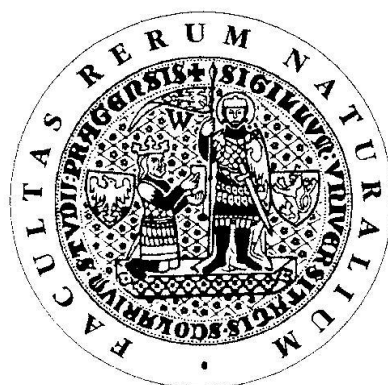


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



*Bc. Anna Dvorská*

## **STRUKTURNÍ BIOLOGIE KOMPLEXU POTKANÍCH NK BUNĚČNÝCH RECEPTORŮ NKR-P1B A CLRB**

**Structural biology of complex of rat NK cell receptors  
NKR-P1B and Clrb**

Diplomová práce

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

Praha 2014

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

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 19. 5. 2014

*Dvořáková*

# Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali s přípravou práce nebo mě jakkoli podporovali během jejího vytváření. Zejména pak chci poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za podnětné rady, čas strávený odbornými konzultacemi a hlavně jeho trpělivost. Děkuji všem členům laboratoře 204 (hlavně Mgr. Janu Bláhovi za ochotu kdykoli poradit a pomoci, Bc. Heleně Pucholtové za poskytnutí fúzního proteinu mNKR-P1C).

Děkuji také Mgr. Janě Písačkové za možnost měření diferenční skenovací fluorimetrie, Mgr. Ctiradu Hofrovi, Ph.D. za pomoc při měření anizotropie fluorescence, Mgr. Jakubu Ptáčkovi za ochotu při nasazování kapek a Ing. Janu Dohnálkovi za pomoc při testování vzniklých krystalů. V neposlední řadě děkuji také svým rodičům a přátelům za jejich podporu v době mého studia.

# Abstrakt

NK buňky mají důležitou roli v nespecifické imunitě organismů. Jejich schopností je rozpoznat a zabít nádorové a virově infikované buňky bez předchozí senzitivace antigenem. Jejich funkce je usměrňována množstvím stimulačních a inhibičních receptorů interagujících s ligandy na cílové - nádorové či infikované buňce. Tato práce se zabývá přípravou a studiem komplexu potkaního NK buněčného inhibičního receptoru NKR-P1B („natural killer cell receptor - protein 1B“) a jeho ligandu Clrb („C-type lectin-related ligand b“). Clrb spouští inhibici NKR-P1B, což znamená, že pokud buňka exprimuje Clrb, nebude zničena. Při infekci potkaním cytomegalovirem ztrácí buňka ze svého povrchu Clrb a není tedy zabráněno jejímu zničení. Buňky infikované tímto virem se brání zničení pomocí exprese virového genu C-lektinového typu RCTL, jenž je homologem Clrb.

Pro rekombinantní přípravu rozpustné formy těchto dvou receptorů potkaních NK buněk byla použita tranzientní transfekce linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 s jednoduchou glykosylací (HEK293S GnTI<sup>-</sup>). Nativní formy receptorů - disulfidicky vázané homodimery - byly připraveny jako fúzní konstrukty s IgG Fc (s pomocí vektoru pYD5), které po odštěpení TEV proteasou poskytují čistě dimerní formu extracelulární části receptorů bez jakékoliv afinitní kotvy. Komplex NKR-P1B s Clrb byl charakterizován pomocí anizotropie fluorescence a rezonance povrchového plazmonu. Samotný ligand Clrb byl použit ke krystalizaci za účelem rozluštění jeho struktury.

## Klíčová slova

NK buňka, receptor, NKR-P1, Clrb, HEK293, SPR, proteinová krystalografie

# Abstract

The Natural Killer (NK) cells have an important role in the nonspecific immunity of the organism. They have the ability to identify and to kill tumor cells and cells infected by a virus without preceding sensitization by antigen. Their function is directed by the amount of stimulation and inhibition receptors interacting with ligands on the tumor or infected cell. This thesis focuses on the preparation and the study of the complex of rat NK cellular inhibition receptor NKR-P1B („natural killer cell receptor - protein 1B“) and its ligand Clrb („C-type lectin-related ligand b“). The Clrb initiates the inhibition of NKR-P1B, meaning that if the cell express Clrb, it won't be destroyed. If the cell gets infected by the rat cytomegalovirus, it loses Clrb from its surface and its destruction is therefore no longer prevented. Cells infected with this virus defend themselves from destruction by expression of the viral gene of C-type lectin RCTL, which is a homolog of Clrb.

Transient transfection of human embryonic kidney 293 cell line with simple glycosylation (HEK293S GnTI<sup>-</sup>) was used for the recombinant preparation of the soluble form of these two receptors of the rat NK cells. The native forms of the receptors - disulfidic homodimers - were prepared as the fusion construct with IgG Fc (using vector pYD5), which after the cleavage using TEV protease provided purely dimeric form of the extracellular part of the receptors without any affinity tag. The complex of NKR-P1B with Clrb was characterized using fluorescence anisotropy and surface plasmon resonance. The ligand Clrb itself was used for the crystallization with the aim to determine its structure and the crystals of Clrb were obtained.

(In Czech)

## Keywords

NK cell, receptor, NKR-P1, Clrb, HEK293, SPR, protein crystallography

# Obsah

<b>1</b>	<b>Teoretický úvod</b>	<b>1</b>
1.1	NK buňky . . . . .	1
1.1.1	Historie NK buněk . . . . .	1
1.1.2	Charakterizace NK buněk . . . . .	2
1.1.3	Porucha funkce NK buněk . . . . .	3
1.2	Receptory zabíječských buněk . . . . .	5
1.2.1	Rodina receptorů rNKR-P1 . . . . .	6
1.2.2	Rodina receptorů Clr . . . . .	6
1.3	Použité metody pro studium struktury proteinů . . . . .	7
1.3.1	Diferenční skenovací fluorimetrie . . . . .	7
1.3.2	Anizotropie fluorescence . . . . .	9
1.3.3	Rezonance povrchového plazmonu . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Materiál</b>	<b>16</b>
3.1	Pomůcky a přístroje . . . . .	16
3.2	Chemikálie . . . . .	18
3.2.1	Enzymy . . . . .	19
3.2.2	Vektory . . . . .	19
3.2.3	Bakteriální kmeny a buněčné linie . . . . .	20
3.2.4	Roztoky a média . . . . .	20

<b>4</b>	<b>Metody</b>	<b>23</b>
4.1	Příprava zásobního množství plazmidu . . . . .	23
4.1.1	Transformace . . . . .	23
4.1.2	Izolace plazmidu . . . . .	23
4.2	Kultivace HEK293S buněčné linie . . . . .	24
4.2.1	Rozmražení kultur . . . . .	24
4.2.2	Suspenzní kultivace . . . . .	24
4.2.3	Určení buněčné hustoty . . . . .	25
4.2.4	Velkoobjemová produkce . . . . .	25
4.3	Purifikace proteinů . . . . .	27
4.3.1	Afinitní chromatografie . . . . .	27
4.3.2	Zakoncentrování proteinů . . . . .	27
4.3.3	Gelová permeační chromatografie . . . . .	27
4.3.4	SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu . . . . .	28
4.3.5	Stanovení koncentrace proteinů . . . . .	28
4.3.6	Štěpení TEV proteasou . . . . .	29
4.3.7	Deglykosylace proteinu rClrb . . . . .	29
4.4	Ověření tvorby komplexu proteinů . . . . .	29
4.4.1	Anizotropie fluorescence . . . . .	29
4.4.2	Rezonance povrchového plazmonu . . . . .	31
4.4.2.1	Regenerace proteinu A . . . . .	31
4.4.2.2	Vazba Fc fragmentu na protein A . . . . .	34
4.4.2.3	Vazba rClrb na fúzní konstrukt NKR-P1B SD . . . . .	34
4.5	Strukturní studium rClrb . . . . .	35
4.5.1	Diferenční skenovací fluorimetrie . . . . .	35
4.5.2	Proteinová krystalizace . . . . .	37
4.5.3	Testování difrakce krystalů . . . . .	37
<b>5</b>	<b>Výsledky práce</b>	<b>38</b>
5.1	Produkce a purifikace rClrb . . . . .	39
5.2	Produkce a purifikace rNKR-P1B SD . . . . .	41

5.3	Ověření tvorby komplexu . . . . .	43
5.3.1	Anizotropie fluorescence . . . . .	43
5.3.2	Rezonance povrchového plazmonu . . . . .	44
5.3.2.1	Regenerace proteinu A . . . . .	44
5.3.2.2	Koncentrace nanášeného Fc fragmentu . . . . .	45
5.3.2.3	Vazba rClrb na fúzní konstrukt NKR-P1B SD . . . . .	46
5.4	Strukturní studium rClrb . . . . .	47
5.4.1	Diferenční skenovací fluorimetrie rClrb . . . . .	47
5.4.2	Proteinová krystalizace . . . . .	49
5.4.3	Měření difrakce krystalů . . . . .	50
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>55</b>



# Seznam zkratek

<b>AA</b>	akrylamid
<b>ADCC</b>	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách („antibody dependent cellular cytotoxicity“)
<b>APS</b>	peroxosíran amonný („ammonium persulfate“)
<b>bp</b>	pár bází (jednotka délky řetězce DNA, „base pair“)
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin („bovine serum albumin“)
<b>CBB R-250</b>	barva Coomassie Brilliant Blue R-250
<b>CD</b>	označení povrchových molekul leukocytů („cluster of differentiation“, viz. kapitola 1.1.2)
<b>CD</b>	cirkulární dichroismus („circular dichroism“) viz. kapitola 1.3.1
<b>Clrb</b>	rodina proteinů obsahujících podobný motiv jako lektiny C-typu („C-type lectin related b“), viz též Ocil
<b>DAP12</b>	12kDa protein aktivující DNAX („DNAX-activating protein of 12 kDa“)
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DSC</b>	diferenciální skenovací kalorimetrie („Differential scanning calorimetry“)
<b>DSF</b>	diferenční skenovací fluorimetrie („Differential scanning fluorimetry“)
<b>DTT</b>	1,4-dithiothreitol
<b>EAE</b>	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ELISA</b>	enzymová imunoanalýza („Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“)
<b>ExCELL293</b>	komerční kultivační médium
<b>F17</b>	komerční kultivační médium

<b>Fc</b>	část molekuly protilátky („Fragment crystallizable“)
<b>FcεRI<math>\gamma</math></b>	vysokoafinitní receptor pro IgE („Fc epsilon receptor type I gamma chain“)
<b>HEK293</b>	lidské embryonální ledvinné buňky 293 („human embryonic kidney 293 cells“)
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
<b>HPLC</b>	vysokouúčinná kapalinová chromatografie („high-performance liquid chromatography“)
<b>IFN</b>	interferon
<b>Ig</b>	imunoglobulin
<b>ITAM</b>	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“)
<b>ITIM</b>	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv („immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif“)
<b>KIR</b>	zabíječské receptory imunoglobulinové povahy („killer-cell immunoglobulin-like receptors“)
<b>LB</b>	Luria-Bertani médium
<b>IPEI</b>	lineární polyethylenimin
<b>mAb</b>	monoklonální protilátky
<b>MCMV</b>	myší cytomegalovirus
<b>MES</b>	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
<b>MHC gp I</b>	glykoproteiny třídy I hlavního histokompatibilního komplexu („major histocompatibility complex type I glycoproteins“)
<b>NK</b>	přírozený zabíječ („natural killer“)
<b>NKC</b>	NK genový komplex („natural killer gene complex“)
<b>NKR-P1B</b>	rodina C-lektinových receptorů NK buněk („natural killer cell receptor - protein 1B“)
<b>NKT</b>	NKT-lymfocyty („natural killer T cells“)
<b>Ocil</b>	lektin inhibující formaci osteoklastů („Osteoclast inhibitory lectin“), viz též Clr
<b>PEG</b>	polyethylen glykol
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce

<b>PBS</b>	fosfátem pufovaný fyziologický roztok („phosphate buffered saline“)
<b>RCMV</b>	potkaní cytomegalovirus
<b>RCTL</b>	gen C-lektinového typu potkaního cytomegaloviru („RCMV C-type lectin-like“)
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>PAGE</b>	polyakrylamidová gelová elektroforéza („polyacrylamide gel electrophoresis“)
<b>SPR</b>	rezonance povrchového plazmonu („Surface plasmon resonance“)
<b>Syk</b>	slezinná tyrosin kinasa („Spleen tyrosine kinase“)
<b>SYPRO</b>	fluorescenční barvivo třídy merocyaninů
<b>TAE</b>	tris-acetátový pufr s EDTA
<b>TBS</b>	Tris pufovaný fyziologický roztok („Tris-buffered saline“)
<b>T<sub>c</sub></b>	cytotoxický T-lymfocyt („T cytotoxic cell“)
<b>TCR</b>	T-buněčný receptor („T-cell receptor“)
<b>TEMED</b>	NNN'N'-tetramethylethyldiamin
<b>TES pufr</b>	Tris pufovaný fyziologický roztok s EDTA („Tris-buffered EDTA saline“)
<b>TEV</b>	virus tabákové mozaiky („Tobacco Etch Virus“)
<b>TK</b>	tkáňové kultury
<b>TNF</b>	faktor nádorové nekrózy („tumor necrosis factor“)
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>ZAP70</b>	ζ protein-kinasa 70 („Zeta-chain-associated protein kinase 70“)

# 1 | Teoretický úvod

## 1.1 NK buňky

Infekční onemocnění způsobují více než 300 milionů onemocnění a více než 5 milionů úmrtí ročně na celém světě. Je důležité pochopit, jak jednotlivé části imunitního systému fungují a jakým způsobem jsou nemoci způsobené patogeny kontrolovány, aby bylo možné vypracovat strategie pro prevenci a kontrolu chorob. Objev vrozených imunitních receptorů sehrál významnou roli v obraně proti infekčním nemocem. Mezi buněčné složky nespecifické (vrozené) imunitní odpovědi patří NK buňky („Natural Killer“; přirození zabíječi). Ty na přítomnost patogenů v organismu reagují mezi prvními spolu s fagocytujícími buňkami. Využívají své přímé zabíjení infikovaných cílových buněk (napadených virem, nádorových či stresových) bez předchozí senzibilizace (nejsou k dispozici protilátky), ale také produkují cytokiny (hlavně IFN- $\gamma$  a TNF), díky nimž se podílejí i na regulaci adaptivní (antigenně specifické) odpovědi (ovlivnění zejména T-lymfocytů a dendritických buněk). Zásadní funkcí je obrana proti virovým, bakteriálním a parazitárním infekcím. U obratlovců jsou jak neadaptivní, tak adaptivní mechanismy nepostradatelné, jsou životně důležité a vzájemně se doplňují [1, 2].

### 1.1.1 Historie NK buněk

NK buňky byly poprvé objeveny v 70. letech 20. století, kdy švédští vědci zjistili, že lymfocyty izolované ze sleziny myší, které dosud nebyly očkovány, měly schopnost zabíjet nádorové buňky. Lymfocyty byly z hybridního typu myší (kříženec 6. generace athymické a Balb/c) a byla u nich prokázána přirozená cytotoxicita proti vlastním i vloženým nádorům. Tento cytotoxický účinek byl pozorován u lymfatické uzliny, sleziny, kostní dřeně a v periferní

krvi myši, kterým byly odebrány T-lymfocyty [3]. V roce 1975 vyšel článek, který poukázal na to, že přírodní efektorové buňky jsou nestabilní při 37 °C, ztrácí aktivitu po 4 hodinách, a v těchto podmínkách by tedy nemohly být detekovány žádné povrchové markery na těchto buňkách. Avšak mechanismus cytotoxicity byl odlišný, a proto byla navržena možnost existence unikátní subpopulace lymfoidních buněk, předběžně nazvaných N-buňky [4].

Schopnost přirozeného zabíjení byla, díky použití diskontinuální gradientové centrifugace a později monoklonálních protilátek, zařazena do podmnožiny velkých granulárních lymfocytů známých dnes jako NK buňky. Tímto objevem a následnou vizualizací buněk nastal zásadní průlom v této oblasti [5].

### 1.1.2 Charakterizace NK buněk

Přirození zabíječi jsou velké granulární lymfocyty žijící krátkou dobu, nemají však na rozdíl od T- a B-lymfocytů antigenně specifické receptory [2]. Jsou součástí vrozeného imunitního systému, vyvíjí se v kostní dřeni a nachází se v periferních lymfoidních tkáních a krvi. Zralými se stanou až po předchozí stimulaci a jsou fenotypově definovány povrchovou expresí znaku CD56 (u lidí) a nedostatkem antigenu CD3 nebo-li TCR u T-lymfocytů a NKT lymfocytů (přechod mezi T-lymfocyty a NK buňkami), který neexprimují. Další rozdíl mezi NK a T-buňkami je pouze v přeskupení TCR lokusů [1, 6].

Nejlépe je prozkoumána reakce a funkce NK buněk na infekci patogenem ve studiích infekce myším (MCMV) či potkaním cytomegalovirem (RCMV). Bylo zjištěno, že kóduje několik genových produktů, jejichž hlavní funkcí je rozvrátit imunitní rozpoznávání založené na MHC (hlavní histokompatibilní komplex). Jedním z genů RCMV je gen C- lektinového typu RCTL („RCMV C-type lectin like“), jenž je homologní s Clr ligandy pro receptory NKR-P1. Po infekci virem RCMV dojde k rychlému snížení povrchové exprese Clrb a tím i ztrátě inhibičního signálu pro NK buňky. Jeho místo však obsadí falešný virový ligand RCTL podobající se Clrb a tímto způsobem virus unikne cytotoxické odpovědi. RCTL a Clr jsou v extracelulárních částech homologní, u myši z 50 % s mClrb, z 48 % s mClrg, u potkana dokonce z 60 % s rClrb. Avšak cytoplazmatická doména je zkrácena a změněna. Expresi RCTL můžeme detekovat už po třech hodinách od infekce cílové buňky [7].

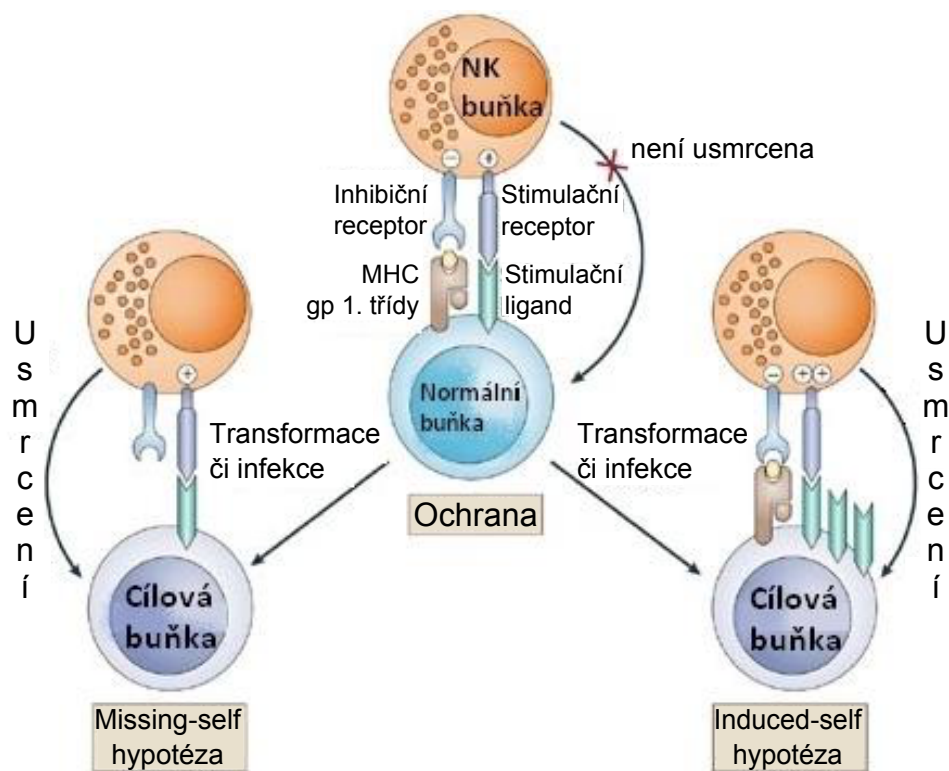
Princip zabíjení infikovaných buněk díky NK buňkám je založen na rozeznávání buněk, které na sobě mají abnormálně málo MHC gp I (glykoproteiny první třídy hlavního histokompatibilního komplexu). Nádorové buňky se brání napadení  $T_c$  buňkami (cytotoxické T-lymfocyty) tak, že potlačují povrchovou expresi MHC gp I [2].

NK buňky mohou přímo způsobit lyzi cílové buňky či ji regulovat, např. výrobou interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), který ovlivní odpověď T-lymfocytů. Na rozdíl od B- a T-lymfocytů nedominuje pouze jeden antigenní receptor, ale výslednou reakci určuje rovnováha mezi stimulačními a inhibičními receptory na povrchu NK buněk. Existují dvě hypotézy (Obr.1.1, str. 4), které popisují zničení buňky nakažené virem či jinak transformované NK buňkou: první předpokládá, že nakažené buňky přijdou o své MHC gp I (známá jako „missing-self“ hypotéza), a druhá tvrdí, že je vyvolána exprese stimulačních ligandů tak silná, že inhibiční signál je mnohonásobně překonán aktivačním (tzv. „induced-self“ hypotéza). V organismu platí obě hypotézy současně a podle situace se uplatní jedna z daných hypotéz či obě, u inhibičních receptorů se využívá první možnost a u aktivačních receptorů ta druhá [8].

### 1.1.3 Porucha funkce NK buněk

NK buňky mohou mít ochrannou i patogenní roli v imunitních onemocněních. Ochranná role NK buněk byla prokázána na zvířecích modelech. Autoimunitní onemocnění může být rozděleno do dvou kategorií, autoimunitní onemocnění tkáňově specifické (např. diabetes mellitus nebo roztroušená skleróza), a systémové autoimunitní onemocnění (např. systémový lupus erythematoses). Některé studie ukazují, že zisk B- nebo T-buněk zodpovědných za autoimunitní reakce nastává dlouho předtím, než se klinické symptomy objeví. To znamená, že také rozvoj autoimunitních onemocnění trvá několik let jako proces skládající se z mnoha kroků. Naopak porucha funkce NK buněk může být spojena se zvýšenou autoimunitní dispozicí a vznikem autoimunitních chorob (např. experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE), zvířecí model zánětu mozku). Může též např. dojít ke snížení hladiny cirkulujících NK buněk u pacientů s psoriásou vedoucí v psoriatické kožní léze [6, 9].

Lidská játra i děloha jsou bohatá na NK buňky, v každém orgánu je však jinak specializovaná NK buňka. Významnou roli mají NK buňky také v graviditě a u spontánních potratů. Děložní NK buňky jsou nejdůležitější děložní lymfocyty při těhotenství a hrají roli



Obrázek 1.1: **Rovnováha mezi aktivačními a inhibičními signály** určuje výslednou odpověď NK buněk. Zdravé cílové buňky jsou chráněny před zabitím NK buňkami tehdy, pokud přijímaný signál od aktivačních ligandů odpovídá inhibičnímu, který interaguje s vlastními MHC glykoproteiny třídy I. Při transformaci či infekci ztrácí cílové buňky vlastní MHC gp I, pak aktivačním signálům dodaných do cílové buňky nevytváří odpor inhibiční signály a dojde k lyzi buňky (tzv. „missing-self“ hypotéza). Transformace či infekce mohou také vyvolávat expresi stimulačních ligandů tím způsobem, že inhibiční signál je mnohonásobně překonán aktivačním (tzv. „induced-self“ hypotéza). Obě rozpoznávání však fungují současně, abychom správně rozlišili buňku napadenou virem či nádorovou od zdravé [8].

při projevech autoimunitních onemocnění. Byly prozkoumány u žen s opakovanými potraty, avšak především pouze NK buňky z krve a nikoli z děložní tkáně [9].

## 1.2 Receptory zabíječských buněk

Existují dvě rodiny NK buněčných receptorů, které můžeme dělit podle struktury, za první imunoglobulinová superrodina a za druhé rodina C-lektinového typu. Při dělení dle buněčné odpovědi se na povrchu nacházejí dva typy receptorů, aktivační a inhibiční. Na povrchu NK buněk receptory rozeznávají své ligandy a díky nim vedou signál dovnitř buněk [2].

Inhibiční receptory rozpoznávají MHC gp I a tlumí cytotoxické mechanismy NK buňky. NK buňka nedokáže rozeznat všechny různorodé typy MHC gp I. Receptory C-lektinového typu jsou tvořeny zpravidla dimery spojenými disulfidickými můstky. Tato skupina byla nalezena u myších NK buněk (např. Ly 49), u lidských (např. heterodimer CD94/NKG2A, B, C), u kuřat (velice podobný heterodimer CD94/NKG2) i dalších [2, 10, 11, 12].

Receptory imunoglobulinové rodiny KIR („Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors“) vytváří zpravidla pouze monomery. Doposud byly nalezeny jen na lidských NK buňkách. Jejich inhibiční aktivita je založena na asociaci s cytoplazmatickými fosfatasami, které ruší signály aktivačních receptorů přenášené pomocí proteinkinas. KIR jsou pojmenovány podle počtu domén, pokud mají 3, tak vlastní dlouhý cytoplazmatický konec, jenž obsahuje tyrosin, který je ústřední součástí inhibičního motivu ITIM, zatímco krátký řetězec se dvěma doménami má potenciálně aktivační funkci [10].

Stimulační receptory rozeznávají struktury na povrchu různých typů buněk (např. proteinů MHC). Mnoho z aktivačních receptorů má podobné extracelulární domény jako inhibiční, chybí však motiv ITIM, ale v transmembránové doméně obsahují aminokyselinové zbytky, díky kterým dokáží vytvořit multimerní komplex s adaptorovými molekulami obsahujícími imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv ITAM. Tyto signály mohou vést k aktivaci NK buňky a tím zahájit cytotoxickou odpověď proti cílové buňce. NK buňky vyrábějí několik adaptorových proteinů obsahujících ITAM, a to membránový protein DAP12, který se může fosforylovat a komunikovat s protein tyrosin-kinasami Syk a ZAP-70, čímž se spustí signalizační kaskády a celá buněčná aktivace. Mezi další důležité adaptorové proteiny



patří  $Fc\epsilon R\gamma$  nebo-li CD16 spojující receptor s  $\gamma$  řetězcí protilátky IgE a následně se naváže na jejich Fc fragment. Dojde k přenesení signálu a následné degranulaci. Tyto aktivační receptory se podílí na ději zvaném cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC) [2, 13].

### 1.2.1 Rodina receptorů rNKR-P1

Mezi první popsané rodiny receptorů u NK buněk jsou NKR-P1 receptory, které byly objeveny roku 1977 na myších NK buňkách [13]. NKR-P1B je disulfidicky vázaný homodimer transmembránového typu II obsahující doménu podobnou lektinům C-typu [14]. Potkaní systém NKR-P1 - Clr je v porovnání s myším ještě rozmanitější. Počet receptorů byl zredukován ze 6 myších NKR-P1 na 4 potkaní, zatímco počet ligandů se zvýšil z osmi na jedenáct potkaních Clr. Geny pro tyto receptory jsou sdruženy v tzv. NK genovém komplexu (NKC), který se nachází na chromozomu 6 u myší, obdobně na chromozomu 4 u potkanů a na dvanáctém chromozomu u lidí. Proteiny, které kódují, jsou značeny jako NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1F a NKR-P1G. První dva se nacházejí na centromerním konci NKC, druhé dva na telomerním konci. Každá z dvojic se skládá z jednoho aktivačního (NKR-P1A, NKR-P1F) a jednoho inhibičního (NKR-P1B a NKR-P1G) receptoru. Genetická vazba NKR-P1 a Clr umožňuje stabilitu a funkčnost páru receptor - ligand podobné specifity, tato vlastnost může ovlivnit odolnost a citlivost k patogenům [14].

### 1.2.2 Rodina receptorů Clr

Receptory rodiny Clr podobné lektinům C-typu se nachází jak na NK buňkách, tak i na NKT buňkách. Ligand pro inhibiční myší NKR-P1B a NKR-P1D je Clrb nebo-li inhibiční lektin osteoklastu Ocil. Je to transmembránový protein II. typu a je složen z 207 aminokyselin. Výskyt Clrb na myších nádorových buněčných liniích zabraňuje buněčnému zabíjení NK buňkami, podobá se inhibici MHC glykoproteiny I. třídy a hraje s inhibičními receptory hlavní roli při alternativní formě „missing self“ rozpoznávání. Inhibice může být blokována monoklonálními protilátkami (mAb) specifickými pro Clrb. Ligand je tvořen na normálních hematopoetických buňkách (vyjma erytrocytů). V současnosti jsou známy myší ligandy pro receptory rodiny NKR-P1, Clrb pro inhibiční NKR-P1B i NKR-P1D a Clrg s Clrx jsou

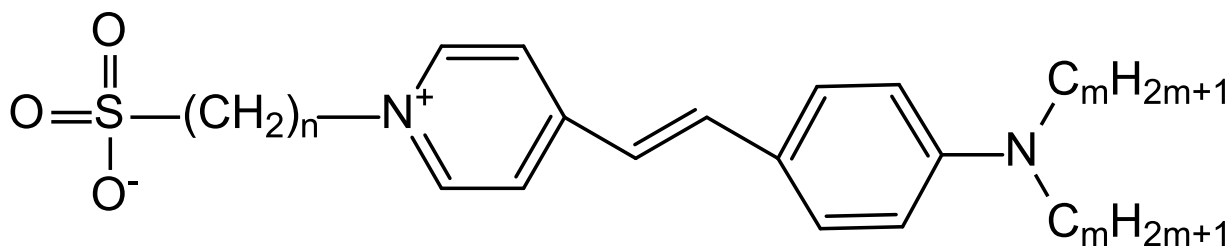
ligandy pro aktivační NKR-P1F. U potkanů je známo 10 ligandů receptorů NKR-P1 rodiny a to např. Clr11, jenž interaguje s inhibičním receptorem NKR-P1B. Ligand Clr11 je orthologem již zmíněného Clrb, jehož role je popsána v infekci RCMV (viz. kapitola 1.1.2). Avšak číslování převyšuje číslo 10 (existuje i Clr11), protože Clr8 je pouze fragmentem [14, 15, 16].

## 1.3 Použité metody pro studium struktury proteinů

### 1.3.1 Diferenční skenovací fluorimetrie

Diferenční skenovací fluorimetrie (DSF) nebo-li tzv. metoda „ThermoFluor“ (Thermal shift assay) byla patentována teprve v roce 2000 M. V. Pantolianem [17]. Je to rychlá a jednoduchá metoda, díky níž můžeme měřit stabilitu proteinů bez specializovaného přístroje a využít termocykler používaný pro kvantitativní PCR, tzv. metodu „real time PCR“. Můžeme měřit až 96 podmínek najednou, se spotřebou 1-15  $\mu\text{g}$  proteinu. Pro studium struktury je důležitá dokonalá purifikace proteinů, která je sama o sobě obtížná a časově náročná. Vzorek proteinu musí být homogenní, stabilní a rozpustný. K optimalizaci těchto vlastností a zlepšení úspěšnosti krystalizace slouží DSF. Metoda také může sloužit k identifikaci potenciálních ligandů [18, 19].

Principem metody je stanovení optimálních podmínek pomocí měření teploty tání proteinu a optimalizací použitých pufrů. Pufr musí protein udržovat stabilní a minimalizovat agregaci a vést k růstu proteinových krystalů. Krystalizace je ovlivněna mnoha parametry, jako je např. pH, iontová síla, aditiva (soli a detergenty), srážedlo, koncentrace proteinu a srážedla a dalšími [18, 19]. Pomocí metody DSF je možné rozlišit složené a nesbalené bílkoviny za pomoci interakce s hydrofobním fluorescenčním barvivem. Sonda je vodním prostředím zhasána, v nepolárním prostředí je vysoce fluorescenční. Sonda se přednostně váže na hydrofobní části nesloženého proteinu, který se postupnou tepelnou denaturací odhaluje, což vede k navázání většího množství sondy, a tím k nárůstu intenzity fluorescence. Takto je možno určit, jak je protein v daném prostředí (pufru) teplotně stabilní. Rozklad teplotou je však nevratný proces [18]. Po dosažení plató začíná fluorescenční intenzita klesat, nejspíše kvůli agregaci denaturovaného proteinu v komplexu s barvivem. Závislost intenzity fluorescence na teplotě tvoří sigmoidální křivku [20].



Obrázek 1.2: **Struktura fluoroforu SYPRO oranž.** Svou strukturou patří do třídy mero-cyaninů ( $m=2-10$ ,  $n = 3-4$ ). Může být excitována v UV světle při 300 nm nebo ve viditelném při 470 nm a emituje při 570 nm [21].

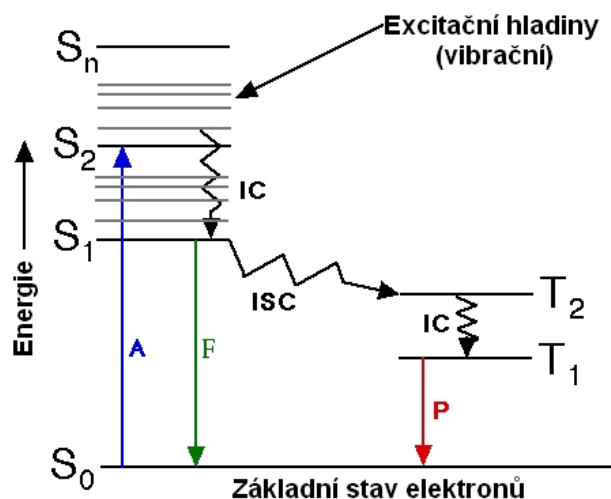
Nejpoužívanější sondou s nejlepšími vlastnostmi pro DSF má SYPRO oranž díky svému vysokému poměru signál - šum [22]. Struktura je znázorněna na Obr. 1.2. Navíc její relativně vysoká excitační vlnová délka 470 nm taktéž snižuje pravděpodobnost interference použitých sloučenin s optickými vlastnostmi barviva a případného zhašení intenzity fluorescence. Na druhou stranu i přesto některé ligandy mohou zvýšeně fluoreskovat ve vlnové délce použité ve fluorimetrické analýze a vysoké pozadí pak může způsobit falešně pozitivní výsledky testu [20, 21].

Standardně se pro DSF používá dvoustavový model s ostrým přechodem mezi složenými a nesbalenými stavy, kde teplota tání  $T_t$  je definována jako střední hodnota teploty přechodu sbaleného proteinu na nesbalený, jejichž koncentrace jsou v rovnováze. Díky získaným  $T_t$  bylo prokázáno, že hodnoty získané na DSF odpovídají hodnotám stanoveným jinými biofyzikálními metodami. K porovnání dat může posloužit metoda diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), kde je sledována změna tepelné kapacity u agregujících proteinů díky přechodu přes svou teplotu tání, či cirkulární dichroismus (CD) [18, 23]. CD je spektroskopická nedestruktivní technika, která měří různou absorpci pravotočivé a levotočivé kruhově polarizované složky záření dané chiralitou dané látky. Při sledování rozkladu proteinů jako funkce teploty, však není přechod z nesbalené formy vratný. Nevýhodou CD je dlouhé trvání měření spekter (na měření pěti proteinů při jedné vlnové délce je potřeba přibližně 8 hodin) [24].

### 1.3.2 Anizotropie fluorescence

Fluorescenční metody se užívají v biochemických výzkumech, ale i v medicíně, genetických analýzách, při monitorování prostředí i v jiných oborech. Patří k nim průtoková cytometrie u identifikace a dělení buněk, fluorescenční mikroskopie pro zobrazování buněčných složek, imunologické testy (např. ELISA), které často nahrazují metody využívající radionuklidové zářiče [25].

Fluorescence je fyzikálně-chemický děj a je formou luminiscence, což je samovolný excitační děj spojený se zbytkovým vyzářením energie při určité teplotě a v určité spektrální oblasti [26]. Mezi její hlavní charakteristiky patří intenzita, spektrální složení, polarizace nebo-li směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny, doba dohasínání, jež je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi (úzce souvisí se stavy vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu), koherenční vlastnosti a vztahy mezi fázemi světelných vln [25]. Znázornění fluorescence je vidět na Jablonského diagramu na Obr. 1.3. Fluorescenční anizotropie je jev, u kterého pozorujeme světlo emitované fluoroforem, jenž má

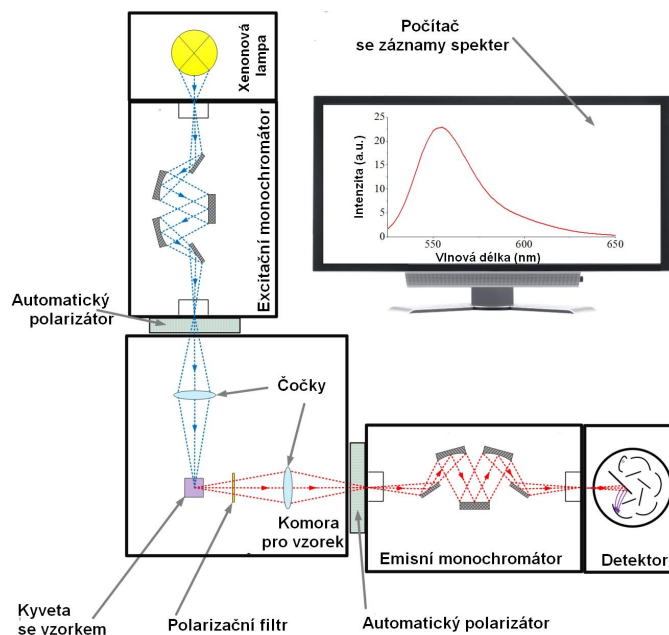


Obrázek 1.3: **Jablonského diagram** ukazuje rozdíl mezi absorpcí, fluorescencí a fosforescencí záření. Fosforescence se od fluorescence liší delší dobou potřebnou k vyzáření a návratu do základního stavu. **A** - absorpce, **F** - fluorescence (emise), **P** - fosforescence, S - singletový stav, T - tripletový stav, IC - vnitřní konverze, ISC - mezisystémový přechod [27].

v různých směrech různou intenzitou. Pokud dojde k excitaci lineárně polarizovaným světlem (kmitajícím v jedné rovině), emise fluorescence se může stát polarizovanou. Jedná se o fotoselekcii, kdy jsou excitovány pouze molekuly natočené do směru polarizace. Anizotropie  $r$  (nestejnorodost) nám popisuje úroveň polarizace. Látky vykazující určitý stupeň nestejnorodosti vykazují polarizovanou fluorescenci [28]. Při fluorescenci molekula fluoroforu absorbuje foton a dostává se do excitovaného stavu. Za krátký okamžik přechází molekula přes metastabilní excitovaný stav (tehdy uvolní část energie ve formě tepla) do základního stavu, kdy dochází ke ztrátě zbylé energie ve formě fotonu. Při excitaci molekuly fluoroforu dojde k přeuspořádání elektronového obalu molekuly. Proto dojde k excitaci pouze při vhodném natočení molekuly vůči dopadajícímu světlu, což nám určuje vektor elektrické intenzity  $E$  (polarizace excitace). Poté také při emisi fotonu bude směr vyzáření vůči rovině molekuly nejpravděpodobnější v jednom směru (polarizace emise). Kdyby molekuly byly v rovnovážném stavu (např. ve zmraženém či viskózním roztoku), nerotovaly by, emitované světlo by bylo také o mnoho více polarizované. V tomto případě by se jednalo o vnitřní anizotropii (označovanou  $r_0$ ) v čase nula. Ve skutečnosti se molekuly neustále pohybují (rotují), díky čemuž je míra polarizace emise výrazně ovlivněna. Za čas, který uplyne mezi excitací molekuly a následnou emisí fotonu (doba dohasínání fluorescence  $\tau$ ), se molekuly otočí do různých směrů. Anizotropie fluorescence je závislá na rychlosti rotace molekul. Rotace molekul je popsána rotačním korelačním časem  $\phi$  (čas, za který se molekula otočí o 1 radián). Například při ozáření proteinu o molekulární hmotnosti 25 kDa můžeme očekávat, že rotační korelační čas bude odpovídat 10 ns [28]. Takto můžeme využít anizotropii i k určení do jaké míry je protein denaturován. Anizotropie fluorescence může být vyjádřena vztahem (Rov. (1.1)), kde  $r$  je pozorovaná anizotropie,  $r_0$  vnitřní anizotropie,  $\tau$  doba dohasínání fluorescence a  $\phi$  rotačním korelační čas molekuly [28].

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\phi}} \quad (1.1)$$

Princip měření fluorescenční anizotropie je znázorněn na Obr. 1.4, str. 11. Pro většinu experimentů se používá vertikálně polarizované světlo [28]. Mezi součásti spektrofluorimetru patří monochromátory, které slouží k vybrání pouze části spektra, jedné vlnové délky, která dopadá na vzorek. Světlo emitované vzorkem dopadá na další monochromátor, který znovu



Obrázek 1.4: Schéma spektrofluorimetru FluoroMax 4 [29] znázorňuje průchod paprsku od lampy přes monochromátory, polarizátory, čočky, vzorek až do detektoru, který paprsek snímá, a poté je záznam počítačově vyhodnocen.

vybírání pouze požadovanou vlnovou délku, která dopadá na detektor. K výběru kýžené vlnové délky se též používají polarizační filtry. Detektor je složen z emisních fotonásobičů.

Toto měření se užívá jak u biochemických výzkumů, tak i u testování v klinické praxi, dává nám informace o orientaci a pohyblivosti molekul a dalších procesech (např. interakce receptor - ligand, protein - DNA, fluidita membrán, proteolýza) [30].

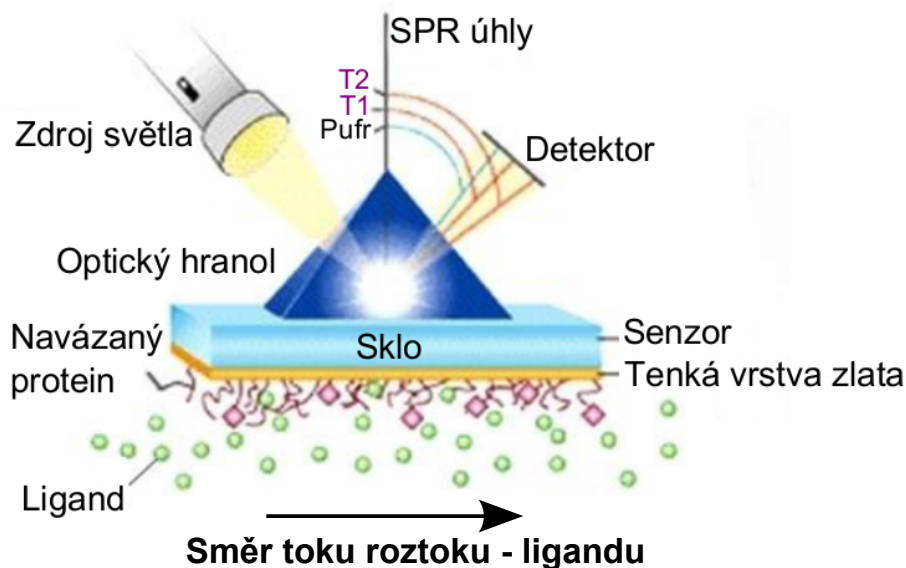
### 1.3.3 Rezonance povrchového plazmonu

Rezonance povrchového plazmonu (Surface plasmon resonance - SPR) je výkonná optická detekční technika pro měření interakcí biomolekul v reálném čase. Zatímco jedna z interagujících látek je umístěna na povrchu kovového terčiku (obvykle zlato nebo stříbro) nebo na povrchu kovových nanočástic, další molekuly jsou v roztoku, který je proháněn přes povrch senzoru. Analýza interakce biomolekul není omezena na proteiny, ale dá se použít na interakce mezi dvojicemi DNA - DNA, DNA - protein, lipid - bílkovina a i hybridních systémů biomolekul s nebiologickými povrchy. V současnosti existuje řada biosenzorů, které se uplat-

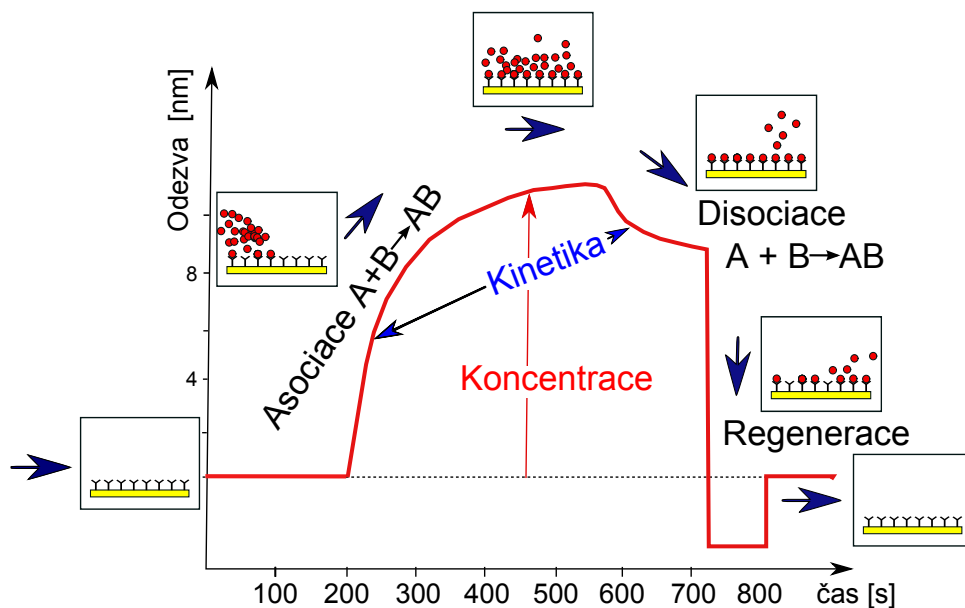
ňují v lékařské diagnostice, ochraně životního prostředí nebo při kontrole kvality a bezpečnosti potravin. Touto metodou můžeme zjistit, zda existuje vazba mezi molekulami, stanovit afinitu interakcí, měřit asociační a disociační konstanty či kvantifikovat koncentraci jedné interagující látky bez nutnosti značení jednoho z reaktantů. Asociaci a disociaci lze sledovat jako posun maxima rezonance, jehož časový průběh - signál ze senzoru - se nazývá senzorgram [32, 33].

Metoda využívá speciální plazmonové elektromagnetické vlny - polaritony, šířící se rovnoběžně s oblastí interakce kov - dielektrikum (kov - vakuum, vzduch, voda). Vzhledem k tomu, že vlny jsou na hranici kovu a střední vrstvy (např. vzduch nebo voda), tak jsou oscilace velmi citlivé na jakékoliv změny hranic a adsorpci molekul na povrchu kovu i ve velmi nízkých koncentracích. Vybuzení lze uskutečnit v planární multivrstvě či na periodickém rozhraní - mřížce [34, 32]. Při stanovení se měří změna indexu lomu vyvolaná interakcí biomolekul (Obr. 1.5).

Měří se změna rezonančního úhlu, jež je úměrná množství navázaného analytu. Je nutné, aby úhel dopadu paprsku na rozhraní kovu a optického hranolu byl větší než mezní úhel



Obrázek 1.5: **Princip rezonance povrchového plazmonu.** Na rozhraní optický hranol - vrstva zlata dopadá paprsek lineárně polarizovaného světla a díky totálnímu odrazu dochází ke vzniku evanescentní vlny, která interaguje s elektrony kovu za vzniku rezonance a plazmonové vlny. Detektor zaznamená pokles intenzity světla kvůli vzniku rezonančního jevu [31, 32].



Obrázek 1.6: **SPR křivka** a její vztah s molekulární interakcí v průběhu experimentu se zahrnutím kinetiky asociace a disociace [35]. Jedná se o závislost intenzity dopadajícího paprsku na detektor na čase. Koncentraci dané látky získáme z rozdílu záznamu před a po reakci.

dopadu. Tímto způsobem dojde k totálnímu odrazu, fotony vytvoří elektrické pole a vznikne evanescentní (tlumivá, zhášivá) vlna, která interaguje s volnými elektrony kovové vrstvy, za vzniku povrchové plazmonové vlny. Vzniklá rezonance je závislá na vlnové délce, polarizaci a úhlu dopadu paprsku [32].

Při měření kinetiky interakce dvou molekul měřené v reálném čase lze stanovit množství stanovované látky ve směsi. Díky zvolení úhlu dopadu paprsku na hranol můžeme pozorovat nárůst signálu v čase, přibližně po 15 minutách nastane ustálení rovnováhy a při odečtení záznamu před a po reakci určíme koncentraci dané látky. Z rychlostních konstant disociace a asociace vypočítáme rovnovážnou konstantu reakce (Obr. 1.6), která nám určí afinitu interakce. Po ukončení stanovení je třeba čip regenerovat použitím vymývacího pufru (např. glycin). Celé měření trvá okolo 20 min.

Proteinové interakce jsou důležité u všech biologických procesů (např. u vázání léčiv v organismu). Často se v dnešní době provádí klinické zkoušky, které mají vyhledat či otestovat nové léky k širokému spektru aplikací (od rakoviny po transplantace tkáňového štěpu). U těchto zkoušek se také užívá metoda SPR, kde bývají na čip navázané rekombinantní



proteiny. Omezením proteinů (i rekombinantních) je jejich stabilita a rozpustnost, proto se nejčastěji používají fúzní proteiny. Fúzní proteiny se lépe produkují v buňkách, jsou rozpustnější a při vazbě na čip lze díky fúznímu partnerovi zajistit vazbu na povrch čipu ve správné orientaci, ponechávající vlastní rekombinantní protein jakožto ligand volný pro vazbu analytu. SPR se tedy stává důležitou pomůckou k rozluštění funkce proteinů [36].

## 2 | Cíle práce

- Příprava fúzních konstruktů NKR-P1B a Clrb
- Purifikace dimerních forem pomocí afinitní a HPLC chromatografie
- Ověření tvorby komplexu NKR-P1B s Clrb biofyzikálními metodami
- Strukturní studium rClrb pomocí proteinové krystalografie

## 3 | Materiál

### 3.1 Pomůcky a přístroje

Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad	<i>New Brunswick Scientific, USA</i>
Analytické váhy	<i>AND, USA</i>
Aparatura pro filtraci	<i>Sigma, USA</i>
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	<i>H+P Labortechnik GmbH, Německo</i>
Automatické pipety Discovery	<i>HTL, Polsko</i>
Automatické pipety Pipetman	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga EBA 12 R	<i>Hettich, Německo</i>
Centrifuga Universal 320R	<i>Hettich, Německo</i>
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Čtečka mikrotitračních destiček Sunrise	<i>Tecan, Rakousko</i>
Deep-well block	<i>Invitrogen, USA</i>
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	<i>Corning, Německo</i>
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570 (16,1 MPix)	<i>SONY, Japonsko</i>
Fotoaparát SP-500 UZ (6 MPix)	<i>Olympus, Japonsko</i>
Hemocytometr	<i>INCYTO, Korea</i>
HPLC systém ÄKTAbasic	<i>Amersham Biosciences, Švédsko</i>
Inkubátor, CO <sub>2</sub> pro tkáňové kultury, MCO-18AIC	<i>Sanyo, Japonsko</i>
Kahan Fuego SCS	<i>VERKON, ČR</i>
Kahan	<i>závod Votice, ČR</i>

Kolona Hitrap MabSelect SuRe	<i>GE Healthcare, USA</i>
Kolona Superdex 200 10/300 GL (1 × 30 cm)	<i>GE Healthcare, USA</i>
Koncentrátory Amicon Ultra	<i>Merck-Millipore, USA</i>
Krystalizační desky Intelli-plate 96	<i>Art Robbins Instruments, USA</i>
Krystalizační robot Crystal Gryphon	<i>Art Robbins Instruments, USA</i>
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	<i>P-LAB, ČR</i>
Laminární box Clean Air Techniek B.V.	<i>PMV a Telstar company, Belgie</i>
Lednice 225 R (4°C)	<i>Calex, ČR</i>
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	<i>VWR, USA</i>
Mikroskop inverzní AE31	<i>Motic, Německo</i>
Mikroskop SZX2	<i>Olympus, Japonsko</i>
Mrazicí box (-20°C)	<i>Calex, ČR</i>
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80°C)	<i>Sanyo, Japonsko</i>
pH metr ino Lab	<i>Schoeller, Německo</i>
Pipetovací nástavec Midiplus	<i>Biohit, USA</i>
Plastik pro tkáňové kultury	<i>Corning, Německo</i>
Předvážky KB1200-2	<i>Kern, Německo</i>
Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	<i>Savant, USA</i>
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Biokeystone Co, USA</i>
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Spektrofluorimetr FluroMax 4	<i>Scientific HORIBA, Japonsko</i>
SPR souprava PLASMON-4	<i>ÚFE AV ČR, v.v.i.</i>
Termoblok LS1	<i>VLM, Německo</i>
Termocykler na real-time PCR LightCycler 480	<i>Roche, Švýcarsko</i>
Termostat LS1	<i>VLM, Německo</i>
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	<i>Gallenkamp, UK</i>
Třepačka Multitron Cell	<i>Infors HT, Švýcarsko</i>
UV/Vis spektrometr UV2 Series	<i>Unicam, UK</i>
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	<i>UVItec, UK</i>
Vaříč	<i>ETA, ČR</i>

Vodní lázeň	<i>Memmert, Německo</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Merck-Millipore, USA</i>
Zdroj napětí EC 250-90	<i>EC Apparatus Corporation, UK</i>
Zdroj napětí PS 251-2	<i>Sigma, USA</i>

### 3.2 Chemikálie

Agar	<i>Oxoid, Anglie</i>
Agarosa	<i>Sigma, USA</i>
Akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
Ampicilin 100 mg/ml	<i>Biotika, SR</i>
APS	<i>Serva, USA</i>
Azid sodný	<i>Serva, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Fluka Chemika, Švýcarsko</i>
DTT	<i>Serva, USA</i>
DyLight 488 NHS-ester	<i>Pierce Biotechnology, USA</i>
EDTA	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
ExCELL293 médium	<i>Sigma, USA</i>
Freestyle F17 médium	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
L-glutamin	<i>Sigma, USA</i>
G5 pufr	<i>New England Biolabs, USA</i>
GoodView	<i>Ecoli, Slovensko</i>
JCSG Core I - IV Suite	<i>Qiagen, Německo</i>
Kvasničný extrakt	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
lineární PEI 25 kDa	<i>Polysciences, USA</i>
2-merkaptoethanol	<i>Sigma, USA</i>

Nosič pro chromatografii Talon	<i>Clontech, USA</i>
PCR H <sub>2</sub> O	<i>Top-Bio, ČR</i>
Penicillin G sodná sůl	<i>Duchefa Biochemie, Nizozemsko</i>
Pluronic F-68	<i>Sigma, USA</i>
Protein-A-agarosa	<i>Sigma, USA</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Sephadex	<i>GE Healthcare, USA</i>
Standard pro SDS PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Streptomycin sulfate	<i>Serva, USA</i>
Sypro oranž	<i>Invitrogen, USA</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
Tris	<i>Roth, Německo</i>
Triton X-100	<i>Serva, USA</i>
Trypanová modř	<i>Sigma, USA</i>
Trypton N1	<i>Organo Technie, Kanada</i>
Tween 20	<i>Sigma, USA</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

### 3.2.1 Enzymy

Endo H <sub>F</sub>	<i>New England Biolabs, USA</i>
RNasa A	<i>Serva, USA</i>

### 3.2.2 Vektory

pHLsec (1 µg/µl)	<i>Dr. A. Radu Aricescu, University of Oxford, UK</i>
pHLsec-FcHis (1 µg/µl)	<i>Dr. A. Radu Aricescu, University of Oxford, UK</i>
pYD5 (1 µg/µl)	<i>Dr. Yves Durocher, CNRC Montreal, Kanada</i>

### 3.2.3 Bakteriální kmeny a buněčné linie

*E. coli* DH5 $\alpha$

*Invitrogen, USA*

HEK293S GnTI<sup>-</sup>

*Americká sbírka buněčných linií (ATCC)*

### 3.2.4 Roztoky a média

Citrátový pufr: 100mM citrát sodný, 150mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, pH = 3

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

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

HEPES pufr (pufr pro gelovou permeační chromatografii): 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>; pH = 7,5

LB agar s ampicilinem: 1,5% (w/v) agar v LB médiu, 100  $\mu$ g/ml ampicilin

LB médium: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH = 7,4

MES pufr: 20mM MES, 100mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, pH = 5,0

PBS pufr: 20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> .12 H<sub>2</sub>O, 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .2 H<sub>2</sub>O, 300mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,0

PBS pufr s imidazolem: 20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> .12 H<sub>2</sub>O, 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .2 H<sub>2</sub>O, 300mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, 250mM imidazol, pH = 7,0

PBS-TK pufr: 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,0

PBS pufr pro anizotropii fluorescence: 40mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> .12 H<sub>2</sub>O, 60mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .2 H<sub>2</sub>O, 150mM NaCl, pH = 7,4

Pufry pro agarosovou elektroforézu:

- TAE pufr (1 $\times$  koncentrovaný): 40mM Tris, 20mM CH<sub>3</sub>COOH, 1mM EDTA, pH = 8,3
- STOP pufr: 30% (v/v) glycerol, 1% (w/v) bromfenolová modř, 70% (v/v) TE pufr

Pufry k soupravě Plasmid DNA Purification (*Macherey Nagel, Německo*):

- Roztok ELU (eluční pufr): 100mM Tris-HCl (pH = 8,5), 1,2 M NaCl
- Roztok EQU (ekvilibrační pufr): 0,1M octan sodný (pH = 5,0), 0,6M NaCl, 0,15% (v/v) Triton X100
- Roztok LYS (lyzující pufr): 0,2M NaOH, 1% (w/v) SDS
- Roztok NEU (srážecí pufr): 3,1M octan draselný, pH = 5,5
- Roztok RES (resuspendační pufr): 50mM Tris (pH = 8,0), 10mM EDTA, 20 mg/ml RNasa A
- Roztok WASH (oplachovací pufr): 0,1M octan sodný (pH = 5,0), 825mM NaCl

Pufry k SDS PAGE:

- AA: 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) N, N' -methylen-bis-akrylamid
- Barvicí roztok pro SDS-PAGE: 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) CBB R-250
- Elektrodotový pufr pro SDS-PAGE (10 × koncentrovaný): 3% (w/v) Tris, 14,4% (w/v) glycin, 1% (w/v) SDS, pH = 8,3
- Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE: 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová, 55% (v/v) dH<sub>2</sub>O
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující (2× koncentrovaný): 100mM Tris, 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) bromfenolová modř, pH = 6,8
- Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující (2× koncentrovaný): 100mM Tris, 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) bromfenolová modř, 100mM DTT, pH = 6,8



Pufry k SPR:

- EA pufr: 1M ethanolamin, pH = 8,5
- NHS/EDC: [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid]/N-hydroxy-sukcinimid o 0,5M koncentraci rozpuštěné ve vodě, EDC uskladněno po 4,6 µg pod argonem v mrazícím boxu v -80 °C, před použitím rozpuštěno v dH<sub>2</sub>O, NHS rozpuštěno ve vodě o c = 0,5 M a zmraženo v -20 °C
- SA pufr: 10mM octan sodný, pH = 3,4
- glycinový pufr: 10mM glycin, pH = 3,0, pH = 2,5, pH = 2,0, pH = 1,5
- HEPES-SPR pufr: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,005% (v/v) TWEEN 20; pH = 7,4
- PBS\*\*: 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,0
- Protein A: 1 µg/ml v SA pufru
- Roztoky na čištění při práci s biologickým materiálem: 0,1M NaOH, 0,5% SDS, 1% kyselina octová, 6M močovina, 0,2M NaHCO<sub>3</sub>
- Roztok thiolů: jednotlivé alikvoty thiolů 8 mg HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>4</sub>-OH a 5 mg HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>6</sub>-OCH<sub>2</sub>COOH rozpuštěny v 0,75 ml UV-ethanolu probubláným dusíkem, smíchány a rozděleny po 200 µl do mikrozkušavek a zmraženy na -80°C.

Před použitím se alikvot rozmrazí a požadované množství se 100 × zředí v UV-ethanolu (např. 50 µl do 5 ml UV-ethanolu pro 2 čipy).

Výsledný poměr se blíží 7:3 (-OH a -COOH) a 200 µM koncentraci.

Roztok IPEI: 10 mg/ml IPEI v PBS-TK, pH = 7,0

TE pufr: 10mM Tris, 0,5mM EDTA, pH = 8,0

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

## 4 | Metody

### 4.1 Příprava zásobního množství plazmidu

#### 4.1.1 Transformace

K transformaci se užívají kompetentní bakterie *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$  a jsou uchovávány při -80 °C. Po vyndání z mrazicího boxu jsou přeneseny na led, aby roztály. K 0,5  $\mu$ l plazmidu se přidává 50  $\mu$ l bakterií *E. coli*. Následuje inkubace na ledu po 30 min. Dalším krokem je tepelný šok, kdy je směs ponořena na 1 min do vodní lázně, která má 42 °C. Po minutě následuje okamžitý návrat na led. Poté se přidá 1 ml sterilního LB média bez antibiotik a směs se inkubuje 30 min při 37 °C. Po inkubaci je směs zcentrifugována 3 min při 3000  $\times$  g. Supernatant se slije a ponechá se přibližně 100  $\mu$ l, ve kterých se resuspenduje peleta. Tato suspenze je poté napipetována na tuhý LB agar na Petriho misce, do kterého bylo předem přidáno antibiotikum ampicilin (100  $\mu$ g/ml). Bakterie jsou inkubovány 16 hod při 37 °C v termostatu.

#### 4.1.2 Izolace plazmidu

Příprava zásobního množství plazmidu probíhá tak, že se kolonie setřou z misek hokejkou v několika ml LB média a přenesou se do 2l Erlenmeyerových baněk s připravenými 500 ml LB média s ampicilinem (100  $\mu$ g/ml). Kultury se inkubují na třepačce 14 hod při 37 °C a 220 ot/min. Poté se zcentrifugují v 250ml kyvetách 15 min při 4500  $\times$  g. Pelet se resuspenduje ve 30 ml TES pufru na vortexovém mixéru a suspenze se rozdělí po 15 ml do dvou 30ml centrifugačních zkumavek a znovu se centrifuguje 15 min při 4500  $\times$  g. Další postup

se provádí dle návodu ke komerční soupravě Plasmid DNA Purification [37]. Pro srážení se používá 10,5 ml isopropanolu, promíchá se a nechá se 0,5 hod srážet v mrazničce. Dalším krokem je centrifugace při  $15000 \times g$ , 30 min při  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po dekantaci supernatantu se přidá 5 ml 70% ethanolu na opláchnutí pelety DNA a znovu se provede odstředění při  $15000 \times g$ , 5 min při  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Peleta se vysuší na rotační vakuové odparce a následně rozpustí v 1 ml sterilní  $\text{dH}_2\text{O}$ . V posledním kroku se změří koncentrace a čistota na UV/Vis spektrometru UV2 Series (*Unicam, UK*). Vzorek je při stanovení zředěn  $300 \times \text{dH}_2\text{O}$ . Absorbance se měří při 260 a 280 nm.

## 4.2 Kultivace HEK293S buněčné linie

Veškeré práce s buněčnými kulturami HEK293S probíhají zásadně v určené místnosti pro tkáňové kultury uvnitř laminárního boxu. Činnost s buňkami je řízena dle zásad sterilní práce.

### 4.2.1 Rozmražení kultur

Alikvot zmražených buněk v kryozkumavce obsahuje 1 ml buněčné suspenze o hustotě  $5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$  a je co nejrychleji rozmražen ve vodní lázni přehřáté na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Poté je ihned přenesen do předem připravené 15ml sterilní zkumavky s víčkem, ve které je 10 ml směsi médií ExCELL293 a F17 v poměru 1:1. Následuje rychlé promíchání a centrifugace při  $200 \times g$ , 5 min. Supernatant je odstraněn a buňky jsou resuspendovány v 10 ml směsi médií a přeneseny na 10cm Petriho misku. Po 2 - 3 dnech kultivace při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  následuje první subkultivace.

### 4.2.2 Suspenzní kultivace

Buňky jsou obvykle kultivovány v inkubátoru při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  v médiu ExCELL293 a F17 v poměru 1:1 a subkultivovány ředěním čerstvým médiem tak, aby se jejich hustota pohybovala přibližně mezi 0,2 a  $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$  a to jak na Petriho miskách, tak ve čtverhranných láhvích na třepačce. Standardní postup vypadá následovně: rozmrazí se buňky, při 2 - 3 dnech kultivace na 10cm Petriho misce dosáhnou hustotu kolem  $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , jsou rozmíchány 10ml

pipetou pomocí pipetovacího nástavce a přeneseny do čtverhranné láhve o objemu 100 či 250 ml s víčkem s prodyšným filtrem do vhodného objemu kultivačního média tak, aby výsledná buněčná hustota stále ležela v optimálním rozmezí. Pro kontrolu bývá ponecháno přibližně  $1 \cdot 10^6$  buněk na misce a doplněno na 10 ml čerstvým kultivačním médiem. Buňky v láhvi byly třepány na třepače Orbi-Safe TS NetWise v inkubátoru při 135 ot./min či na orbitální třepače Multitron Cell rychlostí 180 ot./min, optimální objem média pro dobré míchání buněk je 30 - 40 % objemu láhve. Pro provedení velkoobjemové transfekce je suspenze o další 2 - 3 dny později přenesena do 1000 ml čtverhranné láhve a zředěna na 400 ml čerstvým médiem a jakmile buněčná hustota dosáhne požadované hodnoty, je provedena transfekce, nebo je suspenze dále subkultivována.

### 4.2.3 Určení buněčné hustoty

K manuálnímu počítání buněk a určení buněčné hustoty (a) slouží hemocytometr. Nejprve se odebere automatickou pipetou 20  $\mu$ l buněčné suspenze ve sterilním prostředí laminárního boxu a poté se k ní přidá 20  $\mu$ l 0,4% roztoku trypanové modři v PBS-TK. Po řádném promíchání se vzniklá směs přepipetuje mezi sklíčka hemocytometru. Pod mikroskopem se spočtou živé buňky (průhledné) a mrtvé (modré) v jednotlivých 9 čtvercích zvláště pro výpočet buněčné hustoty (viz. rovnice (4.1)).

$$a = \frac{\text{počet buněk} \cdot 10^4 \cdot \text{ředění}}{\text{počet čtverců}} \quad (4.1)$$

Ředění používáme 1:1, roztok je tedy zředěn 2 $\times$ . Získáme tedy průměrný počet buněk v jednom čtverci v jednotkách  $10^6 \text{ ml}^{-1}$ .

Viabilita (v) nebo-li procento živých buněk se spočte podle rovnice (4.2):

$$v = \frac{\text{počet buněk}}{\text{počet živých} + \text{počet mrtvých buněk}} \cdot 100\% \quad (4.2)$$

### 4.2.4 Velkoobjemová produkce

Uvedený postup je při dodržení vzájemných poměrů objemu láhve, objemu média, buněčné hustoty, množství plazmidové DNA a lineárního polyethyleniminu (25 kDa IPEI) použitelný

pro různé výsledné objemy produkce, jako například pro množství na 1 produkci ve 400 ml média v 1l láhvi, jež byla prováděna nejčastěji. Buňky rostoucí ve 400 ml ExCELL293/F17 média v poměru 1:1 v 1000ml čtverhranné láhvi s prodyšným víčkem na třepačce jsou nejprve spočítány a poté je odebrán objem suspenze odpovídající přibližně  $750-1000 \cdot 10^6$  buněk. Buňky jsou postupně zcentrifugovány ve  $4 \times 50$ ml sterilních zkumavkách s víčkem při  $200 \times g$ , 5 min. Supernatant je slit do odpadní kádinky a buněčný pelet je resuspendován v takovém množství čerstvého média ExCELL293, aby po přidání roztoku DNA byla výsledná buněčná suspenze o hustotě přibližně  $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Zároveň by se koncentrace DNA ve směsi s IPEI měla pohybovat v řádech desítek  $\mu\text{g/ml}$ . Na  $10^6$  buněk připadá 1 mg DNA, požadovaný objem je vyředěn do 10 ml PBS-TK a sterilizován pomocí filtrace přes  $0,22\mu\text{m}$  filtr injekční stříkačkou do sterilní zkumavky. Poté se přidá IPEI o koncentraci 10 mg/ml v hmotnostním poměru s DNA 1:3. Transfekční směs se poté nechává 5 min inkubovat a přidá se k buňkám. V případě produkce ve 400 ml média je 800  $\mu\text{g}$  DNA zředěno do 10 ml PBS-TK, sterilizováno filtrací přes  $0,22\mu\text{m}$  filtr injekční stříkačkou do čisté zkumavky. K suspenzi je pipetován IPEI jako hmotnostní trojnásobek užití DNA, tedy 2400  $\mu\text{g}$  (IPEI 10 mg/ml, 240  $\mu\text{l}$ ), směs je 5 min inkubována a přidána k buňkám ( $800 \cdot 10^6$  buněk resuspendovaných v 30 ml média ExCELL293). Následuje inkubace po 4 hod na třepačce v inkubátoru při  $37^\circ\text{C}$ , 135 rpm. Poté je suspenze zředěna médiem ExCELL293 do 400 ml (výsledná buněčná hustota přibližně  $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) a jsou přidány 4 ml směsi antibiotik penicilinu (1000 U/ml) a streptomycinu (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Druhý den se jako zdroj dodatečných živin ke kultuře přidá hydrolyzát Trypton N1 do výsledné 0,5% koncentrace (10 ml 20% TN1). Produkce probíhá celkem 4 - 6 dní, dokud viabilita kultury neklesne pod 70 % živých buněk v suspenzi. Kultura je poté zcentrifugována 1 hod při  $4500 \times g$  při laboratorní teplotě. Odstředěné médium je přeneseno do čisté láhve, zfiltrováno přes  $0,22\mu\text{m}$  filtr a uchováváno při  $-20^\circ\text{C}$  nebo ihned dále zpracováno.

## 4.3 Purifikace proteinů

### 4.3.1 Afinitní chromatografie

Prvním krokem purifikace je již zfiltrování získaného média (400 ml) přes 0,22 $\mu$ m filtr, dále se k médiu přidá azid sodný, jehož výsledná koncentrace je 10mM. Poté je protein zachycen pomocí kolonky Hitrap MabSelect Sure 5 ml zapojené na HPLC systému, v kolonce se nachází protein-A-agarosa, na níž se pomocí Fc fragmentu zachytí fúzní protein. Tlakový limit kolony je 0,3 MPa. Kolona je nejprve promyta krátce 0,1M NaOH, destilovanou vodou a PBS pufrem (pH = 7) při průtoku 1 ml/min. Filtrát média je nanesen na kolonu při 5 ml/min a kolona se promyje PBS pufrem, dokud absorbance při 280 nm neklesne na původní hladinu. Eluce se provádí citrátovým pufrem (pH = 3). Frakce jsou jímány do zkumavek s víčkem s předem připraveným 0,5 ml Tris pufrem o pH = 8,8 pro okamžitou neutralizaci frakcí. Úspěšná neutralizace je ověřena pH papírkem. Promytí kolony bylo provedeno krátce 0,1M NaOH, dále PBS pufrem, destilovanou vodou a nakonec 20% čistým ethanolem, ve kterém byla uchovávána.

### 4.3.2 Zakoncentrování proteinů

Eluce o objemu přibližně 8 ml je zakoncentrována pomocí koncentrátorů Amicon s membránou propustnou pro molekuly o  $M_r < 10\,000$  v centrifuze při  $4500 \times g$  při laboratorní teplotě na objem přibližně 250  $\mu$ l. Koncentrátory jsou po použití řádně propláchnuty a naplněny dH<sub>2</sub>O a uchovávány při 4 °C v lednici.

### 4.3.3 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300 GL, která má tlakový limit 1,5 MPa. Nejprve byl promyt samotný HPLC systém destilovanou vodou a poté byla při průtoku 0,2 ml/min připojena kolona, která také byla promyta destilovanou vodou a následně HEPES pufrem. Smyčka byla promyta pufrem pomocí injekční stříkačky s tupou jehlou a byly z ní vytlačeny bubliny. Následně byl nastříknut zakoncentrovaný vzorek proteinu. Následovala izokratická eluce v délce odpovídající objemu kolony, při průtoku

0,5 ml/min přibližně 1 hod, během níž byly manuálně jímány frakce do mikrozkušavek. Kolona byla promyta HEPES pufrem, 0,1M NaOH, ddH<sub>2</sub>O a 20% ethanolem, v němž byla uchovávána.

#### 4.3.4 SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Na polyakrylamidovou gelovou elektroforézu za použití dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) se připravuje 15% separační gel pipetováním 1,8 ml ddH<sub>2</sub>O, 4 ml AA, 2 ml 1,5M Tris o pH = 8,8, 80 µl 10% (w/v) SDS, 80 µl 10% (w/v) APS a 4 µl TEMED. Zaostrovací gel se připravuje pipetováním 1,4 ml ddH<sub>2</sub>O, 0,5 ml AA, 0,25 ml 1M roztoku Tris o pH = 6,8, 20 µl 10% (w/v) SDS, 20 µl 10% (w/v) APS, 3 µl TEMED a 120 µl 1× koncentrovaného neredukujícího pufru. Množství jsou uvedena vždy pro 2 gely.

Vzorky byly připraveny v redukujícím a neredukujícím prostředí smícháním 10 µl proteinu (pro dobrou viditelnost proužku přibližně 5 µg) s 10 µl 2× koncentrovaného vzorkového pufru, jednou s neredukujícím pufrem, podruhé s redukujícím. Následně byly vzorky 5 min povařeny a odstředěny při 15000× g, 5 min za laboratorní teploty. U 10-ti jamkového gelu se nanášelo 18 µl takto připravených vzorků na gel společně s 5 µl standardu, u 15-ti jamkového pouze 9 µl vzorku. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 50 min. Gely se poté barvily 20 min v barvicí lázni a následně odbarvily v odbarvovací lázni do úplného odbarvení pozadí gelu [38].

#### 4.3.5 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody dle Bradfordové, kdy se na 96-ti jamkovou destičku napipetovalo 5 µl roztoku BSA o známé koncentraci v rozsahu 0 - 1 mg/ml jako kalibrační řada, a do každé jamky bylo přidáno 200 µl činidla. Mimo kalibrační řadu se na destičku napipetoval náš protein, avšak několikrát zředěn, aby se svou koncentrací vešel do připravené ředící řady, a i k němu se přidalo 200 µl činidla. Reakce byla 5 min inkubována a poté se buď orientačně vizuálně porovnála s kalibrační řadou, nebo byla změřena koncentrace na čteče mikrotitračních destiček Sunrise při 595 nm.

### 4.3.6 Štěpení TEV proteasou

Fúzní proteiny exprimované z plazmidu pYD5 byly dále štěpeny TEV proteasou. Hmotnostní poměr TEV proteasy ( $c = 1$  mg/ml) a proteinu byl 1:50 a štěpení probíhalo 1 hod při 30 °C a poté několik dní v lednici při 4 °C. Proteasa nesoucí histidinovou kotvu byla z roztoku odstraněna na nosiči Talon [39].

Dalším krokem byla chelatační chromatografie na nosiči Talon (*Clontech, USA*), který obsahuje navázané kobaltnaté ionty. Množství použitého nosiče bylo 1 ml na 5 mg proteinu. Suspenze byla několikrát protřepána během 20 min při laboratorní teplotě a následně zcentrifugována. Poté byl supernatant přepipetován do čisté zkumavky a přidána protein-A-agarosa pro navázání odštěpeného Fc fragmentu. Stejným postupem jako s nosičem Talon bylo postupováno i s nosičem protein-A-agarosa. Po 20 min byla frakce přepipetována do čisté zkumavky s víčkem.

Následně byla provedena eluce TEV proteasy z nosiče pomocí PBS s 250 mM imidazolem. Nosič byl dále promyt MES pufrem, dH<sub>2</sub>O a uskladněn v 20% ethanolu v lednici při 4 °C. Fc fragment byl uvolněn z protein-A-agarosy citrátovým pufrem (pH = 3) a nosič byl promyt 0,1M NaOH, PBS, dH<sub>2</sub>O a uchován v 20% ethanolu.

### 4.3.7 Deglykosylace proteinu rClrb

Protein rClrb byl deglykosylován pomocí enzymu Endo H<sub>F</sub>. Celá reakce je složena z pufru G5 pro Endo H<sub>F</sub>, jenž byl 10× koncentrovaný a do reakce bylo tedy použito 0,1 objemu reakční směsi, 100 µl enzymu Endo H<sub>F</sub>, 100 µl pufru G5 a 1 ml proteinu o  $c = 5,3$  mg/ml. Následovalo štěpení při 37 °C, 60 min.

## 4.4 Ověření tvorby komplexu proteinů

### 4.4.1 Anizotropie fluorescence

Dimerní protein rNKR-P1B SD (46 kDa) byl naznačen fluorescenční barvou DyLight 488. Značení se provádí v PBS pufru o 150 mM koncentraci NaCl bez přítomnosti NaN<sub>3</sub>. Prvním



krokem bylo převedení 200  $\mu\text{g}$  proteinu z HEPES pufru, ve kterém byl po gelové permeační chromatografii, do požadovaného pufru pomocí odstředění v koncentrátorech. K proteinu se poté přidalo 100  $\mu\text{l}$  činidla NHS-DyLight 488 ( $\text{o c} = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Použitá zkumavka byla zabalena do alobalu, aby byla barva chráněna před slunečním svitem po celou dobu pokusu. Směs se nechala inkubovat 1 hod při 37 °C. Poté byla oddělena část nenavázané barvy odsolovací kolonou Sephadex (tlakový limit 0,5 MPa, průtok 2 ml/min). Nakonec byl označený protein nanesen na kolonu Superdex 200 a provedena klasická gelová permeační chromatografie. Obě metody k odstranění nenavázaného fluoroforu byly prováděny již v HEPES pufru. Poté byla na UV/Vis spektrofotometru změřena výsledná koncentrace a stupeň značení při 280 a 493 nm dle rovnic (4.3),(4.5) [40]. Stupeň značení by měl být ideálně 1 či nižší.

$$\text{koncentrace proteinu (M)} = \frac{[A_{280} - (A_{493} \times \text{CF})]}{\varepsilon_{\text{protein}}} \times \text{faktor ředění} \quad (4.3)$$

Kde CF je korekční faktor daného fluoroforu (rov. (4.4),  $\varepsilon_{\text{protein}}$  je molární extinkční koeficient proteinu (konstanta specifická pro danou látku při určité vlnové délce) a  $\varepsilon_{\text{fluor}}$  je 70 000.

$$\text{CF} = \frac{A_{280} \text{ fluor}}{A_{493} \text{ fluor}} \quad (4.4)$$

$$\text{stupeň značení} = \frac{A_{493} \times \text{faktor ředění}}{\varepsilon_{\text{fluor}} \times \text{koncentrace proteinu (M)}} \quad (4.5)$$

Měření anizotropie bylo poté provedeno v Brně na Masarykově univerzitě pod vedením Mgr. Ctirada Hofra, Ph.D. na spektrofluorimetru Scientific FluoroMax 4. Na jedno měření je spotřeba 1,5 ml naznačeného proteinu o koncentraci 25 – 100 nM. Každé měření je vhodné 3  $\times$  zopakovat. Spotřeba nenaznačeného proteinu k titraci bývá okolo 100 – 500  $\mu\text{g}$ . Čím nižší interakce, tím vyšší spotřeba. Nenaznačeného ligandu rClrb jsme měli připraveno 2,5 mg.

## 4.4.2 Rezonance povrchového plazmonu

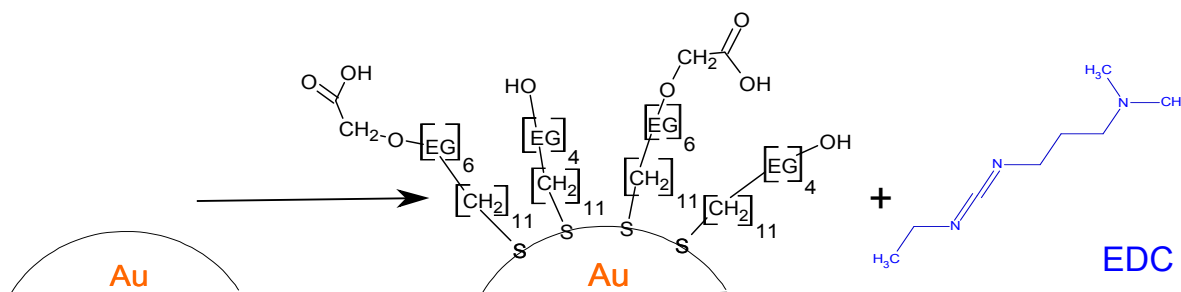
### 4.4.2.1 Regenerace proteinu A

U SPR byl použit optický senzor PLASMON-4. Specifikace senzoru jsou uvedeny v tabulce 4.1. Analýzy byly prováděny při 25 °C. Údržba přístroje byla provedena v souladu s pokyny dodavatele. Software pro ovládání kamery a sběru dat byl SPR UP verze 1.1.95.

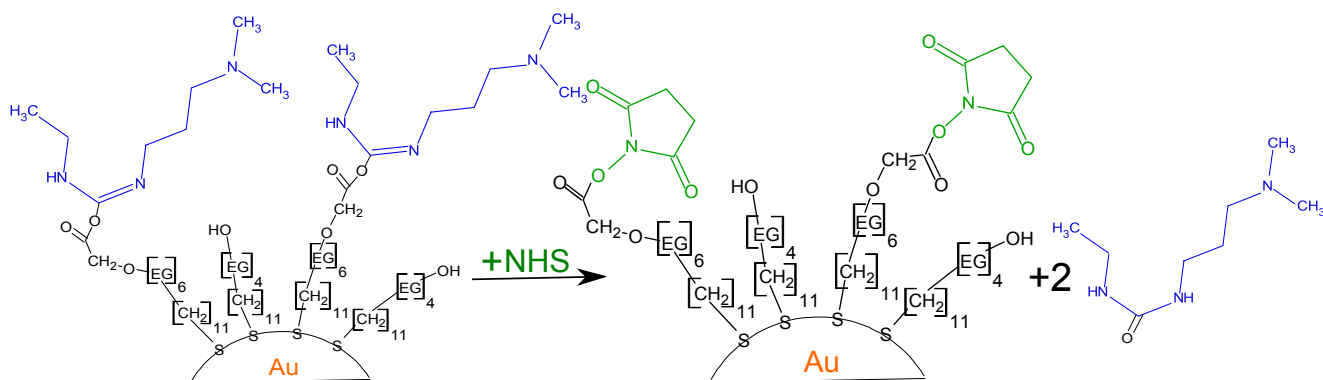
Tabulka 4.1: Specifikace optického senzoru PLASMON-4

Počet měřících kanálů	4
Pracovní rozsah indexu lomu (v jednotkách indexu lomu)	1,2 - 1,4
Rozlišení (v jednotkách indexu lomu)	$3 \cdot 10^{-7}$
Přesnost teplotní stabilizace (v °C)	0,02
Pracovní rozsah teplotní stabilizace (v °C)	10 - 50
Operační systém	Windows

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky a pufrů. Zásobní roztoky jednotlivých thiolů jsme získali od Mgr. Jana Tykvarta z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. (8 mg HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>4</sub>-OH a 5 mg HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>6</sub>-OCH<sub>2</sub>COOH). Čipy se nakládaly do jejich směsi viz. kapitola 3.2.4. Před naložením byly oba čipy opláchnuty UV-ethanolem a dH<sub>2</sub>O, osušeny vzduchem a poté vloženy do připravené směsi thiolů (Obr. 4.1) v zúžených skleněných lahvičkách (vždy zlatou stranou od sebe), ve kterých byly inkubovány 1 hod při 37 °C.

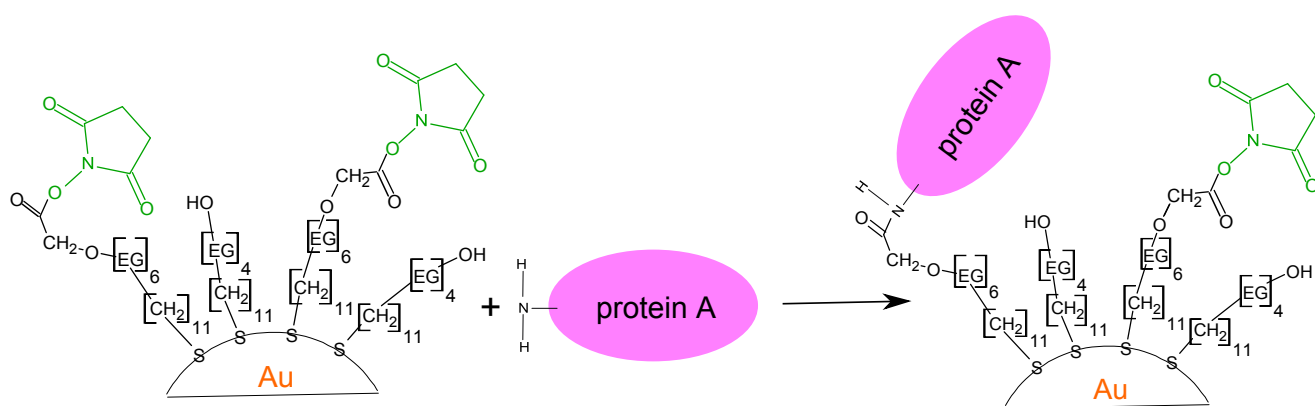


Obrázek 4.1: **Thioly.** V tomto schématu je znázorněna vazba směsi thiolů přes -SH vazbu na zlatou vrstvu, do okolí čnějí -COOH a -OH skupiny v poměru 3:7. V dalším kroku se na -COOH skupinu naváže EDC.

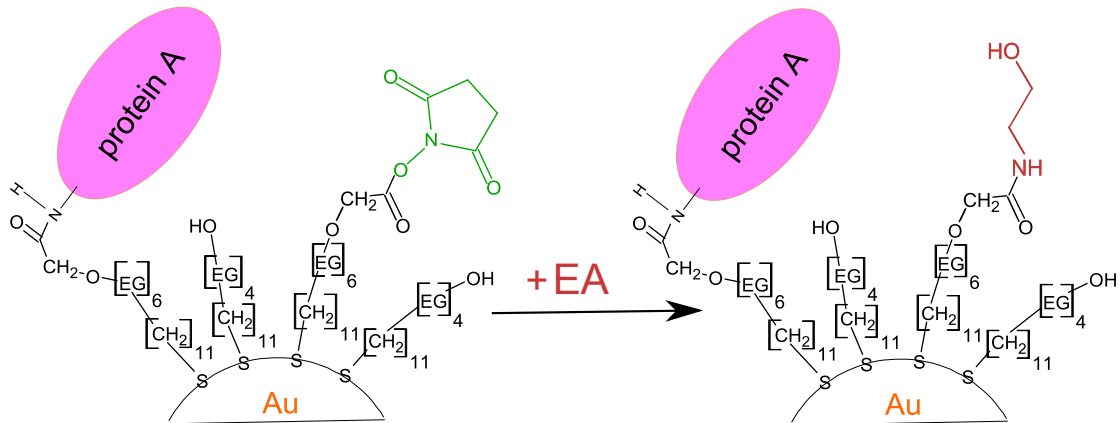


Obrázek 4.2: **EDC/NHS**. EDC reaguje s  $-COOH$  skupinou za vzniku velice reaktivního, avšak krátkodobého esterového meziproductu. Ten může dále reagovat s primárními aminy za vzniku amidových vazeb, se sulfonylovými skupinami za vzniku thioesterů nebo s vodou zpětnou hydrolyzou na karboxylát. K zabránění rychlé deaktivace slouží NHS, získáme tím stabilnější esterový meziproduct s větším výtěžkem [41].

Po inkubaci byl jeden z čipů opláchnut  $dH_2O$  a UV-ethanolem, osušen vzduchem a nainstalován do aparatury SPR přístroje skleněnou stranou, na kterou se nakápnul imerzní olej, na hranol předem očištěný acetonem. Byla spuštěna pumpa a zaplaveny průtokové komory a začal experiment dle návodu k postupu měření. Průtok byl nastaven na  $20 \mu l/min$ . Nejprve byl čip opláchnut 5 min  $dH_2O$ , dále byla nanesena směs EDC/NHS ([1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid]/N-hydroxy-sukcinimid) 1:1 o 0,5M koncentraci rozpuš-



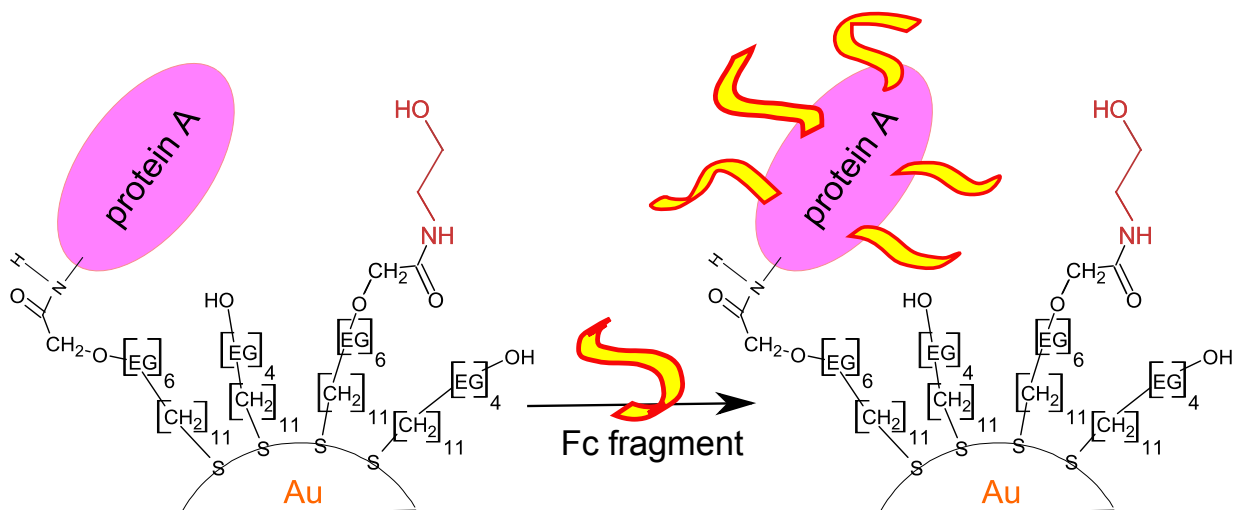
Obrázek 4.3: **Protein A**. Protein A se naváže na předchozí komplex pomocí  $-NH_2$  skupiny. Fúzní protein A je složen z pěti homologních Ig-vazebných domén a každá doména je schopna vázat proteiny z mnoha savčích druhů s Fc fragmentem [41, 42].



Obrázek 4.4: **Ethanolamin.** EA zablokuje neobsazená místa aktivovaných karboxylových skupin [41].

těná ve vodě, která byla připravena těsně před použitím (Obr. 4.2, str. 32). Nanášela se vysoká koncentrace pro dobré pokrytí thiolů. Znovu byl kanál promyt  $\text{dH}_2\text{O}$ , poté SA puřem o  $\text{pH} = 3,4$ .

V SA puřru byl také nanesen protein A ( $c=10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), jenž váže fúzní proteiny přes Fc fragment (Obr. 4.3, str. 32). Protein A má 5 vazebních míst. Pro odmytí nenavázaného proteinu A byl potřeba oplach SA a PBS\*\* a znovu SA puřem. Poté byla zablokována neobsazená místa aktivovaných karboxylových skupin pomocí roztoku ethanolaminu (EA) (Obr. 4.4).



Obrázek 4.5: **Navázání Fc fragmentu** Fc fragment odštěpený z konstruktu pYD5 C1 se může navázat pětkrát na jeden protein A.

Znovu byl opláchnut čip SA puforem a dále byl převeden do 10mM HEPES-SPR pufru s 0,005% TWEEN 20 ke snížení nespecifické vazby na protein A. V tomto pufru byl nanesen i Fc fragment (Obr. 4.5, str. 33) o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  (či fúzní protein v kapitole viz. 4.4.2.3). Fc fragment byl odštěpen z konstruktů fúzního proteinu pYD5 C1.

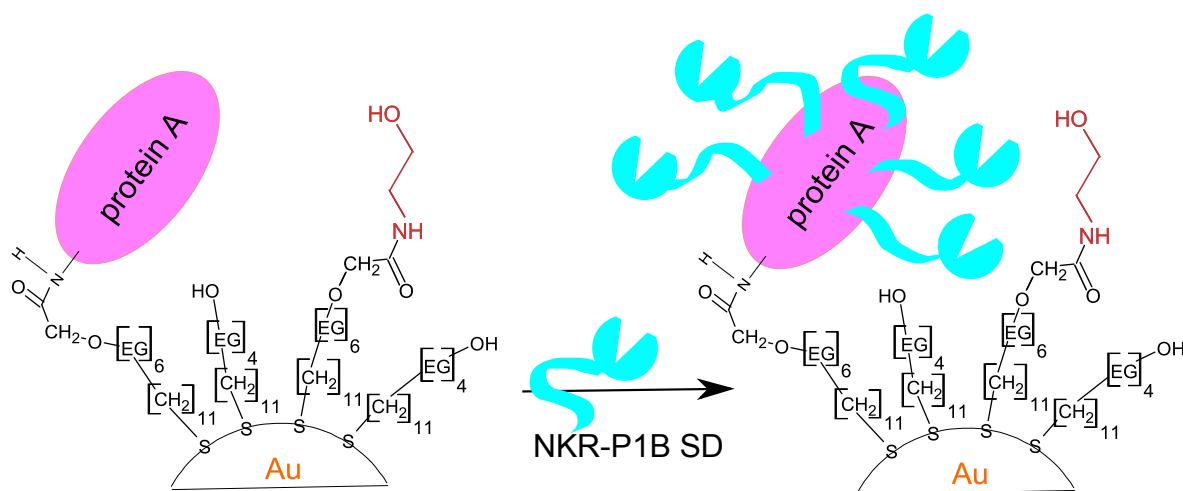
Sledovalo se, jaký pufr je nejlepší pro obnovení proteinu A. Do jednotlivých kanálů byl pouštěn 10 mM glycin, do kanálu 1 o  $\text{pH} = 3,0$ , do kanálu 2 o  $\text{pH} = 2,5$ , do kanálu 3 o  $\text{pH} = 2,0$  a do kanálu 4 o  $\text{pH} = 1,5$ . Poté se znovu protein A promyl HEPES-SPR puforem s 0,005% TWEEN 20 a nanesl se Fc fragment s následnou regenerací glycinovým puforem. Tento pokus byl proveden 10  $\times$  a bylo sledováno, jak se chová protein A po uvedení do původního stavu v závislosti na  $\text{pH}$  glycinového pufru.

#### 4.4.2.2 Vazba Fc fragmentu na protein A

Poté byla optimalizována vazba Fc fragmentu na již navázaný protein A. Do jednotlivých 4 kanálů bylo naneseno postupně 10, 5, 1 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Fc fragmentu nařaděných v HEPES-SPR pufru. Po nanesení byly kanály promyty HEPES-SPR puforem a PBS\*\*.

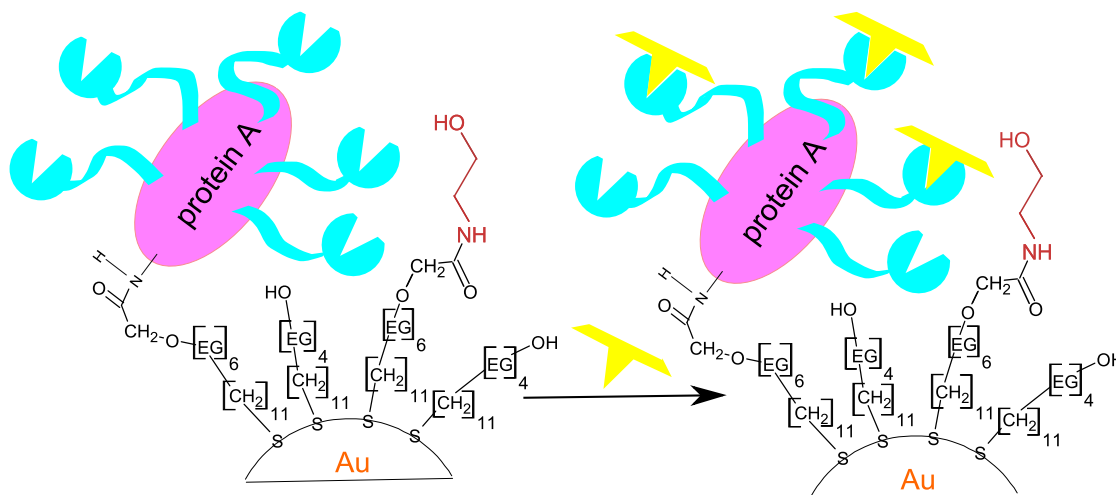
#### 4.4.2.3 Vazba rClrB na fúzní konstrukt NKR-P1B SD

V tomto pokusu jsme vycházeli ze znalostí z kapitoly 4.4.2.1. Bylo sníženo množství nanášeného proteinu A na 1  $\mu\text{g/ml}$  a místo Fc fragmentu se nanášel fúzní konstrukt rNKR-P1B SD



Obrázek 4.6: NKR-P1B SD. Na protein A se nanesl fúzní protein rNKR-P1B SD.

připravený z plazmidu pYD5 S1 (kanál 1) a jako reference fúzní myši NKR-P1C poskytnuté Bc. Helenou Pucholtovou (kanál 2). Vazba je viditelná na Obr. 4.6, str. 34. Také bylo použito množství 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Znovu následovalo promytí HEPES pufrům a nakonec byl nanesen ligand rClrb o koncentraci 5  $\text{mg}/\text{ml}$  (viz. Obr. 4.7).



Obrázek 4.7: **rClrb** Na fúzní proteiny se nanasl ligand rClrb pro zjištění jejich vazby.

## 4.5 Strukturní studium rClrb

### 4.5.1 Diferenční skenovací fluorimetrie

Pokus diferenční skenovací fluorimetrie byl proveden na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. za pomoci Mgr. Jany Písačkové na termocykleru pro real-time PCR LightCycler 480. Byl použit vzorek rClrb o koncentraci 10,8  $\text{mg}/\text{ml}$  v HEPES pufru. Protein byl naředěn na 2,5  $\text{mg}/\text{ml}$  a na 96 jamkové destičce byla vytvořena kalibrační řada 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1  $\text{mg}/\text{ml}$ . Výsledný objem reakce byl 25  $\mu\text{l}$  a skládal se z námi naředěného proteinu doplněného HEPES pufrům a 1  $\mu\text{l}$  barvy Sypro Oranž. Změřila se nejnížší vhodná koncentrace poskytující zřetelnou odezvu fluorescence a ta byla použita do vlastního pokusu. Ten byl proveden také na 96 jamkové destičce, kam bylo pipetováno 12,5  $\mu\text{l}$  aditiva, 1  $\mu\text{l}$  barvy Sypro Oranž, 1  $\mu\text{l}$  proteinu o  $c = 2,5 \text{ mg}/\text{ml}$  a reakce se doplnila 10,5  $\mu\text{l}$  vody (viz. Tab. 4.2, str. 36).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Objem [μl]
A	rClrb octan sodný pH 4,5 dH <sub>2</sub> O	rClrb citrát sodný pH 4,7 dH <sub>2</sub> O	rClrb octan sodný pH 5,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,5 dH <sub>2</sub> O	rClrb citrát sodný pH 5,5 dH <sub>2</sub> O	rClrb Mes pH 5,8 dH <sub>2</sub> O	rClrb KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb Mes pH 6,2 dH <sub>2</sub> O	rClrb NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,5 dH <sub>2</sub> O	rClrb Mes pH 6,5 dH <sub>2</sub> O	rClrb KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0 dH <sub>2</sub> O	1 12,5 10,5 1
	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	
	rClrb Hepes pH 7,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb NaPhos pH 7,5 dH <sub>2</sub> O	rClrb octan amonný pH 7,3 dH <sub>2</sub> O	rClrb Tris pH 7,5 dH <sub>2</sub> O	rClrb Imidazol pH 8,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb Hepes pH 8,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb Tris pH 8,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb Bicin pH 8,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb Tris pH 8,5 dH <sub>2</sub> O	rClrb Bicin pH 9,0 dH <sub>2</sub> O	rClrb dH <sub>2</sub> O x dH <sub>2</sub> O	rClrb Orig. Pufr x Orig. Pufr	1 12,5 10,5 1
	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž
B	rClrb octan sodný pH 4,5 200 mM NaCl	rClrb citrát sodný pH 4,7 200 mM NaCl	rClrb octan sodný pH 5,0 200 mM NaCl	rClrb KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,0 200 mM NaCl	rClrb NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,5 200 mM NaCl	rClrb citrát sodný pH 5,5 200 mM NaCl	rClrb Mes pH 5,8 200 mM NaCl	rClrb KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,0 200 mM NaCl	rClrb Mes pH 6,2 200 mM NaCl	rClrb NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,5 200 mM NaCl	rClrb Mes pH 6,5 200 mM NaCl	rClrb KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0 200 mM NaCl	1 12,5 10,5 1
	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	
	rClrb Hepes pH 7,0 200 mM NaCl	rClrb NaPhos pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb octan amonný pH 7,3 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb Imidazol pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Hepes pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,5 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 9,0 200 mM NaCl	rClrb dH <sub>2</sub> O x 200 mM NaCl	rClrb Orig. Pufr x Orig. Pufr	1 12,5 10,5 1
	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž
C	rClrb Hepes pH 7,0 200 mM NaCl	rClrb NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb octan amonný pH 7,3 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb Imidazol pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Hepes pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,5 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 9,0 200 mM NaCl	rClrb dH <sub>2</sub> O x 200 mM NaCl	rClrb Orig. Pufr x Orig. Pufr	1 12,5 10,5 1
	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	
	rClrb Hepes pH 7,0 200 mM NaCl	rClrb NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb octan amonný pH 7,3 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb Imidazol pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Hepes pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,5 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 9,0 200 mM NaCl	rClrb dH <sub>2</sub> O x 200 mM NaCl	rClrb Orig. Pufr x Orig. Pufr	1 12,5 10,5 1
	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž
D	rClrb Hepes pH 7,0 200 mM NaCl	rClrb NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb octan amonný pH 7,3 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb Imidazol pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Hepes pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,5 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 9,0 200 mM NaCl	rClrb dH <sub>2</sub> O x 200 mM NaCl	rClrb Orig. Pufr x Orig. Pufr	1 12,5 10,5 1
	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	
	rClrb Hepes pH 7,0 200 mM NaCl	rClrb NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb octan amonný pH 7,3 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 7,5 200 mM NaCl	rClrb Imidazol pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Hepes pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 8,0 200 mM NaCl	rClrb Tris pH 8,5 200 mM NaCl	rClrb Bicin pH 9,0 200 mM NaCl	rClrb dH <sub>2</sub> O x 200 mM NaCl	rClrb Orig. Pufr x Orig. Pufr	1 12,5 10,5 1
	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž	Sypro Oranž

Tabulka 4.2: **Diferenční skenovací fluorimetrie.** Složení pufrů ( $c = 200 \text{ mM} + 400 \text{ mM NaCl}$ ) a celkové reakce včetně jednotlivých objemů činidel nanesených na 96-jamkovou destičku. Protein rClrb byl o koncentraci 2,5 mg/ml, fluorofor Sypro Oranž se nanášel 25 × koncentrovaný. Zpracováno Mgr. Janou Písačkovou.

### 4.5.2 Proteinová krystalizace

Krystalizace proteinu rClrb byla prováděna na Biotechnologickém ústavu AV ČR, v.v.i. za pomoci Mgr. Jakuba Ptáčka na robotu typu Crystal Gryphon metodou sedící kapky. Byl použit 1 mg deglykosylovaného proteinu rClrb o koncentraci 8 mg/ml. Na 96 jamkovou krystalizační destičku Intelli-plate 96 bylo pipetováno 50  $\mu$ l rezervoáru. Poté byla vytvářena sedící kapka z 0,15  $\mu$ l rezervoáru z komerční sady pro krystalizaci JCSG Core I - IV Suite (*Qiagen, Německo*) a 0,15  $\mu$ l proteinu. Krystalizační desky byly uchovány v místnosti při 20 °C. Jednotlivý posun experimentů byl sledován 1  $\times$  za 14 dní pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem.

### 4.5.3 Testování difrakce krystalů

Přenos krystalů do tekutého dusíku byl prováděn za pomoci Ing. Jana Dohnálka, Ph.D. na Biotechnologickém ústavu AV ČR, v.v.i.. Nejprve byla prázdná vialka ponořena do tekutého dusíku, ve kterém byla nechána krátkou dobu vytemperovat. Poté byl pomocí nylonové smyčky příslušných rozměrů vyloven krystal z kapky a namočen v kryoprotektantu. Jako kryoprotektant byl použit 20% (v/v) ethylenglykol, 20% (v/v) glycerol, 20% (v/v) PEG 400. Smyčka byla ihned vložena do vialky naplněné tekutým dusíkem.

Pod dohledem Ing. Jana Dohnálka, Ph.D. byly krystaly testovány na krystalovou difrakci na difraktometru Laboratoře strukturní biologie, BTÚ AV ČR, v.v.i..



## 5 | Výsledky práce

Tato studie navazuje na moji bakalářskou práci. Jejím hlavním cílem bylo zjištění, zda námi vytvořený potkaní receptor NKR-P1B z kmene SD tvoří specifickou vazbu s jeho ligandem rClrb. Nejprve však popíšeme plazmidy, které byly použity pro rekombinantní expresi proteinů, jenž jsem získala připravené od RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. už na svou bakalářskou práci. Pracovala jsem hlavně s plazmidy pYD5 jako s pYD5 C1 pro získání ligandu rClrb (úsek Val65 - Met207) a pYD5 S1 pro získání proteinu rNKR-P1B SD (Val78 - Ser223) (Obr. 5.1). Plazmid pYD5 naší laboratoři poskytl Dr. Yves Durocher (*CNRC Montreal, Kanada*) upravený tak, aby obsahoval vhodná klonovací místa a mohly do něj být vloženy konstrukty receptorů. Vektor pYD5 obsahuje sekreční signál, Fc fragment lidského IgG a sekvenci rozpoznávanou TEV proteasou.

```
rClrb          MSAKKASQPMLNNTTGSLSQEGEMGKMFHGKCLRIVSPESPAK LYCCYGVIMVLSVAVVALS 60
              VALSVKMTLPQISTINTYAAQPRNWIGVGNKCFYFSEYASWTFSTQTFCKAQEAELARFDT 120
              EEELNFLSRYKGSFDYWIGLHRESSEHPKWTDNTQYFYSLSIRGVERYAYLNDIGISSA 180
              RVYADKRWSQSRLLNSYSLQCKTPFSPM 207

rNKR1B SD     MDTAVVYADLHLARTGEPKREPPPSLSPDTCQCPRWHLALKLGCACLILLVLSVIGLGV 60
              LVLTLLOKPLIQNSPADVQENRRTKTTDSPAQLKCPKDWHSQDKCFHVSQTSITWKGSLA 120
              DCGGKGATLLLVDQEQELRFLRLNLTKRISSEFWIGLSYTLSEKWKWINGSTLNSDALNI 180
              TGDTEKDSQASVSQDKVLSSECDSDNIWICQKELKRESTCNDSDS 223
```

modře konstrukt C1 (Val<sub>65</sub> – Met<sub>207</sub>)

zeleně konstrukt S1 (Val<sub>78</sub> – Ser<sub>223</sub>)

Obrázek 5.1: Sekvence proteinů rNKR-P1B SD a rClrb. Sekvence proteinů rNKR-P1B SD konstrukt S1 (zeleně) a rClrb konstrukt C1 (modře). Oranžově značené aminokyseliny spouští kaskádu inhibičních reakcí, červeně je znázorněna transmembránová část, v konstruktech jsou znázorněna potenciální místa N-glykosylace (růžově) a cysteiny zodpovědné za tvorbu disulfidických můstků (žlutě) a dimerizaci (šedivě).

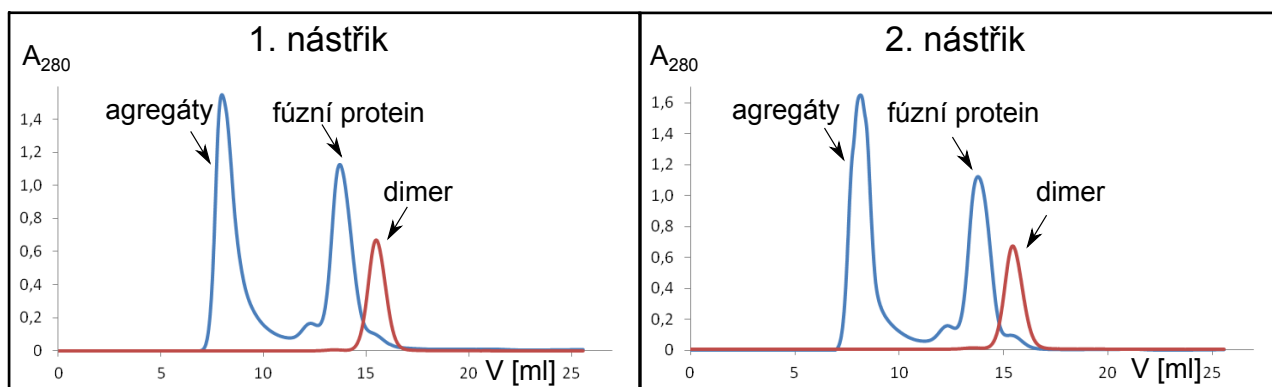
Produkcí proteinů pomocí plazmidů pYD5 byly získány fúzní konstrukty s Fc IgG. Fc fragmenty však lze odštěpit pomocí TEV proteasy a získat tak čisté dimery. Produkce receptorů jako fúzních proteinů napomáhá vzniku jejich kovalentního dimeru.

Dané plazmidy byly připraveny v zásobním množství dle návodu 4.1.2. Byl připraven plazmid pYD5 C1 o koncentraci 8,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a čistotě  $A_{260/280} = 1,6$  a pYD5 S1 o  $c = 2,22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  a čistotě  $A_{260/280} = 1,6$ .

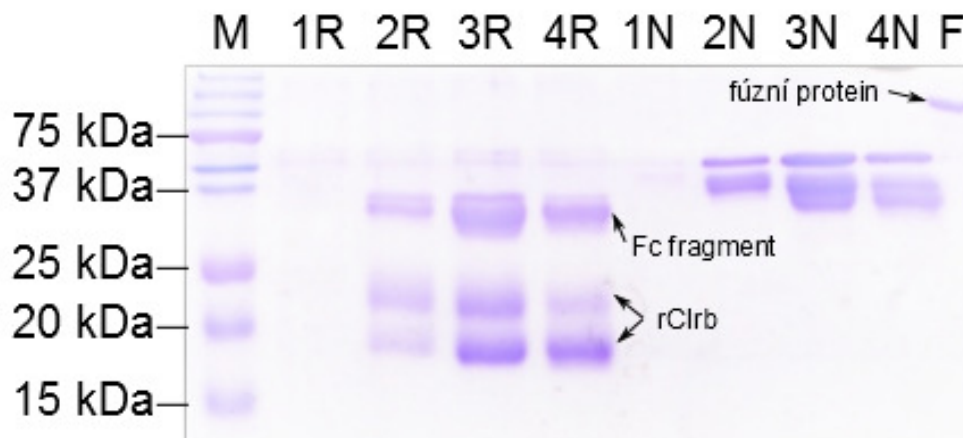
## 5.1 Produkce a purifikace rClrb

K produkci fúzního konstrukt rClrb byl použit připravený plazmid pYD5 C1 (viz. kapitola 4.2.4). Buňky HEK293S GnTI<sup>-</sup> byly rozpěstovány v 1l lahvi o objemu kultivačních médií 400 ml s viabilitou 100%. Celkové množství buněk použitých na jednu produkci bylo  $800 \cdot 10^6$ . Po 6 dnech byla produkce ukončena.

Produkce byla zfiltrována a následovala afinitní chromatografie na kolonce Hitrap MabSelect Sure (viz. kapitola 4.3.1). Vzorek byl zakoncentrován na 600  $\mu\text{l}$ . Kvůli vysoké koncentraci a možnosti sražení proteinu, byl nástřik na kolonu Superdex 200 10/300 GL proveden jako



Obrázek 5.2: **Gelová permeační chromatografie proteinu rClrb.** Chromatografie probíhala na koloně Superdex 200 10/300 GL. Modře je znázorněn chromatogram fúzního rClrb, jsou zde vidět agregáty prošlé s mrtvým objemem kolony a fúzní konstrukt. Červeně je znázorněno rClrb po štěpení TEV proteasou a afinitní chromatografií, eluční vrchol odpovídá čistému dimeru rClrb (u obou nástřiků se hodnota absorbance při 280 nm pohybovala okolo 0,670).

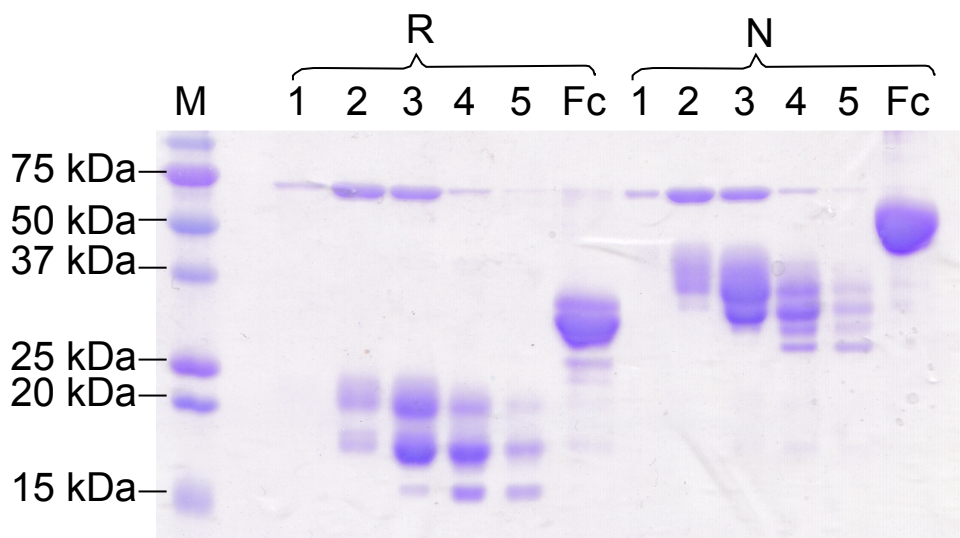


Obrázek 5.3: 15% SDS PAGE proteinu rClrb po štěpení TEV proteasou. Pro kontrolu čistoty připraveného receptoru byla provedena SDS-PAGE. V dráze M je standard, v drahách 1R - 4R jsou frakce 1 – 4 v redukujícím prostředí (rClrb o 2 různých formách glykosylace) a Fc fragment, 1N - 4N jsou frakce 1 – 4 v neredukujícím prostředí, F značí výchozí nerozštěpený fúzní konstrukt.

2 × 300  $\mu$ l. Výsledek gelové permeační chromatografie je vidět na grafu 5.2, str. 39 (modrá křivka).

Další částí práce bylo štěpení proteinu, kdy byly spojeny frakce z prvního nástřiku 3 – 6 a z druhého nástřiku 7 – 10. Pro štěpení bylo použito 60  $\mu$ l TEV proteasy (27 kDa, o c = 1 mg/ml). Štěpení probíhalo 1 hod při 30 °C a poté byl vzorek přemístěn na 4 dny do lednice (4 °C). Od odštěpeného Fc fragmentu byl vzorek oddělen pomocí protein-A-agarosy a od TEV proteasy pomocí nosiče TALON. Vzorek byl znovu zakoncentrován a byla provedena druhá gelová permeační chromatografie (viz. Obr. 5.2, str. 39, červená křivka) a SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu pro kontrolu čistoty (viz. Obr. 5.3). Z obrázku je patrné, že se vzorek zcela neočistil od Fc fragmentu, proto byl tedy celý postup s vyvážáním pomocí protein-A-agarosy zopakován. Protein rClrb byl také deglykosylován pomocí enzymu Endo  $H_F$ . Výsledek je vidět na Obr. 5.4, str. 41.

Tento pokus proběhl ještě 2 × pro získání dostatečného množství proteinu. Po stanovení celkové koncentrace rClrb bylo získáno 5,3 mg proteinu rClrb.

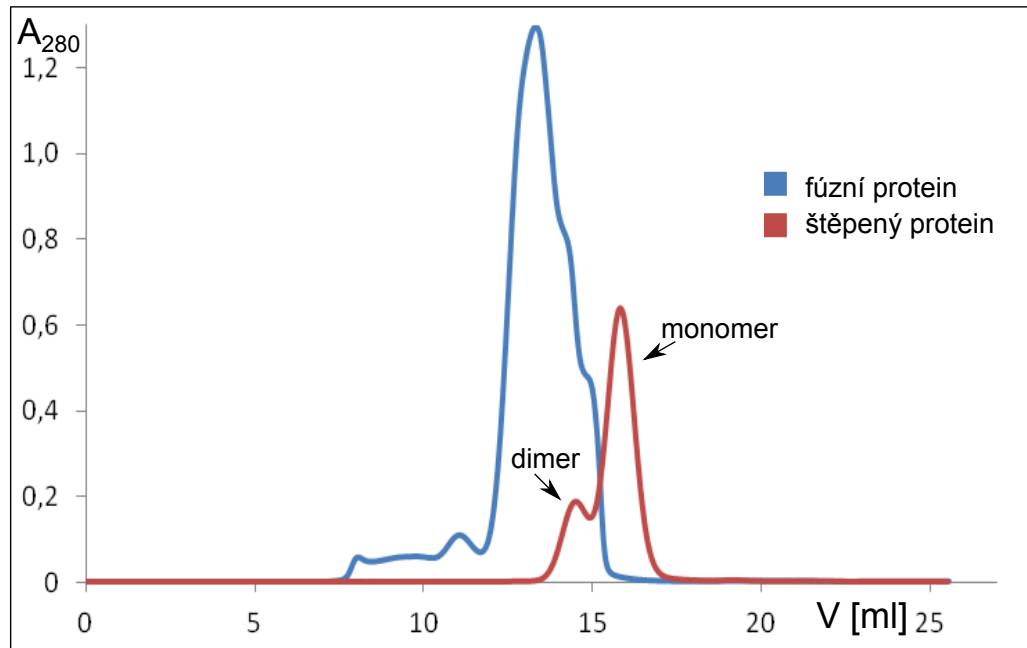


Obrázek 5.4: **12,5% SDS PAGE** proteinu **rClrb**. Kontrola čistoty rClrb už po deglykosylaci. V dráze M je standard, v drahách 1 – 5 jsou frakce z gelové permeační chromatografie v redukujícím prostředí (R) a v neredukujícím (N), Fc značí odštěpený Fc fragment (27 kDa, 54 kDa). Endo  $H_F$ , jímž byla proveden pokus o deglykosylaci má molekulovou hmotnost 70 kDa.

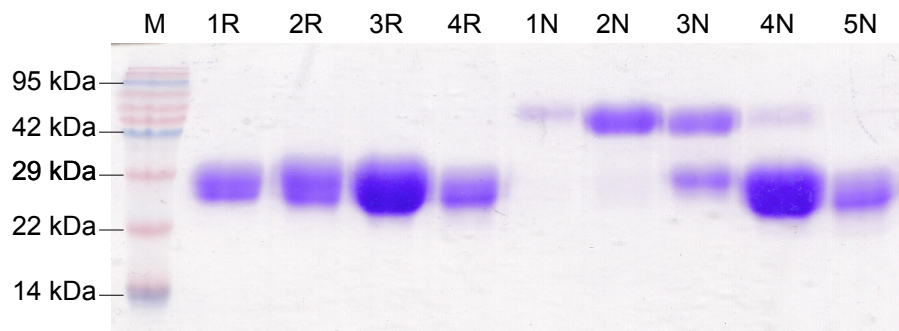
## 5.2 Produkce a purifikace rNKR-P1B SD

K produkci fúzního konstruktů rNKR-P1B SD byl použit připravený plazmid pYD5 S1 (viz. kapitola 4.2.4). Buňky HEK293S GnTI<sup>-</sup> byly rozpěstovány v 1l lahvi o objemu kultačních médií 400 ml s viabilitou 100%. Celkové množství buněk použitých na jednu produkci bylo  $750 \cdot 10^6$ . Dle postupu byla připravena transfekční směs s lineárním PEI v poměru 1:3 a ta byla 5 min inkubována a poté byla přidána k buňkám. Po 4 hodinách byly buňky převedeny do 1l láhve a doplněny do 400 ml médiem ExCELL293 a byly přidány antibiotika. Druhý den bylo přidáno 10 ml 20% Tryptonu N1. Po 6 dnech byla produkce ukončena.

Purifikace pYD5 S1 byla provedena dle návodu v kapitole 4.3. Záznamy z obou gelových permečních chromatografií jsou vidět z Obr. 5.5, str. 42. Pomocí SDS PAGE byla potvrzena čistota proteinu (viz. Obr. 5.6, str. 42).



Obrázek 5.5: **Gelová permeační chromatografie proteinu rNKR-P1B SD.** Chromatografie probíhala na koloně Superdex 200 10/300 GL. Modře je vykreslen fúzní protein. Červeně je znázorněn chromatogram rNKR-P1B SD po štěpení TEV proteasou a chelatační chromatografii, eluční vrchol odpovídá dimeru (14,5 ml,  $A_{280} = 0,187$ ) a monomeru (15,9 ml,  $A_{280} = 0,638$ ).

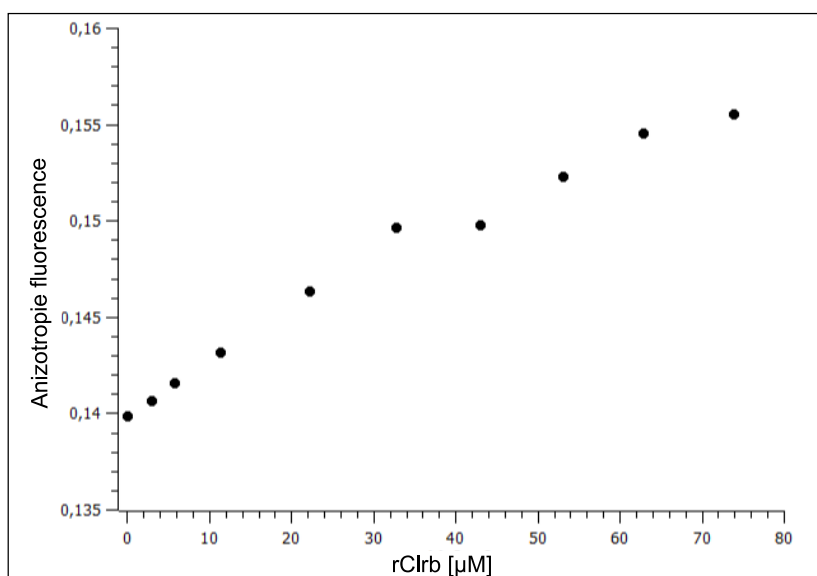


Obrázek 5.6: **15% SDS PAGE proteinu rNKR-P1B SD.** Pro kontrolu čistoty připraveného receptoru byla provedena SDS-PAGE. V dráze M je standard, v drahách 1R - 4R jsou frakce 1 – 4 v redukujícím prostředí (rNKR-P1B SD: 23 kDa), 1N - 5N jsou frakce 1 – 5 v neredukujícím prostředí (rNKR-P1B SD: 46 kDa dimer, 23 kDa monomer).

## 5.3 Ověření tvorby komplexu

### 5.3.1 Anizotropie fluorescence

U protein-proteinové interakce za použití anizotropie fluorescence je důležité předem zvážit velikost proteinů, stabilitu a jejich množství. Nejprve je třeba naznačit jeden z proteinů, nejlépe ten, kterého je méně a je menší. U menšího proteinu bude lépe pozorovatelný posun anizotropie vzniklý vlivem vazby většího ligandu. Zvolila jsem dimerní protein rNKR-P1B SD (46 kDa), který byl naznačen fluorescenční barvou DyLight 488. Druhý neznačený protein byl jeho ligand rClrb (40 kDa). Důvodem výběru bylo větší naprodukované množství dimerního proteinu rClrb, jelikož se protein rClrb příliš neliší velikostí oproti NKR-P1B. Měření bylo provedeno v Brně na Masarykově univerzitě pod vedením Mgr. Ctirada Hofra, Ph.D. na spektrofluorimetru FluoroMax 4. Náš protein byl naznačen z 10 % a použitá koncentrace značeného proteinu byla 7,5 nM. Nejprve jsme měření zkusili na monomerním rNKR-P1B SD (23 kDa), jelikož jsme ho měli větší množství než dimerního proteinu. Po potvrzení, že bylo použito dostatečné množství pro pozorování anizotropie fluorescence jsme přešli k dimerní formě. Roztok byl zředěný v HEPES pufru. Poté jsme postupně přidávali roztok rClrb, což je vidět na Obr. 5.7.



Obrázek 5.7: Vazba rClrb na rNKR-P1B SD. Závislost anizotropie fluorescence na koncentraci rClrb.

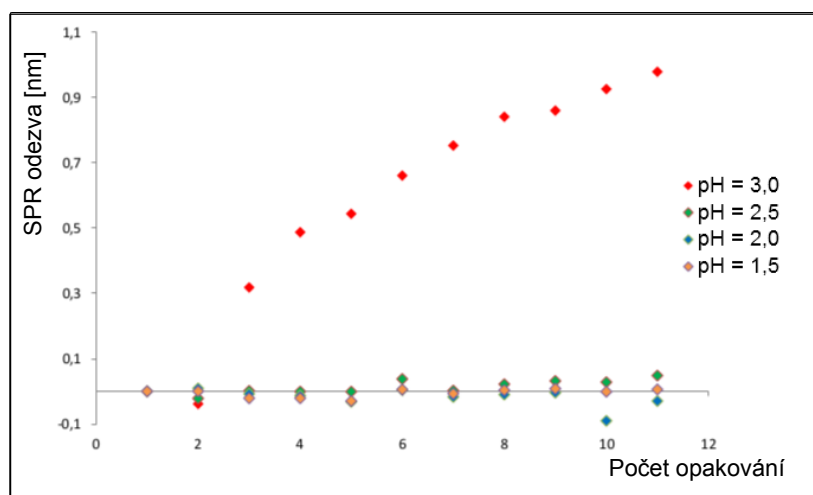
Byla potvrzena vazba rNKR-P1B SD s jeho ligandem rClrb, její specifita však nebyla, díky velké spotřebě ligandu, potvrzena. K tomu by bylo potřeba dosáhnout saturace vazby. Pro potvrzení specifity jsme začali s měřením rezonance povrchového plazmonu.

### 5.3.2 Rezonance povrchového plazmonu

K charakterizaci proteinových interakcí slouží metoda rezonance povrchového plazmonu. Cílem bylo potvrdit specifitu vazby námi připraveného rNKR-P1B SD a rClrb. Na začátku pokusu byla snaha o efektivnější využití čipu, a proto se přistoupilo k vazbě fúzního konstruktů přes protein A, který lze regenerovat.

#### 5.3.2.1 Regenerace proteinu A

Protein A ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ) byl na čip navázán standardním postupem v SA pufru o  $\text{pH} = 3,4$  po aktivaci pomocí EDC/NHS. Dále byl omyt SA puftrem, PBS\*\* a zablokován pomocí 1M EA, dále byl převeden do HEPES-SPR pufru, ve kterém se poté nanášel odštěpený Fc fragment z konstruktů pYD5 C1 (54 kDa, zbylý z fúzního konstruktů po odštěpení rClrb).

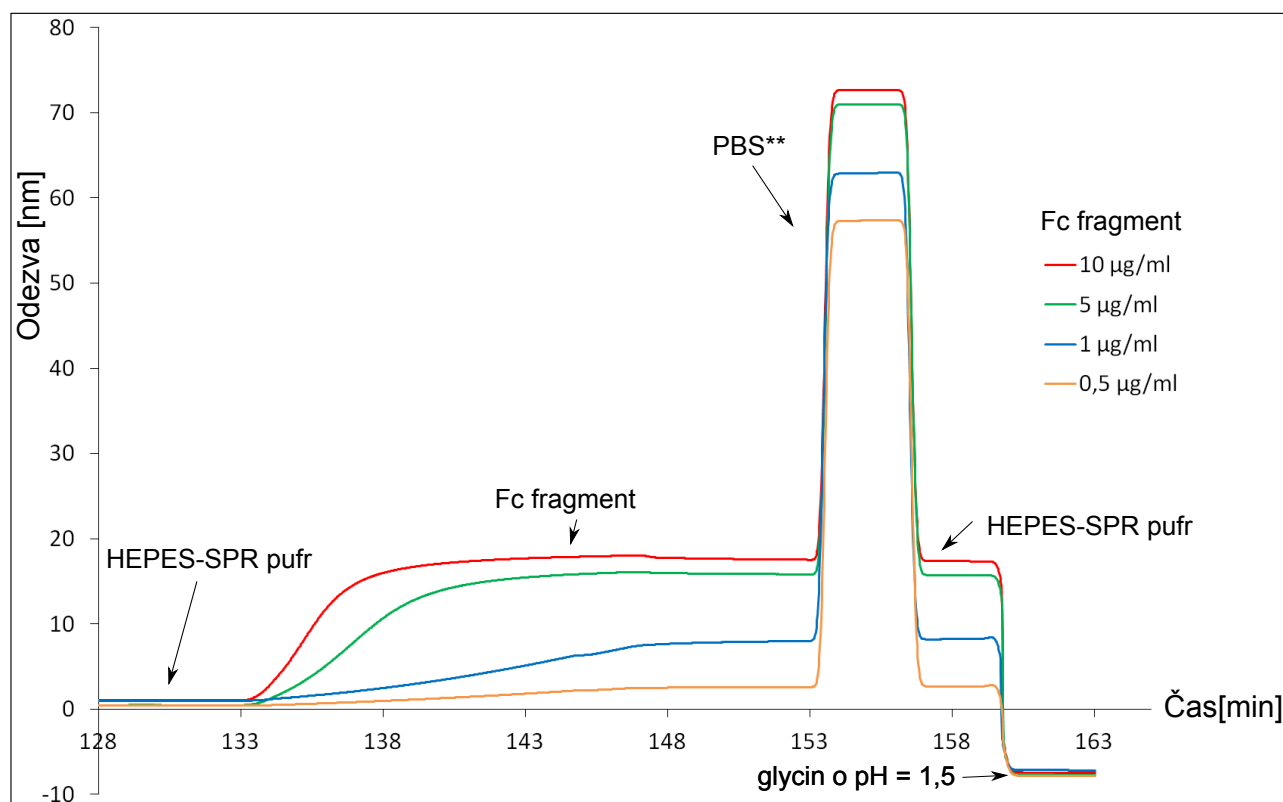


Obrázek 5.8: **Regenerace proteinu A.** Na protein A byl opakovaně nanesen odštěpený Fc fragment a byla prováděna regenerace pomocí 10 mM glycinu o  $\text{pH} 1,5; 2,0; 2,5$  a  $3,0$ . Na tomto grafu je zaznamenán návrat do HEPES-SPR pufru. Při použití pufru o  $\text{pH} 3,0$  je patrná neúplná regenerace povrchu čipu v každém cyklu.

Nakonec byl protein A zregenerován pomocí glycinového pufru (viz. Obr. 5.8, str. 44) o pH od 1,5 do 3. Pokus byl opakován 10 × se stejnými podmínkami a z grafu je vidět, že obnovu proteinu A lze provádět již puftrem o pH = 2,5 a nižším. U vyššího pH není obnova úplná. Následné navázání Fc fragmentu probíhalo vždy stejně, protein A se nesrážel, nízké pH nevede k jeho denaturaci. K dalším pokusům byl pro regeneraci použit glycin o pH = 1,5.

### 5.3.2.2 Koncentrace nanášeného Fc fragmentu

Dalším krokem byla optimalizace naneseného množství proteinu A, kterou jsem určila jako 1 µg/ml. Následujícím pokusem jsem zjišťovala, jaké množství fúzního konstrukturu proteinu je třeba nanést na protein A, aby odezva byla viditelná. Na protein A byl nanesen odštěpený Fc fragment o koncentracích 0,5; 1,0; 5,0 a 10,0 µg/ml a nejnižší viditelná odezva byla určena také 1 µg/ml (viz. Obr. 5.9).

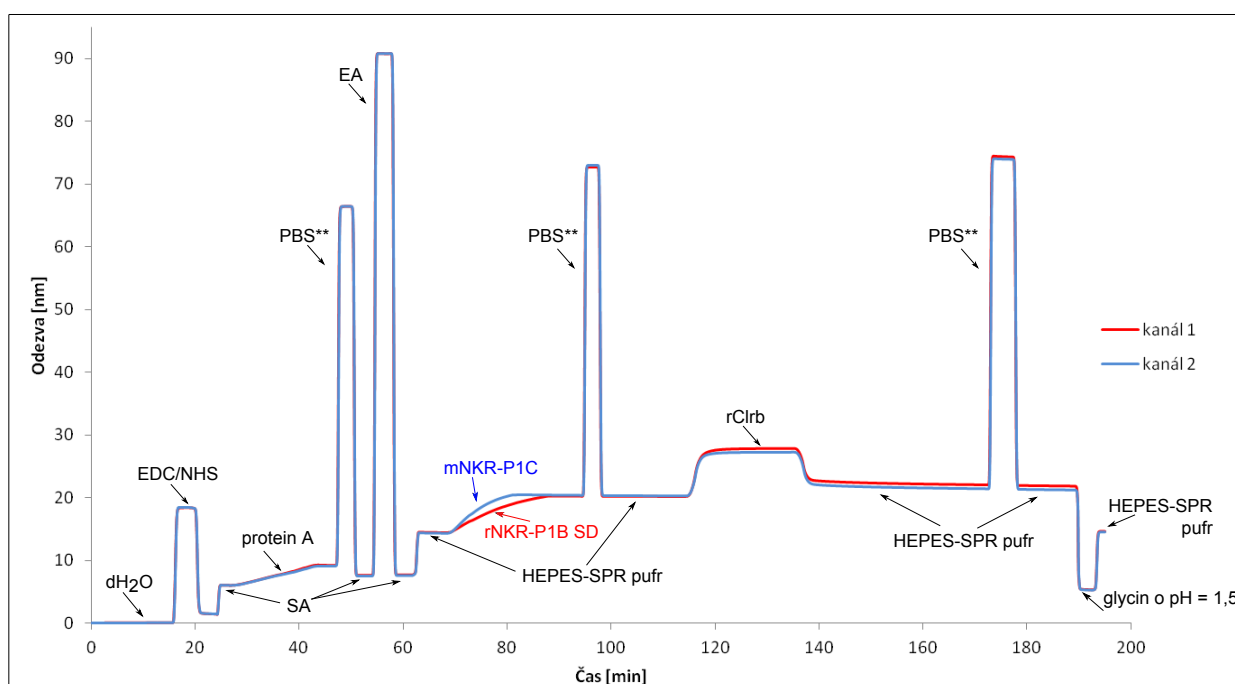


Obrázek 5.9: Senzogram vazby Fc fragmentu na protein A. Z grafu je viditelná vazba Fc fragmentu o vzrůstající koncentraci.



### 5.3.2.3 Vazba rClrb na fúzní konstrukt NKR-P1B SD

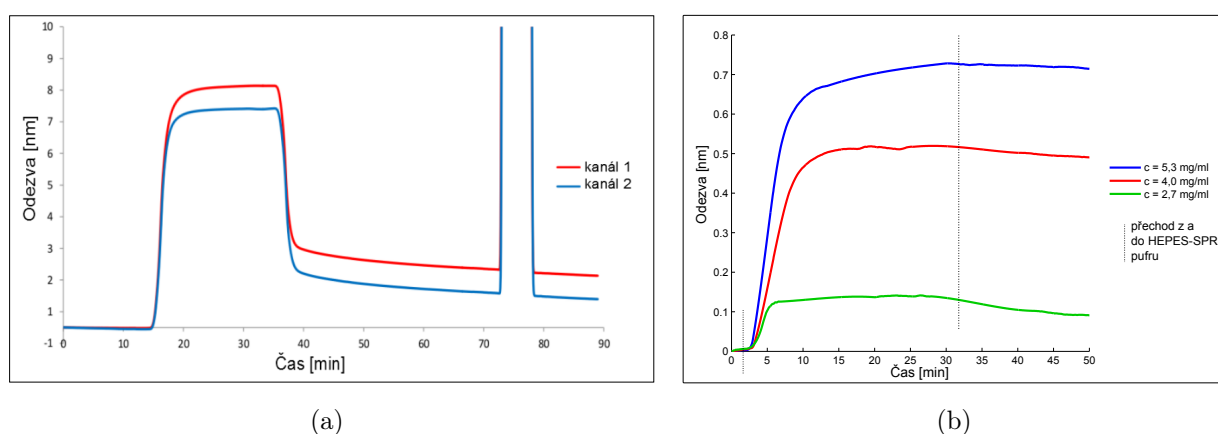
Poté se přešlo k hlavnímu pokusu, což bylo potvrzení vazby rClrb na námi připravený rNKR-P1B SD. Nejprve bylo potřeba určit referenční kanál. Jako referenci, na kterou se nebude vázat rClrb, byl vyzkoušen samotný protein A, odštěpený Fc fragment z konstruktu pYD5 C1 a odlišný fúzní konstrukt myši NKR-P1C (vypurifikováno Bc. Helenou Pucholtovou). Nejlépe se osvědčil fúzní konstrukt mNKR-P1C, na kterém probíhala nespecifická vazba. Pokus probíhal dle grafu na Obr. 5.10 (ve 2 kanálech).



Obrázek 5.10: **Senzogram vazby rClrb na rNKR-P1B SD.** Z grafu je patrný celý postup práce, kdy bylo na čip nejprve navázáno EDC/NHS, na něj byl nanesen protein A, jenž byl zablokován EA. Poté byl čip převeden do HEPES-SPR pufru, ve kterém byl nanesen fúzní konstrukt a rClrb. Porovnání vazby rClrb na rNKR-P1B SD a mNKR-P1C je znázorněno jejich rozdílem na Obr. 5.11, str. 47.

Nejprve se čip aktivoval pomocí 0,5M směsi EDC/NHS, poté se přenesl do prostředí SA pufru, nanasl se protein A o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ , poté se odmyl nenavázaný protein A PBS\*\* a deaktivovaly se nenavázané -COOH skupiny pomocí roztoku EA. Dále se čip přenesl do prostředí HEPES-SPR pufru, ve kterém se do jednotlivých kanálů nanasly fúzní

konstrukty proteinů rNKR-P1B SD (kanál 1) a mNKR-P1C (kanál 2). Znovu se odmyly ne- navázané proteiny pomocí PBS\*\* a nanaslo se rClrb o  $c = 5,3$  mg/ml (viz. Obr. 5.11a). Tento pokus se poté opakoval ještě 3  $\times$ , s nižšími koncentracemi rClrb, a to 4 mg/ml, 2,7 mg/ml a 1,25 mg/ml. U koncentrace 1,25 mg/ml již nebyla specifická vazba patrná, proto při zpracovávání výsledků nebyla zařazena. Pro vyhodnocení specifity vazby byla odečtena vazba reference od fúzního konstruktu rNKR-P1B SD, což je vidět na Obr. 5.11b. Výsledek je tedy takový, že rClrb a rNKR-P1B SD spolu specificky interagují pouze v poměru 1 : 2500 a vyšším.



Obrázek 5.11: **Specifická vazba rClrb na rNKR-P1B SD.**

(a) Sensorgram navázání rClrb (o  $c = 5,3$  mg/ml) na fúzní konstrukt rNKR-P1B SD (kanál 1) a mNKR-P1C (kanál 2, reference), které byly na čipu zachyceny pomocí proteinu A.  
 (b) Graf zobrazuje rozdíl křivek rNKR-P1B SD a mNKR-P1C při nanášení různých koncentrací rClrb.

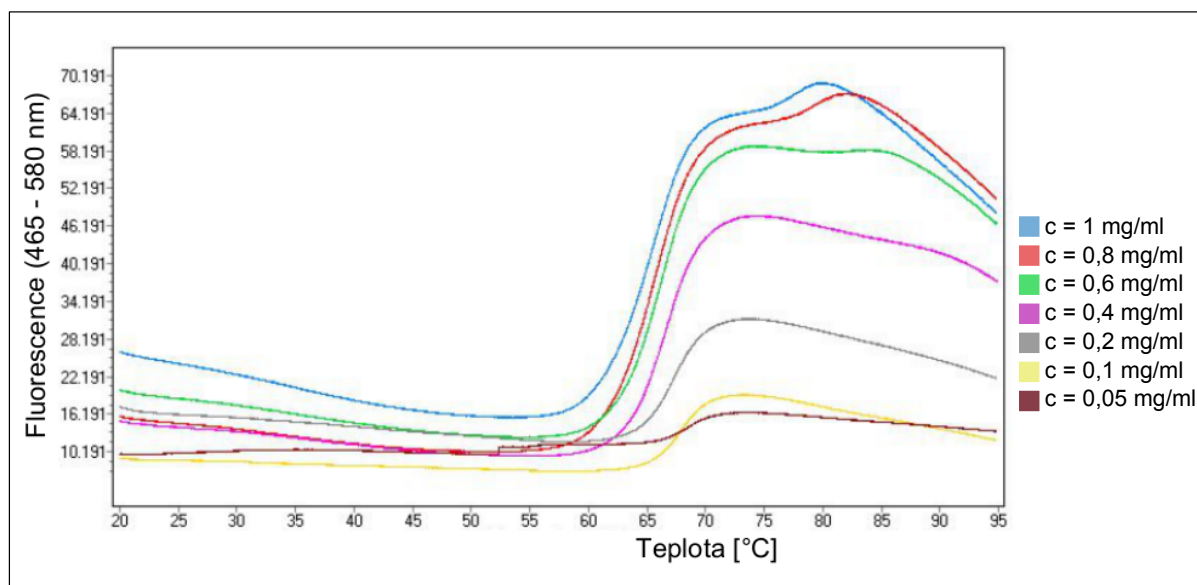
## 5.4 Strukturní studium rClrb

### 5.4.1 Diferenční skenovací fluorimetrie rClrb

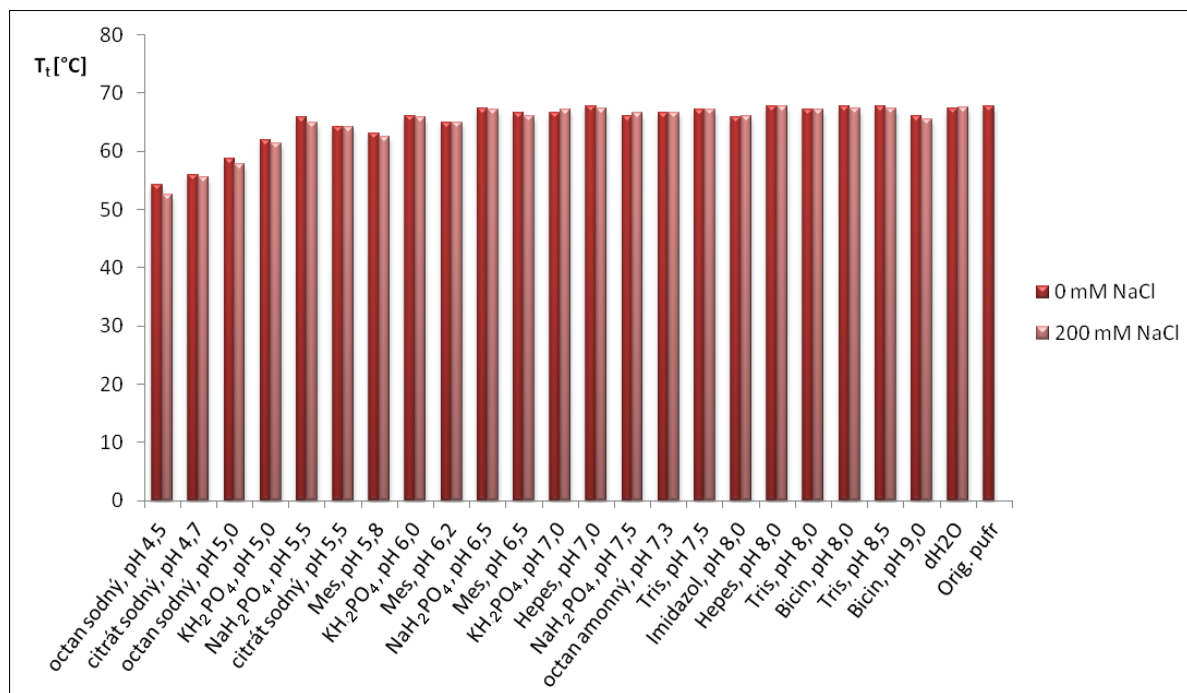
Po charakterizaci komplexu rNKR-P1B SD s jeho ligandem rClrb jsme se zaměřili na charakterizaci pouze ligandu rClrb, jelikož je v naší laboratoři struktura rNKR-P1B SD již známa. Metodou diferenční skenovací fluorimetrie jsme se zabývali, abychom zjistili, v jakých pod-

mínkách je náš protein rClrb stabilní pro následnou krystalizaci. Tento pokus byl proveden na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. za pomoci Mgr. Jany Písačkové. Nejprve jsme proměřili řadu koncentrací od 0,05 až po 1 mg/ml, aby naše spotřeba proteinu nebyla vysoká, ale aby byla dostatečně vidět odezva fluorescence. Tímto předběžným pokusem jsme určili koncentraci 0,1 mg/ml rClrb jako dostatečnou, a tu jsme dále používali (viz. Obr. 5.12).

Následně jsme provedli hlavní pokus, kde jsme sledovali, jak protein rClrb bude reagovat na pufrы s rozlišným pH a na přítomnost NaCl. Výsledkem tohoto pokusu bylo, že rClrb je velice stabilní protein a jeho stabilita není z větší části ovlivněna pufrem či přítomností soli, v kterém se nachází (viz. Obr. 5.13, str. 49). Získané teploty tání byly vysoké, pohybovaly se v rozmezí 52,46 °C u acetátového pufru o pH = 4,5 s NaCl až po 67,73 °C u HEPES pufru o pH = 7,0 bez NaCl a o pH = 8,0 s i bez NaCl a Bicinu o pH = 8,0 bez NaCl. Je tedy patrné, že je vhodnější použít pufr s neutrálním či mírně bazickým pH.



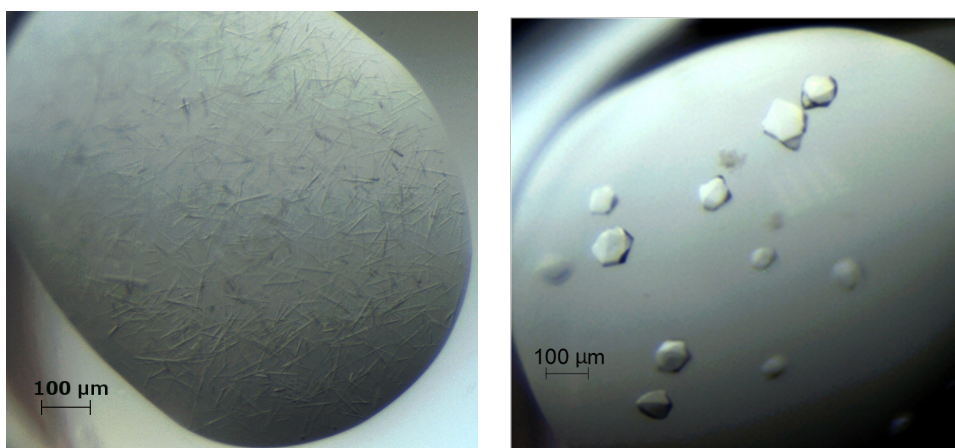
Obrázek 5.12: **Křivka tání rClrb.** Závislost intenzity fluorescence na teplotě tání ukazuje koncentrační řadu proteinu rClrb od koncentrace 0,05 mg/ml (hnědá) do 1 mg/ml (modrá). Tímto byla optimalizována spotřeba proteinu, byla určena nejnižší koncentrace, která ještě vykazovala typickou sigmoidální křivku tepelné denaturace.



Obrázek 5.13: **Vyhodnocení diferenční skenovací fluorimetrie.** Byla pozorována stabilita proteinu rClrb v prostředí pufrů o různém pH a vliv přítomnosti 200 mM NaCl. Zpracováno Mgr. Janou Písačkovou.

#### 5.4.2 Proteinová krystalizace

Krystalizace proteinu rClrb byla prováděna na Biotechnologickém ústavu AV ČR, v.v.i. za pomoci Mgr. Jakuba Ptáčka na robotu typu Crystal Gryphon metodou sedící kapky. Na 96 jamkovou krystalizační destičku bylo robotem pipetováno 50  $\mu$ l rezervoáru z komerční sady pro krystalizaci JCSG Core I - IV. Poté byla vytvořena sedící kapka z 0,15  $\mu$ l rezervoáru a 0,15  $\mu$ l proteinu o koncentraci 8 mg/ml. Krystalizační desky poté byly zalepeny a uchovány v místnosti při 20 °C. Jednotlivý posun experimentů byl sledován 1  $\times$  za 14 dní pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem. Po měsíci sledování byly v kapce s podmínkou 0,1M imidazol o pH = 8,0; 40% (v/v) PEG 400 nalezeny jehličkovité krystaly (viz. Obr. 5.14a, str. 50) a v kapce s 0,2M KSCN, 20% (w/v) PEG 3350 byly nalezeny šestiúhelníkové krystaly (viz. Obr. 5.14b, str. 50).



(a) Podmínka: 0,1M imidazol o pH = 8,0, 40% (v/v) PEG 400. (b) Podmínka: 0,2M KSCN, 20% (w/v) PEG 3350

Obrázek 5.14: Krystaly deglykosylovaného rClrb z produkce v HEK293S GnTI<sup>-</sup> linii

### 5.4.3 Měření difrakce krystalů

Dalším krokem bylo zmrazení krystalů z kapky s podmínkou 0,1M imidazol o pH = 8,0; 40% (v/v) PEG 400, a to v kryoprotektantech jako 20% (v/v) ethylenglykol, 20% (v/v) glycerol, 20% (v/v) PEG 400 pod dohledem Ing. Jana Dohnálka, Ph.D. Kryoprotektanty se používají při zchlazení na nízkou teplotu k zabránění porušení struktury krystalu tvorbou ledových krystalů. Byla použita 120 µm nylonová smyčka, kterou byl krystal oddělen ode dna destičky, vložen do kryoprotektantu a poté do vialky s tekutým dusíkem, kde byl uchován na přepravu.

Na difraktometru Laboratoře strukturní biologie, BTÚ AV ČR, v.v.i. nebyly spatřeny jiné difrakce než ledu, a to ani po 30min expozici. Bylo však pozitivní, že při testování nebyly spatřeny ani difrakce soli, krystalu se dal odlomit roh a po uvolnění ze dna destičky plaval. Výsledkem je, že byl získán skutečně proteinový krystal, který však nedifraktuje a krystalizační podmínky či podmínky chlazení krystalu bude třeba dále optimalizovat. Struktura rClrb tak zatím nebyla vyřešena.

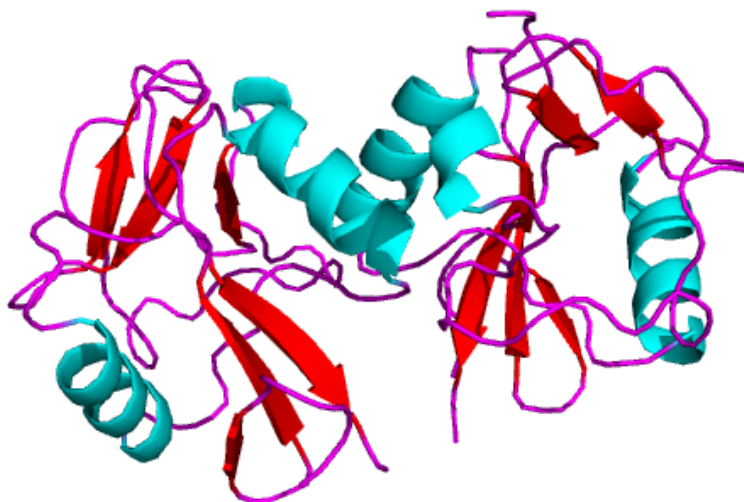
## 6 | Diskuze

V Laboratoři architektury proteinů se již dlouho zabýváme zjišťováním struktur receptorů NK buněk. Receptory rNKR-P1B jsou známy již od 90. let 20. století a stále nejsou publikovány jejich struktury či struktura jejich komplexu [43]. Má práce se nejprve soustředila na produkci, co největšího množství fúzních proteinů (několik mg) proteinů rNKR-P1B SD a jeho fyziologického ligandu rClrb pomocí expresních vektorů pYD5. K tomu byla použita transfekce v expresním systému HEK293S GnTI<sup>-</sup> linie, postup byl několikrát optimalizován (což nebylo součástí mé práce) oproti postupu Y. Durochera (Montreal, Kanada), který zavedl postup, z něhož naše laboratoř vycházela, s linií HEK293E. Optimalizace nastala vždy po rozmražení a rozpěstování nových buněk.

Následovala purifikace fúzních konstruktů. Nejprve navázání na protein-A-agarosu na koloně Hitrap MabSelect Sure, kdy bylo nutné při eluci (pH = 3,0) dostatečně neutralizovat prošlý protein a nezasáhnout či bezpečně přejít jeho izoelektrický bod (pI) do neutrálního pH. Neutralizace probíhala Tris pufrem o pH = 8,8; pI rClrb je 8,6 a pI NKR-P1B SD je 5,4. Poté byl vzorek zakoncentrován a nastříknut na kolonu pro gelovou permeační chromatografii. Výška elučního vrcholu při první gelové permeační chromatografii se pro všechny konstrukty pohybovala přes absorbanci 1 při 280 nm. Na chromatogramu fúzního konstruktů rClrb byl v mrtvém objemu kolony pozorován také výrazný eluční vrchol agregátů, u konstruktů S1 byl patrný pouze vrchol fúzního proteinu. Po štěpení TEV proteasou byl výtěžek zhruba poloviční, což přibližně odpovídá hmotnostnímu poměru receptoru a Fc fragmentu ve fúzním proteinu. Dimerní rClrb se nepodařilo napoprvé přechistit vsádkově protein-A-agarosu nejspíše díky použití malého množství nosiče. Podařilo se také získat dimerní rNKR-P1B SD, bohužel však z větší části vznikala forma monomerní. Tyto produkce byly několikrát zopakovány.

Získané přečištěné proteiny byly poté použity k charakterizaci tvorby jejich komplexu. Nejprve jsme charakterizovali vznik komplexu pomocí anizotropie fluorescence v Brně na Masarykově univerzitě. Naše proteiny (monomer a dimer NKR-P1B SD) byly naznačeny fluoroforem z 10 %, což bylo dostačující pro viditelnost anizotropie. Jelikož proteiny NKR-P1B SD a Clrb byly podobné velikosti a předpokládali jsme nízkou vazebnou afinitu, byl roztok značeného rNKR-P1B ředěn na co nejnižší koncentraci tak, aby bylo dosaženo, co nejvyššího poměru receptor:ligand při následné titraci ligandem, při současném zachování dostatečné odezvy anizotropie fluorescence, až na 7,5 nM koncentraci. Nejprve jsme zkoušeli přidávat rClrb k monomeru NKR-P1B SD a po zjištění, že je anizotropií detekována vazba, jsme přešli k měření vazby dimer NKR-P1B - rClrb. Protein rClrb byl postupně přidáván až po dosažení 80  $\mu$ M koncentrace. Vazba byla pozorována, avšak nebylo dosaženo saturace, proto nelze s jistotou říci, zda se jednalo o vazbu specifickou či nespecifickou. Tento pokus by bylo možné zopakovat s využitím těchto poznatků a více naznačit protein rNKR-P1B SD fluoroforem, pro jeho detekci při ještě nižších koncentracích či naprodukovat minimálně 6 – 8 mg rClrb, a dosáhnout vyšších koncentrací během titrace.

Dalším krokem bylo studování komplexu pomocí rezonance povrchového plasmonu. Tato metoda a celkový postup se prováděl v naší laboratoři poprvé. Bylo třeba metodu optimalizovat. Nakládání čipů do thiolů a aktivace pomocí EDC/NHS byly prováděny dle návodu výrobce s optimalizovanou dobou působení. Další fází postupu bylo navázání proteinu. Nejprve bylo zkoušeno navázání Fc fragmentu (odštěpeného z fúzního proteinu rClrb) pomocí proteinu A, protože fúzní protein se na proteinu A ukotvuje pomocí svého Fc fragmentu. Do budoucna je však důležité se ujistit, jakým způsobem je přesně fúzní protein ukotven a optimalizovat následný postup. Protein A byl nejdříve nanášen v koncentraci 10  $\mu$ g/ml a postupně bylo množství sníženo až na 1  $\mu$ g/ml. Protein A se nanášel v SA pufru o pH = 3,4, které napomáhalo lepší immobilizaci. Byly vyzkoušeny i jiné pufrы jako 50mM pyridin o pH = 6,0 či 10mM SA o pH = 5,0, avšak ani v jednom nebyla immobilizace úplná. I u fúzního proteinu bylo třeba snížit jeho množství na 1  $\mu$ g/ml, aby byla pozorovatelná vazba s rClrb. Nanášením několika koncentrací Fc fragmentu bylo vyzkoušeno, zda je množství dostatečné. Dalším problémem bylo nalézt správný referenční povrch, resp. protein. Jako reference byl použit odštěpený Fc fragment či pouze protein A. Clrb se bohužel na obě varianty vázalo. Poté byl



Obrázek 6.1: **Krystalová struktura rNKR-P1B SD.** Struktura kovalentního dimeru rNKR-P1B. Červeně jsou znázorněny  $\beta$ -listy, modře  $\alpha$  helixy [44].

vyzkoušen fúzní konstrukt myšního NKR-P1C od Bc. Heleny Pucholtové, který by s potkáním ligandem pro NKR-P1B neměl reagovat a zároveň je svou povahou velmi blízký (zčásti identický) s fúzním NKR-P1B. Tato varianta byla poté používána jako reference, která se odečítá od vazby NKR-P1B s Clrb. Dále bylo vyzkoušeno navázání dimeru rNKR-P1B SD přímo na EDC/NHS aktivovaný povrch čipu. Imobilizace v nízkém pH nastala, ale protein nejspíše zdenaturoval a rClrb se na něj nenavázalo. Proto byl tento pokus zopakován a dimer se nanášel v neutrálním pH PBS pufru bez NaCl. Zde byl výtěžek imobilizace také velmi nízký a nejspíše proto ani nebyla následně vazba rClrb pozorována. Přímá imobilizace také může vést k zakrytí vazebného místa NKR-P1B, proto bylo od tohoto postupu upuštěno. Výsledkem tedy bylo potvrzení specifity vazby NKR-P1B SD a jeho ligandu rClrb, pokus by však bylo potřeba zopakovat, kvůli naměření více vazebných pokusů pro kvantitativní analýzu a určení  $K_D$  vazby.

Jelikož je v naší laboratoři již známa struktura rNKR-P1B SD (viz. Obr. 6.1), mé krystalografické snahy se zaměřily na jeho ligand rClrb. Nejprve byly zoptimalizovány krystalizační podmínky pomocí diferenční skenovací fluorimetrie. Bylo zjištěno, že protein rClrb je velice stabilní a že z tohoto hlediska není důležité, v jakém pufru bude proteinová krystalizace prováděna, pokud bude mít pH neutrální či mírně bazické. Na tomto základě byly vytvořeny



sedící kapky rClrb robotem na Biotechnologickém ústavu AV ČR, v.v.i.. V krystalizační podmínce 0,2 M KSCN, 20% (w/v) PEG 3350 se po měsíci vytvořily nadějně vyhlížející šestiúhelníkové krystaly. Krystaly byly velikosti 120  $\mu\text{m}$ , ale bohužel nestáčely polarizované světlo a nedifraktovaly, přesto se však domníváme, že krystal byl opravdu proteinem, protože při testování nebyly spatřeny solné difrakce, krystalu bylo možné odlomit roh a po uvolnění ze dna destičky plaval.

Do budoucna bude snaha získat větší a lépe uspořádané krystaly, které by difraktovaly rentgenové záření a byly vhodné k vyřešení prostorové struktury rClrb receptoru či komplexu rClrb - rNKR-P1B.

## 7 | Závěr

- Byly připraveny fúzní konstrukty potkaních NK receptorů rClrb a rNKRP1B SD ve vektoru pYD5 v expresním systému HEK293S GnTI<sup>-</sup> linie a byla provedena jejich purifikace s výsledkem zisku dimerní formy.
- Pomocí anizotropie fluorescence byla potvrzena vazba rClrb a rNKR-P1B SD.
- Rezonance povrchového plazmonu potvrdila specifitu vazby rClrb a rNKR-P1B SD.
- Byly získány krystaly rClrb o velikosti 120 μm.

# Literatura

- [1] Wang, D. et al. Natural Killer cells in Innate Defense against Infective Pathogens. *Journal of Clinical and Cellular Immunology*. 2013, 13, s. 1–10.
- [2] Hořejší, V. – Bartůňková, J. *Základy imunologie*. Triton, 2009.
- [3] Kiessling, R. et al. Natural killer cells in the mouse. *European Journal of Immunology*. 1975, 5, s. 112–117.
- [4] Herberman, R. et al. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International Journal of Cancer*. 1975, 16(2), s. 230–9.
- [5] Timonen, T. – Saksela, E. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *Journal of Immunological Methods*. 1980, 3-4, s. 285–291.
- [6] Conigliaro, P. et al. Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmunity Reviews*. 2011, 10, s. 577–581.
- [7] Voigt, S. et al. Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clrb missing-self axis. *Immunity*. 2007, 26, s. 617–627.
- [8] Raulet, D. H. – Vance, R. E. Self-tolerance of natural killer cells. *Immunology*. 2006, 6, s. 520–531.
- [9] Schleinitz, N. et al. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 2010, 131, s. 451–458.

- [10] Yokoyama, W. M. Natural killer cell receptors. *Current Opinion in Immunology*. 1998, 10, s. 298–305.
- [11] Chiang, H. I. et al. Chicken CD69 and CD94/NKG2-like genes in a chromosomal region syntenic to mammalian natural killer gene complex. *Immunogenetics*. 2007, 59 (7), s. 603–11.
- [12] Braud, V. M. et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998, 391, s. 795–799.
- [13] Timonen, T. – Helander, T. S. Natural killer cell-target cell interactions. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997, 9 (5), s. 667–673.
- [14] Carlyle, J. R. et al. Missing self - recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Immunology*. 2004, 101 (10), s. 3527–3532.
- [15] Kveberg, L. et al. Two major groups of rat NKR-P1 receptors can be distinguished based on chromosomal localization, phylogenetic analysis and Clr ligand binding. *European Journal of Immunology*. 2009, 39 (2), s. 541–551.
- [16] Aust, J. G. et al. The Expression and Function of the NKRP1 Receptor Family in C57BL/6 Mice. *The Journal of Immunology*. 2009, 183, s. 106–116.
- [17] Pantoliano, M. – Rhind, A. – Salemme, F. Microplate thermal shift assay for ligand development and multi-variable protein chemistry optimization, 1.únor 2000. Dostupné z: <<http://www.google.com/patents/US6020141>>. US Patent 6,020,141.
- [18] Ericsson, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry*. 2006, 357, s. 289–298.
- [19] Boivin, S. – Kozak, S. – Meijers, R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expression and Purification*. 2013, 91, s. 192–206.
- [20] Lo, M. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical Biochemistry*. 2004, 332, s. 153–159.

- [21] Demchenko, A. P. *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology III: Applications in Sensing and Imaging (eKniha Google)*. Springer, 2011.
- [22] Senisterra, G. A. – Jr. Finerty, P. High throughput methods of assessing protein stability and aggregation. *Molecular BioSystems*. 2009, 5 (3), s. 217–223.
- [23] Shi, S. et al. DSF Method Optimization and Its Application in Predicting Protein Thermal Aggregation Kinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, 102, s. 2471–2483.
- [24] Greenfield, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature Protocols*. 2006, 1, s. 2527–2535.
- [25] Fišar, Z. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách, 2014. Dostupné z: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfišar/fluorescence/Default.htm>>. [cit. 29.1.2014].
- [26] Queisser, H. J. Luminescence, review and survey. *Journal of Luminescence*. 1981, 24-25, s. 3–10.
- [27] Tissue, B. et al. The Chemistry Hypermedia Project, 2014. Dostupné z: <<http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/index.html>>. [cit. 29.1.2014].
- [28] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy (eKniha Google)*. Springer, 2007.
- [29] Scientific HORIBA. HORIBA Scientific FluoroMax 4. Dostupné z: <<http://www.horiba.com/>>. [cit. 30.1. 2014].
- [30] Gradinaru, C. C. et al. Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells. *Analyst*. 2010, 135, s. 452–459.
- [31] Wilson, W. D. Analyzing Biomolecular Interactions. *American Association for the Advancement of Science*. 2002, 295, s. 2103–2105.
- [32] Šigutová, R. et al. Využití metody Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) v praxi. *Informační bulletin FONS (Stapro s. r. o.)*. 2013, 2, s. 7–9.

- [33] Marquart, A. SPR overview - Introduction, 2013. Dostupné z: <<http://www.sprpages.nl/spr-overview.html>>. [cit. 13.12. 2013].
- [34] Homola, J. – Yee, S. S. – Myszka, D. *Optical Biosensors: Present and Future, Chapter 7: Surface Plasmon Resonance Biosensors*. Elsevier, 2002.
- [35] ALV Technologies. Surface Plasmon Resonance Applications, 2013. Dostupné z: <[http://alvtechnologies.com.ph/index.php?option=com\\_content&view=article&id=298:spr-applications&catid=11:news&Itemid=6](http://alvtechnologies.com.ph/index.php?option=com_content&view=article&id=298:spr-applications&catid=11:news&Itemid=6)>. [cit. 16.12. 2013].
- [36] GE Healthcare Life Sciences. Recombinant protein stability and solubility enables interaction measurements, 2013. Dostupné z: <<https://promo.gelifesciences.com/na/k11286/misc/29015822AA.pdf>>. [cit.16.12. 2013].
- [37] Protokoly k soupravě Plasmid DNA Purification (Macherey Nagel; Německo). Dostupné z: <<http://www.mn-net.com/tabid/1371/default.aspx>>. [cit.9.5.2014].
- [38] Bazzi, C. et al. SDS PAGE patterns and polymeric albumin in proteinuria of lupus glomerulonephritis. *Clinical Nephrology*. 1995, 43 (2), s. 96–103.
- [39] Phan, J. et al. Structural Basis for the Substrate Specificity of Tobacco Etch Virus Protease. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277, s. 50564–50572.
- [40] DyLight Amine-Reactive Dyes, instruction manual. Dostupné z: <<http://www.piercenet.com/instructions/2162032.pdf>>. [cit. 29.4.2014].
- [41] Olofsson, L. et al. Sensor for detection of single molecules, 24. 8. 2006. Dostupné z: <<http://www.google.com/patents/WO2006088425A1?cl=en>>. WO Patent App. PCT/SE2006/000,227.
- [42] Graille, M. et al. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, 97 (10), s. 5399–5404.

- [43] Dissen, E. et al. An autosomal dominant locus, Nka, mapping to the Ly-49 region of a rat natural killer (NK) gene complex, controls NK cell lysis of allogeneic lymphocytes. 1996, 183, s. 2197–2207.
- [44] Skálová, T. – Vaněk, O. Osobní sdělení, dosud nepublikováno (2012).

