

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Helena Pucholtová

**Produkce myšího NK buněčného receptoru NKR-P1C a
hledání jeho ligandu**

**Production of mouse NK cell receptor NKR-P1C and
seeking of his ligand**

Diplomová práce

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

Praha 2014

Tato diplomová 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

.....

Helena Pucholtová

Poděkování:

Nejprve bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, čas strávený odbornými konzultacemi a trpělivost. Dále děkuji doc. Janu Černému Ph.D za odborné konzultace k uskutečnění pokusů hledání ligandu pro mNKR-P1C prostřednictvím fluorescenční mikroskopie a Mgr. Valérii Grobárové Ph.D za provedení pokusů. Dále chci poděkovat RNDr. Jakubu Tomalovi za umožnění práce na MBÚ AV ČR, v. v. i., poskytnutí buněčných linií a vyhodnocení průtokové cytometrie. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Janu Bláhovi za pomoc při práci a všem ostatním členům laboratoře 204 za přátelské prostředí a vzájemnou výpomoc. Také bych chtěla poděkovat svým rodičům a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

Obsah:

Prohlášení:	2
Poděkování:	3
Obsah.....	4
Seznam zkratk.....	6
Abstrakt	9
Abstract:	10
1. Literární úvod	11
1.1. Imunitní systém	11
1.1.1. Buňky imunitního systému	11
1.2. NK buňky.....	13
1.2.1. NK buněčné rozpoznávání.....	13
1.2.2. Cytotoxicita NK buněk	15
1.2.3. Receptory NK buněk	16
1.2.3.1. Inhibiční receptory	17
1.2.3.2. Aktivační receptory	18
1.2.3.3. Rodina receptorů NKR-P1	18
2. Cíle práce	22
3. Materiál.....	23
3.1. Pomůcky a přístroje	23
3.2. Chemikálie.....	25
3.3. Bakteriální kmeny a buněčné linie	26
3.4. Vektory	27
3.5. Roztoky a média	27
4. Metody.....	29
4.1. Transformace	29
4.2. Izolace plazmidové DNA	29
4.3. Rozmrazování buněčné linie HEK293S	30
4.4. Suspenzní kultivace	30
4.5. Počítání buněk	31
4.6. Tranzientní transfekce v buněčné linii 293S	31
4.7. Tranzientní transfekce v buněčné linii 293T	32

4.8.	Afinitní chromatografie	32
4.9.	Zkoncentrování proteinu.....	33
4.10.	Gelová permeační chromatografie.....	33
4.11.	Štěpení TEV proteasou	33
4.12.	Chelatační chromatografie.....	34
4.13.	SDS elektroforéza	34
4.14.	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové	35
4.15.	Deglykosylace proteinu	35
4.16.	Odstranění Endo F ₁ z proteinu.....	36
4.17.	Krystalizace proteinu	36
4.18.	Fluorescenční značení proteinu A	37
4.19.	Vytvoření komplexu značeného proteinu A s fúzním proteinem pYD5-N1 ..	38
4.20.	Značení myších tkání fúzním proteinem v komplexu se značeným proteinem A a fluorescenční mikroskopie	38
4.21.	Hledání ligandu na buněčných liniích pomocí průtokové cytometrie	39
5.	Výsledky	41
5.1.	Fúzní konstrukt NKR-P1C v plazmidu pYD5.....	41
5.2.	Příprava zásobního množství plazmidu pYD5-N1	43
5.3.	Purifikace proteinu připraveného v buněčné linii HEK293S	43
5.4.	Deglykosylace proteinu a jeho krystalizace	50
5.5.	Příprava proteinu expresí v buněčné linii HEK293T a jeho purifikace.....	51
5.6.	Tvorba komplexu fúzního proteinu se značeným proteinem A.....	53
5.7.	Hledání ligandu na myších tkáních.....	55
5.8.	Hledání ligandu na buněčných liniích průtokovou cytometrií.....	58
6.	Diskuze	63
7.	Závěr	67
8.	Seznam citované literatury	68

Seznam zkratek

AA	akrylamid
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách, angl. <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AK	aminokyselina
APC	antigen prezentující buňky, angl. <i>antigen presenting cells</i>
APS	persíran amonný, angl. <i>ammonium persulfate</i>
BSA	hovězí sérový albumin, angl. <i>bovine serum albumin</i>
CBB R-250	barva Coomassie Brilliant Blue R-250
CD	označení povrchových molekul leukocytů, angl. <i>cluster of differentiation</i>
Clr	rodina proteinů obsahujících podobný motiv jako lektiny typu C, angl. <i>C-type lectin related</i> , viz též Ocil
CRD	lektinová doména vázající sacharid, angl. <i>carbohydrate-recognition domain</i>
CTL	cytotoxické T lymfocyty, angl. <i>cytotoxic T lymphocytes</i>
DAP12	12kDa adaptorový protein
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ExCELL293	médium pro tkáňové kultury
F17	médium pro tkáňové kultury
Fas/FasL	transmembránový protein Fas a jeho ligand FasL, viz též CD95/CD95L
Fc	část molekuly protilátky, angl. <i>fragment, crystallizable</i>
FcεRIγ	vysokoafinitní receptor pro IgE, angl. <i>Fc epsilon receptor type I gamma chain</i>
GPC	gelová permeační chromatografie
HEK293	lidské embryonální ledvinné buňky 293, angl. <i>human embryonic kidney</i>
HEPES	puf, N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie, angl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin

IL	interleukin
ILT	imunoglobulinový transkript, angl. <i>Ig-like transcript</i>
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv, angl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv, angl. <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
KIR	imunoglobulinový receptor zabíječských buněk, angl. <i>killer cell Ig-like receptor</i>
LAK	zabíječská aktivita aktivovaná lymfokiny, angl. <i>lymfokine-activated killer activity</i>
LB	název média podle Luria-Bertaniho
LCR	komplex genů pro receptory leukocytů, angl. <i>leukocyte receptor complex</i>
LIR	imunoglobulinový receptor leukocytů, angl. <i>leukocyte immunoglobulin-like receptor</i>
Ly-49	rodina lymfocytárních receptorů C-lektinového typu, angl. <i>lymphocyte antigen 49</i>
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MHC gp I.	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy, angl. <i>major histocompatibility complex type I. glycoproteins</i>
NK	„přirození zabíječi“, buňky imunitního systému, angl. <i>natural killers</i>
NKC	NK genový komplex, angl. <i>natural killer gene complex</i>
NKG2	rodina C-lektinových receptorů NK buněk, angl. <i>natural killer group 2</i>
NKR-P1	rodina receptorů NK buněk C-lektinového typu, angl. <i>natural killer receptor - protein 1</i>
NKT	NKT-lymfocyty, angl. <i>natural killer T-cells</i>
Ocil	lektin inhibující formaci osteoklastů, angl. <i>osteoclast inhibitory lectin</i> , viz též Clr
PBS	fosfátový pufr, angl. <i>phosphate buffered saline</i>
PI3	fosfatidylinositol-3'-kinasa
PK136	označení monoklonální protilátky rozpoznávající NKR-P1 receptor
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

SH2	tyrosinová fosfatasa
SHIP	inositol polyfosfát 5'-fosfatasa , angl. <i>SH2-domain containing inositol polyphosphate 5' phosphatase</i>
SHP	protein tyrosin fosfatasa, angl. <i>SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
Syk	tyrosin kinasa ve slezině, angl. <i>spleen tyrosine kinase</i>
TCR	receptory T-lymfocytů, angl. <i>T cells receptors</i>
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin
TEV	virus tabákové mazaiky, angl. <i>tobacco ech virus</i>
TK	tkáňové kultury
TNF	faktor nekrotizující nádory, angl. <i>tumor necrosis factor</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZAP70	protein kinasa 70 asociovaná se zeta-řetězcem TCR, angl. <i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

Abstrakt

Přirození zabíječi neboli NK buňky jsou buňky imunitního systému, zprostředkovávající vrozenou imunitu proti patogenům a nádorům, aniž by musely být předem vystaveny antigenu. Zastávají tak okamžitou protivirovou obranu již během počáteční fáze, tedy před zahájením tvorby protilátek a před vývojem specifických cytotoxických T-lymfocytů. Na svém povrchu mají NK buňky širokou škálu inhibičních a aktivačních receptorů, jejichž významnou rodinou jsou receptory podobné lektinům C – typu, z nichž byla první objevena právě rodina NKR-P1 („natural killer cell receptor - protein 1“).

Tato práce se zabývá přípravou/studiem myšního NK buněčného aktivačního receptoru NKR-P1C a hledáním jeho vazebného partnera. Rozpustná forma proteinu NKR-P1C byla připravena rekombinantní expresí pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293 (human embryonic kidney 293) s divokou, či jednoduchou glykosylací jako IgG-Fc fúzní protein, z něž bylo možné po afinitní purifikaci, štěpení TEV proteasou a následnou HPLC chromatografií získat čistý dimer NKR-P1C. Dimerní forma proteinu byla následně využita na strukturní studium pomocí krystalizačních pokusů. Na fúzní protein byl navázán protein A značený fluorescenční sondou DyLight 488. Tímto komplexem byly značeny myší tkáně a buněčné linie za účelem hledání ligandu.

Klíčová slova:

NKR-P1C, receptor, HEK293, proteinová krystalografie, rekombinantní exprese, protein A, ligand

Abstract:

Natural killer or NK cells are immunocytes that mediate innate immunity against pathogens and tumors without pre-exposition to the antigen. They are holding rapid antiviral defense during the initial phase of immune response, before starting the production of antibodies and the development of specific cytotoxic T –lymphocytes. On the surface of NK cells is expressed wide range of inhibition and activation receptors. Important family of those receptors are C – type lectin like from which the family of NKR – P1 ("natural killer cell receptor - protein 1") was discovered first.

Diploma thesis deals with the preparation/study of mice NK cell activation receptor NKR-P1C and searching for its binding partner. The soluble form of the protein NKR-P1C was prepared by recombinant expression using the transient transfection of HEK293 cell line (human embryonic kidney 293) with wild type or homogenous glycosylation as IgG – Fc fusion protein, from which was it possible to obtain pure dimer of NKR P1C, after process of affinity purification, TEV protease cleavage and HPLC chromatography. The fusion protein was bound to protein A labeled with a fluorescent probe DyLight 488. Mice tissues and cell lines were labeled by this complex for purpose of seeking ligand.

Key words:

NKR-P1C, receptor, HEK293, protein crystallography, recombinant expression, protein A, ligand

1. Literární úvod

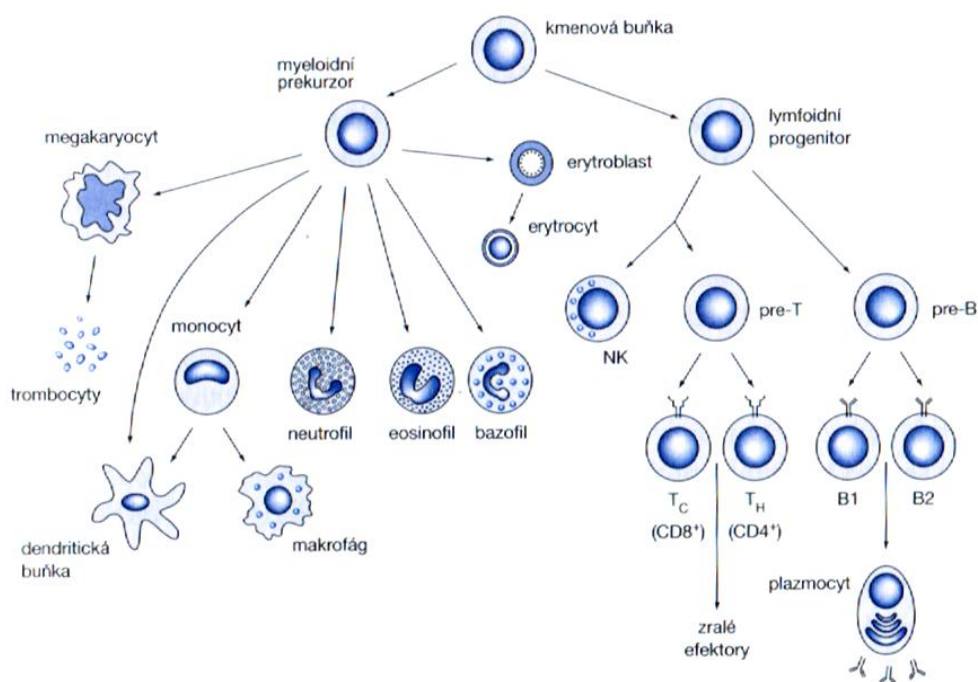
1.1. Imunitní systém

Imunitní systém je jeden ze základních homeostatických systémů organismu [1]. Je vysoce specifický, rozpoznává, zapamatovává si a eliminuje cizí buňky a makromolekuly nebo buňky, které byly poškozeny, infikovány či usmrceny [2]. Imunitní systém udržuje integritu organismu, jeho funkcí je: obranyschopnost – rozpoznává škodliviny z vnějšku, chrání organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům; autotolerance – imunitní systém rozpoznává tkáň vlastní a udržuje vůči nim toleranci; imunitní dohled – systém rozpoznává vnitřní škodliviny a průběžně odstraňuje staré, poškozené a mutované buňky [1].

Imunitní systém můžeme rozdělit na evolučně starší část „nespecifickou“ neboli „neadaptivní“ imunitu, která nemá imunologickou paměť – prezentují ji fagocytující a cytotoxické buňky, do kterých spadají i NK buňky (natural killer cells) [1, 3]. Tuto imunitu mají prakticky všichni živočichové, na přítomnost škodliviny reagují během několika minut [1]. Vývojově mladší „antigenně specifická – adaptivní“ část imunitního systému je výsadou obratlovců, aktivuje se až po setkání s daným antigenem. K rozvoji reakce je třeba několik dní až týdnů. Charakteristickým rysem specifické imunity je imunologická paměť, což je schopnost urychlené odpovědi v případě opětovného setkání s daným patogenem [1, 3].

1.1.1. Buňky imunitního systému

Část imunitního systému je tvořena různými druhy bílých krvinek – leukocyty [1]. Všechny druhy leukocytů pocházejí z univerzálních – pluripotentních kmenových buněk, které jsou přítomny v kostní dřeni po celý život [1, 4]. Vlivem různých faktorů se některé buňky diferencují na různé druhy leukocytů (*obr. 1, str. 12*). Úbytek kmenových buněk způsobený diferenciací je kompenzován jejich dělením. Ve zralých stádiích se nacházejí v krevním oběhu, kde mohou zůstat, nebo vycestovat do tkáně [5].



Obr. 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky [1]

Vznikají 2 hlavní linie – myeloidní a lymfoidní. Z lymfoidní vznikají NK buňky (velké granulární lymfocyty) a různé typy T- a B-lymfocytů (malé lymfocyty) [1]. Dokončení jejich vývoje probíhá až po setkání se s antigenem, po aktivaci produkují rozpustné mediátory zvané cytokiny, které aktivují další složky imunity, stávají se z nich buňky cytotoxické nebo regulační. [4]. Z myeloidní vznikají tři druhy granulocytů (neutrofil, eosinofil, bazofil). Dále vznikají monocyty (cirkulují v krvi a ve tkáních, zde se diferencují na makrofágy, což jsou důležité antigen prezentující buňky (APC, „antigen presenting cells“) pro T-lymfocyty, jsou součástí antigenně specifického imunitního systému) [1]. Všechny tyto druhy myeloidních buněk tvoří základ nespecifické části imunitního systému. Většina je schopná fagocytózy, jsou producenty cytokinů. Dalšími druhy myeloidních buněk jsou erytrocyty (červené krvinky) vyvinuté z erytroblastů a megakaryocyty, diferencující se na trombocyty [1].

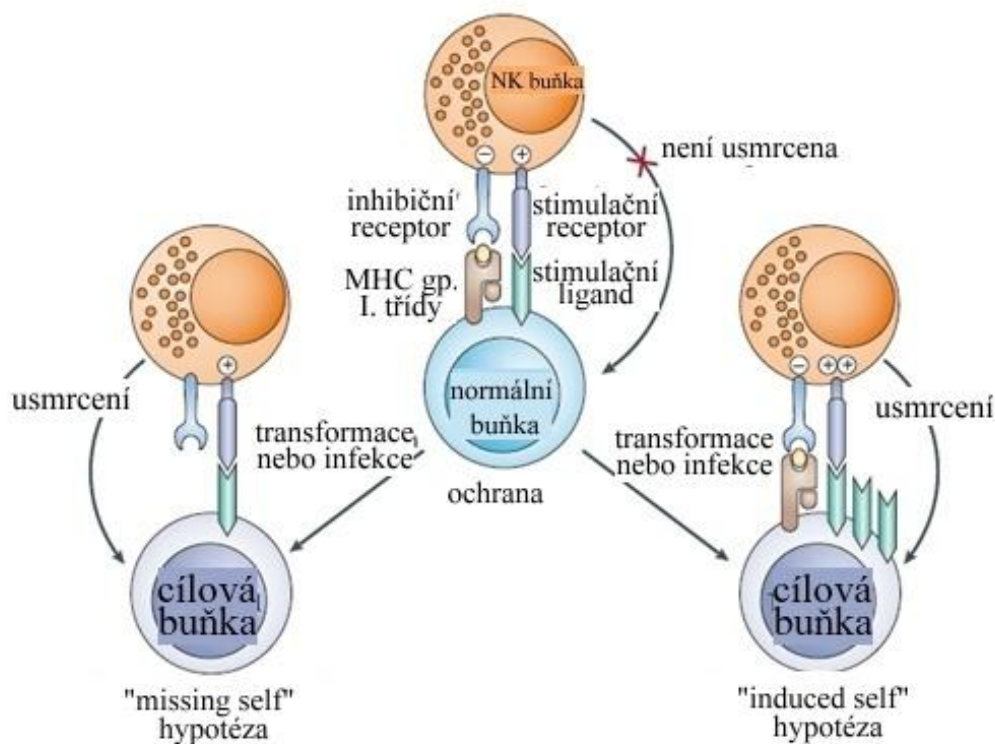
1.2. NK buňky

NK buňky (natural killer cells) byly popsány už v roce 1975 jako velké granulární lymfocyty, patřící do systému nespecifické imunity [4]. Vytvářejí se v kostní dřeni a nachází se v periferních lymfoidních tkáních a krvi [6, 7]. Pro vývoj a rozšíření NK buněk je důležitý interleukin 15 (IL15) [8]. NK buňky tvoří 10 – 15 % lymfocytů v periferní krvi a 1 – 2 % lymfocytů nacházejících se ve slezině [9, 10]. NK buňky byly pojmenovány podle schopnosti rychle rozpoznávat a cytotoxicky usmrcovat nádorové a virově infikované buňky *in vitro* bez předchozí stimulace, proliferace či diferenciaci [1, 11, 12]. Díky tomu, že reagují, aniž by musely být předem vystaveny antigenu, mohou zastávat okamžitou protivirovou obranu již během počáteční (latentní) fáze před zahájením tvorby protilátek a před vývojem specifických cytotoxických T-lymfocytů (CTL = cytotoxic T-lymphocytes) [9]. Produkují řadu důležitých imunoregulačních cytokinů, které mají vliv na jiné buněčné kompartmenty imunitního systému [13].

1.2.1. NK buněčné rozpoznávání

NK buňky nemají antigenně specifické receptory, rozeznávají a zabíjejí buňky jak vlastní (autologní), tak alogenní nádory, jež mají na svém povrchu abnormálně málo MHC glykoproteinů I. třídy (*obr. 2, str. 14*) [1,9].

MHC glykoproteiny I třídy jsou přítomny na všech zdravých jaderných buňkách organismu [1]. Buňky s expresí MHC gp. I jsou před NK buňkami chráněny, pokud však u těchto buněk nedochází k expresi MHC gp. I, jsou NK buňkou vyhledány a zničeny. U buněk infikovaných virem nebo nádorových buněk je exprese MHC gp. I potlačena [14]. NK buňky tedy svými receptory rozpoznávají poměr exprimovaných antigenů na povrchu cílové buňky. Poměr těchto aktivačních a inhibičních signálů udává, zda je buňka usmrcena, nebo ponechána naživu [15].



Obr. 2: Model procesu NK-buněčného rozpoznávání, upraveno dle [7].

Normální cílová buňka je před zabitím NK buňkou chráněna, jelikož přijímaný signál od aktivačních ligandů (+ „zabij“) je vyvážený s inhibičním signálem (- „nezabíjej“), který interaguje s vlastními MHC molekulami I. třídy. Pokud má cílová buňka v důsledku transformace či infekce snížené množství MHC gp. I, nedojde k vazbě inhibičních receptorů s NK buňkou. Ta potom nemá inhibované cytotoxické mechanismy a dojde k lyzi buňky (tzv. „missing-self“ hypotéza). Při transformaci či infekci také může dojít k expresi stimulačních ligandů, kdy je inhibiční signál mnohonásobně překonán aktivačním signálem (tzv. „induced self“ hypotéza) a dochází k lyzi buňky.

Podobným případem je tzv. „non-self“ hypotéza, kdy při alogenní transplantaci hostitelské NK buňky reagují s buňkami dárce, které mají cizí („non-self“) MHC gp. I. Ve většině případů u těchto cizích MHC gp. I molekul nedojde k správné funkci všech inhibičních receptorů na povrchu hostitelské buňky, převáží tak aktivační signály, což vede k lyzi alogenních buněk. Tento mechanismus slouží jako

ochrana před intracelulárními parazity a mutacemi, protože se při nich často vyskytují abnormálně exprimované antigeny, nebo naopak chybí [7, 16].

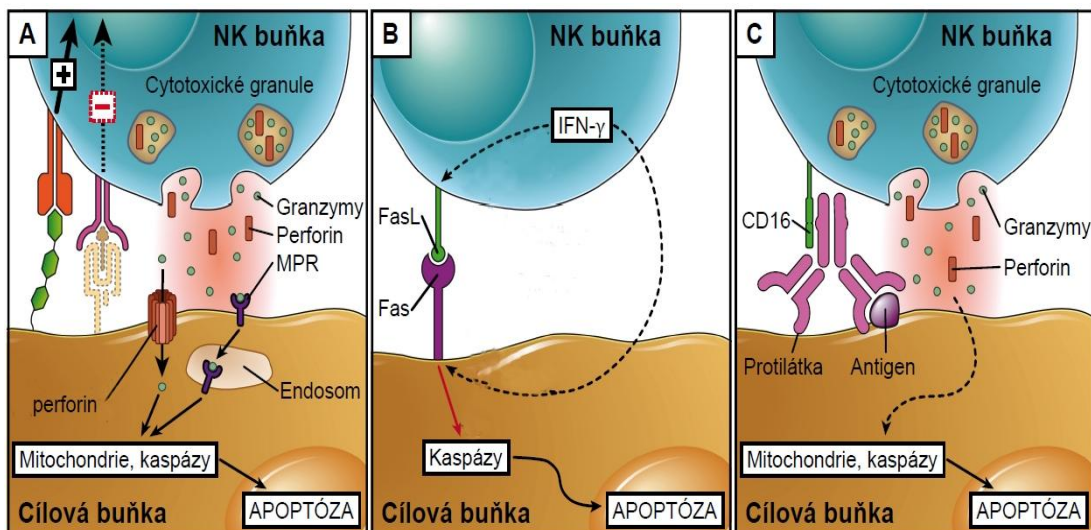
1.2.2.Cytotoxicita NK buněk

Buňky imunitního systému po infekci produkují interferony α a β , které inhibují replikaci viru, navozují antivirový stav bránící rozvoji infekce a zvyšují cytotoxickou aktivitu NK buněk [1, 9]. Na aktivaci NK buněk se podílejí i adhezivní molekuly a receptory cytokinů [17]. IL-2 je aktivátorem NK buněk (produkují ho infikované makrofágy a NK buňky samy po aktivaci produkují velmi mnoho IL-2), které po jeho vystavení v tkáňové kultuře získají schopnost zabít buňky všech typů nádorů, aniž by poškozovali normální tkáň. Tento jev se nazývá zabíječská aktivita aktivovaná lymfokiny – LAK (*lymfokine-activated killer activity*). IL-2 dále zvyšuje cytotoxickou aktivitu, působí jako růstový faktor a vyvolává hojné množení NK buněk [1, 9]. NK buňky sdílejí cytotoxické mechanismy s CD8⁺ cytotoxickými T-lymfocyty, které též využívají granzymy (serinové proteasy) a perforin [4, 18, 19]. Perforin vytváří v cytoplazmatické membráně póry, jež způsobují proděravění membrány, které může vést až k smrti buňky osmotickou lýzou [1]. Tyto póry jsou však většinou malé a jejich prostřednictvím se do poškozené buňky dostanou granzymy [1]. Granzymy štěpí v cytoplazmě prekurzory proteas ze skupiny kapas, které se tím aktivují a spustí kaskádu reakcí, která vyvolá apoptotickou smrt buňky (*obr. 3A, str.16*) [1, 20].

Další strategií je exprese některých membránových cytokinů indukujících buněčnou smrt. Jde o systém Fas – Fas-ligand (FasL), který patří do rodiny receptorů TNF molekul. Váže se na „apoptotický receptor“ Fas (CD95) přítomný na povrchu mnoha různých typů buněk. Tyto ligandy aktivují kapasy a dojde k apoptóze buněk. Ačkoliv Fas není exprimován cílovými buňkami, NK buňky jeho expresi indukují sekrecí IFN- γ a následně tak spouští apoptozu svým FasL (*obr. 3B, str. 16*) [1, 20, 21].

NK buňky vykazují i buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC). Cytotoxická buňka zabíjí buňku cílovou, jež má na svém povrchu navázané protilátky [9]. Převod signálu se děje prostřednictvím povrchového buněčného

receptoru CD16, jež se nachází na cytotoxické výkonné buňce a který váže Fc oblast imunoglobulinu IgG. ADCC v krevním oběhu vyvolávají NK buňky a malá podskupina T-lymfocytů. Při setkání s buňkou, která na svém povrchu váže protilátky IgG, se imunocyty pomocí CD16 naváží na Fc fragment těchto protilátek. To způsobí agregaci receptorů, přenos signálu a degranulaci buňky (obr. 3C, str. 16) [1, 9].



Obr. 3: Tři hlavní mechanismy usmrcení cílové buňky NK buňkou, upraveno dle [20].

Pokud cílové buňce chybí antigeny (MHC I. třídy aj.) je NK buňka aktivována a usmrtí cílovou buňku (A), apoptózu může navodit také skrz „receptory smrti“ jejichž expresi reguluje IFN - γ (B), třetí možností je navázání Fc části IgG na CD16 (C), čímž se spustí podobné cytotoxické mechanismy, jako ty, jež jsou popsány na obrázku A.

1.2.3.Receptory NK buněk

NK buňky mají na svém povrchu velké množství receptorů. Můžeme je rozdělit podle struktury či funkce. Podle funkce dělíme receptory na *aktivační*, které stimulují aktivitu NK buněk a *inhibiční* receptory, které aktivitu tlumí [11, 15, 22]. Receptory rozeznávají své ligandy a díky nim je signál veden dovnitř buněk [7]. Podle struktury

dělíme NK buněčné receptory na *imunoglobulinového* a *C-lektinového typu* [11, 15, 22]. Geny, které kódují C-lektinové receptory se nachází v genovém komplexu zvaném NKC (NK receptorový genový komplex) [18] a geny pro imunoglobulinové receptory v LCR (leukocytární Ig - like receptorový komplex) [23].

1.2.3.1. Inhibiční receptory

Inhibiční receptory rozpoznávají MHC gp. I a tlumí cytotoxické mechanismy NK buňky, neexistuje však univerzální receptor, který by byl schopen rozeznat všechny izotypy a alelické formy MHC gp. I, který je vysoce polymorfní [1, 24]. Všechny dosud popsané inhibiční receptory NK buněk mají ve své cytoplazmatické doméně jednu nebo více kopií inhibičního ITIM motivu (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Tento motiv obsahuje sekvenci: Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val, kde x označuje jakoukoliv aminokyselinu [19]. Po navázání ligandu na receptor dojde k fosforylaci tyrosinu v ITIM doméně prostřednictvím kinasy z rodiny Src, což vede k aktivaci fosfatasy SHP-1, SHP-2 a SHIP (která se procesu účastní, závisí na receptoru) [19, 25]. Cílem této signalizace je zabránit uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula, například defosforylací inositol trisfosfátů na inositol bisfosfáty (SHIP), nebo snížením fosforylace dalších signálních proteinů (SHP-1 a SHP-2) [19].

Mezi inhibiční receptory patří KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptors) transmembránové receptory typu I. Jsou kódovány v oblasti 150 kb na lidském chromozomu 19q13.4 v komplexu genů pro receptory leukocytů (LCR). Účastní se rozmanitých imunitních odpovědí, v závislosti na konkrétním patogenu [19, 26]. Dalšími inhibičními receptory z imunoglobulinové skupiny jsou LIR, resp. ILT (CD85). Vyskytují se na povrchu různých druhů leukocytů a zřejmě pomáhají tlumit jejich přílišnou aktivitu [1]. Inhibiční receptory C-lektinové rodiny jsou známy jak u lidských NK buněk (heterodimer CD94/NKG2A), tak u myši (např. skupina receptorů Ly-49 nebo NKR-P1) [1, 16].

1.2.3.2. Aktivační receptory

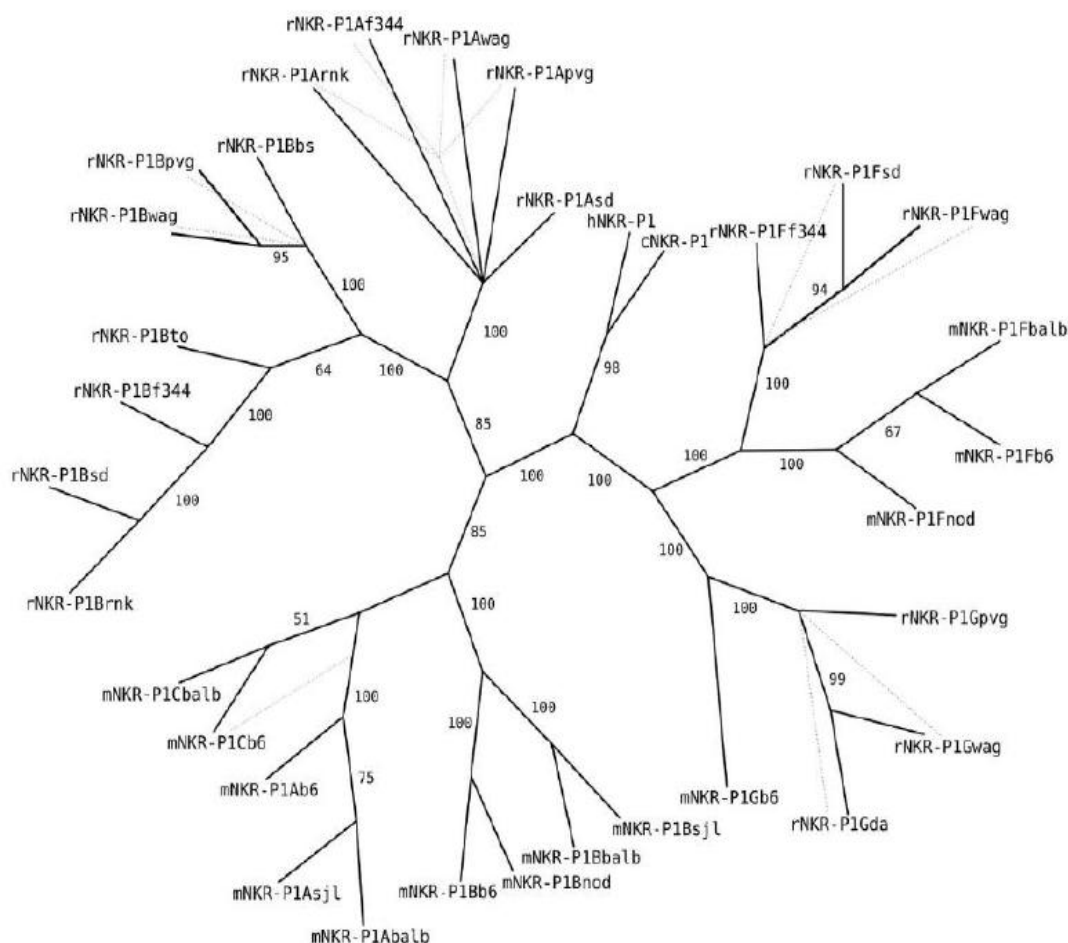
Aktivační receptory nemají vlastní signalizační domény, postrádají intracelulární ITIM motiv. Asociují s adaptorovými proteiny, které mají ve své struktuře ITAM motiv (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) s charakteristickou sekvencí Asp/Glu-x-x-Tyr-x-x-Leu/Ile-x(6–8)-Tyr-x-x-Leu/Ile, kde x představuje libovolnou aminokyselinu [19, 24]. NK buňky exprimují tři adaptorové proteiny obsahující ITAM motiv: DAP12, FcεRIγ a CD3ζ. Lidský CD16 se může vázat na FcεRIγ nebo CD3ζ, zatímco myší CD16 interaguje jen s FcεRIγ [19]. Dojde-li k navázání ligandu na aktivační receptor, dojde k fosforylaci tyrosinu v ITAM motivu a aktivaci tyrosinové kinasy Syk a ZAP-70. Dojde ke kaskádě signalizačních reakcí vedoucích k uvolnění Ca²⁺ z endoplazmatického retikula důležitých k aktivaci NK buněk, degranulaci a transkripčním dějům [19, 28]. Adaptorový protein FcεRIγ spojuje receptor s γ-řetězcí protilátky IgE prostřednictvím receptoru CD16 a váže se na jejich Fc fragment. Tímto způsobem dojde k přenesení signálu a následné degranulaci [1, 15].

Dalším signálním řetězcem, který se vyskytuje u aktivačních receptorů NK buněk je DAP10, který nemá ITAM motiv. Obsahuje pouze krátkou sekvenci aminokyselin Tyr-x-x-Met [28, 29]. Tyrosin se fosforyluje, aktivuje se fosfatasa SH2 a vytvoří se aktivační místo pro PI3 kinasu (fosfatidylinositol-3'-kinasa). PI3 kinasa dále aktivuje GTPasy z rodiny Rho a fosfolipasu C. Kaskáda signalizačních reakcí vede k aktivaci NK buňky [28, 29]. S DAP10 tvoří komplex například NKG2D, který slouží jako obrana proti virům, podílí se na regulaci proliferace cytotoxických T-lymfocytů. Výzkum naznačuje, že NKG2D má významnou roli v autoimunitních onemocněních [19, 28].

1.2.3.3. Rodina receptorů NKR-P1

Jednou z prvních popsaných rodin receptorů na NK buňkách jsou NKR-P1 receptory (natural killer receptor-protein 1“, CD161), které byly poprvé objeveny roku 1977 na myších NK buňkách. Patří sem aktivační i inhibiční receptory NK buněk podobné lektinům C – typu [30 – 32]. Geny pro receptory NKR-P1 se nachází v NKC genovém komplexu na chromozomu 6 u myší, chromozomu 4 u potkanů a

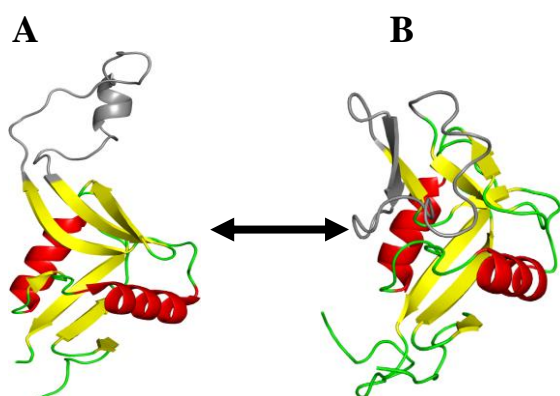
chromozomu 12 u lidí [33, 34]. Jejich exprese, či přítomnost v genofondu se však u člověka a hlodavců značně liší. Zatímco u hlodavců jsou geny NKR-P1 rodiny značně polymorfní, u člověka byl popsán pouze jeden gen NKR-P1 (*obr. 4, str. 19*) [35, 36].



Obr. 4: Evoluční strom receptorů NKR-P1 znázorňující příbuznost receptorů NKR-P1 pro myš (**m**), potkana (**r**), kuře (**c**) a lidské (**h**) receptory. Dvou až tři písmenné zkratky za receptorem označují kmene hlodavců. Čísla u jednotlivých „větvi“ značí pravděpodobnost příbuznosti vyjádřenou v % [37].

Doposud bylo u myši identifikováno celkem sedm genů této receptorové rodiny: NKR-P1A, B, C, D, E, F a G, u potkana byly doposud identifikovány geny receptorové rodiny NKR-P1A, B, F a G [38].

NKR-P1A je aktivační receptor exprimovaný jak u myší, tak u potkanů. Užívá se i jako rozlišovací znak potkaních NK buněk, prvně byl identifikován pomocí monoklonální protilátky 3.2.3 [32, 35, 39]. Myší receptor NKR-P1A^{B6} je jediný receptor z této rodiny, u kterého je rozřešena část jeho struktury- lektinová doména (*obr. 5, str. 20*)



Obr. 5: Trojrozměrná struktura extracelulární lektinové domény mNKR-P1A, upraveno podle [40, 41]. Struktura (A) řešena krystalograficky, struktura (B) pomocí MS, v roztoku, liší se smyčkou (šedá barva) má při různých podmínkách (v krystalu a roztoku) různé polohy, což může naznačovat její roli v rozpoznávání ligandu.

U myší byly NK buňky charakterizovány pomocí protilátky PK136, která se váže na tzv. NK1.1 antigen. Později bylo zjištěno, že tímto antigenem byl myší buněčný aktivační receptor NKR-P1C a některé formy inhibičních receptorů NKR-P1B/D [38]. Z hlediska aminokyselinové sekvence je C-lektinová doména NKR-P1C z 96 % shodná s NKR-P1B/D [42].

Dlouhou dobu nebylo zřejmé, jestli NKR-P1B^{BALB/c} a NKR-P1D^{B6} nejsou jen odlišné alelické formy téhož receptoru. Tuto domněnku podporoval i fakt, že sdílí stejný ligand – Ocil/Clr (osteoclast inhibitory lectin/C-type lectin-related), který je identický pro oba kmeny. Nakonec však bylo prokázáno, že se skutečně jedná o odlišné receptory [38, 43]. Kromě NKR-P1B/D specificky rozpoznávají a váží ligandy z rodiny Ocil/Clr ještě aktivační receptory NKR-P1F. Tento způsob rozpoznávání je podobný jako u „missing-self“ hypotézy, kde je místo MHC gp I. rozpoznávána molekula Clr, jenž se vyskytuje na povrchu různých buněk, ale u

nádorových buněk je její povrchová exprese snížena [38, 43, 44, 45]. Receptoru NKR-P1F je strukturně podobný inhibiční receptor NKR-P1G, rozpoznává i ligandy ze stejné rodiny Clr. NKR-P1E je zřejmě pseudogen [38, 46].

NKR-P1C^{B6} je jedním z nejrozšířenějších povrchových znaků NK a NKT buněk myšního kmene C57BL/6 [34, 47]. Myší NKR-P1C (mNKR-P1C) je známý také jako NK1.1 antigen. Je to homodimerní transmembránový glykoprotein typu II (má jediný transmembránový helix a C-konec je vně buňky) spojený disulfidickým můstkem. Je složený z extracelulární domény podobné lektinům C-typu, která je spojena dimerizačním krčkem s transmembránovou částí a cytoplazmatickou doménou [34, 47]. Myší receptor NKR-P1C stimuluje NK buňky přes FcR γ molekuly, které převádí signály pro Fc γ RIII (CD16) a pro Fc ϵ RI [48, 49, 50]. Když je tento protein zesílen monoklonální protilátkou, dochází u NK buňky k silné produkci IFN- γ [49]. Ligand(y) pro NKR-P1C jsou zatím neznámé, stejně jako jejich struktura [33, 45].

2. Cíle práce

- a. Příprava fúzního konstruktů receptoru NKR-P1C rekombinantní expresí pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T a HEK293S
- b. Purifikace fúzních proteinů na HPLC afinitní a gelovou permeační chromatografií
- c. Štěpení fúzního proteinu a purifikace dimerní formy NKR-P1C (produkované v HEK293S) na HPLC afinitní a gelovou permeační chromatografií
- d. Strukturní studium pomocí proteinové krystalografie
- e. Vytvoření komplexu fúzního proteinu NKR-P1C (produkovaného v HEK293T) s fluorescenčně značeným proteinem A
- f. Navázání komplexu na myší tkáň (fluorescenční mikroskopie) a buněčné linie (průtoková cytometrie)

3. Materiál

3.1. Pomůcky a přístroje

8-kanálová pipeta Transferpette	Biohit, USA
96 jamková destička s kulatým dnem	TPP, USA
Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad	New Brunswick Scientific, USA
Analytické váhy	AND, USA
Aparatura pro filtraci	Sigma-Aldrich, Německo
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	H+P Labortechnik GmbH, Německo
Automatické pipety Discovery	HTL, Polsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12 R	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Čtečka mikrotitračních destiček Sunrise V4.51	Tecan, Německo
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	Corning, Německo
Hemocytometr	INCYTO, Korea
HPLC systém ÄKTAbasic	Amersham Biosciences, Švédsko
Inkubátor CO ₂ 18AIC	Sanyo, Japonsko
Kahan Fuego SCS	VERKON, ČR
Kahan	závod Votice, ČR
Kolona Hitrap MabSelect SuRe	GE Healthcare, Švédsko
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Švédsko
Koncentrátory Amicon	Millipore, USA
Krycí skla 24 x 66 mm	Hirschmann Laborgerate, Německo
Krystalizační screen JCSG+ Suite	Qiagen, Holandsko

Krystalizační screen INDEX	Hampton Research, USA
Krystalizační screen MIDAS HT-96	Molecular Dimensions, USA
Krystalizační screen MORPHEUS HT-96	Molecular Dimensions, USA
Krystalizační destička Intelli - Plate 96	Art Robbins Instruments, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	Schott Duran, Německo
Laminární box Clean Air Techniek B.V.	PMV a Telstar company, Belgie
Lednice 225 R (4 °C)	Calex, ČR
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, USA
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mikroskop fluorescenční Olympus Cell^R	Olympus Corporation, Japonsko
Mrazicí box (-20 °C)	Calex, ČR
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
pH metr ino Lab	Schoeller, Německo
Pipetovací nástavec Midiplus	Biohit, USA
Plastik pro tkáňové kultury	Corning, Německo
Podložní sklička Supersoft plus	Thermo Scientific, USA
Průtokový cytometr BD LSR II	BD biosciences, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Robot Crystal Gryphon	Art Robbins Instruments, USA
Rotační vakuová odparka SpeedVac 110	Savant, USA
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
Souprava PureLink HiPure Plasmid DNA	Invitrogen, USA
Spektrofotometr NanoVue Plus	GE Healthcare, UK
Termoblock LS1	VLM, Německo
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	Schöeller, Německo
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, Švýcarsko
UV/Vis spektrofotometr UV2 Series	Unicam, UK
Varič	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-Aldrich, USA

3.2. Chemikálie

Agar	Oxoid, Anglie
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	Serva, USA
Činidlo dle Bradfordové	Bio-Rad, Německo
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
Endo F ₁	Mgr. Jan Bláha a Barbora Kalousková, PřF UK, Praha
ExCELL293 médium	Sigma, USA
Ethanol	Lach-Ner, ČR
Freestyle F17 médium	Gibco Invitrogen, USA
Glycerol	Lach-Ner, ČR
Hoechst 33258-A	Gibco Invitrogen, USA
Konzervační olej Fluoroshield s DAPI	Sigma, USA
Kvasničný autolyzát	Imuna Pharm, SR
Kyselina octová	Lach-Ner, ČR
L- Glutamin	Sigma, USA
Laktóza	Roth, Německo
Lineární PEI 25 kDa	Polysciences, USA
NHS - DyLight 488	Thermo Scientific, USA
Nosič pro chromatografii Talon	Clontech, USA
PCR H ₂ O	Top-Bio, ČR

Penicillin G sodná sůl	Duchefa Biochemie, Nizozemsko
Protein A	Sino Biological , Čína
Protein-A-agarosa	Sigma, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Streptomycin síran	Serva, USA
TEMED	Serva, USA
Triton X-100	Serva, USA
Tris	Roth, Německo
Trypanová modř	Sigma, USA
Trypton	Oxoid, Anglie
Trypton N1	Organo Technie, Kanada
Tween 20	Sigma, USA
Tissue Tek zmrazovací roztok	Sakura, Japonsko
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, ČR

3.3. Bakteriální kmeny a buněčné linie

E. coli DH5 α	Life Technologies, USA
HEK293S GnTI	Americká sbírka buněčných linií (ATCC)
HEK293T	Dr. Radu A. Aricescu, University of Oxford, UK
Slezinné buňky BALB/c a	RNDr. Jakub Tomala, MBÚ AV ČR,
C57BL/6	v.v.i.
Nádorové linie 38C13, EL4 IL2	RNDr. Jakub Tomala, MBÚ AV ČR,
YAC-1, IC21, 4T1, LL2, CT26,	v.v.i.
B16F10	

3.4. Vektory

pYD5

Dr. Yves Durocher, CNRC,
Kanada

3.5. Roztoky a média

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

Barvicí roztok pro SDS-PAGE: 45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 %
CBB R-250

Citrátový pufr: 0,1 M citrát sodný, 0,15 M NaCl, 10m M NaN₃, pH = 3,0

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE – 10× koncentrovaný: 3 % Tris, 14,4 % glycin,
1 % SDS, pH = 8,3

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

FACS roztok: PBS-TK pufr (viz níže) + 2,5 mM EDTA

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

HEPES pufr = pufr pro gelovou filtraci: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM
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

MES pufr: 20 mM MES, 100 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH = 5,0

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE: 35 % ethanol, 10 % CH₃COOH

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

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

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

Pufry k soupravě PureLink™ HiPure Plasmid DNA:

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

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

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující – 2× koncentrovaný: 100 mM 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, 100 mM DTT, pH = 6,8

4. Metody

4.1. Transformace

Kompetentní buňky kmene DH5 α bakterie *Escherichia coli* byly ponechány 30 minut na ledu, aby pozvolna rozmrzly (byly uchovávány v -80 °C). K 150 μ l buněk bylo přidáno 1-2 μ l plazmidové DNA (byl používán již dříve připravený plazmid pYD5, do nějž byla vložena sekvence NKR-P1C, námi značený jako pYD5-N1, více viz 5.1) a takto vzniklá směs byla 30 min inkubována na ledu. Následně byl proveden tepelný šok, kdy byla směs ponořena do vodní lázně o teplotě 42 °C na 1 min a po uplynutí této doby byla směs ihned vrácena na led. Poté byl přidán 1 ml sterilního LB média a směs byla inkubována 60 min při 37 °C. Následovala centrifugace 5 min při 3000 \times g, supernatant byl skoro celý odstraněn a ve zbylém množství (cca 100 μ l) byla peleta resuspendována. Suspenze byla nanesena a rozetřena na Petriho misku s LB agarem a příslušným antibiotikem – ampicilin (100 μ g/ml). Bakterie byly inkubovány 16 hod při 37 °C v termostatu.

4.2. Izolace plazmidové DNA

Pro přípravu zásobního množství plazmidu byly kolonie narostlé na LB agaru setřeny z Petriho misek s několika ml LB média a přeneseny do 2 l Erlenmeyerovy baňky s 500 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml). Tato kultura byla inkubována na třepačce po dobu 16 hod při 37 °C a 220 ot/min. Následovala centrifugace v 250 ml kyvetách, 15 min při 4500 \times g. Peleta byla resuspendována v 30 ml TES pufru na vortexovém mixéru a suspenze byla rovnoměrně rozdělena do dvou 30 ml polypropylenových kyvet a znovu centrifugována 15 min při 4500 \times g. Další postup byl proveden dle návodu v komerční soupravě PureLink HiPure Plasmid DNA (*Invitrogen*, USA) [51]. Po eluci bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu, směs byla promíchána a ponechána 30 min v lednici. Následovala centrifugace 30 min při 4 °C a 15000 \times g. Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno 5 ml 70 % ethanolu na opláchnutí pelety DNA a znovu odstředěno 15000 \times g, 5 min při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla vysušena na rotační vakuové odparce a

následně rozpuštěna v 1 ml dH₂O. Nakonec byla změřena koncentrace a čistota na spektrofotometru jako absorbance při 260 a 280 nm.

4.3. Rozmrazování buněčné linie HEK293S

Do 15 ml sterilní zkumavky s víčkem bylo pipetováno 10 ml kultivačního média, které bylo předehřáté na 37 °C. Byla použita směs médií ExCELL293 a F17 v objemovém poměru 1:1. Kryozkumavka s alikvotem buněk, který obsahoval 1 ml suspenze o hustotě $5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ byla rychle rozmrazena ve vodní lázni předehřáté na teplotu 37 °C a obsah kryozkumavky byl přenesen do připraveného média. Výsledná suspenze byla promíchána a centrifugována při $200 \times g$, 3 min. Od buněk byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v 10 ml média a přeneseny na Petriho misku.

4.4. Suspenzní kultivace

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ v ExCELL293/F17 médiu v poměru 1:1 a subkultivovány ředěním čerstvým médiem tak, aby se jejich hustota pohybovala v rozmezí 0,2 až $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ a to jak na Petriho miskách, tak ve čtverhranných láhvích na třepačce. Standardní postup vypadal následovně: 2 – 3 dny po rozmrazení dosáhly buňky na 10 cm Petriho misce hustoty kolem $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Buňky byly rozmíchány 10 ml pipetou s pipetovacím nástavcem a zředěny čerstvým médiem 1:3 na celkem $3 \times 10 \text{ cm}$ Petriho misky. Za další 2 – 3 dny byly buňky stejným postupem převedeny do 75 ml média v 250 ml čtverhranné láhvi s víčkem s prodyšným filtrem. Třepány byly na orbitální třepačce vybavené adhezivní podložkou rychlostí 135 ot./min (rotační průměr 19 mm) uvnitř inkubátoru. Za těchto podmínek je optimální objem média 30 – 40 % objemu láhve. Za další 2 – 3 dny byla suspenze přenesena do 1 l čtverhranné láhve a zředěna na 400 ml čerstvým médiem, po dosažení požadované hodnoty buněčné hustoty ($1 - 2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$), byla provedena transfekce (viz 5.4) nebo byla suspenze subkultivována dále.

4.5. Počítání buněk

Pomocí hemocytometru byly buňky počítány manuálně, odebralo se 20 μl buněčné suspenze, která se v mikrozkušavce smíchala se 160 μl 0,4 % roztoku trypanové modři v PBS-TK. Směs se nechala inkubovat 5 min a následně bylo 20 μl směsi pipetováno do hemocytometru. Buňky byly spočítány, živé (průhledné) i mrtvé (modré) ve všech devíti čtvercích zvlášť. Hodnoty z každého čtverce byly sečteny, vynásobeny faktorem $1 \cdot 10^4$ a faktorem ředění 9 a poděleny počtem čtverců 9 (faktor ředění se vykrátí s počtem čtverců). Tato průměrná hodnota na čtverec odpovídá buněčné hustotě v jednotkách 10^6 ml^{-1} . Viabilita, tedy procento živých buněk odpovídá podílu počtu živých buněk a součtu všech buněk vynásobeného stem (%).

4.6. Tranzientní transfekce v buněčné linii 293S

Buňky rostoucí ve čtverhranné láhvi s prodyšným víčkem na třepačce byly spočítány a byla určena buněčná hustota. Pro vysokohustotní produkci (počáteční produkční hustota $\sim 2,0$) bylo $800 - 1000 \cdot 10^6$ buněk 293S postupně centrifugováno v 50 ml sterilních zkumavkách s víčkem při 20 °C, $200 \times g$, 5 min. Supernatant byl odstraněn (slitím do odpadní kádinky) a pelet byl resuspendován v takovém objemu média F17, aby výsledná buněčná hustota během transfekce byla $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ a buňky byly převedeny do čtyřhranné lahve ve které bude produkce probíhat.

Pro přípravu transfekční směsi bylo potřebné množství plasmidu (podle zvoleného celkového počtu buněk; 2 μg DNA na 10^6 buněk) smícháno s 10 ml PBS-TK a sterilizováno filtrací přes 0,22 μm filtr do sterilní zkumavky. V další zkumavce bylo IPEI (10 mg/ml v hmotnostním poměru s DNA 1:6) smícháno s 10 ml PBS-TK. Tato směs IPEI a PBS-TK byla přimíchána do sterilní zkumavky ke směsi DNA a PBS-TK. Výsledný roztok byl důkladně protřepán a inkubován 5 minut (dojde k lehkému zákalu) a poté byl přidán k připravené buněčné suspenzi, která byla následně inkubována po dobu 4 hodin na třepačce v inkubátoru při 37 °C, 135 rpm. Následně bylo k suspenzi přidáno ExCELL293 médium do výsledného objemu 400 ml (výsledná počáteční produkční buněčná hustota byla $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Dále byly přidány 4 ml antibiotika penicilin (1000 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 1,6 ml kyseliny valproové (0,5 M VPA). Následující den bylo přidáno 10 ml 20 %

Tryptonu N1 (výsledná 0,5 % koncentrace TN1) pro dodání živin. Produkce probíhala následujících 4 – 6 dní. Před ukončením produkce byla spočtena viabilita živých buněk, která by neměla klesnout pod 70 %. Produkční kultura byla centrifugována při $4000 \times g$, 60 min, 4 °C. Médium bylo zmrazeno a uchováváno při -20 °C nebo ihned zpracováno.

4.7. Tranzientní transfekce v buněčné linii 293T

Podobný postup jako v 4.6 (tranzientní transfekce v buněčné linii 293S). Jedním z rozdílů bylo, že po spočtení buněk 293T (produkční hustota ~ 2,0) byly buňky centrifugovány (20 °C, $200 \times g$, 5 min), supernatant byl dostraněn a pelet byl resuspendován v 200 ml F17 média do 1 l čtverhranných lahví s prodyšným víčkem. Buňky byly třepány na třepačce v inkubátoru při 37 °C, 135 rpm do druhého dne. Následující den byla k buňkám přidána transfekční směs. Tato transfekční směs byla připravena obdobným postupem jako v bodě 4.6, jen bylo použito 1 µg DNA na 10^6 buněk a poměr DNA: IPEI byl 1:3. Postup přípravy transfekční směsi zůstal jinak nezměněn. Transfekční směs byla přidána k buněčné suspenzi a inkubována po dobu 4 hodin na třepačce v inkubátoru při 37 °C, 135 rpm. Následující průběh transfekce i její ukončení je shodné s postupem v bodě 4.6.

4.8. Afinitní chromatografie

Nízkotlaká kolona HiTrap MabSelect SuRe byla připojena k HPLC systému a byl nastaven tlakový limit 0,3 MPa. Kolona byla promyta 0,1 M NaOH, destilovanou vodou a PBS pufrem (pH = 7) při průtoku 1 ml/min. Následně byl na kolonu aplikován vzorek média, který byl přefiltrován přes 0,22 µm filtr. Rychlost průtoku byla zvolena na 5 ml/min. Po nanesení veškerého vzorku byl na kolonu opět přiváděn PBS pufr po dobu, dokud neklesla absorbance pozorovaná při 280 nm na původní hladinu. Proteiny, které se zachytily na koloně přes Fc fragment byly eluovány citrátovým pufrem (pH = 3) o průtoku 1 ml/min. Frakce z eluce byly sbírány do zkumavek s víčkem. Po eluci byla kolona i systém promyta 0,1 M NaOH, PBS pufrem, potom destilovanou vodou a nakonec 20 % čistým ethanolem, ve

kterém byla i uchovávána. Eluční frakce byla zneutralizována 1,5 M Tris (pH = 8,8) na pH \approx 7 (vzhledem k pH elučního pufru bylo přidáno 1/10 objemu frakce).

4.9. Zkoncentrování proteinu

Eluční frakce byly zkoncentrovány na centrifuze Allegra X-22R při $4000 \times g$ pomocí koncentrátorů Amicon s membránou propustnou pro molekuly o $M_r < 10\,000$ za laboratorní teploty na objem přibližně 200 μ l. Po použití byly koncentrátory umyty destilovanou vodou, v níž byly i uchovávány při teplotě 4 °C v lednici.

4.10. Gelová permeační chromatografie

K HPLC systému byla za průtoku 0,5 ml/min destilované vody připojena kolona Superdex 200 10/300 GL. Byl nastaven tlakový limit 1,5 MPa a kolona byla promyta nejprve destilovanou vodou, 1 M NaOH a opět destilovanou vodou. Potom byla kolona převedena do HEPES pufru pro gelovou permeační chromatografii. Zkoncentrovaný vzorek byl aplikován na ekvilibrovanou kolonu a byly jímány frakce. Kolona i systém byly po promytí destilovanou vodou uchovávány ve 20 % čistém ethanolu.

4.11. Štěpení TEV proteasou

Frakce získané z gelové permeační chromatografie byly štěpeny TEV proteasou (1 μ g/ μ l) v množství odpovídajícím 1/100 hmotnosti fúzního proteinu. TEV proteasa odštěpí Fc fragment od fúzního proteinu. Frakce byly dobře promíchány, krátce centrifugovány a štěpení probíhalo hodinu při 30 °C a následně přes noc (i déle až do dalšího zpracování) při 4 °C.

4.12. Chelatační chromatografie

Pro chelatační chromatografii byl použit nosič Talon, který je nabitý kobaltnatými ionty a váže na sebe přes histidinovou kotvu TEV proteasu. Do každé frakce byl přidán nosič v množství 1 ml na 5 mg proteinu a byl inkubován po dobu 30 minut na třepačce při 110 ot./min, za laboratorní teploty. Následně byl nosič zcentrifugován, frakce byly odpipetovány do čisté zkumavky s víčkem a byla k nim přidána protein A agarosa, která na sebe váže odštěpený Fc fragment. Po aktivní inkubaci 30 minut na třepačce a centrifugaci byly frakce opět přepipetovány do čisté zkumavky s víčkem. TEV proteasa byla uvolněna z nosiče pomocí PBS pufru s imidazolem, následovala centrifugace a supernatant byl odpipetován. Talon byl přečištěn PBS puftrem, centrifugován, supernatant byl odstraněn, následovalo čištění destilovanou vodou, MES puftrem, znovu destilovanou vodou a skladován byl v 20 % ethanolu. Fc fragment byl z protein A agarosy vyváznut elucí citrátovým puftrem a po centrifugování odpipetován. Protein A agarosa byla promyta PBS puftrem, destilovanou vodou a uchovávána v 20 % ethanolu.

4.13. SDS elektroforéza

Pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (SDS-PAGE) [52] byl připraven 15 % separační gel. Na přípravu 2 gelů bylo pipetováno: 1,8 ml ddH₂O, 4 ml AA, 2 ml 1,5 M Tris o pH = 8,8, 80 µl 10 % SDS, 80 µl 10 % APS a 4 µl TEMED. Následně byl připraven zaostřovací gel, který má menší hustotu a nižší pH. Vzorek proto rychleji migruje a nakumuluje se na rozhraní gelů, čímž je zajištěna větší přesnost dělení a lepší rozlišení v gelu separačním. Zaostřovací gel byl připraven pipetováním 1,4 ml dH₂O, 0,5 ml AA, 0,25 ml 1 M Tris o pH = 6,8, 20 µl 10 % SDS, 20 µl 10 % APS a 3 µl TEMED. Takto připravený gel byl vložen do aparatury a byly na něj nanášeny vzorky.

Vzorky pro SDS elektroforézu byly připraveny v redukujícím a neredukujícím prostředí. Vzorek byl připraven smícháním s 2 × koncentrovaným redukujícím, nebo neredukujícím vzorkovým puftrem v poměru 1:1. Následně byly vzorky 5 min povařeny a centrifugovány při 18000 × g, 5 min za laboratorní teploty. Takto připravené vzorky byly nanášeny na gel v množství 10 µl vzorků a 5 µg standardu.

Elektroforéza probíhala 1 hodinu při napětí 200 V. Po skončení byly gely barveny 20 min v barvicí lázni na třepačce a poté odbarveny v odbarvovací lázni do úplného odbarvení pozadí gelu.

4.14. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Stanovení koncentrace proteinů touto metodou je založeno na posunu adsorpčního maxima ($\lambda = 465 \text{ nm}$) barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (čínidlo dle Bradfordové), ke kterému dochází při adsorpci barviva na molekuly proteinu. Po adsorpci získá barvivo modrou barvu, zatímco nenavázané barvivo je hnědé. Díky tomu lze stanovit koncentraci spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm. Míra absorbance je při této vlnové délce přímo úměrná koncentraci proteinu.

Koncentrace přečištěného proteinu byla stanovena v 96 jamkové destičce. Ke 200 μl činidla dle Bradfordové, bylo vždy přidáno 5 μl standardu BSA pro vytvoření kalibrační řady o koncentracích 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mg/ml. Ke 200 μl činidla dle Bradfordové bylo přidáno 5 μl roztoku proteinu a směs byla inkubována 5-15 min za laboratorní teploty. Absorbance vzorků byla změřena při 595 nm čtečkou mikrotitračních destiček Tecan Sunrise V 4.51. Vynesáním hodnot do grafu a proložením rovnicí lineární regrese, lze vypočítat koncentraci proteinu v paralelně změřeném vzorku.

4.15. Deglykosylace proteinu

Deglykosylace proteinu pYD5-N1 byla provedena pomocí enzymu Endo F1, který byl připraven Mgr. Janem Bláhou a Barborou Kalouskovou v rámci její bakalářské práce. Endo F1 z *Flavobacteria meningoseptica* byla připravena jako fúzní protein s glutathion – S – transferasou (byla zaklonovaná do plazmidu pGEX3 a heterologně exprimována v *E.Coli* BL21 Gold DE3), purifikována byla dle [53].

K proteinu byl přidán reakční pufr G5 o $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ v poměru protein:G5 10:1. Pufr G5 se do reakce přidává pro úpravu pH, které by se mělo pohybovat kolem $\text{pH} = 5,5$. Následně byla k proteinu přidána Endo F₁ o $c = 1 \text{ mg/ml}$, v molárním

poměru 10:1. Tato směs byla štěpena při 37 °C po dobu 60 min. Deglykosylace byla následně ověřena na SDS PAGE.

4.16. Odstranění Endo F₁ z proteinu

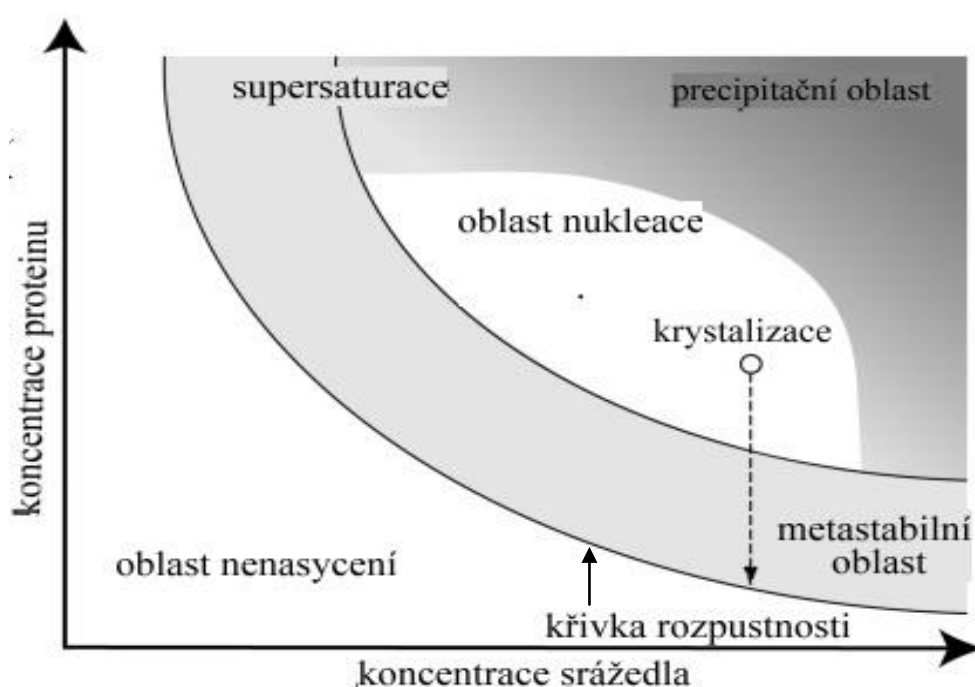
K deglykosylovanému proteinu byla přidána Glutathion Sepharosa, která na sebe váže Endo F₁. Na 3 mg proteinu bylo použito 100 µl nosiče Glutathion Sepharosy. Následovala inkubace na třepačce 30 minut při pokojové teplotě. Centrifugováním proteinu byl oddělen supernatant, který byl přepipetován do čisté zkumavky. Protein byl zkoncentrován a byla provedena gelová permeační chromatografie a SDS elektroforéza pro kontrolu, zda byla veškerá Endo F₁ odstraněna. Glutathion Sepharosa byla promyta PBS s glutathionem, vždy následovala inkubace 15 minut, centrifugace a slití supernatantu. Následovalo promytí PBS, destilovanou vodou a nakonec 20 % ethanolem, ve kterém byla při 4 °C uchovávána v lednici.

4.17. Krystalizace proteinu

Krystalizace proteinu je důležitá pro zjištění jeho struktury, kdy se molekuly v krystalu uspořádají v přesném a pravidelném pořadí. Pro určení počátečních podmínek napomáhají soupravy komerčních roztoků. Přesto je však krystalizace proteinu založena na metodě pokus – omyl, jelikož ji ovlivňuje velké množství proměnných, jako je například: poměr koncentrace srážedla a proteinu, teplota, pH, aj. Při tvorbě krystalu je první fází nukleace, kdy dochází k vytvoření krystalizačního jádra, které potom udává uspořádání celého krystalu. Systém musí být v přesyceném nerovnovázném stavu, kdy je množství proteinu nad rámec jeho rozpustnosti, po ustanovení rovnováhy dojde k vzniku pevných částic jako je krystal, nebo precipitát. Je třeba dostat se do oblasti nukleace, která je ideální pro tvorbu krystalizačních jader, v metastabilní oblasti dále dochází k růstu stávajícího krystalu (*obr. 6, str. 37*) [54].

Krystalizace probíhala na BTÚ AV ČR, v. v. i., pomocí robota Crystal Gryphon bylo naplněno všech 96 jamek rezervoárů sadou srážedel. Pro krystalizaci byly použité komerční sady JCSG+ Suite, INDEX, MIDAS a MORPHEUS. Na

krystalizační destičku Intelli-plate 96 bylo robotem napipetováno do každé pozice příslušné množství srážedla (200 nl, 150 nl a 100 nl). Následně byl robotem pipetován z mikrozkušavky deglykosylovaný protein NKR-P1C (100 nl, 150 nl a 200 nl), tedy v poměru ke srážedlu 1:2, 1:1 a 2:1. Takto bylo připraveno na každé destičce 96 různých 300 nl pokusů typu „sedící kapka“. Desky byly nakonec přelepeny speciální těsnicí průhlednou fólií, aby nedocházelo k nežádoucímu odpařování a vysychání roztoků. Desky byly uchovávány v místnosti s konstantní teplotou 20 °C. Krystalizační experimenty byly sledovány pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem minimálně jednou za 14 dní.



Obr. 6: Fázový diagram popisující krystalizaci proteinu, upraveno dle [54].

4.18. Fluorescenční značení proteinu A

Protein A byl rozpuštěn v 0,05 M kys. borité, pH = 8,0 do výsledné koncentrace $c = 10$ mg/ml. Z takto připraveného proteinu A byly odebrány 2 mg a napipetovány do alikvotu činidla NHS – DyLight 488 a inkubovány hodinu při pokojové teplotě. Separace přebytečného činidla a naznačeného proteinu A byla provedena gelovou permeační chromatografií na koloně Superdex 200 HR 10/300 GL s detekcí

při 280 nm v HEPES pufru. Vzorky byly uchovávány při 4 °C v temnu – zkumavky byly obaleny hliníkovou fólií.

4.19. Vytvoření komplexu značeného proteinu A s fúzním proteinem pYD5-N1

Fúzní protein se na protein A váže prostřednictvím Fc fragmentu. Protein A poskytuje 5 vazebných míst, proto byl ke značenému proteinu A přidán fúzní protein pYD5-N1 v molárním poměru 1:5. Následovala inkubace 10 minut a ověření vzniku komplexu gelovou permeační chromatografií.

Následně byl vzhledem k výsledkům optimalizován čas inkubace na 2 dny při 4 °C a množství přidaného fúzního proteinu bylo zvýšeno do poměru 1:20, aby byl fúzní protein v nadbytku. Vznik komplexu byl ověřen na gelové permeační chromatografii. Vzorky byly uchovávány při 4 °C v temnu – zkumavky byly obaleny hliníkovou fólií.

4.20. Značení myších tkání fúzním proteinem v komplexu se značeným proteinem A a fluorescenční mikroskopie

Ve spolupráci s Laboratoří buněčné biologie vedené doc. Janem Černým Ph.D a za pomoci Mgr. Valérie Grobárové Ph.D, již byly poskytnuty kryorezy myší sleziny a tenkého střeva, bylo provedeno značení fúzním proteinem v komplexu s proteinem A, který byl značený fluorescenční značkou DyLight 488. Myší tkáně byly inkubovány v 3,8 % formaldehydu v PBS pufru, dále pak v 20 – 30 % sacharose v PBS pufru a ponechány ve 4 °C v lednici přes noc. Následně byl na tkáň nanesen zmrazovací roztok Tissue-Tek a tkáň byla zmrazena na suchém ledu. Poté byly na kryostatů vytvořeny 10 nm tenké řezy a fixovány na podložní sklička Supersoft plus.

Na 5 sklíček obsahujících vždy 2 × řez sleziny a 2 × řez tenkého střeva byl nakapán 0,5 % Triton X-100 v PBS pufru a dále PBS pufr pro oplach. Pufr byl slit a oplach PBS pufr byl alespoň 5 × zopakován pro každé sklíčko. Následně bylo na každé sklíčko na tkáň nakapáno 200 µl 1 % BSA (blokovací pufr) a 10 minut probíhala inkubace. Sklídka byla označena: negativní kontrola (inkubace pouze

s pufrem), kontrola 1 (značený protein A, $c = 0,1 \mu\text{g/ml}$), kontrola 2 (značený protein A, $c = 1,0 \mu\text{g/ml}$), vzorek 1 (fúzní protein v komplexu se značeným proteinem A, $c = 0,1 \mu\text{g/ml}$), vzorek 2 (fúzní protein v komplexu se značeným proteinem A, $c = 1,0 \mu\text{g/ml}$). Vzorky byly naředěny 1 % BSA na uvedené koncentrace a po inkubaci byly napipetovány na tkáň. Na negativní kontrolu nebyl nanesen žádný vzorek. Vzorky byly zakryty hliníkovou fólií a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Následovaly oplachy PBS pufrem, alespoň $5 \times$ každé sklo a po odstranění PBS byla skla zakapána konzervačním olejem Fluoroshield obsahující barvivo DAPI (barví buněčná jádra) a přikryta krycím sklíčkem. Vzorky byly zakryté hliníkovou fólií a dány do druhého dne do lednice při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Následovala detekce na fluorescenčním mikroskopu Olympus Cell[^]R.

4.21. Hledání ligandu na buněčných liniích pomocí průtokové cytometrie

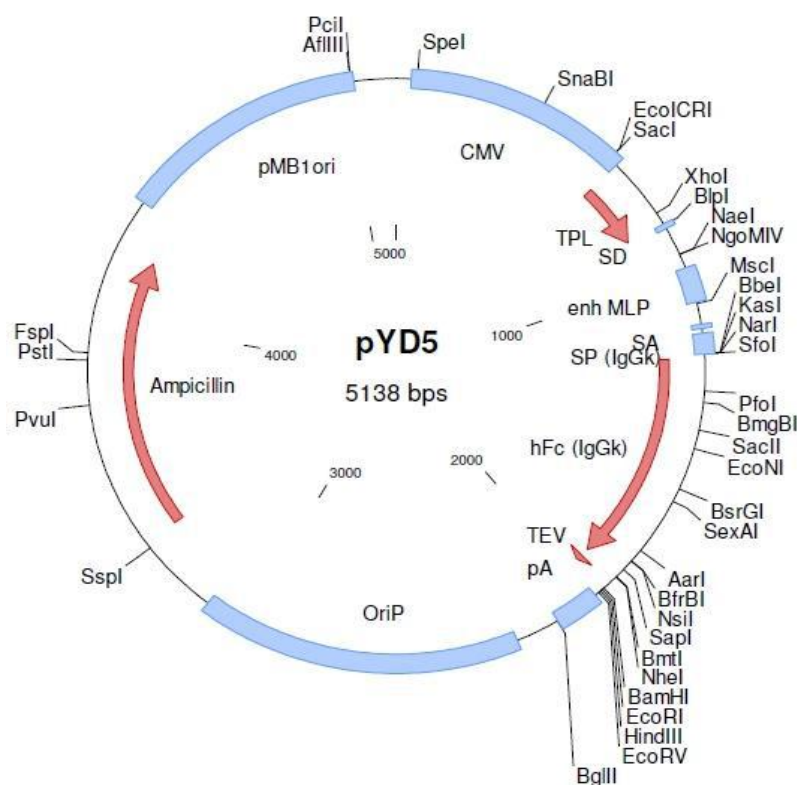
Ve spolupráci s RNDr. Jakubem Tomalou (Laboratoř nádorové imunologie, MBÚ AV ČR, v. v. i.), byly rozmrazeny a rozpěstovány buněčné linie slezinných buněk (linie BALB/c a C57BL/6) a nádorové linie (38C13, EL4 IL2, YAC-1, IC21, 4T1, LL2, CT26, B16F10). Tyto linie byly pipetovány na 96 jamkovou destičku s kulatým dnem (každá řada destičky pro jednu nádorovou linii A-H, slezinné buňky na druhé destičce A-B), byly centrifugovány 4 min, 1300 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a supernatant byl odstraněn. Pro blokaci bylo pro prvních 8 jamek u každé linie použito 15 % myší sérum C57BL/6 o objemu $20 \mu\text{l}$ a zbylé 4 jamky u každé linie byly blokovány $10 \mu\text{g/ml}$ neznačeným proteinem A o objemu $50 \mu\text{l}$. Myší sérum i protein A byly ředěny do požadované koncentrace FACS pufrem. Následovala inkubace 30 minut, centrifugace za stejných podmínek 4 min, 1300 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, po které bylo k liniím přidáno $50 \mu\text{l}$ vzorků o připravených koncentracích $0 \mu\text{g/ml}$ (kontrola), $0,1 \mu\text{g/ml}$, $1,0 \mu\text{g/ml}$ a $10 \mu\text{g/ml}$. Jako negativní kontrola byl nanesen vzorek značeného proteinu A (značen fluorescenční sondou DyLight 488) o uvedených koncentracích (jamky 1-4), dále byl pipetován komplex fúzního proteinu pYD5-N1 se značeným proteinem A (jamky 5-8) a stejný komplex byl pipetován i do jamek 8-12, které byly předinkubovány neznačeným proteinem A. Po další 30 minutové inkubaci byl proveden $2 \times$ oplach FACS pufrem o objemu $200 \mu\text{l}$. Po centrifugaci bylo k vzorkům

pipetováno 100 μ l FACS pufru a vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD LSR II (Centrum pro cytometrii a mikroskopii, MBÚ AV ČR, v. v. i.). K buňkám bylo přidáno těsně před analýzou fluorescenční barvivo Hoechst 33258-A pro určení viability. Podle množství absorbovaného barviva Hoechst se určuje populace mrtvých buněk. Výsledná populace živých buněk byla tedy vybrána jako Hoechst negativní. Byla měřena fluorescence FITC (fluoreskuje ve stejné oblasti jako DyLight 488), která ukazuje, zda došlo k vazbě na ligand, tedy na buněčnou linii. Tato odezva byla posuzována jako procento FITC+ buněk ze všech živých (Hoechst negativních) buněk.

5. Výsledky

5.1. Fúzní konstrukt NKR-P1C v plazmidu pYD5

V laboratoři školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. byl pro rekombinantní expresi proteinů používán již dříve připravený plazmid, pracovně označovaný jako pYD5-N1. Základem je plazmid pYD5 (*obr. 7, str. 41*), který poskytl Dr. Yves Durocher, CNRC Montreal, Kanada. Plazmid byl upraven, aby obsahoval vhodná klonovací místa, díky kterým do něj byla vložena sekvence receptoru NKR-P1C z kmene myši C57BL/6 v rozmezí AK Q67 až S223.



Obr. 7: Mapa plazmidu pYD5

Tento konstrukt nese pracovní označení N1, které odpovídá extracelulární části NKR-P1C. Zahrnuje jak doménu podobnou lektinům C-typu, tak i dimerizační krček (*obr. 8, str. 42*). Plazmid obsahuje sekreční signál, následuje Fc fragment lidského IgG, sekvenci rozpoznávanou TEV proteasou a námi vložený úsek receptoru NKR-P1C. Vlastní konstrukt pYD5-N1 je tedy fúzní protein, který můžeme rozštěpit

TEV proteasou (obr. 9 a 10, str. 42). Příprava NKR-P1C jako fúzního proteinu s Fc fragmentem lidského IgG, který přirozeně tvoří dimer, měla napomoci tvorbě dimeru také jeho fúzního partnera, NKR-P1C.

**MDTASIYLGKPPRTLGAWHESPPSLPPDACRCPRSHRLALKLSCAGLIL
LVLTIGMSVLVRLVQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWL
LHRDKCFHVSQVSNTWEEGQADCGRKGATLLLIQDQEELRFLLSIKEK
YNSFWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKITGVTEINGSCASILGDKV
TPESCASDNRWICQKELNHETPSNDS**

Obr. 8: Sekvence mNKR-P1C, barvy znázorňují intracelulární část, **transmembránový úsek** a konstrukt N1 (extracelulární část receptoru), ve kterém jsou zvýrazněny **cysteiny** a potenciální místa **N-glykosylace**, podtržený úsek kontruktu N1 znázorňuje oblast krčku.

**METDTLLLWVLLWVPGSTGAGSTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKASGAGSTTENLYFQGTGQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECP
QDWLLHRDKCFHVSQVSNTWEEGQADCGRKGATLLLIQDQEELRFL
DSIKEKYNFSWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKITGVTEINGSCASI
LGDKVTPESCASDNRWICQKELNHETPSNDSGT**

Obr. 9: Sekvence konstruktů pYD5-N1 obsahuje **sekreční signál**, Fc fragment lidského IgG po kterém následuje sekvence, kterou rozpoznává **TEV proteasa**, dále navazuje sekvence **konstruktu N1**, v němž jsou zvýrazněny **cysteiny** a potenciální místa **N-glykosylace**, AK TG/GT jsou klonovací místa. Sekvence konstruktů pYD5-N1 je námi označována jako fúzní protein FP .

**GTGQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQV
SNTWEEGQADCGRKGATLLLIQDQEELRFLLSIKEKYNFSWIGLRFTL
PDMNWKWINGTTFNSDVLKITGVTEINGSCASILGDKVTPESCASDNRW
CQKELNHETPSNDSGT**

Obr. 10: Produkt NKR-P1C po odštěpení Fc fragmentu TEV proteasou. Cysteiny v oblasti krčku, tedy Cys11, Cys12 a Cys25 jsou dimerizační. Další cysteiny jsou spolu spojené disulfidickými můstky, konkrétně Cys31 – Cys42, Cys59 – Cys147, Cys126 – Cys139.

5.2. Příprava zásobního množství plazmidu pYD5-N1

Kompetentní buňky *E. Coli* byly transformovány plazmidem pYD5-N1 viz kapitola 4.1. Kolonie narostlé na agaru byly druhý den přeneseny do Erlenmeyerových baněk a po 16 hodinách kultivace byly buňky centrifugovány. Následně byla provedena izolace plazmidu podle bodu 4.2. Na spektrofotometru byly změřeny hodnoty absorbancí při 260 a 280 nm (*tab. 5.1*) a následně byla spočtena koncentrace DNA [55] a čistota plazmidu, kterou udává poměr absorbancí 260/280 nm (*tab. 5.2*). Optimální hodnota čisté DNA se pohybuje okolo 1,8. V případě kontaminace RNA stoupá hodnota absorbance ke 2,0, pokud jde o kontaminaci bílkovinami, poměr absorbancí 260/280 nm klesá pod optimální hodnotu, jelikož přítomné bílkoviny zvyšují absorbanci při 280 nm.

Tab. 5.1: Naměřené hodnoty absorbancí.

plazmid	A ₂₆₀	A ₂₈₀
pYD5-N1	0,212	0,139

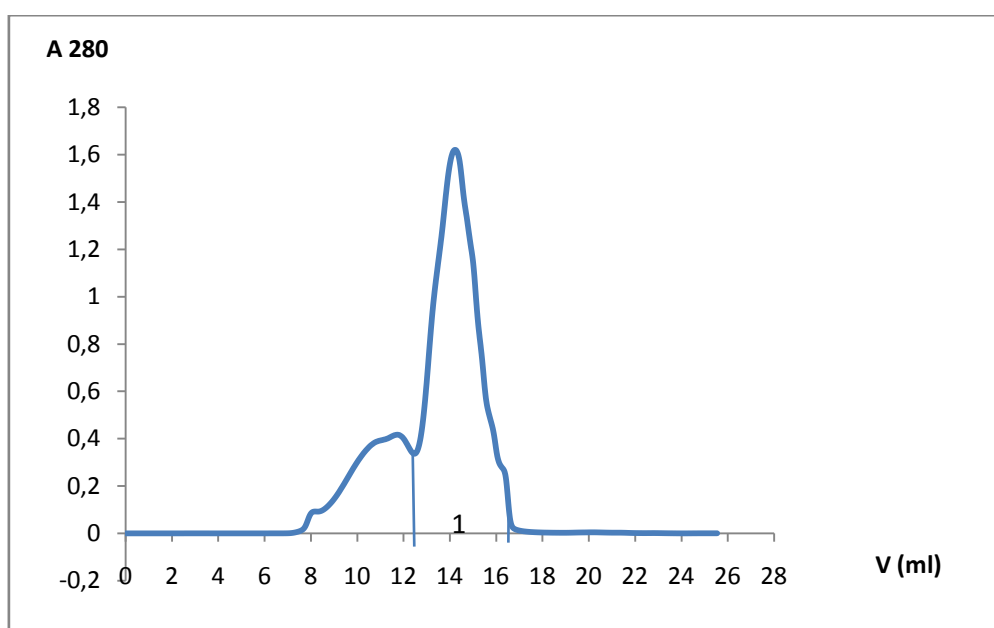
Tab. 5.2: Koncentrace a čistota proteinu.

plazmid	c [μg/μl]	A _{260/280}
pYD5-N1	10,6	1,53

5.3. Purifikace proteinu připraveného v buněčné linii HEK293S

Tranzientní transfekcí (4.6) bylo plazmidem pYD5-N1 transfekováno celkem $1,64 \cdot 10^9$ buněk a provedena produkce v 800 ml média. Po následujících 4 dnech byla produkce sklizena. Viabilita buněk byla 87 % a buněčná hustota se ve všech lahvích pohybovala okolo $4,3 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

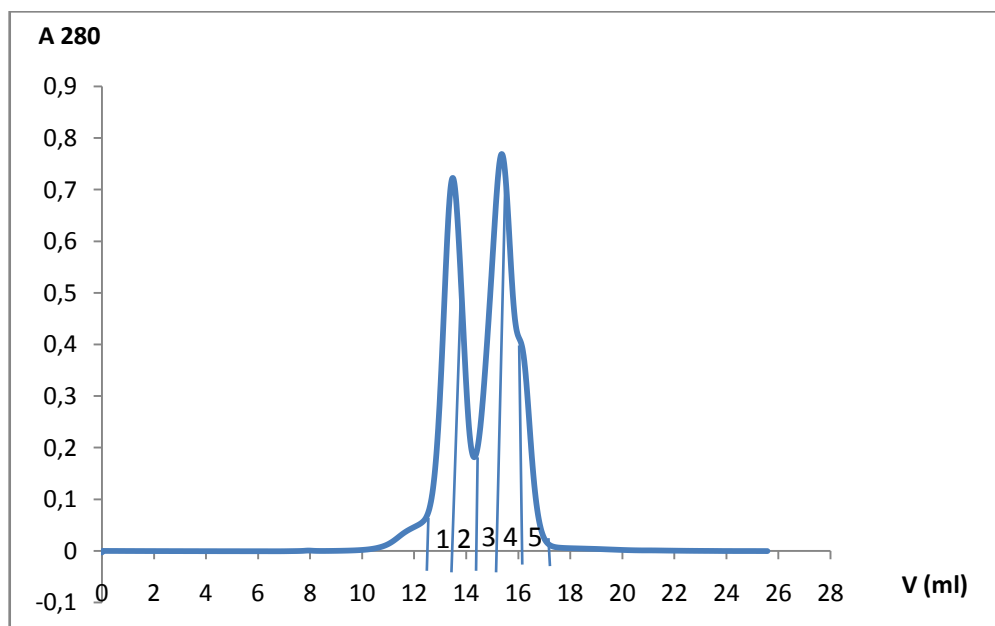
Médium bylo zfiltrováno přes 0,22 μm filtr a naneseno na kolonku „HiTrap mAb Select Sure“ s protein A agarosou postupem popsáným v bodě 4.8. Protein byl na kolonce zachycen přes Fc fragment a následně eluován citrátovým pufrům o pH = 3 a zneutralizován. Následně byl protein zkoncentrován (popsáno v kapitole 4.9) a vzorky byly nastříknuty na kolonu Superdex 200 10/300 GL (popsáno v kapitole 4.10). Během gelové permeační chromatografie (GPC) byla sledována absorbance při 280 nm (*obr. 11, str. 44*). Z uvedené produkce byl protein rozdělen na celkem tři nástřiky, jelikož hrozilo riziko sražení proteinu při dalším koncentrování. Záznamy z GPC jsou obdobné, proto je uveden pouze jeden.



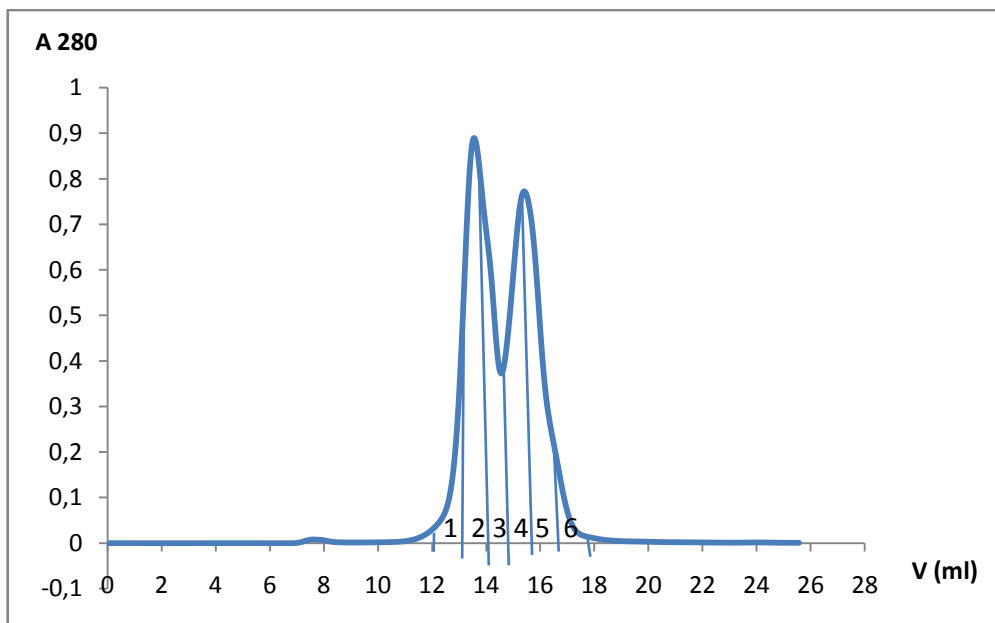
Obr. 11: Gelová permeační chromatografie pYD5-N1. Separace proběhla na koloně Superdex 200 10/300 GL, číslem je označena jímaná frakce

Frakce z každé GPC byla štěpena 90 μl TEV proteasy 1 hod při 30 $^{\circ}\text{C}$ a následně v lednici při 4 $^{\circ}\text{C}$ přes noc (viz 4.11). Následovala chelatační chromatografie s 500 μl chelatačního nosiče Talon a 500 μl protein A agarosy postupem popsáným v bodě 4.12. Poté byla provedena další gelová permeační chromatografie (3 \times GPC/TEV) (*obr. 12, str. 45*). Záznamy ze všech GPC/TEV jsou obdobné, proto je uveden jen jeden. Zde měl být již čistý protein bez Fc fragmentu, ze záznamu je však vidět, že část Fc fragmentu nebyla odštěpena od proteinu. Proto byly frakce 1 a 2 spojeny a

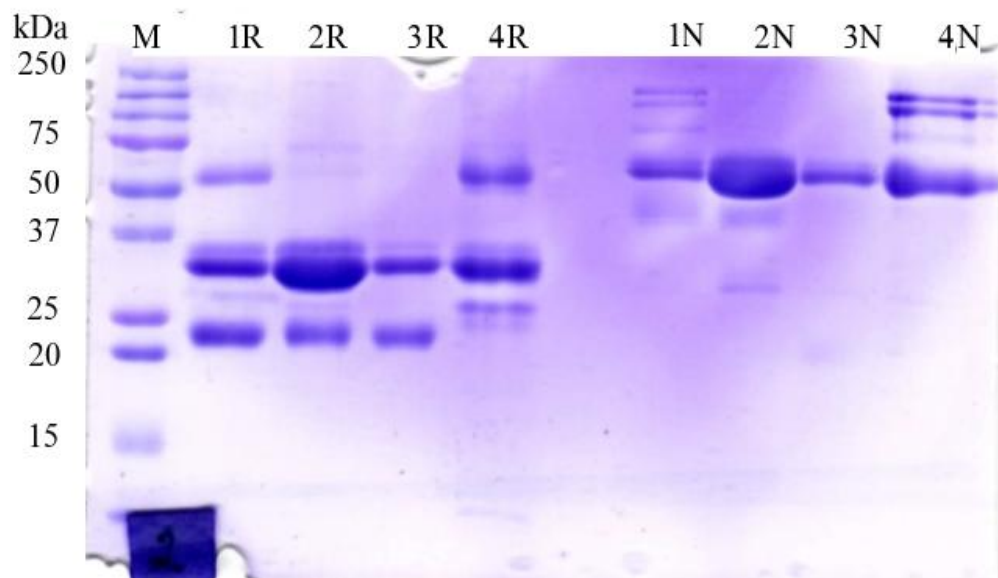
bylo k nim přidáno znovu 400 μ l TEV proteasy (spojeny byly nerozštěpené fúzní proteiny ze všech záznamů GPC/TEV). Následně byla stejným postupem provedena chelatační chromatografie s Talonem, protein A agarosou a nakonec GPC/TEV2 (obr. 13, str. 46). Ze všech chromatografií byla provedena SDS elektroforéza postupem popsáním v bodě 4.13 (obr. 14, str. 46 a obr. 15, str. 47).



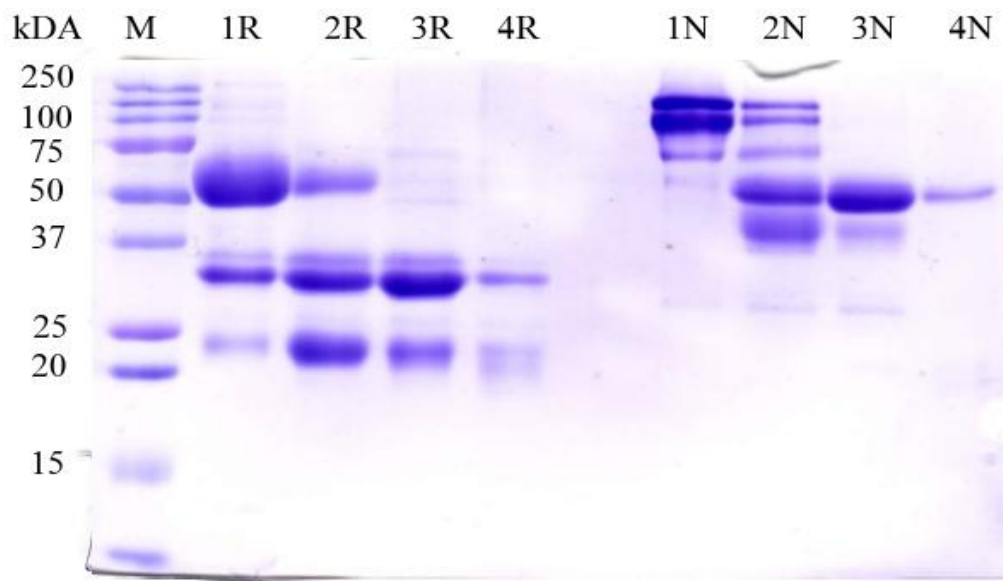
Obr. 12: Gelová permeační chromatografie pYD5-N1 po štěpení TEV proteasou (GPC/TEV). Separace proběhla na koloně Superdex 200 10/300 GL, čísla udávají jednotlivé frakce: 1 a 2 je stále nerozštěpený fúzní protein pYD5-N1, frakce 3 a 4 je dimer NKR-P1C bez Fc fragmentu, frakce 5 je monomer NKR-P1C.



Obr. 13: Gelová permeační chromatografie pYD5-N1 po druhém štěpení TEV proteasou (GPC/TEV2). Separace byla provedena na koloně Superdex 200 10/300 GL, frakce: 1 - 3 odpovídají fúznímu proteinu pYD5-N1, frakce 4 - 6 je dimer NKR-P1C bez Fc fragmentu.



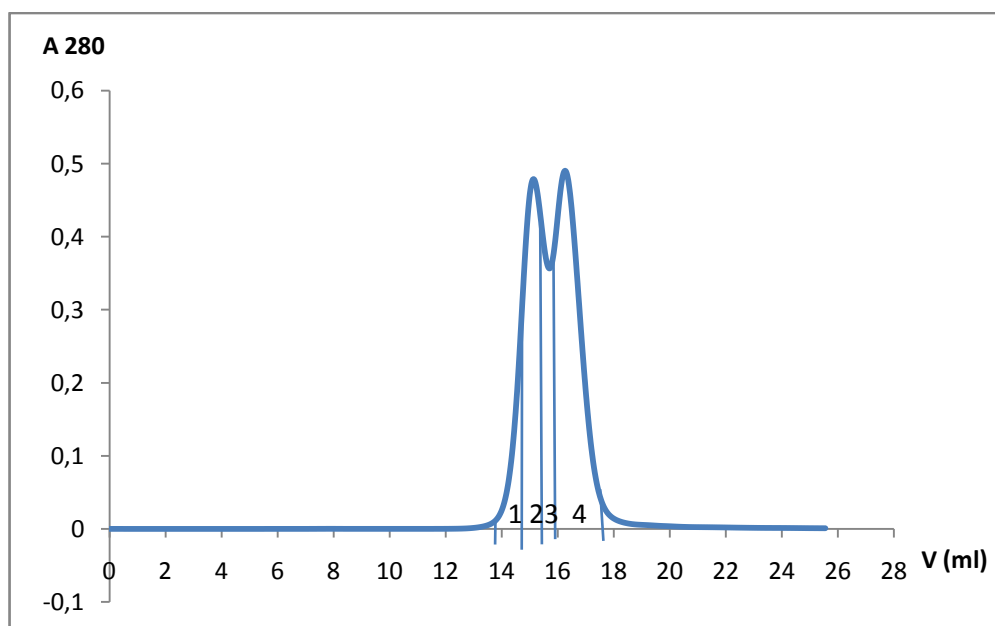
Obr. 14: SDS elektroforéza z gelové permeační chromatografie po štěpení TEV (GPC/TEV), R jsou vzorky v redukujícím pufru, N vzorky v neredučujícím pufru, 1 – frakce 3, 2 – frakce 4, 3 – frakce 5, 4 – odštěpený FC fragment



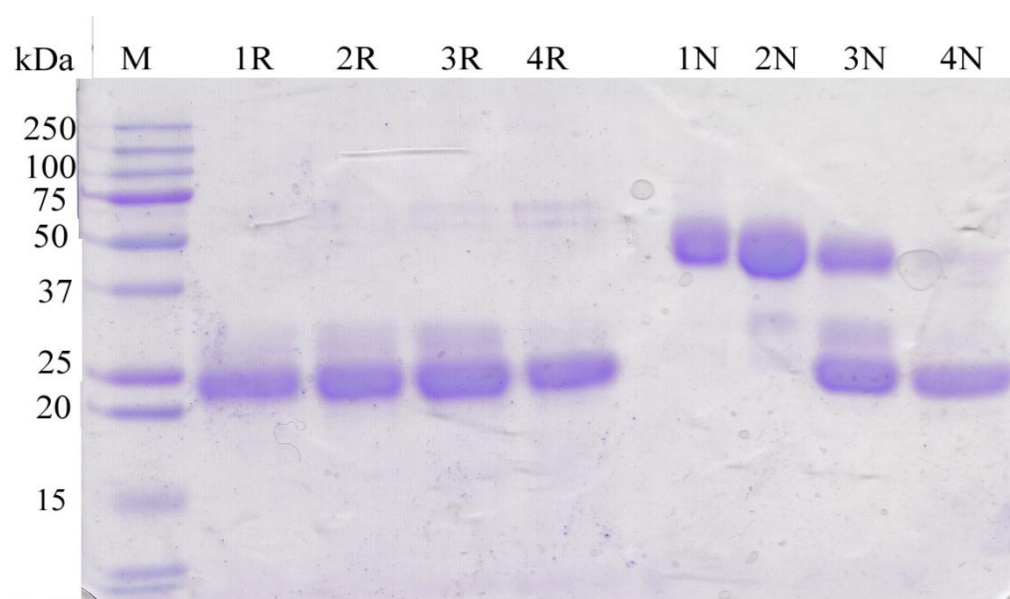
Obr. 15: SDS elektroforéza z GPC/TEV2, R jsou vzorky v redukujícím pufru, N vzorky v neredukujícím pufru,

1 – frakce 3, fúzní protein, 2 – frakce 4, obsahuje dimer, 3 – frakce 5, obsahuje dimer, 4 – frakce 6

Jelikož TEV proteasy bylo přidáno již dostatečné množství a z SDS elektroforézy je viditelné, že proteiny stále nejsou čisté a jsou kontaminované Fc fragmentem, byly frakce 3 – 5 z GPC/TEV a frakce 1 – 6 z GPC/TEV2 spojeny a byla provedena afinitní chromatografie na kolonce „HiTrap mAb Select Sure“ která zachytila Fc fragment lépe než vsádkovou metodou. Byla sledována absorbance při 280 nm. Při průtoku našeho proteinu, který se na koloně nezachytil, ale putoval s mobilní fází, byla pozorovaná zvýšená absorbance. Frakce byly jímány do zkumavky s víčkem a následnou elucí citrátovým pufrům o pH = 3 byl z kolony vyvázn Fc fragment (viz. 4.8). Následovaly další gelové permeační chromatografie (*obr. 16, str. 48*), které byly provedeny 3 ×, záznamy jsou obdobné, proto je uveden pouze jeden, a SDS elektroforéza pro ověření čistoty proteinu (*obr. 17, str. 48*).

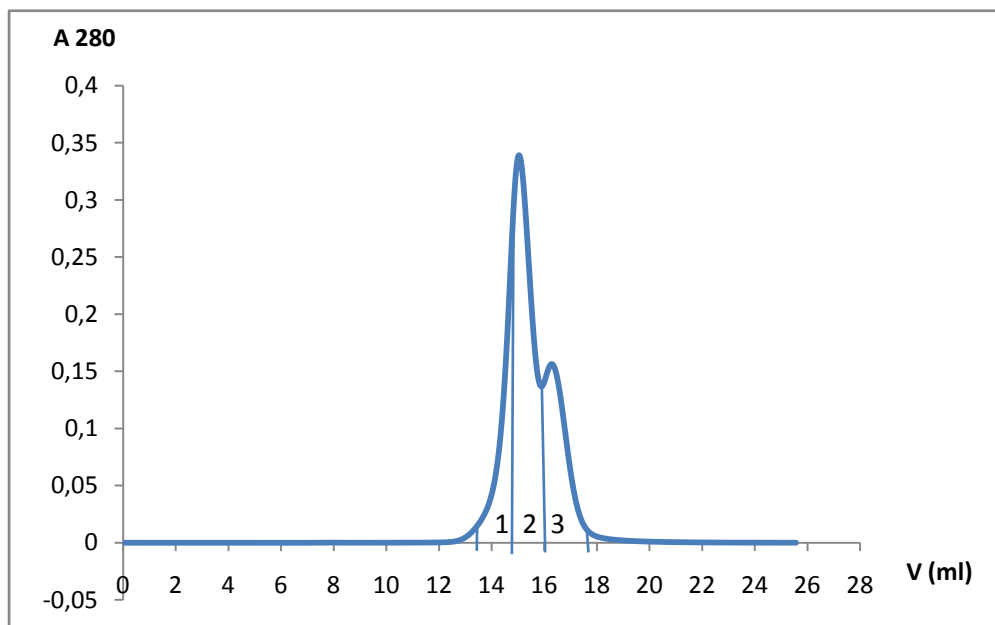


Obr. 16: Gelová permeační chromatografie pYD5-N1 (GPC). Separace proběhla na koloně Superdex 200 10/300 GL, čísla značí frakce 1 – 2 – dimer pYD5-N1, 3 – dimer pravděpodobně ve směsi s monomerem, 4 – monomer

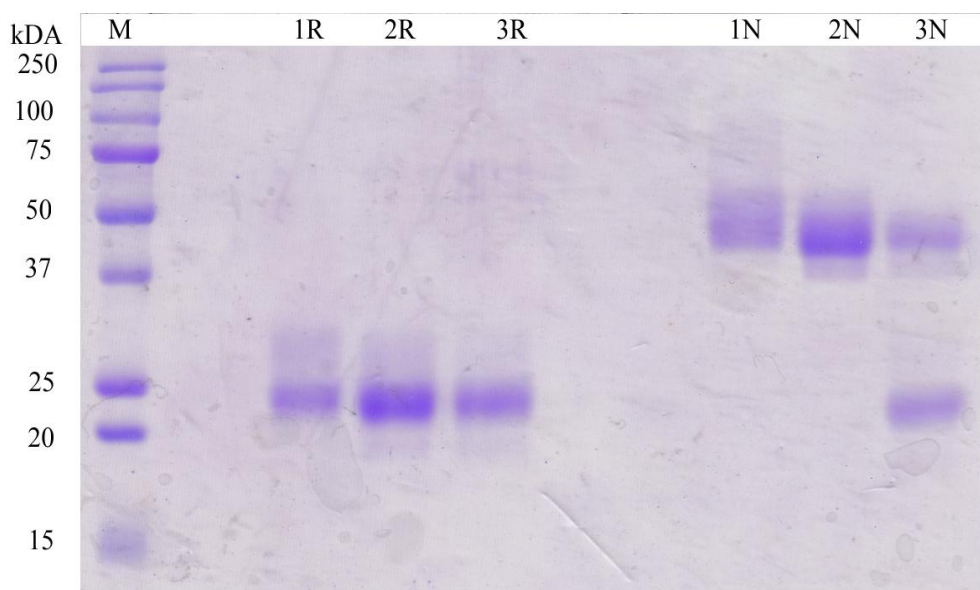


Obr. 17: SDS elektroforéza proteinu pYD5-N1, R – značí vzorky v redukujícím pufru, N – v nerdukujícím pufru, frakce 1 a 2 – dimer pYD5-N1 (46 kDa), frakce 3 – směs dimeru a monomeru, frakce 4 – monomer (23 kDa).

Frakce, kde se dimer nacházel ve směsi s monomerem, byly znovu zkoncentrovány a byla provedena další GPC a SDS elektroforéza (obr. 18 a 19, str. 49).



Obr. 18: Gelová permeační chromatografie pYD5-N1 (GPC). Separace proběhla na koloně Superdex 200 10/300 GL, čísla značí frakce 1 – 2 – dimer pYD5-N1, 3 – monomer



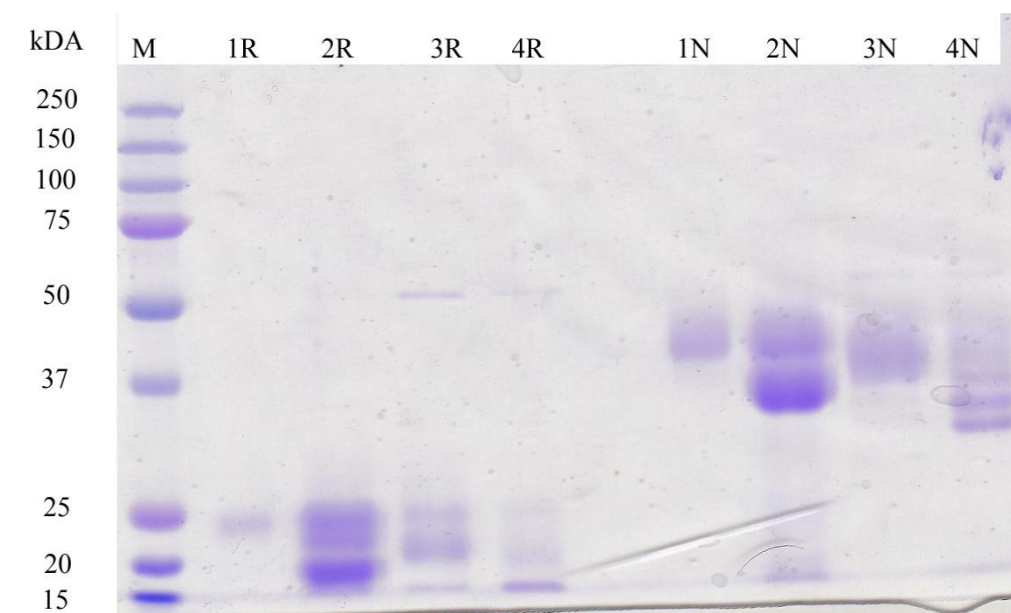
Obr. 19: SDS elektroforéza z GPC na obrázku 18, frakce 1, 2 – čistý dimer, frakce 3 – směs monomeru a dimeru, R – v redukujícím pufru, N – v neredukujícím pufru.

5.4. Deglykosylace proteinu a jeho krystalizace

Všechny čisté dimerní frakce byly spojeny a byla u nich změřena koncentrace metodou dle Bradfordové, která je popsána v bodě 4.14. Koncentrace byla 0,58 mg/ml v celkovém objemu 5,5 ml proteinu. Celkové množství připraveného proteinu bylo tedy 3,2 mg. Veškerý protein byl deglykosylován enzymem Endo F₁ postupem popsáným v bodě 4.15. Byla provedena SDS elektroforéza pro ověření, zda byl vzorek deglykosylován (*obr. 20, str. 50*).

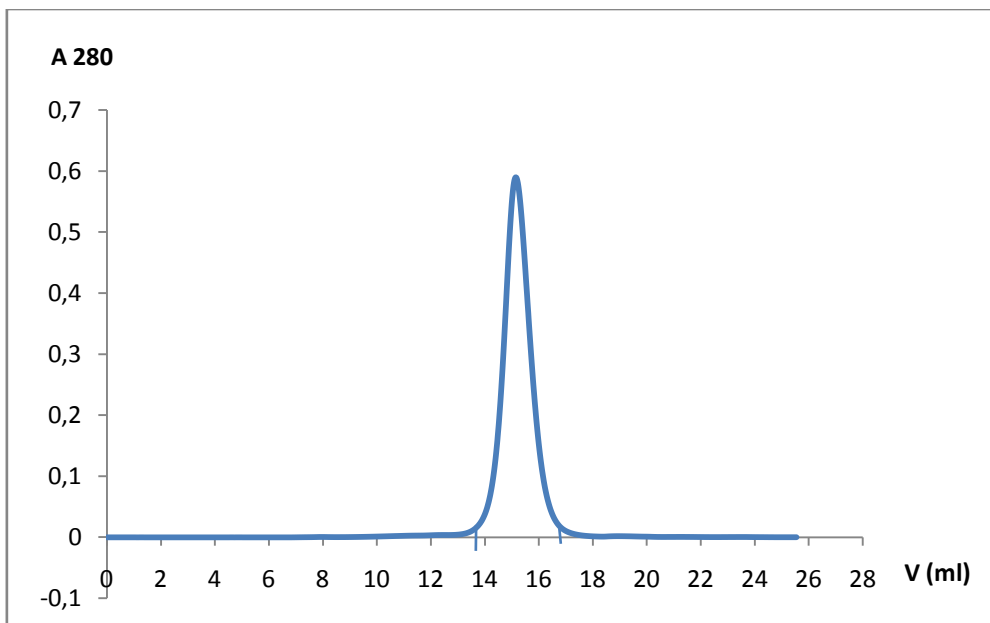
S tímto připraveným proteinem byl paralelně deglykosylován v druhé zkumavce protein pYD5-N1 připravený v roce 2012/13, na začátku mého magisterského studia, stejným postupem a který byl prozatím nevyužitý. Koncentrace proteinu pYD5-N1 z předešlého roku (označení pYD5-N1^{*}) byla 0,35 mg/ml v celkovém objemu 7 ml, celkem bylo tedy tohoto proteinu 2,45 mg.

Následně byla z proteinů Endo F₁ odstráňena postupem popsáným v kapitole 4.16. a byla provedena gelová permeační chromatografie, pro oddělení případných nečistot (*obr. 21, str. 51*). U proteinů byla změřena koncentrace dle Bradfordové (viz. 4.14), a proteiny byly zkoncentrovány do výsledné koncentrace 10 mg/ml. Konečné množství proteinu pYD5-N1 bylo 3,0 mg a pYD5-N1^{*} 2,1 mg. Deglykosylovaný dimer byl použitý na krystalizační pokusy popsané v bodě 4.17.



Obr. 20: SDS elektroforéza proteinu pYD5-N1 před a po deglykosylaci, R – vzorky v redukujícím pufru, N – vzorky v neredukujícím pufru, frakce 1 – dimer proteinu

pYD5-N1, frakce 2 – dimer deglykosylovaného proteinu pYD5-N1, 3 – dimer proteinu pYD5-N1*, 4 – deglykosylovaného proteinu pYD5-N1*



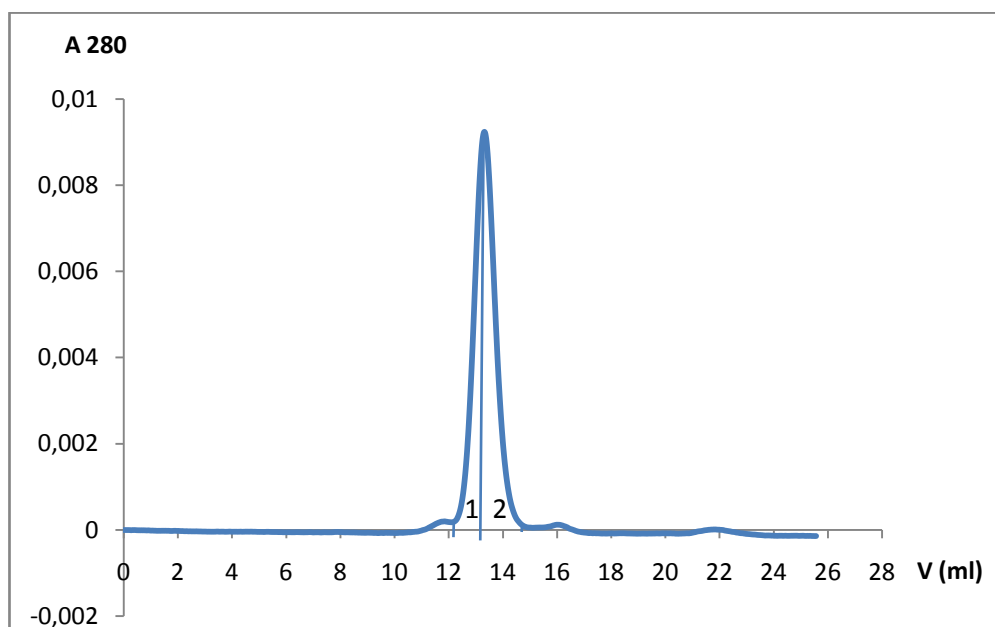
Obr. 21: GPC čistého dimeru po odstranění Endo F₁. Separace proběhla na koloně Superdex 200 10/300 GL.

5.5. Příprava proteinu expresí v buněčné linii HEK293T a jeho purifikace

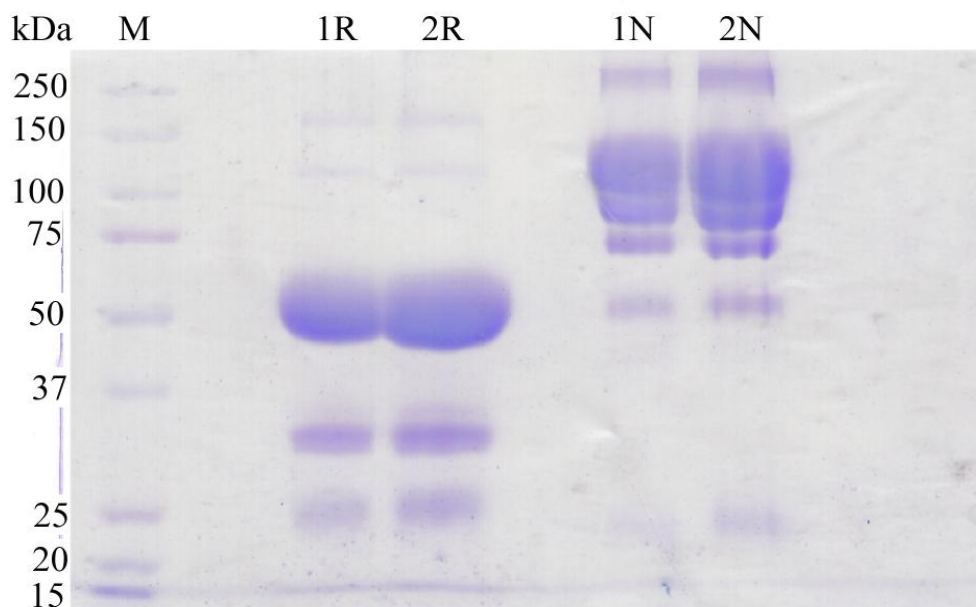
Transfekce byla provedena podle bodu 4.7 v celkovém objemu 800 ml média s množstvím $1,52 \cdot 10^9$ buněk. Po 4 dnech byla produkce sklizena. Viabilita buněk byla 80 % a buněčná hustota se ve všech lahvích pohybovala okolo $5,2 \cdot 10^6$ ml⁻¹.

Médium bylo neseno na kolonku „HiTrap mAb Select Sure“, kde se náš protein zachytil prostřednictvím Fc fragmentu. Bylo postupováno podle bodu 4.8 a eluce pYD5-N1 byla provedena citrátovým pufrem o pH = 3. Následovalo zkoncentrování proteinu (popsáno v kapitole 4.9) a gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL (popsáno v kapitole 4.10), kdy byla sledována absorbance při 280 nm (*obr. 22, str. 52*). Následně byla provedena SDS elektroforéza podle bodu 4.13 (*obr. 23, str. 52*). Obě Frakce byly spojeny a byla změřena koncentrace dle

Bradfordové postupem popsaným v bodě 4.14. Celkové množství proteinu bylo 1,4 mg. Vzorek byl zkoncentrován (popsáno v kapitole 4.9) na koncentraci 4,5 mg/ml.



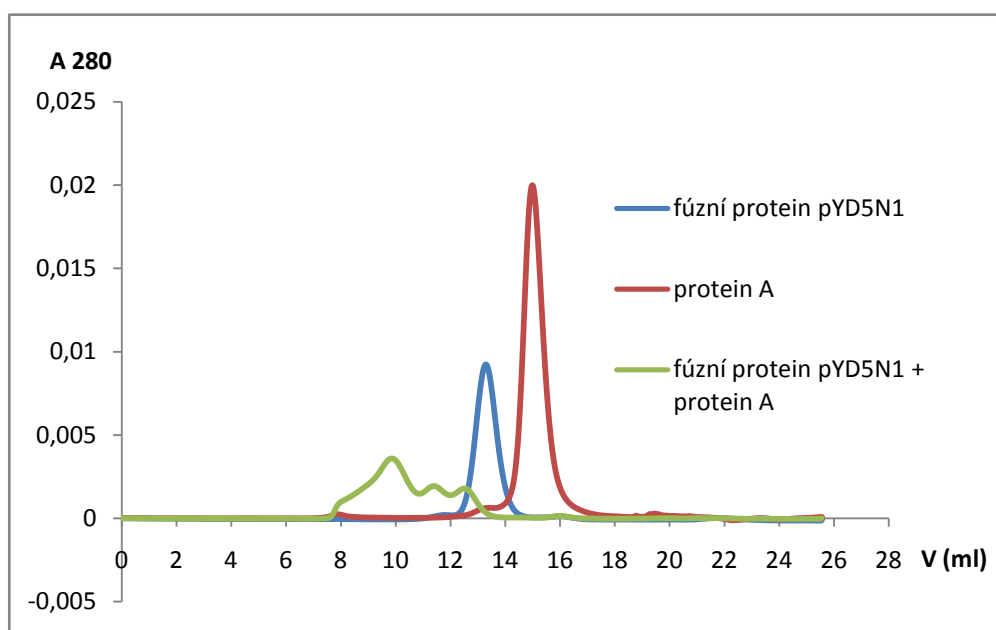
Obr. 22: Gelová permeační chromatografie pYD5-N1, separace proběhla na koloně Superdex 200 10/300 GL.



Obr. 23: SDS elektroforéza fúzního proteinu pYD5-N1 produkovaného v buněčné linii HEK293T, R – v redukujícím pufru, N – v neredukujícím pufru, čísla značí jednotlivé frakce nasbírané při GPC (viz obr. 22).

5.6. Tvorba komplexu fúzního proteinu se značeným proteinem A

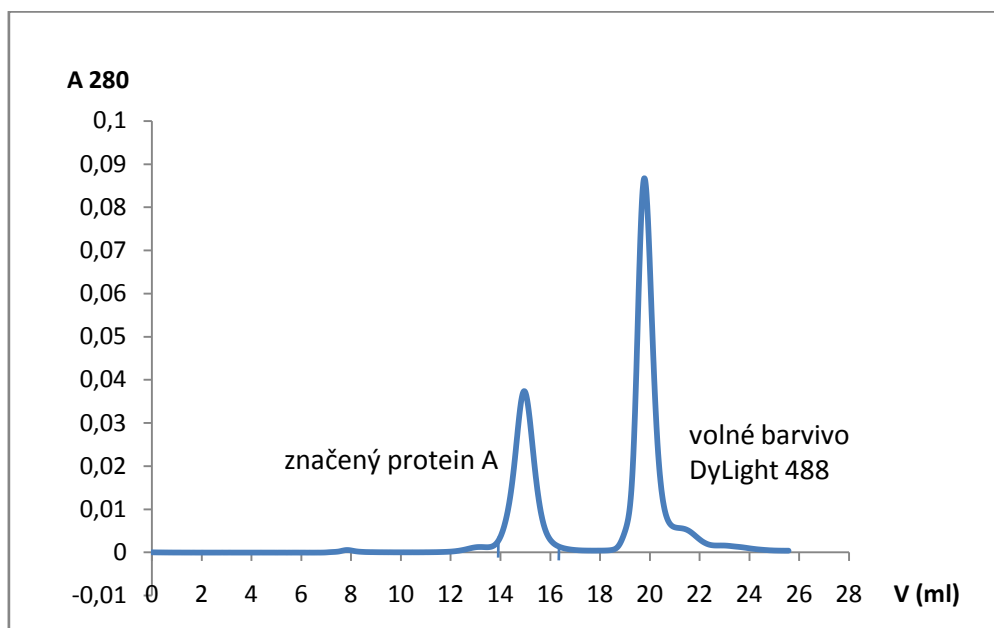
Nejprve byl připraven roztok 10 mg/ml proteinu A rozpuštěním v 1 ml 0,5 M H_3BO_3 o pH = 8,5. Z tohoto množství byly 2 mg nastříknuty na GPC (podle bodu 4.10) pro zjištění velikosti píku – odezva absorbance při 280 nm a retenčního objemu. Gelová permeační chromatografie byla provedena i se známým množstvím (50 μg) fúzního proteinu pYD5-N1. Dále byla vyzkoušena vazba 50 μg fúzního proteinu na protein A v molárním poměru 5:1. Inkubace proběhla 10 minut při pokojové teplotě a byla provedena GPC. Záznamy z GPC jsou zobrazeny na obr. 24, str. 53.



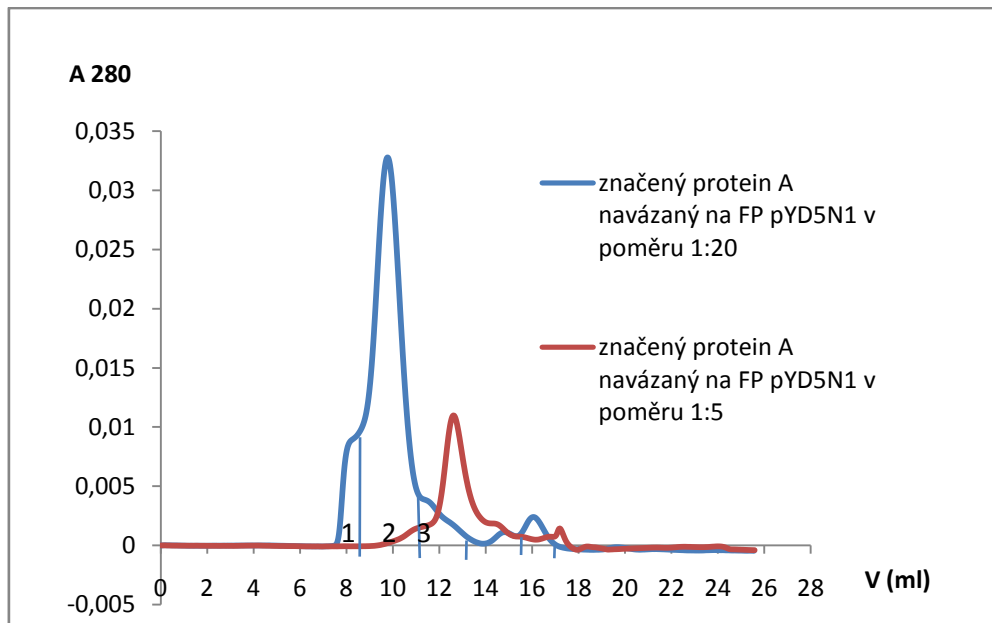
Obr. 24: Záznamy z GPC fúzního proteinu, proteinu A a komplexu fúzního proteinu s proteinem A. Ze záznamu je viditelné, že tvorbu komplexu je třeba zoptimalizovat, aby byl vytvořen homogenní vzorek, tedy ideálně jednotný pík s navázáním 5ti fúzních proteinů na protein A prostřednictvím Fc fragmentu.

Další 2 mg proteinu A byly přidány do alikvotu činidla NHS – DyLight 488 sondy a byly naznačeny podle postupu popsaného v bodě 4.18. Celé množství bylo

nastříknuto na kolonu Superdex 200 10/300 GL (*obr. 25, str. 54*). Následně byl takto značený protein A přidán k fúznímu proteinu v poměru 1:5 a dále v poměru 1:20, kdy byl fúzní protein v nadbytku. Inkubace probíhala 30 minut při pokojové teplotě a další 2 dny v lednici, poté byla provedena GPC (*obr. 26, str. 55*).



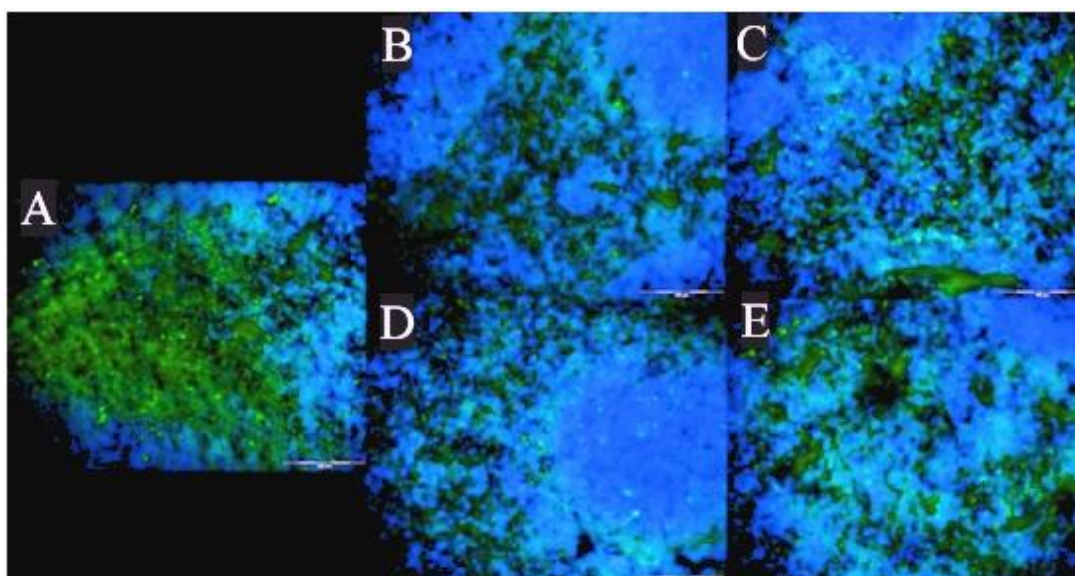
Obr. 25: GPC proběhla n koloně Superdex 200 10/300 GL. Separace značeného proteinu A od volného barviva DyLight 488.



Obr. 26: GPC komplexu fúzního proteinu (FP) pYD5-N1 a proteinu A (značeného fluorescenční sondou DyLight 488) v poměru 1:5 a 1:20. Ze záznamu je vidět, že bylo dosaženo vzniku velkého komplexu (frakce 2) FP a proteinu A.

5.7. Hledání ligandu na myších tkáních

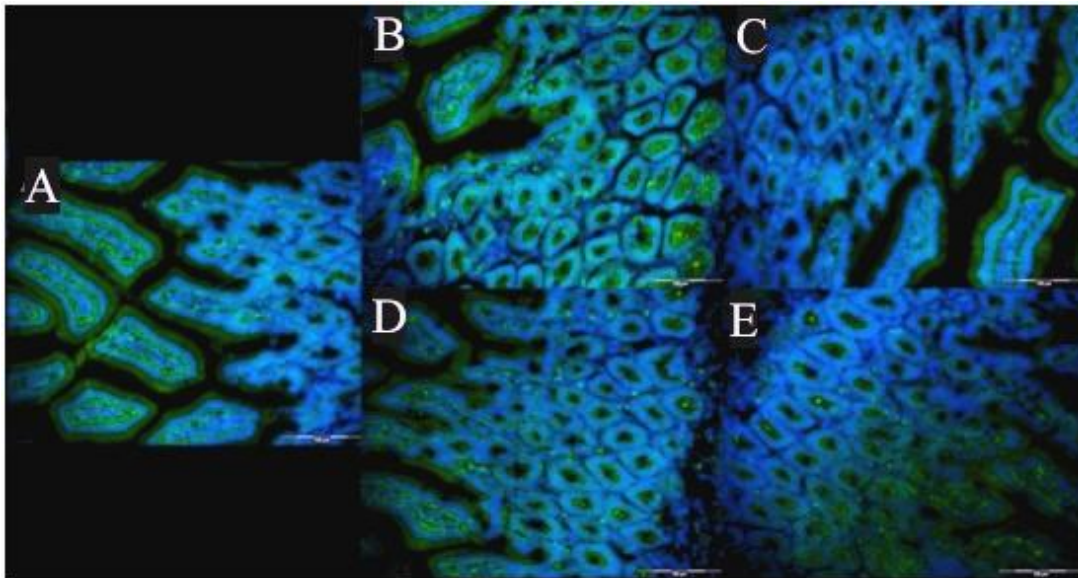
Značení kryožerů tkání z myši bylo provedeno v laboratoři buněčné biologie vedené doc. Janem Černým Ph.D, za pomoci Mgr. Valérie Grobárové Ph.D. Byly značeny kryožery myší sleziny a tenkého střeva, podle postupu, který je popsán v bodě 4.20. Ke každé tkáni byla připravena negativní kontrola (inkubace pouze s puřem), další negativní kontrola, tedy protein A naznačený fluorescenční sondou DyLight 488 v koncentracích 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Posledním vzorkem byl komplex značeného proteinu A a fúzního proteinu pYD5-N1 taktéž v koncentracích 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Vzorky byly změřeny na fluorescenčním mikroskopu Olympus Cell[^]R (obr. 27, str. 56 a obr. 28, str. 57). Naměřené odezvy jsou uvedeny v tabulkách 5.3 a 5.4 (str. 56 a str. 57).



Obr. 27: Vzorky na preparátu sleziny měřené na fluorescenčním mikroskopu Olympus Cell^R, zelená = fluorescence sondy DyLight 488, modrá fluorescence = buněčná jádra barvená sondou DAPI, A – negativní kontrola (nic), B – protein A značený DyLight 488 o $c=0,1 \mu\text{g/ml}$, C – protein A značený DyLight 488 o $c=1,0 \mu\text{g/ml}$, D – komplex fúzního proteinu pYD5-N1 se značeným proteinem A o $c=0,1 \mu\text{g/ml}$, E – komplex fúzního proteinu pYD5-N1 se značeným proteinem A o $c=1,0 \mu\text{g/ml}$.

Tab. 5.3: Odezvy fluorescence vzorků navázaných na preparát sleziny.

vzorky na preparátu sleziny	negativní kontrola	značený protein A, $c=0,1 \mu\text{g/ml}$	značený protein A, $c=1,0 \mu\text{g/ml}$	komplex FP pYD5-N1 a znač. proteinu A, $c=0,1 \mu\text{g/ml}$	komplex FP pYD5-N1 a znač. proteinu A, $c=1,0 \mu\text{g/ml}$
míra fluorescence	2465	2687	2198	3000	2113



Obr. 28: Vzorky na preparátu tenkého střeva měřené fluorescenčním mikroskopem Olympus Cell[^]R, zelená = fluorescence sondy DyLight 488, modrá fluorescence = buněčná jádra barvená sondou DAPI, A – negativní kontrola (nic), B – protein A značený DyLight 488 o $c=0,1 \mu\text{g/ml}$, C – protein A značený DyLight 488 o $c=1,0 \mu\text{g/ml}$, D – komplex fúzního proteinu pYD5-N1 se značeným proteinem A o $c=0,1 \mu\text{g/ml}$, E - komplex fúzního proteinu pYD5-N1 se značeným proteinem A o $c=1,0 \mu\text{g/ml}$.

Tab. 5.4: Odezvy fluorescence vzorků navázaných na preparát tenkého střeva.

vzorky na preparátu tenkého střeva	negativní kontrola	značený protein A, $c=0,1 \mu\text{g/ml}$	značený protein A, $c=1,0 \mu\text{g/ml}$	komplex FP pYD5-N1 a znač. proteinu A, $c=0,1 \mu\text{g/ml}$	komplex FP pYD5-N1 a znač. proteinu A, $c=1,0 \mu\text{g/ml}$
míra fluorescence	1064	614	962	811	1098

Z tabulky 5.3 a 5.4 (a obrázků 27, 28) je viditelná velká fluorescence negativní kontroly, což vypovídá o autofluorescenci samotných preparátů. Z výsledků tedy

nelze určit, zda se připravený komplex váže na některý z preparátů. Proto byla zvolena jiná metoda hledání vazebného partnera.

5.8. Hledání ligandu na buněčných liniích průtokovou cytometrií

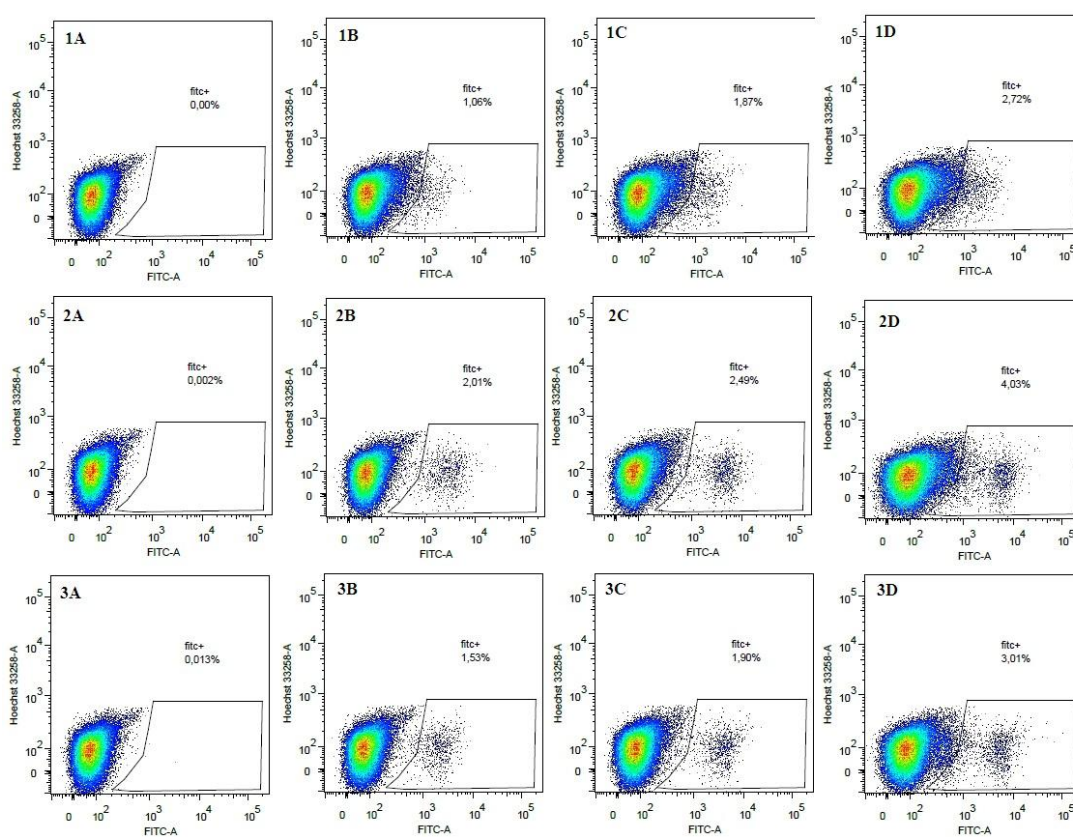
Ve spolupráci s RNDr. Jakubem Tomalou (Laboratoř nádorové imunologie, MBÚ AV ČR, v. v. i.), byl hledán ligand pro fúzní protein pYD5-N1 na buněčných liniích. Postup přípravy je uveden v bodě 4.21. Vzorke pipetované na 96 jamkovou destičku jsou uvedeny v tabulce 5.5. Vzorke byly pipetovány v různých koncentracích pro každou buněčnou linii. Seznam použitých buněčných linií je uveden v tabulce 5.6 (*str. 59*). Byly použité různé nádorové linie a slezinné buňky z myši BALB/c a C57BL/6. Vzorke byly měřeny na průtokovém cytometru a výsledky byly zpracovány do grafů (*obr. 29 a 30, str. 59 a 60*).

Tab. 5.5: Vzorke nanesené na 96 jamkovou destičku o uvedených koncentracích. Protein A značený fluorescenční sondou DyLight 488 sloužil jako negativní kontrola, následující vzorke komplexů jsou stejné, pouze při přípravě byl u posledního vzorku zvolen blokovací pufr s neznačeným proteinem A (předinkubace).

vzorke	koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]			
protein A značený fluorescenční sondou NHS - DyLigth 488	0	0,1	1	10
komplex fúzní protein pYD5-N1 a značený protein A				
komplex fúzní protein pYD5-N1 a značený protein A (předinkubace proteinem A)				

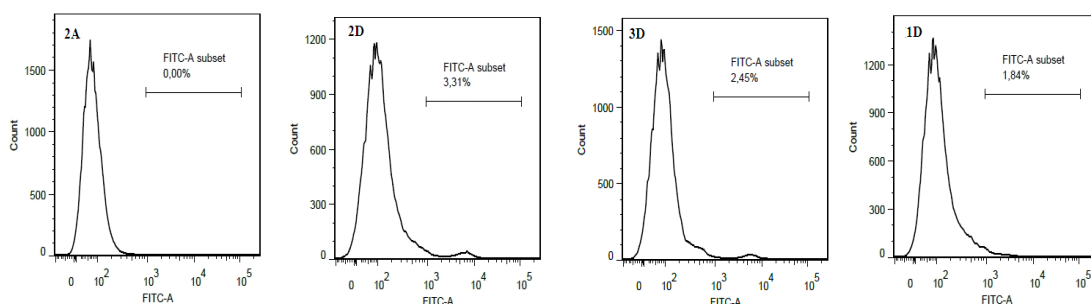
Tab. 5.6: Použité buněčné linie, tedy slezinné buňky a nádorové linie. Na každou buněčnou linii byly na 96 jamkové destičce navázány vzorky o různých koncentracích uvedené v tabulce 5.5.

Slezinné buňky		Nádorové linie							
BALB/c	C57BL/6	38C13 lymfom	EL4 IL2 lymfom	YAC-1	IC21	4T1 karcinom prsu	LL2 Lewis Lung karcinom 2	CT26 karcinom tlustého střeva	B16F10 melanom



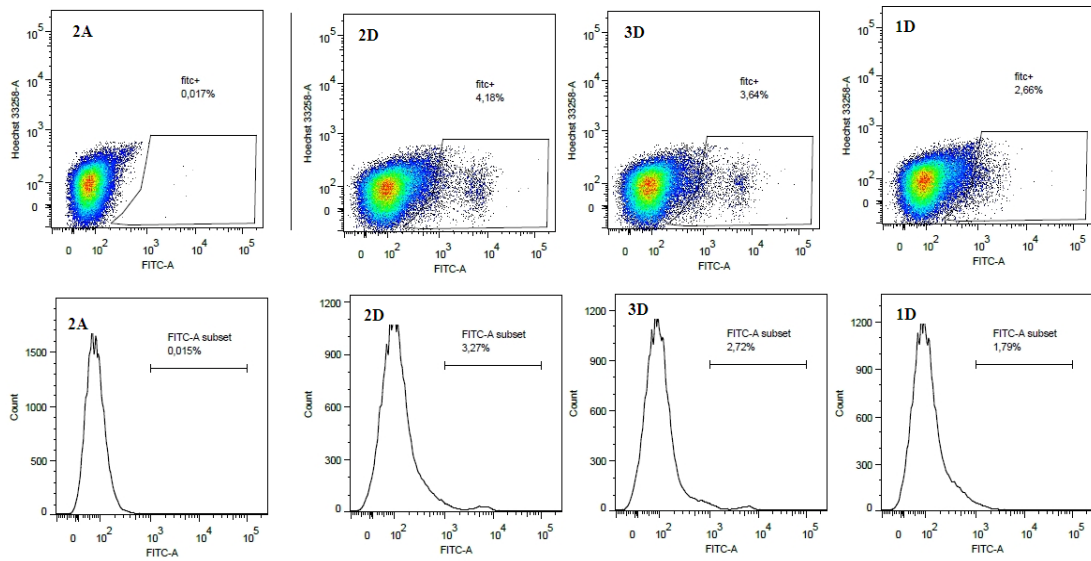
Obr. 29: Výsledky průtokové cytometrie – vazba na slezinné buňky z kmene myši BALB/c. Písmena A – D označují koncentrace vzorků A – 0 µg/ml, B – 0,1 µg/ml, C – 1,0 µg/ml, D – 10 µg/ml. 1 – je negativní kontrola protein A, 2 – komplex FP pYD5-N1 a značeného proteinu A, 3 – stejný vzorek připraven s předinkubací neznačeným proteinem A.

Z grafů je zřejmé, že i když se vzrůstající koncentrací je viditelná odezva i u samotného proteinu A, nejde o oddělenou populaci buněk jako při použití komplexu FP pYD5-N1 (vzorek 2 a 3). Jelikož je odezva oddělené populace buněk viditelná i u vzorku 3, u kterého došlo k předinkubaci proteinem A, lze předpokládat, že jde o specifickou vazbu fúzního proteinu pYD5-N1 na subpopulaci slezinných buněk. Pro ještě lepší viditelnost specifity vazby byly výsledky převedeny do histogramů (uveden histogram z 2A, 2D, 3D a 1D) (obr. 30, str. 60).



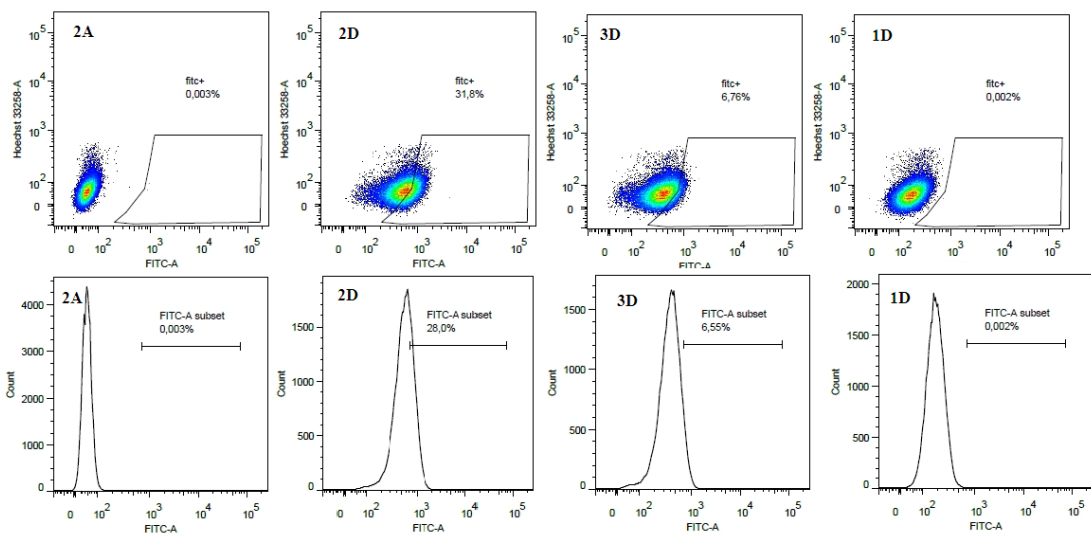
Obr. 30: Histogramy vazby FP pYD5-N1 na slezinné buňky z kmene myši BALB/c, 2A – kontrola bez přidavku vzorku, 2D – komplex FP pYD5-N1 se značeným proteinem A o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$, 3D – vzorek komplexu (10 $\mu\text{g/ml}$) s předinkubací neznačeným proteinem A, 1D – značený protein A (10 $\mu\text{g/ml}$).

Z histogramů je vidět, že v případě nulové odezvy se pík pohybuje v hodnotách intenzity řádově 10^2 , v případě specifické odezvy je viditelný další vrchol s odezvou již kolem 10^4 , zatímco u značeného proteinu A je vidět pouze zvýšené pozadí fluorescence, nikoliv další vrchol značící populaci buněk se specificky navázaným fúzním proteinem pYD5-N1. Další pozitivní odezva byla i u slezinných buněk kmene myši C57BL/6 (obr. 31, str. 61).



Obr. 31: Výsledky z průtokové cytometrie pro vazbu FP pYD5-N1 na slezinné buňky jmene myši C57BL/6. 2A – kontrola bez přidavku vzorku, 2D – komplex FP pYD5-N1 se značeným proteinem A o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$, 3D – vzorek komplexu o $c = 10 \mu\text{g/ml}$ s předinkubací neznačeným proteinem A, 1D – 10 $\mu\text{g/ml}$ značeného proteinu A (negativní kontrola).

U nádorových linií nebyla pozorována žádná vazba, až na linii 38C13, kde docházelo k posunu signálu celé buněčné populace (*obr. 32, str. 61*).



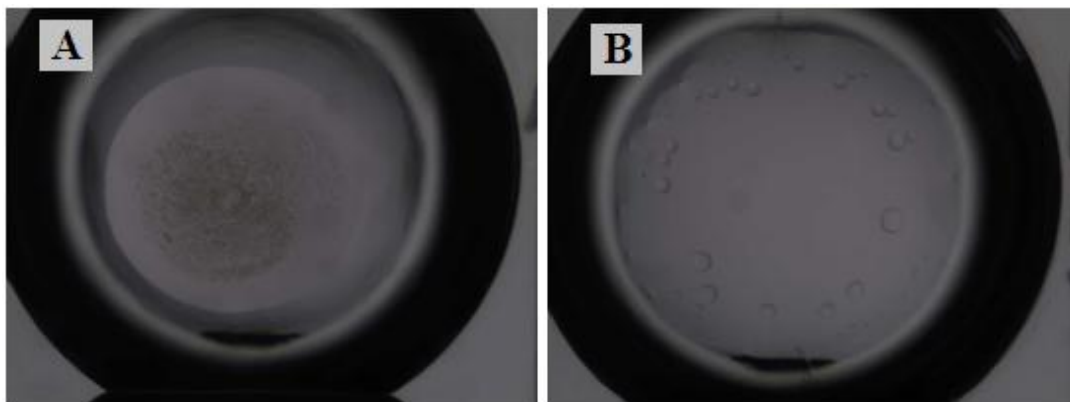
Obr. 32: Výsledky měření z průtokové cytometrie vazby FP pYD5-N1 na nádorovou linii 38C13. 2A – kontrola bez přidavku vzorku, 2D – komplex FP pYD5-N1 se

značeným proteinem A o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$, 3D – vzorek komplexu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ s předinkubací neznačeným proteinem A, 1D – značený protein A (negativní kontrola) o $c = 10 \mu\text{g/ml}$.

6. Diskuze

Jedním z cílů mé diplomové práce byla příprava dimerní rozpustné formy myšního receptoru NKR-P1C. V nativní formě se receptory této rodiny NKR-P1 vyskytují jako homodimery. Ke vzniku dimeru dochází díky cysteinům v oblasti tzv. „krčku“ (popis sekvence je uveden v kapitole 5.1). Oblast krčku spojuje transmembránovou část proteinu a C-lektinovou doménu. Připravovaný expresní konstrukt proteinu NKR-P1C zahrnuje pouze extracelulární část (včetně oblasti krčku) vloženou do expresního plazmidu pYD5. Protein byl připraven rekombinantní expresí pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293S ve fúzi s Fc fragmentem lidského IgG, který podporuje dimerizaci proteinu. Díky sekrečnímu signálu IgG přítomnému v plazmidu pYD5-N1 byl celý fúzní konstrukt NKR-P1C sekretován do kultivačního média, z něhož ho po oddělení buněk centrifugací bylo možno již snadno purifikovat. Purifikace proteinu zahrnovala afinitní chromatografii, kdy byl protein navázán na nosič protein A agarosu díky Fc fragmentu, gelovou permeační chromatografii a štěpení TEV proteasou, která odštěpí Fc fragment. Následně je chelatační chromatografií na nosiči Talonu, který je nabitý kobaltnatými ionty, TEV proteasa zachycena prostřednictvím své histidinové kotvy. Fc fragment je opět navázán na protein A agarosu. Poté byl gelovou permeační chromatografií oddělen dimer od monomeru a měl by být získán čistý dimerní protein. Zde nastal problém, jak je vidět z *obr. 12 (str. 45)*, kdy se rozštěpila pouze zhruba polovina z fúzního proteinu, první pík je tedy stále nerozštěpený fúzní protein. Příčinou by mohlo být používání TEV proteasy, kterou sami vyrábíme v naší laboratoři a tudíž nemusela mít dostatečnou aktivitu, jelikož podle již prověřených postupů bylo dáno k proteinu dostatečné množství TEV proteasy, štěpení probíhalo hodinu při 30 °C, což je optimální teplota při které TEV proteasa štěpí a dále byl protein s TEV proteasou ponechán vždy ještě několik dní v lednici při 4 °C. Frakce, kde nebyl Fc fragment odštěpen byly proto spojeny a štěpení bylo zopakováno stejným postupem, jen s větším množstvím TEV proteasy, aby byl rozštěpen již všechn fúzní protein. Do budoucna by bylo vhodné provést optimalizaci použití námi vyráběné TEV proteasy, jelikož nadbytek může mít i negativní vliv, kdy po odštěpení veškerého Fc fragmentu může TEV proteasa začít interagovat i s dalšími částmi proteinu. Dále bylo zřejmé, že je lepší čistit protein přes kolonku s protein A agarosou na HPLC systému a nikoliv pouze vsádkově. Při vsádkové metodě pravděpodobně nedošlo

k dostatečnému promíchání nosiče s roztokem proteinu, proto byly vzorky stále obsahující příměs volného Fc fragmentu (*obr. 13, str. 46*) znovu přečištěny přes kolonu s nosičem protein A agarosou a zde byl již zachycen všechen volný Fc fragment (*obr. 16, str. 48*). Následující gelovou permeační chromatografií byl ještě lépe odseparován dimer NKR-P1C od monomeru a byla ověřena čistota na SDS elektroforéze. Pro účely krystalizace byl protein vhodnější deglykosylovaný, proto byl k proteinu přidána enzym Endo F₁ a po deglykosylaci proteinu byl prostřednictvím Glutathion Sepharosy enzym odstraněn. Následně byly s proteinem provedeny krystalizační pokusy, bohužel se protein nepodařil dosud vykrytalizovat. Jak je již zmíněno v bodě 4.17, krystalizace je velice složitá, jelikož ji ovlivňuje značné množství proměnných. Je nutné nastavit podmínky tak, abychom se dostali do oblasti nukleace, kde se vytvoří krystalizační jádro a následně v metastabilní oblasti krystal roste (*obr. 6, str. 37*). Ideální je získat jeden velký krystal, u kterého se vyzkouší, zda difraktuje a pokud ano, následně je možné zjistit strukturu proteinu. V případě krystalizace NKR-P1C byl pozorován pouze vznik precipitátů, anebo separace fází, u které je možnost, že se ještě krystal později vytvoří (*obr. 33, str. 65*). Separace fází je relativně dobrým výchozím bodem pro vznik krystalu, proto by bylo dobré se do budoucna zaměřit na podmínky, ve kterých došlo k separaci fází.



Obr. 33: Ukázka krystalizačních kapek, A- vznik precipitátu, B- separace fází

Druhou částí mé diplomové práce bylo hledání ligandu s fúzním proteinem, který byl připraven rekombinantní expresí pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T ve fúzi s Fc fragmentem, který umožňuje imunodetekci. Buněčná linie HEK293S (použitá pro přípravu dimerní formy NKR-P1C) a HEK293T se od sebe

liší formou glykosylace. Zatímco u linie 293S je přítomna jednoduchá manosová glykosylace, u linie HEK293T je přirozená, komplexní glykosylace. Pro účely hledání vazebného partnera je tedy dobré, aby byl protein produkován v co nejpřirozenější formě. Následně byl protein purifikován afinitní chromatografií, kdy byl navázán na nosič protein A agarosu díky Fc fragmentu a přečištěn gelovou permeační chromatografií. Pro naše pokusy hledání vazebného partnera bylo výhodné, aby byl s fúzním proteinem vytvořen komplex, a proto byl prostřednictvím svého Fc fragmentu navázán na protein A, který má 5 vazebných míst pro Fc fragment. Vznikl tedy poměrně velký imunokomplex, u kterého předpokládáme vyšší afinitu, resp. aviditu vůči hledanému ligandu, než kdyby byl použit pouze samostatný fúzní protein. Další výhodou komplexu s proteinem A je, že jsme mohli fluorescenčně naznačit protein A (značen fluorescenční sondou DyLight 488) a fúzní protein byl tedy zachován v nativní formě.

S takto připraveným komplexem bylo nejprve provedeno značení kryožezů myší sleziny a tenkého střeva a následně byla sledována míra fluorescence na fluorescenčním mikroskopu. Bohužel z pokusu nevzešel žádný prokazatelný výsledek, zda se komplex na tyto tkáně váže, jelikož samotná autofluorescence tkání byla příliš velká (*viz obr. 27, 28 a tab. 5.3, 5.4, str. 56 a 57*). Proto jsme navrhli jiný postup, kdy zkusíme náš komplex navázat na buněčné linie a jeho vazbu sledovat průtokovou cytometrií. Pro pokus byly vybrány slezinné buňky z myších kmenů C57BL/6 a BALB/c a 8 různých nádorových linií. Na každé linii byl měřen značený protein A jako negativní kontrola, dále náš komplex fúzního proteinu se značeným proteinem A blokován myším sérem a stejný komplex, který byl blokován neznačeným proteinem A. Tato předinkubace proteinem A byla provedena, abychom mohli posoudit, zda je případná vazba na danou buněčnou linii specifická, jelikož protein A zablokoval místa, kam by se mohl komplex nespecificky vázat. Následovalo měření na průtokovém cytometru, ze kterého výsledky ukazují na specifické odezvy u slezinných buněk (*obr. 29, 30, 31, str. 59 – 61*), zatímco u nádorových linií nebyly pozorovány žádné vazby komplexů až na jednu linii a to 38C13 (*obr 32, str. 61*). U této nádorové linie došlo k posunu celé buněčné populace doprava, tedy směrem k pozitivnímu signálu. U vzorků značeného proteinu A, tedy negativní kontroly docházelo pouze k mírnému posunu, tudíž se nedostal do oblasti pozitivní odezvy fluorescence. Oba vzorky komplexu mají pozitivní odezvy, proto je

možné, že se na tuto nádorovou linii komplex specificky váže, ale vzhledem k velmi malým odezvám by bylo potřeba pokus zopakovat. Vysvětlením, proč se pohybuje do pozitivní odezvy celá buněčná populace, může být to, že nádorová linie je homogenní populace, zatímco u slezinných buněk se jedná o heterogenní populaci – směs různých lymfocytů i vlastních buněk tkáně sleziny samotné. U slezinných buněk jsou vidět pozitivní odezvy fluorescence i u proteinu A, nejde však o oddělenou populaci buněk jako u vzorků značených komplexem (*obr. 29, 30, 31, str. 59 – 61*), kde je odezva patrná ve formě oddělené buněčné subpopulace. Tato odezva oddělené buněčné subpopulace je viditelná i u vzorku komplexu, který byl předinkubován proteinem A. Lze tedy předpokládat, že u slezinných buněk jde o specifickou vazbu fúzního proteinu pYD5-N1 na doposud neidentifikovanou buněčnou subpopulaci sleziny, pravděpodobně některý z mnoha typů lymfocytů, které se v ní přirozeně vyskytují. Do budoucna by bylo dobré zjistit, na jaký druh lymfocytů se tento komplex váže.

7. Závěr

Rekombinantní expresí pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293S byl připraven čistý dimerní myší rozpustný protein pYD5-N1 v množství 5,1 mg. S deglykosylovaným proteinem byly nasazeny krystalizační pokusy, bohužel se dosud nepodařilo protein vykrystalizovat.

Dále byl připraven fúzní protein pYD5-N1 pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T v množství 1,4 mg. Následně byl vytvořen komplex fúzního proteinu s fluorescenčně značeným proteinem A (značen fluorescenční sondou DyLight 488). Tento komplex byl použit k hledání vazebného partnera na myších tkáních (slezina a tenké střevo) a na buněčných liniích (slezinné buňky a nádorové linie). Na slezinných buňkách byla pozorována specifická vazba fúzního proteinu.

8. Seznam citované literatury

1. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*. 4. vydání, Praha, Triton (2009)
2. Vodrážka, Z.: *Biochemie [1]*, Academia, Praha (1992)
3. Pazdera J.: Nobelova cena za objev dendritických buněk, (2011)
Dostupné z URL: <<http://osel.cz/index.php?clanek=5910>> [cit. 6.12.2013]
4. Bartůňková, J., Paulík, M. a kol., *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing, a.s. (2005)
5. Bier, O. G., Silva, W. D., Götze, D., Mota, I.: *Fundamentals of immunology*, Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin (1981)
6. Yokoyama W. M.: Recognition structures on natural killer cells. *Current Opinion in Immunology* 5, 67-73 (1993)
7. Raulet D. H.; Vance R. E.: Self-tolerance of natural killer cells. *Nature Reviews - Immunology* 6, 520-531 (2006).
8. Colonna M., Moretta A., Vély F., Vivier E.: A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function, *Immunology Today* 21, 428–431 (2000)
9. Stites D. P., Terr A. I.: *Basic and Clinical Immunology*, Praha, Victoria Publishing (1991)
10. Grégoire C., Chasson L., Luci C., Tomasello E., Geissmann F., Vivier E., Walzer T.: The trafficking of natural killer cells, *Immunological Reviews* 220, 169–182 (2007)
11. Vivier E., Raulet D. H., Moretta A., Caligiuri M. A., Zitvogel L., Lanier L. L., Yokoyama W. M., Ugolini S.: Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells, *Science* 331, 44–49 (2011) cit. dle: Herberman R. B., Nunn M. E., Lavrin D. H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity, *International Journal of Cancer* 16, 216–229 [PubMed: 50294] (1975)
12. Trinchieri G.: Biology of natural killer cells, *Advances in Immunology* 47, 187–376 (1989)
13. Freud A. G., Caligiuri M. A.: Human natural killer cell development, *Immunological Reviews* 214, 56-72 (2006)
14. Yawata M., Yawata N., Draghi M., Partheniou F., Little A. M., Parham P.: MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse

- human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response, *Blood* 112, 2369–2380 (2008)
15. Yokoyama W. M.: Natural killer cell receptors, *Current Opinion in Immunology* 7, 110-120 (1995)
 16. Kumar V., McNerney E. M.: A new self: MHC-class-I-independent Natural-killer-cell self-tolerance, *Nature Reviews Immunology* 5, 363-374 (2005)
 17. Vély F., Vivier E.: Natural Killer Cell Receptor Signaling Pathway, *Science Signaling STKE*, Issue 292, p. cm6 (2005)
 18. Hao L., Klein J., Nei M.: Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103, 3192–3197 (2006)
 19. Lanier L. L.: NK cell recognition, *Annual Reviews in Immunology* 23, 225-274 (2005)
 20. Smyth M. J., Cretney E., Kelly J. M., Westwood J.A., Street S. E., Yagita H., Takeda k., van Dommelen S. L., Delgi-Esposti M. A., Hayakawa Y.: Activation of NK cell cytotoxicity, *Molecular Immunology* 42, 501-510 (2005)
 21. Zamai L., Ahmad M., Bennett I. M., Azzoni L., Alnemri E. S., Perussia B.: Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells, *The Journal of Experimental Medicine* 188, 2375-2380 (1998)
 22. Middleton D.; Curran M.; Maxwell L.: Natural killer cells and their receptors. *Transplant Immunology* 10, 147-164 (2002)
 23. Martin A. M., Kulski J. K., Witt C., Pontarotti P., Christiansen F. T.: Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men, *Trends Immunology* 23, 81-88 (2002)
 24. Trowsdale J.: Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes, *Immunity* 15, 363-374 (2001)
 25. Lanier L. L.: Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition, *Nature Immunology* 9, 495-502 (2008)
 26. Jamil K. M., Khakoo S. I.: KIR/HLA Interactions and Pathogen Immunity, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 298348, 9 pages, (2011)

27. Dodd R. B., Drickamer K.: Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity, *Glycobiology* 11, 71-79 (2001)
28. Billadeau D. D., Upshaw J. L., Schoon R. A., Dick C. J., Leibson P. J.: NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway, *Nature Immunology* 4, 557-564 (2003)
29. Wu J., Song Y., Bakker A. B., Bauer S., Spies T., Lanier L. L., Phillips J. H.: An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10, *Science* 285, 730-732 (1999)
30. 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)
31. Timonen T., Helander T. S.: Natural killer cell-target cell interactions. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 667-673 (1997)
32. Kveberg L., Bäck C. J., Dai K. Z., Inngjerdigen M., Rolstad B., Ryan, J. C., Vaage J. T., Naper C.: The Novel Inhibitory NKR-P1C Receptor and Ly49s3 Identify Two Complementary, Functionally Distinct NK Cell Subsets in Rats, *Journal of Immunology* 176, 4133-4140 (2006)
33. Rozbeský D., Kavan D., Chmelík J., Novák P., Vaněk O., Bezouška K.: High-level expression of soluble form of mouse natural killer cell receptor NKR-P1C(B6) in *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification* 77, 178-184 (2011)
 cit. dle: Ryan, J. C., Seaman, W. E.: Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells, *Immunological Reviews* 155, 79-89 (1997)
34. Ryan, J. C., Turck, J., Niemi, E. C., Yokoyama, W. M., Seaman, W.E.: Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules, *Journal of Immunology* 149, 1631-1635 (1992)
35. Lanier L. L., Chang C., Phillips J. H.: Human NKR-P1A, a disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes, *Journal of Immunology* 153, 2417-2428 (1994)
36. 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)

37. Sovová Ž., Kopecký V. Jr., Pazderka T., Hofbauerová K., Rozbeský D., Vaněk O., Bezouška K., Ettrich R.: Structural analysis of natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) extracellular domains suggests a conserved long loop region involved in ligand specificity, *Journal of Molecular Modeling* 17, 1353–1370 (2011)
38. Carlyle J. R., Mesci A., Ljutic B., Belanger S., Tai L-H., Rousselle E., Troke A. D., Proteau M-F., Makrigrannis A. P.: Molecular and Genetic Basis for Strain-Dependent NK1.1 Alloreactivity of Mouse NK Cells, *Journal of Immunology* 176, 7511–7524 (2006)
39. Li J., Rabinovich B. A., Hurren R., Shannon J., Miller R. G.: Expression cloning and function of the rat NK activating and inhibitory receptors NKR-P1A and -P1B, *International Immunology* 15, 411-416 (2003)
40. Kolenko P., Rozbeský D., Vaněk O., Kopecký V. J., Hofbauerová K., Novák P., Pompach P., Hašek J., Skálová T., Bezouška K., Dohnálek J.: Molecular architecture of mouse activating NKR-P1 receptors, *Journal of Structural Biology* 175, 434-441 (2011)
41. Rozbeský D., Man P., Kavan D., Chmelík J., Černý J., Bezouška K., Novák P.: Chemical Cross-Linking and H/D Exchange for Fast Refinement of Protein Crystal Structure, *Analytical Chemistry* 84, 867–870 (2012)
42. Carlyle J. R., Martin A., Mehra A., Attisano L., Tsui F. W., Zúñiga-Pflücker J. C.: Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function, *Journal of Immunology* 162, 5917-5923 (1999)
43. Plougastel B., Matsumoto K., Dubbelde C., Yokoyama W. M.: Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse Nkrp1 cluster of genes: cloning of three new Nkrp1 members, Nkrp1d, Nkrp1e, and Nkrp1f, *Immunogenetics* 53, 592-598 (2001)
44. Carlyle J. R., Jamieson A. M., Gasser S., Clingan Ch. S., Arase H., Raulet D. H.: Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 3527-3532 (2004)
45. Aust J. G., Gays F., Mickiewicz K. M., Buchanan E., Brooks C. G.: The Expression and Function of the NKR-P1 Receptor Family in C57BL/6 Mice, *Journal of Immunology* 183, 106-116 (2009)

46. Kveberg L., Dai K. Z., Inngjerdingen M., Brooks C. G., Fossum S., Vaage J. T.: Phylogenetic and functional conservation of the NKR-P1F and NKR-P1G receptors in rat and mouse, *Immunogenetics* 63, 429-436 (2011)
47. Giorda R., Trucco M.: Mouse NKR-P1. A family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine-activated killer cells, *Journal of Immunology* 147, 1701-1708 (1991)
48. Mesci A., Ljutic B., Makrigianni, A. P., Carlyle J. R.: NKR-P1 Biology, *Immunology Research* 35, 13-26 (2006)
49. Arase N., Arase H., Park S. Y., Ohno H., Ra C., Saito T.: Association with Fc γ Is Essential for Activation Signal through NKR-P1 (CD161) in Natural Killer (NK) Cells and NK1.1+ T Cells, *The Journal of Experimental Medicine* 186, 1957-1963 (1997)
50. Brumbaugh K. M., Binstadt B. A., Billadeau D. D., Schoon R. A., Dick Ch. J., Ten R. M., Leibson P. J.: Functional Role for Syk Tyrosine Kinase in Natural Killer Cell-mediated Natural Cytotoxicity, *The Journal of Experimental Medicine* 186, 1965-1974 (1997)
51. Protokoly k soupravě PureLink™ HiPure Plasmid DNA (Invitrogen, USA).
Dostupné z URL:
<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_hipure_plasmid_dna_purification_man.pdf> [cit. 25.3.2014]
52. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685 (1970)
53. Grueninger-Leicht F., D'Arcy A., D'Arcy B., Chene Ch.: Deglycosylation of proteins for crystallization using recombinant fusion protein glycosidases, *Protein science* 5, 2617-2622 (1996)
54. Snell E. H., Nagel R.M., Wojtaszyk A., O'Neill H., Wolfley J.L., Luft J.R.: The application and use of chemical space mapping to interpret crystallization screening results, *Acta Crystallografical section D - Biological Crystallography* 64, 1240-1249 (2008)
55. výpčet koncentrace plazmidu . Dostupné z URL:
<<http://www.endmemo.com/bio/OD260.php>> [cit. 18.4.2014]

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka