

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Ondřej Skořepa

STRUKTURNÍ STUDIUM POTKANÍHO NK BUNĚČNÉHO
RECEPTORU NKR-P1B A JEHO LIGANDU Clrb

Structural studies of rat NK cell receptor NKR-P1B and its ligand
Clrb

Diplomová práce

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

Praha 2016

PROHLÁŠENÍ

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

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

V Praze dne 19. srpna 2016

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD., za odborné vedení mé diplomové práce, časté konzultace a v neposlední řadě za velikou trpělivost. Dále děkuji Mgr. Janu Bláhovi za poskytnutí materiálů pro experimentální část a za ochotu kdykoli pomoci a poradit. Chtěl bych také poděkovat celému osazenstvu laboratoře 204, jmenovitě Mgr. Barboře Kalouskové a Bc. Samuelovi Pažickému za příjemné a přátelské pracovní prostředí.

ABSTRAKT

NK buňky vykazují unikátní schopnost rozeznávat a způsobit smrt nádorových, či virem infikovaných buněk bez předchozí senzitivace antigenem. Jejich funkce je regulována vyváženými signály indukovanými aktivačními a inhibičními povrchovými receptory při interakci s ligandy cílové buňky. To může být ilustrováno na potkaním receptoru NKR-P1B a jeho ligandu Clrb, které hrají mimo jiné zásadní roli v odpovědi NK buněk na infekci potkaním cytomegalovirem (RCMV).

Během infekce RCMV cílová buňka snižuje expresi ligandu Clrb a tím snižuje inhibiční signál přenášený skrze NKR-P1B do NK buňky, to v ideálním případě vede k aktivaci NK buňky a lyzi infikované buňky. Nicméně, RCMV obsahuje gen pro falešný povrchový receptor – RCTL, který napodobuje Clrb, a tak napomáhá úniku před imunitní odpovědí NK buněk. Zatímco tato úniková strategie byla zaznamenána v kmeni potkanů WAG, ukázalo se, že NKR-P1B homolog z potkaního kmene SD váže pouze Clrb a nerozeznává RCTL. Díky tomu je SD kmen méně citlivý k infekci RCMV.

Tato práce si klade za cíl poodhalit molekulární základ NKR-P1B:Clrb receptor-ligandového rozeznávání, přičemž vychází z našich dřívějších úspěšných výsledků získaných pro lidský NKR-P1:LLT1 receptor-ligandový pár.

Ukázalo se, že pro následnou krystalizaci NK buněčných receptorů a jejich ligandů je nejvýhodnějším rekombinantním expresním systémem produkce rozpustných extracelulárních domén těchto proteinů v transientně či stabilně transfekované HEK293S GnTI⁻ lidské buněčné linii, jež poskytuje homogenní N-glykosylaci. Pro zvýšení výtěžku exprese rekombinantních proteinů byl optimalizován transposonový doxycyklinem indukovatelný savčí expresní systém piggyBac v HEK293S GnTI⁻ buněčné linii, a to za použití konstruktů pro rozpustný Clrb jako cílového proteinu.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňky, Clrb, NKR-P1B, RCTL, HEK293S GnTI⁻, piggyBac

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells are an intensively studied part of immune system possessing unique ability to recognize and induce death of tumor and virus-infected cells without prior antigen sensitization. Their function is regulated by a fine balance of signals induced by multiple activating and inhibitory cell surface receptors and their interaction with the ligands present on the target cell. This can be illustrated on the homodimeric rat inhibitory receptor NKR-P1B and its ligand Clrb which play, besides other things, crucial role in the immunological response of NK cells to the infection with rat cytomegalovirus (RCMV), one of the most studied NK cell function model in rat model organism.

During RCMV infection the target cell downregulates cell surface expression of Clrb, thus decreasing inhibitory signal transmitted through the NKR-P1B receptor to the NK cell, which would ideally lead to NK cell activation and lysis of the infected cell. However, RCMV carries a gene for “decoy” surface receptor – RCTL that mimics Clrb and thus helps to escape the immunological response of NK cells. Moreover, while this escape strategy was demonstrated in the WAG rat strain, it has been shown that the NKR-P1B homologue from SD rat strain binds only Clrb and does not recognize RCTL. Thus the SD rat strain is less susceptible to the RCMV infection.

This research aims to elucidate the molecular basis of the NKR-P1B:Clrb receptor-ligand recognition and is based on our previous successful results with homologous human NKRP1:LLT1 receptor-ligand pair.

For protein crystallization of NK cell receptors and ligands, it was found out that the best recombinant expression system for production of soluble extracellular domains of these proteins is transiently or stably transfected HEK293S GnTI⁻ human cell line possessing homogeneous N-glycosylation profile. To increase the yield of recombinant proteins, we have optimized transposon-based doxycycline inducible mammalian cell expression system piggyBac within HEK293S GnTI⁻ cell line using Clrb soluble expression construct as the target protein.

KEY WORDS

NK cells, Clrb, NKR-P1B, RCTL, HEK293S GnTI⁻, piggyBac

SEZNAM ZKRATEK

(v/v)	objem/objem
(w/v)	hmotnost/objem
A ₂₆₀	absorbance při 260 nm
A ₂₈₀	absorbance při 280 nm
AA	akrylamid
AICL	receptor z rodiny CLEC2, angl. activation-induced C-type lectin
APS	peroxidisíran amonný, z angl. ammonium persulfate
bp	počet párů bází, angl. base pairs
CBB R 250	barvivo Coomassie Brilliant Blue R 250
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
CTLD	doména podobná lektinům C-typu, z angl. C-type lectin-like domain
CTLR	receptor obsahující CTLD, z angl. C-type lectin-like receptor
dH ₂ O	destilovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z angl. deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynukleotid trifosfáty, z angl. deoxynucleotide triphosphates
EBNA	nukleární antigen viru Epstein Barrové
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Fc	část molekuly protilátky, z angl. fragment crystalizable
GnTI	N-acetylglukosaminyltransferasa I
HEK293	označení linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293, z angl. human embryonic kidney cell line 293
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie, angl. high-performance liquid chromatography
CHO	linie buněk odvozená od zárodečného vaječníku křečička čínského, z angl. chinese hamster ovary

Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin G
kb	kilobáze DNA (1000 bp)
KLR	lektinům podobné receptory zabíječských buněk, z angl. killer cell lectin-like receptor
LB médium	kultivační médium, z angl. lysogeny broth
LLT1	receptor z rodiny CLEC2, z angl. lectin-like transcript 1
IPEI	lineární polyethylenimin
LRC	region na chromosomu 19q13.4 kódující imunoglobulinové receptory, z angl. leukocyte receptor complex
mAb	monoklonální protilátka, z angl. monoclonal antibody
MCMV	myší cytomegalovirus
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
MHC I, II	glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu I., II. třídy, z angl. major histocompatibility complex glycoproteins class I, II
NK	přirozený zabíječ, z angl. natural killer
NKC	NK genový komplex, z angl. natural killer gene complex
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
NKR-P1	rodina receptorů NK buněk podobný lektinům C-typu, z angl. NK receptor protein 1
Nkrp1	gen pro receptory NKR-P1
PB	piggyBac – systém pro tvorbu stabilně transfekovaných buněčných linií
PBS	fosfátem pufovaný fyziol. roztok, z angl. phosphate buffered saline
PCR	polymerasová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
rClrb	potkaní receptor z rodiny receptorů podobných lektinům C-typu, z angl. rat C-type lectin-related receptor b

RCMV	potkaní cytomegalovirus, z angl. rat cytomegalovirus
RCTL	protein z rodiny receptorů podobných lektinům C-typu produkovaný při nákaze potkaním cytomegalovirem, z angl. RCMV C-type lectin-like receptor
RNA	ribonukleová kyselina, z angl. ribonucleic acid
rNKR-P1B	potkaní receptor B z rodiny NKR-P1
rtTA	reversní tetracyklinový transaktivátor
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného
TAE	pufř, obsahující Tris, kyselinu octovou a EDTA
TEMED	tetramethylethyldiamin
TES	fyzilogický roztok pufřovaný Tris s přídavkem EDTA
TRE	element odpovídající na tetracyklin, z angl. tetracycline response element
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UCOE	gen, upravují účinnost transkripce, z angl. ubiquitous chromatin opening element

OBSAH

1	Teoretický úvod.....	- 11 -
1.1	NK buňky.....	- 11 -
1.1.1	NK buněčné receptory.....	- 11 -
1.1.2	Rozmanitost rozeznávání NK buňkami: systém NKR-P1:Clr.....	- 12 -
1.1.3	Potkaní NKR-P1B a Clrb.....	- 14 -
1.1.4	Únikové strategie virových infekcí.....	- 17 -
1.2	Rekombinantní exprese proteinů.....	- 19 -
1.2.1	Savčí expresní systémy.....	- 20 -
1.2.2	Expese proteinů v linii HEK293.....	- 21 -
1.3	Expresní systém piggyBac.....	- 25 -
2	Cíle práce.....	- 28 -
3	Materiál.....	- 29 -
3.1	Přístroje a pomůcky.....	- 29 -
3.2	Enzymy.....	- 31 -
3.3	Pufry pro enzymy.....	- 31 -
3.4	Buněčné a bakteriální kmeny.....	- 31 -
3.5	Vektory.....	- 31 -
3.6	Oligonukleotidy pro PCR.....	- 32 -
3.7	Kultivační média.....	- 32 -
3.8	Roztoky.....	- 32 -
3.9	Chemikálie.....	- 33 -
4	Metody.....	- 35 -
4.1	Příprava expresních vektorů.....	- 35 -
4.1.1	Transformace a velkoobjemová produkce.....	- 35 -
4.1.2	Příprava zásobního množství plazmidu.....	- 35 -
4.1.3	Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA.....	- 36 -
4.1.4	Měření čistoty a koncentrace plazmidové DNA.....	- 36 -
4.1.5	Agarosová elektroforéza.....	- 37 -
4.1.6	Extrakce DNA z agarosového gelu.....	- 37 -
4.1.7	Sekvenování DNA.....	- 37 -
4.1.8	Štěpení restrikčními endonukleasami.....	- 38 -
4.1.9	Klonování pomocí enzymu Infusion.....	- 38 -
4.2	Polymerasová řetězová reakce.....	- 38 -
4.2.1	Standardně prováděná polymerasová řetězová reakce.....	- 38 -
4.2.2	Polymerasová řetězová reakce z kolonií.....	- 39 -
4.3	Manipulace s linií HEK293S GnTI.....	- 39 -
4.3.1	Rozmražení buněčné linie.....	- 39 -
4.3.2	Suspenzní kultivace.....	- 39 -
4.3.3	Určení buněčné koncentrace.....	- 40 -
4.3.4	Zamrazování buněčných linií.....	- 40 -
4.4	Produkce proteinů.....	- 41 -
4.4.1	Transfekce.....	- 41 -
4.4.2	Velkoobjemová transienční produkce.....	- 41 -
4.4.3	Produkce ve stabilních liniích.....	- 41 -
4.5	Purifikace proteinů.....	- 42 -

4.5.1	Afinitní chromatografie	- 42 -
4.5.2	Chelatační chromatografie.....	- 42 -
4.5.3	Zkoncentrování proteinů.....	- 43 -
4.5.4	Gelová permeační chromatografie.....	- 43 -
4.5.5	Stanovení koncentrace proteinů.....	- 43 -
4.5.6	SDS-PAGE	- 43 -
4.6	Štěpení TEV proteasou	- 44 -
4.7	krystalizace proteinů	- 44 -
5	Výsledky.....	- 46 -
5.1	Sekvence cílových proteinů	- 46 -
5.1.1	Sekvence rNKR-P1B	- 47 -
5.1.2	Sekvence rClrb	- 47 -
5.2	Příprava expresního vektoru pCT5	- 48 -
5.2.1	Příprava linearizovaného vektoru pCT5.....	- 49 -
5.2.2	Příprava vektorů pCT5_C2 a pCT5_H4.....	- 50 -
5.3	Optimalizace systému piggyBac.....	- 51 -
5.4	Příprava proteinů pro krystalizační experimenty.....	- 56 -
5.4.1	Produkce a purifikace rNKR-P1B	- 56 -
5.4.2	Produkce potkaního Clrb	- 59 -
5.5	Krystalizace proteinů	- 59 -
5.5.1	Krystalizace rClrb.....	- 59 -
5.5.2	krystalizace komplexu rClrb-rNKR-P1B	- 60 -
5.6	Řešení krystalové struktury	- 61 -
5.6.1	Řešení struktury rClrb	- 61 -
5.6.2	Řešení struktury komplexu rClrb-rNKR-P1B	- 62 -
6	Diskuse	- 64 -
7	Závěr.....	- 68 -
8	Seznam použité literatury	- 69 -

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 NK BUŇKY

Buňky imunitního systému, známé jako „přirození zabijáci“ (*NK buňky*, z *angl. natural killer cells*), byly objeveny v roce 1975 jako další druh lymfocytů vedle B a T buněk [1]. Jde o lymfocyty odvozené od kostní dřeně, které sdílejí společný původ s T-buňkami. NK buňky neexprimují antigen-specifické povrchové receptory a obvykle tvoří 10-15 % z celkového počtu cirkulujících lymfocytů. Vzhledem k jejich časně produkci cytokinů a chemokinů a schopnosti lyzovat cílové buňky bez předchozí senzitivace antigenem jsou NK buňky rozhodující součástí nespecifického imunitního systému a představují první linii obrany proti infekčním agens [2]. NK buňky se podílejí na kontrole a zneškodňování několika typů nádorů, virových a mikrobiálních infekcí tím, že omezují jejich šíření a následné poškození tkání [3]. Některé výzkumy poukazují na skutečnost, že NK buňky mají také regulační funkci a že jsou zapojené do vzájemných interakcí s dendritickými buňkami, makrofágy, T-buňkami a endoteliálními buňkami [4]. Poznávání funkcí NK buněčných receptorů zároveň představuje slibný směr v imunoterapii nádorových onemocnění [5].

Imunitní odpověď NK buněk je regulována jemnou rovnováhou aktivačních a inhibičních signálů, přenášených povrchovými buněčnými receptory. Na rozdíl od B- a T-lymfocytárních antigenních receptorů, NK buněčné receptory jsou kódovány v zárodečné linii a neprocházejí somatickou rekombinací [6]. NK buňky rozpoznávají ostatní buňky v těle na základě jejich povrchových znaků, prostřednictvím kterých dostávají signály aktivační nebo inhibiční. O tom, jak NK buňka ve výsledku zareaguje, rozhoduje právě rovnováha mezi těmito signály [7].

1.1.1 NK BUNĚČNÉ RECEPTORY

NK receptory patří ke dvěma odlišným strukturním rodinám: imunoglobulinové superrodině (Ig) a k superrodině receptorů podobných lektinům C-typu (CTLR, z *angl. C-type lectin-like receptor*) [8, 9]. U lidí jsou NK receptory těchto superrodin kódovány jednak v genovém komplexu pro receptory leukocytů (LRC, z *angl. leukocyte receptor complex*), který se nachází u člověka na 19. chromozomu (na 7. u myši) [10], a jednak v NK genovém komplexu (NKC, z *angl. natural killer gene complex*) na chromozomu 12 (6. u myši a na 4. chromozomu u potkana) [11, 12]. Obě zmíněné superrodiny

zahrnují inhibiční i aktivační receptory [13, 14].

1.1.2 ROZMANITOST ROZEZNÁVÁNÍ NK BUŇKAMI: SYSTÉM NKR-P1:CLR

Zdravé buňky obecně exprimují řadu inhibičních ligandů (a to včetně molekul MHC-I), jejichž exprese je často snížena při patologické transformaci, infekci, nebo při buněčném stresu. Tento jev bývá nazýván „missing-self“ rozpoznávání [15, 16]. Na druhou stranu, většina aktivačních ligandů je zdravými buňkami exprimována jen minimálně, ovšem bývá silně zvýšena během buněčné patologie. Tento jev je znám jako tzv. „induced-self“ rozpoznávání [17]. Oba tyto jevy obvykle fungují zároveň a prostřednictvím signálů od cílové buňky udržují rovnováhu mezi indukcí NK buněčné aktivity, či tolerance [17, 18].

Genová rodina NKC kóduje přibližně 30 transmembránových glykoproteinů II. typu. Všechny tyto proteiny se řadí k superrodině CTLR [19]. Geny v NKC jsou rozděleny na KLR (*lektinům podobné receptory zabijčských buněk, z angl. killer cell lectin-like receptor*) a geny CLEC (*lektinové receptory C-typu, z angl. C-type lectin receptor*). KLR geny kódují molekuly exprimované na NK buňkách, zatímco CLEC geny kódují molekuly exprimované na jiných typech buněk, například na dendritických buňkách (CLEC9A) a na myeloidních buňkách (CLEC2B) [13]. Rodina KLR zahrnuje receptory Ly49, NKG2D a CD94/NKG2A, které vážou MHC-I a MHC-I podobné ligandy. KLR rodina rovněž zahrnuje receptory, které rozeznávají od MHC-I odlišné ligandy (např. KLRG1, které rozpoznává E-kadherin) [20] a zároveň vážou CLEC2 kódované ligandy, které samy patří k rodině CTLR [21]. Geny kódující tyto CLEC2-KLR ligand-receptorové páry jsou tedy geneticky spojeny v rámci NKC.

Jako příklad lze uvést myši inhibiční receptor NKR-P1D z rodiny KLR, který váže Clrb [14]. Snížení exprese Clrb během genotoxického stresu spouští lyzi zprostředkovanou NK buňkami. Tato skutečnost tedy podporuje koncept na MHC-I nezávislé kontroly zprostředkované NK buňkami s pomocí NKR-P1 receptorů [22, 23]. U člověka je situace obdobná, lidský NK receptor NKR-P1 rozeznává protein LLT1 (ligand z rodiny CLEC2) a snižuje jednak cytotoxicitu zprostředkovanou NK buňkami, jednak sekreci interferonu γ [24 – 26]. Virová indukce exprese LLT1 na B buňkách poukazuje na roli NKR-P1:LLT1 interakce v regulaci imunitní odpovědi vůči patogenům [27]. Lidský aktivační NK receptor NKp80 rozeznává AICL (rovněž ligand z rodiny CLEC2). Tento receptor-ligandový pár napomáhá komunikaci mezi NK

buňkami a monocyty. Ligand AICL je navíc exprimován na monokiny aktivovaných lidských NK buňkách [21], jež rovněž exprimují NKp80, což by mohlo umožňovat autonomní kontrolu NK buněčných odpovědí [28, 29]. Přehled genové struktury superrodiny CTLR je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Genová struktura potkaních a lidských Nkrp1 příbuzných genů a genů pro ligandy podobné lektinům C-typu.

Geny, jejichž transkripty u potkana jsou předmětem této diplomové práce, jsou v tabulce označeny **oranžově**. Geny, jejichž transkripty u myši a člověka jsou zmíněným potkaním proteinům významně příbuzné také strukturně a funkčně, jsou označeny **modře**. Převzato a upraveno z [12].

Rod	Gen	Počet Exonů	Velikost (kb)	Genové ID
Myš	Nkrp1a (Klrb1a); MGI107540	6	13.7	17057
	Nkrp1b (Klrb1b/d); MGI107539	6	12.6	80782
	Nkrp1c (Klrb1c); MGI107538	6	10.2	17059
	Nkrp1e (Klrb1-ps1); MGI3624540	6	12.9	724020
	Nkrp1f (Klrb1f); MGI2442965	6	11.5	232408
	Nkrp1g (Klrb1/1g); MGI96877	6	16.5	100043861
Potkan	Nkrp1a (Klrb1a); RGD1586149	6	16.7	362443
	Nkrp1b (Klrb1b); RGD1583688	6	12.4	678513
	Nkrp1f (Klrb1c/f); RGD1587571/1583336b	5–6b	4.1–11.6b	689809
	Nkrp1g (Klrb1/1d/1g); RGD1587563	6	18.7	689817
Člověk	KLRB1 (NKR-PIA/CD161); HGNC6373	6	12.6	3820
	KLRF1 (NKp80); HGNC13342	6	17.5	51348
Myš	Clra (Clec2e); MGI3028921	5	9.0	232409
	Clrb (Clec2d); MGI2135589	5	5.9	93694
	Clrc (Clec2f); MGI3522133	5	6.4	435921
	Clrd (Clec2g); MGI1918059	7	50.3	70809
	Clre (Clec2-ps1)	3	13	(53)
	Clrf (Clec2h); MGI2136934	5	14.9	94071
	Clrg (Clec2i); MGI2136650	6	9.2	93675
	Clrh (Clec2j); MGI3647940	5–6b	4.6–9b	677440
	Clri (Clec2-ps2)	5	29	(53)
	Clrj (Clec2-ps3)	2	1	(53)
	Clr1 (Clec2d1); RGD1564464	7	14.7	500331
	Clr2 (Clec2d2); RGD1562831	5	8.1	362445
	Clr3 (Clec2d3); RGD1588731	5	9.1	689757
	Clr4 (Clec2d4); RGD1588718	5	17.4	689770
	Clr5 (Clec2d5a); RGD620070	5–6b	10.0	113937
	Clr6 (Clec2d6a); RGD1588698	5	7.3	689790
	Clr7 (Clec2d7); RGD1587580	6	33.7	689800
	Clr8 (Clec2d8p)	4	9	(7)
Potkan	Clr9 (Clec2d9a); RGD1306865	6	106.1	312745
	Clr10 (Clec2d10a); RGD1587527	5	5.3	689853
	Clr11 (Clec2d11a); RGD1563148	5	8.6	362447
	CLEC2A (KACL); HGNC24191	5	19.1	387836
	CLEC2B (AICL); HGNC2053	5	17.5	9976
	CLEC2C (CD69); HGNC1694	5	8.4	969
	CLEC2D1p (LOC374443)	5	41.1	374443
	CLEC2D2 (LLT1); HGNC14351	5	29.8	29121
	CLEC2L (BACL); HGNC21969	5	21.1	154790
	CLECL1 (DCAL); HGNC24462	5	17.4	160365
Člověk				

Přestože již byla prokázána velká řada funkčních interakcí mezi různými NKR-P1 receptory a jejich Clr ligandy u myši [30] a potkanů [31], či jejich homologů u lidí [32], mnoho receptor-ligandových interakcí zůstává neznámých, stejně jako je neznámou jejich funkce [12].

Tato diplomová práce je zaměřena na potkaní receptor-ligandový pár NKR-P1B:Clr_b, a to především na aspekty rekombinantní exprese těchto proteinů za účelem studia jejich struktury. Nejprve je ale třeba upřesnit teoretické pozadí strukturní charakterizace těchto proteinů. Následující text bude tedy zaměřen na potkaní receptory (a jejich případné funkční, genetické a strukturní srovnání s homologními proteiny u člověka a především u myši – ekvivalentní myši ligand-receptorové páry jsou potkaním velmi podobné).

1.1.3 POTKANÍ NKR-P1B A CLR_B

Potkaní NK buněčný receptor NKR-P1B je disulfidicky vázaný homodimer transmembránového typu II, jež obsahuje doménu podobnou lektinům C-typu (CTLD, z *angl.* *C-type lectin-like domain*). Je to jeden ze čtyř potkaních NKR-P1 receptorů (vedle NKRP-1A, F a G). Potkaní NKR-P1B je kódován genem *Nkrp1b* (tj. *Klr1b* z rodiny *KLR*) v NKC genovém komplexu na centromerním konci NKC na 4. chromozomu. Zde je uložen i gen pro NKR-P1A, zatímco geny pro NKR-P1F a G jsou uloženy na telomerním konci (geny homologních receptorů rodiny NKR-P1 jsou u myši uloženy na chromozomu 6 a na chromozomu 12 u člověka). Potkaní NKR-P1 zahrnují jak receptory aktivační (NKR-P1A, NKR-P1F), tak receptory inhibiční (NKR-P1B, NKR-P1G) [22]. Transkripty všech myších *Nkrp1* genů byly nalezeny ve slezině, brzlíku, lymfatických uzlinách a dalších hematopoetických tkáních, tedy v podstatě všude, kde se nacházejí NK buňky [33]. Inhibiční role NKR-P1B byla v nedávném výzkumu potvrzena na *Nkrp1b* deficientním myším kmenu. Clr_b NK buněčná inhibice byla u tohoto kmenu zrušena a zároveň byl tento kmen defektní v odmítání buněk postrádajících Clr_b, což podporuje hypotézu na MHC I nezávislém „missing-self“ rozpoznávání Clr_b *in vivo* [34].

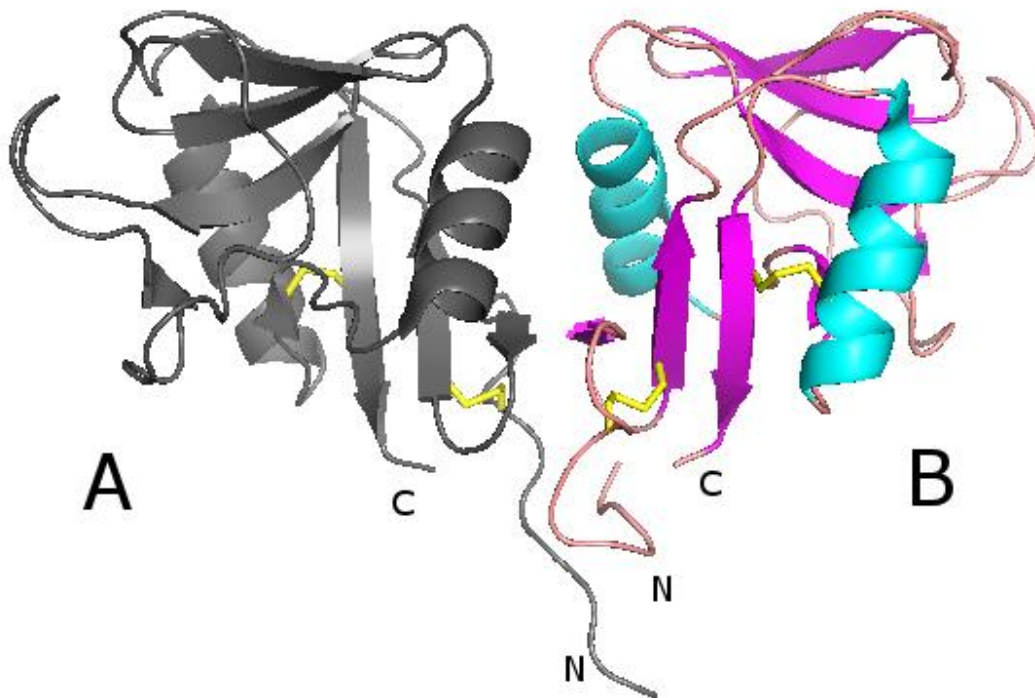
Potkaní receptor Clr_b (Clr₁₁, tj. produkt genu *Clec2d11*) z rodiny proteinů podobných lektinům C-typu je, stejně jako jeho vazebný partner, transmembránový

protein II. typu. Clrb je exprimován ve všech jaderných hematopoetických buňkách a některých nehematopoetických buňkách napříč většinou tkání, vyjma mozku, který postrádá jak Clr, tak NKR-P1 expresi [22]. Exprese potkaního Clrb inhibuje funkci NK buněk skrz interakci s inhibičním receptorem NKR-P1B (stejně jako u myších homologů; lidskými homology pro tento pár jsou NKR-P1A a LLT1). Inhibiční povaha zmíněného ligand-receptorového páru byla pro Clrb potvrzena na myši pomocí specifické anti-Clrb monoklonální protilátky 4A6, která po aplikaci blokovala inhibici NK buněk [22]. Zdá se, že Clrb je zásadní povrchový znak zdravých buněk, a to vzhledem k tomu, že jej produkují v podstatě všechny jaderné hematopoetické buňky a stejně tak embryonální buňky a dospělé kožní fibroblasty [23]. Že se jedná o „známku zdraví“ podporuje i fakt, že exprese Clrb je často snížena při buněčné patologii, což zahrnuje hematopoetické tumory, nákazu potkaním a myším cytomegalovirem (RCMV, z *angl. rat cytomegalovirus*; MCMV, z *angl. murine cytomegalovirus*) [35] a genotoxický a buněčný stres [23]. Zajímavé je, že potlačení exprese se děje jak na transkripční, tak na translační úrovni. To naznačuje, že transkripční, post-transkripční a post-translační mechanismy hrají důležitou roli v expresi Clrb a tím i v regulaci NK buněčné aktivity [23, 35].

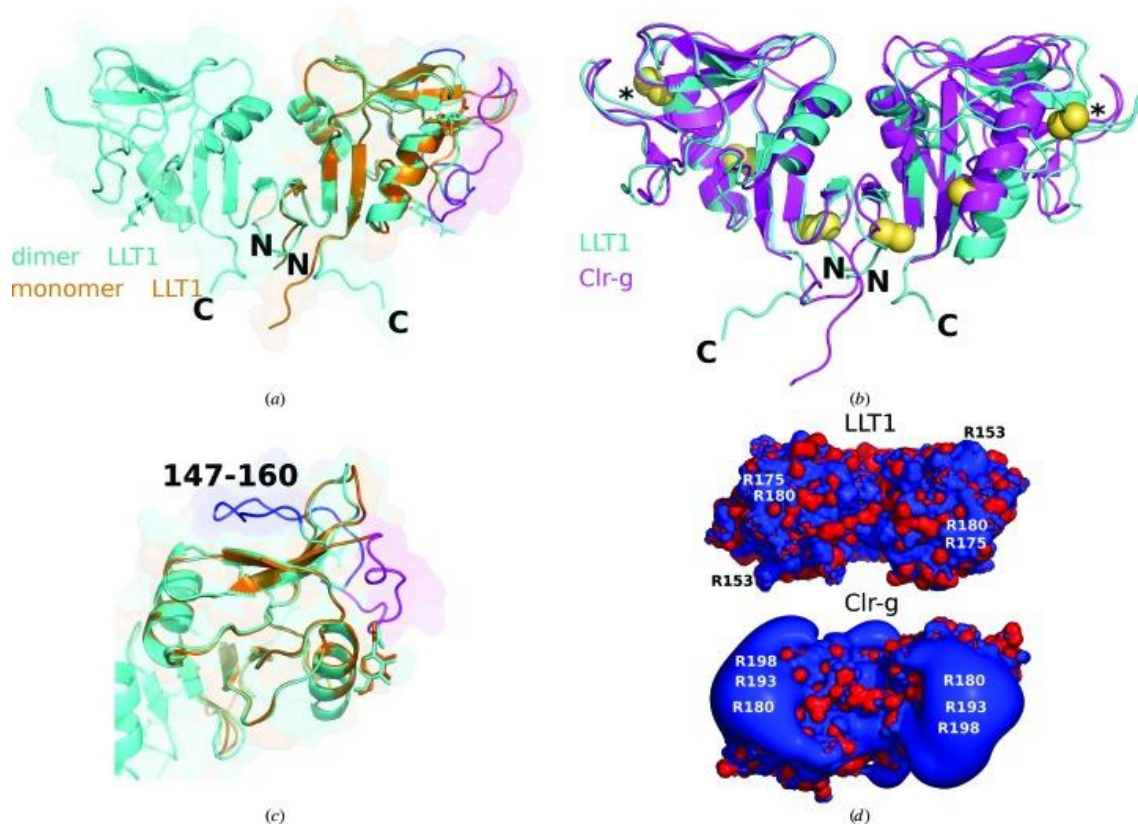
Na strukturní úrovni proteiny NKR-P1 a Clr patří ke skupině V superrodiny lektinů C-typu. Lektiny C-typu jsou třída glykoproteinů charakteristická závislostí na iontech Ca^{2+} , konzervovanými disulfidicky spojenými cysteiny a funkční doménou pro rozeznávání sacharidů [19, 36]. Proteiny NKR-P1 a Clr jsou označovány jako lektinům podobné, neboť primárně vážou jiné proteiny a vykazují atypickou konzervovanost ve svých cysteinových reziduích ve smyslu, že pravděpodobně ztratily některá rezidua a struktury důležité pro koordinaci Ca^{2+} iontů, a tak postrádají vysokou afinitu v Ca^{2+} -dependentní vazbě sacharidů (například myší Clr a lidské LLT1 postrádají pátý cystein v jejich lektinům podobné doméně) [37]. Celkově se zdá, že všechny NKR-P1 proteiny sdílejí strukturu podobnou jiným CTLD, což zahrnuje minimálně dva α helixy a dva anti-paralelní β listy. Mají β jádro složené z dlouhých anti-paralelních β řetězců, které formuje centrální pilíř lemovaný z jedné strany krátkým β řetězcem a z druhé strany β listem. Toto jádro je obklopeno dvěma až třemi α helixy. Pravděpodobně všechny mají tři disulfidické vazby (kromě myšího NKR-P1C^{BALB}, jež má dvě). Porovnání všech

známých NKR-P1 ektodomén odhalilo nejvyšší konzervovanost v oblasti β -jádra, nižší v oblasti smyček na povrchu CTLD, kde, jak se zdá, nejdelší smyčka hraje zásadní roli v ligandové specifitě [38].

Očekávaná struktura potkaního Clrb by měla být podobná jiným proteinům z rodiny CLEC2. Pro ilustraci zde uvádím obrázek krystalové struktury myšního Clrg (Obr. 1) [39]. Nedávno publikované čtyři krystalové struktury lidského LLT1 (homolog potkaního Clrb) získané za různých podmínek ukázaly, že jeho dimerní forma sleduje klasický způsob dimerizace CLEC2 receptorů, stejný jako u lidského receptoru CD69, jenž byl prvním receptorem z CLEC2 rodiny se známou strukturou. Monomerní forma vykazuje stejné sbalení s výjimkou polohy vnější části regionu dlouhé smyčky (Obr. 2, str. 17) [40].



Obr. 1: Struktura myšního Clrg. Clrg se objevuje v krystalové struktuře jako dimer složený z podjednotek A a B, což je zároveň obsah asymetrické jednotky. Na úrovni sekundární struktury myšící Clrg formují dva α -helixy, dva anti-paralelní β -listy a dvě disulfidické vazby (Cys92–Cys103, Cys120–Cys202). Sbalení je velmi podobné lidskému receptoru CD69 s typickým uspořádáním smyčky v CTL doméně. Převzato z [39].



Obr. 2: Struktura lidského LLT1. (a) Struktury dimerní (LLT1_D2, cyan) a monomerní (LLT1_mono, oranžová) formy LLT1. Smyčka je ve standardní dimerní pozici u LLT1_D2 (modrá) a je v opačné pozici u LLT1_mono (nachová). (b) porovnání struktury LLT1_D2 (cyan) s myším ortologem Clr-g. Disulfidické vazby jsou označeny žlutě. (c) Detailní pohled na struktury smyčky diskutované v (a). (d) Elektrostatický potenciál povrchů LLT1_D2 (horní) a myší Clr-g (spodní; pohled z vrchu dimeru). Převzato z [40].

1.1.4 ÚNIKOVÉ STRATEGIE VIROVÝCH INFEKČÍ

Objasnění funkce a mechanismu imunitní odpovědi NK buněk během virové infekce již bylo a je věnováno mnoho pozornosti. Důležité informace o funkci NK buněk při potlačování virových infekcí *in vivo* byly získány studiem infekce myším cytomegalovirem (MCMV). U rezistentního kmene myší C57BL/6 (B6) NK buněčný aktivační receptor Ly49H rozeznává virem kódovaný protein m157-a exprimovaný na povrchu infikované buňky. Vazba aktivačního receptoru s virem kódovaným ligandem následně spouští NK cytolytické funkce a infikovaná buňka je zničena [41, 42]. Pozorovány byly ovšem i virové strategie obcházející tento typ nespecifické imunity.

Funkce zmíněných aktivačních a inhibičních receptorů může být ilustrována na potkaním inhibičním receptoru NKR-P1B a jeho ligandu Clrb, které hrají zásadní roli

v odpovědi NK buněk na infekci potkaním cytomegalovirem. Cytomegaloviry jsou známé tím, že kódují několik genových produktů, jejichž funkcí je podlomit MHC-dependentní imunitní rozeznávání. Infekce RCMV také výrazně potlačuje expresi Clrb a tím se nakažená buňka stává senzitivnější k rozeznání a zabití NK buňkami. Naproti tomu genový produkt potkaního cytomegaloviru, lektinu podobný transkript C-typu RCTL, s homologií k Clr ligandům NKR-P1 receptorů, funguje jako falešný ligand, který chrání infikované buňky před NK zabíjením skrze interakci s NKR-P1B inhibičním receptorem.

Protein RCTL (z *angl. RCMV C-type lectin-like*) je exprimován v druhé části časně a během pozdní fáze replikačního cyklu tohoto viru. Jedná se o protein o velikosti 20 kDa obsahující CTLD a sdílející významnou homologii s potkaními i myšimi Clr molekulami [43] (z 50 % stejná aminokyselinová sekvence s myším Clrb, ze 48 % s myším Clrg, z 60 % s potkaním Clrb). Je pozoruhodné, že také intron-exonová struktura genu pro RCTL je podobná struktuře genů pro Clr, což poukazuje na pravděpodobné převzetí tohoto genu virem od hostitele během replikačního cyklu; mezi oběma geny však existují jisté rozdíly – introny byly v genu pro RCTL zkráceny a region kódující intracelulární doménu byl zkrácen a pozměněn. Předpokládá se, že tyto změny vedou v důsledku k možnosti regulace exprese a funkce RCTL nezávisle na Clrb. Pomocí monoklonální protilátky R3A8 (specifické pro RCTL a potkaní Clrb) bylo zjištěno, že infekce RCMV způsobuje ztrátu povrchové exprese Clrb, která by vedla k eliminaci virem napadených buněk NK lymfocyty. Ztráta fyziologického ligandu je ale rychle nahrazena expresí RCTL ve formě homodimeru; tento náhradní ligand přímo interaguje s NKR-P1B a tak inhibuje NK buněčnou cytotoxickou aktivaci [44].

Geny pro NKR-P1B u jednotlivých potkaních kmenů vykazují vyšší míru alelického polymorfismu než ostatní izoformy NKR-P1. Významně se liší např. alely NKR-P1B u potkaních kmenů SD, BN, F344, BS, PVG, WAG a TO. Identické jsou NKR-P1B^{BS/PVG} a NKR-P1B^{WAG}, od nichž se odlišují NKR-P1B^{RNK,SD,BN,F344} (které jsou si vzájemně dosti podobné); NKR-P1^{BTO} se odlišuje od obou výše uvedených skupin. Byla zkoumána interakce NKR-P1B^{SD} a NKR-P1B^{WAG} jednak s Clrb, jednak s RCTL. Zatímco NKR-P1B^{WAG} rozpoznával jak Clrb, tak RCTL, NKR-P1B^{SD} specificky vázal pouze Clrb. Tento fakt výrazně nasvědčuje hypotéze, že alelická divergence hlodavčích NKR-P1 receptorů může být důsledkem evoluce genomu hostitele pod selekčním

tlakem ve snaze vyhnout se diskutované virové strategii a zároveň zachovat rozeznávání Clrb pro toleranci organismu vlastních buněk. Existence lektinům podobných genů v některých jiných virech zároveň naznačuje, že by se mohlo jednat o obecněji rozšířenou strategii k obcházení nespecifické imunity [35, 44].

1.2 REKOMBINANTNÍ EXPRESE PROTEINŮ

Zásadní otázkou pro odvětví jako jsou biomedicína, farmaceutický průmysl, imunologie a proteomika je získání dostatečného množství proteinů ve formě vhodné pro daný účel. Pro většinu účelů je získávání proteinů z původního zdroje naprosto nedostačující. Je proto jasné, že produkci rekombinantních proteinů a jejímu zlepšování je stále věnováno mnoho úsilí (a to hlavně s přihlédnutím k ekonomickým aspektům produkce proteinů pro farmaceutický průmysl, kde roční obrat za biofarmaka činí více než 50 miliard dolarů) [45].

Pro rekombinantní expresi proteinů, tedy postup, při kterém je pomocí vektoru virového či bakteriálního původu vnesen do produkčního organismu gen cílového proteinu, je nejprve třeba odpovědět si na otázku, k jakému účelu je protein vyžadován a jaké má mít vlastnosti. Prokaryotické organismy mají velmi odlišný proteosyntetický aparát oproti eukaryotům, což může často vyústit v produkci nerozpustných proteinů ve formě inkluzních tělísek. Ta je v některých případech možné s vysokým výtěžkem renaturovat a získat tak značné množství rozpustného proteinu při zachování poměrně malých nákladů. Prokaryoty nejčastěji používanými pro rekombinantní expresi proteinů jsou bakterie *Escherichia coli* a *Lactococcus lactis* [46].

Eukaryotické expresní systémy jsou výrazně rozmanitější a díky propracovanějšímu proteosyntetickému aparátu a posttranslačním modifikacím mnohdy překonávají obtíže se špatným sbalováním proteinů, případně jsou využívány tam, kde jsou konkrétní posttranslační modifikace žádoucí. Velmi rozšířenými organismy pro eukaryotickou rekombinantní expresi jsou kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*. Jejich hlavní výhodou je nenáročná kultivace a poměrně vysoké výtěžky. Kvasinkový proteosyntetický aparát ovšem poskytuje manosovou hyperglykosylaci proteinů, což je největší nevýhodou tohoto systému. Další velmi rozšířenou buněčnou linií pro rekombinantní expresi jsou hmyzí buňky, předně od *Drosophila melanogaster* odvozená buněčná linie S2. Tyto buňky opět nejsou příliš

náročné na kultivaci a poskytují proteiny s jednoduchou manosovou glykosylací, což z hmyzích linií činí vhodný produkční systém pro strukturní biologii [46, 47]. Dále stojí za zmínku použití *Leishmania tarentolae*, zástupce prvoků ze skupiny *Protozoa*. Systémy využívající tyto buňky poskytují proteiny s glykosylací podobnou glykosylaci savčího typu. Ve farmaceutickém průmyslu se ve velkém používají expresní systémy, založené na savcích buněčných liniích. Jde především o linii CHO, odvozenou od primárních buněk vaječníku křeččíka čínského [48], linii NS0 [49] odvozenou od myšího myelomu a v neposlední řadě i o linii HEK293 odvozenou od lidských embryonálních ledvinných buněk [50]. Obecně tedy není možné říci, že některý z rekombinantních systémů je nejlepší, nýbrž jak vhodný je pro konkrétní aplikaci. Je ovšem možné konkrétní expresní systémy optimalizovat a hledat další přístupy ke zvýšení výtěžků a ke snížení časové, finanční a materiální náročnosti rekombinantní produkce proteinů.

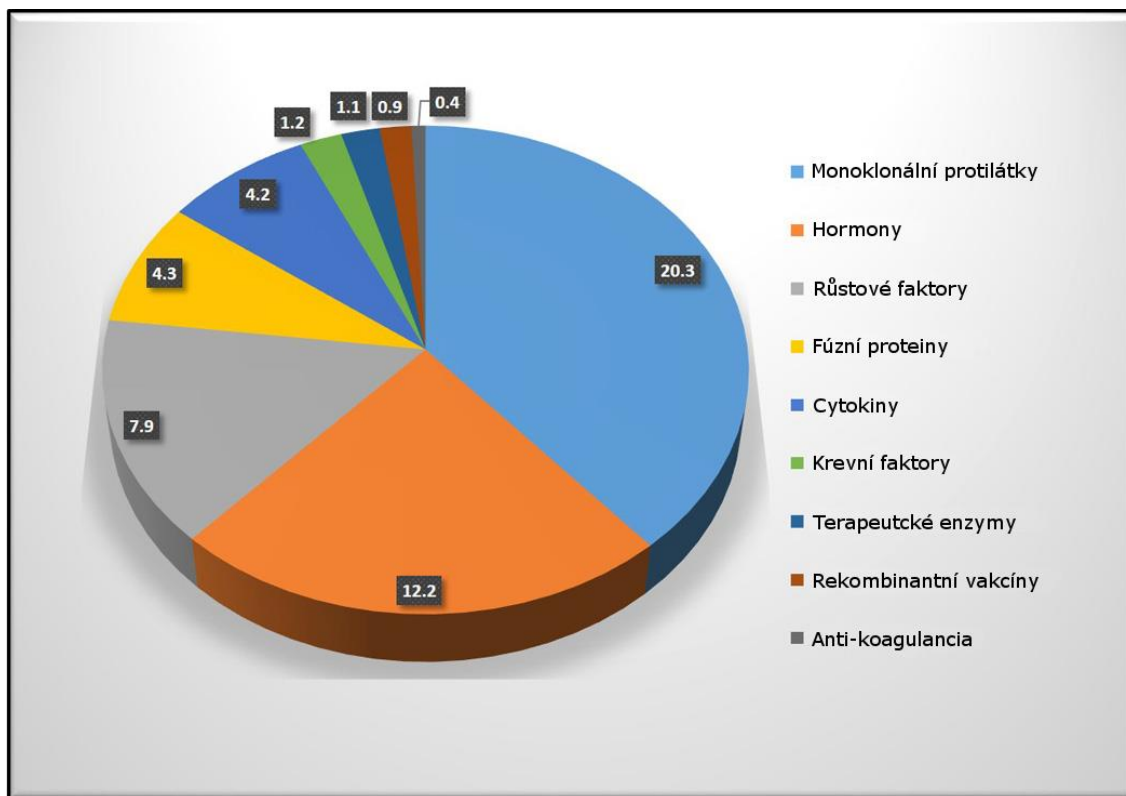
1.2.1 SAVČÍ EXPRESNÍ SYSTÉMY

Savčí buněčné linie jsou odvozeny od primárních buněk příslušného organismu. Tyto buňky se ovšem nemohou dělit neomezeně dlouho, proto jsou tzv. immortalizovány a to buď náhodnými mutacemi, transformací virovou DNA, nebo fúzí s již immortalizovanou nádorovou buňkou [51].

Jak již bylo uvedeno výše, tržby z biofarmak činí ročně kolem 50 miliard dolarů. V přehledu nejprodávanějších biofarmak s náskokem vedou monoklonální protilátky (Obr. 3, str. 21). Tyto proteiny jsou obvykle produkovány právě v liniích CHO a NS0, o významu savcích expresních systémů proto není pochyb [52].

Důvody pro rozšíření linie CHO proti jiným savčím systémům jsou v možnosti kultivace v bezsérových médiích při vysokých hustotách suspenzních kultur, ze kterých je možno získat výtěžky mezi 2 a 6 g/l média. V roce 1989 bylo na této linii testováno 44 lidských patogenů – většina z nich se v CHO nereplikuje (včetně virů HIV, chřipky, herpes virů a spalniček). To dělá z CHO poměrně robustní expresní systém s nižším rizikem kontaminace [53]. Diskutovaným problémem ohledně CHO je glykosylace. Ukázalo se, že různé varianty glykosylačních motivů ovlivňují stabilitu a funkci produkováných proteinů, a také, že nepřírozené glykoformy mohou být imunogenní. U CHO buněk se jedná hlavně o terminální galaktosa- α -1,3-galaktosový epitop, u kterého se prokázala imunogenita u člověka [54]. Tento problém je možno překonat expresí

v lidských buněčných liniích, kde na významu stále více nabývá linie HEK293 a od ní odvozené varianty.



Obr. 3: Diagram prodeje devíti nejprodávanějších biofarmak. Srovnání tržeb z devíti nejprodávanějších biofarmak, čísla jsou uvedena v miliardách dolarů. Zhruba jednu třetinu tvoří monoklonální protilátky (mAb), následované hormony a růstovými faktory. Společně tak první tři skupiny tvoří více než tři čtvrtiny celkového prodeje. Převzato a upraveno [52].

1.2.2 EXPRESE PROTEINŮ V LINII HEK293

První lidská buněčná linie byla vyvinuta téměř 20 let po CHO linii a to v roce 1970 Frankem Grahamem (v laboratoři Alexandra Van der Eba v Leidenu; Holandsko). Byla odvozena od primárních lidských ledvinných buněk z potrácených embryí. Imortalizace byla provedena transformací adenovirovou DNA Ad5 sérotypu. Samotná transformace byla provedena postupem vyvinutým Van der Ebem, tedy užitím chloridu vápenatého. Číslo 293 označuje číslo pokusu, ze kterého tato linie vzešla [55].

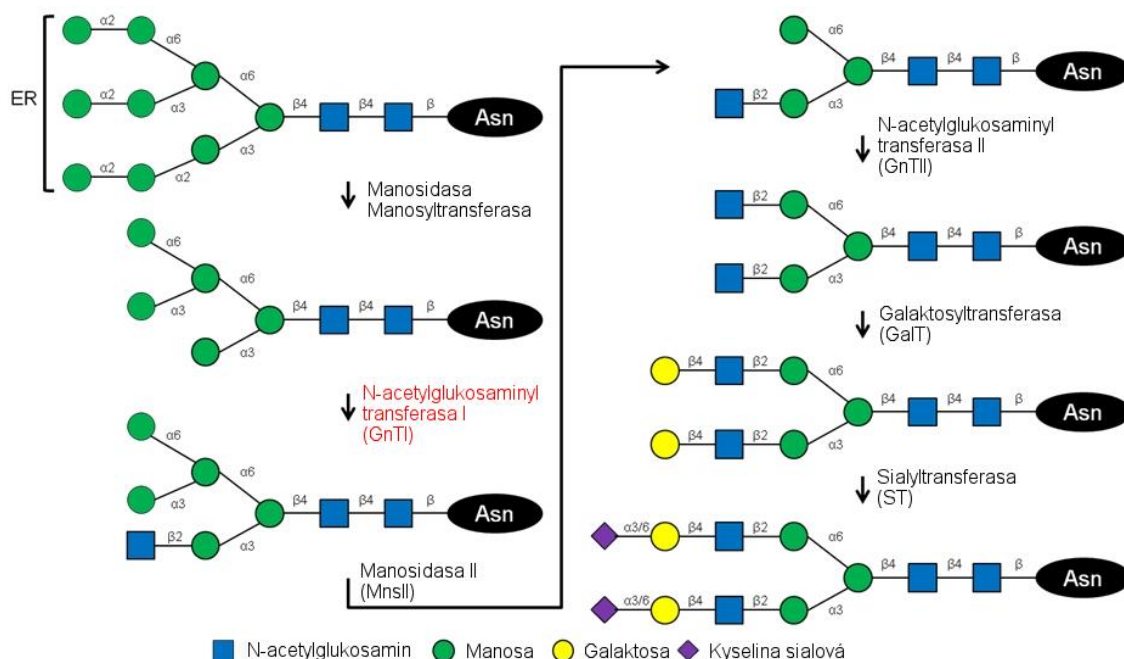
Od chvíle, kdy vznikla, si linie HEK293 drží prvenství v použití pro rekombinantní expresi proteinů mezi lidskými liniemi. Byla vyvinuta řada variant odvozených od původní linie. Zde zmíním nejpoužívanější z nich:

- HEK293N3S byla vyvinuta pro suspenzní růst ve velkoobjemových bioreaktorech [56].
- HEK293S byla adaptována pro růst v bezsérových podmínkách [57].
- HEK293T je kultura stabilně transfekovaná genem pro velký antigen polyomaviru SV40 TAg. Tato kultura je vhodná pro transientní produkce, neboť díky zmíněnému genu umožňuje episomální replikaci plazmidů s replikačním počátkem SV40 [58].
- HEK293E je linie stabilně transfekovaná genem EBNA1t, tedy genem pro nukleární antigen 1 viru Epstein-Barrové. Ten umožňuje episomální replikaci plazmidů s replikačním počátkem oriP. Zároveň i tato kultura je upravena pro bezsérovou kultivaci [59].
- HEK293S GnTI je upravena tak, že postrádá aktivitu N-acetylglukosaminyltransferasy I (GnTI). To zajišťuje homogenní manosovou N-glykosylaci typu GlcNAc₂Man₅ (Obr. 4, str. 23) [60].

Obecnou výhodou HEK293 buněčných linií je jejich snadná transfekovatelnost, kdy lze snadno dosáhnout nadpoloviční a v některých případech až takřka 100% úspěšnosti transfekce. Rekombinantní příprava proteinů v těchto liniích s sebou ovšem nese problém v podobě neuniformní glykosylace savčího typu. Navázané oligosacharidy se liší v počtu zbytků kyseliny sialové a fukosy, na některých glykosylačních místech mohou oligosacharidy zcela chybět. Nehomogenní glykosylace bývá problémem hlavně při proteinové krystalizaci, neboť připravený protein tak není chemicky čistou látkou. Potíže s nehomogenní glykosylací je možno řešit více přístupy. Je známo několik endoglykosidas, které je možno použít k deglykosylaci (např. endoglykosidasa H, či protein-N-glykanasa F). Přestože tyto enzymy deglykosylují poměrně spolehlivě, nevýhodou v jejich použití je nutnost zavedení dalšího purifikačního kroku pro jejich odstranění ze vzorku. Jiný přístup tkví v použití kifunensinu, inhibitoru α -manosidasy, při expresi proteinu. Kifunensin zabrání odštěpení manosové struktury a tím i následné syntéze komplexních oligosacharidů. Nevýhodou použití kifunensinu je jeho vysoká cena [61].

Celkem elegantním řešením je zásah přímo do buněčné glykosylační kaskády, kdy je vyřazen enzym N-acetylglukosaminyltransferasa I, jako je tomu u linie HEK293S GnTI (Obr. 4, str. 23). Takovéto linie poté poskytují uniformní glykosylaci typu

GlcNAc₂Man₅, která je jednodušší, než při použití kifunensinu. Nevýhodou této linie mohou být nižší výtěžky způsobené nepřírozenou glykosylací.



Obr. 4: Glykosylační kaskáda v linii HEK293S. Glykosylační kaskáda u linie HEK293S GnTI je přerušena inaktivací na místě N-acetylglucosaminyltransferasy I (GnTI, červeně). To zajišťuje homogenní manosovou N-glykosylaci typu GlcNAc₂Man₅. Převzato a upraveno [62].

1.2.3 MOŽNOSTI TRANSIENTNÍ A STABILNÍ TRANSFEKCE LIDSKÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ

Transientní transfekce, následovaná selekcí na antibiotika, představovala tradiční metodu pro začlenění DNA do genomu a vytvoření stabilně produkujících buněčných linií. Byl-li pokus vůbec úspěšný, představoval časově náročnou práci v trvání 4 až 6 měsíců. Ani tak ale často nebyly výtěžky z těchto linií vysoké, neboť cílová DNA byla do genomu vložena náhodně [52].

Jednou strategií, jak urychlit proteinovou produkci a zároveň získat rozumná množství proteinu, je vyhnout se selekčnímu kroku provedením pouze tranzientní transfekce (bez selekce na antibiotika) vhodným expresním plazmidem. Používání suspenzních buněčných linií a relativně levných transfekčních činidel (chlorid vápenatý či lineární polyethylenimin, IPEI), činí z tohoto postupu metodu volby pro rekombinantní expresi snadno produkovatelných proteinů a to v objemech od mililitrů až po stolitrové reakční tanky. Hlavní nevýhodou této metody je vysoká spotřeba

plazmidové DNA. Na druhou stranu, získání dostatečného množství plazmidové DNA ze suspenzí transformovaných *E. coli* není v současnosti problém. U produkci pro farmaceutický průmysl je však nutné, aby používaná DNA byla zcela čistá, bez endotoxinů a jiných kontaminantů. Další nevýhodou je podstata tranzientní produkce, tedy fakt, že pouze část buněčné suspenze je transfekována a že celá produkce je přechodná. Na rozdíl od stabilně transfekovaných linií je tedy pro výrobu další šarže proteinu potřeba celý postup zopakovat. Proto je při tranzientní transfekci vhodné využít některý z přístupů pro zvýšení produkční účinnosti, neboť samotná produkce je záležitostí pouze jednoho týdne až čtrnácti dnů [63]. Jedním přístupem je použití anti-apoptotických proteinů, například z bcl-2 rodiny, které vede k vyšší viabilitě kultury a tím k lepším výtěžkům. Další přístup je v regulaci buněčného cyklu, který může být ovlivněn jak chemicky (např. vinblastinem, kolchicinem, či hydroxymočovinou), nebo geneticky. Rovněž kultivace s inhibitory methyltransferas a histondeacetylas (např. kyselina valproová a butyrát sodný) se výrazně osvědčila ve smyslu zvýšení výtěžků. Tento výčet je jen přehled nejobvyklejších postupů, existuje i řada dalších; pro optimální produkci cílového proteinu je možno tyto postupy v různé míře kombinovat. Ani to ale vždy nezaručí dostatečné množství cílového proteinu. Pro tyto případy a pro případ potřeby dlouhodobé produkce je možné použít některou z metod tvorby stabilních linií [52].

Ze snahy učinit ze stabilní transfekce ne zcela náhodný proces vzešlo hned několik přístupů, díky kterým lze dosáhnout stabilně a vysoce produkujících linií za poměrně krátký čas. Přístup založený na rekombinacích využívá vysoce produkujícího klonu z linie, která již byla stabilně transfekována reportérovým genem. Tento gen je ohraničen sekvencí, kterou rekombinasa rozeznává a dokáže jej vyměnit za cílový gen, který je poté na tomto místě v genomu rovněž silně transkribován [64]. Jiným přístupem je používání upravených virů, které vloží cílovou DNA do genomu hostitelského organismu. Tyto viry byly upraveny tak, aby se v hostitelském organismu nereplikovaly. I tak ale představují jisté bezpečnostní riziko, což spolu s omezenou kapacitou pro přenášenou DNA (cca 10 kb) činí jejich hlavní nevýhodu. Pro zvýšení produkce je také možno použít některé sekvence DNA, které, jsou-li uloženy vedle cílového genu, upravují účinnost jeho transkripce (např. element UCOE, z *angl. Ubiquitous Chromatin Opening Element*) [65].

Zajímavým a poměrně rychlým nástrojem pro tvorbu stabilních linií je systém piggyBac, který využívá enzymu transpozasy pro dopravení cílových genů do genomu produkčního organismu.

1.3 EXPRESNÍ SYSTÉM PIGGYBAC

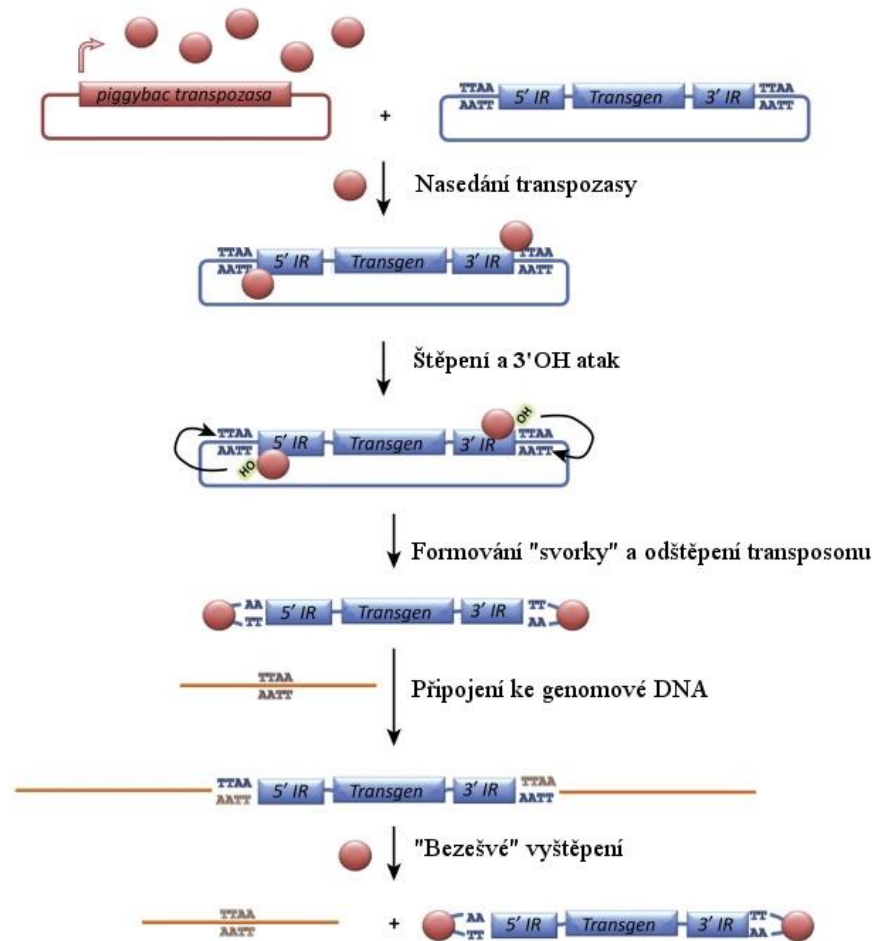
Transpozon je semiparazitický DNA element, který používá „cut-and-paste“ (vystříhnout a vložit) mechanismus, kdy za pomoci enzymu transpozasy je konkrétní sekvencí ohraničený úsek DNA vystříhnut z jeho momentální lokace a vložen do lokace jiné (Obr. 5, str. 26). Transpozon tak může být použit pro přenos DNA do genomu cílové buňky či tkáně (za použití plazmidu či virové DNA jako přenašeče transpozonu do hostitelské buňky či tkáně) [66].

Transpozonu aktivně využívá systém piggyBac, jež se ukázal být velice efektivním systémem nejen na poli stabilní rekombinantní exprese, ale i v medicínských aplikacích, kde může být použit jako přenašeč genových terapeutik, například při léčbě muskulární dystrofie [67], či pro modifikace lymfocytů *in vitro* a *in vivo* za účelem protinádorové terapie [68].

Transpozonový systém piggyBac se v přírodě v podstatě vyskytuje přirozeně a byl prvně objeven na hmyzích buňkách *Trichoplusia ni* z rodu *Lepidoptera* při propagaci bakuloviru, do kterého, jak bylo následně zjištěno, byl vložen nový DNA element. Bakulovirus s sebou nesl tento element (anglické „piggyback“ znamená nést na zádech; také ve významu svést se s něčím); anglické „back“ bylo zkráceno na „Bac“, jako připomínku nalezení na bakuloviru a odtud tedy název piggyBac.

Pro většinu aplikací jsou transpozon a gen pro produkci transpozasy odděleny mezi dva různé plazmidy, kterými je produkční linie kotransfekována. Kultura je poté selektována na dvě různá antibiotika. Když je piggyBac transpozasa transientně exprimována, váže se na palindromickou sekvenci TTAA, kde přeruší sekvenci a odhalí 3'hydroxylovou skupinu na obou koncích genu. To vyústí v hydrofilní atak přilehlé TTAA sekvence a je zformována tzv. svorková formace. Takto je transpozon uvolněn z plazmidu. Transpozasa poté vyhledá další TTAA sekvenci v genomu hostitelského organismu a transpozon vloží doprostřed této sekvence. Takto je transpozon přenesen do genomu, kde je opět z obou stran obklopen sekvencí TTAA (je tedy možno ho za použití transpozasy znovu vystříhnout). Výhodou tohoto systému

oproti virovým vektorům je větší kapacita v rámci velikosti přenášeného genu a také nižší biologické riziko při jeho používání. Geny přenesené tímto systémem také netrpí tolik umlčováním exprese, jako je tomu u virových vektorů [66].



Obr. 5: Mechanismus systému piggyBac. piggyBac transpozasa se váže na palindromatickou sekvenci TTAA, kde přeruší sekvenci a odhalí 3'hydroxylovou skupinu na obou koncích genu. To vyústí v hydrofilní atak přílehlé TTAA sekvence a je zformována tzv. svorková formace. Takto je transpozon uvolněn z plazmidu. Transpozasa poté vyhledá další TTAA sekvenci v genomu hostitelského organismu a transpozon vloží doprostřed této sekvence. Takto je transpozon přenesen do genomu, kde je opět z obou stran obklopen sekvencí TTAA (je tedy možno ho za použití transpozasy znovu vystříhnout). Převzato a upraveno [66].

V této diplomové práci byl použit systém piggyBac, jež je upraven tak, že transpozon v sobě mimo expresní kazety nese také gen pro reversní tetracyklinový transaktivátor (rtTA), který je produkován konstitutivně. Po přidání doxycyklinu se

rtTA váže na element odpovídající na tetracyklin (TRE, z *angl. tetracycline response element*) v promotoru a indukuje expresi cílového genu [70]. Námí použitý systém je tedy indukovatelný doxycyklinem a produkci rekombinantního proteinu lze spustit, až když je na ni produkční kultura připravena.

2 CÍLE PRÁCE

- Zavedení a optimalizace expresního systému piggyBac jako nástroje pro tvorbu indukovatelných stabilně transfekovaných linií HEK293S GnTI.
- Produkce potkaního NK buněčného receptoru Clrb ve stabilně transfekované linii HEK293S GnTI.
- Produkce potkaního NK buněčného receptoru NKR-P1B ve transiентně transfekované linii HEK293S GnTI.
- Krystalizace komplexu potkaního NK buněčného ligand-receptorového páru Clrb-NKR-P1B.

3 MATERIÁL

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

0,1µm centrifugační filtry Ultrafree-MC	Millipore, USA
Autokláv Varioklav 400 E	HP Labortechnik GmbH, Německo
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
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Fotoaparát Cyber-shot DSC W570	SONY, Japonsko
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid, 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 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona HiTrap MabSelect Sure 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona HiTrap Talon Crude 5 ml	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 Kit	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
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler Techgene	Techne, UK
Termocycler Rotor-Gene 2000	Corbett Life Science, USA
Třepačka Orbi-Safe TS	Gallenkamp, UK
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, Švýcarsko
Vaň	ETA, ČR
Vodní lázeň	Memmert, Německo
Vodní lázeň TW2	Julabo, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
UV prosvěcovací lampa (300 nm)	Ultra-Lum, USA
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	UVItec, UK
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí EC 250-90 EC	Apparatus Corporation, UK
ZymoPure Mix & Go <i>E. coli</i> Transformation Kit	Zymo Research, USA

3.2 ENZYMY

Infusion	Takara Bio, USA
Q5 DNA polymerasa	New England Biolabs, USA
NheI HF	New England Biolabs, USA
PmeI HF	New England Biolabs, USA
RNAsa A	Lach-Ner, ČR

3.3 PUFRY PRO ENZYMY

CutSmart buffer	New England Biolabs, USA
Infusion buffer	Takara Bio, USA
Q5 reaction buffer	New England Biolabs, USA

3.4 BUNĚČNÉ A BAKTERIÁLNÍ KMENY

<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen, USA
<i>E. coli</i> Stbl3	Thermo Fisher, USA
HEK293S GnTI	ATCC, USA

3.5 VEKTORY

PB-T-PAF	Prof. James M. Rini, Ph.D., University of Toronto
PB-RN	Prof. James M. Rini, Ph.D., University of Toronto
PBase	Sanger Institute, UK
pCT5_C2	Bc. Ondřej Skořepa, PřF UK, Praha
pCT5_H4	Bc. Ondřej Skořepa, PřF UK, Praha
pTW5sec_C2	Bc. Tereza Prokopová, PřF UK, Praha
pTW5_aFGF	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK, Praha
pTW5sec_H4	Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha
pTW5_p27	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK, Praha
pYD5_S1	Mgr. Anna Dvorská, PřF UK, Praha

3.6 OLIGONUKLEOTIDY PRO PCR

pCT5_C2_inf_FW	5'- AGTTTGTACAGCTAGATGGGAGAACTGCTGC -3'
pCT5_C2_inf_REV	5'- CTGATCAGCGGGTTTTACCCGTGGTGGTG -3'
pCT5_H4_inf_FW	5'- AGTTTGTACAGCTAGATGGGAGAACTGCTGC -3'
pCT5_H4_inf_REV	5'- CTGATCAGCGGGTTTTACCCGTGGTGGTG -3'
pCT5_seq_FW	5'- TCAGATCGCCTGGAGACG -3'
pCT5_seq_REV	5'- GTGGGAGTGGCACCTTCC -3'

3.7 KULTIVAČNÍ MÉDIA

LB médium	1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH = 7,4
ExCell 293	Komerční médium (Sigma, USA), před použitím doplněno o L-glutamin (do 4mM koncentrace)
Freestyle F17	Komerční médium (Gibco Invitrogen, USA), před použitím doplněno o L-glutamin (do 4mM koncentrace) a Pluronic F-68 (do koncentrace 0,1% w/v)
Ex/F17	Směs komerčních médií ExCell 293 a Freestyle F17 (doplněných příslušnými suplementy) v poměru 1:1 (v/v)

3.8 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 Na ₂ HPO ₄ , 300mM NaCl, 10mM NaN ₃ , 250mM imidazol, pH = 7,0
LBamp:	LB médium s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml
MES:	20mM MES, 100 mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH = 5,0
Mobilní fáze pro gelovou chromatografii:	10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH = 7,5
Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:	35% ethanol, 10% kyselina octová
PBS:	50mM Na ₂ HPO ₄ , 300mM NaCl, 10mM NaN ₃ , pH = 7,0
PBS-TK:	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH ₂ PO ₄ , pH = 7,0

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

Roztoky pro izolaci zásobního množství plazmidu:

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' methylenbisakrylamid

Roztok IPEI: 10 mg/ml IPEI v PBS-TK

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

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

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

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

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. redukující: k 900 µl 5× koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru bylo přidáno 100 µl 2-merkptoethanolu

3.9 CHEMIKÁLIE

1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkptoethanol	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
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, Česká republika
DMSO	New England Biolabs, USA

Doxycyklin	Serva, USA
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, ČR
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
Ethanol pro UV spektroskopii	Lach-Ner, ČR
Geneticin G418	Thermo Scientific, USA
Good View II	Ecoli, Slovensko
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, SR
Kyselina valproová	Sigma, USA
L-glutamin	Sigma, USA
IPEI 25 kDa	Polysciences, USA
N,N'-Methylenbisakrylamid	Serva, USA
PCR H ₂ O	Top-Bio, ČR
Pluronic F-68	Sigma, USA
Puromycin	Serva, USA
Q5 enhancer	New England Biolabs, USA
RNAsa A	Lach-Ner, ČR
SDS	Jersey Lab Supply, USA
TEMED	Serva, USA
Trypanová modř	Sigma, USA

4 METODY

4.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ

4.1.1 TRANSFORMACE A VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE

Buněčná suspenze kompetentních bakterií *E. coli* DH5 α , případně Stbl3 (připravených pomocí soupravy ZymoPure Mix & Go *E. coli* Transformation Kit a umožňujících rychlou transformaci bez nutnosti použití tepelného šoku) o objemu 50 μ l, byla na ledu smíchána s 20 až 100 ng požadovaného plazmidu a inkubována 20 minut. Následně byla buněčná suspenze natřena na Petriho misky s ampicilinem (ampicilin do koncentrace 100 μ g/ml byl přidán do zchladlého LB média předem povařeného s 1,5% (w/v) agarem). Misky byly inkubovány při 37 °C přes noc.

Poté byly kolonie resuspendovány ve 2 ml LB média a vzniklá suspenze pipetována do sterilní 2l Erlenmayerovy baňky s 0,5 l LB média s ampicilinem (o koncentraci 100 μ g/ml). Suspenze byla za třepání 220 ot./min inkubována při 37 °C přes noc.

Následně byla kultura centrifugována 30 minut při 3900 \times g, 20 °C. Buněčný pelet byl resuspendován ve 20 ml TES pufru. Suspenze poté byla opět centrifugována v 50ml zkumavce za stejných podmínek. Vzniklý pelet byl buď použit pro extrakci plazmidové DNA, nebo zmražen na -20 °C a pro účel extrakce DNA použit později.

4.1.2 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLAZMIDU

Izolace plazmidové DNA byla provedena za použití komerční soupravy Nucleobond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Německo). Pelet (viz kapitola 4.1.1) byl resuspendován v 18 ml RES pufru s přídáním RNAsou (0,1 mg/ml) Směs byla poté rozdělena do dvou 30ml kyvet Oak Ridge. Bakterie v suspenzi byly lyzovány přidáním 9 ml pufru LYS do každé kyvety. Lyzát byl neutralizován přidáním 9 ml NEU pufru po pěti minutách přesně. Následujícím krokem byla centrifugace při 20000 \times g, při 20 °C po dobu 10 min. Supernatant byl zfiltrován přes filtrační papír na kolonu (kolonka byla předtím promyta dH₂O, následně 15 ml elučního pufru, opět dH₂O a 2 \times 25 ml pufru EQ1). Poté byla kolona opláchnuta 25 ml Wash roztoku. Plazmidová DNA byla z kolonky eluována 15 ml ELU roztoku. K roztoku DNA bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného (-20 °C) isopropanolu. Poté byl roztok centrifugován, v kyvetách Oak Ridge, 30 min při 16000 \times g a 0 °C. Supernatant byl odstraněn a DNA pelet opláchnut 5 ml předchlazeného (-20 °C) 70% ethanolu. Pelet s ethanolem byl centrifugován 10 min při 16000 \times g a 0 °C. Supernatant byl

opatrně slit a pelet vysušen ve vakuové rotační odparce CentriVap DNA (Labconco, USA). Plazmidová DNA byla rozpuštěna v 1 ml sterilní dH₂O a pipetována do čisté mikrozkušavky.

4.1.3 NÍZKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDOVÉ DNA

Nízkoobjemovou přípravu plazmidové DNA byla prováděna pro identifikaci pozitivních kolonií (viz kapitola 4.2.2). Bakterie z kolonie byly sterilní pipetovací špičkou přeneseny do 5 ml LB média s ampicilem (o koncentraci 100 µg/ml) a inkubovány přes noc při 37 °C a 220 ot./min. Plazmidová DNA byla z kultury extrahována pomocí komerční soupravy Geneaid High-Speed Plasmid Mini Kit dle návodu od výrobce. Kultura byla centrifugována při 16000 × g, bakteriální pelet byl resuspendován ve 200 µl roztoku PD 1. Následně bylo přidáno 200 µl roztoku PD 2 a směs byla mírně promíchána. Po 2 min bylo přidáno 300 µl roztoku PD 3, směs byla promíchána a centrifugována opět při 16000 × g po 3 min. Supernatant byl nanesen na kolonku a centrifugován 30 s při 16000 × g. Kolonka byla následně promyta 400 µl roztoku W1 a centrifugována 30 s při 16000 × g. Poté byla promyta 600 µl roztoku Wash (s přidaným ethanolem) a centrifugována za týchž podmínek. Dále byla kolonka vysušena centrifugací při 16000 × g po dobu 3 min. DNA byla následně eluována 50 µl sterilní dH₂O předehřáté na 70 °C.

4.1.4 MĚŘENÍ ČISTOTY A KONCENTRACE PLAZMIDOVÉ DNA

Měření koncentrace a čistoty plazmidové DNA bylo na spektrofotometru (UV/VIS UV4-500, UNICAM, UK) provedeno následovně. Vzorek DNA byl naředěn 300 × v dH₂O a jeho absorbance byla změřena při 280 a 260 nm za použití dH₂O jako slepého vzorku. Na čistotu vzorku bylo usuzováno z poměru hodnot A_{260}/A_{280} . Roztok čisté DNA má tento poměr roven 1,8. Odchylky od této hodnoty jsou způsobeny kontaminanty, např. bílkovinami, či RNA. Koncentrace vzorku byla spočtena z empirického vztahu pro závislost absorbance DNA při 260 nm, která je v roztoku dvoušroubovice DNA o koncentraci 50 µg/ml rovna 1.

Druhý způsob měření koncentrace a čistoty spočíval v použití spektrofotometru DS-11⁺ (DeNovix, USA). Referenčním vzorkem byla sterilní dH₂O. Koncentrace a čistota vzorku byly odečteny z displeje přístroje, přepočet z absorbance na koncentraci však byl proveden dle stejného empirického vztahu.

4.1.5 AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA

Za účelem kontroly kvality a čistoty izolované DNA, popřípadě pro její přečištění po štěpných reakcích či PCR, byla provedena elektroforéza v 1% agarosovém gelu. Ten byl připraven povařením 0,65 g agarosy v 65 ml TAE pufru. Po zchladnutí byly přidány 3 μ l barviva Good View II a směs byla nalita do aparatury pro elektroforézu. Po ztuhnutí gelu byl do jamek nanášen vzorek (maximálně 20 μ l) smíchaný s 10 \times koncentrovaným vzorkovým pufrům pro DNA elektroforézu. Do jedné jamky bylo nanášeno 5 μ l standardu. Elektroforéza probíhala při stejnosměrném napětí 200 V podobu 15-20 minut. DNA byla vizualizována na UV prosvěcovačce či na prosvěcovačce s modrým světlem (pro účely izolace DNA).

4.1.6 EXTRAKCE DNA Z AGAROSOVÉHO GELU

Extrakce z agarosového gelu byla prováděna komerční soupravou Geneaid Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit podle návodu od výrobce. Do mikrozkušavky s vyříznutým vzorkem v agarosovém gelu bylo pipetováno 500 μ l roztoku DF. Směs byla rozpouštěna přibližně 10 minut při 60 °C za občasného promíchání. Vzorek byl poté pipetován do extrakční kolonky umístěné ve sběrné mikrozkušavce a centrifugován 30 s při 16000 \times g. Kolonka byla promyta 400 μ l roztoku W1 a centrifugována opět 30 s při 16000 \times g. Poté byla promyta 600 μ l roztoku Wash (s přidaným ethanolem) a centrifugována za týchž podmínek. Dále byla kolonka vysušena centrifugací při 16000 \times g po dobu 3 min. DNA byla eluována 50 μ l sterilní dH₂O předeřáté na 70 °C.

4.1.7 SEKVENOVÁNÍ DNA

Vzorky DNA byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA na pracovišti Core facility - Genomika, Biocev, Průmyslová 595, Vestec, 252 42. Sekvenace byla prováděna na jednom ze tří přístrojů, které má laboratoř k dispozici (čtyřkapilární 3130 Genetic Analyzer, šestnáctikapilární 3130xl Genetic Analyzer a dvacetičtyřkapilární 3500 Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems). Vzorky pro sekvenování byly připravovány do 0,2ml PCR mikrozkušavek smícháním 10 ng plazmidové DNA na každých 100 bp sekvenované oblasti společně s 1 μ l 5 μ M roztoku sekvenačních oligonukleotidů do celkového objemu 8 μ l.

4.1.8 ŠTĚPENÍ RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEASAMI

Plazmid PB-T-PAF byl štěpen restrikčními endonukleasami NheI HF a PmeI HF. Potřebné množství plazmidu (obvykle 0,5 µg) bylo smícháno v objemu 50 µl s 5 µl reakčního pufru CutSmart, 1 µl každého z restrikčních enzymů (o zásobní koncentraci 10 U/µl) a sterilní dH₂O do 50 µl. Směs byla inkubována 1 hod při 37 °C v termobloku. Reakční směs byla poté nanášena na agarosový gel pro elektroforézu.

4.1.9 KLONOVÁNÍ POMOCÍ ENZYMU INFUSION

Infusion reakce byla prováděna smícháním 100 ng štěpeného vektoru pCT5 a 20 ng PCR produktu (pCT5_C2_Inf nebo pCT5_H4_Inf pro Infusion reakci, které byly předtím izolovány z agarosového gelu) společně se 4 µl reakčního pufru pro Infusion (5× koncentrovaný). Reakční směs byla doplněna sterilní dH₂O do 20 µl. Nakonec bylo přidáno 0,2 µl enzymu Infusion a směs byla inkubována 40 min při 37 °C. Reakční směsi byly následně transformovány bakterie *E. coli* Stbl 3.

4.2 POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Polymerasová řetězová reakce (PCR, z *angl. polymerase chain reaction*) byla prováděna pro amplifikaci insertů pro následnou Infusion reakci, nebo jako kontrola úspěšnosti Infusion reakce z kolonií narostlých po transformaci na agarových miskách.

4.2.1 STANDARDNĚ PROVÁDĚNÁ POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Reakční směs pro polymerasovou řetězovou reakci se standardně skládala z 10 µl reakčního pufru Q5, 10 µl roztoku Q5 Enhancer, 0,2 µl Q5 polymerasy (vždy přidávána poslední), 1 µl dNTPs, 5 µl 5µM roztoku obou příslušných oligonukleotidů a 10 ng templátu (viz tabulka 2).

Reakce byla uskutečněna v termocykleru s teplotním programem nastaveným následovně: 95 °C, 5 min; 30× (95 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 72 °C 10 min. Produkty byly následně přečištěny izolací z agarosového gelu po elektroforéze.

Tabulka 2: Přehled templátů a oligonukleotidů používaných pro PCR.

	Templát	Produkt	Oligonukleotidy
Pro vložení insertu H4 do plazmidu pCT5	pTW5_H4	pCT5_H4_Inf	pCT5_H4_Inf_FW pCT5_H4_Inf_REV
Pro vložení insertu C2 do plazmidu pCT5	pTW5_C2	pCT5_H2_Inf	pCT5_C2_Inf_FW pCT5_C2_Inf_REV

4.2.2 POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE Z KOLONIÍ

Pro ověření úspěšnosti klonování bylo z Petriho misky vybráno až dvanáct kolonií. Ty byly pomocí špičky automatické pipety přeneseny do 20 μ l reakční směsi složené z 10 μ l roztoku Combi PPP Master Mix, 2 μ l přímého a zpětného oligonukleotidu a 6 μ l sterilní dH₂O. Stejnou špičkou bylo následně zaočkováno 5 ml LBamp média a kultura byla inkubována v 50ml plastové zkumavce s prodyšným víčkem při 37 °C a 220 ot./min přes noc. Kultura byla takto připravena pro nízkoobjemovou přípravu plazmidové DNA. PCR reakční směs byla umístěna do termocykleru při teplotním programu: 95 °C, 5 min; 20 \times (95 °C, 30 s; 54 °C, 30 s; 72 °C, 1 min); 72 °C 10 min. Vzorky PCR z kolonií byly posléze vyhodnoceny agarosovou elektroforézou.

4.3 MANIPULACE S LINIÍ HEK293S GnTI⁻

Manipulace s buněčnými liniemi probíhá v místnosti k tomu určené. Místnost je přes noc sterilizována UV zářením a je klimatizována na 21 °C. Veškerý plastik a laboratorní nádobí používané k manipulacím s buněčnými liniemi je sterilní. Manipulace s těmito liniemi probíhají ve sterilních laminárních boxech. Veškerá média byla před použitím temperována na teplotu 37°C.

4.3.1 ROZMRAŽENÍ BUNĚČNÉ LINIE

Alikvotní podíl buněčné suspenze HEK293S GnTI⁻ uchovávaný v -80 °C o objemu 1 ml a buněčné koncentraci 5 \cdot 10⁶ b/ml byl rozmražen ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Celý objem suspenze byl přenesen do 10 ml ExCell 293 média. Suspenze v 50ml sterilní zkumavce byla centrifugována 5 minut při 95 \times g při laboratorní teplotě, supernatant byl slit a buněčný pelet resuspendován v 10 ml média ExCell 293. Takto byly buňky opláchnuty a zbaveny 10% DMSO (který slouží jako kryoprotektant). Buněčná suspenze byla přenesena na 10cm Petriho misku a kultivována při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

4.3.2 SUSPENZNÍ KULTIVACE

Linie HEK293S GnTI⁻ byly kultivovány v inkubátoru MC0-18 AIC (Sanyo, Japonsko) při 37 °C a za přítomnosti 5 % CO₂ v kultivační atmosféře. Suspenze kultivované ve čtverhranných lahvích byly navíc třepány při 135 ot./min.

Buňky byly po rozmrazení kultivovány na Petriho misce v médiu ExCell 293. Po třech dnech byla kultura zkontrolována pod mikroskopem kvůli zjištění případné kontaminace. Byla-li kultura v pořádku, byla resuspendována a přenesena do 100ml čtverhranné lahve s prodyšným víčkem ve 30 ml směsi médií ExCell 293 a Freestyle F17 v poměru 1:1 (Ex/F17).

Subkultivace byla prováděna po 3 – 4 dnech. Nejprve byla hemocytometrem určena buněčná koncentrace a zároveň zkontrolována případná kontaminace. Část původní suspenze byla poté zředěna médiem Ex/F17 na požadovanou koncentraci (obvykle $0,2 - 0,3 \cdot 10^6$ b/ml). Byl-li objem původní suspenze určené k naředění větší než 10 % výsledného objemu, byla tato suspenze nejprve centrifugována 5 minut při $95 \times g$ a $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant byl slit a pelet resuspendován v požadovaném objemu média Ex/F17. Objem buněčné suspenze ve čtverhranné lahvi při kultivaci a produkci nikdy nepřesahoval 30 – 40 % objemu lahve, aby bylo zajištěno dostatečné provzdušnění.

4.3.3 URČENÍ BUNĚČNÉ KONCENTRACE

Pro určení buněčné koncentrace bylo pipetováno 20 μl buněčné suspenze do mikrozkušavky. Tento objem byl 2 \times až 9 \times naředěn barvicím roztokem 0,4% trypanové modři v PBS-TK pufru. Obarvená suspenze byla pipetována do hemocytometru. Pod mikroskopem bylo v hemocytometru spočteno množství živých buněk. Celkové množství buněk spočtené v hemocytometru bylo vynásobeno ředícím faktorem a objemovým faktorem $1 \cdot 10^4$. Takto byla získána hodnota buněčné koncentrace v milionech buněk na 1 ml suspenze. Podíl živých buněk na celkové množství buněk (živé a mrtvé) byl vynásoben stem; takto byla určena viabilita kultury v procentech.

4.3.4 ZAMRAZOVÁNÍ BUNĚČNÝCH LINIÍ

Médium s potřebným množstvím buněk (tak, aby požadovaný počet alikvotních podílů obsahoval 1 ml zmrazovací suspenze o buněčné koncentraci $5 \cdot 10^6$ b/ml) bylo centrifugováno 5 minut při $95 \times g$ a $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Pelet byl resuspendován tak, aby obsahoval 45 % původního média, 45 % čerstvého média Ex/F17 a 10 % DMSO. Tato suspenze byla rozdělena do kryozkušavek po 1 ml. Zkušavky byly v mrazicím kontejneru Mr. Frosty (Nalgene, USA) umístěny do mrazicího boxu a skladovány při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4 PRODUKCE PROTEINŮ

4.4.1 TRANSFEKCE

Transfekce buněčné linie HEK293S GnTI⁻ probíhala v režimu tzv. vysokohustotní transfekce. Buněčná suspenze obsahující potřebné množství buněk byla centrifugována 5 minut při $95 \times g$ a $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Pelet byl resuspendován v médiu ExCell 293 tak, aby koncentrace buněk byla přibližně $23 \cdot 10^6$ b/ml a suspenze přenesena do čtverhranné lahve. Do této suspenze byl přidán roztok DNA v PBS-TK (zfiltrován přes $0,22\mu\text{m}$ filtr), který obsahoval DNA v množství $1 \mu\text{g}$ na jeden milion buněk v suspenzi. Objem transfekční směsi byl zvolen tak, aby výsledná buněčná koncentrace byla $20 \cdot 10^6$ b/ml. Poté byl přidán roztok IPEI tak, aby poměr IPEI ku transfekční DNA byl 1:3. Transfekovaná suspenze byla inkubována 4 hodiny v inkubátoru při podmínkách 135 ot./min, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 5 % CO_2 . Po uplynutí 4 hodin bylo k suspenzi přidáno požadované množství média ExCell 293 a výsledná buněčná koncentrace byla $1 \cdot 10^6$ b/ml (v případě transienční produkce byla koncentrace $2 \cdot 10^6$ b/ml a zároveň byla přidána kyselina valproová do výsledné 2mM koncentrace).

4.4.2 VELKOOBJEMOVÁ TRANSIENTNÍ PRODUKCE

Buněčná suspenze byla dle postupu (4.4.1) transfekována směsí tří plazmidů pYD5_S1 (konstrukt pro fúzní protein NKP-P1B s Fc fragmentem IgG [71]), pTW5p27 a pTW5_aFGF v hmotnostním poměru 88:10:2. Byla přidána kyselina valproová do výsledné 2mM koncentrace, penicilin do výsledné koncentrace 10 U/ml a streptomycin do výsledné koncentrace $1 \mu\text{g/ml}$. Produkce probíhala v objemu 400 ml média ExCell 293 v 11 čtverhranné lahvi za podmínek 135 ot./min, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 5 % CO_2 . Produkční kultura byla sklizena po 4 – 6 dnech, dokud viabilita neklesla pod 70 %. Sklizení bylo provedeno centrifugací při $4500 \times g$ po dobu 1 hod při laboratorní teplotě. Médium s rekombinantním proteinem bylo poté přefiltrováno přes $0,22 \mu\text{m}$ filtr do čisté lahve a uchováváno při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ nebo ihned purifikováno.

4.4.3 PRODUKCE VE STABILNÍCH LINIÍCH

Transfekce stabilních linií piggyBac byla provedena třemi plazmidy pCT5_C2 nebo pCT5_H4, PB-RN a PBase v hmotnostním poměru 8:1:1 [70, 72]. Selekcce byla zahájena po 48 hodinách od transfekce. Buněčná suspenze byla převedena do čerstvého média Ex/F17. Linie byla selektována antibiotiky puromycinem o koncentraci $5 \mu\text{g/ml}$ a

geneticinem o koncentraci 50 µg/ml. Poté, co během subkultivace za přítomnosti selekčních antibiotik kultura dosáhla viability nad 95 %, byly odebrány a zamrazeny alikvotní podíly a bylo možno zahájit produkci.

Produkce byla indukována přidavkem doxycyklinu do koncentrace 100 – 900 ng/ml. Počáteční koncentrace a případné přídavky doxycyklinu během produkce byly předmětem optimalizace (viz výsledková část). Produkce probíhala obvykle 8 – 9 dnů při počátečních buněčných koncentracích 1 až $2 \cdot 10^6$ b/ml v příslušných lahvích a objemech média Ex/F17.

4.5 PURIFIKACE PROTEINŮ

4.5.1 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Zfiltrované médium s rekombinantním proteinem bylo nanášeno na kolonku HiTrap MabSelect Sure 5 ml (GE Healthcare, USA) zapojené na HPLC systému ÄKTAbasic. Protein byl na kolonce zachycen pomocí protein-A-agarosy, která váže Fc fragment na fúzním rekombinantním proteinu. Kolonka byla předem promyta PBS pufrem o pH = 7,0 při průtoku 2 ml/min. Po nanášení média (rychlostí 5 ml/min) byla kolonka opět promyta PBS, dokud hodnota absorbance při 280 nm na detektoru neklesla na původní hladinu. Protein byl eluován citrátovým pufrem o pH = 3,0 rychlostí 2,5 ml/min. Frakce byly jímány do 15 ml zkumavek s 5 ml 10mM Tris pufru o pH = 8,8 pro okamžitou neutralizaci kyselého pH elučního pufru (jinak by mohlo dojít k denuraci proteinu). Kolonka byla poté promyta 0,1M NaOH, PBS pufrem, destilovanou vodou a nakonec 20% ethanolem. Kolonka byla uchovávána při 4 °C.

4.5.2 CHELATAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Proteiny obsahující histidinovou kotvu byly purifikovány na kolonce Talon HiTrap 5 ml (GE Healthcare, USA) připojené na HPLC systému ÄKTAbasic. Kolonka byla předem promyta PBS pufrem o pH = 7,0 při průtoku 2 ml/min. Médium s proteinem bylo naředěno PBS pufrem v poměru 1:1. Po nanášení média (rychlostí 5 ml/min) byla kolonka opět promyta PBS, dokud hodnota absorbance při 280 nm na detektoru neklesla na původní hladinu. Protein byl eluován isokraticky 250mM imidazolem v elučním pufru pro Talon rychlostí 2,5 ml/min. Kolonka byla poté promyta MES pufrem, PBS pufrem, destilovanou vodou a nakonec 20% ethanolem. Kolonka byla uchovávána při 4 °C.

4.5.3 ZKONCENTROVÁNÍ PROTEINŮ

Purifikované proteiny byly zkoncentrovány před nanesením na gelovou permeační chromatografii anebo pro dosažení vhodné koncentrace pro proteinovou krystalizaci. Koncentrování bylo prováděno použitím koncentrátorů Amicon Ultra (MWCO 10000, Millipore, USA). Vzorek byl několikrát dle potřeby v koncentrátoru centrifugován po dobu 5 až 10 minut při $3900 \times g$ a laboratorní teplotě. Mezi jednotlivými centrifugacemi byl vzorek promíchán automatickou pipetou, aby nedocházelo ke srážení proteinu naspodu koncentrátoru.

4.5.4 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

K HPLC systému ÄKTAbasic byla připojena kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL, (GE Healthcare, USA). Kolona a nástřiková smyčka byly ekvilibrovány mobilní fází (pufr HEPES pro gelovou permeační chromatografii). Na kolonu byl nanesen zkoncentrovaný vzorek o objemu maximálně 300 μ l. Chromatografie probíhala isokraticky při průtoku 0,75 ml/min. Průběh chromatografie byl sledován změnou absorbance na spektrofotometrickém detektoru při vlnové délce 280 nm. Jednotlivé frakce byly jímány automatickým sběračem, při nízkém množství proteinu byly frakce jímány ručně do mikrozkuvek. Kolona byla dlouhodobě uchovávána ve 20% ethanolu.

4.5.5 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky při 280 nm na přístroji DS-11+ (DeNovix, USA). Jako slepý vzorek byla použita mobilní fáze gelové chromatografie. Pro přesnější výpočet koncentrace byla do přístroje zadána relativní molekulová hmotnost a molární extinkční koeficient daného proteinu predikovaný z jeho aminokyselinové sekvence.

4.5.6 SDS-PAGE

Čistota frakcí získaných proteinů byla ověřována elektroforeticky v 12,5% polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného. Gel se skládal z vrchní zaostřovací části a spodní rozdělovací části. Složení gelu bylo následující:

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

Zaostřovací gel: 0,7 ml dH₂O, 0,25 ml 30% AA, 0,125 ml 1M Tris (pH = 6,8), 10 µl 10% SDS, 10 µl APS a 1,5 µl TEMED

Gel mezi elektroforetickými skly byl umístěn do aparatury pro elektroforézu, naplněné elektrodoým pufrem. Ze zaostřovacího gelu byl vytažen hřeben, tvořící jamky pro vzorek a gel převrstven elektrodoým pufrem.

Vzorek proteinu o maximálním objemu 10 µl byl smíchán s redukujícím 5 × koncentrovaným vzorkovým pufrem. Vzorek byl umístěn do termobloku o teplotě 100 °C na cca 5 minut a následně centrifugován 3 min při 15000 × g a laboratorní teplotě. Proteinový standard a vzorky byly oparně nanесeny na gel. Elektroforéza obvykle probíhala 45 – 60 minut při stejnosměrném napětí 200 V.

Po skončení elektroforézy byl gel přemístěn do nádoby s barvicím roztokem, kde byl barven minimálně 30 minut za pomalého míchání na třepačce. Odbarvování odbarvovacím roztokem probíhalo obvykle minimálně ve třech krocích po 30 minutách za pomalého míchání na třepačce.

4.6 ŠTĚPENÍ TEV PROTEASOU

Fúzní protein rNKR-P1B z konstruktu pYD5_S1 byl po afinitní chromatografii štěpen TEV proteasou. Fúzní protein byl smíchán s TEV v hmotnostním poměru 1:50. Štěpení probíhalo po dobu 1 hodiny při 30 °C. Odštěpený Fc fragment byl následně z roztoku odstraněn afinitní chromatografií na kolonce HiTrap MabSelect Sure (4.5.1) a eluát s cílovým proteinem jímán do zkumavky.

4.7 KRYSTALIZACE PROTEINŮ

Krystalizace proteinů byla provedena Mgr. Janem Bláhou v Henry Wellcome Building for Genomic Medicine, University of Oxford, UK, za pomoci místního pracovníka Dr. Yuguanga Zhao, PhD.

Pro krystalizaci byla zvolena metoda visící kapky. Roztoky proteinů v HEPES pufru (mobilní fáze pro gelovou permeační chromatografii) byly zkoncentrovány na požadovanou koncentraci a zfiltróvány přes 0,22 µm centrifugační filtry. Na 96jamkovou krystalizační destičku (Greiner, Německo) bylo robotem Hydra (Art Robbins Instruments, USA) pipetováno do rezervoáru 100 µl srážedla a následně robot

Cartesian (Genomic Solutions, USA) pipetoval visící krystalizační kapky (100 nl srážedla a 100 nl vzorku proteinu). Destička byla umístěna do automatizovaného skladovacího a zobrazovacího systému Rock Imager 1000 (Formulatrix, USA) při 20 °C, případně 0 °C, a pravidelně sledována díky on-line přístupu přes Protein Information Management System (PiMS).

5 VÝSLEDKY

Studiem struktury potkaních NK receptorů se pracovní skupina pod vedením Dr. O. Vaňka na Katedře biochemie PřF UK zabývá již dlouhodobě a některé předchozí bakalářské a diplomové práce popisovaly různé přístupy k produkci těchto proteinů. Hlavní snahou v rámci této práce byla rovněž příprava potkaních receptorů NKR-P1B v lidské buněčné linii HEK293S GnTI, která poskytuje homogenní glykosylaci, jež se ukázala být vhodnou pro proteinovou krystalizaci.

Pro produkci proteinu Clrb, který byl v předchozích pracích produkován transientně [73], jsme se rozhodli ustavit stabilně produkující linii zavedením systému piggyBac. Transientní produkce byla ve zmíněných pracích sice úspěšná, nicméně časově náročná a výtěžky proteinů pro některé pokusy nebyly dostatečné. Cílem v zavedení systému piggyBac byla jednak optimalizace produkčních podmínek, ale hlavně vytvoření jednotného a opakovatelného postupu, kterým by mohly být stabilně produkovány i další proteiny, kterými se v laboratoři zabýváme.

Pro optimalizaci produkčních podmínek byly použity dva různé proteiny. Prvním byl zmíněný potkaní ligand Clrb, jež se i při transientní expresi prokukuje v poměrně vysokých výtěžcích (až 2 mg/l média). Druhým použitým proteinem byl lidský NK buněčný receptor NKR-P1A, který se naopak transientně produkuje jen velmi obtížně (0,2 mg/l média). Lidský receptor byl také vybrán nejen pro potřeby laboratoře, ale i pro srovnání použitelnosti systému piggyBac pro různě se produkující proteiny.

Potkaní receptor NKR-P1B byl připraven již zavedeným postupem transientní produkce, jež poskytuje dostatečné výtěžky pro strukturní výzkum.

5.1 SEKVENCE CÍLOVÝCH PROTEINŮ

Tato práce navazuje na předešlé práce provedené na projektu řešení struktury potkaních NK buněčných receptorů. V rámci řešení tohoto diplomového projektu tedy nebyly tvořeny nové konstrukty cílových proteinů; pro vytvoření nových expresních vektorů byly použity pouze konstrukty, které již byly vytvořeny v laboratoři dříve, během předchozího řešení projektu.

5.1.1 SEKVENCE rNKR-P1B

Pro produkci potkaního NKR-P1B byl použit konstrukt pYD5_S1, který je určen pro transienční produkci v lidské buněčné linii HEK293. Produkce proteinu pomocí plazmidu pYD5 poskytuje fúzní konstrukty s Fc fragmentem IgG. Fc fragment je možné odštěpit TEV proteasou a získat tak pouze receptor, přičemž produkce receptoru ve formě fúzního proteinu napomáhá vzniku jeho kovalentního dimeru [73]. Aminokyselinová sekvence konstrukt rNKR-P1B je uvedena na obrázku 6.

Sekvence rNKR-P1B SD:

MDTAVVYADLHLARTGEPKREPPPSLSPDTCQCPRWHLALKLGCACLILLVLSVIGLGVLVLTLLQKPL
IQNSPADVQENRRTKTTDSPAKLKC PKDWHSHQDKCFHVSQTSITWKGSLADCGGKGATLLLVDQEEL
RFLRNLTKRISSEFWIGLSYTLSDEKWKWINGSTLNSDALNITGDTEKDCASVSQDKVLSSECDSDNIWI
CQKELKRESTCND

Konstrukt pYD5_S1:

METDTLLLWVLLWVPGSTGAGSTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKASGAGSTTENLYFQGTGVQENRRTKTTDSPAKLKC PKDWHSH
QDKCFHVSQTSITWKGSLADCGGKGATLLLVDQEELRFLRNLTKRISSEFWIGLSYTLSDEKWKWINGSTLN
SDALNITGDTEKDCASVSQDKVLSSECDSDNIWICQKELKRESTCNDSGT

Finální produkt po odštěpení Fc pomocí TEV proteasy:

GTGVQENRRTKTTDSPAKLKC PKDWHSHQDKCFHVSQTSITWKGSLADCGGKGATLLLVDQEELRFLRN
NLTKRISSEFWIGLSYTLSDEKWKWINGSTLNSDALNITGDTEKDCASVSQDKVLSSECDSDNIWICQK
ELKRESTCNDSGT

Obr. 6: Aminokyselinová sekvence rNKR-P1B S1. Zeleně označené aminokyseliny spouští inhibiční kaskádu, červeně je znázorněna trans membránová část, modře je vyznačen konstrukt S1, oranžově místo pro TEV proteasu, tmavě zeleně sekreční signál. Dimerizační cysteiny jsou označeny žlutě a místa pro potenciální N-glykosylaci růžově.

5.1.2 SEKVENCE rCLRB

Pro produkci potkaního proteinu Clrb (aminokyselinová sekvence tohoto proteinu je uvedena na obrázku 7 na straně 48) byl použit konstrukt C2. Ten byl již v naší laboratoři úspěšně transienčně produkován pomocí vektoru pTW5_C2 [73]. Tento konstrukt byl ze zmíněného vektoru přenesen do expresního vektoru pro systém piggyBac a následně použit pro optimalizaci produkčních podmínek. Následně byl tento konstrukt použit pro proteinovou krystalizaci a to jak samostatně, tak v komplexu

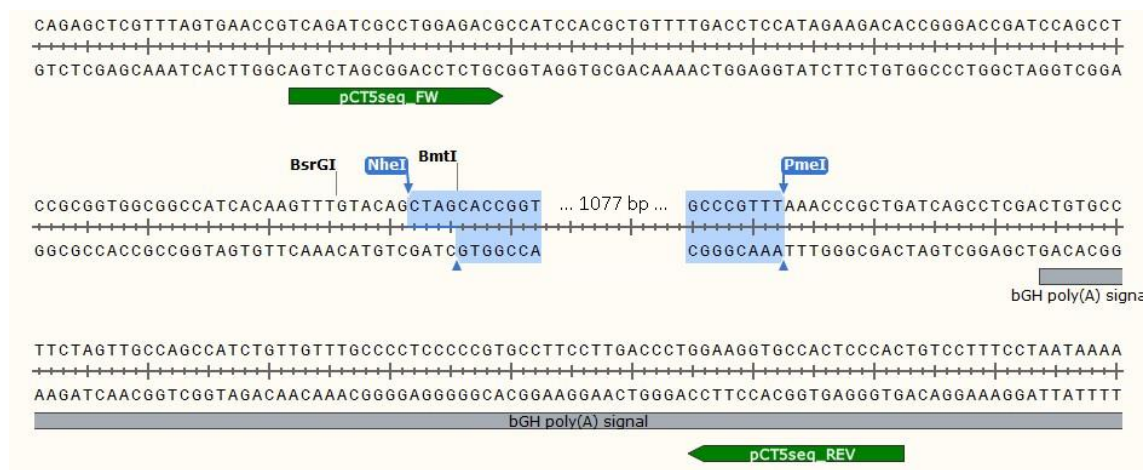
s potkaním NKR-P1B.

MSAKKASQPMLNTTGS LQEGEMGKMFHGKCLRIVSPESPAKLYCCYGVIMVLSVAVVALSVKMT
PQISTINTYAA **PRNWIGVGNK** **FYFSEYAS** **WTFSQTF** **KAQEAELARFDTEELNFLSRYKGSFDYWI**
GLHRESSEHPWKWTDNTQY **NYSLSIRGVERYAYLNDIGISSARVYADKRWS** **SRLNSYSLQCKTPFSPM**

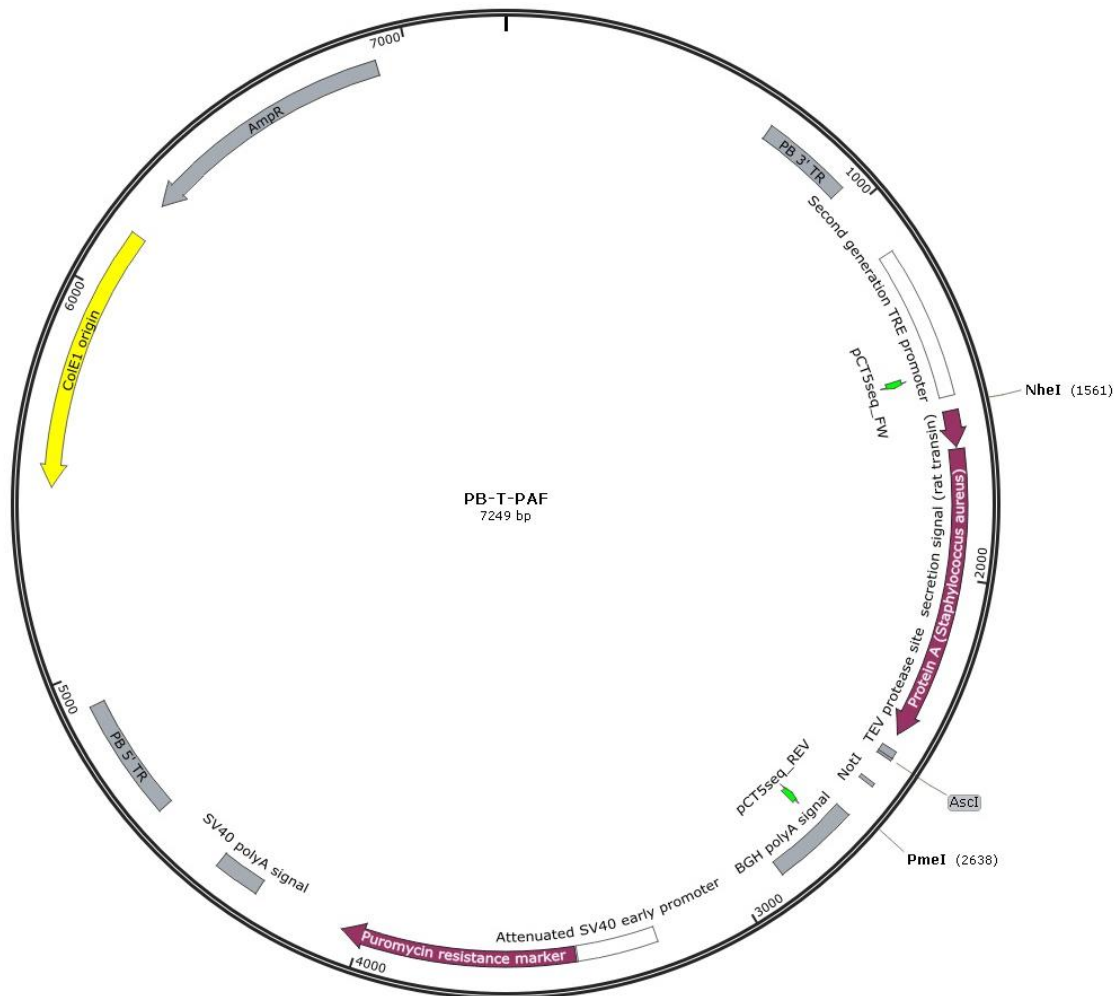
Obr. 7: Aminokyselinová sekvence rClrb. Modře je vyznačen konstrukt C1, fialově použitý konstrukt C2. Červeně je znázorněna trans membránová část, v konstruktech jsou znázorněna potenciální místa N-glykosylace (ružově) a cysteiny zodpovědné za tvorbu disulfidických můstku (žlutě).

5.2 PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU pCT5

Cílem klonovacích postupů bylo vytvoření linearizovaného vektoru pCT5 (Obr. 8 a Obr. 9, str. 49) z původního vektoru PB-T-PAF, jež v systému piggyBac hraje roli transpozonu, tedy přenosového vektoru, do něž je možno vkládat cílové geny. Dalším cílem bylo vytvoření konstruktů pCT5_C2, tedy piggyBac vektoru s genem pro potkaní Clrb a vytvoření konstruktů pCT5_H4, tedy vektoru pro lidský NKR-P1A. Tyto geny byly po PCR amplifikaci vloženy do vektoru reakcí Infusion.



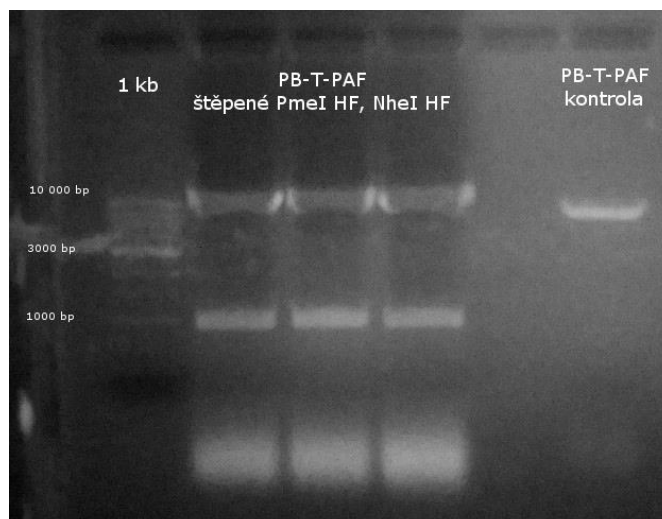
Obr. 8: Detail MCS. Detail plazmidové sekvence místa pro klonování (diskutované v Obr. 9, str. 48) se zvýrazněným klonovacím místem (NheI; PmeI) použitým pro inserci cílových genů pro Clrb a NKR-P1A. Zeleně jsou zobrazena místa nasedání sekvenačních oligonukleotidů.



Obr. 9: Mapa plazmidu PB-T-PAF, donoru plazmidu pCT5. Plazmid pCT5 vznikl vyjmutím genu pro protein A z vektoru PB-T-PAF. Zelené šipky (vpravo) zobrazují pozice nasedání sekvenačních oligonukleotidů. Mezi těmito šipkami na okraji polyA signálu leží místo pro klonování (MCS, z *angl. multiple cloning site*). Gen pro ampicilinovou rezistenci (AmpR, šedě vlevo nahoře) je využit při produkci plazmidu v *E. coli* a gen pro puromycinovou rezistenci (PuroR, fialově, dole) je využit při selekci transfekovaných klonů v lidské buněčné linii. Velikost plazmidu PB-T-PAF je 7249 bp, velikost vyjmutého segmentu je 1077 bp.

5.2.1 PŘÍPRAVA LINEARIZOVANÉHO VEKTORU PCT5

Plazmid PB-T-PAF byl linearizován restrikcími endonukleasami NheI HF a PmeI HF. Z výchozího plazmidu byl vyštěpen segment genu pro protein A o velikosti 1077 bp. Štěpený vzorek byl nanesen do gelu pro agarosovou elektroforézu (Obr. 10, str. 50). Po elektroforéze byl štěpený plazmid extrahován z gelu metodou popsanou v kapitole 4.1.6 a dále použit pro Infusion inserci požadovaných genů Clrb a NKR-P1A.



Obr. 10: Agarosová elektroforéza linearizovaného vektoru pCT5 (PB-T-PAF). Zleva: (1) DNA standard, (2) tři dráhy rozděleného stejného vzorku štěpeného pCT5 (PB-T-PAF), (3) nelinearizovaný plazmid PB-T-PAF pro kontrolu štěpení. Ve srovnání s kontrolní dráhou neštěpeného plazmidu je zřetelné, že štěpení proběhlo úspěšně. Vyštěpený segment má v porovnání s DNA standardem velikost přibližně 1000 bp, což odpovídá velikosti genu pro protein A, který měl být vyštěpen (1077 bp).

5.2.2 PŘÍPRAVA VEKTORŮ pCT5_C2 A pCT5_H4

Insert pro přípravu vektoru pCT5_C2 pro produkci proteinu rClrb systémem piggyBac byl PCR amplifikován za použití Q5 HF polymerasy, oligonukleotidů pCT5_C2_inf_FW a REV. Templátem pro reakci byl konstrukt pTW5_C2, který byl připraven Bc. Terezou Prokopovou v rámci její bakalářské práce [74]. Stejným způsobem s příslušnými oligonukleotidy byl připraven insert pro pCT5_H4 za použití templátu pTW5_H4 (vytvořen Mgr. Janem Bláhou). Produkty byly přečištěny přes agarosový gel a vloženy do linearizovaného vektoru pCT5 pomocí enzymové reakce Infusion. Reakční směsí Infusion byly poté transformovány bakterie *E. coli* Stbl 3 (viz kapitola 4.1.1) a inkubovány do druhého dne. Z narostlých kolonií byla poté provedena reakce PCR se sekvenčními oligonukleotidy pro pCT5 (viz kapitoly 4.1.2-3 a 4.2.2). Z pozitivních kolonií byla provedena nízkoobjemová izolace plazmidu a vložení požadované sekvence bylo ověřeno DNA sekvenací. Sekvence potvrdila správnou sekvenci vložených insertů pro oba vektory pCT5_C2 a pCT5_H4. Sekvenací ověřené plazmidy byly následně použity pro velkoobjemovou přípravu zásobního množství plazmidu (4.1.1).

5.3 OPTIMALIZACE SYSTÉMU PIGGYBAC

Zavedení a optimalizace systému piggyBac bylo provedeno na konstruktu C2 pro potkaní Clrb. Následně byly výsledky použity pro produkci lidského NKR-P1A, konstruktů H4. Produkce obou proteinů následně byly srovnány s výsledky dalších metod produkce, které byly použity v laboratoři dříve. Příprava expresních plazmidů je popsána v kapitole 5.2.2.

Systém piggyBac je založený na DNA transpozonech (viz kapitola 1.3). Transientně produkovaný enzym transpozasa rozpoznává opakující se úseky ohraničující cílový DNA fragment a je schopná tento fragment vložit mezi náhodná TTAA místa na chromosomu. Zároveň s tím je do buňky vložen gen pro reversní tetracyklinový transaktivátor (rtTA), který je produkován konstitutivně. Po přidání doxycyklinu se rtTA váže na element odpovídající na tetracyklin (TRE, z *angl. tetracycline response element*) v promotoru a indukuje expresi cílového genu. Expresi proteinů je tak indukovatelná doxycyklinem.

Buňky linie HEK293S GnT1⁻ byly metodou vysokohustotní transfekce kontrastifikovány třemi plazmidy (viz 4.4.3). Prvním z plazmidů byl expresní vektor pCT5_C2, který nese gen pro cílový protein a TRE promotor, ohraničené TTAA repetitivy. Plazmid rovněž nese gen pro rezistenci na puromycin, který je použit jako selekční znak úspěšné transfekce. Druhý plazmid (PT-RN) nese gen pro induktor rtTA a gen pro rezistenci na geneticin (rovněž selekční znak), ohraničené TTAA repetitivy. Posledním plazmidem (PBase) byl expresní plazmid, nesoucí gen pro hyperaktivní piggyBac transpozasu. Ta je v buňkách produkována transientně a jejím účelem je integrace transpozonů do genomu transfekované buněčné linie.

Selekce na puromycin (5 µg/ml) a geneticin (50 µg/ml) byla zahájena 48 hodin po transfekci a stabilní linie byly pěstovány po dva týdny do dosažení viability vyšší než 95 %. Poté bylo odebráno a zamraženo 5 alikvotních podílů.

Produkce probíhaly v objemu 30 ml médií Ex/F17 ve 100ml čtverhranných lahvích. Nejprve bylo optimalizováno počáteční množství doxycyklinu pro indukci produkce v rozsahu od 100 do 900 ng/ml (výběr těchto koncentrací byl zvolen na základě publikovaných dat [70]). Dalším optimalizačním experimentem bylo přidávání doxycyklinu v různých časových intervalech (pouze na začátku, ob den či ob dva dny).

Po devíti dnech produkce byly buněčné suspenze sklizeny a purifikovány na

kolonce Talon HiTrap (díky histidinové kotvě, kterou konstrukt obsahuje). Eluát byl následně zkoncentrován na 100 μ l a nanesen na kolonu Superdex 200 Increase 10/300 GL pro gelovou permeační chromatografii. Výsledky produkci a purifikaci jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Optimalizace počáteční koncentrace doxycyklinu pro produkci rClrb 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, popřípadě přidávání doxycyklinu v průběhu produkce

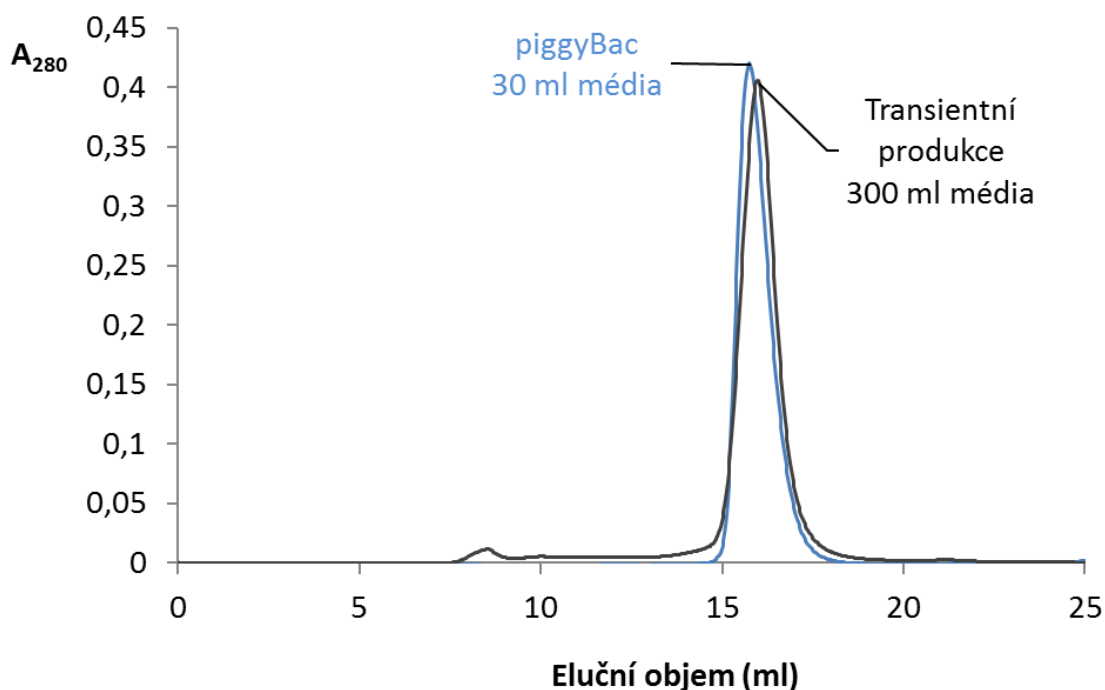
Doxycyklin	Puromycin	Geneticin	Počáteční buněčná hustota	Buněčná hustota při sklizení	Viabilita při sklizení	Množství proteinu
ng/ml	μ g/ml	μ g/ml	10^6 b/ml	10^6 b/ml	%	$A_{280} \cdot \text{ml} \cdot 10^{-3}$
100	5	50	1	4,79	75	398,09
200	5	50	1	4,42	71	524,18
300	5	50	1	4,02	70	459,62
450	5	50	1	4,01	40	343,90
600	5	50	1	4,14	58	414,17
900	5	50	1	3,48	58	398,57
Jedna počáteční dávka na 300 ng/ml.	5	50	1	3,77	70	383,05
Dva ekvivalenty dávky 300 ng/ml ob dva dny.	5	50	1	4,12	63	407,36
Tři ekvivalenty dávky 300 ng/ml ob den.	5	50	1	4,08	68	392,10

Z výsledků produkce Clrb v piggyBac stabilní linii je zřejmé, že produkce přes celý rozsah počátečních koncentrací doxycyklinu je podobná. Zdá se, že při vyšších koncentracích doxycyklinu se snižuje viabilita a tento trend je sledován nižším konečným množstvím proteinu. Opakované přidávání doxycyklinu během produkční fáze nemá výrazný vliv na výtěžek, naopak tyto další manipulace s produkční linií jsou časově velmi náročné, mohou způsobit případnou kontaminaci produkční linie a kvůli vyšší spotřebě doxycyklinu je tento postup i ekonomicky nevýhodný.

Obdobné výsledky vychází i z publikace [70], z níž jsme vycházeli. Z té je také zřetelné, že optimální koncentrace doxycyklinu závisí na povaze produkovaného proteinu, přesto pro většinu z testovaných je již koncentrace 300 ng/ml dostatečná. Další možnou veličinou pro optimalizaci byla počáteční buněčná koncentrace a také

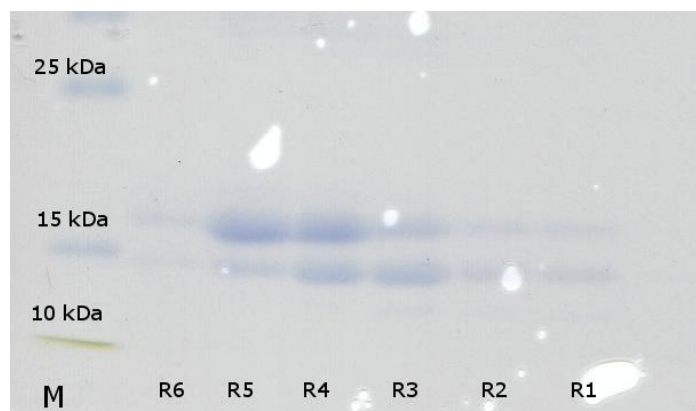
vliv přítomnosti selekčních antibiotik v médiu. Tyto pokusy prováděla Mgr. Barbora Kalousková v rámci své diplomové práce [75] na proteinu NKp80, kde jsou její výsledky uvedeny v tabulce 4 na straně 53; porovnání zde uvádím v diskuzi (str. 64).

Záznam gelové permeační chromatografie rClrb (provedené po afinitní chromatografii) na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL získaného z produkce ve stabilní linii piggyBac ve srovnání s průběhem chromatografie po jeho transientní produkci [74] je uveden na obrázku 11, SDS-PAGE z jímaných frakcí je na obrázku 12 na straně 54. Porovnání výtěžků z těchto produkcí je zobrazeno graficky na obrázku 13 na straně 54. Pro srovnání byly použity záznamy z chromatografií produkcí s nejvyšším výtěžkem v daném expresním systému. Výtěžky jsou vztaženy na 1 litr média.

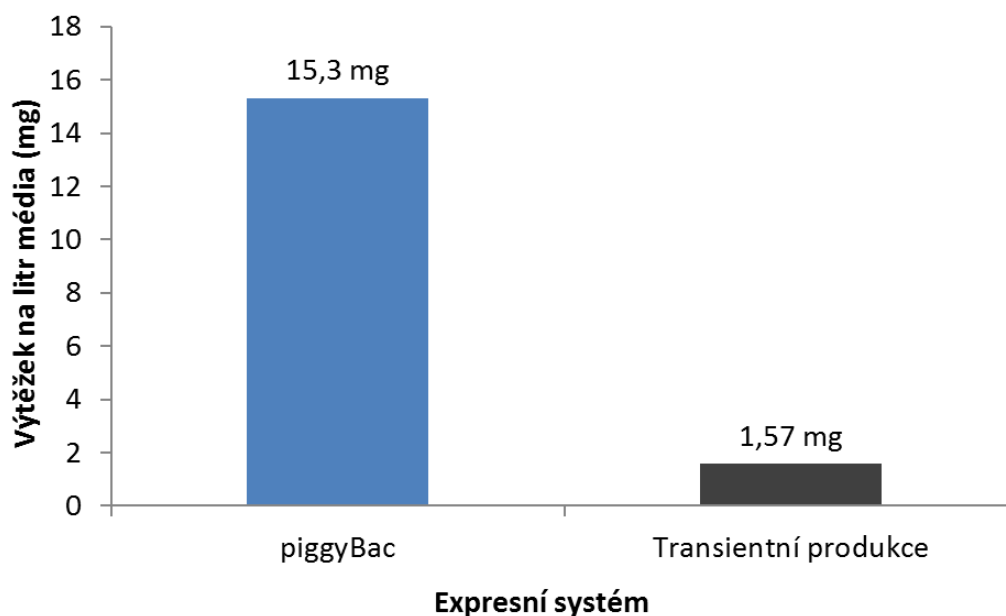


Obr. 11: Průběh gelové permeační chromatografie rClrb; srovnání stabilní a transientní produkce.

Modře: záznam chromatografie rClrb produkovaného ve stabilní linii piggyBac. Záznam je z produkce indukované doxycyklinem při koncentraci 200 ng/ml (Tab. 3, str. 52) ve 30 ml média. Výška vrcholu je 0,415, eluční objem 15,8 ml, plocha 0,524 A · ml. **Černě:** záznam chromatografie rClrb produkovaného transientně ve 300 ml média [74]. Výška vrcholu je 0,403, eluční objem 16,0 ml, plocha 0,471 A · ml. Plochy vrcholů byly pomocí molárních absorpčních koeficientů při 280 nm přepočítány na výtěžek v mg a ten vztažen na 1 l produkčního média. Výsledky tohoto srovnání jsou uvedeny na obrázku 13 na straně 53.



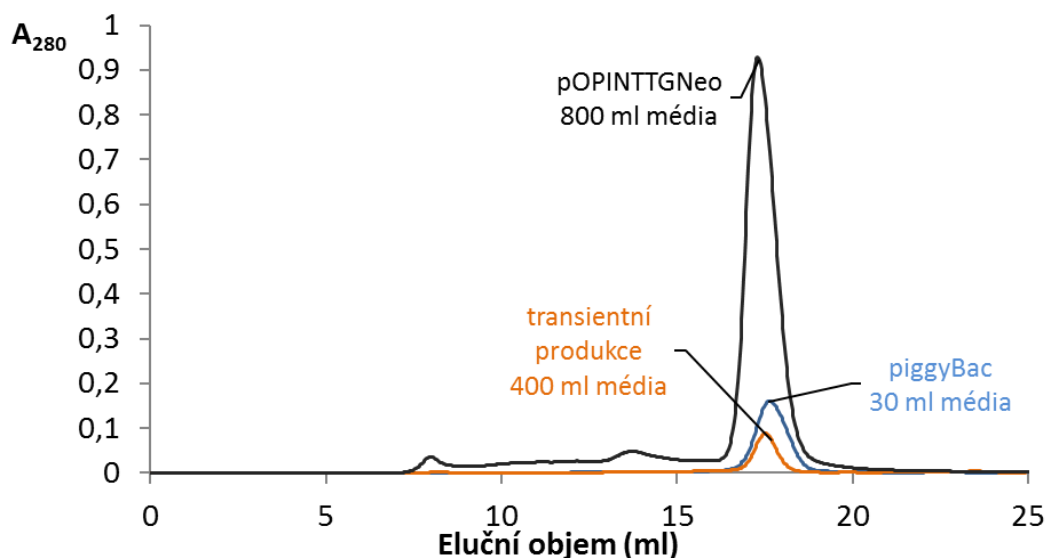
Obr. 12: SDS-PAGE frakcí Clrb v redukujícím prostředí. Dráha M: proteinový standard. Dráhy R1 – R6: vzorky Clrb z jednotlivých frakcí po gelové permeační chromatografii; 12,5% AA.



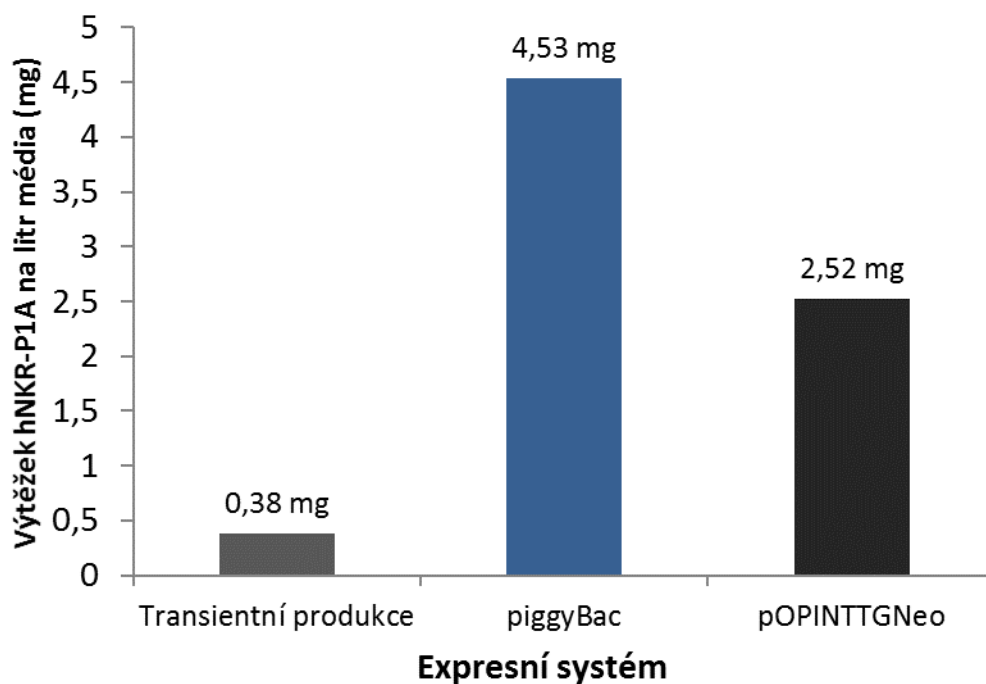
Obr. 13: Srovnání výtěžku rClrb z transientní a stabilní produkce v systému piggyBac. Plochy vrcholů z gelové permeační chromatografie (Obr. 11, str. 54) byly pomocí molárních absorpčních koeficientů při 280 nm přepočítány na výtěžek v mg a ten vztažen na 1 l produkčního média. Je zřejmé, že v případě produkce rClrb byl výtěžek produkce zvýšen až desetinásobně.

Na základě výsledků z produkce rClrb byla provedena produkce lidského NKR-P1A, abychom ověřili pozitivní zvýšení výtěžku i pro transientně obtížně produkovaný protein. Transfekce expresním vektorem pCT5_H4 pro hNKR-P1A byla provedena stejně jako u pCT5_C2, která je popsána výše. Rovněž selekční kroky byly prováděny

stejně. Produkce probíhala v 75 ml Ex/F17 ve 250ml čtverhranné lahvi za nepřítomnosti selekčních antibiotik při počáteční buněčné koncentraci $2 \cdot 10^6$ b/ml. Indukce produkce byla provedena doxycyklinem, přidaným do koncentrace 450 ng/ml. Suspenze byla sklizena po osmi dnech. Buněčná koncentrace při sklizni byla $3,45 \cdot 10^6$ b/ml a viabilita 66 %. Záznam gelové permeační chromatografie (provedené po afinitní chromatografii) na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL pro hNKR-P1A produkované ve stabilní linii piggyBac ve srovnání s průběhem chromatografie po transienční produkci a produkci ze stabilní linie připravené s použitím plazmidu pOPINTTGNeo s pasivní integrací do genomu je uveden na obrázku 14. Porovnání výtěžků z těchto produkcí je zobrazeno graficky na obrázku 15 na straně 56. Pro srovnání byly použity záznamy z chromatografií produkcí s nejvyšším výtěžkem v daném expresním systému. Výtěžky jsou vztaženy na 1 litr média.



Obr. 14: Průběh gelové permeační chromatografie hNKR-P1A; srovnání produkce ve stabilní linii piggyBac, stabilní linii pOPINTTGNeo a transienční produkce. **Modře:** záznam chromatografie hNKR-P1A produkovaného ve stabilní linii piggyBac. Záznam je z produkce indukované doxycyklinem při koncentraci 450 ng/ml v 75 ml média. Výška vrcholu je 0,155, eluční objem 17,5 ml, plocha 0,170 A · ml. **Černě:** záznam chromatografie hNKR-P1A produkovaného systémem pro tvorbu stabilních linií pOPINTTGNeo v 800 ml média. Výška vrcholu je 0,892, eluční objem 17,2 ml, plocha 1,009 A · ml. **Oranžově:** záznam chromatografie hNKR-P1A produkovaného transienčně ve 400 ml média. Výška vrcholu je 0,067, eluční objem 17,3 ml, plocha 0,076 A · ml. Plochy vrcholů byly pomocí molárních absorpčních koeficientů při 280 nm přepočítány na výtěžek v mg a ten vztažen na 1 l produkčního média. Výsledky tohoto srovnání jsou uvedeny na obrázku 15 na straně 56. Transienční produkce a produkce pomocí systému pOPINTTGNeo byly provedeny Mgr. Janem Bláhou.



Obr. 15: Srovnání výtěžku hNKR-P1A z produkce ve stabilní linii piggyBac, stabilní linii pOPINTTNeo a z transientní produkce. Plochy vrcholů byly pomocí molárních absorpčních koeficientů při 280 nm přepočítány na výtěžek v mg a ten vztažen na 1 l produkčního média. Je zřejmé, že v případě produkce hNKR-P1A byl výtěžek produkce zvýšen až desetinásobně ve srovnání s transientní produkcí a téměř dvojnásobně ve srovnání s jiným systémem pro tvorbu stabilních linií.

Z optimalizačních experimentů a produkce proteinů systémem piggyBac vyplývá, že se nám zavedením tohoto systému podařilo zvýšit výtěžky exprese proteinů až desetinásobně ve srovnání s transientní produkcí a to jak u potkaního Clrb, tak u lidského NKR-P1A. Tento systém tak zatím představuje nejefektivnější metodu přípravy rekombinantních proteinů v naší laboratoři.

5.4 PŘÍPRAVA PROTEINŮ PRO KRYSTALIZAČNÍ EXPERIMENTY

Pro účely krystalizace proteinů rClrb a rNKR-P1B a jejich komplexu byly tyto proteiny produkovány a purifikovány dle následujících postupů.

5.4.1 PRODUKCE A PURIFIKACE RNKR-P1B

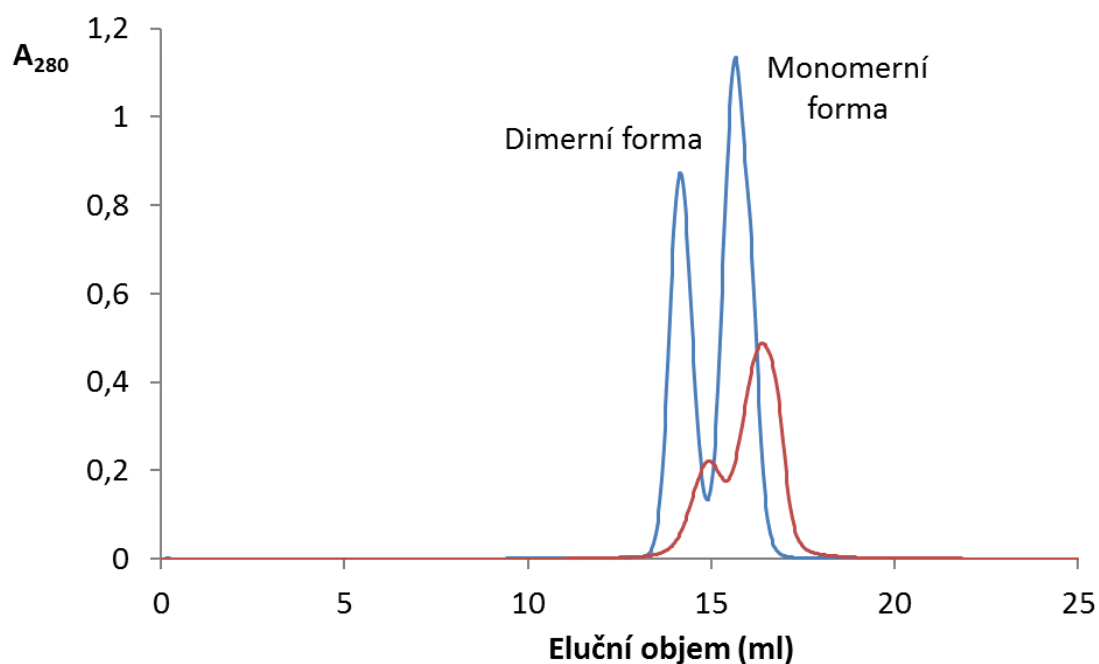
Potkaní NK buněčný receptor NKR-P1B byl produkován transientně v lidské buněčné linii HEK293S GnT1. K produkci fúzního konstruktu NKR-P1B s Fc fragmentem IgG byl použit plazmid pYD5_S1, kterým byla transientně transfekována

linie HEK293S GnTI postupem uvedeným v kapitole 4.4.1 za použití IPEI jako transfekčního činidla. Produkce probíhala dle postupu velkoobjemové transientní produkce (4.4.2) ve třech 1l čtverhranných lahvích v celkovém objemu 1,2l média Ex/F17. Po 6 dnech byla produkce ukončena a buňky sklizeny (4.4.2). Viabilita (V, %) a buněčná koncentrace (CC, miliony buněk na mililitr) při sklizení buněk ve třech produkcích byla a) V: 23 %, CC: 0,75; b) V: 25 %, CC: 1,25; c) V: 57 %, CC: 0,25.

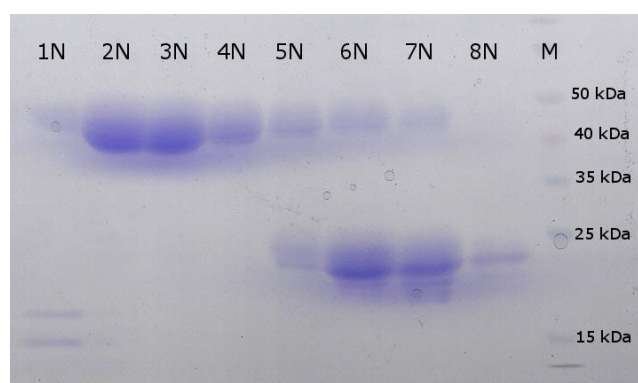
Zfiltrované médium bylo purifikováno afinitní chromatografií na kolonce HiTrap MabSelect Sure (4.5.1). Eluce byla provedena citrátovým pufrům o pH 3,0. Eluát byl jímán do 50ml zkumavky s 1 ml Tris pufru o pH 8,8 pro neutralizaci pH.

Eluovaný fúzní protein byl štěpen TEV proteasou (viz kapitola 4.6) v hmotnostním poměru 1:50. Celkové množství proteinu 55 mg (změřeno na Spektrofotometru UV/VIS UV4-500 UNICAM, UK) bylo smícháno s 1,1 mg TEV proteasy. Štěpení probíhalo 1 hod při 30 °C. Odštěpený Fc fragment byl následně z roztoku odstraněn na kolonce HiTrap MabSelect Sure. Eluát, tedy směs monomeru a dimeru potkaního NKR-P1B z konstruktu S1, byl jímán a následně zkoncentrován dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2 na objem 250 µl a nanesen na kolonu Superdex 200 Increase 10/300 GL pro gelovou permeační chromatografii (4.5.3). Takto získaný protein byl následně použit pro proteinovou krystalizaci.

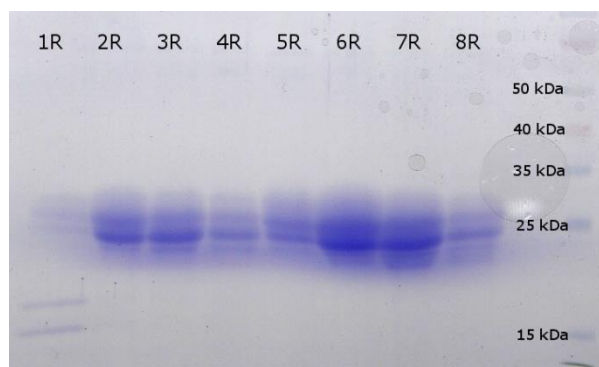
Záznam průběhu chromatografie je uveden na obrázku 16 na straně 58. Pro srovnání zde uvádím i záznam chromatografie z diplomové práce Mgr. Anny Dvorské. Ta ve své práci používala kolonu Superdex 200 10/300 GL, která má nižší účinnost než mnou použitá kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL. Je zjevné, že použití účinnější kolony má veliký vliv na oddělení monomerní a dimerní frakce potkaního NKR-P1B. Zároveň je zřejmý vyšší výtěžek dimerní formy z mnou provedených produkcí. Pravděpodobnou příčinou vyššího výtěžku dimerní formy může být purifikace bez předchozího dlouhodobého zmrazení a následného rozmrazování média (jako v případě zmíněné práce), kdy by se dimerní forma mohla rozpadat. Sebrané frakce dimerní a monomerní formy byly následně analyzovány SDS-PAGE (Obr. 17, str. 58 a Obr. 18, str. 59). Na základě srovnání elektroforéz provedených v neredukujícím a redukujícím prostředí lze říci, že frakce 1 až 4 obsahují čistou dimerní formu receptoru, tj. disulfidicky vázaný homodimer extracelulární části receptoru rNKR-P1B SD.



Obr. 16: Gelová permeační chromatografie proteinu rNKR-P1B SD. Chromatografie probíhala na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL za detekce absorbance při 280 nm. **Modře** je znázorněn chromatogram rNKR-P1B po štěpení TEV proteasou a afinitní chromatografii, eluční vrchol odpovídá dimeru (14,2 ml, $A_{280} = 0,867$) a monomeru (15,7 ml, $A_{280} = 1,125$). **Červeně** je zobrazen chromatogram rNKR-P1B z práce Mgr. Anny Dvorské [73]. Posun v elučním objemu je způsoben srovnáváním průběhu gelové permeační chromatografie provedené na dvou různých kolonách (Superdex 200 10/300 GL a Superdex 200 Increase GL 10/300).



Obr. 17: SDS-PAGE frakcí NKR-P1B v neredukujícím prostředí. Dráha M: proteinový standard. Dráhy N1 – N6: vzorky NKR-P1B z jednotlivých frakcí po gelové permeační chromatografii; 12,5% AA.



Obr. 18: SDS-PAGE frakcí NKR-P1B v redukujícím prostředí. Dráha M: proteinový standard. Dráhy R1 – R6: vzorky NKR-P1B z jednotlivých frakcí po gelové permeační chromatografii; 12,5% AA.

5.4.2 PRODUKCE POTKANÍHO CLRb

Pro krystalizační experimenty zcela dostačovalo množství rClrb konstruktů C2 vyprodukované během optimalizace systému piggyBac tímto proteinem. Produkce a purifikace jsou tak popsány v kapitole 5.3. Jednotlivé frakce rClrb byly smíchány dohromady a zkoncentrovány na požadovanou koncentraci pro krystalizační experimenty.

5.5 KRYSTALIZACE PROTEINŮ

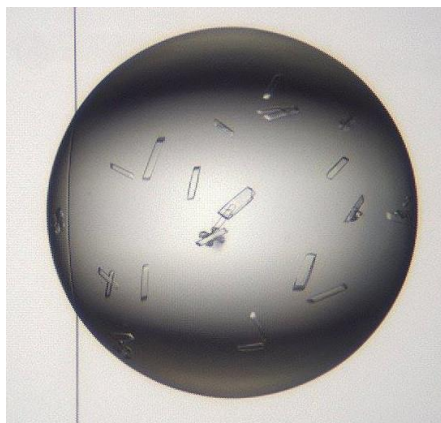
Veškeré krystalizační experimenty za použití proteinů, vyprodukovaných v rámci této práce, byly provedeny Mgr. Janem Bláhou v Henry Wellcome Building for Genomic Medicine, University of Oxford, UK. Pro krystalizaci byla zvolena metoda visící kapky s difúzí par.

5.5.1 KRYSTALIZACE RCLRb

Protein Clrb byl již v naší laboratoři několikrát vykrytalizován, avšak ani za použití několika různých expresních konstruktů i způsobů přípravy žádná z jeho krystalových forem dosud neposkytla difrakci dostačující pro vyřešení jeho struktury [73, 74]. Nejnadějnější se jevil právě konstrukt C2, velmi těsně ohraničující CTLD doménu. Za účelem získání difrakčních dat o dostatečném rozlišení byly proto optimalizovány další krystalizační podmínky. Nejvhodnější se ukázala být krystalizační podmínka, kdy bylo robotem pipetováno 100 nl vzorku Clrb o koncentraci 8 mg/ml v pufru HEPES (mobilní fáze pro gelovou permeační chromatografii) smíchaného s endoglykosidasou Endo F1 v poměru 200:1. Tento zásobní roztok proteinů byl smíchán se 100 nl roztoku 0,1M octanu sodného a 1M mravenčanu sodného o pH = 5,0.

Krystalizace probíhala při teplotě 20 °C. Růst krystalů byl sledován díky on-line přístupu přes Protein Information Management System (Obr. 19).

Krystaly z této podmínky byly zmrazeny v tekutém dusíku a následně byla měřena jejich rentgenová difrakce na zdroji synchrotronového záření Diamond Light Source, UK. Naměřená difrakční data byla použita k řešení krystalové struktury.

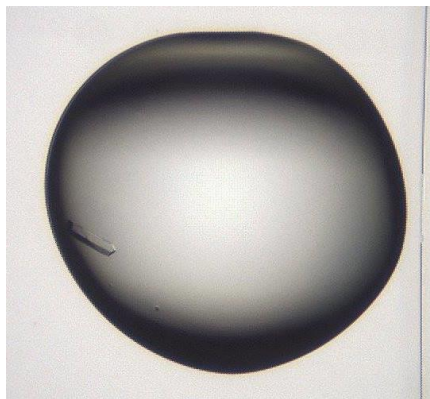


Obr. 19: Krystaly potkaního Clrb. Krystalizační podmínka: 100 nl vzorku Clrb (8 mg/ml) s endoglykosidasou Endo F1 v poměru 200:1, přidáno 100 nl roztoku 0,1M octanu sodného a 1M mravenčanu sodného o pH = 5,0. Krystalizace probíhala při teplotě 20 °C.

5.5.2 KRYSTALIZACE KOMPLEXU rCLRb-rNKR-P1B

Protein rNKR-P1B byl také již v naší laboratoři úspěšně vykrytalizován a jeho krystaly poskytly difrakční data pro řešení krystalové struktury o rozlišení 2,3 Å. Hlavním cílem však bylo pokusit se vykrytalizovat komplex receptoru s jeho ligandem, tj. rNKR-P1B:Clrb. Pro krystalizaci komplexu cílových proteinů byla Mgr. Janem Bláhou nasazena řada krystalizačních podmínek, z nichž nejvhodnější se ukázala být krystalizační podmínka, jež obsahovala v celkovém objemu 200 nl směs Clrb a NKR-P1B v poměru 1 : 1 o celkové koncentraci 15 mg/ml, 0,2 M NaCl, 0,1M octan sodný, 20% PEG 20 000, pH = 5,0. Krystalizace probíhala při teplotě 20 °C. Růst krystalů byl sledován díky on-line přístupu přes Protein Information Management System (Obr. 20, str. 61).

Krystal z této podmínky byl zmrazen v tekutém dusíku a následně byla měřena jeho rentgenová difrakce na zdroji synchrotronového záření Diamond Light Source, UK. Naměřená difrakční data byla použita k řešení krystalové struktury komplexu.



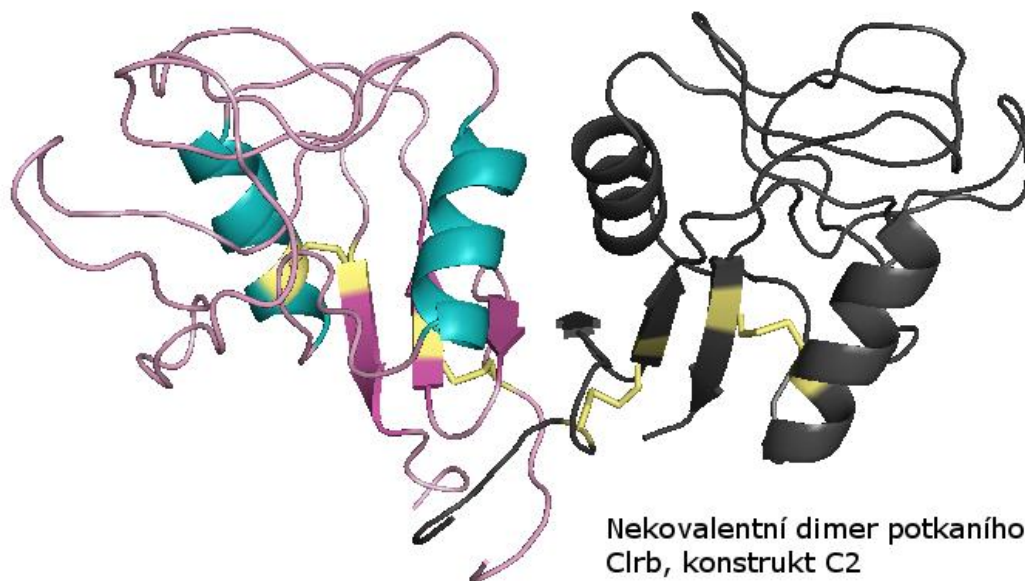
Obr. 20: Krystal potkaního komplexu Clrb a NKR-P1B. Krystalizační podmínka: v objemu 200 nl byla směs Clrb a NKR-P1B v poměru 1 : 1 o celkové koncentraci 15 mg/ml, 0,2 M NaCl, 0,1M octan sodný, 20% PEG 20 000, pH = 5,0. Krystalizace probíhala při teplotě 20 °C.

5.6 ŘEŠENÍ KRYSTALOVÉ STRUKTURY

Veškerá získaná difrakční data zpracovávali (včetně tvorby a rafinace prostorových modelů) RNDr. Tereza Skálová, Ph.D. a Mgr. Jan Bláha.

5.6.1 ŘEŠENÍ STRUKTURY RCLRB

Struktura Clrb byla řešena v programu Morda. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení použitím již vyřešené struktury 3T3A (myší NKR-P1A). V asymetrické jednotce těchto krystalů se nachází nekovalentní dimer potkaního Clrb konstruktu C2. Prostorový model vytvořený na základě upřesněných map elektronových hustot je na Obr. 21, str. 62. Rozlišení krystalové struktury je 1,45 Å. Struktura je dle očekávání svým celkovým uspořádáním velmi podobná příbuzným ligandům z CLEC2 rodiny.

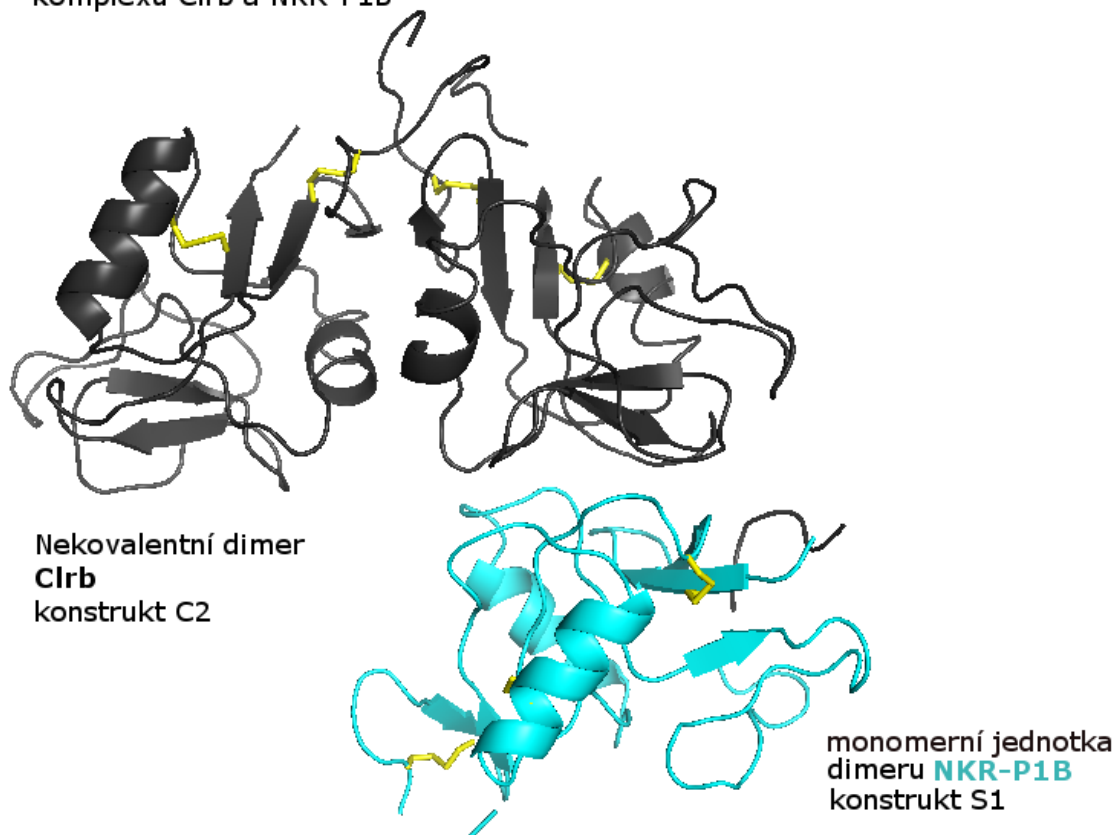


Obr. 21: Krystalografický model struktury Clrb: Model byl vytvořen na základě difrakčních dat krystalů Clrb konstruktů C2 (s homogenní glykosylací) RNDr. Terezou Skálovou, PhD. a Mgr. Janem Bláhou. Obrázek zobrazuje asymetrickou jednotku krystalu, nekovalentní dimer. Disulfidická spojení jsou vybarvena žlutě a znázorněna tyčkovým modelem. Levá podjednotka je vybarvena na základě prvků sekundárních struktur (světle modře α -helixy a fialově β -skládané listy, žlutě disulfidické můstky). Rozlišení struktury je 1,45 Å. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL.

5.6.2 ŘEŠENÍ STRUKTURY KOMPLEXU RCLRB-RNKR-P1B

Struktura komplexu Clrb a NKR-P1B byla řešena v programu Morda. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení použitím již vyřešené struktury 3FF8 (lidské KLRG v komplexu s E-kadherinem). V asymetrické jednotce těchto krystalů se nachází nekovalentní dimer potkaního Clrb konstruktů C2 a monomerní jednotka kovalentního dimeru potkaního NKR-P1B, konstruktů S1. Prostorový model vytvořený na základě upřesněných map elektronových hustot je na Obr. 22, str. 63. Rozlišení krystalové struktury je 3,26 Å. Ve struktuře komplexu Clrb a NKR-P1B je v rámci asymetrické jednotky obsažen dimer Clrb ve stejném uspořádání, jako výše. Z potkaního NKR-P1B se v jedné asymetrické jednotce nachází jen jedna doména z jeho kovalentního dimeru, druhá doména interaguje stejným způsobem s dimerem Clrb v další asymetrické jednotce.

Asymetrická jednotka krystalové struktury
komplexu Clrb a NKR-P1B



Obr. 22: Krystalografický model struktury komplexu potkaniho Clrb a NKR-P1B: Model byl vytvořen na základě difrakčních dat krystalů komplexu Clrb konstrukt C2 a NKR-P1B konstrukt S1 (oba proteiny s homogenní glykosylací) RNDr. Terezou Skálovou, PhD. a Mgr. Janem Bláhou. Obrázek zobrazuje asymetrickou jednotku krystalu, nekovalentní dimer Clrb (šedivě) v komplexu s monomerní jednotkou kovalentního dimeru NKR-P1B (modře). Disulfidická spojení jsou vybarvena žlutě a znázorněna tyčkovým modelem. Rozlišení krystalové struktury je 3,26 Å. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL.

6 DISKUSE

Hlavní náplní tohoto diplomového projektu byla příprava dostatečného množství potkaních receptorů Clrb a NKR-P1B pro následné krystalizační experimenty provedené Mgr. Janem Bláhou v Henry Wellcome Building for Genomic Medicine, University of Oxford, UK.

Protein NKR-P1B v podobě fúzního konstruktů s Fc fragmentem IgG byl již úspěšně produkován v rámci diplomové práce Mgr. Anny Dvorské [73]. Zmíněné předešlé produkce se ale potýkaly s problémy, především pak v purifikačních krocích produkce NKR-P1B, kdy byly výtěžky požadované dimerní formy výrazně nižší, než výtěžky monomerní formy NKR-P1B. Problém byl také v separaci frakcí monomerní a dimerní formy při gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 200 10/300 GL. Rozlišení elučních vrcholů nebylo dostatečné a tento fakt vedl ke snížení množství čisté dimerní formy NKR-P1B pro krystalizační experimenty. Purifikace NKR-P1B v rámci tohoto diplomového projektu byla na základě předešlých výsledků upravena jednak použitím účinnější kolony pro gelovou permeační chromatografii Superdex 200 Increase 10/300 GL a jednak zrychlením purifikačních kroků. Purifikace tak byla provedena co nejdříve po sklizení produkční kultury a během jednotlivých purifikačních kroků nebyl vzorek znovu zamrazen. Díky tomu se podařilo získat dostatečné množství čisté dimerní formy NKR-P1B, se kterou byla následně provedena krystalizace komplexu s Clrb. Srovnání průběhu gelové permeační chromatografie obou zmíněných postupů je zobrazeno na obrázku 16 na straně 57.

Pro produkci proteinu Clrb, který byl v předchozích pracích rovněž produkován transientně [73], jsme se rozhodli ustavit stabilně produkující linii zavedením systému piggyBac. Cílem v zavedení tohoto systému byla jednak optimalizace produkčních podmínek, ale hlavně vytvoření jednotného a opakovatelného postupu, kterým by mohly být stabilně produkovány i další proteiny, kterými se v laboratoři zabýváme.

Ustavení linie stabilně produkující Clrb bylo úspěšné. Protože je systém piggyBac indukovatelný doxycyklinem, byl hlavním předmětem optimalizace vliv koncentrace doxycyklinu jako indukčního činidla na výtěžek produkce cílového proteinu. Rozsah počátečních koncentrací doxycyklinu byl zvolen na základě publikace [70], která se již touto problematikou zabývala. Z výsledků optimalizace stabilní produkce Clrb (viz tabulka 3 na straně 51) v závislosti na přídatku doxycyklinu je

zřejmé, že v rozsahu počátečních množství doxycyklinu použitým pro optimalizaci, se výtěžek zásadním způsobem nemění. Při vyšších koncentracích doxycyklinu je však zřejmá snížená viabilita a zároveň s tím klesá i výtěžek produkovaného proteinu. Přidávání dalších dávek doxycyklinu během produkční fáze nezvýšilo výtěžky produkce a lze ho tedy považovat za zbytečné s přihlédnutím k tomu, že každá další manipulace s produkční kulturou s sebou nese riziko možné kontaminace.

Na základě výsledků z produkce rClrb byla provedena produkce lidského NKR-P1A, abychom ověřili pozitivní zvýšení výtěžku i pro transientně obtížně produkovatelný protein. Ustavení linie stabilně produkující NKR-P1A bylo rovněž úspěšné a i zde bylo pozorováno výrazné, až desetinásobné, zvýšení výtěžku (srovnání s transientní produkcí je uvedeno na Obr. 14, str. 55 a Obr. 15, str. 56).

Další možnou veličinou pro optimalizaci (mimo koncentrace doxycyklinu) byla počáteční buněčná koncentrace a také vliv přítomnosti selekčních antibiotik v médiu. Tyto optimalizační pokusy prováděla Mgr. Barbora Kalousková v rámci své diplomové práce [75] na proteinu NKp80, kde jsou její výsledky uvedeny v tabulce 4 na straně 53. Ze srovnání s výsledky optimalizace produkce NKp80 vyplývá, že optimální počáteční koncentrace doxycyklinu je protein-dependентní. Zde je nutno zmínit, že NKp80 je vedle lidského NKR-P1A také zástupcem proteinů, které se transientně v lidské buněčné linii produkují jen s velmi malým výtěžkem. Dále je zřejmé, že počáteční buněčná koncentrace neovlivňuje výtěžek produkce zásadním způsobem. Produkci proteinů také neovlivňuje přítomnost selekčních antibiotik puromycinu a geneticinu.

Ze získaných dat je tedy možné shrnout následující: pro proteiny, které se dobře produkují při transientní produkci, je v systému piggyBac dostačující indukce jednou dávkou doxycyklinu na koncentraci 300 ng/ml při počáteční buněčné hustotě $1 \cdot 10^6$ b/ml. Pro proteiny, které jsou produkovány jen s malým výtěžkem, je vhodné množství doxycyklinu zvýšit až na 900 ng/ml, stejně jako je možné zvýšit počáteční buněčnou hustotu až na $5 \cdot 10^6$ b/ml, vyšší hustota už by ale mohla zapříčinit nízkou viabilitu a tím i dekompozici cílového proteinu proteasami uvolněnými z mrtvých buněk. Při problémech s výtěžkem pro nové proteiny, produkované systémem piggyBac, je tedy vhodné provést obdobnou optimalizaci alespoň pro počáteční množství doxycyklinu. Obdobné výsledky vychází i z publikace [70], z níž jsme vycházeli. Z té je také zřetelné, že optimální koncentrace doxycyklinu závisí na povaze

produkovaného proteinu, přesto pro většinu z testovaných je již koncentrace 300 ng/ml dostatečná.

Z optimalizačních experimentů a produkce proteinů systémem piggyBac vyplývá, že se nám zavedením tohoto systému podařilo zvýšit výtěžky exprese proteinů až desetinásobně ve srovnání s transientní produkcí a to jak u potkaního Clrb, tak u lidského NKR-P1A a NKp80. Tento systém tak zatím představuje nejefektivnější metodu přípravy rekombinantních proteinů v naší laboratoři.

Připravená rozpustná extracelulární doména potkaního receptoru Clrb a byla úspěšně vykrytalizována v deglykosylované formě jako nekovalentní dimer v asymetrické jednotce krystalu. Ve zdroji synchrotronového záření krystal poskytl difrakční data o rozlišení 1,45 Å. Struktura, řešená RNDr. Terezou Skálovou Ph.D., ještě není zcela hotová a model se bude nadále zpřesňovat. Pozice postranních řetězců aminokyselin se tak ještě jistě budou měnit. Nicméně, základní kostra struktury již bude pozměněna minimálně, a tak je už nyní možné říci, že struktura potkaního Clrb je velmi podobná dalším proteinům z rodiny CLEC2. Krytalizovaná dimerní forma sleduje klasický způsob dimerizace CLEC2 receptorů, stejný, jako je například u lidského receptoru CD69 a LLT1. Clrb obsahuje v asymetrické jednotce dimer, protože cystein, zodpovědný za kovalentní dimerizaci není v konstruktu C2 zahrnut. To naznačuje, že by se mohlo jednat o formu, v jaké Clrb interaguje s receptory na buněčné membráně. Struktura monomerní jednotky potom rovněž typicky obsahuje dva α helixy, dva anti-parallelní β listy a region dlouhé smyčky. Tvorba nekovalentního dimeru je v Clrb zprostředkována skrz interakci α_2 helixů.

Ve struktuře komplexu Clrb a NKR-P1B je v rámci asymetrické jednotky obsažen dimer Clrb ve stejném uspořádání, jako je diskutováno výše. Z potkaního NKR-P1B, které zde bylo krytalizováno ve formě kovalentního dimeru, se v jedné asymetrické jednotce nachází jedna doména. Druhá doména je v rámci krytalové struktury symetricky sdružená a interaguje s dimerem Clrb v další asymetrické jednotce. NKR-P1B rovněž sleduje sbalení CTLD a ve struktuře obsahuje dva α helixy, dva anti-parallelní β listy a region dlouhé smyčky, na rozdíl od Clrb je však dimerizace zprostředkována skrz α_1 helix. Podíl dimerní formy NKR-P1B vůči monomerní formě je při produkci tohoto receptoru jen velmi malý. Z toho důvodu byl protein NKR-P1B produkován jako chimerní protein s Fc fragmentem IgG, který napomáhá kovalentní

dimerizaci skrz cysteiny v krčkové oblasti proteinu. Tato oblast v krystalové struktuře není kvůli flexibilitě krčkové oblasti viditelná.

Nedávno byla publikována struktura komplexu homologních proteinů NKp65 s KACL [76]. Ve zmíněné struktuře homodimer KACL (homolog Clrb) interaguje s monomerním NKp65 (homolog NKR-P1B) stejným způsobem, jakým interagují v našem komplexu potkaní receptory. Rozdíl je v tom, že NKR-P1B, je na rozdíl od NKp65 v krystalu přítomen jako kovalentní dimer, který každou doménou interaguje s jiným dimerem Clrb. Toto uspořádání pak umožňuje řetězení dimerů obou vazebných partnerů. Zde také vyvstává myšlenka, že by toto řetězení mohlo být biologicky relevantní formou zesilování interakce mezi inhibičním ligandem a receptorem NK buňky. Zmíněné uspořádání také neodporuje publikované struktuře komplexu NKp65 a KACL, jen ji doplňuje o další doménu extracelulární části NK receptoru. Zde je ovšem třeba říci, že NKR-P1B tvoří přirozeně dimerní formu jen velmi málo a je pravděpodobné, že formu dimeru má na buněčné membráně jen malý podíl těchto receptorů. To ovšem neodporuje případné biologické relevanci, kdy by řetězení probíhalo jen v omezeném rozsahu několika málo molekul receptorů a ligandů; v opačném případě, kdy by tvorba dimerů NKR-P1B byla přirozeně vysoká, si lze představit, že by interakce byla takto zesílena až příliš a byla by tím porušena funkčnost rozeznávání NK buněčnými receptory založená na jemné rovnováze mezi aktivačními a inhibičními signály.

7 ZÁVĚR

- Za použití potkaního Clrb, konstruktu C2 a lidského NKR-P1A, konstruktů H4 byl zaveden a optimalizován expresní systém piggyBac jako nástroj pro tvorbu indukovatelných stabilně transfekovaných linií HEK293S GnTI.
- Potkaní NK buněčný receptor Clrb byl produkován ve stabilně transfekované linii HEK293S GnTI a purifikován v dostatečném množství pro proteinovou krystalizaci.
- Potkaní NK buněčný receptor NKR-P1B, konstrukt S1 byl produkován v transientně transfekované linii HEK293S GnTI a purifikován v dostatečném množství pro proteinovou krystalizaci.
- Byly získány krystaly Clrb, jež poskytly dostatečnou difrakci. Difrakční data byla použita pro řešení krystalové struktury Clrb.
- Byly získány krystaly komplexu Clrb a NKR-P1B, jež poskytly dostatečnou difrakci. Difrakční data byla použita pro řešení krystalové struktury tohoto komplexu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KIESSLING, R., KLEIN, E., WIGZELL, H.: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **1975**, 5(2), 112-117.
- [2] MIDDLETON, D., CURRAN, M., MAXWELL, L.: Natural killer cells and their receptors. *Transplant Immunology.* **2002**, 10(2-3), 147-164.
- [3] VIVIER, E., NUNÈS, A. J., VÉLY, F.: Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science.* **2004**, 306(5701), 1517-1519.
- [4] LONG, O. E.: Ready for Prime Time: NK Cell Priming by Dendritic Cells. *Immunity.* **2007**, 26(4), 385-387.
- [5] 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.
- [6] WANG D., MA Y., WANG J., LIU X., FANG M.: Natural Killer cells in Innate Defense against Infective Pathogens. *J. Clin. Cell. Immunol.* **2013**, S13(6).
- [7] RENARD, V., CAMBIAGGI, A., VÉLY, F., BLÉRY, M., OLCESE, L., OLIVERO, S., BOUCHET, M., VIVIER, E.: Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immun. Rev.* **1997**, 155, 205-221.
- [8] YOKOYAMA, W. M., SEAMAN, W. M.: The Ly49 and NKRP1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Ann. Rev. Immunol.* **1993**, 11, 613-635.
- [9] 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**, 155-168.
- [10] KELLEY, J., WALTER, L., TROWSDALE, J.: Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *P. Lo. S. Genet.* **2005**, 1, 129-139.
- [11] YOKOYAMA, W. M., PLOUGASTEL, B. F. M.: Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3, 304-316.
- [12] KIRKHAM, CH., CARLYLE, J.: Complexity and diversity of the NKR-P1:Clr (Klrh1:Clec2) recognition systems. *Front. in Immunol.* **2014**, 5, 1-16.
- [13] LI, Y., MARIUZZA, A. R.: Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors. *Frontiers in Immunology.* **2014**, 5(123), 1-20.
- [14] IIZUKA, K., NAIDENKO, O. V., PLOUGASTEL, B. F., FREMONT, D. H., YOKOYAMA W. M.: Genetically linked C-type lectin related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nat. Immunol.* **2003**, 4, 801-807.
- [15] LANIER, L. L.: NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, 23, 225-274.

-
- [16] KARRE, K., LJUNGGREN, H. G., PIONTEK, G., KIESSLING, R.: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. **1986**, 319, 675–678.
- [17] RAULET, D. H., VANCE, R. E.: Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 520–531.
- [18] ORR, M. T., LANIER, L. L.: Natural killer cell education and tolerance. *Cell*. **2010**, 142, 847–856.
- [19] HAO, L., KLEIN, J., NEI, M.: Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2006**, 103, 3192–3197.
- [20] LI, Y., HOFMANN, M., WANG, Q., TENG, L., CHLEWICKI, L. K., PIRCHER, H.: Structure of natural killer cell receptor KLRG1 bound to E-cadherin reveals basis for MHC-independent missing self recognition. *Immunity*. **2009**, 31, 35–46.
- [21] BARTEL, Y., BAUER, B., STEINLE, A.: Modulation of NK cell function by genetically coupled C-type lectin-like receptor/ligand pairs encoded in the human natural killer gene complex. *Front. Immunol.* **2013**, 4, 362.
- [22] CARLYLE, J. R., JAMIESON, A. M., GASSER, S., CLINGAN, C. S., ARASE, H., RAULET, D. H.: Missing self recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2004**, 101, 3527–3532.
- [23] FINE, J. H., CHEN, P., MESCI, A., ALLAN, D. S., GASSER, S., RAULET, D. H.: Chemotherapy-induced genotoxic stress promotes sensitivity to natural killer cell cytotoxicity by enabling missing self recognition. *Cancer Res.* **2010**, 70, 7102–7113.
- [24] ALDEMIR, H., PRODHOMME, V., DUMAURIER, M. J., RETIERE, C., POUPON, G., CAZARETH, J.: Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J. Immunol.* **2005**, 175, 7791–7795.
- [25] ROSEN, D. B., BETTADAPURA J., ALSHARIFI, M., MATHEW, P. A., WARREN, H. S., LANIER, L. L.: Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J. Immunol.* **2005**, 175, 7796–7799.
- [26] ROSEN, D. B., CAO, W., AVERY, D. T., TANGYE, S. G., LIU, Y. J., HOUCHINS, J. P.: Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J. Immunol.* **2008**, 180, 6508–6517.
- [27] GERMAIN, C., MEIER, A., JENSEN, T., KNAPNOUGEL, P., POUPON, G., LAZZARI, A.: Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- γ contributes to modulate immune responses. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 37964–37975.
- [28] WELTE, S., KUTTRUFF, S., WALDHAEUER, I., STEINLE, A.: Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat. Immunol.* **2006**, 7, 1334–1342.

-
- [29] KLIMOSCH, S. N., BARTEL, Y., WIEMANN, S., STEINLE, A.: Genetically coupled receptor-ligand pair NKp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses. *Blood*. **2013**, 122, 2380–2399.
- [30] CHEN, P., BELANGER, S., AGUILAR, O. A., ZHANG, Q., ST-LAURENT, A., RAHIM, M. M.: Analysis of the mouse 129-strain Nkrp1-Clr gene cluster reveals conservation of genomic organization and functional receptor-ligand interactions despite significant allelic polymorphism. *Immunogenetics*. **2011**, 63, 627–640.
- [31] KVEBERG, L., DAI, K. Z., INNGJERDINGEN, M., BROOKS, C. G., FOSSUM, S., VAAGE, J. T.: Phylogenetic and functional conservation of the NKR-P1F and NKR-P1G receptors in rat and mouse. *Immunogenetics*. **2011**, 63, 429–436.
- [32] VOGLER, I., STEINLE, A.: Vis-a-vis in the NKC: genetically linked natural killer cell receptor/ligand pairs in the natural killer gene complex (NKC). *J. Innate Immun.* **2011**, 3, 227–235.
- [33] ZHANG, Q., RAHIM, M. M., ALLAN, D. S., TU, M. M., BELANGER, S., ABOU-SAMRA, E.: Mouse Nkrp1-Clr gene cluster sequence and expression analyses reveal conservation of tissue-specific MHC-independent immunosurveillance. *P. Lo. S. One*. **2012**, 7, e50561.
- [34] RAHIM, M. M., CHEN, P., MOTTASHED, A. N., MAHMOUD, A. B., THOMAS, M. J., ZHU, Q., BROOKS, C. G., KARTSOGIANNIS, V., GILLESPIE, M. T., CARLYLE, J. R., MAKRIGIANNIS, A. P.: The mouse NKR-P1B: Clr-b recognition system is a negative regulator of innate immune responses. *Blood*. **2015**, 125(14), 2217-2227.
- [35] VOIGT, S., MESCI, A., ETTINGER, J., FINE, J. H., CHEN, P., CHOU, W.: Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity*. **2007**, 26, 617–627.
- [36] DRICKAMER, K.: Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* **1988**. 263, 9557–9560.
- [37] PLOUGASTEL, B., DUBBELDE, C., YOKOYAMA, W. M.: Cloning of Clr, a new family of lectin-like genes localized between mouse Nkrp1a and Cd69. *Immunogenetics*. **2001**, 53, 209–214.
- [38] SOVOVA, Z., KOPECKY, V. J., PAZDERKA, T., HOFBAUEROVA, K., ROZBESKY, D., VANEK, O.: Structural analysis of natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) extracellular domains suggests a conserved long loop region involved in ligand specificity. *J. Mol. Model.* **2011**, 17, 1353–1370.
- [39] SKÁLOVÁ, T., KOTÝNKOVÁ, K., DUŠKOVÁ, J., HAŠEK, J., KOVAL, T., KOLENKO, P., NOVÁK, P., MAN, P., HANČ, P., VANĚK, O., BEZOUŠKA, K., DOHNÁLEK, J.: Mouse Clr-g, a ligand for NK cell activation receptor NKR-P1F: crystal structure and biophysical properties. *J. Immunol.* **2012**, 189(10), 4881-4889.

-
- [40] 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. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2015**, 71(3), 578-591.
- [41] ARASE, H., MOCARSKI, E. S., CAMPBELL, A. E., HILL, A. B., LANIER, L. L.: Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. **2002**, 296(5571), 1323-1326.
- [42] SMITH, H. R., HEUSEL, J. W., MEHTA, I. K., KIM, S., DORNER, B. G., NAIDENKO, O. V., IIZUKA, K., FURUKAWA, H., BECKMAN, D. L., PINGEL, J. T., SCALZO, A. A., FREMONT, D. H., YOKOYAMA, W. M.: Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2002**, 99, 8826-8831.
- [43] DANIELS, K. A., DEVORA G., LAI W. C., O'DONNELL C. L., BENNETT M., WELSH R. M.: Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* **2001**, 194, 29-44.
- [44] VOIGT S., SANDFORD G. R., DING L., BURNS W. H.: Identification and Characterization of a Spliced C-Type Lectin-Like Gene Encoded by Rat Cytomegalovirus. *J. Virol.* **2001**, 75, 603-611.
- [45] WALSH, G.: Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology.* **2014**, 32, 992-1000.
- [46] SCHMIDT, F. R.: Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 65(4), 363-372.
- [47] SCHETZ, J. A., SHANKAR, E. P.: Protein expression in the Drosophila Schneider 2 cell system. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2004**, 4, 4.16.
- [48] KIM, J. Y., KIM, Y. G., LEE, G. M.: CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 93, 917-930.
- [49] BIRCH, J. R., ONAKUNLE, Y.: Biopharmaceutical proteins: opportunities and challenges. *Methods. Mol. Biol.* **2005**, 308, 1-16.
- [50] GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C., NAIRN, R.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **1977**, 36, 59-74.
- [51] LANZAVECCHIA, A., CORTI, D., SALLUSTO, F.: Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr Opin Biotechnol.* **2007**, 18(6), 523-528.
- [52] BANDARANAYAKE, A. D., ALMO, S. C.: Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett.* **2014**, 588(2), 253-260.
- [53] JAYAPAL, K., WLASCHIN, K.: Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* **2007**. 103, 40-44.

-
- [54] BOSQUES, C. J., COLLINS, B. E., MEADOR, J. W., SARVAIYA, H., MURPHY, J. L., DELLORUSSO, G., BULIK, D. A., HSU, I. H., WASHBURN, N., SIPSEY, S. F., MYETTE, J. R., RAMAN, R., SHRIVER, Z., SASISEKHARAN, R., VENKATARAMAN, G.: Chinese hamsterovary cells can produce galactose- α -1,3-galactose antigens on proteins. *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 1153–1156.
- [55] GRAHAM, F. L., VAN DER EB, A. J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* **1973**, 52, 456–467.
- [56] GRAHAM, F. L.: Growth of 293 cells in suspension culture. *J. Gen. Virol.* **1987**, 68(3), 937–940.
- [57] GARNIER, A., CÔTÉ, J., NADEAU, I., KAMEN, A., MASSIE, B.: Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology.* **1994**, 15, 145–155.
- [58] DU BRIDGE, R. B., TANG, P., HSIA, H. C., LEONG, P. M., MILLER, J. H., CALOS, M. P.: Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, 7, 379–387.
- [59] DUROCHER, Y., PERRET, S., KAMEN, A.: High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, e9.
- [60] REEVES, P. J., CALLEWAERT, N., CONTRERAS, R., KHORANA, H. G.: Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, 99(21), 13419-13424.
- [61] ELBEIN, A. D., TROPEA, J. E., MITCHELL, M., KAUSHAL, G. P.: Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I. *Journal of Biological Chemistry.* **1990**, 265(26), 15599-15605.
- [62] JOANNE, E.: Structural Biology of Glycoproteins. Glycosylation [online]. *In. Tech.* **2012**, ISBN 978-953-51-0771-2.
Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/glycosylation/structural-biology-of-glycoproteins>.
- [63] BALDI, L., HACKER, D. L., ADAM, M., WURM, F. M.: Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol. Lett.* **2007**, 29, 677–684.
- [64] SORRELL, D. A., ROBINSON, C. J., SMITH, J. A., KOLB, A. F.: Recombinase mediated cassette exchange into genomic targets using an adenovirus vector. *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, e123.
- [65] BANDARANAYAKE, A. D., CORRENTI, C., RYU, B. Y., BRAULT, M., STRONG, R. K., RAWLINGS, D. J.: Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, e143.
- [66] WOODARD, L. E., WILSON, M. H.: piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends in biotechnology.* **2015**, 33(9), 525-533.

-
- [68] LEY, D., VAN ZWIETEN, R., PUTTINI, S., IYER, P., COCHARD, A., MERMOD, N.: A PiggyBac-mediated approach for muscle gene transfer or cell therapy. *Stem cell research*. **2014**, 13(3), 390-403.
- [69] SARIDEY, S. K., LIU, L., DOHERTY, J. E., KAJA, A., GALVAN, D. L., FLETCHER, B. S., WILSON, M. H.: PiggyBac transposon-based inducible gene expression in vivo after somatic cell gene transfer. *Molecular Therapy*. **2009**, 17(12), 2115-2120.
- [70] LI, Z., MICHAEL, I. P., ZHOU, D., NAGY, A., RINI, J. M.: Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2013**, 110(13), 5004-5009.
- [71] CAMPBELL, K. S., & COLONNA, M.: Natural killer cell protocols. *Humana*. **2010**, ISBN 978-1-60761-361-9.
- [72] SCHOLZ, J., BESIR, H., STRASSER, C., & SUPPMANN, S.: A new method to customize protein expression vectors for fast, efficient and background free parallel cloning. *BMC biotechnology*. **2013**, 13(1), 1.
- [73] DVORSKÁ, A.: Strukturní biologie komplexu potkaních NK buněčných receptorů NKR-P1B a Clrb. Diplomová práce, PřF UK Praha, **2014**.
- [74] PROKOPOVÁ, T.: Produkce a purifikace rekombinantního receptoru Clrb. Bakalářská práce, PřF UK, Praha **2015**.
- [75] KALOUSKOVÁ, B.: Příprava lidského NK buněčného aktivačního receptoru NKp80 a jeho ligandu AICL. Diplomová práce, PřF UK Praha, **2016**.
- [76] 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. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2013**, 110(28), 11505-11510.

