestyle F17 médium: zakoupeno hotové médium (*Gibco Invitrogen*, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsl. konc. 4 mM), Pluronic F-68 (výsl. konc. 0,1%)

HEPES pufr = pufr pro gelovou filtraci: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃; pH = 7,5

LB agar s ampicilinem: 1,5% agar v LB médiu, 100 µg/ml ampicilinu

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

L1, L2 roztoky: JETquick Gel Extraction Spin Kit (*Genomed, Německo*)³³

PBS pufr: 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 7,0

PBS pufr s imidazolem: 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, 250mM imidazol, pH = 7,0

PBS-TK pufr: 10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH = 7,0

Pufry pro agarosovou elektroforézu:

- **TAE pufr** (1 × koncentrovaný): 40mM Tris, 20mM CH₃COOH, 1mM EDTA
- **STOP pufr:** 30% glycerol, 1% bromfenolová modř, 70% TE pufr

Pufry pro imunodetekci:

- **Blokovací pufr pro imunodetekci:** 3% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl, pH = 7,5
- **ECL1:** 2,5mM luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion), 0,1M Tris, pH = 8,8
- **ECL2:** 5,4mM H₂O₂, 0,1M Tris, pH = 8,8
- **Pufr pro inkubaci s primární protilátkou (Anti-His) 1:1000:** 3% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl, pH = 7,5
- **Pufr pro inkubaci se sekundární protilátkou (G-anti mouse HRP) 1:2000:** 5% odtučněné sušené mléko, 10mM Tris, 150mM NaCl, pH = 7,5
- **Transferový pufr:** 25mM Tris, 150mM Glycin, 10% (v/v) methanol, pH = 8,3
- **TBS:** 10mM Tris, 150mM NaCl, pH = 7,5
- **TBS-Tween/Triton:** 20mM Tris, 500mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, 0,2% (v/v) Triton X-100, pH = 7,5

Pufry k „Maxiprepu“ – PureLink™ HiPure Plasmid DNA (Invitrogen, USA)³⁴:

- **Roztok E4 (eluční pufr):** 100mM Tris-HCl (pH = 8,5), 1,2 M NaCl
- **Roztok EQ1 (ekvilibrační pufr):** 0,1M octan sodný (pH = 5,0), 0,6M NaCl, 0,15% (v/v) Triton® X-100
- **Roztok L7 (lyzující pufr):** 0,2M NaOH, 1% (w/v) SDS
- **Roztok N3 (srážecí pufr):** 3,1M octan draselný, pH = 5,5
- **Roztok R3 (resuspendační pufr):** 50mM Tris (pH = 8,0), 10mM EDTA, 20 mg/ml RNasa A
- **Roztok W8 (mycí pufr):** 0,1M octan sodný (pH = 5,0), 825mM NaCl

Pufry k „Miniprepu“: High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, USA)³²:

- **PD1, PD2, PD3, W1, WASH, Eluční pufr**

Pufry k SDS-PAGE:

- **AA:** 30% akrylamid, 1% N,N'-methylen-bis-akrylamid
- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% CBB R 250
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE (10 × koncentrovaný):** 3% Tris, 14,4% glycin, 1% SDS, pH = 8,3
- **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35% ethanol, 10% CH₃COOH, 55% dH₂O
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující (2 × koncentrovaný):** 100mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, pH = 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující (2 × koncentrovaný):** 100mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, 100mM DTT, pH = 6,8

TES pufr: 10mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM NaN₃, pH = 8,0

5. METODY

5.1 Delece pHLsec-FcHis_C1, pHLsecFcHis_W1, pHLsecFcHis_S1, pHLsecFcHis_R2

PCR reakce byly provedeny podle protokolů *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*.³⁵

5.1.1 PCR amplifikace I.

V 0,5ml PCR mikrozkušavkách bylo smícháno vždy 30,5 μ l ddH₂O, 5 μ l reakčního pufru Thermopol (10 \times koncentrovaný), 1,5 μ l 10mM směsi deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs), 1,5 μ l 10mM MgSO₄, 5 μ l 0,5 μ M přímého primeru FcHis_FW1 a 5 μ l 0,5 μ M reverzního primeru FcHis_REV, 1 μ l templátu (c = 1 ng/ μ l) a 0,5 μ l Deep Vent DNA polymerasy.

PCR proběhla v termocykleru, zvolen byl následující termální profil:

1) 1 cyklus: 5 min – 94 °C

2) 30 cyklů: 30 s – 94 °C → 30 s – 55 °C → 1 min – 72 °C

3) 1 cyklus: 10 min – 72 °C

4) 1 cyklus: ∞ min – 4 °C; při teplotě 4 °C zůstávaly zkumavky v termocykleru do doby než byly vyjmuty.

5.1.2 Agarosová elektroforéza

Výsledný produkt PCR byl analyzován pomocí agarosové elektroforézy. Vzorek byl připraven smícháním 5 μ l PCR produktu a 1 μ l STOP pufru.

Gel byl vyroben 1%, 0,65 g agarosy bylo doplněno 65 ml 1 \times koncentrovaným TAE pufrům do Erlenmeyerovy baňky. Dále byla suspenze povařena v mikrovlnné troubě po dobu 1,40 min. Promíchaný roztok byl zchlazen na teplotu přibližně 40 - 50 °C a byly k němu přidány 3 μ l roztoku GoodView fluorescenční DNA detekční barvy. Poté byla směs nalita do aparatury na elektroforézu, přidán hřebínek a gel nechán ztuhnout. Gel byl přelit 200 ml dH₂O, do prostoru elektrod byl nalit TAE pufr dle návodu. Elektroforéza byla spuštěna na 15 min., 220 V při maximálním proudu. DNA fragmenty byly vizualizovány na UV prosvěcovací lampě při 312 nm.

5.1.3 Izolace z agarosového gelu³³

Část gelu obsahující náš produkt byla vyříznuta plastovým nožkem, aby nedošlo k poškrábání dna nádoby. Vyříznutý produkt byl přenesen do předem zvážené

1,5ml mikroskopické zkumavky. Extrakce DNA z gelu byla provedena pomocí soupravy JETquick Gel Extraction Spin Kit (*Genomed*, Německo) dle manuálu dodavatele. Na 100 mg gelu bylo použito 300 μ l roztoku L1. Nakonec proběhla DNA eluce 50 μ l sterilní dH_2O předem přehřáté na 70 $^\circ\text{C}$ do čistých zkumavek.

5.1.4 PCR amplifikace II.

V 0,5ml PCR mikroskopické zkumavkách byla smíchána stejná reakce jako u I. PCR amplifikace, ale jako templát byl použit produkt z I. PCR reakce, jako přímý primer byl použit primer FcHis_FW2 (5 μ l 0,5 μM). Termální profil byl stejný jako u I. PCR amplifikace. Při opakování této reakce bylo přidáno 1,5 μ l dimethylsulfoxidu (DMSO) a pouze 29 μ l ddH_2O , což vedlo k vyššímu výtěžku reakce.

5.1.5 Restrikční štěpení plazmidu

V 0,5ml PCR mikroskopické zkumavce probíhala 20 μ l reakce za přítomnosti 2 μ l 10 \times koncentrovaného hovězího sérového albuminu (BSA), 2 μ l restrikčního pufru 1, 3 - 4 μ g plazmidu (\sim 1 μ l), 14 μ l ddH_2O , 0,5 μ l restrikční endonukleasy KpnI a XhoI. Štěpilo se při 37 $^\circ\text{C}$ 30 - 60 min. Byla provedena agarosová elektroforéza (viz. 5.1.2) a následně izolace z gelu (viz. 5.1.3).

5.1.6 Restrikční štěpení PCR-produktu

Nejprve bylo 20 μ l vzorku sráženo přidáním 120 μ l 100% ethanolu a 5 μ l 3M octanu sodného s inkubací min. 10 min v mrazicím boxu. Dalším krokem byla centrifugace, 15000 \times g, 1 min. Supernatant byl opatrně odstraněn pipetou a peleta opláchnuta 100 μ l 70% ethanolu. Znovu proběhla centrifugace, supernatant byl opět opatrně odstraněn pipetou a sediment nechán vysušit na vzduchu při laboratorní teplotě. Nakonec byl pelet resuspendován v 15 μ l dH_2O . Následně byl použit stejný postup jako u restrikčního štěpení plazmidu (viz. 5.1.5).

5.1.7 Ligace

Ligace proběhla jako 20 μ l reakce za přítomnosti 2 μ l ligačního pufru, 1 μ l ligasy T4 DNA ligasy, 5 μ l roztoku plazmidu po restrikčním štěpení, 12 μ l roztoku PCR produktu po restrikčním štěpení. Reakce probíhala 30 min při pokojové teplotě.

5.1.8 Transformace I.

Kompetentní bakterie *Escherichia coli* kmene DH5 α byly uchovávány při -80 °C. Po vyndání z mrazicího boxu byly ponechány roztát na ledu. K 150 μ l buněk bylo přidáno 20 μ l vytvořené ligační směsi. Následovala 30min inkubace na ledu. Dalším krokem byl tepelný šok, kdy byla směs ponořena na 1 min do vodní lázně, která měla 42 °C. Po minutě následoval okamžitý návrat na led. Poté byl přidán 1 ml sterilního LB média bez antibiotik a směs se inkubovala 30 min při 37 °C. Po inkubaci byla směs zcentrifugována 3 min při 3000 \times g. Supernatant byl slit a bylo ponecháno přibližně 100 μ l, ve kterých byla resuspendována peleta. Tato suspenze byla poté napipetována na tuhý LB agar na Petriho misce, do kterého byl předem přidán ampicilin (100 μ g/ml). Bakterie byly inkubovány 16 hod při 37 °C v termostatu. Vyrostlé kolonie na misce byly dále uchovávány v lednici při 4 °C.

5.1.9 PCR z kolonií

Z každé misky bylo vybráno několik kolonií, které byly každá resuspendovány v 6 μ l dH₂O v 0,2ml PCR mikrozkušavce a špička byla poté odhozena do 50ml zkumavek s víčky s 5 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml). Kultura ve zkumavkách byla inkubována na třepačce 14 hod při 37 °C a rychlosti 220 ot./min pro pozdější izolaci plazmidu (viz. 5.1.10). Dále bylo do 20 μ l PCR reakce přidáno 10 μ l 2 \times koncentrované PPP PCR reakční směsi a 2 μ l přímého primeru pHLsec-FcHis_FW a 2 μ l reverzního primeru pHLsec-FcHis_REV.

PCR proběhla v termocykleru, zvolen byl následující termální profil:

- 1) 1 cyklus: 5 min – 94 °C
- 2) 20 cyklů: 30 s – 94 °C \rightarrow 30 s – 55 °C \rightarrow 1 min – 72 °C
- 3) 1 cyklus: 10 min – 72 °C
- 4) 1 cyklus: ∞ min – 4 °C; při teplotě 4 °C zůstávaly zkumavky v termocykleru do doby než byly vyjmuty.

Do následné agarosové elektroforézy již není třeba přidávat STOP pufr.

5.1.10 „Miniprep“³²

Izolace plazmidové DNA nebo-li „miniprep“ probíhala tak, že natřepaná kultura byla po 14 hod postupně odstředěna v 1,5ml mikrozkušavkách po 30 s při 15000 \times g. Supernatant byl vždy slit do odpadní kádinky. Peleta byla resuspendována na vortexu po přidání 200 μ l PD1 pufru (s přidanou RNasou A) z komerčního kitu High-Speed

Plasmid Mini Kit (*Geneaid*, USA). Dále bylo postupováno dle návodu z kitu. Posledním krokem byla eluce, kdy 50 μl dH₂O předem přehřáté na 70 °C bylo nejprve 2 min absorbováno na kolonce a poté 2 min centrifugováno do čisté zkumavky.

5.1.11 Ověření koncentrace pomocí Spektrofotometru NanoVue Plus

Koncentrace a čistota plazmidů byla ověřena pomocí Spektrofotometru NanoVue Plus (*GE Healthcare*, UK), kde se měří koncentrace v ng/ μl a čistota díky poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm. Nanáší se 3 μl a jako reference byla použita dH₂O.

5.1.12 Sekvenování

Do 0,2 μl PCR mikrozkuavky bylo napipetováno 5 - 10 ng plazmidu na 100 bp celkové délky produktu (0,5 – 2 μl); 3,2 - 5 pmol přímého primeru ($T_m = <50; 55>$ °C, ~ 1 μl); a 12,5 μl dH₂O. V Laboratoři sekvenace DNA PŘF UK byla RNDr. Štěpánkou Hrdou reakce doplněna 6 μl sekvenační směsí. Analýza byla provedena pomocí přístroje Genetic Analyzer 3130 (*Applied Biosystems*) s 16ti kapilárami. Pro ověření správnosti celé sekvence byla zpravidla připravena i druhá sekvenační reakce, do které byl však místo přímého primeru přidán primer reverzní.

5.1.13 Transformace II.

Liší se od transformace I. pouze použitím množství buněk *E. coli*. K 0,5 μl plazmidu bylo přidáno 50 μl *E. coli* kmene DH5 α . Misky byly inkubovány 16 hod při 37 °C.

5.1.14 „Maxiprep“³⁴

Příprava zásobního množství plazmidu nebo-li „maxiprep“ probíhala tak, že kolonie byly setřeny z misek hokejkou v několika ml LB média a přeneseny do 2l Erlenmeyerových baněk s připravenými 500 ml LB média s ampicilinem (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Kultury byly inkubovány na třepače 16 hod při 37 °C a 220 ot/min. Poté byly centrifugovány v 250ml kyvetách 15 min při 4500 \times g. Pelet byl resuspendován v 30 ml TES pufru na vortexu a suspenze byla rozdělena po 15 ml do dvou 30ml polypropylenových kyvet a znovu centrifugována 15 min při 4500 \times g. Pokračovalo se dle návodu komerčního kitu PureLinkTM HiPure Plasmid DNA (*Invitrogen*, USA). Pro eluci bylo použito 10,5 ml isopropanolu, promícháno a necháno 0,5 hod srážet v mrazničce. Dalším krokem byla centrifugace při 15000 \times g, 30 min při 4 °C. Po dekantaci supernatantu bylo přidáno 5 ml 70% ethanolu na opláchnutí pelety DNA a znovu odstředěno při 15000 \times g, 5 min při 4 °C. Peleta byla vysušena na rotační

vakuové odparce a následně rozpuštěna v 1 ml dH₂O. Posledním krokem bylo změření koncentrace a čistoty na UV/Vis spektrometru UV2 Series (*Unicam*, UK). Vzorek byl při stanovení zředěn 300 × ddH₂O. Absorbance byla měřena při 260 a 280 nm.

5.2 Příprava proteinu pYD5_C1, W1, S1 a pHLsec-ΔFcHis_C1, W1, S1, R1

5.2.1 Kultivace HEK293S buněčné linie

5.2.1.1 Rozmražení buněčných linií

Alikvot zmražených buněk v kryozkumavce obsahující 1 ml buněčné suspenze o hustotě 5.10⁶ ml⁻¹ byl rozmražen ve vodní lázni předehřáté na 37 °C a ihned přenesen do 15ml sterilní zkumavky s víčkem, v které bylo předem připraveno 10 ml směsi médií ExCELL293 a F17 v poměru 1:1. Následovalo rychlé promíchání a centrifugace při 200 × g, 5 min. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 10 ml směsi médií a přeneseny na 10 cm Petriho misku. Po 2 - 3 dnech kultivace při 37 °C, 5 % CO₂ následovala první subkultivace (viz. 5.2.1.2).

5.2.1.2 Suspenzní kultivace

Buňky byly obvykle kultivovány v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ v médiu ExCELL293 a F17 v poměru 1:1 a subkultivovány ředěním čerstvým médiem tak, aby se jejich hustota pohybovala přibližně mezi 0,2 a 2.10⁶ ml⁻¹ a to jak na Petriho miskách, tak ve čtverhranných láhvích na třepačce. Standardní postup vypadal následovně: 2-3 dny po rozmražení buňky na 10cm Petriho misce dosáhly hustotu kolem 2.10⁶ ml⁻¹, byly rozmíchány 10ml pipetou pomocí pipetovacího nástavce a přeneseny do čtverhranné láhve o objemu 100 či 250 ml s víčkem s prodyšným filtrem do vhodného objemu kultivačního média, tak aby výsledná buněčná hustota stále ležela v optimálním rozmezí. Přibližně 1.10⁶ buněk bylo ponecháno na misce a doplněno na 10 ml čerstvým kultivačním médiem. Buňky v láhvi byly třepány na orbitální třepačce Multitron Cell (*Infors HT*, Švýcarsko) rychlostí 180 ot./min., optimální objem média pro dobré míchání buněk je 30 - 40 % objemu láhve. Pro provedení velkoobjemové transfekce byla suspenze o další 2 - 3 dny později přenesena do 1000ml čtverhranné láhve a zředěna na 400 ml čerstvým médiem a jakmile buněčná hustota dosáhla požadované hodnoty, byla provedena transfekce (viz. 5.2.3), nebo byla suspenze dále subkultivována.

5.2.1.3 Určení buněčné hustoty

K manuálnímu počítání buněk slouží hemocytometr. Nejprve se odebere 20 μl buněčné suspenze ve sterilním prostředí laminárního boxu a poté se k ní přidá 20 μl 0,4% roztoku trypanové modři v PBS-TK. Po řádném promíchání se vzniklá směs přepipetuje mezi sklička hemocytometru. Pod mikroskopem se poté spočtou živé buňky (průhledné) a mrtvé (modré) v jednotlivých 9 čtvercích zvlášť.

$$\frac{\text{počet buněk} \cdot 10^4 \cdot \text{ředění}}{\text{počet čtverců}}$$

Ředění používáme 1:1, roztok je tedy zředěn 2 \times . Získáme tedy průměrný počet buněk v jednom čtverci v jednotkách 10^6 ml^{-1} .

Viabilita nebo-li procento živých buněk se spočte podle tohoto vzorce:

$$\frac{\text{počet živých buněk}}{\text{počet živých} + \text{počet mrtvých buněk}} \cdot 100\%$$

5.2.2 Expresní test

5.2.2.1 Transfekce ve 12ti jamkové destičce

Po spočítání buněk v zásobní kultuře byl odebrán příslušný objem suspenze tak, aby byl získán dostatečný počet buněk pro vybraný počet transfekcí. Odebrané buňky byly zcentrifugovány při $200 \times g$, 5 min v 15ml sterilní zkumavce s víčkem. Peleta byla resuspendována v 7,5 ml média F17. Dále byla suspenze resuspendována pipetou a přenesena po 0,5 ml do jednotlivých jamek na destičce.

Plazmid byl naředěn na koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ do objemu 20 μl pufrem PBS-TK. Pro dosažení sterility směsi bylo přidáno 20 μl chloroformu, který byl oddělen centrifugací při $15000 \times g$, 3 min. Transfekční směs poté byla namíchána jako 1 μl plazmidu ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 46 μl PBS-TK a 3 μl IPEI ($c = 1 \text{ mg}/\text{ml}$), tedy v poměru DNA:PEI = 1:3 a zároveň 1 μg plazmidu na 10^6 buněk. Tato směs se poté inkubovala 5 - 10 min. Nakonec byla směs přidána k 500 μl buněk v jamkách a následovala inkubace 4 hod při 37 $^{\circ}\text{C}$ na orbitální třepačce. Poté bylo do každé jamky přidáno 450 μl média ExCELL a deska byla dále inkubována za stejných podmínek po 72 hod.

5.2.2.2 SDS-PAGE ³⁶

Na polyakrylamidovou gelovou elektroforézu za použití dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byl připraven 15% separační gel pipetováním 1,8 ml ddH₂O, 4 ml 30% AA, 2 ml 1,5M Tris o pH = 8,8, 80 μl 10% SDS, 80 μl 10% APS a 4 μl TEMED.

Zaostřovací gel byl připraven pipetováním 1,4 ml ddH₂O, 0,5 ml 30% AA, 0,25 ml 1M roztoku Tris o pH = 6,8, 20 µl 10% SDS, 20 µl 10% APS, 3 µl TEMED a 120 µl 1× koncentrovaného neredukujícího pufru. Množství jsou uvedena vždy pro 2 gely.

Vzorky pro SDS elektroforézu byly připraveny tak, že médium z každé jamky bylo opatrně odebráno do mikrozkušavky, aby nedošlo k narušení vrstvy přilnutých buněk, a odstředěno při 15000 × g, 5 min. Vzorky se připravily v redukujícím a neredukujícím prostředí smícháním 10 µl supernatantu s 10 µl 2 × koncentrovaného vzorkového pufru, jednou s neredukujícím roztokem, podruhé s redukujícím. Zbylé buňky adheované na destičku byly resuspendovány a přeneseny do čisté mikrozkušavky, zcentrifugovány, supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky a zmražen. Následně byly vzorky 5 min povařeny a odstředěny při 15000 × g, 5 min za laboratorní teploty. 18 µl takto připravených vzorků se nanášelo na gel společně s 5 µg standardu. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 50 min. Pokud dalším krokem po skončení elektroforézy nebyl elektropřenos proteinů na membránu, byly gely barveny 20 min v barvicí lázni a následně odbarveny v odbarvovací lázni do úplného odbarvení pozadí gelu. V tomto případě se gely nebarvily, postup pokračoval elektropřenosem.

5.2.2.3 Elektropřenos proteinu na membránu

Gel z předešlé SDS-PAGE byl změřen, podle jeho rozměrů byla vystřižena nitrocelulosová membrána, oba byly na 10 min ponořeny do pufru pro elektropřenos. Na aparaturu pro elektropřenos bylo vloženo 5 filtračních papírů navlhčených pufrem pro elektropřenos, poté membrána, gel a opět vrstva 5 vlhčených filtračních papírů; vše bylo přikryto vrchní částí aparatury pro elektropřenos, která byla následně upevněna, a byly zapojeny elektrody (v orientaci gel ke katodě). Elektropřenos probíhal při 3,5 mA/cm² po dobu 50 min.

5.2.2.4 Imunodetekce

Membrána byla oplachována 2 × po 10 min v TBS za laboratorní teploty. Poté byla inkubována 1 hod v blokovacím pufre (3% BSA v TBS), oplachována 2 × po 10 min v TBS-Tween a 1 × po 10 min v TBS. Následovala inkubace membrány v roztoku 3% BSA v TBS s primární protilátkou (Penta-His mAb, ředění 1:1000) přes noc při 4 °C. Druhý den následovaly dva 10min oplachy v TBS-Tween a jeden 10min oplach v TBS. Dalším krokem byla inkubace membrány v 10% roztoku odtučněného

sušeného mléka v TBS se sekundární protilátkou (Goat polyclonal to Mouse IgG Ab konjugovaná s HRP, ředění 1:2000) po dobu 1 hodiny a oplachována TBS-Tween $4 \times$ vždy po 10 min. Poté byla provedena chemiluminiscenční detekce v temné komoře. Membrána byla umístěna na tvrdou podkladovou destičku, 3 ml roztoku ECL1 byly bezprostředně před detekcí smíchány s 3 ml roztoku ECL2. Tato směs byla nalita na připravenou membránu na podkladové destičce. Po minutové inkubaci byl roztok slit, membrána osušena a i s podložkou byla obalena do potravinové polyethylenové fólie, aby bylo zabráněno navlhčení fotografického filmu. Destička s membránou byla vložena do fotografické kazety, překryta fotografickým filmem, kazeta byla uzavřena a byla provedena nejprve krátká expozice (0,5 - 2 min), poté jedna delší (5 - 10 min). Fotografický film byl vždy po ukončení expozice inkubován ve vývojce (dokud se neobjevily proužky a nedosáhly požadované výraznosti, 2 - 5 min) a poté v ustalovači (cca 10 min). Nakonec byl film opláchnut pod tekoucí vodou a ponechán uschnout.

5.2.3 Velkoobjemová produkce ²³

Uvedený postup je při dodržení vzájemných poměrů objemu láhve, objemu média, buněčné hustoty, množství plazmidové DNA a lineárního polyethyleniminu (IPEI) použitelný pro různé výsledné objemy produkce, jako například pro množství na 1 produkci ve 400 ml média v 1000ml láhvi, která byla prováděna nejčastěji. Buňky rostoucí ve 400 ml ExCELL293/F17 média v poměru 1:1 v 1l čtverhranné láhvi s prodyšným víčkem na třepáčce (viz. 5.2.1.2.) byly spočítány a poté byl odebrán objem suspenze odpovídající $400 \cdot 10^6$ buněk. Buňky byly postupně zcentrifugovány ve 4×50 ml sterilních zkumavkách s víčkem při $200 \times g$, 5 min. Buněčný pelet byl resuspendován v takovém množství čerstvého média ExCELL293/ F17 v poměru 1:1, aby výsledná buněčná suspenze měla hustotu $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Transfekční směs byla připravena smícháním plazmidové DNA s lineárním polyethyleniminem (25 kDa IPEI, zásobní roztok o $c = 8 \text{ mg/ml}$) v hmotnostním poměru 1:3, přičemž množství použité DNA se odvíjelo od počtu transfekovaných buněk – $1 \mu\text{g DNA}$ na 10^6 buněk. V případě produkce ve 400 ml média bylo $400 \mu\text{g DNA}$ zředěno do 1 ml PBS-TK pufru, promícháno a sterilizováno filtrací přes $0,22 \mu\text{m}$ filtr injekční stříkačkou do čisté zkumavky. Poté bylo přidáno 150 μl zásobního roztoku IPEI, směs byla intenzivně protřepána, inkubována 10 min a poté přidána k připravené buněčné suspenzi, která byla následně inkubována 4 hod na třepáčce v inkubátoru. Poté byla suspenze zředěna médiem do 400 ml (výsledná buněčná hustota $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a byly přidány 4 ml antibiotik

penicilinu (1000 U/ml) a streptomycinu (100 µg/ml). Druhý den byl jako zdroj dodatečných živin ke kultuře přidán hydrolyzát Trypton N1 do výsledné 0,5% koncentrace (10 ml 20% TN1). Produkce probíhala celkem 5 - 7 dní, pokud viabilita kultury klesla pod 70 % živých buněk v suspenzi, produkce byla ukončena. Kultura byla centrifugována 1 hod při 4500 × g při laboratorní teplotě. Odstředěné médium bylo přeneseno do čisté láhve a uchováváno při -20 °C nebo ihned dále zpracováno.

5.3 Purifikace proteinů

5.3.1 Afinitní chromatografie

Prvním krokem purifikace bylo zfiltrování získaného média (400 ml) přes 0,22 µm filtr. Dále byl protein zachycen pomocí kolony Hitrap MabSelect Sure 5 ml zapojené na HPLC systému, v kolonce se nachází protein-A-agarosa, na níž se pomocí Fc fragmentu zachytí chtěný protein. Tlakový limit kolony je 0,3 MPa. Kolona byla nejprve promyta krátce 0,1M NaOH, destilovanou vodou a PBS pufrem (pH = 7) při průtoku 1 ml/min. Filtrát média byl nanesen na kolonu při 5 ml/min. a kolona byla promyta PBS pufrem, dokud absorbance při 280 nm neklesla na původní hladinu. Eluce byla provedena citrátovým pufrem (pH = 3). Frakce byly jímány do zkumavek s víčkem s předem připraveným 0,5 ml Tris pufru o pH = 8,8 pro okamžitou neutralizaci frakcí. Promytí kolony bylo provedeno krátce 0,1M NaOH, dále PBS pufrem, destilovanou vodou a nakonec 20% čistým ethanolem, v kterém byla uchovávána.

5.3.2 Zkoncentrování proteinů

Eluce o objemu 20 ml byla zkoncentrována pomocí koncentrátorů Amicon s membránou propustnou pro molekuly o $M_r < 10\,000$ v centrifuze Allegra X-22R při 4500 × g při laboratorní teplotě na objem přibližně 200 µl. Koncentrátory byly po použití řádně propláchnuty a naplněny dH₂O a uchovávány při 4 °C v lednici.

5.3.3 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300 GL, která má tlakový limit 1,5 MPa. Nejprve byl promyt samotný HPLC systém destilovanou vodou a poté byla při průtoku 0,5 ml/min připojena kolona, která také byla promyta destilovanou vodou, 1M NaOH a následně HEPES pufrem. Injekční stříkačkou s tupou jehlou byla promyta smyčka pufrem a vytlačeny bubliny. Následně byl

nastříknut zkoncentrovaný vzorek proteinu. Následovala izokratická eluce v délce odpovídající objemu kolony, při daném průtoku přibližně 1 hod, během níž byly manuálně jímány frakce do mikrozkuumavek. Kolona byla promyta HEPES pufrem, dH₂O a 20% ethanolem, v němž byla uchovávána.

5.3.4 Stanovení koncentrace proteinů³⁷

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody dle Bradfordové, kdy na 96-ti jamkovou destičku bylo pipetováno 5 µl roztoku BSA o známé koncentraci v rozsahu 0-1 mg/ml jako kalibrační řada, a do každé jamky bylo přidáno 200 µl činidla. Stranou na desku byl dán 1 µl našeho proteinu a i k němu se přidalo 200 µl činidla. Reakce se nechala 5 min inkubovat a poté se buď orientačně vizuálně porovnala s kalibrační řadou, nebo byla změřena koncentrace na čtečce mikrotitračních destiček Sunrise (*Tecan*, Rakousko) při 595 nm. Čistota proteinů byla ověřována pomocí SDS-PAGE (viz. 5.2.2.2), kdy na gel bylo nanášeno 5 µg proteinu.

5.3.5 Štěpení TEV proteasou

Fúzní proteiny exprimované z plazmidu pYD5 byly dále štěpeny TEV proteasou. Poměr TEV proteasy (c = 1 mg/ml) a proteinu byl 1:50 a štěpení probíhalo v lednici při 4 °C přes noc několik dní. Proteasa nesoucí histidinovou kotvu byla z roztoku odstraněna na nosiči Talon (viz. 5.3.6).

5.3.6 Chelatační chromatografie

Dalším krokem byla chelatační chromatografie na nosiči Talon (*Clontech*, USA), jenž obsahuje navázané kobaltnaté ionty. Množství použitého nosiče bylo 1 ml na 5 mg proteinu. Suspenze byla několikrát protřepaná během 20 min při laboratorní teplotě a následně zcentrifugována. Poté byl supernatant přepipetován do čisté zkumavky a přidána protein-A-agarosa. pro navázání odštěpeného Fc fragmentu. Stejným postupem jako s nosičem Talon bylo postupováno i s nosičem protein-A-agarosa. Po 20 min byla frakce přepipetována do čisté zkumavky s víčkem.

Následně byla provedena eluce TEV proteasy z nosiče PBS s 250 mM imidazolem. Nosič byl dále promyt MES pufrem, dH₂O a uskladněn v 20% ethanolu v lednici při 4 °C. Fc fragment byl uvolněn z protein-A-agarosy citrátovým pufrem (pH = 3) a nosič byl promyt 0,1M NaOH, PBS, dH₂O a uchován v 20% ethanolu.

Nakonec byl vzorek znovu zkoncentrován pro gelovou permeační chromatografií, byla změřena koncentrace proteinu a čistota byla ověřena SDS-PAGE (viz. 5.3.2 - 5.3.4, 5.2.2.2).

5.3.7 Deglykosylace proteinu rClrb

Protein rClrb byl deglykosylován pomocí enzymu Endo Hf. Celá reakce byla složena z pufru G5 pro Endo Hf, jenž byl 10× koncentrovaný a do reakce bylo tedy použito 0,1 objemu reakční směsi, 2 μ l enzymu Endo Hf a 120 μ l proteinu o $c = 1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Následovalo štěpení při 37 °C, 60 min.

5.4 Charakterizace proteinu - analytická ultracentrifugace

5.4.1 Metoda sedimentační rychlosti

Měření bylo provedeno na analytické ultracentrifuze Proteomelab XL-I s rotorem An-50Ti (*Beckman Coulter*, USA). Pro měření rClrb byl použit roztok proteinu v pufru pro gelovou chromatografií o koncentraci 43,0 μM , pro NKR-P1B WAG o $c = 49,5 \mu\text{M}$, pro NKR-P1B SD o $c = 54,7 \mu\text{M}$. Při této metodě byla využita dvoukomorová cela s optickou dráhou 3 mm. Do jednoho sektoru bylo pipetováno 100 μ l roztoku proteinu, do druhého sektoru 100 μ l pufru jako reference. Měření probíhalo při 48000 ot./min, 20 °C a sedimentace vzorku byla sledována pomocí absorbanční optiky při 280 nm, bylo sbíráno 100 snímků s intervalem 3 min. Pro měření směsí rNKR-P1B SD a rClrb, rNKR-P1B WAG a rClrb byly použity jednotlivé roztoky o koncentraci složek směsi 20 μM , jinak bylo vše provedeno stejným způsobem. Data byla vyhodnocena pomocí programů Sedfit a Sedphat, přičemž hustota pufru a parciální specifické objemy proteinů byly predikovány ze znalosti složení pufru, resp. aminokyselinových sekvencí proteinů v programu SEDNTERP^{38,39,40}. Měření a jeho vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

5.5 Strukturní studium rClrb - Proteinová krystalizace

Krystalizace proteinu rClrb byla prováděna na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. za pomoci RNDr. Terezy Skálové, Ph.D. metodou visící kapky. Nejprve byl namíchán rezervoár o složení: 0,05M KH_2PO_4 , 20% PEG 8000, 1M Tris, který byl poté napipetován v množství 300 – 500 μ l na dno krystalizační destičky. Protein rClrb o koncentraci 10 mg/ml nativní a 6 mg/ml deglykosylovaný, byl nanášen na víčko krystalizační desky v objemu 1 μ l. Ke kapce byl přidáván různý poměr rezervoáru či

aditiva (Aditive ScreenTM - HR2-428, *Hampton Research*, USA), testovala se rovněž optimální koncentrace proteinu jeho ředěním. Bylo zkoušeno i zaočkování malých krystalků pomocí techniky „mikro seeding“. Nakonec byla deska uložena v inkubátoru při 18 °C. Po 14 dnech RNDr. Tereza Skálová, Ph.D. provedla vizuální kontrolu desek pod mikroskopem.

6. VÝSLEDKY PRÁCE

6.1 Příprava a studium pYD5_C1, pYD5_W1, pYD5_S1

Má studie začíná plazmidy pro rekombinantní expresi proteinů již připravenými RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D. s pracovním označením pYD5_C1, pYD5_W1 a pYD5_S1, kde konstrukt C1 odpovídá Val₆₅ - Met₂₀₇ úseku receptoru Clrb (ligandu potkaniho NKR-P1B), konstrukt W1 odpovídá úseku Val₇₈ - Ser₂₂₃ receptoru NKR-P1B kmene potkana WAG a konstrukt S1 odpovídá stejnému úseku receptoru NKR-P1B kmene potkana SD (Obr. 2.3, str. 15). Jejich základem je plazmid pYD5 (Obr. 6.2, str. 40) poskytnutý Dr. Yves Durocherem (CNRC Montreal, Kanada), který byl upraven tak, aby obsahoval vhodná klonovací místa a byly do něj vloženy konstrukty receptorů.

Na následujících obrázcích (6.1 a 6.2, str. 40) je popsán vektor pYD5 obsahující sekreční signál, Fc fragment lidského IgG a sekvenci rozpoznávanou TEV proteasou. Tyto konstrukty jsou tedy fúzní proteiny s Fc IgG, které lze rozštěpit TEV proteasou. Produkce receptorů jako fúzních proteinů napomáhá vzniku jejich kovalentního dimeru.

METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGSTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKASGAGSTTENLYFQ//GTGVKMTPEQISTI
 NTYAA**C**PRNWIGVGNK**C**FYFSEYAS**N**WTFSQTF**C**KAQEAELARFDTEEELNFLSR
 YKGSFDYWIGLHRESSEHPWKWTDNTQY**N**YLSIRGVERYAYLNDIGISSARVYAD
 KRWS**C**SRLNSYSLQ**C**KTPFSPM**GT**

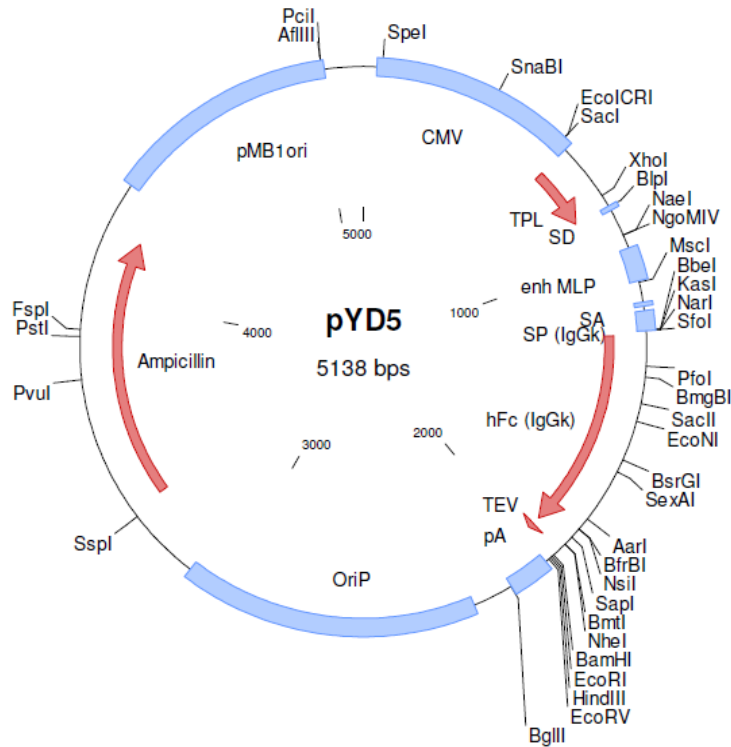
Obr. 6.1: Sekvence konstrukt pYD5_C1.

Nejprve **sekreční signál**, poté Fc fragment lidského IgG, štěpící místo pro **TEV proteasu**, TG a GT jsou aminokyseliny přidáné z **klonovacího místa** a **konstrukt rClrb** V₆₅ - M₂₀₇, kde jsou zvýrazněny **cysteiny** tvořící disulfidické můstky a možná místa **N-glykosylace**.

6.1.1 Příprava zásobního množství plazmidu

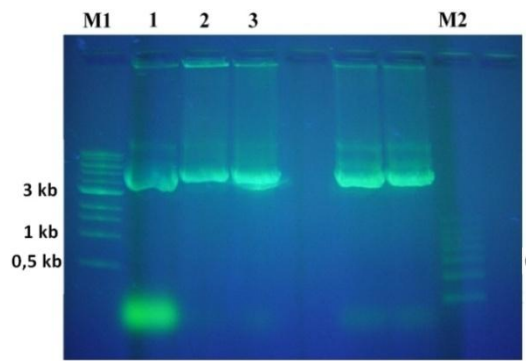
Dané plazmidy byly připraveny v zásobním množství „maxiprepem“³⁴ dle návodu 5.1.14, kdy nejprve následovala transformace tepelným šokem a po noci v termostatu byly narostlé kolonie přeneseny do Erlenmeyerových baněk a po 14 hod kultivaci byly

kultury sklizeny. Na Obr. 6.3 jsou záznamy agarosových elektroforéz, kde je porovnávána čistota, správná délka a celistvost plazmidů. Nově připravené plazmidy byly v pořádku v porovnání se starší šarží plazmidu pYD5_C1, která už jeví známky degradace.

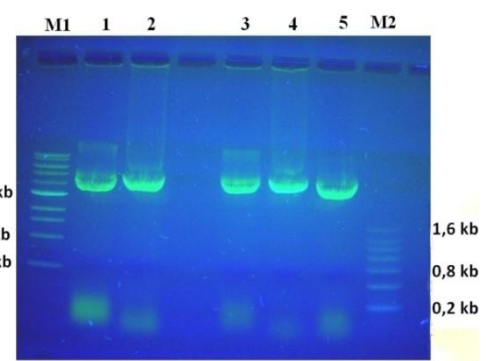


Obr. 6.2: Mapa plazmidu pYD5.

Plazmid pYD5 obsahuje gen pro rezistenci na ampicilin, bakteriální a virový počátek replikace, promotor cytomegaloviru, Fc fragment lidského IgG a štěpící místo pro TEV proteasu.



Obr. 6.3a: Kontrolní agarosová elektroforéza pYD5_C1:
V dráze M1 a M2 je marker. V dráze 1 je vzorek staré šarže plazmidu, v dráze 2 a 3 je nově připravený plazmid po „maxiprepu“.



Obr. 6.3b: Kontrolní agarosová elektroforéza:
V dráze M1 a M2 je marker. V dráze 1 a 2 je pYD5_S1 (1- starý, 2- nový). V dráze 3 a 4 je pYD5_W1 (1- starý, 2- nový). V dráze 5 je pHLsec-FcHis_C1 (připravený Mgr. Petrou Celadovou).

V Tab. 6.1 je změřená koncentrace a čistota plazmidů vyjádřená poměrem absorbancí při 260 a 280 nm.⁴¹ Čistota plazmidů je nižší než optimální hodnota 1,8 odpovídající čisté DNA (při kontaminacích RNA stoupá absorbance k 2,0 a při kontaminaci bílkoviny stoupá absorbance při 280 nm a tím klesá poměr absorbancí).

Tab. 6.1: Koncentrace a čistota plazmidů změřené spektrofotometricky.

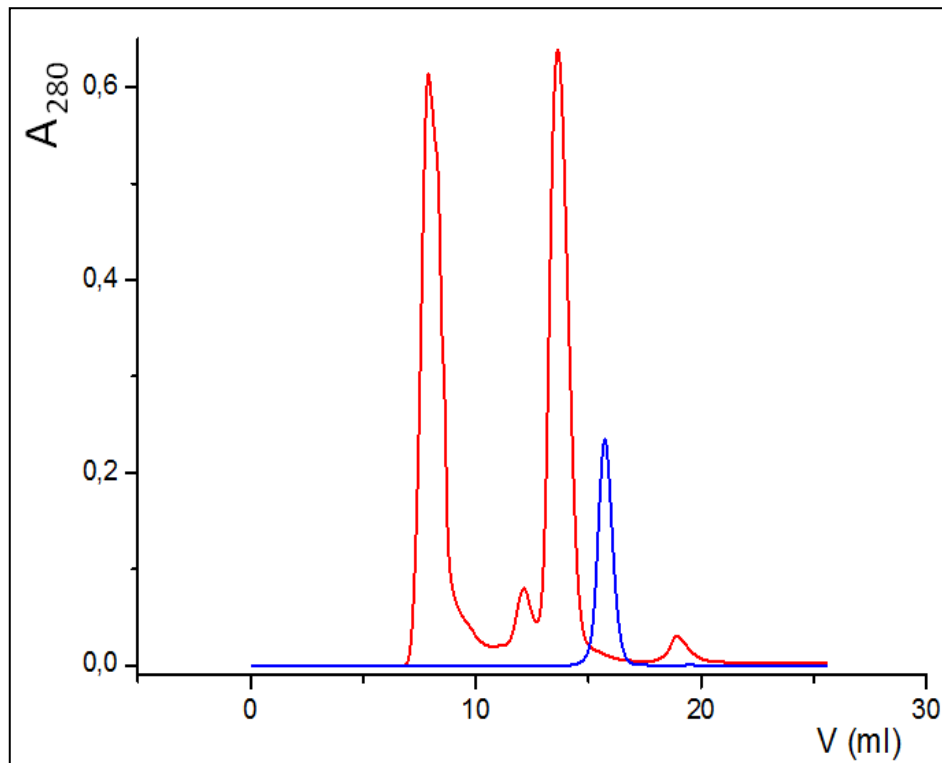
plazmid	c[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	$A_{260/280}$
pYD5_C1	1,16	1,57
pYD5_S1	2,22	1,56
pYD5_W1	1,59	1,54

6.1.2 Velkoobjemová produkce v HEK293S GnTI linii

Připravené plazmidy byly poté použity k transfekci (viz. 5.2.3). Buňky HEK293S GnTI byly rozpěstovány ve dvou 1l lahvích o objemu médií 400 ml, viabilitu měly 100%. Celkové množství buněk bylo na čtyři produkce použito 1600 mil. Buňky byly odstředěny ve čtyřech 50ml sterilních zkumavkách s víčkem 5 min při $200 \times g$. Mezitím byly připraveny 4 transfekční směsi, bylo použito 402 μg plazmidů pYD5_C1, pYD5_W1 a pYD5_S1 (koncentrace plazmidů uvedena v Tab. 6.1) a přefiltrováno s 1 ml PBS-TK. Poté byly ke každé směsi přidány 2 ml IPEI o $c = 1 \text{ mg/ml}$ v poměru 1:5. Následovala inkubace 10 min. Nakonec byly buňky resuspendovány v 17 ml médií ExCELL a F17 v poměru 1:1 a přidána transfekční směs. Výsledná hustota buněk byla $20 \cdot 10^6$ buněk/ml. Po 4 hodinách byly láhve doplněny do 400 ml ExCELL a F17 1:1 a přidána antibiotika. Druhý den bylo přidáno 10 ml 20% Tryptonu N1. Po 6 dnech byla produkce ukončena.

6.1.3 Purifikace proteinů

Následovala purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie na HPLC systému, kdy byl protein nejprve zachycen pomocí kolonky Hitrap MabSelect Sure s protein-A-agarosou, na níž se pomocí Fc fragmentu zachytí fúzní protein. Kolona byla promyta PBS pufrem a eluce proběhla snížením pH pomocí citrátového pufru (viz. 5.3.1).



Obr. 6.4: Gelová permeační chromatografie proteinu rClrb (z plazmidu pYD5_C1).

Chromatografie probíhala na koloně Superdex 200 10/300 GL. Červeně je znázorněn chromatogram fúzního proteinu po afinitní purifikaci. První eluční vrchol odpovídá mrtvému objemu kolony, agregátům. Druhý vrchol odpovídá rClrb-Fc IgG fúznímu proteinu. Modře je znázorněn chromatogram rClrb po štěpení TEV proteasou a chelatační chromatografii, eluční vrchol odpovídá čistému dimeru rClrb.

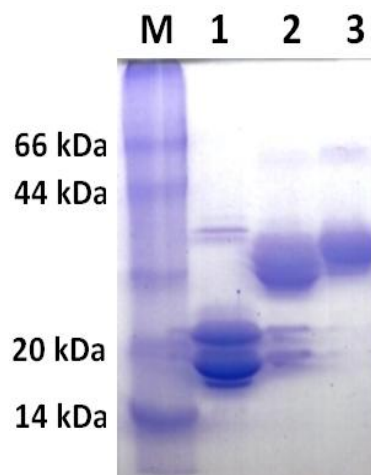
Frakce získané v tomto purifikačním kroku byly spojeny a zkoncentrovány, aby mohl být výsledný preparát aplikován na kolonu Superdex 200 10/300 GL. Průběh gelové permeační chromatografie (5.3.3) byl monitorován měřením absorbance při 280 nm, příkladem je záznam z gelové chromatografie rClrb na Obr. 6.4 znázorněný červenou křivkou (chromatogramy pro ostatní proteiny byly velmi podobné a nejsou zde uvedeny).

Poté byly proteiny štěpeny TEV proteasou přes noc při 4 °C. Další částí purifikace je chelatační chromatografie (5.3.6) založená na principu reverzibilní interakce histidinového řetězce s Co^{2+} ionty, díky níž byla TEV proteasa zachycena na agarosových kuličkách prostřednictvím histidinové kotvy. Dále byl vzorek inkubován 20 min s volnou protein-A-agarosou, čímž byl z roztoku odstraněn Fc fragment. Tímto byl získán čistý odštěpený dimer rClrb, který byl znovu přečištěn gelovou permeační chromatografií (Obr. 6.4, modrá křivka).

Množství získaných proteinů je vidět z Tab. 6.2 a čistota z Obr. 6.5.

Tab. 6.2: Koncentrace připravených proteinů změřené na čtečce mikrotitračních destiček

protein	c[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	V [μl]
pYD5_C1	4,89	55
pYD5_S1	1,27	60
pYD5_W1	0,79	60



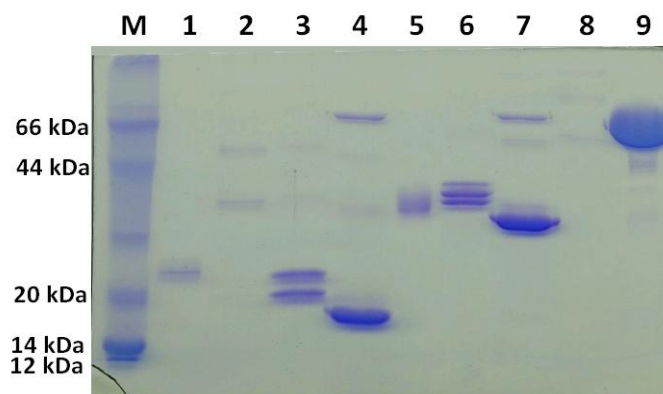
Obr. 6.5: 15% SDS-PAGE analýza připravených receptorů.

Pro kontrolu čistoty připravených receptorů byla provedena SDS-PAGE v redukujícím prostředí. V dráze M je marker, v drahách 1 - 3 jsou postupně proteiny rClrb (19 kDa), NKR-P1B SD (23 kDa), NKR-P1B WAG (24 kDa).

Na Obr. 6.5 je vidět, že předpokládaná molekulová hmotnost v případě NKR-P1B proteinů neodpovídá velikosti pozorované na elektroforéze, to může být způsobeno tím, že NKR-P1B receptory obsahují vyšší počet glykosylačních míst a přítomnost oligosacharidů ovlivňuje elektroforetickou mobilitu proteinů směrem k vyšším pozorovaným molekulovým hmotnostem. V dráze 1 vidíme dvě různé glykoformy rClrb.

6.1.4 Deglykosylace rClrb

Po další transfekci pYD5_C1 a purifikaci rClrb (5.2.3 a 5.3) byla provedena deglykosylace proteinu pomocí enzymu Endo Hf (viz. 5.3.7). Odstranění sacharidů a tím zmenšení velikosti proteinu můžeme pozorovat na Obr. 6.6 (str. 44). Bylo získáno 120 μl deglykosylovaného proteinu rClrb o $c = 1,5 \text{ mg/ml}$.



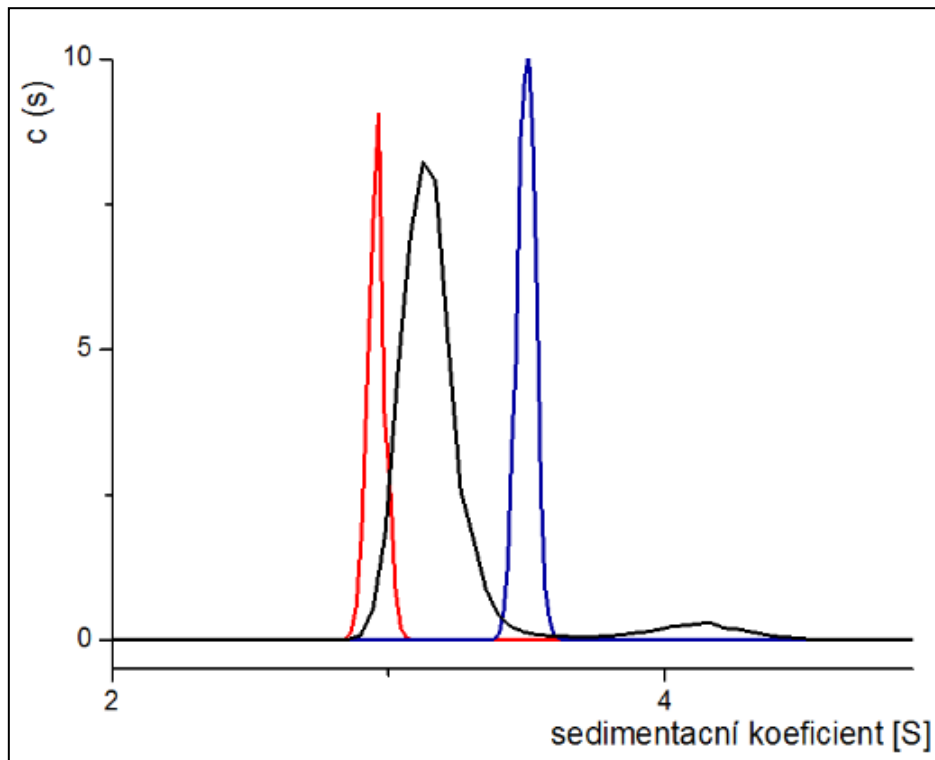
Obr. 6.6: 15% SDS-PAGE analýza deglykosylace rClrb.

V dráze M je marker, v dráze 3 a 6 je glykosylované rClrb (3 - v redukujícím pufru – 19 kDa, 6 - v neredukujícím pufru – 39 kDa); v dráze 4 a 7 je deglykosylované rClrb (4 - v redukujícím pufru – 17 kDa, 7 - v neredukujícím pufru – 34 kDa); v dráze 9 je enzym Endo Hf (který je také přítomen v dráhách 4 a 7); v ostatních dráhách jsou nesouvisející vzorky.

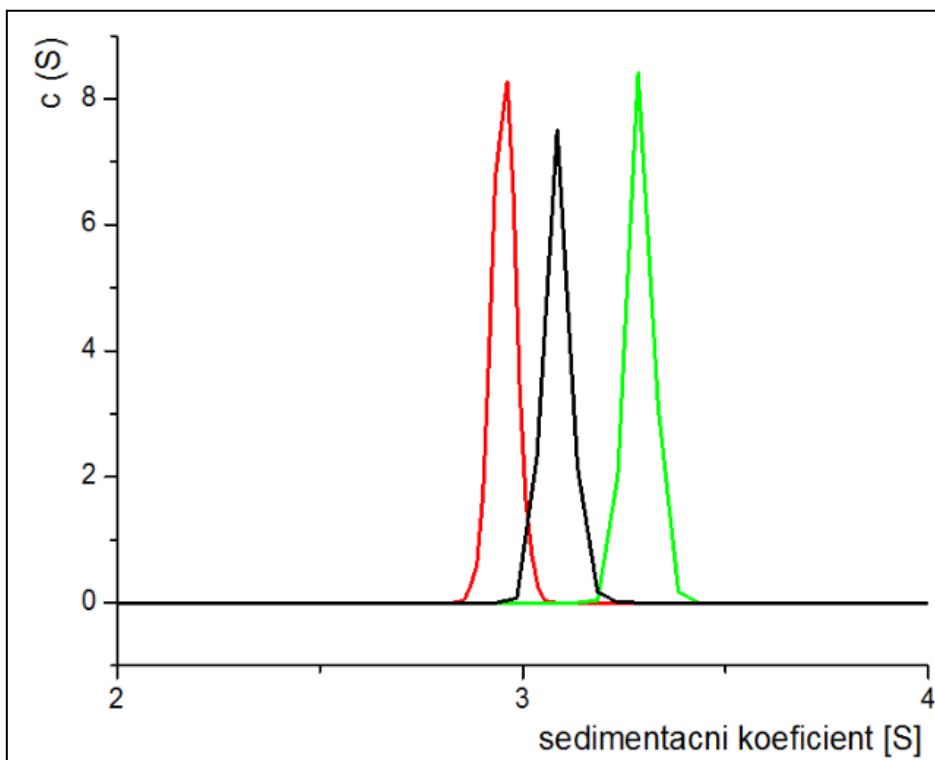
6.1.5 Analýza tvorby komplexu rClrb - NKR-P1B pomocí analytické ultracentrifugy

Měření sedimentační rychlosti patří mezi hydrodynamické techniky a je citlivé k hmotnosti a tvaru makromolekul.⁴² Proteiny rClrb a rNKR-P1B WAG, rClrb a rNKR-P1B SD byly použity pro počáteční ověření tvorby komplexu na analytické ultracentrifugaci, kterou provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Jelikož ultracentrifugace probíhala v malých koncentracích proteinů, nebylo možno s jistotou určit výsledek. Bylo však zřejmé, že za daných koncentrací se slabě tvoří komplex mezi rClrb a rNKR-P1B WAG, oproti rClrb a NKR-P1B SD, kde se komplex netvořil. Tyto výsledky jsou doloženy grafy distribucí sedimentačních koeficientů daných proteinů a jejich směsí uvedené na Obr. 6.7 (str. 45) a Obr. 6.8 (str. 45).

Výsledkem měření na analytické ultracentrifuze je závislost absorbance vzorku na poloměru otáčení.⁴² Kyvety mají dva sektory, v jednom byl analyzovaný vzorek a proti němu byl umístěn pufr z gelové permeační chromatografie, v němž byl vzorek rozpuštěn.⁴²



Obr. 6.7: Distribuce sedimentačního koeficientu pro rClrb, rNKR-P1B WAG a jejich směs. Červeně je znázorněno rClrb, modře rNKR-P1B WAG a černě jejich směs. V oblasti hodnot sedimentačního koeficientu 4,0 S je zřejmé, že se tvoří jejich komplex.



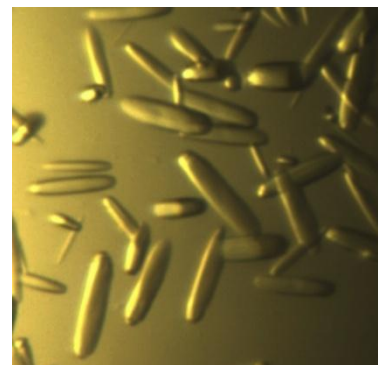
Obr. 6.8: Distribuce sedimentačního koeficientu pro rClrb, rNKR-P1B SD a jejich směs. Červeně je znázorněno rClrb, zeleně rNKR-P1B SD a černě jejich směs.

6.1.6 Krystalizace proteinu rClrb

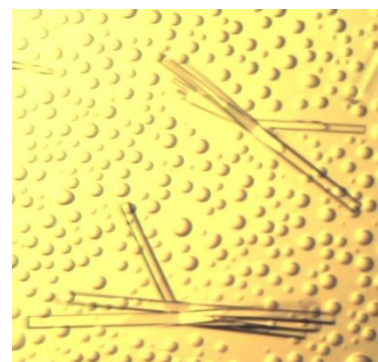
Krystalizace proteinů byla prováděna na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. Nejprve jsem se podílela na optimalizaci krystalizace konstruktů rClrb připravených vedoucím této práce s plazmidy pTT28 a pHLsecFcHis produkovaných v linii HEK293E v přítomnosti kifunensinu v deglykosylované (Obr. 6.9) i nativní formě (Obr. 6.10). Pokusy probíhaly metodou visící kapky s již dříve optimalizovaným rezervoárem o složení 0,05M KH_2PO_4 , 20% PEG 8000 (pH = 3,9); 1M Tris o pH = 7,5. Testoval se vliv různých aditiv na růst krystalů. Na 15ti jamkovou desku bylo nanášeno 300 μl rezervoáru. Do kapky bylo napipetováno 1 μl plazmidu, 1 μl rezervoáru a 0,2 μl aditiva a desky byly uchovávány při 18 °C v termostatu. Byla použita komerční sada s 96 aditiv. Jejich úspěšnost při tvorbě krystalů je uvedena v Tab. 6.3 (str. 47).

Následně byl v dalším krystalizačním pokusu jako aditivum použit 40% aceton pro nativní protein a BaCl_2 pro deglykosylovaný. Použitými proteiny rClrb byly již mnou vyrobené proteiny z plazmidů pYD5_C1 produkovaného v HEK293S GnTI a pHLsec-FcHis_C1 také pěstovaného v HEK293S GnTI linii. Jelikož proteiny byly hodně zředěné, bylo použito několik metod k jejich zahuštění jako přídavek rezervoáru ředěného ddH₂O, byly zkoušeny různé poměry protein : rezervoár : ddH₂O. Čerstvě připraveného rezervoáru se na dno jamek pipetovalo 500 μl .

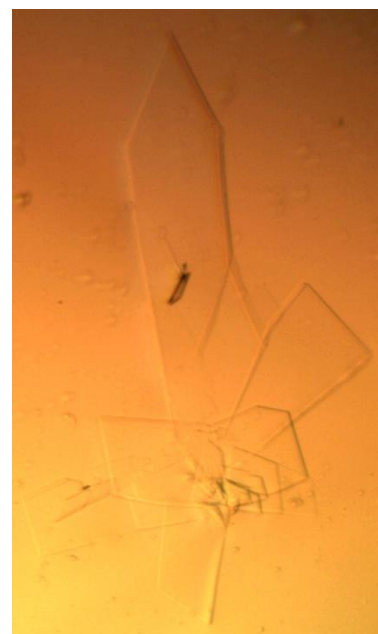
Nakonec vznikly krystaly rClrb z konstruktu pHLsec-FcHis_C1 produkovaném v HEK293S GnTI linii (Obr. 6.11) o $c = 1,13 \text{ mg/ml}$, kdy podmínkou byl poměr 2 : 2 : 0,2 protein : ddH₂O : rezervoár, při použití metody „microseeding“ s 0,5 μl rozdrcených krystalů z kapek, kde vznikly krystaly za přítomnosti 7% v/v 1-butanolu a 40% v/v 2,2,2-trifluoro-ethanolu z předešlé krystalizace. Vznikly tenounké desky.



Obr. 6.9: Krystaly deglykosylovaného rClrb.



Obr. 6.10: Krystaly nativního rClrb.



Obr. 6.11: Krystaly nativního rClrb z plazmidu pHLsec-FcHis_C1 a produkce v HEK293S GnTI linii.

Tab. 6.3: Aditiva, v nichž vznikly krystaly.

Deglykosylované	Nativní
0,1 M chlorid barnatý dihydrát	0,1 M spermidin
1,0 M vinan draselno-sodný tetrahydrát	0,1 M močovina
1,0 M citronan trisodný dihydrát	10% polyethylen glykol 3350
30% w/v kys.6-aminohexanová	1,0 M NDSB-256
1,0 M glycin	30% v/v (+/-)-2-methyl-2,4-pentandiol
0,3 M glycyl-glycyl-glycin	50% w/v polyethylen glykol 400
1,0 M guanidin hydrochlorid	30% v/v 1,4 dioxan
30% w/v sacharosa	30% v/v ethanol
30% w/v xylitol	30% v/v 2-propanol
30% w/v D-(+)-dihydrát trehalosy	30% v/v methanol
30% w/v D-(+)-galaktosa	40% v/v terc-butanol
2,0 M NDSB-211	40% v/v acetonitril
2,0 M NDSB-221	40% v/v amid kys. mravenčí
20% w/v benzamidin - hydrochlorid hydrát	40% v/v 1-propanol
30% w/v 1,6-hexanediol	5% v/v ethylacetát
50% w/v polyethylen glykol 400	40% v/v aceton
50% v/v Jeffamine M-600®pH = 7,0	0,25% v/v dichloromethan
	7% v/v 1-butanol
	40% v/v 2,2,2-trifluoroethanol
	40% v/v 1,1,1,3,3,3-hexafloro-2-propanol

Aditiva z Tab. 6.3 nám prozrazují, že krystaly nativního proteinu rClrb rostou lépe převážně v přítomnosti organických sloučenin, oproti deglykosylovanému proteinu, kde jednoznačnou tendenci nelze vysledovat. Nativní rClrb tvoří jehlice, deglykosylovaný protein tvoří spíše oválky, které nemají ideálně vytvořené hrany.

6.2 Delece ve vektoru pH_Lsec-FcHis

Jelikož bylo dříve zjištěno, že při produkci samotných extracelulárních úseků proteinů rClrb a rNKR-P1B nelze získat čistý dimer, byly vytvořeny fúzní proteiny s Fc fragmentem IgG. V diplomové práci Mgr. Petry Celadové se zjistilo, že fúzní produkty z plazmidu pH_Lsec-FcHis (Obr. 6.2.1, str. 48) lze štěpit 3C proteasou pouze v případě rClrb, u rNKR-P1B proteinů ke štěpení téměř nedocházelo. Nejpravděpodobnější příčinou bylo to, že cysteiny zodpovědné za tvorbu dimeru rNKR-P1B se křížem mylně provázaly s cysteiny tvořícími dimer Fc fragmentu, protože v sekvenci fúzních konstruktů plazmidu pH_Lsec-FcHis následují tyto cysteiny blízko za sebou.



Obr. 6.2.1: Schéma plazmidu pHlsec-FcHis.

V pořadí **Kozakova sekvence**, **sekreční signální sekvence**, **štěpné místo pro 3C proteasu**, **Fc fragment**, **C-terminální histidinová kotva**. Důležitá štěpná místa jsou pro enzym **AgeI**, pro enzym **KpnI**. Celá expresní kazeta je ukončena štěpným místem pro **XhoI**.

Naším úmyslem bylo odstranit z původních vektorů (vyrobených Mgr. Petrou Celadovou) v oblasti Fc fragmentu 3 cysteiny, neboť právě v této oblasti mohlo docházet mezi cysteiny ke křížení. Z Obr. 6.2.2 je vidět, že deletováno bylo 13 aminokyselin. Zároveň byla pro účinnější purifikaci histidinová kotva prodloužena z původních šesti na deset histidinů.

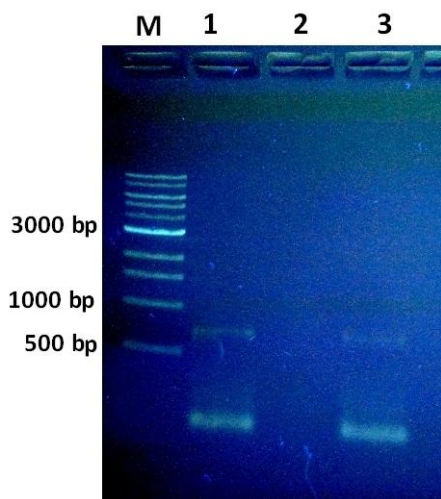
před	GTLEVLFGQPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS	60
po	GTLEVLFGQ-----PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS	47
před	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKA	120
po	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKA	107
před	LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP	180
po	LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP	167
před	ENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK	240
po	ENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK	227
před	HHHHHH----	246
po	HHHHHHHHHH	237

Obr. 6.2.2: Srovnání původního konstruktů Fc fragmentu a konstruktů po deleci.

Červeně je znázorněna delece 13 aminokyselin a 4 přidané histidiny. Porovnáno v programu ClustalW2.

6.2.1 Vytvoření deletovaného Fc fragmentu

Prvním krokem při přípravě delece vektorů byla PCR amplifikace zvolené DNA sekvence. Jako templát pro PCR byl použit Mgr. Petrou Celadovou vytvořený plazmid pHlsec-FcHis_W1.

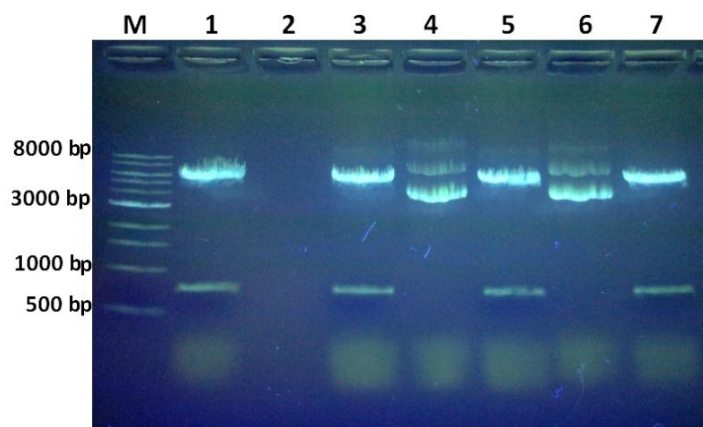


Obr. 6.2.3: Celkový Fc fragment na agarosovém gelu.

V dráze M je 1 kb marker. V dráze 1 je PCR produkt s přidavkem 10% DMSO, v dráze 3 bez přidavku 10% DMSO, dráha 2 je prázdná. Velikost celkového konstruktu Fc fragmentu je 720 bp.

Použité dvojice primerů jsou uvedeny v kapitole 5.1.1 a 5.1.4, jejich sekvence v sekci 4.2.4. Připravené produkty byly analyzovány agarosovou elektroforézou. Velikost konstruktu I je 690 bp a celkového konstruktu Fc fragmentu je 720 bp, což bylo ověřeno porovnáním s markerem (viz. Obr. 6.2.3). Bylo vyzkoušeno, zda reakci PCR ovlivní přidavek 10% DMSO a z Obr. 6.2.3 je vidět, že proužky produktu zůstávaly stejné, jak po přidavku, tak bez něho.

Fc fragment s delecí získaný po PCR byl v dalším kroku vložen do 4 produkčních vektorů pHLsec-FcHis s inzerty – C1, W1, S1 a R2, které byly linearizovány restrikcími enzymy KpnI a XhoI (Obr. 6.2.4). Těmito enzymy bylo do plazmidu vložen také původní Fc fragment. Vektor pHLsec-FcHis poskytuje buňkám ampicilinovou rezistenci.

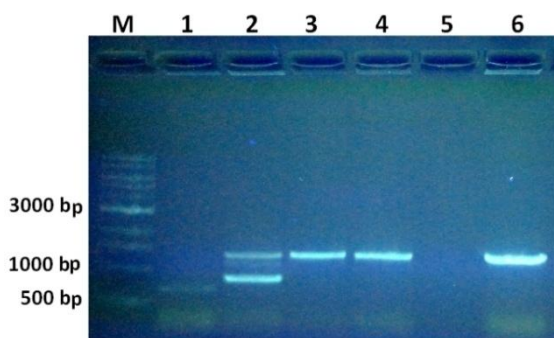


Obr. 6.2.4: Linearizace plazmidu pHLsec-FcHis s jednotlivými inzerty.

Vektor byl štěpen pomocí enzymů KpnI a XhoI. V dráze 4 a 6 je neštěpený plazmid pHLsec-FcHis_W1 a pHLsec-FcHis_C1. Postupně je v drahách 1, 3, 5, 7 štěpený plazmid pHLsec-FcHis_R2, pHLsec-FcHis_S1, pHLsec-FcHis_W1, pHLsec-FcHis_C1. (Vyštěpený inzert má velikost 720 bp).

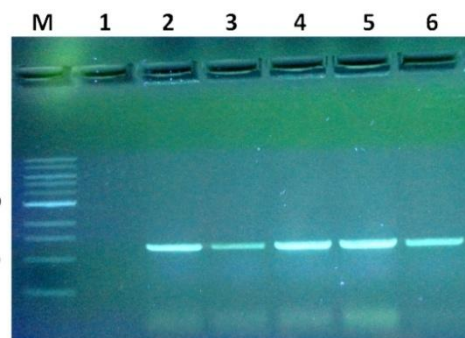
6.2.2 PCR z kolonií

Ligační směsí byly posléze transformovány bakterie *E. coli* kmene DH5 α . Transformace byla provedena tepelným šokem a bakterie byly vysety na misky s LB agarem obsahujícím ampicilin. Na miskách vyrostlo několik kolonií, další postup byl proveden podle odstavce 5.1.9. Na Obr. 6.2.4a je zobrazen výsledek PCR z kolonií, na jejímž základě byly pro další práci vybrány klony Δ C1, Δ W1, Δ S1-1 a Δ S2-3. Pro R2 byl později získán pozitivní klon Δ R2-1 až Δ R2-5 (Obr. 6.2.4b).



Obr. 6.2.5a: PCR z kolonií I.

V dráze M je 1kb marker. V dráze 1 je nesouvisející vzorek. V dráze 2 je vzorek z PCR z kolonií pro Δ C1, ve třetí pro Δ W1, ve čtvrté a šesté dráze jsou kolonie z Δ S1.



Obr. 6.2.5b: PCR z kolonií II.

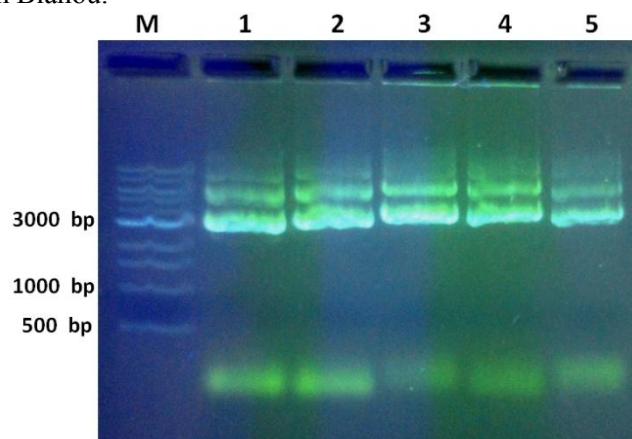
V dráze M je 1kb marker. Dráha 1 je prázdná. Dráhy 2 až 6 jsou pozitivní kolonie pro pHLsec- Δ FcHis_{R2}.

Z vybraných klonů byla pomocí soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (*Genomed*, Německo) izolována plazmidová DNA z agarosového gelu, která byla předána RNDr. Štěpánce Hrdé do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK na sekvenaci. Nukleotidové sekvence byly poté porovnávány se známými nukleotidovými sekvencemi před delecí. Sekvenování potvrdilo správnost všech plazmidů s delecemi. Následně bylo připraveno zásobní množství všech plazmidů dle kapitoly 5.1.14. Pro určení čistoty a množství získané plazmidové DNA byla změřena absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm, výsledky jsou shrnuty v Tab. 6.4.

Tab 6.4: Koncentrace a čistota plazmidů změřené spektrofotometricky.

protein	c[μ g/ μ l]	A _{260/280}
pHLsec- Δ FcHis_C1	3,33	1,73
pHLsec- Δ FcHis_W1	2,01	1,97
pHLsec- Δ FcHis_S1	4,08	1,69
pHLsec- Δ FcHis_R2	5,31	1,73

Po „maxiprepu“ byly vytvořené plazmidy (Obr. 6.2.6) ověřeny na agarosovém gelu porovnáním s 1 kb markerem a známou velikostí plazmidu pTT28_L2_H176C vytvořeného Bc. Janem Bláhou.



Obr. 6.2.6: Kontrola plazmidů pHLsec-ΔFcHis.

Dráha M je marker. V dráze 1 je kontrolní vzorek pTT28_L2_H176C, v drahách 2 až 5 po sobě následují plazmidy pHLsec-ΔFcHis_C1, ΔW1, ΔS1 a ΔR2.

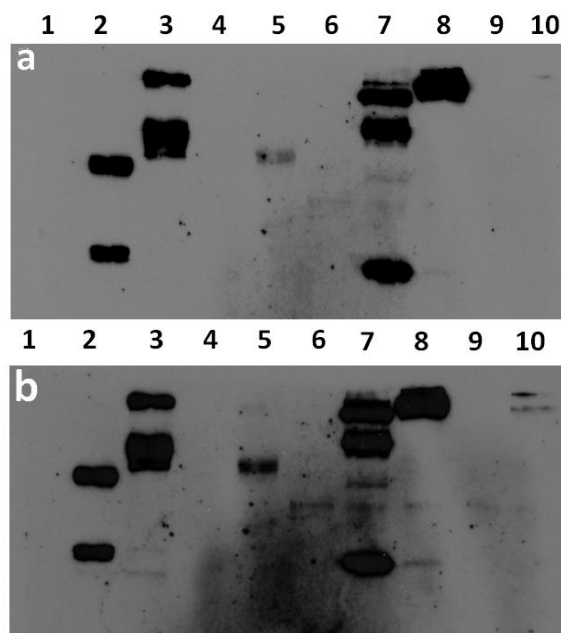
6.2.3 Expresní test plazmidů pHLsec-ΔFcHis

Zda a v jaké míře jsou suspenzní HEK293T buňky schopné produkovat studované proteiny po transfekci připravenými plazmidy, bylo zjišťováno pomocí tzv. expresního testu. Z kultury narostlé do hustoty přibližně $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ bylo odebráno 7,5 ml suspenze a zcentrifugováno. Buněčná peleta byla následně resuspendována v 7,5 ml média F17 a rozdělena po 0,5 ml do každé jamky. Následovala transfekce podle odstavce 5.2.2.1. Po třech dnech produkce byly odebrány vzorky z média, zcentrifugovány a ze supernatantu byly připraveny neredukující a redukující vzorky v poměru 1 : 1 roztok : vzorkový pufr.

Následovala SDS elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu, elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu a imunodetekce pomocí primární protilátky rozpoznávající sekvenci histidinové kotvy a sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou umožňující následnou chemiluminiscenční detekci podle odstavců 5.2.2.2 - 4. S primární protilátkou se membrána inkubovala přes noc a se sekundární 1 hod.

Výsledkem tohoto postupu jsou fotografie pořízené během chemiluminiscenční detekce (Obr. 6.2.7, str. 52). Konstrukty ΔC1, ΔW1 se podle expresního testu produkují poměrně dobře, ΔR2 je produkováno velmi slabě, konstrukt ΔS1 není produkováno vůbec. U ΔC1 jsou vidět dva pruhy – dimerní a nejspíše odštěpený monomerní

Fc fragment, u $\Delta W1$ vrchní proužek je nejspíše fúzní protein složen z dimeru a monomeru a nižším proužkem je dimer. U neredukující prostředí konstruktů $\Delta W1$ můžeme také spatřit odštěpený monomerní Fc fragment.



Obr. 6.2.7 Expresní test $\Delta FcHis$ konstruktů.

Vzorky kultivačního média byly rozděleny pomocí SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulosovou membránu a vizualizovány pomocí imunodetekce protilátkami s následnou chemiluminiscenční detekcí. Obr. 6.2.7a je detekce po 2 min a Obr. 6.2.7b je detekce po 10 min. V dráze 1 až 5 jsou konstrukty v redukujícím pufru a v 6 až 10 v neredukujícím pufru. Dráha 2 a 7 je konstrukt $\Delta C1$; 3 a 8 $\Delta W1$; 4 a 9 je $\Delta S1$; 5 a 10 $\Delta R2$. V dráze 1 pozitivní kontrola konstrukt Bc. Jana Bláhy pTT28_L2_H176C. Monomery se pohybují v rozmezí hodnot 17-27 kDa, dimery 34-43 kDa dle zaplnění N-glykosylačních míst.

7. DISKUZE

Prvním bodem mé práce byla purifikace už dříve vytvořených plazmidů vektoru pYD5 receptorů rNKR-P1B SD a rNKR-P1B WAG a jejich fyziologického ligandu rClrb. Nejprve jsem agarosovou elektroforézou ověřila, zda jsou nově vzniklé plazmidy v pořádku, zda nejsou degradované a poté si vytvořila jejich zásobní množství. Následovala transfekce v expresním systému HEK293S GnTI linie, postup byl optimalizován (což nebylo součástí mé práce) oproti postupu Y. Durochera (Montreal, Kanada), který zavedl postup, z něhož naše laboratoř vycházela, s linií HEK293E.⁴³

Následovala purifikace fúzních konstruktů. Výška elučního vrcholu při první gelové permeační chromatografii se pro všechny konstrukty pohybovala okolo absorbance 0,6 při 280 nm, u pYD5_C1 byl na chromatogramu v mrtvém objemu kolony pozorován také výrazný eluční vrchol agregátů, u konstruktů S1 a W1 byly patrné pouze vrcholy fúzních proteinů. Po štěpení TEV proteasou byl výtěžek zhruba třetinový, což přibližně odpovídá hmotnostnímu poměru receptoru a Fc fragmentu ve fúzním proteinu. Jelikož musela purifikace těchto proteinů probíhat přes kolonku obsahující protein-A-agarosu, což bylo velice zdlouhavé a nákladné, bylo by do budoucna dobré vnést do vektoru pYD5 histidinovou kotvu, díky níž by bylo možné zachytit fúzní protein na nosiči Talon, což je rychlejší i levnější postup.

I když bylo získané množství proteinů menší než 1 mg, byla provedena ultracentrifugace s metodou sedimentační rychlosti pro jednotlivé konstrukty i pro jejich směsi. Tvorbu komplexu jsme mohli pozorovat u směsi rNKR-P1B WAG a rClrb. Tyto vzorky byly dále poslány do Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. na pokusy o zmapování disulfidů a síťování komplexu (tzv. „cross-link“) obou směsí pomocí hmotnostní spektrometrie, avšak výsledky doposud nebyly průkazné, což bylo nejspíše způsobeno omezeným množstvím proteinů.

Jednotlivé varianty proteinu rClrb, ať glykosylované či deglykosylované, byly také použity na pokusy o krystalizaci tohoto receptoru. Účastnila jsem se úspěšných pokusů, kdy vykrytalizoval konstrukt rClrb pocházející z plazmidu pTT28 a tedy nesoucí histidinovou kotvu, který byl produkován v linii HEK293E s přidavkem kifunensinu do kultivačního média - kifunensin je inhibitor α -manosidasy I a proteiny produkové v jeho přítomnosti tak mají upravenou, zjednodušenou N-glykosylaci.²¹ Vycházeli jsme z již dříve optimalizovaného složení srážedla - rezervoáru a použili jsme řidkou matici aditiv složenou z 96 roztoků. V Tab. 5.3 (str. 47) lze vidět, které z aditiv pomáhá

při krystalizaci jaké formě proteinu rClrb. Díky tomuto pozitivnímu zjištění byly následující krystalizační experimenty s mnoha připravenými proteiny rClrb z plazmidů pYD5_C1 a pHLsec-FcHis_C1 produkované v HEK293S GnTI liniích s homogenní glykosylací prováděny za přídavku aditiva 0,1M hydrátu chloridu barnatého pro deglykosylovaný protein a 40% acetonu pro nativní protein. Jelikož proteiny byly velice zředěné, bylo vyzkoušeno několik podmínek, ve kterých jsme hledali různé poměry proteinu ku rezervoáru a ddH₂O, vyzkoušeli jsme také metodu „microseeding“. Zatím se podařilo získat jen tenkovrstvé 2D krystaly z rClrb vyprodukovaného v pHLsec-FcHis_C1 v podmínce poměru 2 μl proteinu ku 2 μl ddH₂O ku 0,2 μl rezervoáru s přídavkem 0,5 μl očkovacího roztoku (tzv. „seed stock“) z kapek, kde vznikly krystaly za přítomnosti 7% v/v 1-butanolu a 40% v/v 2,2,2-trifluoroethanolu. Do budoucna bude snaha získat větší a lépe uspořádané krystaly, které by difraktovaly rentgenové záření a byly vhodné k vyřešení prostorové struktury rClrb receptoru.

Druhým hlavním úkolem mé bakalářské práce bylo provedení delece ve vektoru pHLsec-FcHis v oblasti Fc fragmentu, v němž bylo odstraněno 13 aminokyselin včetně třech cysteinů. O této oblasti se předpokládalo, že dochází ke křížení těchto cysteinů z Fc fragmentu s dimerizačními cysteiny NKR-P1 receptorů, jelikož Mgr. Petra Celadová ve své diplomové práci narazila na problém při štěpení pHLsec-FcHis fúzních konstruktů 3C proteasou, kdy se u rodiny NKR-P1B nedal rozštěpit celý fúzní protein. Pro zlepšení purifikace byly také na C-konci konstruktu přidány 4 histidiny pro silnější afinitu k nosiči.

Nejprve byly navrženy primery tak, že se odstraňovala část Fc fragmentu navázaného přímo na inzertech oddělených restrikcími místy AgeI a KpnI, ale po několika neúspěšných pokusech byly navrženy nové primery pouze pro Fc fragment, kdy se provedla delece ve dvou krocích. Primery byly navrženy jako dvojice na sebe postupně navazujících oligonukleotidů, aby nedocházelo k jejich vnitřnímu spojení či napojení na jinou část plazmidu. Nová restrikcími místa byla KpnI a XhoI. Ideální teplota nasedání byla 55 °C. Získat zkrácený Fc fragment nebylo zcela jednoduché, vzniklé proužky PCR produktů byly velice slabé, proto byly vytvořeny 4 stejné reakce, jejichž produkt byl poté spojen. Dále byl nově vzniklý Fc fragment vložen do linearizovaných plazmidů rozštěpených pomocí restrikcími enzymů KpnI a XhoI. Po úspěšné přípravě všech plazmidů, tedy pHLsec-ΔFcHis_C1, pHLsec-

Δ FcHis_W1, pHLsec- Δ FcHis_S1 a pHLsec- Δ FcHis_R2, byly plazmidy poslány na sekvenaci, která potvrdila úspěšnost delece u všech plazmidů. Následujícím krokem bylo vytvoření zásobního množství plazmidů pomocí komerčních kitů pro „maxiprep“.³² Expresním testem s imunodetekcí jsme zjistili, že probíhá produkce všech proteinů mimo rNKR-P1B SD. Vzorky média z expresního testu byly analyzovány v redukujícím i neredukujícím prostředí, posun po redukci odpovídající redukci dimerního proteinu na monomer bylo možno rozeznat. U rClrb byly pozorovány 2 proužky fúzního proteinu v redukujícím prostředí a 3 v neredukujícím, je zřejmé, že nejmenší proužek je monomerní odštěpený Fc fragment, jelikož jeho mobilita se nemění při redukci a 2 vrchní proužky byly nejspíše zredukovány na jeden - je tedy možné, že vzniká směs monomerního a dimerního fúzního proteinu či dochází k částečné degradaci. U fúzního proteinu NKR-P1B WAG nebyl zredukován celý proužek, část zůstala nezredukována, je však patrné, že fúzní protein tvoří čistý dimer.

Dalším postupem do budoucna je velkoobjemová transfekce v HEK293S GnTI linií, která se již kvůli nedostatku času v rámci této práce nestihla. Až teprve při následné purifikaci a štěpení TEV proteasou zjistíme, zda delece byla prospěšná či nikoli.

8. ZÁVĚR

- Potkaní NK receptory rClrb WAG, rNKRP1B WAG, rNKRP1B SD ve vektoru pYD5 byly připraveny v expresním systému HEK293S GnTI linie a byla provedena jejich purifikace.
- Pomocí analytické ultracentrifugy metodou sedimentační rychlosti byla detekována tvorba komplexu u směsi rClrb a rNKR-P1B.
- S připravenými proteiny rClrb byla provedena optimalizace krystalizačních podmínek.
- Byly připraveny nové expresní vektory kódující potkaní NK receptory rClrb WAG, rNKRP1B WAG, rNKRP1B SD a virový protein RCTL ve vektoru pHLsec- Δ FcHis.
- Produkce proteinů z pHLsec- Δ FcHis plazmidů byla ověřena expresním testem v HEK293T linii s následnou imunodetekcí.

9. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- 1 - Hořejší V.; Bartůňková J.: *Základy imunologie*. 4.vydání, Praha, Triton 2009.
- 2 - Pazdera J.: Nobelova cena za objev dendritických buněk. 2011 Dostupné z URL: <www.osel.cz> [cit.1.5.2012]
- 3 - Cruse J.M.; Lewis E.; Wang H.; Schreuder G. M. T.; Marsh S. G. E.; Kennedy L. J.: T Cells and the Thymus. In: *Immunology Guidebook*. Cruse J. M.; Lewis E.; Wang H. (Ed.) New York: Academic Press, 2004, p. 311-338.
- 4 - Yokoyama W. M.: Recognition structures on natural killer cells. *Current Opinion in Immunology* 5, 67-73 (1993).
- 5 - Raulet D. H.; Vance R. E.: Self-tolerance of natural killer cells. *Nature Reviews - Immunology* 6, 520-531 (2006).
- 6 - Hopkins L. M.; Davis J. M.; Buchli R.; Vangundy R. S.; Schwartz K. A.; Gerlach J. A.: MHC class I-associated peptides identified from normal platelets and from individuals with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Human Immunology* 66 (8), 874-883 (2005).
- 7 - Middleton D.; Curran M.; Maxwell L.: Natural killer cells and their receptors. *Transplant Immunology* 10(2-3),147-164 (2002).
- 8 - Yokoyama W. M.: Natural killer cell receptors. *Current Opinion in Immunology* 10, 298-305 (1998).
- 9 - Chiang H. I.; Zhou H.; Raudsepp T.; Jesudhasan P.R.; Zhu J.J.: Chicken CD69 and CD94/NKG2-like genes in a chromosomal region syntenic to mammalian natural killer gene complex. *Immunogenetics* 59 (7),603-11 (2007).

10 - Glimcher L.; Shen F. W.; Cantor H.: Identification of a cell surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *The Journal of Experimental Medicine* 145, 1-9 (1977).

11 - Carlyle J. R.; Mesci A.; Fine J. H.; Chen P.; Belanger S.; Tai L-H.; Makrigiannis A. P.: Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems. *Seminars in Immunology* 20, 321-330 (2008).

12 - Drickamer K.: C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 585-590 (1999).

13 - Timonen T.; Helander T. S.: Natural killer cell-target cell interactions. *Current Opinion in Cell Biology* 9 (5), 667-673 (1997).

14 - Carlyle J. R.; Jamieson A. M.; Gasser S.; Clingan C. S.; Arase H.; Raulet D. H.: Missing self - recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Immunology* 101 (10), 3527-3532 (2004).

15 - Voigt S.; Mesci A.; Ettinger J.; Fine J. H.; Chen P.; Chou W.; Carlyle J. R.: Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity* 26, 617-627 (2007).

16 - Kveberg L.; Dai K. Z.; Westgaard I. H.; Daws M. R.; Fossum S.; Naper C.; Vaage J. T.: Two major groups of rat NKR-P1 receptors can be distinguished based on chromosomal localization, phylogenetic analysis and Clr ligand binding. *European Journal of Immunology* 39 (2), 541-551 (2009).

17 - Voigt S.; Sandford G. R.; Ding L.; Burns W. H.: Identification and Characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus. *Journal of Virology* 75, 603-611 (2001).

18 - Stevens R. C.: Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure* 8, 177-185 (2000).

19 - Chuang M. H.; Wu M. S.; Lin J. T.; Chiou S.H.: Proteomic analysis of proteins expressed by *Helicobacter pylori* under oxidative stress. *Proteomics* 5 (15), 3895-390 (2005).

20 - Breitling R.; Sorokin A. V.; Behnke D.: Temperature-inducible gene expression in *Bacillus subtilis* mediated by the c1857-encoded repressor of bacteriophage lambda. *Gene* 93, 35-40 (1990).

21 - Chiruvolu V.; Cregg J. M.; Meagher M. M.: Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations *Enzyme and Microbial Technology* 21 (4), 277-283 (1997).

22 - Suen K. F.; Turner M. S.; Gao F.; Liu B.; Althage A.; Slavin A.; Ou W.; Zuo E.; Eckart M.; Ogawa T.; Yamada M.; Tuntland T.; Harris J. L.; Trauger J. W.: Transient expression of an IL-23R extracellular domain Fc fusion protein in CHO vs. HEK cells results in improved plasma exposure. *Protein Expression and Purification* 71 (1), 96-102 (2010).

23 - Aricescu A. R.; Lu W.; Jones E. Y.: A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* 62, 1243-1250 (2006).

24 - Thomas P.; Smart T. G.: HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51, 187-200 (2005).

25 - McPherson A.: Introduction to protein crystallization. *Methods* 34, 254-265 (2004).

26 - Pusey M. L.; Liu Z. J.; Tempel W.; Praissman J.; Lin D.; Wang B. C.; Gavira J. A.; Ng J. D.: Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88 (3), 359-86 (2005).

27 - Minor W.; Tomchick D.; Otwinowski Z.: Strategies for macromolecular synchrotron crystallography. *Structure* 8 (5), 105-110 (2000).

28 - Skálová T.; Vaněk O.: Osobní sdělení, dosud nepublikováno (2012).

29 - Li M.; Chang W. R.: Protein crystallization. *Photosynth Research* 102, 223–229 (2009).

30 - Stura E. A.; Wilson I. A.: Applications of the streak seeding technique in protein crystallization. *Journal of Crystal Growth* 110 (1-2), 270-282 (1991).

31 - Kutá Smatanová I.: Krystalizace biologických makromolekul. Dostupné z URL: <<http://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm#ref>> [cit.15.5.2012]

32 - Protokoly k “miniprepu” High-Speed Plasmid Mini Kit (*Geneaid*, Německo). Dostupné z URL: < http://www.geneaid.com/sites/default/files/PD100_0.pdf > [cit.16.5.2012]

33 - Protokoly k izolaci z agarosového gelu JETquick Gel Extraction Spin Kit (*Genomed*, Německo). Dostupné z URL: <<http://www.veritastk.co.jp/attached/655/400XXX.410XXX.420XXX-JETQUICK-Protocol.pdf>> [cit.16.5.2012]

34 - Protokoly k “maxiprepu” PureLink™ HiPure Plasmid DNA (*Invitrogen*, USA). Dostupné z URL: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_hipure_plasmid_dna_purification_man.pdf> [cit.16.5.2012]

35 - Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR.: Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77 (1), 51-59 (1989).

36 - Bazzi C.; Petrini C.; Rizza V.; Sabadini E.; Arrigo G.; Beltrame A.; D'Amico G.: SDS-PAGE patterns and polymeric albumin in proteinuria of lupus glomerulonephritis. *Clinical Nephrology* 43(2), 96-103 (1995).

37 - Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-54 (1976).

38 - Schuck P.: Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical Journal* 78 (3),1606-1619 (2000).

39 - Schuck P.: On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Analytical Biochemistry* 320 (1),104-124 (2003).

40 - Program SEDNTERP. Dostupné z URL: <www.jphilo.mailway.com> [citováno 23. 5. 2012].

41 - Reichmann M. E.; Rice S. A.; Thomas C. A.; Doty P.: A further examination of the molecular weight and size of desoxyribose nucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* 76 (11), 3047-3053 (1954).

42 - Vaněk O., Bezouška K.: Analytická ultracentrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy* 104, 1155-1162 (2010).

43 - Durocher Y.; Perret S.; Kamen A.: High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research* 30(2), 1-9 (2002).

