

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Biochemie



Štěpán Herynek

**REKOMBINANTNÍ PŘÍPRAVA JADERNÉHO  
ANTIGENU PROLIFERUJÍCÍCH BUNĚK (PCNA)**

Bakalářská práce

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

Praha 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

---

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za konzultace spojené s touto prací a také za naměření a vyhodnocení dat z analytické ultracentrifugy. Velký dík také patří Mgr. Janu Bláhovi za poskytnutí vstupního materiálu a za cenné rady. Za veškerou pomoc, kterou jsem během práce potřeboval, bych rád ještě poděkoval Mgr. Barboře Kalouskové a Mgr. Ondřeji Skořepovi. Na závěr patří velký dík celému kolektivu laboratoře 204, který mi vytvořil příjemné pracovní prostředí.

## Abstrakt

NK buňky (z anglického natural killer cells) jsou buňky přirozené imunity. Jejich úkolem je rozpoznávat a likvidovat nádorové nebo například viry infikované buňky. K rozpoznání takto postižených buněk slouží NK buňkám řada povrchových receptorů. Tyto receptory mohou být aktivační, které aktivují cytotoxickou odpověď NK buňky vedoucí k vyvolání apoptosy u cílové buňky, nebo inhibiční, které naopak tuto odpověď NK buněk inhibují. Zda dojde k vyvolání cytotoxické odpovědi záleží na obou typech NK receptorů.

Receptor NKp44 patří do rodiny imunoglobulinových receptorů a je to jeden z aktivačních receptorů. Svými vlastnostmi je NKp44 velmi ojedinělý. Dalšími aktivačními receptory z rodiny imunoglobulinových receptorů jsou NKp46 a NKp30.

V nedávné době byla popsána interakce mezi receptorem NKp44 a jaderným antigenem proliferujících buněk (PCNA) (z anglického proliferating cell nuclear antigen). PCNA je svorkový protein, který hraje klíčovou roli při replikaci a opravách DNA, neboť ukotvuje proteiny replisomu.

Tato práce se zaměřuje na produkci proteinu PCNA a její optimalizaci, a na přípravu expresních vektorů pro pozdější produkci NK receptorů NKp44 a NKp46. Interakce tohoto proteinu se zmíněným receptorem bude zkoumána později. Ze stejného důvodu je připravován i expresní vektor pro protein NKp46.

Protein PCNA byl připraven rekombinantně za využití expresních systémů bakterie *Escherichia coli* BL21(DE3) a lidské buněčné linie HEK293S GnTI. V eukaryotickém systému HEK293S GnTI byla provedena intracelulární i sekretovaná exprese a protein byl purifikován pomocí afinitní chelatační chromatografie a následné gelové permeační chromatografie. Při purifikaci PCNA produkovaného intracelulárně jim ještě předcházela iontově výměnná chromatografie.

Dále byly připraveny vektory obsahující geny kódující expresní konstrukty NK receptorů NKp44 a NKp46 vnesením úseků jejich genů do plasmidu pTW5sec pro pozdější sekretovanou produkci v HEK293S GnTI. Příprava vektorů s geny pro NK receptory proběhla úspěšně, což bylo ověřeno DNA sekvenací. Podařilo se připravit i PCNA, které bylo úspěšně analyzováno pomocí SDS elektroforézy a analytické ultracentrifugace.

## Klíčová slova

NKp44, NKp46, PCNA, rekombinantní exprese, HEK293

## Abstract

Natural killer (NK) cells are cells of native immunity. Their task is to recognize and destroy tumor cells or, for example, viruses infected cells. NK cells use a number of surface receptors to recognize affected cells. These receptors may be activating, i.e., activate the cytotoxic response of NK cells leading to the induction of apoptosis in the target cell, or inhibitory ones, which, on the other hand, inhibit NK cell response. Whether a cytotoxic response occurs depends on both types of NK receptors.

The NKp44 receptor belongs to the family of immunoglobulin receptors and it is one of the activating receptors. Its properties are very unique among other receptors. Other activating receptors of the immunoglobulin receptor family are NKp46 and NKp30.

Recently, the interaction between the NKp44 receptor and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) has been described. PCNA is a clamp protein that plays a key role in DNA replication and repair as it anchors replication proteins.

This work focuses on the production and optimization of a production of PCNA and on the preparation of expression vectors for the later production of NKp44 and NKp46. Interaction of NKp44 and PCNA will be investigated later. For the same reason, the expression vector for the NKp46 protein is also prepared in this work.

PCNA protein was prepared recombinantly using expression systems of *Escherichia coli* BL21 (DE3) and human HEK293S GnTI<sup>-</sup> cell line. The intracellular and secreted expression was performed in the HEK293S GnTI<sup>-</sup> eukaryotic system and the protein was purified by affinity chelating chromatography followed by gel permeation chromatography. Purification of PCNA produced intracellularly was preceded by ion-exchange chromatography.

In addition, vectors containing genes encoding NKp44 and NKp46 NK receptor expression constructs were prepared by introducing sections of their genes into plasmid pTW5sec for later secreted production in HEK293S GnTI<sup>-</sup>. The preparation of vectors with genes for NK receptors was successful, which was verified by DNA sequencing. PCNA was successfully prepared and analyzed by SDS electrophoresis and analytical ultracentrifugation.

## Keywords

NKp44, NKp46, PCNA, recombinant expression, HEK293

## Seznam zkratek

AA	akrylamid
APS	peroxosíran amonný (z anglického ammonium persulfate)
CBR	barva Coomassie Brilliant Blue
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
dNTP <sub>S</sub>	deoxynukleotidtrifosfáty
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z anglického ethylenediaminetetraacetic acid)
HA	hemaglutinin (protein viru chřipky)
HLA	lidský leukocytový antigen (z anglického human leukocyte antigen)
HMPV	lidský metapneumovirus
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
ITAM	imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrosinu (z anglického immunoreceptor tyrosine - based activation motif)
ITIM	imunoreceptorový inhibiční motiv na bázi tyrosinu (anglického immunoreceptor tyrosin – based inhibition motif)
KARAP	polypeptid asociovaný s aktivovaným receptorem NK buněk (z anglického killer activated receptor - associated polypeptide)
IPEI	lineární polyethylenimin
MHC gp	glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu (z anglického major histocompatibility complex glycoprotein)
NCR	receptor přirozené cytotoxicity (z anglického natural cytotoxicity receptor)
NK	přirozený zabiják (z anglického natural killer)
NKp30	receptor NK buněk o velikosti 30 kDa (z anglického natural killer cell protein 30 kDa)
NKp44	receptor NK buněk o velikosti 44 kDa (z anglického natural killer cell protein 44 kDa)
NKp46	receptor NK buněk o velikosti 46 kDa (z anglického natural killer cell protein 46 kDa)
PBMC	jednojaderné buňky periferní krve (z anglického peripheral blood mononuclear cells)
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk (z anglického proliferating cell nuclear antigen)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z anglického polymerase chain reaction)
PDB ID	kód označující protein s vyřešenou strukturou v proteinové databance
PMSF	fenylmethan sulfonylfluorid (z anglického phenylmethane sulfonyl fluoride)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS
SDS	dodecylsulfát sodný (z anglického sodium dodecylsulfate)

# Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	NK buňky.....	10
1.1.1	Rozpoznávání cíle NK buňkami .....	10
1.1.2	Receptory NK buněk.....	11
1.1.2.1	Receptory přirozené cytotoxicity.....	12
1.1.2.1.1	Receptor NKp46.....	13
1.1.2.1.1.1	Struktura receptoru NKp46.....	13
1.1.2.1.2	Receptor NKp44.....	15
1.1.2.1.2.1	Struktura receptoru NKp44.....	15
1.1.3	Protein PCNA.....	16
1.1.3.1	Struktura proteinu PCNA.....	17
1.1.4	Interakce NKp44 s PCNA.....	17
1.1.4.1	Komplex PCNA s HLA I. třídy .....	19
2	Cíle práce .....	20
3	Materiál .....	21
3.1	Použité přístroje .....	21
3.2	Použité chemikálie.....	22
3.2.1	Enzymy .....	22
3.2.2	Pufry a roztoky .....	22
3.2.3	DNA klony .....	23
3.2.4	PCR a sekvenční primery .....	23
3.3	Buněčné kmeny a linie.....	24
3.4	Soupravy .....	24
4	Metody .....	26
4.1	Příprava zásobních a pracovních roztoků DNA klonů .....	26
4.2	Amplifikace genů pomocí PCR .....	26
4.3	Štěpení plasmidů.....	27

4.4	Agarosová elektroforéza .....	27
4.5	Přečištění vzorků z agarosového gelu.....	28
4.6	Měření koncentrace a čistoty DNA .....	29
4.7	Vnesení genu do linearizovaného plasmidu .....	29
4.8	Transformace kompetentních buněk.....	30
4.9	Zrychlená metoda transformace kompetentních buněk .....	30
4.10	Nízkoobjemová příprava plasmidové DNA .....	30
4.11	Sekvenování plasmidové DNA .....	31
4.12	Velkoobjemová příprava plasmidové DNA .....	32
4.13	Transfekce buněčné linie HEK293S GnTI .....	32
4.14	Produkce proteinů v bakteriálním expresním systému.....	33
4.15	Chelatační afinitní chromatografie .....	34
4.16	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	34
4.17	Iontově výměnná chromatografie.....	36
4.18	Koncentrování proteinových vzorků .....	36
4.19	Gelová permeační chromatografie .....	36
4.20	Měření koncentrace proteinů.....	36
4.21	Sedimentační analýza .....	37
5	Výsledky .....	38
5.1	Příprava plasmidů obsahujících geny pro proteiny NKp44, NKp46 a PCNA.....	38
5.2	Příprava proteinu PCNA .....	43
5.2.1	Produkce PCNA v bakteriálním expresním systému .....	43
5.2.2	Produkce PCNA v expresním systému HEK293 .....	46
5.2.3	Analýza oligomerního stavu PCNA.....	49
6	Diskuse.....	51
7	Závěr .....	53



8	Citovaná literatura.....	54
---	--------------------------	----

# 1 Úvod

## 1.1 NK buňky

NK buňky (z anglického natural killer – „přirozený zabiják“), které byly objeveny již před více než 40 lety, jsou klíčové buňky imunitního systému. NK buňky tvoří asi 15% všech v těle cirkulujících lymfocytů [1]. Vznikají diferenciací myeloidních multipotentních lymfocytů, což jsou buňky kostní dřeně [2]. Jde o složku nespecifické imunity, takže na rozdíl od T a B lymfocytů u NK buněk nenajdeme antigenně specifické receptory. NK buňky obsahují množinu různých receptorů. Úkolem těchto buněk je zabít buňky infikované viry či nádorové buňky. Zejména proto se NK buňky staly cílem zájmu mnoha vědeckých týmů, které studují potenciální klinické aplikace NK buněk například pro imunoterapii při léčbě nádorových onemocnění. Klinický výzkum se orientuje zejména na použití cytokinů k aktivaci NK buněk *in vivo*, použití monoklonálních protilátek ke zvýšení funkce NK buněk, nebo adoptivní přenesení NK buněk s protinádorovou aktivitou [3].

Zabíjení infikované či jinak poškozené buňky je zprostředkováno tzv. cytotoxickými molekulami (proteiny), které u NK buněk najdeme v sekrečních lysozomech. Rozpoznání cílové buňky indukuje tvorbu synapse, přes kterou jsou do této buňky pomocí sekreční lysozomální exocytosy vpraveny cytotoxické molekuly [4]. Ty poté vyvolají apoptosu cílové buňky.

### 1.1.1 Rozpoznávání cíle NK buňkami

Aby NK buňky zabíjely pouze cílové buňky, a ne veškeré živé buňky, musí být schopné od sebe tyto buňky rozlišit. K tomu jim slouží povrchové receptory (NK receptory), jejichž úkolem je rozpoznávat příslušné ligandy ukotvené v membránách cílových buněk. NK receptory jsou membránové proteiny, exprimované NK buňkami, které se dělí do 2 skupin – receptory aktivační a inhibiční. Dnes je známo několik desítek těchto receptorů. Na molekulární úrovni se liší aktivační a inhibiční receptory signalizačními motivy uvnitř buňky, které jsou zodpovědné za přenos signálu a vyvolání aktivační nebo inhibiční odpovědi. Inhibiční receptory jsou díky asociaci s cytoplasmatickými fosfatasami zodpovědné za rušení signalizačních drah zahájených aktivačními receptory asociovanými s příslušnými proteinkinasami [5].

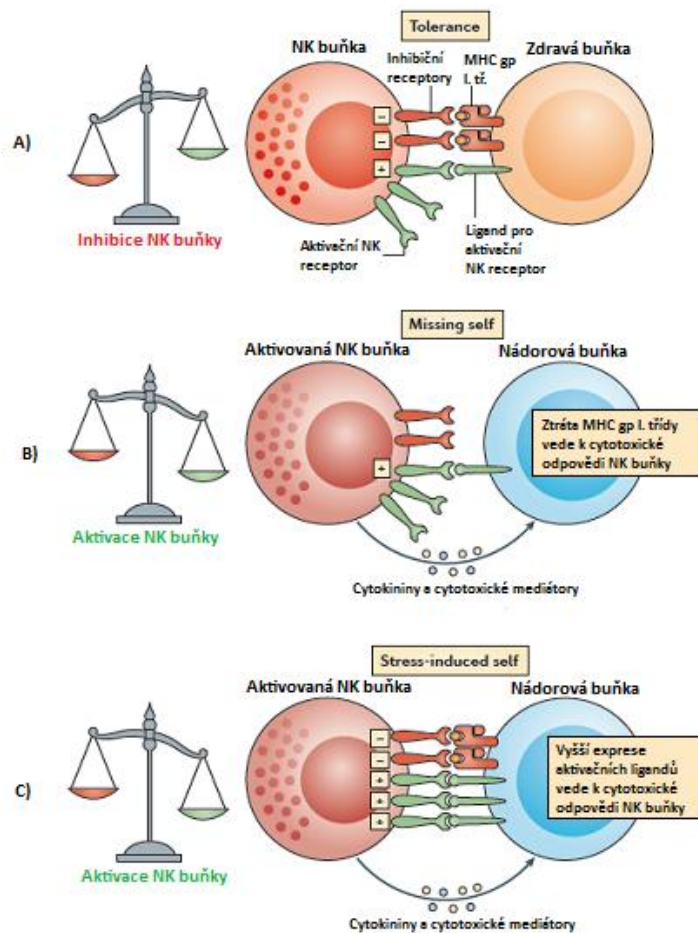
## 1.1.2 Receptory NK buněk

Inhibiční receptory, které jsou specifické pro lidský leukocytový antigen (HLA, z angl. human leukocyte antigen) I. třídy umožňují NK buňkám detekovat a zabíjet buňky, které nemají na svém povrchu exprimované antigeny HLA I. třídy (nebo jich mají nedostatek). Na povrchu všech zdravých jaderných buněk by se měly nacházet MHC glykoproteiny I. třídy (z anglického major histocompatibility complex, dále jen MHC gp I. třídy) [6]. MHC gp I. třídy byly objeveny před více než padesáti lety během pokusů, které objasnily odvrhnutí štěpu po transplantaci imunitním systémem, za kterou jsou tyto asi 44 kDa velké glykoproteiny zodpovědné. Proto se také označují jako transplantační antigeny [7]. Nepřítomnost těchto glykoproteinů vyvolá spuštění imunitní odpovědi NK buněk. V případě, že dojde k vyvolání apoptozy NK buňkou chybějícími MHC gp I. třídy, mluvíme o tzv. „missing-self“ hypotéze. Absence MHC gp I. třídy se může objevit u nádorových nebo viry infikovaných buněk. Rozpoznání MHC gp I. třídy inhibičními receptory zabrání vyvolání apoptozy u cílové buňky [6].

Vyvolání samotné apoptozy NK buňkou, jakožto imunitní odpovědi, závisí zároveň na aktivačních receptorech. Během aktivace odpovědi NK buňky jde tedy o jistou formu rovnováhy mezi interakcí aktivačních a inhibičních receptorů s jejich protějšky, jak je znázorněno na Obr. 1, str. 12.

Jedním z důležitých faktorů při imunitní odpovědi zprostředkované NK buňkami je proto exprese ligandů pro aktivační receptory cílovými buňkami. Tyto ligandy na základě interakce s receptory NK buněk indukují cytolytickou aktivitu a produkci cytokinů [9]. V takovém případě se hovoří o tzv. „stress induced-self“ hypotéze [8].

NK receptory lze ještě rozdělit na základě jejich molekulární struktury na dvě skupiny – NK receptory příbuzné imunoglobulinům a NK receptory příbuzné C-lektinům. V obou těchto skupinách se nacházejí jak receptory aktivační, tak inhibiční [5]. V této práci se budeme zabývat některými imunoglobulinovými receptory.



**Obrázek 1: Aktivace NK buňky interakcí aktivačních a inhibičních NK receptorů.** A) Nedochozí k aktivaci cytotoxické odpovědi, neboť zdravá buňka má na povrchu dostatek MHC gp I. třídy a zároveň nemá na svém povrchu nadměru ligandů pro aktivační receptory. B) Dochází k aktivaci imunitní odpovědi NK buňky, neboť chybí MHC gp I. třídy. C) Dochází k aktivaci imunitní odpovědi NK buňky, protože na povrchu nádorové buňky je velký počet aktivačních receptorů. Převzato z [8].

### 1.1.2.1 Receptory přirozené cytotoxicity

Receptory přirozené cytotoxicity (NCR, z anglického natural cytotoxicity receptors) jsou transmembránové proteiny, patřící do superrodiny imunoglobulinových receptorů. Mají jednu až dvě extracelulární domény, které jsou zodpovědné za vazbu ligandů [10]. Ligandy pro receptory NCR jsou polypeptidy ukotvené v membránách cílových buněk [11]. Transmembránová část NCR obsahuje pozitivně nabitou aminokyselinu a může interagovat se signálními adaptačními proteiny, které obsahují imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrosinu (ITAM, z anglického immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Také existují inhibiční motivy založené na imunoreceptoru na bázi tyrosinu (ITIM, z anglického immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif), které při fosforylaci využívají tyrosin-fosfatasy, které inhibují buněčnou aktivaci. Tento motiv je

častěji pozorován u inhibičních receptorů, ale najdeme jej například i u aktivačního receptoru NKp44 (viz kap. 1.1.2.1.2). Na rozdíl od inhibičních receptorů mají aktivační receptory kratší intracelulární doménu, která se nekovalentně pojí se signalizačním adaptérem DAP12, který obsahuje ITAM [3].

Tři z NCR receptorů exprimovaných NK buňkami byly objeveny v devadesátých letech. Jde o NK receptory NKp46, NKp44 a NKp30 (NKp, z anglického natural killer cell protein, číslo udává velikost proteinu v kDa) [10].

#### **1.1.2.1.1 Receptor NKp46**

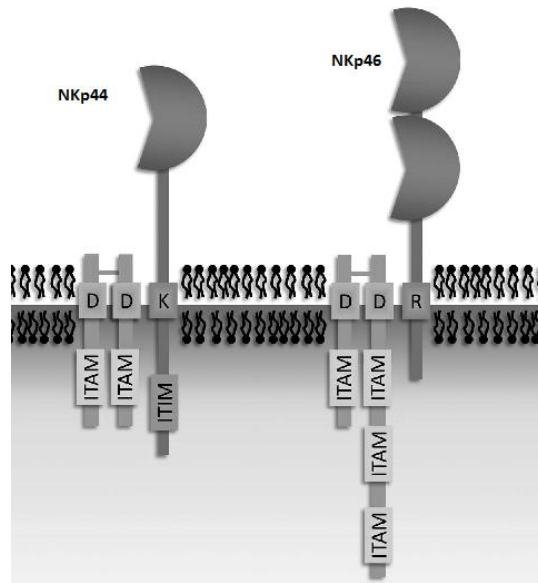
NK receptor NKp46 byl objeven jako první z uvedené trojice a je také považován za hlavní receptor přirozené cytotoxicity [10, 12]. První identifikovaný ligand pro tento receptor byl hemagglutinin (HA), což je protein viru chřipky. To bylo potvrzeno *in vivo* experimenty na myších [13], které mají ortolog tohoto receptoru NCR1. Ukázalo se, že myši bez tohoto receptoru jsou náchylnější k chřipkové infekci. NKp46 může dále být aktivován například při styku s buňkou nakaženou lidským metapneumovirem (HMPV), což je respirační virus objevený v roce 2001, který je zodpovědný za akutní infekci dýchacích cest u asi 70% kojenců a dětí. Dále bylo prokázáno, že NKp46 (i jeho ortolog NCR1 u myši) ovlivňuje průběh diabetu I. a II. typu, jaterní fibrosy, nádorových onemocnění a dalších nemocí [13].

##### **1.1.2.1.1.1 Struktura receptoru NKp46**

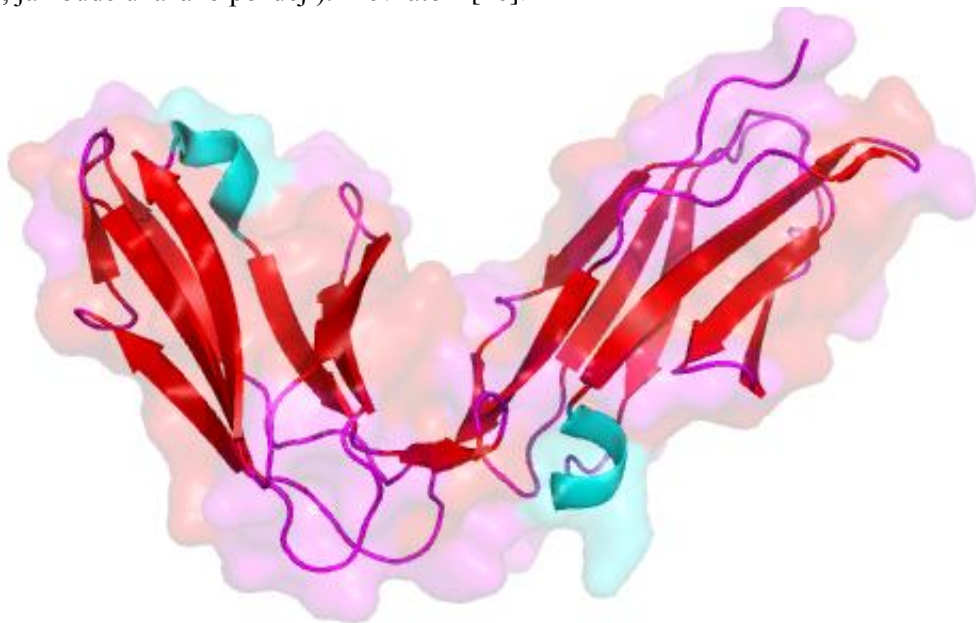
Gen kódující tento receptor je uložen na 19. chromosomu. NKp46 je 46 kDa velký glykoprotein, který má dvě extracelulární imunoglobulinové domény (schématické znázornění viz Obr. 2, str. 14) tvořené 188 aminokyselinami. Tyto domény NKp46 se označují jako D1 a D2 a zahrnují aminokyseliny 1 – 94 a 101 – 188, které jsou spojeny krátkým spojovacím článkem (zbytky 95 – 100).

Extracelulární domény jsou tvořeny primárně  $\beta$ -listy, které jsou uspořádána do  $\beta$ -antiparalelní struktury. Obě domény také obsahují krátký úsek ve strukturní formě  $\alpha$ -helixu, který se nachází mezi dvěma úseky  $\beta$ -listů (aminokyseliny 66 – 68 a 158 – 160). Navzdory poměrně malé podobnosti aminokyselin v obou extracelulárních doménách (22% identických aminokyselin na konkrétních pozicích) jsou si obě domény strukturně velmi blízké [14]. Extracelulární část NKp46 je zobrazena na Obr. 3, str. 14. Tyto domény jsou propojeny transmembránovou částí (peptidovým řetězcem o asi 25 aminokyselinách)

s cytoplazmatickou doménou, která je tvořena asi 30 aminokyselinami. Transmembránový segment obsahuje kladně nabitou aminokyselinu arginin [15].



**Obrázek 2: Schématické porovnání receptorů NKp44 a NKp46.** NKp44 (vlevo) s jednou extracelulární doménou a lysinem jakožto kladně nabitou aminokyselinou v transmembránové části receptoru; NKp46 (vpravo) se dvěma extracelulárními doménami pro vazbu ligandů a argininem jakožto kladně nabitou aminokyselinou v transmembránové části receptoru. Kladně nabité aminokyseliny v transmembránové části proteinu umožňují interakci s molekulami obsahujícími ITAM, které přenášejí aktivační signál do NK buňky. U receptoru NKp44 si můžeme všimnout i inhibičního motivu ITIM, který může být aktivován vazbou na určité ligandy (jako například PCNA, jak bude ukázáno později). Převzato z [10].



**Obrázek 3: Extracelulární část proteinu NKp46.** Části proteinu ve formě  $\alpha$ -helixy jsou znázorněny světle modře,  $\beta$ -skládaný list červeně a řetězce pojící jednotlivé útvary sekundární struktury jsou znázorněny fialovou barvou. Zobrazení struktury bylo vytvořeno v programu PyMol [16] dle struktury PDB ID 1OLL [14].

### **1.1.2.1.2 Receptor NKp44**

Tato molekula byla objevena v roce 1998. Jde o receptor exprimovaný specificky NK buňkami, který se účastní lýzy nádorových buněk. Nádorové buňky jsou rozpoznávány interakcí jiných molekul než MHC gp I. třídy [17]. Receptor NKp44 se také označuje názvem NCR2. Předpokládá se, že NKp44 tvoří v krystalickém stavu dimer a je jediným NCR z uvedené trojice, který je exprimován pouze NK buňkami v aktivovaném stavu [18]. Bylo prokázáno, že pro expresi NKp44 je stěžejní molekula KARAP/DAP12 (z anglického killer activated receptor-associated polypeptide). Jde o molekulu, o které se předpokládá, že je zodpovědná za přenos signálu z receptoru dovnitř do buňky díky asociaci s kladně nabitým lysinem v transmembránové části proteinu [19].

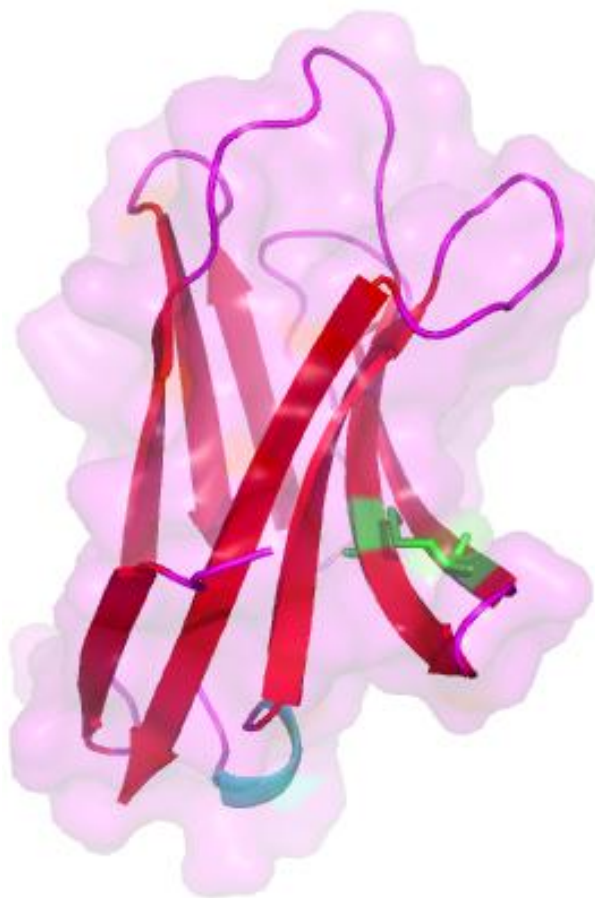
Gen kódující NKp44 nebyl dosud v genomu myši lokalizován, proto zatím neexistuje vhodný model pro zkoumání NKp44. Ligandy NKp44 zůstávají do značné míry neznámé. Svorkový protein PCNA (z anglického proliferating cell nuclear antigen) je nadměrně exprimován v nádorových buňkách a je receptorem NKp44 rozpoznáván. Ukázalo se také, že NKp44 se podílí na rozpoznávání buněk nakažených některým z chřipkových virů [20]. Dále je známo, že aktivační ligandy pro NKp44 jsou ve zvýšené míře produkovány například v buňkách nakažených virem HIV [21].

#### **1.1.2.1.2.1 Struktura receptoru NKp44**

Na rozdíl od většiny ostatních genů, které kódují jak aktivační, tak inhibiční receptory NK buněk, je gen pro NKp44 u lidí lokalizován na 6. chromosomu [19]. Tento 44 kDa velký receptor má jednu extracelulární doménu pro vytvoření vazby s ligandem [18]. Schématické znázornění zmíněných NK receptorů je zobrazeno na Obr. 2, str. 14.

Extracelulární doména receptoru NKp44 je tvořena 168 aminokyselinami. Transmembránový segment je tvořen 25 aminokyselinami a cytoplazmatická doména 63 aminokyselinami. Extracelulární doména je s transmembránovou částí proteinu spojena peptidem o 55 aminokyselinách, který dle predikce obsahuje 13 míst pro O-glykosylaci a 1 místo pro N-glykosylaci. Prostorové uspořádání extracelulární části tohoto receptoru odpovídá uspořádání imunoglobulinového proteinu s tím, že struktura NKp44 obsahuje navíc jeden disulfidický můstek mezi cysteiny 37 a 45, jak je vyznačeno na Obr. 4, str. 16. Tento disulfidický můstek nebyl pozorován u jiných imunoglobulinových proteinů a je tak charakteristickým rysem receptoru NKp44. Jeho úkolem je stabilizace vlásenky mezi

$\beta$ -listy, která jsou tímto disulfidickým můstkem propojena. Tato dvě vlákna navíc tvoří povrchový žlábek (stejně tak jako ještě další dva  $\beta$ -listy extracelulární domény), která jsou také ojedinělým znakem tohoto receptoru. Podobný strukturální prvek je například znám ještě u některých imunoglobulinových receptorů T buněk. U imunoglobulinové domény NKp44 je ještě neobvyklé rozložení aminokyselin nesoucích kladný náboj, které jsou více méně lineárně uspořádány na povrchu zmíněného žlábku. Tento znak doposud nebyl pozorován u jiného imunoglobulinového receptoru. Struktura je tvořena osmi vlákny, která jsou složena do dvou antiparalelních  $\beta$ -listů, jak ukazuje Obr. 4 [18].



**Obrázek 4: Imunoglobulinová doména proteinu NKp44.** Části proteinu ve formě  $\alpha$ -helixu jsou znázorněny světle modře,  $\beta$ -skládaný list červeně a řetězce pojící jednotlivé útvary sekundární struktury jsou znázorněny fialovou barvou. Zelenou barvou je zobrazen disulfidický můstek mezi cysteiny 37 a 45. Zobrazení struktury bylo vytvořeno v programu PyMol [16] dle struktury PDB ID 1HKF [18].

### 1.1.3 Protein PCNA

Jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA, z anglického proliferating cell nuclear antigen) je protein patřící do rodiny svorkových proteinů (anglicky sliding clamp proteins)



a je nezbytný pro replikaci a opravy DNA. Tvoří posuvnou svorku (tato struktura se také nazývá toroid) kolem DNA. Jejím úkolem je ukotvit proteiny důležité pro samotnou replikaci – polymerasu  $\delta$  a další proteiny replisomu. Stimuluje syntézu DNA díky specifickým interakcím s DNA polymerasami, díky čemuž dochází ke snížení disociace primeru od templátu [22]. Během replikace je PCNA navazován na DNA pomocí replikačního faktoru C (anglicky označovaného jako clamp loader), který za spotřeby ATP může otevírat a zavírat strukturu PCNA kolem DNA tak, že sklon PCNA vůči helixu nukleové kyseliny je asi  $30^\circ$ . Podobný sklon ( $22^\circ$ ) byl pozorován i u  $\beta$ -svorky (anglicky označované  $\beta$ -clamp), což byl první objevený svorkový protein u bakterie *Escherichia coli*. Mechanismus posouvání po DNA stále není známý [23].

### 1.1.3.1 Struktura proteinu PCNA

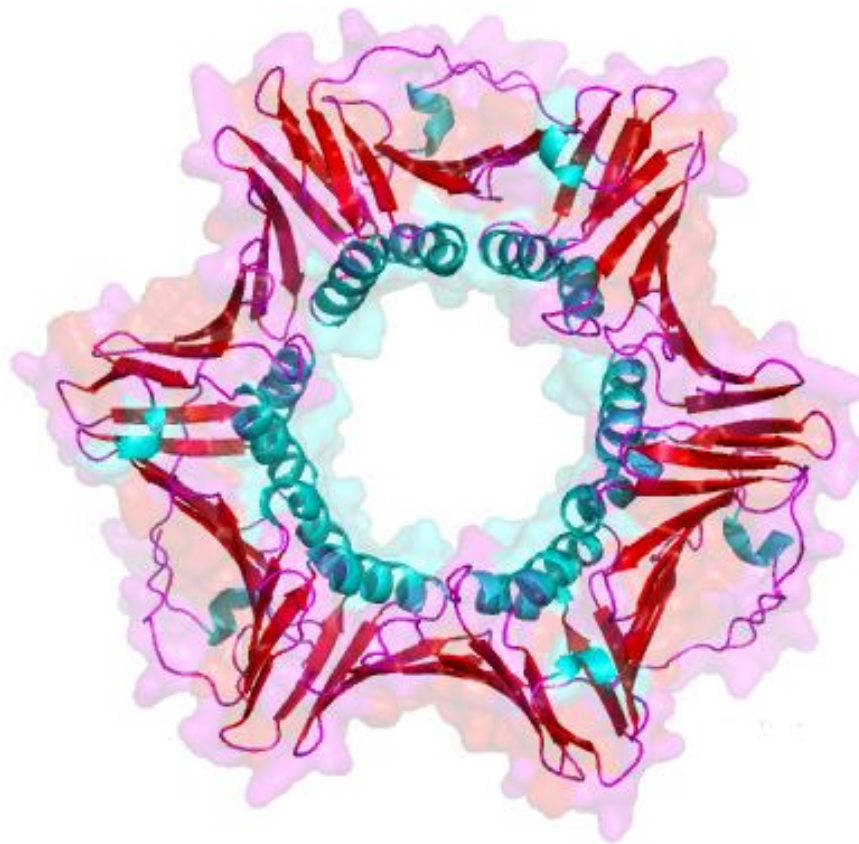
Tento protein tvoří v nativním stavu symetrický trimer o velikosti 86 kDa uspořádaný tak, že ze vnitřní strany kruhové struktury povrch nese kladný náboj díky  $\alpha$  – helixům, které jsou zde umístěny a jsou bohaté na lysin a arginin. Díky tomu může PCNA přímo interagovat s negativně nabitými fosfátovými zbytky DNA. Otvor v prstencovité struktuře proteinu má průměr asi 35 Å (průměr B-DNA je asi 24 Å) [24]. Struktura trimeru PCNA je zobrazena na Obr. 5, str. 18.

Každá ze tří podjednotek, které dohromady tvoří prstencovitý trimer, obsahuje dvě domény. Tyto domény jsou tvořeny vždy dvěma  $\alpha$ -helixy, které jsou antiparalelně uspořádány vůči ploše  $\beta$ -skládaného listu, který je ve vnější vrstvě prstencovité struktury PCNA trimeru. Celkem je tak na povrchu otvoru PCNA 12  $\alpha$ -helixů.  $\beta$ -skládané listy tvoří celistvý vnější povrch struktury PCNA [25].

### 1.1.4 Interakce NKp44 s PCNA

Bylo prokázáno, že nadměrná exprese PCNA cílovými buňkami redukuje účinnost NK buněk, která je závislá na produkci receptoru NKp44. Interakce receptoru NKp44 s PCNA exprimovaným cílovou buňkou paradoxně u NK buněk inhibuje lýzu cílových buněk a sekreci interferonu gama ( $IFN\gamma$ ).  $IFN\gamma$  je prozánětlivý cytokin, který je produkován například T lymfocyty, NK buňkami, nebo buňkami centrálního nervového systému v reakci na specifické podněty [26]. Soudí se, že inhibice je zprostředkována pomocí ITIM motivu [20]. Je tedy možné, že PCNA na povrchu buněk tak může způsobit, že aktivační receptor NKp44 vyvolá inhibiční účinky na cytotoxickou odpověď [21]. Na druhou stranu

jsou publikované i práce, ve kterých se uvádí, že ITIM motiv spojený s tímto receptorem není funkční [10, 27].



**Obrázek 5: Struktura trimeru PCNA při pohledu skrz prstenec.** Části proteinu ve formě  $\alpha$ -helixu jsou znázorněny světle modře,  $\beta$ -skládaný list červeně a řetězce pojící jednotlivé útvary sekundární struktury jsou znázorněny fialovou barvou. Zobrazení struktury bylo vytvořeno v programu PyMol [16] dle struktury PDB ID 1U7B [22].

Molekula PCNA byla objevena jako první ligand receptoru NKp44. Protein PCNA je vysoce exprimován v proliferujících buňkách, včetně buněk rakovinných. Nadměrná exprese PCNA je potom také spojena se zvýšenou malignitou. Ač je protein PCNA spojen s rakovinnými buňkami, může být zářející, že je přímým ligandem NKp44, neboť je to protein vyskytující se v buněčném jádře, kde je součástí replikačního procesu (proto je jeho výskyt v buněčné membráně zdánlivě nesmyslný) [10, 20]. Protein PCNA může být nadměrně produkován i ve zdravých buňkách během prvního trimestru těhotenství. Jde o buňky, které se jako první oddělují z oplodněného vajíčka, poskytují embryu živiny a tvoří velkou část placenty. V prvním trimestru těhotenství se také exprimuje NKp44 na povrch NK buněk bez předchozí aktivace. Tyto buňky tvoří většinu lymfoidních buněk během prvního trimestru těhotenství. PCNA jakožto ligand NKp44 by tady tak mohl sloužit jako

autotolerantní prvek. Stejného mechanismu pravděpodobně využívají i nádorové buňky, aby elegantně unikly imunitnímu dohledu [10].

#### **1.1.4.1 Komplex PCNA s HLA I. třídy**

V roce 2013 byla publikována práce, ve které byla popsána kolokalizace PCNA s HLA I. třídy na povrchu buněk lidského lymfomu. Představuje tak možný mechanismus, jakým se PCNA dostane na povrch buněk. Podle některých studií by tak obecně ligandy pro NCR receptory mohly být komplexy složené z membránového glykoproteinu HLA I. třídy a proteinu, který se běžně vyskytuje intracelulárně. Takovéto proteiny se souhrnně označují jako DAMP (z anglického damage associated molecular pattern molecules) a patří mezi ně právě PCNA. Pro zkoumání interakce PCNA v komplexu s HLA I. třídy a NKp44 byly použity jednojaderné buňky periferní krve (PBMC – z anglického peripheral blood mononuclear cells) izolované ze zdravých jedinců. Během experimentu se potvrdilo, že komplex PCNA s HLA I. třídy vyvolá inhibici cytolytické funkce prostřednictvím receptoru NKp44, zatímco protilátka pro NKp44 způsobí opačné chování NK buňky. Inhibiční působení PCNA na NK buňky prostřednictvím NKp44 je tedy experimentálně ověřeno, zatím ale není jisté, zda inhibiční účinky vyvolává samotný protein PCNA, nebo jsou tyto projevy spojeny pouze s interakcí s HLA I. třídy [21].

## 2 Cíle práce

- ❖ Příprava vektorů umožňujících expresi proteinů NKp44, NKp46 a PCNA.
- ❖ Příprava proteinu PCNA v expresních systémech *Escherichia coli* a HEK293.

## 3 Materiál

### 3.1 Použité přístroje

Analytická ultracentrifuga ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA)

Analytické váhy AND HA – 180M (A&D, Japonsko)

Centrifuga EBA 12R (Hettich, Německo)

Centrifuga Allegra X – 22R (Beckman Coulter, USA)

Elektroforetická souprava pro agarosovou elektroforézu (Biokeystone, USA)

Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE (Bio – Rad, Německo)

Inkubátor IR 5000 (LABsystem Praha, ČR)

Inkubátor MC0-18 AIC (Sanyo, Japonsko)

Kolona Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA)

Kolona Talon 5 ml (GE Healthcare, USA)

Koncentrátor Amicon Ultra (MWCO 10000) (Millipore, USA)

Laminární box Labox BIO 126 (LABOX, ČR)

Mikrocentrifuga Ministar Silverline (VWR, USA)

Mikrofiltr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  (TPP, Švýcarsko)

Mikrozkumavka 200  $\mu\text{l}$  (Eppendorf, USA)

Mikrozkumavka 1,5 ml (Eppendorf, USA)

Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact (Optimo Moulinex, Francie)

Spektrofotometr DS-11 (DeNovix, USA)

Termoblok LS1 (VLM, Německo)

Termocykler T100 (Bio – Rad, Německo)

Třepačka Celltron (Infors HT, Švýcarsko)

Třepačka HT Multitron Pro (Infors, Švýcarsko)

Třepačka G24 (New Brunswick Scientific, USA)

Ultrazvuková sonda SONOPLUS (Bandelin, Německo)

Vortexový mixér (Velp Scientifica, Itálie)

Zdroj napětí 251 – 2 (Sigma, USA)

## 3.2 Použité chemikálie

Agarosa (Sigma, USA)

Akrylamid (Sigma, USA)

Ampicilin 100 mg/ml (Biotika, SR)

dNTPS 10 mM (Top – Bio, ČR)

Goodview II (Ecoli, Slovensko)

IPTG (Sigma, USA)

Isopropanol (Lach – Ner, ČR)

Kvasničný extrakt (Imuna Pharm, SR)

Leupeptin 0,001 mg/ml (Sigma, USA)

Pepstatin 0,001 mg/ml (Thermo Scientific, USA)

Plasmid pOPINE

Plasmid pTW5sec

PMSF v ethanolu 100 mM (Thermo Scientific, USA)

RNAsa A 100 ng/ml (Lach – Ner, ČR)

Standard pro agarosovou DNA elektroforézu 1 kb (New England Biolabs, USA)

Standard pro agarosovou DNA elektroforézu 100 bp (New England Biolabs, USA)

Standard pro SDS PAGE (Thermo Fisher)

Tris (Sigma, USA)

### 3.2.1 Enzymy

Infusion enzym a pufr (Biotool)

Polymerasa Q5 a pufr (New England Biolabs, USA)

Restrikční endonukleasa AgeI (New England Biolabs, USA)

Restrikční endonukleasa KpnI (New England Biolabs, USA)

### 3.2.2 Pufry a roztoky

**Barvicí roztok pro SDS-PAGE** (45% methanol, 10% kys. octová, 0,25% CBB R 250)

**Cutsmart pufr** pro štěpení plasmidů (New England Biolabs, USA) (50 mM octan draselný, 20 mM Tris acetát, 10 mM octan hořečnatý, 100 µg/ml BSA, pH 7,9)

**Elektrodový pufr** (0,025 M Tris, 0,19 M glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3)

**ExCell 293** (komerční médium, před použitím doplněno o L-glutamin o výsledné koncentraci 4 mM; Sigma-Aldrich, USA)

**LB – médium** (1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4)

**Mobilní fáze pro gelovou permeační chromatografii** (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5)

**Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE** (35% ethanol, 35% kys. octová)

**PBS pufr** (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, NaN<sub>3</sub> 10 mM, pH 7,5)

**PBS-TK** (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0)

**Pufr A pro iontově výměnnou chromatografii** (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,0)

**Pufr B pro iontově výměnnou chromatografii** (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 900 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,0)

**Roztok IPEI** (10 mg/ml IPEI v PBS-TK)

**Síran hořečnatý** (New England Biolabs) (100 mM)

**TAE pufr pro agarosovou elektroforézu** (40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA)

**TES pufr** (10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 8,0)

**Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu** (30% glycerol, bromfenolová modř v TAE)

**Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. neredukující** (31,5 mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8)

**Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. redukující** (vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný naředěný desetinovým podílem 2-merkptoethanolu)

### 3.2.3 DNA klony

Gen NKp44 klon HG11550-M (Sino Biological, Čína)

Gen NKp46 klon HG13772-G (Sino Biological, Čína)

Gen PCNA klon HG12131-M (Sino Biological, Čína)

### 3.2.4 PCR a sekvenační primery

Všechny roztoky primerů byly připraveny v koncentraci 5 μM.

**PCNA\_M1\_OPINE\_FW**

5'-AGGAGATATACCATGTTCGAGGC-3'

**PCNA\_S261\_OPINE\_REV**

5'-GTGATGGTGATGTTTAGATCCTTCTTCATCCTC-3'

**PCNA\_M1\_pTW5sec\_FW**

5'-TCTTGAATTACCGGTATGTTTCGAGGCACG-3'

**PCNA\_S261\_pTW5sec\_REV**

5'-TGGTGGTGATGGTGGGTACCAGATCCTTCTTCATCCTC-3'

**NKp46\_Q22\_pTW5sec\_FW**

5'-TCTTGAATTACCGGTCAGCAGCAGACTCTC-3'

**NKp46\_G212\_pTW5sec\_REV**

5'-TGGTGGTGATGGTGGGTACCGCCTGTGACCAG-3'

**NKp44\_S19\_pTW5sec\_FW**

5'-TCTTGAATTACCGGTTCTCAGGCACAAT-3'

**NKp44\_S130\_pTW5sec\_REV**

5'-TGGTGGTGATGGTGGGTACCAGATACCACCAGATAGAATCT-3'

**pTT\_FW**

5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

**T7promoter**

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

**pTT\_REV**

5'-TATGTCCTTCCGAGTGAGAG-3'

**pTWsec\_REV**

5'-TATGTCCTTCCGAGTGAGAG-3'

### **3.3 Buněčné kmeny a linie**

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Thermo Scientific, USA)

*Escherichia coli* BL21(DE3) (Thermo Scientific, USA)

HEK293S GnTI (ATCC, USA)

### **3.4 Soupravy**

Nucleospin® gel and PCR clean-up (Macherey – Nagel, Německo)



NucleoSpin® Plasmid (Macherey – Nagel, Německo)

NucleoBond® Xtra Midi / Maxi (Macherey – Nagel, Německo)

## 4 Metody

### 4.1 Příprava zásobních a pracovních roztoků DNA klonů

Lyofilizované vzorky DNA byly nejprve rozpuštěny ve sterilní dH<sub>2</sub>O. 10 µg DNA kódující každý z proteinů bylo nejprve sterilně rozpuštěno ve 100 µl sterilní dH<sub>2</sub>O, čímž byl připraven zásobní roztok daného genu o koncentraci 100 ng/µl. Zásobní roztok byl následně ještě 10× zředěn, čímž byl připraven pracovní roztok o koncentraci 10 ng/µl. Příprava zásobních i pracovních roztoků byla prováděna ve sterilním prostředí laminárního boxu.

### 4.2 Amplifikace genů pomocí PCR

PCR reakce (polymerasová řetězová reakce; z anglického polymerase chain reaction) byla prováděna v mikrokumavkách o objemu 200 µl; objem reakční směsi činil 50 µl. Do tohoto objemu byl přidán takový objem roztoku s templátovou DNA, který obsahoval 100 ng DNA. Pokud byla koncentrace příliš vysoká, byl roztok předem naředěn tak, aby byla minimalizována chyba způsobená pipetováním příliš malých objemů. Dále byly pipetovány roztoky obsahující primery pro daný gen, roztok dNTPs (deoxynukleotid trifosfátů), reakční pufr Q5, polymerasa Q5 a dH<sub>2</sub>O. Polymerasa Q5 byla vždy pipetována jako poslední, aby se minimalizoval časový interval mezi pipetováním a vložením reakční směsi do termocykleru. Množství jednotlivých složek PCR reakční směsi je uvedeno v Tab. 1.

**Tabulka 1: Množství složek v PCR reakční směsi o celkovém objemu 50 µl.**

Chemikálie	Množství
Templátová DNA	100 ng
Roztoky primerů	5 µl
Roztok dNTPs	1,5 µl
Reakční pufr Q5	10 µl
Polymerasa Q5	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	doplnění reakční směsi do objemu 50 µl

Po smíchání všech složek byla reakční směs krátce centrifugována (asi 20 s) na stolní centrifuze, aby se z roztoku odstranily bubliny. Poté byla směs umístěna do termocykleru.

V termocykleru byla v prvním kroku reakční směs vystavena teplotě 95° C po dobu 5 min. Během druhého kroku (který se 20 – 30× opakoval) byla reakční směs denaturována při teplotě 95° C 30 s, poté byla teplota snížena na teplotu, při které mohlo docházet k nasedání primerů (56° C), při které byla reakční směs ponechána opět 30 s. Teoretická teplota nasedání primerů byla určena pomocí online kalkulatoru (New England Biolabs) [28]. Pro použitou teplotu nasedání primerů v termocykleru byla tato hodnota snížena asi o 4° C, aby se zabránilo nespecifickým interakcím primerů s templátovou DNA. Druhý krok byl zakončen polymerační fází, která probíhala při 72° C 1 min. Třetím krokem bylo dokončení polymerace, které při 72° C probíhalo 5 min. Nakonec byla mikrozkušavka obsahující reakční směs chlazená na teplotu 4° C, dokud nebyla vyjmuta z termocykleru.

### **4.3 Štěpení plasmidů**

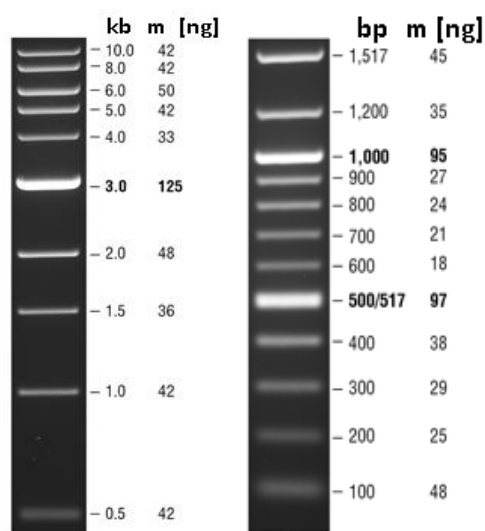
Do reakční směsi o celkovém objemu 20 µl v mikrozkušavce byl postupně pipetován takový objem roztoku nenaštěpeného plasmidu, který obsahoval 2 µg tohoto plasmidu. Dále byly přidány 2 µl pufru Cutsmart a takové množství restrikcí endonukleas, které odpovídalo množství štěpeného plasmidu za daný čas, podle aktivity enzymu. Samotné štěpení plasmidů bylo prováděno při 37° C 1 – 2 h.

Štěpení bylo po uplynutí stanoveného času zastaveno inaktivací restrikcí endonukleas zamražením vzorku na -18° C, nebo okamžitým zpracováním na agarosovém gelu. Pokud vzorek nebyl ihned zpracován, ale byl zamražen, byl k roztoku ještě přidán vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu, která byla následujícím krokem.

### **4.4 Agarosová elektroforéza**

Pro elektroforézu v agarosovém gelu byl nejčastěji používán 1% gel. Pro přípravu tohoto gelu bylo tedy naváženo 0,65 g agarosy, která byla přidána do 65 ml TAE pufru. Tato směs byla povařena asi 1 min v mikrovlnné troubě. Po ochlazení roztoku na asi 50° C, což bylo rozpoznáno subjektivně přiložením dlaně ke stěně baňky s roztokem, byly přidány 3 µl GoodView barviva. Po zamíchání byla směs nalita do připravené aparatury, ve které se nechal gel zatuhnout. Po zatuhnutí byl vyjmut hřeben. Podle informací na štítku elektroforetické aparatury byl gel převrstven 200 ml dH<sub>2</sub>O a do rezervoárů s elektrodami bylo nalito 65 a 180 ml TAE pufru.

Do jamek byly pipetovány vzorky, které byly předem připraveny z 10  $\mu$ l vzorku, ke kterým byly přidány 2  $\mu$ l vzorkového pufru. Do krajní jamky bylo pipetováno 5  $\mu$ l standardu (Obr. 6). Poté byla elektroforetická aparatura připojena ke zdroji napětí, který byl nastaven na 200 V. Elektroforéza probíhala, dokud nebylo dosaženo dostatečné migrace vzorků (15 – 20 min), což bylo ověřeno vizualizací pomocí UV lampy.



**Obrázek 6: Použité standardy pro agarosovou elektroforézu (1 kb vlevo a 100 bp vpravo).** Pro elektroforézu na tomto obrázku bylo pipetováno 5  $\mu$ g 1 kb standardu do jamky v 0,8% agarosovém gelu; 100 bp standard je zobrazen v 1,3% gelu. Levý sloupec hodnot vyjadřuje velikost úseku DNA v kilobázích (u 1 kb standardu) či v párech bází (u 100 bp standardu), pravý sloupec hmotnost DNA v nanogramech. Převzato z [29, 30].

## 4.5 Přečištění vzorků z agarosového gelu

Agarosové gely, které byly později využity k separaci DNA touto metodou, byly vystaveny minimální dávce UV záření nutné k vyhodnocení výsledků elektroforetického měření. K separaci DNA z gelu byla využívána komerční souprava NucleoSpin gel and PCR Clean-up (Macherey – Nagel, Německo).

Postup se vždy řídil návodem dodaným od výrobce. Vyříznutá oblast gelu obsahující požadovaný vzorek byla zvážena na analytických vahách. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l pufru NT1 na 100 mg vyříznutého gelu. Pokud vyříznuté fragmenty agarosového gelu byly přibližně stejně velké, nebyly váženy a byl pouze přidán stejný objem pufru NT1. Poté byla mikrozkušavka se vzorkem inkubována v termobloku při teplotě 50° C a každé 2 – 3 minuty lehce promíchána. Tento postup byl opakován, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarosového gelu. Vzniklý roztok byl nanesen na kolonu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, která byla umístěna do sběrného rezervoáru. Kolona se vzorkem

byla centrifugována 1 min při 20° C a 11000 × g a roztok, který kolonou protekl, byl odstraněn. Na kolonu, která byla opět umístěna do sběrné nádoby, bylo nanášeno 350 µl pufru NT3 a byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Tento postup byl po odstranění prošlé kapaliny ještě jednou zopakován. Kolona byla vysušena centrifugací při 11000 × g po dobu 1 min za teploty 20° C. Posledním krokem byla eluce, která byla provedena umístěním kolony do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a nanášením 30 – 50 µl elučního pufru NE předehřátého na 70 °C na povrch nosiče. Poté byl vzorek ponechán asi 1 min při laboratorní teplotě a následně centrifugován 1 min při 11000 × g za teploty 20° C. Pro zvýšení výtěžku eluce byl eluční krok ještě jednou opakován za použití elučního pufru, který již kolonou prošel.

## 4.6 Měření koncentrace a čistoty DNA

Měření koncentrace a čistoty DNA bylo prováděno pomocí spektrofotometru DeNovix DS - 11. Proti slepému vzorku (nejčastěji elučnímu pufru z nízkoobjemové přípravy plasmidové DNA) byl měřen vzorek, kterého byl použit vždy 1 µl. Měření každého vzorku proběhlo 3× v řadě a pokud žádná z naměřených hodnot nebyla příliš odlehlá, koncentrace DNA v analyzovaném vzorku byla určena jako průměr získaných hodnot z každého měření. Uvedený spektrofotometr je schopen automaticky určit hodnotu koncentrace, proto nebylo třeba manuálních výpočtů. Čistota jednotlivých vzorků byla určena z poměru absorbancí při 260 a 280 nm. Určení této hodnoty opět proběhlo automaticky na zmíněném přístroji. Při každém měření byla tato hodnota opět určena jako průměr ze tří měření. Bylo kontrolováno, zda DNA není znečištěna například proteiny nebo RNA, což by se projevilo vychýlením poměru naměřených absorbancí z intervalu 1,8 – 2,0.

## 4.7 Vnesení genu do linearizovaného plasmidu

Tato reakce byla prováděna v objemu 10 µl. Do mikrozkušavky byl pipetován takový objem roztoku vektoru (linearizovaného plasmidu), který obsahoval 100 ng této DNA. Hmotnostní poměr (zde označený  $x$ ) pipetovaného množství insertu (DNA vkládané do vektoru) a štěpeného plasmidu byl orientačně určen ze vztahu 1

$$\frac{2 \cdot bp_{insertu}}{bp_{vektoru}} = x, \quad (1)$$

ve kterém  $bp_{insertu}$  značí počet párů bází insertu (vkládaného genu) a  $bp_{vektoru}$  počet párů bází vektoru (štěpeného plasmidu). Do reakční směsi bylo dále pipetováno 0,5  $\mu$ l Infusion enzymu a 2  $\mu$ l Infusion reakčního pufru. Roztok byl doplněn dH<sub>2</sub>O na celkový objem 10  $\mu$ l. Takto připravená reakční směs byla inkubována při 37° C po dobu 30 min. Úspěšnost vnesení insertu do plasmidu byla následně ověřena pomocí agarosové elektroforézy.

## 4.8 Transformace kompetentních buněk

Do připravené mikrozkušavky s 50  $\mu$ l suspenze kompetentních buněk byl přidán takový objem roztoku plasmidu, který obsahoval 0,5  $\mu$ g tohoto plasmidu. Vzorek byl inkubován 10 min na ledu a následně byl proveden tepelný šok – zkumavky byly na 45 – 60 s umístěny do termobloku, který byl předem vytemperován na 42° C. Poté byly na 5 min opět dány na led. Po uplynutí tohoto časového intervalu byl přidán 1 ml LB média a vzorek byl inkubován 1 hod při 37° C. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 1 min při 4000  $\times$  g za pokojové teploty. Po centrifugaci byl 1 ml supernatantu odstraněn a ve zbytku kapaliny byla resuspendována buněčná peleta. Vzniklá suspenze byla přenesena na bakteriologickou kultivační misku s 1% agarem v LB médiu s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml a rozetřena sterilní hokejkou po celé ploše misky. Po vsáknutí kapaliny do pevného média byla miska při teplotě 37 °C inkubována přes noc.

## 4.9 Zrychlená metoda transformace kompetentních buněk

Při provádění zrychlené metody transformace kompetentních buněk byl dodržen podobný postup jako při běžné transformaci kompetentních buněk. Zrychlení tohoto postupu spočívá ve vynechání tepelného šoku a v přidávání LB média. Po uplynutí 10 min inkubace kompetentních buněk s přidaným roztokem plasmidu na ledu byly takto transformované buňky ihned natřeny na misku.

## 4.10 Nízkoobjemová příprava plasmidové DNA

Nejprve bylo asepticky v laminárním boxu do 1,5 ml mikrozkušavky přeneseno 6  $\mu$ l sterilní dH<sub>2</sub>O. Do druhé zkumavky se šroubovacím víčkem o objemu 50 ml bylo přeneseno 5 ml LB média a 5  $\mu$ l roztoku ampicilinu. Pipetovací špičkou byla poté z povrchu agaru na

kultivační misce opatrně setřena jedna bakteriální kolonie. Tato špička byla nasazena na pipetu, umístěna do připravené mikrozkušavky s dH<sub>2</sub>O a promyta 2 – 3× nasátím a vypuzením kapaliny. Poté byla špička odhozena do připravené zkumavky s LB médiem. Tato zkumavka byla zakryta víčkem, které nebylo dotaženo, aby mohlo docházet k výměně plynů a byla inkubována při 37° C přes noc na třepače při 200 ot./min.

K izolaci plasmidové DNA byla využívána souprava NucleoSpin Plasmid (Macherey – Nagel, Německo). Z přes noc inkubované bakteriální suspenze byla sterilní pinzetou vyjmuta pipetovací špička. Suspenze byla následně centrifugována 5 min při 3900 × g za pokojové teploty. Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v 250 µl pufru A1 s přidanými 2,5 µl RNAsy opakovaným nasátím a vypuzením z pipety. Vzniklá suspenze byla přenesena do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 250 µl pufru A2. Roztok byl promíchán opakovaným otáčením zkumavky dnem vzhůru (asi 10×), poté bylo přidáno 300 µl A3 pufru a roztoky byly promíchány stejným způsobem. Následně byl roztok centrifugován 5 min při 11000 × g za pokojové teploty. Supernatant byl pipetován na připravenou kolonu, která byla součástí soupravy. Kolona byla vložena do sběrné zkumavky a centrifugována 1 min při 11000 × g za pokojové teploty. Kapalina, která protekla kolonou, byla na kolonu znovu nanášena a centrifugace byla zopakována. Poté bylo na kolonu nanášeno 500 µl pufru AW a centrifugováno za stejných podmínek. Po vylití kapaliny proteklé kolonou bylo nanášeno 600 µl pufru A4 a opět centrifugováno za stejných podmínek. Sušení bylo provedeno další centrifugací po 2 min při 11000 × g. Posledním krokem byla eluce, pro kterou bylo vždy použito 50 µl elučního pufru, který byl předem temperován na 70° C. Po nanášení na kolonu byla provedena centrifugace 2 min při 11000 × g, která byla ještě jednou zopakována. Kapalina proteklá kolonou byla během centrifugace sbírána do sterilní mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.

## **4.11 Sekvenování plasmidové DNA**

Do 0,2 ml mikrozkušavek bylo pipetováno takové množství eluátu z nízkoobjemové izolace plasmidové DNA, které obsahovalo 200 – 250 ng DNA, roztok jednoho primeru (buďto nasedajícího od 5'-konce nebo 3'-konce na templátovou DNA) v takovém množství, které obsahovalo 5 pmol tohoto primeru. Do celkového objemu 8 µl byla reakční směs doplněna sterilní dH<sub>2</sub>O. Samotná sekvenace byla provedena v Laboratoři sekvenace

DNA ve výzkumném centru BIOCEV. Obdržená sekvence nukleotidů byla porovnána s předpokládanou sekvencí nukleotidů insertu v daném plasmidu.

## **4.12 Velkoobjemová příprava plasmidové DNA**

Nejprve bylo v laminárním boxu do sterilních 2 l Erlenmayerových baněk převedeno 500 ml LB média, do kterého bylo přidáno 500  $\mu$ l roztoku ampicilinu. Bakteriální kolonie na pevném živném agarovém médiu byly resuspendovány pomocí sterilní bakteriologické kličky ve 2 ml tohoto LB média. Vzniklou suspenzí bylo inokulováno médium v Erlenmayerových baňkách, které byly následně přes noc inkubovány na třepačce při 37° C a 200 ot./min. Po přibližně 12 – 14 hod inkubaci byly bakteriální kultury centrifugovány 25 min při 3900  $\times$  g. Buněčná peleta byla resuspendována ve 20 ml TES pufru za použití vortexového mixéru. Vzniklá suspenze byla centrifugována při pokojové teplotě po 10 min při 3900  $\times$  g.

Pro samotnou izolaci plasmidové DNA byla využita komerčně dostupná souprava NucleoBond Xtra Midi / Maxi (Macherey – Nagel, Německo). Peleta byla resuspendována v 18 ml RES pufru, do kterého bylo předem přidáno takové množství RNAsy, aby výsledná koncentrace byla 0,1 mg/ml a roztok byl rozdělen do dvou zkumavek. Do každé ze zkumavek bylo přidáno 9 ml LYS pufru a roztok byl citlivě promíchán opakovaným (10 $\times$ ) otáčením uzavřené zkumavky dnem vzhůru. Následně byl roztok inkubován přesně 5 min při laboratorní teplotě. Po inkubování bylo přidáno 9 ml NEU pufru, roztok byl opatrně promíchán (stejně jako v předchozím kroku) a poté byl centrifugován 10 min při 3900  $\times$  g. Supernatant byl filtrován přes dvojitý skládaný filtr (popřípadě přes filtr dodávaný výrobcem) a nanesen na kolonu předem promytou pufrům EQ1. Po prokapání roztoku kolonou byla kolona promyta 25 ml WASH pufru. Eluce byla provedena 15 ml pufru ELU. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu o laboratorní teplotě a roztok byl promíchán. Vzniklý roztok byl pomocí injekční stříkačky nanesen na mikrofiltr o velikosti pórů 0,22  $\mu$ m, na kterém se precipitovaná DNA zachytila. Filtr byl promyt 15 ml 70% ethanolu a sušen protlačováním vzduchu pomocí injekční stříkačky. Eluce byla provedena 1 ml stejného elučního pufru, jaký byl použit při nízkoobjemové izolaci DNA.

## **4.13 Transfekce buněčné linie HEK293S GnTI**

Kultivace této buněčné linie byla prováděna ve čtverhranných lahvích s prodyšným víčkem umístěných na třepačce Celltron při 135 ot./min v inkubátoru MC0-18 AIC (Sanyo,



Japonsko) při 37 °C a v 5 % CO<sub>2</sub>. Kultivační médium bylo tvořeno směsí roztoků EcCELL293 a Freestyle F17 v poměru 1:1. Subkultivace byla prováděna v intervalu 3 – 4 dnů. Hustota buněk byla určována hemocytometrem a také byla kontrolována přítomnost kontaminantů. Část suspenze byla doplněna kultivačním médiem o takovém objemu, aby byla hustota vzniklé suspenze  $0,2 \cdot 10^6 - 0,3 \cdot 10^6$  buněk/ml. Objem původní suspenze byl vždy maximálně 1/10 objemu vzniklého a čtverhranné láhve byly touto suspenzí plněny maximálně do 40% svého objemu, aby mohlo docházet k dostatečnému provzdušnění. Pokud byl objem původní buněčné suspenze příliš velký, byla tato suspenze centrifugována (5 minut při  $95 \times g$ , 21 °C) a buněčná peleta byla resuspendována v kultivačním médiu.

Buněčná suspenze HEK293S GnTI byla nejprve centrifugována 5 min při  $95 \times g$  za pokojové teploty. Poté byla resuspendována v čerstvém médiu ExCELL293 tak, aby výsledná hustota resuspendovaných buněk byla  $23,5 \cdot 10^6$  buněk/ml. K buňkám byl přidán sterilně zfiltrovaný transfekční roztok DNA v PBS-TK obsahující takové množství DNA, aby na  $1 \cdot 10^6$  buněk připadal 1 µg DNA. Transfekčního roztoku byl přidán takový objem, aby výsledná hustota buněk byla  $20 \cdot 10^6$  buněk/ml. Dále byl přidán roztok IPEI v hmotnostním poměru DNA a IPEI 1:3. Směs byla inkubována 4 hod na třepačce při 135 ot./min a 37° C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Poté byla směs naředěna na 37 °C předehřátým médiem ExCELL293 v takovém množství, aby výsledná hustota buněk v roztoku byla  $1 \cdot 10^6$  buněk/ml.

## **4.14 Produkce proteinů v bakteriálním expresním systému**

Kompetentní buňky *Escherichia coli* BL21(DE3) transformované plasmidem umožňujícím expresi daného proteinu byly inkubovány na pevném živném agarovém médiu obsahujícím ampicilin o koncentraci 100 µg/ml přes noc. Poté byly narostlé kolonie převedeny do 2 l Erlenmayerovy baňky obsahující 0,5 l LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml. Inkubace byla provedena na třepačce při teplotě 37° C a 200 ot./min. Během inkubace byly odebírány vzorky o objemu 1 ml a byla měřena optická hustota buněčné suspenze při 600 nm. Inkubace probíhala, dokud nebylo dosaženo optické hustoty přibližně 0,6. Po inkubaci byl odebrán 1 ml vzorku (uchován jako vzorek A) a do Erlenmayerovy baňky byl pipetován takový objem roztoku IPTG (isopropyl-beta-D-

thiogalaktopyranosid), jakožto indukčního činidla, aby výsledná koncentrace IPTG v LB médiu byla 1 mmol/l. Po indukci byla buněčná suspenze inkubována na třepačce při 200 ot./min. Pro teplotu inkubace odpovídající 37° C byl zvolen čas 4 h, při inkubaci při 18° C byla buněčná suspenze inkubována přes noc. Po inkubaci byl odebrán 1ml vzorku označeného B. Buněčná suspenze byla sklizena centrifugací při 3900 × g, 20° C po dobu 25 min. Vzniklá peleta byla resuspendována v 20 ml TES pufru. Poté byla buněčná suspenze opět centrifugována za stejných podmínek po dobu 10 min. Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta uchována při teplotě -18° C.

## 4.15 Chelatační afinitní chromatografie

K buněčné peletě bylo přidáno 40 ml PBS pufru. Následná homogenizace ultrazvukovou sondou byla prováděna 4 × 1 min při výkonu sondy 40 W. Mezi druhou a třetí minutou homogenizace bylo k lyzátu přidáno 400 µl roztoku PMSF, 40 µl roztoku leupeptinu, 40 µl roztoku pepstatinu, 40 µl roztoku RNAsy a 2 µl roztoku síranu hořečnatého (MgSO<sub>4</sub>). Po úplné desintegraci buněk byl ze vzniklé suspenze odebrán 1 ml vzorku označeného jako vzorek C. Vzniklá suspenze byla centrifugována při 20000 × g, 20° C, 10 min. Byl odebrán vzorek pelety, označený jako vzorek D, i vzorek supernatantu, označený jako vzorek E. Supernatant byl pomocí injekční stříkačky a filtru o velikosti pórů 0,22 µm zfiltrován. Z filtrátu byl odebrán vzorek F.

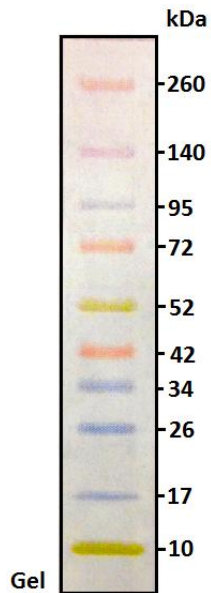
Expresní konstrukt PCNA obsahuje histidinovou kotvu, proto bylo možné využít chelatační afinitní chromatografii s kolonami Talon o objemu 5 ml, na které byl vzorek nanesen pomocí HPLC systému ÄKTA basic. Připravený vzorek pro afinitní chelatační chromatografii byl naředěn v poměru 1:1 PBS puftrem a nanesen na kolonu. Průtok při nanášení vzorku byl nastaven na 5 ml/min, poté byla kolona s naneseným vzorkem promyta PBS puftrem za stejného průtoku. Eluce probíhala PBS puftrem obsahujícím 250 mM imidazol. Eluce probíhala za polovičního průtoku.

## 4.16 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Pro elektroforézu v prostředí SDS v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) byly připraveny vždy 2 gely. Gel rozdělovací a gel zaostřovací. Vzorky nejprve procházely gelem zaostřovacím, poté gelem rozdělovacím.

Rozdělovací gel o koncentraci polyakrylamidu 12,5% byl připraven smícháním 1,27 ml dH<sub>2</sub>O, 1,68 ml 30% AA, 1 ml 1,5M Tris (pH 8,8), 40 µl 10% SDS, 40 µl APS a 2 µl TEMED. Takto připravený roztok byl pipetován mezi skla elektroforetické aparatury a převrstven po okraj skla dH<sub>2</sub>O ze stříčky. Po zatuhnutí rozdělovacího gelu byla odstraněna voda a byl nanesen gel zaostřovací. Zaostřovací gel byl připraven smícháním 0,7 ml dH<sub>2</sub>O, 0,25 ml 30% AA, 0,13 ml 1M Tris (pH 6,8), 10 µl 10% SDS, 10 µl APS a 1,5 µl TEMED. Po nanesení zaostřovacího gelu byl do soupravy vsunut hřeben.

Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byl hřeben vyjmut a elektroforetická skla s gely byla vložena do elektroforetické vany, která byla následně naplněna po rysku elektrodoým pufrem. Ke vzorkům proteinů o objemu 10 – 16 µl byl přidán 5× koncentrovaný vzorkový pufr (redukující či neredukující) v takovém množství, které po přidavku odpovídalo 1× koncentrovanému roztoku. Vzorky byly v termobloku na 10 min vystaveny teplotě 100° C a poté centrifugovány 3 min při 15000 × g za pokojové teploty. Poté byly nanесeny do jamek zaostřovacího gelu. Do krajní jamky bylo vždy pipetováno 5 µl standardu molekulových hmotností (Obr. 7). Elektroforéza probíhala, dokud se elektroforetické čelo neocitlo asi 0,5 cm před koncem elektroforetických skel.



**Obrázek 7: Standard pro SDS-PAGE.** Uvedené hodnoty označují velikost v kDa, které odpovídají dané proužky.

Gely byly po skončení elektroforézy barveny barvicím roztokem minimálně 30 min a poté odbarvovány odbarvovacím roztokem. Tento krok byl opakován, dokud nebyly gely

dostatečně odbarvené. Poté byly skenovány a v případě potřeby uchovány v dH<sub>2</sub>O za laboratorní teploty.

## **4.17 Iontově výměnná chromatografie**

Pro iontově výměnnou chromatografii byl využit přístroj ÄKTA basic s připojenou kolonou HiTrap Q Sepharose XL (GE Healthcare). Kolona byla nejprve ekvilibrována pufrům A. Poté byl při průtoku 5 ml/min nanesen vzorek a kolona byla promyta pufrům A. Eluce probíhala lineárním gradientem iontové síly, což bylo zajištěno lineárním gradientem koncentrace pufru B (0 – 100%). Eluované frakce byly sbírány po 1 ml a analyzovány pomocí SDS-PAGE.

## **4.18 Koncentrování proteinových vzorků**

Koncentrování proteinových vzorků bylo prováděno v koncentrátorech Millipore Amicon Ultra MWCO 10000, do kterých byl pipetován roztok proteinu. Aparatura s naneseným vzorkem byla centrifugována 5 – 10 min při 3900 × g za pokojové teploty. Poté byl retenát opakovaně nasán a vypuzen pipetou, aby došlo k promíchání koncentrovaného roztoku. Filtrát byl odstraněn. Postup byl opakován, dokud nebylo takto zpracováno potřebné množství roztoku, resp. dosaženo požadované koncentrace proteinu.

## **4.19 Gelová permeační chromatografie**

Vzorek nanášený na gelovou permeační chromatografii byl vždy předem koncentrován (při použití kolony Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) na objem 300 – 500 µl) a centrifugován 5 min při 15000 × g za pokojové teploty. Samotná chromatografie byla provedena na přístroji ÄKTA basic s připojenou kolonou Superdex 200 10/300 GL, která byla nejprve ekvilibrována mobilní fází, která byla použita i k promytí 1 ml nástřikové smyčky. Zkoncentrovaný vzorek byl nanesen do nástřikové smyčky a chromatografie probíhala při průtoku 0,5 ml/min. Frakce o objemu 1 ml byly sbírány pomocí automatického sběrače frakcí do 1,5 ml mikrozkušavek.

## **4.20 Měření koncentrace proteinů**

Měření koncentrace proteinů bylo prováděno pomocí spektrofotometru DeNovix DS-11. Proti slepému vzorku byl měřen vzorek proteinu, kterého byly použity vždy 3 µl.

Měření každého vzorku proběhlo 3× v řadě a pokud žádná z naměřených hodnot nebyla příliš odlehlá, koncentrace proteinu v analyzovaném vzorku byla určena jako průměr získaných hodnot z každého měření. Hodnota koncentrace byla vypočtena uvedeným přístrojem pomocí programu „Prot280 MW & Ext. Coef.“, který byl schopen po zadání molekulové hmotnosti proteinu a jeho teoretického extinkčního koeficientu určit koncentraci daného proteinu.

## 4.21 Sedimentační analýza

Sedimentační analýza byla provedena na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) v rotoru An50-Ti metodou sedimentační rychlosti [31]. Vlastní měření i vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Jako vzorek byl použit protein PCNA získaný během intracelulární produkce v expresním systému HEK293S GnTI po gelové permeační chromatografii, jako reference byl použit pufr pro gelovou permeační chromatografii. Do centrifugačních kyvet bylo pipetováno 400 µl roztoku proteinu o koncentraci 0,65 mg/ml a 400 µl reference. Data byla sbírána při 48000 ot./min a 20 °C, bylo snímáno 200 snímků po 3 min s pomocí absorbanční detekce při vlnové délce 280 nm a s pomocí interferenční detekce. Hustota a viskozita referenčního pufru a parciální specifický objem proteinu byly predikovány pomocí programu Sednterp [32] a sedimentační data byla vyhodnocena pomocí programu Sedfit [33] metodou kontinuální distribuce sedimentačního koeficientu  $c(s)$ .

## 5 Výsledky

### 5.1 Příprava plasmidů obsahujících geny pro proteiny NKp44, NKp46 a PCNA

Pro přípravu expresních plasmidů s příslušnými geny bylo nejprve nutné určit délku expresního konstruktů pro dané proteiny vhodnou pro pozdější produkci proteinů. Vzhledem k tomu, že tato práce směřuje k budoucímu studiu interakce NK receptorů a jejich ligandů, nebylo nutné proteiny připravovat celé, ale nabízelo se navrhnout takové konstrukty, které zahrnovaly extracelulární domény těchto proteinů (pokud se jednalo o transmembránový protein). Pro NKp44 byl vybrán úsek nukleotidů kódujících imunoglobulinovou doménu proteinu podle publikované práce, ve které se zdařilo tuto část připravit v krystalickém stavu [18]. Stejným způsobem byl navržen expresní konstrukt pro receptor NKp46 [34]. Gen kódující protein PCNA bylo nutné použít celý. Expresní konstrukty jsou znázorněny na Obr. 8A-C, str. 38 – 39. Konstrukty proteinů byly zároveň navrženy tak, aby na svém C-konci nesly histidinovou kotvu, dle toho bylo nutné navrhnout vhodné komplementární primery.

#### NKp44

```
ATGGCCTGGCGAGCCCTACCCCACTGCTACTGCTGCTGCTGCTGTTCCCAAGGCTCAGGCAATCCAAGGCTCAGGCTACTTCAAAGT
GTGGCAGGGCAGACGCTAACCGTGAGATGCCAGTACCCGCCACGGGCAGTCTCTACGAGAAGAAAGGCTGGTGAAGGAGGCTTCAG
CACTTGTGTGCATCAGGTTAGTCACCAGCTCCAAGCCAGGACGATGGCTTGGACCTCTCGATTACAATCTGGGACGACCCTGATGCTG
GCTTCTTCACTGCACCATGACTGATCTGAGAGAGGAAGACTCAGGACATTACTGGTGTAGAATCTACCGCCCTTCTGACAACCTGTCTC
TAAGTCCGTCAGATTCTATCTGGTATCTCCAGCCTCTCCCTCCACACAGACCTCCTGGACTCCCGCGACCTGGTCTCTTACAGACCC
AGACCCAGAGCTGTGTGCTCCCACTGCAGGAGCCAGACAAGCCCTGAGTCTCCATCTACCATCCCTGCTCCCTTACAGCCACAGAAGT
CCACGCTCCGCCCTGGCCCTGCAGCCCCATTGCCCTGGTGCTGTCTGTGGACTCCTCGTAGCCAAGAGCCTGGTGTGTGAGCCCT
GCTCGTCTGGTGGGGGACATATGGTGGAAAACCATGATGGAGCTCAGGAGCCTGGATACCCAAAAGCCACCTGCCACCTTCAACAG
GTCACGGACCTTCCCTGGACCTCAGTTTCTCACCTGTAGAGAGAGAAATATTATATCACACTGTTGCAAGGACTAAGATAAGCGATGAT
GATGATGAACACACTTGTGA
```

NKp44\_S19\_pTW5sec\_FW  
5' TCTTGGAAATTACCGGTCTCAGGCAAT 3'

NKp44\_S130\_pTW5sec\_REV  
5' TGGTGGTATGGTGGTACCAGATACCACCAGATAGAATCT 3'

```
MAWRALHPLLLLLLFPGSQAQSKAQVLQSVAGQTLTVRCQYPPTGSLYEKKGWCKEASALVCIRLVTSKPRMTA
WTSRFTIWDDPDAGFFVTMTDLREEDSGHYWCRIYRPSDNSVSKSVRFYLVVSPASASTQTSWTPRDLVSSQTQT
QSCVPPTAGARQAPESPSTIPVPSQPQNSTLRPGPAAPIALVPVFCGLLVAKSLVLSALLVWWGDIWWKTMMELR
SLDTQKATCHLQQVTDLPWTSVSSPVEREILYHTVARTKISDDDDDEHTL
```

**Obrázek 8A: Gen NKp44 – návrh expresního konstruktů.** Nejprve je uvedena sekvence nukleotidů v genu kódujícím NKp44, v poli níže je uvedena aminokyselinová sekvence proteinu. Oranžovou barvou písma je zvýrazněn signální peptid, černým písmem je označena extracelulární část proteinu, červeným transmembránová část a zeleným cytoplazmatický úsek. Tyrkysovou barvou jsou podbarveny přesahy PCR primerů, jejichž sekvence je na obrázku uvedena pod sekvencí nukleotidů, žlutou barvou jsou podbarveny komplementární přesahy pro vnesení genu do plasmidu. Podtržení označuje část proteinu amplifikovanou pozdější PCR. Červeným podbarvením je na konci genu označen STOP kodon TGA.

## NKp46

ATGTCTCCACACTCCCTGCCCTGCTCGCTGCGTGGGGCTGTGTCTGAGTCAGAGGATCAGCGCCAGCAGCAGACTCTCCAAAAACCGTTC  
ATCTGGGCCGAGCCCCATTTTCATGGTTCCAAAGGAAAAGCAAGTGACCATCTGTTGCCAGGAAAATTATGGGGCTGTTGAATACCAGCT  
GCACCTTTAAGGAAGCCTTTTTGCCGTGGACAGACAAAACCCCTGAGCGGATTAACAAAGTCAAATCTACATCCCGGACATGAACCT  
CCGCATGGCAGGGCAATACAGCTGCATCTATCGGGTTGGGGAGCTCTGGTCAGAGCCAGCAACTTGCTGGATCTGGTGGTAACAGAA  
ATGTATGACACACCCACCTCTCGGTTTCATCCTGGACCCGAAGTGATCTCGGGAGAGAAGGTGACCTTCTACTGCCGTCTAGACACTGCA  
ACAAGCATGTTCTTACTGCTCAAGGAGGGAAGATCCAGCCACGTACAGCGCGGATACGGGAAGGTCCAGGCGGAGTTCCTCCCTGGGCC  
CTGTGACCACAGCCACCGAGGGACATACCGATGTTTTGGCTCCTATAACAACCATGCCTGGTCTTTCCCCAGTGAGCCAGTGAAGCTCC  
TGGTCACAGGCACATTGAGAACACCAGCCTTGACCTGAAAGACCCACCTTTCTGACACTTGGGGCACCTACCTTTTAACCACAGAGA  
CGGGACTCCAGAAAGACCATGCCTCTGGGATCACACTGCCAGAATCTCCTCGGATGGCCTGGCCTTTCTAGTCTGGTGGCTCTAG  
TGTGGTTCCTGTTGAAGACTGGCTCAGCAGGAAGAGGACTAGAGAGCGAGCCAGCAGAGCTTCCACTTGGGAAGGCAGGAGAAGGC  
TGAACACACAGACTCTTGA

NKp46\_Q22\_pTW5sec\_FW

NKp46\_G212\_pTW5sec\_REV

5' TCTTGAATTACCGGT CAGCAGCAGACTCTC 3'

5' TGGTGGTGATGGTGGGTACC GCCTGTGACCAG 3'

MSSTLPALLCVGLCLLSQRISAQQQTLPKPFIWAEPHF MVPKEKQVTICCCQGNYGAVEYQLHFEGSLFAVDRPKPPER  
INKVKFYIPDMNSRMAGQYSCYRVGELWSEPSNLLDLVVTEMYDPTLSVHPGPEVISGEKVTFCRLDTATSMFL  
LLEGRSSHVQRGYGKVQAEFPLGPVTTAHRGTYRCFGSYNNHAWSPSEPVKLLVTGDIENTSLAPEDPTFPADT  
WGTYLLTETGLQKDHALWDHTAQNLLRMGLAFLVLVALVWFLVEDWLSRKRTREASRASTWEGRRRLNTQTL

**Obrázek 8B: Gen NKp46 – návrh expresního konstruktů.** Nejprve je uvedena sekvence nukleotidů v genu kódujícím NKp46, v poli níže je uvedena aminokyselinová sekvence proteinu. Oranžovou barvou písma je zvýrazněn signální peptid, černým písmem je označena extracelulární část proteinu, červeným transmembránová část a zeleným cytoplazmatický úsek. Tyrkysovou barvou jsou podbarveny přesahy PCR primerů, jejichž sekvence je na obrázku uvedena ve střední části, žlutou barvou jsou podbarveny komplementární přesahy pro vnesení genu do plasmidu. Podtržení označuje část proteinu amplifikovanou pozdější PCR. Červeným podbarvením je na konci genu označen STOP kodon TGA.

## PCNA

ATGTTCCGAGGCAGCCCTGGTCCAGGGCTCCATCCTCAAGAAGGTGTTGGAGGCACTCAAGGACCTCATCAACGAGGCCTGCTGGGATAT  
TAGCTCCAGCGGTGTAACCTGCAGAGCATGGACTCGTCCACGTCTCTTTGGTGCAGCTCACCTGCGGTCTGAGGCTTCGACACCTA  
CCGCTGCGACCCGAACCTGGCCATGGGCGTGAACCTCACAGTATGTCAAAATACTAAAATGCGCCGCAATGAAGATATCATTACACT  
AAGGGCCGAAGATAACGCGGATACCTTGGCGTAGTATTTGAAGCACCAACCAGGAGAAAGTTTCAGACTATGAAATGAAGTTGATG  
GATTTAGATGTTGAACAACCTTGAATCCAGAACAGGAGTACAGCTGTGTAGTAAAGATGCCTTCTGGTGAATTTGCACGTATATGCCGA  
GATCTCAGCCATATTGGAGATGCTGTTGTAATTTCTGTGCAAAAGACGGAGTGAATTTTCTGCAAGTGGAGAAGTTGGAAATGGAAA  
CATTAAATGTCACAGACAAGTAATGTCGATAAAGAGGAGGAGCTGTACCATAGAGATGAATGAACCAAGTTCAACTAATTTTGCCT  
GAGGTACCTGAACCTTTTACAAAAGCCACTCCACTCTTCAACGGTGACACTCAGTATGCTGCAGATGTACCCCTGTTGTAGAGTAT  
AAAATTGCGGATATGGGACACTTAAAATACTACTTGGCTCCCAAGATCGAGGATGAAGAAGGATCTAG

PCNA\_M1\_OPINE\_FW

PCNA\_S261\_OPINE\_REV

5' AGGAGATATACC ATGTTCCGAGGC 3'

5' GTGATGGTGATGTTAGATCCTTCTTCATCCTC 3'

PCNA\_M1\_pTW5sec\_FW

PCNA\_S261\_pTW5sec\_REV

5' TCTTGAATTACCGGT ATGTTCCGAGGC 3'

5' TGGTGGTGATGGTGGGTACCAGATCCTTCTTCATCCTC 3'

MFEARLVQGSILKKVLEALKDLINAECDWISSGVNLQSMDSHVSLVQLTLRSEGFDTYRCDRNLAMGVNLTSM  
KILKAGNEDIITLRAEDNADTLALVFEAPNQEKVSDYEMKLMDLVEQLGIPEQEYSCVVKMPSGEFARICRDL  
SHI GDAVVISCAKDGKFSASGELGNNGIKLSQTSNVDKEEAVTIEMNEPVQLTFALRYLNFFTKATPLSSTVTL  
SMSAD VPLVVEYKIADMGHLKYYLAPKIEDEEGS

**Obrázek 8C: Gen PCNA – návrh expresního konstruktů.** Nejprve je uvedena sekvence nukleotidů v genu kódujícím PCNA, v poli níže je uvedena aminokyselinová sekvence proteinu. Tyrkysovou barvou jsou podbarveny přesahy PCR primerů, jejichž sekvence je na obrázku uvedena ve střední části, žlutou barvou jsou podbarveny komplementární přesahy pro vnesení genu do plasmidu. Podtržení označuje část proteinu amplifikovanou pozdější PCR, v tomto případě tedy celý protein. Červeným podbarvením je na konci genu označen STOP kodon TAG.

Gen kódující PCNA byl amplifikován za použití různých primerů, které obsahovaly specifické přesahy pro plasmidy pTW5sec a pOPINE, neboť produkce později probíhala v různých expresních systémech a jak intracelulárně, tak extracelulárně. V plasmidu pTW5sec byl na rozdíl od plasmidu pOPINE zahrnut i sekreční signál.

DNA klony obsahující geny pro NKp44, NKp46 a PCNA (Sino Biological) byly nejprve zředěny na pracovní roztoky o koncentraci 10 ng/ml, které sloužily jako templáty pro PCR amplifikaci navržených konstruktů během 30 cyklů. Teplota nasedání primerů byla zvolena 56° C, neboť to byla nejnižší z vypočítaných hodnot pro skupinu zmíněných konstruktů a jejich primerů. Pro amplifikaci PCNA byly použity 2 sady primerů s rozdílnými přesahy (primery PCNA\_M1\_OPINE\_FW a PCNA\_S261\_OPINE\_REV se specifickým přesahem pro plasmid pOPINE a primery PCNA\_M1\_pTW5sec\_FW a PCNA\_S261\_pTW5sec\_REV pro plasmid pTW5sec), neboť vzniklé PCR produkty byly později použity pro různé plasmidy (pOPINE a pTW5sec), do kterých byly vloženy. Pro geny kódující části proteinů NKp44 a NKp46 byly navrženy a použity primery se specifickými přesahy pro vložení do plasmidu pTW5sec (primery NKp44\_S19\_pTW5sec\_FW a NKp44\_S130\_pTW5sec\_REV pro NKp44 a primery NKp46\_Q22\_pTW5sec\_FW a NKp46\_G212\_pTW5sec\_REV pro NKp46).

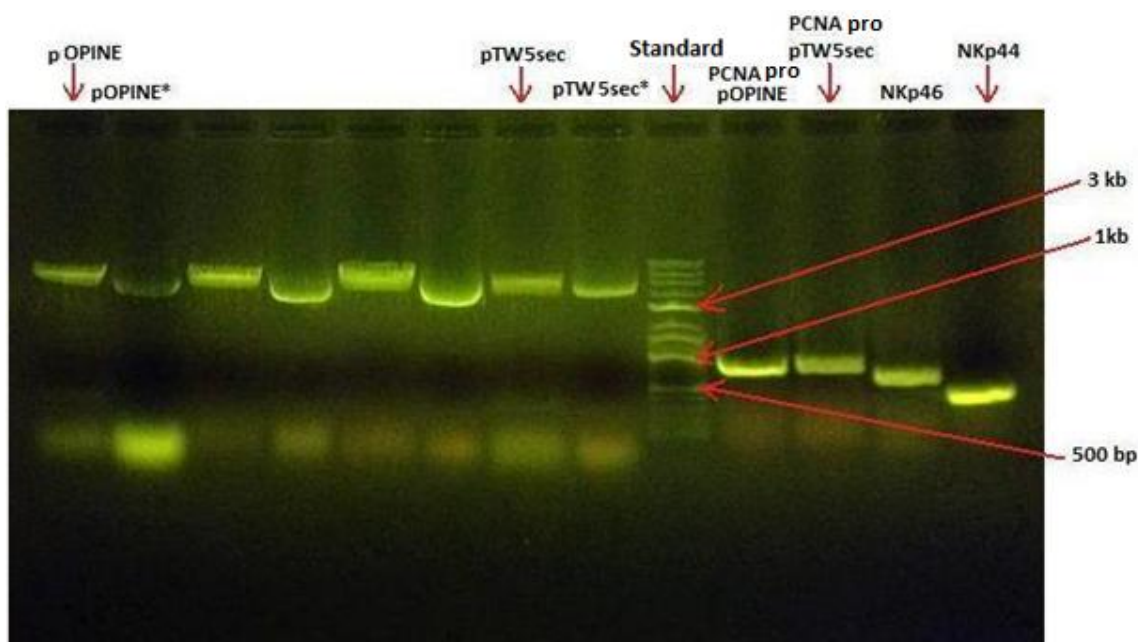
V průběhu PCR reakce byl plasmid pTW5sec linearizován pomocí restrikčních endonukleas AgeI a KpnI. Bylo použito takové množství enzymu, které odpovídalo aktivitě štěpení 5 µg/hod. Po namíchání reakční směsi byla provedena inkubace přibližně 90 min při 37° C. Plasmid pOPINE byl použit ze zásobního roztoku již dříve linearizovaného plasmidu.

Výsledky štěpení plasmidů a PCR reakcí byly vyhodnoceny agarosovou elektroforézou (Obr. 9, str. 41). Vzhledem k rozptylu velikostí DNA fragmentů analyzovaných agarosovou elektroforézou bylo smícháno 5 µl 1 kbp standardu a 5 µl 100 bp standardu. Vzorky byly vyříznuty a přečištěny z agarosového gelu. Linearizované plasmidy byly eluovány 30 µl a amplifikované geny 50 µl elučního pufru. Poté byla změřena koncentrace DNA v jednotlivých eluátech. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 2, str. 41.

Následně byly amplifikované expresní konstrukty vneseny do linearizovaných plasmidů nesoucích gen pro resistenci na ampicilin. Podle vztahu (1), str. 29, bylo orientačně určeno množství použitého insertu i vektoru. Vždy bylo použito 100 ng plasmidu a 25 ng amplifikovaného genu. Připravenými vektory byly zrychleně transformovány kompetentní bakteriální buňky *Escherichia coli* DH5α, které byly poté rozetřeny na kultivační misky



s agarem v LB médiu obsahujícím ampicilin o koncentraci 100 µg/ml. Misky byly přes noc inkubovány při 37° C.



**Obrázek 9: Agarosová elektroforéza PCR produktů, štěpení plasmidů pTW5sec a pOPINE.** Plasmidy označené hvězdičkou značí linearizované formy plasmidů. Označení plasmidu u jednotlivých vzorků PCNA označuje použití různých primerů se specifickými přesahy pro plasmid pOPINE či pTW5sec. Očekávané velikosti fragmentů byly pro PCNA určeny pro vložení do plasmidu pOPINE 810 bp, pro PCNA určené pro vložení do plasmidu pTW5sec 819 bp, pro NKp46 609 bp a pro NKp44 372 bp.

**Tabulka 2: Koncentrace DNA vzorků přečištěných z agarosového gelu.**

Vzorek	c [ng/µl]
pOPINE*	14
pTW5sec*	21
PCNA pOPINE	42
PCNA pTW5sec	20
NKp44	43
NKp46	46

Poté byla provedena nízkoobjemová izolace plasmidové DNA z buněk, které narostly po transformaci. Dále byla změřena koncentrace získané plasmidové DNA. Naměřené hodnoty shrnuje Tab. 3, str. 42. Ze získaných vzorků byly odebrány příslušné objemy pro provedení sekvenace. Složení vzorků pro sekvenční analýzu shrnuje Tab. 4, str. 42.

**Tabulka 3: Koncentrace plasmidové DNA získané nízkoobjemovou izolací.**

Vzorek	c [ng/μl]
PCNA pOPINE	75
PCNA pTW5sec	106
NKp44 pTW5sec	112
NKp46 pTW5sec	137

**Tabulka 4: Složení vzorků pro sekvenční analýzu.**

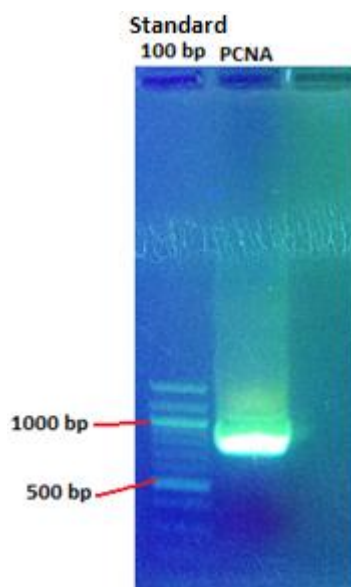
Označení	Vzorek	Použitý primer
STH1	NKp44 pTW5sec	pTT_FW
STH2	NKp44 pTW5sec	pTWsec_REV
STH3	NKp46 pTW5sec	pTT_FW
STH4	NKp46 pTW5sec	pTWsec_REV
STH5	PCNA pOPINE	T7promoter
STH6	PCNA pOPINE	pTT_REV
STH7	PCNA pTW5sec	pTT_FW
STH8	PCNA pTW5sec	pTWsec_REV

Kontrolou výsledků sekvenční analýzy vyšlo najevo, že geny kódující požadované proteiny byly úspěšně vneseny do plasmidů. Vzorky získané nízkoobjemovou preparací plasmidové DNA byly po ověření sekvence použity pro zrychlenou metodu transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5α, které byly přes noc inkubovány při 37° C na agarovém živném médiu obsahujícím ampicilin o koncentraci 100 μg/ml. Poté byly buňky z misky spláchnuty a připraveny na velkoobjemovou izolaci plasmidové DNA. Naměřené koncentrace získané DNA shrnuje Tab. 5.

**Tabulka 5: Koncentrace plasmidové DNA získané velkoobjemovou izolací.**

Vzorek	c [ng/μl]	Výtěžek [mg]
PCNA pOPINE	1350	1,350
PCNA pTW5sec	3023	3,023
NKp44 pTW5sec	3081	3,081
NKp46 pTW5sec	3478	3,478

Přítomnost genu pro PCNA ve vzorku obsahujícím PCNA pOPIN E byla pro jistotu ověřena provedením PCR reakce s produktem velkoobjemové izolace plasmidové DNA. PCR produkty byly vyhodnoceny pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 10). Délka PCR produktu získaného reakcí se zmíněným templátem a primery PCNA\_M1\_OPINE\_FW a PCNA\_S261\_OPINE\_REV odpovídala očekávané délce konstruktů PCNA (810 bp).



**Obrázek 10:** Agarosová elektroforéza produktu PCR reakce, jejímž templátem byl plasmid pOPINE nesoucí gen pro PCNA. Předpokládaná velikost amplifikovaného konstruktů byla 810 bp.

## 5.2 Příprava proteinu PCNA

### 5.2.1 Produkce PCNA v bakteriálním expresním systému

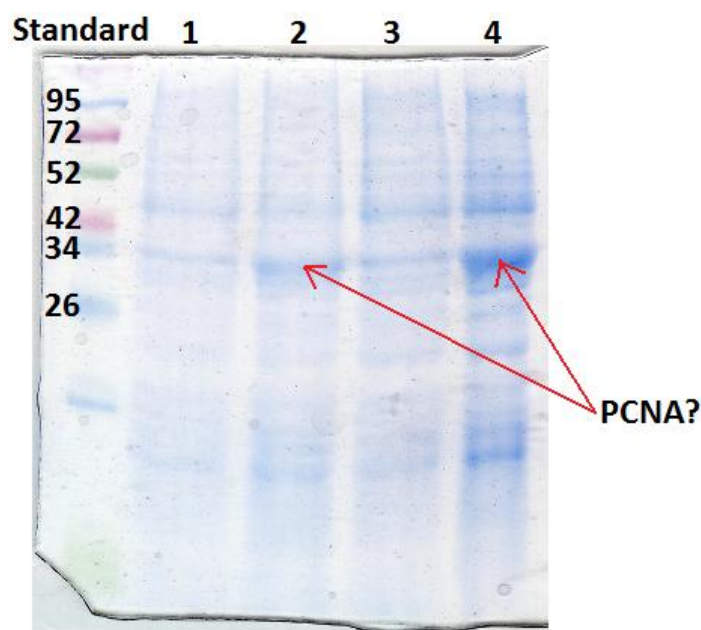
Plasmidem pOPINE získaným z velkoobjemové izolace obsahujícím gen pro PCNA byly transformovány bakteriální buňky *Escherichia coli* BL21(DE3). Pro tuto transformaci bylo použito 50  $\mu$ l suspenze kompetentních buněk a 1  $\mu$ l roztoku plasmidu PCNA pOPINE.

Dalším krokem byla produkce proteinu PCNA v bakteriálním expresním systému. Produkce byla provedena ve dvou paralelních experimentech, které se lišily teplotou inkubace po přidání indukčního činidla. Produkce 1 byla inkubována při 37° C po 4 h, zatímco produkce 2 při 18° C přes noc. Naměřené hodnoty optické hustoty při 600 nm během nárůstu buněčné suspenze jsou zaznamenány v Tab. 6, str. 44.

**Tabulka 6: Optická hustota při kultivaci bakteriální kultury *Escherichia coli* BL21(DE3) transformované plasmidem PCNA pOPINE.**

t [min]	OD <sub>600</sub> (produkce 1)	OD <sub>600</sub> (produkce 2)
210	0,020	0,013
300	0,120	0,129
360	0,363	0,395
390	0,570	0,640

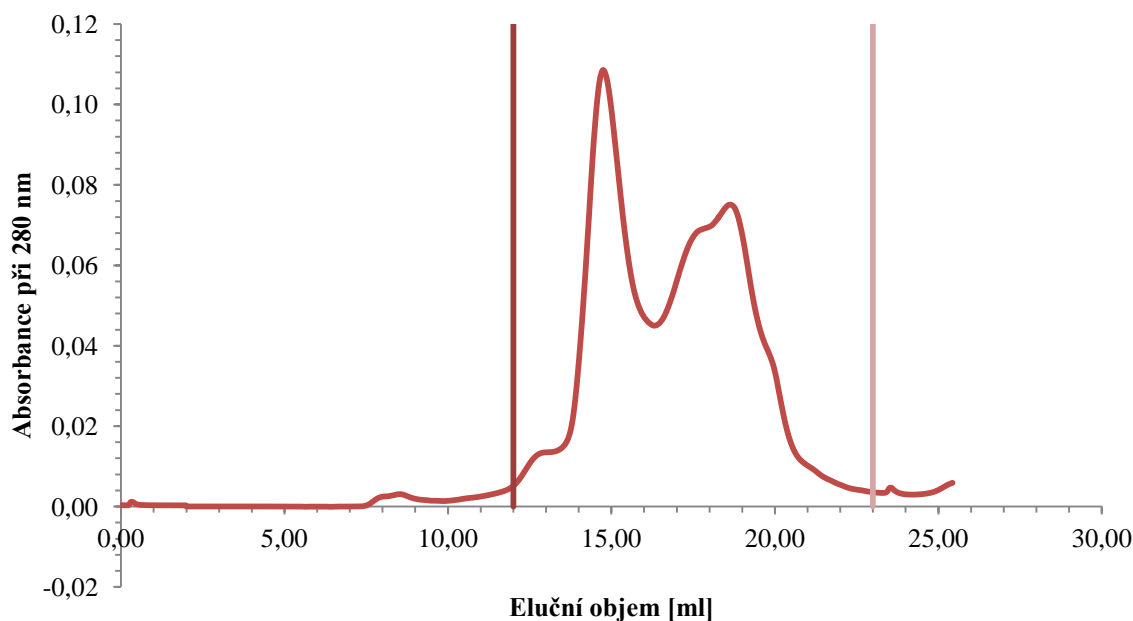
Po 390 min inkubace bylo přidáno indukční činidlo IPTG. Buněčné suspenze byly inkubovány při 37° C po 4 h nebo při 18° C přes noc a následně sklizeny centrifugací a promyty TES pufrem. Vzorky odebrané před indukcí a po indukci (resp. v okamžiku sklizení kultur) byly naneseny na SDS-PAGE (Obr. 11).



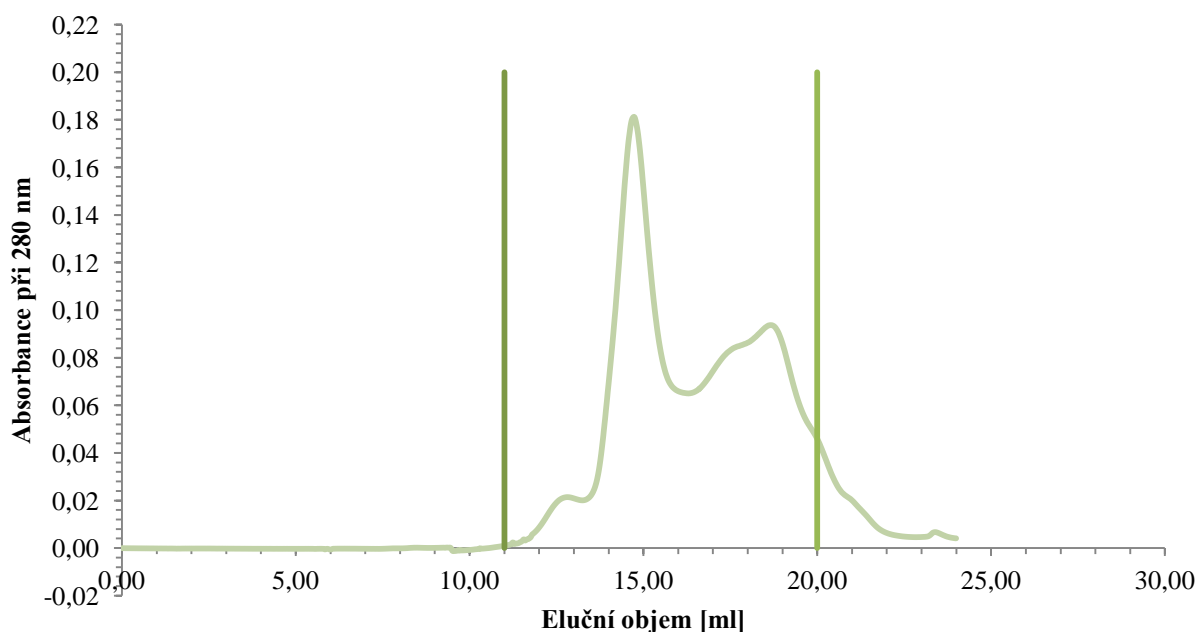
**Obrázek 11: Bakteriální exprese proteinu PCNA.** 12,5% SDS elektroforéza vzorků odebraných před a po indukci buněčné kultury *Escherichia coli* BL21(DE3) transformované plasmidem PCNA pOPINE. Do dráhy 1 byl pipetován vzorek obsahující bakterie těsně před provedením indukce (kultivované při 37° C), do dráhy 2 byl pipetován vzorek těchto bakterií po následné inkubaci. Do dráhy 3 byl pipetován roztok obsahující bakterie před provedením indukce inkubované při 18° C, do dráhy 4 byl pipetován vzorek těchto bakterií po inkubaci. Červené šipky s popiskou „PCNA?“ míří ke stopám v polyakrylamidovém gelu, které jsou výraznější u vzorků buněčných suspenzí odebraných po indukci. Velikostně by také mohly odpovídat monomeru PCNA (29,6 kDa).

Ze vzniklých pelet byly připraveny vzorky pro chelatační afinitní chromatografii. Necelých 15 ml sesbíraného eluátu z této chromatografie bylo zkoncentrováno na objem

asi 0,5 ml. S koncentrátem byla provedena gelová permeační chromatografie, získané chromatogramy jsou uvedeny na Obr. 12A, (produkce při 37° C) a 12B, (produkce při 18° C).



**Obrázek 12A: Gelová permeační chromatografie PCNA po afinitní chelatační chromatografii.** Vzorek proteinu byl získán bakteriální produkcí při 37° C; kolona Superdex 200 10/300 GL. Svislé čáry vymezují eluční objem, který byl sbírán po 1 ml frakcích.



**Obrázek 12B: Gelová permeační chromatografie PCNA po afinitní chelatační chromatografii.** Vzorek proteinu byl získán bakteriální produkcí při 18° C; kolona Superdex 200 10/300 GL. Svislé čáry vymezují eluční objem, který byl sbírán po 1 ml frakcích.

U frakcí sesbíraných z obou gelových permeačních chromatografií byla změřena koncentrace PCNA (Tab. 7). Reálná koncentrace PCNA se ovšem od určených hodnot vzhledem k přítomnosti znečišťujících látek lehce liší. Teoretický extinkční koeficient a velikost exprimovaného proteinu byla určena pomocí online kalkulátoru ProtParam [35]. Molekulová hmotnost byla určena jako 29591.63 Da a teoretický extinkční koeficient při 280 nm jako  $16305 \text{ mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS elektroforézy (Obr. 13 – 14, str. 47).

**Tabulka 7: Koncentrace PCNA ve frakcích z gelové permeační chromatografie.**

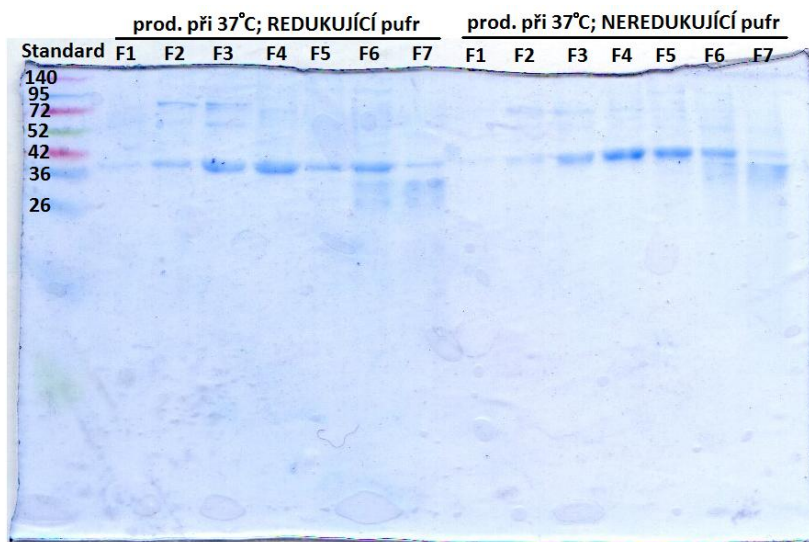
Produkce při 37° C			Produkce při 18° C		
Frakce	V <sub>eluční</sub> [ml]	c <sub>PCNA</sub> [mg/ml]	Frakce	V <sub>eluční</sub> [ml]	c <sub>PCNA</sub> [mg/ml]
1	12	0,00	1	11	0,022
2	13	0,057	2	12	0,083
3	14	0,150	3	13	0,298
4	15	0,682	4	14	1,054
5	16	0,609	5	15	0,970
6	17	0,426	6	16	0,808
7	18	0,559	7	17	0,751
8	19	0,608	8	18	0,848
9	20	0,468	9	19	0,739
10	21	0,244	10	20	0,453
11	22	0,042			
12	23	0,081			

### 5.2.2 Produkce PCNA v expresním systému HEK293

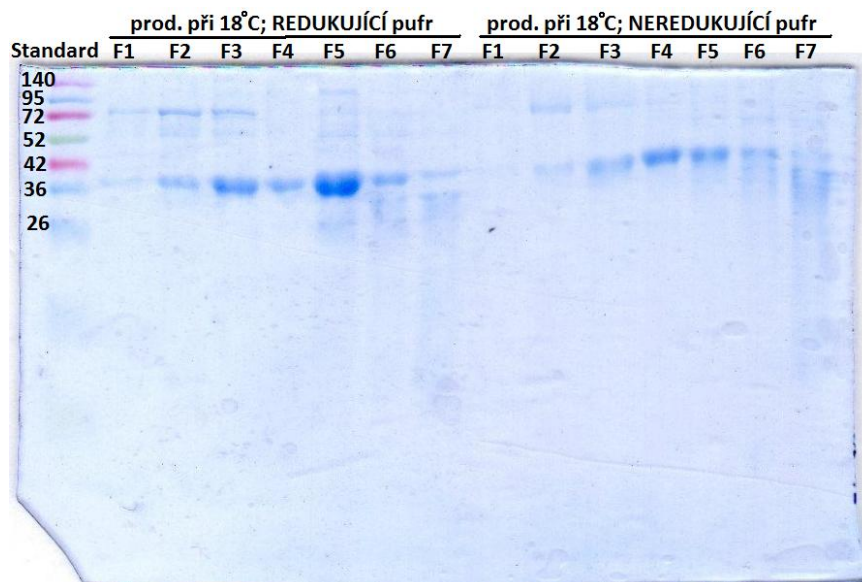
Plasmidem PCNA pOPINE umožňujícím intracelulární expresi proteinu byly transientně transfekovány buňky HEK293S GnTI. Po týdenní inkubaci v objemu 400 ml byly buňky sklizeny centrifugací. Následná purifikace byla provedena pouze z jedné čtvrtiny sklizených buněk. Zbylé pelety byly uskladněny při -80° C.

Buňky byly lyzovány stejným způsobem jako v případě zpracování bakteriálního expresního systému. Poté byla provedena iontově výměnná chromatografie. Eluát byl následně zpracován pomocí afinitní chromatografie. Objem eluátu afinitní chromatografie

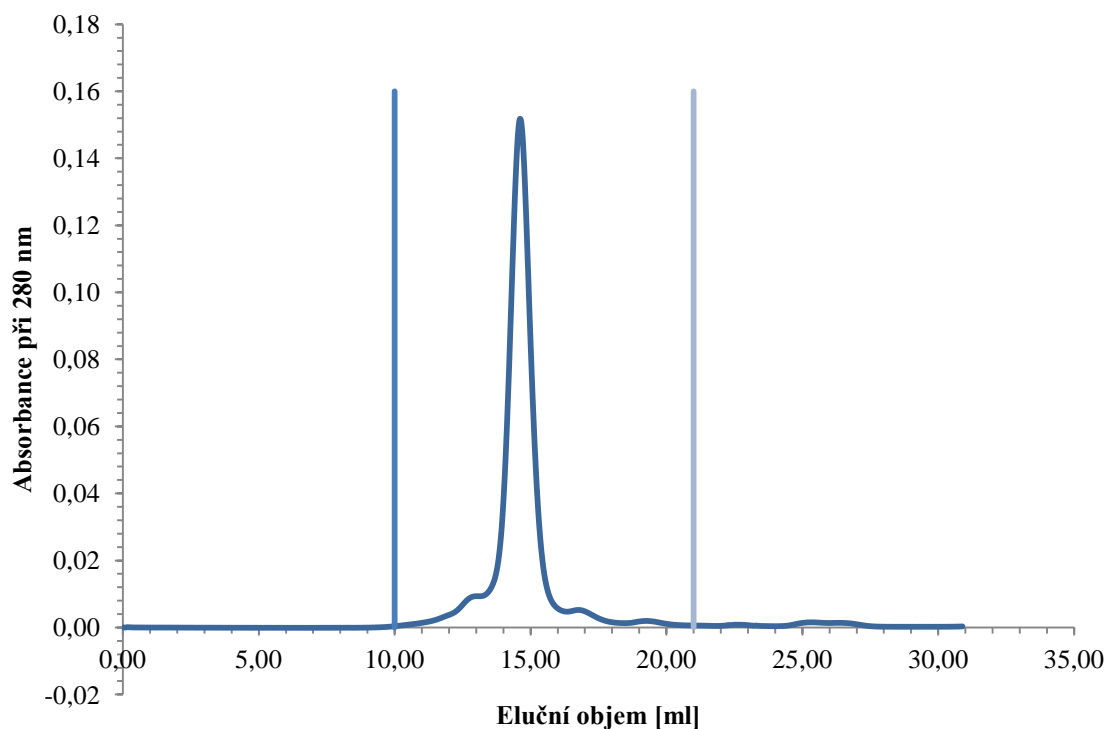
byl 10 ml, které byly zkoncentrovány na výsledný objem asi 0,5 ml. Koncentrát byl následně zpracován pomocí gelové permeační chromatografie (Obr. 15, str. 48). U sesbíraných frakcí byla změřena koncentrace PCNA (Tab. 8, str. 48). Vybrané frakce (3 – 7) byly dále analyzovány pomocí SDS elektroforézy (Obr. 16, str. 49).



**Obrázek 13: Analýza frakcí z gelové permeační chromatografie.** Vzorky z frakcí F1 – F7 z chromatografie z produkce proteinu PCNA při 37°C byly analyzovány SDS elektroforézou v 12,5% polyakrylamidovém gelu v redukujícím i neredukujícím vzorkovém pufru.



**Obrázek 14: Analýza frakcí z gelové permeační chromatografie.** Vzorky z frakcí F1 – F7 z chromatografie z produkce proteinu PCNA při 18°C byly analyzovány SDS elektroforézou v 12,5% polyakrylamidovém gelu v redukujícím i neredukujícím vzorkovém pufru.

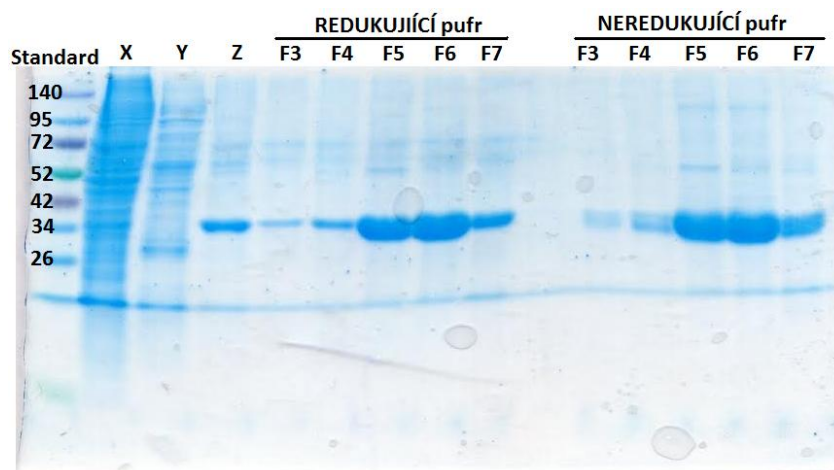


**Obrázek 15: Gelová permeační chromatografie PCNA po iontové výměnné a chelatační afinitní chromatografii.** Vzorek proteinu byl získán intracelulární produkcí v expresním systému HEK293S GnTI; kolona Superdex 200 10/300 GL. Svislé čáry vymezují eluční objem, který byl sbírán po 1 ml frakcích.

**Tabulka 8: Koncentrace PCNA ve frakcích z gelové permeační chromatografie vzorku PCNA produkovaného intracelulárně v buněčné linii HEK293S GnTI**

Frakce	$V_{\text{eluční}}$ [ml]	$c_{\text{PCNA}}$ [mg/ml]
1	10	0,00
2	11	0,00
3	12	0,02
4	13	0,06
5	14	0,52
6	15	0,65
7	17	0,15
8	18	0,00
9	19	0,00
10	20	0,03
11	21	0,00





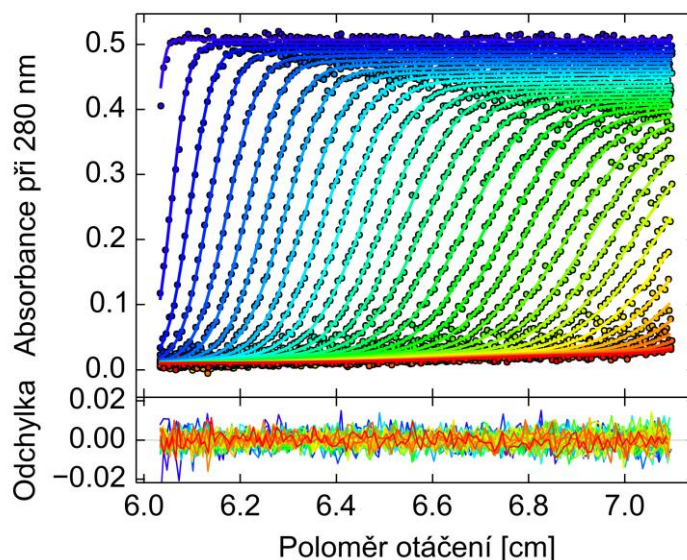
**Obrázek 16: Analýza frakcí z gelové permeační chromatografie.** Vzorky z frakcí F3 – F7 z chromatografie z intracelulární produkce proteinu PCNA v HEK293S GnTI<sup>-</sup> buněčné linii byly analyzovány SDS elektroforézou v 12,5% polyakrylamidovém gelu v redukcujícím i neredukujícím vzorkovém pufru. V dráze X byl analyzován roztok, který protekl kolonou během iontově výměnné chromatografie, v dráze Y roztok, který protekl kolonou během afinitní chromatografie a v dráze Z eluát z afinitní chromatografie.

### 5.2.3 Analýza oligomerního stavu PCNA

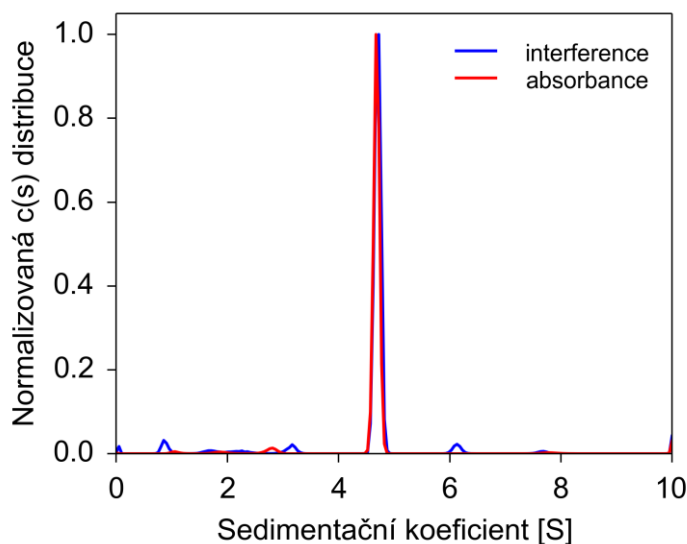
Sedimentační analýza byla provedena metodou sedimentační rychlosti [31]. Tato analýza nám poskytuje údaje o velikosti částic a o jejich zastoupení v roztoku. Na makromolekuly v roztoku působí velká odstředivá síla, díky které se začnou pohybovat směrem ke dnu kyvety. V roztoku se tak vytvoří rozhraní mezi roztokem s makromolekulami a čistým pufrům. Pohyb rozhraní je sledován sérií snímků a lze tak určit sedimentační koeficient (a dále pak velikost) dané makromolekuly.

Sedimentační analýzu provedl na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Protein byl analyzován při koncentraci 0,65 mg/ml (Obr. 17, str. 50). Normalizovanou distribuci sedimentačního koeficientu pro data získaná pomocí absorbanční i interferenční detekce zobrazuje Obr. 18, str. 50. Protein PCNA má pozorovanou hodnotu sedimentačního koeficientu přepočtenou na standardní podmínky (20 °C, čistá voda)  $s_{20,w} = 4,92$  S. Na základě srovnání naměřeného sedimentačního koeficientu a teoretické hodnoty odpovídající sedimentaci částice tvaru koule o molekulové hmotnosti monomeru PCNA lze odvodit, že protein se v roztoku nachází v oligomerní formě, protože takto lehká částice by tak rychle sedimentovat nemohla. Z hodnoty sedimentačního koeficientu se jako nejpravděpodobnější uspořádání jeví trimer, přičemž pro model tvaru částice typu

zploštělý rotační elipsoid vychází rozměry přibližně  $11,9 \times 2,3$  nm, což velice dobře odpovídá rozměrům PCNA podle krystalové struktury (PDB ID 5L7C [24]) s rozměry  $9,5 \times 2,5$  nm. Malý signál u  $s_{20,w}$  2,9 S by pak mohl odpovídat monomeru PCNA.



**Obrázek 17: Sedimentační analýza proteinu PCNA.** Data byla sbírána při 48000 ot./min a 20 °C, bylo snímáno 200 snímků po 3 min při vlnové délce 280 nm. Graf zobrazuje každý třetí snímek, horní panel obsahuje absorbanční data (body) s modelovanými průběhy sedimentačního rozhraní (křivky) pro dané částice, spodní panel ukazuje odchylnku modelu od naměřených dat.



**Obrázek 18: Distribuce sedimentačního koeficientu pro protein PCNA.** Graf zobrazuje normalizovanou distribuci sedimentačního koeficientu částic přítomných v analyzovaném vzorku pozorovanou pomocí absorbanční a interferenční detekce. Sedimentační koeficient odpovídající trimeru PCNA přepočtený na standardní podmínky je  $s_{20,w} = 4,92$  S.

## 6 Diskuse

Geny kódující proteiny PCNA, NKp44 a NKp46 byly amplifikovány a vloženy do příslušných vektorů, kterými byly transformovány a transfekovány buněčné kultury. Ty byly poté využity pro produkci těchto proteinů.

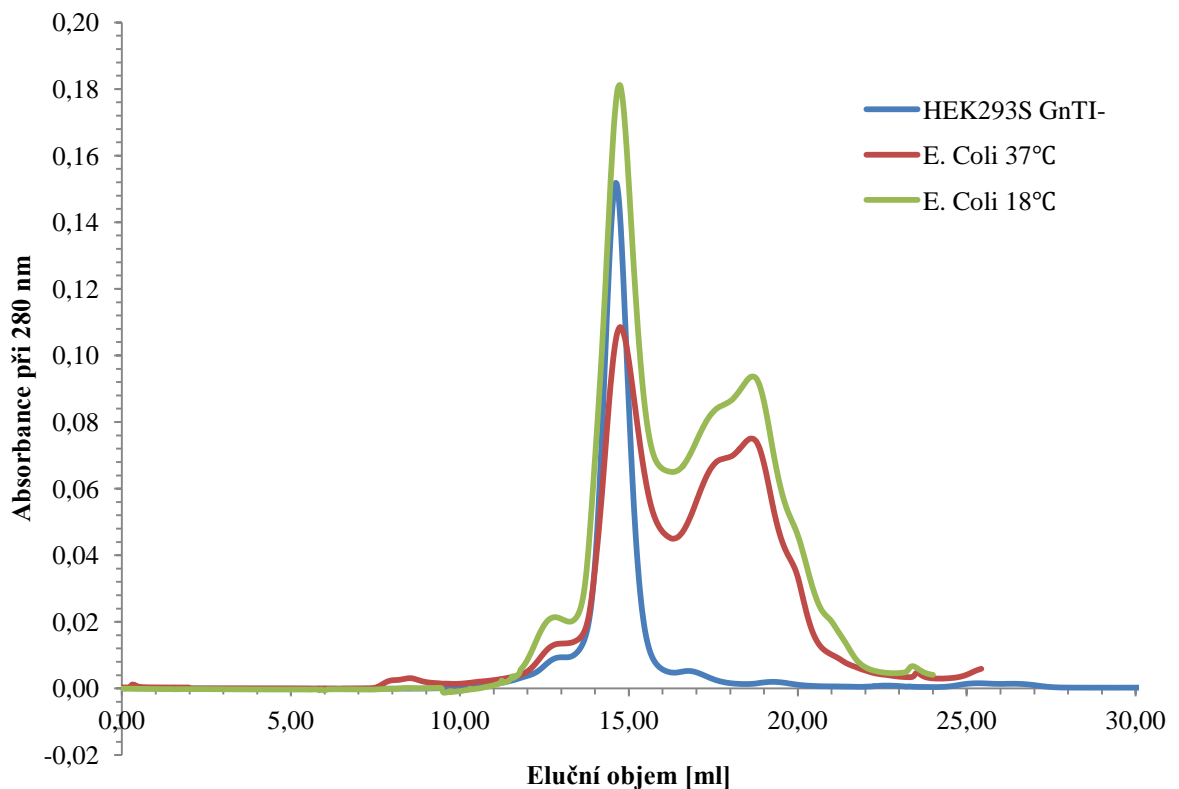
Z neznámého důvodu se ovšem nezdařilo produkovat PCNA v expresním systému HEK293S GnTI za použití plasmidu pTW5sec. Rozdíl oproti produkci, pro kterou byl využit plasmid pOPINE, tkvěl v tom, že plasmid pTW5sec obsahuje tzv. sekreční signál, díky kterému je produkován protein buňkami HEK293S GnTI produkován extracelulárně (tedy sekretován do média). Tento způsob produkce přináší značná zjednodušení pracovního postupu. Není například potřeba lyzovat buňky ultrazvukovou sondou. Navíc použité buňky HEK293S GnTI produkují mnohem více proteinů intracelulárně, proto je protein produkován extracelulárně jednodušší purifikovat s menším znečištěním jinými proteiny.

Na druhou stranu při pohledu do chromatogramů získaných při gelových permeačních chromatografiích je zcela evidentní, že protein PCNA byl purifikován s nejmenším podílem znečištění právě při produkci, která probíhala intracelulárně v expresním systému HEK293S GnTI. Toho mohlo být dosaženo díky použití iontově výměnné chromatografie, která nebyla provedena v případě bakteriálních produkcí. Díky tomuto kroku navíc byl zřejmě protein purifikován méně znečištěný, ač byl produkován v expresním systému s mnohem větším proteomem. Vzhledem k pozitivním výsledkům bude v budoucnu experiment opakován, ovšem bude vynechána iontově výměnná chromatografie a bude pozorována míra znečištění produkovaného PCNA, která bude porovnána s již získanými daty. Porovnání jednotlivých produkcí shrnuje Obr. 19, str. 52.

Purifikace z produkce v linii HEK293S GnTI uvedená v tomto chromatogramu ovšem byla prováděna pouze z množství buněk ze 100 ml buněčné suspenze, zatímco bakteriálních suspenzí bylo použito vždy 0,5 l. Veškerá získaná data tak naznačují, že v budoucnu bude produktivnější využívat pro rekombinantní expresi PCNA právě tento expresní systém.

Zda se podařilo vyprodukovat PCNA ve stavu trimeru či nikoliv nebylo z dat získaných provedením gelových permeačních chromatografií zcela jisté. Pravděpodobně nejvyšší eluční vrchol skutečně vždy patřil právě trimeru PCNA. Menší vrchol (při 12 ml) by pak mohl patřit monomerní formě tohoto proteinu. Předpokládáme, že nejde pouze o

znečištění, protože jej můžeme na obrázku 19 pozorovat u všech produkcí. Zda se skutečně podařilo připravit PCNA ve formě trimeru bylo následně ověřeno provedením sedimentační analýzy v analytické ultracentrifuze, která tvorbu očekávaného trimeru jednoznačně potvrdila.



**Obrázek 19: Srovnání chromatogramů z gelových permeačních chromatografií z produkci proteinu PCNA v bakteriálním expresním systému při různých teplotách a v buněčné linii HEK293S GnTI.** Již při prvním pohledu je zcela zřejmé, že produkce PCNA v buněčné linii HEK293S GnTI vedla k nejčistšímu získanému vzorku.

Tato práce v budoucnu povede ke studiu interakcí receptoru NKp44 s jeho protějškem PCNA. Protein NKp46 bude připraven také z důvodu studia interakce tohoto receptoru s jeho vlastním ligandem Epa1 kvasinkového původu, a také pro použití obou receptorů jako vzájemné negativní kontroly při těchto vazebných experimentech.

## **7 Závěr**

V bakteriálním i eukaryotickém expresním systému se podařilo připravit protein PCNA. Expresní systém linie HEK293S GnTI byl určen jako vhodnější pro produkci PCNA. Dále se podařilo připravit vektory obsahující konstrukty umožňující expresi extracelulárních domén proteinů NKp44 a NKp46.

## 8 Citovaná literatura

1. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., The biology of human natural killer-cell. *Trends in Immunology*. 2001. **22**: p. 633-640.
2. Bellora, F., Castriconi, R., Dondero, A., Carrega, P., Mantovani, A., Ferlazzo, G., Moretta, A., Bottino, C., Human NK cells and NK receptors. *Immunol Lett*, 2014. **161**(2): p. 168-73.
3. Knorr, D.A., Bachanova, V., Verneris, M.R., Miller, J.S., Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Semin Immunol*, 2014. **26**(2): p. 161-72.
4. Topham, N.J., Hewitt, E.W., Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*. 2009. **128** (1): p. 7-15.
5. Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdlička, T., Špíšek, R., *Základy imunologie*. 2013, Praha/Kroměříž: TRITON.
6. Huntington, N.D., NK cell recognition of unconventional ligands. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(3): p. 208-9.
7. Voet, D., Voet, J.G., *Biochemie*. 1995, Victoria Publishing: Praha.
8. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., Brossay, L., Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(4): p. 239-52.
9. Moretta, L., Pietra, G., Vacca, P., Pende, D., Moretta, F., Bertaina, A., Mingari, M.C., Locatelli, F., Moretta, A., Human NK cells: From surface receptors to clinical applications. *Immunol Lett*, 2016. **178**: p. 15-9.
10. Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., Vivier, E., Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(3): p. 221-9.
11. Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., Moretta, A., Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol*, 2005. **26**(4): p. 221-6.
12. Cagnano, E., Hershkovitz, O., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Golder, A., Sion-Vardy, N., Bogdanov-Berezovsky, A., Mandelboim, O., Benharroch, D., Porgador, A., Expression of ligands to NKp46 in benign and malignant melanocytes. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(4): p. 972-9.
13. Diab, M., Glasner, A., Isaacson, B., Bar-On, Y., Drori, Y., Yamin, R., Duev-Cohen, A., Danziger, O., Zamostiano, R., Mandelboim, M., Jonjic, S., Bacharach, E., Mandelboim, O., NK-cell receptors NKp46 and NCR1 control human metapneumovirus infection. *Eur J Immunol*, 2017. **47**(4): p. 692-703.
14. Ponassi, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Pesce, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M., Bordo, D., Structure of the human NK cell triggering receptor NKp46 ectodomain. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **309**(2): p. 317-23.
15. Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., Moretta, A., Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*, 1998. **188**(5): p. 953-60.
16. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
17. Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A., NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2065-72.

18. Cantoni, C., Ponassi, M., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M., Bordo, D., The three-dimensional structure of the human NK cell receptor NKp44, a triggering partner in natural cytotoxicity. *Structure*, 2003. **11**(6): p. 725-34.
19. Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., Biassoni, R., NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med*, 1999. **189**(5): p. 787-96.
20. Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M.Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L.A., Aharoni, A., Cerwenka, A., Campbell, K.S., Braiman, A., Porgador, A., Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol*, 2011. **187**(11): p. 5693-702.
21. Horton, N.C., Mathew, S.O., Mathew, P.A., Novel interaction between proliferating cell nuclear antigen and HLA I on the surface of tumor cells inhibits NK cell function through NKp44. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59552.
22. Bruning, J.B., Shamoo, Y., Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure*, 2004. **12**(12): p. 2209-19.
23. Yao, N.Y., O'Donnell, M., DNA Replication: How Does a Sliding Clamp Slide? *Curr Biol*, 2012. **27**(5): p. R174-R176.
24. De March, M., Merino, N., Barrera-Vilarmau, S., Crehuet, R., Onesti, S., Blanco, F.J., De Biasio, A., Structural basis of human PCNA sliding on DNA. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 13935.
25. Ivanov, I., Chapados, B.R., McCammon, J.A., Tainer, J.A., Proliferating cell nuclear antigen loaded onto double-stranded DNA: dynamics, minor groove interactions and functional implications. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(20): p. 6023-33.
26. Monteiro, S., Roque, S., Marques, F., Correia-Neves, M., Cerqueira, J.J., Brain interference: Revisiting the role of IFN $\gamma$  in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 2017. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.05.003. [Epub ahead of print]
27. Campbell, K.S., Yusa, S., Kikuchi-Maki, A., Catina, T.L., NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol*, 2004. **172**(2): p. 899-906.
28. Kalkulátor teploty nasedání primerů <http://tmcaculator.neb.com/#/> Citováno 24. 6. 2017, New England biolabs.
29. DNA standard 1 kb <https://www.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder> Citováno 24. 6. 2017, New England Biolabs.
30. DNA standard 100 bp <https://www.neb.com/products/n3231-100-bp-dna-ladder> Citováno 25. 6. 2017, New England Biolabs.
31. Vaněk, O., Bezouška, K., Analytická ultracentrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy*, 2010. **104**(12): p. 1155-1162.
32. Sednterp <http://www.jphilo.mailway.com/default.htm> Citováno 2. 8. 2017.
33. Sedfit <http://www.analyticalultracentrifugation.com> Citováno 2. 8. 2017.
34. Ponassi, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M., Bordo, D., Expression and crystallographic characterization of the extracellular domain of human natural killer cell triggering receptor NKp46. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003. **59**(12): p. 2259-61.
35. Kalkulátor ProtParam <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam> Citováno 27. 6. 2017.

