

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Barbora Kalousková

**PŘÍPRAVA LIDSKÉHO NK BUNĚČNÉHO
AKTIVAČNÍHO RECEPTORU NKP80 A JEHO
LIGANDU AICL**

**PREPARATION OF HUMAN NK CELL
ACTIVATION RECEPTOR NKP80 AND ITS
LIGAND AICL**

Diplomová práce

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

Praha 2016

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného projektu GA ČR 15-15181S a GA UK 927916.

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 10. května 2016

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové 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. Velké díky patří Mgr. Michalu Rosůlkovi za změření a vyhodnocení hmotnostně-spektrometrických dat, RNDr. Kateřině Hofrauerové, PhD. za měření dynamického rozptylu světla a Yuguangovi Zhao, PhD. za vedení krystalizačních experimentů. Nesmím také zapomenout na kolektiv laboratoře 204, který mi vytvořil zázemí a vřelé pracovní prostředí.

ABSTRAKT

NK buňky (z angl. natural killer cells, přirozeně zabíječské buňky) hrají klíčovou roli při rozpoznávání a ničení nádorových, infikovaných nebo jinak pozměněných buněk. Na svém povrchu nemají antigenně specifické receptory, proto je řadíme mezi složky přirozené imunity. K rozpoznání cílových buněk slouží řada jiných povrchových receptorů. Inhibiční receptory zajišťují buněčnou toleranci, naopak aktivační receptory spouští cytotoxické mechanismy vedoucí k apoptóze a tedy lýzi buňky. Díky této vlastnosti jsou NK buňky intenzivně studovány v souvislosti s imunoterapií nádorových onemocnění.

Jedním z aktivačních receptorů je NKp80 rozpoznávající svůj ligand AICL. Oba proteiny patří do rodiny receptorů podobných lektinům C-typu. Tento komplex se účastní nejenom přímé lýze maligních buněk myeloidního charakteru, ale má také důležitou roli v imunomodulaci zánětu.

Předmětem této diplomové práce je příprava receptoru NKp80 a jeho ligandu AICL. Receptor NKp80 byl připraven v linii lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK 293S GnTI⁻). Byly připraveny stabilně transfekované linie produkující protein NKp80 konstitutivně nebo indukovatelně. Zapojení disulfidických můstků a obsazení N-glykosylačních míst proteinu NKp80 bylo ověřeno hmotnostní spektrometrií. Dále byl optimalizován postup Mgr. Jiřího Nového na přípravu ligandu AICL v expresním systému *E. coli*, čímž se zvýšila rozpustnost připraveného proteinu.

Byly nasazeny krystalizační pokusy pro NKp80, AICL a komplex NKp80:AICL. Během krystalizace byly získány krystaly proteinu NKp80.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňka, NKp80, AICL, imunoreceptor, HEK293, stabilní buněčná linie

ABSTRACT

NK (natural killer) cells play a key role in recognition and elimination of tumour, infected or altered cells. They do not possess any antigen-specific receptors on their surface, therefore they are classified as part of innate immunity. Recognition of target cell is based on other surface receptors. Inhibition receptors assure cell tolerance, by contrast activation receptors trigger cytotoxic mechanisms leading to apoptosis and thus to cell lysis. Thanks to this characteristics, NK cells are intensively studied in connection with tumour immunotherapy.

One of the activating receptors is NKp80 recognising its ligand AICL. Both proteins belong into C-type lectin-like family. Complex is involved not only in direct lysis of malignant myeloid cells, but plays a crucial role in immunomodulation of inflammation.

Objective of this master's thesis is expression of receptor NKp80 and its ligand AICL. Receptor NKp80 was prepared in human embryonic kidney cell line (HEK 293S GnTI). Stable cell lines expressing NKp80 protein in constitutive or inducible way were prepared. Formation of disulfide bonds as well as occupation of sites predicted for N-glycosylation in NKp80 protein was verified by mass spectrometry. Furthermore, the preparation of AICL described by Mgr. Jiří Nový in *E. coli* expression system was optimised, which led to increased solubility of protein.

Crystallization trials for NKp80, AICL and complex NKp80:AICL were set up. Crystals of NKp80 were obtained.

KEY WORDS

NK cell, NKp80, AICL, immunoreceptor, HEK293, stable cell line

(This thesis is written in Czech)

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------------------|--|
| AA | akrylamid |
| ADCC | cytotoxická reakce závislá na protilátkách, z angl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity |
| AICL | receptor z rodiny CLEC2, angl. activation-induced C-type lectin |
| APS | peroxodisíran amonný, z angl. ammonium persulfate |
| CBB | modré barvivo, z angl. Coomassie brilliant blue |
| CD | označení povrchových molekul, z angl. cluster of differentiation |
| CLEC2 | rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu, z angl. C-Type lectin domain family 2 |
| CTLA-4 | protein asociovaný s cytotoxickými T-lymfocyty, z angl. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein |
| CTLD | doména podobná lektinům C-typu, z angl. C-type lectin-like domains |
| CTLR | receptor obsahující CTLD, z angl. C- |
| dH ₂ O | deionizovaná voda |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DSF | diferenční skenovací fluorimetrie |
| DLS | měření dynamického rozptylu světla, z angl. dynamic light scattering |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| Fas | receptor indukující apoptózu, člen rodiny receptoru TNF |
| FasL | ligand receptoru Fas |
| 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 |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie, angl. high-performance liquid chromatography |
| ILT | receptor z imunoglobulinové superrodiny, z angl. immunoglobulin-like transcript |
| INF γ | interferon γ , jeden z cytokinů |

| | |
|--------------|--|
| IPTG | isopropylthiogalaktopyranosid, syntetický induktor lac 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 |
| KACL | receptor z rodiny CLEC2, keratinocyte-associated C-type lectin |
| KIR | zabíječský receptor z imunoglobulinové superrodiny, z angl. killer cell immunoglobulin-like receptor |
| KLRF | rodina receptorů NK buněk podobný lektinům C-typu, z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily F |
| LB | kultivační médium, z angl. lysogeny broth |
| LIR | receptor z imunoglobulinové superrodiny na povrchu lymfocytů, z angl. leukocyte Ig-like receptors |
| LLT1 | receptor z rodiny CLEC2, z angl. lectin-like transcript 1 |
| LRC | region na chromosomu 19q13.4 kódující imunoglobulinové receptory, z angl. leukocyte receptor complex |
| IPEI | lineární polyethylenimin |
| hemITAM | poloviční imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv ITAM |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonová kyselina |
| MBP | receptor vážící manosu, z angl. manose binding protein |
| MHC gp I(II) | glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu I. (II.) třídy, z angl. major histocompatibility complex glycoproteins class I (II) |
| MWCO | propustnost membrány proteinových koncentrátorů, z angl. molecular weight cut off |
| NCR | receptor přirozené cytotoxicity, z angl. natural cytotoxicity receptor |
| NK | přirozený zabíječ, z angl. natural killer |
| NK-92 | linie buněk odvozených od NK buněčného lymfomu |
| NKC | region na chromosomu 12p13.1 kódující lektinům C-typu podobné receptory, z angl. natural killer complex |
| NKT | T-lymfocyty podobné přirozeně zabíječským buňkám |
| NKG2 | rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu, z angl. natural-killer group 2 |

| | |
|----------|--|
| 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 1 |
| PBS | fosfátem pufovaný fyziologický roztok, z angl. phosphate buffered saline |
| PD-1 | receptor inhibující programovanou buněčnou smrt, z angl. programmed death 1 |
| PDB | databáze proteinových struktur, z angl. Protein data bank |
| 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 na T-lymfocytech, z angl. T-cell receptor |
| TEMED | tetramethylethylendiamin |
| TES | fyziologický roztok pufovaný Tris s přísávkem EDTA |
| Th17 | subpopulace pomocných T-lymfocytů, z angl. T helper cell |
| TLR | receptor prezentující antigen, z angl. toll-like receptor |
| TNF | faktor nekrotizující nádory, z angl. tumor necrosis factor |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| (v/v) | objem/objem |
| (w/v) | hmotnost/objem |

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Teoretický úvod..... | 11 |
| 1.1 | Imunitní systém..... | 11 |
| 1.2 | Protinádorová imunita..... | 11 |
| 1.3 | Funkce přirozených zabijáků..... | 12 |
| 1.4 | NK buněčné receptory..... | 13 |
| 1.5 | Rodina NKRP1..... | 14 |
| 1.5.1 | NKp80:AICL..... | 16 |
| 1.5.2 | NKp65:KACL..... | 18 |
| 1.5.3 | NKRP1A:LLT1..... | 18 |
| 1.6 | Imunoterapie nádorových onemocnění..... | 19 |
| 1.6.1 | Imunoléčba založená na NK receptorech..... | 20 |
| 2 | Cíle práce..... | 21 |
| 3 | Materiál..... | 22 |
| 3.1 | Přístroje a pomůcky..... | 22 |
| 3.2 | Chemikálie..... | 23 |
| 3.3 | Kultivační média..... | 25 |
| 3.4 | Roztoky..... | 25 |
| 3.5 | Vektory..... | 27 |
| 3.6 | Buněčné linie a bakteriální kmeny..... | 27 |
| 4 | Metody..... | 28 |
| 4.1 | Příprava expresních vektorů..... | 28 |
| 4.1.1 | Transformace a velkoobjemová produkce..... | 28 |
| 4.1.2 | Izolace zásobního množství plasmidové DNA..... | 28 |
| 4.1.3 | Určení koncentrace a čistoty plasmidové DNA..... | 29 |
| 4.1.4 | Agarosová elektroforéza..... | 29 |
| 4.2 | Manipulace s linií HEK293S GnTI..... | 29 |
| 4.2.1 | Určení buněčné hustoty..... | 29 |
| 4.2.2 | Rozmrazování..... | 30 |
| 4.2.3 | Kultivace..... | 30 |
| 4.2.4 | Zamrazování..... | 30 |
| 4.3 | Produkce proteinu NKp80 v linii HEK293S GnTI..... | 31 |
| 4.3.1 | Transfekce..... | 31 |
| 4.3.2 | Selekce stabilních linií..... | 31 |
| 4.3.3 | Produkce proteinu NKp80..... | 31 |
| 4.4 | Exprese proteinu AICL v <i>E. coli</i> | 32 |
| 4.4.1 | Kultivace <i>E. coli</i> a produkce proteinu..... | 32 |
| 4.4.2 | Izolace inkluzních tělísek..... | 32 |
| 4.4.3 | <i>In vitro</i> renaturace..... | 33 |
| 4.5 | Purifikace proteinů..... | 33 |
| 4.5.1 | Iontově výměnná chromatografie..... | 33 |
| 4.5.2 | Chelatační chromatografie..... | 34 |
| 4.5.3 | SDS PAGE..... | 34 |
| 4.5.4 | Odsolování..... | 35 |
| 4.5.5 | Zakoncentrování..... | 35 |
| 4.5.6 | Gelová permeační chromatografie..... | 35 |
| 4.5.7 | Určení koncentrace proteinu..... | 36 |
| 4.6 | Charakterizace proteinů..... | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.6.1 | Diferenční skenovací fluorimetrie | 36 |
| 4.6.2 | Měření dynamického rozptylu světla..... | 37 |
| 4.6.3 | Hmotnostní spektrometrie..... | 38 |
| 4.6.4 | Sedimentační analýza | 38 |
| 4.6.5 | Krystalizace | 38 |
| 5 | Výsledky..... | 40 |
| 5.1 | Příprava proteinu AICL a optimalizace jeho skladovacích podmínek..... | 40 |
| 5.1.1 | Sekvence proteinu AICL | 40 |
| 5.1.2 | Produkce a purifikace konstruktu AICL | 41 |
| 5.1.3 | Optimalizace skladovacích podmínek | 44 |
| 5.2 | Expres a purifikace proteinu NKp80 a jeho hmotnostní analýza | 45 |
| 5.2.1 | Sekvence proteinu NKp80 | 46 |
| 5.2.2 | Produkce NKp80 ve stabilní linii transfekované vektorem pOPINTTGneo..... | 47 |
| 5.2.3 | Produkce NKp80_F2 v piggyBac stabilní linii..... | 51 |
| 5.2.4 | Hmotnostní analýza NKp80..... | 54 |
| 5.3 | Komplex NKp80:AICL..... | 55 |
| 5.3.1 | Měření dynamického rozptylu světla..... | 55 |
| 5.3.2 | Sedimentační analýza | 58 |
| 5.4 | Krystalizace proteinů..... | 59 |
| 6 | Diskuse | 62 |
| 7 | Závěr..... | 66 |
| 8 | Seznam citované literatury | 67 |

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunita je primárně definována jako schopnost organismu odolávat nemocem [1]. Je zajišťována širokým souborem buněk a tkání, tedy imunitním systémem. Jeho klíčovou rolí je rozpoznání cizích a tělu vlastních buněk [2]. Obranyschopnost organismu tak neznamená pouze schopnost ubránit se vnějším patogenům, ale také schopnost tolerovat buňky tělu vlastní.

1.2 PROTINÁDOROVÁ IMUNITA

Role imunitního systému při vzniku rakoviny byla ověřena u imunodeficientních myší, které byly náchylnější ke vzniku a rychlejšímu růstu nádorů [3, 4]. Imunitní systém dokáže identifikovat a zničit maligně transformované buňky během procesu nazývaného imunitní dohled. Účastní se ho složky přirozené i získané imunity a je mechanismem pro potlačení vzniku nádorů. Na druhou stranu však bylo zjištěno, že imunitní systém může zapříčinit i progresi rakoviny, když rakovinné buňky mylně považuje za buňky tělu vlastní a chrání je.

Dvojí roli imunitního systému, tedy chránící organismus (angl. host-protective) nebo podporující růst nádoru (angl. tumor-promoting), označuje anglický výraz immunoediting [5]. Vysvětluje zpracování maligních buněk imunitním systémem tak, že dojde k jejich eliminaci (úspěšný imunitní dohled), je ustanovena rovnováha a buňky jsou imunitním systémem tolerovány nebo imunitnímu systému uniknou a dojde k jejich proliferaci.

Schopnost vycestovat do místa nádoru, rozpoznat a zabít nádorové buňky mají především NK buňky (z angl. natural killer cells, přirozeně zabíječské buňky, přesnější pojmenování by však mělo být přirození zabijáci) a některé subpopulace T-lymfocytů, jako jsou T-lymfocyty podobné NK buňkám (NKT buňky), cytotoxické T-lymfocyty (Tc) nebo $\gamma\delta$ T-lymfocyty [5]. Protože invaze nádoru do okolních tkání bývá spojená se zánětem, účastní se imunitní odpovědi také makrofágy a dendritické buňky. Důležitou roli hraje také produkce interferonu gamma (INF γ), který stimuluje imunitní systém k odpovědi.

1.3 FUNKCE PŘIROZENÝCH ZABIJÁKŮ

Protinádorové imunity se účastní jak buňky specifické imunity, některé T-lymfocyty, tak i buňky nespecifické imunity, NK buňky [6]. I když jsou NK buňky, jako ostatní buňky specifické imunity, odvozené od lymfoidního prekursoru, tak na svém povrchu nenesou antigenně specifické receptory. Proto je řadíme do nespecifické imunity. NK buňky nesou na svém povrchu řadu receptorů, díky kterým jsou schopné rozpoznat a zničit nejen nádorové, ale také infikované nebo jinak abnormálně se chovající buňky.

Za abnormální je považováno například vystavování velmi malého množství MHC gp I (glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy, z angl. major histocompatibility complex glycoproteins class I), který je přítomný na všech jaderných buňkách a tělo podle něj pozná, že se jedná o buňky, ke kterým je třeba zachovat toleranci [7]. Rakovinné buňky se snaží uniknout pozornosti imunitního systému tak, že expresi MHC gp I potlačují. Pro NK buňky však MHC gp I představují inhibiční signál zajišťující autotoleranci, proto je tento „chybějící“ (z angl. missing-self) fenotyp aktivuje [8]. Další možnost, jak aktivovat NK buňky je prostřednictvím alterovaných (z angl. altered-self) nebo buňkám nevlastních (z angl. non-self) povrchových znaků, objevujících se v reakci na buněčný stres nebo vyvolaný infekcí.

NK buňky nesou na svém povrchu také Fc receptor CD16, díky němuž mohou rozpoznat buňky opsonizované protilátkami [9]. Tento způsob aktivace NK buněk se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách (z angl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC).

Po rozpoznání je NK buňka schopná v cílové buňce vyvolat apoptózu a tím ji zničit, aniž by vyvolala zánět v okolních tkáních [10]. K tomu slouží dvě hlavní cesty. První je založená na exocytóze cytotoxických granulí obsahujících perforin, který narušuje buněčnou membránu, a umožňuje vstup do buňky dalším granulím obsahujícím granzymy. To jsou serinové proteasy s různou substrátovou specifitou. Právě granzymy vyvolávají v buňce apoptózu. Druhá cesta je založená na aktivaci apoptózy srze interakci se zástupci skupiny TNF (faktor nekrotizující nádory, z angl. tumor necrosis factor) receptorů [11]. Ty se nacházející na povrchu cílové buňky jsou aktivovány ligandem na povrchu NK buněk, čímž se spouští apoptotická kaskáda. Konkrétním příkladem je receptor Fas a jeho ligand FasL.

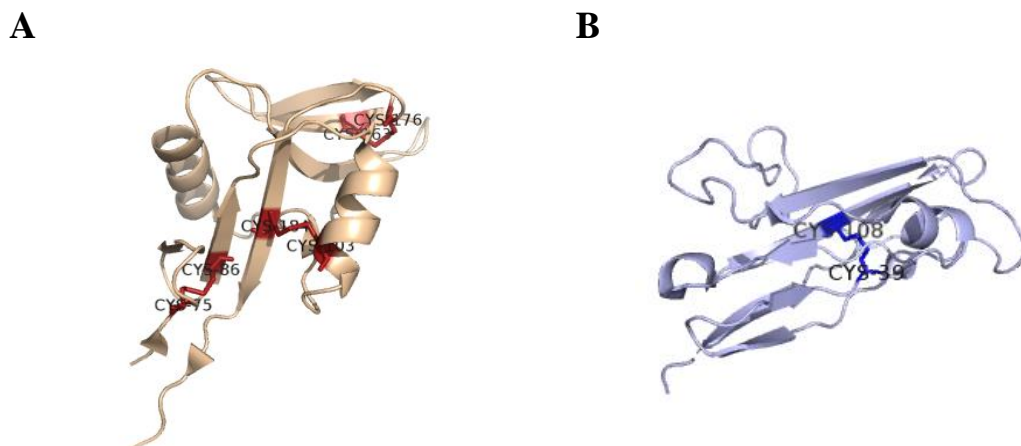
1.4 NK BUNĚČNÉ RECEPTORY

Na povrchu lidských NK buněk se nachází množství receptorů s různými funkcemi. Typickými povrchovými znaky charakterizujícími NK buněk jsou molekuly CD56 a CD16. Ze strukturního hlediska patří povrchové molekuly mezi receptory podobné lektinům C-typu (z angl. C-type lectin-like receptor, CTLR) a receptory patřící mezi imunoglobuliny [12]. Zástupci obou skupin jsou na Obr. 1, str. 14. V obou těchto skupinách najdeme receptory jak aktivační, tak inhibiční. NK buněčné receptory jsou kódované v lidském genomu ve dvou klastrech. Geny pro imunoglobulinové receptory jsou uloženy na chromosomu 19q13.4 v LRC (z angl. leukocyte receptor complex), lektinům C-typu podobné receptory jsou na chromosomu 12p13.1 v NKC (z angl. natural killer complex) [13].

CTLR obsahují charakteristickou strukturní doménu CTLD (z angl. C-type lectin-like domain) [14]. Má strukturu dvojité smyčky stabilizované disulfidickými můstky. První smyčka tvoří vnitřní část domény. Obsahuje čtyři cysteiny, vysoce konzervované napříč CTLD, které tvoří dva disulfidické můstky (se zapojením C1-C4 a C2-C3). U dlouhé formy CTLD je ještě jeden disulfid (C0-C0') v prodloužené N-terminální části. Disulfidické zapojení dlouhé CTLD tak lze popsat jako C1-C2, C3-C6, C4-C5. Druhá smyčka je variabilní a není tak konzervovaná. Účastní se vazby s ligandy. Klasické CTLR váží sacharidové ligandy (např. receptor vážící manosu, MBP z angl. mannose binding protein). Tato vazba je závislá na přítomnosti vápenatých iontů. Některé receptory obsahující CTLD jsou však schopné vázat proteinové ligandy (např. CD161) a vazba navíc nemusí být závislá na přítomnosti vápenatých iontů [15]. Takovými receptory na povrchu lidských NK buněk jsou receptory rodiny NKG2 (z angl. natural-killer group 2, NKG2A-F, heterodimer NKG2A, C, F/CD94), jejichž ligandy patří mezi MHC gp I nebo zástupci rodiny NKRP1 (z angl. NK receptor protein 1), do které patří i studovaný protein NKp80 a podrobněji se jí věnuje Kapitola 1.5, str. 14. Struktura CTLR LLT1 je na Obr. 1A, str. 14.

Druhou strukturní skupinou jsou receptory patřící do imunoglobulinové nadrodiny. Obsahují jednu nebo více imunoglobulinových domén. Jádro domény tvoří 4 β -skládané listy v antiparalelním postavení stabilizované disulfidovým můstkem a spojené smyčkami a dalšími β -skládanými listy [16]. Mezi imunoglobuliny na povrchu lidských NK buněk patří 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 také receptor CD16. Struktura NCR NKp30 je na Obr. 1B.



Obr. 1 Zástupci dvou strukturálních rodin NK receptorů. A Receptor podobný lektinům C-typu s CTLD LLT1 (PDB kód struktury 4QKG) s vyznačenými disulfidy C75-C86, C103-C184 a C163-C176, poslední cystein byl obnoven cílenou mutagenézí [17]. B Imunoglobulinový receptor NKp30 (PDB kód struktury 3NOI) [18].

1.5 RODINA NKRP1

Lidská rodina NKRP1 patří strukturálně mezi CTLR [19]. Členy této rodiny jsou receptory NKR-P1A, NKp80 a NKp65. Jejich ligandovými partnery, strukturálně také CTLR, jsou proteiny rodiny CLEC2 (z angl. C-Type lectin domain family 2) LLT1, AICL a KACL. Ligand:receptorové páry NKp80:AICL a NKp60:KACL stimuluje NK buněčnou cytotoxicitu, naopak NKR-P1A:LLT1 tlumí odpověď NK buněk. Ligand-receptorové páry jsou popsány v Tabulka 1, str. 15.

I když jsou si tyto receptor:ligandové páry po strukturální stránce velice podobné, síla jejich interakce se výrazně liší. Vazba NKp80:AICL a NKR-P1A:LLT1 má nízkou afinitu, disociační konstanta se pohybuje v řádu μM (přesněji $4 \mu\text{M}$ pro NKp80:AICL a $48 \mu\text{M}$ pro NKR-P1A:LLT1) [20, 21]. Naproti tomu interakce NKp65:KACL je vysokoafinitní s disociační konstantou přibližně 1-10 nM [22].

Tabulka 1 Členové rodiny NKRP1 a jejich ligandy z rodiny CLEC2. Názvy proteinů používané v této práci jsou vyznačeny **tučně**, dále jsou v tabulce uvedeny některé alternativní a běžně používaná pojmenování.

| | | | |
|--|---|--|--|
| Receptor (rodina NKRP1) | NKR-P1A (z angl. natural killer cell protein 1A) | NKp80 (z angl. natural killer cell protein 80 kDa) | NKp65 (z angl. natural killer cell protein 65 kDa) |
| Alternativní název | KLRB1 (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1), CD161 | KLRF1 (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1) | KLRF2 (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 2) |
| Ligand (rodina CLEC2) | LLT1 (z angl. lectin-like transcript 1) | AICL (z angl. activation-induced C-type lectin) | KACL (z angl. keratinocyte-associated C-type lectin) |
| Alternativní název | CLEC2D (z angl. C-type lectin domain family 2, member D) | CLEC2B (z angl. C-type lectin domain family 2, member B) | CLEC2A (z angl. C-type lectin domain family 2, member A) |
| Ovlivnění NK buněk | INHIBICE | AKTIVACE | AKTIVACE |

Signalizace probíhá na základě fosforylace intracelulární domény, ke které dochází po navázání ligandu. Doména asociuje s adaptorovými proteiny, které spouští signalizační kaskádu [23]. Receptory rodiny NKRP1 však nesledují klasický intracelulární motiv ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activating motiv), běžný pro aktivaci B a T-lymfocytů. Motiv ITAM je charakteristický dvěma aminokyselinovými moduly YxxL oddělenými 6-8 aminokyselinami. Receptory NKp65 a NKp80 signalizují do buňky prostřednictvím hemITAM [24]. Tato doména obsahuje pouze jeden YxxL modul, je tedy poloviční. HemITAM receptoru je NKp65 společná s ostatními CTLR (motiv DGYxxL), ale u receptoru NKp80 se odlišuje (anomální motiv ERYxxL) [25]. Jelikož NKR-P1A je inhibiční receptor, obsahuje atypický motiv ITIM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motiv) [23].

Geny pro receptory i jejich ligandy jsou u člověka uloženy na chromosomu 12p13.1 v NKC a jsou vždy několik kilobází od sebe, což podporuje teorii o jejich genetické vazbě a regulaci exprese na úrovni transkripce [26]. Lokalizace genů na chromosomu je znázorněna na Obr. 2, str. 16. Na NKC se nachází také NK buněčný receptor CD69, patří do rodiny CLEC2, a NKG2D z rodiny NKG2 [20].



Obr. 2 Znárodnění lokalizace genů pro receptory z rodiny NKRPI a jejich ligandy na chromosomu 12 [26]. Receptory a jejich ligandy jsou lokalizovány blízko sebe v orientaci „head-to-head“ (NKR-P1A:LLT1) nebo „tail-to-tail“ (NKp80:AICL, NKp65:KACL).

1.5.1 NKp80:AICL

Předmětem této práce je rekombinantní příprava a charakterizace komplexu NKp80:AICL.

Aktivační receptor NKp80 je exprimován na povrchu NK buněk jako homodimer o velikosti 80 kDa [27]. Nachází se nejenom na povrchu NK buněk, ale minoritně také na CD56⁺ T-lymfocytech a na některých granulárních lymfocytech vykazujících maligní proliferaci. Jeho ligand, AICL, se vyskytuje především na hematopoetických buňkách, jako jsou makrofágy, granulocyty a po předchozí stimulaci TLR (z angl. toll-like receptor) i na monocytech [20]. Přirozená přítomnost AICL na myeloidních buňkách poukazuje na roli imunokomplexu NKp80:AICL v imunitním dohledu nad buňkami myeloidní leukémie. Ligand receptoru NKp80 byl nalezen také na nehematopoetických buňkách a to na buňkách primárního karcinomu jater [28].

Za určitých okolností může být ligand AICL přítomný i na povrchu samotných NK buněk [29]. V klidovém stavu mají NK buňky v Golgiho komplexu intracelulární zásoby AICL. Po vystavení působení monokinů dochází k rychlému vystavení ligandu AICL na buněčný povrch. Současně dochází k utlumení exprese receptoru NKp80. Takováto NK buňka se sama stává cílem pro cytotoxickou reakci zprostředkovanou receptorem NKp80 na jiné NK buňce. Jedná se tedy o autonomní regulaci NK buněčné odpovědi založenou na interakci receptoru NKp80 a jeho ligandu AICL.

Kromě přímé cytotoxické odpovědi NK buněk vůči maligním myeloidním buňkám spouští interakce NKp80:AICL další mechanismy modulující imunitní odpověď organismu [20]. Buněčný kontakt zprostředkovaný tímto imunokomplexem je velice důležitý pro průběh zánětlivé reakce. V rané fázi zánětu NK buňky aktivují monocyty [30]. Udržení zánětlivé reakce je podporováno sekrecí prozánětlivých cytokinů IFN γ a TNF oběma typy buněk, což hraje důležitou roli během chronické fáze zánětu. NK buňky

mohou prostřednictvím receptoru NKp80 aktivovat také efektorové T-lymfocyty [31]. Schopnost NK buněk komunikovat s monocyty a T-lymfocyty prostřednictvím NK buněčného receptoru NKp80 tvoří důležitou imunomodulační dráhu.

Kromě vystavování ligandu AICL na povrch a tím umožnění buněčné lýze zprostředkované receptorem NKp80 při autoregulaci populací NK buněk byl u maligních buněk pozorován opačný fenotyp. Myeloidní buňky nakažené herpes virem asociovaným s Kaposiho sarkomem snižují expresi AICL a tím se chrání před cytotoxickou reakcí NK buněk [32]. Tlumení exprese aktivačních ligandů nebo vystavování inhibičních molekul na povrchu je jednou ze strategií nádorových buněk jak uniknout imunitnímu dohledu.

Většina CTLR, které jsou receptory NK buněk nebo jejich ligandy, obsahuje dlouhou CTLD a měly by tedy obsahovat šest cysteinů. Výjimku tvoří AICL, LLT1 a KACL. Porovnání sekvencí je na Obr. 3. Ligand AICL obsahuje sedmý cystein na pozici 87, který napříč CTLR není konzervovaný. Během předchozí práce v naší laboratoři se Mgr. Jiřím Novému podařilo zavedením mutace C87S zvýšit výtěžek a stabilitu proteinu [33]. Proteinu LLT1 naopak na konzervované pozici cystein chybí. Přidání cysteinu na pozici 176 (mutace H176C) výrazně zvyšuje výtěžek produkce, jak zjistil během své práce Mgr. Jan Bláha [34]. Další výjimkou je receptor KACL, který obsahuje pouze čtyři cysteiny. Párování tak není narušeno, ale oproti běžným třem disulfidickým můstkům obsahuje pouze dva (jsou zachovány disulfidy v pozicích C1-C2 a C3-C6, přičemž na pozici C6 je čtvrtý cystein).

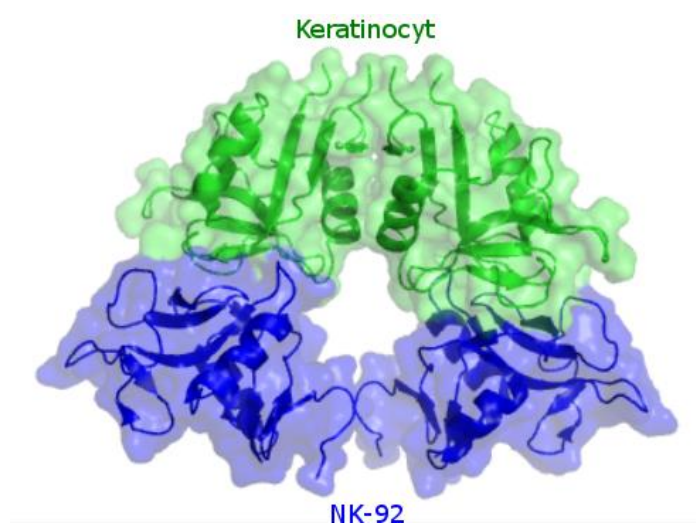
| | | | |
|----------------|-----|--|-----|
| LLT1 | 73 | AACPESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSSQRFCDSDADLAQVESFQELNFLLR-YKG-PSD | 130 |
| KACL | 56 | VACSGDWLGVRDKCFYFSDDTRNWTASKIFCSLQKAELAQIDTQEDMEFLKR-YAG-TDM | 113 |
| AICL | 34 | -LCPYDWIGFQNKCYFYSKEEGDWNSSKYNCSSTQHADLTIIDNIEEMNFLRR-YKC-SSD | 90 |
| NKR-P1A | 92 | LNCPIYWQQLREKCLLFSHTVNPWNNSLADCSSTKESLLLRDKDELIIHTQNLIRDKAIL | 151 |
| NKp65 | 76 | YLCPNDWLLNEGKCYWFSTSFKTWKESQRDCTQLQAHLIIVIQNLDELEFIQNSLKP-GHF | 134 |
| NKp80 | 113 | VLCQSEWLKYQGKCYWFNSNEMKSWSDSYVYCLERKSHLLIIHDQLEMAFTIQKNLRQ-LNY | 170 |
| LLT1 | 131 | HWIGLSR-EQGQPWKWING-TEWTRQFPILG---AGECAYLNDKGASSARHYTERKWC | 185 |
| KACL | 114 | HWIGLSR-KQGDSWKWTNG-TTFNGWFEIIG---NGSEAFLSADGVHSSRFIDIKWC | 168 |
| AICL | 91 | HWIGLKM-AKNRTGQWVDG-ATFTKSFGMRG---SEGCAYLSDDGAATARCYTERKWICR | 145 |
| NKR-P1A | 152 | FWIGLNFSLSEKNWKWINGSFLNSNDLEIRGDAKENSISISQTSVYSEYCSSTEIRWICQ | 211 |
| NKp65 | 135 | GWIGLYVTFQGNLWMWIDEHFLVPELFSVIGPTDDRSCAVITGNWVYSEDCSSTFKGICQ | 194 |
| NKp80 | 171 | VWIGLNFSLKMTWTWVDGSPIDSKIFFIKGPAKENSCAAIKESKIFSETCSSVFKWICQ | 231 |

Obr. 3 Srovnání částí aminokyselinových sekvencí několika CTLR. Ve srovnání jsou vyznačeny konzervované cysteiny, C87 proteinu AICL, H176 proteinu LLT1, F146 a G159 KACL. Ke srovnání byl použit program ClustalW [33], sekvence proteinů byly získány z databáze UniProt [34] pod kódy Q9UHP7 (LLT1), 6UVW9 (KACL), Q92478 (AICL), Q12918 (NKR-P1A), D3W0D1 (NKp65) A Q9NZS2 (NKp80).

1.5.2 NKp65:KACL

Výrazná exprese NKp65 byla detekována na NK buňkách linie NK-92, což jsou buňky odvozené od NK buněčného lymfomu [37]. Ligandem NKp65 je KACL (z angl. keratinocyte-associated C-type lectin). Nachází se téměř výhradně na keratinocytech. Výskyt KACL naznačuje, že tato interakce hraje roli v imunitním dohledu nad buňkami kůže, kožních onemocněních nebo během hojení. Aktivace stimuluje u NK-92 buněk produkci prozánětlivých cytokinů a cytolytické mechanismy.

Struktura tohoto páru je na Obr. 4. Ligand KACL (na obrázku zeleně) tvoří nekovalentní dimer [38]. Ze znázornění přístupného povrchu je zřejmý kontakt mezi monomery KACL i mezi receptorem a ligandem.



Obr. 4 Struktura NKp65:KACL. Struktura NKp65 je zobrazena modře, struktura nekovalentního dimeru KACL zeleně, PDB kód 4IOP [39].

1.5.3 NKRP1A:LLT1

Receptor NKR-P1A je kromě NK buněk vystaven také na povrchu dalších lymfocytů, jako jsou NKT buněk nebo Th17 lymfocyty [40, 21]. Ligandem tohoto receptoru je LLT1, primárně exprimovaný na aktivovaných lymfocytech a antigen prezentujících buňkách, jako jsou aktivované B-lymfocyty. Přítomnost LLT1 na buněčném povrchu je stimulována $IFN\gamma$, infekcí virem HIV nebo virem Epstein-Barrové. Důvodem je povaha receptor:ligandové interakce vyvolávající inhibici cytotoxické odpovědi. Protože jsou receptor i jeho ligand přítomné na mnoha typech buněk, nejsou fyziologické projevy této interakce jednotné. Dochází například k tlumení zánětlivé reakce a je jedním z mechanismů zajištění autotolerance. Nepřímým důsledkem je pak strategie maligních

nebo virem infikovaných buněk, které se jeho prostřednictvím snaží uniknout pozornosti imunitního systému, jako je tomu v případě glioblastomu [41].

Struktura extracelulární části lidského LLT1 s mutací H176C byla vyřešena a je na Obr. 1A, str. 14 [42]. Právě přidání šestého cysteinu se ukázalo jako klíčové pro produkci dostatečného množství materiálu pro krystalizaci.

1.6 IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Imunoterapie nádorových onemocnění předpokládá využití přirozených mechanismů imunitního systému proti nádorům. Snaží se obnovit a případně posílit reakci imunitních buněk proti nádorům, které si vyvinuly únikové strategie. V současné době je intenzivně zkoumáno několik přístupů k imunoterapii, jsou to protirakovinné vakcíny, aktivace adaptivních imunitních mechanismů, použití virů ničících nádory a modulace imunitní odpovědi blokací inhibičních signálů rakovinných buněk nebo vytvořením aktivačních signálů [43].

Podání protirakovinných vakcín dokáže v těle spustit dynamické procesy, které vedou k ustanovení imunitní rovnováhy. Pokud jsou vakcíny podány preventivně, tělo si vytvoří CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocyty schopné rozpoznat nádorové antigeny a předejít tak vzniku nekontrolovaného nádorového bujení, jako je tomu například u lidského papilomaviru [44]. Další možností jsou vakcíny založené na dendritických buňkách, které jsou nejprve odebrány pacientovy, *in vitro* kultivovány s cytokiny, nádorovými antigeny a fragmenty nádorových buněk a následně jsou jako zralé buňky aktivně prezentující antigen injektovány pacientovi, kde mohou odstartovat imunitní reakci [45].

Onkolytické viry jsou přirozené nebo geneticky upravené viry s tropismem vůči nádorovým buňkám [46]. Mají schopnost inhibovat růst nádorů a také aktivovat imunitní systém. Tato terapie má dobré výsledky v kombinaci s chemoterapií.

Dalším přístupem je aktivování imunitní odpovědi založené na antigenně specifických T-buněčných receptorech (TCR). Z místa nádoru jsou odebrány T-lymfocyty, které na svém povrchu sice mají TCR rozpoznávající specificky nádorové buňky, ale jsou umlčené působením nádorových buněk [47]. *Ex vivo* jsou aktivovány a injektovány zpátky pacientovi. Dochází tak k prolomení tolerance a k reakci proti nádoru. Dalším mechanismem je transfekce T-lymfocytů upravenými TCR. Modifikované receptory mohou být TCR s vysokou afinitou vůči nádorovému antigenu vystavenému na

MHC gp II nebo jsou to chimérní antigenně specifické receptory (CAR z angl. chimeric antigen receptor) [48, 49]. Receptory CAR vznikají fúzí variabilní domény protilátky, což je extracelulární část rozpoznávající cílový antigen, a konstantní domény TCR zajišťující intracelulární signalizaci.

Modulace imunitní odpovědi probíhá především odstíněním inhibičních signálů, které jsou zprostředkovány například receptory CTLA-4 nebo PD-1 [50, 51]. K tomu se v současné době používají především monoklonální protilátky. Kromě blokace inhibičních signálů lze také uměle vytvořit aktivační signály, například vystavením aktivačních ligandů na povrch nádorových buněk [52]. Pomocí terapeutických proteinů je možné zprostředkovat přímý buněčný kontakt lymfocytu a nádorové buňky a to spojením aktivačního receptoru lymfocytu se specifickým nádorovým antigenem. K tomu se využívají bispecifické protilátky nebo receptory [53].

Důležitou částí imunoterapie je využití protilátek [54]. Protilátky slouží především k cílení. Využívají se k blokování povrchových receptorů nádorových buněk zodpovědných za růst a proliferaci a tím tlumí rozvoj nádoru. Slouží jako blokátory inhibičních receptorů [55, 50]. Při spojení protilátky proti nádorovým antigenům a aktivačního receptoru je možné vystavit na povrch nádorové buňky aktivační signály, které na ní chybí. Přímou zprostředkovávají ADCC. V neposlední řadě se také využívají pro specifické cílení cytotoxických terapeutik.

1.6.1 IMUNOLÉČBA ZALOŽENÁ NA NK RECEPTORECH

NK buňky se účastní imunitního dohledu nad maligními buňkami a lze je využít v imunoléčbě založené na NK buněčných receptorech a jejich ligandech.

Zajímavých terapeutických výsledků bylo dosaženo při aktivaci NK buněk chiméřními nebo fúzními ligandy. Fúzní protein obsahující extracelulární doménu B7-H6 a fragment protilátky 7D8 rozpoznávající antigen CD20 na povrchu CD20⁺ lymfomů je schopný aktivovat buněčnou cytotoxicitu a je možné ho využít v léčbě chronické leukemie a lymfomů [53]. Obdobně byl pro cílení efektorových T buněk proti B7-H6⁺ tumorům připraven chiméřní receptor NKp30 (chNKp30) [56]. Byla publikována data o aktivaci reakce NK buněk proti HER2⁺ nádorovým liniím a to prostřednictvím fúzního proteinu AICL:HER2-scFv (aktivace přes receptor NKp80) a B7-H6:HER2-scFv (aktivace pomocí NKp30) [52]. Dalším příkladem je NKp80-Fc fúzní protein, který se ukázal jako účinná podpora při léčbě akutní myeloidní leukémie [57].

2

CÍLE PRÁCE

- Příprava receptoru AI1L dle práce Mgr. Jiřího Nového v expresním systému *E. coli*, optimalizace tohoto postupu a skladovacích podmínek proteinu.
- Rekombinantní exprese receptoru NKp80 v buněčné linii HEK293S s využitím tvorby stabilních linií.
- Strukturní charakterizace proteinu NKp80 a komplexu NKp80:AI1L

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

| | |
|---|------------------------|
| Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I | Beckman Coulter, USA |
| Automatické pipety | Discovery HTL, Polsko |
| Automatické pipety | Pipetman Gilson, USA |
| Centrifuga Allegra X-22R | Beckman Coulter, USA |
| Centrifuga EBA 12R | Hettich, Německo |
| Centrifuga Universal 320 R | Hettich, Německo |
| Centrifugační zkumavky Oak Ridge | Sigma, USA |
| Dialyzační trubice | Sigma, USA |
| Filtry pro sterilizaci 0,22 µm | TPP, Švýcarsko |
| 0,1µm centrifugační filtry Ultrafree-MC | Millipore, 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 Superdex 200 10/300 GL | GE Healthcare, USA |
| Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL | GE Healthcare, USA |
| Kolonka HiTrap Talon Crude 5 ml | GE Healthcare, USA |
| Kolonka HiTrap Desalting | GE Healthcare, USA |
| Kolona SP Sepharosa XL | GE Healthcare, USA |
| Koncentrátory Amicon Ultra (MWCO 10000) | Millipore, USA |
| Krystalizační destička (96 jamek) | Greiner, Německo |
| Krystalizační robot Cartesian | Genomic Solutions, 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 |
| Mr. Frosty mrazicí kontejner | Nalgene, USA |
| Nucleobond Xtra Maxi | Macherey-Nagel, Německo |
| pH metr Φ 200 | Beckman Coulter, USA |
| Pipetovací nástavec Pipetus | Hirschmann, Německo |
| Pipetovací stanice Hydra | Art Robbins Instruments, USA |
| Plastik pro tkáňové kultury | Sigma, USA |
| Předvážky KB1200-2 | Kern, Německo |
| Robot Cartesian | Genomic Solutions, USA |
| Rotační vakuová odparka CentriVap DNA | Labconco, USA |
| Souprava pro agarosovou elektroforézu | Biokeystone, USA |
| Souprava pro SDS-PAGE | Bio-Rad, Německo |
| Spektrofotometr DS-11+ | DeNovix, USA |
| Spektrofotometr UV/VIS UV4-500 | UNICAM, UK |
| Termocycler Rotor-Gene 2000 | Corbett Life Science, USA |
| Třepačka Celltron | Infors HT, Švýcarsko |
| Třepačka Multitron Cell | Infors HT, Švýcarsko |
| Vařič | ETA, ČR |
| Vodní lázeň | Memmert, Německo |
| Vodní lázeň TW2 | Julabo, Německo |
| Vortexový mixér | VELP Scientifica, Itálie |
| Ultrazvuková sonda Sonoplus | Bandelin, Německo |
| Ultrazvuková vodní lázeň | P-Lab, ČR |
| UV prosvěcovací lampa (312 nm) | UVItec, UK |
| Zdroj deionizované vody Milli Q | Millipore, USA |
| Zdroj napětí EC 250-90 EC | Apparatus Corporation, UK |
| Zobrazovací systém Rock Imager 1000 | Formulatrix, USA |

3.2 CHEMIKÁLIE

| | |
|---------------------|--------------------------|
| 100 bp DNA standard | New England Biolabs, USA |
| 1 kb DNA standard | New England Biolabs, USA |

| | |
|--------------------------------|--------------------------|
| 2-merkaptoethanol | 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 |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | Fluka Chemika, Švýcarsko |
| DNAsa | Lach-Ner, ČR |
| DMSO | Finnzymes, Finsko |
| Doxycyklin | Serva, USA |
| EDTA | Jersey Lab Supply, USA |
| IPTG | Sigma, USA |
| L-arginin | Sigma, USA |
| L-glutamin | Sigma, USA |
| Leupeptin | Sigma, USA |
| Geneticin G418 | Thermo Scientific, USA |
| GoodView II | Ecoli, Slovensko |
| Kanamycin | Sigma, USA |
| Kvasničný extrakt | Imuna Pharm, SR |
| Kyselina valproová | Sigma, USA |
| IPEI 25 kDa | Polysciences, USA |
| N,N'-Methylenbisakrylamid | Serva, USA |
| MgCl ₂ | Lach-Ner, ČR |
| PCR H ₂ O | Top-Bio, ČR |
| Pepstatin | Thermo Scientific, USA |
| Pluronic F-68 | Sigma, USA |
| PMSF | Thermo Scientific, USA |
| Puromycin | Serva, USA |
| RNAsa A | Lach-Ner, ČR |
| SDS | Jersey Lab Supply, USA |

| | |
|---|------------------------|
| SyproOrange | Thermo Scientific, USA |
| TEMED | Serva, USA |
| Trypanová modř | Sigma, USA |
| Ostatní běžné chemikálie (nejméně čistoty p.a.) | Lach-Ner, ČR |

3.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA

ExCell 293 – 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 (do koncentrace 4 mM) a Pluronic F-68 (do koncentrace 0,1%)

Expi 293 – hotové komerční médium (Thermo Scientific, USA)

Ex/F17 – směs komerčních médií ExCell 293 a Freestyle F17 (včetně všech suplementů) v poměru 1 : 1

Expi/F17 – směs komerčních médií Expi a Freestyle F17 (včetně všech suplementů) v poměru 1 : 1

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

3.4 ROZTOKY

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

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

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

Guanidinový pufr – 6M Guanidin-HCl, 10mM DTT, pH = 8,0

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

Mobilní fáze pro gelovou chromatografii – 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

Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek – 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM merkaptoethanol, 1mM NaN₃, 1mM PMSF, 1μM pepstatin, 1μM leupeptin, pH = 7,4

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

Pufr A – 10mM HEPES, 9mM NaCl, 1mM NaN₃, pH = 6,8

Pufr B – 10mM HEPES, 1M NaCl, 1mM NaN₃, pH = 6,8

Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek – 0,5% (w/v) Triton X-100, 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM merkaptoethanol, 1mM NaN₃, 1mM PMSF, 1μM pepstatin, 1μM leupeptin, pH = 7,4

Renaturační pufr – 20mM HEPES, 1M L-arginin-HCl, 100mM CaCl₂, 1mM cystamin, 10mM cysteamin, 1mM NaN₃, 1mM PMSF, pH = 6,8

Roztoky pro izolaci zásobního množství plasmidu:

RES – 50mM Tris-HCl, 100 μg/ml RNAsa A, pH = 8,0

LYS – 0,2M NaOH, 1% SDS

NEU – 3,1M CH₃COOK, pH = 5,5

EQ1 – 0,1M CH₃COONa, 0,6M NaCl, 0,15% Triton X-100, pH = 5,0

Wash – 0,1M CH₃COONa, 825mM NaCl, pH = 5,0

ELU – 100mM Tris-HCl, 1,25M NaCl, pH = 8,5

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

Roztok IPEI – 10 mg/ml IPEI v PBS-TK

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

Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek – 25% (w/v) sacharosa, 50mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1mM NaN₃, 1mM PMSF, 1μM pepstatin, 1μM leupeptin, pH = 7,4

Skladovací pufr – 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM L-arginin, 10mM NaN₃, pH = 5,5

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

3.5 VEKTORY

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| pET30_AICL C87S | Mgr. Jiří Nový, PřF UK, Praha |
| pOPINTTGneo_NKp80_F1 | Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha |
| pOPINTTGneo_NKp80_F1 | Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha |
| pCT5_NKp80_F2 | Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha |

3.6 BUNĚČNÉ LINIE A BAKTERIÁLNÍ KMENY

| | |
|--------------------------------|------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5α | Thermo Scientific, USA |
| <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) | Thermo Scientific, USA |
| HEK293S GnTI | ATCC, USA |

4.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ

4.1.1 TRANSFORMACE A VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE

Pro transformaci bylo použito 20 - 100 ng plasmidové DNA. Objem plasmidu obsahující potřebné množství DNA byl přidán do 100 μ l buněčné suspenze Z-kompetentních *E. coli* DH5 α . Směs byla ponechána 10 min na ledu a následně rozetřena na plotny s ampicilinem (ampicilin do koncentrace 100 μ g/ml přidán do zchladlého LB média předem povařeného s 1,5% (w/v) agarem). Plotny byly umístěny do inkubátoru a ponechány při 37 °C do druhého dne.

Druhý den byly kolonie rozetřeny v několika mililitrech LB média, které bylo přeneseno do 2l Erlenmayerovy baňky s 0,5 l LB média s ampicilinem (koncentrace 100 μ g/ml). Směs byla ponechána na třepačce při 37 °C a 220 ot./min přes noc.

Kultura byla sklizena druhý den centrifugací. Buněčná suspenze byla rozdělena do dvou 250ml kyvet a centrifugována minimálně 30 min při 3900 \times g, 20 °C. Následně byla peleta resuspendována ve 20 ml TES pufru. Suspenze z obou pelet byla spojena v jedné 50ml centrifugační kyvetě a centrifugována 20 min při 3900 \times g, 20 °C. Supernatant byl odstraněn. Takto vzniklá peleta byla použita pro izolaci zásobního množství DNA nebo uchována při -20 °C.

4.1.2 IZOLACE ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLASMIDOVÉ DNA

Pro izolaci plasmidové DNA byly použity komerční kolonky ze soupravy Nucleobond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Německo). Peleta byla resuspendována v 18 ml RES pufru s přídáním RNAsou. Následně byla suspenze přenesena do dvou připravených 30ml kyvet typu Oak Ridge. Bakteriální buňky byly lyzovány přidáním 9 ml LYS pufru do každé kyvety. Po 5 minutách byl lyzát neutralizován přidáním 9 ml NEU pufru. Následně byly kyvety centrifugovány při 20000 \times g, 20 °C, 10 min. Supernatant byl přenesen přes skládaný filtrační papír na ekvilibrovanou kolonu (nová kolona byla ekvilibrována 25 ml EQ1 roztoku, dříve použitá kolona byla promyta dH₂O, 15 ml elučního pufru ELU, opět dH₂O a 2 \times 25 ml pufru EQ1). Poté byla kolona promyta 25 ml Wash roztoku. Pro eluci plasmidové DNA bylo použito 15 ml ELU roztoku. K eluované DNA bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného (-20 °C) isopropanolu. Poté byl roztok centrifugován, opět

v kyvetách typu Oak Ridge, 30 min při $16000 \times g$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud nedošlo po 30 minutách k vytvoření viditelné pelety, centrifugace byla za stejných podmínek opakována dalších 30 min. Po odstranění supernatantu byla peleta opláchnuta přidáním 5 ml předchlazeného ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 70% ethanolu. Opláchnutá peleta s ethanolom byla centrifugována 10 min při $16000 \times g$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odstraněn a peleta vysušena ve vakuové rotační odparce CentriVap DNA (Labconco, USA). Plasmidová DNA byla rozpuštěna v 1 ml sterilní dH_2O a přenesena do čisté mikrozkuhavky.

4.1.3 URČENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY PLASMIDOVÉ DNA

Koncentrace byla změřena spektrofotometricky. Byla změřena absorbance $300 \times$ zředěného roztoku (vyředěn dH_2O) při 260 a 280 nm. Jako reference byla použita dH_2O . K určení koncentrace byl použit empirický vztah, který předpokládá, že roztok dvouvláknové DNA o koncentraci $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ má při 260 nm absorbanci rovnou 1. Čistota byla dána poměrem absorbancí při 260 nm a 280 nm, který je pro čistou dvouvláknovou DNA 1,8 – 2,0.

4.1.4 AGAROSOVÁ EKTROFORÉZA

Pro kontrolu čistoty a kvality izolované plasmidové DNA byla použita elektroforéza v 1% agarosovém gelu. Gel byl připraven rozvařením 0,65 g agarosy v 65 ml TAE pufru. Po zchladnutí byly do stále ještě tekutého gelu přidány 3 μl barviva GoodView II (Ecoli, Slovensko) pro vizualizaci DNA pod UV světlem. Po zatuhnutí gelu byl do jamek nanášen vzorek DNA. Vzorek (10 – 20 μl) byl připraven smícháním potřebného množství DNA (max. 1 μg), vzorkového pufru pro agarosovou elektroforézu tak, aby byl $10 \times$ zředěný a potřebného množství dH_2O . Do jedné z jamek bylo pipetováno 5 μl standardu. Elektroforéza probíhala při stejnosměrném napětí 200 V, 20 min. Gel byl vizualizován pod UV prosvěcovací lamnou (UVItec, UK) při 312 nm.

4.2 MANIPULACE S LINÍ HEK293S GNTI

4.2.1 URČENÍ BUNĚČNÉ HUSTOTY

K určení buněčné hustoty byl použit hemocytometr. Do mikrozkuhavky bylo odebráno 20 μl buněčné suspenze, která byla naředěna 2 až $9 \times 0,4\%$ roztokem trypanové modři v PBS-TK. Naředěná suspenze byla pipetována do hemocytometru, kde byly spočítány

živé (průhledné) a mrtvé (modré) buňky. Průměrný počet buněk v každém z devíti velkých čtverců byl vynásoben ředěním a objemovým faktorem $1 \cdot 10^4$ přepočítán na počet buněk v 1 ml. Podíl mrtvých (modrých) buněk vůči celkovému počtu buněk vynásobený stem pak určuje viabilitu.

4.2.2 ROZMRAZOVÁNÍ

Buněčné kultury jsou uchovávány v kryozkumavkách při -80°C . Takto zmražené alikvotní podíly buněčné suspenze o objemu 1 ml mají buněčnou hustotu $5 \cdot 10^6$ b/ml. Suspenze byla co nejrychleji rozmrazena ve vodní lázni předeřáté na 37°C a přenesena do 10 ml média ExCell 293. Centrifugací (5 minut při $95 \times g$, 21°C) byly buňky opláchnuty od supernatantu obsahujícího kryoprotektant (10% DMSO). Buněčná peleta byla resuspendována v 10 ml kultivačního média a přenesena na 10cm Petriho misku.

4.2.3 KULTIVACE

Buňky byly kultivovány na 10cm Petriho miskách nebo ve čtverhranných lahvích s prodyšným víčkem umístěných na třepačce Celltron (Infors HT, Švýcarsko) při 135 ot./min v inkubátoru MC0-18 AIC (Sanyo, Japonsko) při 37°C a 5 % CO_2 . Kultivační médium byla směs komerčních médií EcCELL293 a Freestyle F17 v poměru 1:1 (Ex/F17). Subkultivace byla prováděna každý 3. – 4. den. Hemocytometrem byla určena buněčná hustota a rovněž byla zkontrolována přítomnost kontaminantů. Část suspenze byla poté doplněna čerstvým médiem tak, aby byla hustota $0,2 \cdot 10^6 - 0,3 \cdot 10^6$ b/ml. Zároveň však objem původní suspenze musel být menší než 10 % výsledného objemu. V opačném případě byl potřebný objem suspenze centrifugován (5 minut při $95 \times g$, 21°C) a buněčná peleta byla resuspendována v čerstvém médiu. Objem média ve čtverhranné lahvi nepřesahoval 30 % - 40 % celkového objemu lahve, aby bylo zabezpečeno optimální provzdušnění. Takto byly buňky kultivovány a rozrůstány až do dosažení optimální viability a počtu buněk pro transfekci.

4.2.4 ZAMRAZOVÁNÍ

Objem média obsahující potřebné množství buněk byl centrifugován (5 minut při $95 \times g$, 21°C). Peleta byla resuspendována tak, aby výsledná koncentrace byla $5 \cdot 10^6$ b/ml a zároveň aby mrazicí suspenze obsahovala 45 % původní suspenze, 45 % čerstvého média Ex/F17 a 10 % DMSO. Mrazicí suspenze byla pipetována po 1 ml do

kryozkumavek, které byly následně v mrazicím kontejneru Mr. Frosty (Nalgene, USA) umístěny do mrazicího boxu s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 PRODUKCE PROTEINU NKP80 V LINII HEK293S GnTI

4.3.1 TRANSFEKCE

Buněčná suspenze HEK293S GnTI byla centrifugací (5 minut při $95 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) převedena do čerstvého média ExCELL293, výsledná hustota byla $23,5 \cdot 10^6$ b/ml. K buňkám byl přes $0,22\text{ }\mu\text{m}$ filtr přidán transfekční mix DNA a PBS-TK. Mix obsahoval takové množství DNA, aby na $1 \cdot 10^6$ buněk připadal $1\text{ }\mu\text{g}$. Objem transfekční směsi byl zvolen tak, aby po jejím přidání byla výsledná koncentrace $20 \cdot 10^6$ b/ml. K buněčné suspenzi byl kromě transfekčního mixu přidán IPEI. Poměr DNA a IPEI byl 1:3.

Transfekovaná suspenze byla ponechána na 4 hodiny na třepačce v inkubátoru (135 ot./min , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\% \text{ CO}_2$). Poté byla směs vyředěna médiem ExCELL293 na výslednou hustotu $1 \cdot 10^6$ b/ml (v případě transientní exprese na $2 \cdot 10^6$ b/ml a navíc byla přidána kyselina valproová do výsledné koncentrace 2 mM).

4.3.2 SELEKCE STABILNÍCH LINIÍ

V případě tvorby stabilních linií byla selekce antibiotiky zahájena 48 hodin po transfekci. Byla spočítána buněčná hustota a buňky byly centrifugací převedeny do 30 ml směsi Ex/F17 ve 100ml čtverhranné lahvi. Koncentrace antibiotika byla předmětem optimalizace. Každý třetí den byly buňky přepočítány a centrifugací převedeny do čerstvé směsi Ex/F17 a byla opět přidána antibiotika.

Když přešly buňky opět do fáze růstu a dosáhly 100% viability, bylo zamraženo několik alikvotních podílů.

4.3.3 PRODUKCE PROTEINU NKP80

Následně byly buňky kultivovány ve větších objemech (75 ml suspenze ve 250ml lahvi, 150 ml v 0,5l lahvi, 300 ml v 1l lahvi) a hustotách (počáteční hustota $1 \cdot 10^6$ - $3 \cdot 10^6$ b/ml), případně bylo přidáno antibiotikum indukující produkci proteinu. Produkující suspenze byly sklizeny (centrifugace ve 250ml kyvetách, 30 min, $4500 \times g$, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$), pokud viabilita poklesla pod 30 %.

4.4 EXPRESE PROTEINU AICL V *E. COLI*

Expres proteinu AICL probíhala podle postupu, který popsal ve své diplomové práci Mgr. Jiří Nový [33], který zároveň poskytl plasmidovou DNA pET30_AICL C87S ($c = 1,70 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $A_{260}/A_{280} = 1,64$).

4.4.1 KULTIVACE *E. COLI* A PRODUKCE PROTEINU

K na ledu rozmražené suspenzi kompetentních bakteriálních buněk *E. coli* BL21 Gold (DE3) o objemu 100 μl bylo přidáno 0,6 μl plazmidu pET30_AICL C87S ($c = 1,70 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $A_{260}/A_{280} = 1,64$). Směs byla ponechána 10 minut na ledu. Následně byl přidán 1 ml LB média a mikrozkuhavka s buněčnou suspenzí byla umístěna na 1 h do inkubátoru při 37 °C. Mikrozkuhavka byla centrifugována (3 min při $4000 \times g$, 20 °C). Přebytný supernatant byl odstraněn. Buněčná peleta byla resuspendována ve zbytku média a rozetřena na Petriho misku s kanamycinem (kanamycin do koncentrace 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ přidán do zchlazeného LB média předem povařeného s 1,5% (w/v) agarem). Plotny byly ponechány v inkubátoru při 37 °C přes noc.

Druhý den byly kolonie na plotně rozetřeny s několika mililitry LB média. Vzniklou suspenzí bylo zaočkováno médium (vždy 0,5 l LB média s kanamycinem do koncentrace 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve sterilní 2l Erlenmayerově baňce). Baňky byly umístěny na třepačku (37 °C, 220 ot./min). Byla sledována optická denzita oproti čistému LB médiu jako absorbance při 550 nm. Po dosažení hodnoty optické denzity mezi 0,6 – 0,7 byla teplota snížena na 18 °C a zároveň byly kultury indukovány přidáním IPTG (výsledná koncentrace 0,5 mM).

Druhý den byly produkce centrifugovány ve 250ml centrifugačních kyvetách (30 min při $3900 \times g$, 4 °C). Peleta byla resuspendována ve 20 ml TES pufru a centrifugována v 50ml centrifugační kyvetě 20 min při $3900 \times g$, 20 °C. Supernatant byl odstraněn. Z těchto pelet byla ihned izolována inkluzní tělíska nebo byla uchována při -20 °C.

4.4.2 IZOLACE INKLUZNÍCH TĚLÍSEK

Každá z pelet byla resuspendována v 10 ml sacharosového lyzačního pufru. Buňky byly rozbíjeny ultrazvukovou sondou ve 30ml centrifugačních kyvetách. Vždy 3×30 s za stálého chlazení na ledu při 40% amplitudě a rázech po 0,5 s.

Následovalo $4 \times$ zmražení v -80 °C a rozmražení ve vodní lázni na 37 °C.

Do suspenze bylo přidáno 200 μ l 1 M $MgCl_2$, 10 μ l DNAsy o koncentraci 10 U/ μ l a 2,5 μ l RNAsy o koncentraci 10 mg/ml. Směs byla za nepřístupu světla inkubována 20 min při laboratorní teplotě. Následně byla rozbíjena působením ultrazvuku jako v předchozím kroku a následně centrifugována 10 min při $8000 \times g$, 4 °C.

Po odstranění supernatantu bylo k peletám přidáno 10 ml pufru s detergentem. Po resuspendování byla suspenze opět rozbíjena působením ultrazvuku jako v předchozím kroku. Následovala centrifugace 10 min při $8000 \times g$, 4 °C.

Supernatant byl odstraněn. K peletám bylo přidáno 10 ml promývacího pufru. Následovalo rozbíjení působením ultrazvuku jako v předchozím kroku a centrifugace 10 minut při $8000 \times g$, 4 °C.

Pelety s izolovanými inkluzními tělísky byly uchovány v mrazáku při -20 °C.

4.4.3 *IN VITRO* RENATURACE

Peleta inkluzních tělísek z 0,5l bakteriální produkce byla rozpuštěna ve 2 ml 6M guanidinového pufru s inhibitory proteas (1 mM PMSF, 1 μ M leupeptinem a 1 μ M pepstatinem). Během rozpouštění byla zkumavka inkubována v ultrazvukové vodní lázni předehřáté na 40 °C. Také byla každých 10 min promíchávána vortexovou míchačnou. Takto byla inkluzní tělíska rozpouštěna po dobu alespoň 2 hod.

Po rozpuštění byla směs rozdělena do dvou mikrozkuvek a centrifugována 60 min při $39000 \times g$, 4 °C.

Supernatant byl za stálého míchání po kapkách přikapáván do 200 ml renaturačního pufru předem vychlazeného na 4 °C. Renaturace probíhala za stálého míchání a teplotě 4 °C dalších 60 min.

Renaturační roztok byl přenesen do dialyzačních trubic. Trubice byly umístěny do nádoby s 8 l dialyzačního pufru. Dialýza probíhala za stálého míchání při 4 °C přes noc. Druhý den byl protein purifikován z dialyzátu.

4.5 PURIFIKACE PROTEINŮ

4.5.1 IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRAFIE

Pro purifikaci *in vitro* renaturovaného proteinu AICL byla zvolena iontově výměnná chromatografie s elucí lineárním gradientem NaCl.

Před provedením iontové výměnné chromatografie byl roztok z dialyzačních trubic centrifugován 10 min při $4500 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně filtrován přes dvojitý filtrační papír.

K purifikaci byl použit HPLC systém ÄKTAbasic se spekrofotometrickým detektorem o vlnové délce 280 nm a kolonka SP Sepharosa XL (GE Healthcare, USA) o objemu 1 ml. Kolonka byla před nanesením vzorku promyta $0,5\text{ M NaOH}$ a 1 M HCl , ekvilibrována pufrem A, pufrem B a opět pufrem A. Následně byl rychlostí 5 ml/min nanesen vzorek (z důvodu malé kapacity kolonky vždy po 70 ml). Po nanesení byla kolonka promyta pufrem A. Byl nastaven 20min lineární gradient od 0 % pufru B (9 mM NaCl) až po 100 % pufru B (1 M NaCl). Eluované frakce byly jímány do 1,5ml mikrozkuvek.

4.5.2 CHELATAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Konstrukty proteinu NKp80 obsahují histidinovou kotvu, proto je možné purifikovat je z média díky afinitě k nosiči nabitému kobaltnatými ionty. Pro chelatační chromatografii byly použity kolonky Talon (GE Healthcare, USA) o objemu 5 ml a HPLC systém ÄKTAbasic. Eluce probíhala isokraticky 250 mM imidazolem v elučním pufru pro Talon.

Před purifikací byla buněčná suspenze centrifugována minimálně 30 min při $3900 \times g$, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl filtrován přes $0,22\text{ }\mu\text{m}$ filtr. Zfiltrované médium bylo $2 \times$ naředěno PBS pufrem a nanášeno na kolonku Talon ekvilibrovanou rovněž v PBS. Rychlost nanášení byla 5 ml/min. Po nanesení byla kolonka promyta PBS a protein byl eluován elučním pufrem pro Talon rychlostí 2,5 ml/min.

4.5.3 SDS PAGE

Čistota jednotlivých frakcí byla ověřena elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného. Koncentrace rozdělovacího gelu byla zvolena s ohledem na účel analýzy a velikost proteinu. Rozdělovací gel byl převrstven vrchním zaostřovacím gelem. Složení gelů vždy pro jednu elektroforézu je popsáno níže:

12,5% rozdělovací gel: 1,265 ml dH_2O , 1,675 ml 30% AA, 1 ml $1,5\text{ M Tris}$ ($\text{pH} = 8,8$), 40 μl 10% SDS, 40 μl APS a 2 μl TEMED

15% rozdělovací gel: 0,9 ml dH_2O , 2 ml 30% AA, 1 ml $1,5\text{ M Tris}$ ($\text{pH} = 8,8$), 40 μl 10% SDS, 40 μl APS a 2 μl TEMED

Zaostřovací gel: 0,7 ml dH_2O , 0,25 ml 30% AA, 0,125 ml 1 M Tris ($\text{pH} = 6,8$), 10 μl 10% SDS, 10 μl APS a 1,5 μl TEMED.

Do zaostřovacího gelu byl zasunut hřeben. Po zatuhnutí byl hřeben z jamek odstraněn a elektroforetická skla s gelem umístěna do stojánku a do elektroforetické vany. Aparatura byla naplněna elektrodovým pufrem.

Ke vzorku proteinu (objem do 10 μ l) bylo přidáno odpovídající množství 5 x koncentrovaného vzorkového pufru (redukujícího nebo neredukujícího). Vzorky byly povařeny 10 min ve vodní lázni. Následně byly centrifugovány 3 min při 15000 \times g a 20 °C. Vzorky byly nanесeny do jamek. První jamka byla vyhrazena pro standard molekulových hmotností. Elektroforéza probíhala 55 min při 200 V.

Po skončení elektroforézy byly gely barveny barvicím roztokem minimálně 30 min a následně po dobu 2 \times 20 min odbarveny odbarvovacím roztokem. V případě potřeby byl přidán ještě jeden odbarvovací krok. Odbarvené gely byly naskenovány.

4.5.4 ODSOLOVÁNÍ

Pro odsolení proteinů nebo pro jejich převedení do jiného pufru byly použity 5ml kolonky HiTrap Desalting (GE Healthcare, USA). Kolonka i nástřiková smyčka byly připojeny k HPLC systém ÄKTAbasic a promyty pufrem, do kterého byl protein převáděn. Tento pufr sloužil jako mobilní fáze. Vzorek byl nanášen rychlostí 3 ml/min.

4.5.5 ZAKONCENTROVÁNÍ

Proteiny byly zakoncentrovány na koncentrátorech Amicon Ultra (MWCO 10000, Millipore, USA). Vzorek proteinu byl v koncentrátoru centrifugován 5 – 10 min, podle objemu a koncentrace vzorku, při 3900 \times g, 20 °C. Po centrifugaci byl obsah koncentrátoru promíchán automatickou pipetou, aby na dně koncentrátoru nedošlo ke sražení proteinu. V případě většího objemu vzorku byl z koncentrátoru odstraněn filtrát a proces centrifugace byl opakován.

4.5.6 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Před nanesením na kolonu byl vzorek zakoncentrován na objem 300 – 500 μ l. Pro odstranění větších agregátů byl vzorek centrifugován v mikrozkuhavce 5 min při 15000 \times g a 20 °C.

K HPLC systému ÄKTAbasic byla připojena kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL, případně Superdex 200 10/300 GL (obě GE Healthcare, USA). Kolona byla ekvilibrována mobilní fází. Mobilní fází byla promyta také 1ml nástřiková smyčka.

Chromatografie probíhala izokraticky při průtoku 0,5 ml/min (Superdex 200 10/300 GL) nebo 0,75 ml/min (Superdex 200 Increase 10/300 GL). Detekce byla spektrofotometrická při 280 nm. Jednotlivé frakce byly jímány automatickým sběračem a dále analyzovány.

4.5.7 URČENÍ KONCENTRACE PROTEINU

Koncentrace proteinů byla změřena spektrofotometricky na přístroji DS-11+ (DeNovix, USA). Jako blank byl použit eluční pufr gelové chromatografie. Pro přesnější výpočet koncentrace byla zadána relativní molekulová hmotnost a molární extinkční koeficient proteinu predikovaný z jeho aminokyselinové sekvence.

4.6 CHARAKTERIZACE PROTEINŮ

4.6.1 DIFERENČNÍ SKENOVACÍ FLUORIMETRIE

Pro měření dat diferenční skenovací fluorimetrií byl použit termocykler Rotor-Gene 2000 (Corbett Life Science, USA) s nastaveným teplotním gradientem 25 °C – 95 °C a teplotním krokem 0,5 °C za 30 s. Excitační vlnová délka byla nastavena na 300 nm, detekce probíhala při 570 nm. Jako fluorescenční barva byla použita SyproOrange (Thermo Scientific, USA).

Vzorek proteinu s fluorescenční barvou byl ve 200 µl PCR mikrozkuhavce vyředěn na výsledný objem 20 µl. Před měřením termostability proteinu bylo nejdříve proměřeno několik různých koncentrací proteinu a s různě vyředěnou fluorescenční barvou. Z výsledků primárního měření byla vybrána optimální koncentrace proteinu (pro minimalizaci jeho spotřeby při měření) a ředění fluorescenční barvy. Tuto optimalizaci měření je nutné provést vždy pro každý protein, protože schopnost vázat na sebe fluorescenční barvu se pro každý protein liší. Pro finální měření termostability proteinu v daném prostředí bylo potřebné množství proteinu smícháno s 1 µl SyproOrange (10 až 100 × vyředěné dle optimalizace) a puftrem pro dané prostředí (minimálně polovina objemu směsi). Reakční směs byla umístěna do termocykleru s výše popsáním teplotním programem. Složení jednotlivých měřených směsí, s cílem optimalizovat pH a koncentraci soli je uvedeno v Tabulka 2, str. 37.

Tabulka 2 Složení roztoků pro měření diferenční skenovací fluorimetrie. Na základě optimalizace bylo do 20 μ l reakce pipetováno 8 μ g proteinu AICL a 1 μ l 20x zředěné SyproOrange, jako reference byl použit vzorek bez proteinu.

| pH | Sůl | Pufr |
|-----------|------------|--------------|
| 4,5 | 150 mM | 200mM citrát |
| 5,5 | 150 mM | 200mM citrát |
| 6,5 | 150 mM | 200mM HEPES |
| 7,5 | 150 mM | 200mM HEPES |
| 9,5 | 150 mM | 200mM Tris |
| 4,5 | 300 mM | 200mM citrát |
| 5,5 | 300 mM | 200mM citrát |
| 6,5 | 300 mM | 200mM HEPES |
| 7,5 | 300 mM | 200mM HEPES |

4.6.2 MĚŘENÍ DYNAMICKÉHO ROZPTYLU SVĚTLA

Měření dynamického rozptylu světla provedla a vyhodnotila RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D. (Fyzikální ústav, MFF UK). K měření byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) s heliovo-neonovým laserem o vlnové délce 633 nm. Měření probíhalo v křemenných kyvetách rozměru o objemu 40 μ l, při teplotě 20 °C. Před samotným měřením byl vzorek přefiltrován přes 0,1 μ m centrifugační filtry Ultrafree-MC (Millipore, USA). Takto byly odstraněny prachové částice, které by rušily měření. Pro vyhodnocení výsledků byl použit software Zetasizer 6.2 (Malvern Instruments Ltd., UK). Tabulka 3 popisuje složení měřených roztoků.

Tabulka 3 Složení roztoků při měření dynamického rozptylu světla.

| | Protein | Koncentrace | Pufr | pH |
|---|----------------|--------------------|---|-----------|
| 1 | AICL | 0,6 mg/ml | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ | 5,5 |
| 2 | AICL | 0,6 mg/ml | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , 100mM L-Arginin | 5,5 |
| 3 | AICL | 0,6 mg/ml | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , 50 mM citrát | 5,5 |
| 4 | AICL | 1,6 mg/ml | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ | 7,5 |
| 5 | NKp80_F2 | 1 mg/ml | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ | 7,5 |
| 6 | NKp80_F2:AICL | 0,6 mg/ml | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ | 7,5 |
| 7 | NKp80_F2:AICL | 0,6 mg/ml | 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , 50 mM citrát | 5,5 |

4.6.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Mapování disulfidických můstků a obsazení glykosylačních míst v proteinových konstruktech NKp80 provedl Mgr. Michal Rosůlek (MBÚ AV ČR).

Vzorek byl štěpen trypsinem v oxidujícím prostředí 200 μ M cystaminu. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C. Peptidy byly vysušeny a následně opět rozpuštěny ve směsi 0,5% kyseliny mravenčí a 2% acetonitrilu. Rozpuštěné peptidy byly odsoleny a následně separovány HPLC systémem UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA). Pro odsolení byla použita kolona Acclaim C18 PepMap™ 100 (0,1 \times 20 mm, průměr částic 5 μ m, velikost pórů 100 Å, Thermo Scientific, USA). Následně byly separovány na analytické koloně s obrácenou fází Acclaim C18 PepMap™ 100 (0,1 \times 150 mm, průměr částic 3 μ m, velikosti pórů 100 Å, Thermo Scientific, USA) vyhřívané na 60 °C. Měření hmotnostních spekter probíhalo na FT-ICR hmotnostním spektrometru Solarix XR 12T (Bruker Daltonics, Německo) v pozitivním modu. K vyhodnocení naměřených dat byly využity programy DataAnalysis 4.2 a MSLinks.

4.6.4 SEDIMENTAČNÍ ANALÝZA

Sedimentační analýza byla provedena na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) metodou sedimentační rychlosti [58]. Vlastní měření i vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Jako vzorek byl použit protein po gelové permeační chromatografii, jako reference byl použit pufr pro gelovou chromatografii. Data byla sbírána při 50000 ot./min a 20 °C. Bylo snímáno 150 snímků po 6 minutách při vlnové délce 280 nm. Do centrifugačních kyvet bylo pipetováno 400 μ l roztoku proteinu o koncentraci (v případě směsi proteinů o celkové koncentraci) 0,2 mg/ml. Za těchto podmínek byl analyzován protein AICL (pufr o pH 5,5), konstrukt F2 proteinu NKp80 (pufr o pH 7,5) a ekvimolární směs obou proteinů při obou hodnotách pH. Výsledky byly vyhodnoceny s použitím programů Sednterp a Sedfit.

4.6.5 KRYSTALIZACE

Krystalizace proteinů probíhala v Henry Wellcome Building for Genomic Medicine, University of Oxford, UK za pomoci Yuguanga Zhao, PhD. Na krystalizaci byly použity prostředky získané díky projektu BioStruct-X (PID 10915). Pro hledání optimálních krystalizačních podmínek byla zvolena metoda sedící kapky.

Před odjezdem na pracoviště v Oxfordu byl proveden prekrystalizační test [59] pro určení optimální koncentrace, ve které budou proteiny nasazovány do krystalizačních kapek. Na pracovišti v Oxfordu byl protein zakoncentrován na požadovanou koncentraci a zfiltrován přes 0,01 μm centrifugační filtry. Na 96jamkovou krystalizační destičku (Greiner, Německo) bylo pipetovacím robotem Hydra (Art Robbins Instruments, USA) pipetováno do rezervoáru 200 μl srážedla a následně robot Cartesian (Genomic Solutions, USA) pipetoval krystalizační kapky (vždy 100 nl srážedla a 100 nl zakoncentrovaného proteinu). Destička byla pevně přelepena folií a umístěna do automatizovaného skladovacího a zobrazovacího systému Rock Imager 1000 (Formulatrix, USA) při 20 °C a pravidelně sledována díky on-line přístupu přes Protein Information Management System (PiMS).

Postup klonování vybraných proteinových konstruktů do expresních vektorů není předmětem této práce. Vektory poskytl Mgr. Jan Bláha (pro konstrukty NKp80) a Mgr. Jiří Nový (konstrukt AICL). Správnost expresních vektorů, stejně jako přítomnost potřebných regulačních sekvencí byla ověřena sekvenací v Laboratoři sekvenace DNA, PřF UK. Plasmid s ověřenou sekvencí byl produkován v *Z*-kompetentních *E. coli* DH5 α [60] a následně byla izolována plasmidová DNA.

5.1 PŘÍPRAVA PROTEINU AICL A OPTIMALIZACE JEHO SKLADOVACÍCH PODMÍNEK

Protein AICL byl připraven podle postupu popsaného Mgr. Jiřím Novým v jeho diplomové práci [33]. Byl připraven čistý proteinový preparát (ověřeno SDS-PAGE, Obr. 8, str. 43). Bohužel, tento preparát se podařilo zakoncentrovat maximálně na 2 mg/ml, než se protein začal viditelně srážet, což není pro krystalizaci optimální. Proto bylo provedeno měření pomocí diferenční skenovací fluorimetrie s cílem najít vhodnější podmínky (pufr, jeho pH, iontovou sílu), při které by byl protein stabilnější.

5.1.1 SEKVENCE PROTEINU AICL

Pro přípravu proteinu byl použit plasmid pET30_AICL C87S ($c = 1,70 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $A260/A280 = 1,64$) s kanamycinovou rezistencí. Cystein v pozici 87 je mutovaný na serin. Mutací tohoto lichého cysteinu se podařilo Mgr. Jiřímu Novému zvýšit výtěžek oproti konstrukt s přirozenou sekvencí. Proteinový konstrukt má délku 119 aminokyselin (S31 - H149) a predikovanou relativní molekulovou hmotnost 14 kDa. Protože se jedná o konstrukt produkováný v bakteriích, neobsahuje žádné oligosacharidy, i když jsou zde predikovaná místa pro N-glykosylaci. Aminokyselinová sekvence AICL je na Obr. 5, str. 41 [61].

MMPKHKKCFIIVGVLITPNIITLIVKLTRDSQSLCPYDWIGFQNKCYYSKEEGDWSSKYNCSTQHAD
LTIIDNIEEMNFLRRYKSSDHWIGLMAKNRFGQWVDGATFTKSFGMRGSEGCAYLSDDGAATARCYT
ERKWIQRKRIH

Obr. 5 Aminokyselinová sekvence AICL. Kurzívou znázorněné aminokyseliny nejsou součástí konstruktu, **cytoplasmatická** doména, **transmembránová** část, dále konstrukt **AICL (S31-H149)**, **CLTD (F42-R145)**, **cysteiny**, mutace **S37S**, predikovaná místa pro **N-glykosylaci**

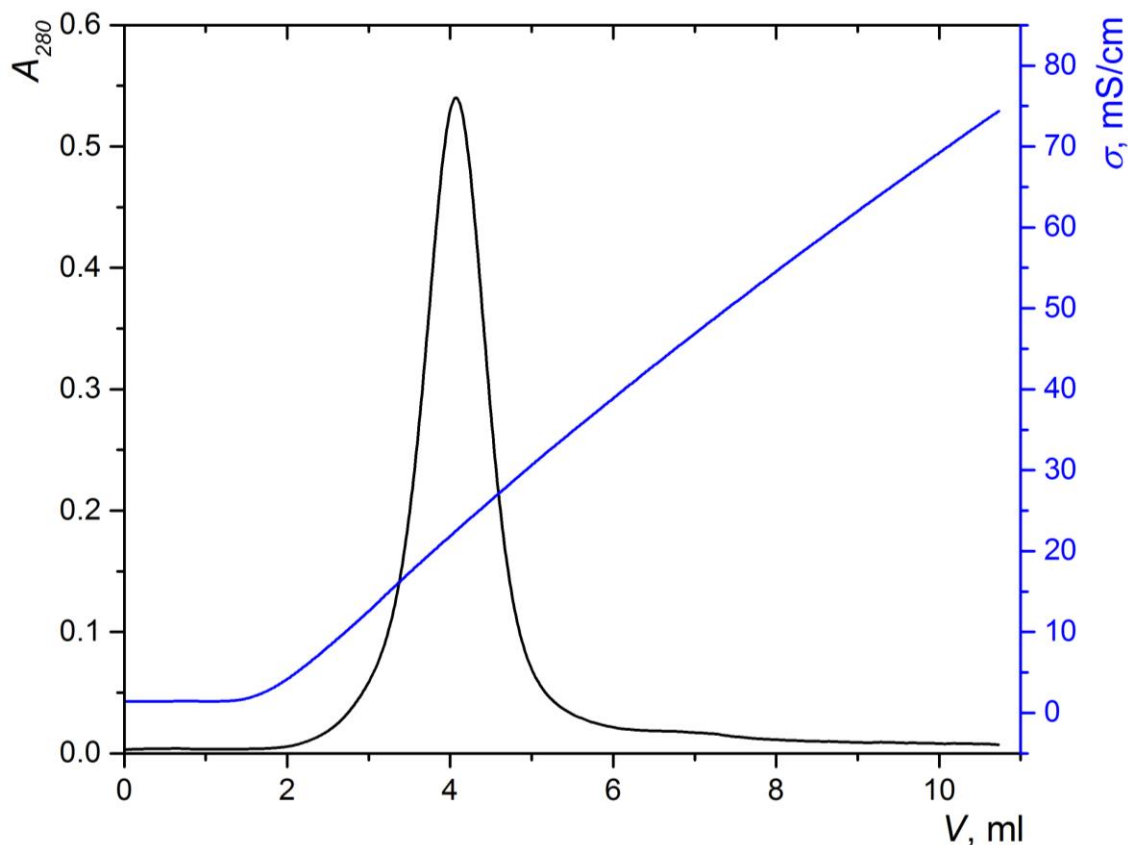
5.1.2 PRODUKCE A PURIFIKACE KONSTRUKTU AICL

Pro produkci rekombinantního proteinu AICL byl alikvot bakterií *E. coli* kmene BL21 (DE3) Gold transformován plasmidem pET30_AICL C87S. Bakterie transformované plasmidem byly přes noc nechány narůst na Petriho misce s LB médiem s kanamycinem a agarem. Druhý den byly bakteriemi z misky inokulovány celkem 3 l LB média s kanamycinem. Po dosažení OD_{550} 0,710 byla indukována produkce proteinu přidavkem IPTG. Kultura byla ponechána přes noc při teplotě 18 °C a 220 ot./min. Pelety byly sklizeny a použity pro izolaci proteinu.

Exprimovaný protein není rozpustný v cytoplasmě, ale agreguje a tvoří inkluzní tělíska. Izolaci proteinu tedy předcházela izolace inkluzních tělísek z bakterií. Pro rozbití bakteriálních buněk byla použita kombinace opakovaného mražení a působení ultrazvukovou sondou v lyzačním pufru. Poté byla inkluzní tělíska přečištěna v pufru s detergentem a v promývacím pufru.

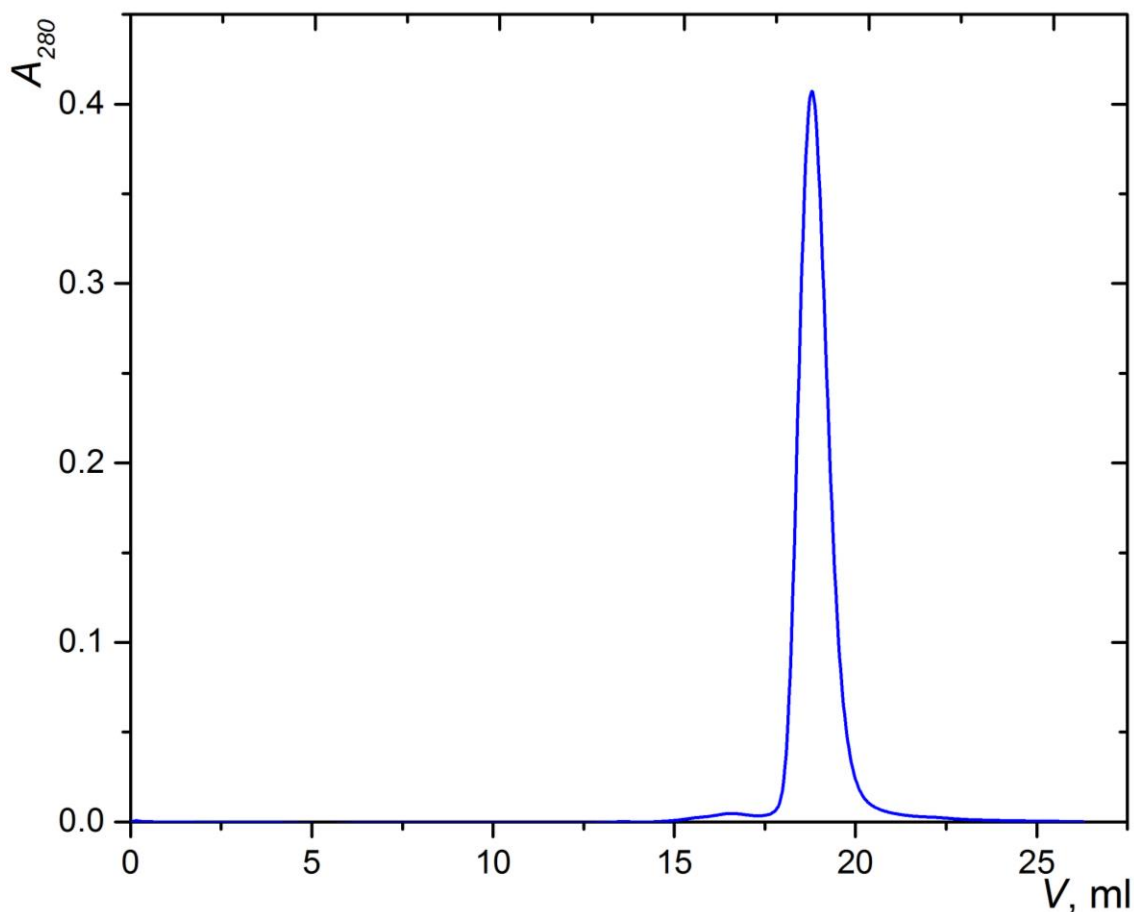
Následně byla inkluzní tělíska rozpouštěna v 6M guanidinovém pufru za současného působení ultrazvuku ve 40 °C vodní lázni. Po centrifugaci byl rozpuštěný (a denaturovaný protein) přikapáván do renaturačního pufru s 1M L-argininem. L-arginin jako tzv. „nízkomolekulární chaperon“ napomáhá sbalení do správné konformace. Renaturační pufr byl poté odstraněn dialýzou.

Dialyzát byl centrifugován, zfiltrován a nanesen na kolonku SP Sepharose XL. Byl eluován gradientem iontové síly, tedy zvyšující se koncentrací NaCl. Byl nastaven 20minutový lineární gradient z pufru A (9mM NaCl) do 100 % pufru B (1M NaCl). Typický záznam chromatografie je na Obr. 6, str. 42.



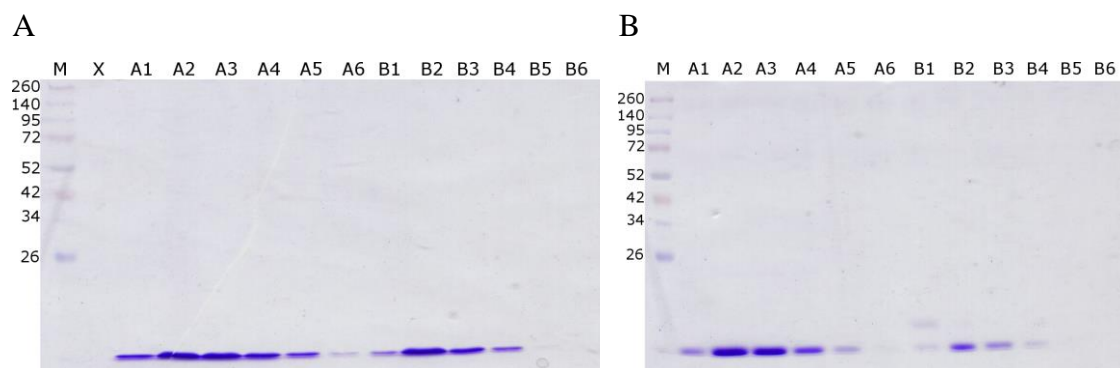
Obr. 6 Iontově výměnná chromatografie AICL po *in vitro* renaturaci. Kolonka SP Sepharose XL, na kolonku byla nanášena pouze část (70 ml, přibližně 1/3) dialyzátu po renaturaci materiálu z jedné 0,5l bakteriální produkce. V grafu je znázorněn průběh **absorbance** a růst **konduktivity**, který představuje průběh gradientové eluce.

Po iontové výměnné chromatografii byl vzorek zakonzentrován. Během zakonzentrování však docházelo v koncentrátoru k tvorbě viditelných sraženin. Sraženiny se začínaly tvořit při koncentraci nad 2 mg/ml. Proto byl vzorek oproti běžnému postupu zakonzentrován pouze na asi 1 ml. Pro gelovou permeační chromatografii na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL tak byla použita větší nástřiková smyčka (2ml). Typický eluční profil z gelové filtrace je na Obr. 7, str. 43.



Obr. 7 Gelová permeační chromatografie AICL po iontové výměnné chromatografii. Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL

Po gelové permeační chromatografii byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného (SDS PAGE). Výsledek elektroforézy v redukujícím i neredukujícím prostředí pro dvě různé bakteriální produkce je na Obr. 8. Z výsledků je patrné, že se podařilo získat čistý proteinový preparát.



Obr. 8 SDS PAGE proteinu AICL. 15% gel, panel A je výsledek SDS PAGE v neredukčním prostředí, panel B v redukujícím prostředí; dráha M obsahuje standard molekulových hmotností, dráhy A1-A6 a B1-B6 obsahují frakce z gelové permeační chromatografie dvou různých bakteriálních produkcí. Očekávaná velikost produktu je 14 kDa.

Koncentrace proteinu byla změřena spektrofotometricky. Výtěžek z jedné bakteriální pelety (0,5 l produkce) byl přibližně 1 mg.

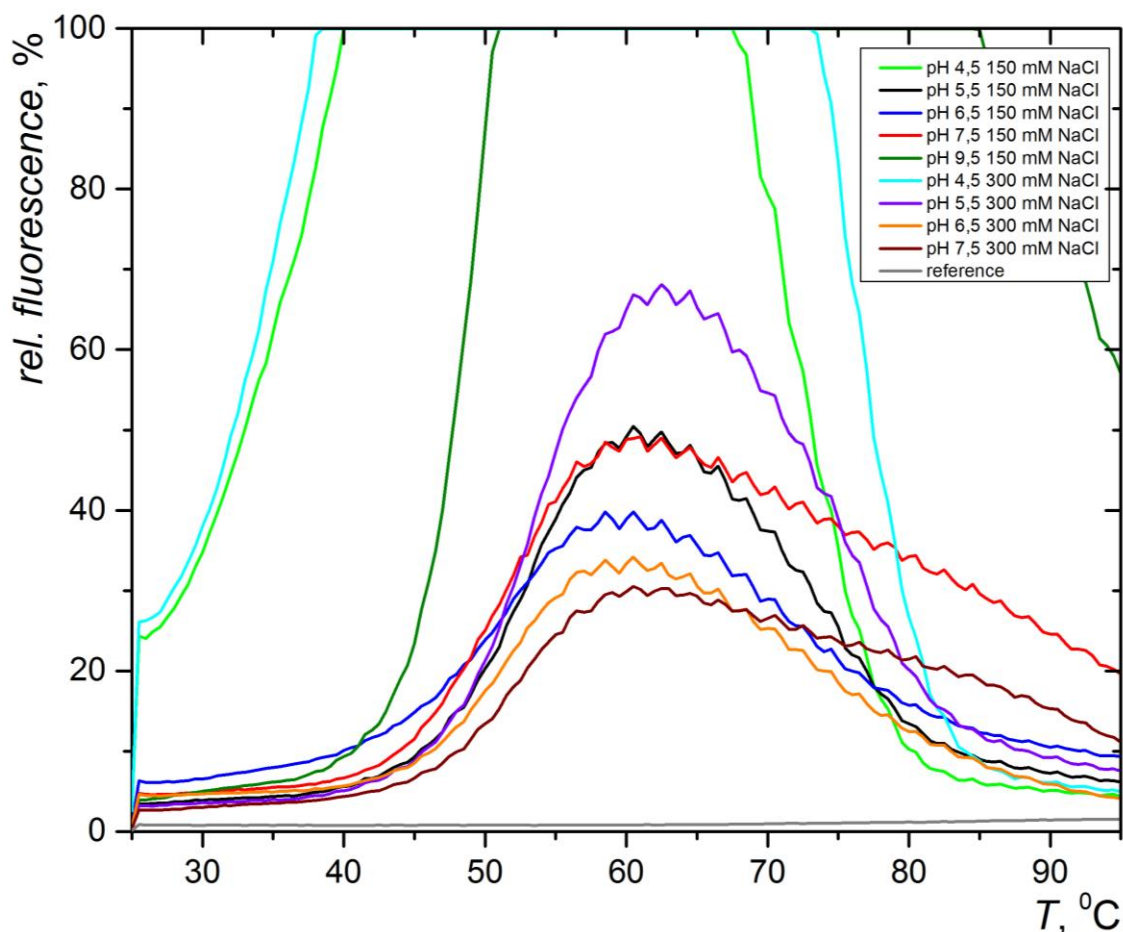
5.1.3 OPTIMALIZACE SKLADOVACÍCH PODMÍNEK

Diferenční skenovací fluorimetrie (DSF) je metoda pro určení teplotní stability proteinu v různých podmínkách [62]. Protein se se zvyšující teplotou rozbaluje a tím odhaluje svoje hydrofobní jádro, na které se váže fluorescenční barva, což lze detekovat jako nárůst fluorescence. Výsledkem je závislost nárůstu fluorescence na teplotě, představující křivku tání proteinu. Díky této metodě lze rychle analyzovat velký počet podmínek (pufr, jeho pH či iontovou sílu) a nalézt tak optimální podmínky, ve kterých bude daný protein nejstabilnější. Obecně také platí, že proteiny s vyšší teplotou tání krystalizují ochotněji než proteiny s nižší teplotou. Takto lze například porovnat šance na vykrytalizování několika konstruktů jednoho proteinu.

Protože se protein AICL při zakoncentrování srážel, pokusili jsme se metodou DSF najít podmínky, ve kterých by byl protein stabilnější.

Složení pufrů pro měření teplotní stability je v Tabulka 2, str. 37. Kromě těchto vzorků byly naměřeny křivky tání i pro další pufrы (s pH 5,0, 6,0 a 7,0, vždy se 150mM i 300mM NaCl). Výsledky měření však sledují stejný trend a kopírují křivky na Obr. 9, str. 45, proto je jejich uvádění nadbytečné.

Z výsledků na Obr. 9, str. 45 je patrné, že protein má nízkou teplotní stabilitu (podle prostředí, ve kterém se nachází, je to 50 – 55 °C). Kromě extrémních hodnot pH, 4,5 a 9,5 (kdy se protein rychle rozbalil a fluorescence přesáhla citlivost detektoru), jsou výsledky pro další hodnoty pH srovnatelné. V rozsahu pH 5,5 – 7,5 nedochází k výraznému zlepšení nebo zhoršení stability. Protože teoretický izoelektrický bod proteinu je 8,53, doufali jsme, že pH v kyselé oblasti napomůže rozpustnosti proteinu. Proto bylo jako vybráno pH 5,5. Koncentrace NaCl a tedy iontová síla stabilitu AICL neovlivňují. S ohledem na fyziologickou relevanci byla zvolena 150 mM NaCl. Navíc byl do skladovacího pufru přidán L-arginin do koncentrace 10 mM, který jako tzv. „nízkomolekulární chaperon“ napomáhá stabilizaci proteinu. Výsledný skladovací pufr je tedy 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM L-arginin, 10mM NaN₃ o pH 5,5. Tento pufr není určený jenom pro skladování proteinu, ale také pro zakoncentrování.



Obr. 9 Diferenční skenovací fluorimetrie proteinu AICL. Protein AICL byl vyředěn do pufrů o různém pH a koncentraci NaCl a byla k němu přidána fluorescenční barva Sypro Orange. Graf znázorňuje závislost relativní fluorescence na teplotě a zachycuje tak křivku tání proteinu. Černě je znázorněn pufr o pH 5,5 se 150 mM solí, který byl zvolen jako skladovací.

Do procesu purifikace byl přidán navíc ještě jeden purifikační krok. Po iontové výměnné chromatografii byl protein za pomoci kolonky HiTrap Desalting (GE Healthcare) převeden do skladovacího pufru. V něm byl zakonzentrován (bez viditelné agregace na koncentraci 4 mg/ml) a byla s ním provedena gelová permeační chromatografie. Při ní byl jako mobilní fáze opět použit skladovací pufr. Při těchto podmínkách byl protein zamražen a převezen ke krystalizačním studiím do Henry Wellcome Bulding for Genomic Medicine, University of Oxford.

5.2 EXPRESE A PURIFIKACE PROTEINU NKp80 A JEHO HMOTNOSTNÍ ANALÝZA

Protože bakteriální exprese ani transientní exprese v linii HEK293 nebyla úspěšná, byl konstrukt vložen vektoru pOPINTTGneo. Tento plasmid umožňuje přípravu stabilně transfekovaných linií HEK293. Plasmid pro oba konstrukty poskytl Mgr. Jan Bláha.

Plasmidy byla transfekována linie HEK293S GnTI. Tato linie produkuje proteiny s jednoduchou a odštěpitelnou glykosylací savčího typu. Po selekci na geneticin proběhlo několik produkcí ve větším objemu. V případě konstruktů NKp80_F1 bylo množství takto získaného proteinu 3,5 mg z 1 l média, což je dostatečné pro strukturní studie. V případě konstruktů NKp80_F2 to bylo pouze 0,4 mg z 1 l média. Proto byl tento konstrukt vložen do plasmidu pCT5, který byl použit pro tvorbu stabilních linií s použitím tzv. piggyBac systému (viz. 5.2.3 na str. 51).

5.2.1 SEKVENCE PROTEINU NKp80

Protein NKp80 je transmembránový protein II. typu s cytoplasmatickou doménou na N-konci [63]. Sekvence proteinu s vyznačenými částmi je na Obr. 10.

*MQDEERYMTLNVQSKKRSSAQTSQLTFKDYSVTLHWYKILLGISGTVNGILTTLTLLISLILLVSQGVLLK
CQKGCSCSNATQYEDTGDLKVNNGTRRNISNKDLCASRSADQTVLCQSEWLKYQKCYWFSNEMKSWSDS
VYVYCLERKSHLLIIHDQLEMAFIQKNLRQLNYVWIGLNFTSLKMTWTWVDGSPIDSKIFFIKGPAKENS
CAAIKESKIFSETCSSVFKWICQY*

Obr. 10 Aminokyselinová sekvence proteinu NKp80. Kurzívou znázorněné aminokyseliny nejsou součástí konstruktů, **cytoplasmatická** doména, **transmembránová** část, delší konstrukt **NKp80_F1 (Q64-Y232)**, kratší konstrukt **NKp80_F2 (S107-Y232)**, **CLTD (Y121-G231)**

Byly navrženy dva konstrukty proteinu NKp80. Delší varianta (konstrukt F1, Q64-Y232, predikovaná relativní molekulová hmotnost 21 kDa) obsahuje kromě CTLD také část flexibilního regionu, který ji spojuje s transmembránovou částí. Kratší varianta (konstrukt F2, S107-Y232, predikovaná relativní molekulová hmotnost 16 kDa) obsahuje CTLD a pouze několik aminokyselin navíc. Aminokyselinová sekvence konstruktů je na Obr. 11.

*MGELLLLLLLLLGLRLQLSLGITG**ITGQGVLLK**CQKGCSCSNATQYEDTGDLKVN**NGTRRNISNKDLCASRS**
ADQTVL**CQSEWLKYQKCYWFSNEMKSWSDSYVY**CLERKSHLLIIHDQLEMAFIQKNLRQLNYVWIGL**N**
FTSLKMTWTWVDGSPIDSKIFFIKGPAKEN**S**CAAIKESKIFSET**CSSVFKWICQY**GTHHHHHHHHG*

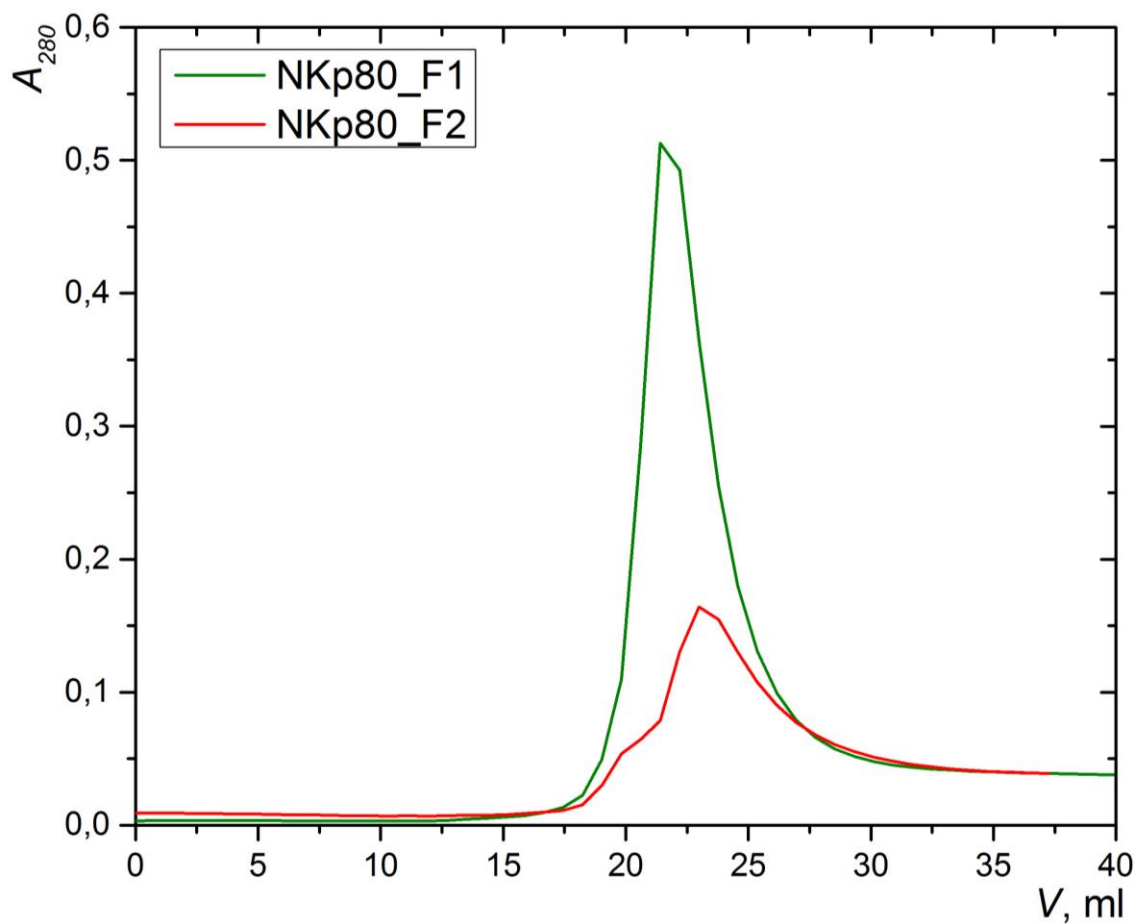
Obr. 11 Aminokyselinová sekvence konstruktů NKp80. Sekreční signál, který je odštěpený během produkce, **pozůstatek klonovacího místa**, delší konstrukt **NKp80_F1 (Q64-Y232)**, konstrukt **NKp80_F2 (S107-Y232)**, **cysteiny**, predikovaná místa pro **N-glykosylaci**, **histidinová kotva**.

5.2.2 PRODUKCE NKp80 VE STABILNÍ LINII TRANSFEKOVANÉ VEKTOREM POPINTTGNEO

Vektor pOPINTTGneo nese gen rezistence proti geneticinu. Do vektoru byl zaklonován proteinový konstrukt NKp80. Po transfekci dochází nejprve k transienční expresi obou proteinů. Během buněčného dělení však není plasmid předáván do další generace. Díky stálému selekčnímu tlaku antibiotika dochází k náhodné integraci do chromosomu a to jak genu nesoucího rezistenci, tak i genu pro konstrukt proteinu NKp80, který je v jeho těsné blízkosti. Selekcí tak přežijí jen ty buňky, u kterých došlo k integraci. Takto vzniklé stabilní linie produkují konstitutivně, kromě proteinu zajišťujícího rezistenci, také protein NKp80_F1 nebo NKp80_F2.

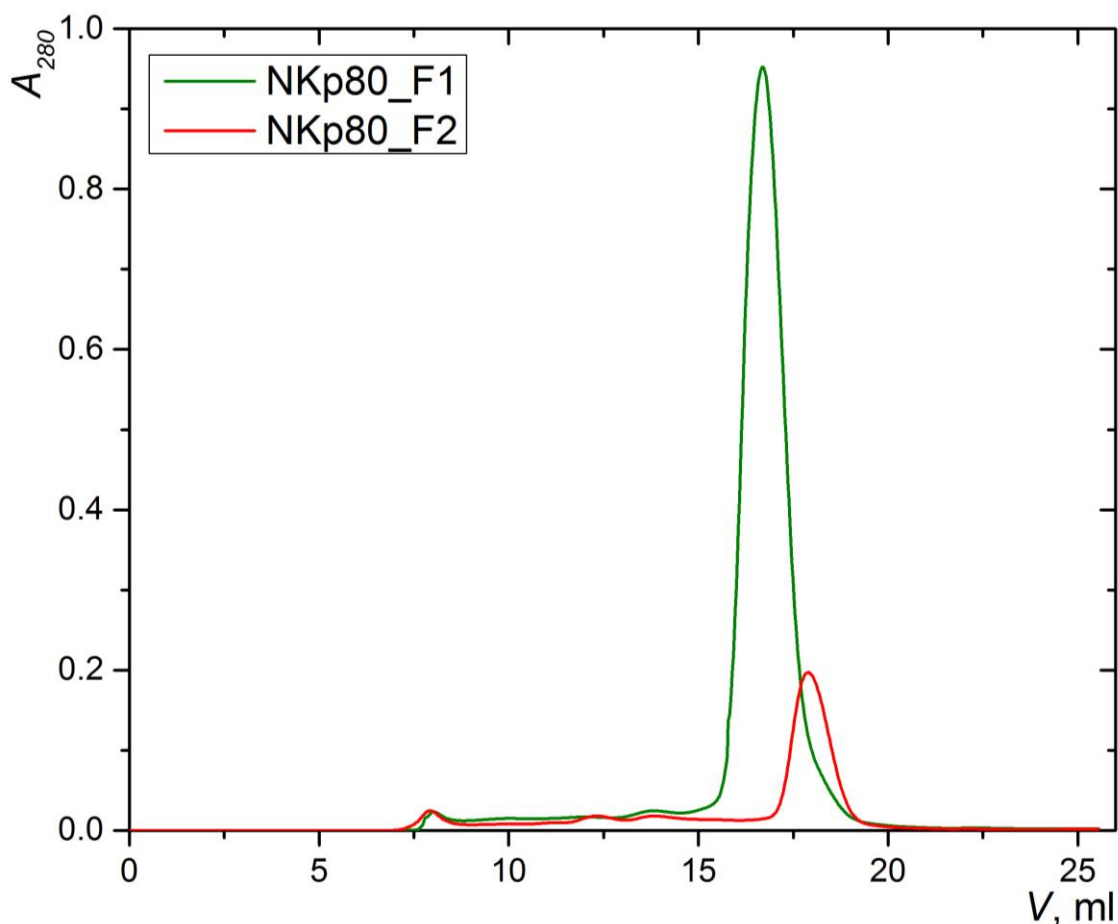
Plasmidem pOPINTTGneo_F1 byla transfekována linie HEK293S GnTI. Druhý den po transfekci byla zahájena selekce přidáním geneticinu do koncentrace 50 µg/ml. Buňky byly každý třetí den přepočítány a centrifugací přeneseny do čerstvého média s antibiotikem. V první fázi selekce viabilita klesala. V další fázi, po přibližně třech týdnech, začala viabilita opět stoupat. Takto byly selektovány buňky nesoucí ve svých chromozomech gen pro rezistenci k neomycinu a také gen pro konstrukt NKp80. Bylo zamraženo několik alikvotních podílů umístěných do kryobanky na -80 °C.

Pro produkci proteinů byla buněčná suspenze centrifugací převedena do 300 ml čerstvého média Expi/F17 a byl přidán geneticin do koncentrace 50 µg/ml. Buněčná hustota byla $0,8 \cdot 10^6$ - $1,5 \cdot 10^6$ b/ml. Kultura byla sklizena po 10 – 14 dnech, když viabilita klesla pod 30 %. Médium bylo použito pro purifikaci proteinů chelatační chromatografií na kolonce Talon. Po nanesení média zředěného 1 : 1 pufrům PBS na kolonku Talon byl protein eluován elučním pufrům s 250 mM imidazolem rychlostí 2,5 ml/min. Záznam eluce pro proteiny NKp80_F1 a NKp80_F2 je na Obr. 12, str. 48. Již z této chromatografie je patrné, že se konstrukt NKp80_F1 produkuje lépe než NKp80_F2.



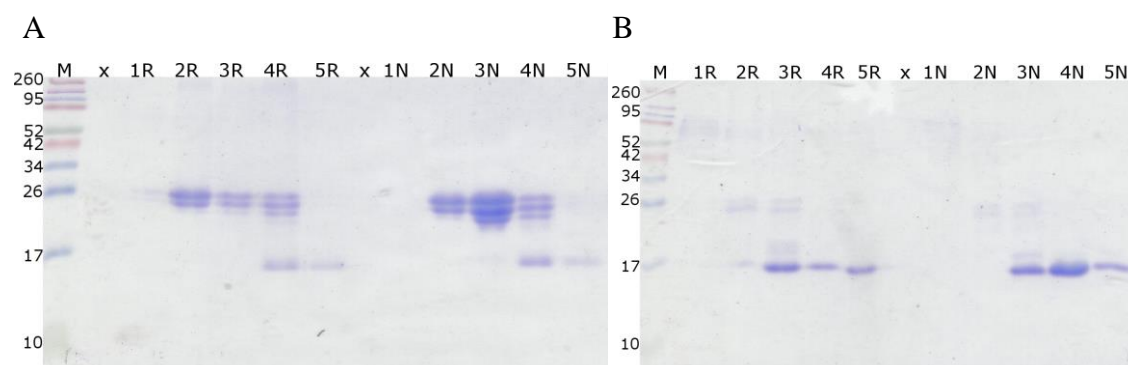
Obr. 12 Eluce proteinu NKp80_F1 a NKp80_F2 po chelatační chromatografii.

Eluát byl zakoncentrován na 300 – 500 μ l, které byly naneseny na kolonu Superdex 200 10/300 GL. Byla provedena gelová permeační chromatografie. Záznam chromatografie je na Obr. 13, str. 49.



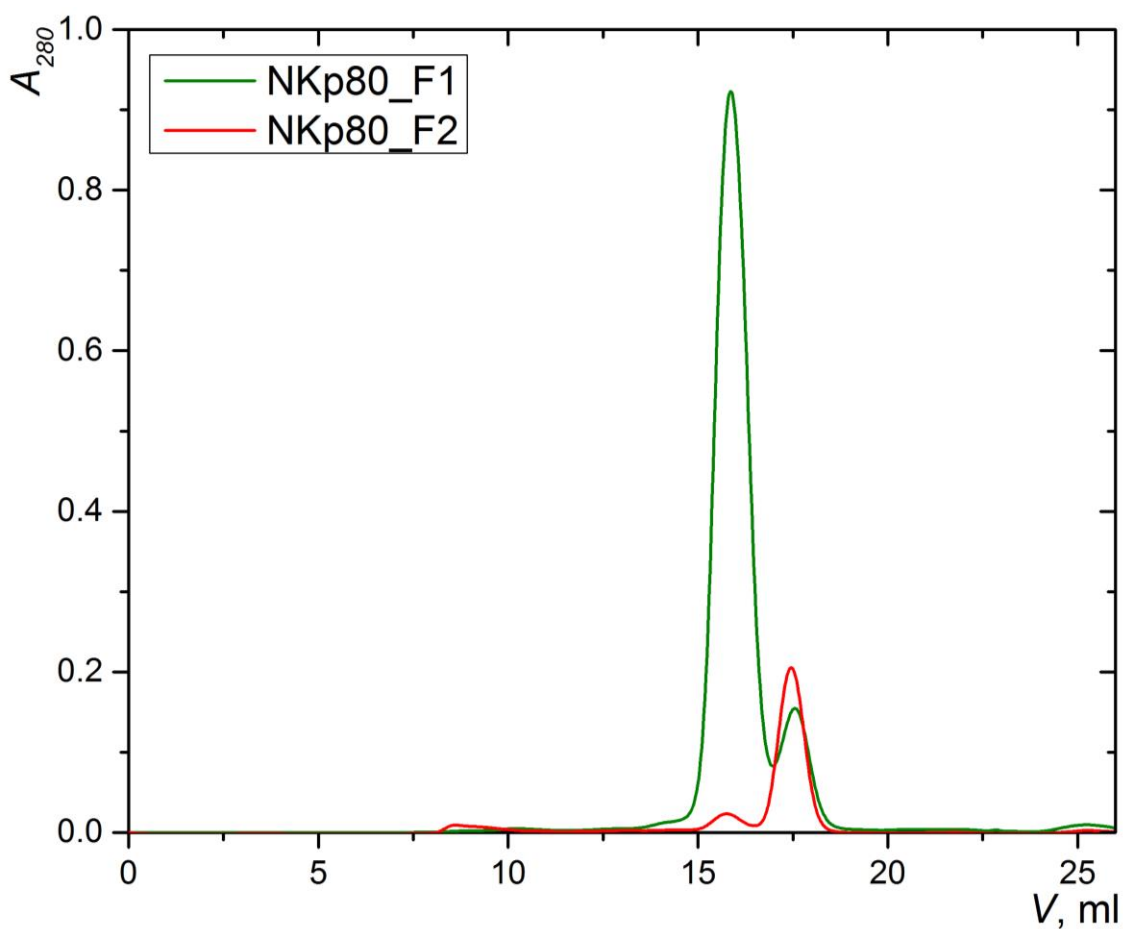
Obr. 13 Záznam z gelové permeační chromatografie NKp80_F1 a NKp80_F2. Kolona Superdex 200 10/300 GL. Každý z proteinů má jiný eluční objem, což odpovídá různé molekulové hmotnosti.

S frakcemi z gelové chromatografie byla provedena SDS PAGE v 15% gelu. Výsledek je na Obr. 14.



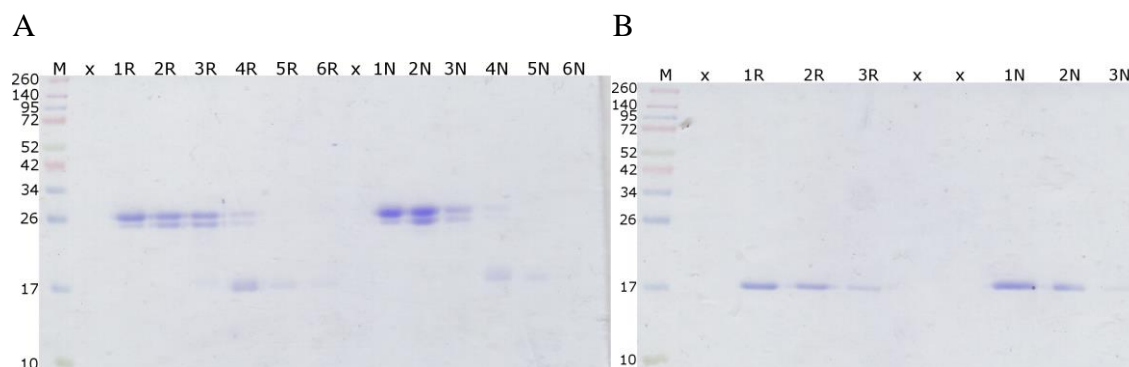
Obr. 14 SDS PAGE proteinu NKp80. 15% gel. Panel A představuje elektroforézu proteinu NKp80_F1, panel B proteinu NKp80_F2; v dráze M je standard molekulových hmotností, x označuje prázdné dráhy, dráhy 1R-5R obsahují frakce z gelové permeační chromatografie v redukujícím prostředí, dráhy 1N-5N obsahují frakce z gelové permeační chromatografie v neredukujícím prostředí. Očekávaná velikost proteinů (bez glykosylaci) je 21 kDa pro NKp80_F1 a 16 kDa pro NKp80_F2.

Z SDS PAGE na Obr. 14 je patrné, že protein NKp80_F2 tvoří několik proužků, které se od sebe mírně liší velikostí, ale protein NKp80_F2 tvoří jen jeden proužek. Oba proteiny obsahují několik predikovaných míst pro N-glykosylaci. Protein NKp80_F1 se tedy vyskytuje v několika glykoformách, reprezentovaných různými proužky, ale NKp80_F2 tvoří pouze jednu glykoformu. Také je vidět nejspíše vzájemná kontaminace. Proto byly frakce opět zakoncentrovány a přečištěny gelovou permeační chromatografií na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL s vyšší rozlišovací schopností. Záznam této chromatografie je na Obr. 15.



Obr. 15 Záznam opakované gelové permeační chromatografie NKp80_F1 a NKp80_F2. Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL.

S frakcemi po gelové filtraci byla opět provedena SDS PAGE, která je na Obr. 16, str. 51.



Obr. 16 SDS PAGE proteinu NKp80. 15% gel. Panel A představuje elektroforézu proteinu NKp80_F1, panel B proteinu NKp80_F2; v dráze M je standard molekulových hmotností, x označuje prázdné dráhy, dráhy 1R-6R obsahují frakce z gelové permeační chromatografie v redukujícím prostředí, dráhy 1N-6N obsahují frakce z gelové permeační chromatografie v neredukujícím prostředí.

Z výsledku SDS PAGE na Obr. 16 je zřejmé, že se preparativně podařilo oddělit kontaminanty a získat čisté frakce č. 1-3 NKp80_F1. Protein NKp80_F2 je čistý.

Koncentrace proteinů byla změřena spektrofotometricky s přepočtem podle molekulové hmotnosti a teoretického molárního extinkčního koeficientu. V případě konstruktu NKp80_F1 bylo množství takto získaného proteinu 3,5 mg z 1 l média, pro konstrukt NKp80_F2 pouze 0,4 mg z 1 l média.

5.2.3 PRODUKCE NKp80_F2 V PIGGYBAC STABILNÍ LINII

Protože výtěžek proteinu NKp80_F2 nebyl v linii vytvořené díky pOPINTTGneo dostatečný pro strukturální studie, byla vytvořena nová stabilní linie na základě piggyBac (PB) expresního systému.

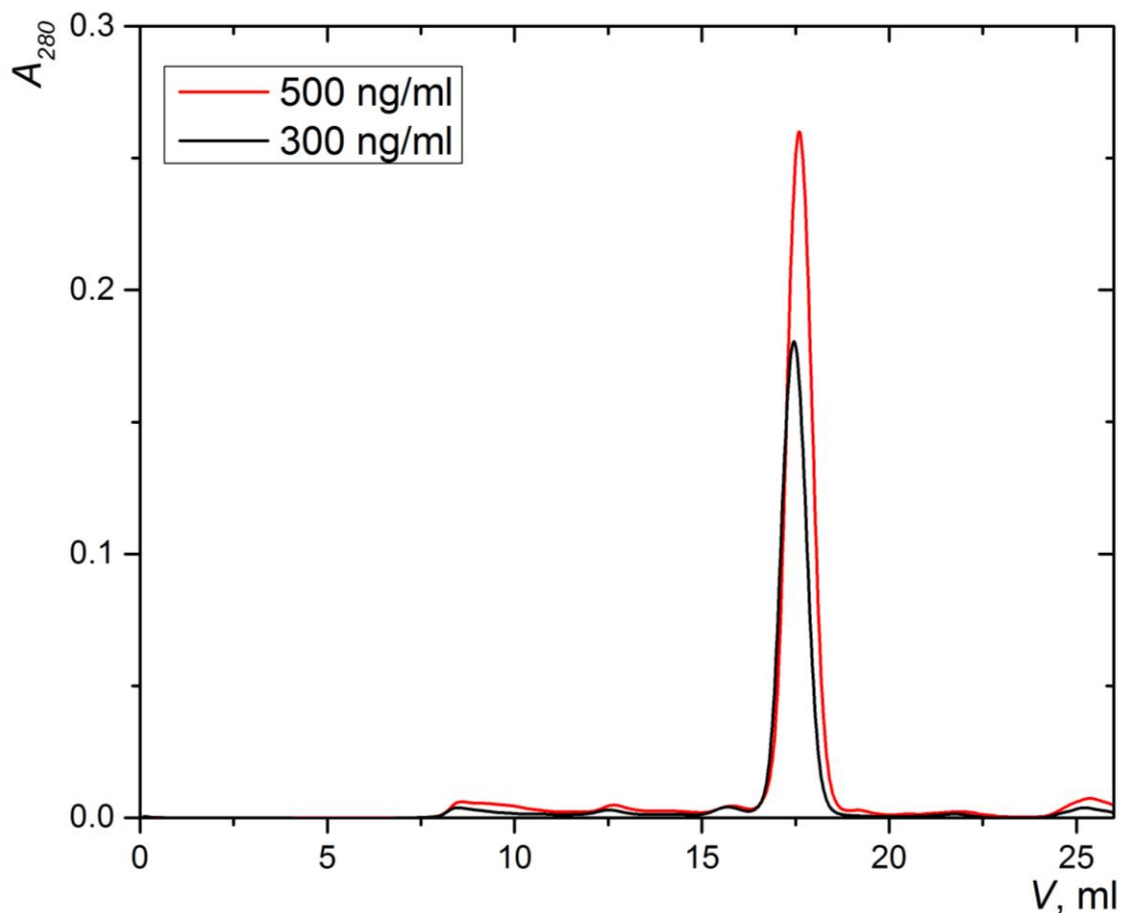
PB systém je založený na DNA transposonech, tedy mobilních úsecích DNA [64]. Enzym transposasa rozpoznává opakující se úseky ohraničující DNA fragment a je schopný tento fragment vložit mezi náhodná TTAA místa na chromosomu. Do chromosomu buňky je navíc vložen gen pro reversní tetracyklinový transaktivátor (rtTA), který je produkován konstitutivně [65]. Po přidání doxycyklinu se rtTA váže na element odpovídající na tetracyklin (z angl. tetracycline response element TRE) v promotoru a indukuje tak expresi cílového genu. Exprese proteinů v tomto systému je tedy indukovatelná doxycyklinem.

Buňky linie HEK293S GnTI⁻ byly kotransfekovány třemi plasmidy [64]. První z plasmidů (pCT5) nese proteinový konstrukt ohraničený krátkými repeticemi a kontrolovaný TRE promotorem. Tento plasmid je nositelem rezistence na puromycin. Druhý plasmid (PB-RN) nese induktor rtTA, také ohraničený repeticemi. Součástí

plasmidu PB-RN je rezistence na geneticin. Geny pro rezistenci nesené těmito plasmidy jsou vždy v blízkosti proteinového konstruktu. Oba geny jsou tak na základě transposonového přesunu integrovány do chromosomu. K integraci slouží třetí pomocný plasmid (PBase), který nese gen pro hyperaktivní transposasu [66]. Tímto plasmidem jsou buňky transfekovány pouze transientně.

Selekce byla zahájena 48 hodin po transfekci. Buňky byly selektovány na puromycin (5 $\mu\text{g/ml}$) a zároveň na geneticin (50 $\mu\text{g/ml}$). Poté, co se viabilita opět vrátila na 100 %, bylo zamraženo několik alikvotních podílů.

Pro indukci byly buňky převedeny do dvou čtverhranných lahví (150 ml čerstvého média, buněčná hustota $1 \cdot 10^6$ b/ml). Byly zaindukovány doxycyklinem o koncentraci 300 ng/ml a 500 ng/ml. Po 7 dnech od indukce byly kultury sklizeny a protein byl purifikován díky histidinové kotvě nejdříve chelatační chromatografií a poté gelovou permeační chromatografií, jejíž záznam je na Obr. 17.



Obr. 17 Záznam z gelové permeační chromatografie NKp80_F2 produkovaného v PB lini. Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL. Produkce indukovaná 300 ng/ml a 500 ng/ml doxycyklinu.

Výtěžek při indukci 500 ng/ml doxycyklinu a počáteční hustotě $1 \cdot 10^6$ b/ml jsou přibližně 4 mg/l produkce. V porovnání s výtěžkem pOPINTTGneo linie (0,4 mg/l) se jedná o desetinásobek.

Protože byl výtěžek při indukci 500 ng/ml větší než při 300 ng/ml, bylo zřejmé, že musí být provedena optimalizace koncentrace indukčního antibiotika. V malých produkcích (30ml Ex/F17 média ve 100 ml čtverhranných lahvích) byla optimalizována koncentrace doxycyklinu (od 500 ng/ml do 900 ng/ml) a navíc počáteční buněčná hustota (od $1 \cdot 10^6$ b/ml do $9 \cdot 10^6$ b/ml). Také byl sledován vliv přítomnosti selekčních antibiotik na výtěžek produkce. Po týdně byly produkce sklizeny a z média byl purifikován protein. Výsledky zachycuje Tabulka 4.

Tabulka 4 Optimalizace počáteční buněčné hustoty a koncentrace doxycyklinu pro produkci NKp80_F2 v PB linii. Množství proteinu bylo určeno integrací plochy pod křivkou gelové permeační chromatografie. Tabulka je rozdělena na několik panelů sledujících vliv počáteční koncentrace doxycyklinu, počáteční buněčné hustoty a přítomnosti selekčních antibiotik na produkci.

| Doxycylin | Puromycin | Geneticin | Počáteční buněčná hustota | Buněčná hustota při sklizení | Viabilita při sklizení | Množství proteinu |
|-----------|-----------|-----------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---|
| ng/ml | ug/ml | ug/ml | 10^6 b/ml | 10^6 b/ml | % | $A_{280} \cdot \text{ml} \cdot 10^{-3}$ |
| 500 | - | - | 3 | 10,2 | 76 | 15,94 |
| 700 | - | - | 3 | 7,0 | 71 | 19,35 |
| 900 | - | - | 3 | 7,9 | 70 | 28,37 |
| 500 | - | - | 1 | 5,6 | 61 | 16,04 |
| 500 | - | - | 3 | 10,2 | 76 | 15,94 |
| 500 | - | - | 5 | 11,2 | 62 | 17,90 |
| 500 | - | - | 7 | 10,1 | 0 | 15,39 |
| 500 | - | - | 9 | 12,0 | 0 | 14,81 |
| 500 | 5 | 50 | 3 | 8,3 | 70 | 15,99 |
| 500 | - | 50 | 3 | 6,8 | 74 | 14,70 |
| 500 | 5 | - | 3 | 8,2 | 69 | 15,40 |

Z výsledků optimalizace je zřejmé, že nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při koncentraci doxycyklinu 900 ng/ml. Koncentrace doxycyklinu navržené pro optimalizaci vycházejí z publikovaných dat, kde již při koncentraci 300 - 400 ng/ml bylo dosaženo produkčního maxima [64]. Zároveň z publikovaných dat vychází, že koncentrace doxycyklinu je závislá na exprimovaném proteinu a je tedy nutné ji vždy optimalizovat. Nejvhodnější počáteční buněčná koncentrace je $5 \cdot 10^6$ b/ml, ale rozdíly ve výtěžku jsou minimální (pokud navíc vezmeme v úvahu, že rozrůst buňky do této koncentrace

vyžaduje čas a čerstvé médium). I s ohledem na ekonomický aspekt proto byla pro budoucí produkce zvolena koncentrace doxycyklinu 900 ng/ml (případně i vyšší, bude předmětem další optimalizace) a počáteční hustota $1 \cdot 10^6$ - $3 \cdot 10^6$ b/ml. Přítomnost selekčních antibiotik výtěžek produkce neovlivňuje, je proto zbytečné je do produkci přidávat.

Produkce konstruktu NKp80_F2 byla v PB linii úspěšná, výtěžek byl oproti pOPINTTGneo desetinásobný, tedy přibližně 4 mg/l. Proto bude do vekrotu pCT5 zaklonován i konstrukt NKp80_F1.

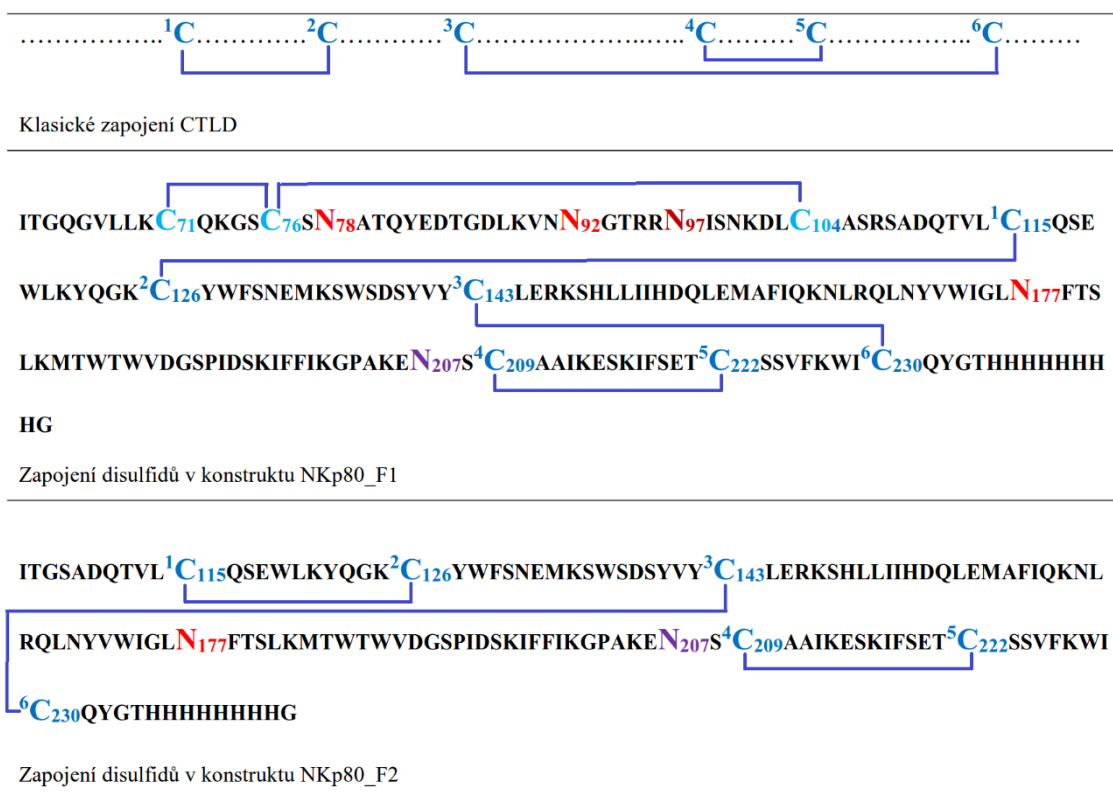
5.2.4 HMOTNOSTNÍ ANALÝZA NKp80

Hmotnostní analýzu provedl Mgr. Michal Rosůlek (MBÚ AV ČR). Peptidické štěpy vzniklé po digesci trypsinem byly analyzovány pomocí LC-MS na FT-ICR hmotnostním spektrometru Solarix XR 12T. Touto analýzou bylo určeno zapojení cysteinů do disulfidických můstků a také obsazenost N-glykosylačních míst.

Zapojení v CTLD receptoru NKp80 odpovídá klasickému CTLD motivu, tedy C1-C2, C3-C6 a C4-C5 [14]. Konstrukt NKp80_F1 však obsahuje kromě CTLD také tři cysteiny ve flexibilní doméně. Na základě naměřených intenzit pro jednotlivé signály lze odvodit nejpravděpodobnější zapojení disulfidů v konstruktu NKp80_F1. Zapojení C115-C126, C143-C230 a C209-C222 sleduje motiv CTLD. Flexibilní doména však obsahuje další tři cysteiny. Podle naměřených intenzit je možné zapojení C71-C76 i C76-C104 a to s přibližně stejnou pravděpodobností. Z hlediska disulfidů tak není připravený protein homogenní. V konstruktu NKp80_F2, který obsahuje cysteiny pouze v CTLD, je nejpravděpodobnější zapojení C115-C126, C143-C230, C209-C222. Zapojení je schematicky znázorněno na Obr. 18, str. 55.

Dále byla mapována N-glykosylační místa. Konstrukt NKp80_F1 obsahuje celkem pět predikovaných míst pro N-glykosylaci. Z hmotnostní analýzy tryptických štěpů vyplývá, že obsazená jsou pouze místa N78, N92 a N177. Tato místa však nejsou obsazena vždy a protein tak tvoří několik několik glykoform, což je patrné z SDS PAGE (Obr. 14A, str. 49). Konstrukt NKp80_F2 obsahuje dvě predikovaná místa, z toho je obsazeno pouze jedno, N177. Tento protein tvoří jen jednu glykoformu (patrné z SDS PAGE Obr. 14B, str. 49). Predikované místo N207 je atypické, aminokyselinová sekvence nesleduje klasický motiv pro N-glykosylaci, ale Asn-X-Cys. Asparagin s tímto motivem je však

N-glykosylován například v CD69 [67], což je receptor strukturně příbuzný a proto jsme brali v úvahu možnost N-glykosylace tohoto místa.



Obr. 18 Zapojení disulfidů v klasické CTLD a v konstruktech NKp80 a obsazenost N-glykosylačních míst.

5.3 KOMPLEX NKp80:AICL

Po úspěšné přípravě obou proteinových partnerů AICL i NKp80 následovala strukturní charakterizace komplexu. S ohledem na povzbudivé výsledky při produkci konstruktu NKp80_F2 v PB a také na to, že protein tvoří jen jednu glykoformu, byla měření dynamického rozptylu světla a sedimentační analýza provedena na komplexu NKp80_F2:AICL.

5.3.1 MĚŘENÍ DYNAMICKÉHO ROZPTYLU SVĚTLA

Měření dynamického rozptylu světla (z angl. dynamic light scattering, DLS) je fyzikální metoda, díky které lze určit distribuci velikostí částic v roztoku [68]. Světlo paprsku laseru je rozptýleno na částicích pohybujících se Brownovým pohybem a díky tomu je detekován rozptyl a fluktuace jeho intenzity. Na základě těchto měření lze určit

velikost částic a jejich relativní zastoupení. Také lze určit, zda vzorek obsahuje částice jednoho druhu, je monodisperzní, nebo částice různého druhu (typicky nepravidelné agregáty) a je tedy polydisperzní.

Bylo zjištěno, že monodisperzní roztoky proteinů ochotněji krystalizují a naopak polydisperzní krystalizaci ztěžuje [69]. Protože cílem této práce je krystalizace obou proteinů a případně také jejich komplexu, rozhodli jsme se měřením DLS zjistit, zda jsou naše vzorky vhodné pro krystalizaci. Zajímal nás především protein AICL, který měl tendenci tvořit agregáty.

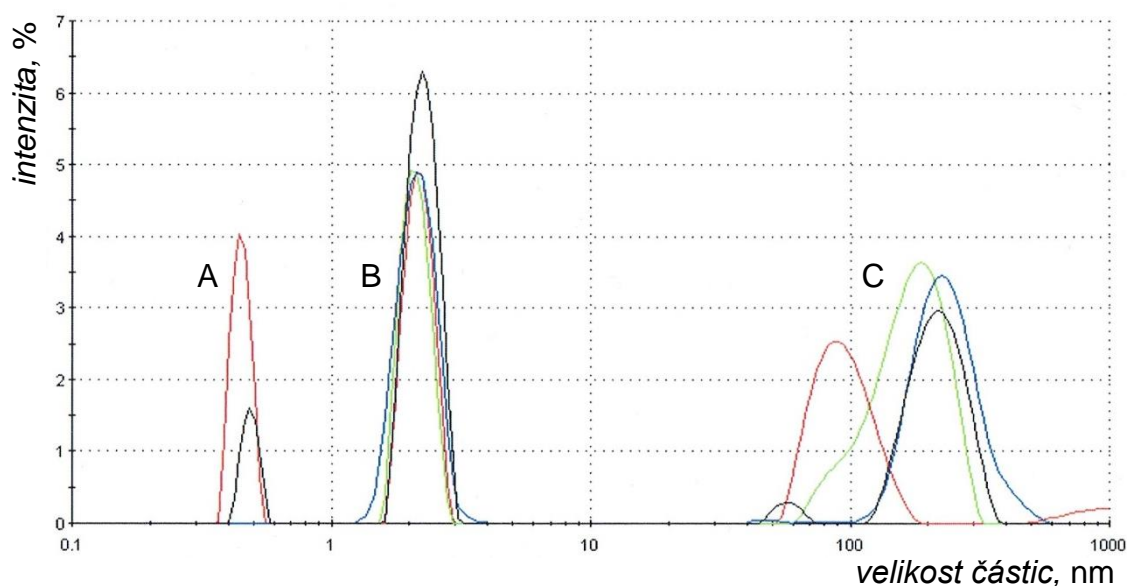
Měření dynamického rozptylu světla provedla a vyhodnotila RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D. (Fyzikální ústav, MFF UK). Data byla naměřena na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK).

Před měřením byly vzorky přefiltrovány přes 0,1 μm centrifugační filtry, protože tato metoda je zvláště citlivá k větším částicím, které poskytují signál s větší intenzitou (i když jejich relativní zastoupení je menší) a prachové částice by zkreslily výsledky. Měření probíhalo při teplotě 20 °C v křemenných kyvetách o objemu 40 μl. Nejprve byl proměřen protein AICL v několika podmínkách (koncentrace 0,6 mg/ml a 1,6 mg/ml, pH 5,5 nebo 7,5, 100mM L-arginin, 50mM citrát). Cílem bylo další metodou ověřit, ve které z podmínek má protein optimální chování. Dále byl změřen protein NKp80_F2 a také komplex NKp80_F2:AICL (molární poměr 1:1) při hodnotě pH 5,5 a 7,5. Výsledky měření (poloměr částic, relativní polydisperznost, relativní molekulovou hmotnost částice) zaznamenává Tabulka 5, str. 57. Grafické znázornění distribuce intenzity částic s různým poloměrem pro AICL (měření č.2), NKp80_F2 (měření č.5) a komplexy při obou hodnotách pH (měření č.6 a 7) je na Obr. 19, str. 57.

Tabulka 5 Výsledky měření DLS při 20 °C.

| Protein | Poloměr±SD nm | Pd % | MW±SD kDa | |
|--------------------|---|---------|--------------|---------------|
| 1 AICL | 2,098±0,3056 0,6 mg/ml, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH = 5,5 | 14,6 | 19,7±2,8 | Monodisperzní |
| 2 AICL | 2,184±0,2590 0,6 mg/ml, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , 100mM L-arginin pH = 5,5 | 11,9 | 20,9±2,5 | Monodisperzní |
| 3 AICL | 2,081±0,3447 0,6 mg/ml, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , 50mM citrát pH = 5,5 | 16,6 | 18,7±7,5 | Monodisperzní |
| 4 AICL | 2,067±0,5533 1,6 mg/ml, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH = 7,5 | 26,8 | 18,4±4,9 | Polydisperzní |
| 5 NKp80_F2 | 2,115±0,2596 1 mg/ml, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH = 7,5 | 12,3 | 19,4±5,9 | Monodisperzní |
| 6 NKp80_F2:AICL | 2,283±0,2613 0,6 mg/ml, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH = 5,5 | 11,4 | 23,2±7,7 | Monodisperzní |
| 7 NKp80_F2:AICL | 2,151±0,3555 0,6 mg/ml, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH = 7,5 | 16,5 | 20,2±5,9 | Monodisperzní |

Predikovaná relativní molekulová hmotnost AICL je 14 kDa, NKp80_F2 (včetně jedné N-glykosylace) je 17,5 kDa. Pd - relativní polydisperzita, MW – relativní molekulová hmotnost, SD - směrodatná odchylka.



Obr. 19 Grafické znázornění distribuce velikosti částic dle intenzity. AICL (měření č. 2), NKp80_F2 (měření č.5), NKp80_F2:AICL (měření č.6), NKp80_F2:AICL (měření č.7). Skupina částic A představuje malé molekuly, složky pufru, skupina B jsou monomerní proteiny a skupina C jsou větší agregáty.

Měření ukázalo, že oba protein jsou monodisperzní (kromě AICL v koncentraci 1,6 mg/ml). Zároveň ve všech vzorcích byla patrná přítomnost větších částic, ovšem s malým relativním zastoupením. Vzorek AICL při měření č.2 (0,6 mg/ml,

10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, 100mM L-arginin pH = 5,5) měl nejmenší relativní polydisperzitu. Čímž bylo potvrzeno, že tako podmínka je vhodná jako finální skladovací (koncentrace L-Argininu byla snížena na 10mM). Při těchto podmínkách byl také protein zakoncentrován pro krystalizační pokusy.

Tvorba komplexu pozorována nebyla. Předpokládaným důvodem je nízká koncentrace. V roztocích komplexu nedocházelo k agregaci při pH = 7,5 ani pH = 5,5. Z toho lze vyvodit, že pokud pH leží v tomto rozsahu, nemá na agregaci vliv a je vhodné pro zakoncentrování před krystalizací.

5.3.2 SEDIMENTAČNÍ ANALÝZA

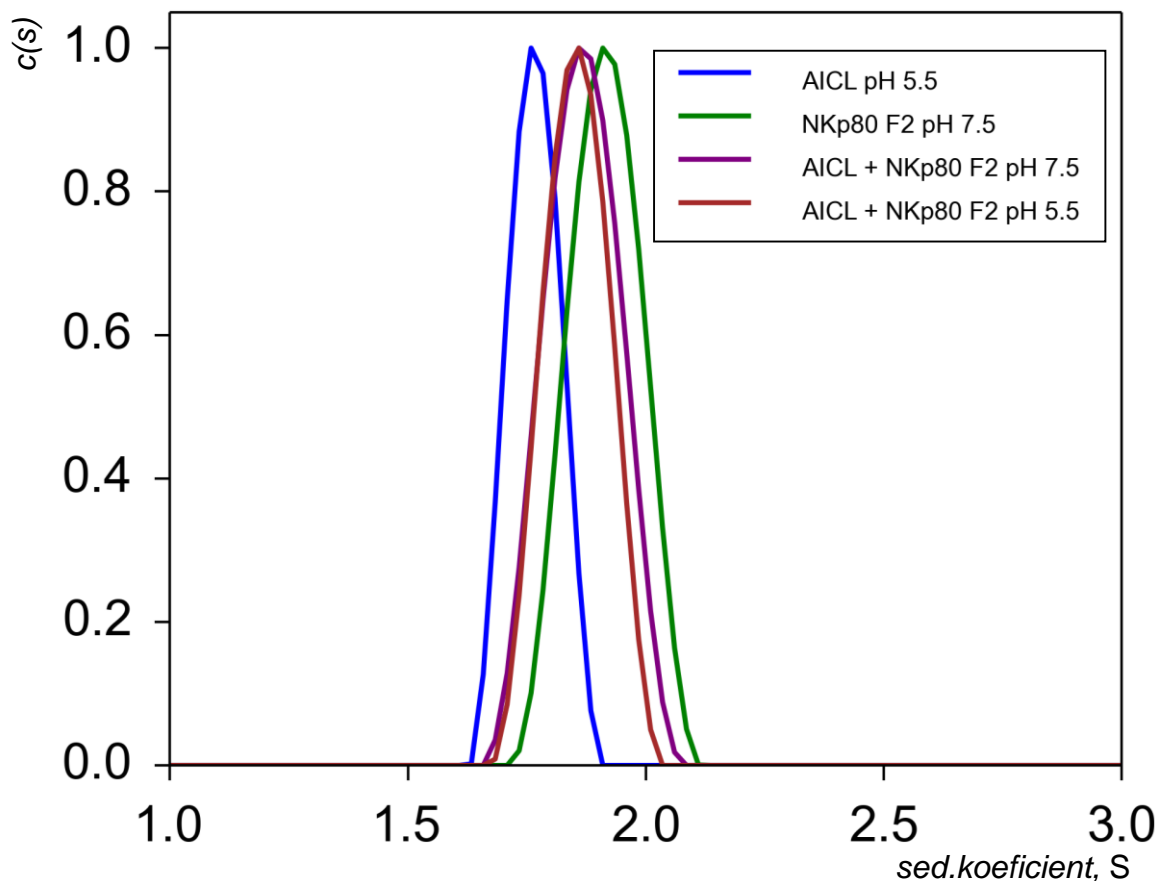
Sedimentační analýza byla provedena metodou sedimentační rychlosti [58]. Tato analýza nám poskytuje údaje o velikosti částic a o jejich zastoupení v roztoku. Na makromolekuly v roztoku působí velká odstředivá síla, díky které se začnou pohybovat směrem ke dnu kyvety. V roztoku se tak vytvoří rozhraní mezi roztokem s makromolekulami a čistým pufrům. Pohyb rozhraní je sledován sérií snímků a lze tak určit sedimentační koeficient (a dále pak velikost) dané makromolekuly.

Sedimentační analýzu provedl na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Proteiny byly analyzovány při koncentraci 0,2 mg/ml, v případě komplexu se jednalo o celkovou koncentraci. Byl analyzován protein AICL (pufr o pH 5,5), NKp80_F2 (pufr o pH 7,5) a ekvimolární směs AICL:NKp80_F2 při obou hodnotách pH (protože jsou skladovací podmínky pro každý protein jiné a pH by mohlo vazbu komplexu ovlivňovat).

Normalizovanou distribuci sedimentačních koeficientů zobrazuje

Obr. 20, str. 59. Protein AICL má pozorovanou hodnotu sedimentačního koeficientu přepočtenou na standardní podmínky (20 °C, čistá voda) $s_{20,w} = 1,83$ S, pro protein NKp80_F2 pozorujeme $s_{20,w} = 1,92$ S. Na základě srovnání naměřeného sedimentačního koeficientu a teoretické hodnoty odpovídající sedimentaci částice tvaru koule o stejné molekulové hmotnosti lze odvodit, že oba proteiny se v roztoku nachází ve formě monomerů mírně protáhlého tvaru o rozměrech cca 3-4 × 5-6 nm, což odpovídá velikostem molekul pozorovaným ve známých krystalových strukturách příbuzných CTLD. Pro směs obou proteinů pozorujeme hodnotu sed. koeficientu mezi hodnotami pro jednotlivé proteiny, těžší částice s vyšší hodnotou sed.

koeficientu nevzniká. Nedochází tedy ke vzniku komplexu, pozorovaná distribuce pouze odráží překryv signálů pro jednotlivé složky směsi proteinů ve vzorku. Tento komplex má však poměrně nízkou afinitu a proto při nízkých koncentracích proteinů použitých pro měření nemusí být pozorovatelný.



Obr. 20 Sedimentační analýza proteinů AICL, NKp80_F2, NKp80_F2:AICL při pH 7,5 a 5,5. Data byla sbírána při 50000 ot./min a 20 °C, bylo snímáno 150 snímků po 6 minutách při vlnové délce 280 nm. Graf zobrazuje normalizovanou distribuci sedimentačního koeficientu částic přítomných v daném vzorku. Pozorované sedimentační koeficienty odpovídající monomerním proteinům jsou $s_{20,w} = 1,83$ S pro AICL a $s_{20,w} = 1,92$ S pro NKp80_F2, distribuce směsi odpovídá překryvu distribucí pro její jednotlivé složky, ke vzniku komplexu za použité koncentrace proteinů nedochází.

5.4 KRYSTALIZACE PROTEINŮ

Krystalizace proteinů na pracovišti v Henry Wellcome Bulding for Genomic Medicine, University of Oxford, UK byla umožněna díky podpoře z projektu BioStruct-X (PID 10915). Nasazení krystalizačních kapek probíhalo v za odborného dohledu Yuguanga Zhao, PhD.

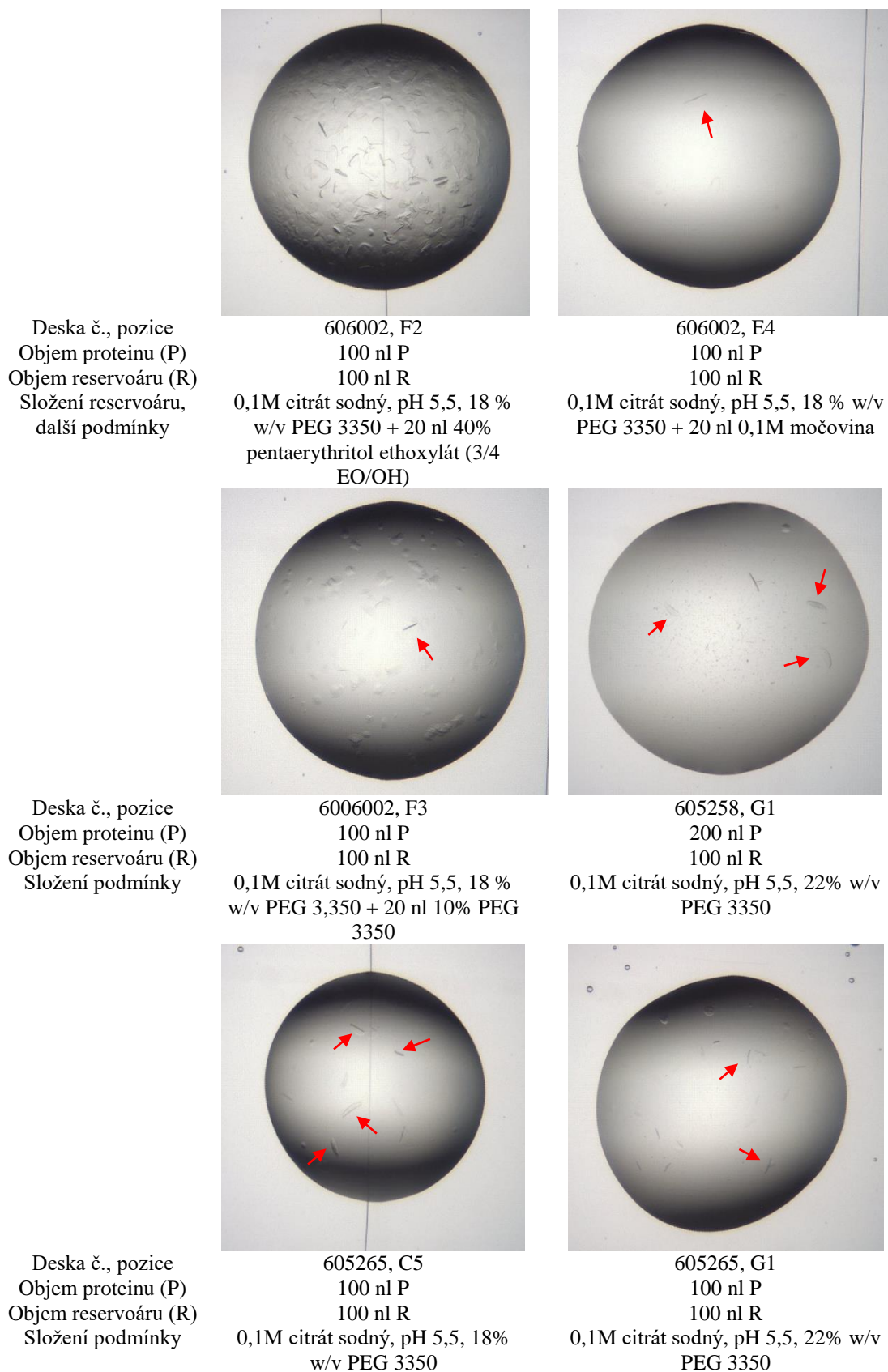
Pro určení optimální koncentrace pro krystalizaci byl proveden prekrystalizační test [59]. Pro protein AICL to byly 4 mg/ml, pro komplex NKp80:AICL 8 mg/ml (celková

koncentrace proteinu ve směsi). Protože množství NKp80_F2 (v době krystalizačních experimentů nebyl ještě systém PB plně optimalizován) nebylo dostatečné pro samostatnou krystalizaci, byl samostatně nasazen pouze konstrukt NKp80_F1. Pro něj byla určena optimální koncentrace 20 mg/ml. Navíc byla k proteinu těsně před krystalizací přidána 200 × koncentrovaná endoglykosydas F₁.

Proteiny byly v nízké koncentraci zmrazeny a přepraveny do Oxfordu. Krystalizační testy byly nasazeny metodou sedící kapky. Vývoj kapek byl sledován díky systému Rock Imager 1000 (Formulatrix, USA) při 20 °C a on-line přístupu přes Protein Information Management System (PiMS).

Po dvou měsících od nasazení nepozorujeme vznik krystalů v kapkách komplexu (NKp80_F1:AICL ani NKp80_F2:AICL). Krystaly nejsou pozorovatelné ani pro AICL. Podařilo se získat krystaly pro NKp80_F1 hned v několika podmínkách, jak je vidět na Obr. 21, str. 61.

Pro všechny podmínky je společný citrát sodný, pH 5,5 a PEG 3350 (18% a 22%). Krystaly z první fotografie (deska č. 606002, pozice F2). Byly vybrány pro difrakční měření na synchrotronu Diamond, Harwell, UK na jaře 2016.



Obr. 21 Kapky s krystaly proteinu NKp80_F2. Fotografie krystalů pořízené systémem Rock Imager 1000 (Formulatrix, USA) a podmínky, ve kterých krystaly vyrostly.

Cílem práce bylo připravit proteiny NKp80 a AICL, strukturně je charakterizovat a dozvědět se více o receptor:ligandovém rozhraní, protože krystalová struktura proteinů ani komplexu není dosud známa.

Příprava proteinu AICL probíhala podle postupu uvedeného v diplomové práci Mgr. Jiřího Nového [33]. Protože výsledný proteinový preparát měl nízkou rozpustnost a srážel se, byla provedena diferenční skenovací fluorimetrie s cílem optimalizovat složení pufru, ve kterém se protein nachází. Z výsledků na Obr. 9, str. str. 45 je však patrné, že protein má v rozmezí pH od 5,5 do 7,5 a při koncentraci NaCl 150mM nebo 300mM podobnou stabilitu. Bylo zvoleno pH 5,5 s ohledem na to, že teoretický isoelektrický bod proteinu je 8,53 a tedy nižší pH by mohlo napomoci i jeho rozpustnosti. Koncentrace NaCl byla zvolena 150mM, protože tato hodnota odpovídá fyziologickým podmínkám. Navíc byl do pufru přidán L-arginin do koncentrace 10mM. Tato látka se chová jako tzv. „nízkomolekulární chaperon“ a může tak stabilizovat protein v roztoku. Za těchto podmínek se podařilo protein zakonzentrovat na koncentraci 4 mg/ml, což je zlepšení oproti původním 2 mg/ml.

Protein NKp80 se nepodařilo připravit expresí v *E. coli* ani transienční expresí v HEK293. Úspěšná byla až produkce ve stabilních liniích HEK293S GnTI. Prvním použitým systémem pro tvorbu stabilních linií byl vektor pOPINTTGneo, který nese rezistenci na geneticin. Díky selekčnímu tlaku antibiotika dochází k integraci genu nesoucího rezistenci a s ním i expresního konstrukt, který se nachází v jeho těsné blízkosti, do chromosomu buněk. I poté, co buňky během dělení o plasmid přijdou, tak díky této integraci produkují cílový protein. Produkce proteinu je konstitutivní, gen není regulován promotorem reagujícím na přítomnost represoru či induktoru. Výtěžek proteinu NKp80_F1 byl asi 3,5 mg/l buněčné produkce, což představuje dostatečné množství pro strukturní studie. Výtěžek proteinu NKp80_F2 byl mnohem nižší, pouze 0,4 mg/l, což není dostatečné, proto byl pro jeho expresi využit ještě další systém pro tvorbu stabilních linií.

Rozdíly ve výtěžku exprese lze vysvětlit rozdílnými konstrukty proteinů, které jsou znázorněné na Obr. 11, str. 46. Konstrukt NKp80_F1 obsahuje kromě CTLD ještě flexibilní část, která spojuje CTLD s transmembránovým regionem. Tato část obsahuje,

dle hmotnostní analýzy, dva N-vázané oligosacharidy. U konstruktů NKp80_F2 tvoří tuto část pouze několik aminokyselin a nenese N-glykosylaci. Přítomnost flexibilní domény a její N-glykosylace by mohla hrát roli při stabilizaci proteinu a vysvětlit tak rozdílný výtěžek.

Pro přípravu proteinu NKp80_F2 byly použity stabilní linie získané díky piggyBac systému. Díky tomuto systému jsou geny pro studované proteinové konstrukty vnášeny na do chromosomů buňky jako transposony, tedy mobilní úseky DNA. Tyto úseky jsou ohraničené repeticemi rozpoznávanými transposasou. Součástí transposonu je kromě genu pro studovaný protein a genu rezistence na selekční antibiotikum také promotor odpovídající na tetracyklin. Dalším vloženým transposonem je gen pro produkci reversního tetracyklinového transaktivátoru a dalšího selekčního antibiotika. Tetracyklinový transaktivátor je produkován konstitutivně. Produkci cílového proteinu tak lze indukovat přidáním doxycyklinu, což může být výhodné, pokud se jedná o protein, který buňku abnormálně zatěžuje nebo poškozuje. Plasmidem nesoucím gen pro transposasu jsou buňky transfekovány pouze transientně, protože její exprese je potřeba pouze na začátku.

I když jsou buňky selektovány na dvě různá antibiotika (selekce pro produkováný protein a ještě pro transaktivátor) a jsou tedy vystaveny většímu stresu, probíhá rychleji než v případě použití pOPINTTGeo (pouze dva týdny ve srovnání s čtyřmi). Lze tedy usuzovat, že úspěšnost integrace do chromosomu je vyšší, než v systému s pOPINTTGeo. Integrace není náhodná, ale aktivní a cílená díky transposase a repetickým ohraničujícím transposonům.

Produkce proteinu NKp80_F2 byla optimalizována z hlediska počáteční buněčné hustoty a koncentrace indukčního antibiotika. Vhodná počáteční hustota pro sedmidenní produkce je $1 \cdot 10^6$ - $3 \cdot 10^6$ b/ml. Pro získání vyšší buněčné hustoty je však nutné přidat ještě jeden subkultivační krok, kdy jsou buňky převedeny do nového média a jelikož rozdíly ve výtěžku nejsou výrazné, není to z ekonomického hlediska výhodné. Vhodná koncentrace doxycyklinu je 900 ng/ml. Z výsledků není patrné, jestli již bylo dosaženo produkčního maxima. Doxycyklin však v těchto koncentracích není pro buňky toxický a během dalších produkcí je možné jeho koncentraci ještě zvýšit. Zvolené koncentrace vycházely z publikovaných dat, kde bylo maximálního výtěžku produkce dosaženo již s koncentrací 300 – 400 ng/ml [64]. Koncentrace indukčního antibiotika se pro různé

proteiny liší, což bylo tímto potvrzeno. Pro každý nově produkováný protein v piggyBac stabilní linii je tedy nutné provést optimalizaci a to v širším rozsahu koncentrací. Výtěžek z proteinu NKp80_F2 z těchto linií je přibližně 4 mg/l.

Přínosem této práce je také ověření výhodnosti piggyBac systému pro obtížně produkovatelné proteiny, kterým je právě konstrukt NKp80_F2. Tento protein se nepodařilo připravit expresí v *E. coli* ani v HEK293S GnTI⁻ s využitím transienční transfekce a výtěžky ze stabilní linie HEK293S GnTI⁻ při použití vektoru pOPINTTGneo byly malé. Zavedení piggyBac systému výtěžek výrazně zvýšilo a umožnilo tak strukturní studie. Tento systém tedy představuje alternativu pro další námi studované proteiny, které se dříve nedařilo produkovat, nebo jejich výtěžky nebyly dostatečné.

Hmotnostně spektrometrická analýza prokázala správné zapojení cysteinů v rámci CTLD proteinu NKp80_F1 a NKp80_F2, tedy C115-C126, C143-C230, C209-C222. V případě proteinu NKp80_F1 dochází ještě k párování cysteinů ve flexibilní doméně. Podle naměřených dat je možné zapojení C71-C76 i C76-C104 a to s přibližně stejnou pravděpodobností. Nedochází tak k tvorbě intermolekulárního dimeru přes lichý cystein ležící mimo CTLD, jako je tomu například u receptoru CD69 [70]. Zapojení cysteinů ve flexibilní doméně však nenarušuje zapojení CTLD, což svědčí o její stabilitě.

CTLD doména obou konstruktů obsahuje dvě možná místa pro N-glykosylaci. Jedno z nich obsahuje klasický motiv Asn-X-Ser/Thr a podle hmotnostní analýzy je obsazené, druhé je atypické s motivem Asn-X-Cys. Tento motiv nese N-vázané oligosacharidy v receptoru CD69 [67]. I když jsou si receptory CD69 a NKp80 strukturně podobné, není toto atypické místo v NKp80 glykosylované. Protein NKp80_F2, který další predikovaná místa pro N-glykosylaci neobsahuje, tvoří pouze jednu glykoformu. Protein NKp80_F1 obsahuje ještě další tři místa ve flexibilní doméně, z nichž pouze dvě jsou obsazené. Celkově tedy obsahuje tři místa pro N-vázanou glykosylaci. Tato místa však nejsou obsazena vždy a protein tak tvoří několik glykoform, jak je patrné na SDS PAGE na Obr. 16, str. 51.

Měření dynamického rozptylu světla prokázalo, že protein AICL i NKp80_F2 jsou převážně monodisperzní. Zároveň bylo potvrzeno, že protein AICL v pufru o pH 5,5, 150mM NaCl a s přidavkem L-argininu vykazuje nejmenší relativní polydisperzitu a že tyto podmínky jsou vhodné pro skladování a zakoncentrování před krystalizací. Tvorba komplexu NKp80_F2:AICL pozorována nebyla, což lze přisoudit nízké koncentraci

proteinů. Podobný výsledek poskytla i sedimentační analýza. Tvorba komplexu nebyla pozorována, ale koncentrace proteinu byla opět nižší než disociační konstanta tohoto nízkoafinitního komplexu. Analytickou ultracentrifugou byly pozorovány proteiny v monomerním stavu, což potvrzuje shoda teoretických sedimentačních koeficientů s těmi naměřenými.

Vzorky proteinů byly v únoru 2016 převezeny do Henry Wellcome Bulding for Genomic Medicine, University od Oxford, UK, kde bylo za pomoci a odborného dozoru Yuguanga Zhao, PhD. nasazeno množství krystalizačních pokusů. Byl pozorován vznik krystalů proteinu NKp80_F1. Pro podmínky, ve kterých byl protein nasazen ke krystalizaci, je společná přítomnost citrátu, pH 5,5 a přibližně 20% PEG 3350. V době odevzdávání práce ještě nebyl znám výsledek měření rentgenové difrakce těchto krystalů.

Dále byl nasazen ke krystalizaci samotný protein AICL, komplex NKp80_F1:AICL a NKp80_F2:AICL. Krystaly však zatím nebyly pozorovány. Krystalizace komplexu je problematická, protože rozpustnost NKp80 (15-20 mg/ml) a AICL (4 mg/ml) se výrazně liší. Je tedy obtížné připravit ekvimolární směs. Ekvimolární směs byla připravena v nižší koncentraci a komplex byl následně zakoncentrován společně. Předpokládalo se, že tvorba komplexu by mohla protein AICL stabilizovat. I přes to však během tohoto kroku docházelo ke srážení, což vnáší nejistotu do složení výsledného koncentrátu. Koncentrace proteinu ve vzorku komplexu pro krystalizaci byla 8 mg/ml.

Protein AICL připravený bakteriální expresí v *E. coli* a *in vitro* renaturovaný z inkluzních tělísek má nízkou rozpustnost i teplotní stabilitu. Oproti původnímu postupu se podařilo najít mírně lepší podmínky, ale i přes to se rozpustnost vůči NKp80 liší. Protein AICL obsahuje několik predikovaných míst pro N-glykosylaci. Je proto možné že struktuře, která má sice správně poskládané disulfidy, chybí tento typ stabilizace. Cestou pro krystalizaci komplexu je tedy příprava proteinu AICL v HEK293S GnTI, což se doposud nepodařilo (transientní exprese ani linie stabilně transfekované pOPINTTGneo nebyly úspěšné). Nabízí se však možnost využití piggyBac systému, který se osvědčil například pro obtížně exprimovatelný protein NKp80_F2.

- Postup přípravy proteinu AICL a jeho skladovací podmínky byly optimalizovány
- S použitím vektoru pOPINTTGneo byly vytvořeny stabilní linie HEK293S GnTI⁻ produkující NKp80_F1 a NKp80_F2.
- S využitím piggyBac systému byla vytvořena linie s doxycyklinem indukovatelnou produkcí NKp80_F2.
- Tvorba komplexu NKp80_F2:AICL nebyla pozorována dynamickým rozptylem světla ani analytickou ultracentrifugou.
- Byly získány krystaly NKp80_F1.

- [1] ABBAS, A. K.; LICHTMAN A. H. H.; PILLAI S. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. *Elsevier Health Sciences* **2015**, s. 1-10.
- [2] SCHINDLER L. W, Understanding the Immune System. *NIH publication* **1991**, s. 2-5.
- [3] SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **2011**, 331 (6024), 1565-1570.
- [4] VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology* **2011**, 29(1), 235-271.
- [5] DUNN, G. P.; BRUCE, A.T.; IKEDA, H.; OLD L. J.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* **2002**, 3(11), 991-998.
- [6] HOŘEJŠÍ, V.; BARTŮŇKOVÁ, J.: Základy imunologie. 4. vyd. Praha: Triton **2009**, 316 s.
- [7] DELVES, P. J.; ROITT, I. J.: Roitt's essential immunology. 12th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell **2011**, s. 26-29
- [8] HUNTINGTON, N. D. NK cell recognition of unconventional ligands. *Immunology and Cell Biology* **2014**, 92(3), 208–209.
- [9] SEIDEL, U. J. E.; SCHLEGEL, P.; LANG, P. Natural Killer Cell Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Tumor Immunotherapy with Therapeutic Antibodies. *OncoImmunology* **2015**, 5(1), 1-8.
- [10] SMYTH, M. J.; CRETNEY, E.; KELLY, J. M.; WESTWOODA, J. A.; STREETA, S. E. A.; YAGITAB, H.; TAKEDAB, K.; DOMMELENC, S. L. H.; DEGLI-ESPOSTIC, M. A.; HAYAKAWAA, Y. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology* **2005**, 42(4), 501-510.
- [11] ORTALDO, J. R.; WINKLER-PICKETT, R. T.; NAGATA, S.; WARE, C. F. Fas involvement in human NK cell apoptosis: lack of a requirement for CD16-mediated events. *Journal of Leukocyte Biology* **1997**, 61(2), 209-215.
- [12] 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.
- [13] KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative Genomics of Natural Killer Cell Receptor Gene Clusters. *PLoS Genetics* **2005**, 1(2), 129-139.
- [14] ZELENSKY, A. N.; GREADY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal* **2005**, 272(24), 6179–217.

- [15] LI, Y.; MARIUZZA, R. A. Structural Basis for Recognition of Cellular and Viral Ligands by NK Cell Receptors. *Frontiers in Immunology* **2014**, 5(123).
- [16] BORK, P.; HOLM L.; SANDER, C. The Immunoglobulin Fold. *Journal of Molecular Biology* **1994**, 242(4), 309-320.
- [17] PDB sturuktura LLT1 (4QKG)
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4QKG> 11.5.2016
- [18] PDB sturuktura NKp30 (3NOI)
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3NOI> 11.5.2016
- [19] VOGLER, I.; STEINLE, A. Vis-à-Vis in the NKC: Genetically Linked Natural Killer Cell Receptor/Ligand Pairs in the Natural Killer Gene Complex (NKC). *PLoS Genetics* **2005**, 1(2), 227-235.
- [20] WELTE, S.; KUTTRUFF1, S.; WALDHAEUER, I.; STEINLE, A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nature Immunology* **2006**, 7(12), 1334-1342.
- [21] KAMISHIKIRYO, J.; FUKUHARA, H.; OKABE, Y.; KUROKI, K.; MAENAKA, K.; STEINLE, A. Molecular Basis for LLT1 Protein Recognition by Human CD161 Protein (NKRPIA/KLRB1): Genetically Linked Natural Killer Cell Receptor/Ligand Pairs in the Natural Killer Gene Complex (NKC). *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286(27), 23823-23830.
- [22] SPREU, J.; KUTTRUFF, S.; STEJFOVA, V.; DENNEHY, K. M.; SCHITTEK, B.; STEINLE, A. Interaction of C-type lectin-like receptors NKp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **2010**, 107(11), 5100-5105.
- [23] LONG, E. O.; KUTTRUFF, S.; STEJFOVA, V. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunological Reviews* **2008**, 224(1), 70-84.
- [24] LONG, E. O.; SIK KIM, H.; LIU, D.; PETERSON, M. E.; RAJAGOPALAN, S.; STEINLE, A. Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annual Review of Immunology* **2013**, 31(1), 227-258.
- [25] RUCKRICH, T.; STEINLE, A.; LIU, D.; PETERSON, M. E.; RAJAGOPALAN, S. Attenuated Natural Killer (NK) Cell Activation through C-type Lectin-like Receptor NKp80 Is Due to an Anomalous Hemi-immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (HemITAM) with Impaired Syk Kinase Recruitment Capacity: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288(24), 17725-17733.

- [26] BARTEL, Y.; BAUER, B.; STEINLE, A.; PETERSON, M. E.; RAJAGOPALAN, S.; 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: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Frontiers in Immunology* **2013**, 4(24)
- [27] VITALE, M.; FALCO, M.; CASTRICONI, R.; PAROLINI, S.; ZAMBELLO, R.; SEMENZATO, G.; BIASSONI, R.; BOTTINO, C.; MORETTA, L.; MORETTA, A. Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *European Journal of Immunology* **2001**, 31 (1), 233-242.
- [28] AKATSUKA, A.; ITO, M.; YAMAUCHI, C.; OCHIAI, A.; YAMAMOTO, K.; MATSUMOTO, N. Tumor cells of non-hematopoietic and hematopoietic origins express activation-induced C-type lectin, the ligand for killer cell lectin-like receptor F1: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *International Immunology* **2010**, 22(9), 783-790.
- [29] KLIMOSCH, S. N.; BARTEL, Y.; WIEMANN, S.; STEINLE, A.; YAMAMOTO, K.; MATSUMOTO, N. Genetically coupled receptor-ligand pair NKp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Blood* **2013**, 122(14), 2380-2389.
- [30] KUTTRUFF, S.; KOCH, S.; KELP, A.; PAWELEC, G.; RAMMENSEE, H. G.; STEINLE, A. NKp80 defines and stimulates a reactive subset of CD8 T cells: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Blood* **2008**, 113(2), 358-369.
- [31] DALBETH, N.; GUNDLE, R.; DAVIES, R. J. O.; LEE, Y. G. C.; MCMICHAEL, A. J.; CALLAN, M. F. C. CD56bright NK Cells Are Enriched at Inflammatory Sites and Can Engage with Monocytes in a Reciprocal Program of Activation. *The Journal of Immunology* **2004**, 173(10), 6418-6426.
- [32] THOMAS, M.; BONAME, J. M.; FIELD, S.; NEJENTSEV, S.; SALIO, M.; CERUNDOLO, V.; WILLS, M.; LEHNER, P. J. Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **2008**, 105(5), 1656-1661.
- [33] NOVÝ, J. Příprava a studium lidského NK buněčného receptoru AICL. Diplomová práce, PřF UK Praha, **2015**
- [34] BLÁHA, J. Příprava a studium lidského lymfocytárního receptoru LLT1. Diplomová práce, PřF UK Praha, **2012**
- [35] Nástroj ClustalW, ExPaSy – Bioinformatics resource portal, dostupné z: <http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html> 8.5.2016.
- [36] Databáze Uniprot, dostupné z <http://www.uniprot.org/> 8.5.2016.

- [37] SPREU, J.; KIENLE, E. C.; SCHRAGE, B.; STEINLE, A. CLEC2A: a novel, alternatively spliced and skin-associated member of the NKC-encoded AICL-CD69-LLT1 family. *Immunogenetics* **2007**, 59(12), 903-912.
- [38] LI, Y.; WANG, Q.; CHEN S.; BROWN, P. H.; MARIUZZA, R. A. Structure of NKp65 bound to its keratinocyte ligand reveals basis for genetically linked recognition in natural killer gene complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **2013**, 110(28), 11505-11510.
- [39] PDB sturuktura KACL (4IOP)
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4iop> 11.5.2016
- [40] SPITS, H.; CUPEDO, T.; CHEN, S.; BROWN, P. H.; MARIUZZA, R. A. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annual Review of Immunology* **2012**, 30(1), 647-675.
- [41] ROTH, P.; MITTELBRONN, M.; WICK, W.; MEYERMANN, R.; TATAGIBA, M.; WELLER, M. Malignant Glioma Cells Counteract Antitumor Immune Responses through Expression of Lectin-Like Transcript-1: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Cancer Research*. **2007**, 67(8), 3540-3544.
- [42] SKÁLOVÁ, T.; BLÁHA, J.; HARLOS, K.; Dušková, J.; Koval', T.; Stránský, J.; Hašek, J.; Vaněk, O.; Dohnálek, J. Four crystal structures of human LLT1, a ligand of human NKR-P1, in varied glycosylation and oligomerization states. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **2015**, 71(3), 578-591.
- [43] FARKONA, S.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* **2016**, 14(1)
- [44] Yaddanapudi, K.; Mitchell, R. A.; Eaton, J. W. Cancer vaccines: Looking to the future. *Oncoimmunology* **2013**, 2(3)
- [45] Sabado, R. L.; Bhardwaj, N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy* **2010**, 2(1), 37-56.
- [46] Wennier, S. T.; Liu, J.; McFadden, G. Bugs and Drugs: Oncolytic Virotherapy in Combination with Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2012**, 13(9), 1817-1833.
- [47] Hinrichs, C.S.; Rosenberg, S. A. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunological reviews* **2014**, 257(1),56-71.
- [48] Rosenberg, S.A.; Restifo, N.P.; Yang, J.C.; Morgan, R. A.; Dudley, M. E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* **2008**, 8(4), 299-308.
- [49] Gross, G.; Waks, T.; Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **1989**, 86(24).10024-10028.

- [50] Leach, D. R.; Krummel, M. F.; Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996, 271(5256),1734-1736.
- [51] Shin, J. H.; Park, H. B.; Choi K. Enhanced Anti-tumor Reactivity of Cytotoxic T Lymphocytes Expressing PD-1 Decoy. *Immune Network* **2016**, 16(2),134-139.
- [52] Peipp, M.; Derer, S.; Lohse, S.; Staudinger, M.; Klausz, K.; Valerius, T.; Gramatzki, M.; Kellner, C. HER2-specific immunoligands engaging NKp30 or NKp80 trigger NK-cell-mediated lysis of tumor cells and enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Oncotarget* **2015**, 6(31), 32075-32088
- [53] 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.
- [54] Scott, A. M.; Wolchok, J. D.; Old, L. J. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **2015**, 12(4), 278-287.
- [55] Figueroa-Magalhães, M.C.; Jelovac, D.; Connolly, R.; Wolff, A. C. Treatment of HER2-positive Breast Cancer. *Breast* **2014**, 23(2), 128-136.
- [56] 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.
- [57] DENG, G.; ZHENG, X.; ZHOU, J.; WEI, H.; TIAN, Z.; SUN, R. Generation and Preclinical Characterization of an NKp80-Fc Fusion Protein for Redirected Cytotoxicity of Natural Killer (NK) Cells against Leukemia. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290(37), 22474-22484.
- [58] VANĚK, O.; BEZOUŠKA, K.: Analytická ultracentrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy* **2010**, 104(12). 1155-1162.
- [59] Pre-Crystallization test, Hampton Research, dostupné z: https://hamptonresearch.com/documents/product/hr000257_2-140_user_guide.pdf 3.5.2016
- [60] Instruction manual: Z-Competent TM E. coli Transformation Kit & Buffer set. Zymo Research Corp.
- [61] Sekvence AICL, dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q92478> 10.5.16
- [62] DUPEUX, F.; RÖWER, M.; SEROUL, G.; BLOT, D.; MÁRQUEZ, J. A. A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples *Crystallographica Section D Biological Crystallography* **2011**, 67(11), 915-909.
- [63] Sekvence NKp80, dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NZS2> 10.5.16

- [64] LI, L.; MICHAEL, I. P.; ZHOU, D.; NAGY, A.; RINIA, J. M. Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **2013**, 110(13), 5004-5009.
- [65] GOSSEN, M.; FREUNDLIEB, S.; BENDER, G.; MULLER, G.; HILLEN, W.; BUJARD, H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **1995**, 268(5218), 1766-1769.
- [66] YUSA, K.; ZHOU, L.; LI, M. A.; BRADLEY, A.; CRAIG, N. L.; BUJARD, H. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **2011**, 108(4), 1531-1536.
- [67] VANCE, B. A.; BENNETT, M. J.; WARD, Y.; GRESS, R. G.; KEARSE, K. P. Distinct but Dispensable N-Glycosylation of Human CD69 Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, 368(2), 214-220
- [68] SCHMITZ K. S. An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules, *Academic Press* **1990**, 470 s.
- [69] FERRÉ-D'AMARÉ, A. R.; BURLEY, S. K. Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. *Structure* **1994**, 2(5), 357-359.
- [70] Childs, R. A.; Galustian, C.; Lawson, A. M.; Dougan, G.; Benwell, K.; Frankel, G.; Feizi, T. Recombinant Soluble Human CD69 Dimer Produced in *Escherichia coli*: Reevaluation of Saccharide Binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1999**, 266(1), 19–23.

