

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Bc. Štěpán Herynek

STRUKTURNÍ BIOLOGIE RECEPTORU NKp44
A JEHO LIGANDU PCNA
STRUCTURAL BIOLOGY OF RECEPTOR NKp44
AND ITS LIGAND PCNA

Diplomová práce

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

Praha, 2019

Prohlášení

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

V Praze dne

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval školiteli své diplomové práce, RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D., za konzultace spojené s touto prací a také za provedení a vyhodnocení experimentů za použití analytické ultracentrifugy. Poděkování za pomoc během laboratorní činnosti a odpovědi na otázky, na které bych se styděl zeptat školitele, patří studentům a kolegům z laboratoře 204, jmenovitě Mgr. Janu Bláhovi, Ph.D, Mgr. Ondřeji Skořepovi a Mgr. Barboře Kalouskové, které v neposlední řadě patří velký dík za svědomité zásobování laboratoře dostatkem kávy. Celému kolektivu laboratoře 204 bych na závěr rád poděkoval za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Součástí imunitního systému nejen člověka jsou tzv. NK buňky (z anglického natural killer cells). Úkolem těchto buněk, které jsou složkou nespecifické imunity, je vyvolat apoptózu u buněk těla vlastních, které jsou hrozbou pro organismus (například buňky napadené viry či rakovinné buňky).

K rozpoznání cílových buněk slouží NK buňkám povrchové receptory. Receptorů je dnes známa celá řada a jejich dělení vyplývá například z podobnosti jejich struktur, nebo povahy signálu, který zprostředkovávají NK buňkám. Podle toho rozlišujeme receptory aktivační a inhibiční. Inhibiční receptory potlačují NK buněčnou odpověď, zatímco receptory aktivační tuto odpověď vyvolávají. Během kontaktu NK buňky s jinou buňkou je výsledné chování NK buňky vždy výsledkem určité rovnováhy odpovědí receptorů aktivačních i inhibičních.

Receptor NKp44 je imunoglobulinový receptor. Tento receptor je mezi ostatními receptory velmi ojedinělý z mnoha hledisek, například i proto, že je spojen jak s aktivačním, tak inhibičním motivem. Ligandem tohoto receptoru je jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA). PCNA je svorkový protein důležitý mimo jiné během replikace DNA, při které ukotvuje ostatní proteiny replizómu.

Tato práce je zaměřena na rekombinantní přípravu receptoru NKp44 (protein PCNA byl již připraven dříve) a studium vzájemné interakce obou vazebných partnerů. Protein NKp44 byl připraven rekombinantně v expresním systému HEK293S GnTI. Protein byl připraven v různých variantách fúzních konstruktů (některé nesly mutaci a lišily se orientací Fc fragmentu IgG).

Z připravených konstruktů byl poté vybrán nejvhodnější kandidát, který byl použit pro analýzu vazby mezi oběma vazebnými partnery. K tomu byly využity biofyzikální metody analytická ultracentrifugace a mikrotermoforéza. Pomocí mikrotermoforézy byla pozorována určitá interakce mezi proteiny, ač přesnost určení disociační konstanty komplexu NKp44:PCNA byla v tomto případě velmi malá. Analytická ultracentrifugace na druhou stranu neprokázala interakci žádnou.

Klíčová slova

NK buňka, NKp44, PCNA, HEK293, MST

Abstract

Natural killer cells (NK cells) are part of the immune system in human and other mammals. The task of these cells, which belong to the non-specific immunity, is to induce apoptosis in other cells of the body that may represent a threat for the body (i.e., tumour or virally infected cells).

NK cells have a variety of surface receptors to recognize their target cells. A number of receptors are well-known today and they may be divided into groups based, e.g., on their structural similarities or on the type of signal which these receptors present to NK cells. Accordingly, we distinguish activation and inhibitory receptors. Inhibitory receptors inhibit NK cell response, while activation receptors elicit this response. During NK cell contact with another cell, the resulting NK cell behaviour is always the result of a certain balance of activation and inhibitory receptor responses.

The NKp44 receptor is an immunoglobulin-like receptor. This receptor is very unique among other receptors in many respects, for example because it is associated with both activation and inhibitory motif. The ligand of this receptor is a proliferating cell nuclear antigen (PCNA). PCNA is a clamp protein important, inter alia, during DNA replication, in which it anchors other replisome proteins.

This work is focused on recombinant preparation of NKp44 receptor (PCNA protein was already prepared earlier) and a study of interaction between both of these binding partners. NKp44 was prepared recombinantly in the HEK293S GnTI⁻ expression system. The protein was prepared in several variants of the fusion constructs (some carrying mutation and differing in the orientation of the IgG Fc fragment).

The most suitable candidate was then selected from the prepared constructs and used to analyze the binding between the two proteins. Biophysical methods of analytical ultracentrifugation and microscale thermophoresis were used for this purpose. Some interaction between proteins was observed by microscale thermophoresis, although the accuracy of the determination of the dissociation constant of the NKp44:PCNA complex was really very poor. On the other hand, analytical ultracentrifugation did not show any interaction.

Key words

NK cell, NKp44, PCNA, HEK293, MST

Seznam zkratek

AA	akrylamid (z anglického acrylamide)
APS	peroxosíran amonný (z anglického ammonium persulfate)
AUC	analytická ultracentrifuga (z anglického analytical ultracentrifuge)
BSA	hovězí sérový albumin (z anglického bovine serum albumin)
cPCR	PCR z buněčných kolonií (z anglického colony polymerase chain reaction)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DOL	úspěšnost značení (z anglického degree of labelling)
IFN- γ	interferon γ
HLA	lidský leukocytární antigen (z anglického human leukocyte antigen)
IPTG	izopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (z anglického isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
ITAM	imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrozinu (z anglického imunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITIM	imunoreceptorový inhibiční motiv na bázi tyrozinu (z anglického imunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)
ILC	vrozené lymfoidní buňky (z anglického innate lymphoid cells)
IR	infračervený (z anglického infrared)
IPEI	lineární polyethylenimin (z anglického linear polyethylenimine)
MBP	maltózu vázající protein (z anglického maltose – binding protein)
MHC gp	glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu (z anglického major histocompatibility complex)
MLL5	leukemický protein smíšené linie (z anglického mixed lineage leukemia 5 protein)
MST	mikrotermoforéza (z anglického microscale thermophoresis)
NCR	receptory přirozené cytotoxicity (z anglického natural cytotoxicity receptors)
NK	přirozený zabiják (z anglického natural killer)
NKp30	receptor NK buněk o velikosti 30 kDa (z anglického natural killer cell protein 30 kDa)
NKp44	receptor NK buněk o velikosti 44 kDa (z anglického natural killer cell protein 44 kDa; produkovaný konstrukt: Q22–A188)

NKp44L	izoforma proteinu MLL5, ligand receptoru NKp44 (z anglického NKp44 ligand)
NKp44M	mutovaná verze produkovaného NKp44 (konstrukt Q22–A188 s mutací C155S)
NKp46	receptor NK buněk o velikosti 46 kDa (z anglického natural killer cell protein 46 kDa)
OE-PCR	metoda PCR pro prodlužování přesahujících konců (z anglického overlap extension polymerase chain reaction)
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk (z anglického proliferating cell nuclear antigen)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z anglického polymerase chain reaction)
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid (z anglického phenylmethanesulfonyl fluoride)
RFC	replikační faktor C (z anglického replication factor C, často také označovaného jako clamp loader)
SDS	dodecylsulfát sodný (z anglického sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z anglického sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIC	na teplotě závislá změna intenzity fluorescence (z anglického temperature related intensity change)
(w/w)	hmotnostní zlomek (z anglického weight/weight)
(w/v)	hmotnostně-objemový zlomek (z anglického weight/volume)
(v/v)	objemový zlomek (z anglického volume/volume)

Obsah

1	Úvod.....	11
1.1	Imunitní systém.....	11
1.2	NK buňky.....	11
1.2.1	Původ NK buněk.....	11
1.2.2	Úloha NK buněk.....	12
1.2.3	Rozpoznání cíle NK buňkami.....	13
1.2.4	Receptory NK buněk.....	13
1.2.4.1	Receptory přirozené cytotoxicity.....	14
1.2.4.1.1	Receptor NKp44.....	16
1.2.4.1.1.1	Struktura NKp44.....	16
1.2.5	PCNA, inhibiční ligand pro NKp44.....	18
1.2.5.1	Struktura PCNA.....	19
1.2.6	Interakce PCNA s jinými proteiny.....	20
1.2.6.1	Interakce NKp44 s PCNA.....	21
1.3	Teoretický úvod k vybraným metodám.....	22
1.3.1	OE-PCR.....	22
1.3.2	Mikrotermoforéza.....	23
2	Cíle práce.....	26
3	Materiál.....	27
3.1	Použité přístroje a vybavení.....	27
3.2	Použité chemikálie.....	28
3.2.1	Použité enzymy.....	29
3.2.2	Pufry a roztoky.....	29
3.2.3	DNA klony, plazmidy a primery pro PCR a DNA sekvenaci.....	31
3.2.3.1	DNA klony.....	31
3.2.3.2	Plazmidy.....	31

3.2.3.3	Primery pro PCR	31
3.2.3.3.1	Primery pro klonování do plazmidu pHLsecFcHis.....	31
3.2.3.3.2	Primery pro klonování do plazmidu pYD5	31
3.2.3.3.3	Sekvenační a ostatní primery	31
3.2.4	Buněčné kmeny a linie.....	32
3.2.5	Soupravy	32
4	Metody	33
4.1	Amplifikace DNA pomocí PCR	33
4.2	Agarózová elektroforéza	34
4.3	Separace DNA vzorků z agarózového gelu	35
4.4	Měření koncentrace a čistoty DNA	35
4.5	Vnášení mutací do DNA pomocí OE-PCR.....	36
4.6	Linearizace plazmidů	36
4.7	Vnesení vektoru do linearizovaného plazmidu.....	37
4.7.1	Vložení genu pomocí reakce Infusion	37
4.8	Transformace kompetentních buněk.....	37
4.9	Zrychlená transformace kompetentních buněk.....	38
4.10	Vypichování buněčných kolonií	38
4.11	PCR z buněčných kolonií	38
4.12	Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA	39
4.13	Sekvenování plazmidové DNA	40
4.14	Velkoobjemová příprava plazmidové DNA	40
4.15	Produkce proteinů v bakteriálním expresním systému.....	41
4.16	Práce s buněčnou linií HEK293S GnTI	42
4.16.1	Určování buněčné hustoty	42
4.16.2	Kultivace linie HEK293S GnTI	42
4.16.3	Tranzientní transfekce linie HEK293S GnTI	43

4.17	Purifikace proteinů.....	43
4.17.1	Sklizení buněčné kultury	43
4.17.2	Afinitní chromatografie	44
4.17.2.1	Chelatační afinitní chromatografie na koloně Talon.....	44
4.17.2.2	Afinitní chromatografie na koloně MabSelect SuRe.....	45
4.17.3	Koncentrování proteinů pro gelovou permeační chromatografii.....	45
4.17.4	Gelová permeační chromatografie.....	45
4.17.5	Výměna pufru/odsolování.....	45
4.18	Měření koncentrace proteinů	46
4.19	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	46
4.20	Ověření sbalení proteinů.....	48
4.21	Fluorescenční značení proteinů pro MST.....	48
4.22	Mikrotermoforméza	49
4.23	Sedimentační analýza	50
5	Výsledky	51
5.1	Příprava proteinu NKp44 prostřednictvím plazmidu pHLsecFcHis.....	51
5.2	Příprava 3C proteázy	59
5.3	Štěpení proteinů pomocí 3C proteázy.....	61
5.4	Příprava NKp44 prostřednictvím plazmidu pYD5	62
5.5	Charakterizace interakce proteinů NKp44 a PCNA	66
5.5.1	Charakterizace interakce NKp44 a PCNA pomocí MST	67
5.5.2	Charakterizace interakce NKp44:PCNA pomocí AUC.....	70
6	Diskuze	72
7	Závěr	79
8	Citovaná literatura.....	80

1 Úvod

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je jedním ze základních homeostatických mechanismů organismu. Jeho úkolem je rozpoznání potenciální hrozby a její případná eliminace. Imunitní systém musí být schopen zajistit obranyschopnost jedince, tedy rozpoznat vnější škodliviny, patogeny a jejich produkty, a před jejich působením organizmus bránit. Na druhou stranu musí být schopen autotolerance, aby nepoškozoval vlastní tkáň. Zároveň také zprostředkovává imunitní dohled, tedy rozpoznává i vnitřní škodliviny, jako třeba mutované buňky, které průběžně odstraňuje. Nedílnou složkou imunitního systému jsou NK buňky (z anglického natural killer cells) [1].

1.2 NK buňky

1.2.1 Původ NK buněk

NK buňky byly nejspíše poprvé pozorovány dvojicí Cudkovicz a Stimpfling v roce 1964. Zpočátku byly NK buňky popisovány jako lymfocyty se spontánní reaktivitou vůči určitým nádorovým buňkám. Později, v sedmdesátých letech, byly popsány a odlišeny od T a B lymfocytů. Samotný název „NK buňky“ (resp. natural killer cells) pochází také ze sedmdesátých let (konkrétně z roku 1975) a byl zaveden výzkumným týmem Evy Kleinové [2, 3].

NK buňky vznikají diferenciací z buněk kostní dřeně a morfologicky jsou řazeny mezi velké granulární lymfocyty [4]. Místo maturace NK buněk bylo donedávna předmětem diskuze. Uvažovalo se o kostní dřeni či sekundárních lymfatických orgánech, které se dnes zdají být pravděpodobnějším místem dozrání NK buněk [5, 6].

Na rozdíl od T a B lymfocytů u NK buněk nenajdeme antigenně specifické receptory. Tím pádem byly zařazeny do neadaptivní složky imunitního systému. Nedávno bylo na základě nových studií navrženo řazení NK buněk do rodiny vrozených lymfoidních buněk (ILC – z anglického innate lymphoid cells). ILC přispívají ke tkáňové homeostáze, organizaci lymfoidních tkání a obraně proti infekcím [7]. Jiné studie zmiňují například schopnost NK buněk využívat imunologickou paměť či vysokou specifitu NK receptorů vůči jejich ligandům. Díky tomu, se dnes hovoří spíše o tom, že NK buňky vytvářejí „evoluční most“ mezi imunitou neadaptivní a adaptivní [1, 8].

NK buňky se vyskytují primárně v periferní krvi a dále je nalezneme například v kostní dřeni, slezině, lymfatických uzlinách, ale i v orgánech jako jsou ledviny, plíce, slinivka břišní nebo děloha. NK buňky navíc migrují do zánětlivých tkání a sekundárních lymfatických orgánů, kde tvoří první obranu proti virovým infekcím [7]. U člověka tvoří NK buňky až 15 % v těle cirkulujících lymfocytů [9].

1.2.2 Úloha NK buněk

Úkolem NK buněk je rozpoznání a následná likvidace cílových buněk, které jsou určitým způsobem poškozené. Jde například o buňky rakovinné či virově infikované. NK buňky se podílí i na obraně proti patogenům, jako jsou například bakterie. Unikátní schopností těchto buněk imunitního systému je poměrně specifické rozpoznání a lýze buněk cílových bez předchozího kontaktu [10, 11]. Funkce těchto buněk imunitního systému tkví zejména v jejich silné cytolytické aktivitě. Aktivované NK buňky navíc produkují cytokiny, které dále zprostředkovávají zánět, jedním z nich je třeba interferon γ (IFN- γ), stimulují hematopoézu (krvotvorbu) a indukují aktivaci a proliferaci granulocytů, čímž dále zesilují zánětlivou odpověď [7].

Samotná lýze cílových buněk probíhá za využití speciálních exocytických organel, sekrečních lyzozómů, nazývaných také lytická granula. Jsou to organely, které kombinují degradační funkci běžných lyzozómů s možností podstupovat řízenou exocytózu. V sekrečních lyzozómech jsou uloženy cytotoxické proteiny, jako granzymy či perforin.

Granzymy jsou proteázy a perforin je protein strukturně podobný komplementovému proteinu C9 a podobně jako on je schopen vytvářet póry v cytoplazmatické membráně. Tyto póry mohou proděravěním membrány zapříčinit až smrt buňky osmotickým šokem. Póry jsou však většinou příliš malé na to, aby byla cílová buňka usmrcena tímto způsobem. Slouží především pro vstup granzymů do buňky. Ty mají za úkol štěpit prekurzory proteáz zvaných kaspázy, čímž dochází k aktivaci těchto kaspáz. Ty v cytoplazmě štěpí další proteiny, čímž se spouští kaskáda reakcí vedoucích až k apoptotické smrti zasažené buňky. Při rozpoznání cílové buňky NK buňka aktivuje polarizovanou exocytózu sekrečních lyzozómů. Proces vpravení cytotoxických molekul do cílové buňky se nazývá degranulace.

Během degranulace nejprve migrují sekreční lyzozomy k místu na membráně, kde jsou buňky ve vzájemném kontaktu. Poté dojde k fúzi obou buněk a cytotoxické molekuly jsou vpraveny úzkou štěrbinou do cílové buňky. Lytická granula jsou sekretována

pravděpodobně jako celek, díky čemuž cytotoxické molekuly nenapadají NK buňky [1, 12].

1.2.3 Rozpoznání cíle NK buňkami

Cílové buňky musí být NK buňkami rozlišeny od buněk zdravých, aby nedocházelo k útokům na zdravé buňky. K tomuto účelu slouží NK buňkám povrchové receptory označované jako NK receptory [1].

1.2.4 Receptory NK buněk

Dnes je známo několik desítek těchto receptorů, mezi které patří receptory aktivační, inhibiční, adhezní a cytokinové [13].

Dělení na aktivační a inhibiční druhy receptorů vyplývá z toho, jaká informace je na základě kontaktu receptoru s jeho ligandem předána NK buňce. Ligandů pro aktivační receptory je celá řada. Jde o široké spektrum proteinů, z nichž některé nejsou ještě známy. Mezi známé ligandy aktivačních receptorů patří například některé povrchové proteiny exprimované buňkami infikovanými virem, či proteiny, jejichž zvýšená exprese je spojena s buněčným stresem nebo nádorovou transformací. Signály, které NK buňka obdrží z aktivačních receptorů, stimulují cytotoxickou odpověď NK buňky. Inhibiční receptory jsou specifické pro MHC gp třídy I (u člověka také nazývané HLA I), což jsou povrchové glykoproteiny, jejichž úkolem je vázat peptidové fragmenty proteinů produkovaných buňkou. Buňka tak inhibičním receptorům dává najevo, že není nijak poškozena. Signál, který NK buňka od inhibičního receptoru dostává, potlačuje cytotoxickou odpověď [1].

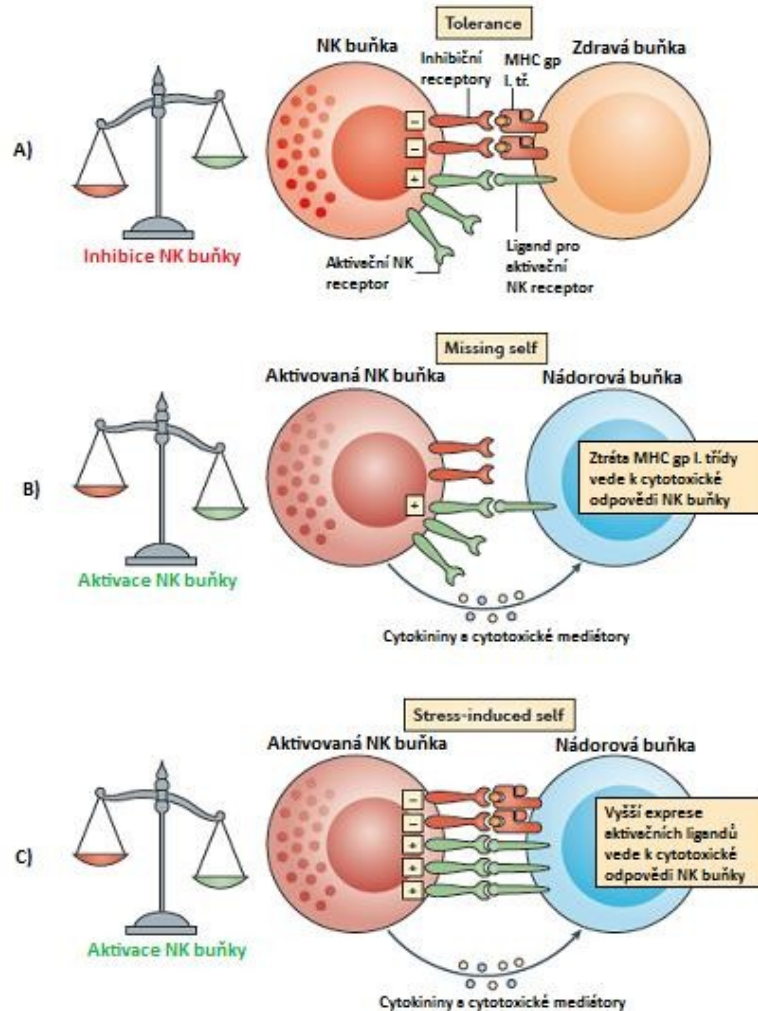
Dojde-li ke kontaktu NK buňky s jinou buňkou, mohou nastat tři různé situace (často se hovoří o tzv. hypotézách), pro které se vžily anglické názvy „tolerance“, „missing-self“ a „induced-self“.

Stav označovaný názvem „tolerance“ nastává, pokud má NK buňka více signálu od inhibičních receptorů než od receptorů aktivačních. V takovém případě je cílová buňka rozpoznána jako zdravá a nedochází k aktivaci NK buněčné odpovědi.

Stav „missing-self“ nastává ve chvíli, kdy cílová buňka na svém povrchu nemá MHC gp třídy I (nebo jich má nedostatek). V takovém případě nemá NK buňka dostatek signálu od inhibičních receptorů a dochází k aktivaci její cytotoxické odpovědi.

Stav „stress induced-self“ nastává v situaci, kdy cílová buňka sice má na svém povrchu MHC gp třídy I, ale zároveň je na jejím povrchu nadbytek ligandů pro aktivační receptory,

např. v důsledku buněčného stresu. V takovém případě dochází také k aktivaci NK buňky vlivem nadbytku aktivačního signálu. Výsledná odpověď NK buňky vždy závisí na rovnováze mezi signály od aktivačních a inhibičních receptorů [13]. Všechny tyto situace jsou znázorněny na Obrázku 1.

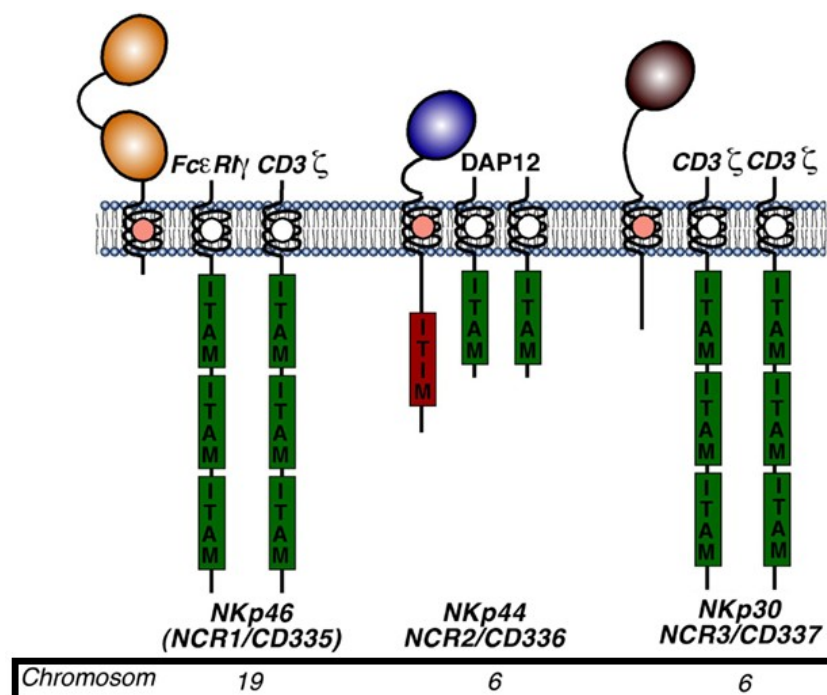


Obrázek 1: Hypotézy „tolerance“, „missing-self“ a „induced-self“ pro aktivaci NK buňky. A) Stav „tolerance“. B) Stav „missing-self“. C) Stav „induced-self“. Převzato a upraveno z [13].

1.2.4.1 Receptory přirozené cytotoxicity

Jednou ze skupin NK receptorů jsou tzv. receptory přirozené cytotoxicity, označované zkratkou NCR (z anglického natural cytotoxicity receptors). Tyto proteiny byly objeveny v 90. letech a byly zařazeny do této skupiny kvůli tomu, že jsou prostřednictvím kontaktu s příslušnými ligandy schopny aktivovat NK buňku. Mezi tyto receptory řadíme proteiny NKp46 (NCR1), NKp44 (NCR2) a NKp30 (NCR3). Receptory NK buněk řazené do této

skupiny jsou transmembránové proteiny typu I (tedy prochází pouze jednou přes membránu a jejich C-konec je na intracelulární straně membrány), mají jednu až dvě extracelulární domény pro vazbu ligandu a patří do superrodiny imunoglobulinových receptorů. Transmembránová doména NCR obsahuje kladně nabitou aminokyselinu, která může interagovat se signálními adaptorovými proteiny obsahujícími imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrozinu (ITAM – z anglického imunoreceptor tyrosine-based activation motif) [14]. ITAM, podobně jako imunoreceptorový inhibiční motiv na bázi tyrozinu (ITIM – z anglického imunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), tvoří rozhraní receptorů s aktivačními a inhibičními signálními cestami. Zatímco ITAM mobilizují aktivaci tyrozin kináz, ITIM mobilizují protikladné tyrozinové a inozitol-lipidové fosfatázy [15]. Vzhledem k tomu, že skupina receptorů NCR byla vytvořena dříve, než byly známy struktury těchto proteinů, nevykazují jednotlivé sem zařazené NK receptory příliš dalších podobností [14]. Například receptor NKp46 má dvě extracelulární imunoglobulinové domény, zatímco NKp30 a NKp44 mají pouze jednu. Receptor NKp44 je jako jediný ze zmíněné trojice spojen s ITIM motivem [16]. Schematické znázornění receptorů NCR je uvedeno na Obrázku 2.



Obrázek 2: Schematické znázornění receptorů NCR (NKp46, NKp44 a NKp30). NCR je nesourodá skupina proteinů. Receptory mají různý počet imunoglobulinových domén, pojí se s jinými signalizačními adaptéry v transmembránovém úseku, mohou mít prostřednictvím ITAM a ITIM motivů různý účinek na chování NK buňky a geny pro tyto proteiny jsou uloženy na různých chromozómech. Převzato a upraveno z [16].

1.2.4.1.1 Receptor NKp44

Receptor NKp44 byl objeven roku 1998. Jde o protein, který chybí na povrchu čerstvě izolovaných lymfocytů periferní krve, ale nachází se na povrchu aktivovaných NK buněk. NKp44 chybí u aktivovaných T lymfocytů i klonů T buněk. Vzhledem k tomu, že NKp44 nebyl detekován v žádné z ostatních analyzovaných buněčných linií, byl označen jako první marker specifický pro aktivované lidské NK buňky [17]. Gen NCR2 kódující NKp44 nebyl nalezen v genomu myši, proto není možné použít myši model pro studium tohoto proteinu, jako je tomu u řady ostatních receptorů NK buněk [18].

Řada ligandů tohoto receptoru ještě pravděpodobně není známa. Mezi známé ligandy patří jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA – z anglického proliferating cell nuclear antigen), který vyvolává po navázání na NKp44 inhibiční účinky na NK buňku. Aktivační funkce tohoto receptoru je spojena s proteiny produkovanými některými nádory či buňkami nakaženými virem HIV [19]. Dále je známo, že NKp44 je spojen s funkčním rozpoznáváním některých subtypů chřipkového viru, obálkových glykoproteinů viru dengue a viru západonilské horečky či hemaglutinin – neuraminidázy viru Sendai [18]. Jedním z ligandů NKp44 exprimovaných rakovinnými buňkami je protein NKp44L (NKp44 ligand). Tento ligand byl objeven díky screening testu za použití extracelulární domény NKp44. Výsledek testu poskytl neobvyklou izoformu proteinu MLL5 (z anglického mixed lineage leukemia 5 protein; jedná se o jadernou lyzin methyltransferázu 2E). Tato izoforma je neobvyklá svou C-koncovou sekvencí, která je nezbytná pro lokalizaci MLL5 na povrch buňky i pro vazbu receptoru NKp44 [20].

1.2.4.1.1.1 Struktura NKp44

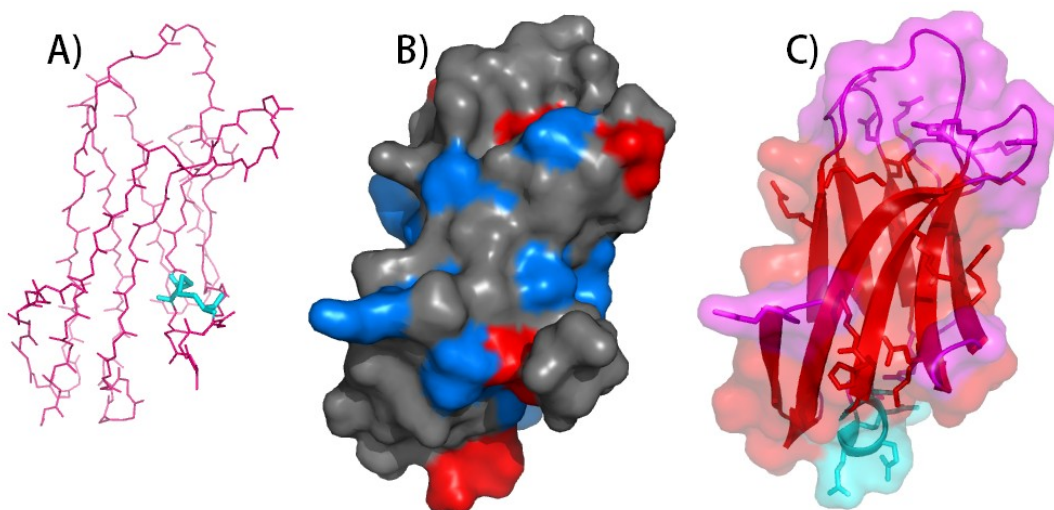
Vyřešit strukturu NKp44 se povedlo 5 let po objevení tohoto receptoru, v roce 2003, po jeho rekombinantní expresi v bakteriálním expresním systému *E. coli*. Protein byl krystalizován a jeho prostorová struktura objasněna s pomocí rentgenové difrakce s rozlišením 2,2 Å [21].

Jedná se o 44 kDa velký protein, jehož extracelulární doména vykazuje sekvenční podobnost s proteiny imunoglobulinové superrodiny. Extracelulární část receptoru NKp44 je tvořena 168 aminokyselinami, transmembránový segment obsahuje 25 aminokyselin a do intracelulárního prostoru zasahuje 63 aminokyselin. Imunoglobulinová doména NKp44 je spojena s transmembránovou částí receptoru úsekem o 55 aminokyselinách, který obsahuje řadu míst N-glykosylace. Předpokládá se, že právě díky tomu je celková

molekulová hmotnost proteinu 44 kDa, ač by molekulová hmotnost samotného řetězce aminokyselin podle teoretického výpočtu odpovídala pouze 29 kDa.

Imunoglobulinová doména receptoru je tvořena osmi vlákny, které tvoří takzvanou β -sendvičovou strukturu, tedy dvěma antiparalelními β -listy (po třech a pěti vláknech). Oproti typické imunoglobulinové doméně, která obsahuje pouze jeden disulfidický můstek, zahrnuje tato doména u NKp44 navíc i druhý disulfidický můstek, který zřejmě stabilizuje smyčku spojující dva sousední β -listy. Struktura imunoglobulinové domény NKp44 je zobrazena na Obrázku 3.

Kladně nabitou aminokyselinou v transmembránovém segmentu je u NKp44 lyzin. Prostřednictvím této aminokyseliny je pravděpodobně receptor spojen s dimerem proteinu DAP12, který nese ITAM [21]. Díky tomuto spojení se předpokládalo, že NKp44 je aktivačním receptorem. Později však vyšlo najevo, že tento receptor má pravděpodobně na NK buňky nejen aktivační účinek, ale může v závislosti na vazbě s konkrétními ligandy působit i jako inhibiční receptor. Pro samotnou povrchovou expresi NKp44 je však přítomnost transmembránové molekuly DAP12 nesoucí ITAM nezbytná. Inhibiční účinek receptoru NKp44 se projevuje například při vazbě ligandu PCNA, což způsobuje spuštění signální dráhy přes rozhraní ITIM přítomné v jeho vlastní intracelulární části [19].



Obrázek 3: Struktura imunoglobulinové domény receptoru NKp44. A) Hlavní řetězec struktury imunoglobulinové domény NKp44 s vyznačeným charakteristickým druhým disulfidovým můstkem (tyrkysová). B) Povrchové zobrazení imunoglobulinové domény NKp44 s vyznačenými náboji (modrá – pozitivní náboj, červená – negativní náboj). C) Struktura imunoglobulinové domény NKp44 s barevným označením podle sekundární struktury proteinu (červená – β -listy, tyrkysová – α -helix, fialová – smyčky spojující ostatní útvary sekundární struktury). Grafické znázornění bylo vytvořeno v programu PyMol [22] dle struktury PDB ID 1HKF [21].

1.2.5 PCNA, inhibiční ligand pro NKp44

O PCNA, ligandu receptoru NKp44, máme dnes k dispozici mnohem více informací než o receptoru samotném, neboť tento ligand je molekulou, která se účastní řady životně důležitých metabolických dějů. Objev PCNA byl uskutečněn v roce 1978, kdy byl tento protein popsán jako antigen u pacientů s autoimunitní chorobou systémový lupus erythematoses. Poprvé byl tedy protein PCNA pozorován v séru pacientů postižených tímto onemocněním [23]. O dva roky později, tedy v roce 1980, byl PCNA popsán nezávisle na objevu z roku 1978 jako protein, jehož exprese je závislá na fázi buněčného cyklu, a výzkumným týmem, který jej objevil, byl o další dva roky později pojmenován jako cyclin [24, 25], s tímto názvem se však dnes již nesetkáváme.

O existenci a úloze PCNA se díky zmíněným objevům hovořilo již v osmdesátých letech, kdy byl tento protein pokládán za faktor nutný pro dostatečné přiblížení polymerázy δ během replikace DNA [26, 27]. Později vyšlo najevo, že PCNA neplní jen funkci posuvné svorky během replikace DNA, ale může interagovat s celou řadou partnerů, již jsou zapojeni v mnoha metabolických dějích. PCNA se tak účastní dějů jako je zpracovávání Okazakiho fragmentů, opravy DNA, remodelace chromatinu, methylace DNA, regulace buněčného cyklu a dalších [28]. Prostorová struktura tohoto trimerního proteinu byla vyřešena díky krystalizaci a rentgenostrukturní analýze v roce 2004 s rozlišením 2,6 Å [29].

PCNA patří do proteinové rodiny tak zvaných posuvných svorek. Do této rodiny patří proteiny většinou prstencovitého tvaru, které mohou být vázány na dvoušroubovici DNA prostřednictvím na sekvenci nezávislé interakce. Dvoušroubovice DNA tak v tomto komplexu prochází středem prstencovitého proteinu. Vnitřní průměr svorkových proteinů bývá v rozmezí 30 až 35 Å, díky čemuž může DNA proteinovou strukturou volně procházet, aniž by její vazba vyvolávala sterické pnutí [30, 31]. Prvním objeveným proteinem z rodiny posuvných svorek byla tak zvaná β -svorka (anglicky β -clamp), obdoba proteinu PCNA v organismu *E. coli* [32].

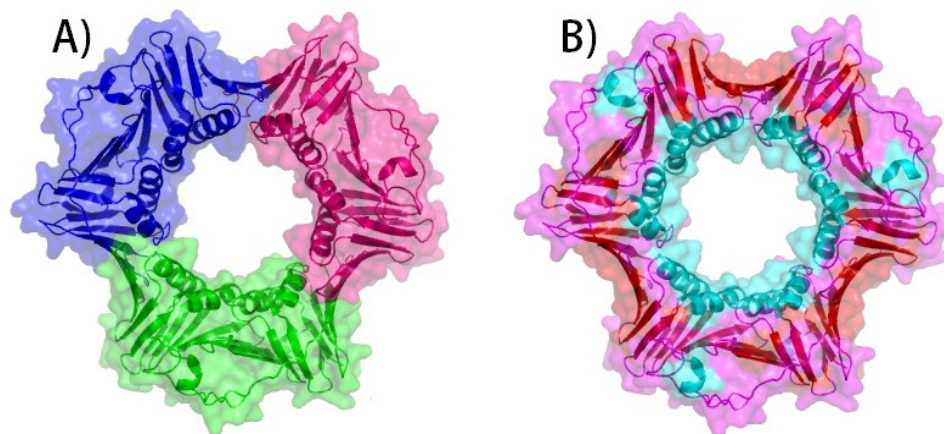
PCNA, stejně jako řada dalších proteinů rodiny posuvných svorek, stimuluje syntézu DNA díky svým interakcím s DNA polymerázami. Výsledkem tohoto působení PCNA je snížení míry disociace primeru od templátové DNA [29]. PCNA během replikace tvoří strukturu, která zejména kotví proteiny replizómu na svém místě a je tak jednou z nezbytných komponent tohoto děje [33]. Mechanismus, díky kterému se PCNA po molekule DNA posunuje, zůstává neobjasněn. Během pohybu PCNA po DNA však

zůstává zachován úhel 30° , pod kterým je protein PCNA na nukleovou kyselinu vázán. Konkrétní úhel vazby PCNA na DNA je zřejmě nutný i pro správnou funkci polymerázy δ , která je na svém místě ukotvena díky PCNA a přímo katalyzuje samotnou replikaci DNA.

Struktura prstence je kolem dvoušroubovice DNA tvořena za spotřeby ATP pomocí pentamerického proteinu nazývaného replikační faktor C (RFC, anglicky clamp loader nebo také replication factor C) [32].

1.2.5.1 Struktura PCNA

Prostorovou strukturu, jež zaujímá PCNA, nazýváme toroid [29]. Protein v nativní formě tvoří homotrimer o molekulové hmotnosti 86 kDa [33]. Každý z monomerů je složen ze dvou podjednotek klínovitého tvaru. Podjednotky se skládají ze dvou antiparalelně uspořádaných α -helixů, které jsou lokalizovány na vnitřní straně toroidní struktury PCNA, a jednoho β -skládaného listu, který je na vnější straně homotrimeru PCNA. Struktura proteinu PCNA je znázorněna na Obrázku 4.

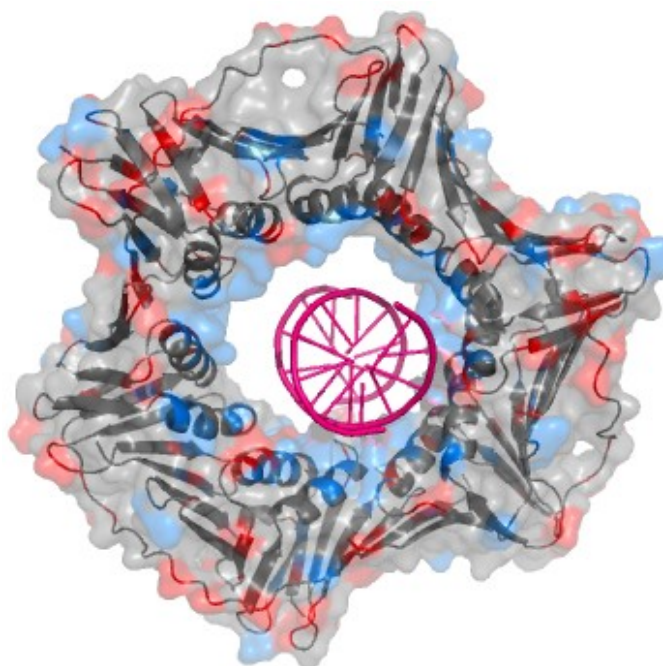


Obrázek 4: Struktura nativní formy PCNA. A) Struktura homotrimeru PCNA s barevně odlišenými monomerními podjednotkami. B) Struktura PCNA s barevným označením podle sekundární struktury proteinu (červená – β -listy, tyrkysová – α -helixy, fialová – smyčky spojující ostatní útvary sekundární struktury). Grafické znázornění bylo vytvořeno v programu PyMol [22] dle struktury PDB ID 1U7B [29].

Popsaný strukturální motiv je zachován i u ostatních proteinů z rodiny posuvných svorek (například u jiných organismů), ač v jejich sekvencích jsou značné rozdíly. Prostor, kterým DNA prochází, má na svém povrchu tedy 12 α -helixů (4 α -helixy na každou ze tří podjednotek homotrimeru), které tvoří vnitřní povrch PCNA [34].

Vnitřní povrch toroidu nese bazické aminokyseliny lyzin a arginin, které mají kladný náboj, a mohou tak vázat dvoušroubovici DNA. Vazbu mezi molekulami PCNA a DNA

zprostředkovává jen 5 z 12 kladně nabitých aminokyselin na povrchu α -helixů umístěných na vnitřním povrchu PCNA [32, 34]. Interakce PCNA s DNA je znázorněna na Obrázku 5.

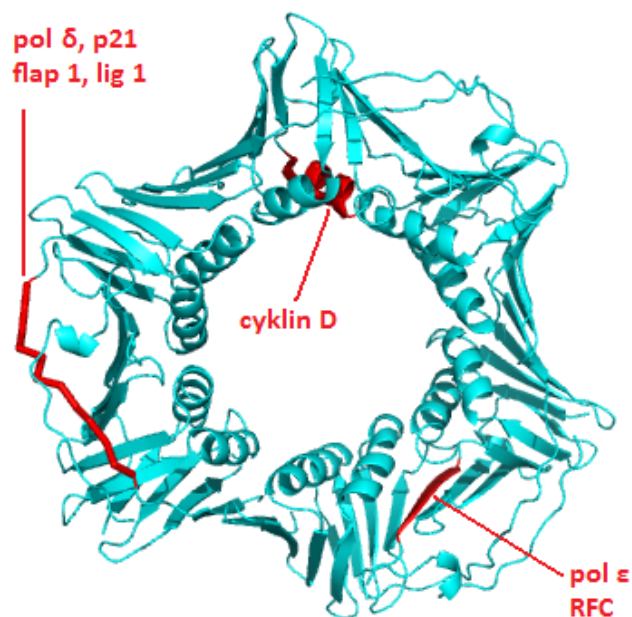


Obrázek 5: Interakce proteinu PCNA s molekulou DNA. Struktura proteinu PCNA s vyznačenými náboji (modrá – pozitivní náboj, červená – negativní náboj) a molekulou DNA (tmavě růžová) procházející skrz PCNA. DNA interaguje s 5 z 12 α -helixů na vnitřní straně povrchu PCNA, které nesou kladně nabitě aminokyseliny. Grafické znázornění bylo vytvořeno v programu PyMol [22] dle struktury PDB ID 5L7C [33].

1.2.6 Interakce PCNA s jinými proteiny

Hlavním interakčním místem v molekule PCNA je interdoménová smyčka pojící obě podjednotky monomeru PCNA. Jde o úsek L121–E132, který je rozpoznáván řadou interakčních molekul, mimo jiné i polymerázou δ . Mezi další proteiny rozpoznávající toto místo patří například flap endonukleáza 1, p21 (inhibitor cyklin dependentních kináz) nebo ligáza 1. Tento pro interakci důležitý úsek je vyznačen na Obrázku 6.

Další důležitou vazebnou sekvencí v PCNA je N-koncový úsek zahrnující α -helixy na vnitřní straně toroidu. Tento úsek je součástí vazebného místa například pro cyklin D. Neméně důležitou sekvencí je i úsek na C-konci PCNA, který je důležitý pro interakci PCNA s polymerázou ϵ či RFC. Oba úseky jsou společně s interdoménovou smyčkou vyznačeny na Obrázku 6. Mnoho proteinů vážících se na PCNA obsahuje běžný vazebný motiv označovaný jako PIP-box [28].



Obrázek 6: Interakční úseky proteinu PCNA. Struktura trimeru proteinu PCNA s vyznačenými úseky (červeně), které jsou důležité pro interakci s proteiny, jejichž názvy jsou uvedeny u příslušných úseků. Grafické znázornění bylo vytvořeno v programu PyMol [22] dle struktury PDB ID 1AXC [35] a strukturního popisu [28].

1.2.6.1 Interakce NKp44 s PCNA

Protein PCNA byl prvním objeveným ligandem receptoru NKp44. Inhibiční působení proteinu PCNA na NK buňky bylo však popsáno ještě dříve [14]. Po navázání PCNA na NKp44 dochází totiž k přenosu signálu přes ITIM motiv, lokalizovaný v cytoplasmatické části proteinu NKp44, což vyvolává inhibiční účinek na NK buňky [19]. Existují sice i studie, které hovoří o tom, že ITIM motiv receptoru NKp44 postrádá aktivitu, ale převážná řada publikací, mimo jiné i publikace zmiňující interakci NKp44:PCNA, toto tvrzení již vyvracejí [36].

Nadměrná exprese PCNA je spojena s rakovinnými buňkami. Díky povrchové expresi PCNA mohou zřejmě nádorové buňky unikat imunitnímu dohledu. Stejného principu využívá lidský organizmus během prvního trimestru těhotenství. V tomto období dochází ke zvýšení produkce PCNA. Díky tomu je plod chráněn před útokem imunitního systému prostřednictvím NKp44:PCNA interakce [18, 19]. Během prvního trimestru těhotenství je také na povrchu NK buněk exprimován receptor NKp44 bez předchozí aktivace NK buněk, která je v jiných případech pro expresi NKp44 nutná [14].

Ač byl protein PCNA úzce spojován s nádorovým bujením, fakt, že může být přímým ligandem receptoru NKp44, byl poměrně překvapující. Exprese i působení PCNA byly

původně považovány za procesy, které se odehrávají pouze v buněčném jádře [14, 37]. Možným mechanismem výskytu PCNA na buněčném povrchu se ukazuje být kolokalizace PCNA s HLA I. třídy. Na povrchu nádorových buněk se podařilo nalézt komplex PCNA s HLA I. třídy a povedlo se ověřit, že tento komplex je rozeznáván receptorem NKp44, výsledkem čehož je inhibice NK buněčné odpovědi. Otázkou po úspěšném experimentu však zůstalo, zdali je inhibiční účinek prostřednictvím NKp44 vyvolán proteinem PCNA, nebo pouze komplexem PCNA s HLA I. třídy [19].

Interakce samotného proteinu PCNA s NKp44 se stala cílem nedávného výzkumu, během kterého byl receptor připraven ve formě 20 aminokyselin dlouhých peptidů, u kterých byla sledována míra interakce s proteinem PCNA. Výsledkem bylo nalezení fragmentu NKp44, pojmenovaného pep8 (aminokyseliny 57–76), který specificky vázal PCNA a blokoval vazbu molekuly NKp44 na PCNA. Jeden z dalších testovaných fragmentů NKp44, pep10 (aminokyseliny 67–86), také během experimentu interagoval s molekulou PCNA. Fragment pojmenovaný pep10 v komplexu s PCNA však neblokoval vazbu receptoru NKp44 na PCNA. Alespoň některé z aminokyselin (67–76) jsou tak zřejmě součástí vazebného místa NKp44 pro PCNA. Samotný peptid tvořený pouze těmito 10 aminokyselinami však PCNA nevázal [38]. Bližší strukturní popis interakce těchto proteinů zatím k dispozici není.

1.3 Teoretický úvod k vybraným metodám

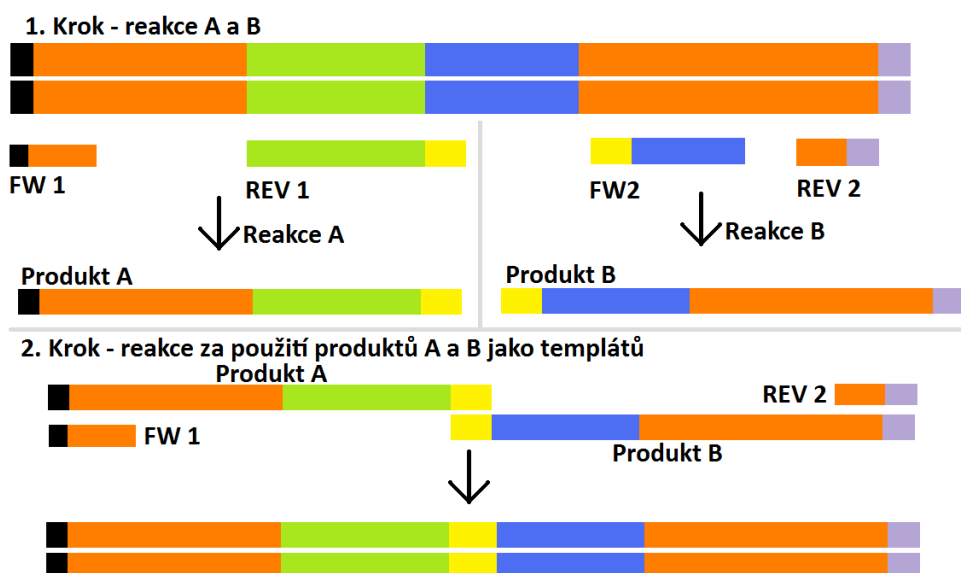
1.3.1 OE-PCR

Varianta PCR prodlužování přesahujících konců (OE-PCR – z anglického overlap extension polymerase chain reaction) se používá pro spojení dvou DNA fragmentů, ale mimo jiné může být použita i pro vnášení mutací do DNA.

Během pracovního postupu dochází ke spojení dvou nebo více DNA fragmentů díky komplementárním přesahům, které jsou vytvořeny na koncích DNA vláken. Tato vlákna získáme pomocí první PCR reakce za použití primerů s určitým přesahem. Důležitým krokem je tedy návrh primerů. Primery pro tento typ PCR mají přesahy (doporučuje se asi 20–30 párů bází), které jsou navzájem komplementární, díky čemuž se na sebe vlákna DNA amplifikovaná pomocí těchto primerů váží. Je také důležité, aby rozdíl v teplotě disociace primeru od templátu byl pro oba navržené primery co nejmenší [39].

Produkty první reakce se ve kroku druhém chovají jako PCR primery (s rozdílem ve velikosti oproti běžným PCR primerům). Vlákna syntetizovaná v prvním kroku reakce míří na opačné strany od sebe. Díky tomu jsou k sobě obě vlákna vázána pouze krátkým úsekem, který je tvořen původními přesahy DNA primerů. Ve druhém kroku tedy dochází k syntéze zbylých úseků DNA za vzniku plnohodnotného dvouvláknového produktu [40].

Pokud použijeme jeden DNA templát, můžeme jej pomocí dvou nezávislých PCR reakcí rozdělit na 2 produkty (za použití FW a REV primerů v místě rozdělení). Následně mohou být oba produkty pomocí OE-PCR spojeny, během čehož může být do genu zavedena požadovaná mutace. Pro úspěšné vnesení mutace je zásadní správné navržení primerů. Pokud během tohoto kroku vneseme mutaci do částí obou primerů, které jsou při druhém kroku použity pro vzájemnou hybridizaci obou vláken, bude mutace přítomna i ve výsledném produktu. Schéma OE-PCR je znázorněno na Obrázku 7.



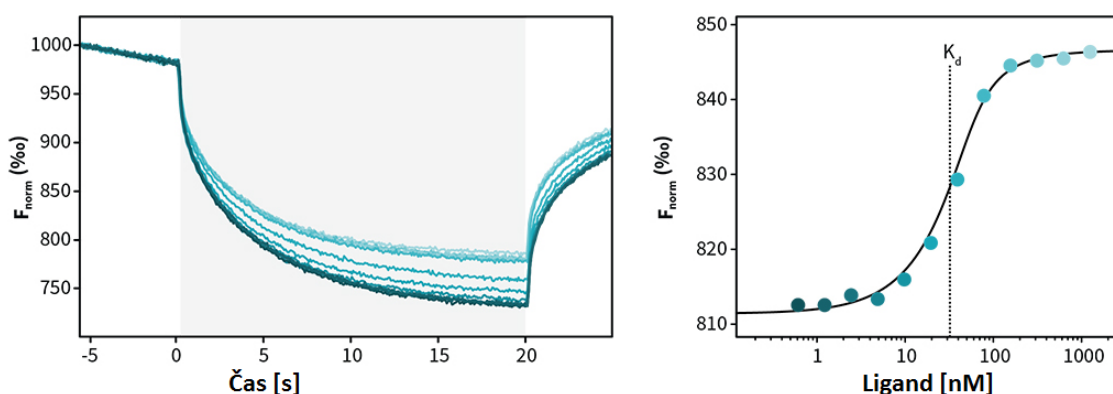
Obrázek 7: Schéma průběhu OE-PCR. Během prvního kroku jsou vytvořeny 2 produkty (produkt A a produkt B), které nesou mutaci (žlutá) na svých vzájemně komplementárních koncích. Inzerce této mutace je možné díky vnesení mutace do primerů (REV 1 a FW 2), které hybridizují s templátovou DNA v místě, kde má být mutace vložena. Ve druhém kroku slouží PCR produkty A a B jako primery pro druhou PCR reakci a je syntetizován zbytek genu.

1.3.2 Mikrotermoforéza

Mikrotermoforéza (MST – z anglického microscale thermophoresis) je biofyzikální metoda studia mezimolekulových interakcí založená na jevech známých jako termoforéza

a na teplotě závislá změna intenzity fluorescence (TRIC – z anglického temperature related intensity change). Pomocí MST je možné kvantitativně popsat mezimolekulové interakce. Termoforéza využívá pohybu molekul v přítomnosti teplotního gradientu a TRIC je zhášení fluoroforu při vystavení teplotnímu gradientu. Pro vytvoření teplotního gradientu se využívá infračervený (IR – z anglického infrared) laser. Jev působící proti termoforéze je difúze. MST měření vypovídá o velikosti molekul, náboji, hydratační vrstvě, konformaci a účincích TRIC. Tyto údaje se s vazbou další molekuly odlišují a měření se provádí v řadě, ve které je v každém vzorku stejná koncentrace cílového fluorescenčně značeného proteinu, ale koncentrace ligandu se mění (běžně se používá dvojková ředící řada) [41, 42].

Vzorky jsou do MST přístroje aplikovány v kapilárách. MST signál je poté vyneseno do grafu v závislosti na koncentraci ligandu, čímž je získána funkce vypovídající o závislosti odezvy na dávce ligandu. Z této funkce je možno vypočítat disociační konstantu pro pozorovaný komplex [43]. Schéma průběhu MST signálu i graf závislosti odezvy na dávce ligandu je na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma MST experimentu a jeho vyhodnocení. Fluorescenční MST signál detekovaný v čase je v normalizované formě vyneseno pro všechny kapiláry obsahující různou koncentraci ligandu (vlevo). Ze začátku sledujeme pouze klidovou fluorescenci použitého vzorku. Poté je aplikován teplotní gradient prostřednictvím IR laseru, který působí po čas vyznačený šedým polem na obrázku. Náhlá změna signálu je označována jako tzv. teplotní skok (anglicky T-jump) a obdobný jev po vypnutí laseru je označován jako inverzní teplotní skok (anglicky inverse T-jump). Jednotlivá měření znázorněná různými odstíny modré se vzájemně liší koncentrací ligandu. Disociační konstanta K_d je poté určena ze závislosti odezvy detektoru ve vybraném čase působení teplotního gradientu na koncentraci ligandu (vpravo). Převzato a upraveno z [43].

MST experiment nevyžaduje imobilizaci ani jednoho z vazebných partnerů a prostřednictvím této metody mohou být charakterizovány interakce bez omezení velikosti

molekul či druhu rozpouštědla. Většinou je však nutné fluorescenční značení jednoho z vazebných partnerů [41]. MST přístroj Monolith NT.115 Pico (NanoTemper Technologies, Německo) je zobrazen na Obrázku 9.



Obrázek 9: MST přístroj. Monolith NT.115 Pico (NanoTemper Technologies, Německo; vlevo) a držák pro kapiláry naplněné vzorkem, který se vkládá do přístroje (vpravo). Převzato a upraveno z [43, 44].

2 Cíle práce

- ❖ Příprava proteinu NKp44 v expresním systému HEK293
- ❖ Studium interakce receptoru NKp44 s jeho ligandem PCNA

3 Materiál

3.1 Použité přístroje a vybavení

Analytická ultracentrifuga ProteomeLab XL-I	(Beckman Coulter, USA)
Analytické váhy AND HA – 180M	(A&D, Japonsko)
Centrifuga EBA 12R	(Hettich, Německo)
Centrifuga Allegra X – 22R	(Beckman Coulter, USA)
Elektroforetická souprava pro agarosovou elektroforézu	(Biokeystone, USA)
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE	(Bio – Rad, Německo)
Fluorimetr Tycho	(NanoTemper Technologies, Německo)
Indikátorové papírky pro orientační zjištění pH	(Lachema, ČR)
Inkubátor IR 5000	(LABsystem Praha, ČR)
Inkubátor MC0-18 AIC	(Sanyo, Japonsko)
Kapiláry Monolith NT.115 Premium	(NanoTemper Technologies, Německo)
Kapiláry Monolith NT.115	(NanoTemper Technologies, Německo)
Kapiláry Tycho NT.6	(NanoTemper Technologies, Německo)
Kolona HiTrap Desalting Sephadex G-25	(GE Healthcare, USA)
Kolona HiTrap MabSelect SuRe 5 ml	(GE Healthcare, USA)
Kolona HiTrap Talon 5 ml	(GE Healthcare, USA)
Kolona Superdex 200 10/300 GL	(GE Healthcare, USA)
Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL	(GE Healthcare, USA)
Koncentrátor Amicon Ultra (MWCO 10000)	(Millipore, USA)
Laminární box Labox BIO 126	(LABOX, ČR)
Mikrocentrifuga Ministar Silverline	(VWR, USA)
Mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 μm	(TPP, Švýcarsko)
Mikrozkumavka 200 μl	(Eppendorf, USA)
Mikrozkumavka 1,5 ml	(Eppendorf, USA)
Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact	(Optimo Moulinex, Francie)
MST přístroj Monolith NT.115 Pico	(NanoTemper Technologies, Německo)
Spektrofotometr DS-11	(DeNovix, USA)
Termoblok LS1	(VLM, Německo)
Termocykler T100	(Bio – Rad, Německo)

Třepačka Celltron	(Infors HT, Švýcarsko)
Třepačka HT Multitron Pro	(Infors, Švýcarsko)
Třepačka G24	(New Brunswick Scientific, USA)
Ultrazvuková sonda SONOPLUS	(Bandelin, Německo)
Vortexový mixér	(Velp Scientifica, Itálie)
Zdroj napětí 251 – 2	(Sigma – Aldrich, USA)

3.2 Použité chemikálie

Agar	(Oxoid, Anglie)
Agaróza	(Sigma – Aldrich, USA)
Akrylamid	(Sigma – Aldrich, USA)
Ampicilin 100 mg/ml	(Biotika, SR)
Azid sodný (NaN ₃)	(Serva, USA)
Barvivo GoodView II	(Ecoli, Slovensko)
Deoxynukleotidový mix (dNTPS) 10 mM	(Top – Bio, ČR)
Dodecylsulfát sodný (SDS)	(Jersey Lab Supply, USA)
Fenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	(Thermo Scientific, USA)
Hovězí sérový albumin (BSA) 10 mg/ml	(New England Biolabs, USA)
Chlorid hořečnatý (MgCl ₂) 100 mM	(New England Biolabs, USA)
Izopropanol	(Lach – Ner, ČR)
Izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	(Sigma – Aldrich, USA)
Kvasničný extrakt	(ImunaPharm, SR)
Kyselina valproová	(Sigma – Aldrich, USA)
L-glutamin	(Sigma – Aldrich, USA)
Leupeptin 1 µg/ml	(Sigma – Aldrich, USA)
Lineární polyethylenimin (IPEI) 25 kDa	(Polysciences, USA)
Pepstatin 0,001 mg/ml	(Thermo Scientific, USA)
Peroxosíran amonný (APS)	(Serva, USA)
Pluronic F-68	(Sigma – Aldrich, USA)
Standard pro agarózovou elektroforézu 1 kb	(New England Biolabs, USA)
Standard pro agarózovou elektroforézu 100 bp	(New England Biolabs, USA)
Standard pro SDS-PAGE	(Thermo Fisher)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	(Serva, USA)

Tris	(Sigma – Aldrich, USA)
Trypanová modř	(Sigma – Aldrich, USA)
Tween 20	(NanoTemper Technologies, Německo)
2-merkaptoethanol	(Sigma – Aldrich, USA)

3.2.1 Použité enzymy

Emerald cPCR master mix	(Thermo Scientific, USA)
Infusion enzym s reakčním pufrem	(Biotool, Švýcarsko)
Lysozym 100 mg/ml	
Polymeráza Q5 s reakčním pufrem	(New England Biolabs, USA)
Polymeráza Phusion s reakčním pufrem	
Restrikční endonukleáza AgeI HF 10 U/μl	(New England Biolabs, USA)
Restrikční endonukleáza KpnI 5 U /μl	(New England Biolabs, USA)
RNáza A 100 ng/ml	(Lach – Ner, ČR)

3.2.2 Pufry a roztoky

- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE**

(45 % methanol, 10 % kys. octová, 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R 250)

- **Citrátový pufr**

(100 mM citrát sodný, 150 mM NaCl, 10 M NaN₃, pH 3,0)

- **Elektrodový pufr**

(25 mM Tris, 190 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3)

- **ExCell 293**

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

- **LB – médium**

(1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH 7,4)

- **MES**

(20 mM MES, 100 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 5,0)

- **Mobilní fáze pro gelovou permeační chromatografii**

(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5)

- **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE**

(35 % ethanol, 35 % kys. octová)

- **PBS pufr**

(50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5)

- **PBS imidazol pufr**

(50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 250 mM imidazol, pH 7,5)

- **PBS-TK**

(10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,0)

- **Pufr 1 pro linearizaci plazmidů**

(10 mM Bis Tris Propan – HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.0; New England Biolabs, USA)

- **Roztok antibiotik pro transfekci HEK293 100× koncentrovaný**

(penicilin 1000 U/ml, streptomycin 100 µg/ml)

- **Roztok IPEI**

(10 mg/ml IPEI v PBS-TK)

- **Roztok PMSF**

(100 mM PMSF v ethanolu)

- **Síran hořečnatý (MgSO₄)**

(100 mM; New England Biolabs)

- **TAE pufr pro agarosovou elektroforézu**

(40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA)

- **TES pufr**

(10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 8,0)

- **Tris 6,8**

(1,5 M Tris, pH 6,8)

- **Tris 8,8**

(1,5 M Tris, pH 8,8)

- **Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu 5×**

(30 % glycerol, bromfenolová modř v TAE)

- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. neredukující**

(31,5 mM Tris, 10 % (v/v) glycerol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN₃, pH 6,8)

- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× konc. redukující**

(vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný s 10 % podílem 2-merkptoethanolu)

3.2.3 DNA klony, plazmidy a primery pro PCR a DNA sekvenaci

3.2.3.1 DNA klony

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

3.2.3.2 Plazmidy

Plazmid pHLsecFcHis

Plazmid pMAL-C2T – HRV – MBP-3C

Plazmid pTW5 – aFGF

Plazmid pTW5 – p27

Plazmid pYD5

3.2.3.3 Primery pro PCR

3.2.3.3.1 Primery pro klonování do plazmidu pHLsecFcHis

- NKp44_A188_pHLsec_FcHis_REV

5' AACAGCACCTCCAGGGTACCTGCAGGGCCAGGG 3'

- NKp44_C155S_FW

5' CCAGAGCTCTGTGCCT 3'

- NKp44_C155S_REV

5' AGGCACAGAGCTCTGG 3'

- NKp44_Q22_pHLsec_FW

5'CGTAGCTGAAACCGGTCAATCCAAGGCTCAGGT 3'

3.2.3.3.2 Primery pro klonování do plazmidu pYD5

- NKp44_Q22_pYD5_FW

5' TTTTCAGGGCACCGGTCAATCCAAGGCTCAGGT 3'

- NKp44_A188_pYD5_REV

5' AGGTCGGGGGATCAGGTACCTGCAGGGCCAGGG 3'

3.2.3.3.3 Sekvenační a ostatní primery

- pTT_FW

TGATATTCACCTGGCCCGATCTG

- **pTT_REV**

GAGAGTGAGCCTTCCTGTAT

- **pHLsec_FW**

GCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATC

- **pHLsec_REV**

GATAGTCTTCCACCACCGACCAC

- **pTW5seq_REV**

GCGATACACCTATGCGACGAA

3.2.4 Buněčné kmeny a linie

Escherichia coli BL21(DE3)

(Thermo Scientific, USA)

Escherichia coli DH5 α

(Thermo Scientific, USA)

Escherichia coli NEB 10

(New England Biolabs, USA)

HEK293S GnTI⁻

(ATCC, USA)

3.2.5 Soupravy

Monolith Protein Labeling kit RED-NHS 2nd gen.

(NanoTemper Technologies, Německo)

Nucleospin® gel and PCR clean-up

(Macherey – Nagel, Německo)

NucleoSpin® Plasmid

(Macherey – Nagel, Německo)

NucleoBond® Xtra Midi / Maxi

(Macherey – Nagel, Německo)

4 Metody

4.1 Amplifikace DNA pomocí PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR – z anglického polymerase chain reaction) byla používána pro amplifikaci vybraných genů. Reakce byla prováděna v mikrozkušnicích o objemu 200 μl , přičemž objem reakční směsi činil 20 μl . Reakční směs vždy obsahovala templátovou DNA, primery pro daný gen, roztok dNTPs (deoxynukleotidtrifosfáty), Q5 polymerázu s příslušným reakčním pufrům a případně i enhancer. Do objemu 20 μl byla reakční směs doplněna dH₂O (deionizovanou vodou). Složení reakční směsi je popsáno v Tabulce 1. Polymeráza samotná byla do reakční směsi pipetována vždy až jako poslední, aby se minimalizoval časový interval, během kterého je roztok polymerázy vystaven laboratorní teplotě

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro PCR.

Chemikálie	Množství
Templátová DNA	100 ng
Roztoky primerů	2 μl
Roztok dNTPs	0,5 μl
Reakční pufr pro Q5 polymerázu	4 μl
Enhancer pro Q5 polymerázu	4 μl
Polymeráza Q5	0,5 μl
dH ₂ O	Doplnění reakční směsi do objemu 20 μl

Připravená reakční směs poté byla asi 20 s centrifugována za použití stolní centrifugy. Zkuševka s roztokem byla umístěna do termocyklu. V prvním kroku byla směs vystavena teplotě 95 °C po 3 min. V druhém kroku probíhala denaturace směsi při 95 °C po dobu 30 s, následně byla teplota snížena na teplotu vhodnou pro nasedání primerů po dobu 30 s. Teplota vhodná pro nasedání primerů byla určena pomocí online kalkulátoru New England Biolabs [45]. Dalším krokem byla polymerace DNA, která probíhala 1 min při 72 °C. Druhý krok byl 20–30× opakován.

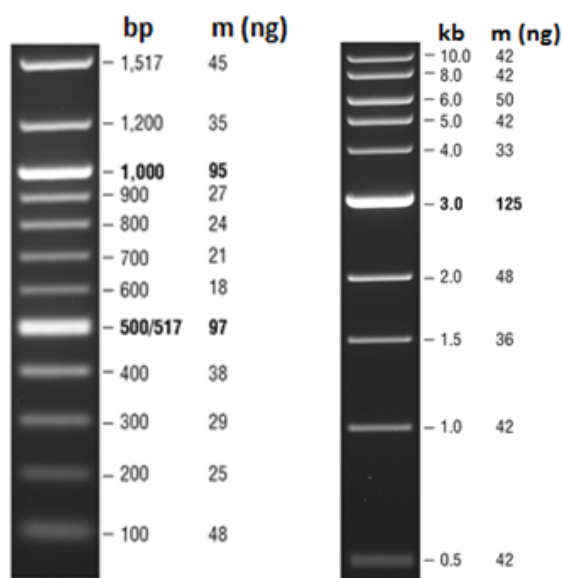
Po uplynutí reakčních cyklů byl zaveden ještě jeden polymerační krok, který probíhal 5 min při 72 °C. Poté byl vzorek temperován na teplotu 4 °C, při které byl ponechán, dokud nebyl vyjmut z termocyklu.

4.2 Agarózová elektroforéza

Pro agarózovou elektroforézu bylo připravováno 65 ml 1 %gelu. Agaróza byla přidána do TAE pufru a směs byla přivedena k varu v mikrovlnné troubě po dobu 1 min. Po ochlazení roztoku na asi 50 °C, což bylo rozpoznáno subjektivně přiložením dlaně na stěnu baňky, byly přidány 3 µl barviva GoodView II, roztok byl promíchán a přelit do předpřipravené elektroforetické formy. Do formy byl vložen hřeben. Po zatuhnutí gelu bylo do rezervoárů elektrod převedeno příslušné množství TAE pufru a gel byl převrstven deionizovanou vodou. Poté byl vyjmut hřeben. Objemy TAE pufru a deionizované vody byly určeny podle štítku na elektroforetické soupravě.

Vzorky pro agarózovou elektroforézu byly připraveny smícháním vzorku s analyzovanou DNA a vzorkovým pufr. Vzorkový pufr byl vždy se vzorkem míchán v poměru vzorek:vzorkový pufr = 4:1. Takto připravený roztok DNA byl centrifugován stolní centrifugou po dobu 10 s.

Do první a druhé jamky gelu bylo pipetováno 5 µl standardů. Do následujících jamek byly pipetovány postupně vzorky o objemu 12 µl. Pokud elektroforéza sloužila dále pro preparativní účely, byl použit vzorek všechn i za cenu jeho rozdělení do více jamek. Použité standardy jsou na Obrázku 10.



Obrázek 10: Elektroforeogram standardů pro agarózovou elektroforézu (100 bp vlevo; 1 kb vpravo). Standard 1 kb je vizualizován v 0,8% agarózovém gelu, 100 bp standard je vizualizován v 1,3% gelu. Levý sloupec hodnot vyjadřuje velikost v počtech bází, resp. kilobází, pravý sloupec hodnot vyjadřuje hmotnost v nanogramech. Převzato a upraveno z [46, 47].

Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala při 200 V po dobu dostatečnou k rozdělení jednotlivých vzorků a jejich frakcí (asi 20 min). Elektroforeogram byl vizualizován pomocí ultrafialové (UV) lampy. Pokud šlo o preparativní elektroforézu, byl použit slabší zdroj záření o delších vlnových délkách, aby nedošlo k poškození DNA ve vzorcích.

4.3 Separace DNA vzorků z agarózového gelu

Po elektroforetické analýze DNA vzorků, které měly být dále používány, byly tyto vzorky preparovány z agarózového gelu. Pro toto přečištění vzorků byla používána komerčně dostupná souprava NucleoSpin® gel and PCR Clean-up (Macherey – Nagel, Německo) [48].

Pracovní postup se řídil návodem výrobce. Část agarózového gelu obsahující vzorek byla vyříznuta plastovým nožem a přenesena do mikrozkuhavky. Vyříznutý kus gelu byl zvážen a poté bylo přidáno 200 μ l roztoku NTI na každých 100 mg gelu a vzorek byl inkubován při teplotě 50 °C, přičemž byl každé 2 min míchán opakovaným otáčením zkuhavky dnem vzhůru. Po úplném rozpuštění agarózového gelu v pufru NTI byl vzniklý roztok nanesen po částech (po 600 μ l) na NucleoSpin® gel and PCR Clean-up kolonu, která byla umístěna v mikrozkuhavce. Vzorek byl centrifugován přes kolonu 1 min při 11000 \times g za laboratorní teploty. Takto byl postupně nanesen veškerý vzorek na kolonu. Roztok, který protekl kolonou, byl odstraněn. Kolona byla promyta 600 μ l pufru NT3, k čemuž bylo využito centrifugace za shodných podmínek jako při nanášení DNA vzorku na kolonu. Promývací krok byl ještě jednou zopakován, poté byla kolona vysušena centrifugací opět za stejných podmínek jako v předchozích krocích. DNA byla z kolony eluována 30 μ l roztoku NE do nové připravené mikrozkuhavky. Eluční roztok byl pro tento krok temperován na 70 °C. Poté byl eluovaný roztok opět nanesen na kolonu a byl proveden ještě jeden eluční krok za použití tohoto roztoku místo pufru NE pro minimalizaci ztráty vzorku.

4.4 Měření koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA byly měřeny na spektrofotometru DeNovix DS-11, který disponuje předpřipraveným módem pro měření koncentrace i čistoty DNA. Jako slepý vzorek bylo vždy použito rozpouštědlo, ve kterém byla DNA rozpuštěna. Pro samotné

měření byl použit 1 μ l roztoku DNA. Měření každého vzorku bylo provedeno v tripletu a koncentrace byla určena jako průměr získaných hodnot, pokud žádná z naměřených hodnot nebyla příliš odlehlá. Pokud tomu tak bylo, měření bylo opakováno. Čistota vzorků byla kontrolována z poměru absorbancí při 260 a 280 nm. Vychýlení poměru těchto absorbancí z intervalu 1,8–2,0 indikovalo znečištění například RNA či proteiny.

4.5 Vnášení mutací do DNA pomocí OE-PCR

První krok OE-PCR byl proveden podle postupu pro amplifikaci DNA pomocí PCR s tím, že byly použity primery navržené speciálně pro tuto reakci. Pomocí těchto primerů byla do genu vnesena žádaná mutace. Tímto postupem byly provedeny dvě PCR reakce, jejichž produkty nebyly celé amplifikované geny, ale pouze dvě části sahající svými konci k místu mutace, kterou tyto produkty nesly na svých PCR přesazích.

Pro druhý krok byly použity produkty z kroku prvního jako templátová DNA. Takto získané templáty byly nejprve analyzovány pomocí agarózové elektroforézy, přečištěny z gelu a byla změřena jejich koncentrace. Poté bylo do mikrozkuhavky o objemu 200 μ l přeneseno takové množství roztoku obou templátových DNA, které obsahovalo 15 ng od každého templátu. Zbytek reakce byl namíchán shodně s běžnou PCR reakcí, jak je uvedeno v Tabulce 1.

4.6 Linearizace plazmidů

Štěpení plazmidů probíhalo pomocí restrikčních endonukleáz v mikrozkuhavce o objemu 200 μ l. Objem reakční směsi činil 20 μ l. Složení reakční směsi je popsáno v Tabulce 2. Restrikční endonukleázy (AgeI a KpnI) byly do reakční směsi přidávány vždy až jako poslední, aby se co nejvíce zkrátil časový interval, během kterého jsou enzymy vystaveny laboratorní teplotě. Po přípravě reakční směsi byl vzorek centrifugován stolní centrifugou asi 20 s.

Štěpení pomocí restrikčních endonukleáz AgeI a KpnI probíhalo 1 hod při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky okamžitě analyzovány pomocí agarózové elektroforézy, nebo zmrazeny. I v případě zamražení vzorků byl po štěpení přidán vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro linearizaci plazmidu.

Chemikálie	Množství
Plazmid určený pro linearizaci	3 µg
AgeI HF	1 µl
KpnI	2 µl
Pufř 1	2 µl
Roztok BSA	0,2 µl
dH ₂ O	Doplnění reakční směsi do objemu 20 µl

4.7 Vnesení vektoru do linearizovaného plazmidu

4.7.1 Vložení genu pomocí reakce Infusion

Reakce Infusion byla prováděna v mikrozkušavkách o objemu 200 µl. Reakční směs činila 10 µl. Nejprve byl do zkumavky přenesen takový objem roztoku linearizovaného plazmidu, který obsahoval 100 ng této DNA. Množství použitého inzertu bylo orientačně určeno pomocí vztahu 1,

$$bp_{inzert} = \frac{bp_{vektor} \cdot x}{2} \quad (1)$$

kde bp_{inzert} značí počet bází inzertu (vkládaného DNA úseku), bp_{vektor} značí počet bází vektoru (linearizovaného plazmidu) a x značí hmotnostní poměr inzertu a vektoru. Reakční směs dále obsahovala 2 µl Infusion reakčního pufru a 0,5 µl Infusion enzymu, který byl opět přidán jako poslední. Do celkového objemu 10 µl byla reakční směs doplněna deionizovanou vodou a centrifugována asi 20 s stolní centrifugou. Reakce samotná probíhala při 37 °C po dobu 30 min. Takto připravený vektor nesoucí vložený gen byl následně použit k transformaci kompetentních buněk.

4.8 Transformace kompetentních buněk

Pro transformaci 50 µl suspenze kompetentních buněk (*E. coli* NEB10, *E. coli* DH5α nebo *E. coli* BL21 (DE3)) bylo použito 100 ng vektoru nesoucího daný gen. Pokud byla transformace prováděna po vnesení inzertu do linearizovaného plazmidu, byl použit všechny získaný plazmid obsahující nově vložený gen. Do suspenze byl asepticky přenesen roztok obsahující 100 ng plazmidu a takto vzniklá suspenze byla inkubována asi 10 min na

ledu. Po uplynutí inkubační doby byl proveden tepelný šok, během kterého byla suspenze prostřednictvím temperované vodní lázně zahřáta na teplotu 42 °C po dobu 45 s. Poté byla zkumavka vrácena na led na dalších 5 min. Následně byl k takto transformovaným buňkám přidán 1 ml LB média a suspenze byla inkubována 1 hod při 37 °C. Po inkubaci byla suspenze centrifugována 1 min při 4000 × g za laboratorní teploty. Ze supernatantu byl odebrán 1 ml roztoku a ve zbylé kapalině byla resuspendována buněčná peleta. Vzniklá suspenze byla přenesena na bakteriologickou kultivační misku, kde byla rozetřena po celé ploše sterilní hokejkou. Po vsáknutí kapaliny do pevného kultivačního média byla miska otočena dnem vzhůru a byla inkubována při 37 °C přes noc.

4.9 Zrychlená transformace kompetentních buněk

Zrychlená transformace kompetentních buněk byla prováděna podle postupu popsaného jako transformace kompetentních buněk, ovšem nebyl prováděn tepelný šok ani hodinová inkubace v 1 ml LB média. Po smíchání buněčné suspenze s roztokem obsahujícím plazmid byla směs ponechána 10 min na ledu a následně byla suspenze přenesena na bakteriologickou kultivační misku, kde byla rozetřena sterilní hokejkou. Inkubace probíhala stejným způsobem jako v případě nezrychlené metody transformace kompetentních buněk.

4.10 Vypichování buněčných kolonií

Po inkubaci transformovaných buněk byly vybrány jednotlivé kolonie, které byly z misky vypíchnuty. Vypíchnutí kolonie spočívalo v setření narostlých buněk jedné kolonie pipetovací špičkou (10 µl). Špička s vypíchnutými koloniemi byla následně nasazena na pipetu a promyta opakovaným nasáváním a vypuzováním 6 µl dH₂O. Vzniklých 6 µl suspenze bylo použito pro PCR z buněčných kolonií. Špička byla uschována ve sterilní mikrozskumavce pro pozdější použití k nízkoobjemové přípravě plazmidové DNA.

4.11 PCR z buněčných kolonií

PCR z buněčných kolonií (cPCR – z anglického colony polymerase chain reaction) byla prováděna v mikrozskumavkách o objemu 200 µl. Reakční směs činila 20 µl. Pro tento typ PCR byly vždy voleny takové primery, které vymezovaly vkládaný DNA úsek včetně míst, ve kterých byla vkládaná DNA spojována s plazmidem. PCR z buněčných kolonií tak

sloužila jako první krok ověření, podařilo-li se správně vložit požadovaný gen do linearizovaného plazmidu. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Složení reakční směsi cPCR.

Chemikálie	Množství
Buněčná suspenze získaná vypíchnutím kolonie	6 μ l
Emerald master mix	10 μ l
Primer FW	2 μ l
Primer REV	2 μ l

Reakce probíhala podle obdobného protokolu jako běžná PCR reakce s tím rozdílem, že první krok, denaturace při 95 °C, neprobíhal 3 min, ale 5 min. Získané PCR produkty byly následně analyzovány pomocí agarózové elektroforézy.

4.12 Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA

Špička, kterou byla vypíchnuta kolonie z agarové plotny, byla následně použita pro nízkoobjemovou přípravu plazmidové DNA. Tato špička byla umístěna do zkumavky se šroubovacím víčkem o objemu 50 ml, ve které byl připravený roztok obsahující 5 ml LB média s přidaným ampicilinem o koncentraci 100 μ g/ml. Zkumavka byla uzavřena tak, že víčko nebylo úplně dotaženo, aby mohlo docházet k výměně plynů mezi zkumavkou a okolím. Víčko bylo zajištěno lepicí páskou, aby bylo zabráněno jeho ztrátě během třepání. Takto připravená buněčná suspenze byla inkubována přes noc při 37 °C a 200 ot./min. Izolace plazmidové DNA byla provedena pomocí komerčně dostupné soupravy NucleoSpin® Plasmid (Macherey – Nagel, Německo) [49].

Postup se řídil návodem výrobce. Buněčná suspenze byla po inkubaci centrifugována při 3900 \times g po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována pipetou v 250 μ l roztoku A1. Vzniklá suspenze byla převedena do mikrozukavky o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 250 μ l lyzačního roztoku A2. Směs byla promíchána opakovaným otáčením zkumavky dnem vzhůru a poté inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla buněčná lýze zastavena přidáním 300 μ l roztoku A3 a vzorek byl míchán stejným způsobem jako v předchozím kroku. Dostatečné promíchání a zastavení buněčné lýzy indikovalo vymizení modrého zbarvení roztoku lyzátu. Lyzát byl následně centrifugován při 11000 \times g po dobu 5 min za laboratorní

teploty. Supernatant byl nanesen na připravenou kolonu NucleoSpin®. Kolona umístěná ve sběrném rezervoáru byla centrifugována při $11000 \times g$ po dobu 1 min za laboratorní teploty. Tento krok byl opakován, dokud nebyl veškerý supernatant z předchozího kroku nanesen na kolonu. Následoval promývací krok, během kterého bylo na kolonu nanesen 500 μ l roztoku AW, který protekl kolonou při centrifugaci za stejných podmínek jako v minulém kroku. Poté byla kolona promyta stejným postupem za použití 600 μ l roztoku A4 a sušena centrifugací při $11000 \times g$ po dobu 2 min za laboratorní teploty. Eluce byla provedena 50 μ l roztoku AE, který byl předem temperován na 70 °C. Poté byl eluovaný roztok opět nanesen na kolonu a byl proveden ještě jeden eluční krok za použití již jednou proteklého roztoku pro minimalizaci ztráty DNA.

4.13 Sekvenování plazmidové DNA

Sekvence vzorků byla prováděna ve výzkumném centru BIOCEV odborníky z Laboratoře sekvenace DNA. Do 200 μ l mikrozkušavek bylo pipetováno vždy takové množství roztoku, které obsahovalo asi 100 ng DNA, 2 μ l roztoku primeru (buď primeru nasedajícího na 5'-konec, nebo primeru nasedajícího na 3'-konec) a do celkového objemu 8 μ l byla směs doplněna dH₂O. Takto připravený vzorek byl společně s průvodkou odeslán do Laboratoře sekvenace DNA. Po obdržení výsledné sekvence nukleotidů byla takto získaná data porovnána se sekvencí očekávanou pomocí online programu Clustal Omega Multiple Sequence Alignment [50].

4.14 Velkoobjemová příprava plazmidové DNA

Nejprve byla provedena transformace kompetentních bakterií *E. coli* DH5 α zrychlenou metodou transformace. Transformované buňky byly natřeny na bakteriologickou misku s pevným živným médiem a inkubovány při 37 °C přes noc. Další den byly na misku asepticky přeneseny 3 ml LB média, ve kterém byly buněčné kolonie resuspendovány pomocí sterilní bakteriologické hokejky. Vzniklá suspenze byla přenesena pipetou do předem připraveného roztoku obsahujícího 500 ml LB média s přidaným ampicilinem o výsledné koncentraci 100 μ g/ml. Erlenmayerova baňka o objemu 2 l s takto připraveným vzorkem byla inkubována přes noc na třepačce při 37 °C a 200 ot./min. Buněčná suspenze byla poté odstředěna při $3900 \times g$ po dobu 20 min za pokojové teploty. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v asi 20 ml TES pufru. Takto připravená suspenze byla převedena do 50 ml zkumavek se šroubovacím víčkem a centrifugována za stejných

podmínek jako v předchozím kroku. Supernatant byl odstraněn. Izolace plazmidové DNA byla provedena pomocí komerčně dostupné soupravy NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey – Nagel, Německo) [51].

Peleta byla nejprve resuspendována v 18 ml RES roztoku, do kterého byla předem přidána RNáza A o výsledné koncentraci 0,1 mg/ml. Suspenze byla rozdělena do dvou zkumavek a do každé bylo přidáno 9 ml roztoku LYS. Roztok byl promíchán opakovaným otáčením zkumavky dnem vzhůru a inkubován při laboratorní teplotě 5 min. Po uplynutí inkubace byl roztok neutralizován 9 ml roztoku NEU a promíchán stejným způsobem jako v minulém kroku. Směs byla centrifugována při $3900 \times g$ po dobu 10 min za laboratorní teploty. Supernatant byl filtrován přes filtr dodaný výrobcem a nanesen na předem ekvilibrovanou kolonu (pomocí roztoku EQU). Nanesený vzorek DNA byl promyt 25 ml roztoku WASH a eluován do centrifugační kyvety s čirými stěnami pomocí 15 ml elučního roztoku (ELU). Poté bylo přidáno 10,5 ml izopropanolu předem temperovaného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Precipitovaná DNA byla z roztoku odstředěna centrifugací při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $20450 \times g$ po dobu 30 min. Supernatant byl odstraněn a peleta byla opláchnuta 15 ml 70% ethanolu. Ethanol byl následně odstraněn, peleta vysušena a rozpuštěna v 1 ml elučního pufru. Eluční pufr pro tento účel byl shodný s elučním pufrem používaným v nízkoobjemové přípravě plazmidové DNA.

4.15 Produkce proteinů v bakteriálním expresním systému

Pro tento účel byly používány bakterie *E. coli* BL21 (DE3). Bakterie byly transformovány plazmidem nesoucím gen pro translaci připravovaného proteinu. Získaná suspenze transformovaných buněk byla nanesa na pevné živné médium s ampicilinem o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Bakterie byly inkubovány přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Další den byla z bakteriologické misky vypíchnuta 1 kolonie, kterou bylo očkováno 25 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Takto připravená suspenze byla přes noc inkubována při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 200 ot./min.

Další den bylo médium s narostlými bakteriemi použito pro očkování 500 ml LB média s přidáním ampicilinem. Suspenze byla inkubována v 2 l Erlenmayerových baňkách za stejných podmínek jako v minulém kroku. Během inkubace byly odebírány vzorky, u kterých byla měřena optická hustota při vlnové délce 600 nm. Ve chvíli, kdy optická hustota v kyvetě o optické dráze 1 cm dosáhla hodnoty asi 0,6, bylo do suspenze přidáno takové množství IPTG, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,5 mM. Po tomto indukčním

kroku byla buněčná suspenze inkubována ještě další 4 hod. Suspenze byla následně centrifugována při $3900 \times g$ za pokojové teploty po dobu 25 min. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v asi 20 ml TES pufru a opět odstředěna za stejných podmínek, jako v minulém kroku. Peleta byla poté buďto okamžitě zpracována, nebo uchována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.16 Práce s buněčnou linií HEK293S GnTI

Práce s touto buněčnou linií probíhala striktně asepticky ve speciální místnosti určené pouze pro práci s tkáňovými kulturami. Veškerá manipulace s buněčnou linií byla prováděna ve speciálních boxech s laminárním vzduchovým prouděním. Pro minimalizaci rizika kontaminace byl pro kultivaci těchto buněk vyhrazen speciální inkubátor s atmosférou obohacenou 5 % CO_2 .

4.16.1 Určování buněčné hustoty

Z buněčné suspenze bylo odebráno do sterilní mikrozkušavky 20 μl . Do zkumavky bylo dále pipetováno 160 μl roztoku 0,4% trypanové modři rozpuštěné v PBS-TK. Směs byla promíchána nasáváním a vypuzováním suspenze z pipety a následně byla část takto připravené směsi přenesena na hemocytometr. Pod mikroskopem bylo určeno množství živých buněk v hemocytometru. Celkové množství spočítaných buněk bylo následně vynásobeno objemovým faktorem 10000 a ředícím faktorem (při ředění 20 μl suspenze 160 μl roztoku trypanové modři byl tento faktor 9). Získaná hodnota udávala počet buněk v milionech na 1 ml suspenze. Podíl živých a mrtvých buněk byl přepočten na procenta.

4.16.2 Kultivace linie HEK293S GnTI

Kultivace této buněčné linie probíhala ve čtverhranných lahvích s prodyšným víčkem, které umožňovalo výměnu plynů mezi lahví a okolím. Láhve byly umístěny v inkubátoru s atmosférou obsahující 5 % CO_2 při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za neustálého třepání o frekvenci 135 ot./min. Pro kultivaci této buněčné linie bylo používáno komerční médium ExCell293.

Subkultivace probíhala jednou za 3–4 dny. Část suspenze byla doplněna čerstvým kultivačním médiem o takovém objemu, aby výsledná buněčná hustota vzniklé suspenze byla 2 miliony buněk/ml. Kultivační médium bylo předem temperováno na teplotu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Objem původní suspenze byl vždy maximálně 10 % nově vzniklého objemu. Láhve byly vždy plněny maximálně do 40 % svého objemu, aby mohlo docházet k dostatečnému

provzdušnění suspenze. Pokud byl objem původní buněčné suspenze příliš velký, byla tato suspenze centrifugována 5 min při $95 \times g$ a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ a následně resuspendována v příslušném objemu čerstvého kultivačního média.

4.16.3 Tranzientní transfekce linie HEK293S GnTI⁺

Nejprve byl připraven roztok obsahující dané množství DNA, kterou byla buněčná linie HEK293S GnTI⁺ transfekována. Množství DNA bylo vždy navrženo tak, aby na 1 milion buněk byl použit 1 μg připravené DNA. Roztok DNA pro transfekci této buněčné linie byl připraven v pufru PBS-TK a obsahoval z 88 % (w/w) plazmid, kterým měla být suspenze transfekována, z 10 % (w/w) plazmid pTW5 nesoucí gen pro inhibitor cyklin-dependentních kináz p27 a z posledních 2 % (w/w) plazmid pTW5 nesoucí gen pro aFGF (kyselý růstový faktor fibroblastů, z anglického acidic fibroblast growth factor).

Suspenze byla nejprve odstředěna za pokojové teploty při $95 \times g$ a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v čerstvém kultivačním médiu o takovém objemu, aby výsledná buněčná hustota byla asi 23,5 milionu buněk/ml. Kultivační médium bylo předem temperováno na teplotu $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Poté byl přidán DNA transfekční mix, který byl připraven tak, aby po jeho přidání byla buněčná hustota v suspenzi 20 milionů buněk/ml. Ihned poté byl do suspenze přidán roztok IPEI (lineárního polyethyleniminu) v takovém množství, aby hmotnostní poměr DNA:IPEI byl 1:5. Směs byla inkubována 4 hod při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 135 ot./min v atmosféře obsahující 5 % CO_2 . Po uplynutí inkubační doby byla suspenze $10 \times$ zředěna kultivačním médiem, které bylo předem temperováno na teplotu $37 \text{ }^\circ\text{C}$. K suspenzi byla navíc přidána kyselina valproová v takovém množství, aby její výsledná koncentrace byla 2 mM, a takové množství roztoku obsahujícího antibiotika pro transfekci, které tvořilo jednu setinu celkového objemu suspenze.

4.17 Purifikace proteinů

4.17.1 Sklizení buněčné kultury

Buněčná suspenze, jejíž buňky produkovaly připravovaný protein, byla sklizena pomocí centrifugace. V případě extracelulární produkce byla suspenze centrifugována při $20450 \times g$ po dobu 30–45 min za laboratorní teploty. Supernatant byl následně filtrován pomocí 0,22 μm filtru. Získaný filtrát byl buďto uskladněn při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, nebo okamžitě

purifikován. Před samotnou purifikací byl roztok naředěn v poměru 1:1 pufrům PBS a přečištěn pomocí chromatografických metod.

Buněčná suspenze, ve které byl připravovaný protein produkován intracelulárně, byla centrifugována při $3900 \times g$ po 20 min za laboratorní teploty. Odstředění probíhalo v 50 ml zkumavkách se šroubovacím víčkem. Peleta v každé ze zkumavek byla následně resuspendována v asi 40 ml pufru PBS. Buněčná suspenze byla homogenizována ultrazvukovou sondou. Homogenizace byla prováděna $4 \times$ po 1 min za výkonu 40 W. Během homogenizace byl vzorek chlazen ledovou lázní, přičemž po prvních dvou minutách homogenizace byly ke vzorku přidány roztoky shrnuté v Tabulce 4.

Tabulka 4: Roztoky přidávané během homogenizace buněčné suspenze při izolaci intracelulárně produkovaných proteinů.

Roztok	Přidané množství
PMSF	400 μ l
Leupeptin	40 μ l
Pepstatin	40 μ l
RNáza	40 μ l
MgCl ₂	2 μ l
Lysozym	25 μ l

Po dezintegraci byl lyzát centrifugován při $20450 \times g$ po dobu 10 min za laboratorní teploty. Supernatant byl filtrován pomocí 0,22 μ m filtrů. Filtrát byl poté ředěn v poměru 1:1 PBS pufrům a přečištěn pomocí chromatografických metod.

4.17.2 Afinitní chromatografie

4.17.2.1 Chelatační afinitní chromatografie na koloně Talon

Kolona HiTrap Talon 5 ml (GE Healthcare, USA) byla používána pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou. Na tuto kolonu byl vzorek nanesen pomocí HPLC systému ÄKTA basic. Kolona byla nejprve ekvilibrována pufrům PBS. Nanášení vzorku probíhalo za průtoku 5 ml/min. Kolona s naneseným vzorkem byla za stejného průtoku promyta pufrům PBS. Vzorek byl následně eluován za průtoku 3 ml/min PBS pufrům s přidáním imidazolem. Pro eluci imidazolu byl použit pufr MES.

4.17.2.2 Afinitní chromatografie na koloně MabSelect SuRe

Kolona HiTrap MabSelect SuRe 5 ml (GE Healthcare, USA) byla využívána během purifikace proteinů s Fc fragmentem lidského imunoglobulinu G (IgG), který má vysokou afinitu k proteinu A imobilizovanému ve zmíněné koloně. Ekvilibrace, nanášení vzorku i promývání probíhaly obdobně jako v případě chelatační afinitní chromatografie, s tím rozdílem, že pro všechny tyto kroky byl použit průtok 4 ml/min. Eluce byla provedena citrátovým pufrům při průtoku 3 ml/min. Eluovaný roztok byl okamžitě neutralizován 1,5 M roztokem Tris o pH 8,8, přičemž výsledná hodnota pH byla orientačně ověřována pH papírkem.

4.17.3 Koncentrování proteinů pro gelovou permeační chromatografii

Roztok proteinů získaný po provedení afinitní chromatografie byl před dalším purifikačním krokem, gelovou permeační chromatografií, koncentrován tak, aby jeho výsledný objem nepřesahoval výrazně 500 μ l. K tomuto účelu byly využívány koncentrátoři Amicon Ultra (MWCO 10000) (Millipore, USA). Do koncentrátorů byl pipetován roztok obsahující protein a souprava byla centrifugována při $3900 \times g$ za laboratorní teploty po dobu 5–10 min. Retenát byl promíchán opakovaným nasátím vzorku do pipety a jeho vypuštěním. Postup byl opakován, dokud nebyl veškerý roztok zahuštěn na požadovaný objem. Filtrát byl poté odstraněn.

4.17.4 Gelová permeační chromatografie

Pro tento typ chromatografie byla používána kolona Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, USA), případně kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL stejného výrobce. Koncentrovaný vzorek byl nejprve centrifugován při $20000 \times g$ za pokojové teploty 10 min. Kolona byla ekvilibrována mobilní fází a poté na ni byl pomocí nástřikové smyčky o objemu 2 ml nanesen vzorek. Gelová permeační chromatografie byla prováděna za průtoku 0,5 ml/min. Frakce byly sbírány pomocí automatického sběrače do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml.

4.17.5 Výměna pufru/odsolování

Pro výměnu pufru, ve kterém byl protein rozpuštěn, byly využívány kolony HiTrap Desalting Sephadex G-25 (GE Healthcare, USA). Kolona byla nejprve ekvilibrována

pufrem, do kterého měl být protein převeden. Pracovní postup byl totožný s postupem při gelové permeační chromatografii.

4.18 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinu byla měřena pomocí spektrofotometru DeNovix DS-11. Pro měření bylo vždy použito 2,5 µl vzorku, jehož koncentrace byla zjišťována proti slepému vzorku (nejčastěji pufr HEPES). Hodnota koncentrace v mg/ml byla zjištěna pomocí přednastavené metody Prot 280 MW & Ext. Coef. Pomocí této metody byl spektrofotometr schopen na základě vložených údajů (molekulová hmotnost a teoretický extinkční koeficient) vypočítat koncentraci z naměřené absorbance roztoku při 280 nm. Hodnota teoretického extinkčního koeficientu a molekulová hmotnost proteinu byly určeny pomocí online kalkulátoru ProtParam [52]. Teoretická hodnota extinkčního koeficientu byla určena za předpokladu, že všechny cysteiny v molekule daného proteinu jsou přítomny v oxidované formě. Měření koncentrace bylo provedeno vždy v tripletu a koncentrace byla určena jako průměr získaných hodnot, pokud žádná z naměřených hodnot nebyla příliš odlehlá. V opačném případě bylo měření opakováno.

4.19 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE – z anglického sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) byl vždy připraven gel, který se skládal z gelu zaostřovacího, kterým vzorek procházel jako první, a gelu rozdělovacího, přes který putoval vzorek po průchodu gelem zaostřovacím. Rozdělovací gel byl podle potřeby připravován v různých koncentracích polyakrylamidu – 10 % nebo 15 %. Objemy jednotlivých složek všech variant polyakrylamidového gelu jsou uvedeny v Tabulce 5.

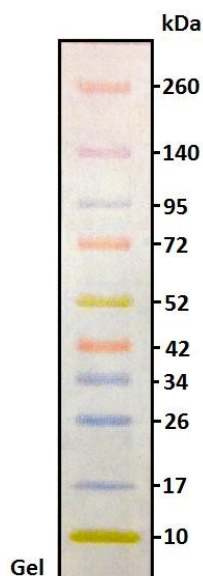
Peroxosíran amonný (APS – z anglického ammonium persulfate) byl do směsi přidán vždy až jako poslední, neboť je iniciátorem polymerace gelu. Poté byl roztok promíchán pomocí automatické pipety a pipetován do připravené formy. Nejprve byl připraven rozdělovací gel, který byl během tuhnutí převrstven deionizovanou vodou. Gel zaostřovací byl připraven až jako druhý a byl do něj vložen hřeben. Hotové gely byly umístěny do elektroforetické vany, která byla po rysku naplněna elektrodovým pufrem.

Tabulka 5: Složení polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE.

Chemikálie	Zaostřovací gel	10% gel	15% gel
dH ₂ O	0,7 ml	1,6 ml	0,9 ml
30% AA	0,25 ml	1,33 ml	2 ml
1,5 M Tris pH 6,8	0,13 ml	-	-
1,5 M Tris pH 8,8	-	1 ml	1 ml
10% SDS	10 μl	40 μl	40 μl
10% APS	10 μl	40 μl	40 μl
TEMED	1,5 μl	2 μl	2 μl

(AA – směs obsahující z 29,5 % akrylamid a z 0,5 % N,N'-metylen-bis-akrylamidu)

Během tuhnutí gelů byly proteinové vzorky připraveny na SDS-PAGE. Ke vzorkům o objemu maximálně 16 μl byl přidán 5 × koncentrovaný vzorkový pufr tak, aby jeho výsledný objemový podíl byl pětinnový (redukující či neredukující) a vzorky byly po 10 min vystaveny teplotě 100 °C. Poté byly odstředěny při 20000 × g při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly pipetovány do jamek v zaostřovacím gelu. Do první jamky bylo pipetováno 5 μl standardu, jehož elektroforeogram je uveden na Obrázku 11.

**Obrázek 11: Elektroforeogram standardu pro SDS-PAGE.** Uvedené hodnoty znázorňují velikosti vzorků jednotlivých proužků v kDa.

Elektroforéza probíhala, dokud elektroforetické čelo nedoputovalo téměř ke spodnímu okraji gelu. Poté byly gely vyjmuty a barveny přes noc v barvicím roztoku. K odbarvení

gelů byl použit odbarvovací roztok. Ke gelu bylo přilito asi 30 ml odbarvovacího roztoku, který byl po asi 30 min vylit a nahrazen čerstvým odbarvovacím roztokem. Tento krok byl opakován, dokud nebyl gel dostatečně odbarven. V případě potřeby byly gely dále skladovány ve 20% ethanolu při teplotě 6 °C.

4.20 Ověření sbalení proteinů

Strukturní integrita produkovaných proteinů byla zjišťována prostřednictvím sledování změn vnitřní fluorescence tryptofanu a tyrozinu při 330 a 350 nm, přičemž byl vzorek vystaven teplotnímu gradientu. Experimenty byly provedeny na přístroji NanoTemper Tycho. Náhlé změny fluorescence indikovaly přechod mezi jednotlivými stavy složení proteinu při dosažení určité teploty, tzv. inflexní teploty.

Experiment byl prováděn vždy v duplikátu. Proteinový vzorek byl naředěn na příslušnou koncentraci a byly jím naplněny kapiláry NanoTemper NT.6. Kapiláry byly umístěny do přístroje a měření bylo spuštěno. Změna vnitřní fluorescence byla sledována během plynulé teplotní změny od 35 °C do 95 °C. Hodnota inflexní teploty byla určena jako první derivace (podle teploty) funkce získané závislosti poměru zjištěné fluorescence při 350 nm a 330 nm na teplotě.

4.21 Fluorescenční značení proteinů pro MST

Vzorek proteinu použitý pro měření interakce s vazebným partnerem byl nejprve fluorescenčně značen. K tomu byla použita souprava Monolith Protein Labelling Kit RED-NHS 2nd Generation (NanoTemper Technologies, Německo). Pracovní postup se řídil návodem výrobce [53].

Značený protein byl nejprve naředěn na koncentraci asi 10 μM. Barvicí roztok byl připraven rozpuštěním NHS esteru fluorescenční sondy v 25 μl bezvodého DMSO. Směs byla promíchána pomocí automatické pipety. Takto připravený barvicí roztok byl 2 × ředěn dodaným pufrem pro NHS značení. Z ředěného barvicího roztoku bylo odebráno 10 μl, které byly v mikrozkušavce smíchány s 90 μl roztoku proteinu. Směs byla promíchána a inkubována 30 min za pokojové teploty ve tmě. Během inkubace byla ekvilibrována kolona B pomocí pufru, ve kterém byla měřena proteinová interakce (HEPES). Po inkubaci byl roztok značeného proteinu nanesen na ekvilibrovanou kolonu. Poté, co se veškerý vzorek vsáknul do kolony, bylo na kolonu pipetováno 550 μl mobilní fáze. Značený protein byl následně eluován 450 μl pufru použitého během ekvilibrace.

Koncentrace proteinu v tomto roztoku byla následně určena pomocí vztahu 2,

$$c(M) = \frac{A_{280} - (A_{650} \times 0,04)}{\varepsilon_{protein} \times d} \quad (2)$$

ve kterém $c(M)$ značí molární koncentraci značeného proteinu, $\varepsilon_{protein}$ jeho molární absorpční koeficient, d optickou dráhu během měření absorbance a A_{280} a A_{650} absorbance při vlnových délkách 280 a 650 nm. Úspěšnost značení (DOL – z anglického degree of labelling) byla určena pomocí vztahu 3,

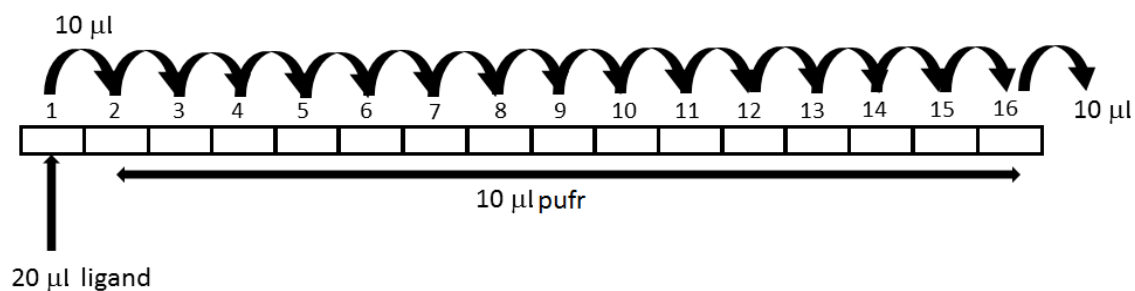
$$DOL = \frac{A_{650}}{195\,000 M^{-1} cm^{-1} \times c(M)} \quad (3)$$

kde A_{650} značí absorbanci při 650 nm a $c(M)$ molární koncentraci proteinu.

4.22 Mikrotermoforéza

Fluorescenčně značený protein byl podle pokynů programu NT.Control, pomocí kterého byl obsluhován MST přístroj Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Německo), ředěn na koncentraci 5 nM. Takto naředěným vzorkem byly naplněny 2 kapiláry. Se vzorkem v těchto kapilárách byl nejprve proveden tzv. pretest. Kapiláry byly vloženy do přístroje a pretest byl spuštěn. Během tohoto testování bylo zjištěno, jestli je fluorescence vzorku dostatečná a zdali nedochází k adhezi proteinu ke stěnám kapilár.

Po pretestu bylo připraveno 16 vzorků, ve kterých byla vždy koncentrace značeného proteinu 5 nM a koncentrace druhého proteinu klesala postupně od nejvyšší hodnoty dvojkovou ředící řadou. Pro přípravu těchto vzorků bylo použito 16 mikrozkušavek o objemu 200 μ l. Do zkumavek 2–16 bylo pipetováno 10 μ l pufru, ve kterém měření MST probíhalo. Poté bylo do první zkumavky pipetováno 20 μ l roztoku neznačeného proteinu. Z první zkumavky bylo odebráno 10 μ l roztoku, které byly přeneseny do zkumavky druhé. Takto byly přenášeny dávky po 10 μ l až do poslední zkumavky, ze které bylo nakonec 10 μ l roztoku odebráno tak, aby v každé zkumavce objem roztoku byl 10 μ l. Tímto byla připravena dvojková ředící řada. Schéma pipetování je na Obrázku 12.



Obrázek 12: Schéma pipetování dvojkové ředící řady pro MST experiment. Převzato a upraveno z [54].

Do každé zkumavky bylo poté pipetováno 10 µl roztoku značeného proteinu o koncentraci 10 nM. Pro dosažení co nejvyšší přesnosti pipetování byla použita technika reverzního pipetování pro pipetování značeného proteinu i reakčního pufru. Takto připravené vzorky byly nanесeny do kapilár, které byly umístěny do zásobníku. Ten byl vložen do MST přístroje a měření bylo spuštěno.

4.23 Sedimentační analýza

Tento experiment byl proveden pomocí metody sedimentační rychlosti na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) v rotoru An50-Ti. Vlastní měření i vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Do centrifugačních kyvet bylo pipetováno 400 µl roztoku proteinu. Jako reference byl použit pufr, ve kterém byl protein rozpuštěn. Koncentrace roztoku jednoho či více proteinů byla vždy určena tak, aby výsledná absorbance roztoku byla v intervalu 0,5–1. K výpočtu takové koncentrace byl použit online kalkulačor ProtParam, pomocí kterého byla vypočtena koncentrace proteinu, která odpovídala absorbanci 1,0 [52]. Z tohoto údaje byla určena hledaná koncentrace měřeného proteinu.

Samotné měření probíhalo při 48000 ot./min a 20 °C. Snímáno bylo 200 snímků po dobu 3 min s pomocí absorbanční detekce při 280 nm a s pomocí interferenční detekce. Hustota a viskozita referenčního pufru a parciální specifický objem proteinu byly predikovány pomocí programu Sednterp. Experimentální data byla následně vyhodnocena pomocí programu Sedfit metodou kontinuální distribuce sedimentačního koeficientu $c(s)$.

5 Výsledky

5.1 Příprava proteinu NKp44 prostřednictvím plazmidu pHLsecFcHis

Pro produkci imunoglobulinové domény NKp44 byl na základě dostupné vědecké literatury navržen expresní konstrukt Q22–A188 [55]. Cílem práce bylo především studium interakce NKp44 a PCNA, nebylo tedy nutné produkovat protein celý. Na C-konci navrženého konstruktů tak chyběly části NKp44 procházející membránou a intracelulární segment. Místo toho obsahoval konstrukt Fc fragment na C-konci v podobě lidského imunoglobulinu IgG. Tento postup se v laboratoři osvědčil a Fc fragment tak zde nahradil zbytek řetězce NKp44. Vzhledem k tomu, že konstrukt Q22–A188 obsahoval jeden lichý cystein, byla navržena i mutovaná verze proteinu, kde byl lichý cystein 155 nahrazen za serin. Navrhnuté verze expresních konstruktů jsou znázorněny na Obrázcích 13–15.

```
ATGGCCTGGCGAGCCCTACACCCACTGCTACTGCTGCTGCTGTTCCAGGCTCTCAGGCACAATCCAAGGCTCAG  
GTACTTCAAAGTGTGGCAGGGCAGACGCTAACCCTGAGATGCCAGTACCCGCCACGGGCAGTCTCTACGAGAAGA  
AAGGCTGGTGTAAAGGAGGCTTCAGCACTTGTGTGCATCAGGTTAGTACCAGCTCCAAGCCCAGGACGATGGCTTG  
GACCTCTCGATTCAAACTGGGACGACCCTGATGCTGGCTTCTTCACTGTCAACATGACTGATCTGAGAGAGGAAG  
ACTCAGGACATTACTGGTGTAGAATCTACCGCCCTTCTGACAACTCTGTCTCTAAGTCCGTGAGATTCTATCTGGTGG  
TATCTCCAGCCTTGCCCTCCACACAGACCTCTGGACTCCCGCGACCTGGTCTCTTACAGACCCAGACCCAGAGCT  
GTGTGCCTCCACTGCAGGAGCCAGACAAGCCCCTGAGTCTCCATCTACCATCCCTGTCCCTTACAGCCACAGAAGT  
CCACGCTCCGCCCTGGCCCTGCAGCCCCATTGCCCTGGTGCTGTGTTCTGTGGACTCCTCGTAGCCAAGAGCCTGG  
TGCTGTCAGCCCTGCTCGTCTGGTGGGGGGACATATGGTGGAAAACCATGATGGAGCTCAGGAGCCTGGATACCCA  
AAAAGCCACCTGCCACCTTAACAGGTCACGGACCTTCCCTGGACCTCAGTTTCTCACCTGTAGAGAGAGAAATATT  
ATATCACACTGTTGCAAGGACTAAGATAAGCGATGATGATGAACACACTTGTGA
```

NKp44_Q22_pHLsec_FW

5' **CGTAGCTGAAACCGT** **CAATCCAAGGCTCAGGT** 3'

NKp44_C155S_FW

5' **CCAGAGCTCTGTGCCT** 3'

NKp44_A188_pHLsec_REV

5' **AACAGCACCTCCAGG**GTACCT**GCAGGGCCAGGG** 3'

NKp44_C155S_REV

5' **AGGCACAGAGCTCTGG** 3'

Obrázek 13: Návrh expresních konstruktů NKp44 a NKp44 mutované verze – návrh PCR primerů. Nejprve je uvedena nukleotidová sekvence NKp44, ve které je podtržením vyznačena imunoglobulinová doména, černá barva písma značí extracelulární část, červenou barvou písma je vyznačen transmembránový úsek a zeleně je vyznačen intracelulární úsek. Červené podbarvení textu označuje STOP kodon. Část nukleotidů použitých pro expresi NKp44 je vyznačena fialovým podbarvením s bledě modrými okraji, které znázorňují přesahy pro primery uvedené ve spodní části obrázku. Primery pro OE-PCR jsou podbarveny růžově a nasedají v oblasti mutovaného tripletu. Bílou barvou je ve fialovém poli označen triplet, TGT, kódující lichý cystein. NKp44M (mutovaná verze) obsahuje místo tohoto tripletu triplet TCT, který kóduje serin.

ACCGGTCAATCCAAGGCTCAGGTAATTCAAAGTGTGGCAGGGCAGACGCTAACCGTGAGATGCCAGTACCCGCCA
 CGGGCAGTCTCTACGAGAAGAAAGGCTGGTGTAAAGAGGCTTCAGCACTTGTGTGCATCAGGTTAGTACCAGCTC
 CAAGCCCAGGACGATGGCTTGGACCTCTCGATTACAATCTGGGACGACCTGATGCTGGCTTCTCACTGTACCAT
 GACTGATCTGAGAGAGGAAGACTCAGGACATTACTGGTGTAGAATCTACCGCCCTTCTGACAACTCTGTCTCTAAGT
 CCGTCAGATTCTATCTGGTGGTATCTCCAGCCTCTGCCTCCACACAGACCTCCTGGACTCCCCGCGACCTGGTCTCTC
 ACAGACCCAGACCCAGAGCTGTGTGCCTCCACTGCAGGAGCCAGACAAGCCCCCTGAGTCTCCATCTACCATCCCTG
 TCCCTTACAGCCACAGAACTCCACGCTCCGCCCTGGCCCTGCAGGTACCTGGAGGTGCTGTTCCAGGGCCCCAAAT
 CTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC
 CAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
 CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
 GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAG
 TGCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
 TTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAATAAGGCCACGCTCCCG
 TGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT
 CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAACA
 TCACCATCATACCATTGA

Obrázek 14: Návrh expresních konstruktů NKp44 a NKp44M-DNA. Genetický kód celého produkovaného proteinu. Fialově je vyznačena část NKp44 amplifikovaná pomocí navržených primerů. Bílým písmem vyznačený triplet znázorňuje triplet kódující cystein, který je v mutované verzi nahrazen tripletem TCT, který kóduje serin. Žlutě je zde vyznačeno místo zásahu pro 3C proteázu, tmavě modré podbarvení znázorňuje nukleotidy zbylé z plazmidu a šedě je podbarven Fc fragment. Zelenou barvou je zvýrazněna histidinová kotva na konci Fc fragmentu a červeně STOP kodon.

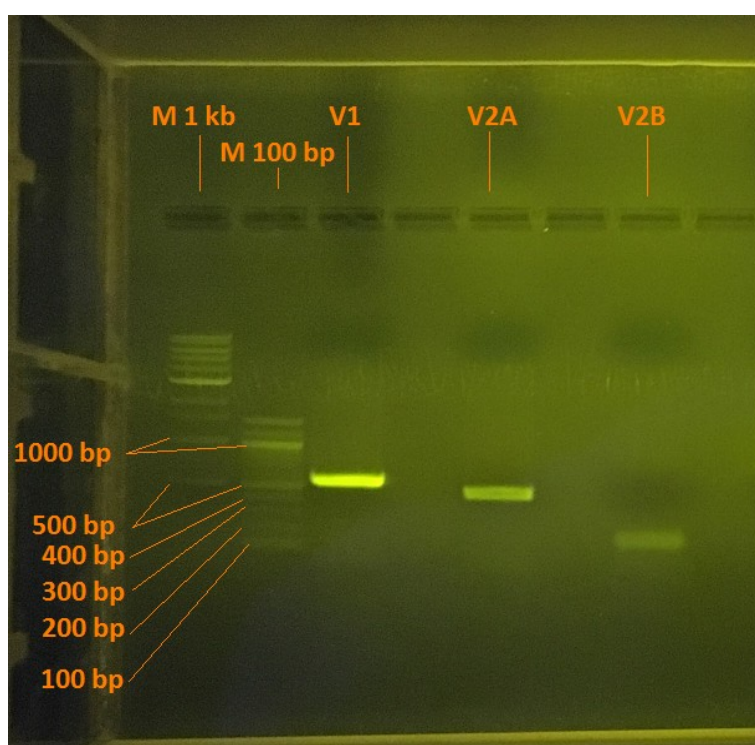
MAWRALHPLLLLLLFPGSQAQSKAQVLQSVAGQTLTVRCQYPPTGSLYEKKGWCKEASALVCIRLVTSSKPRMTAWTS
 RFTIWDDPDAGFFTVMTDLREEDSGHYWCRIYRPSDNSVSKSVRFYLVVSPASASTQTSWTPRDLVSSQTQTQS CVPP
 TAGARQAPESPSTIPVPSQPQNSTLRPGPAAPIALVPVFCGLLVAKSLVLSALLVWWGDIWWTMMELRSLDTQKATC
 HLQQVTDLPWTSVSSPVEREILYHTVARTKISDDDDDEHTL*

TGQSKAQVLQSVAGQTLTVRCQYPPTGSLYEKKGWCKEASALVCIRLVTSSKPRMTAWTSRFTIWDDPDAGFFTVMT
 DLREEDSGHYWCRIYRPSDNSVSKSVRFYLVVSPASASTQTSWTPRDLVSSQTQTQS CVPPTAGARQAPESPSTIPVPSQ
 PQNSTLRPGPAGTLEVLFGQPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALTH
 NHYTQKSLSLSPGKHHHHHH*

Obrázek 15: Aminokyselinová sekvence NKp44 a NKp44M. Zde je znázorněna sekvence aminokyselin NKp44, kde je fialově vyznačena produkovaná část. Podtržená písmena značící aminokyseliny tvořící imunoglobulinovou doménu NKp44. Černý text znázorňuje extracelulární segment, červený transmembránový a zeleně je vyznačen intracelulární úsek NKp44. Níže na obrázku je aminokyselinová sekvence celého produkovaného konstruktu. Část NKp44 je podbarvena fialově, místo zásahu pro 3C proteázu žlutě, Fc fragment šedou barvou, histidinová kotva zeleně a aminokyseliny zanesené plazmidem modrou barvou. Cystein 155 vyznačen bílým písmem. V mutované verzi je nahrazen serinem.

Požadovaný fragment NKp44 byl amplifikován pomocí PCR s využitím klonu genu NKp44 (Sino Biological, Čína), během které byla teplota nasedání primerů nastavena na 63 °C. Byly použity primery NKp44_Q22_pHLsec_FW a NKp44_A188_pHLsec_REV.

Pro vytvoření mutované verze, NKp44M, byla provedena OE-PCR. V prvním kroku této PCR byly provedeny 2 PCR reakce za použití primerů NKp44_Q22_pHLsec_FW a NKp44_C155S_REV s teplotou nasedání 63 °C (označeno pracovním jako V2A), druhá reakce byla provedena s primery C155S_FW a NKp44_A188_pHLsec_REV a teplotou nasedání primerů 65 °C (s pracovním označením V2B). Výsledek PCR reakcí byl ověřen pomocí agarózové elektroforezy. Získaný elektroforeogram je na Obrázku 16.

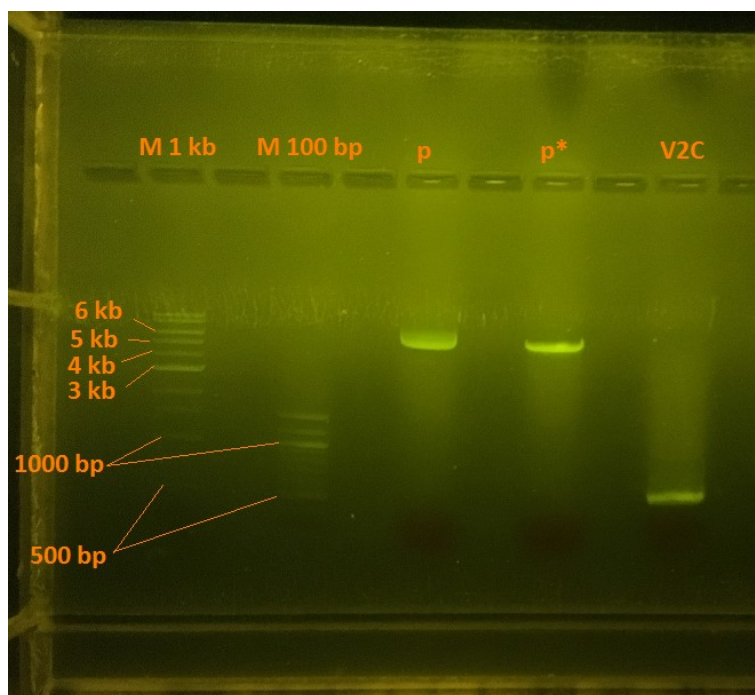


Obrázek 16: Elektroforeogram se vzorky po PCR reakcích. Elektroforéza probíhala v 1% agarózovém gelu. PCR produkt získaný pomocí primerů NKp44_Q22_pHLsec_FW a NKp44_A188_pHLsec_REV byl označen jako V1, očekávaná velikost byla 537 bp. Jako V2A byl označen konstrukt amplifikovaný pomocí primerů NKp44_Q22_pHLsec_FW a NKp44_C155S_REV, jehož očekávaná velikost byla 425 bp. Vzorek označený V2B byl amplifikován pomocí primerů NKp44_C155S_FW a NKp44_A188_pHLsec_REV a jeho očekávaná velikost činila 129 bp. M 1 kb značí 1 kb standard a M 100 bp značí 100 bp standard.

Vzorky byly následně vyříznuty a přečištěny z agarózového gelu, poté v nich byla změřena koncentrace DNA. Poté byl proveden druhý krok OE-PCR, ve kterém byly jako templáty použity vzorky V2A a V2B, konkrétně 15 ng od každého. Pro tuto reakci byly

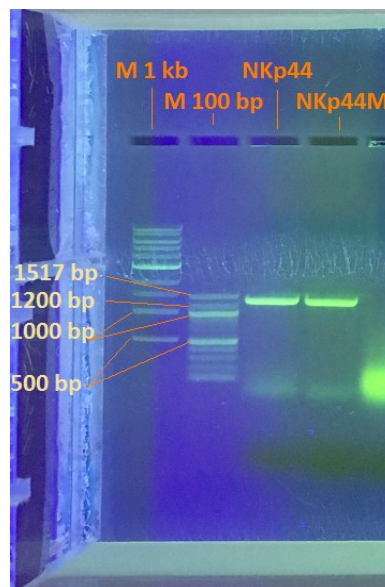
použity primery NKp44_Q22_pHLsec_FW a NKp44_A188_pHLsec_REV. Teplota nasedání primerů byla nastavena na 65 °C a vzorek byl pracovně označen V2C.

Pomocí restričních endonukleáz byly štěpeny 3 µg plazmidu pHLsecFcHis. Výsledek OE-PCR i linearizace plazmidu byl analyzován pomocí elektroforézy, jejíž elektroforeogram je na Obrázku 17.



Obrázek 17: Elektroforeogram vzorků po OE-PCR a linearizaci plazmidu pHLsecFcHis. Elektroforéza probíhala v 1% agarózovém gelu. M 1 kb značí 1 kb standard a M 100 bp značí 100 bp standard. Do dráhy p byl pipetován vzorek neštěpeného plazmidu, štěpený plazmid je označen jako p*. Velikost štěpeného plazmidu byla očekávána 5331 bp. Produkt OE-PCR s templáty V2A a V2B za použití primerů NKp44_Q22_pHLsec_FW a NKp44_A188_pHLsec_REV byl nanesen do dráhy V2C. Očekávaná velikost činila 501 bp.

Inzerty NKp44 a NKp44M byly vloženy do linearizovaného plazmidu pHLsecFcHis pomocí Infusion reakce. Vzniklým vektorem byly následně zrychlenou metodou transformovány kompetentní buňky *E. coli* NEB10, které byly natřeny na bakteriologickou misku s pevným živným médiem a přes noc inkubovány při 37 °C. Dalšího dne byly vypíchnuty některé z narostlých kolonií, se kterými byla provedena cPCR. Pro cPCR byly použity primery NKp44_Q22_pHLsec_FW a pHLsec_REV. Teplota nasedání primerů byla zvolena 65 °C. Výsledek byl analyzován pomocí agarózové elektroforézy v 1% gelu. Získaný elektroforeogram je uveden na Obrázku 18.



Obrázek 18: Elektroforeogram vzorků po cPCR. Elektroforéza probíhala v 1% agarózovém gelu. M 1 kb značí 1 kb standard a M 100 bp značí 100 bp standard. Očekávaná velikost obou cPCR produktů byla 1326 bp.

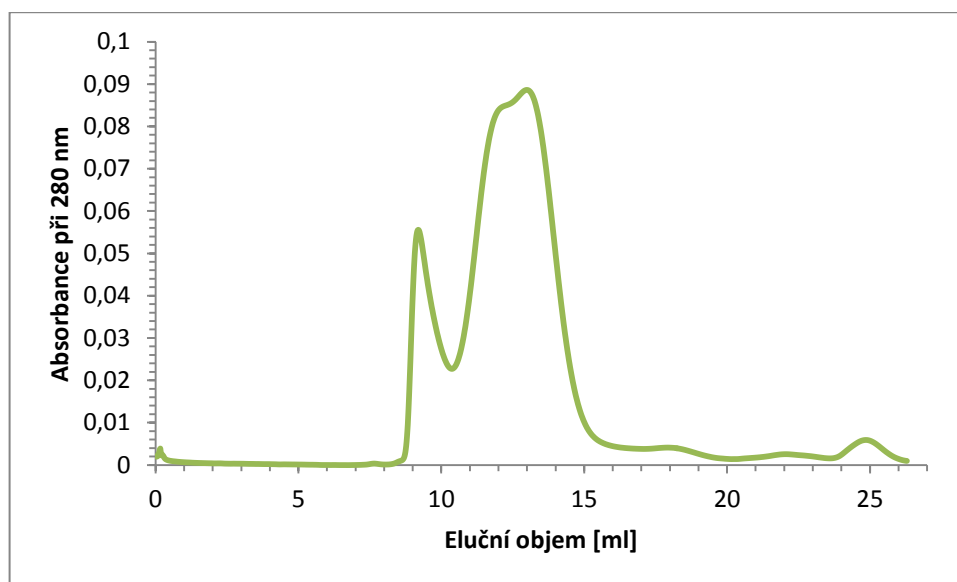
Po cPCR byla provedena nízkoobjemová příprava plazmidové DNA vzorků NKp44 i NKp44M. Dále byla měřena koncentrace DNA v obou vzorcích, přičemž bylo zjištěno, že koncentrace DNA v roztoku NKp44 činila 772,1 ng/μl a koncentrace DNA ve vzorku NKp44M činila 746,8 ng/μl.

Oba vzorky byly připraveny pro DNA sekvenaci za použití primerů pHLsec_FW a pHLsec_REV a následně odeslány do Laboratoře sekvenace DNA. Po obdržení výsledků DNA sekvenace byla obdržaná sekvence porovnána se sekvencí požadovanou. Z experimentálních dat vyšlo najevo, že oba inzerty byly do plazmidů vloženy úspěšně.

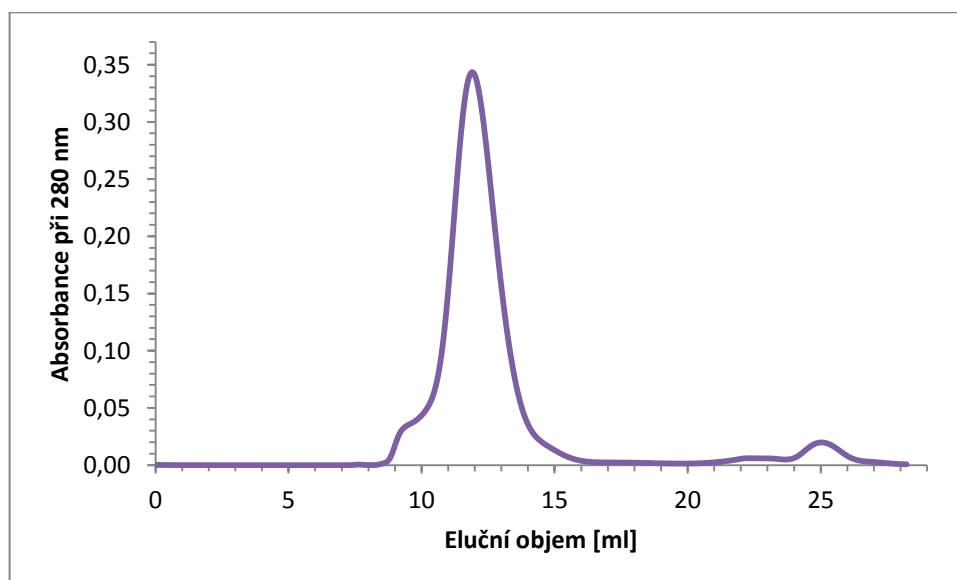
Sekvenovaný plazmid byl tedy použit pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* DH5α, které byly natřeny na pevné živné médium a přes noc inkubovány při 37 °C. Další den byly narostlé kolonie použity pro velkoobjemovou přípravu plazmidové DNA. Naměřené koncentrace získané plazmidové DNA činily v případě NKp44 2512 ng/μl a v případě NKp44M 3851 ng/μl.

Připravenými roztoky obsahujícími vektory pro produkci obou verzí NKp44 byly transfekovány buněčné suspenze HEK293S GnTI. Produkce probíhala v objemu 200 ml. Po týdnu byla produkce sklizena centrifugací a purifikována. Prvním purifikačním krokem byla afinitní chelatační chromatografie na koloně TALON.

Eluované roztoky byly pomocí koncentrátorů Amicon Ultra (MWCO 10000) koncentrovány tak, aby výsledný objem roztoku proteinu výrazně nepřesahoval 500 μ l. Retenát byl purifikován pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL. Získané chromatogramy jsou uvedeny na Obrázcích 19 a 20.



Obrázek 19: Chromatogram gelové permeační chromatografie NKp44 (pHLsecFcHis) za použití kolony Superdex 200 Increase 10/300 GL. Eluční objemy u chromatogramů získaných při purifikaci NKp44 a NKp44M není možné porovnat, neboť byly použity různé kolony. Velikost produkovaného konstruktů by měla být 46045 Da.



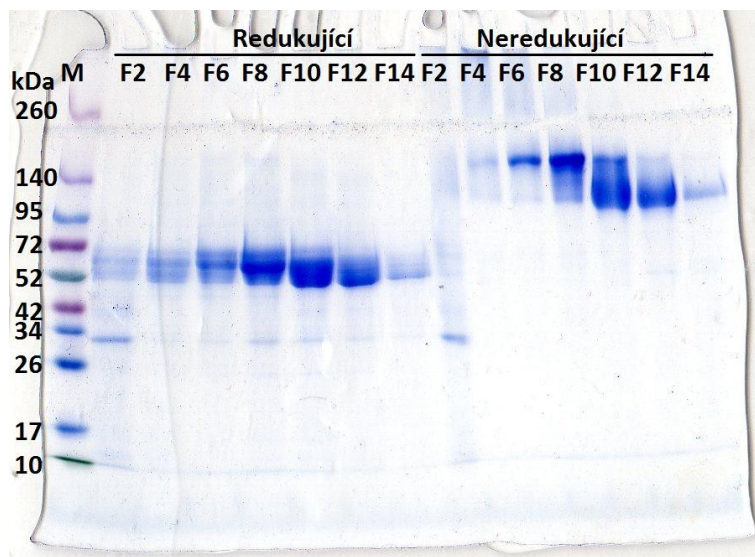
Obrázek 20: Chromatogram gelové permeační chromatografie NKp44M (pHLsecFcHis) za použití kolony Superdex 200 10/300 GL. Eluční objemy u chromatogramů získaných při purifikaci NKp44 a NKp44M není možné porovnat, neboť byly použity různé kolony. Velikost produkovaného konstruktů by měla být 46029 Da.

Během gelových permeačních chromatografií byl eluát sbírán po frakcích. Eluční objemy jednotlivých frakcí, společně s naměřenou koncentrací příslušné verze NKp44, jsou uvedeny v Tabulce 6.

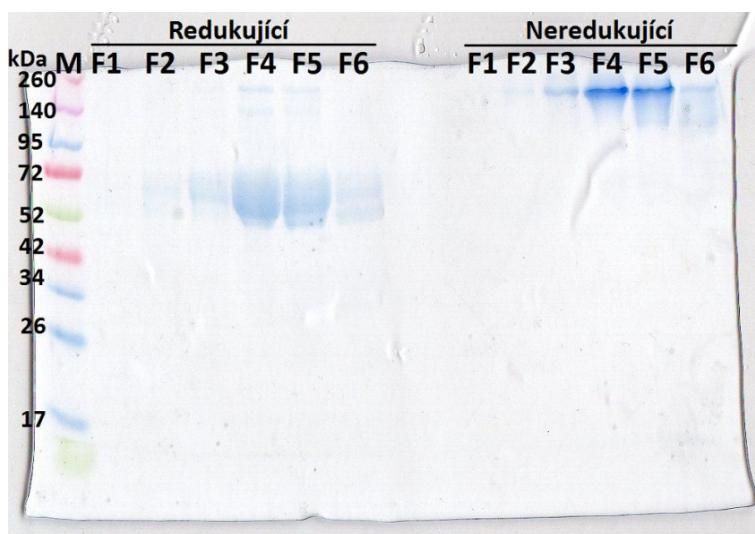
Tabulka 6: Eluční objemy a koncentrace příslušných verzí NKp44 (pHLsecFcHis) ve frakcích z gelových permeačních chromatografií.

NKp44			NKp44M		
Frakce	Eluční objem [ml]	Koncentrace [mg/ml]	Frakce	Eluční objem [ml]	Koncentrace [mg/ml]
1	8,81	0,090	1	8,26	0,028
2	8,83	0,100	2	9,26	0,093
3	9,33	0,129	3	10,26	0,181
4	9,83	0,078	4	11,26	0,674
5	10,33	0,074	5	12,26	0,541
6	10,83	0,133	6	13,26	0,286
7	11,33	0,189	7	14,26	0,090
8	11,83	0,265	8	15,26	0,024
9	12,33	0,282	9	16,26	0,021
10	12,83	0,246			
11	13,33	0,251			
12	13,83	0,168			
13	14,33	0,098			
14	14,53	0,043			
15	15,53	0,000			
16	16,08	0,006			

Vybrané frakce byly analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Elektroforeogram získaný analýzou produkovaného NKp44 je uveden na Obrázku 21 a elektroforeogram získaný analýzou NKp44M je na Obrázku 22.



Obrázek 21: Elektroforeogram analýzy NKp44 (pHLsecFcHis). 10% polyakrylamidový gel s jednotlivými frakcemi z gelové permeační chromatografie NKp44. Produkovaný protein NKp44 včetně Fc fragmentu by měl být velký 46045 Da. Prostřednictvím disulfidické vazby mezi Fc fragmenty by měly vznikat dimery, jak vidíme v neredukujícím prostředí. M značí marker, F s příslušnými čísly jednotlivé frakce v redukujícím i neredukujícím prostředí.



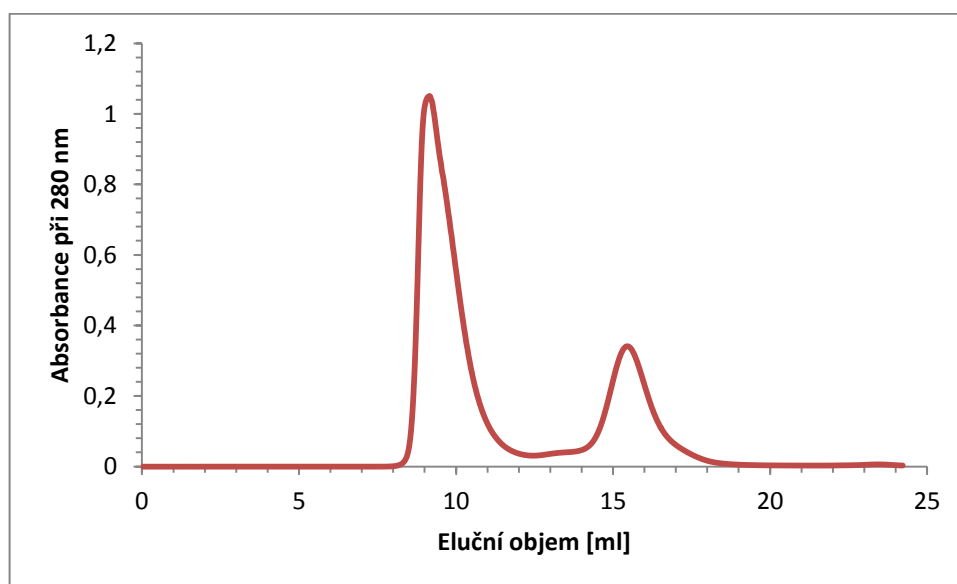
Obrázek 22: Elektroforeogram analýzy NKp44M (pHLsecFcHis). 10% polyakrylamidový gel s jednotlivými frakcemi z gelové permeační chromatografie NKp44M. Produkovaný protein NKp44 včetně Fc fragmentu by měl být velký 46029 Da. M značí marker, F s příslušnými čísly jednotlivé frakce v redukujícím i neredukujícím prostředí.

5.2 Příprava 3C proteázy

Pro štěpení Fc fragmentu od NKp44 produkované buňkami HEK293S GnTI⁺ po transfekci vektorem pHLsecFcHis byla připravena 3C proteáza. Proteáza byla připravena ve fúzi s maltózu vázajícím proteinem (MBP – z anglického maltose-binding protein).

Pro produkci této proteázy byl použit plazmid pMAL-C2T – HRV – MBP-3C [56]. Tím byly transformovány buňky *E. coli* BL21(DE3), ve kterých byla proteáza produkována. Protein, produkováný intracelulárně, byl po buněčné dezintegraci za použití ultrazvukové sondy purifikován pomocí afinitní chelatační chromatografie na koloně TALON.

Eluát byl redukován pomocí 2-merkptoethanolu o výsledné koncentraci 5 mM. Roztok byl poté koncentrován tak, aby jeho výsledný objem příliš nepřesahoval 500 μ l. Poté byl tento roztok dále čištěn pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL. Získaný chromatogram je uveden na Obrázku 23.



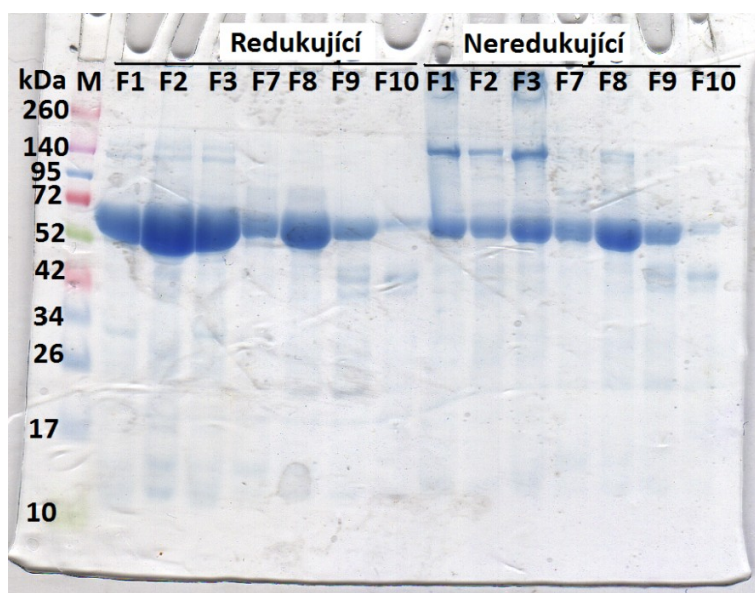
Obrázek 23: Chromatogram gelové permeační chromatografie MBP-3C proteázy za použití kolony Superdex 200 10/300 GL. Velikost produkované MBP-3C proteázy odpovídá 64327 Da.

Během gelové permeační chromatografie byl eluát sbírán po frakcích o objemu 1 ml. Eluční objemy jednotlivých frakcí, společně s naměřenou koncentrací příslušné frakce MBP-3C proteázy, jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Eluční objemy a koncentrace ve frakcích MBP-3C proteázy z gelové permeační chromatografie.

Frakce	Eluční objem [ml]	Koncentrace [mg/ml]
1	8,20	1,300
2	9,20	4,394
3	10,20	1,907
4	11,20	0,534
5	12,20	0,459
6	13,20	0,619
7	14,20	1,307
8	15,19	2,038
9	16,19	1,114
10	17,19	0,947
11	18,19	0,350
12	19,19	0,537

Vybrané frakce byly analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Elektroforeogram s těmito vzorky je uveden na Obrázku 24.



Obrázek 24: Elektroforeogram analýzy produkované MBP-3C proteázy. 10% polyakrylamidový gel s jednotlivými frakcemi z gelové permeační chromatografie MBP-3C proteázy. Velikost produkovaného konstruktů odpovídá 64327 Da (bez N-glykosylace). M značí marker, F s příslušnými čísly jednotlivé frakce v redukujícím i neredukujícím prostředí.

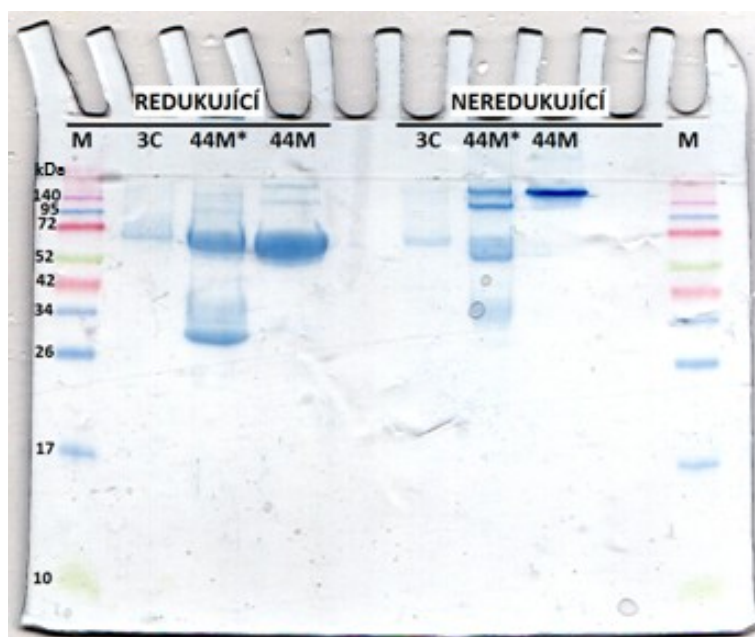
Frakce 7–10 byly smíchány a bylo k nim přidáno takové množství glycerolu, aby jeho výsledná koncentrace byla 50 %. Takto byl připraven roztok MBP-3C proteázy o koncentraci 0,67 mg/ml.

5.3 Štěpení proteinů pomocí 3C proteázy

Proteázou 3C mohou být štěpeny proteiny, které obsahují zásahové místo pro tuto proteázu, jako například proteiny produkované za použití expresního vektoru pHLsecFcHis.

Samotné štěpení probíhalo při laboratorní teplotě minimálně 3 hod. Proteázy bylo přidáno takové množství, aby hmotnostní poměr proteázy a štěpeného proteinu byl asi 1:5.

Štěpení konstruktu NKp44M produkovaného prostřednictvím vektoru pHLsecFcHis bylo provedeno tak, že bylo pipetováno takové množství štěpeného konstruktu (NKp44M frakce 4), které obsahovalo asi 7 μg příslušného proteinu (10,5 μl), ke kterému bylo přidáno 2,5 μl roztoku proteázy (tedy asi 1,675 μg proteázy). Směs byla ponechána při laboratorní teplotě přes noc a poté byl výsledek štěpení analyzován pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Elektroforeogram je znázorněn na Obrázku 25.



Obrázek 25: Elektroforeogram analýzy štěpení NKp44M MBP-3C proteázou. 15% polyakrylamidový gel s výsledky štěpení konstruktu NKp44M (frakce 4). Konstruktu by měla odpovídat 46029 Da (bez glykosylace), velikost MBP-3C proteázy 64327 Da, velikost odštěpeného Fc fragmentu 26814 Da a velikost odštěpeného NKp44M 19408 Da (bez glykosylace). M značí marker, 3C samotnou MBP-3C proteázu, 44M* značí štěpený konstrukt NKp44M a 44M značí neštěpený konstrukt NKp44M.

5.4 Příprava NKp44 prostřednictvím plazmidu pYD5

Stejné konstrukty NKp44, které byly vloženy do plazmidu pHLsecFcHis, byly vloženy i do expresního vektoru pYD5. Tento plazmid obsahuje také Fc fragment lidského IgG. V tomto případě není imunoglobulinová sekvence na C-konci, ale je umístěna na N-konci produkovaného proteinu. Výhodou takto produkovaného proteinu je, že nejprve vzniká během translace stabilní imunoglobulinový Fc fragment, na který později navazuje protein, jehož gen byl do plazmidu pYD5 vložen. Díky tomu by mohla být zvýšena pravděpodobnost, že produkovaný konstrukt bude v prostorovém uspořádání odpovídající nativnímu stavu. Namísto zásahového místa pro 3C proteázu je v plazmidu pYD5 pro odštěpení Fc fragmentu zásahové místo TEV proteázy.

I v případě proteinové produkce prostřednictvím plazmidu pYD5 byly připraveny dva expresní vektory – NKp44 i jeho mutovaná verze, NKp44M. Expresní konstrukty včetně navržených primerů jsou na Obrázcích 26–28.

```

ATGGCCTGGCGAGCCCTACACCCACTGCTACTGCTGCTGCTGCTGTTCCAGGCTCTCAGGCACAATCCAAGGCTCAG
GTACTTCAAAGTGTGGCAGGGCAGACGCTAACCGTGAGATGCCAGTACCCGCCACGGGCAGTCTCTACGAGAAGA
AAGGCTGGTGTAAAGGAGGCTTCAGCACTTGTGTGCATCAGGTTAGTCACCAGCTCCAAGCCAGGACGATGGCTTG
GACCTCTCGATTCACAATCTGGGACGACCCTGATGCTGGCTTCTTCACTGTCACCATGACTGATCTGAGAGAGGAAG
ACTCAGGACATTACTGGTGTAGAATCTACCGCCCTTCTGACAACCTGTCTCTAAGTCCGTCCAGATTCTATCTGGTGG
TATCTCCAGCCTCTGCCTCCACACAGACCTCCTGGACTCCCCGCGACCTGGTCTCTTACAGACCCAGACCCAGAGC
GTGTGCCTCCACTGCAGGAGCCAGACAAGCCCTGAGTCTCCATCTACCATCCCTGTCCCTTACAGCCACAGAAT
CCACGCTCCGCCCTGGCCCTGCAGCCCCATTGCCTGGTGCCTGTGTTCTGTGGACTCCTCGTAGCCAAGAGCCTGG
TGCTGTCAGCCTGCTCGTTGGTGGGGGGACATATGGTGGAAAACCATGATGGAGCTCAGGAGCCTGGATACCCA
AAAAGCCACCTGCCACCTCAACAGGTCACGGACCTTCCCTGGACCTCAGTTTCTCACCTGTAGAGAGAGAAATATT
ATATCACACTGTTGCAAGGACTAAGATAAGCGATGATGATGATGAACACACTTGTGA

```

NKp44_Q22_PYD5_FW

NKp44_A188_pYD5_REV

5' **TTTTCAGGGCACCGGT**CAATCCAAGGCTCAGGT**** 3' | 5' **AGGTCGGGGGATCAG**GTACCT**TGCAGGGCCAGGG** 3'

Obrázek 26: Návrh expresních konstruktů NKp44 a NKp44 mutované verze – návrh PCR primerů. Nejprve je uvedena nukleotidová sekvence NKp44, ve které je podtržením vyznačena imunoglobulinová doména, černá barva písma značí extracelulární část, červenou barvou písma je vyznačen transmembránový úsek a zeleně je vyznačen intracelulární úsek. Červené podbarvení textu označuje STOP kodon. Část nukleotidů použitých pro expresi NKp44 je vyznačena fialovým podbarvením s bledě modrými okraji, které znázorňují přesahy primerů, které jsou uvedené ve spodní části obrázku. Bílou barvou je ve fialovém poli označen triplet, TGT, kódující lichý cystein. NKp44M (mutovaná verze) obsahuje místo tohoto tripletu triplet TCT, který kóduje serin.

GCCGGATCAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCA
AAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCCTG
TTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAAGCTA
GCGGAGCCGGAAGCACAACC**GAAAACCTGTATTTTCAGGGC****ACCGGT**CAATCCAAGGCTCAGGTACTTCAAAGTGT
GGCAGGGCAGACGCTAACCGTGAGATGCCAGTACCCGCCACGGGCAGTCTCTACGAGAAGAAAGGCTGGTGTAA
GGAGGCTTACACTTGTGTGCATCAGGTTAGTACCAGCTCCAAGCCAGGACGATGGCTTGGACCTCTCGATTCA
CAATCTGGGACGACCCTGATGCTGGCTTCTTCACTGTACCATGACTGATCTGAGAGAGGAAGACTCAGGACATTAC
TGGTGTAGAATCTACCGCCCTTCTGACAACCTGTCTCTAAGTCCGTGAGATTCTATCTGGTGGTATCTCCAGCCTCTG
CCTCCACACAGACCTCTGGACTCCCCGCGACCTGGTCTTTCACAGACCCAGACCCAGAGCT**GT**GTGCCTCCACTG
CAGGAGCCAGACAAGCCCTGAGTCTCCATCTACCATCCCTGTCCCTTACAGCCACAGAACTCCACGCTCCGCCCTG
GCCCTGCA**GGTAC**TGA

Obrázek 27: Návrh expresních konstruktů NKp44 a NKp44M-DNA. Genetický kód celého produkovaného konstruktů. Fialově je vyznačena část NKp44 amplifikovaná pomocí PCR. Bílým písmem vyznačený triplet znázorňuje triplet kódující cystein, který je v mutované verzi nahrazen tripletem TCT. Žlutě je zde vyznačeno zásahové místo TEV proteázy, tmavě modré podbarvení znázorňuje nukleotidy zbytečné z plazmidu, šedě je podbarven Fc fragment a červeně STOP kodon.

MAWRALHPLLLLLLFPGSQAQSKAQVLSVAGQTLVRCQYPPTGSLYEKKGWCKEASALVCIRLVTSKPRM~~AWTS~~
~~RFTIWDDPDAGFFT~~VTMTDLREEDSGHYWCRIYRPSDNSVSKSVRFYLVVSPASASTQTSWTPRDLVSSQTQTQS ~~VP~~
TAGARQAPESPSTIPVPSQPQNSTLRPGPA**APIALVPVFCGLLVAKSLVLSALLV**WWGDIWWTMMELRSLDTQKATC
HLQVTDLPWTSVSSPVEREILYHTVARTKISDDDEHTL*

AGSTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKASGAGST**EN**
LYFQGTGQSKAQVLSVAGQTLVRCQYPPTGSLYEKKGWCKEASALVCIRLVTSKPRM~~AWTS~~RFTIWDDPDAGFFT
VTMTDLREEDSGHYWCRIYRPSDNSVSKSVRFYLVVSPASASTQTSWTPRDLVSSQTQTQS ~~VP~~PPTAGARQAPESPSTI
PVPSQPQNSTLRPGPA**G***

Obrázek 28: Aminokyselinová sekvence NKp44 a NKp44M. Nahoře na obrázku je znázorněna sekvence aminokyselin NKp44, kde je fialově vyznačena produkovaná část. Podtržená písmena značí aminokyseliny tvořící imunoglobulinovou doménu NKp44. Černý text znázorňuje extracelulární segment, červený transmembránový úsek a zeleně je vyznačena intracelulární část proteinu. Níže na obrázku je aminokyselinová sekvence celého produkovaného konstruktů. Část NKp44 je podbarvena fialově, místo zásahu TEV proteázy žlutě, Fc fragment šedou barvou a aminokyseliny zanesené z plazmidu modrou barvou. Cystein v mutované verzi nahrazen serinem je znázorněn bílou barvou písma.

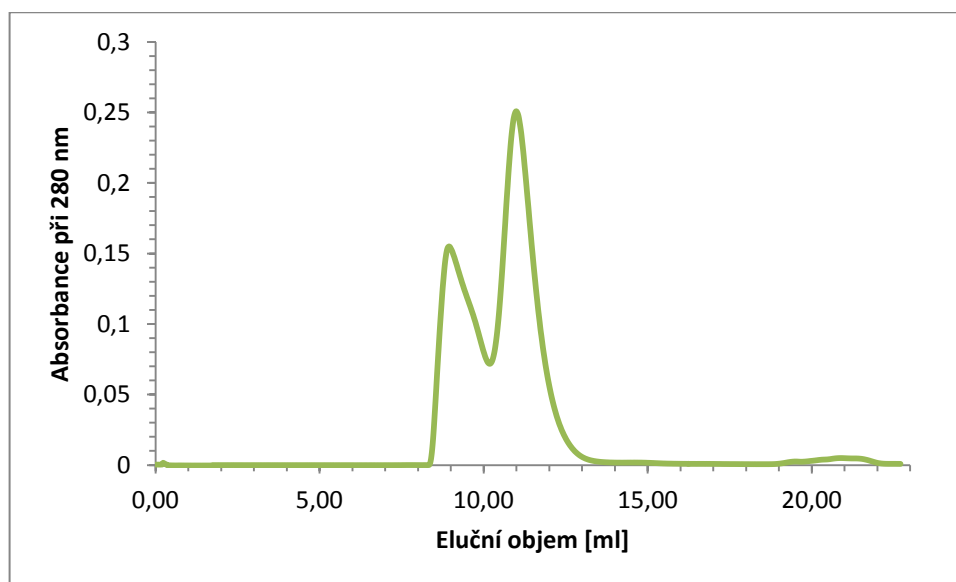
Pro vytvoření konstruktů kódujícího mutovanou verzi NKp44 nebyla provedena OE-PCR, ale pomocí nově navržených primerů byl gen pro tento protein získán reakcí PCR, během

kteře byl jako templát použit expresní vektor NKp44M pHLsecFcHis nesoucí požadovaný gen s mutací, který byl připraven v předchozím bodu. Teplota nasedání primerů NKp44_Q22_pYD5_FW a NKp44_A188_pYD5_REV byla nastavena na 63 °C a pro štěpení plazmidu pYD5 byly použity restriční endonukleázy AgeI a KpnI.

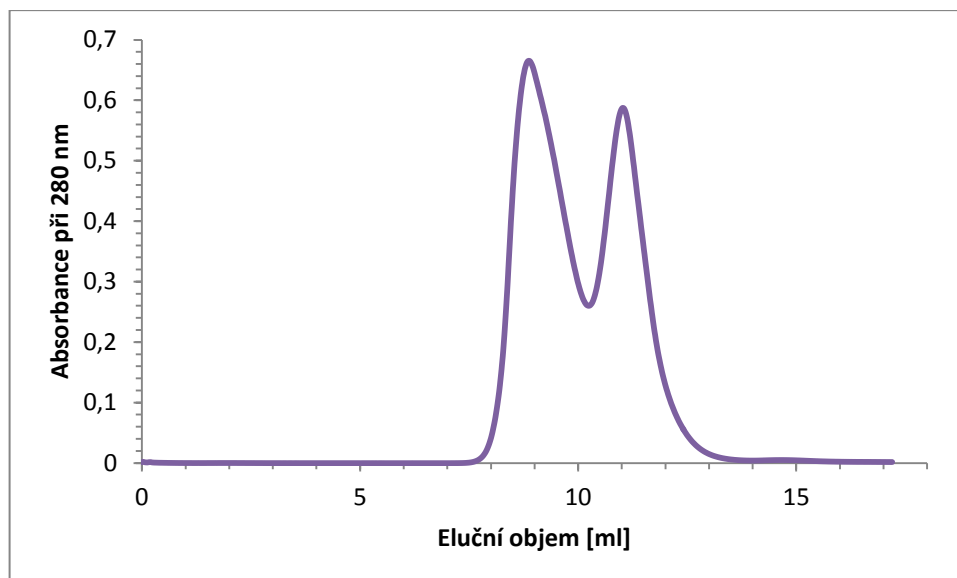
Dále probíhala příprava produkčních vektorů pYD5 obdobným způsobem, jaký byl popsán v případě přípravy vektorů pHLsecFcHis. Úspěšnost byla ověřena pomocí DNA sekvenace a následně byla provedena velkoobjemová příprava plazmidové DNA, pomocí které byly získány roztoky obsahující vektor pro produkci NKp44 o koncentraci DNA 2924 ng/μl a vektor pro produkci NKp44M o koncentraci 2831 ng/μl.

Připravenými roztoky obsahujícími vektory pro produkci obou verzí NKp44 byly transfekovány buněčné suspenze HEK293S GnTI. Produkce probíhala v objemu 200 ml. Po týdnu byl produkovaný protein sklizen a purifikován. Prvním purifikačním krokem byla afinitní chelatační chromatografie na koloně MabSelect SuRe.

Eluované roztoky byly pomocí koncentrátorů Amicon Ultra (MWCO 10000) koncentrovány tak, aby výsledný objem roztoku proteinu výrazně nepřesahoval 500 μl. Koncentrované roztoky eluátu byly následně čištěny pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL. Získané chromatogramy jsou uvedeny na Obrázcích 29 a 30.



Obrázek 29: Chromatogram gelové permeační chromatografie NKp44 (pYD5) za použití kolony Superdex 200 Increase 10/300 GL. Velikost produkovaného konstrukturu by měla být 47819 Da (bez glykosylace).



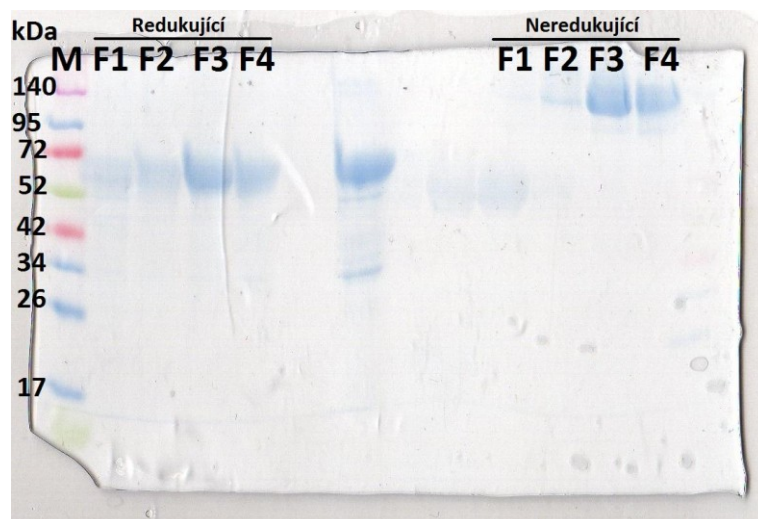
Obrázek 30: Chromatogram gelové permeační chromatografie NKp44M (pYD5) za použití kolony Superdex 200 Increase 10/300 GL. Velikost produkovaného konstruktu by měla být 47803 Da (bez glykosylace).

Během gelových permeačních chromatografií byl eluát sbírán po frakcích. Eluční objemy jednotlivých frakcí, společně s naměřenou koncentrací příslušné verze NKp44, jsou uvedeny v Tabulce 8.

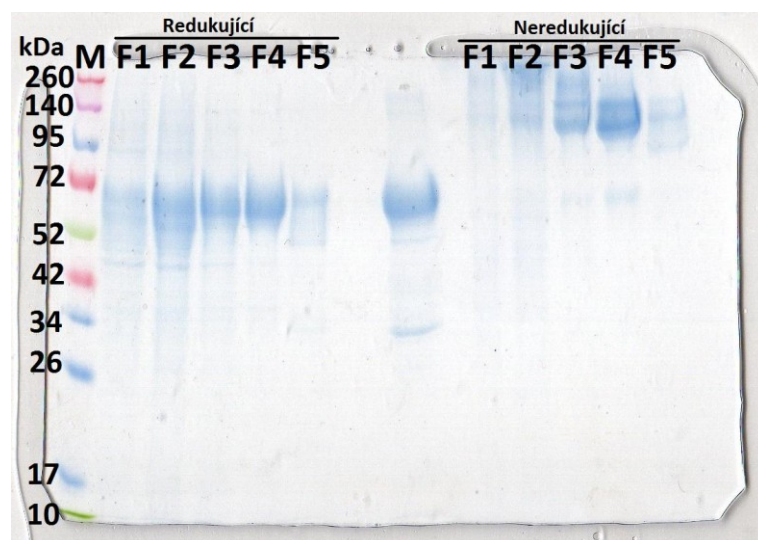
Tabulka 8: Eluční objemy a koncentrace příslušných verzí NKp44 (pYD5) ve frakcích z gelových permeačních chromatografií.

NKp44			NKp44M		
Frakce	Eluční objem [ml]	Koncentrace [mg/ml]	Frakce	Eluční objem [ml]	Koncentrace [mg/ml]
1	8,45	0,184	1	7,99	0,457
2	9,45	0,284	2	8,99	1,507
3	10,45	0,253	3	9,99	0,604
4	11,45	0,409	4	10,99	2,067
5	12,45	0,029	5	11,99	0,336
6	13,45	0,016	6	12,99	0,015

Vybrané frakce poté byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Elektroforeogram získaný analýzou produkovaného NKp44 je uveden na Obrázku 31 a elektroforeogram získaný analýzou NKp44M je na Obrázku 32.



Obrázek 31: Elektroforeogram analýzy NKp44 (pYD5). 10% polyakrylamidový gel s jednotlivými frakcemi z gelové permeační chromatografie NKp44. Velikost produkovaného proteinu NKp44 včetně Fc fragmentu by měla být 47819 Da (bez glykosylace). M značí marker, F s příslušnými čísly jednotlivé frakce v redukujícím i neredukujícím prostředí.



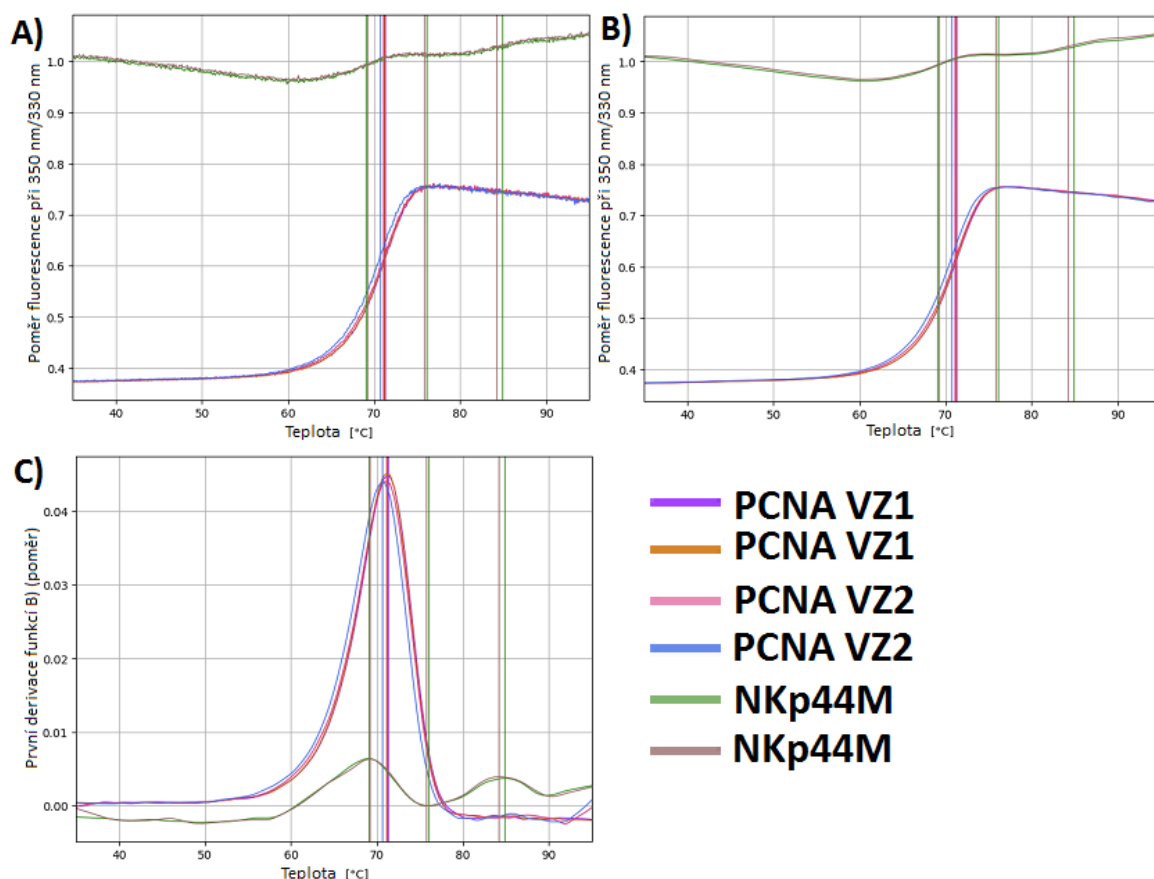
Obrázek 32: Elektroforeogram analýzy NKp44M (pYD5). 10% polyakrylamidový gel s jednotlivými frakcemi z gelové permeační chromatografie NKp44M. Velikost produkovaného proteinu NKp44M včetně Fc fragmentu by měla činit 47803 Da (bez glykosylace). M značí marker, F s příslušnými čísly jednotlivé frakce v redukujícím i neredukujícím prostředí.

5.5 Charakterizace interakce proteinů NKp44 a PCNA

Z produkovaných proteinů byl pro stanovení interakce vybrán fúzní konstrukt NKp44M produkovaný pomocí vektoru pHLsecFcHis (frakce 4). Jeho vazebný partner, PCNA, byl

připraven již dříve [57]. Interakce byla charakterizována pomocí biofyzikálních metod MST a AUC.

Před charakterizací interakce mezi zmíněnými proteiny byla provedena analýza stavu sbalení proteinu. Byla sledována závislost změny vnitřní fluorescence obou proteinů na teplotě. Pro tento experiment byl použit přístroj Tycho. Získané závislosti jsou uvedeny na Obrázku 33.



Obrázek 33: Výsledné závislosti změny vnitřní fluorescence proteinů NKp44M (pHLsecFchis) a PCNA na teplotě a derivace získané funkce. A) Hrubá data naměřená přístrojem. B) Křivky vytvořené vyhlazením hrubých dat. C) První derivace funkcí z „B)“ podle teploty. Svislé čáry znázorňují pozici inflexních bodů, resp. lokální minima a maxima v 1. derivaci.

5.5.1 Charakterizace interakce NKp44 a PCNA pomocí MST

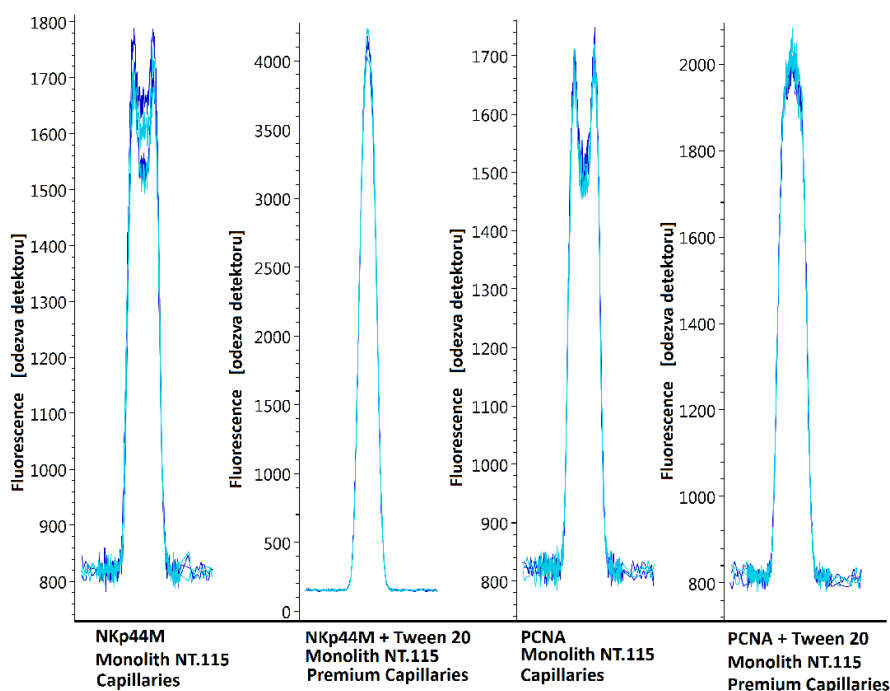
Pro tento experiment byly nejprve oba proteiny značeny fluorescenční sondou (pro samotné měření byl pak použit vždy jen jeden z vazebných partnerů nesoucí fluorescenční

značku). Po značení proteinů byla změřena jejich koncentrace a stupeň úspěšnosti značení (DOL). Získané hodnoty shrnuje Tabulka 9.

Tabulka 9: Koncentrace a úspěšnost značení proteinů PCNA a NKp44M (pHLsecF₆His) po jejich fluorescenčním značení.

Vzorek	Úspěšnost značení [%]	Koncentrace [μM]
NKp44M	24,6	2,24
PCNA	11,0	4,67

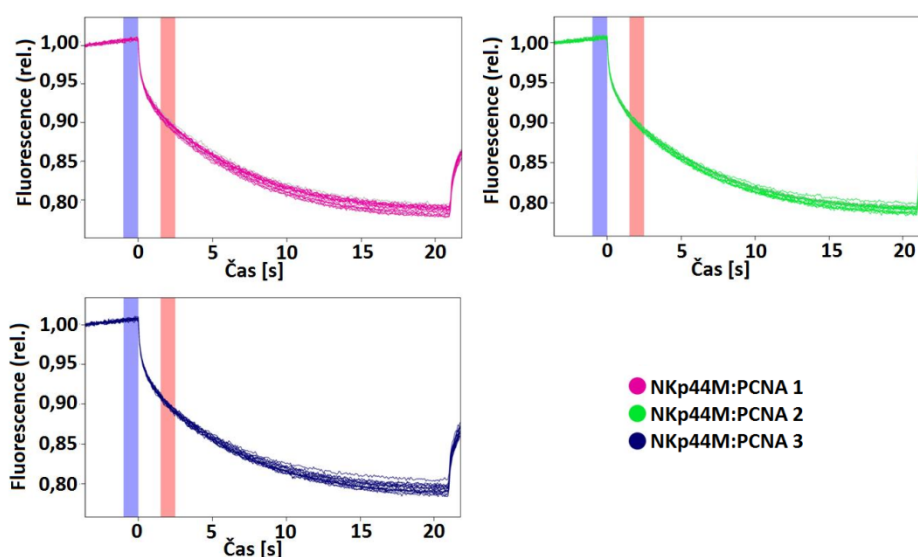
Značené proteiny byly ředěny dle pokynů na výslednou koncentraci 5 nM a byl s nimi proveden pretest. Vzorky byly nejprve analyzovány v kapilárách Monolith NT.115. Vzhledem k vysoké míře adsorpce proteinů ke kapilárám byly dále použity kapiláry Monolith NT.115 Premium a do pufru, ve kterém byly proteiny rozpuštěny, byl přidán Tween 20 v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace činila 0,05 %. Výsledky pretestu shrnuje Obrázek 34.



Obrázek 34: Výsledky pretestu značených proteinů NKp44M a PCNA. Pro každý z proteinů je nejprve uveden pretest se vzorkem v kapilárách Monolith NT.115. Druhý sken kapilár je pro oba vzorky proveden s přidavkem 0,05 % Tween 20 a kapilárami Monolith NT.115 Premium. Tmavě modrá křivka byla získána měřením před MST, světle modrá byla získána provedením pretestu po MST.

Na základě výsledků pretestu bylo zvoleno uspořádání experimentu, ve kterém byl použit značený protein NKp44M ředěný na výslednou koncentraci 5 nM. NKp44M byl titrován neznačeným proteinem PCNA. Nejvyšší koncentrace PCNA činila 40,56 μM (1,205 mg/ml) a klesala dvojkovou ředící řadou v 16 vzorcích, kterými byly později naplněny kapiláry pro samotný MST experiment. Do reakčního pufru (HEPES pufr použitý pro gelovou permeační chromatografii) byl přidán Tween 20 o výsledné koncentraci 0,05 % a byly použity kapiláry Monolith NT.115 Premium.

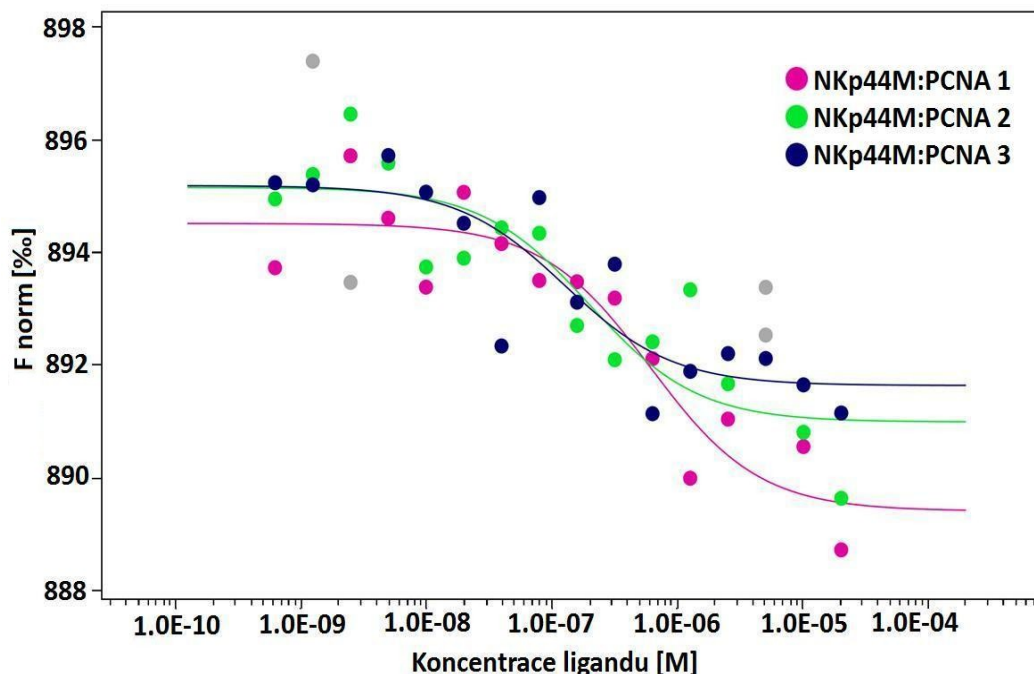
Samotné měření bylo provedeno v tripletu, přičemž každá série vzorků byla měřena nejprve při nízkém MST výkonu, poté se středním výkonem, a nakonec s nejvyšším možným nastavením MST výkonu. Excitace fluoroforu byla během všech měření nastavena na 60 %. Pro vyhodnocení byla vybrána série měření při nejvyšším možném výkonu MST. Pro výpočet K_d byly použity časové intervaly -1–0 s před a 1,5–2,5 s po excitaci vzorku. Výsledek tohoto experimentu je uveden na Obrázku 35.



Obrázek 35: Průběh MST měření vzorků obsahujících NKp44M a PCNA. Data byla sbírána při nejvyšším možném výkonu MST a 60% síle excitace fluoroforu. Vzorky byly nanášeny v kapilárách Monolith NT.115 Premium a byl přidán 0,05 % Tween 20. Časové intervaly -1–0 s před a 1,5–2,5 s po excitaci vzorku byly použity pro další analýzu. Tyto časové úseky jsou znázorněny modrými a růžovými sloupci.

Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu MO.Affinity Analysis. Pomocí tohoto programu byla určena normalizovaná hodnota fluorescence (odezva detektoru) pro každý vzorek – tedy pro každou koncentraci ligandu (PCNA). Tyto hodnoty byly vyneseny do grafu a proloženy vazebnou křivkou sigmoidního tvaru, ze které byla vypočtena

hodnota pro disociační konstantu pozorovaného komplexu (pro vazebný model o stechiometrii 1:1). Graf je uveden na Obrázku 36. Hodnoty disociační konstanty komplexu NKp44M:PCNA, určené z jednotlivých měření, jsou uvedeny v Tabulce 10.



Obrázek 36: Závislost podílu normalizovaných hodnot fluorescence na koncentraci PCNA. Normalizované hodnoty fluorescence byly získány z údajů naměřených v časových intervalech -1,0–0 s před a 1,5–2,5 s po excitaci vzorků. Různé barvy křivek a bodů odpovídají různým měřením (experiment byl proveden v triplicátu), šedé body nebyly zahrnuty do vyhodnocení, neboť se jevily jako příliš odlehlé.

Tabulka 10: Hodnoty disociační konstanty komplexu NKp44M:PCNA.

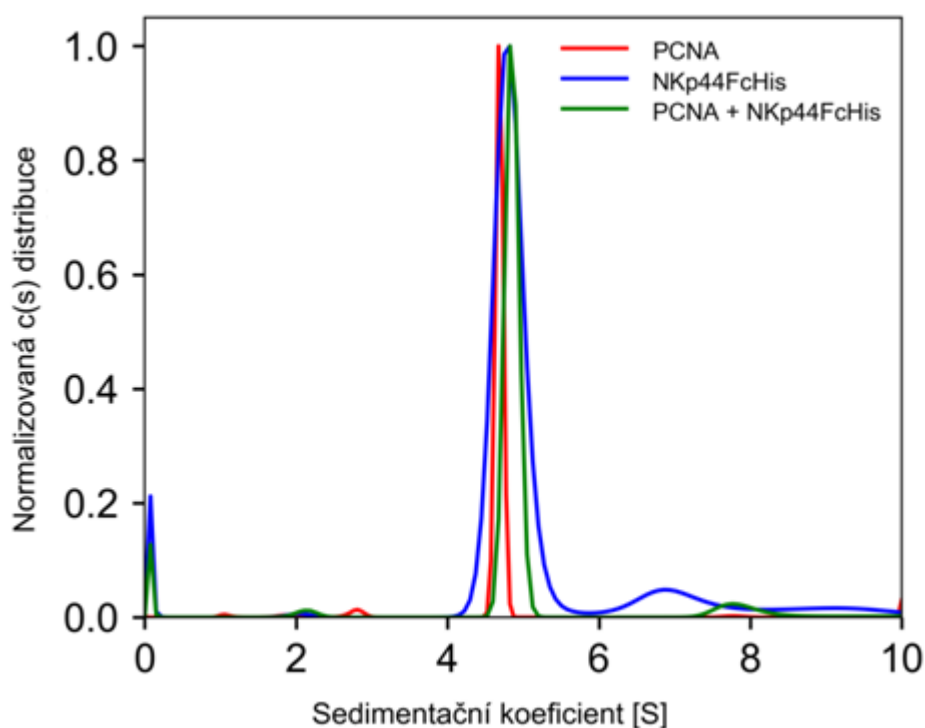
Vzorek	Disociační konstanta [nM]	Přesnost určení disociační konstanty [nM]
NKp44M:PCNA 1	607	± 316
NKp44M:PCNA 2	197	± 139
NKp44M:PCNA 3	124	± 936

5.5.2 Charakterizace interakce NKp44:PCNA pomocí AUC

Sedimentační analýzu provedl na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. metodou sedimentační rychlosti [58]. Data byla sbírána při 48000 ot./min a 20 °C, bylo snímáno 200 snímků po 3 min při vlnové délce 280 nm.

Pro tento experiment byla použita opět mutovaná forma proteinu NKp44 produkovaná pomocí vektoru pHLsecFcHis s neodštěpeným Fc fragmentem. U vzorku PCNA byla před AUC experimentem provedena výměna pufru, neboť tento vzorek byl skladován v pufru s 10% podílem glycerolu. Oba proteiny byly nejprve analyzovány samostatně, poté ve směsi s molárním poměrem NKp44:PCNA odpovídajícím 1:1. Normalizovanou distribuci sedimentačního koeficientu zobrazuje Obrázek 38.

Protein PCNA má pozorovanou hodnotu sedimentačního koeficientu přepočtenou na standardní podmínky (20 °C, čistá voda) $s_{20,w} = 4,92$ S. Analýza oligomerního stavu PCNA byla provedena již dříve a potvrdila nativní stav proteinu, tedy trimer [57]. Pro samotný fúzní konstrukt proteinu NKp44M byla pozorovaná hodnota sedimentačního koeficientu přepočtena na standardní podmínky $s_{20,w} = 5,10$ S. Stejný výsledek, $s_{20,w} = 5,10$ S, byl pozorován i pro směs obou vazebných partnerů, což vyvrátilo hypotézu o interakci mezi těmito proteiny ve směsném vzorku, která by se měla projevit přítomností částice s vyšší hodnotou sedimentačního koeficientu.



Obrázek 38: Distribuce sedimentačního koeficientu pro protein PCNA, NKp44M (pHLsecFcHis) a směs obou proteinů v molárním poměru 1:1. Graf zobrazuje normalizovanou distribuci sedimentačního koeficientu částic přítomných v analyzovaném vzorku. Sedimentační koeficient odpovídající trimeru PCNA přepočtený na standardní podmínky je $s_{20,w} = 4,92$ S, pro samotný NKp44M je $s_{20,w} = 5,10$ S a pro směs obou proteinů byla stejná hodnota určena také $s_{20,w} = 5,10$ S.

6 Diskuze

Geny kódující proteiny NKp44 a NKp44M byly amplifikovány a vloženy do příslušných vektorů, kterými byla transfekována buněčná linie HEK293S GnTI. V rámci diplomové práce byly pro tento účel použity plazmidy pHLsecFcHis a pYD5. Pomocí obou těchto plazmidů byly produkovány proteiny ve formě fúzního konstruktů s Fc fragmentem lidského imunoglobulinu G (IgG). Produkované proteiny byly v případě obou těchto produkčních vektorů produkovány sekretované do média. Nad rámec této práce probíhá ještě příprava produkčních vektorů za použití plazmidů pTW5 a pTW5sec. Tyto vektory by produkovaly protein NKp44 (případně NKp44M) bez Fc fragmentu. V případě plazmidu pTW5sec by šlo o sekretovanou produkci proteinu do média, zatímco v případě plazmidu pTW5 by produkce probíhala intracelulárně.

Připravované konstrukty NKp44 vykazovaly ve všech případech kromě produkce NKp44M pomocí vektoru pHLsecFcHis určitou míru agregace produkovaného proteinu, jak je vidět na chromatogramech získaných během gelových permeačních chromatografií, které jsou na Obrázcích 19, 29 a 30. Z tohoto důvodu bylo dodatečně přistoupeno k přípravě nových konstruktů pomocí vektorů pTW5 a pTW5sec. Porovnání výtěžků proteinu NKp44 a NKp44M je uvedeno v Tabulce 11. Do tohoto porovnání byly zahrnuty pouze ty proteinové frakce, ve kterých nebyly na základě dat získaných během gelových permeačních chromatografií a SDS elektroforéz přítomny agregáty. Všechny produkce zahrnuté do porovnání výtěžků proteinů probíhaly v objemu 200 ml buněčné suspenze transfekované daným vektorem. Pro další experimenty (AUC a MST) byl vybrán konstrukt NKp44M pHLsecFcHis.

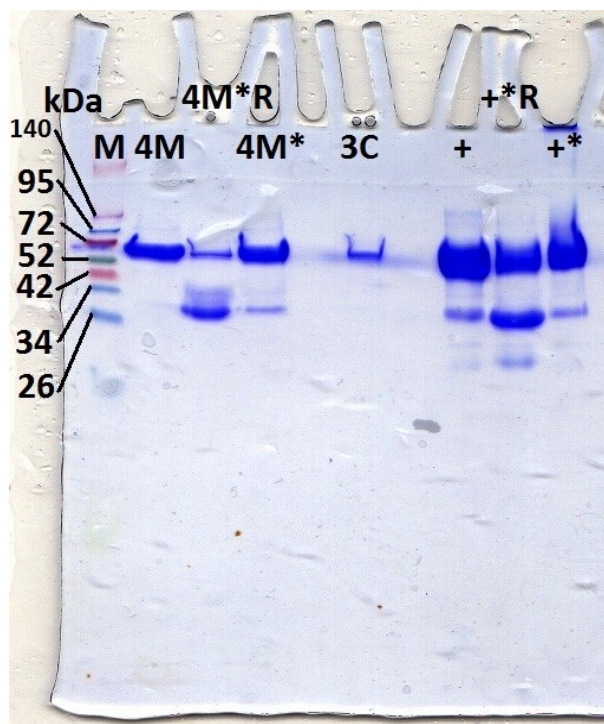
Tabulka 11: Porovnání výtěžků jednotlivých konstruktů NKp44 produkovaných ve 200 ml suspenze buněčné linie HEK293S GnTI.

Vzorek	Celkový výtěžek [μg]
NKp44 (pHLsecFcHis)	804
NKp44M (pHLsecFcHis)	1701
NKp44 (pYD5)	691
NKp44M (pYD5)	2418

Konstrukt NKp44M produkováný pomocí plazmidu pHLsecFcHis vykazuje určitou míru sbalení proteinu, jak ukazuje Obrázek 33. Na křivce závislosti poměru vnitřní

fluorescence při 350 a 330 nm na teplotě můžeme pozorovat více inflexních bodů, které by mohly odpovídat denaturačním teplotám Fc fragmentu a samotného NKp44M.

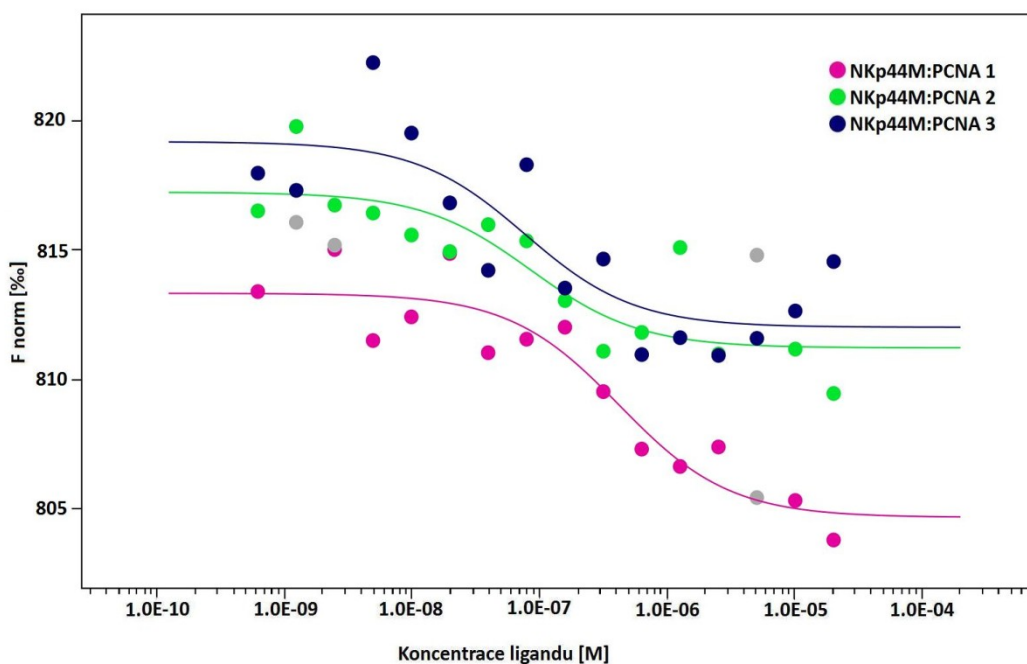
Diskutabilní výsledek přineslo štěpení tohoto konstruktu pomocí MBP-3C proteázy, jak je vidět na Obrázku 25. Ač by velikost konstruktu MBP-3C proteázy měla být větší než velikost konstruktu NKp44M, na elektroforeogramu se jeví jako téměř stejně velké. Zde je potřeba vzít v úvahu glykosylaci NKp44M. Jedno místo pro N-glykosylaci je na Fc fragmentu a jedno na samotném konstruktu NKp44M. Buněčná linie HEK293S GnTI zprostředkovává glykosylaci ve formě oligosacharidu, který je složený ze dvou jednotek N-acetylglukosaminu a pěti jednotek manózy (Asn-GlcNAc₂-Man₅). Každé z míst pro tuto glykosylaci tak může nést oligosacharid o velikosti 843 Da. Protein NKp44M byl na rozdíl od MBP-3C proteázy, která byla produkována v bakteriálním produkčním systému *E. coli* BL21(DE3), produkována v buněčné linii HEK293S GnTI. V neredukujícím vzorkovém pufru můžeme na Obrázku 25 pozorovat produkt štěpení o velikosti asi 27 kDa, což by odpovídalo velikosti odštěpeného Fc fragmentu. Tuto hypotézu potvrzuje i analýza štěpených produktů v neredukujícím prostředí, kde Fc fragment pravděpodobně dimerizuje prostřednictvím disulfidické vazby a tvoří tak na elektroforeogramu proužek odpovídající dvojnásobné velikosti. Velikost odštěpeného NKp44M by měla činit asi 19 kDa. Na elektroforeogramu pozorujeme jen slabý proužek o velikosti asi 34 kDa. Vzhledem k absenci pozitivní kontroly nepřineslo štěpení MBP-3C proteázou jednoznačný výsledek. Nelze proto vyloučit, že proteinový konstrukt nesoucí NKp44M je v naprostém pořádku, ale připravená MBP-3C proteáza nevykazuje aktivitu (v minulosti však již byla tato proteáza v laboratoři vedoucího práce úspěšně připravena a byla aktivní). Z tohoto důvodu byla buněčná linie HEK293S GnTI opět transfekována vektorem NKp44M pHLsecFcHis. Nově produkováný protein byl MBP-3C proteázou štěpen v redukujícím (5 mM 2-merkapt ethanol) i neredukujícím prostředí. Navíc byl nyní pro ověření aktivity MBP-3C proteázy štěpen i vzorek pozitivní kontroly, který během prvního pokusu o štěpení fúzního konstruktu NKp44M nebyl k dispozici. Pozitivní kontrolu tvořil konstrukt připravený pomocí vektoru pHLsecFcHis – R2 (homolog potkaního receptoru podobného C-lektinům připravený ve formě, která je schopna rozpoznat svůj ligand, ale dále není schopna spustit signalizaci). Tento protein byl již dříve připraven v laboratoři školitele. Výsledek štěpení byl analyzován pomocí elektroforezy v polyakrylamidovém gelu. Elektroforeogram je uveden na Obrázku 39 na následující straně.



Obrázek 39: Elektroforeogram analýzy štěpení MBP-3C proteázou. 15% polyakrylamidový gel se vzorky NKp44M (pHLsecFcHis) a pozitivní kontroly získané štěpením MBP-3C proteázou (všechny v redukujícím vzorkovém pufru). Velikost produkovaného proteinu NKp44 včetně Fc fragmentu by měla být 46029 Da (bez glykosylace), velikost odštěpeného Fc fragmentu 26814 Da, velikost odštěpeného NKp44M 19408 Da, velikost MBP-3C proteázy 64327 Da a velikost fúzního konstrukt vzorku pozitivní kontroly 43062 Da (přičemž Fc fragment je zde stejný jako u produkovaného NKp44M). M značí marker, 4M značí vzorky NKp44M (pHLsecFcHis), 3C značí vzorky MBP-3C proteázy a + značí vzorek pozitivní kontroly. Vzorky označené hvězdičkou byly štěpeny MBP-3C proteázou, vzorky označené hvězdičkou a písmenem R byly štěpeny v redukujícím prostředí (5 mM 2-merkapt ethanol)

Jak vyplývá z elektroforeogramu na Obrázku 39, MBP-3C proteáza je aktivní v redukujícím prostředí. Vzorek pozitivní kontroly byl úspěšně štěpen stejně jako vzorek NKp44M, po jehož štěpení již nezbyl v analyzovaném vzorku původní fúzní konstrukt. I přesto, že se podařilo ověřit aktivitu proteázy, není úplně jasné, jestli byl štěpením fúzního konstrukt získán požadovaný fragment NKp44M. Velikost pozorovaného proužku na elektroforeogramu na Obrázku 39 totiž nesouhlasí s očekávanou velikostí tohoto proteinu (19 kDa). Štěpení proteinu NKp44M za takovýchto podmínek však není vhodné, neboť by došlo k redukci disulfidických můstků v molekule proteinu. Pro štěpení většího množství produkovaného fúzního konstrukt NKp44M bude proteáza redukována, poté bude provedena výměna pufru tak, aby bylo odstraněno redukční činidlo z roztoku proteázy, která bude ihned použita pro štěpení.

Výsledky MST experimentu ukazují na přítomnost interakce mezi připravenými proteiny, ovšem je potřeba vzít v úvahu nepřesnosti výsledků způsobené proložením experimentálně získaných bodů vazebnou křivkou. Hodnoty přesnosti proložení jsou uvedeny v Tabulce 10. Pokud jsou hodnoty disociační konstanty stanoveny z MST experimentů v jiných časových intervalech od excitace než 1,5–2,5 s, výsledky jsou velmi odlišné. Vyhodnocení stejného experimentu za použití časového intervalu 9–10 s po excitaci vzorku je pro ilustraci uvedeno na Obrázku 40.



Obrázek 40: Závislost podílu normalizované hodnoty fluorescence na koncentraci PCNA. Normalizované hodnoty fluorescence byly získány z údajů naměřených v časových intervalech -1,0–0 s před a 9,0–10,0 s po excitaci vzorků. Různé barvy křivek a bodů odpovídají různým měřením (experiment byl proveden v triplikátu), šedé body nebyly zahrnuty do vyhodnocení. Pro porovnání byly vynechány stejné body, které nebyly zahrnuty do prvního vyhodnocení.

Pro porovnání byly z této analýzy vynechány stejné experimentální body, které byly vynechány během prvního vyhodnocení. Získané hodnoty disociační konstanty společně s hodnotami získanými během prvního vyhodnocení experimentu jsou uvedeny v Tabulce 12 na následující straně.

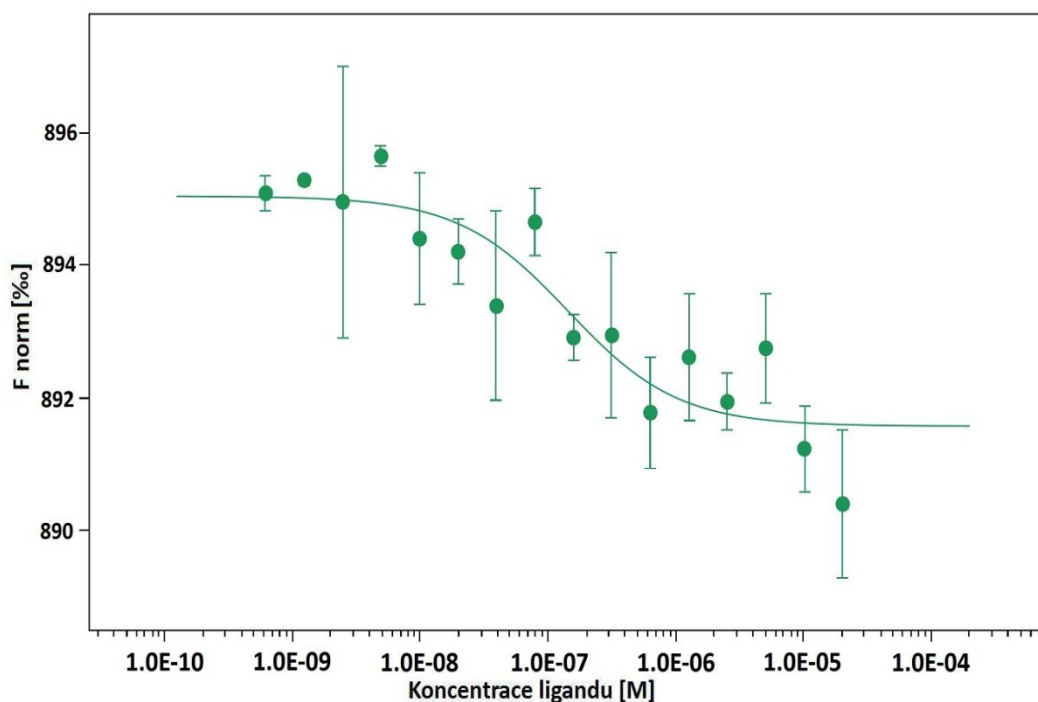
Tabulka 12: Hodnoty disociační konstanty komplexu NKp44M:PCNA

Použité časové intervaly	Vzorek	Disociační konstanta [nM]	Přesnost určení disociační konstanty [nM]
-1,0–0 s a 1,5–2,5 s	NKp44M:PCNA 1	607	± 316
	NKp44M:PCNA 2	197	± 139
	NKp44M:PCNA 3	124	± 936
-1,0–0 s a 9,0–10,0 s	NKp44M:PCNA 1	421	± 202
	NKp44M:PCNA 2	831	± 672
	NKp44M:PCNA 3	749	± 650

Experimentální data získaná pomocí MST experimentu byla vyhodnocována různými způsoby. Během dalšího způsobu vyhodnocení byly experimentální body získané během jednotlivých měření tripletu v sérii průměrovány. Průměrovanými hodnotami podílů normalizovaných hodnot fluorescence byla v závislosti na koncentraci ligandu (PCNA) proložena vazebná křivka stejně jako v jednotlivých případech vyhodnocení na Obrázcích 36 a 40. Příklad tohoto typu vyhodnocení experimentu je uveden na Obrázku 41. Tento graf byl sestaven za použití průměru bodů z druhé a třetí série měření (zelené a modré body na Obrázcích 36 a 40), přičemž v tomto případě žádný experimentální bod nebyl v rámci vyhodnocení vynechán.

Ani tento způsob vyhodnocení experimentu nepřinesl výsledek, ze kterého by mohla být jasně určena hodnota disociační konstanty. Stejně jako v předchozím případě vyhodnocení se výsledek pohybuje v řádu stovek nM v závislosti na časových intervalech, ve kterých byl pokus vyhodnocen. Už jen z rozptylů podílů normalizovaných hodnot fluorescence, které vznikly průměrováním hodnot při jednotlivých pokusech vyplývá, že získaný výsledek nemá příliš velkou výpovědní hodnotu.

Výsledek MST experimentu není jednoznačný, ale naznačuje možnost interakce mezi studovanými proteiny.



Obrázek 40: Závislost podílu normalizovaných hodnot fluorescence na koncentraci PCNA. Normalizované hodnoty fluorescence byly získány z údajů naměřených v časových intervalech -1,0–0 s před a 1,5–2,5 s po excitaci vzorků. Během vyhodnocení byly vytvořeny průměry podílů hodnot normalizovaných fluorescencí získaných během druhé a třetí série měření triplikátu. Takto získané hodnoty podílů normalizovaných hodnot fluorescence byly pro každou z koncentrací ligandu (PCNA) vyneseny do grafu a byla jimi proložena vazebná křivka.

Analýza provedená pomocí AUC poukazuje na výsledek opačný, než jaký byl získán pomocí MST experimentu. Distribuce sedimentačních koeficientů měřených proteinů (NKp44M pHLsecFchis, PCNA a jejich směs) na Obrázku 38 ukazuje tři velmi podobné píky. Jeden odpovídá měření samotného konstruktu NKp44, jeden odpovídá samotnému PCNA a poslední byl získán měřením směsi obou proteinů. Pokud by spolu proteiny interagovaly, byl by pravděpodobně pozorován ztelně vyšší sedimentační koeficient vzniklého komplexu, ovšem distribuce pro směsný vzorek odpovídá pouze překryvu vrcholů pro její jednotlivé složky. V distribuci lze sice pozorovat menší vrchol při zhruba 8 S, stejně tak lze ovšem v distribuci pro samotné NKp44M pozorovat přítomnost menšího množství vyšších oligomerů, resp. agregátů (vrcholy při 7 a 9 S), a tedy tento malý vrchol u směsného vzorku nemusí znamenat přítomnost komplexu, ale pouze agregátů NKp44M. Tyto výsledky tedy spíše vyvrací hypotézu interakce mezi připravenými proteiny. Doposud byla interakce mezi proteiny NKp44 a PCNA charakterizována pouze metodou rezonance povrchového plazmonu, pomocí které byla určena disociační konstanta 3,4 nM [18].

Jedním z rozdílů mezi analýzami pomocí AUC a MST bylo fluorescenční značení NKp44M pro MST experiment. Značení bylo provedeno pomocí komerčně dostupné soupravy Monolith Protein Labelling kit RED-NHS 2nd Generation (NanoTemper Technologies, Německo). Takto vnášená fluorescenční značka se váže na primární aminy značeného vzorku (tedy na lyzin a terminální amin na N-konci proteinu). Není přesně známo, jaká část domény NKp44 se účastní vazby s jeho ligandem, PCNA. Jedna z publikovaných studií zabývajících se touto interakcí však poukazuje na peptidový úsek proteinu NKp44, který se velmi pravděpodobně vazby s PCNA účastní [38]. Součástí tohoto peptidu je i jeden zbytek lyzinu. Nelze tak vyloučit, že pozorovaná interakce je ovlivněna právě fluorescenčním značením připraveného proteinu.

7 Závěr

Protein NKp44 se podařilo připravit pomocí rekombinantní exprese za použití buněčné linie HEK293S GnTI. Byly připraveny různé vektory pro produkci tohoto receptoru, díky čemuž bylo exprimováno a purifikováno více variant požadovaného proteinu. Ze získaných proteinů byl vybrán nejvhodnější kandidát, fúzní konstrukt NKp44M produkovaný pomocí vektoru pHLsecFcHis, který byl použit pro další experimenty.

Pro štěpení vybraného konstruktů byla připravena 3C proteáza ve formě fúzního konstruktů MBP-3C. Byla ověřena aktivita této proteázy, pomocí které byl dále štěpen i vzorek fúzního konstruktů NKp44M (pHLsecFcHis).

Přesvědčivé výsledky, které by přinesly nové informace o vazbě ligandu PCNA na receptor NKp44, se však získat nepodařilo. Objasnění této interakce tak bude předmětem dalšího výzkumu stejně jako optimalizace produkce zmíněného receptoru.

8 Citovaná literatura

1. Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špišek, R., *Základy imunologie*. 5. vydání, 2013, Praha/Kroměříž: TRITON.
2. Rolstad, B., The early days of NK cells: an example of how a phenomenon led to detection of a novel immune receptor system - lessons from a rat model. *Front Immunol*, 2014. **5**: str. 283.
3. Giancchetti, E., Delfino, D.V., Fierabracci, A., NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmun Rev*, 2017. **17**(2): str. 142-154.
4. Fang, F., Xiao, W., Tian, Z., NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin Immunol*, 2017. **31**: str. 37-54.
5. Bellora, F., Castriconi, R., Dondero, A., Carrega, P., Mantovani, A., Ferlazzo, G., Moretta, A., Bottino, C., Human NK cells and NK receptors. *Immunol Lett*, 2013. **161**(2): str. 168-73.
6. Knorr, D.A., Bachanova, V., Verneris, M.R., Miller, J.S., Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Semin Immunol*, 2014. **26**(2): str. 161-72.
7. Moretta, L., Pietra, G., Vacca, P., Pende, D., Moretta, F., Bertaina, A., Mingari, M.C., Locatelli, F., Moretta, A., Human NK cells: From surface receptors to clinical applications. *Immunol Lett*, 2016. **178**: str. 15-9.
8. Sun, J.C., Lanier, L.L., Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol*, 2009. **39**(8): str. 2059-64.
9. Orange, J.S., Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect*, 2002. **4**(15): str. 1545-58.
10. Lam, V.C., Lanier, L.L., NK cells in host responses to viral infections. *Curr Opin Immunol*, 2017. **44**: str. 43-51.
11. Vivier, E., Nunès, J.A., Vély, F., Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science*, 2004. **306**: str. 1517-1519.
12. Topham, N.J., Hewitt, E.W., Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*, 2009. **128**(1): str. 7-15.
13. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., Brossay, L., Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(4): str. 239-52.
14. Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., Vivier, E., Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol*, 2013. **92**(3): str. 221-9.
15. Getahun, A., Cambier, J.C., Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol Rev*, 2015. **268**(1): str. 66-73.
16. Hudspeth, K., Silva-Santos, B., Mavilio, D., Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol*, 2013. **4**: str. 69.
17. Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A., NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): str. 2065-72.
18. Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M.Y., Afegan, F., Yossef, R., Rosenberg, L.A., Aharoni, A., Cerwenka, A., Campbell, K.S., Braiman,

- A., Porgador, A., Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol*, 2011. **187**(11): str. 5693-702.
19. Horton, N.C., Mathew, S.O., Mathew, P.A., Novel interaction between proliferating cell nuclear antigen and HLA I on the surface of tumor cells inhibits NK cell function through NKp44. *PLoS One*, 2013. **8**(3): str. e59552.
 20. Rajagopalan, S., Long, E.O., Found: a cellular activating ligand for NKp44. *Blood*, 2013. **122**(17): str. 2921-2.
 21. Cantoni, C., Ponassi, M., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M., Bordo, D., The three-dimensional structure of the human NK cell receptor NKp44, a triggering partner in natural cytotoxicity. *Structure*, 2003. **11**(6): str. 725-34.
 22. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
 23. Miyachi, K., Fritzler, M.J., Tan, E.M., Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol*, 1978. **121**(6): str. 2228-34.
 24. Bravo, R., Celis, J.E., A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol*, 1980. **84**(3): str. 795-802.
 25. Bravo, R., Fey, S.J., Bellatin, J., Larsen, P.M., Celis, J.E., Identification of a nuclear polypeptide ("cyclin") whose relative proportion is sensitive to changes in the rate of cell proliferation and to transformation. *Prog Clin Biol Res*, 1982. **85 Pt A**: str. 235-48.
 26. Prelich, G., Tan, C.-K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M., Stillman, B., Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*, 1987. **326**(6112): str. 517-520.
 27. Tan, C.K., Castillo, C., So, A.G., Downey, K.M., An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem*, 1986. **261**(26): str. 12310-6.
 28. Maga, G., Hubscher, U., Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 15): str. 3051-60.
 29. Bruning, J.B., Shamoo, Y., Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure*, 2004. **12**(12): str. 2209-19.
 30. Hingorani, M.M., O'Donnell, M., Sliding clamps: a (tail)ored fit. *Curr Biol*, 2000. **10**(1): str. R25-9.
 31. Kuriyan, J., O'Donnell, M., Sliding clamps of DNA polymerases. *J Mol Biol*, 1993. **234**(4): str. 915-25.
 32. Yao, N.Y., O'Donnell, M., DNA Replication: How Does a Sliding Clamp Slide? *Curr Biol*, 2017. **27**(5): str. R174-R176.
 33. De March, M., Merino, N., Barrera-Vilarmau, S., Crehuet, R., Onesti, S., Blanco, F.J., De Biasio, A., Structural basis of human PCNA sliding on DNA. *Nat Commun*, 2017. **8**: str. 13935.
 34. Ivanov, I., Chapados, B.R., McCammon, J.A., Tainer, J.A., Proliferating cell nuclear antigen loaded onto double-stranded DNA: dynamics, minor groove interactions and functional implications. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(20): str. 6023-33.
 35. Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., Kuriyan, J., Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*, 1996. **87**(2): str. 297-306.
 36. Campbell, K.S., Yusa, S., Kikuchi-Maki, A., Catina, T.L., NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol*, 2004. **172**(2): str. 899-906.

37. Stoimenov, I., Helleday, T., PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans*, 2009. **37**(Pt 3): str. 605-13.
38. Shemesh, A., Kundu, K., Peleg, R., Yossef, R., Kaplanov, I., Ghosh, S., Khrapunsky, Y., Gershoni-Yahalom, O., Rabinski, T., Cerwenka, A., Atlas, R., Porgador, A., NKp44-Derived Peptide Binds Proliferating Cell Nuclear Antigen and Mediates Tumor Cell Death. *Front Immunol*, 2018. **9**: str. 1114.
39. Lu, Y., Xiao, S., Yuan, M., Gao, Y., Sun, J., Xue, C., Using overlap-extension PCR technique to fusing genes for constructing recombinant plasmids. 2017. str. 273-276.
40. Bryksin, A.V., Matsumura, I., Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 2010. **48**(6): str. 463-5.
41. NanoTemper, The Researcher's Guide to Measuring Binding Affinity and Why It Matters; dostupné na: <https://resources.nanotempertech.com/> citováno 26. 3. 2019, NanoTemper.
42. Seidel, S.A.I., Dijkman, P.M., Lea, W.A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazic, A., Joseph, J.S., Srinivasan, P., Baaske, P., Simeonov, A., Katritch, I., Melo, F.A., Ladbury, J.E., Schreiber, G., Watts, A., Braun, D., Duhr, S., Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*, 2013. **59**: str. 301-315.
43. NanoTemper, <https://nanotempertech.com/monolith/> citováno 26. 3. 2019.
44. Obrázek NanoTemper Monolith NT.115 Pico <https://media.biocompare.com/m/37/product/7141925-400x300.jpg> citováno 26. 3. 2019.
45. Kalkulátor teploty nasedání primerů: <http://tmcalculator.neb.com/#/> Citováno 20. 3. 2019, New England Biolabs.
46. DNA standard 100 bp <https://www.neb.com/products/n3231-100-bp-dna-ladder> Citováno 20. 3. 2019, New England Biolabs.
47. DNA standard 1 kb <https://www.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder> Citováno 20. 3. 2019, New England Biolabs.
48. Souprava pro čištění DNA z agarosového gelu <http://www.mn-net.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNAPurification/Cleanup/NucleoSpinGelandPCRCleanup/tabid/1452/language/en-US/Default.aspx> Pracovní protokol: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20cleanup/UM_PCRcleanup_Gelex_NSGelPCR.pdf Citováno 20. 3. 2019.
49. Souprava pro nízkoobjemovou preparaci plasmidové DNA <http://www.mn-net.com/tabid/1379/default.aspx> Pracovní protokol: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf Citováno 20. 3. 2019.
50. Online program pro porovnávání sekvencí: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> Citováno 20. 4. 2019.
51. Souprava pro velkoobjemovou preparaci plasmidové DNA <http://www.mn-net.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNAPurification/PlasmidDNApurificationeasysfasterreliable/NucleoBondXtraplasmidMidiprepMaxiprepkits/tabid/1479/language/en-US/Default.aspx> Pracovní protokol: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBoXtraEF.pdf Citováno 21. 3. 2019.
52. Kalkulátor ProtParam: <https://web.expasy.org/protparam/> Citováno 25. 3. 2019.

53. NanoTemper, Pracovní protokol Monolith Protein Labeling KitRED-NHS 2nd Generation For Monolith NT.115Seriesand NT.AutomatedInstruments withaRED Detector; Cat# MO-L011.
54. NanoTemper, Pracovní protokol Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA 2nd Generation; Cat Nr:L018.
55. Vacca, P., Cantoni, C., Prato, C., Fulcheri, E., Moretta, A., Moretta, L., Mingari, M.C., Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int Immunol*, 2008. **20**(11): str. 1395-405.
56. Alexandrov, A., Dutta, K., Pascal, S.M., MBP fusion protein with a viral protease cleavage site: one-step cleavage/purification of insoluble proteins. *Biotechniques*, 2001. **30**(6): str. 1194-8.
57. Herynek, Š., Rekombinantní příprava jaderného antigenu proliferujících buněk (PCNA). Bakalářská práce, 2017, Univerzita Karlova - Katedra biochemie: Praha.
58. Vaněk, O., Bezouška, K., Analytická ultracentrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy*, 2010. **104**(12): str. 1155-1162.

