

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Filip Hausleitner

**Vliv mutace S159A na oligomerní stav NKR-P1A receptoru
lidských NK buněk**

The influence of S159A mutation on the oligomeric state of human NK cell
receptor NKR-P1A

Bakalářská práce

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

Praha 2018

Prohlášení:

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

V Praze dne 24.5.2018

Podpis: _____
Filip Hausleitner

Poděkování:

Na tomto místě chci poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za veškerou podporu a za práci spojenou se sedimentační analýzou. Děkuji Mgr. Janu Bláhovi, Ph.D. za všechno co mě naučil v průběhu této práce, za jeho trpělivost a cenné rady. Za veškerou pomoc a ochotu poradit děkuji Mgr. Barboře Kalouskové, Mgr. Ondřeji Skořepovi, Celeste Abreu, Denisovi Cmuntovi, Štěpánu Herynkovi, Alžbetě Runové, Janě Houserové a Janu Horevajovi.

Upřímně děkuji mým nejbližším Janě a Viliamovi Hausleitnerovým, Radovanu Sahánkovi, Kristíně Margolienové, Kataríně Markové a Štěpánu Marešovi za Vaši nekonečnou víru ve mne a v lepší zítřky.

Abstrakt:

Přírozeně zabíječské buňky (NK buňky) jsou lymfocyty schopné ničit nádorové a viry infikované buňky bez předešlé antigenní senzitivace. Využívají k tomu svoje aktivační a inhibiční povrchové receptory, které interagují s povrchovými molekulami cílových buněk. Imunitní odpověď NK buněk závisí na celkovém součtu signálů z obou typů receptorů.

Receptor NKR-P1A lidských NK buněk patří do strukturní rodiny receptorů podobných lektinům C-typu. Tento receptor interaguje s jeho ligandem LLT1 ze stejné proteinové rodiny, přičemž tato interakce je charakterizována nízkou afinitou a vysokou specifitou. Vytvoření komplexu NKR-P1A:LLT1 mezi NK buňkou a cílovou buňkou inhibuje cytotoxicitu NK buňky, a tak je součástí regulace imunitní odpovědi.

V této práci byl studován vliv mutace S159A na oligomerní stav rozpustné ektodomény lidského NKR-P1A v roztoku. Pro tento účel byla úspěšně rekombinantně připravená mutantní forma rozpustné ektodomény lidského NKR-P1A G90-S225 S159A ve stabilně transfekovaných lidských embryonálních ledvinných buňkách 293 (HEK293S GnTI⁻). Připravený konstrukt byl purifikován pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie a následně analyzován pomocí SDS-PAGE a sedimentační analýzy. Výsledky potvrzují, že absence *N*-vázané glykosylace v pozici 157 podporuje dimerizaci ektodomény v roztoku.

(Práce je psaná v českém jazyce.)

Klíčová slova:

imunitní systém, rekombinantní exprese, HEK293, NKR-P1A, CD161, NK buňky, piggyBac

Abstract:

Natural killer cells (NK cells) are lymphocytes that possess cytotoxic activity against tumour or virally infected cells independent of preceding antigen sensitisation. To kill such cells, they utilise their activating and inhibitory surface receptors that interact with target cell surface molecules. The immune response carried by NK cells depends on the balance of both activating and inhibitory signals.

Human NK cell surface receptor NKR-P1A belongs to the structural family of C-type lectin-like receptors. This receptor interacts with its ligand LLT1, which belongs to the same protein family, with low affinity and high specificity. The NKR-P1A:LLT1 complex formed between NK cell and its target cell inhibits NK cell cytotoxicity, and hence is a part of the regulation of immune response.

This thesis studied the effect of S159A mutation on the stoichiometric state of soluble human NKR-P1A ectodomain in solution. Therefore, a mutant form of NKR-P1A G90-S225 S159A ectodomain was successfully produced in stably transfected human embryonic kidney cells 293 (HEK293S GnTI⁻). This construct was purified by affinity and size-exclusion chromatography, and analysed by SDS-PAGE and analytical ultracentrifugation. Our results show that the preclusion of *N*-linked glycosylation in the position 157 promotes the dimerization of the NKR-P1A ectodomain in solution.

(The thesis is written in Czech.)

Keywords:

immune system, recombinant expression, HEK293, NKR-P1A, CD161, NK cells, piggyBac

Seznam zkratek

ADCC	cytotoxická reakce závislá na protilátkách (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
CLEC	lektiny C-typu (C-type lectins)
CRD	sacharid-rozpoznávající doména (carbohydrate-recognition domain)
CTLD	domény podobné lektinům C-typu (C-type lectin-like domains)
CTLR	receptory podobné lektinům C-typu (C-type lectin-like receptors)
HEK293	Lidské embryonální ledvinné buňky 293 (human embryonic kidney cells 293)
IFN γ	interferon gama
IgG	imunoglobulin G
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)
ITS	inverzní terminální sekvence
IPEI	lineární polyethylenimin
LRC	komplex genů pro receptory leukocytů (leukocyte receptor complex)
MHC molekula třídy I	molekula hlavního histokompatibilního komplexu (major histocompatibility complex) první třídy
NCR	receptory přirozené cytotoxicity (natural cytotoxicity receptors)
NK buňky	přirozeně zabíječské buňky (natural killer cells)
NKC	genový komplex NK buněk (natural killer gene complex)
PBasa	<i>piggyBac</i> transposasa
rtTA	reverzní tetracyklinový transaktivátor (reverse tetracycline transactivator)
TLR	receptory podobné receptoru Toll (Toll-like receptor)
TRE	element responsivní pro tetracyklin (tetracycline response element)

Obsah

1. Literární úvod	8
1.1 Imunitní systém a NK buňky	8
1.1.1 Receptory NK buněk	9
1.1.1.1 Kategorizace receptorů NK buněk	11
1.1.1.2 Receptory NK buněk podobné lektinům C-typu	12
1.1.2 Lidský receptor NKR-P1A	14
1.1.2.1 Mutovaná forma lidského NKR-P1A	15
1.2 Lidské embryonální ledvinné buňky 293.....	17
1.2.1 Expresní transposonový systém <i>piggyBac</i>	17
2. Cíle práce	20
3. Materiál	21
3.1 Přístroje a pomůcky	21
3.2 Chemikálie	21
3.3 Buněčné linie	22
3.4 Vektory	22
3.5 Enzymy	22
3.6 Roztoky a média	23
3.6.1 Puřry a jiné roztoky	23
3.6.2 Kultivační média	23
4. Metody	24
4.1 Práce s buněčnými liniemi HEK293	24
4.1.1 Kultivace buněčné linie.....	24
4.1.2 Produkce mutovaného NKR P1A ve stabilně transfekované linii.....	24
4.1.3 Transfekce buněčné linie.....	25
4.1.4 Selektce stabilních linií.....	25
4.1.5 Indukce produkce konstruktů NKR-P1A S159A.....	25
4.2. Sklizení produkci.....	25
4.3 Afinity chromatografie	26
4.4 Zkoncentrování frakcí s obsahem proteinu NKR-P1A S159A.....	26
4.5 Gelová permeační chromatografie	26
4.6 Charakterizace připraveného proteinu	27
4.6.1 Stanovení koncentrace po gelové permeační chromatografii.....	27
4.6.2 Deglykosylace NKR-P1A S159A	27
4.6.3 Elektroforetická analýza proteinu v denaturujícím prostředí.....	27
4.6.4 Sedimentační analýza.....	28
5. Výsledky	29
5.1 Purifikace proteinu NKR-P1A S159A	29
5.2 Deglykosylace konstruktů NKR-P1A S159A.....	32
5.4 Sedimentační analýza oligomerního stavu NKR-P1 S159A v roztoku	33
6. Diskuse	35
7. Shrnutí.....	39
8. Seznam použité literatury.....	40

1. Literární úvod

1.1 Imunitní systém a NK buňky

Imunitní systém tvoří soubor biologických struktur a procesů, který si evolučně vyvinul komplexní mechanismy pro ochranu organismů před patogeny a cizorodými látkami. Buňky imunitního systému jsou odvozené z hematopoetických kmenových buněk, a tvoří adaptivní (specifický, přítomný jen u obratlovců) a nespecifický imunitní systém¹. Adaptivní imunitní systém zastupují T a B lymfocyty a nespecifický makrofágy, granulocyty, žírné buňky, krevní destičky a tzv. přirozeně zabíječské buňky zkracované jako NK buňky (z angl. natural killer cells). Avšak oba systémy jsou propojené, a ne vždy je možné je z funkčního hlediska striktně oddělit. Příkladem mohou být makrofágy – zástupci nespecifické imunity, které slouží také jako antigen prezentující buňky pro adaptivní imunitní odezvu¹.

V sedmdesátých letech 20. století byly poprvé objeveny a popsány myší NK buňky^{2,3}. Byly zařazeny jako buňky nespecifického imunitního systému, protože *in vitro* projevovaly cytotoxickou aktivitu vůči leukemickým buňkám nezávislou na předešlé senzitivaci protilátkou. Ukázalo se, že NK buňky napadají také alogenně transplantovanou tkáň⁴ a v osmdesátých letech byla pak prokázána jejich cytotoxická aktivita vůči mikrobiálním parazitům⁵. NK buňky mimo jiné participují na krvetvorbě⁶. Aktivované NK buňky sekretují granzymy a perforiny jimiž ničí nádorové buňky a viry nebo bakteriemi infikované buňky, a dále se podílí na regulaci imunitní odpovědi produkcí cytokinů – např. interferonu gama (IFN γ)⁷. Na rozdíl od imunitní odpovědi T lymfocytů, se kterými sdílejí společného lymfoidního progenitora⁸, je imunitní odpověď NK buněk rychlá, protože nezávisí na klonální specificitě a expanzi lymfocytů, která obecně trvá několik dní¹.

NK buňky jsou dnes charakterizovány především pomocí přítomnosti povrchového receptoru NKp46. Tento způsob identifikace NK buněk je specifičtější než dříve využívaná identifikace pomocí adhezní molekuly CD56, protože NKp46 je konzistentně exprimovaný u lidí, myší, potkanů, krav a tří druhů opic⁹. Tento fakt podporuje snahu pro unifikaci identifikace NK buněk pomocí NKp46 pro všechny savce⁹. Bohužel NKp46 je při bližší examinaci možné najít i u některých T lymfocytů, tudíž opravdu specifický marker NK buněk zatím chybí⁷.

1.1.1 Receptory NK buněk

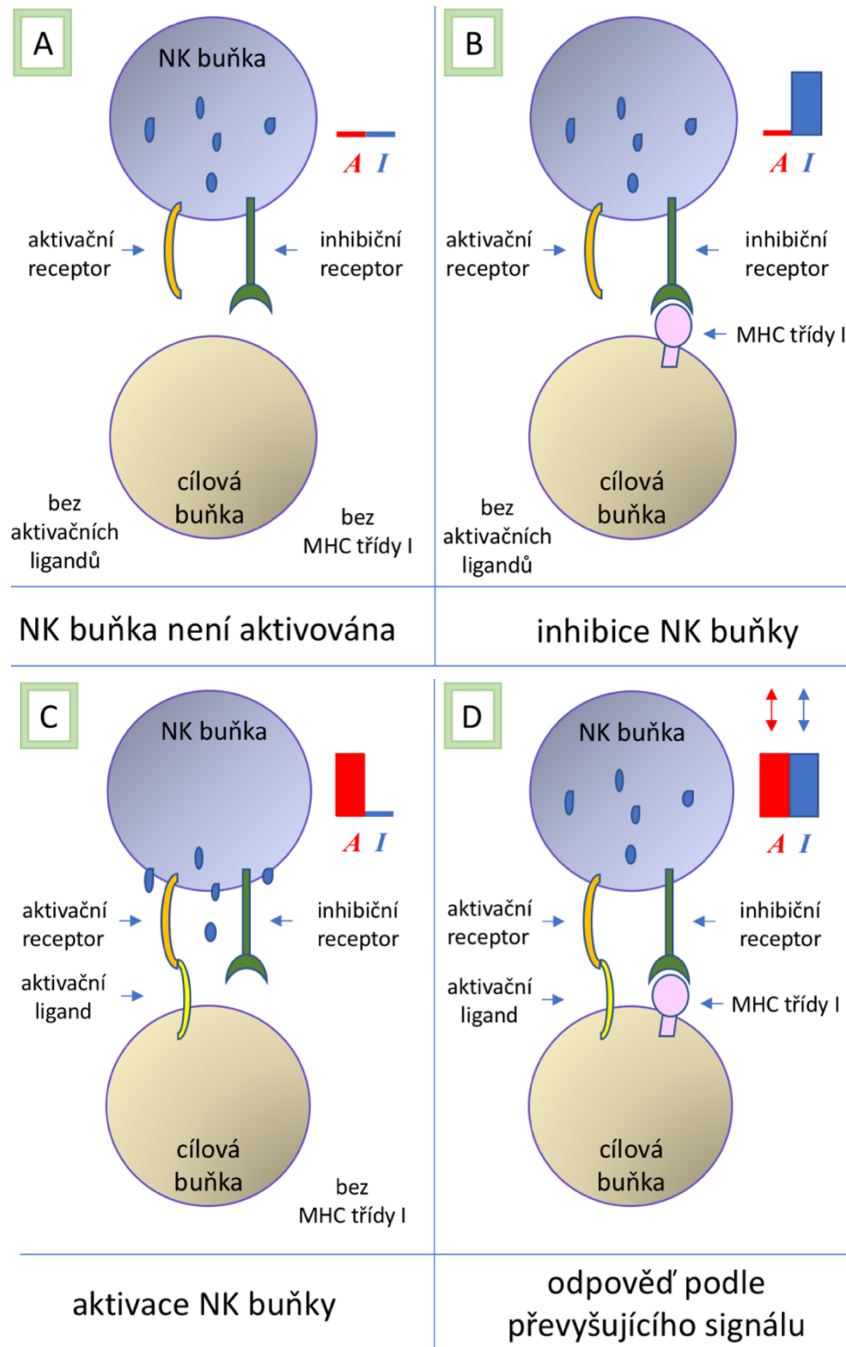
Pro rozeznání cílových buněk využívají NK buňky sofistikovaný repertoár aktivačních a inhibičních povrchových receptorů. Tyto receptory kontrolují aktivaci, proliferaci a efektorové funkce NK buněk skrze interakci s povrchovými molekulami cílových buněk^{8,10}. Rozpoznání a lýze cílových buněk závisí na komplexních mechanismech, které integrují různé signály, jež NK buňka souběžně získává. Tyto signály rozpoznává pomocí interakce mezi svými aktivačními a inhibičními receptory a různými ligandy exprimovaných na povrchu buněk⁷. Obecně lze říci, že inhibice cytotoxické odpovědi NK buněk je důsledkem dostatečného signálu od inhibičních receptorů, anebo nedostatečného aktivačního signálu zprostředkovaného aktivačními receptory¹⁰ (Obrázek 1, str. 10). Interakce receptorů NK buněk s jejich ligandy lze rozdělit do tří funkčních kategorií:

První kategorie je popsána tzv. missing-self konceptem¹¹. Nádorové buňky a buňky napadené virem často snižují povrchovou expresi MHC molekul třídy I, z důvodu úniku před specifickou imunitou. Absence těchto inhibičních ligandů vede u NK buněk k aktivaci jejich cytotoxické aktivity a zabití cílové buňky^{11,12}. Nicméně žádná nebo nízká povrchová exprese těchto molekul nemusí vést k cytotoxické odpovědi NK buněk (Obrázek 1, str. 10). Toto tvrzení potvrzuje fakt, že NK buňky nezabíjejí buňky tkání s nízkou (neurony) nebo žádnou (erytrocyty) expresí molekul MHC třídy I¹⁰. Jedním z důvodů může být nepřítomnost aktivačních ligandů na buňkách těchto tkání nebo přítomnost inhibičních ligandů nepatřících do rodiny molekul MHC třídy I¹⁰.

V případě nehomeostatických podmínek (např. u nádorových, virem infikovaných nebo jinak stresovaných buněk) dojde k prezentaci aktivačních ligandů na povrch cílových buněk. Interakce těchto ligandů s aktivačními receptory NK buňky spouští cytotoxickou odpověď NK buňky – tzv. induced-self koncept¹³. Tyto aktivační receptory NK buněk se nazývají receptory přirozené cytotoxicity (NCR, natural cytotoxicity receptors), zástupci těchto NCR jsou například NKp30, NKp44 a NKp46¹³.

Třetí způsob interakce NK buněk s cílovými buňkami je na rozdíl od prvních dvou závislý na protilátkách. NK buňky exprimují receptory rozeznávající Fc fragment imunoglobulinů, který spouští jejich aktivaci. NK buňky jsou tudíž schopné zabít buňky, které mají na svém povrchu imunoglobulinu navázané¹. Nejznámějším příkladem je receptor FcγRIII (CD16) s nízkou afinitou pro Fc fragment imunoglobulinu G (IgG). Tento způsob eliminace cílových buněk se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC,

antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)¹.



Obrázek 1: Inhibice (I) a aktivace (A) cytotoxické odpovědi NK buňky. Panel A ukazuje, že NK buňka nezabíjí cílovou buňku, když na svém povrchu neexprimuje inhibiční molekuly MHC třídy I, a ani aktivační molekuly. Na panelu B je vidět, že NK buňku inhibuje přítomnost povrchových molekul MHC třídy I cílové buňky. Panel C znázorňuje, že interakce aktivačních molekul cílové buňky s aktivačními receptory NK buňky spouští její cytotoxickou aktivitu. Panel D znázorňuje, že za případu současné přítomnosti inhibičních a aktivačních povrchových molekul cílové buňky závisí cytotoxická odpověď NK buňky od převažujícího signálu¹⁰. *Poznámka:* molekula MHC třídy I zde slouží jako příklad inhibiční molekuly.

1.1.1.1 Kategorizace receptorů NK buněk

Receptory NK buněk je možné rozdělit podle jejich funkce na inhibiční a aktivační, přičemž pro každou z těchto skupin je charakteristický evolučně konzervovaný aminokyselinový motiv. Přenos inhibičních signálů zajišťuje imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) se sekvencí S/I/V/L-X-Y-X-X-I/V/L (kde X označuje libovolnou aminokyselinu)¹⁴. ITIM je součástí cytoplasmatických domén všech inhibičních receptorů NK buněk, a také je přítomný u jiných receptorů buněk imunitního systému. Jako příklad je možné uvést Fc receptor pro IgG (FcγRIIb) B lymfocytů, na kterém byl ITIM poprvé popsán¹⁰. Interakce ligandu a inhibičního receptoru má za následek fosforylaci tyrosinového zbytku v ITIM tyrosinkinasou ze *Src* rodiny (rodina nereceptorových tyrosinkinas). Následně jsou aktivovány fosfotyrosinofosfatasy, které snižují úroveň fosforylace intracelulárních signálních proteinů NK buněk. Výsledkem je inhibice cytotoxicity NK buněk a také jejich produkce cytokinů¹⁰.

U aktivačních receptorů byl popsán imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif). ITAM není součástí těchto receptorů, ale je exprimován na adaptorových transmembránových proteinech, se kterými aktivační receptory interagují¹⁴. Jako příklad je možné uvést už zmíněný aktivační receptor FcγRIII (CD16), zprostředkující ADCC NK buněk, který nekovalentně interaguje s ITAM-obsahujícím adaptorovým proteinem FcεRIγ¹⁰. Aminokyselinová sekvence ITAM je Y-X-X-I/L-X₍₆₋₁₂₎-Y-X-X-I/L, kde X značí libovolnou aminokyselinu, kterých je 6 až 12 mezi dvěma Y-X-X-I/L motivy^{10,14}. Po interakci aktivačního receptoru s ligandem je tyrosinový zbytek ITAM fosforylován (analogie s ITIM). Tato fosforylace šíří signál pro vyloučení Ca²⁺ iontů do cytosolu NK buňky a má za následek zvýšenou transkripci genů kódujících cytokiny a jejich degranulaci tj. cytotoxickou odpověď NK buňky¹⁰. Inhibiční a aktivační funkce ITIM a ITAM nejsou ale zcela striktně rozdělené: bylo prokázáno, že existují ITIM v rámci ITAM, a také, že v některých případech mohou ITAM zprostředkovat inhibiční signál, a naopak ITIM signál aktivační¹⁴.

Receptory NK buněk je také možné rozdělit dle struktury, a to do dvou rodin. První zastupují receptory podobné lektinům C-typu (CTLR, C-type lectin-like receptors) kódované tzv. genovým komplexem NK buněk (NKC, natural killer gene complex), který se nachází na lidském chromosomu 12. Druhé jsou receptory podobné imunoglobulinům, které kóduje komplex genů pro receptory leukocytů (LRC, leukocyte receptor gene

complex) na lidském chromosomu 19^{15,16}. Inhibiční i aktivační receptory NK buněk jsou kódovány v obou genových komplexech¹⁶.

1.1.1.2 Receptory NK buněk podobné lektinům C-typu

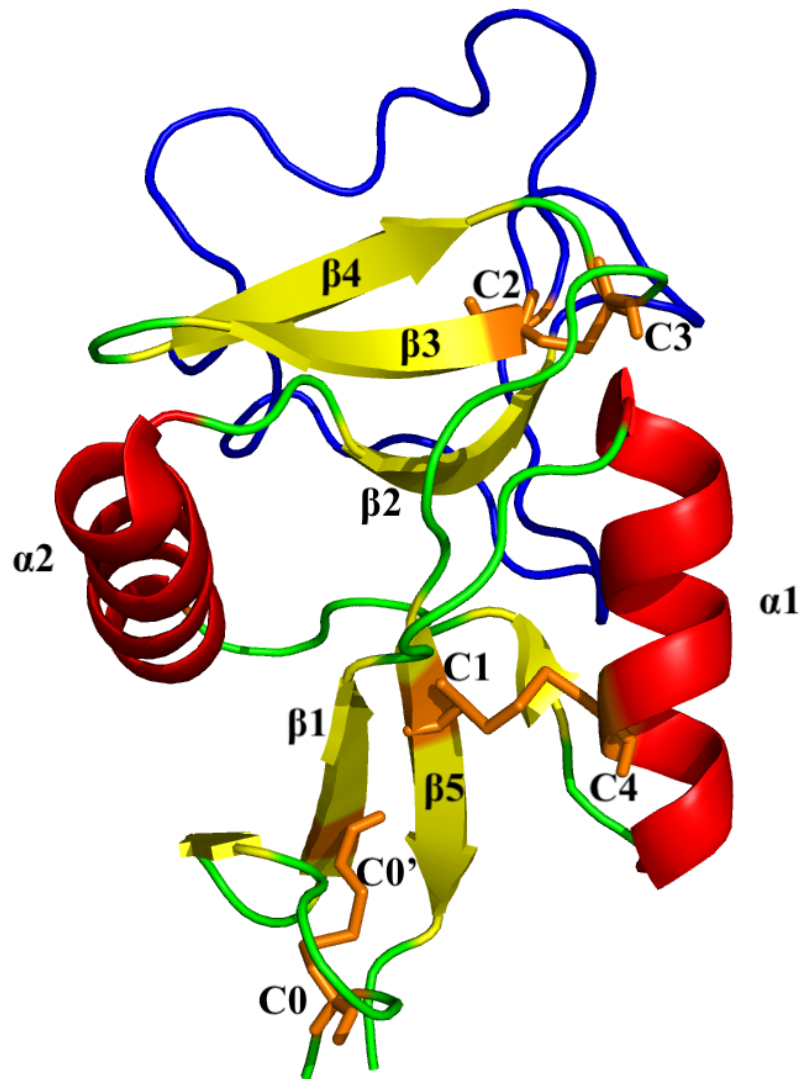
CTLR jsou transmembránové glykoproteiny II. typu s N-terminální cytoplasmatickou doménou, jednou transmembránovou doménou, která je následována extracelulární oblastí krčku a jednou C-terminální doménou¹⁶.

Lektiny jsou proteiny, které rozpoznávají a vážou sacharidy, aniž by je enzymaticky přeměňovaly; k lektinům se dále nepočítají protilátky¹⁷. Lektiny C-typu pro tuto vazbu vyžadují Ca^{2+} ionty, které tvoří koordinační vazbu se dvěma hydroxylovými skupinami daného sacharidu. Vazba mezi lektinem a sacharidem je dále stabilizována vodíkovými můstky¹⁸. Schopnost vázat sacharidy je pro lektiny C-typu zprostředkována typickou extracelulární sacharid-rozpoznávající doménou (CRD, carbohydrate-recognition domain)^{18–20}. Kompaktní globulární stavba CRD byla popsána pomocí krystalografických studií na manosu-vázajícím proteinu z krevního séra potkanů, který reprezentuje typickou CRD²¹. Doména byla nazvána „doména CRD C-typu“ nebo „lektinová doména C-typu“, avšak s rostoucím počtem známých struktur bylo zjištěno, že ne všechny CRD mohou vázat sacharidy a Ca^{2+} ionty¹⁹, a tak pro tyto CRD byl navrhnout obecnější název domény podobné lektinům C-typu (CTLD, C-type lectin-like domains)²².

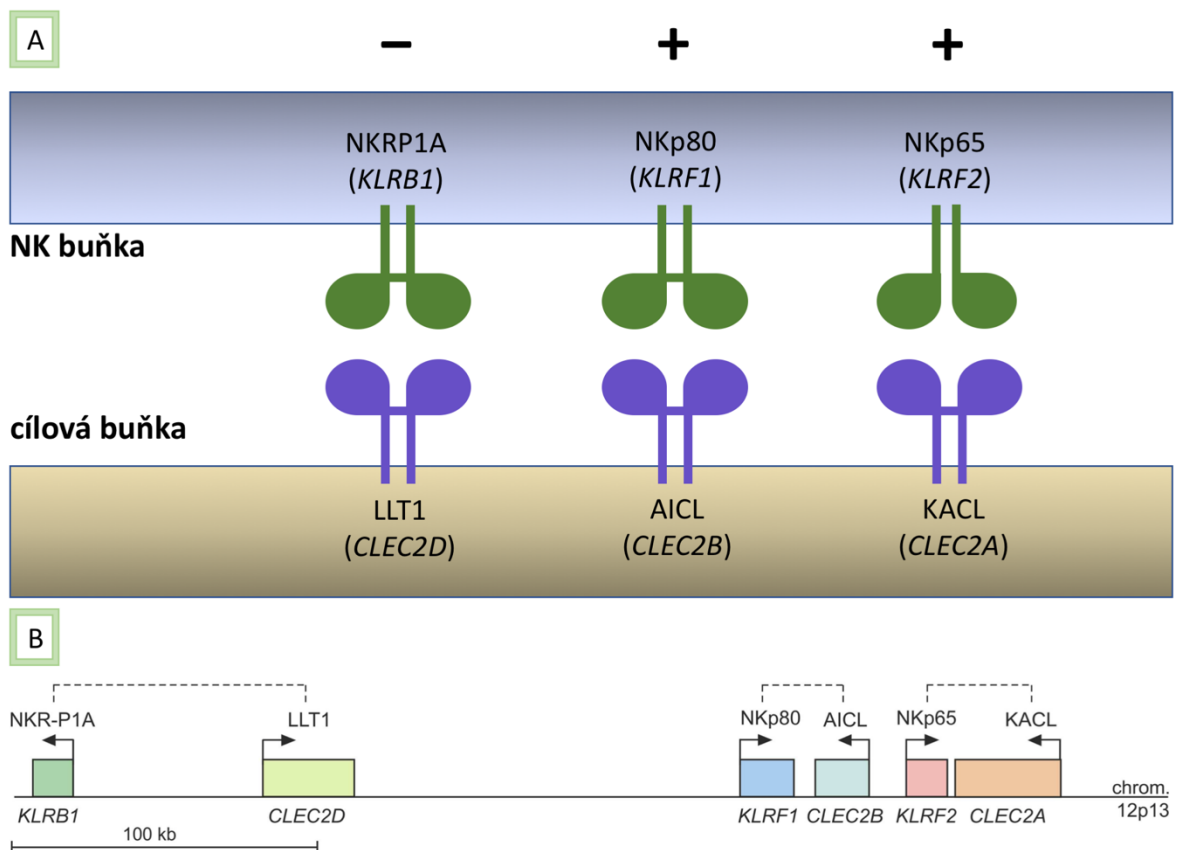
Struktura CTLD domény je ve tvaru smyčky a typicky obsahuje dva α -helixy a dva antiparalelní N- a C-terminální β -listy (Obrázek 2, str. 13). Součástí CTLD může také být tzv. dlouhá smyčka („long loop region“), která vychází a vchází do domény na přibližně stejném místě¹⁹. Celá struktura je stabilizována dvěma nebo většinou třemi evolučně konzervovanými disulfidickými můstky. Čtyři cysteiny tvořící dva disulfidické můstky stabilizující základny obou smyček jsou přitom nejvíce konzervovanými aminokyselinovými zbytky CTLD. Typický je zároveň tzv. WIGL motiv, který je sekvencí čtyř hydrofobních aminokyselin a tvoří jádro této struktury¹⁹.

CTLD mohou kromě sacharidů vázat také anorganické sloučeniny, lipidy a proteiny¹⁹. Právě u lymfocytů nacházíme receptory, které prostřednictvím jejich CTLD vážou CTLD proteinových ligandů cílových buněk²². Tyto interakce zprostředkovávají aktivační a inhibiční signály pro NK buňky, a tak jsou zásadní pro jejich imunitní odpověď^{16,23}. Příkladem těchto CLTR NK buněk je rodina NKR-P1¹⁶. U lidí se vyskytují tři receptory v této rodině, a to NKR-P1A (také CD161), NKp80 a NKp65. Bylo prokázáno,

že ligandy receptorů NKR-P1 jsou glykoproteiny s CTLD z *CLEC2* podrodiny, které jsou stejně jako receptory NKR-P1 kódované v NKC. Pro inhibiční NKR-P1A je to LLT1 (lectin-like transcript 1)²³ a pro aktivační NKp80 a NKp65 receptory to jsou v tomto pořadí AICL (activation-induced C-type lectin) a KACL (keratinocyte-associated C-type lectin) (Obrázek 3, str. 14)¹⁶.



Obrázek 2: Typická struktura CTLD. V hlavní části domény je vidět antiparalelní β -list tvořený N- a C-terminálními β -vláknými ($\beta 1, \beta 5$; žlutě), druhý antiparalelní β -list ($\beta 2, \beta 3, \beta 4$; žlutě), a také dva α -helixy ($\alpha 1, \alpha 2$; červeně). Tzv. dlouhá smyčka je zobrazena modře. Cysteinové zbytky (C0, C0', C1–C4) tvořící disulfidické můstky jsou vyznačeny oranžovým paličkovým modelem. C1–C4 stabilizují základny obou smyček CTLD a C0, C0' tvoří třetí disulfidický můstek přítomný u většiny CTLD¹⁹. Vytvořeno v programu PyMOL²⁴ (PDB kód: 1K9I).



Obrázek 3: Blízká pozice genů rodiny lidských receptorů NKR-P1 a jejich ligandů. Panel A zobrazuje jednotlivé páry receptorů rodiny NKR-P1 a jejich povrchových ligandů na cílových buňkách. V závorkách jsou uvedeny názvy genů, které je kódují. Znak - značí inhibiční receptor a znak + aktivační. **Panel B** zobrazuje blízkou pozici genů na lidském chromosomu 12 (oblast 1, pruh 3), které kódují NKR-P1 receptory a jejich ligandy. Přerušované čáry značí pár receptor-ligand a šípky udávají transkripční orientaci¹⁶.

1.1.2 Lidský receptor NKR-P1A

Předmětem této práce je lidský receptor NKR-P1A, který je kódován genem *KLRB1* v NKC na chromosomu 12²⁵. Tento receptor je jediným lidským homologem myšičího NKR-P1 receptoru (konkrétně NKR-P1B), se kterým sdílí 46% aminokyselinové identity²⁶. NKR-P1A je exprimován na NK buňkách, ale také na T a B lymfocytech. Přibližně 25% zralých periferních T lymfocytů exprimuje NKR-P1A²⁶ a pro Th17 a některé Tc17 lymfocyty je přímo jejich specifickým povrchovým znakem²⁷. V roce 1994 bylo popsáno, že lidský receptor NKR-P1A je na povrchu lymfocytů exprimován jako disulfidicky vázaný homodimer²⁶. Tato forma disulfidické dimerizace v oblasti krčku receptoru je pro CTLR kódované v NKC typická¹⁶.

Receptor NKR-P1A nemá typické aktivační ani inhibiční motivy, avšak funkčně se chová jako kostimulační nebo inhibiční receptor v závislosti na buňce, kterou je

exprimován²⁸. Vytvoření komplexu NKR-P1A:LLT1 mezi NK buňkou a cílovou buňkou inhibuje cytotoxicitu NK buňky a snižuje její produkci IFN γ ²³. Bylo však také prokázáno, že vytvoření tohoto komplexu mezi NKR-P1A na T lymfocytu a LLT1 cílové buňky má kostimulační charakter a zvyšuje produkci IFN γ T lymfocytu²⁵.

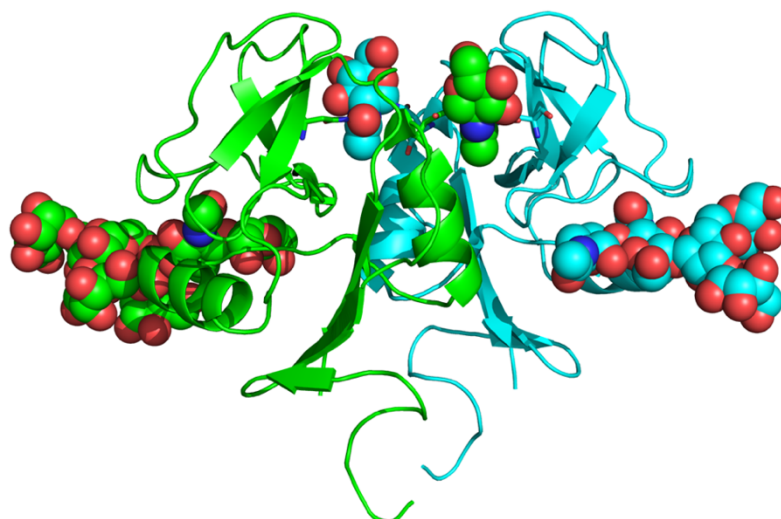
LLT1 není za normálních podmínek na povrchu lymfocytů exprimován. Exprese LLT1 je zvýšena a koordinována specifickou stimulací přes receptory podobné receptoru Toll (TLR, Toll-like receptors) B lymfocytů a dendritických buněk²⁵. Exprese LLT1 je tak součástí homeostatické kontroly aktivity NK buněk, která je nutná pro správně fungující imunitní systém. NKR-P1A a LLT1 mají vůči sobě nízkou afinitu ($K_D \sim 48 \mu\text{M}$) a zároveň signály po jejich navázání jsou relativně nízké intenzity, tudíž pro jejich detekci je nutné dostatečné množství NKR-P1A a LLT1 exprimovaného na povrchu buněk²⁵.

1.1.2.1 Mutovaná forma lidského NKR-P1A

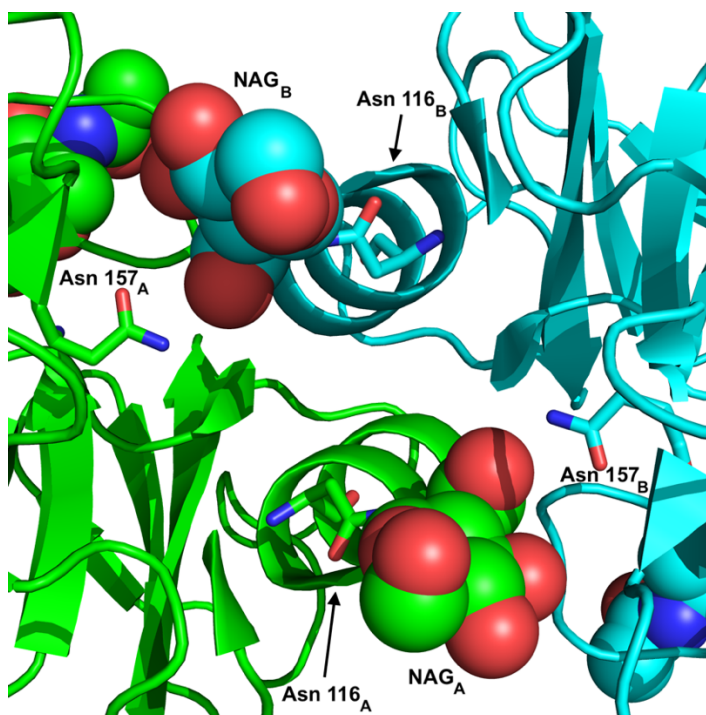
V této práci je zkoumán vliv *N*-vázané glykosylace na asparaginu 157 na oligomerizaci rozpustné ektodomény NKR-P1A v roztoku. Ze strukturních studií je možné předpokládat, že glykosylace může ovlivňovat oligomerní stav ektodomény NKR-P1A. Ektodoména lidského NKR-P1A má tři *N*-vázaná glykosylační místa, v aminokyselinové sekvenci to jsou místa 116, 157 a 169. V dimerizačním rozhraní ektodomény se nacházejí glykosylační místa 116 a 157 (Obrázek 4 a 5, str. 16). Místo 169 se v této části nenachází, a tudíž se nemůže podílet na dimerizaci ektodomény.

Místa 116 a 157 se nachází v dimerizačním rozhraní orientovány proti sobě na opačných řetězcích. Ze struktury je patrné, že v případě obsazení obou protilehlých *N*-vázaných glykosylačních míst oligosacharidovými řetězci budou tyto řetězce stericky bránit tvorbě předpokládaného nekovalentního dimeru. Naproti tomu obsazenost jen jednoho z těchto dvou možných glykosylačních míst umožní tvorbu vodíkových můstků mezi sacharidem a druhou ektodoménou NKR-P1A, a tak předpokládaný nekovalentní dimer potenciálně stabilizuje (Obrázek 4 a 5 str. 16).

Akceptor *N*-vázané glykosylace je asparaginový zbytek v konvenční sekvenci N–X–S/T (kde X označuje libovolnou aminokyselinu kromě prolinu). Avšak ne každý asparagin v takové sekvenci je vždy glykosylován, pro tuto glykosylaci je také nutná vhodná konformace daného peptidu²⁹. Změnou této aminokyselinové sekvence cílenou mutací je možné této glykosylaci zabránit. Pro podpoření předpokládané dimerizace bylo tudíž cílenou mutací S159A zamezeno *N*-vázané glykosylaci na Asn 157.



Obrázek 4: Struktura homodimeru ektodomény lidského NKR-P1A. Expresní konstrukt G90-S225, **zeleně** a **modře** jsou zvýrazněné monomery ektodomény NKR-P1A. Sacharidové zbytky jsou vyznačeny kuličkovým modelem, kde **červená** znázorňuje kyslík a **tmavomodrá** dusík. *N*-vázaná glykosylační místa 116 a 157 se nachází v dimerizačním rozhraní a jsou orientovány proti sobě na opačných řetězcích monomerů. Naproti tomu glykosylační místo 169 je na vnějších stranách monomerů a nepodílí se na dimerizaci ektodomény. Vytvořeno v programu PyMOL²⁴ (kód PDB: 5MGR).



Obrázek 5: Detail dimerizačního rozhraní homodimeru ektodomény lidského NKR-P1A při pohledu shora. Expresní konstrukt G90-S225, indexy A, B označují monomery ektodomény A (**zelená**) a B (**modrá**), kde NAG je *N*-acetylglukosamin (kuličkový model). Obsazení *N*-vázaným NAG jenom jednoho glykosylačního místa dimerizačního rozhraní (místo 116) umožní tvorbu vodíkových můstků mezi tímto NAG a neglykosylovaným Asn 157 druhého monomeru. Vytvořeno v programu PyMOL²⁴ (kód PDB: 5MGR).

1.2 Lidské embryonální ledvinné buňky 293

Lidské embryonální ledvinné buňky 293 (HEK293, human embryonic kidney cells 293) označují buněčnou linii, která je široce využívána jako expresní systém pro výrobu rekombinantních proteinů³⁰. Tato linie byla vytvořena roku 1976 Frankem Grahamem pomocí transformace embryonálních ledvinných buněk získaných z potráceného embrya virovou DNA adenoviru 5. Tato transformace způsobila u buněčného klonu číslo 293 imortalizaci, a tedy uzpůsobila tyto buňky, označované dnes HEK293, pro vědecké studie³¹. Buňky HEK293 jsou schopné zabezpečit většinu post-translačních modifikací a správného sbalení exprimovaných proteinů, a tudíž jsou častou volbou pro rekombinantní expresi proteinů. Kromě toho je možné je transfekovat různými metodami s vysokou efektivitou čemuž pak odpovídá i efektivní produkce žádaných proteinů³⁰.

Transfekce je proces vložení cizorodého genetického materiálu do eukaryotických buněk za cílem získání buněk geneticky modifikovaných³². Pro tento důvod je také využívána v rekombinantní expresi proteinů: buňka přijme genetický materiál, exprimuje gen a produkuje žádaný protein. Takto vložený genetický materiál může v buňkách existovat transientně nebo stabilně. Při transientní expresi se v buněčné linii nachází jenom limitovaný čas, protože není integrovaný do genomu buněk. Dělením buněk se tudíž postupně v linii ztrácí. Na druhé straně při stabilní transfekci je genetický materiál vložen do genomu buněk, a tak je zachován i při jejich dělení³². Obecně nelze určit, která z těchto dvou metod exprese je lepší, protože záleží na mnoha faktorech jako je charakter buněčné linie a rekombinantní DNA. Exprese rozpustné ektodomény NKR-P1A ve stabilně transfekovaných lidských HEK293 buňkách se s ohledem na výtěžek jeví jako nejvhodnější³³ a proto byla také zvolena v této práci.

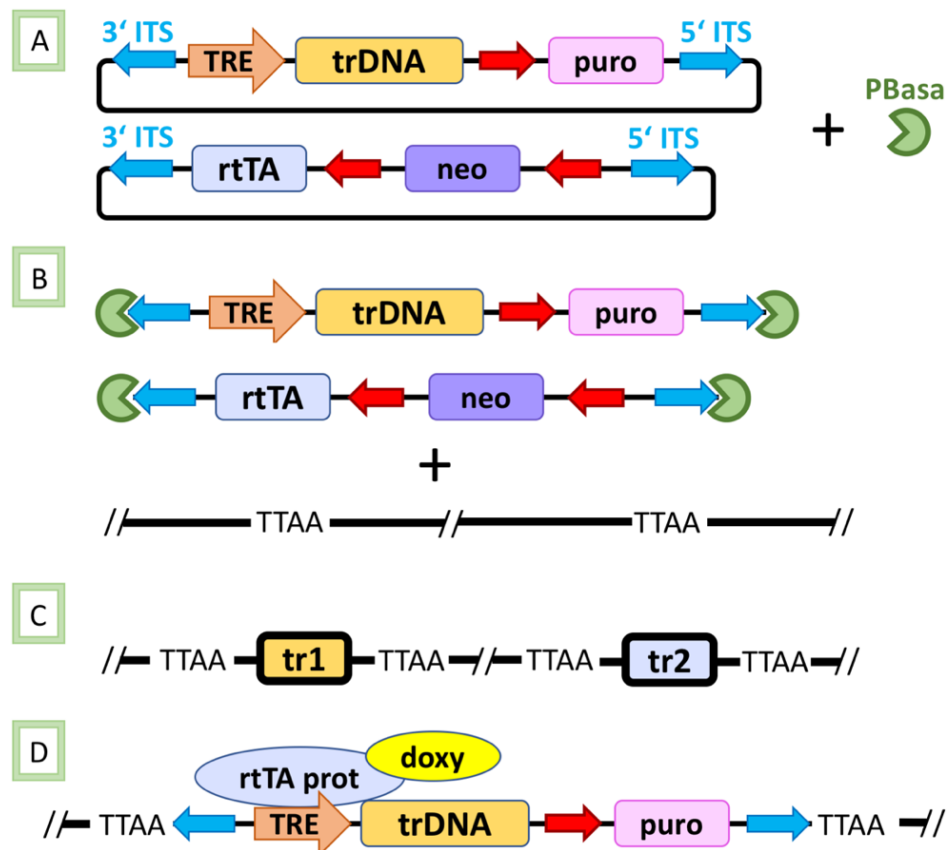
1.2.1 Expresní transposonový systém *piggyBac*

Klasická metoda stabilní integrace cizorodé DNA do cílové buňky (tj. spontánní integrace) má několik nevýhod. Jednou z nich je tzv. poziční efekt, při kterém dochází ke změně pozice genu na chromosomu, co může ovlivnit jeho expresi³⁴. Další nevýhodou je časté vložení transgenní DNA ve formě konkatemeru, tj. dlouhé molekuly DNA obsahující opakované sekvence původní transgenní DNA. Tyto genomové struktury mohou být inaktivovány a tedy neexprimovány. Tato inaktivace je vyvolána opakující se sekvencí a nazývá se RIGS (repeat-induced gene silencing), což lze volně přeložit jako inaktivace genu vyvolaná opakováním³⁵.

Z důvodu existence nevýhod spontánní integrace vznikly metody využívající transposony pro úspěšnou integraci transgenní DNA³⁴. Transposon je mobilní genetický element, který napomáhá integraci transgenní DNA do genomu cílové buňky. Transposon II. třídy je DNA transposon, který je integrován tzv. procesem vystříhnutí a vložení (z angl. cut and paste process), tj. je vystřížen z jednoho místa na DNA a vložen na místo nové³⁶. K tomuto procesu potřebuje enzym transposasu, přičemž tento enzym může být kódovaný sekvencí, která je přímou součástí transposonu³⁷.

Jeden z efektivních expresních transposonových systémů využívá transposon II. třídy *piggyBac*. Tento transposon je ohraničen inverzními terminálními sekvencemi (ITS) 13 párů bází, které rozeznává *piggyBac* transposasa (PBasa). PBasa rozštěpí ITS a celý jimi ohraničený DNA fragment vloží na náhodné TTAA místo genomu dané buňky, přičemž tuto TTAA sekvenci při inzerci duplikuje³⁷. Do *piggyBac* transposonu může být vložena transgenní sekvence DNA a transposiční aktivita může být spuštěna PBasou nacházející se na jiném plasmidu³⁶. Systém *piggyBac* využitý v této práci využívá tři plasmidů – první dva obsahují transposony a třetí obsahuje sekvenci, která kóduje PBasu, konkrétně její tzv. hyperaktivní formu³⁸. První transposon-obsahující plasmid nese element responsivní pro tetracyklin (TRE, tetracycline response element), gen pro antibiotickou rezistenci (např. puromycin) a transgenní DNA, která má být stabilně integrována do genomu dané buňky, např. buňky HEK293. Druhý transposon-obsahující plasmid nese gen, který kóduje protein reverzní tetracyklinový transaktivátor (rtTA, reverse tetracycline transactivator), a zároveň obsahuje gen pro jinou antibiotickou rezistenci, než byla u prvního plasmidu (např. neomycin)³⁴ (Obrázek 6, str. 19).

Po transfekci všech tří plasmidů do cílové buňky transientně exprimovaná PBasa zprostředkuje vložení transposonů z prvního a druhého plasmidu do buněčného genomu. Buňky, které takto úspěšně integrovaly oba transposony do svého genomu jsou selektovány pomocí rezistence na obě antibiotika. Exprimovaný rtTA protein se za přítomnosti doxycyklinu (derivát tetracyklinu) váže na TRE a spouští transkripci transgenní DNA (tzv. Tet-On systém)^{34,39}. Doxycyklinem je tudíž jednoduché regulovat expresi transgenní DNA (Obrázek 6, str. 19).



Obrázek 6: Expresní systém *piggyBac*. Červené šipky označují promotory. **Panel A** zobrazuje oba transposon-obtížující plasmidy a transientně exprimovanou PBasu ze třetího plasmidu, která štěpí ITS sekvence transposonů. První transposon obsahuje TRE, transgenní DNA (trDNA) a gen pro rezistenci na puromycin (puro). Druhý transposon obsahuje gen, který kóduje protein rtTA a gen pro rezistenci na neomycin (neo). **Panel B** zobrazuje vyštěpené transposony, která PBasa vloží na náhodné TTAAs místo buněčného genomu, přičemž tyto místa replikuje. **Panel C** schematicky zobrazuje DNA po vložení prvního (tr1) a druhého transposonu (tr2). **Panel D** znázorňuje spuštění transkripce transgenní DNA navázáním rtTA proteinu za přítomnosti doxycyklinu (doxy) na TRE³⁴.

Tento *piggyBac* transposonový systém je několikanásobně efektivnější než klasická integrační metoda. Jeho výhodou je, že funguje s mnohými běžně využívanými buněčnými liniemi a vyžaduje jenom jeden transfekční krok. Konkrétně je také vhodný pro práci s HEK293S buňkami, které je obecně náročnější stabilně transfekovat³⁴.

2. Cíle práce

1. Rekombinantní příprava rozpustné ektodomény G90-S225 lidského NKR-P1A s bodovou mutací S159A ve stabilně transfekovaných buňkách HEK293S GnTI⁻
2. Purifikace připraveného rekombinantního proteinu
3. Studium vlivu mutace S159A na oligomerní stav rozpustné ektodomény lidského NKR-P1A v roztoku

3. Materiál

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytická ultracentrifuga ProteomeLab XL-1	Beckman Coulter, USA
Automatické pipety PIPETMAN	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-30R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Švýcarsko
Centrifugační zkumavky 85 ml	Beckman Coulter, USA
Centrifugační filtr UltraFree-MC VV	Merck, USA
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Filtr pro filtraci buněčného média, póry 0,22 µm	Merck, USA
FPLC systém Äkta Basic	GE Healthcare, USA
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
HPLC systém Äkta Basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Inkubátor Raven 2	LTE Scientific, Velká Británie
Kolona HiTrap Desalting 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona HiTrap TALON crude 5 ml	GE Healthcare, USA
Koncentrátor Amicon Ultra – 0,5 ml nebo 4 ml (MWCO 10000 Da)	Merck, USA
Lahve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-Lab, ČR
Mikrozkumavky 1,5 ml	Eppendorf, USA
Spektrofotometr DS-11	DeNovix, USA
Termoblok Elite Dry Bath Incubator	Major Science, USA
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Orbit 1000	Labnet International, USA
Zkumavky centrifugační Falcon 15 ml	Thermo Fisher Scientific, USA

3.2 Chemikálie

Akrylamid	Fluka, Švýcarsko
<i>N,N'</i> -metylenbisakrylamid	Fluka, Švýcarsko

Azid sodný	SERVA, Německo
Citrát sodný	Lachema, Česká Republika
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka, Švýcarsko
Chlorid sodný	Lach-Ner, Česká Republika
Geneticin (G418)	Thermo Fisher Scientific, USA
HEPES	Merck, USA
Imidazol	Carl Roth, Německo
IPEI	Polysciences, USA
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	Lach-Ner, Česká Republika
Peroxodisíran amonný	SERVA, Německo
Puromycin	Invivogen, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Standard pro SDS-PAGE Spectra Multicolour Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
TEMED	SERVA, Německo
Tris	Carl Roth, Německo

3.3 Buněčné linie

HEK293S GnTI ⁻	ATCC, USA
---------------------------	-----------

3.4 Vektory

pUT7_NKRP1A_S159A	Mgr. Barbora Kalousková, Katedra biochemie PřF UK
PB-RN	Prof. James M. Rini, Ph.D., University of Toronto, Kanada
pCMV-hyPBase	Wellcome Sanger Institute, Anglie

3.5 Enzymy

Endoglykosidasa F1	Mgr. Ondřej Skořepa, Katedra biochemie PřF UK
--------------------	---

3.6 Roztoky a média

3.6.1 Pufry a jiné roztoky

Akrylamid/*N,N'*-methylenbisakrylamid 30%: *N,N'*-methylenbisakrylamid 0,8% (w/v), akrylamid 29,2% (w/v)

Citrátový pufr 10× koncentrovaný: 0,5 M citrát sodný, pH 5,5

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

HEPES pufr: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5

IPEI roztok: 1% IPEI (w/v), 150 mM NaCl, pH 7,0

Odbarvovací roztok pro akrylamidové gely: ethanol 35% (w/v), kyselina octová 55% (w/v)

PBS pufr: 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5

PBS pufr s imidazolem: 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 250 mM imidazol, pH 7,0

PBS-TK pufr: 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂HPO₄, pH 7,0

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující 5× koncentrovaný: 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 redukující 5× koncentrovaný: vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující 5× konc., 5% (v/v) β-merkaptoethanol

3.6.2 Kultivační média

EX-CELL 293: komerční médium (Merck, USA), před použitím doplněno o L-glutamin do 4 mM koncentrace

4. Metody

4.1 Práce s buněčnými liniemi HEK293

4.1.1 Kultivace buněčné linie

Buněčné kultury jsou uchovávány v kryozkumavkách při -80°C . Takto zmražené alikvotní podíly buněčné suspenze o objemu 1 ml mají buněčnou hustotu $5 \cdot 10^6$ b/ml. Suspenze byla co nejrychleji rozmrazena ve vodní lázni předehřáté na 37°C a přenesena do 10 ml média EX-CELL 293. Centrifugací po dobu 5 minut při $95 \times g$ a 21°C byly buňky opláchnuté od supernatantu obsahujícího kryoprotektant (10% DMSO (v/v)). Buněčná peleta byla resuspendována v 10 ml kultivačního média a přenesena na 10 cm Petriho misku. Buňky byly kultivovány v inkubátoru MC0-18 AIC při 37°C a 5% CO_2 . Poté, co se buňky začaly dělit, byly přeneseny do 30 ml čtverhranné lahve a umístěny na třepačku Celltron umístěnou v inkubátoru. Kultivace probíhala dále při 37°C , 135 ot./min a 5% CO_2 .

Jednou za 3 až 4 dny probíhala subkultivace. Pomocí hemocytometru byla prováděna kontrola buněčné hustoty a viability. Část buněčné suspenze byla doplněna kultivačním médiem tak, aby výsledná hustota buněk činila $0,2 - 0,3 \cdot 10^6$ b/ml a zároveň objem původní suspenze činil maximálně 10 % výsledného objemu. Pokud došlo k překročení této hodnoty, suspenze byla centrifugována 5 minut při $95 \times g$ a 21°C a peleta byla následně resuspendována v kultivačním médiu. Z důvodu dostatečného provzdušnění tvořila suspenze maximálně 40 % objemu čtverhranné láhve. Takto byly buňky kultivovány až do dosažení optimální viability a počtu buněk pro transfekci.

4.1.2 Produkce mutovaného NKR P1A ve stabilně transfekované linii

Buňky linie HEK293S GnTI^- byly kotransfekovány třemi plasmidy. První z plasmidů (pUT7_NKRP1A_S159A) byl kontrolovaný TRE promotorem a nesl proteinový konstrukt lidského NKR-P1A G90-S225 s mutací S159A ohraničený krátkými repeticemi a rezistencí na puromycin. Druhý plasmid (PB-RN) nesl induktor rtTA, také ohraničený repeticemi, a gen pro rezistenci na geneticin (G418). K integraci do genomu sloužil třetí pomocný plasmid (pCMV-hyPBBase), který nesl gen pro hyperaktivní *piggyBac* transposasu. Tímto plasmidem jsou buňky transfekovány pouze transientně. Expresi proteinu lze indukovat doxycyklinem.

4.1.3 Transfekce buněčné linie

Buněčná suspenze HEK293S GnTI⁻ byla centrifugací (5 minut při $95 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) převedena do čerstvého média EX-CELL 293. Výsledná hustota byla $23,5 \cdot 10^6$ b/ml a výsledný objem 1,2 ml. Buňky byly umístěny do jedné z jamek na 12-jamkové destičce. K buněčné suspenzi bylo přidáno 300 μl sterilního DNA transfekčního mixu v pufru PBS-TK. Transfekční mix obsahoval tři plasmidy: pUT7_NKRP1A_S159A (24 μg), PB-RN (3 μg) a pCMV-hyPBase (3 μg). K buněčné suspenzi byl přidán roztok IPEI. Poměr DNA a IPEI byl 1:4, tudíž ke 30 μg DNA bylo přidáno 120 μg IPEI (12 μl roztoku IPEI). Destička byla umístěna na 4 hodiny na třepáčku v inkubátoru MC0-18 AIC (135 ot./min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5 % CO_2). Poté byla buněčná suspenze přenesena do 100 ml čtverhranné lahve s prodyšným víčkem a doplněna médiem EX-CELL 293 na 30 ml a ponechána v inkubátoru (135 ot./min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5 % CO_2).

4.1.4 Selektce stabilních linií

Po 48 hodinách po transfekci byla přidána selekční antibiotika (puromycin do koncentrace 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a G418 do koncentrace 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Každý třetí den byly buňky přepočítány a centrifugací převedeny do čerstvého média EX-CELL 293 a opět byla přidána antibiotika. Když přešly buňky opět do fáze růstu a dosáhly 100% viability, bylo zamraženo několik alikvotních podílů.

4.1.5 Indukce produkce konstruktů NKR-P1A S159A

Následně byly buňky kultivovány a rozrůstány do větších objemů (300 ml suspenze v láhvi o objemu 1 litr). Po dosažení buněčné hustoty $3 - 5 \cdot 10^6$ b/ml bylo přidáno indukční antibiotikum (doxycyklin do koncentrace 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

4.2. Sklizení produkci

Produkující suspenze byly sklizené centrifugací 5. den po indukci nebo když klesla viabilita pod 40%. Každá suspenze byla rozdělena do 85 ml centrifugačních kyvet a centrifugována při $10864 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 50 minut. Následně byla zfiltrována přes filtr s 0,22 μm póry a uchována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Afinitní chromatografie

Pro purifikaci pomocí afinitní chromatografie byla použita kolona HiTrap TALON crude obsahující imobilizované kobaltnaté ionty, které vykazují afinitu k histidinové kotvě purifikovaného proteinu. Chromatografie byla provedená pomocí FPLC přístroje ÄKTA Basic. Zfiltrované médium bylo rozmrazeno a zředěno PBS pufrem v poměru 1:1. Kolona byla ekvilibrována PBS pufrem a následně bylo zředěné médium nanášeno na kolonu rychlostí 5 ml/min. Po nanášení byla kolona promyta PBS pufrem.

Následně byl protein NKR-P1A S159A navázaný na TALON koloně eluován pufrem PBS s imidazolem (250 mM). Použitím kolon HiTrap Desalting byl eluát přímo převeden do PBS pufru bez imidazolu. Frakce byly sbírány do 15 ml centrifugačních zkumavek. Nástřik a sběr frakcí byl opakován, dokud docházelo k efektivní eluci zachyceného proteinu z afinitní kolony.

4.4 Zkoncentrování frakcí s obsahem proteinu NKR-P1A S159A

Po afinitní chromatografii byly frakce s obsahem proteinu zkoncentrované na 4 ml centrifugačním koncentrátoru Amicon Ultra (MWCO 10000 Da). Koncentrátor s nanášeným vzorkem byl centrifugován při $3900 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Následně byl retenát promíchán opakovaným nasátím a vysátím pipetou, aby se zabránilo sražení proteinu. Tento postup byl opakován do dosažení požadovaného objemu 250 až 500 μl .

4.5 Gelová permeační chromatografie

Zkoncentrovaný vzorek byl centrifugován při $30000 \times g$ po dobu 5 minut. Chromatografie byla provedena na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL připojené k HPLC systému ÄKTA Basic. Kolona byla nejprve ekvilibrována do HEPES pufru. Tento pufr byl také použitý k promytí a naplnění nástřikové smyčky o objemu 1 ml. Následně byl proveden nástřik vzorku a chromatografie probíhala rychlostí 0,5 ml/min. Frakce o objemu 0,5 ml byly sbírány pomocí automatického sběrače do 1,5 ml mikrozkušavek.

4.6 Charakterizace připraveného proteinu

4.6.1 Stanovení koncentrace po gelové permeační chromatografii

Měření koncentrace bylo provedeno na spektrofotometru DeNovix DS-11. V přístrojovém menu byla zvolena metoda měření Protein A280. Koncentrace proteinu byla spočítána po zadání molekulové hmotnosti proteinu 17413,67 Da a jeho teoretického extinkčního koeficientu $39335 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, které byly určeny pomocí programu ProtParam⁴⁰. Pro měření byly vždy použity 2 μl vzorku, jako slepý vzorek byl použit HEPES pufr.

4.6.2 Deglykosylace NKR-P1A S159A

Z frakcí s obsahem NKR-P1A S159A po gelové permeační chromatografii bylo vždy odpipetováno takové množství, aby obsah proteinu ve vzorku činil 2,5 μg . Stejně bylo postupováno s nemutovaným typem tohoto proteinu. K oběma vzorkům byl vždy přidán 1 μl roztoku endoglykosidasy F1 o koncentraci 1,4 mg/ml, a 2 μl citrátového pufru. Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 90 minut.

4.6.3 Elektroforetická analýza proteinu v denaturujícím prostředí

Pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) byly připraveny dva gely podle Tabulky 1 (str. 28). Peroxodisíran amonný (APS, ammonium persulfate) byl do směsi na přípravu gelů vždy pipetován jako poslední, protože spouští radikálovou polymeraci 30% roztoku akrylamidu a *N,N'*-methylenbisakrylamidu. Koncentrace tohoto roztoku v rozdělovacím gelu byla 12,5%.

Nejprve byl připravený gel rozdělovací. Po přidání APS byl roztok pro rozdělovací gel urychleně pipetován mezi elektroforetická skla a převrstven destilovanou vodou. Po zatuhnutí rozdělovacího gelu byla odstraněna voda a nad rozdělovací gel byl pipetován gel zaostřovací až po horní okraj elektroforetických skel. Mezi skla byl ihned zasunut hřeben pro vytvoření jamek v zaostřovacím gelu, který měl minimální výšku 1,5 cm. Po zatuhnutí gelu byl hřeben odstraněn a elektroforetická skla s gely byla vložena do elektroforetické vany naplněné dostatečným množstvím elektrodového pufru.

Tabulka 1: Chemikálie pro přípravu polyakrylamidových gelů. Objemy jsou uvedené pro přípravu jednoho polyakrylamidového gelu. Koncentrace 30% roztoku akrylamidu a *N,N'*-metylenbisakrylamidu (AA 30%) v rozdělovacím gelu činila 12,5%. Elektroforetická skla měla mezeru 0,75 mm.

rozdělovací gel		zaostřovací gel	
chemikálie	V / μ l	chemikálie	V / μ l
dH ₂ O	1265	dH ₂ O	700
AA 30%	1675	AA 30%	250
pufř 1,5M Tris pH = 8,8	1000	pufř 1,5M Tris pH = 6,8	125
SDS 10%	40	SDS 10%	10
TEMED	2	TEMED	1,5
APS	40	APS	10

Ke vzorkům o objemu 8 až 16 μ l v 1,5 ml mikrozkušnicích bylo přidáno takové množství 5 \times koncentrovaného redukujícího nebo neredukujícího vzorkového pufru, aby byl tento pufř po jeho přidavku 1 \times koncentrovaný. Vzorky, které měly příliš malý objem pro praktické pipetování, byly nejdřív zředěny HEPES pufřem. Vzorky po deglykosylaci endoglykosidasou F1 byly zředěny sterilní destilovanou vodou.

Vzorky byly následně umístěny do termobloku na 95 °C na 10 minut a potom centrifugovány po dobu 2 minut při 15000 \times g a 20 °C. Poté byly nanášeny do jednotlivých jamek zaostřovacího gelu. Do jedné jamky bylo nanášeno 5 μ l proteinového standardu molekulových hmotností. Elektroforéza probíhala 50 minut při konstantním napětí 200 V.

4.6.4 Sedimentační analýza

Sedimentační analýza byla provedena na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-1 v rotoru An50-Ti metodou sedimentační rychlosti⁴¹. Měření i vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Jako vzorek byl použit protein NKR-P1A S159A po gelové permeační chromatografii. Jako reference byl použitý HEPES pufř. Do centrifugačních kyvet bylo pipetováno 100 μ l vzorku o koncentraci 1 – 5,8 mg/ml a 100 μ l reference. Data byla sbírána při 50 000 ot./min a 20 °C, bylo snímáno 200 snímků po 3 min s pomocí absorbanční detekce při 280 – 300 nm. Hustota a viskozita referenčního pufru a parciální specifický objem proteinu byly predikovány pomocí programu Sednterp⁴² a sedimentační data byla vyhodnocena pomocí programu Sedfit⁴³ metodou kontinuální distribuce sedimentačního koeficientu $c(s)$.

5. Výsledky

5.1 Purifikace proteinu NKR-P1A S159A

Pro expresní konstrukt lidského NKR-P1A S159A byla zvolena ektodoména tohoto receptoru o aminokyselinové sekvenci G90-S225 (Obrázek 7 a Obrázek 8). Cílená mutace S159A byla docílena mutací thyminu za guanin v kodonech TCA → GCA.

1.
MDQQAIYAELNLPTDSGPES SSPSLPRDVCQGSPWHQFALKLSCAGIILLVLVVT
GLSVSVTSLIQKSSIEKCSVDIQSRNK TTERPGLLNCP IYWQQLREKCLLFSHTVN
PWNSLADCS TKESLLLRDKDELIHTQNLIRDKAILFWIGLNFSLSEKNWKWING
SFLNSNDLEIRGDAKENS CISISQTSVYSEY CSTEIRWICQKELTPVRNKVYPDS

2.
ATGGACCAACAAGCAATATATGCTGAGTTAACTTACCCACAGACTCAGGCCAGAAAGTTCTT
CACCTTCATCTCTTCTCGGGATGTCTGTCAGGGTTCACCTTGGCATCAATTTGCCCTGAAACTT
AGCTGTGCTGGGATTATTCTCCTTGCTTGGTTGTTACTGGGTTGAGTGTTCAGTGACATCCTT
AATACAGAAATCATCAATAGAAAATGCAGTGTGGACATTCAACAGAGCAGGAATAAAACAAC
AGAGAGACCGGGTCTCTTAACTGCCCAATATATTGGCAGCAACTCCGAGAGAAATGCTTGT
ATTTTCTCACACTGTCAACCCTTGGAAAT AACAGTCTAGCTGATTGTTCCACCAAAGAATCCAGC
CTGCTGCTTATTGAGATAAGGATGAATTGATACACACACAGAACCTGATACGTGACAAAGCA
ATTCTGTTTTGATTGGATTA AATTTT TCAATTATCAGAAAAGAACTGGAAGTGGATAAACGGCTC
TTTTTAAATTCTAATGACTTAGAAATTAGAGGTGATGCTAAAGAAAACAGCTGTATTTCCATCT
CACAGACATCTGTGTATTCTGAGTACTGTAGTACAGAAATCAGATGGATCTGCCAAAAGAACT
AACACCTGTGAGAAATAAAGTGTATCCTGACTCT TGA

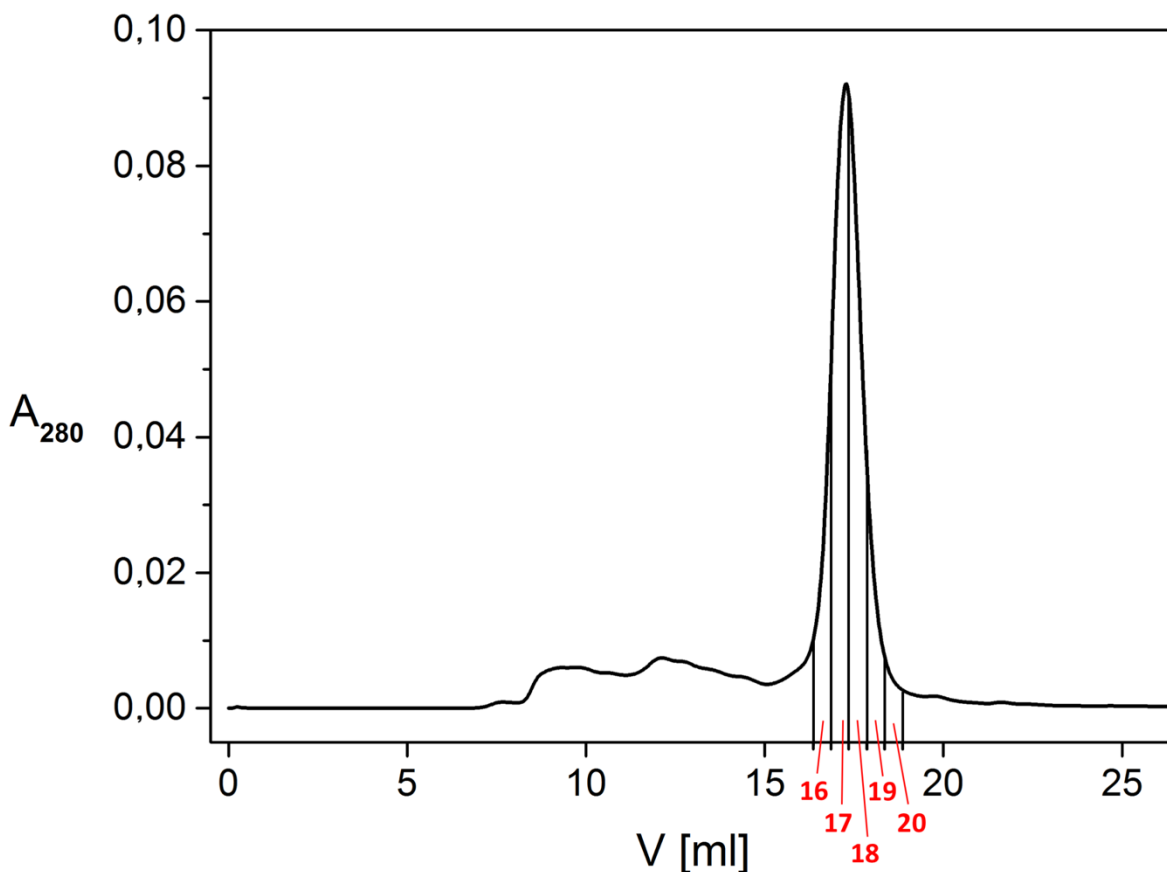
Obrázek 7: Sekvence lidského NKR-P1A. Aminokyselinová sekvence lidského NKR-P1A (panel 1) je kódována sekvencí nukleotidů (panel 2). **Oranžové písmo** označuje sekvenci intracelulární a transmembránové části a oblasti krčku receptoru. **Černě** je zobrazena část připravovaného konstruktu G90-S225 a **růžově** jsou zvýrazněny tři místa *N*-vázané glykosylace v pozicích asparaginů 116, 157 a 169, a kodony, které tato místa kódují. **Červeně** je zvýrazněný kodon kódující serin v pozici 159, který byl cílenou mutagenézí kodonu TCA → GCA zaměněn za alanin. **Žlutě** jsou zvýrazněny cysteiny stabilizující ektodoménu disulfidickými můstky a **modře** je zvýrazněn STOP kodon.

ITGGLLNCP IYWQQLREKCLLFSHTVNPWNNSLADCS TKESLLLRDKDELIHTQN
LIRDKAILFWIGLNFALSEKNWKWING SFLNSNDLEIRGDAKENS CISISQTSVYSEY
CSTEIRWICQKELTPVRNKVYPDSGTHHHHHHHHG

Obrázek 8: Aminokyselinová sekvence produkovaného konstruktu NKR-P1A S159A. **Růžově** jsou zvýrazněny asparaginy schopné *N*-vázané glykosylace v pozicích 116 a 169. Mutace S159A nahradila serin za alanin v pozici 159 (**červeně**), který zabránil *N*-vázané glykosylaci na Asn 157 (**zeleně**), protože konvenční sekvence N–X–S/T pro *N*-vázanou glykosylaci na asparaginu byla jeho přítomností porušena. **Zelené písmo** označuje *N*-terminální pozůstatek sekrečního signálu přítomného v expresním plasmidu (protein je buňkami sekretován do média a sekreční signál je jimi odštěpen) a **modré písmo** označuje polyhistidinovou kotvu.

Mgr. Barbora Kalousková vytvořila expresní plasmid pUT7_NKRP1A_S159A. Pod jejím dohledem byla tímto plasmidem stabilně transfekována, selektována a subkultivována linie HEK293S GnTI⁻. S touto linií byly následně opakovaně prováděny produkce proteinu NKR-P1A S159A.

Produkce konstruktů lidského NKR-P1A S159A o objemu 960 ml byla filtrována na filtrech s 0,22 μm póry a purifikována pomocí afinitní chelatační a gelové permeační chromatografie. Eluát z afinitní chromatografie činil 14 ml a byl zkoncentrován na výsledný objem přibližně 250 μl . Zkoncentrovaný vzorek byl centrifugován při $30000 \times g$ a 20°C po dobu 5 minut. Se vzorkem byla následně provedena gelová permeační chromatografie (Obrázek 9).

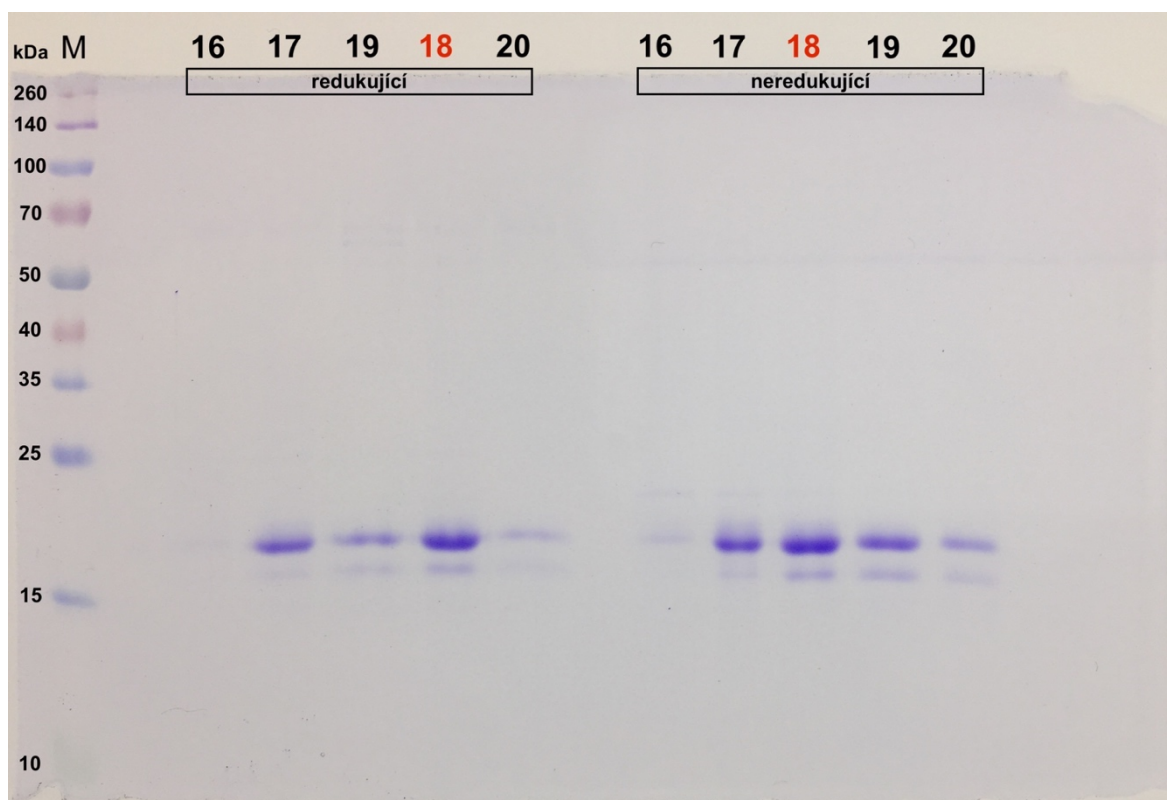


Obrázek 9: Průběh gelové permeační chromatografie NKR-P1A G90-S225 S159A. Frakce byly sbírány po 0,5 ml. Celkem bylo sesbíráno 23 frakcí. NKR-P1A S159A se začal eluovat přibližně při 15,4 ml (hlavní monodisperzní pík). Na obrázku jsou svislými černými čarami zvýrazněny frakce, které obsahovaly glykoprotein NKR-P1A S159A a byly použity dále. Byly to frakce 16 až 20 (**červeně**).

U sesbíraných frakcí 16–20 z gelové permeační chromatografie byla změřena koncentrace konstruktů NKR-P1A S159A (Tabulka 2). Pomocí programu ProtParam⁴⁰ byly po zadání aminokyselinové sekvence konstruktů NKR-P1A S159A spočítány molekulová hmotnost 17413,67 Da a teoretický extinkční koeficient 39335 M⁻¹cm⁻¹. Následně byly frakce použity pro analýzu pomocí SDS-PAGE. Vzorky byly do jamek gelu pipetovány jako duplikáty pro redukující i neredukující prostředí (Obrázek 10).

Tabulka 2: Koncentrace NKR-P1A S159A ve frakcích 16–20 po gelové permeační chromatografii, kde *c* označuje koncentraci proteinu a *m* jeho hmotnost, tj. výtěžek v jednotlivých frakcích.

frakce	16	17	18	19	20
<i>c</i> [mg ml ⁻¹]	0,01	0,05	0,13	0,04	0,02
<i>m</i> [mg]	0,005	0,025	0,065	0,02	0,01

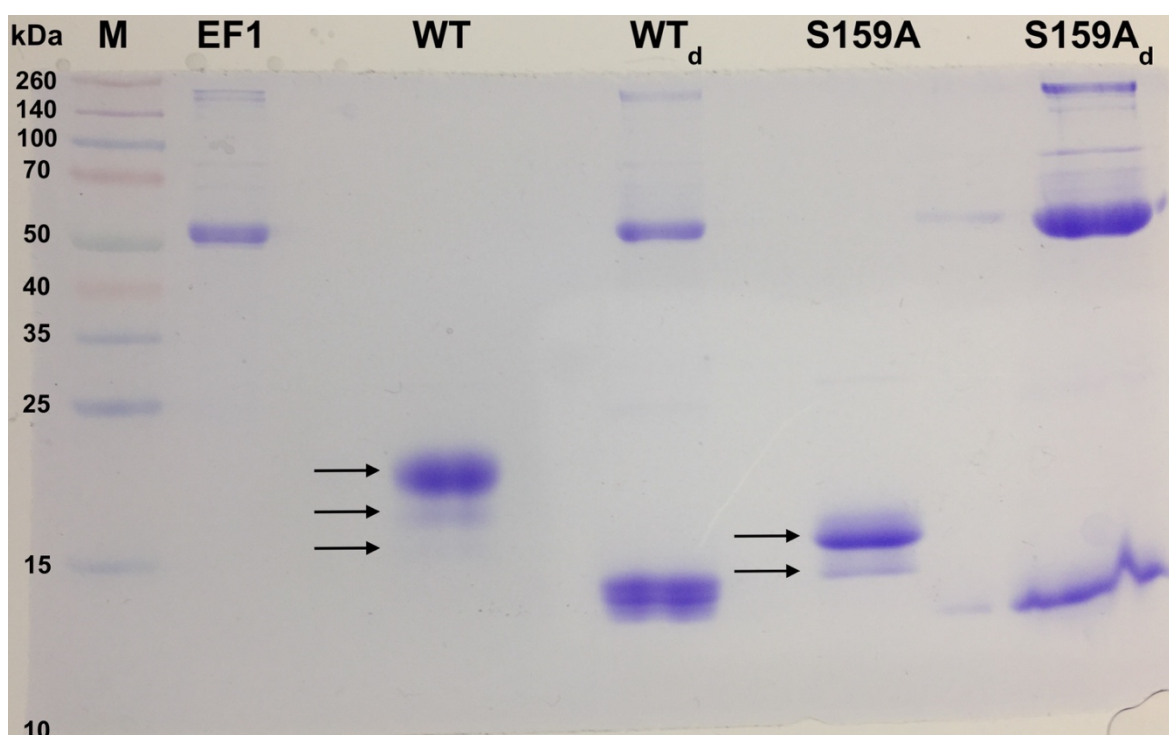


Obrázek 10: Analýza vzorků NKR-P1A S159A z frakcí 16–20 po gelové permeační chromatografii pomocí SDS-PAGE. Na obrázku je 12,5% polyakrylamidový gel po SDS-PAGE. **M** označuje proteinový standard molekulových hmotností, jeho jednotlivé pruhy jsou označeny jejich přibližnou molekulovou hmotností v kDa. Čísla **16–20** označují jednotlivé frakce pipetované do jamek gelu. Frakce číslo 18 (**červeně**) s nejvyšší koncentrací konstruktů je pro přehlednost zvýrazněna, protože její pořadí se lišilo v redukující a neredukující části gelu. Je vidět, že konstrukt je primárně přítomný ve dvou glykoformách (dva pruhy o rozdílné molekulové hmotnosti). Redukující a neredukující prostředí nemělo rozdílný vliv na protein.

Výtěžek po této gelové permeační chromatografii činil pouze 0,13 mg na litr buněčného média. Tento výsledek je možné považovat za statisticky odlehlý, protože u dalších tří produkcí výtěžek činil v průměru 1,1 mg na litr média – u dalších tří produkcí konstruktů NKR-P1A S159A výtěžky činily 1,68 a 1,31 a 0,42 mg.

5.2 Deglykosylace konstruktů NKR-P1A S159A

Pro srovnání mutantního konstruktů lidského NKR-P1A S159A a jeho přirozeného typu byla provedena jejich deglykosylace pomocí endoglykosidasy F1 s následnou analýzou pomocí SDS-PAGE. Oba deglykosylované konstrukty vykazovaly podobnou zdánlivou molekulovou hmotnost 15 kDa na rozdíl od jejich glykosylovaných forem (Obrázek 11).

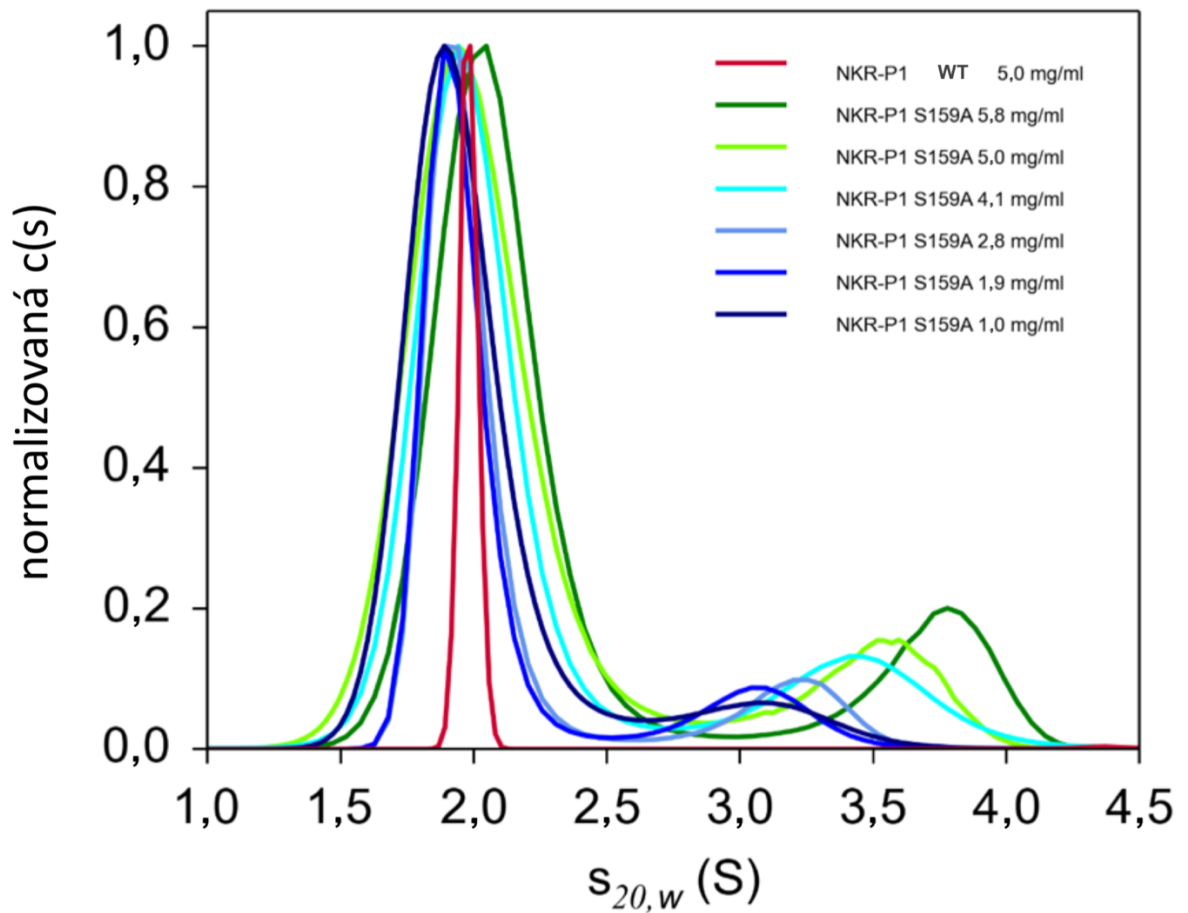


Obrázek 11: Analýza deglykosylace konstruktů NKR-P1A S159A a jeho přirozeného typu (WT). M označuje proteinový standard molekulových hmotností, jeho jednotlivé pruhy jsou označeny jejich přibližnou molekulovou hmotností v kDa. EF1 označuje endoglykosidasu F1 a index d v případě WT_d a $S159A_d$ označuje v tomto pořadí deglykosylovaný přirozený typ lidského NKR-P1A a jeho mutantní S159A formu. Z poloh pruhů na gelu je vidět, že obě deglykosylované formy NKR-P1A měly stejnou zdánlivou molekulovou hmotnost. Naopak tomu bylo u jejich glykosylovaných forem, kde WT měl větší molekulovou hmotnost než konstrukt NKR-P1A S159A, který neměl na N-vázaném glykosylačním místě 157 navázaný oligosacharidový řetězec. Černé šipky označují jednotlivé pruhy proteinů o různém stupni N-glykosylace: pro WT byly pozorovány tři glykoformy proteinu a pro konstrukt S159A jenom dvě.

5.4 Sedimentační analýza oligomerního stavu NKR-P1 S159A v roztoku

Sedimentační analýza byla provedena metodou sedimentační rychlosti⁴¹, která umožňuje zjistit údaje o velikosti částic, jejich tvaru a o jejich zastoupení v roztoku. Při působení dostatečně velké odstředivé síly na roztok makromolekul v kyvetě se makromolekuly pohybují stejným směrem ke dnu kyvety. Tak se vytvoří rozhraní mezi sedimentujícími makromolekulami a roztokem, kde se již nenacházejí. Toto rozhraní se pohybuje směrem ke dnu kyvety (přičemž vlivem difuze dochází k jeho rozmývání) a je možné ho sledovat sérií snímků. Z rychlosti tohoto pohybu a tvaru rozhraní je možné určit sedimentační a difuzní koeficient makromolekuly a následně její velikost a tvar⁴¹.

Sedimentační analýzu provedl na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-1 RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Konstrukt NKR-P1A S159A byl analyzován při koncentracích 1 – 5,8 mg/ml. Normalizovanou distribuci sedimentačního koeficientu pro data získaná pomocí absorbanční detekce zobrazuje Obrázek 12 (str. 34). Konstrukt přirozeného typu NKR-P1A má pozorovanou hodnotu sedimentačního koeficientu přepočtenou na standardní podmínky (20 °C, čistá voda) $s_{20,w} = 2,1$ S. Na základě srovnání naměřeného sedimentačního koeficientu a teoretické hodnoty odpovídající sedimentaci částice tvaru koule o molekulové hmotnosti NKR-P1A lze odvodit, že se protein v roztoku nachází ve formě monomeru globulárního tvaru. Pro konstrukt NKR-P1A S159A však v grafu distribuce sedimentačního koeficientu se vzrůstající koncentrací vzorku pozorujeme rostoucí množství další částice o $s_{20,w} = 3,7$ S. Tato hodnota odpovídá očekávanému dimeru mutantu proteinu NKR-P1A S159A, zatímco přirozený typ NKR-P1A se v roztoku nachází i ve srovnatelně vysoké koncentraci pouze ve formě monomeru.



Obrázek 12: Sedimentační analýza konstruktů NKR-P1A S159A a jeho přirozeného typu (WT). Oba proteiny byly analyzovány v analytické ultracentrifuge v uvedených koncentracích a byla pro ně vypočítána distribuce sedimentačního koeficientu – graf zobrazuje porovnání normalizovaných křivek těchto distribucí pro oba proteiny o daných koncentracích. Vrchol u 2 S odpovídá monomernímu proteinu a posouvající se vrchol mezi 3 a 4 S odpovídá rovnováze monomer-dimer s rychlou kinetikou a vzrůstajícímu množství dimerního proteinu se vzrůstající koncentrací konstruktů NKR-P1A S159A.

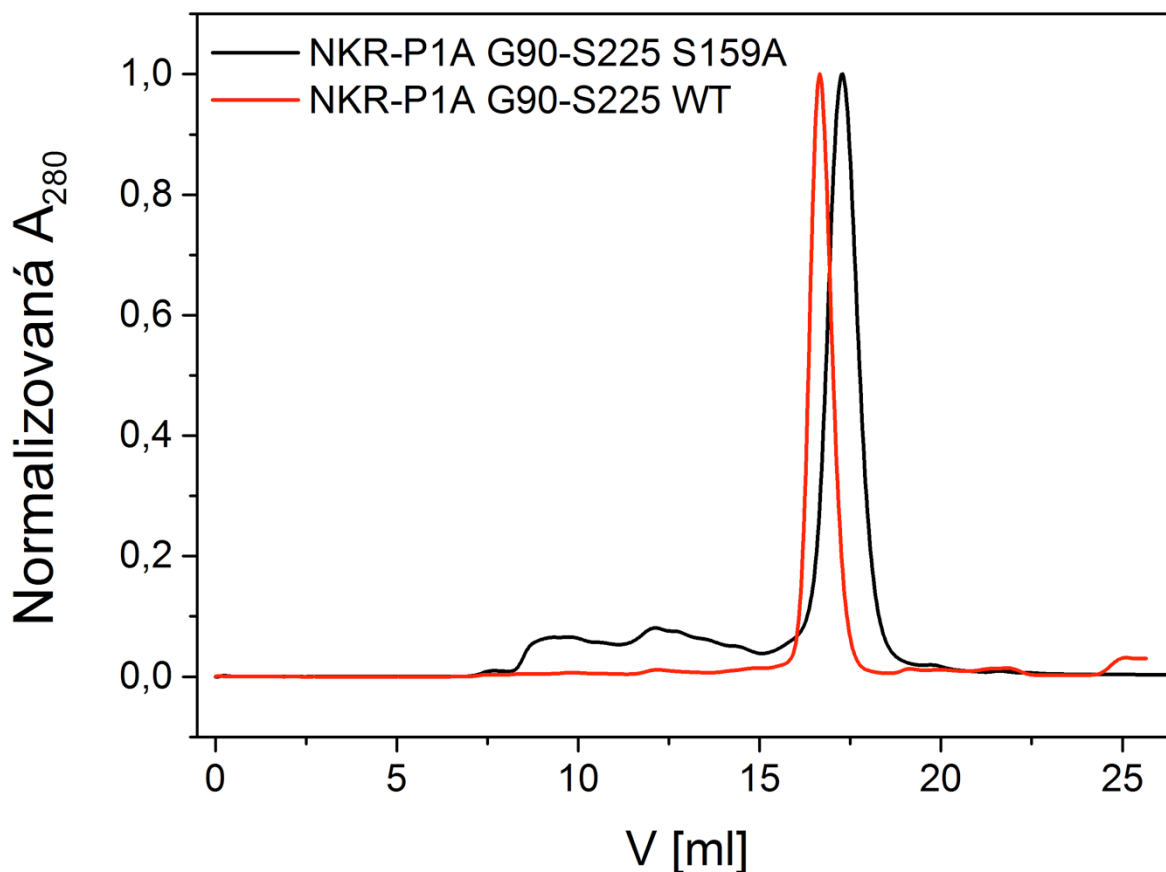
6. Diskuse

Mutantní forma rozpustné ektodomény lidského NKR-P1A G90-S225 S159A byla rekombinantně připravena v stabilně transfekovaných buňkách HEK293S GnTI⁻. Tato linie poskytuje uniformní *N*-vázanou glykosylaci (Asn-GlcNAc₂-Man₅)⁴⁴. Buňky byly transfekovány použitím transposonového systému *piggyBac*. Konstrukt NKR-P1A S159A byl buňkami sekretován do média a z něj byl purifikován pomocí chelatační afinitní a následně gelové permeační chromatografie.

Retenční objem připravované mutantní formy ektodomény receptoru NKR-P1A na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL byl srovnatelný, ale větší (17,28 ml) než retenční objem jeho přirozené formy na stejné chromatografické koloně (16,65 ml) (Obrázek 13, str. 36). Větší retenční objem mutované formy je pravděpodobně způsoben změnou hydrodynamického poloměru molekuly způsobenou ztrátou jednoho *N*-vázaného oligosacharidu (na pozici N157).

Získané frakce obsahující ektodoménu lidského receptoru NKR-P1A S159A byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 10, str. 31). Výsledky potvrdily přítomnost proteinu o zdánlivé molekulové hmotnosti přibližně 17 kDa, což velmi dobře odpovídá teoretické molekulové hmotnosti 17413,67 Da konstruktu NKR-P1A S159A. Redukující a neredukující prostředí nemělo na NKR-P1A pro konstrukt S159A ani jeho přirozenou formu rozdílný vliv, jelikož ektodoména NKR-P1A netvoří kovalentní dimery (nebo vyšší oligomery) prostřednictvím disulfidických vazeb postranních řetězců cysteinů.

Následná deglykosylace obou konstruktů potvrdila, že oba deglykosylované proteiny mají stejnou zdánlivou molekulovou hmotnost (Obrázek 11, str. 32). U obou proteinů tedy endoglykosidasa F1 dokázala kompletně odštěpit *N*-vázané oligosacharidové řetězce ze všech asparaginů (na každém takovém asparaginu však zůstává navázaná jedna molekula *N*-acetylglukosaminu). Oba deglykosylované proteiny měly oproti svým glykosylovaným formám vyšší elektroforetickou mobilitu (menší zdánlivou molekulovou hmotnost) a v souladu s očekáváním oba glykosylované konstrukty migrovaly gelem jako několik různých proužků odpovídajících jednotlivým glykoformám daného proteinu. *N*-vázané glykosylační místo totiž nemusí být vždy glykosylované – přirozená forma ektodomény receptoru NKR-P1A mohla tudíž obsahovat až tři *N*-vázané oligosacharidy, zatímco mutantní forma S159A maximálně dva. Tomu odpovídá vyšší pozorovaný počet proužků pro glykosylované NKR-P1A přirozeného typu oproti mutantu S159A (Obrázek 11, str. 32).

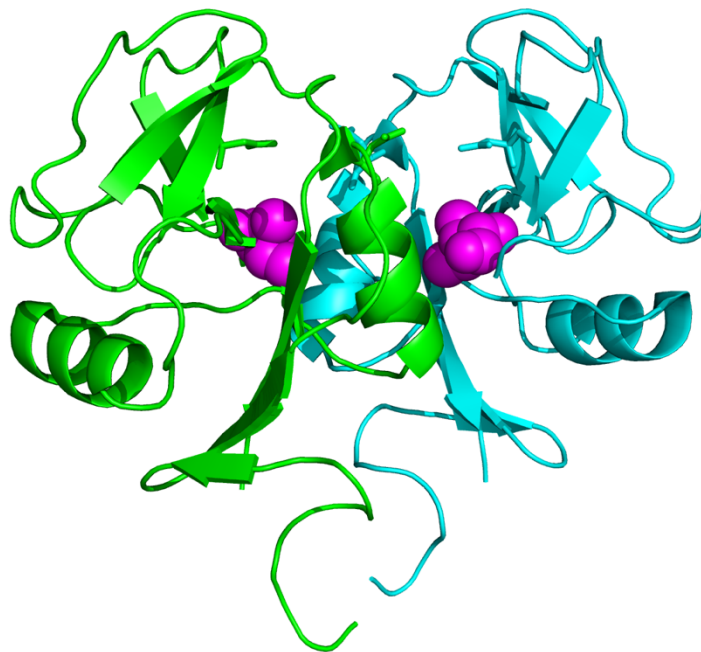


Obrázek 13: Srovnání dvou glykosylačních stavů konstruktů NKR-P1A G90-S225. Graf ukazuje porovnání průběhu gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL dvou konstruktů ektodomény lidského NKR-P1A: přirozené formy (WT, **červeně**) a mutantní formy (S159A, **černě**) bez N-vázané glykosylace v pozici Asn 157. Z grafu je patrné, že s ubývající glykosylací se retenční objem zvyšuje z důvodu změny hydrodynamického poloměru mutantní formy ektodomény způsobenou absencí oligosacharidu. Retenční objem pro konstrukt S159A byl 17,28 ml, pro přirozenou formu pak 16,65 ml.

Závěrečným krokem analýzy připraveného mutantu NKR-P1A S159A byla sedimentační analýza v analytické ultracentrifuze umožňující sledovat, zda se studované proteiny nachází v roztoku jako monomer nebo nekovalentní dimer. Z naměřené koncentrační série pro mutant S159A a z porovnání s měřením pro přirozený typ NKR-P1A lze potvrdit předpoklad, že absence jednoho ze dvou *N*-vázaných oligosacharidů, které se stericky překrývají v dimerizačním rozhraní, tvorbu dimeru podpořila (Obrázek 12, str. 34). Výsledky této analýzy mohou být biologicky relevantní. U většiny populace se v dimerizačním rozhraní ektodomény NKR-P1A nachází obě *N*-vázaná glykosylační místa 116 a 157. Existuje však také jednonukleotidový polymorfismus N157S – u lidí s tímto polymorfismem⁴⁵ se na ektodomě NKR-P1A nenachází *N*-vázané glykosylační

místo 157. V souvislosti s výsledky studie z roku 2015 o polymorfismu NKR-P1A v pozici I168T (viz níže) se zdá, že polymorfismus N157S by také mohl mít vliv na signalizaci komplexu NKR-P1A:LLT1.

V roce 2015 byl popsán jednonukleotidový genetický polymorfismus c.503T>C lidského genu *KLRB1* kódujícího NKR-P1A⁴⁶. Tento polymorfismus má za následek záměnu isoleucinu 168 ektodomény lidského NKR-P1A za threonin (I168T)⁴⁷. Zároveň byl potvrzen vliv tohoto polymorfismu na signalizaci způsobenou interakcí NKR-P1A s jeho ligandem LLT1. Konkrétně bylo zjištěno, že u CC homozygotních jedinců byla inhibiční funkce receptoru méně efektivní než u TT homozygotů. V krystalové struktuře ektodomény NKR-P1A můžeme pozorovat, že se Ile 168 nachází na dimerizačním rozhraní v hydrofobním jádru nekovalentního dimeru (Obrázek 14) a ne v interakčním rozhraní s LLT1, jak bylo dříve předpokládáno⁴⁶. Je tedy možné usuzovat, že důvodem pro změnu inhibiční aktivity receptoru je oslabení jeho schopnosti nekovalentní dimerizace, protože hydrofobní isoleucin je nahrazen polárním threoninem, který má na svém postranním řetězci hydrofilní OH skupinu.



Obrázek 14: Isoleuciny 168 se nacházejí v dimerizačním rozhraní ektodomény lidského NKR-P1A. Residua Ile 168 jsou znázorněné růžovým kuličkovým modelem na obou monomerech NKR-P1A (zelený a modrý). Záměna I168T má za následek změnu inhibiční aktivity NKR-P1A. Vytvořeno v programu PyMOL²⁴ (kód PDB: 5MGR).

Když má náhrada I168T nacházejícího se v dimerizačním rozhraní prokazatelný vliv na signalizační aktivitu NKR-P1A, pravděpodobně kvůli oslabení schopnosti dimerizace jeho ektodomény, je analogicky možné předpokládat, že jiné bodové mutace ovlivňující oligomerní stav tohoto receptoru mohou mít podobný vliv na signalizaci receptoru NKR-P1A. Z toho může obecně plynout, že glykosylační stupeň v dimerizačním rozhraní ektodomény lidského receptoru NKR-P1A může mít vliv na aktivitu tohoto receptoru.

Lidský gen *KLRB1* kódující NKR-P1A je jedním z identifikovaných genů, které souvisí s rozvojem řady autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, psoriatida, roztroušené sklerózy, aj.)⁴⁶. Abnormální signalizační funkce tohoto receptoru způsobená dědičnou změnou dynamiky jeho přirozené oligomerie může být signifikantní pro rozvoj takových chorob. Souvislosti mezi oligomerním stavem tohoto receptoru, vlivu na signalizaci NK buněk a NK buněčné odpovědi a patologií autoimunitních chorob by proto měly být dále studovány.

7. Shrnutí

Mutantní forma rozpustné ektodomény lidského NKR-P1A G90-S225 S159A byla rekombinantně připravena použitím stabilně transfekovaných buněk HEK293S GnTI- a následně purifikována. Byl potvrzen vliv mutace S159A na oligomerní stav ektodomény v roztoku – mutace podpořila vznik dimeru ektodomény v roztoku.

8. Seznam použité literatury

- (1) Male, D.; Brostoff, J.; Roth, D. B.; Roitt, I. *Immunology*, 7th ed.; Elsevier Ltd.: Edinburgh, 2006.
- (2) Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H. “Natural” Killer Cells in the Mouse I. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Specificity and Distribution According to Genotype. *Eur. J. Immunol.* 1975, 5, 112–117.
- (3) Kiessling, R.; Klein, E.; Pross, H.; Wigzell, H. „Natural” Killer Cells in the Mouse. II. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Characteristics of the Killer Cell. *Eur. J. Immunol.* 1975, 5, 117–121.
- (4) Kiessling, R.; Hochman, P. S.; Haller, O.; Shearer, G. M.; Wigzell, H.; Cudkovicz, G. Evidence for a Similar or Common Mechanism for Natural Killer Cell Activity and Resistance to Hemopoietic Grafts. *Eur. J. Immunol.* 1977, 7 (9), 655–663.
- (5) Hatcher, F. M.; Kuhn, R. E. Destruction of *Trypanosoma Cruzi* by Natural Killer Cells. *Science* 1982, 218 (4569), 295–296.
- (6) Holmberg, L. A.; Miller, B. A.; Ault, K. A. The Effect of Natural Killer Cells on the Development of Syngeneic Hematopoietic Progenitors. *J. Immunol.* 1984, 133 (6), 2933–2939.
- (7) Caligiuri, M. A. Human Natural Killer Cells. *Blood* 2008, 112 (3), 461–469.
- (8) Spits, H.; Blom, B.; Jaleco, A.-C.; Weijer, K.; Verschuren, M. C. M.; van Dongen, J. J. M.; Heemskerk, M. H. M.; Res, P. C. M. Early Stages in the Development of Human T, Natural Killer and Thymic Dendritic Cells. *Immunol. Rev.* 1998, 165 (1), 75–86.
- (9) Walzer, T.; Bléry, M.; Chaix, J.; Fusser, N.; Chasson, L.; Robbins, S. H.; Jaeger, S.; André, P.; Gauthier, L.; Daniel, L.; et al. Identification, Activation, and Selective in Vivo Ablation of Mouse NK Cells via NKp46. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 104 (9), 3384–3389.
- (10) Lanier, L. L. NK Cell Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005, 23 (1), 225–274.
- (11) Ljunggren, H. G.; Kärre, K. In Search of the “Missing Self”: MHC Molecules and NK Cell Recognition. *Immunol. Today* 1990, 11 (7), 237–244.
- (12) Hewitt, E. W. The MHC Class I Antigen Presentation Pathway: Strategies for Viral Immune Evasion. *Immunology* 2003, 110 (2), 163–169.
- (13) Bottino, C.; Castriconi, R.; Moretta, L.; Moretta, A. Cellular Ligands of Activating

- NK Receptors. *Trends Immunol.* 2005, 26 (4), 221–226.
- (14) Barrow, A. D.; Trowsdale, J. You Say ITAM and I Say ITIM, Let's Call the Whole Thing off: The Ambiguity of Immunoreceptor Signalling. *Eur. J. Immunol.* 2006, 36 (7), 1646–1653.
- (15) Yokoyama, W. M.; Plougastel, B. F. M. Immune Functions Encoded by the Natural Killer Gene Complex. *Nat. Rev. Immunol.* 2003, 3 (4), 304–316.
- (16) Bartel, Y.; Bauer, B.; Steinle, A. Modulation of NK Cell Function by Genetically Coupled C-Type Lectin-like Receptor/Ligand Pairs Encoded in the Human Natural Killer Gene Complex. *Front. Immunol.* 2013, 4, 362.
- (17) Loris, R. Principles of Structures of Animal and Plant Lectins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2002, 1572 (2–3), 198–208.
- (18) Weis, W. I.; Drickamer, K. Structural Basis of Lectin-Carbohydrate Recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 1996, 65 (1), 441–473.
- (19) Zelensky, A. N.; Gready, J. E. The C-Type Lectin-like Domain Superfamily. *FEBS J.* 2005, 272 (24), 6179–6217.
- (20) Drickamer, K.; Dordal, M. S.; Reynolds, L. Mannose-Binding Proteins Isolated from Rat Liver Contain Carbohydrate-Recognition Domains Linked to Collagenous Tails. Complete Primary Structures and Homology with Pulmonary Surfactant Apoprotein. *J. Biol. Chem.* 1986, 261 (15), 6878–6887.
- (21) Weis, W. I.; Kahn, R.; Fourme, R.; Drickamer, K.; Hendrickson, W. A. Structure of the Calcium-Dependent Lectin Domain from a Rat Mannose-Binding Protein Determined by MAD Phasing. *Science* 1991, 254 (5038), 1608–1615.
- (22) Drickamer, K. C-Type Lectin-like Domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999, 9 (5), 585–590.
- (23) Aldemir, H.; Prod'homme, V.; Dumaurier, M.-J.; Retiere, C.; Poupon, G.; Cazareth, J.; Bihl, F.; Braud, V. M. Cutting Edge: Lectin-Like Transcript 1 Is a Ligand for the CD161 Receptor. *J. Immunol.* 2005, 175 (12), 7791–7795.
- (24) Schrödinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, verze 1.2r3pre <https://pymol.org/> (25-04-2018).
- (25) Germain, C.; Meier, A.; Jensen, T.; Knapnougel, P.; Poupon, G.; Lazzari, A.; Neisig, A.; Håkansson, K.; Dong, T.; Wagtmann, N.; et al. Induction of Lectin-like Transcript 1 (LLT1) Protein Cell Surface Expression by Pathogens and Interferon- γ Contributes to Modulate Immune Responses. *J. Biol. Chem.* 2011, 286 (44), 37964–

37975.

- (26) Lanier, L. L.; Chang, C.; Phillips, J. H. Human NKR-P1A. A Disulfide-Linked Homodimer of the C-Type Lectin Superfamily Expressed by a Subset of NK and T Lymphocytes. *J. Immunol.* 1994, *153* (6), 2417–2428.
- (27) Fergusson, J. R.; Fleming, V. M.; Klenerman, P. CD161-Expressing Human T Cells. *Front. Immunol.* 2011, *2* (36), 1–7.
- (28) Kamishikiryo, J.; Fukuhara, H.; Okabe, Y.; Kuroki, K.; Maenaka, K. Molecular Basis for LLT1 Protein Recognition by Human CD161 Protein (NKR-P1A/KLRB1). *J. Biol. Chem.* 2011, *286* (27), 23823–23830.
- (29) Schwarz, F.; Aebi, M. Mechanisms and Principles of N-Linked Protein Glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2011, *21* (5), 576–582.
- (30) Thomas, P.; Smart, T. G. HEK293 Cell Line: A Vehicle for the Expression of Recombinant Proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2005, *51* (3), 187–200.
- (31) Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* 1977, *36* (1), 59–72.
- (32) Kim, T. K.; Eberwine, J. H. Mammalian Cell Transfection: The Present and the Future. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, *397* (8), 3173–3178.
- (33) Bláha, J.; Kalousková, B.; Skořepa, O.; Pažický, S.; Novák, P.; Vaněk, O. High-Level Expression and Purification of Soluble Form of Human Natural Killer Cell Receptor NKR-P1 in HEK293S GnTI⁻ Cells. *Protein Expr. Purif.* 2017, *140*, 36–43.
- (34) Li, Z.; Michael, I. P.; Zhou, D.; Nagy, A.; Rini, J. M. Simple PiggyBac Transposon-Based Mammalian Cell Expression System for Inducible Protein Production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013, *110* (13), 5004–5009.
- (35) Garrick, D.; Fiering, S.; Martin, D. I. K.; Whitelaw, E. Repeat-Induced Gene Silencing in Mammals. *Nat. Genet.* 1998, *18* (1), 56–59.
- (36) Wilson, M. H.; Coates, C. J.; George, A. L. PiggyBac Transposon-Mediated Gene Transfer in Human Cells. *Mol. Ther.* 2007, *15* (1), 139–145.
- (37) Ding, S.; Wu, X.; Li, G.; Han, M.; Zhuang, Y.; Xu, T. Efficient Transposition of the PiggyBac (PB) Transposon in Mammalian Cells and Mice. *Cell* 2005, *122* (3), 473–483.
- (38) Yusa, K.; Zhou, L.; Li, M. A.; Bradley, A.; Craig, N. L. A Hyperactive PiggyBac

- Transposase for Mammalian Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011, *108* (4), 1531–1536.
- (39) Agha-Mohammadi, S.; O'Malley, M.; Etemad, A.; Wang, Z.; Xiao, X.; Lotze, M. T. Second-Generation Tetracycline-Regulatable Promoter: Repositioned Tet Operator Elements Optimize Transactivator Synergy While Shorter Minimal Promoter Offers Tight Basal Leakiness. *J. Gene Med.* 2004, *6* (7), 817–828.
- (40) Swiss Institute of Bioinformatics. ExPASy - ProtParam tool <https://web.expasy.org/protparam> (25-04-2018).
- (41) Vaněk, O.; Bezouška, K. Analytická ultracentrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chem. List.* 2010, *104* (12), 1155–1162.
- (42) Philo, J. SEDNTERP, verze 2 <http://jphilo.mailway.com/download.htm#SEDNTERP> (24-05-2018).
- (43) Schuck, P. SEDFIT, verze 15.01b <http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedfit.htm> (24-05-2018).
- (44) Reeves, P. J.; Callewaert, N.; Contreras, R.; Khorana, H. G. Structure and Function in Rhodopsin: High-Level Expression of Rhodopsin with Restricted and Homogeneous N-Glycosylation by a Tetracycline-Inducible N-Acetylglucosaminyltransferase I-Negative HEK293S Stable Mammalian Cell Line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, *99* (21), 13419–13424.
- (45) National Center for Biotechnology Information. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs775856610 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=775856610 (28-04-2018).
- (46) Rother, S.; Hundrieser, J.; Pokoyski, C.; Kollrich, S.; Borns, K.; Blasczyk, R.; Poehnert, D.; Klempnauer, J.; Schwinzer, R. The c.503T>C Polymorphism in the Human KLRB1 Gene Alters Ligand Binding and Inhibitory Potential of CD161 Molecules. *PLoS One* 2015, *10* (8), 1–18.
- (47) National Center for Biotechnology Information. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1135816 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs1135816 (28-04-2018).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka