

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Kalousková

PŘÍPRAVA GLYKOSYLOVANÉ FORMY LIDSKÉHO
IMUNORECEPTORU NKp30

Preparation of glycosylated form of human immunoreceptor
NKp30

Bakalářská práce

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

Praha 2014

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

PROHLÁŠENÍ

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

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

V Praze dne 26. května 2014

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za jeho trpělivost, cenné rady a odborné konzultace. Také děkuji Mgr. Janu Bláhovi za jeho ochotu, velkou pomoc při experimentální práci a za poskytnutí vstupního materiálu, na kterém je celá práce založena. V neposlední řadě musím poděkovat také všem členům laboratoře 204 za spolupráci a vytvoření vřelého pracovního prostředí.

ABSTRAKT

NK buňky (z angl. natural killer cells, přirozeně zabíječské buňky) hrají klíčovou roli v přirozené imunitě. Jejich úkolem je rozpoznávat a eliminovat infikované, stresované nebo maligně transformované buňky. K rozpoznání buněk slouží řada povrchových receptorů. Pro eliminaci buněk slouží cytotoxické mechanismy, které vedou k indukci apoptózy v cílové buňce. Jedním ze spouštěčů cytotoxické reakce je receptor NKp30, patřící společně s NKp46 a NKp44 do rodiny NCR (z angl. natural cytotoxicity receptors).

Tato práce popisuje přípravu receptoru NKp30 s přirozenou i s jednoduchou glykosylací v expresním systému lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (HEK293). Bylo zjištěno, že glykosylovaný receptor NKp30 tvoří nekovalentní oligomery. Mezi oligomery a monomery v roztoku se ustavuje rovnováha. Oligomerizace je závislá na glykosylaci, deglykosylovaný protein oligomery netvoří.

Za účelem deglykosylace byla připravena rekombinantní endoglykosidasa ENDO F₁.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňka, NKp30, receptor, glykosylace, oligomerizace, HEK293

ABSTRACT

NK cells (natural killer cells) play a key role in innate immunity. Their function is to recognize and kill infected, stressed or malignantly transformed cells. A range of surface receptors promotes this recognition. Cytotoxic mechanisms, lead to induction of apoptosis in the target cell. Receptor NKp30 is one of cytotoxic reaction triggers. It belongs, with NKp46 and NKp44, to NCR (natural cytotoxicity receptors) family.

This work describes preparation of NKp30 receptor with natural and simple glycosylation in expression system of human embryonic kidney cell line 293 (HEK293). It was found that glycosylated receptor NKp30 forms noncovalent oligomers. Equilibrium is formed in solution between oligomers and monomers. Oligomerization depends on glycosylation, deglycosylated protein doesn't form oligomers.

A recombinant endoglycosidase ENDO F₁ was prepared for purposes of deglycosylation.

KEY WORDS

NK cell, NKp30, receptor, glycosylation, oligomerization, HEK293

(This work is written in Czech)

SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
APS	peroxodisíran amonný, z angl. ammonium persulfate
B7-H6	receptor z rodiny B7, ligand NKp30
BAG6	ligand NKp30, z angl. BCL2-associated athanogene 6
BAT3	jiný název pro BAG6, z angl. HLA-B-associated transcript 3
bp	pár bází (jednotka délky DNA), z angl. base pair
BSA	hovězí sérový albumin, z angl. bovine serum albumine
CBB	modré barvivo, z angl. Coomassie brilliant blue
CD	označení povrchových molekul, z angl. cluster of differentiation
CTLD	doména podobná lektinům C-typu, z angl. C-type lectin-like domains
DAP12	12 kDa adaptorový protein, z angl. DNAX activating protein 12
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Fas	receptor indukující apoptózu, člen rodiny receptoru TNF
Fc	část molekuly protilátky, z angl. fragment crystalizable
FPLC	rychlá proteinová kapalinová chromatografie, z angl. fast protein liquid chromatography
GnTI	buňky deficientní na N-acetylglukosaminyltransferasu I
HEK293	označení linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293, z angl. human embryonic kidney cell line 293
HLA	lidský hlavní histokompatibilní komplex, z angl. human leukocyte antigen
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, angl. high-performance liquid chromatography
IgG	imunoglobulin G
IL-3	interleukin 3, jeden z cytokinů
ILT	receptor z imunoglobulinové superrodiny, z angl. immunoglobulin-like transcript
INF γ	interferon γ , jeden z cytokinů
IPTG	isopropylthiogalaktopyranosid, syntetický induktor <i>lac</i> operonu

ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv, z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
kb	kilobáze (jednotka délky DNA), z angl. kilobase pair
KIR	zabíječský receptor z imunoglobulinové superrodiny, z angl. killer cell immunoglobulin-like receptor
LB	kultivační médium, z angl. lysogeny broth
LIR	receptor z imunoglobulinové superrodiny na povrchu lymfocytů, z angl. leukocyte Ig-like receptors
IPEI	lineární polyethylenimin
MHC gp I	glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy, z angl. major histocompatibility complex glycoproteins class I
MICA	stresem indukovaný protein podobný MHC gp I, z angl. MHC class I-related chain A
MICB	stresem indukovaný protein podobný MHC gp I, z angl. MHC class I-related chain B
MWCO	propustnost membrány proteinových koncentrátorů, z angl. molecular weight cut off
NK	přirozený zabíječ, z angl. natural killer
NCR	receptor přirozené cytotoxicity, z angl. natural cytotoxicity receptor
NKG	receptory NK buněk podobné lektinům C-typu
NKp30	receptor NK buněk o velikosti 30 kDa, z angl. natural killer cell protein 30 kDa
NKp44	receptor NK buněk o velikosti 44 kDa, z angl. natural killer cell protein 44 kDa
NKp46	receptor NK buněk o velikosti 46 kDa, z angl. natural killer cell protein 46 kDa
NKp65	receptor NK buněk o velikosti 65 kDa, z angl. natural killer cell protein 65 kDa
NKp80	receptor NK buněk o velikosti 80 kDa, z angl. natural killer cell protein 80 kDa

NKRP1	rodina receptorů NK buněk podobný lektinům C-typu, z angl. NK receptor protein 1A
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok, z angl. phosphate buffered saline
PCR	polymerázová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
PDB	databáze proteinových struktur (z angl. Protein data bank)
PfEMP1	protein na povrchu erytrocytů nakažených <i>P. falciparum</i> , z angl. <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein-1
PMSF	fenylmethylsulfonyl florid, inhibitor serinových proteas
SDS	dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
SDS PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsíranu sodného
Tc	cytotoxické T lymfocyty
TCR	antigenně specifický receptor T lymfocytů, z angl. T-cell receptor
TEMED	tetramethylethylendiamin
TES	fyziologický roztok pufovaný Tris s přidavkem EDTA
TNF	faktor nekrotizující nádory, z angl. tumor necrosis factor
TRAIL	receptor indukující apoptózu, z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
(v/v)	objem/objem
(w/v)	hmotnost/objem

OBSAH

1	Teoretický úvod.....	11
1.1	Imunitní systém.....	11
1.2	NK buňky.....	11
1.2.1	Funkce.....	11
1.2.2	Cytotoxické mechanismy.....	12
1.3	Receptory na povrchu NK buněk.....	12
1.3.1	Inhibiční receptory.....	13
1.3.2	Aktivační receptory.....	14
1.4	Rodina receptorů NCR.....	15
1.4.1	NKp46.....	16
1.4.2	NKp44.....	17
1.4.3	NKp30.....	18
2	Cíle práce.....	22
3	Materiál.....	23
3.1	Přístroje a pomůcky.....	23
3.2	Chemikálie.....	24
3.3	Enzymy.....	25
3.4	Kultivační média.....	25
3.5	Roztoky.....	26
3.6	Pufry pro enzymy.....	27
3.7	Vektory.....	27
3.8	Primery pro PCR.....	27
3.9	Buněčné linie a bakteriální kmeny.....	27
4	Metody.....	28
4.1	Příprava expresního vektoru.....	28
4.1.1	Izolace zásobního množství plazmidové DNA.....	28
4.1.2	Měření koncentrace a čistoty DNA.....	28
4.1.3	Elektroforéza v agarosovém gelu.....	29
4.1.4	PCR.....	29
4.1.5	Štěpení restrikčními enzymy.....	29
4.1.6	Ligace.....	30
4.1.7	Transformace.....	30
4.1.8	PCR z kolonií.....	30
4.1.9	Izolace plazmidové DNA.....	31
4.1.10	Sekvenace.....	31

4.1.11	Velkoobjemová produkce plazmidu.....	31
4.2	Produkce rekombinantních proteinů	32
4.2.1	Počítání buněčné hustoty	32
4.2.2	Kultivace buněčné linie HEK293	32
4.2.3	Transfekce linie HEK293T	33
4.2.4	Transfekce linie HEK293S GnTI	33
4.2.5	Produkce ENDO F ₁	34
4.3	Purifikace proteinů	34
4.3.1	Purifikace proteinu NKp30.....	34
4.3.2	Purifikace ENDO F ₁	35
4.4	Manipulace s proteiny	36
4.4.1	Zakoncentrování	36
4.4.2	Gelová permeační chromatografie.....	36
4.4.3	Určení koncentrace	36
4.4.4	SDS PAGE.....	36
4.5	Ověření enzymatické aktivity ENDO F ₁	37
4.6	Studium oligomerního stavu NKp30	38
4.6.1	Opakované nástřiky	38
4.6.2	Deglykosylace spojených frakcí	38
4.6.3	Opakované nástřiky deglykosylovaných frakcí.....	39
4.6.4	Sedimentační analýza	39
5	Výsledky.....	40
5.1	Příprava expresního vektoru.....	40
5.2	Produkce proteinu NKp30 v linii HEK293T.....	41
5.2.1	Purifikace proteinu NKp30 z produkce v linii HEK293T	42
5.2.2	Sedimentační analýza proteinu NKp30	43
5.3	Produkce proteinu NKp30 v linii HEK293S GnTI	45
5.3.1	Purifikace proteinu NKp30 z produkce v linii HEK293 GnTI	45
5.4	Produkce proteinu ENDO F ₁ v bakteriálním kmeni BL21-Gold (DE3).....	47
5.4.1	Purifikace proteinu ENDO F ₁	48
5.4.2	Ověření enzymatické aktivity ENDO F ₁ – deglykosylace NKp30	50
5.5	Studium oligomerního stavu NKp30 produkovaného v HEK293S GnTI ...	51
6	Diskuse	54
7	Závěr.....	56
8	Seznam citované literatury	57

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 IMUNITNÍ SYSTÉM

Úkolem imunitního systému je zajištění obranyschopnosti, autotolerance a imunitního dohledu [1]. Pod zajištěním obranyschopnosti rozumíme obranu proti patogenům a toxickým patogenním produktům, které pochází z vnějšího prostředí. Další funkcí je zajištění tolerance k tělu vlastním buňkám, což je hlavní mechanismus pro udržení homeostázy. Imunitní dohled znamená rozlišování vnitřních škodlivin, které vznikají v těle a musí být eliminovány. Jedná se o odstraňování starých, apoptotických nebo jinak poškozených buněk a buněk, které procházejí maligními změnami.

1.2 NK BUŇKY

Zvláštní místo v imunitním systému mají NK buňky (z angl. natural killer cells, přirozeně zabíječské buňky, přesněji však přirození zabijáci) [1]. Jsou to granulární lymfocyty, které na svém povrchu nemají antigenně specifické receptory. Netvoří tedy součást specifické imunity, jako ostatní buňky odvozené od lymfoidního prekursoru, ale jsou součástí nespecifické imunity. Díky svým povrchovým molekulám jsou schopné rozeznávat a následně eliminovat buňky, které se chovají abnormálně.

1.2.1 FUNKCE

NK buňky eliminují buňky, které na svém povrchu nesou abnormálně málo MHC gp I (glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy, z angl. major histocompatibility complex glycoproteins class I) [2]. Za normálních okolností jsou MHC gp I přítomné na všech jaderných buňkách. Díky nim tělo pozná, že se jedná o tělu vlastní buňky a je nutné k nim zachovat toleranci. Buňky procházející maligními změnami potlačují expresi MHC gp I, aby unikly pozornosti imunitního systému. Právě tento fenotyp však rozpoznávají NK buňky.

Pozornost NK buněk přitahují také proteiny, které nejsou na povrchu buněk normálně přítomné a objevují se jako reakce na stres [2]. Jako buněčný stres rozumíme například poškození DNA nebo virovou infekci. NK buňky jsou tedy schopné eliminovat nakaženou buňku i s patogenem, který unikl všem ostatním složkám nespecifické imunity, ještě před tím, než se infekce stihne rozšířit.

Aktivované NK buňky kromě přímé eliminace abnormálně pozměněných buněk produkují řadu látek, které podporují ostatní imunitní mechanismy [1]. Produkují INF γ (faktor nekrotizující nádory, z angl. tumor necrosis factor), IL-3 (interleukin 3) a další látky důležité pro modulaci imunitního systému a pro rozvoj specifické imunitní reakce.

Buňkami s podobnými funkcemi jsou Tc lymfocyty (cytotoxické T lymfocyty) [1]. Mají podobnou stavbu i funkci, ale na svém povrchu nesou antigenně specifický TCR (z angl. T-cell receptor), proto patří k adaptivním imunitním mechanismům. NK buňky dokáží eliminovat abnormální buňky, které unikly Tc lymfocytům.

1.2.2 CYTOTOXICKÉ MECHANISMY

Hlavním cílem NK buněk je aktivovat v poškozené buňce její vlastní eliminační mechanismy [1]. Takovým mechanismem je apoptóza, kterou jsou NK buňky schopné v cílové buňce aktivovat.

Jedním ze způsobu aktivace apoptotických mechanismů je využití fyziologického systému ligand-receptor [2]. NK buňky aktivují receptory ze superrodiny receptoru TNF (receptory pro Fas, TNF a TRAIL). Po aktivaci tyto receptory vyvolávají v buňce řadu reakcí, která má za výsledek programovanou buněčnou smrt.

Druhým způsobem je využití cytotoxických granulí, které NK buňky obsahují [2]. Účinky cytotoxických látek obsažených v granulích se vzájemně doplňují. Perforin vytvoří póry v buněčné membráně, aby skrze ně mohly do buňky proniknout granzymy, které aktivují apoptózu.

NK buňky mají na svém povrchu také Fc receptor CD16 [1]. Díky němu se může navázat na buňky opsonizované protilátkami IgG, což spustí kaskádu reakcí vedoucích k aktivaci cytotoxických mechanismů. Tento způsob aktivace NK buněk se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách.

1.3 RECEPTORY NA POVRCHU NK BUNĚK

Typickými povrchovými znaky NK buněk jsou molekuly CD16 a CD56. Kromě nich se na povrchu NK buněk nachází velké množství molekul s rozdílnými funkcemi. Obecně je můžeme rozdělit na inhibiční a aktivační. [3] Aktivace NK buněk je kontrolována rovnováhou mezi signály z aktivačních a inhibičních receptorů [4].

Ze strukturního hlediska patří receptory na povrchu NK buněk mezi imunoglobuliny nebo mezi receptory podobné lektinům C-typu (z angl. C-type lectin-like).

Velký počet receptorů patří mezi imunoglobuliny [5]. Tzv. imunoglobulinová nadrodina zahrnuje velké množství proteinů s různými fyziologickými funkcemi. Všechny však ve své struktuře obsahují jednu nebo více imunoglobulinových domén. Jedná se o strukturu s hlavním motivem β -skládaného listu. Jádro struktury tvoří 4 β -skládané listy v antiparalelním postavení. Tyto řetězce jsou spojené smyčkami s dalšími β -skládanými listy, jejichž počet se u různých proteinů liší. Celá doména má globulární tvar. Struktura je navíc stabilizovaná disulfidovým můstkem mezi dvěma cysteiny.

Na povrchu NK buněk je hned několik receptorů s imunoglobulinovou strukturou [4]. Patří mezi ně rodina receptorů KIR (z angl. killer cell immunoglobulin-like receptor), rodina receptorů LIR (z angl. leukocyte Ig-like receptors, také LILR nebo ILR), rodina receptorů NCR (z angl. natural cytotoxicity receptor) a receptor CD16.

Druhou velkou skupinu tvoří receptory podobné lektinům C-typu (anglicky C-type lectin-like) [6]. Charakteristická CTLD (z angl. C-type lectin-like domains) má strukturu dvojitě smyčky stabilizované dvěma disulfidovými můstky. První ze smyček tvoří vnitřní část domény stabilizovanou dvěma disulfidovými můstky. Druhá smyčka je variabilnější a účastní se interakce s vápenatými ionty a sacharidovými ligandy. I když všechny receptory podobné lektinům C-typu obsahují motiv CTLD, váží proteinové ligandy. U některých navíc není vazba na ligand závislá na přítomnosti vápenatých iontů (např. receptor NKG2D) [7].

Do skupiny lektinů C-typu nacházejících se na NK buňkách patří receptory rodiny NKG2 (NKG2A-F, heterodimer NKG2A, C, F/CD94) [4]. Jejich ligandy jsou glykoproteiny MHC I. Dalšími zástupci jsou například členové rodiny NKRP1 (z angl. NK receptor protein 1; NKRP1A, NKp65, NKp80) [8].

Obě strukturní skupiny zahrnují jak aktivační, tak inhibiční receptory. Přehled aktivačních a inhibičních receptorů znázorňuje Tab. 1, str. 14.

1.3.1 INHIBIČNÍ RECEPTORY

Inhibiční receptory rozeznávají různé alelické formy MHC gp I [1]. Tím je zajištěna tolerance k tělu vlastním buňkám vykazujícím z hlediska struktury MHC gp I normální fenotyp. Pokud je na MHC gp I navázán abnormální peptid, pocházející například z virového obalu, inhibiční receptor se na něj naváže s menší afinitou, nebo ho nerozpozná vůbec. Absence inhibičních signálů pak může vést k aktivaci NK buňky.

Nejvíce inhibičních receptorů patří do rodiny KIR [9]. Tato rodina je velice heterogenní a rozeznává velké množství MHC gp I. Dále jsou to receptory podobné lektinům C-typu, například heterodimer CD94/NKG2A. Další skupinou jsou imunoglobulinové receptory LIR (z angl. leukocyte Ig-like receptors). Tyto receptory najdeme také na B lymfocytech. Mají nižší afinitu k MHC gp I než receptory KIR.

1.3.2 AKTIVAČNÍ RECEPTORY

Ligandy aktivačních receptorů jsou abnormální proteiny vyskytující se na buňkách nakažených virovou infekcí nebo procházejících maligními změnami a také abnormální formy MHC gp I, jako je například stresem indukovaný protein MICA (MHC class I-related chain A) [4].

Aktivačními receptory, které spouštějí buněčnou cytotoxicitu, jsou receptory KIR, C-lektinové receptory (receptor NKG2D, který váže protein MICA) a receptory přirozené cytotoxicity NCR (z angl. natural cytotoxicity receptor) [4]. Dále sem patří také receptor CD16, který váže Fc fragment protilátek. Reakci NK buněk tak mohou spustit i buňky, které mají na svém povrchu navázanou protilátku.

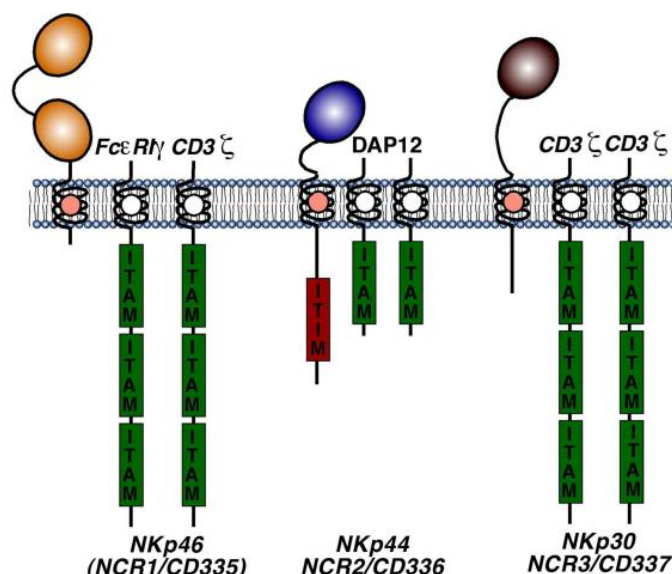
	Skupina receptorů	Zástupci	Příklady ligandů
Inhibiční receptory	CTLR (C-type lectin-like receptors)	CD94/NKG2A	HLA-E
	LIR (leukocyte Ig-like receptors)	ILT-2	HLA-A, B, C, E, F, G, CMV UL18
	KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor)	KIR3DL KIR2DL4	HLA-A, HLA-B HLA-G
Aktivační receptory	CTLR (C-type lectin-like receptors)	CD94/NKG2C,E NKG2D	HLA-E MICA, MICB
	NCR (natural cytotoxicity receptor)	NKp30 NKp44 NKp46	B7-H6, BAT3 NKp44L Hemagglitinin viru chřipky
	KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor)	KIR2DS	HLA-C
	Fc receptor	CD16	IgG

Tab. 1 Přehled aktivačních a inhibičních receptorů na povrchu NK buněk

1.4 RODINA RECEPTORŮ NCR

Rodina receptorů NCR (z angl. natural cytotoxicity receptors) zahrnuje tři povrchové molekuly, které se vyskytují na povrchu NK buněk. NKp46 (také NCR1, CD335) a NKp30 (také NCR3, CD337) jsou stále přítomné na povrchu, třetí receptor NKp44 (také NCR2, CD336) je exprimovaný pouze u aktivovaných NK buněk [4, 10]. Jsou to receptory schopné při kontaktu se svými ligandy přenést do buňky aktivační signál a tím spustit cytotoxické mechanismy. Ligandy se nachází na povrchu nádorových nebo virem infikovaných buněk. Spektrum ligandů NCR je široké. Zahrnuje molekuly virového, bakteriálního a parazitárního původu a také stresem indukované molekuly produkované v tělu vlastních buňkách. NK buňky jsou schopné rozpoznat své ligandy hned napoprvé, bez předchozího setkání. Díky tomu umožňují rychlé odstranění zasažených buněk.

Ze strukturního hlediska se jedná o transmembránové receptory s jednou (NKp44 a NKp30) nebo se dvěma (NKp46) extracelulárními imunoglobulinovými doménami [10], jak znázorňuje Obr. 1. Pro přenesení signálu asociují s adaptorovými proteiny. Hlavním aktivačním motivem v intracelulární doméně adaptorů je ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Receptor NKp44 má ve své intracelulární doméně navíc inhibiční motiv ITIM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Z hlediska funkce se navzájem doplňují.



Obr. 1 Schématické znázornění receptorů z rodiny NCR [10]. Obrázek schématicky znázorňuje receptory z rodiny NCR i s jejich adaptorovými proteiny CD3ζ, FcεRIγ a DAP12. Barevné ovály znázorňují extracelulární imunoglobulinové domény. Zeleně je znázorněn aktivační motiv ITAM adaptorových proteinů. Jedině receptor NKp44 obsahuje vlastní intracelulární inhibiční motiv ITIM, znázorněno červeně.

heparansulfáty, vyskytující se na povrchu nádorových buněk [21]. Zatím neidentifikovaný ligand NKp46 je také exprimován některými zdravými β -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu, což vede k eliminaci těchto buněk a k rozvoji diabetu I. typu [22].

1.4.2 NKp44

Dalším receptorem z rodiny NCR je NKp44 (též NCR2), který je přítomný pouze na povrchu aktivovaných NK buněk [4]. Tento receptor je kódován geny nacházejícími se na 6 chromosomu (6p21.1). Jeho extracelulární část tvoří jedna imunoglobulinová doména (Obr. 2B, str. 16) a krček, který ji spojuje s transmembránovým regionem. Intracelulární část obsahuje motiv ITIM (Obr. 1., str. 18), o kterém se myslelo, že není funkční [23]. Později bylo zjištěno, že pouze některé ligandy jsou schopné vyvolat buněčnou signalizaci skrze motiv ITIM. Díky lysinu v transmembránovém regionu asociuje NKp44 s dimerem adaptorových proteinů DAP12, které přenáší do buňky aktivační signály.

Jedním z ligandů je PCNA (z angl. Proliferating Cell Nuclear Antigen) [24]. PCNA je silně exprimován rychle se množícími buňkami, tedy rakovinnými nebo například buňkami během prvního trimestru embryonálního vývoje. PCNA je lokalizován uvnitř buňky, pokud je však produkován ve velkém množství, některé molekuly se dostávají na povrch, kde tvoří komplex s HLA I. Díky tomuto komplexu je PCNA prezentován NKp44. Signál, který NK buňka dostane je inhibiční [25]. Díky tomu je na jedné straně zajištěna imunitní tolerance v děloze, ale zároveň díky tomuto mechanismu unikají nádorové buňky imunitnímu dohledu [14].

NKp44 se váže na hemaglutitiny a neuraminidasy některých virů z čeledi *Orthomyxoviridae* (chřipka A) nebo *Paramyxoviridae* (Sendai virus, virus Newcastleké nemoci) [16]. Dalším ligandem jsou glykoproteiny virové obálky horečky dengue a západonilské horečky [26]. Receptor NKp44 je schopný vázat také složky buněčné stěny *Mycobacterium tuberculosis* [27].

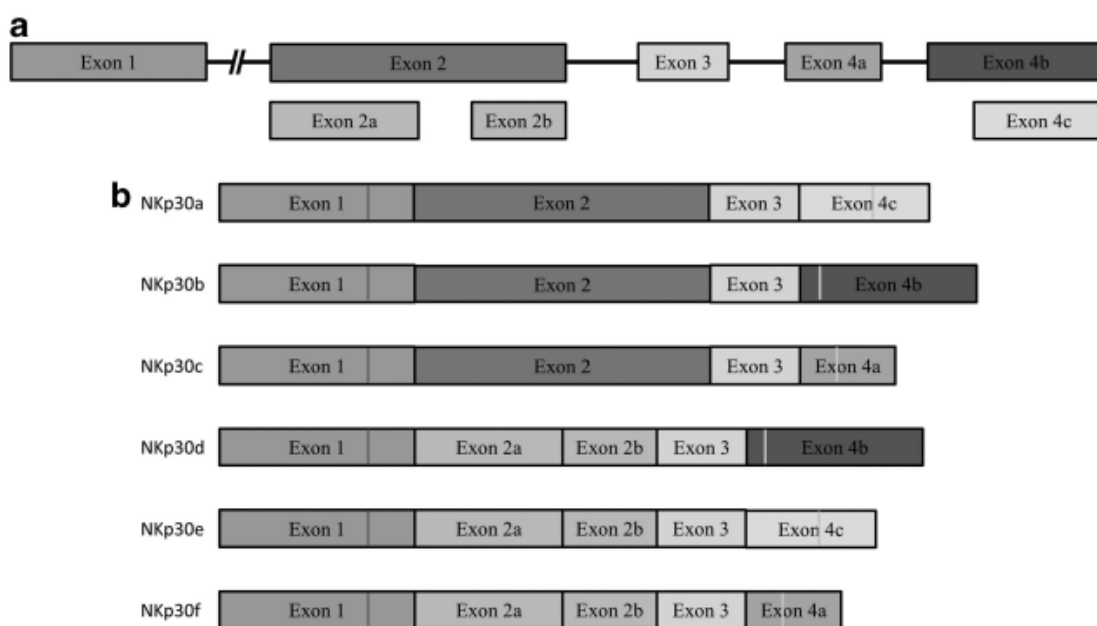
Mezi buněčné ligandy NKp44 patří hparin a heparansulfáty a také NKp44L, které jsou exprimované na nádorových buňkách [18, 26].

1.4.3 NKp30

Posledním dosud známým členem rodiny NCR je receptor NKp30 (též NCR3). Nachází se na povrchu aktivovaných i neaktivovaných NK buněk. Receptor má jednu extracelulární imunoglobulinovou doménu (Obr. 2C, str. 16) spojenou s membránou krčkem. Transmembránový region obsahuje nabitý arginin, díky kterému asociuje s adaptorovým proteinem CD3 ζ tvořícím homodimer [28].

Všechny tři receptory z rodiny NCR spolu úzce spolupracují a vzájemně se doplňují. Díky tomu jsou schopné aktivovat cytotoxické mechanismy NK buněk. Receptor NKp30 má však výsadní postavení při rozpoznávání a zabíjení nádorových buněk [28].

Gen pro NKp30 je lokalizován na šestém chromosomu (6p21.3 [29]) v těsné blízkosti genu NKP44, odtud podobnost obou receptorů. Gen NKP30 se skládá z několika exonů (Obr. 3a). Během posttranskripčních modifikací dochází k sestřihu. Díky několika možným alternativním sestřihům (Obr. 3b) vzniká šest různých isoform receptoru NKp30 [30]. Isoformy NKp30a a NKp30b působí imunostimulačně, jsou schopné aktivovat NK buňku, naopak isoforma NKp30c působí imunosupresivně [31]. Ostatní isoformy zatím nebyly experimentálně charakterizovány.



Obr. 3 Schematické znázornění struktury genu pro receptor NKp30 a varianty a alternativního sestřihu. a) struktura genu pro NKp30, b) alternativní sestřih, isoformy a, b jsou aktivní [14]

Na Obr. 4 je aminokyselinová sekvence s vyznačenými významnými částmi. Žlutě zvýrazněná imunoglobulinová doména je připojena krátkou sekvencí k transmembránovému regionu. Zeleně zvýrazněná část na pomezí extracelulární a transmembránové části obsahující 15 aminokyselin je označována jako krček (v angličtině stalk domain). Svůj strukturní význam mají také asparaginy na pozicích 42, 68 a 121 [30]. Tyto asparaginy jsou N-glykosylovány. Délka krčku a glykosylační stav receptoru NKp30 hrají velmi důležitou roli při interakci s ligandy [32].

MAWMLLLILIMVHPGSCA **LWVSQPPEIRTLEGSSAFLPCSF** **N**ASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKE
VR**N**GTPEFRGRLAPLASSRFLHDHQAELHIRDVRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTG**N**GTRLVVE**K**
EHPQLGACTVLLLR**AGFYAVSFLSVAV**GSTVYYQGKCLTWKGPRRQLPAVVPAPLPPPCGSSAH
 LLPPVPGG

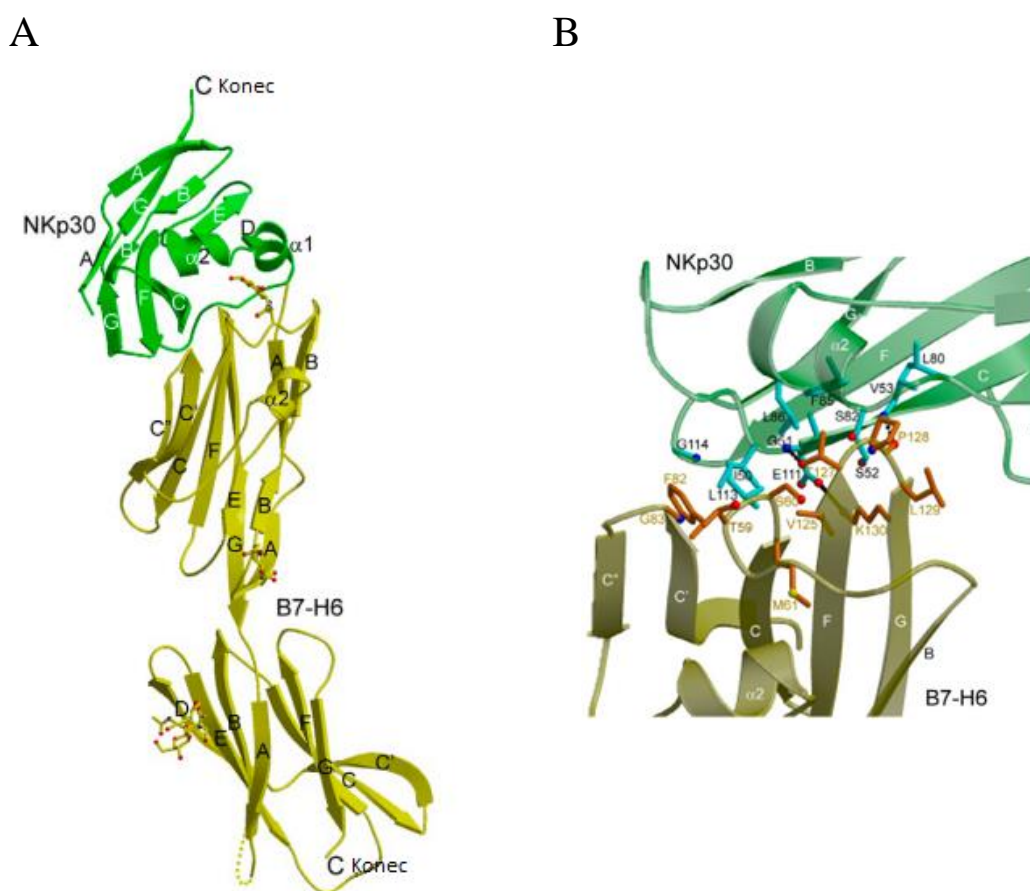
Obr. 4 Aminokyselinová sekvence NKp30 s vyznačenými významnými částmi [30, 32]. Signální peptid (1-18), extracelulární doména (19-135), Ig doména (19-128), krček (angl. stalk domain, 129-143), transmembránový region (136-156), cytoplazmatická doména (157-201), místa pro N-glykosylaci (42, 48 a 121)

I přes to, že se jedná o aktivační receptor, existují ligandy, které po navázání inhibují přirozenou cytotoxicitu. Jedná se například o protein pp65 produkovaný lidským cytomegalovirem [33]. Po navázání ligandu disociuje NKp30 od svých adaptorových proteinů, což způsobí zablokování aktivačních mechanismů. Dalším ligandem, který blokuje cytotoxicitu NK buněk je hemaglutinin viru vakcínie. Jedná se o jeden z mechanismů viru jak uniknout imunitnímu systému [17].

Mezi aktivační ligandy patří *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP1), exprimovaný na povrchu erytrocytů nakažených malárií [20]. Dalšími aktivačními ligandy jsou heparin a heparansulfáty [21]. Tyto molekuly mohou sloužit spíše jako koligandy. I tady je pro vazbu velmi důležitá glykosylace receptoru. [34]

BAG-6 (z angl. BLC2-associated anthanogene 6, také Bat-3) je dalším ligandem NKp30. Jedná se o multifunkční protein plnící funkci chaperonu, který může mít podle aktuálních fyziologických požadavků buňky různou buněčnou lokaci [35]. Membránová forma BAG-6 vyskytující se na povrchu dendritických buněk nebo na povrchu exosomů je aktivačním ligandem pro NKp30 [36]. Naproti tomu rozpustná forma BAG-6 (konstrukt o délce 250 aminokyselin, obsahující aminokyseliny 686 až 936 z C-terminální části) po navázání na receptor cytotoxicitu inhibuje [37].

Dalším ligandem je membránový protein B7-H6, člen imunoreceptorové rodiny B7 (Obr. 5A). B7-H6 se vyskytuje pouze na povrchu nádorových buněk, na zdravých buňkách ho nenajdeme [38]. Strukturálně patří mezi imunoglobuliny se dvěma imunoglobulinovými doménami. Vazby se účastní koncová doména (N-terminální), vzdálenější od buněčné membrány. Tato doména je pro vazbu dostačující, bez ohledu na zbytek struktury [39]. Přímé interakce se účastní 12 aminokyselin NKp30 a 11 aminokyselin molekuly B7-H6 (Obr. 5B). Tvar rozhraní obou molekul je vysoce komplementární. Převažují hydrofobní interakce, z rozhraní jsou vytlačeny všechny molekuly vody [40]. Síla vazby je závislá na glykosylaci receptoru NKp30 a na úplnosti krčku (části spojující imunoglobulinovou doménu a transmembránový region) [32].



Obr. 5 Komplex NKp30-B7-H6 [39] Zelená představuje NKp30, žlutá (okrová) B7-H6. **A** komplex NKp30-B7-H6, **B** detail vazebného místa komplexu NKp30-B7-H6 s vyznačenými aminokyselinami účastnicími se kontaktu

Právě interakce NKp30 - B7-H6 má velký potenciál v léčbě rakoviny. Za tímto účelem byl připraven fúzní protein obsahující extracelulární doménu B7-H6 a fragment protilátky 7D8 rozpoznávající antigen CD20. Tento protein se váže na receptor CD20,

přítomný na povrchu CD20⁺ lymfomů, a zároveň na receptor NKp30. Má tedy schopnost cíleně aktivovat cytotoxicitu NK buněk v těsné blízkosti nádorových buněk [41]. Obdobně pro cílení efektorových T buněk proti B7-H6⁺ tumorům byl vyvinut chimérický receptor NKp30 (chNKp30). Ten obsahuje extracelulární imunoglobulinovou doménu NKp30, transmembránový region optimalizovaný pro povrchovou expresi a aktivační intracelulární doménu tvořenou CD3 ζ nebo CD28, která přenesení signál do buňky a nastartuje reakci. Modifikované T-buňky exprimující chNKp30 jsou schopné účinně eliminovat nádorové buňky nesoucí na povrchu receptor B7-H6 [42].

Pro aktivaci receptoru NKp30 je důležitá také oligomerizace. Receptor NKp30 má schopnost tvořit homooligomery, které mají vyšší afinitu k ligandu B7-H6. Formace oligomerů závisí na krčku a pravděpodobně také na glykosylaci. Oligomerizace je dalším možným mechanismem hrajícím roli při aktivaci NK buněk přes receptor NKp30 [43].

2

CÍLE PRÁCE

- Příprava expresního vektoru pro produkci extracelulární domény receptoru NKp30
- Produkce a následná purifikace glykosylované extracelulární domény receptoru NKp30 v expresním systému HEK293T a HEK293S GnTI
- Studium oligomerního stavu extracelulární domény receptoru NKp30 v závislosti na jeho glykosylaci
- Příprava rekombinantní endoglykosydasy v expresním systému *E. coli*

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I	Beckman Coulter, USA
Aparatura pro filtraci	Sigma, USA
Automatické pipety	Discovery HTL, Polsko
Automatické pipety	Pipetman Gilson, USA
Centrifuga 5415 R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Spectrofuge 16M	Edison, USA
Centrifuga Universal 320 R	Hettich, Německo
Čtečka mikrotitračních destiček Sunrise	Tecan, Rakousko
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare, USA
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, USA
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor, CO ₂ MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Inkubátor IR 1500	LABsystem Praha, ČR
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Německo
Kahan Fuego SCS	VERKON, ČR
Kolona Hitrap MabSelect SuRe	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Koncentrátory Amicon Ultra (MWCO 10 000)	Millipore, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-Lab, ČR
Laminární box Clean Air.	PMV, Nizozemí
Laminární box BIO 126	LABOX, ČR
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, USA
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
Nosič pro chelatační chromatografii TALON	Clontech, USA
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Německo

pH metr Φ 200	Beckman Coulter, USA
Pipetovací nástavec Midiplus	Biohit, USA
Plastik pro tkáňové kultury	Corning, Německo
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	Savant, USA
Souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone, USA
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Spektrofotometr NanoVue Plus	GE Healthcare, UK
Spektrofotometr UV/VIS UV4-500	UNICAM, UK
Termocykler 0,5 ml x 20	Techne, UK
Třepačka Orbi-Safe TS	Gallenkamp, UK
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Vaň	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

3.2 CHEMIKÁLIE

100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkapt ethanol	Sigma, USA
Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR
APS	Serva, USA
Azid sodný	Serva, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
BSA	New England Biolabs, USA
Combi PPP master mix	Top-Bio, ČR

Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
DMSO	Finnzymes, Finsko
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, ČR
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
IPTG	Sigma, USA
L-glutamin	Sigma, USA
Leupeptin	Sigma, USA
GoodView II	Ecoli, Slovensko
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, SR
Kyselina valproová	Sigma, USA
IPEI 25 kDa	Polysciences, USA
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, USA
MgSO 4, 100 mM	New England Biolabs, USA
PCR H ₂ O	Top-Bio, ČR
Pluronic F-68	Sigma, USA
PMSF	Thermo Scientific, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
TEMED	Serva, USA
Tris	Roth, Německo
Trypanová modř	Sigma, USA
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, ČR

3.3 ENZYMY

AgeI (5 000 U/ml)	New England Biolabs, USA
Deep Vent DNA polymerasa (2 000 U/ml)	New England Biolabs, USA
KpnI (10 000 U/ml)	New England Biolabs, USA
Lysozym	Sigma, USA
RNAsa A	P-Lab, ČR
T4 DNA ligasa (400 000 U/ml)	New England Biolabs, USA

3.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA

ExCELL293 – hotové komerční médium (Sigma, USA), před použitím doplněno o L-glutamin (výsledná koncentrace 4mM)

Freestyle F17 – hotové komerční médium (Gibco Invitrogen, USA), před použitím doplněno o L-glutamin (výsledná koncentrace 4 mM) a Pluronic F-68 (výsledná koncentrace 0,1%)

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

3.5 ROZTOKY

ATB – 100× konc. roztok antibiotik (penicilin 1000 U/ml, streptomycin 100 µg/ml)

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

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

Citrátový pufr pro ENDO F₁ (10x konc.) – 0,5M citrát sodný, pH = 5,5

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE 10× konc. – 0,25M Tris, 1,9M glycin, 1% (w/v) SDS, pH = 8,3

Eluční pufr pro nosič Glutathione Sepharose 4B – 20mM Tris, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, 10 mM glutathion, pH = 8,0

Eluční pufr pro nosič TALON – 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, 250mM imidazol, pH = 7,0

LBamp – LB médium s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml

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

Mobilní fáze pro gelovou chromatografii ENDO F₁ – 40mM Tris, 100mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 7,5

Mobilní fáze pro gelovou chromatografii NKp30 – 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 7,5

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

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

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

Pufr A – 20mM Tris, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 8,0

Pufr pro agarosovou elektroforézu TAE – 40mM Tris, 20mM CH₃COOH, 1mM EDTA

Roztok akrylamidu pro SDS PAGE – 29% akrylamid, 1% N,N'-metylen-bis-akrylamid

Roztok IPEI – 10 mg/ml IPEI v PBS-TK

Roztok RNAsy A – 10 mg/ml RNAsy A, 10mM EDTA, 50mM TRIS

Roztok trypanové modři – 0,4% trypanová modř v PBS-TK

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

Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu – 30% glycerol, bromfenolová modř v TAE

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. neredukující – 31,5mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10mM NaN₃, pH = 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. redukující – k 900 µl 5× koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru (viz. výše) je přidáno 100 µl 2-merkptoethanolu

3.6 PUFRY PRO ENZYMY

NEB1	New England Biolabs, USA
Pufr pro T4 DNA ligasu	New England Biolabs, USA
ThermoPol reakční pufr	New England Biolabs, USA

3.7 VEKTORY

pTW5sec_NKp30'	Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha
pTW5sec linearizovaný (AgeI a KpnI)	Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha
pGEX3-Endo F ₁	Strubi, Oxford, UK

3.8 PRIMERY PRO PCR

NKp30_fw_1 5' AAAAACCGGTCTGTGGGTTTCTCAGCCG 3'

NKp30_rev_del 5' TTTTGGTACCCCGAAGGAGGAGGACTGTACCAGCGCCC
AGCTGCGGATGTTCTT 3'

pTT_FW: 5' TGATATTCACCTGGCCCGATCTG 3'

pTW5seq_REV: 5' AAGCAGCGTATCCACATAGCG 3'

3.9 BUNĚČNÉ LINIE A BAKTERIÁLNÍ KMENY

<i>E. coli</i> DH5a	Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha
<i>E. coli</i> BL21 Gold DE3	Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha
HEK293S GnTI	ATCC, USA
HEK293T	Dr. Yves Durocher, CNRC, Montreal, Kanada

4.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU

Prvním z cílů práce byla příprava vektoru (plazmidu) obsahujícího konstrukt proteinu NKp30. Vektor, který poskytl Mgr. Jan Bláha ve formě bakteriální pelety, nesl pracovní název pTW5sec_NKp30'. Obsahoval konstrukt NKp30', ale bylo nutné ho modifikovat pomocí PCR. Modifikovaný konstrukt byl vložen do linearizovaného vektoru pTW5sec, který také poskytl Mgr. Jan Bláha.

4.1.1 IZOLACE ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLAZMIDOVÉ DNA

Pro izolaci plazmidové DNA z bakteriální pelety byla použita komerčně dostupná souprava NucleoBond Xtra Maxi [44]. Peleta byla rozmrazena a resuspendována v 10 ml RES pufru. Suspenze byla rozdělena do dvou kyvet typu Oak Ridge. Do každé kyvety bylo přidáno 9 ml LYS pufru. Roztoky byly promíchány a ponechány 5 minut inkubovat. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno 9 ml neutralizačního pufru NEU. Po důkladném promíchání následovala centrifugace při $20000 \times g$, 20°C , 10 min. Následně byl supernatant aplikován přes filtrační papír na ekvilibrovanou kolonu. Kolona byla promyta 25 ml roztoku Wash. DNA byla eluována 15 ml roztoku ELU do čistých kyvet typu Oak Ridge určených pro práci s DNA. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu o teplotě -20°C . Následovala centrifugace 30 min při $16000 \times g$ a 0°C . Supernatant byl odstraněn a peleta opláchnuta 5 ml 70% ethanolu předchlazeného na -20°C . Následovala centrifugace 10 min při $16000 \times g$ a 0°C . Po odstranění supernatantu byla peleta vysušena ve vakuové rotační odparce SpeedVac. DNA byla rozpuštěna v 1 ml sterilní dH_2O a předesena do mikrozkušky.

4.1.2 MĚŘENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA

Čistota a koncentrace byla měřena spektrofotometricky. Vzorek byl 300 x naředěn dH_2O a byla změřena absorbance při 260 a 280 nm oproti dH_2O . Koncentrace byla vypočítána z empirického vztahu, podle kterého má roztok dvoušroubovice DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ absorbanci při 260 nm rovnou 1. Čistota byla vypočítána z poměru A_{260}/A_{280} .

4.1.3 ELEKTROFORÉZA V AGAROSOVÉM GELU

Agarosový gel byl připraven rozvažením agarosy v 65 ml TAE pufru. Pro přípravu 1% gelu bylo použito 0,65 g agarosy, pro 1,5% gel 0,98 g agarosy. Do zchlazeného, ale ne zatuhlého, gelu byly přidány 3 μ l barviva GoodView II. Ke vzorku DNA pro elektroforézu byl přidán takový objem vzorkového pufru pro agarosovou elektroforézu, aby byl pufr 10 \times zředěný. Takto připravené vzorky byly po zatuhnutí gelu nanášeny do jamek. Do jedné z jamek byl vždy nanesen odpovídající standard. Elektroforéza probíhala 20 min při napětí 180 V. Výsledek elektroforézy byl vizualizován UV lampou při 312 nm.

4.1.4 PCR

Izolovaná DNA byla použita jako templát pro PCR reakci, při které byla modifikována sekvence konstruktu NKp30'. Směs pro PCR byla připravena následovně: 10 μ l templátu (plazmid pTW5sec_NKp30'), 5 μ l ThermoPol reakčního pufru, 1,5 μ l 0,1M MgSO₄, 1,5 μ l 10 mM dNTPs, 2,5 μ l DMSO, 5 μ l primer NKp30_fw_1, 5 μ l primer NKp30_rev_del, 19 μ l PCR H₂O, 0,5 μ l Deep Vent polymerasy. Teplotní profil PCR reakce byl nastaven následovně:

5 min při 94 °C

30 cyklů: 30 s při 94 °C, 30 s při 60 °C, 1 min při 72 °C

8 min při 72 °C

Následně byl vznik PCR produktu ověřen agarosovou elektroforézou (viz. 4.1.3). Pro dosažení optimálních výsledků při následné ligaci byla směs přečištěna. Do mikrozkušavky bylo přidáno 5 μ l acetátového pufru (1/10 objemu směsi). Dále bylo přidáno 125 μ l 100% ethanolu (2,5 násobek objemu směsi). Směs byla ponechána 25 min při -20 °C. Následovala centrifugace 20 min 20000 \times g při 4 °C. Peleta byla omyta 200 μ l 70% ethanolu a centrifugována 10 min 20000 \times g při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta vysušena na rotační vakuové odparce SpeedVac. Následně byla rozpuštěna v 15 μ l sterilní dH₂O.

4.1.5 ŠTĚPENÍ RESTRIKČNÍMI ENZYMY

K 15 μ l přečištěného PCR produktu byly přidány 2 μ l 10 \times koncentrovaného roztoku BSA, 2 μ l 10 \times koncentrovaného pufru NEB1, 0,5 μ l enzymu KpnI a 0,5 μ l enzymu AgeI. Reakční směs byla inkubována 1 hod při 37 °C a následně 20 min při 65 °C. Pro

kompletní inaktivaci a odstranění enzymů byla použita souprava určená pro izolaci DNA z agarosového gelu JETQUICK Gel Extraction Spin Kit [45]. Bylo přidáno 300 μ l roztoku L1, roztok byl nanesen na kolonku a ta byla stočena 1 min při 16000 \times g a teplotě 20 $^{\circ}$ C. Na kolonku bylo nanesen 500 μ l roztoku L2 a kolonka byla opět centrifugována 1 min při 16000 \times g a teplotě 20 $^{\circ}$ C. Kolonka byla vysušena centrifugací 1 min při 16000 \times g a teplotě 20 $^{\circ}$ C. Kolonka byla přemístěna do čisté mikrozkušavky a bylo na ni nanesen 50 μ l dH₂O vody předehřáté na 65 $^{\circ}$ C. Následovala centrifugace 2 min při 16000 \times g a teplotě 20 $^{\circ}$ C. Takto připravený insert byl použitý pro ligaci.

4.1.6 LIGACE

Do ligační reakce byly použity 4 μ l linearizovaného plazmidu pTW5sec, 10 μ l insertu, 2 μ l 10 \times koncentrovaného pofru pro T4 DNA ligasu, 3 μ l dH₂O a 1 μ l T4 DNA ligasy. Reakce probíhala 20 min při 20 $^{\circ}$ C.

4.1.7 TRANSFORMACE

Po uplynutí inkubační doby bylo k ligační směsi přidáno 90 μ l suspenze bakteriálních buněk *E. coli* DH5 α . Směs byla ponechána 30 min na ledu. Následoval tepelný šok ve vodní lázni 1 min při 42 $^{\circ}$ C a rychlé zchlazení na 0 $^{\circ}$ C. Buňky byly revitalizovány přidáním 1 mL LB média předehřátého na 37 $^{\circ}$ C a ponechány 30 min v inkubátoru při 37 $^{\circ}$ C. Suspenze byla stočena 1 min při 5000 \times g a 20 $^{\circ}$ C. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány ve zbytku LB média. Takto vzniklá suspenze byla nanesena na předehřátou plotnu s ampicilinem (LB médium převařené s 1,5% (w/v) agarem, po zchladnutí byl přidán ampicilin do koncentrace 100 μ g/ml). Současně bylo na další plotnu rozetřeno také 90 μ l buněčné suspenze jako negativní kontrola. Plotny byly ponechány v inkubátoru při teplotě 37 $^{\circ}$ C do druhého dne.

4.1.8 PCR Z KOLONIÍ

Následující den byla z kolonie narostlé na misce provedena PCR z kolonií. Špičkou byla vypíchnuta kolonie bakterií, která byla resuspendována v 6 μ l sterilní dH₂O. Zároveň bylo špičkou zaočkováno 5 ml LBamp. Do reakce bylo přidáno 10 μ l reakční směsi Combi PPP Master Mix a po 2 μ l primerů NKp30_fw_1 a pTW5seq_rev.

Teplotní profil reakce byl nastaven následovně:

5 min při 95 °C

20 cyklů: 30 s při 95 °C, 30 s při 54 °C, 1 min při 72 °C

8 min při 72 °C

Po PCR byla provedena elektroforéza v 1,5% agarosovém gelu.

4.1.9 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

Kultura narostlá přes noc (na třepačce při 37 °C a 200 ot./min) v 5 ml LBamp byla postupně centrifugována (vždy 1 min při 16000 × g a 20 °C) do jedné mikrozkušavky. Plazmidová DNA byla izolována pomocí soupravy High-Speed Plasmid Mini Kit [46]. K peletě bylo přidáno 200 µl roztoku PD1. Peleta byla resuspendována a následně bylo přidáno 200 µl roztoku PD2. Peleta byla opatrně promíchána a ponechána inkubovat 2 min. Následně bylo přidáno 300 µl roztoku PD3 a obsah zkumavky byl opět opatrně promíchán a stočen 3 min při 16 000 x g a 20 °C. Supernatant byl nanesen na kolonku ve sběrné zkumavce a opět stočen 3 min při 16000 × g a 20 °C. Na kolonku bylo nanesen 400 µl Roztoku W1 a byla centrifugována 30 s při 16000 × g a 20 °C. Bylo přidáno 600 µl Wash roztoku s ethanolem. Kolonka byla centrifugována nejprve 30 s při 16000 × g a 20 °C a pro vyprázdnění sběrací zkumavky ještě 3 min při 16 000 x g a 20 °C, aby byla kolonka vysušena. Plazmidová DNA byla eluována 50 µl dH₂O přehřáté na 65 °C a centrifugována do čisté mikrozkušavky 2 min při 16000 × g a 20 °C. Čistota a koncentrace DNA byly změřeny spektrofotometricky (viz. 4.1.2).

4.1.10 SEKVENACE

Byly připraveny dva vzorky pro sekvenaci. Do dvou 200µl PCR mikrozkušavek bylo pipetováno 5 µl PCR H₂O, 2 µl plazmidové DNA získané při izolaci a vždy po 1 µl primeru (do jedné mikrozkušavky sekvenační primer pTT_FW a do druhé pTW5seq_rev). Takto připravené vzorky byly odneseny na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK.

4.1.11 VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE PLAZMIDU

Pro transformaci bylo smícháno 5 µl plazmidu získaného při izolaci DNA (viz. 4.1.9) se 100 µl buněčné suspenze Z-kompetentních [47] *E. coli* DH5α. Směs byla po 10 min na ledu rozetřena na plotny s ampicilinem (LB médium převařené s 1,5% (w/v) agarem,

po zchladnutí byl přidán ampicilin do koncentrace 100 µg/ml). Na misku s transformanty bylo pipetováno 5 ml LBamp a kolonie v něm byly rozmíchány. Následně byla takto směs přenesena do připravené 2l Erlenmayerovy baňky s 0,5 l LBamp. Směs byla nechána na třepačce při 37 °C a 200 ot./min do druhého dne.

Druhý den byla kultura sklizena. Suspenze byla centrifugována ve dvou 250 ml kyvetách 1 hod při 3900 × g, 20 °C. Supernatant byl slit a každá z pelet byla resuspendována ve 20 ml TES pufru. Suspenze byla přenesena do jedné 50ml centrifugační kyvety. Ta byla centrifugována 20 min 3900 × g, 20 °C. Peleta byla použita pro izolaci zásobního množství DNA (viz. 4.1.1).

4.2 PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Pro produkci proteinu na základě sekvence vložené do vektoru pTW5sec_NKp30' del byla použita buněčná linie HEK293S GnTI a HEK293T. K produkci ENDO F₁ za použití vektoru pGEX3-Endo F₁ [48] byl použit expresní systém *E. coli*, konkrétně kmen BL21-Gold (DE3).

4.2.1 POČÍTÁNÍ BUNĚČNÉ HUSTOTY

Buněčná hustota byla počítána pomocí hemocytometru. V mikrozkušavce bylo smícháno 20 µl odebrané buněčné suspenze se 160 µl roztoku trypanové modři. Po 5min inkubaci při laboratorní teplotě byl vzorek směsi nanesen do hemocytometru. Živé buňky jsou průhledné, mrtvé jsou modré. Následně jsou buňky spočítány. Počet buněk ve všech čtvercích vynásobený faktorem $1 \cdot 10^4$ odpovídá počtu buněk v jednom ml kultury.

4.2.2 KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE HEK293

Buňky HEK293 byly kultivovány ve čtverhranných lahvích v inkubátoru na třepačce Multitron Cell při 37 °C, 135 ot./min a 5 % CO₂. Jako kultivační médium byla zvolena směs média ExCELL293 a Freestyle F17 v poměru 1:1. Vždy po 3-4 dnech byla zkontrolována buněčná hustota a přítomnost kontaminantů. Pokud byla kultura bez kontaminantů, byla část odebrána do čisté lahve a doplněna čerstvým médiem tak, aby buněčná hustota byla přibližně $0,2 \cdot 10^6$ buněk/ml a zároveň aby původní suspenze byla zředěna čerstvým médiem minimálně 10×. Tímto způsobem byla suspenze kultivována a buňky rozrůstány až do dosažení potřebného počtu buněk pro transfekci.

4.2.3 TRANSFEKCE LINIE HEK293T

Buněčná kultura HEK293T kultivovaná v objemu 200 ml obsahovala $482 \cdot 10^6$ buněk. Suspenze byla po částech centrifugována 5 minut při $200 \times g$ a teplotě 21 °C. Peleta byla resuspendována v médiu Freestyle F17 a přenesena do 1l čtverhranné lahve. Objem byl doplněn médiem Freestyle F17 na celkových 200 ml. Lahev byla umístěna na třepačku.

Transfekční směs byla připravena s ohledem na následující kritéria: hmotnostní poměr DNA a IPEI byl 1:6 a na $1 \cdot 10^6$ buněk byly použity 2 µg DNA. Potřebné množství DNA bylo vyředěno do 5 ml sterilního PBS-TK, odpovídající množství zásobního roztoku IPEI bylo vyředěno do 6,5 PBS-TK. Oba roztoky byly zfiltrány přes 0,22 µl filtr do jedné 15ml zkumavky. Transfekční směs byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byl mix přidán ke 200 ml buněčné suspenze.

Takto transfekované buňky byly ponechány 4 hod na třepačce. Poté bylo do lahve k buňkám přidáno 200 ml média ExCELL293 a 4 ml ATB.

Šestý den po transfekci byla kultura sklizena.

4.2.4 TRANSFEKCE LINIE HEK293S GnTI

Buněčná kultura HEK293S GnTI kultivovaná v objemu 200 ml obsahovala $710 \cdot 10^6$ buněk. Suspenze byla rozdělena do 4 50ml kyvet a centrifugována 5 minut při $200 \times g$ a teplotě 20 °C. Pelety byly resuspendovány v médiu ExCELL293 tak, aby výsledný objem po přenesení do 250ml čtverhranné lahve byl 26 ml. Lahev byla umístěna na třepačku.

Transfekční směs byla připravena tak, aby na $1 \cdot 10^6$ buněk připadal 1 µl DNA a zároveň aby poměr DNA a IPEI byl 1:3. Potřebné množství DNA a IPEI bylo pipetováno k 9 ml média ExCELL293. Tato směs byla zfiltrována přes filtr 0,22 µm přímo k buněčné suspenzi.

Následovala inkubace 4 hod na třepačce. Poté byla suspenze přenesena do 1l čtverhranné lahve a doplněna médiem ExCELL293 na 400 ml. Byly přidány 4 ml ATB a 1,6 ml 0,5M kyseliny valproové. Láhev byla umístěna na třepačku.

Šestý den po transfekci byla kultura sklizena.

4.2.5 PRODUKCE ENDO F₁

Pro produkci ENDO F₁ byl vybrán bakteriální kmen BL21-Gold (DE3). Pro transformaci bylo v mikrozkuhavce smícháno 90 µl rozmražené buněčné kultury Z-kompetentních [47] *E. coli* BL21-Gold (DE3) se 2 µl plazmidu pGEX3-Endo F₁. Po 10 min inkubace na ledu byla transformační směs rozetřena na předeřátou plotnu s ampicilinem (LB médium převařené s 1,5% (w/v) agarem, po zchladnutí byl přidán ampicilin do koncentrace 100 µg/ml). Miska byla umístěna do inkubátoru při 37 °C přes noc.

Byly připraveny 4 sterilní 2l Erlenmayerovy baňky s 0,5 l LBamp. Na misku bylo pipetováno 5 ml média LBamp a kolonie v něm byly rozetřeny. Každá Erlenmayerova baňka byla zaočkována 1 ml této suspenze. Baňky byly kultivovány při 37 °C, 200 ot./min. U jedné referenční kultury byla sledována optická denzita při 600 nm oproti čistému LB médiu. Po dosažení optické denzity přibližně 0,8 byla třepačka s kulturami zchlazena na 22 °C. Zároveň bylo do každé baňky přidáno 100 µl 1M IPTG. Lahve byly ponechány na třepačce při 22 °C, 200 ot./min přes noc.

Obsah každé z lahví byl rozdělen do dvou plastových kyvet a centrifugován 20 min při 3900 × g, 20 °C. Každá z pelet byla resuspendována ve 20 ml TES pufru. Suspenze z pelet ze stejné baňky byly přeneseny do jedné 50ml centrifugační kyvety. Kyvety byly centrifugovány 30 min při 3900 × g, 20 °C. Supernatant byl odstraněn. Pelety byly zamrazeny.

4.3 PURIFIKACE PROTEINŮ

Pro purifikaci proteinů bylo využito etikety vložené za aminokyselinovou sekvenci proteinů. Protein NKp30 má histidinovou etiketu, proto byl pro jeho purifikaci použit nosič TALON [49] s navázanými nikelnatými kationty. Pro produkci z HEK293S GnTI i HEK293T byl použit stejný postup. ENDO F₁ má za svoji aminokyselinovou sekvenci vloženou sekvenci glutathion S-transferasy, pro purifikaci byl použit nosič Glutathione Sepharose 4B.

4.3.1 PURIFIKACE PROTEINU NKp30

Kultura HEK293T nebo HEK293S GnTI byla šestý den po transfekci sklizena. Byla rozdělena do 250ml plastových kyvet a centrifugována 30 min při 3900 × g, 15 °C. Supernatant byl použit pro purifikaci proteinu NKp30.

Supernatant byl přefiltrován a převeden do 2l Erlenmayerovy baňky. Dále bylo přidáno 400 ml PBS a cca 4 ml nosiče TALON. Baňka byla umístěna na třepačku Orbi-Safe TS a při 140 ot./min ponechána inkubovat 1 hod. Roztok byl převeden do kolonky s fritou. Nosič TALON byl promyt přibližně 150 ml PBS. Následně byl protein eluován 4 x 5 ml elučního pufru pro TALON.

Po purifikaci byl roztok zakoncentrován (viz. 4.4.1) a s takto zakoncentrovaným vzorkem byla provedena gelová permeační chromatografie (viz. 4.4.2).

Nosič byl pro regeneraci promyt přibližně 100 ml elučního pufru pro TALON, 100 ml dH₂O, 100 ml MES pufru a 100 ml PBS. Dále byl přenesen do 50ml zkumavky a uchováván ve 20% ethanolu v lednici.

4.3.2 PURIFIKACE ENDO F₁

Pro purifikaci ENDO F₁ byla rozmrazena jedna ze 4 pelet. Peleta byla resuspendována ve 40 ml pufru A. K suspenzi byly přidány 4 mg lysozymu, 50 µl RNasy A (o koncentraci 10 mg/ml, v roztoku s 10mM EDTA a 50mM TRIS), 4 µl 10mM leupeptinu, 400 µl 100mM PMSF a 800 µl 0,5M EDTA. Buněčná suspenze byla ponechána 15 min inkubovat při laboratorní teplotě. Směs byla 4 x sonikována, vždy 1 min při 40% amplitudě a rázech po 0,5 s. Mezi jednotlivými cykly byla kultura uchovávána 5 min na ledu. Po sonikaci byla suspenze centrifugována 20 min při 20000 × g.

Supernatant byl přes 0,22 µm filtr zfiltrován do čisté 50ml zkumavky. K filtrátu byl přidán 1 ml nosiče Glutathione Sepharose 4B. Roztok byl inkubován 1 hod za neustálého převrácení a promíchávání. Po inkubaci byl roztok nanesen na kolonku s fritou. Nosič byl promyt přibližně 200 ml pufru A. ENDO F₁ byla eluována 4 x 5 ml elučního pufru pro Glutathione Sepharose 4B.

Po purifikaci byl roztok zakoncentrován (viz. 4.4.1) a s takto zakoncentrovaným vzorkem byla provedena gelová permeační chromatografie (viz. 4.4.2).

Nosič Glutathione Sepharose 4B byl pro regeneraci promyt ještě asi 100 ml elučního pufru pro Glutathione Sepharose 4B, 100 ml pufru A a 100 ml dH₂O. Nosič byl přenesen do čisté mikrozkušavky a uchováván ve 20% ethanolu v lednici.

4.4 MANIPULACE S PROTEINY

V následující části jsou popsány všeobecné postupy práce s proteiny. Metody jsou shodné jak pro NKp30 tak i pro ENDO F₁.

4.4.1 ZAKONCENTROVÁNÍ

Pro zakoncentrování proteinů byly použity koncentrátoři Amicon Ultra (MWCO 10000). Koncentrátor byl naplněn roztokem proteinu a následně centrifugován při $16000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Doba centrifugace se odvíjela podle objemu. Zhruba po 5-7 min byla centrifugace vždy přerušena a obsah koncentrátoru byl promíchán nasátím a vypuzením ze špičky automatické pipety, aby se zabránilo sražení proteinu. V případě většího objemu vzorku byl do koncentrátoru postupně doplňován a společně s tím odstraňován průtok.

Po zakoncentrování na požadovaný objem byl vzorek přenesen do mikrozkušavky. Následně byl centrifugován při 3 min při $16000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Kolona Superdex 200 10/300 GL byla připojena k HPLC systému. Kolona byla dlouhodobě uchována ve 20% čistém ethanolu, proto bylo nutné ji ekvilibrovat. Kolona byla promyta nejprve dH₂O a následně mobilní fází. Po promytí celého objemu kolony byla mobilní fází propláchnuta 1ml nástřiková smyčka. Vzorek byl nanášen na ekvilibrovanou kolonu. Byly jímány jednotlivé frakce, které byly dále analyzovány.

4.4.3 URČENÍ KONCENTRACE

U vzorků byla změřena koncentrace proteinů dle Bradfordové [50]. Na mikrotitrační destičku bylo do jedné jamky pipetováno vždy 5 μl vzorku a 200 μl činidla dle Bradfordové. Stejným postupem byla vytvořena kalibrační závislost, kdy jako vzorky byly použity roztoky BSA o koncentraci 0,1 – 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Po 5min inkubaci byla změřena absorbance při 595 nm.

4.4.4 SDS PAGE

Čistota jednotlivých frakcí z gelové chromatografie byla ověřena elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného.

Byl připraven rozdělovací gel pro separaci proteinů. Pro různé účely byly připraveny gely s různou koncentrací polyakrylamidu:

12,5% gel: 1,265 ml dH₂O, 1,675 ml 30% AA, 1 ml 1,5M Tris (pH = 8,8), 40 μl 10% SDS, 40 μl APS a 2 μl TEMED

15% gel: 0,9 ml dH₂O, 2 ml 30% AA, 1 ml 1,5M Tris (pH = 8,8), 40 μl 10% SDS, 40 μl APS a 2 μl TEMED

18% gel: 0,5 ml dH₂O, 2,4 ml 30% AA, 1 ml 1,5M Tris (pH = 8,8), 40 μl 10% SDS, 40 μl APS a 2 μl TEMED

Po zatuhnutí spodního rozdělovacího gelu byl připraven vrchní zaostřovací gel (0,7 ml dH₂O, 0,25 ml 30% AA, 0,125 ml 1M Tris (pH = 6,8), 10 μl 10% SDS, 10 μl APS a 1,5 μl TEMED), do kterého byl zasunut hřeben pro vytvoření nanášecích jamek. Po zatuhnutí vrchního gelu byl hřeben odstraněn a skla s gelem byla umístěna do stojánku a do elektroforetické vany. Vana i stojánek byly naplněny elektrodočím pufrům.

Vzorky byly připraveny smícháním malého množství vzorku (do 10 μl) s odpovídajícím množstvím 5 x koncentrovaného vzorkového pufru. Následně byly vzorky rozvařeny 10 min ve vodní lázni a centrifugovány 2 min při 10000 × g a 20 °C. Takto připravené vzorky byly nanášeny do jednotlivých jamek. Do první jamky byl vždy nanesen standard. Po nanesení vzorků byla spuštěna elektroforéza při napětí 200 V po dobu 45-55 min (podle potřeby, vždy bylo sledováno čelo elektroforézy).

Po skončení elektroforézy byly gely přeneseny do misky a obarveny barvicím roztokem (minimálně 30 min) a následně odbarveny odbarvovacím roztokem (2x20 min nebo do úplného odbarvení těch částí gelu, kde nebyly naneseny proteiny). Odbarvený gel byl digitalizován naskenováním.

4.5 OVĚŘENÍ ENZYMATICKÉ AKTIVITY ENDO F₁

Enzymatická aktivita ENDO F₁ byla ověřena jak pro denaturovaný i pro nativní protein NKp30.

Pro deglykosylaci denaturovaného proteinu bylo 10 μl vzorku NKp30 (produkovaného linií HEK293S GnTI) rozvařeno 10 min při 100 °C s 1 μl 5% SDS. Po vychladnutí bylo do zkumavky pipetováno 1,6 μl citrátového pufru pro ENDO F₁, 1,4 μl

dH₂O a 2 µl roztoku ENDO F₁ o koncentraci 0,1 µg/µl (zásobní roztok byl tedy 10× zředěn). Reakční směs byla ponechána inkubovat 1 hod při 37 °C.

Pro deglykosylaci nativního proteinu bylo k 10 µl NKp30 (produkovaného linií HEK293S GnTI) přidáno 1,6 µl citrátového pufru pro ENDO F₁, 1,4 µl dH₂O a 2 µl roztoku ENDO F₁ o koncentraci 0,1 µg/µl. Reakční směs byla ponechána inkubovat 1 hodinu při 37 °C.

Po inkubaci byla provedena elektroforéza (viz. 4.4.4) v 18% gelu.

4.6 STUDIUM OLIGOMERNÍHO STAVU NKp30

Pro studium oligomerního stavu byly použity spojené frakce č. 2, 3 a 4 (představující oligomerní stav NKp30, dále označované jako oligomer) a spojené frakce č. 8 a 9 (představující monomerní stav NKp30, dále označované jako monomer). Frakce pocházejí z gelové permeační chromatografie proteinu NKp30 produkovaného linií HEK293S GnTI.

4.6.1 OPAKOVANÉ NÁSTŘIKY

Monomer a oligomer byly odděleně zakoncentrovány (viz. 4.4.1) a se vzorky byla provedena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL (viz. 4.4.2). Mobilní fází byl v obou případech pufr HEPES.

4.6.2 DEGLYKOSYLACE SPOJENÝCH FRAKcí

Frakce získané po opakovaném nástřiku monomeru a oligomeru byly opět zakoncentrovány (viz. 4.4.1). U oligomeru i monomeru byla změřena koncentrace proteinu (viz. 4.4.3) a celkový objem. K proteinům byl přidán 10× koncentrovaný citrátový pufr pro ENDO F₁ tak, aby byl ve výsledném roztoku 1× koncentrovaný. Dále bylo do roztoků přidáno takové množství zásobního roztoku ENDO F₁ o koncentraci 1 mg/ml tak, aby hmotnostní poměr ENDO F₁ : NKp30 byl 1 : 100. Reakční směs byla ponechána inkubovat 1 hodinu při 37 °C.

Po inkubaci bylo do obou zkumavek přidáno 100 µl nosiče Glutathione Sepharose 4B. Roztok byl za neustálého převrácení inkubován 1 hodinu. Poté byly zkumavky centrifugovány 5 minut při 200 × g, 20 °C. Supernatant byl přenesen do čistých zkumavek a opět centrifugován 5 minut při 200 × g, 20 °C, znovu přenesen do čistých

zkumavek a centrifugován 5 minut při $20000 \times g$, 20°C a přenesen do čisté zkumavky. Takto byla odstraněna ENDO F₁ po deglykosylaci z roztoku.

K nosiči Glutathione Sepharose 4B byl přidán 1 ml elučního pufru pro Glutathione Sepharose 4B a zkumavka byla centrifugována 5 minut při $200 \times g$, 20°C . Po odstranění supernatantu byl postup opakován ještě 2×. Regenerovaný nosič byl uchováván ve 20% ethanolu v lednici.

4.6.3 OPAKOVANÉ NÁSTŘIKY DEGLYKOSYLOVANÝCH FRAKČÍ

Deglykosylovaný monomer a oligomer zbavený ENDO F₁, byl zakoncentrován (viz. 4.4.1) a s deglykosylovanými vzorky byla provedena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL (viz. 4.4.2). Mobilní fází byl v opět HEPES pufr.

4.6.4 SEDIMENTAČNÍ ANALÝZA

Sedimentační analýzu provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I metodou sedimentační rychlosti [51]. Analýza proteinu probíhala při 42000 ot./min a 20°C . Bylo sbíráno 150 snímků po 5 min při vlnové délce 280 nm. Jako reference byl použit HEPES pufr použitý při gelové filtraci proteinu. Hustota a viskozita použitého pufru, stejně jako parciální specifický objem analyzovaného proteinu byly predikovány za pomoci programu SEDNTERP [52] a získaná data byla následně vyhodnocena s využitím programu SEDFIT [53].

5.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU

Jedním z cílů práce bylo připravit vektor s vloženou sekvencí pro konstrukt proteinu NKp30 dlouhý 125 aminokyselin. Byl zvolen konstrukt obsahující kompletní extracelulární imunoglobulinovou doménu a navíc i kompletní krček, tedy sekvenci spojující imunoglobulinovou doménu s transmembránovým regionem. Nukleotidová sekvence celého expresního konstrukt je znázorněna na Obr. 6, aminokyselinová pak na Obr. 7. Pro vložení konstrukt do plazmidu pTW5sec byly použity restriční endonukleasy AgeI a KpnI. V plazmidu je před konstruktem vložen sekreční signál, protein tedy buňka sekretuje do média. Sekreční signál je až na jednu aminokyselinu odstraněn. V plazmidu je také za konstrukt vložena histidinová kotva, aby bylo pro purifikaci možné použít chelatační chromatografii. Předikovaná molekulová hmotnost proteinu bez glykosylací je 15,4 kDa.

ATGGGAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCTTCAGCTGAGTCTTG
 GAATTACCGGTCTGTGGGTTTCTCAGCCGCCGAAATCCGTA CTCTGGAAGGTTCTCTGCGTTCTGCGGTGCAGCTTCAACGCGTCTCAGGGCCGCTGGCAATCGGTAGC
 GTGACCTGGTTTCGTGACGAAGTGGTTCGGGGCAAAGAGGTTTCGTAACGGAACCC
 GGAATTTTCGTGGTTCGCTGGCACCCTGGCGTCTTCTCGTTTCCTGCACGATCATCA
 GGCGAACTGCATATCCGTGACGTTTCGTGGCCATGATGCGAGCATCTACGTTTGCC
 GTGTTGAAGTTCGTGGGTCTGGGCGTTGGTACTGGCAACGGCACTCGTCTGGTTGTGG
 AGAAAGAACATCCGCAGCTGGGCGGGGCTGGTACAGTCCTCCTCCTTCGGGGTACC
 CACCATCACCACCATCACCACCACGGGTGA

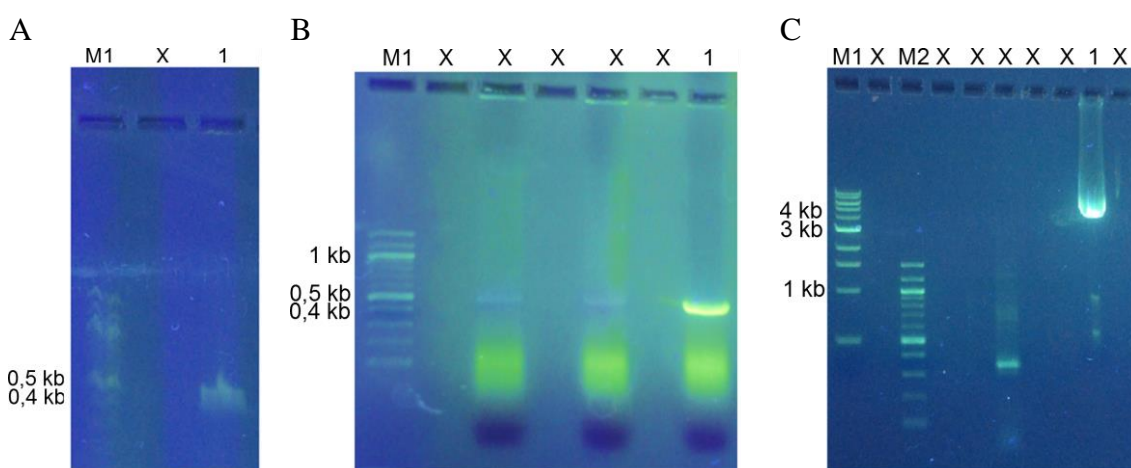
Obr. 6 Nukleotidová sekvence konstrukt NKp30. Start kodon, sekreční signál, restriční místo pro AgeI, vlastní konstrukt NKp30, silně mutované místo (původní sekvence je GGTACC, tedy restriční místo pro KpnI), PŘEBYTEČNÝ TRIPLET, restriční místo pro KpnI, histidinová kotva, stop kodon

ITGLWVSQPPEIRTLEGSSAFLPCSFNASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEVRNGTPEFRG
 RLAPLASSRFLHDHQAE LHIRDVRGHDASIYVCRVEVLGLGVGTGNGTRLVVEKEHPQ
 LGAGTVLLLRGTHHHHHHHHG

Obr. 7 Aminokyselinová sekvence konstrukt NKp30. Pozůstatek sekrečního signálu a klonovacího místa, vlastní konstrukt, histidinová kotva.

Plazmid, který poskytl Mgr. Jan Bláha, obsahoval triplet navíc. Pro získání správného konstrukt NKp30 bylo tedy nutné sekvenci upravit. Plazmid byl nejprve izolován z bakteriální pelety. Čistota izolované DNA, dána poměrem A_{260}/A_{280} , byla 1,81. Koncentrace byla $10,42 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Plazmid byl použit jako templát do PCR reakce.

Při PCR reakci, byl použit dlouhý oligonukleotid NKp30_rev_del, který nasedá několik nukleotidů před přebytečným tripletem a několik za ním. Vznik PCR produktu potvrdila elektroforéza v agarosovém gelu (Obr. 8A). PCR produkt byl vložen do linearizovaného plazmidu pTW5sec a ligační směsí byly transformovány bakterie *E. coli* kmene DH5 α . Do druhého dne na misce s ampicilinem narostla jediná kolonie. Bakteriemi z kolonie bylo zaočkováno LBamp médium a byla provedena PCR z kolonií, výsledek je na Obr. 8B. PCR z kolonií potvrdila přítomnost konstruktu v plazmidu. Proto byl plazmid izolován z LBamp média a vzorek byl poslán na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Sekvence potvrdila správnou orientaci konstruktu v plazmidu, přítomnost všech částí důležitých pro produkci v buněčné linii HEK293 a především odstranění přebytečného tripletu. Bylo tedy připraveno zásobní množství plazmidu. Koncentrace plazmidu zjištěná spektrofotometricky byla 2,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a čistota daná poměrem A_{260}/A_{280} byla 1,8. Jedná se tedy o čistý preparát DNA, což je patrné i z elektroforézy (Obr. 8C). Tento plazmid byl použit pro transfekci buněk HEK293.



Obr. 8 Elektroforéza v agarosovém gelu. V dráze M je vždy standard, X označuje prázdné dráhy nebo nesouvisející vzorky **A** – V dráze 1 je vzorek PCR produktu. PCR produkt má velikost okolo 0,4 kb. **B** – V dráze 1 je vzorek PCR z kolonie. PCR produkt má velikost okolo 0,5 kb. **C** – V dráze 1 je vzorek plazmidu po izolaci. Plazmid má velikost okolo 4 kb, není výrazně fragmentovaný a neobsahuje kontaminující RNA

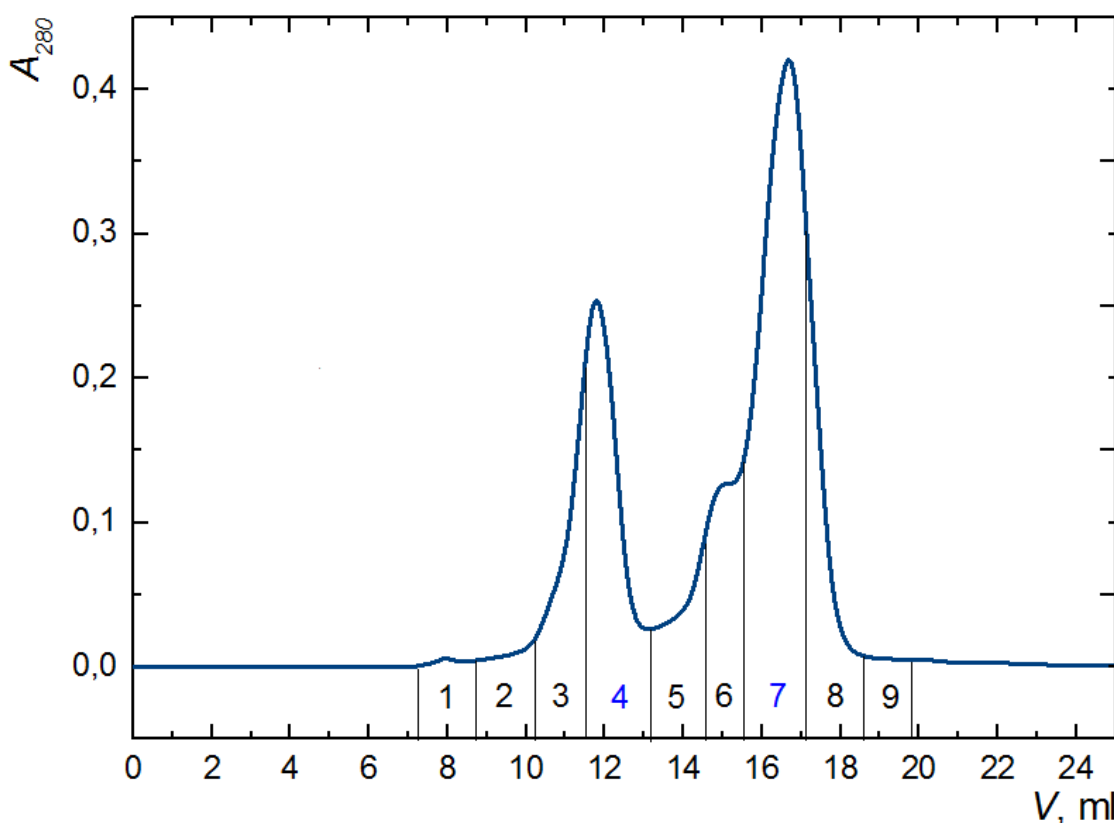
5.2 PRODUKCE PROTEINU NKp30 V LINII HEK293T

Pro získání přirozeně glykosylovaného proteinu NKp30 byla transfekována buněčná linie HEK293T [54]. Tyto buňky jsou schopné tvořit komplexní N-glykosylaci savčího typu, výsledný rekombinantní protein se tak svojí strukturou blíží svojí přirozené formě.

Celkem bylo transfekováno (viz. 4.2.3) $482 \cdot 10^6$ buněk, které byly převedeny do 200 ml média Freestyle F17. Transfekční směs byla nejprve inkubována 10 min při laboratorní teplotě a pak byla přidána k buňkám. Transfekované buňky byly inkubovány 4 hod na třepačce při buněčné hustotě $2,4 \cdot 10^6$ buněk/ml. Poté byl objem doplněn na 400ml přidáním 200 ml média ExCELL293. Kultura byla sklizena šestý den. Buňky byly odstředěny centrifugací, médium bylo zfiltrováno a použito pro purifikaci proteinu.

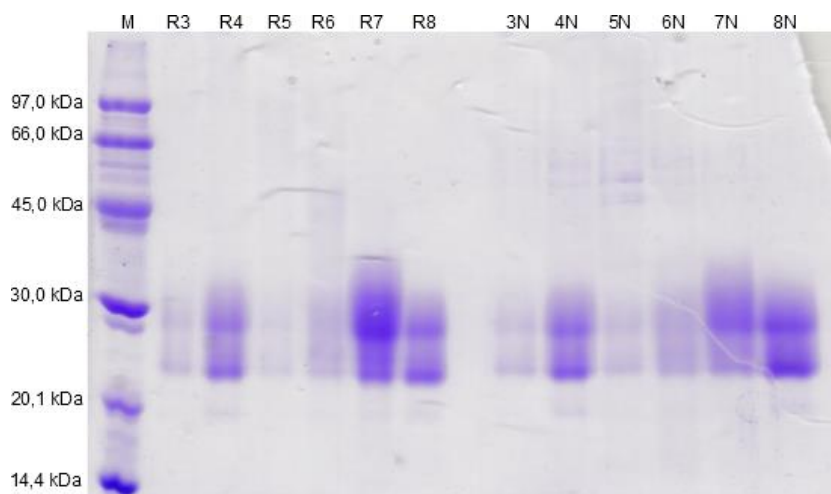
5.2.1 PURIFIKACE PROTEINU NKp30 Z PRODUKCE V LINII HEK293T

Díky vložené histidinové kotvě bylo možné protein NKp30 purifikovat chelatační chromatografií za použití nosiče TALON (viz. 4.3.1), který obsahuje ionty kobaltu. Protein byl z nosiče uvolněn PBS pufrem s přidavkem imidazolu. Po eluci byl roztok proteinu zakoncentrován (viz. 4.4.1) a nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL (viz. 4.4.2). Během izokratické eluce byly jímány jednotlivé frakce. Záznam gelové permeační chromatografie je uveden na Obr. 9.



Obr. 9 Záznam gelové permeační chromatografie proteinu NKp30 produkovaného v HEK293T buněčné linii. Kolona Superdex 200 10/300 GL, izokratická eluce. Modrá linie představuje eluční profil, svislé čáry oddělují jednotlivé jímání frakce. Dva oddělené píky znamenají eluci látek s různou molekulovou hmotností. Modře označené frakce č. 4 a 7 byly použity pro studium oligomerního stavu pomocí sedimentační analýzy.

Výsledek gelové permeační chromatografie naznačuje, že ve vzorku jsou průměrné částice s různou molekulovou hmotností. Pro určení, jestli se jedná o oligomery NKp30 nebo o jiný protein, který se kopurifikoval s NKp30 byl z frakcí č. 3 až 8 odebrán vzorek pro analýzu SDS PAGE. Elektroforéza byla provedena ve 12,5% gelu, Obr. 10.



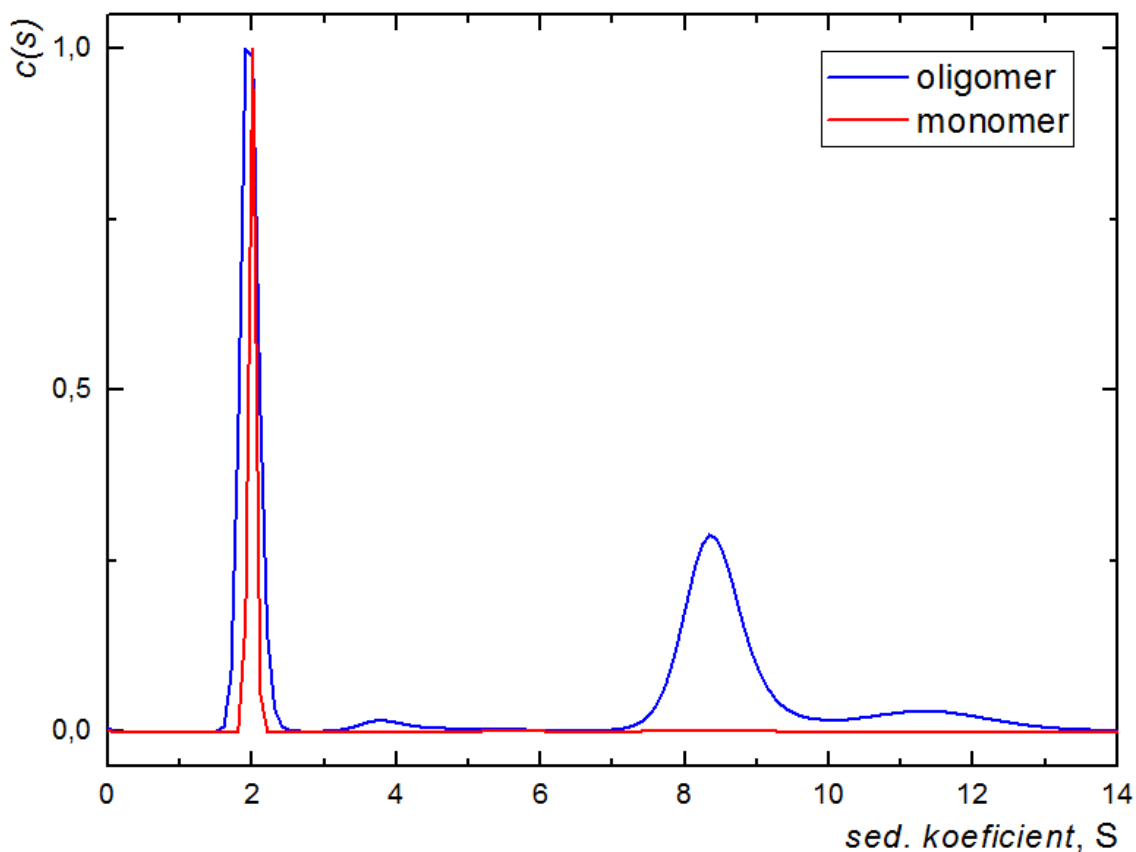
Obr. 10 SDS PAGE proteinu NKp30, produkce v linii HEK293T. 12,5% gel, v dráze M je standard, 3-8 označuje číslo frakce po gelové permeační chromatografii (Obr. 9, str. 42), R označuje použité redukující prostředí, N označuje neredukující prostředí.

Z Obr. 10, je vidět, že vzorky neobsahují výraznější kontaminanty. Predikovaná molekulová hmotnost konstruktu NKp30 je 15,4 kDa. Proužky vyšší molekulové hmotnosti svědčí o glykosylaci proteinu (3 predikovaná N-glykosylační místa) dva výraznější proužky naznačují dvě převažující glykoformy. Rozostření proužku je dáno přítomností komplexní glykosylace.

Na profilu gelové permeační chromatografie (Obr. 9, str. 42) jsou vidět eluční vrcholy, které reprezentují částice s různou molekulovou hmotností. Na výsledku SDS PAGE (Obr. 10) je však jasně vidět, že se jedná pouze o jeden protein. Vrcholy s různým retenčním objemem lze vysvětlit tvorbou oligomerů, které jsou vázány nekovalentně (Obr. 10, protein se chová stejně v redukujícím i neredukujícím prostředí).

5.2.2 SEDIMENTAČNÍ ANALÝZA PROTEINU NKp30

Vzorky z frakce č. 4 (frakce obsahující oligomer) a č. 7 (frakce obsahující monomer) z gelové permeační chromatografie NKp30 produkovaného v linii HEK293T s přirozenou glykosylací (Obr. 9, str. 42) byly podrobeny sedimentační analýze na analytické ultracentrifuze (Obr. 11, str. 44).



Obr. 11 Sedimentační analýza NKp30 produkovaného v HEK293T buněčné linii. Frakce 4 (odpovídající oligomerní formě NKp30, **modrá**) a frakce 7 (monomerní forma NKp30, **červená**) z gelové permeační chromatografie byly analyzovány metodou sedimentační rychlosti; graf zobrazuje normalizovanou distribuci sedimentačního koeficientu částic přítomných v daném vzorku.

Zatímco monomerní frakce sedimentuje dle očekávání jako jediná částice s hodnotou sedimentačního koeficientu $s_{20,w} = 2,10$ S odpovídající hmotnosti monomeru (Obr. 11, červená křivka), druhá frakce vytváří v roztoku směs oligomerů, které disociují na monomer (Obr. 11, modrá křivka). V oligomerní frakci lze rozlišit částice o sed. koeficientu $s_{20,w} = 2,07 - 4,1 - 8,9$ a 12 S, z nichž první odpovídá monomeru NKp30 a následující by svou hodnotou sed. koeficientu mohly teoreticky odpovídat trimeru či tetrameru NKp30 (4,1 S), hexameru či oktameru NKp30 (8,9 S) a např. dodekameru NKp30 (12 S); přesnější určení stupně oligomerie by vyžadovalo znalost tvaru a rozměrů sedimentující částice, které hodnotu sed. koeficientu také ovlivňují.

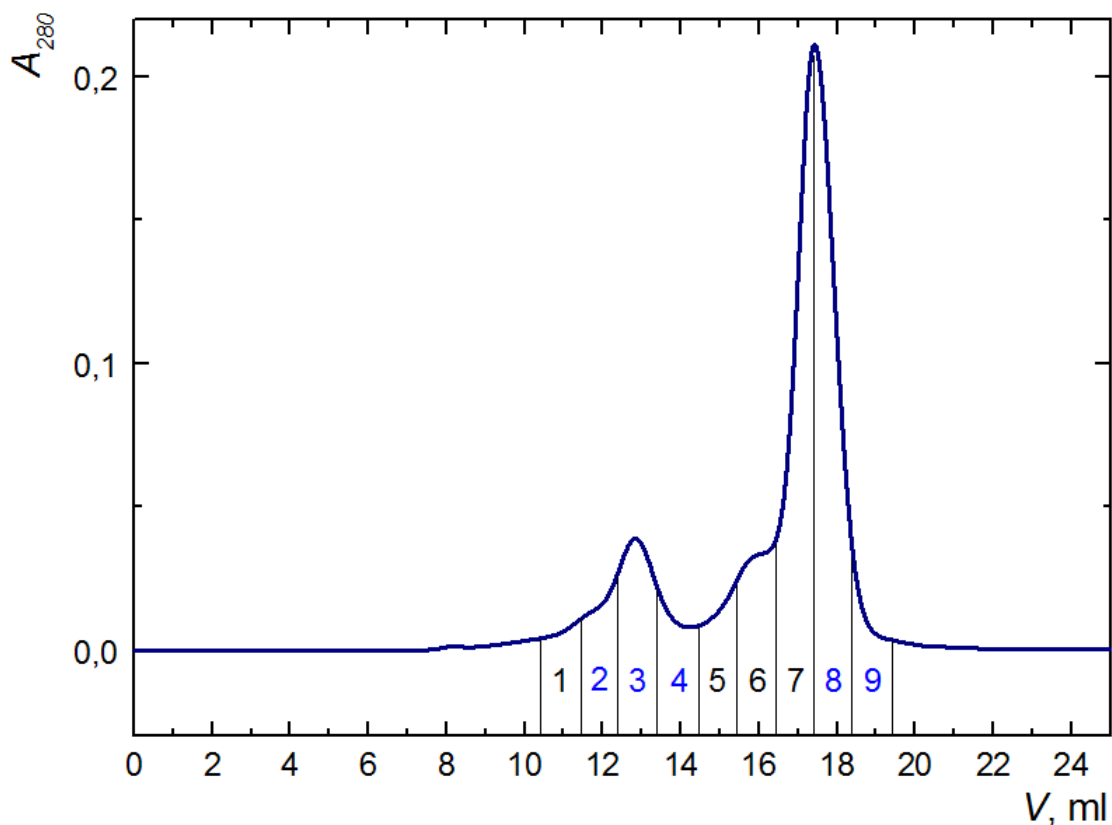
5.3 PRODUKCE PROTEINU NKp30 V LINII HEK293S GnTI

Pro produkci proteinu NKp30 s homogenní glykosylací manosového typu byla zvolena buněčná linie HEK293S GnTI [55]. Tyto buňky nemají funkční N-acetyl-glucosaminyltransferasu I, tedy enzym potřebný pro tvorbu komplexních N-glykosidů. Jejich glykosylace je jednoduchá (Asn-GlcNAc₂-Man₅). Jelikož nedochází k fukosylaci, lze glykosid odštěpit endoglykosidasou ENDO F₁.

Bylo transfekováno (viz. 4.2.3) $710 \cdot 10^6$ buněk. Transfekční směs byla přidána přímo k buněčné suspenzi. Buňky byly transfekovány v objemu 35 ml, při buněčné hustotě $20 \cdot 10^6$ buněk/ml. Po 4hod inkubaci na třepače byla buněčná suspenze přenesena do 1l čtverhranné lahve, doplněna médiem ExCELL293 na objem 400 ml a byla přidána antibiotika a kyselina valproová. Kultura byla sklizena šestý den po transfekci. Buňky byly odstředěny centrifugací, médium bylo zfiltrováno a použito pro purifikaci proteinu.

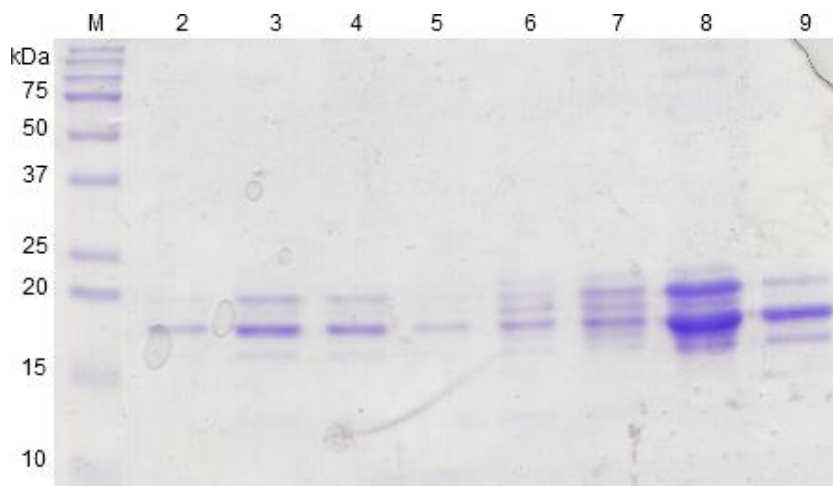
5.3.1 PURIFIKACE PROTEINU NKp30 Z PRODUKCE V LINII HEK293 GnTI

Postup pro purifikaci proteinu NKp30 byl stejný v případě produkce v linii HEK293S GnTI. Byla použita chelatační chromatografie na nosiči TALON (viz. 4.3.1). Po purifikaci byl roztok proteinu zakoncentrován (viz. 4.4.1) a nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL (viz. 4.4.2), záznam izokratické eluce je zobrazen na Obr. 12, str. 46.

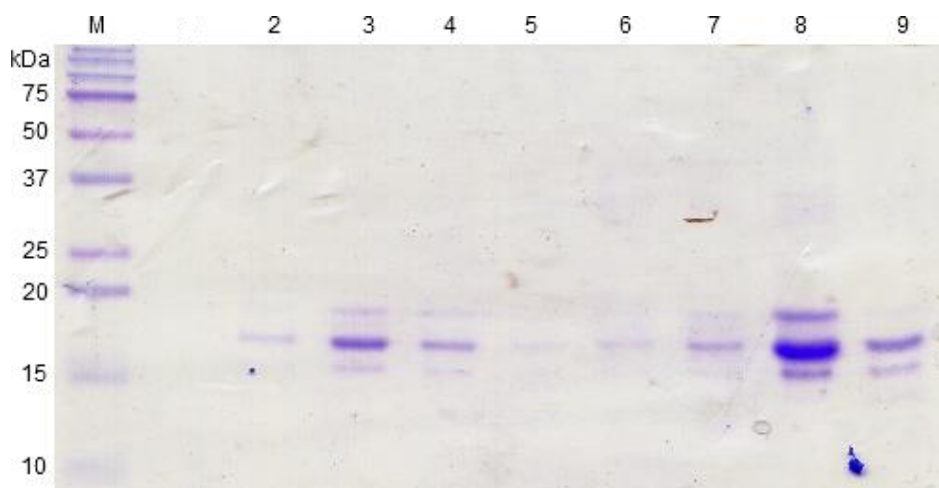


Obr. 12 Záznam gelové permeační chromatografie proteinu NKp30 produkovaného v HEK293S GnTI buněčné linii. Kolona Superdex 200 10/300 GL, izokratická eluce. Modrá linie představuje eluční profil, svislé čáry oddělují jednotlivé jímané frakce. Modrým písmem označené frakce byly použity pro studium oligomerního stavu proteinu NKp30 (viz 5.5). Frakce č. 2, 3 a 4 představují oligomer, frakce č. 8 a 9 představují monomer.

Na Obr. 13, str. 47 a Obr. 14, str. 47 je výsledek SDS PAGE. Z výsledků je patrné, že vzorek neobsahuje významnější kontaminanty. Opět se potvrzuje, že chromatografické vrcholy s různým elučním objemem (Obr. 12) představují různé oligomerní stavy jednoho proteinu. Oligomery jsou nekovalentní, protože není patrný posun mezi SDS PAGE v redukujícím (Obr. 13, str. 47) a neredukujícím (Obr. 14, str. 47) prostředí.



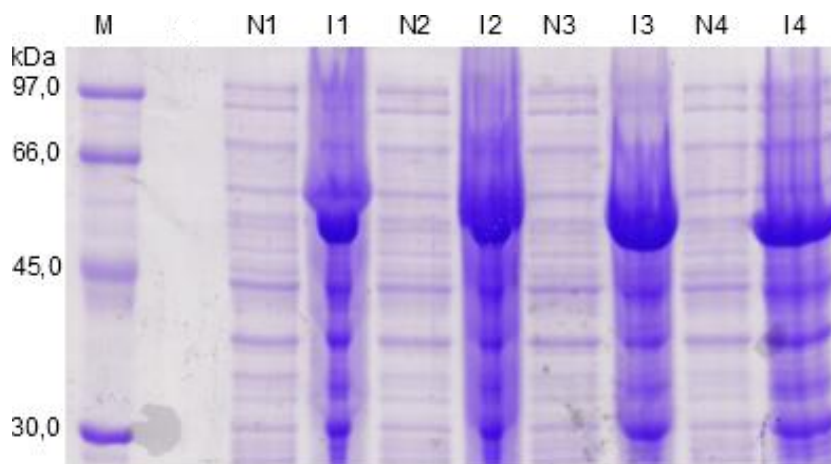
Obr. 13 SDS PAGE proteinu NKp30, produkce z HEK293 GnTI, redukující prostředí. 18% gel, v dráze M je standard, 2-9 označuje číslo frakce po gelové permeační chromatografii (Obr. 12, str. 46), ze které byl vzorek odebrán.



Obr. 14 SDS PAGE proteinu NKp30, produkce z HEK293 GnTI, neredukující prostředí. 18% gel, v dráze M je standard, 2-9 označuje číslo frakce po gelové permeační chromatografii (Obr. 12, str. 46), ze které byl vzorek odebrán.

5.4 PRODUKCE PROTEINU ENDO F₁ V BAKTERIÁLNÍM KMENI BL21-GOLD (DE3)

Pro produkci rekombinantního proteinu ENDO F₁ byl zvolen bakteriální kmen BL21-Gold (DE3). Bakterie transformované plazmidem pGEX3-Endo F₁ byly kultivovány nejprve na LBamp médiu s agarem. Druhý den byly narostlé kolonie resuspendovány a byly zaočkovány celkem 2 l LBamp média. Po dosažení OD₆₀₀ 0,824 byla kultura zchlazena na 22 °C a produkce byla započata přidávkem IPTG. Byly odebrány vzorky před indukcí a před sklízením (Obr. 15, str. 48).



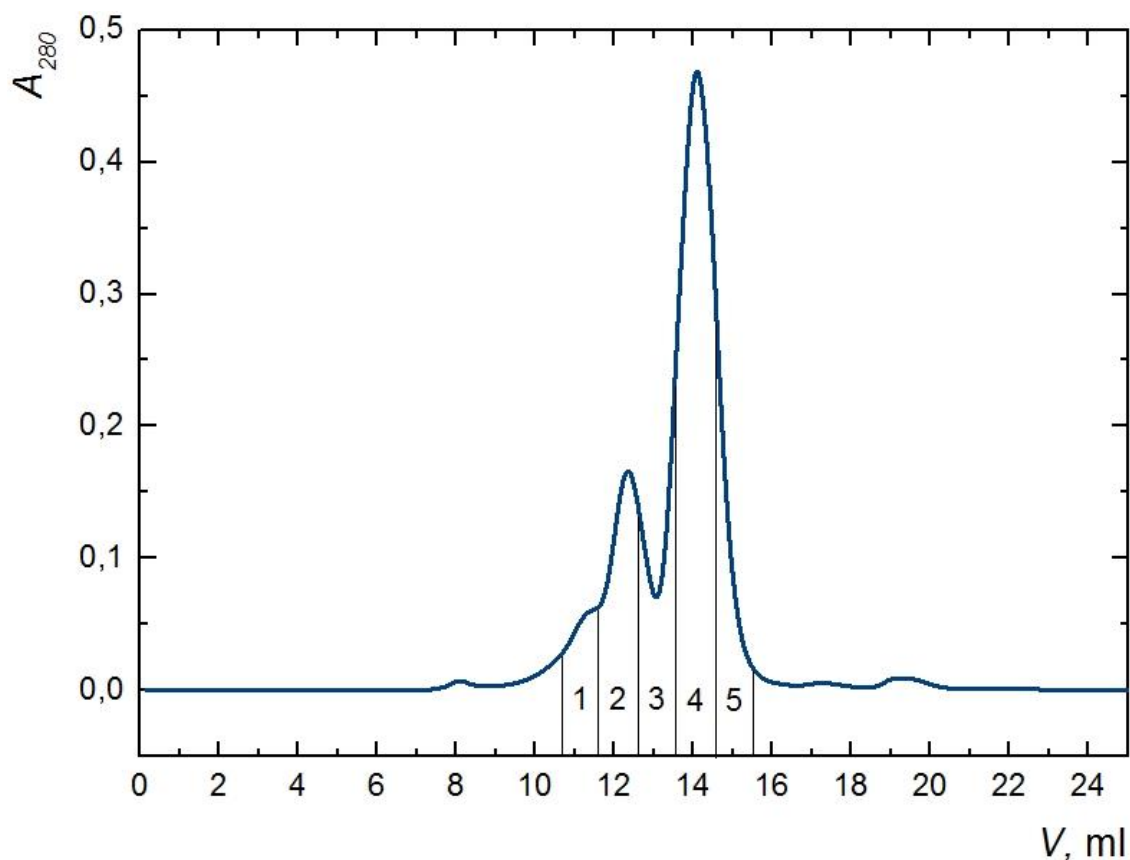
Obr. 15 SDS PAGE proteinu ENDO F₁ během produkce. 12,5% gel, redukující prostředí, v dráze M je standard, N značí neindukované, I indukované, Číslo označuje, ze které lahve byl vzorek odebrán.

Na Obr. 15 jsou vzorky odebrané před indukcí a po indukcí IPTG. V drahách s označením I (I1, I2, I3 a I4) je vidět velice výrazný proužek s molekulovou hmotností okolo 55 kDa, který v drahách s označením N (N1, N2, N3 a N4) není tak výrazný. Tento proužek představuje ENDO F₁. Pro purifikaci byla následně použita kultura z láhve č. 1. Ze zbylých kultur bylo centrifugací odstraněno médium a bakteriální pelety byly uschovány při -20 °C.

5.4.1 PURIFIKACE PROTEINU ENDO F₁

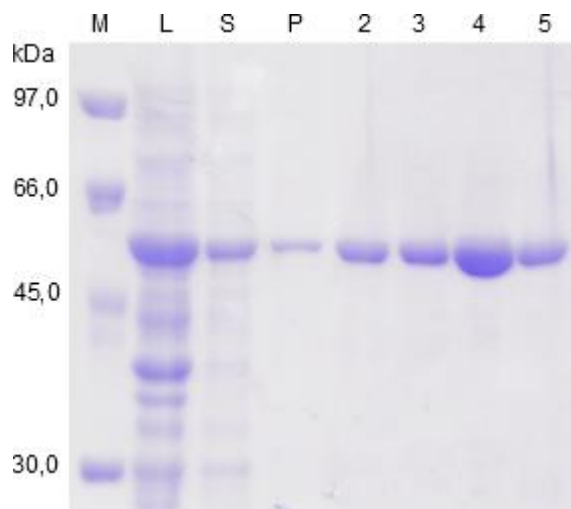
Protein ENDOF₁ zůstává po produkci v bakteriích. Pro jeho uvolnění byly bakteriální buňky lyzovány působením ultrazvukové sondy v prostředí obsahujícím lysozym, inhibitory proteas (leupeptin, PMSF), RNAsu A a EDTA. Lyzované buňky byly centrifugovány a supernatant byl použit pro izolaci ENDO F₁.

Rekombinantní ENDO F₁ má za svoji aminokyselinovou sekvenci vloženou sekvenci glutathion S-transferasy, díky které je možné využít pro purifikaci nosič Glutathione Sepharose 4B, který má afinitu ke glutathion S-transferase. Po eluci volným glutathionem byl roztok proteinu zakoncentrován (viz. 4.4.1) a nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL (viz. 4.4.2). Během izokratické eluce byly jímány jednotlivé frakce. Záznam gelové permeační chromatografie je na Obr. 16, str. 49.



Obr. 16 Záznam gelové permeační chromatografie proteinu ENDO F1. Kolona Superdex 200 10/300 GL, izokratická eluce. Modná linie představuje eluční profil, svislé čáry oddělují jednotlivé jímáné frakce. Vrchol s elučním objemem okolo 12,5 ml představuje dimer, který se tvoří díky glutathion S-transferase. Vrchol s elučním objemem okolo 14,5 ml představuje monomer.

Během purifikace byl odebrán vzorek pro SDS PAGE z pelety a supernatantu po lyzování buněk a také z průtoku při promývání nosiče Glutathione Sepharose 4B před elucí ENDO F₁. Vzorek pro SDS PAGE byl také odebrán z frakcí č. 2-5 z gelové permeační chromatografie (Obr. 16), výsledek je na Obr. 17, str. 50.



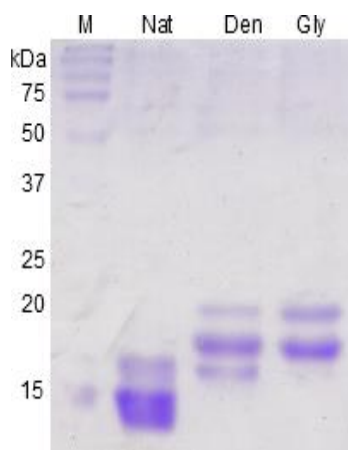
Obr. 17 SDS PAGE proteinu ENDO F₁ během purifikace a po purifikaci. 12,5% gel, redukující prostředí, v dráze M je standard, v dráze L je vzorek pelety po lyzování buněk, v dráze S je vzorek supernatantu po lyzování buněk, použitý pro purifikaci, v dráze P je průtok při omývání nosiče Glutathione Sepharose 4B před elucí ENDO F₁. Dráhy označené 2-5 představují vzorky z jednotlivých frakcí po gelové chromatografii (viz. Obr. 16, str. 47).

Z elektroforézy (Obr. 17) je vidět, že vzorek odebraný z pelety po lyzování buněk (dráha L), vzorek supernatantu (dráha S) i vzorek průtoku při promývání nosiče Glutathione Sepharose 4B před elucí enzymu (dráha P) obsahují ENDO F₁. V případě supernatantu, ze kterého byla ENDO F₁ purifikována pomocí nosiče Glutathione Sepharose 4B, je to žádoucí. ENDO F₁ přítomná v peletě však může znamenat, že část proteinu byla špatně sbalena a zůstala v nerozpustných inkluzních tělíscích. Přítomnost ENDO F₁ v průtoku při omývání nosiče Glutathione Sepharose 4B naznačuje, že byla pravděpodobně překročena kapacita nosiče.

Dále je z elektroforézy (Obr. 17) také patrné, že frakce č. 2 až 5 neobsahují žádné výraznější nečistoty a zároveň všechny obsahují ENDO F₁. Proto byly spojeny a zakonzentrovány na 2 mg/ml a následně vyředěny 100% glycerolem na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Tento zásobní roztok ENDO F₁ je uchováván při -20 °C.

5.4.2 OVĚŘENÍ ENZYMATICKÉ AKTIVITY ENDO F₁ – DEGLYKOSYLACE NKp30

Pro ověření enzymatické aktivity ENDO F₁ byl denaturován protein NKp30 a to jak v nativním, tak v denaturujícím prostředí. Inkubační doba reakce byla 1 hod a hmotnostní poměr ENDO F₁ : NKp30 byl 1 : 50. V případě denaturovaného proteinu byl vzorek proteinu NKp30 před deglykosilací 10 min vařen v prostředí 0,5% SDS. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky analyzovány SDS PAGE, Obr. 18, str. 51.



Obr. 18 Deglykosylace receptoru NKp30. 18% gel, redukující prostředí, v dráze M je standard, v dráze Nat je deglykosylovaný protein NKp30 v nativním stavu, v dráze Den je deglykosylovaný denaturovaný protein NKp30, v dráze Gly je glykosylovaný protein NKp30.

Na Obr. 18 je jasně viditelný pokles molekulové hmotnosti v dráze Nat. V nativním stavu se tedy podařilo protein NKp30 deglykosylovat, i když stále je patrných několik proužků, což znamená že deglykosylace není úplná. Pro další pokusy by bylo vhodné prodloužit inkubační dobu nebo použít větší množství enzymu. Také je možné, že některá místa nejsou pro ENDO F₁ přístupná, takže protein nemůže být úplně deglykosylován.

Z dráhy Den na Obr. 18 je patrné, že denaturovaný protein se podařilo deglykosylovat pouze z velmi malé části. Enzymatická aktivita ENDO F₁ je pravděpodobně citlivá k denaturujícímu prostředí.

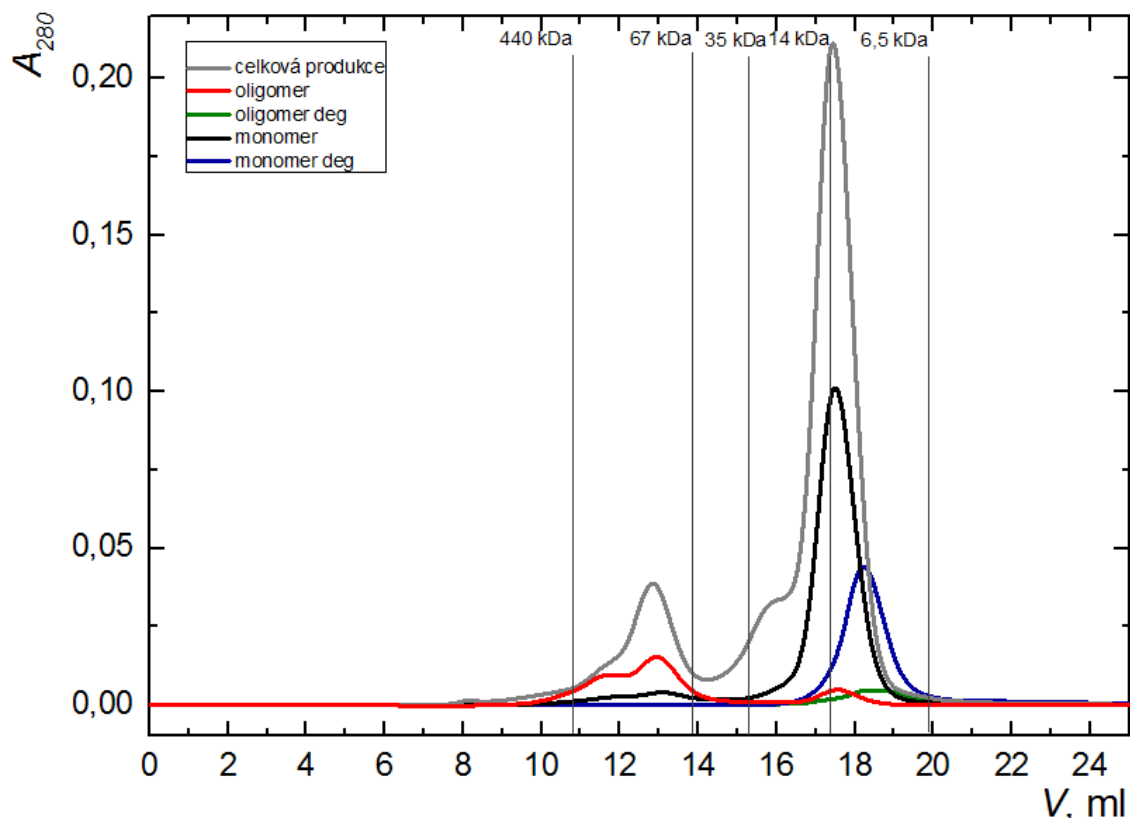
5.5 STUDIUM OLIGOMERNÍHO STAVU NKp30 PRODUKOVANÉHO V LINII HEK293S GnTI

Oligomerní stav proteinu NKp30 v závislosti na jeho glykosylaci byl analyzován opakovanými nástřiky na kolonu Superdex 200 10/300 GL. Všechny gelové permeační chromatografie probíhaly za stejných podmínek a za izokratické eluce.

Pro studium oligomerního stavu byly spojeny frakce č. 2, 3 a 4 obsahující oligomer a frakce č. 8 a 9 obsahující monomer. Frakce byly získány při gelové permeační chromatografii proteinu NKp30 produkovaného v buněčné linii HEK293S GnTI (Obr. 12, str. 46). Oligomer i monomer byly naneseny na kolonu Superdex 200 10/300 GL (viz. 4.6.1), získané frakce byly spojeny a deglykosylovány (viz. 4.6.2).

Deglykosylované frakce byly opět naneseny na kolonu (viz. 4.6.3). Porovnání získaných elučních profilů je uvedeno na Obr. 19, str. 52 a Obr. 20, str. 53.

Eluční objemy proteinů o dané molekulové hmotnosti deklarované výrobcem jsou pouze orientační, protože na eluční objem má vliv také tvar molekuly, její interakce s nosičem a také stav kolony. Z těchto přibližných dat je však zřejmé, že oligomer obsahuje výrazně větší částice než monomer.



Obr. 19 Porovnání profilů gelové permeační chromatografie monomerní a oligomerní frakce proteinu NKp30 produkovaného v linii HEK293S GnTI. Kolona Superdex 200 10/300 GL, izokratická eluce. Nástřik glykosylovaného proteinu NKp30 po purifikaci, **glykosylovaný oligomer**, **deglykosylovaný oligomer**, **glykosylovaný monomer** a **deglykosylový monomer**. Svislé čáry označují typický eluční objem proteinů o dané molekulové hmotnosti deklarované výrobcem [56].

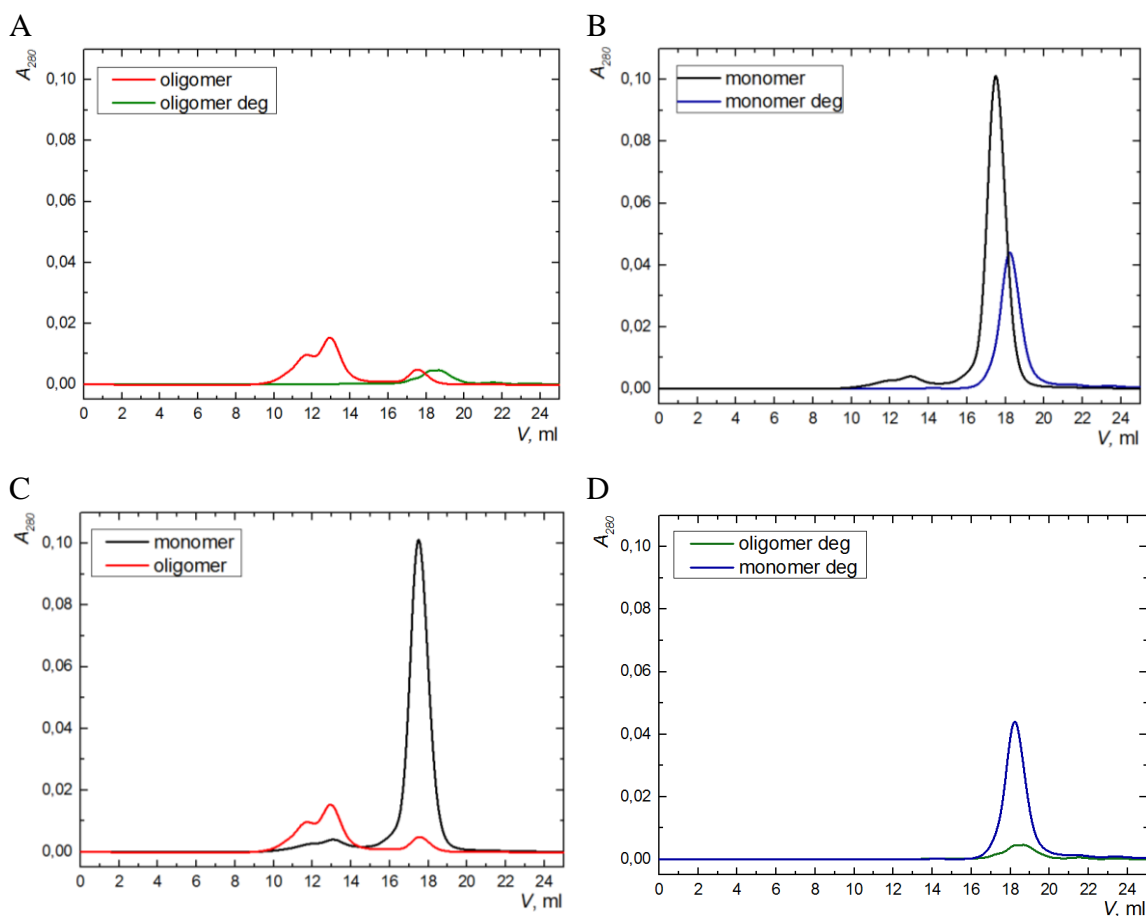
Obr. 20, str. 53 nabízí detailnější porovnání profilu gelové permeační chromatografie nástřiku spojených frakcí. Osa y je ve stejném měřítku, aby byly profily lépe porovnatelné.

Při porovnání glykosylovaných a deglykosylovaných frakcí (Obr. 20A, str. 53 a Obr. 20B, str. 53) je na profilu chromatografie patrný posun v retenčním objemu. Protein tedy byl deglykosylován, čímž se snížila jeho molekulová hmotnost a je eluován později.

Při porovnání glykosylovaných frakcí (Obr. 20C, str. 53), je zřejmé, že při nástřiku monomeru byly eluovány i molekuly odpovídající oligomeru. Ve vzorku tedy došlo

k oligomerizaci. Naopak při nástřiku oligomeru vidíme malý chromatografický pík odpovídající monomeru. Část oligomerů se tedy rozpadla na jednotlivé monomery. To svědčí o dynamické rovnováze mezi oligomery a monomery přítomnými v roztoku.

Pokud porovnááme deglykosylované frakce (Obr. 20D), vidíme pouze vrcholy odpovídající monomeru. U deglykosylované frakce monomeru tedy nedošlo k oligomerizaci (patrné také z Obr. 20B). V oligomerní frakci došlo ke kompletní disociaci oligomerů na monomery (patrné také z Obr. 20A). Z toho lze vyvodit, že formace oligomerů v roztoku je závislá na glykosylaci receptoru NKp30.



Obr. 20 Porovnání profilů gelové permeační chromatografie při nástřiku spojených frakcí. Kolona Superdex 200 10/300 GL, izokratická eluce. **Glykosylovaný oligomer**, **deglykosylovaný oligomer**, **glykosylovaný monomer** a **deglykosylovaný monomer**. **A** porovnání glykosylovaného a deglykosylovaného oligomeru, **B** porovnání monomeru a oligomeru, **C** porovnání glykosylovaného a deglykosylovaného monomeru, **D** porovnání deglykosylovaného monomeru a oligomeru.

Cílem této práce bylo připravit přirozeně a jednoduše glykosylovanou extracelulární doménu lidského imunoreceptoru NKp30 a dále charakterizovat jeho oligomerní stav v roztoku v závislosti na jeho glykosylaci.

Výsledky opakovaných nástřiků monomeru a oligomeru (Obr. 20C, str. 53) ukazují, že monomer má tendenci tvořit oligomery a oligomer má tendenci disociovat. Tato data svědčí o rovnováze, která se ustavuje v roztoku proteinu. Rovnováha však bude pomalá, protože během ředění při gelové permeační chromatografii nedochází k úplnému rozpadu oligomeru. Poměr oligomeru a monomeru bude pravděpodobně závislý na koncentraci. Není však zřejmé, jak velký vliv má na formování nebo rozpad oligomerů zakonzentrování před nanesením na kolonu.

Z výsledků gelové permeační chromatografie deglykosylovaného monomeru a oligomeru (Obr. 20D, str. 53) je patrné, že dochází k úplnému rozpadu oligomeru a ve vzorku je přítomný pouze monomer. Vzniká předpoklad, že deglykosylace proteinu nebyla úplná, protože při ověřování enzymatické aktivity ENDO F₁ se protein NKp30 také nepodařilo deglykosylovat úplně (Obr. 18, str. 51). I částečná deglykosylace však stačí na to, aby se oligomer rozpadl na monomerní jednotky. Lze se domnívat, že některé glykosidy jsou hůře přístupné jak pro ENDO F₁, tak pro interakci s ostatními jednotkami.

Monomerní a oligomerní frakce přirozeně glykosylovaného proteinu NKp30 byly podrobeny sedimentační analýze. Výsledky ukazují, že původně oligomerní frakce obsahuje také částice s menší molekulovou hmotností, tedy menší oligomery a také monomer. Monomerní frakce naopak obsahuje téměř výhradně monomer. To opět svědčí o dynamické rovnováze mezi oligomerem a monomerem, která se pravděpodobně ustavuje velmi pomalu. Oligomerizace bude pravděpodobně také závislá na typu glykosylace, protože srovnání výsledků získaných opakovanými nástřiky jednoduše glykosylovaného proteinu a data získaná sedimentační analýzou komplexně glykosylovaného proteinu se mírně liší.

Pro úplnost dat bude vhodné v budoucnu provést sedimentační analýzu i pro jednoduše glykosylovaný a deglykosylovaný protein. Dále by bylo vhodné zjistit, jaký

vliv na oligomerizaci má koncentrace vzorku (případně zakoncentrování před nanesením na kolonu).

Získaná experimentální data jsou v souladu s některými již dříve publikovanými závěry. Podle nich má glykosylovaný protein NKp30 vyšší afinitu ke svému ligandu B7-H6 [32]. Afinitu receptoru NKp30 k ligandu B7-H6 také zvyšuje jeho homooligomerizace [43]. Zjištění, že formování homooligomerů je závislé na glykosylaci, je novým poznatkem ve studiu biologie imunoreceptoru NKp30.

- Byl připraven expresní vektor pro produkci extracelulární domény receptoru NKp30.
- Byla připravena homogenně glykosylovaná forma extracelulární domény receptoru NKp30 v expresním systému HEK293S GnTI.
- Byla připravena přirozeně glykosylovaná forma extracelulární domény receptoru NKp30 v expresním systému HEK293T.
- Bylo zjištěno, že mezi oligomery a monomery receptoru NKp30 je dynamická rovnováha.
- Bylo zjištěno, že oligomerizace receptoru NKp30 je závislá na jeho glykosylačním stavu, oligomery tvoří pouze glykosylovaný protein.
- Bylo připraveno zásobní množství rekombinantní endoglykosidasy ENDO F₁

- [1] HOŘEJŠÍ, V.; BARTŮŇKOVÁ, J.: *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s.
- [2] DELVES, P. J.; ROITT, I. J.: *Roitt's essential immunology*. 12th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2011, s. 26-29.
- [3] BURMESTER, G. R.; PEZZUTTO, A.; ULRICHS, T.; AICHER, A.: *Color atlas of immunology*. New York: Thieme, 2003, s. 68-72.
- [4] STERN-GINOSSAR, N.; MANDELBOIN, O.: Receptors on NK cells. In: LOTZE, M. T.; THOMSON, A. W.: *Natural killer cells: basic science and clinical application*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2010, s. 155-168.
- [5] BORK, P.; HOLM L.; SANDER, C.: The Immunoglobulin Fold. *Journal of Molecular Biology*. 1994, **242**(4), 309-320.
- [6] ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E.: The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*. 2005, **272**(24), 6179–217.
- [7] LI, Y.; MARIUZZA, R. A.: Structural Basis for Recognition of Cellular and Viral Ligands by NK Cell Receptors. *Frontiers in Immunology*. 2014, **5**(123).
- [8] BARTEL, Y.; BAUER, B.; STEINLE A.: Modulation of NK Cell Function by Genetically Coupled C-Type Lectin-Like Receptor/Ligand Pairs Encoded in the Human Natural Killer Gene Complex. *Frontiers in Immunology*. 2013, **4**(362).
- [9] ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S.: *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012, s. 68-72.
- [10] HUDSPETH, K.; SILVA-SANTOS, B.; MAVILIO, D.: Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells. *Frontiers in Immunology*. 2013, **4**(69).
- [11] NKp46. *Protein Data Bank* [online]. [cit. 2014-05-08]. Dostupné z: <http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1P6F>
- [12] NKp44. *Protein Data Bank* [online]. [cit. 2014-05-09]. Dostupné z: <http://pdb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1HKF&opt=3>
- [13] NKp33. *Protein Data Bank* [online]. [cit. 2014-05-23]. Dostupné z: <http://pdb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=3NOI&opt=3&bionumber=1>
- [14] KRUSE, P. H.; MATTA, J.; UGOLINI, S.; VIVIER, E.: Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology and Cell Biology*. 2014, **92**(3), 221-229.

- [15] JARON-MENDELSON, M.; YOSSEF, R.; APPEL, Y. M.; ZILKA, A.; HADAD, U.; AFERGAN, F.; ROSENTAL, B.; ENGEL, S.; NEDVETZKI, S.; BRAIMAN, A.; PORGADOR, A.: Dimerization of NKp46 Receptor Is Essential for NKp46-Mediated Lysis: Characterization of the Dimerization Site by Epitope Mapping. *Journal of Immunology*. 2012, **188**(12), 6165-6174.
- [16] ARNON, T. I.; ACHDOUT, H.; LIEBERMAN, N.; GAZIT, R.; GONEN-GROSS, T.; KATZ, G.; BAR-ILAN, A.; BLOUSHTAIN, N.; LEV, M.; JOSEPH, A.; KEDAR, E.; PORGADOR, N.; MANDELBOIM, O.: The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood*. 2004, **103**(2), 664-672.
- [17] JARAHIAN, M.; FIEDLER, M.; COHNEN, A.; DJANDJI, D.; HÄMMERLING, G. J.; GATI, C.; CERWENKA, A.; TURNER, P. C.; MOYER, R. W.; WATZL, C.; HENGEL, H.; MOMBURG, F.; YOKOYAMA, W.M.: Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin. *PLoS Pathogens*. 2011, **7**(8).
- [18] GARG, A.; BARNES, P. F.; PORGADOR, A.; ROY, S.; WU, S.; NANDA, J. S.; GRIFFITH, D. E.; GIRARD, W. M.; RAWAL, N.; SHETTY S.; VANKAYALAPATI, R.: Vimentin Expressed on Mycobacterium tuberculosis-Infected Human Monocytes Is Involved in Binding to the NKp46 Receptor. *Journal of Immunology*. 2006, **177**(9), 6192-6198.
- [19] CHAUSHU, S.; WILENSKY, A.; GUR, C.; SHAPIRA, L.; ELBOIM, M.; HALFTEK, G.; POLAK, D.; ACHDOUT, H.; BACHRACH, G.; MANDELBOIM, O.; CARLYLE, J.: Direct Recognition of Fusobacterium nucleatum by the NK Cell Natural Cytotoxicity Receptor NKp46 Aggravates Periodontal Disease. *PLoS Pathogens*. 2013, **8**(3).
- [20] MAVOUNGOU, E.; HELD, J.; MEWONO, L.; KREMSNER, P. G.: A Duffy Binding-Like Domain Is Involved in the NKp30-Mediated Recognition of Plasmodium falciparum -Parasitized Erythrocytes by Natural Killer Cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2007, **195**(10), 1521-1531.
- [21] HECHT, M.-L.; ROSENTAL, B.; HORLACHER, T.; HERSHKOVITZ, O.; DE PAZ, J. L.; NOTI, C.; SCHAUER, S.; PORGADOR, A.; SEEBERGER, P. H.: Natural Cytotoxicity Receptors NKp30, NKp44 and NKp46 Bind to Different Heparan Sulfate/Heparin Sequences. *Journal of Proteome Research*. 2009, **8**(2), 712-720.
- [22] ENK, J.; MANDELBOIM, O.: The Role of Natural Cytotoxicity Receptors in Various Pathologies: Emphasis on Type I Diabetes. *Frontiers in Immunology*. 2014, **5**(4).
- [23] CAMPBELL, K. S.; YUSA, S.-I.; KIKUCHI-MAKI, A.; CATINA, T. L.: NKp44 Triggers NK Cell Activation through DAP12 Association That Is Not Influenced by a Putative Cytoplasmic Inhibitory Sequence. *Journal of Immunology*. 2004, **172**(2), 899-906.

- [24] ROSENTAL, B.; BRUSILOVSKY, M.; HADAD, U.; OZ, D.; APPEL, M. Y.; AFERGAN, F.; YOSSEF, R.; ROSENBERG, L. A.; AHARONI, A.; CERWENKA, A.; CAMPBELL, K. S.; BRAIMAN, A.; PORGADOR, A.: Proliferating Cell Nuclear Antigen Is a Novel Inhibitory Ligand for the Natural Cytotoxicity Receptor NKp44. *Journal of Immunology*. 2011, **187**(11), 5693-5702.
- [25] HORTON, N. C.; MATHEW, S. O.; MATHEW, P. A.; AHLENSTIEL, G.: Novel Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen and HLA I on the Surface of Tumor Cells Inhibits NK Cell Function through NKp44. *PLoS ONE*. 2013, **8**(3).
- [26] HERSHKOVITZ, O.; ROSENTAL, B.; ROSENBERG, L. A.; NAVARRO-SANCHEZ, M. E.; JIVOV, S.; ZILKA, A.; GERSHONI-YAHALOM, O.; BRIENT-LITZLER, E.; BEDOUELLE, H.; HO, J. W.; CAMPBELL, K. S.; RAGER-ZISMAN, B.; DESPRES, P.; PORGADOR, A.: NKp44 Receptor Mediates Interaction of the Envelope Glycoproteins from the West Nile and Dengue Viruses with NK Cells. *Journal of Immunology*. 2009, **183**(4), 2610-2621.
- [27] ESIN, S.; COUNOUPAS, C.; AULICINO, A.; BRANCATISANO, F. L.; MAISETTA, G.; BOTTAI, D.; DI LUCA, M.; FLORIO, W.; CAMPA, M.; BATONI, G.: Interaction of Mycobacterium tuberculosis Cell Wall Components with the Human Natural Killer Cell Receptors NKp44 and Toll-Like Receptor 2. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2013, **77**(6), 460-469.
- [28] PENDE, D.; PAROLINI, S.; PESSINO, A.; SIVORI, S.; AUGUGLIARO, R.; MORELLI, L.; MARCENARO, E.; ACCAME, L.; MALASPINA, A.; BIASSONI, R.; BOTTINO, C.; MORETTA, L.; MORETTAC, A.: Identification and Molecular Characterization of NKp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1999, **190**(10), 1505-16.
- [29] Human chromosom 6. *www.uniprot.org* [online]. [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/docs/humchr06>
- [30] Natural cytotoxicity triggering receptor 3. *www.uniprot.org* [online]. [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: http://www.uniprot.org/uniprot/O14931#section_comments
- [31] DELAHAYE, N. F.; RUSAKIEWICZ, S.; MARTINS, I.; MÉNARD, C.; ROUX, S.; LYONNET, L.; PAUL, P.; SARABI, M.; CHAPUT, N.; SEMERARO, M.; MINARD-COLIN, V.; POIRIER-COLAME, V.; CHABA, K.; FLAMENT, C.; BAUD, V.; AUTHIER, H.; Kerdine-Römer, S.; PALLARDY, M.; CREMER, I.; PEAUDECERF, L.; ROCHA, B.; VALTEAU-COUANET, D.; GUTIERREZ, J. C.; NUNÈS, J. A.; COMMO, F.; BONVALOT, S.; IBRAHIM, N.; TERRIER, P.; OPOLON, P.; BOTTINO, C.; MORETTA, A.; TAVERNIER, J.; RIHET, P.; COINDRE, J.-M.; BLAY, J.-Y.; ISAMBERT, N.; EMILE, J.-F.; VIVIER, E.; LECESNE, A.; KROEMER, G.; ZITVOGEL, L.: Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature Medicine*. 2011, **17**(6), 700-707.

- [32] HARTMANN, J.; TRAN, T.-V.; KAUDEER, J.; OBERLE, K.; HERRMANN, J.; QUAGLIANO, I.; ABEL, T.; COHNEN, A.; GATTERDAM, V.; JACOBS, A.; WOLLSCHIED, B.; TAMPE, R.; WATZL, C.; DIEFENBACH, A.; KOCH, J.: The Stalk Domain and the Glycosylation Status of the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 Are Important for Ligand Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, **287**(37), 31527-31539.
- [33] ARNON, T. I.; ACHDOUT, H.; LEVI, O.; MARKEL, G.; SALEH, N.; KATZ, G.; GAZIT, R.; GONEN-GROSS, T.; HANNA, J.; NAHARI, E.; PORGADOR, A.; HONIGMAN, A.; PLACHTER, B.; MEVORACH, D.; WOLF, D. G.; MANDELBOIM, O.: Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nature Immunology*. 2005, **6**(5), 515-523.
- [34] HERSHKOVITZ, O., M. JARAHIAN, A. ZILKA, A. BAR-ILAN, G. LANDAU, S. JIVOV, Y. TEKOA, R. GLICKLIS, J. T. GALLAGHER, S. C. HOFFMANN, H. ZER, O. MANDELBOIM, C. WATZL, F. MOMBURG a A. PORGADOR. Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology*. 2007, **18**(1), 28-41.
- [35] BINICI, J.; KOCH, J.: BAG-6, a jack of all trades in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014, **71**(10), 1829-1837.
- [36] POGGE VON STRANDMANN, E.; SIMHADRI, V. R.; VON TRESCKOW, B.; SASSE, S.; REINERS, K. S.; HANSEN, H. P.; ROTHE, A.; BÖLL, B.; SIMHADRI, V. L.; BORCHMANN, P.; McKINNON, P. J.; HALLEK, M.; ENGERT, A.: Human Leukocyte Antigen-B-Associated Transcript 3 Is Released from Tumor Cells and Engages the NKp30 Receptor on Natural Killer Cells. *Immunity*. 2007, **27**(6), 965-974.
- [37] BINICI, J.; HARTMANN, J.; HERRMANN, J.; SCHREIBER, C.; BEYER, S.; GULER, G.; VOGEL, V.; TUMULKA, F.; ABELE, R.; MANTELE, W.; KOCH, J.: A Soluble Fragment of the Tumor Antigen BCL2-associated Athanogene 6 (BAG-6) Is Essential and Sufficient for Inhibition of NKp30 Receptor-dependent Cytotoxicity of Natural Killer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, **288**(48), 34295-34303.
- [38] MATTA, J.; BARATIN, M.; CHICHE, L.; FOREL, J.-M.; COGNET, C.; THOMAS, G.; FARNARIER, C.; PIPEROGLOU, C.; PAPAZIAN, L.; CHAUSSABEL, D.; UGOLINI, S.; VELY, F.; VIVIER, E.: Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions. *Blood*. 2013, **122**(3), s. 394-404.
- [39] JOYCE, M. G., TRAN, P.; ZHURAVLEVA, M. A.; JAW, J.; COLONNA, M.; SUN, P. D.: Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor NKp30 and identification of its ligand binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011, **108**(15), 6223-6228.

- [40] LI, Y.; WANG, Q.; MARIUZZA, R. A.; JAW, J.; COLONNA, M.; SUN, P. D.: Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *Journal of Experimental Medicine*. 2011, **208**(4), 703-714.
- [41] KELLNER, C.; MAURER, T.; HALLACK, D.; REPP, R.; VAN DE WINKEL, J. G. J.; PARREN, P. W. H. I.; VALERIUS, T.; HUMPE, A.; GRAMATZKI, M.; PEIPP, M.: Mimicking an Induced Self Phenotype by Coating Lymphomas with the NKp30 Ligand B7-H6 Promotes NK Cell Cytotoxicity. *Journal of Immunology*. 2012, **189**(10), 5037-5046.
- [42] ZHANG, T.; WU, M.-R.; SENTMAN, C. L.; REPP, R.; VAN DE WINKEL, J. G. J.; PARREN, P. W. H. I.; VALERIUS, T.; HUMPE, A.; GRAMATZKI, M.; PEIPP, M.: An NKp30-Based Chimeric Antigen Receptor Promotes T Cell Effector Functions and Antitumor Efficacy In Vivo. *Journal of Immunology*. 2012, **189**(5), 2290-2299.
- [43] HERRMANN, J., BERBERICH, H.; HARTMANN, J.; BEYER, S.; DAVIES, K.; KOCH, J.: Homo-oligomerization of the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 Ectodomain Increases Its Binding Affinity for Cellular Ligands. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, **289**(2), 765-777.
- [44] Oficiální návod k produktu NucleoBond Xtra Maxi. *Macherey-Nagel* [online]. [cit. 2014-05-17]. Dostupné z: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/SP_NBXtra_LargeConstructs.pdf
- [45] Oficiální návod distributora k produktu JETQUICK Gel Extraction Spin Kit. *Genomed* [online]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.genomed-dna.com/pdf/Quick-PDFs/JETQUICK-Protocol.PDF>
- [46] Oficiální návod výrobce k produktu High-Speed Plasmid Mini Kit. *Geneaid* [online]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.geneaid.com/products/plasmid-dna-purification/plasmid-kit-miniprep>
- [47] Instruction manual: Z-Competent TM E. coli Transformation Kit & Buffer set. *Zymo Research Corp.*
- [48] GRUENINGER-LEITCH, F.; D'ARCY, A.; D'ARCY, B.; CHÈNE, C.: Deglycosylation of proteins for crystallization using recombinant fusion protein glycosidases. *Protein Science*. 1996, **5**(12), 2617-2622.
- [49] Oficiální návod výrobce k produktu TALON. *Clontech Laboratories* [online]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: http://www.clontech.com/CZ/Products/Protein_Expression_and_Purification/His-Tagged_Protein_Purification/ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17512&fileId=6571562&sitex=10023:22372:US
- [50] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, **72**, 248-254.

- [51] VANĚK, O.; BEZOUŠKA, K.: Analytická ultracentrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy*. 2010, vol. 104, iss. 12, s. 1155-1162.
- [52] Program SENDTERP. [online]. [cit. 2014-02-20]. Dostupné z: <http://www.jphilo.mailway.com/default.htm>
- [53] SCHUCK, P.: Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. *Biophysical Journal*. 2000, **78**(3), 1606-1619. Program dostupný z: <http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>. [cit. 2014-02-24].
- [54] HEK293T. ATCC [online]. [cit. 2014-05-17]. Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-3022.aspx#characteristics>
- [55] HEK293S GnTI. ATCC [online]. [cit. 2014-05-17]. Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-3022.aspx#characteristics>
- [56] Oficiální protokol výrobce ke koloně Superdex 200 10/300 GL. *GE Healthcare* [online]. [cit. 2014-05-24]. Dostupné z: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc71501796_20140108234952.pdf

