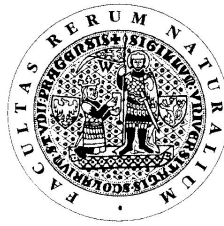


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jiří Nový

PŘÍPRAVA LIDSKÉHO NK BUNĚČNÉHO RECEPTORU
KACL

Preparation of the human NK cell receptor KACL

Bakalářská práce

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

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a projektu UNCE204025/2012.

Prohlášení

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

Jsem si vědom 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 28. Května 2013

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mě podporovali a pomáhali mi v přípravě a tvorbě bakalářské práce. Zejména mé poděkování patří mému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi za odborné vedení práce, konzultace a předání mnoha vědomostí a dovedností. Stejně tak bych rád poděkoval všem členům z laboratoře 204, především Mgr. Janu Bláhovi. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat rodině za podporu při práci.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	- 7 -
1 ÚVOD	- 10 -
2 TEORETICKÝ ÚVOD	- 11 -
2.1 Imunitní systém	- 11 -
2.1.1 Hlavní funkce	- 11 -
2.1.2 Buňky imunitního systému	- 11 -
2.1.3 T-lymfocyty	- 12 -
2.1.3.1 NK-T buňky	- 13 -
2.2 Přirození buněční zabíječi – NK buňky	- 13 -
2.2.1 Charakterizace NK buněk	- 13 -
2.2.1.1 Hlavní histokompatibilní komplex I	- 15 -
2.2.2 Receptory NK buněk	- 15 -
2.2.2.1 Receptory podobné lektinům C-typu	- 16 -
2.2.3 Receptor KACL	- 18 -
2.2.3.1 Komplex receptorů KACL-NKp65	- 18 -
2.3 Rekombinantní exprese proteinů	- 19 -
2.4 Lidské embryonální ledvinné buňky 293	- 20 -
3 CÍLE PRÁCE	- 22 -
4 MATERIÁL	- 23 -
4.1 Pomůcky a materiál	- 23 -
4.2 Chemikálie	- 24 -
4.3 Enzymy	- 25 -
4.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie	- 25 -
4.5 Vektory	- 26 -
4.6 Plazmidové DNA	- 26 -
4.7 Roztoky a média	- 26 -

4.7.1	Pufry a jiné roztoky.....	- 26 -
4.7.2	PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit	- 27 -
4.7.3	Kultivační média.....	- 27 -
5	METODY	- 28 -
5.1	Velkoobjemová příprava plazmidové DNA.....	- 28 -
5.1.1	Transformace a kultivace bakteriálních kultur	- 28 -
5.1.2	Izolace plazmidové DNA.....	- 28 -
5.1.3	Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	- 29 -
5.1.4	Agarosová elektroforéza	- 29 -
5.2	Rekombinantní exprese proteinů v buněčné linii HEK293S	- 29 -
5.2.1	Rozmrazování linie HEK293S.....	- 29 -
5.2.2	Kultivace linie HEK293S	- 29 -
5.2.3	Počítání buněčné hustoty.....	- 30 -
5.2.4	Produkce proteinů v HEK293S linii s transfekční směsí.....	- 30 -
5.2.5	Produkce proteinů v HEK293S linii bez transfekční směsi.....	- 31 -
5.3	Purifikace proteinů.....	- 31 -
5.3.1	Filtrace kultury.....	- 31 -
5.3.2	Chelatační chromatografie	- 32 -
5.3.3	Zakoncentrování proteinu	- 32 -
5.3.4	Gelová permeační chromatografie.....	- 32 -
5.4	Charakterizace proteinu	- 33 -
5.4.1	SDS elektroforéza.....	- 33 -
5.4.2	Stanovení koncentrace	- 33 -
5.5	Deglykosylace proteinu	- 34 -
5.6	Hmotnostní spektrometrie - mapování disulfidických můstků	- 34 -
5.6.1	Gradientová SDS elektroforéza v oxidativním prostředí.....	- 34 -
5.6.2	Deglykosylace denaturovaného proteinu	- 34 -

5.6.3	Digesce trypsinem.....	- 35 -
5.6.4	Extrakce peptidů	- 35 -
5.6.5	Nabohacení a odsolení peptidů	- 35 -
5.6.6	Analýza na hmotnostním spektrometru.....	- 35 -
5.7	Krystalizace	- 36 -
6	VÝSLEDKY	- 37 -
6.1	Příprava zásobního množství plazmidu.....	- 37 -
6.2	Produkce proteinu KACL v linii HEK293S	- 38 -
6.3	Purifikace proteinu KACL	- 38 -
6.3.1	Zpracování vzorku z produkce X.....	- 39 -
6.3.2	Zpracování vzorku z produkce A.....	- 40 -
6.3.3	Zpracování vzorku z produkce B.....	- 41 -
6.4	Deglykosylace KACL.....	- 43 -
6.4.1	Stanovení koncentrace frakcí.....	- 43 -
6.4.2	Deglykosylace frakcí	- 43 -
6.5	Mapování disulfidických můstků proteinu KACL.....	- 47 -
6.6	Krystalizace proteinu KACL.....	- 48 -
7	DISKUZE.....	- 49 -
8	ZÁVĚR	- 52 -
9	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	- 53 -

SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
AcN	acetonitril
ADCC	cytotoxická reakce závislá na protilátkách (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AICL	receptor NK buněk (<i>activation-induced C-type lectin</i>)
APS	peroxosíran amonný (<i>ammonium persulfate</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CHO	buňky vaječníku křečička čínského (<i>chinese hamster ovary cells</i>)
CLEC2	rodina C-lektinových receptorů NK buněk (<i>C-type lectin domain family 2</i>)
Clr	rodina proteinů obsahujících podobný motiv jako lektiny C-typu (<i>C-type lectin related</i>)
CTLD	doména podobná C-lektinům (<i>C-type lectin-like domain</i>)
CD	povrchové molekuly leukocytů (<i>cluster of differentiation</i>)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
Endo H _f	endoglykosidasa H s fúzním proteinem
ESI	metoda ionizace elektrosprejem (<i>electrospray ionization</i>)
ExCELL293	komerční kultivační médium
F17	komerční kultivační médium
FA	kyselina mravenčí (<i>formic acid</i>)
Fc	část molekuly protilátky (<i>fragment crystallizable</i>)
GnTI	N-acetylglukosaminyltransferasa I
HEK293	lidské embryonální ledvinné buňky 293 (<i>human embryonic kidney 293</i>)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HLA	hlavní lidský histokompatibilní antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)

IAA	jod acetamid (<i>iodacetamid</i>)
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
INF	interferon
KACL	receptor NK buněk (<i>keratinocyte-associated C-type lectin</i>)
KIR	imunoglobulinový receptor NK buněk (<i>killer cell Ig-like receptor</i>)
LB	Luria Bertani médium
LC-MS	hmotnostní spektrometr spojený s kapalinovou chromatografií (<i>liquid chromatography - mass spectrometry</i>)
LIR	imunoglobulinový receptor NK buněk (<i>leukocyte inhibitor receptor</i>)
LLT1	receptor NK buněk (<i>lectin like transcript 1</i>)
IPEI	lineární polyethylenimin
MHC gp I	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (<i>major histocompatibility complex type I glycoproteins</i>)
MHC gp II	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (<i>major histocompatibility complex type II glycoproteins</i>)
MICA, MICB	neklasické MHC molekuly (<i>MHC class I-related</i>)
NK	přirozený zabíječ (<i>natural killer</i>)
NKC	NK genový komplex (<i>natural killer receptor gene complex</i>)
NKG2	rodina receptorů NK buněk (<i>natural killer group 2</i>)
NKp65	receptor NK buněk (<i>natural killer cell protein, 65 kDa</i>)
NKp80	receptor NK buněk (<i>natural killer cell protein, 80 kDa</i>)
NKR-P1	receptor NK buněk (<i>natural killer cell receptor protein 1</i>)
NK-T	NK-T lymfocyty (<i>natural killer T-cells</i>)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (<i>phosphate buffered saline</i>)
PTK	protein tyrosin kinasa
SDS	dodecylsulfát sodný (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
T _c	cytotoxický T-lymfocyt (<i>cytotoxic T-cell</i>)
TCR	receptor T-lymfocytů (<i>T-cell receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TES	Tris pufovaný EDTA obsahující fyziologický roztok (<i>Tris</i>

	<i>buffered EDTA containing saline</i>
TFA	kyselina trifluoroctová (<i>trifluoroacetic acid</i>)
T _H	pomocný T-lymfocyt (<i>helper T-cell</i>)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 ÚVOD

NK buňky neboli přirození buněční zabíječi jsou důležitou součástí imunitního systému organismů. Jejich specifickou vlastností je to, že dokážou rozeznat a zneškodnit některé nádorové buňky a buňky infikované virem bez jakéhokoliv předchozího signálu. Jejich funkce je závislá na aktivitě povrchových stimulačních a inhibičních receptorů, které se aktivují interakcí s ligandy na povrchu cílových buněk. Interakce lidského NK receptoru NKp65 a ligandu KACL je velmi specifická, což potvrzuje velmi vysoká afinita interakce, která je oproti jiným příbuzným komplexům až 400× vyšší. O tomto komplexu je zatím známo jen málo informací, ale je jisté, že se účastní imunitních procesů v kůži, neboť KACL je produkován výhradně keranocyty.

Náplní této bakalářské práce byla příprava rozpustné formy receptoru KACL za pomoci rekombinantní exprese proteinů v lidských embryonálních ledvinných buňkách s homogenní glykosylací (linie HEK293S GnTI). Protein byl následně charakterizován gelovou chromatografií a SDS elektroforézou. Správné zapojení čtyř cysteinů do dvou disulfidických můstků bylo ověřeno hmotnostní spektrometrií. S připraveným proteinem KACL bylo zahájeno strukturní studium metodou krystalizace proteinů.

Klíčová slova

Přirozené zabíječské buňky, HEK293 buněčná linie, rekombinantní exprese, KACL, NKp65, krystalizace

Key words

Natural cell killers, HEK293 cell line, recombinant expression, KACL, NKp65, crystallization

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Imunitní systém

2.1.1 Hlavní funkce

Od počátků evoluce jsou organismy stále vystaveny útokům jiných organismů. Jednou z největších hrozeb je napadení infekčními mikroorganismy a viry.

Aby se jim živočichové ubránili, vyvinuli si propracované obranné zařízení známé jako imunitní systém [1]. Název pochází z latinského slova *immunis*, které znamená nezúčastněný. Pokud patogeny překonají fyzickou bariéru organismu, jsou identifikovány jako cizí a postupně jsou zlikvidovány. Imunitní systém má řadu vlastností podobných nervovému systému. Těmi zásadními jsou schopnosti zaznamenat podnět, reagovat na něj a pamatovat si ho.

O imunitní systém a jeho studium se lidé zajímají už od starověké Číny přes starověké Řecko až dodnes [2]. Imunologickým průkopníkem v historii byl Edward Jenner roku 1798, který vytvořil vakcínu proti planým neštovicím. Od šedesátých let dvacátého století se studium lidské imunity rozvíjí o stále modernější techniky (imunochemie, rentgenová krystalografie, rekombinace DNA).

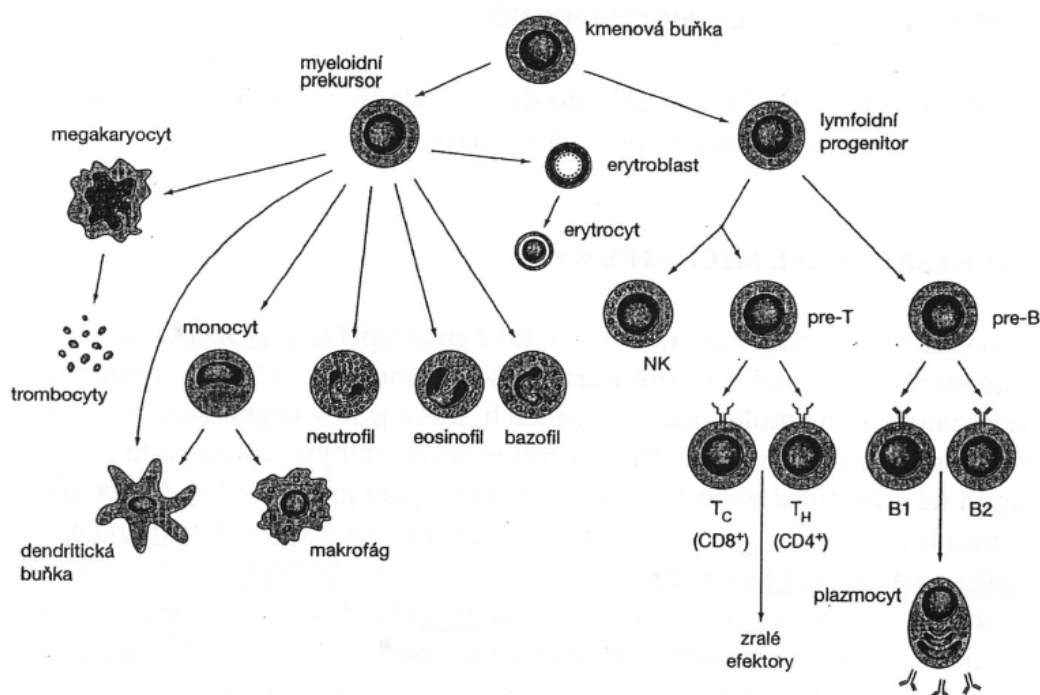
Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu a je dělen na nespecifický (vrozený) a specifický (získaný) neboli adaptivní mechanismus [3]. Nespecifické mechanismy jsou evolučně starší a jsou založeny na molekulách a buňkách předem připravených bojovat proti různým patogenům.

Buněčné nespecifické systémy jsou zastupovány epiteliální bariérou, fagocytujícími buňkami (makrofágy) a přirozenými zabíječi (NK buňky, *natural killer cells*) [2,3]. Humorální jsou reprezentovány interferony (INF), lektiny a sérovými proteiny. Tyto složky v přítomnosti škodlivin reagují během několika minut až hodin, nemají však imunologickou paměť. Opačně tomu tak je u specifických imunitních složek. Specifické mechanismy jsou evolučně mladší (známé až u obratlovců). Ze složek lze jmenovat protilátky produkované B-lymfocyty a antigenně specifické receptory T-lymfocytů. Imunitní reakce těchto složek trvá dny až týdny.

2.1.2 Buňky imunitního systému

Buněk imunitního systému je celá řada o různých strukturách a funkcích. Přesto mají řadu společných rysů, jakým je například původ [4]. Nejznámějšími zástupci jsou bílé krvinky. Všechny tyto buňky pocházejí z pluripotentních kmenových buněk kostní

dřeně [4]. Kmenové buňky se dělením diferencují do dvou linií, a to myeloidní a lymfoidní (leukocyty) [3,4]. Z myeloidní linie vznikají erytrocyty, makrofágy, dendritické buňky, granulocyty a krevní destičky (trombocyty) [4]. Z lymfoidní pak B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky [4]. Ty se vyvíjejí v buňkách kostní dřeně a dozrávají v lymfoidních orgánech, jako jsou uzliny, slezina, Peyerovy plaky (sliznice střeva) a brzlík [1]. Podrobné dělení kmenových buněk kostní dřeně je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1: Diferenciace buněk vznikajících z kmenových buněk kostní dřeně. Myeloidní linie se dělí na granulocyty (neutrofil, eozinofil, bazofil) trombocyty, erytrocyty, makrofágy a dendritické buňky. Z lymfoidní linie vznikají NK buňky a lymfocyty T, B [3].

2.1.3 T-lymfocyty

Povrch každého T-lymfocytu nese desítky tisíc identických, klonálně unikátních receptorů [3]. Podle typu receptorů lze buňky rozdělit na buňky s receptory T-lymfocytů (TCR, *T-cell receptor*) $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$ [3]. Lymfocyty nesoucí receptory typu $\gamma\delta$ lze považovat za menšinové, které se dokážou množit i mimo brzlík [3]. Imunologický význam těchto receptorů není dosud zcela jasný [3]. Ze studií vyplynulo, že lymfocyty s těmito receptory rozeznávají poměrně jednoduché látky, jako jsou aminy či fosfoestery alifatických alkoholů, které vznikají z některých potravin nebo jsou produkty mikroorganismů [5]. Některými vlastnostmi se lymfocyty s $\gamma\delta$ receptory podobají NK

buňkám a zřejmě se uplatňují při obraně proti některým specifickým patogenům [3]. T-lymfocyty s receptory $\alpha\beta$ jsou naopak většinové a u většiny savců konvenční [3]. Nesou molekuly CD8 a CD4 (*cluster of differentiation*), přičemž molekuly CD8 reagují s glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I (MHC, *major histocompatibility complex*) (u člověka HLA I) a jsou prekurzory cytotoxických T-lymfocytů (T_C , *cytotoxic T-cell*) [3], které vznikají po prezentaci antigenu v asociaci s HLA I poté, co HLA I přijal antigen z cytosolu antigen prezentující buňky [6]. Pokud jsou tedy buňky infikovány virem, T_C rozpoznají svým receptorem příslušný antigen ve vazbě s HLA I a infikovanou buňku zničí indukovanou apoptózou [6]. Molekuly CD4 interagují s MHC gp II (u člověka HLA II) a jsou prekurzory pomocných T-lymfocytů (T_H , *helper T-cell*). T_H vznikají v závislosti na asociaci antigenu z buňky s HLA II [6]. V tomto případě se může jednat o bakteriální infekci a vznikají T_H dvou typů [6]. Prozánětlivé (T_{H1}), které pomocí $INF-\gamma$ aktivují makrofágy a je vyvolán zánět, a pomocné (T_{H2}), které aktivují proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů pomocí sekrece IL4 (interleukin) [6].

2.1.3.1 NK-T buňky

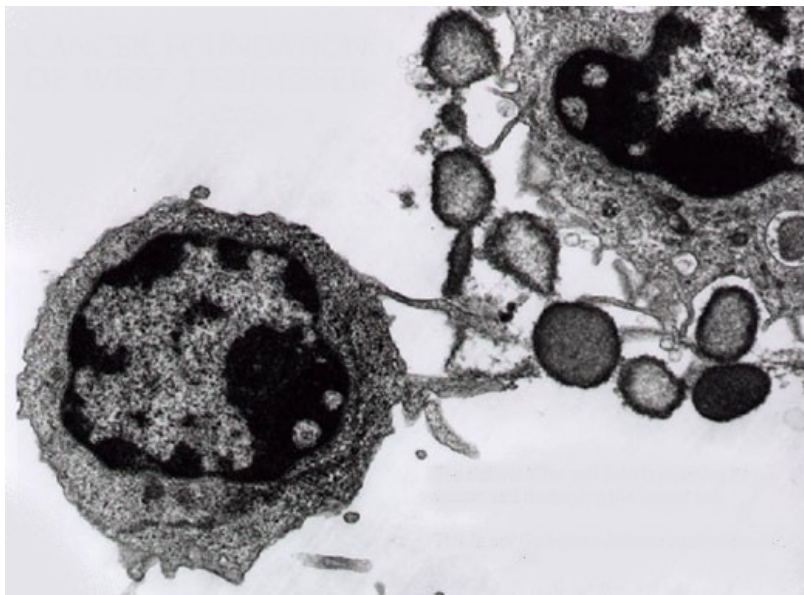
Existuje malá část T-lymfocytů nesoucích znaky nalezené u NK buněk, které jsou nazývány NK-T buňky (*natural killer T-cells*) [2]. Zatímco s T-lymfocyty je spojuje přítomnost TCR $\alpha\beta$, s NK buňkami mají společné stimulační a inhibiční receptory [3]. Tyto buňky jsou zdrojem cytokinů, jako jsou například $INF-\gamma$ a IL4, které jsou potřebné pro funkci pomocných T-lymfocytů [3]. Na rozdíl od klasických T-lymfocytů, NK-T buňky interagují s molekulou CD1d prezentující glykolipidy mikrobiálního nebo vlastního původu [3]. Fyziologické funkce NK-T buněk zatím nejsou zcela známy [2].

2.2 Přirození buněční zabíječi – NK buňky

2.2.1 Charakterizace NK buněk

Přirození zabíječi neboli NK buňky (Obr. 2, str. 14) jsou známy již dlouhou dobu jako součást přirozené imunity [7]. Jejich specializací je nespecifická obrana hlavně proti virům, mykobakteriím a nádorovým buňkám [6]. Představují okolo 10 % lymfocytů v krvi, kde je lze identifikovat jako velké lymfocyty s červenými granuly [8]. Díky tomuto vzhledu jsou řazeny mezi velké granulární lymfocyty [8]. Prekurzory NK

buněk se nacházející v kostní dřeni, fetálních játrech a brzlíku [8]. Typickým markerem pro NK buňky je CD16 receptor pro Fc fragment (*fragment crystallizable*) imunoglobulinu (IgG) a adhezni molekula CD56 [8]. Původně byly popsány jako lymfocyty se schopností rychle zabít některé nádorové, nebo virem napadené buňky, a to bez jakékoliv stimulace, proliferace a diferenciaci [3]. NK buňky nemají schopnost specificky rozlišit antigeny tak, jako tomu je u T-lymfocytů, ale co se týče aktivity a cytotoxických mechanismů, jsou NK buňky podobné T_C [3,4]. Přesto většinou dokážou nádorové, či virem infikované buňky odhalit a zneškodnit [3,4].



Obr. 2: NK buňka (vlevo) zneškodňující nádorovou buňku. Fotografie pořízena elektronovým mikroskopem [9].

Jedna představa o identifikaci „cizích“ buněk vychází z poznatku, že některé nádory na svém povrchu disponují sacharidy, které zdravá buňka nemá [3,4]. Na povrchu NK buněk jsou lektinové receptory, které pevně interagují se sacharidovými strukturami, tedy i s těmi, které se nachází na povrchu nádorové buňky. Dalším způsobem odhalení a zneškodnění abnormálních buněk je identifikace sníženého množství MHC gp I. NK buňka funguje tak, že normální množství MHC gp I na povrchu cílové buňky inhibuje cytotoxickou aktivitu NK buňky, čímž je buňka neaktivní při kontaktu se zdravými buňkami s normálním množstvím MHC gp I. Pokud se ovšem objeví buňka s nízkým množstvím MHC gp I, inhibice NK buňky se neuplatní, NK buňka se může aktivovat a cílovou buňku zneškodnit. Sníženou expresí MHC gp I se nakažená buňka maskuje před T_C lymfocyty, protože ty se na buňky váží pomocí tohoto komplexu.

Klíčové studie uvádí, že NK buňky mohou zneškodnit některé nádorové buňky s chybějícím MHC gp I, ale ušetří stejné nádory exprimující MHC gp I [10].

Třetím způsobem identifikace nebezpečné buňky je detekce navázaných protilátek. Pokud se protilátka naváže na povrch cílové buňky, může být její Fc fragment rozeznán buňkami nesoucími receptor pro Fc fragment protilátek (CD16 receptor), jako jsou právě NK buňky nebo T_C lymfocyty. Následně dojde k vypuštění lytických granul [8]. Ty obsahují protein perforin, který vytvoří v cílové buňce otvory, a dále granzymy, které aktivují kaspázy (protein aktivující apoptózu), čímž dojde k usmrcení buňky [8]. Aktivita NK buněk se liší mezi lidmi všech věkových kategorií a jejich nízká aktivita může být spojena s rozvojem infekcí, které mohou u starších pacientů končit i úmrtím [7].

2.2.1.1 Hlavní histokompatibilní komplex I

Molekula MHC gp I se skládá ze dvou nekovalentních řetězců [11]. Větší část tvoří α řetězec (44 - 47 kDa) a menší část β_2 -mikroglobulin (12 kDa) [11]. Každý α řetězec je ze tří čtvrtin vně membrány, hydrofobní část je v buněčné membráně a karboxy-koncové zbytky se nacházejí v cytoplasmě [11]. Části α_1 a α_2 obsahují vazebné místo pro CD8 (T_C), β_2 -mikroglobulin a α_3 část jsou strukturně podobné imunoglobulinům [11]. Poslední částí je antigenní peptid stabilizující celou MHC molekulu [11]. Tyto tři části spolu tvoří heterotrimer. MHC gp I jsou v organismu součástí všech jaderných buněk [3].

2.2.2 Receptory NK buněk

NK buňky exprimují pestrou škálou stimulačních a inhibičních receptorů regulujících aktivitu NK buněk [12]. Stimulační receptory rozeznávají struktury povrchu různých typů buněk [3]. Signál poskytnutý těmito receptory aktivuje cytotoxické mechanismy NK buňky [3]. Důležitými aktivátory NK buněk jsou INT- α a INT- β , které jsou uvolňovány leukocyty a fibroblasty [6]. Dalším aktivátorem je IFN- γ , který je produkován T-lymfocyty, NK buňkami a NK-T buňkami [3,6]. Interferony jsou z těchto buněk uvolňovány v souvislosti s poznáním infekce organismu [6].

Stimulačním receptorem je například Fc-receptor CD16 [3]. Pokud NK buňka narazí na buňku opsonizovanou protilátkami IgG, naváže se pomocí receptoru CD16 na jejich Fc fragmenty. Dojde k agregaci receptorů, přenosu signálu a aktivaci

cytotoxických mechanismů. Tento pochod se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Inhibiční receptory rozeznávají MHC gp I. Pokud buňka dostane přes tyto receptory signál, cytotoxické mechanismy se inhibují. Strukturně se řadí mezi imunoglobulinové a podobné lektinům C-typu. Imunoglobulinové receptory jsou oproti C-lektinovým početnější. Spadají mezi ně KIR (*killer cell Ig-like receptors*) a LIR (*leukocyte inhibitor receptors*). KIR byly zatím nalezeny na lidských NK buňkách. Jejich inhibiční aktivita je založena na asociaci s cytoplazmatickými fosfatázami rušícími signalizační dráhy zahájené stimulačními receptory spojenými s protein-kinázami. LIR jsou funkčně podobné KIR. Ty jsou přítomny na povrchu různých leukocytů a zřejmě pomáhají tlumit jejich přílišnou aktivitu. Inhibiční receptory podobné lektinům C-typu jsou přítomny u myšičích a lidských buněk, u člověka jsou zastoupeny např. několika typy heterodimerních receptorů CD94/NKG2.

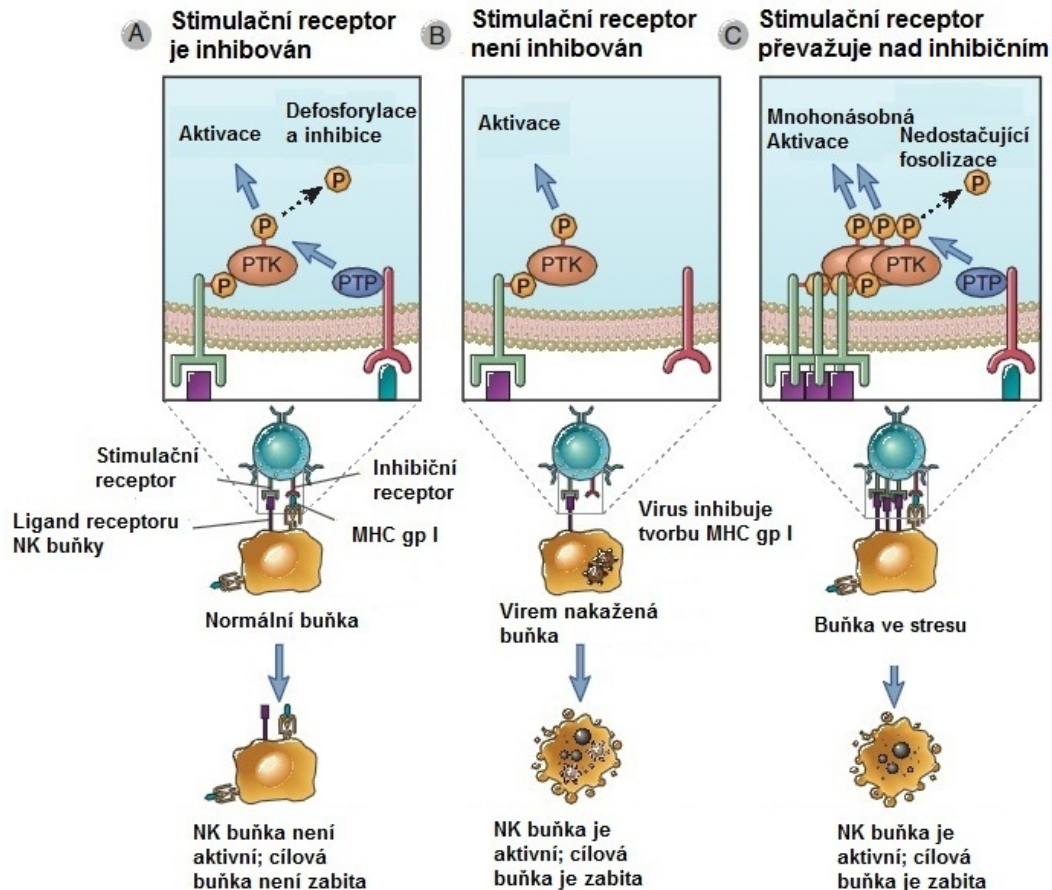
Výsledné reakce NK buněk s jinou buňkou závisí na převaze stimulačního či inhibičního signálu [3]. Pokud má buňka normální množství MHC gp I, převáží inhibiční signály. Pokud je na povrchu buňky málo MHC gp I, chybí některý z izotypů, či jsou molekuly pozměněny tak, že nejsou inhibičními receptory rozeznány, NK buňka se stimuluje a buňku zneškodní (Obr. 3, str. 17).

Ke zneškodnění buňky může také dojít, pokud se na jejím povrchu objeví zvýšené množství ligandů aktivačních receptorů [3]. Takovými jsou MICA a MICB molekuly podobné molekule MHC gp I, které interagují s NKG2D [8]. Ty se v normálních buňkách projevují slabě, ovšem ve stresovaných a nádorových buňkách je jejich množství neregulováno [8].

2.2.2.1 Receptory podobné lektinům C-typu

Skupina receptorů obsahujících domény podobné lektinům C-typu (CTLD, *C-type lectin-like domain*) je soubor transmembránových bílkovin, který zahrnuje inhibiční a aktivační receptory NK buněk [13]. Lektiny C-typu pro vazbu sacharidových ligandů vyžadují přítomnost vápenatých iontů, ovšem receptory obsahující CTLD doménu neváží ani vápník, ani sacharidy, a to i přes značnou sekvenční i strukturní podobnost s lektiny C-typu. Pro CTLD je charakteristická dvojitá smyčka, která je stabilizovaná pomocí disulfidických můstků, a to dvěma až čtyřmi. V pořadí druhá smyčka, nazývána jako *oblast dlouhé smyčky* (*long loop region*), je strukturně a evolučně flexibilní, ba někdy může i chybět.

Mezi CTLD receptory lidských NK buněk patří například AICL a NKp80, KACL a NKp65, NKR-P1 a LLT1, CD94/NKG2 a NKG2D, CD69, KLRG1 a další [12]. Z myších NK buněčných CTLD receptorů lze jmenovat NKR-P1 a Clr rodinu receptorů, CD69 nebo rozsáhlou rodinu receptorů Ly49. Tyto geny jsou kódovány v NK genovém komplexu (NKC, *natural killer receptor gene komplex*).



Obr. 3: Schéma funkce NK buněk v závislosti na aktivačních a inhibičních receptorech.

A: Aktivační receptor rozpozná ligand na cílové buňce a aktivuje protein-tyrosin kinázy (PTK), jejíž činnost je ovšem defosforylací zablokována inhibičním receptorem, který rozpoznává molekulu MHC gp I. NK buňka se nestimuluje a nezabije buňku, která je považována za zdravou.

B: Při virové infekci může být exprese MHC gp I snížena nebo úplně zrušena. Při připojení buňky a aktivaci PTK nemůže dojít k defosforylacii, protože nedochází k interakci inhibičního receptoru s MHC gp I. NK buňka je aktivní a cílovou buňku zničí.

C: Při infekci nebo nádorové transformaci může dojít ke zvýšení množství aktivačních ligandů, které se váží na aktivační receptory NK buňky a je aktivováno i větší množství PTK. K interakci inhibičního receptoru s MHC gp I sice dojde, ovšem převažuje aktivační signál a buňka je zničena. Převzato a upraveno z [11].

2.2.3 Receptor KACL

Do NKC spadá také nedávno charakterizovaný gen CLEC2A (*C-type lectin domain family 2*) kódující receptor KACL (*keratinocyte-associated C-type lectin*) [12]. Z názvu plyne, že je to další člen lidské CLEC2A rodiny CTLD receptorů. KACL transkripty byly výhradně detekovány v lidské kůži, v ostatních tkáních jsou sotva detekovatelné. S kůží asociovaná mRNA exprese jasně odlišuje KACL od ostatních podobných lidských receptorů, jako jsou AICL, LLT1 a CD69. Strukturně se jedná o glykoprotein vyskytující se jako homodimer o molekulové velikosti přibližně 32 kDa v *N*-glykosylované formě. Po deglykosylaci protein disponuje molekulovou velikostí kolem 20 kDa. Je složen ze 143 aminokyselin. Řetězec obsahuje čtyři cysteiny, které mezi sebou mohou tvořit disulfidové můstky.

Vedle KACL byl detekován aktivační receptor NKp65 na povrchu NK buněk, který se váže s KACL, a to s velmi vysokou afinitou [12]. NKp65 je stejně jako KACL receptor CTLD typu a strukturně se jedná též o glykoprotein, jehož molekulová velikost v *N*-glykosylované formě se pohybuje okolo 32 kDa. Molekulová velikost po deglykosylaci činí přibližně 24 kDa. Je složen ze 169 aminokyselin, obsahuje šest cysteinů, které mohou tvořit disulfidové můstky podobně jako KACL. Oba tyto CTLD receptory jsou kódovány v lidském genovém receptoru NK buněk. Sekvence těchto receptorů a jejich konstruktů připravených v laboratoři školitele je znázorněna na Obr. 4, str. 19. Ve své práci jsem pracoval s konstruktem pTT28_K1.

2.2.3.1 Komplex receptorů KACL-NKp65

Ze studií vyplývá, že NKp65 navázaný na povrchu NK buňky je funkční aktivační receptor stimulující cytotoxicitu NK buňky a sekreci prozánětlivých cytokinů, pokud interaguje s KACL [12]. Buňka nesoucí KACL také stimuluje NK buňku k produkci INF- γ , pravděpodobně v přítomnosti IL-12 nebo IL-18. Z experimentů zkoumajících možnosti interakce KACL s receptory NK buněk je zřejmé, že KACL dokáže interagovat pouze s receptorem NKp65, nikoliv s jemu podobnými receptory NKp80 nebo NKR-P1A. Zásadní je kinetická stránka interakce těchto receptorů. Rozpustná forma NKp65 dokáže vázat imobilizovaný KACL vysokou rychlostí, naopak odpojit se dokáže jen velmi pomalu. Díky tomu bylo možno změřit afinitu jejich interakce, která je zhruba 400 \times vyšší než afinita interakce komplexu AICL-NKp80. Do budoucna je výzkum komplexu receptorů KACL a NKp65 založen na řešení funkčních

důsledků pro využití v léčbě kožních chorob a zlepšení hojení ran.

KACL:

MINPELRDGRADGFIHRIVPKLIQNWKIGLMCFLSIIITTVCIIMIATWSKHAKPVACSGDWLGVR
DKCFYFSDDTRNWTASKIFCSLQKAELAQIDTQEDMEFLKRYAGTDMHWIGLSRKQGDSWK
WTNGTTFNGWFEIIGNGSFAFLSADGVHSSRGFIDIKWICSKPKYFL

pTT28 K1:

MGELLLLLLLGLRLQLSLGITGATWSKHAKPVACSGDWLGVRDKCFYFSDDTRNWTASKIFC
SLQKAELAQIDTQEDMEFLKRYAGTDMHWIGLSRKQGDSWKWTNGTTFNGWFEIIGNGSFA
FLSADGVHSSRGFIDIKWICSKPKYFLGTKHHHHHHHHG

NKp65:

MENEDGYMTLSFKNRCKSKQKSKDFSLYPQYYCLLLIFGCIVILIFIMTGIDLKFWHKKMDFSQ
NVNVSSLSGHNYLCPNDWLLNEGKCYWFSTSFKTWKESQRDCTQLQAHLVLIQNLDELEFIQ
NSLKPFGHFGWIGLYVTFQGNLWMWIDEHFLVPELFSVIGPTDDRSCAVITGNWVYSEDCSSTF
KGICQRDAILTHNGTSGV

pTT28 P1:

MGELLLLLLLGLRLQLSLGITGKFWHKKMDFSQNVNVSSLSGHNYLCPNDWLLNEGKCYWF
STSFKTWKESQRDCTQLQAHLVLIQNLDELEFIQNSLKPFGHFGWIGLYVTFQGNLWMWIDEH
FLVPELFSVIGPTDDRSCAVITGNWVYSEDCSSTFKGICQRDAILTHNGTSGVGTKHHHHHHH
HG

Obr. 4: Sekvence proteinů KACL a NKp65 a konstruktů pTT28_K1 a pTT28_P1.

KACL (konstrukt K1) je značen fialově, NKp65 (konstrukt P1) je značen zeleně, transmembránový úsek je značen červeně. Sekreční signál, který je proteolyticky odštěpen během exprese proteinu, je značen šedě. V růžových rámečcích jsou vyznačena *N*-glykosylační místa, ve žlutých rámečcích cysteiny tvořící disulfidové můstky. Oba konstrukty jsou opatřeny histidinovou kotvou na C-konci.

2.3 Rekombinantní exprese proteinů

Rekombinantní exprese proteinů je proces, kdy můžeme za pomoci expresních systémů vytvořit protein odvozený od konkrétního genu [14]. Tento protein pak lze purifikací oddělit od nežádoucích nečistot, čímž je získán čistý produkt. Sekvence nukleotidů kódující konstrukt proteinu, tzv. inzert, je upravena tak, že na koncích inzertu se nacházejí restrikční místa kompatibilní se zvoleným expresním vektorem, do něž je s jejich pomocí inzert vložen. Expresním vektorem rozumíme nejčastěji plazmid (kruhová molekula DNA). Jako expresní systém lze použít prokaryotické i eukaryotické buňky.

Z prokaryotických buněk se nejčastěji používá *E. coli* [15]. Rekombinantní exprese v těchto buňkách je výhodná jak po časové i finanční stránce, tak i nízkou obtížností přípravy [14-16]. Bohužel, prokaryotické systémy mnohdy selhávají při expresi správně složených funkčních forem savčích proteinů z důvodu neschopnosti zavést v nich správné post-translační modifikace, jako například při produkci přirozeně glykosylovaných proteinů [14-16]. Prokaryotické expresní systémy nejsou moc vhodné pro eukaryotické geny [16]. Důvodem je, že *E. coli* často rozpoznají bílkovinné produkty z eukaryotických genů a zdegradují je [16]. Dalšími důvody je již zmíněná neschopnost post-translační modifikace nebo nároky na vyšší výtěžnost [16].

Z tohoto důvodu byly vyvinuty eukaryotické expresní systémy [15,16]. Z eukaryotických buněk jsou nejčastěji využívány kvasinky *P. pastoris* a *S. cerevisiae*, hmyzí buňky, lidské embryonální ledvinné buňky (HEK, *human embryonic kidney cells*) a buňky vaječníku křečička čínského (CHO, *chinese hamster ovary cells*) [15,16]. Nevýhodou těchto systémů oproti prokaryotním je obtížnost práce, finanční zatížení a zejména pomalý růst eukaryotních buněk, z čehož plyne vyšší časová náročnost [14,16]. Zejména u savčích buněk je třeba aseptické práce s buňkami a inkubace za regulovaného přísunu kyslíku a oxidu uhličitého [14]. Naopak hlavními výhodami eukaryotních expresních systémů je získání produktu v nativní formě a zejména pak u savčích vysoká výtěžnost [14,15]. Vysoký výtěžek produktu je důležitý například pro výzkum krystalové struktury [15].

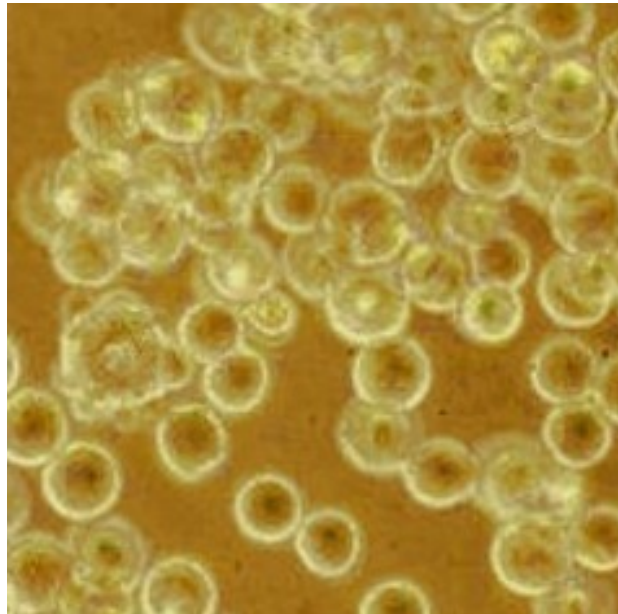
2.4 Lidské embryonální ledvinné buňky 293

Lidské embryonální ledvinné buňky 293, známé pod zkratkou HEK, je buněčná linie odvozená od lidských ledvinných buněk pěstovaných ve tkáňové kultuře [17]. Linie byla vytvořena roku 1970 Alexem Van der Ebem, který ji kultivoval a Frankem Grahamem, který provedl transformaci virové DNA adenoviru 5. Jako transfekční činidlo využil fosforečnan vápenatý, zdrojem buněk byl zdravý, potrácený plod. Číslo 293 za zkratkou je z důvodu, že tento Grahamův pokus byl 293. v řadě. Důležité je, že tyto epiteliální buňky jsou schopny provádět post-translační modifikace, čímž vznikají funkční proteiny (správné poskládání molekuly, glykosylace). Dnes existuje mnoho různých odvozených linií HEK293.

Jako první lze zmínit HEK293T buněčnou linii, která obsahuje velký tumorový T-antigen opičího viru SV40 (simian virus 40), jenž může zvýšit replikaci vektorů

nesoucích virální počátek replikace (tzv. episomální replikace plazmidu) [18,19]. Další je HEK293S GnTI⁻ buněčná linie, postrádající aktivní *N*-acetylglukosaminyltransferasu I (GnTI), čímž jsou veškeré proteiny, vyprodukované touto linií homogenně *N*-glykosylovány [20]. A dále HEK293E buněčná linie, která je transformovaná nukleárním antigenem 1 z viru Epstein-Barrové (EBNA1) [19,21].

Celkově HEK293 buněčné linie poskytují robustní a spolehlivou platformu pro expresi rozličných proteinů, včetně rozpustných forem buněčných imunoreceptorů [19]. Tyto proteiny jsou pak využitelné například pro zkoumání krystalové struktury, hybridní screening souvisejících molekul nebo biochemické testy [19]. Buňky se kultivují v suspenzi (Obr. 5) přímo v určeném kultivačním médiu doplněném o L-glutamin. Inkubovány by měly být při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře [17].



Obr. 5: Fotografie buněčné linie HEK293. Fotografie byla stažena ze stránek <http://www.ascentgene.com>.

3 CÍLE PRÁCE

- Příprava proteinu pomocí transfekce plazmidové DNA v HEK293S linii
- Purifikace připraveného proteinu pomocí chelatační chromatografie a HPLC
- Charakterizace připraveného proteinu
- Strukturní studium KACL pomocí proteinové krystalizace

4 MATERIÁL

4.1 Pomůcky a materiál

4-12% NuPAGE Bis-Tris gradient gel	<i>Invitrogen, USA</i>
Acetonitril	<i>Merck, Německo</i>
Adhezivní podložka na třepačku Sticky Stuff	<i>Infors HT, Švýcarsko</i>
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	<i>H+P Labortechnik GmbH, Německo</i>
Automatické pipety Pipetman	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Universal 320R	<i>Hettich, Německo</i>
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Cystamin	<i>Sigma, USA</i>
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Filtry Millipore Express 0,22 µm	<i>Millipore, USA</i>
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570	<i>SONY, Japonsko</i>
Hemocytometr	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Hmotnostní spektrometr Apex-Ultra	<i>Bruker Daltonics USA</i>
HPLC systém ÄKTAbasic	<i>Amersham Biosciences, Švédsko</i>
Injekční mikrostříkačka	<i>Hamilton, USA</i>
Inkubátor 18 AIC, CO ₂ pro tkáňové kultury	<i>Sanyo, Japonsko</i>
Inkubátor IR 1500	<i>LABsystem Praha, ČR</i>
Kahan Fuego SCS	<i>VERKON, ČR</i>
Kolona s fritou Econo-column	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Kolona Superdex 200 300/10 GL	<i>Amersham Biosciences, Švédsko</i>
Koncentrátory Amicon Ultra, 10 000 MWCO	<i>Millipore, USA</i>
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	<i>P-LAB, ČR</i>
Laminární box BIO 126	<i>LABOX, ČR</i>
Laminární box Clean Air Techniek B.V.	<i>PMV, Nizozemsko</i>
Lednice 225 R (4 °C)	<i>CALEX, ČR</i>
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	<i>VWR, USA</i>
Mikrokolonka MicroTrap	<i>Michrom Bioresources, USA</i>
Mikroskop inverzní AE31	<i>Intraco Micro, ČR</i>
Mrazicí box (-20 °C)	<i>Zanussi, Itálie</i>

Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	<i>Sanyo, Japonsko</i>
Nosič pro IMAC chromatografii Talon	<i>Clontech, USA</i>
pH metr 3310	<i>Jenway, UK</i>
Pipetovací nástavec Midi plus	<i>Biohit, USA</i>
Plastik pro tkáňové kultury	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Předvážky KB1200-2	<i>Kern, Německo</i>
PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit	<i>Invitrogen, USA</i>
Robot Crystal Gryphon	<i>Art Robbins Instruments, USA</i>
Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	<i>Savant, USA</i>
Skener LiDE 210	<i>Canon, Japonsko</i>
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Biokeystone, USA</i>
Souprava pro filtraci za sníženého tlaku	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Spektrofotometr UV/VIS UNICAM	<i>Beckman, USA</i>
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	<i>Schöeller, Německo</i>
Třepačka Multitron Cell	<i>Infors HT, Švýcarsko</i>
Třepačka Celltron	<i>Infors HT, Švýcarsko</i>
UV prosvěcovací lampa	<i>UltraLum, USA</i>
Vařič	<i>ETA, ČR</i>
Vodní lázeň WNE14	<i>Memmert, Německo</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>
Zdroj napětí PS 251-2	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

4.2 Chemikálie

Agar	<i>Oxoid, Anglie</i>
Agarosa	<i>Sigma, USA</i>
Akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
Ampicilin	<i>Biotika, SR</i>
APS	<i>Serva, USA</i>
Azid sodný	<i>Serva, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
BSA	<i>New England Biolabs, USA</i>

Butyrát sodný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Sigma, USA</i>
Činidlo dle Bradfordové	<i>Bio-Rad, Německo</i>
DMSO	<i>Sigma, USA</i>
DTT	<i>Serva, USA</i>
EDTA	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Ethanol 96 %	<i>Lach-Nech, ČR</i>
ExCELL293	<i>Sigma, USA</i>
F17	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
GoodView	<i>Ecoli, Slovensko</i>
IAA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
L-glutamin	<i>Sigma, USA</i>
Kit pro krystalizaci Index HT	<i>Hampton Research, USA</i>
Kit pro krystalizaci JCSG+ Suite	<i>QIAGEN, Německo</i>
Kvasničný extrakt	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
IPEI 25 kDa	<i>Polysciences, USA</i>
Pluronic F68	<i>Sigma, USA</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Standard pro agarosovou elektroforézu 1 kb	<i>New England Biolabs, USA</i>
Standard pro SDS PAGE Pink protein ladder	<i>Central European Biosystems, ČR</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
TFA	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
Tris	<i>Roth, Německo</i>
Trypanová modř	<i>Sigma, USA</i>
Trypton N1	<i>Oxoid, Anglie</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

4.3 Enzymy

Endo H _f	<i>New England Biolabs, USA</i>
---------------------	---------------------------------

4.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>Marek Ingr, Praha, ČR</i>
HEK293S GnT1 ⁻	<i>CRL-3022, ATCC, USA</i>

4.5 Vektory

pTT28

Y. Durocher, Montreal, Kanada

4.6 Plazmidové DNA

pTT28_K1

Barbora Mikulová, Praha, ČR

4.7 Roztoky a média

4.7.1 Pufry a jiné roztoky

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

Antibiotika: směs streptomycinu a penicilinu

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

EtMorpff pufr: 50mM 4-ethylmorfolin acetát, 0,2mM cystamin, 10% AcN. pH 8,2

LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4; použitá
koncentrace antibiotik: ampicilin 100 µg/ml

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE: 35% ethanol, 10% kyselina octová

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

Pufr pro digesci trypsinem: 50mM NH₄Ac, 1 µM cystamin, 10% AcN, pH 7,0

Pufr pro gelovou chromatografií: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃,
pH 7,5

Roztok IPEI: 8 mg/ml IPEI v PBS-TK, pH 7,0

Roztok mobilní fáze A: 0,2% FA; 2% IPA; 2% AcN v H₂O

Roztok mobilní fáze B: 0,16% FA; 10% IPA; 5% H₂O v AcN

TAE pufr (1x koncentrovaný): 40mM Tris, 20mM CH₃COOH, 1mM EDTA, pH 8,3

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

Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu: 30% glycerol, 1% bromfenolová modř,
70% TE pufr

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

4.7.2 PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit

Roztok R3: 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa A, pH 8,0

Roztok L7: 0,2M NaOH, 1% SDS

Roztok N3: 3,1M octan draselný, pH 5,5

Roztok EQ1: 0,1M octan sodný, 0,6M NaCl, 0,15% Triton X-100, pH 5,0

Roztok W8: 0,1M octan sodný, 825mM NaCl, pH 5,0

Roztok E4: 100mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, 1,25M NaCl, pH 8,5

4.7.3 Kultivační média

ExCELL293 médium: zakoupeno hotové médium (*Sigma*, USA), před použitím přidán L-glutamin (výsledná koncentrace 4 mM)

F17 médium: zakoupeno hotové médium (*Gibco Invitrogen*, USA), před použitím přidán L-glutamin (výsledná koncentrace 4 mM) a Pluronic F-68 (výsledná koncentrace 0,1 %)

5 METODY

5.1 Velkoobjemová příprava plazmidové DNA

5.1.1 Transformace a kultivace bakteriálních kultur

Alikvot bakteriálních buněk *Escherichia coli* DH5 α byl ponechán k volnému rozmrznutí na ledu. K suspenzi buněk o objemu 200 μ l byl přidán 1 μ l plazmidu pTT28_K1 ($c = 2,78 \mu\text{g/ml}$, $A_{260}/A_{280} = 1,62$). V 1,5ml mikrozkušavce byla směs ponechána 30 min inkubovat na ledu. Poté byla mikrozkušavka ponořena do vodní lázně předehřáté na 42 °C přesně na 1 min a následně umístěna zpět na led. Ke směsi v mikrozkušavce byl přidán 1 ml LB média předehřátého na 37 °C, zkušavka byla promíchána a inkubována 1 hod při 37 °C v inkubátoru bez třepání. Poté bylo suspenzí ze zkušavky inokulováno 500 ml LB média s ampicilinem ve 2l Erlenmeyerově baňce. Láhev byla umístěna na třepačku, kde byla ponechána 16 hod při 37 °C a 220 ot/min.

5.1.2 Izolace plazmidové DNA [22]

Po inkubaci byl obsah baňek centrifugován v 250ml plastových kyvetách po dobu 30 minut při 4500 \times g, 4 °C. Supernatant byl slit, pelet resuspendován ve 40 ml TES pufru a suspenze byla rozdělena na 2 \times 20 ml do 30ml polypropylenových zkumavek typu Oak Ridge. Obsah zkumavek byl centrifugován 10 minut při 14 000 \times g, 4 °C. K izolaci plazmidové DNA byla použita komerční souprava PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit. Peleta v 30ml polypropylenové zkumavce byla resuspendována v 9 ml R3 pufru. Následně bylo přidáno 9 ml L7 pufru a kyveta byla promíchána několikanásobným otočením. Po 5 ti minutách inkubace bylo ke směsi přidáno 9 ml precipitačního pufru N3 a směs byla opět promíchána několikanásobným otočením. Směs ve zkumavkách byla 10 min centrifugována při 14 000 \times g, 20 °C. Během centrifugace byla připravena komerční kolona a kolona s fritou naplněná sorbentem (stejný jako v komerční koloně). Ty byly ekvilibrovány 30 ml ekvilibračního pufru EQ1. Na kolony byl nalit supernatant z polypropylenových zkumavek, následovalo promytí 2 \times 30 ml promývacího pufru W8 a nakonec eluce 15 ml elučního pufru E4 do 30ml čisté zkumavky. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu, směs byla promíchána a centrifugována při 20 000 \times g, 30 min, 0 °C. Supernatant byl slit, k peletě bylo přidáno 5 ml 70% (v/v) ethanolu a obsah zkumavky byl centrifugován při 15300 \times g, 5 min, 0 °C. Supernatant byl odstraněn, peleta byla vysušena ve vakuové odparce a resuspendována v 1 ml sterilní dH₂O.

5.1.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Čistota a koncentrace plazmidové DNA byla zjištěna spektrofotometricky. Plazmidová DNA byla zředěna 300× v dH₂O a byla změřena absorbance roztoku při 260 a 280 nm. Koncentrace byla vypočítána dle empirického vztahu, kdy má roztok DNA při absorbanci $A_{260} = 1,0$ koncentraci 50 µg/ml. Čistota byla určena z poměru A_{260}/A_{280} , který se u čisté DNA rovná přibližně 1,8.

5.1.4 Agarosová elektroforéza [23]

Gel pro agarosovou elektroforézu byl připraven z 0,65 g agarosy v 65 ml pufru TAE a rozpuštěn povařením v mikrovlnné troubě. Ke zchlazenému roztoku (cca 50 °C) byly přidány 3 µl GoodView (fluorescenční DNA indikátor). Gel byl nalit do vaničky aparatury a byl ponechán zatuhnout společně s hřebenem. Po zatuhnutí byl zalit 200 ml dH₂O. K elektrodám byl nalit TAE pufr (65 a 180 ml). Do jamek byly napipetovány vzorky obsahující jednu desetinu objemu vzorkového pufru pro agarosovou elektroforézu. Do další jamky byl pipetován standard. Elektroforéza probíhala po dobu 15 min při 180 V. K vizualizaci DNA byla využita fluorescence sledovaná pod UV lampou při 312 nm.

5.2 Rekombinantní exprese proteinů v buněčné linii HEK293S

5.2.1 Rozmrazování linie HEK293S

Alikvot zmražené buněčné suspenze HEK293S byl rozmražen v 37 °C vodní lázni a přenesen do 10 ml kultivačního média ExCELL293 v 15ml sterilní plastové zkumavce. Ta byla centrifugována 5 min při 160 × g, 25 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta buněk resuspendována v 10 ml směsi kultivačních médií ExCELL293 a F17 (1:1). Suspenze byla přenesena na 10cm Petriho misku. Petriho miska byla umístěna do inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂.

5.2.2 Kultivace linie HEK293S

Po několikadenní kultivaci na Petriho misce byla hustota buněk v suspenzi cca 2.10⁶ ml⁻¹. Suspenze byla odebrána 10ml plastovou pipetou pomocí pipetovacího nástavce a smíchána se vhodným množstvím směsi médií ExCELL293/F17 (1:1) v hranaté láhvi opatřené víčkem s prodyšným filtrem. Následně byly buňky kultivovány v CO₂ inkubátoru na orbitální třepače Celltron nebo v inkubované CO₂ orbitální

třepače Multitron Cell; obě třepačky byly opatřeny adhezivní podložkou Sticky Stuff. Frekvence otáček u třepaček se upravovala v závislosti na tom, jaké množství suspenze buněk v médiu se třepalo a jaké láhve byly použity. Subkultivace byla prováděna vždy po 3 - 4 dnech kultivace, aby se hustota buněk v láhvi pohybovala mezi $0,2$ a $4 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Buňky byly kultivovány v celkovém objemu 30 ml ve 100ml lahvích nebo v objemu 75 ml ve 250ml lahvích, protože optimální objem buněčné suspenze je 30 – 40 % celkového objemu láhve. Pro provedení velkoobjemové produkce byly buňky kultivovány ve 400 ml směsi médií v 11 láhvi. Po dosažení potřebné hustoty byla provedena transfekce plazmidové DNA do buněk.

5.2.3 Počítání buněčné hustoty

Ke zjištění buněčné hustoty byl použit hemocytometr a mikroskop. Nejprve bylo automatickou pipetou odebráno 20 μl promíchané buněčné suspenze z láhve, v mikroskopické zkumavce smícháno s 20 μl 0,4% trypanové modři v PBS-TK a směs promíchána. Po 5min inkubaci bylo pipetou odebráno 20 μl a nanášeno na hemocytometr. Pod mikroskopem byly pomocí čtverců spočítány živé a mrtvé buňky. Pro zjištění buněčné hustoty byl celkový počet buněk v oblasti čtverců na hemocytometru podělen počtem čtverců, vynásoben faktorem ředění (2) a faktorem $1 \cdot 10^4$. Buněčná hustota poté odpovídala jednotce 10^6 ml^{-1} . Ke zjištění viability (procento živých buněk) se počet živých buněk podělil součtem živých a mrtvých buněk a vynásobil stem.

5.2.4 Produkce proteinů v HEK293S linii s transfekční směsí [15]

Po dosažení předpokládané hustoty suspenze buněk v 11 čtverhranné láhvi byly buňky spočítány pomocí hemocytometru (viz. 5.2.3). Poté bylo odebráno takové množství suspenze, které obsahovalo celkem $400 \cdot 10^6$ buněk. Potřebné množství suspenze bylo centrifugováno v 50ml sterilních plastových zkumavkách po dobu 5 min, $200 \times g$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant byl slit a buňky resuspendovány v 16 ml média ExCELL293, čímž vznikla buněčná suspenze o hustotě $25 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Pro transfekci buněčné linie HEK293S byl použit poměr 1 μg plazmidu na $1 \cdot 10^6$ buněk. K transfekci byl použit plazmid pTT28_K1, který předem připravila Barbora Mikulová ($c = 2,78 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $A_{260}/A_{280} = 1,62$). Jako transfekční činidlo byl použit lineární polyethylenimin 25 kDa. Hmotnostní poměr DNA:IPEI byl 1:4. Příprava transfekční směsi spočívala ve

zředění 144 μl roztoku plazmidu ve 3,66 ml PBS-TK a tento roztok byl pomocí injekční stříkačky a 0,22 μm filtru sterilizován. K plazmidu bylo přidáno 200 μl IPEI ($c = 8 \text{ mg/ml}$) tak, aby byl zachován již zmíněný poměr DNA:IPEI. Transfekční směs po přípravě měla objem cca 4 ml. Po protřepání byla transfekční směs ponechána 5 min inkubovat. Během inkubace se ve směsi vytvořil komplex DNA:IPEI (zákal). Po inkubaci byla transfekční směs přidána k 16 ml suspenze buněk, čímž byla hustota zředěna na $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Suspenze ve 100ml čtverhranné sterilní láhvi s víčkem opatřeným filtrem byla ponechána 4 hod v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ za stálého třepání. Po 4 hod byla suspenze přenesena do 1l čtverhranné láhve a doplněna čerstvým médiem ExCELL293 na 400 ml a hustotu $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Dále byly do suspenze přidány 4 ml směsi antibiotik streptomycinu a penicilinu. K suspenzi bylo po 24 hod přidáno 10 ml 20% hydrolyzátu Trypton N1 (celková koncentrace v médiu 0,5 %).

Při jedné této transfekci byl plazmid pTT28_K1 v PBS-TK přidán nedopatřením přímo do buněčné suspenze s následným přidáním IPEI. Nedošlo tedy k přípravě předem inkubované transfekční směsi. Z důvodu vysoké výtěžnosti byl tento postup využit při dalších transfekcích.

5.2.5 Produkce proteinů v HEK293S linii bez transfekční směsi

Vysoko-hustotní transfekce HEK293S linie bez přípravy transfekční směsi probíhala podle téměř stejného postupu jako v části 5.2.4. Pro transfekci bylo použito celkem $1250 \cdot 10^6$ buněk. Buňky byly stejným způsobem centrifugovány a resuspendovány v 56 ml média ExCELL293. K této transfekci byla použita plazmidová DNA pTT28_K1(b) ($c = 1,44 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $A_{260}/A_{280} = 1,33$; viz 5.1.2 a 6.1). Roztok plazmidu o objemu 860 μl byl zředěn 5,17 ml média ExCELL293, pomocí 0,22 μm filtru byla směs sterilizována a přenesena přímo do láhve s buněčnou suspenzí. K buňkám s plazmidem bylo přidáno 469 μl IPEI ($c = 8 \text{ mg/ml}$) v poměru DNA:IPEI = 1:4. Vzniklá suspenze o objemu 62,5 ml a hustotě $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ byla ve 250 ml čtverhranné láhvi inkubována 4 hod, další postup byl totožný s částí 5.2.4. pouze s tím rozdílem, že tato směs byla navíc doplněna o 5mM butyrát sodný.

5.3 Purifikace proteinů

5.3.1 Filtrace kultury

Po 5 - 7 dnech průběhu produkce, kdy viabilita buněk klesla pod 70%, byla

produkce ukončena. Médium bylo centrifugováno ve 250ml plastových kyvetách 60 min při $4500 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byl supernatant filtrován za sníženého tlaku přes filtr Millipore Express o velikosti pórů $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Zfiltrované médium bylo přeneseno do čistých plastových lahví a zmrazeno v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo ihned zpracováno.

5.3.2 Chelatační chromatografie

Zfiltrované médium bylo přeneseno do 2l Erlenmeyerovy baňky a doplněno pufrům PBS v objemovém poměru 1:1. K této směsi byl přidán nosič pro chelatační chromatografii TALON nabitý kobaltnatými ionty. Množství nosiče na objem jedné produkce o objemu 400 ml činilo 2 – 3 ml. Suspenze byla třepána 30 min při 160 ot/min, $16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla suspenze přenesena na kolonu Econo s fritou. Po zachycení veškerého nosiče v koloně byla kolona promyta PBS pufrům. Po promytí následovala eluce pomocí pufru PBS s 250mM imidazolem. Eluce byla provedena 4×4 ml tohoto pufru.

5.3.3 Zakoncentrování proteinu

Eluované frakce byly spojeny a zakoncentrovány pomocí koncentrátorů Amicon Ultra 10000, které přes membránu nepropustí molekuly o $M_r > 10000$. Koncentrátory s eluátem byly centrifugovány při $4500 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na objem $< 200\text{ }\mu\text{l}$. Mezi jednotlivými doplňování koncentrátoru eluátem byla sledována frakce prošlá přes membránu metodou Bradfordové, zda membrána není poškozená a proteiny nepropouští. Koncentrátory byly po použití vždy doplněny dH_2O , aby membrána nevyschla. Po zakoncentrování byl vzorek uchován v mikrozkuhavce v lednici ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) do druhého dne, kdy byl dále zpracován.

5.3.4 Gelová permeační chromatografie

HPLC systém byl nejprve promyt dH_2O . Na HPLC systém byla napojena kolona Superdex 200 300/10 GL o tlakovém limitu 1,5 MPa, uchovávaná v 20% ethanolu. Celý systém byl promyt opět dH_2O , 1M NaOH a nakonec pufrům pro gelovou chromatografii při průtoku $0,5\text{ ml/min}$. Pomocí injekční stříkačky opatřené jehlou byla pufrům promyta dávkovací smyčka a následoval nástřik koncentrovaného vzorku na kolonu. Během zhruba 50min programu byly jímány frakce po $0,5 - 1\text{ ml}$ do mikrozkuhovek. Po skončení chromatografie byla kolona promyta pufrům, dH_2O a 20% ethanolu. Frakce

v mikrozkuvkách byly uchovávány při 4 °C.

5.4 Charakterizace proteinu

5.4.1 SDS elektroforéza [24]

Nejprve byla sestavena souprava pro přípravu gelu. Byl použit dělicí 15% polyakrylamidový gel. Ten byl připraven z 2,7 ml dH₂O, 6 ml 30% AA, 3 ml 1,5M Tris pH 8,8, 120 µl 10% SDS, 6 µl TEMED a 120 µl APS. Zarovnávací gel byl připraven z 2,1 ml dH₂O, 0,75 ml 30% AA, 0,375 ml 1,5M Tris pH 6,8, 30 µl 10% SDS, 4 µl TEMED, 120 µl neredukujícího 1× koncentrovaného vzorkového pufru a 30 µl APS. Tato množství roztoků jsou dostatečná pro přípravu tří gelů. Dělicí gel byl pomocí automatické pipety nanesen mezi elektroforetická skla a převrstven dH₂O, po ztuhnutí gelu byla voda slita a byl přidán zarovnávací gel, do kterého byl zasunut hřeben pro vytvoření otvorů pro vzorky. Neredukované vzorky byly připravovány smícháním 10 µl vzorku s 10 µl 2× konc. neredukujícího vzorkového pufru. Pro přípravu redukováného vzorku byl použit 2× konc. redukující vzorkový pufr (neredukující se 100mM DTT). Vzorky byly 5 min povařeny a krátce centrifugovány. Na gel bylo nanášeno 10 µl takto připravených vzorků vedle 5 µl standardu Pink Protein Ladder (11 proteinů o Mr = 10-175 kDa). Elektroforéza probíhala 60 min při 200 V. Poté byly gely barveny 30 min v barvicí lázni a následně odbarveny.

5.4.2 Stanovení koncentrace [24]

Po zjištění čistoty a molekulové hmotnosti z elektroforézy byly stejné frakce spojeny a zakoncentrovány na 0,5 ml (viz 5.3.3). Koncentrace proteinu byla orientačně stanovena pomocí metody dle Bradfordové. Stanovení bylo provedeno na 96-ti jamkové destičce, kdy byla vytvořena kalibrační řada z roztoků BSA v koncentračním rozmezí 0 - 1 mg/ml. Ke standardním vzorkům BSA o objemu 5 µl bylo vždy přidáno 200 µl činidla dle Bradfordové, směs byla automatickou pipetou promíchána a ponechána 5 min inkubovat. K 5 µl vzorku bylo přidáno stejné množství činidla dle Bradfordové, jako ke standardním vzorkům, směs byla též promíchána a ponechána inkubaci. Po inkubaci byla vizuálním porovnáním odhadnuta koncentrace vzorku podle kalibrační řady.

5.5 Deglykosylace proteinu

Následovala deglykosylace proteinu v roztoku o objemu 0,5 ml. K roztoku v mikroskopické kádince bylo přidáno 50 μ l rozmraženého 10 \times konc. reakčního pufru Endo H_f. Dále bylo přidáno 0,5 μ l enzymu Endo H_f. Směs v mikroskopické kádince byla ponechána přes noc inkubovat za mírného míchání za laboratorní teploty. Druhý den byla mikroskopická kádinka přenesena do inkubátoru a zde byla ponechána inkubovat při 37 °C po dobu 2 hodin. Poté bylo odebráno ze vzorku 10 μ l k provedení SDS elektroforézy a mikroskopická kádinka byla ponechána další 2 hodiny v inkubátoru.

5.6 Hmotnostní spektrometrie - mapování disulfidických můstků

Analýza cysteinů zapojených do disulfidických můstků v připraveném proteinu byla provedena měřením hmotnosti (m/z) peptidových štěpů z tohoto proteinu v oxidativním prostředí. Vlastní práci provedl Mgr. Zdeněk Kukačka (*Laboratoř charakterizace molekulární struktury*, MBÚ AV ČR) dle následujícího protokolu.

5.6.1 Gradientová SDS elektroforéza v oxidativním prostředí

Do mikroskopické kádinky bylo pipetováno 10 μ l proteinu v pufru pro gelovou chromatografii a 2 μ l 120mM alkylačního roztoku IAA. Vzorky byly ponechány 20 min inkubovat za tmy a laboratorní teploty. Ke vzorku do mikroskopické kádinky poté byly přidány 4 μ l 5 \times konc. neredukujícího vzorkového pufru a 2 μ l 1mM roztoku cystaminu. Vzorek byl po 1 min inkubace při 90 °C centrifugován a nanesen na komerční gradientový polyakrylamidový gel (4-12% NuPAGE Bis-Tris gradient gel). Elektroforéza probíhala po dobu 40 min, při napětí 200 V. Poté se gel barvil přibližně půl hodiny v barvicí lázni a následně byl zcela odbarven odbarvovacím roztokem. Proužek proteinu byl z gelu vyříznut a rozřezán na malé kostičky. Kostičky gelu byly v mikroskopické kádince doplněny o EtMorf pufr o pH 8,2. Po sonikaci byl supernatant odstraněn a tento postup se opakoval do odbarvení kousků gelu. Následoval oplach roztokem cystaminu v dH₂O a sonikace, oplach roztokem cystaminu v AcN a sonikace. Poslední oplach byl opět v EtMorf pufru o pH 8,2, následně sonikace a odstranění supernatantu.

5.6.2 Deglykosylace denaturovaného proteinu

Deglykosylace byla provedena pomocí enzymu Endo H_f. Ke kouskům gelu bylo pipetováno 8 μ l dH₂O, 1 μ l 10 \times konc. pufru Endo H_f a 1 μ l enzymu Endo H_f. Po 1 hod

inkubace ve 37 °C byl odstraněn supernatant a kousky gelu byly oplachovány stejným způsobem jako v předešlém odstavci. Po opláchnutí byly vysušeny na vakuové odparce.

5.6.3 Digesce trypsinem

S gelem obsahujícím protein byla zahájena digesce trypsinem (štěpí polypeptidový řetězec na C-konci Lys a Arg). Zásobní roztok trypsinu byl 50× zředěn pufrům pro digesci trypsinem. Pufr byl přidán v takovém množství, aby všechny kousky gelu byly ponořené. Následně byla provedena inkubace ve vodní lázni předehřáté na 37 °C, 8 - 12 hodin.

5.6.4 Extrakce peptidů

Supernatant byl odebrán do čisté mikrozkušavky. Gel byl sonikován 5 min v 50 µl 80% AcN, 0,1% TFA a supernatant přidán do stejné zkumavky jako předchozí. Kousky gelu byly uschovány při -80 °C. Odebrané supernatanty byly vysušeny na vakuové rotační odparce. K sušině bylo přidáno 100 µl 0,1% TFA a sonikováno 15 min.

5.6.5 Nabohacení a odsolení peptidů

K nabohacení a odsolení peptidů byla použita komerční kolonka Micro Trap. Ta byla promyta 500 µl 80% AcN, 0,1% TFA, poté byla promyta 300 µl 0,1% TFA a následně byl nanesen vzorek (100 µl 0,1% TFA peptidového extraktu). Kolonka byla dvakrát promyta 500 µl 0,1% TFA. Nabohacená a odsolená peptidová frakce byla eluována 50 µl 80% AcN, 0,1% TFA do čisté mikrozkušavky. Eluát byl v mikrozkušavce vysušen na rotační vakuové odparce a uchován při -80°C až do samotného MS měření.

5.6.6 Analýza na hmotnostním spektrometru [25]

Vlastní analýza byla provedena Mgr. Zdeňkem Kukačkou. Připravené vzorky (vzorek + 20 µl dH₂O a 30 µl 5% AcN, 1% kys. octové) ve vialkách byly umístěny do vzorkovače napojeného k systému LC-MS. Kapalinová chromatografie (µHPLC systém Agilent 1200) s kolonou Magic C18 probíhala s roztoky mobilní fáze o různém složení (roztok A, roztok B). Objem nástřiku na kolonu činil 5 µl. Separované peptidy byly nabity pomocí ESI ionizace a detekovány pomocí FT-ICR analyzátoru hmotnostního spektrometru Apex-Ultra. Naměřené hodnoty m/z získaných peptidů byly dále

analyzovány pomocí speciálních programů DataAnalysis 4.0 a MSLinks pro sledování modifikací jako jsou disulfidické můstky nebo *N*-glykosylace.

5.7 Krystalizace

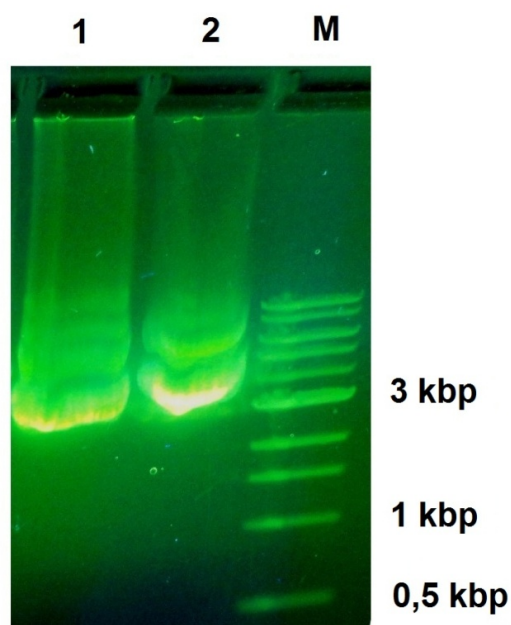
Krystalizace proteinu byla prováděna v *Laboratoři strukturní biologie*, BTÚ AV ČR, pod dohledem Mgr. Jana Bláhy a Mgr. Jakuba Ptáčka. Pomocí zde dostupného pipetovacího robota Crystal Gryphon byly prováděny širokospektré krystalizační experimenty metodou difúze par sedící kapky nad rezervoárem.

Na 96-ti jamkové krystalizační destičky Intelli-plate 96 bylo nejprve robotem pipetováno 80 μ l daného roztoku srážedla z komerční sady pro hledání vhodných krystalizačních podmínek. Sedící kapka byla vytvořena v prostoru nad rezervoárem pipetováním 150 nl roztoku srážedla a 150 nl roztoku proteinu. Destička byla přelepena krycí folií, která bránila nekontrolovanému vysychání krystalizačních experimentů a zároveň oddělila 96 krystalizačních experimentů na destičce od sebe. Krystalizační experimenty probíhaly při 8 °C a jejich vývoj byl sledován pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem a digitální kamerou, vždy jednou za 7 dní.

6 VÝSLEDKY

6.1 Příprava zásobního množství plazmidu

Zásobní množství plazmidu pTT28_K1 bylo připraveno dle postupu uvedeného v kapitole 5.1.2. Příprava plazmidu probíhala paralelně v dvojím provedení. Nejprve byly provedeny dvě transformace plazmidu pTT28_K1 do buněčné suspenze *E. coli* DH5 α tepelným šokem. Transformovanými bakteriemi bylo následně inokulováno 2 \times 500 ml LB média v Erlenmeyerových baňkách. Po 16-ti hodinách kultivace byly kultury sklizeny a následovala izolace plazmidové DNA, během níž byla porovnána účinnost komerčně dodávané kolony (a) a kolony s fritou naplněnou volným sorbentem (b). Izolované plazmidy byly označeny jako pTT28_K1(a) a pTT28_K1(b). Na Obr. 6 je záznam agarosové elektroforézy, kde je zkontrolována čistota a celistvost plazmidů.



Obr. 6: Agarosová elektroforéza plazmidů pTT28_K1(a) a pTT28_K1(b). V dráze M je DNA standard (viz 5.1.4), v dráze 1 je plazmid pTT28_K1(a) a v dráze 2 pTT28_K1(b), připravené s použitím komerční resp. volně plněné kolony.

V Tab. 1, str. 38 je uvedena vypočítaná koncentrace a čistota izolovaných plazmidů (měření a výpočet viz 5.1.3). Čistota plazmidů byla nižší než optimální hodnota 1,8 - 2,0, která odpovídá čisté DNA. Pokud je čistota plazmidu nižší než 1,8, jedná se o kontaminaci bílkovinami z důvodu vyšší absorpance při 280 nm, čímž klesá poměr absorpací. Pokud je poměr vyšší než 2,0, plazmid je kontaminován RNA a stoupá absorpance při 260 nm.

Tab. 1: Koncentrace a čistoty plazmidů měřených spektrofotometricky.

plazmid	koncentrace [mg/ml]	čistota (A_{260}/A_{280})
pTT28_K1(a)	1,53	1,55
pTT28_K1(b)	1,44	1,33

6.2 Produkce proteinu KACL v linii HEK293S

Transfekce plazmidu do buněk HEK293S GnTI⁻ byla provedena dvěma způsoby lišícími se ve způsobu smísení plazmidu s transfekčním činidlem. První transfekce byla provedena v médiu obsahujícím $400 \cdot 10^6$ buněk s transfekční směsí obsahující plazmid, PBS pufr a IPEI, která byla předem smíchána, 5 min inkubována a poté přidána k buněčné suspenzi. Tato produkce byla ukončena po 6-ti dnech inkubace za třepání a následně zpracovávána pod názvem „produkce X”. Výtěžek z této produkce byl velmi nízký na to, aby s ním bylo možno provést následné pokusy. Další transfekce probíhala za stejných podmínek, nedopatřením však došlo k přímému přidání plazmidové DNA do suspenze buněk a následnému přidání IPEI, nikoliv inkubované transfekční směsi. Po purifikaci bylo zjištěno, že výtěžek po tomto způsobu transfekce je mnohem vyšší, než u předchozí produkce. Tato produkce byla zpracována pod názvem „produkce A”. Následně byl tento způsob transfekce využit pro další produkci. Třetí transfekce probíhala v médiu o obsahu $1250 \cdot 10^6$ buněk. Transfekce proběhla tzv. přímým přidáním - plazmid byl zfiltrován přímo do média s buňkami a transfekční činidlo IPEI bylo přidáno ihned poté, neproběhla tedy žádná předinkubace DNA s IPEI. Produkce probíhala po 7 dní za stejných podmínek jako v předchozím případě. Během následných zpracování byla nazývána „produkce B”.

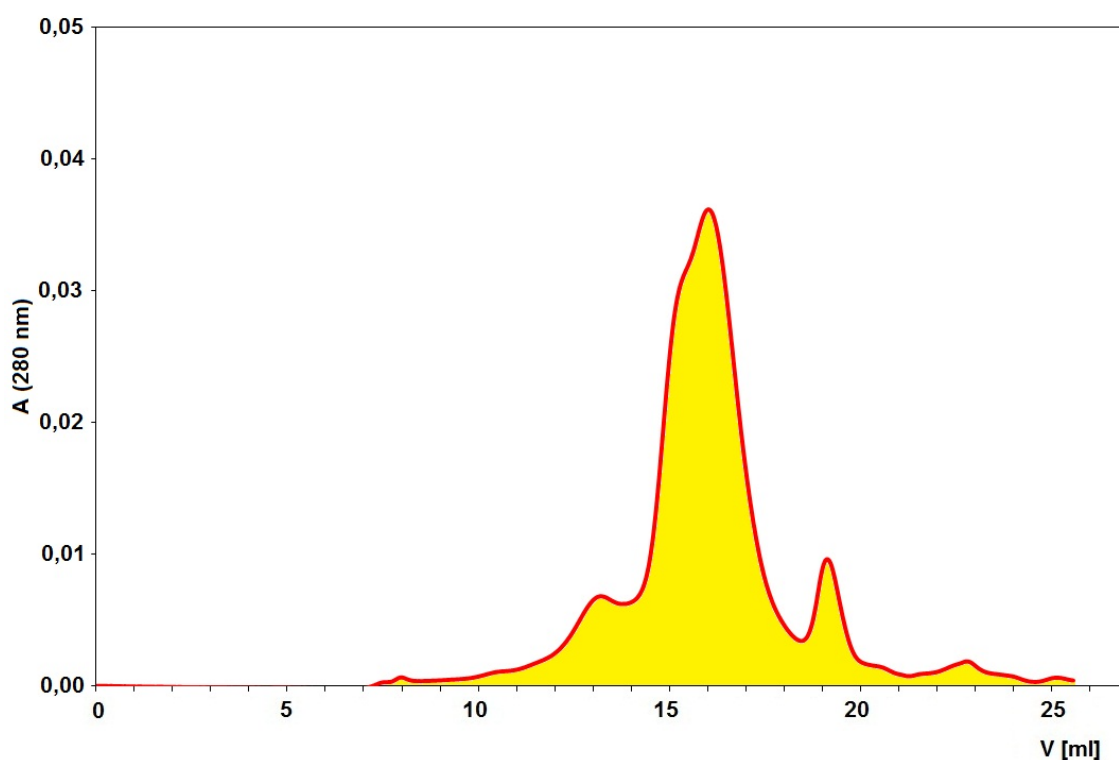
6.3 Purifikace proteinu KACL

Po ukončení produkce bylo médium centrifugací a filtrací zbaveno buněk a byla s ním provedena chelatační chromatografie. Nejprve byl k danému objemu média přidán stejný objem pufru PBS a 2 - 3 ml nosiče TALON. Ve 2l baňkách byla směs 30 min mírně promíchávána na třepačce. Během třepání se volný protein reverzibilně navázal na nosič. Principem metody je interakce kobaltnatých iontů pevně navázaných na nosiči, na které se proteiny mohou vázat pomocí tzv. histidinové kotvy, která je v případě konstruktu K1 proteinu KACL tvořena osmi histidiny na C-konci proteinu. Jako ekvilibrační a promývací pufr byl použit PBS, k eluci byl použit PBS s 250mM

imidazolem. Jímané frakce byly spojeny a zakoncentrovány na objem 150 - 200 μ l. Zakoncentrovaný vzorek byl aplikován v HPLC systému na kolonu Superdex 200 300/10 GL. Chromatografie byla monitorována spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Následně byla s posbíranými frakcemi provedena SDS elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu.

6.3.1 Zpracování vzorku z produkce X

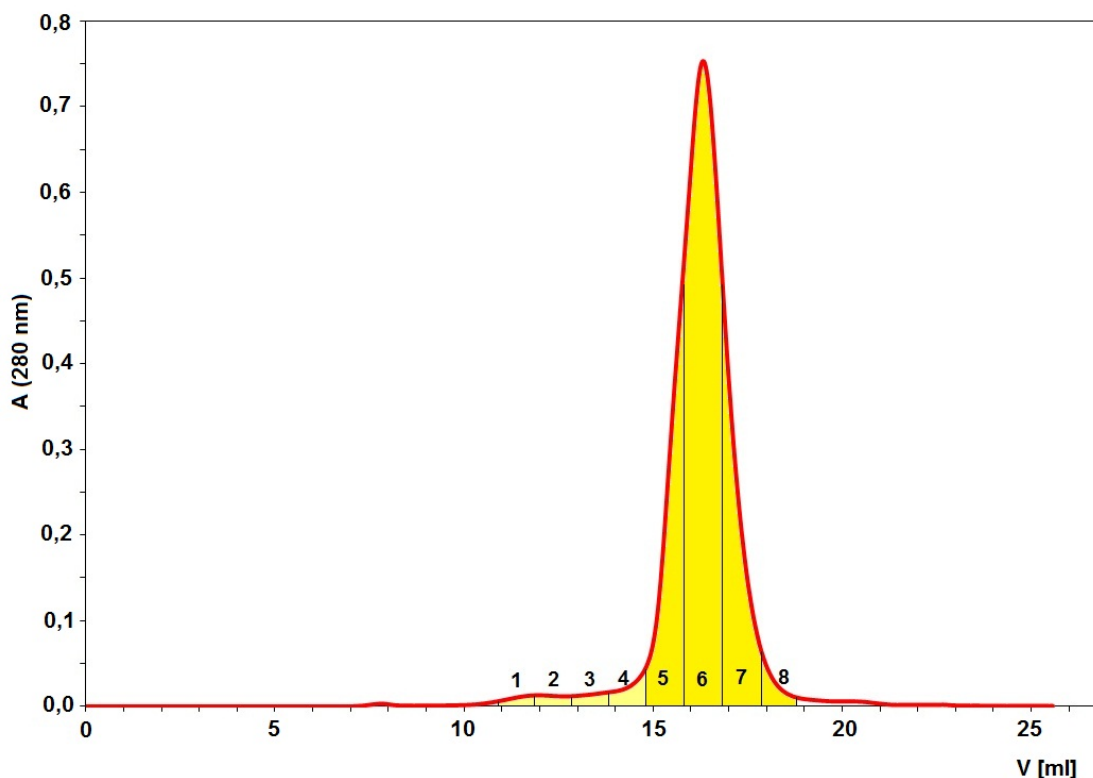
Metodou gelové permeační chromatografie bylo zjištěno, že vzorek z produkce X obsahuje zanedbatelné množství proteinu, což naznačuje, že transfekce nebyla příliš efektivní (obr. 7). Z retenčního objemu píku ve srovnání se známým retenčním časem KACL, který se pohybuje kolem 16 ml lze uvažovat, že se pravděpodobně jedná o kýžený rekombinantní receptor.



Obr. 7: Chromatogram purifikace proteinu KACL z produkce X. Záznam z gelové permeační chromatografie proteinu KACL produkovaného v HEK293S linii na koloně Superdex 200 300/10 GL. Červená křivka značí průběh měření absorbance při 280 nm. Během měření nebyly jímány frakce z důvodu nízké výtěžnosti.

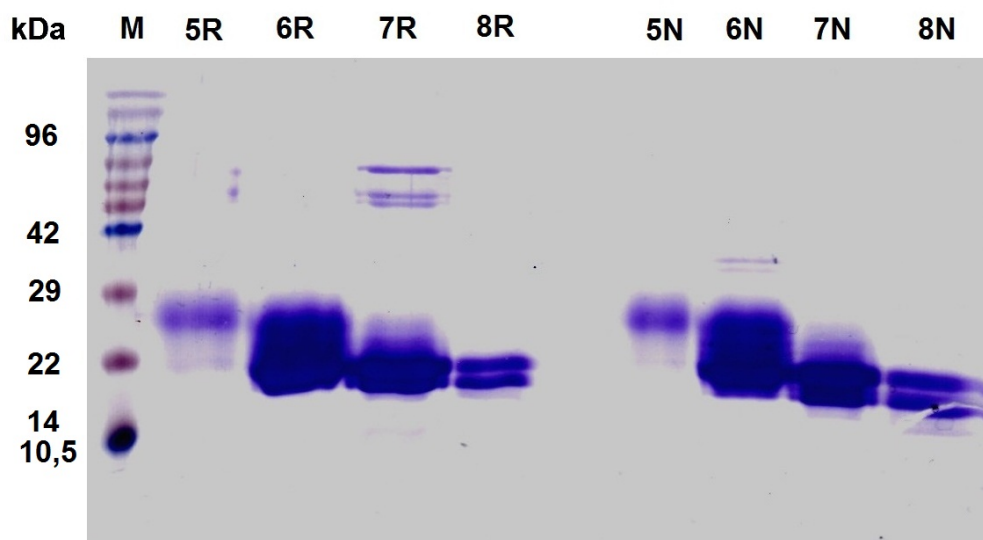
6.3.2 Zpracování vzorku z produkce A

Při provedení gelové permeační chromatografie se vzorkem z produkce A byly sbírány frakce po 1 ml do mikrozkušavek, celkem bylo jímáno 8 frakcí. Z chromatogramu (Obr. 8) je vidět, že výtěžek proteinu zachycený během chelatační chromatografie je oproti produkci X (obr. 7, str. 39) vysoký a poměrně čistý. Po porovnání retenčních objemů (viz. 6.3.1) lze též uvažovat, že se jedná o rekombinantní receptor.



Obr. 8: Chromatogram purifikace proteinu KACL z produkce A. Záznam z gelové permeační chromatografie proteinu KACL produkovaného v HEK293S linii na koloně Superdex 200 300/10 GL. Červená křivka značí průběh měření absorbance při 280 nm. Žlutě vybarvené oblasti představují posbírané frakce.

Následně byla provedena SDS elektroforéza (Obr. 9, str. 41; viz 5.4.1) s frakcemi 5_A, 6_A, 7_A, 8_A v redukujícím a neredukujícím prostředí. Pomocí standardu byla odhadnuta velikost proteinu přibližně na 20 kDa. Teoretická molekulová hmotnost konstruktu K1 je okolo 16,5 kDa. Z tohoto výsledku lze usoudit, že jednotlivé frakce mohou obsahovat protein KACL, který je přítomen v různých glykoformách a netvoří kovalentní oligomery spojené disulfidickými můstky. Jedna molekula KACL obsahuje tři potencionální *N*-glykosylační místa (Obr. 4, str. 19).

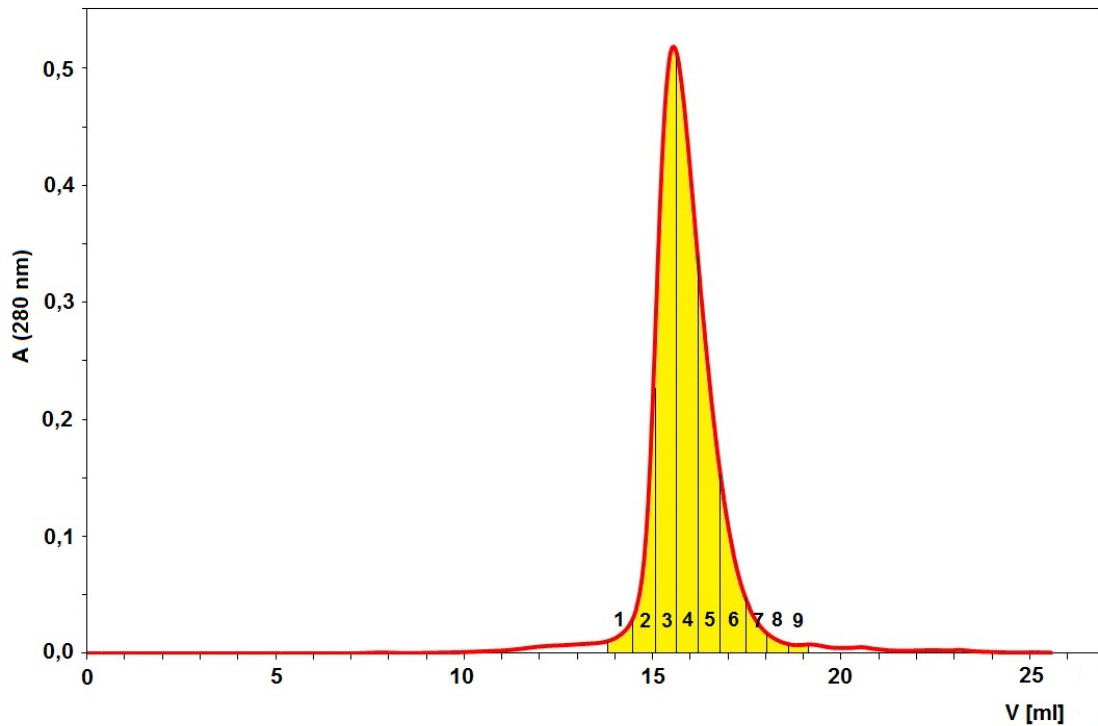


Obr. 9: 15% SDS elektroforéza frakcí GC z produkce A. Fotografie elektroforetické analýzy frakcí 5_A - 8_A z gelové permeační chromatografie produkce A. Vzorky jsou popsány čísly dané frakce, podle R a N rozděleny na redukované a neredukované. M - proteinový standard.

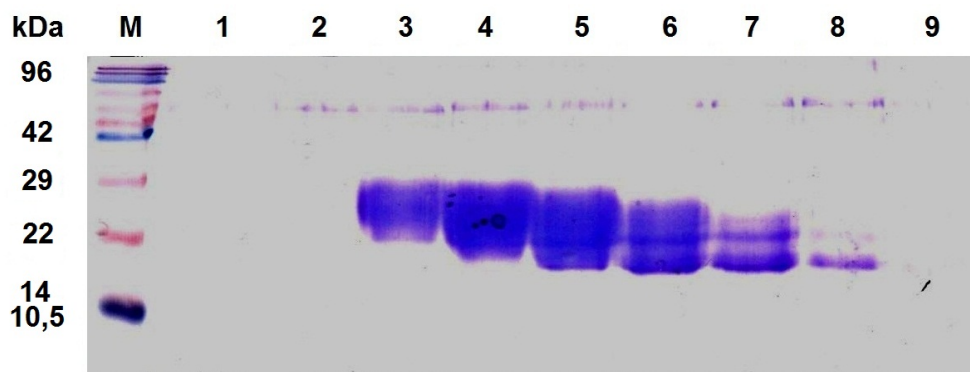
6.3.3 Zpracování vzorku z produkce B

Chromatografické zpracování vzorku z produkce B probíhalo podobně jako u vzorku z produkce A. Celkově bylo posbíráno 9 frakcí po 0,5 ml. V případě tohoto měření je z chromatogramu (Obr. 10, str. 42) podle retenčního objemu zřejmé, že se pravděpodobně také jedná o konstrukt KACL vysoké čistoty.

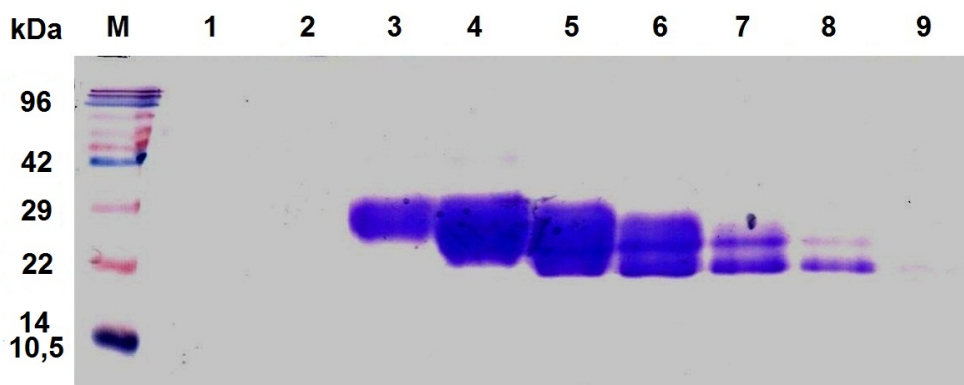
S frakcemi 1_B - 9_B byla provedena SDS-PAGE v redukujícím (Obr. 11, str. 42) a neredukujícím (Obr. 12, str. 43) prostředí. Pomocí standardu byla v obou gelech odhadnuta velikost proteinu na 19 - 20 kDa. Z analýzy je patrné, že frakce 3_B - 8_B obsahují monomerní protein KACL opět v různě glykosylovaných formách.



Obr. 10: Chromatogram purifikace proteinu KACL z produkce B. Záznam z gelové permeační chromatografie proteinu KACL produkovaného ve vysoké hustotě HEK293S linie. Použita kolona Superdex 200 300/10 GL. Červená křivka značí průběh měření absorbance při 280 nm. Očíslované žluté oblasti představují posbírané frakce.



Obr. 11: 15% SDS elektroforéza frakcí GC z produkce B, redukující prostředí. Fotografie elektroforetické analýzy redukujících frakcí 1_B - 9_B z gelové permeační chromatografie produkce B. Vzorky jsou popsány čísly dané frakce, M - proteinový standard.



Obr. 12: 15% SDS elektroforéza frakcí GC z produkce B, neredukující prostředí.

Fotografie elektroforetické analýzy neredukovaných frakcí 1_B - 9_B z gelové permeační chromatografie produkce B. Vzorky jsou popsány čísly dané frakce, M - proteinový standard.

6.4 Deglykosylace KACL

6.4.1 Stanovení koncentrace frakcí

Před deglykosylací byla stanovena přibližná koncentrace jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie. Koncentrace frakcí 5_A - 8_A z produkce A byla zjištěna v každé jednotlivé frakci zvlášť, zatímco frakce 3_B - 8_B z produkce B byly spojeny do dvou částí I_B (frakce 3_B - 4_B) a II_B (5_B - 8_B), které byly zakoncentrovány na objem 0,5 ml. Koncentrace byla stanovena metodou dle Bradfordové pomocí ředící řady BSA (viz 5.4.2).

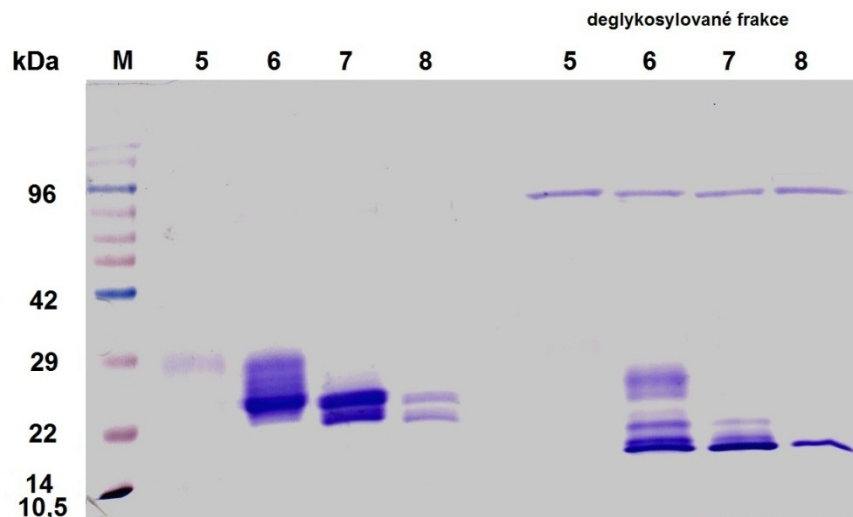
Tab. 2: Koncentrace jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie.

frakce	koncentrace [mg/ml]	frakce	koncentrace [mg/ml]
5 _A	0,53	I _B	0,35
6 _A	1,15	II _B	0,45
7 _A	0,88		
8 _A	0,54		

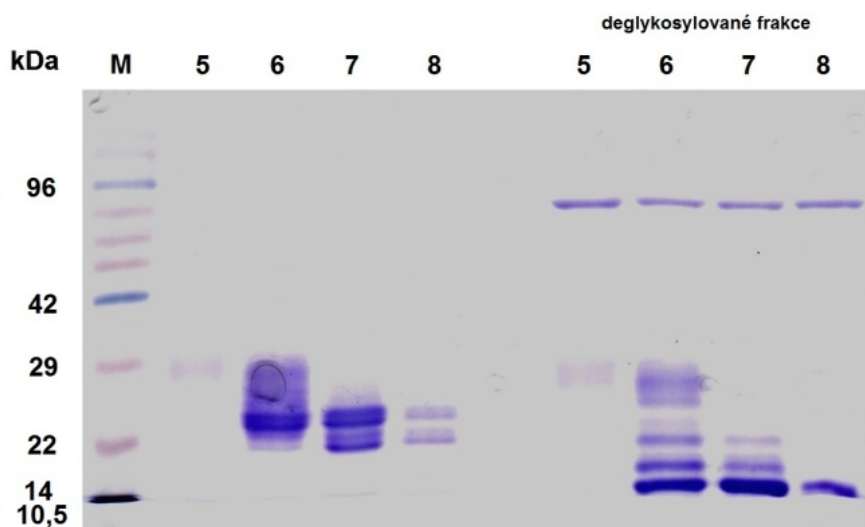
6.4.2 Deglykosylace frakcí

Po zjištění koncentrace byla s frakcemi provedena deglykosylace s pomocí enzymu Endo H_f v nativním prostředí (viz 5.5). Frakce byly poté opět analyzovány pomocí SDS elektroforézy. Na fotografiích se nacházejí elektroforetické gely se vzorky 5_A - 8_A v redukujícím (Obr. 13, str. 44) a neredukujícím (Obr. 14, str. 44) prostředí. Z obou gelů je zřetelné, že vzorky 6 - 8 obsahují deglykosylovanou formu proteinu KACL

očekávané molekulové velikosti 16 kDa a zároveň je patrné, že kompletně deglykosylovaný protein se nachází pouze ve frakci 8_A. V jamkách 5 - 8, kde byly pipetovány deglykosylované formy, je také zřetelně vidět enzym Endo H_f o velikosti cca 96 kDa.

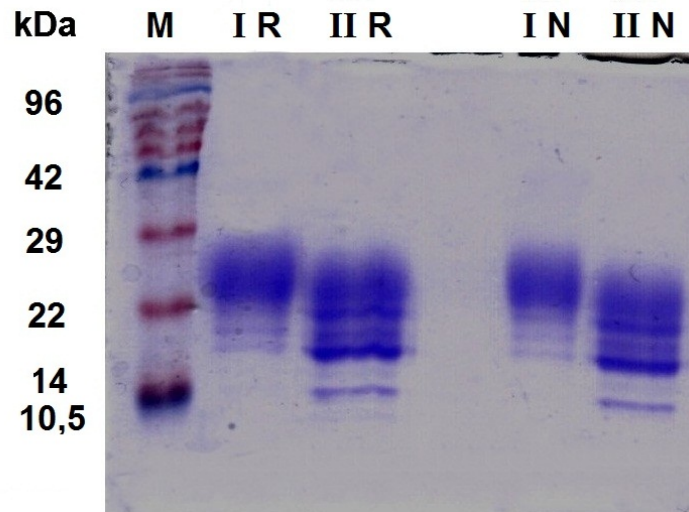


Obr. 13: 15% SDS elektroforéza deglykosylovaných frakcí z Produkce A, redukující prostředí. Fotografie elektroforetické analýzy deglykosylovaných frakcí 5_A - 8_A z produkce A. Vlevo se nacházejí *N*-glykosylované a vpravo deglykosylované frakce.



Obr. 14: 15% SDS elektroforéza deglykosylovaných frakcí z produkce A, neredukující prostředí. Fotografie elektroforetické analýzy deglykosylovaných frakcí 5_A - 8_A z produkce A. Vlevo se nacházejí *N*-glykosylované a vpravo deglykosylované frakce.

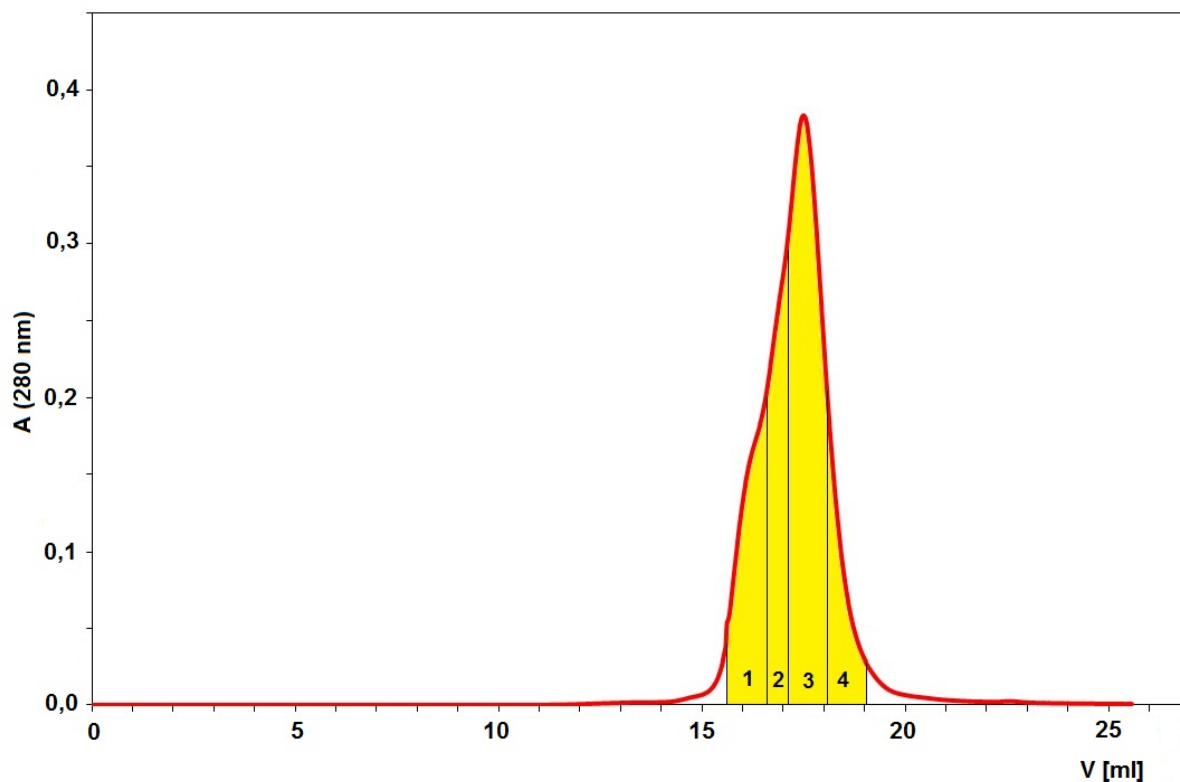
SDS elektroforéza deglykosylovaných frakcí I_B a II_B z produkce B (Obr. 15, str. 45) v redukujícím i neredukujícím prostředí. Z analýzy je zřejmé, že deglykosylace v obou frakcích proběhla jen v omezené míře.



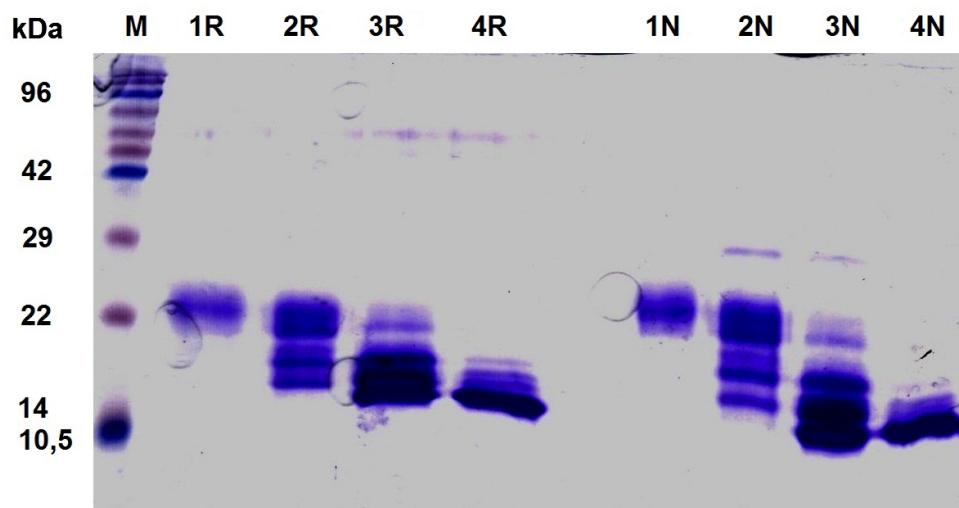
Obr. 15: 15% SDS elektroforéza deglykosylovaných frakcí z produkce B. Fotografie elektroforetické analýzy deglykosylovaných frakcí I_B a II_B z produkce B. Vlevo redukované, vpravo neredukované vzorky.

Deglykosylované frakce 6_A - 8_A z produkce A byly spojeny, zakoncentrovány na cca 150 μl a přečištěny pomocí gelové permeační chromatografie. Retenční objem proteinu se zdatelně zvýšil z důvodu snížení molekulové hmotnosti, což odpovídá úspěšné deglykosylaci (Obr. 16, str. 46).

S posbíranými frakcemi byla naposledy provedena SDS elektroforéza (Obr. 17, str. 46). Nejvíce homogenní a téměř kompletně deglykosylovaná frakce 3 a 4 byly spojeny, zakoncentrovány a použity pro krystalizaci, zbylé frakce byly podrobeny hmotnostně spektrometrické analýze zapojení disulfidických můstků a stavu *N*-glykosylace.



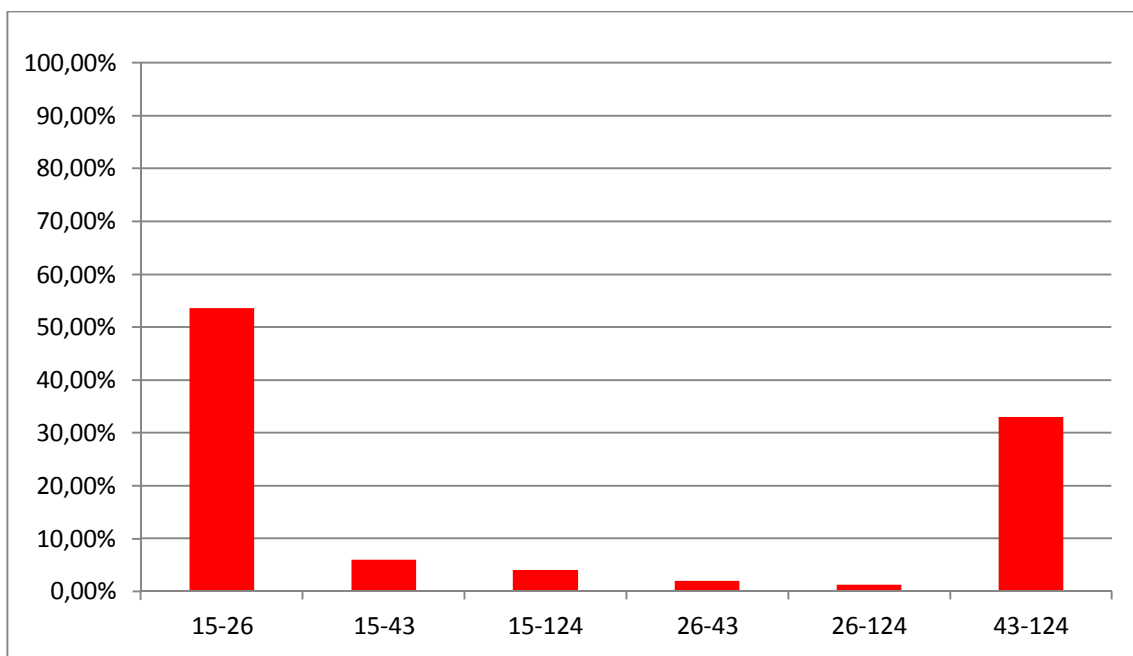
Obr. 16: Chromatogram deglykosylovaného proteinu KACL z produkce A. Záznam z gelové permeační chromatografie deglykosylovaného proteinu KACL. Použita kolona Superdex 200 300/10 GL. Červená křivka značí průběh měření absorbance při 280 nm. Žlutě vybarvené oblasti představují posbírané frakce.



Obr. 17: 15% SDS elektroforéza deglykosylovaných frakcí gelové chromatografie z produkce A. Fotografie elektroforetické analýzy frakcí 1 - 4 z gelové permeační chromatografie deglykosylovaného proteinu KACL z produkce A. Vzorky jsou popsány čísly dané frakce, podle R a N rozděleny na redukované a neredukované. M - proteinový standard.

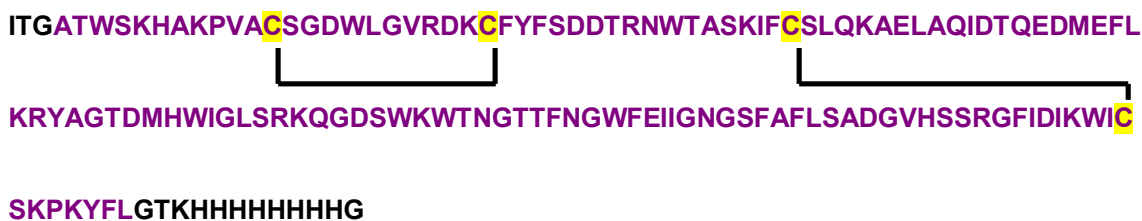
6.5 Mapování disulfidických můstků proteinu KACL

K objasnění disulfidové konfigurace vyprodukovaného proteinu byla použita hmotnostní spektrometrie. Pro mapování byl použit preparát konstruktu K1 separovaný elektroforézou provedenou v oxidativním prostředí (viz 5.6.1 a dále), proužky proteinu byly z gelu vyřezány a štěpeny trypsinem. Po extrakci, nabožení a odsolení získaných peptidů byla Mgr. Zdeňkem Kukačkou provedena LC-MS analýza (viz 5.6.6; [25]). Získané výsledky (Obr. 18) dokazují, že se v proteinu skutečně nachází 4 cysteiny, které spolu tvoří 2 disulfidické můstky. Zapojení Cys15-Cys26 a Cys43-Cys124 (Obr. 19) je v souladu s příbuznými proteiny, u kterých je v CTLD doméně disulfidické zapojení známé (např. CD69 či mClrg [26,27]).



Obr. 18: Výsledky mapování disulfidických můstků v konstruktu K1 proteinu KACL.

Graf zobrazuje relativní porovnání součtu intenzit signálů identifikovaných disulfidicky spojených peptidů.



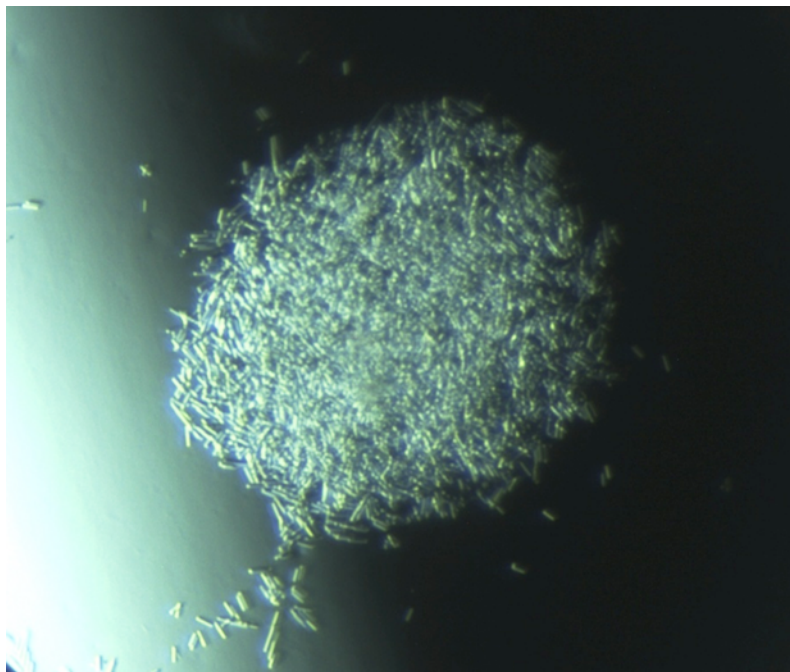
Obr. 19: Vyznačení disulfidických můstků v sekvenci konstruktu K1 mapované pomocí hmotnostní spektrometrie. Konstrukt K1 je značen fialově, ve žlutých rámečcích jsou cysteiny tvořící mezi sebou disulfidické můstky (černé čáry). Na konci konstruktu je histidinová kotva.

6.6 Krystalizace proteinu KACL

Třetí a čtvrtá frakce gelové permeační chromatografie deglykosylovaného preparátu konstruktu K1 proteinu KACL z produkce A byly použity pro krystalizační experimenty. Frakce byly spojeny a na centrifugačním koncentrátoru zakoncentrovány na 12 mg/ml - koncentrace byla určena relativně metodou Bradfordové proti BSA jako standardu. Protože použité frakce nebyly kvůli omezené deglykosylaci homogenní, byla k zakoncentrovanému preparátu před krystalizací přidána Endo H_f v hmotnostním poměru 1:200. S takto připraveným proteinovým vzorkem byly prováděny širokospektré krystalizační experimenty metodou s využitím krystalizačního robota a komerčních sad srážedel (viz 5.7).

Zhruba po 14 dnech od nasazení těchto experimentů byly v kapce obsahující jako srážedlo 0,1M Tris pH 8,5, 3M NaCl (Index HT - A12, Obr. 20) detekovány krystaly tvaru malých jehlic až trámců o velikosti do 10 μm.

Krystalizace proteinu byla prováděna v *Laboratoři strukturní biologie*, BTÚ AV ČR, pod dohledem Mgr. Jana Bláhy a Mgr. Jakuba Ptáčka.



Obr. 20: Fotografie krystalů vyprodukovaného proteinu. Fotografie byla pořízena digitální kamerou na optickém mikroskopu, velikost krystalů se pohybuje v jednotkách až desítkách mikrometrů.

7 DISKUZE

Cílem této bakalářské práce byla příprava lidského buněčného receptoru KACL pomocí metody rekombinantní proteinové exprese. Exprese probíhala transfekcí plazmidové DNA nesoucí konstrukt kódující KACL (pTT28_K1) do lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293S GnTI. Tato buněčná linie postrádá enzym *N*-acetylglukosaminyltransferasu I, čímž je docíleno produkce proteinů s homogenní *N*-glykosylací. Pro transfekci byly použity 2 různé plazmidové DNA. První, pro produkci X a A, byla připravena Barborou Mikulovou. Druhá plazmidová DNA byla připravena v rámci této práce a byla využita pro produkci B. Výtěžek druhé izolace plazmidu nebyl příliš vysoký. Totéž lze říci i o jeho čistotě, neboť poměr A_{260}/A_{280} byl roven hodnotě 1,33. Jedním důvodem nízké čistoty mohl být fakt, že pro izolaci plazmidové DNA nebyla použita komerčně dodávaná kolona se zafixovaným nosičem, ale kolona s fritou naplněná sice stejným, ale již recyklovaným nosičem. Dalším důvodem nízkého výtěžku mohly být i samotné bakterie *E. coli*, do kterých byl plazmid transformován. Bakterie mohly být například ve stresu z rozmrazení, nebo z tepelného šoku při transformaci. Obvykle totiž po transformaci následuje selekce transformantů na misce s agarem, avšak v našem případě byl tento krok z časových důvodů vynechán a čerstvě transformované bakterie byly rovnou použity k inokulaci média. I přes získání takovéto plazmidové DNA s nízkou koncentrací a čistotou byl výtěžek transfekce poměrně přijatelný.

Po ukončení produkce následovala purifikace proteinu. Díky histidinové kotvě, která je vnesena do vektoru pTT28 bylo možné získat čistý protein pomocí chelatační chromatografie s pomocí komerčního nosiče TALON nabitého kobaltnatými ionty. Eluce z nosiče byla provedena imidazolem, který, co by volný ligand, vytěsnil přes imidazolový kruh histidinů vázaný protein z kolony. Po zakoncentrování eluátů byla provedena gelová permeační chromatografie, při níž byla pomocí měření absorbance při 280 nm sledována mobilita proteinu. Z pozice elučního vrcholu v chromatogramu lze usuzovat na molekulovou velikost daného proteinu. Pozorovaný eluční objem konstrukt K1 proteinu KACL je přibližně 16,3 ml (Obr. 8, str. 40), což u použité kolony odpovídá proteinu o velikosti přibližně 40 kDa - je tedy pravděpodobné, že daný konstrukt tvoří nekovalentní dimer, což by bylo v souladu s již publikovanými údaji [12].

Po několika transfekcích plazmidové DNA do buněk pomocí transfekčního

činitla IPEI bylo zjištěno, že pokud je připravena transfekční směs skládající se z plazmidové DNA, pufru a IPEI, která se několik minut inkubuje a poté je přidána k buňkám, je výtěžek produkce mnohonásobně nižší oproti transfekci, kdy je plazmidová DNA přímo přidána k buňkám a následně doplněna IPEI, bez jakékoliv inkubace. Toto zjištění dokazují produkce X a následně produkce A a B. Postup při transfekci pro produkci A byl na poslední chvíli pozměněn, kdy nedopatřením došlo k přípravě transfekční směsi bez přidání IPEI a tento nedostatek byl odhalen následně po přidání plazmidové DNA k buňkám, čímž byl IPEI přidán samotný bez inkubace společně s plazmidem. Výsledkem byl vysoký výtěžek z produkce A oproti neúspěšné produkci X. Při produkci B byl postup přímého přidání plazmidu a následně IPEI do buněk cílený a z této transfekce byl výtěžek též přijatelně vysoký oproti ostatním transfekcím využívajícím inkubovanou transfekční směs. Důvodem neúspěšnosti těchto transfekcí může být teorie, že při inkubaci je plazmidová DNA obalena IPEI tak silně, že vzniklé komplexy (viditelné jako zákal roztoku) jsou již příliš velké pro snadnou endocytózu a vstřebání plazmidu do buňky.

Frakce získané z gelové permeační chromatografie byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy, a to v redukujícím i neredukujícím prostředí. Z výsledků je patrné, že v neredukujícím prostředí se protein pohybuje rychleji než v redukujícím, což je pravděpodobně způsobeno tím, že se v proteinu nachází disulfidické můstky, díky nimž je více sbalený a jeví se jako menší. V porovnání se standardem lze říci, že purifikovaný protein svojí velikostí odpovídá KACL konstruktu K1 a tvoří vícero glykoform. Ze sekvence konstruktů K1 je zřejmé, že obsahuje 3 místa *N*-glykosylace. Ve snaze zvýšit homogenitu získaného proteinu byla provedena deglykosylace pomocí enzymu Endo H_f (endoglykosidasa H, fúzní). Z SDS elektroforézy deglykosylovaných frakcí je patrné, že došlo ke snížení molekulové hmotnosti přibližně o 3 kDa na teoretických 16,5 kDa, avšak je evidentní, že deglykosylace nebyla ani zdaleka úplná, a to i přesto, že glykosylace tvořená v linii HEK293S GnTI je obvykle enzymem Endo H_f dobře odštěpována i za nativních podmínek. Je pravděpodobné, že některá místa *N*-glykosylace jsou u konstruktů K1 pro enzym Endo H_f stericky nedostupná.

Disulfidické můstky přítomné v konstruktu K1 byly mapovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Z relativního porovnání naměřených intenzit jednotlivých cystických peptidů (Obr. 18, str. 47) je zřejmé, že čtyři cysteiny obsažené v molekule konstruktů K1 spolu skutečně tvoří dva disulfidické můstky, a to v očekávaném uspořádání, jež je v souladu s příbuznými CTLD receptory, u nichž je zapojení

disulfidických můstků známo (např. CD69 či mClrg [26,27]). Zároveň z přesné hmoty jednotlivých peptidů lze s jistotou určit, že se skutečně jedná o kýžený rekombinantní receptor KACL.

I přes neúplnou deglykosylaci byla s proteiny jak z produkce A, tak z produkce B zahájena proteinová krystalizace na krystalizační destičce o 96 jamkách v různých podmínkách metodou „sedící kapky“. Krystalizace byla provedena Mgr. Janem Bláhou. Z prvotních pokusů vyplynulo, že vyprodukovaný protein je schopen krystalizace, nicméně jak vhodnou krystalizační podmínku, tak i přípravu proteinu z hlediska jeho homogenity, bude vhodné dále optimalizovat.

8 ZÁVĚR

- Lidský buněčný receptor KACL interagující s NK receptorem NKp65 byl ve vektoru pTT28 připraven rekombinantní expresí v buněčné linii HEK293S GnTI a byla provedena jeho purifikace.
- Pomocí SDS elektroforézy byl ověřen stav jeho *N*-glykosylace a protein byl deglykosylován enzymem Endo H_f.
- Hmotnostní spektrometrií byly zmapovány disulfidické můstky mezi čtyřmi cysteiny, které konstrukt obsahuje, a dále potvrzeno obsazení všech tří míst *N*-glykosylace.
- S vyprodukovanými proteiny z úspěšné produkce A byla zahájena proteinová krystalizace, byly získány první malé krystaly deglykosylovaného konstruktu K1.

9 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Voet, D., Voetová, J. G.: Biochemistry, Victoria Publishing, Praha 1995
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H.: Cellular and molecular immunology, 5th Edition. Elsevier Saunders, USA 2003
3. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie, 3. vydání, TRITON, Praha 2005
4. Jílek, P.: Základy imunologie, 2. vydání, ANYWAY, Praha 2008
5. Hořejší, V.: Podivné T-lymfocyty, *Vesmír* 84, 318-319 (2005)
6. Silbernagl, S., Despopoulos, A.: Taschenatlas der Physiologie, 6. vydání, GRADA, Praha 2004
7. Middleton, D., Curran, M., Maxwell, L.: Natural killer cells and their receptors, *Transplant Immunology* 10, 147-164 (2002)
8. Burmersted, G-R., Pezzutto, A.: Color Atlas of Immunology, Thieme, USA 2003
9. <http://www.cancerfoundation.com/NKcells.html>, citováno 30. 3. 2013
10. Lanier, L. L.: Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition, *Nature immunology* 9, 495-502 (2008)
11. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S.: Cellular and molecular immunology, 7th Edition. Elsevier Saunders, USA 2012
12. Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K. M., Schitteck, B., Steinle, A.: Interaction of C-type lectin-like receptors NKp65 and KACL facilitates

- dedicated imine recognition of human keratinocytes, *PNAS* 107, 5100-5105 (2010)
13. Zelensky, A. N., Gready, J. E.: The C-type lectin-like domain superfamily, *FEBS J.* 272, 6179-6217 (2005)
14. <http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Exprese-rekombinantnich-proteinu-teoreticky-zaklad.pdf>, citováno 1.4.2013
15. Aricescu, A. R., Lu, W., Jones, E. Y.: A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells, *Acta Cryst., Biological Crystallography* 62, 1243-1250 (2006)
16. <http://www.molecularstation.com/molecular-biology-techniques/recombinant-protein-expression/>, citováno 1.4.2013
17. <http://hek293.com/index.html>, citováno 2.4.2013
18. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., Baltimore, D.: Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection, *PNAS* 90, 8392-8396 (1993)
19. 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).
20. Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R., Khorana, H. G.: Structure and function in rhodopsin: High-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous *N*-glycosylation by a tetracycline-inducible *N*-acetylglucosaminyltransferase I - negative HEK293S stable mammalian cell line, *PNAS* 99, 13419-13424 (2002)
21. 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 Res.* 30, e9 (2002)

22. PureLink™ HiPure Plasmid DNA (*Invitrogen*, USA). Dostupné z URL: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_hipure_plasmid_dna_purification_man.pdf, citováno 5.4.2013
23. Sambrook, J., Russell, D. W.: *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 2001
24. <http://www.biotech.kth.se/courses/gru/courselist/BB2060/HT08/Analytlab2009.pdf>, citováno 28.4.2013
25. Pompach, P., Man, P., Kavan, D., Hofbauerová, K., Kumar, V., Bezouška, K., Havlíček, V., Novák, P.: Modified electrophoretic and digestion conditions allow a simplified mass spectrometric evaluation of disulfide bonds, *J. Mass Spectrom.* 11, 1571-1578 (2009)
26. Skálová, T., Kotýnková, K., Dušková, J., Hašek, J., Kovař, T., Kolenko, P., Novák, P., Man, P., Hanč, P., Vaněk, O., Bezouška, K., Dohnálek, J.: Mouse Clr-g, a Ligand for NK Cell Activation Receptor NKR-P1F: Crystal Structure and Biophysical Properties, *J. Immunol.* 189, 4881-4889 (2012)
27. Kolenko, P., Skálová, T., Vaněk, O., Štěpánková, A., Dušková, J., Hašek, J., Bezouška, K., Dohnálek, J.: The high-resolution structure of the extracellular domain of human CD69 using a novel polymer, *Acta Cryst.* 65, 1258-1260 (2009)

