

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Kristýna Pazderová

**MUTAGENEZE A EXPRESE PROTEINU NKp80,
AKTIVAČNÍHO RECEPTORU LIDSKÝCH LYMFOCYTŮ**

**MUTAGENESIS AND EXPRESSION OF PROTEIN NKp80,
THE ACTIVATING RECEPTOR OF HUMAN LYMPHOCYTES**

Bakalářská práce

Konzultantka: Mgr. Barbora Kalousková

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

Praha, 2021

PROHLÁŠENÍ:

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

V Praze dne:

Váš podpis:

Kristýna Pazderová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mě podporovali a pomáhali mi v průběhu mé práce v laboratoři. Nejprve bych chtěla poděkovat **RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D.** za možnost být součástí týmu v laboratoři 204 a za možnost pracovat na tomto projektu. Dále bych chtěla poděkovat **Mgr. Barboře Kalouskové**, na jejíž diplomovou práci jsem navazovala, za její trpělivost, organizaci experimentů, rady, konzultace výsledků a celkově za čas, který byla ochotná si pro mě vyhradit. Také bych chtěla poděkovat **Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu** za pomoc při měření DSF a **Mgr. Ondřeji Skořepovi** za rady a pomoc při provádění experimentů. Děkuji také všem členům laboratoře 204 za vytváření skvělého pracovního a přátelského prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem, kteří tu pro mě byli, když jsem potřebovala, a to rodině a přátelům.

ABSTRAKT

Předmětem této práce je receptor NKp80, také známý jako KLRF1 (z angl. *killer cell lectin-like subfamily F, member 1*). Je to aktivační receptor tvořící homodimery na povrchu NK buněk. Váže se na ligand AICL, který se přirozeně nachází na myeloidních buňkách. Pokud dojde k výraznému navýšení exprese ligandu AICL, např. na nádorových buňkách, stává se buňka terčem pro NK buňky, které exprimují receptor NKp80. Komplex NKp80:AICL je potenciálním cílem imunoterapeutické léčby myeloidní leukémie.

Cílem práce byla produkce a purifikace extracelulární domény receptoru NKp80 a jejích variant, kde v její části tzv. „stalk“ oblasti byly jednotlivé cysteiny nahrazeny seriny. Pomocí zavedených mutací zde byl sledován vliv na tvorbu homodimerů. Proteiny byly produkovány za použití stabilně transfekovaných linií buněk HEK293S GnTI-. Celkem bylo produkováno sedm mutantů se všemi možnými kombinacemi mutací tří cysteinů „stalk“ oblasti. Proteiny pak byly analyzovány pomocí analytické gelové permeační chromatografie, diferenční skenovací fluorimetrie, a nakonec byla pomocí deglykosylace ověřena přítomnost více glykosylačních forem receptoru NKp80.

Z výsledků je zřejmé, že u žádných varianty receptoru NKp80 nedochází ke tvorbě kovalentních homodimerů, ale z hodnoty elučního objemu proteinu můžeme předpokládat, že v roztoku dochází k tvorbě dimerů nekovalentních. Dále u NKp80 nebyla zjištěna nijak výrazná korelace mezi pozicí mutace či kombinací mutací a úrovní exprese či termální stability. U všech proteinů byla potvrzena přítomnost více glykosylačních forem.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňka, NKp80, AICL, imunoterapie, HEK293S GnTI-

ABSTRACT

The subject of this study is a receptor NKp80, also known as killer cell lectin-like subfamily F, member 1 (KLRF1). It is an activating receptor which forms homodimers on the surface of natural killer (NK) cells. Receptor NKp80 binds to a ligand, AICL, which is naturally expressed on all myeloid cells. Upon a substantial increase in AICL expression, for example in cancer cell, the cell then becomes a target for an NK cells expressing the receptor NKp80. Ultimately, the complex NKp80:AICL is therefore a potential target for the immunotherapeutic treatment of myeloid leukaemia.

The aim of the study was to produce and purify a series of mutants of an extracellular domain of NKp80 by replacing cysteins by serines in a segment of extracellular domain called the stalk region. Here, by introducing the mutations, we studied their effect on homodimer formation. The proteins were prepared in HEK293S GnTI⁻ cells using stable transfection. Altogether, we produced seven mutants with all possible combinations of mutations of the three cysteins in the stalk region. We then analysed the proteins using size exclusion chromatography and differential scanning fluorimetry. Lastly, we deglycosylated the proteins to verify that NKp80 is present in several glycoforms.

Our results show that none of the variants of NKp80 form covalent dimers. However, regarding the elution volume of the proteins we may suggest that they form non-covalent dimers. In addition, we ascertained that there is no significant correlation between the position of a mutation or their combinations and the level of expression or their thermal stability. Finally, we confirmed the presence of several glycoforms in all prepared proteins.

KEY WORDS

NK cell, NKp80, AICL, immunotherapy, HEK293S GnTI⁻

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AA	akrylamid
ACT	adoptivní buněčná terapie (z angl. <i>adoptive cell therapy</i>)
ADCC	cytotoxická reakce závislá na protilátkách (z angl. <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AICL	receptor NK buněk (z angl. <i>activation-induced C-type lectin</i>)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. <i>ammonium persulfate</i>)
BiKE/TriKE	bi/tri-specifické protilátky (z angl. <i>bi-/tri-specific killer engagers</i>)
CAR	chimérický antigenní receptor (z angl. <i>chimeric antigen receptor</i>)
CD	označení povrchových molekul leukocytů, (z angl. <i>cluster of differentiation</i>)
CLEC2	rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu (z angl. <i>C-type lectin domain family</i>)
CPI	blokátor kontrolních bodů (z angl. <i>checkpoint inhibitor</i>)
CTLA-4	protein asociovaný s cytotoxickými T-lymfocyty (z angl. <i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>)
CTLD	doména podobná lektinům C-typu (z angl. <i>C-type lectin-like domain</i>)
CTLR	receptory podobné lektinům C-typu (z angl. <i>C-type lectin-like receptors</i>)
CRD	doména rozpoznávající sacharidy (z angl. <i>carbohydrate-recognition domain</i>)
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát (z angl. <i>deoxynucleoside triphosphate</i>)
DSF	diferenční skenovací fluorimetrie (z angl. <i>differential scanning fluorimetry</i>)
Fab	variabilní oblast protilátky (z angl. <i>fragment antigen-binding</i>)
Fas	receptor indukující apoptózu, člen rodiny receptorů TNF
Fc	konstantní oblast protilátky (z angl. <i>fragment crystallizable</i>)
GnTI	buňky deficientní na N-acetylglukosaminyltransferasu I
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293 (z angl. <i>human embryonic kidney cell line 293</i>)
HLA-I	hlavní lidský histokompatibilní antigen (z angl. <i>human leukocyte antigen</i>)
HPV16	lidský papillomavirus typu 16 (z angl. <i>human papillomavirus type 16</i>)
HSCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk (z angl. <i>allogeneic haematopoetic stem cell transplantation</i>)
IFN	interferon
IL	interleukin

ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (z angl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (z angl. <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
KIR	zabíječský receptor z imunoglobulinové superrodiny (z angl. <i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i>)
KSHV	herpes virus asociovaný s Kaposiho sarkomem (z angl. <i>Kaposi's sarcoma associated herpesvirus</i>)
LB	název média podle Luria-Bertaniho
LILR	receptory leukocytů patřící do imunoglobulinové nadrodiny (z angl. <i>leukocyte immunoglobulin-like receptors</i>)
LRC	oblast na chromosomu 19q13.4 kódující imunoglobulinové receptory (z angl. <i>leukocyte receptor complex</i>)
MALT	slizniční imunitní systém (z angl. <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
MHC gp. I	glykoproteiny MHC třídy I (z angl. <i>major histocompatibility complex glycoproteins type I</i>)
NCR	receptory přirozené cytotoxicity patřící do imunoglobulinové nadrodiny (z angl. <i>natural cytotoxicity receptors</i>)
NK	přirození zabijáci (z angl. <i>natural killer</i>)
NKC	NK genový komplex (z angl. <i>natural killer complex</i>)
NKp80	receptor NK buněk o velikosti 80 kDa (z angl. <i>natural killer cell protein 80 kDa</i>)
NKT	T lymfocyty podobné NK buňkám (z angl. <i>natural killer T-lymphocyte</i>)
NKRp1	rodina receptorů NK buněk (z angl. <i>natural killer receptor protein 1</i>)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD1	receptor na povrchu buněk kontrolujících imunitní odpověď (z angl. <i>programmed cell death 1</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS
Th	pomocné T lymfocyty (z angl. <i>helper T-lymphocytes</i>)
TILs	T lymfocyty izolované z nádorové tkáně (z angl. <i>tumour-infiltrating lymphocytes</i>)
TLR	receptory podobné receptoru Toll (z angl. <i>toll-like receptors</i>)
TNF	faktor nekrotizující nádory (z angl. <i>tumor necrosis factor</i>)
TRAIL	ligand indukující apoptózu, člen rodiny receptorů TNF (z angl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)

Obsah

1	Teoretický úvod.....	13
1.1	Imunitní systém	13
1.1.1	Vrozený imunitní systém	13
1.1.2	Adaptivní imunitní systém	14
1.1.3	Lymfatické tkáně a buňky imunitního systému.....	14
1.2	NK buňky	15
1.2.1	Funkce NK buněk.....	16
1.2.2	Regulace funkce NK buněk	17
1.2.3	Mechanismus cytotoxicity přirozeně zabíječských buněk	19
1.3	Receptory NK buněk	20
1.3.1	Geny kódující receptory NK buněk	21
1.3.2	Receptory imunoglobulinové nadrodiny	21
1.3.3	Receptory podobné lektinům C-typu	21
1.3.4	Skupina receptorů NKR-P1.....	23
1.3.5	Receptor NKp80.....	25
1.4	Imunoterapie	27
1.4.1	Imunoterapie založená na NK buňkách.....	29
2	Cíl práce	31
3	Materiál	32
3.1	Přístroje a pomůcky	32
3.2	Chemikálie.....	33
3.3	Pufry a roztoky	34
3.4	Kultivační média	34
3.5	Enzymy	35
3.6	Vektory	35
3.7	Buněčné linie a bakteriální kmeny.....	35
3.8	Primery pro PCR.....	35
4	Metody.....	36
4.1	Příprava expresních vektorů.....	36
4.1.1	Příprava vektorů pomocí celoplasmidové PCR.....	36
4.1.2	Agarosová elektroforéza.....	37
4.1.3	Přečištění plasmidové DNA z reakční směsi PCR.....	37
4.1.4	Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10 a jejich produkce.....	38
4.1.5	Nízkoobjemová produkce plasmidové DNA.....	38

4.1.6	Sekvenování plasmidové DNA.....	38
4.1.7	Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> DH5 α a jejich produkce.....	39
4.1.8	Velkoobjemová produkce plasmidové DNA	39
4.1.9	Určení koncentrace a čistoty plasmidové DNA	39
4.2	Exprese proteinů v linii HEK293S GnTI.....	40
4.2.1	Kultivace buněk.....	40
4.2.2	Transfekce buněk a tvorba stabilní linie.....	40
4.2.3	Selekce stabilních linií	40
4.2.4	Sklízení proteinu	41
4.3	Purifikace proteinů.....	41
4.3.1	Afinitní chromatografie.....	41
4.3.2	Koncentrování proteinů.....	42
4.3.3	Gelová permeační chromatografie	42
4.3.4	Stanovení koncentrace proteinů	43
4.3.5	Deglykosylace proteinů.....	43
4.3.6	SDS page	43
4.3.7	Diferenční Skenovací Fluorimetrie	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Příprava expresních vektorů mutantů pomocí celoplasmidové PCR a produkce	46
5.2	Purifikace proteinů.....	47
5.2.1	Analytická gelová permeační chromatografie	50
5.2.2	Diferenční skenovací fluorimetrie	51
5.2.3	Deglykosylace proteinů.....	53
6	Diskuze.....	55
7	Závěr.....	58
8	Seznam citované literatury	59

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém je důležitý pro ochranu organismu, a to nejen před patogeny. Na základě modelu navrhnutém Polly Matzinger, tzv. *Danger* modelu, je hlavním cílem imunitního systému zbavit se látek či mikroorganismů, které jsou pro organismus nebezpečné¹. Mezi tyto látky patří nejen látky tělu nevlastní, např. bakterie, viry a toxiny, ale i látky tělu vlastní, např. napadené či poškozené buňky organismu. Tyto buňky poté signalizují buňkám imunitního systému, který reaguje tak, aby při odpovědi došlo k eliminaci nebezpečných látek a zároveň došlo k co nejmenšímu poškození organismu². Klíčovou vlastností imunitního systému je tedy rozpoznávání tělu škodlivých látek od látek neškodných.

Imunitní systém můžeme dělit do dvou subsystémů, vrozeného a adaptivního³. Tyto systémy od sebe bývají odlišovány na základě specifiity odpovědi vůči antigenu, kde odpověď adaptivního systému má oproti vrozenému mnohem větší specifitu. Podle místa působení oba tyto systémy využívají humorální a buněčné složky imunitního systému. Nevýhodou adaptivního imunitního systému je rychlost odpovědi, pro kterou je zapotřebí dnů až týdnů. Naproti tomu je vrozený řádově rychlejší a probíhá řádově v minutách⁴. Výhodou je ovšem dlouhodobá imunologická paměť, kterou vrozený imunitní systém postrádá.

1.1.1 VROZENÝ IMUNITNÍ SYSTÉM

Vrozený imunitní systém je evolučně starší⁵. Jeho principem je rozpoznávání molekul, které mají společné rysy. Mezi tyto molekuly můžou patřit evolučně konzervované produkty mikrobiálního metabolismu, či různé struktury přítomné na povrchu patogenů, např. lipopolysacharidy, peptidoglykany³.

Rozpoznávání těchto molekul závisí na receptorech, které jsou kódované v zárodečné linii. Je jich omezený počet, a proto je omezený i počet molekul, které mohou být rozpoznány. Buněčnou složkou vrozeného imunitního systému jsou např. fagocytující buňky a NK buňky, a humorálního např. komplementový systém a interferony.

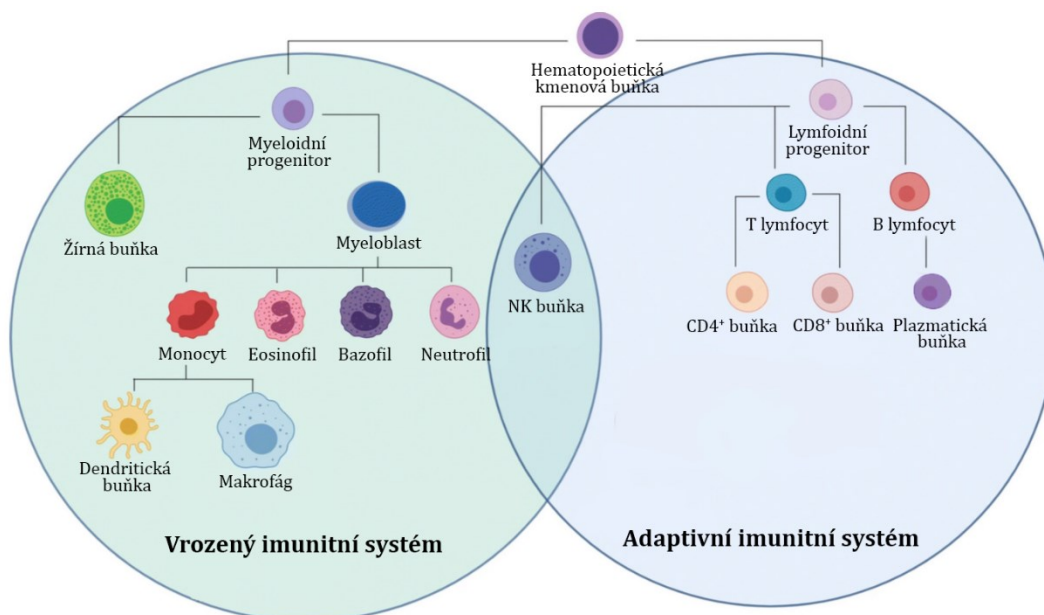
1.1.2 ADAPTIVNÍ IMUNITNÍ SYSTÉM

Adaptivní imunitní systém je evolučně mladší a jeho odpověď je více specifická. Tato specifita odpovědi je docílena receptory, které nejsou kódované přímo v zárodečné linii, ale v jednotlivých buňkách imunitního systému dochází k somatické rekombinaci⁶. Výsledkem této rekombinace je vysoká variabilita a také specifita adaptivního systému. Součástí buněčného adaptivního imunitního systému jsou např. T a B lymfocyty, a humorálního např. protilátky a cytokiny.

1.1.3 LYMFATICKÉ TKÁŇE A BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Lymfatické orgány a tkáně můžeme rozdělit na primární a sekundární. Mezi primární patří kostní dřev a brzlík, tedy orgány, ve kterých dochází k diferenciaci kmenových buněk za vzniku buněk imunitního systému⁴. Sekundární orgány jsou orgány, ve kterých dochází k interakci buněk imunitního systému s buňkami či látkami nebezpečnými pro organismus. Patří mezi ně lymfatické uzliny, slezina, mandle a důležitou součástí je slizniční lymfatická tkáň (MALT, z angl. *mucosa-associated lymphoid tissue*)⁴.

Buňky imunitního systému jsou odvozeny od společné hematopoetické kmenové buňky (viz **Obrázek 1, str. 15**). Ta se nejprve diferencuje v myeloidní či lymfoidní progenitor. Myeloidní progenitor se dále diferencuje do mnoha typů buněk vrozené (nespecifické) imunity, jako např. neutrofilů či žírné buňky⁷. A z lymfoidních progenitorů pak vznikají především buňky adaptivní (specifické) imunity jako jsou T a B lymfocyty. Zvláštní pozici zde zaujímají právě NK buňky, které vznikají z lymfoidního progenitoru a jsou odvozeny od prekursoru T lymfocytů^{4,7}. Obecně jsou řazeny do vrozeného imunitního systému, ale do jisté míry vykazují i vlastnosti adaptivního imunitního systému (viz **oddíl 1.2, str. 15**).



Obrázek 1: Diferenciace buněk kostní dřeně, které jsou součástí imunitního systému⁷. Buňky imunitního systému jsou odvozeny od hematopoietické kmenové buňky, která se diferencuje na myeloidní a lymfoidní progenitor. Z těch pak vznikají více specifické typy buněk. Myeloidní dávká vzniknout buňkám vrozené imunity (vlevo) a lymfoidní buňkám adaptivní imunity (vpravo). NK buňky jsou získány diferenciací lymfoidního progenitoru, jsou řazeny do vrozené imunity, ale mají i vlastnosti imunity adaptivní.

1.2 NK BUŇKY

Přirozeně zabíječské buňky (NK buňky, z angl. *natural killer cells*) byly popsány poprvé v 70. letech 19. století jako velké granulární lymfocyty, které jsou schopné eliminovat buňky nádoru bez předchozího kontaktu s nimi⁸.

Byly přiřazeny do vrozeného imunitního systému, protože narozdíl od T a B lymfocytů u NK buněk nedochází k somatické rekombinaci genů kódujících receptory na jejich povrchu⁹. Nedávné studie ovšem ukázaly, že NK buňky mají určitou podobnost i s buňkami adaptivního imunitního systému. Jsou schopny se do jisté míry adaptovat a dokonce dozrát ve dlouhodobé paměťové buňky¹⁰.

Vznikají v kostní dřeni z hematopoietické kmenové buňky, která se postupně diferencuje v NK buňky¹¹. K následnému zrání NK buněk pak dochází nejen v kostní dřeni, ale také v sekundárních lymfatických tkáních jako jsou mandle, brzlík a lymfatické uzliny¹¹. Po dozrání se vyskytují především ve slezině, lymfatických uzlinách, kostní dřeni a v krevním řečišti, ve kterém tvoří až 10-15 % lymfocytů^{10,12}.

V průběhu zrání na NK buňky působí faktory typické pro danou tkáň. Mezi tyto faktory patří faktory vnější, což jsou především různé druhy cytokinů (např. IL15, IL2), ale také molekuly přítomné z důvodu virální infekce¹³. A faktory vnitřní, mezi které patří různé transkripční faktory¹⁴. V závislosti na těchto faktorech získávají NK buňky určitou charakteristiku, podle které můžeme NK buňky rozdělit do tří základních

skupin a to cytotoxických, tolerantních a regulatorních¹⁵. Ty pak mají v organismu odlišné funkce.

Mezidruhově dosud nebyla objevena společná membránová molekula, která by specificky definovala fenotyp NK buněk¹⁶. Pro lidské NK buňky je charakteristická absence molekuly CD3 a přítomnost molekul CD56, NKp46 a receptoru CD16⁹. V závislosti na úrovni exprese CD56, jsou pak lidské NK buňky primárně děleny do dvou subpopulací: CD3-CD56^{dim}CD16⁺ a CD3-CD56^{bright}CD16⁻(¹⁵). V sekundárních lymfatických tkáních se nachází pouze buňky s vysokou expresí CD56, tedy méně zralé buňky. Charakteristické jsou tím, že po aktivaci produkují velké množství cytokinů a chemokinů, ale mají nízkou cytotoxickou aktivitu.¹⁷ Tyto buňky jsou také v přítomné v krevním řečišti, ovšem ve výrazné menšině. Většinu NK buněk, až 90 %, v krevním řečišti tvoří již zralé NK buňky s nízkou expresí CD56⁹. Ty mají vysokou cytotoxickou aktivitu, ale produkují menší množství cytokinů¹⁶.

1.2.1 FUNKCE NK BUNĚK

NK buňky jsou důležitou součástí vrozeného imunitního systému a v organismu hrají nezastupitelnou roli. Jsou důležitou součástí imunitního dohledu, tedy rozpoznávání a eliminace nádorových či poškozených buněk organismu⁴.

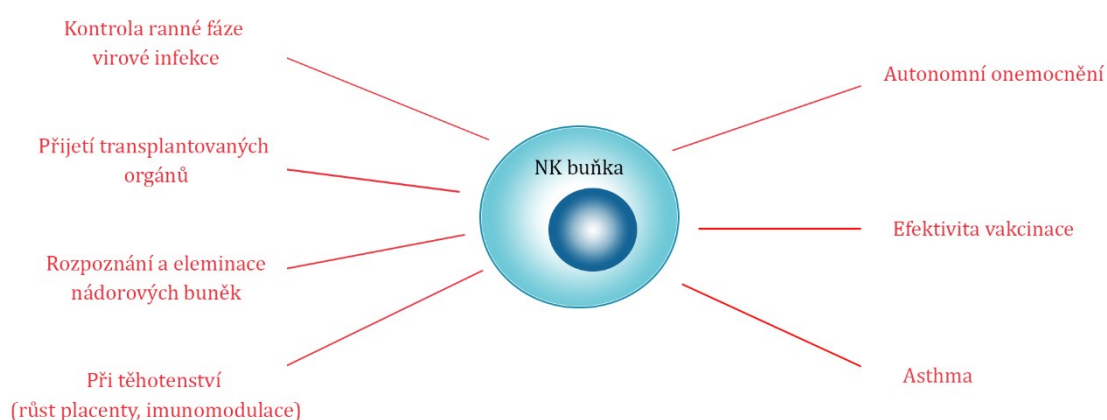
Hrají roli v tzv. imunoeditaci nádorových buněk. Jako imunoeditace jsou označovány komplexní interakce buněk imunitního systému s nádorovými buňkami a obecně mají tři možné průběhy: 1. Eliminace, při které je nádor úspěšně rozpoznán a odstraněn; 2. Ustanovení rovnováhy, kdy imunitní systém není schopný odstranit nádor, ale omezí jeho proliferaci; 3. Únik nádorových buněk, při kterém dochází k nekontrolovanému dělení nádorových buněk¹⁸.

NK buňky mají dále imunoregulační vlastnost, po aktivaci sekretují cytokiny, které mají vliv při odpovědi imunitního systému^{9,12}. Příkladem může být interferon γ (INF- γ), který ovlivňuje imunitní odpověď buněk Th1, aktivuje cytotoxicitu u makrofágů, reguluje expresi glykoproteinů MHC třídy I (dále MHC gp. 1, z angl. *major histocompatibility complex glycoproteins type I*) a má antiproliferativní efekt na nádorové či virem infikované buňky⁹.

Díky imunoregulační vlastnosti tedy NK buňky hrají centrální roli v antivirové imunitě. Virové infekce často indukují IL-12, který vyvolá produkci INF- γ a spustí tak mechanismy pro odstranění virem infikovaných buněk¹⁹. Tato role byla potvrzena u různých virů, např. u viru HIV (z angl. *human immunodeficiency virus*), u herpes virů, ale také u aktuálně celosvětově problematického viru SARS-CoV-2 (z angl. *severe acute*

respiratory syndrome coronavirus 2)²⁰. Jejich centrální roli zde také dokazuje korelace mezi nižší imunoregulační aktivitou NK buněk a zvýšenou náchylností vůči virovým onemocněním¹⁹.

Nedávno bylo také potvrzeno, že regulatorní NK buňky se podílejí na komunikaci mezi dendritickými buňkami, makrofágy, T lymfocyty a endotheliálními buňkami²¹ a tím dále ovlivňují imunitní odpověď. Tato schopnost NK buněk ovlivňovat imunitní odpověď je velmi důležitá např. při přijetí transplantovaných orgánů²², při zvýšení efektivity vakcinace²³ a při autoimunitních onemocněních²⁴. NK buňky mají také důležitou roli při těhotenství, kdy dochází ke zvýšení množství děložních NK buněk, které podporují růst placenty a poskytují imunomodulaci dítěte matkou²⁵.



Obrázek 2: Shrnutí vlivu NK buněk²¹ na procesy organismu.

1.2.2 REGULACE FUNKCE NK BUNĚK

Funkce NK buněk je přísně regulována rovnováhou mezi signály aktivačních a inhibičních receptorů, které jsou přítomné na povrchu NK buněk²⁶. NK buňky v krvi a tkáních neustále cirkulují, interagují s okolními buňkami a tak sbírají signály prostřednictvím molekul exprimovaných na povrchu okolních buněk.²⁶ Na základě těchto signálů je následně modulována odpověď NK buňky, kdy výsledkem interakce může být aktivace NK buněk, jejich proliferace či produkce cytokinů²⁷.

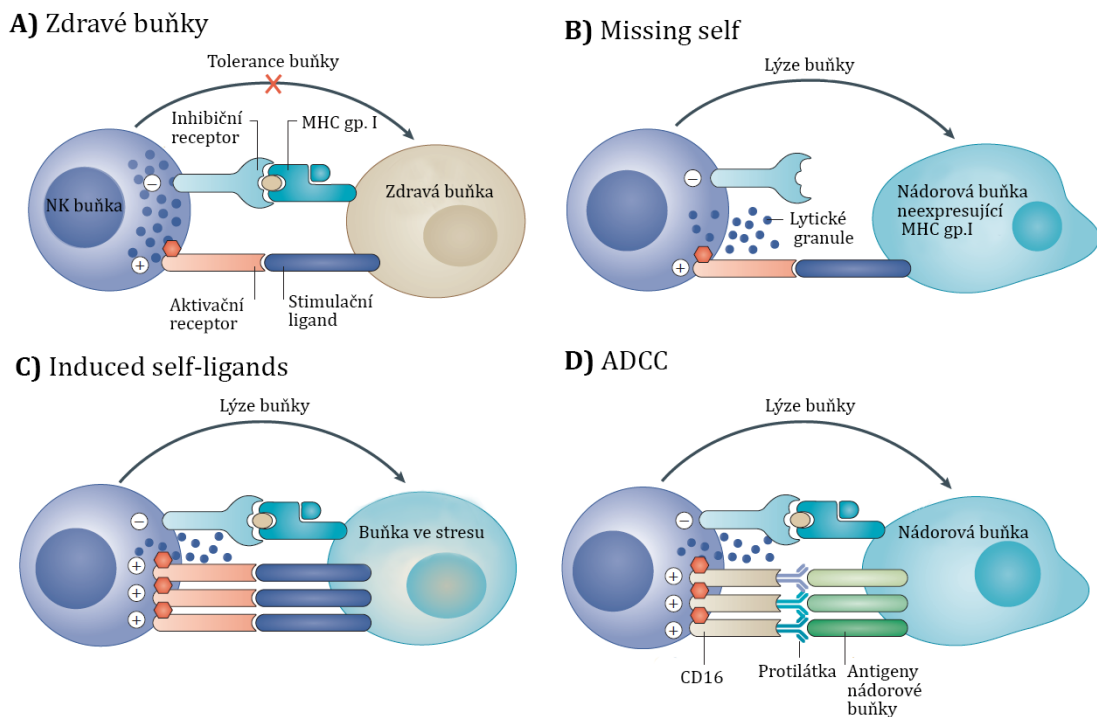
Při interakci NK buňky se zdravou buňkou organismu dochází k inhibici aktivace NK buňky na základě převahy inhibičních signálů za přítomnosti MHC gp. I (viz **Obrázek 3A, str. 19**). Glykoprotein MHC gp. I je ligand, který je vysoce polymorfický a je pro daný organismus typický. U člověka je známý jako tzv. molekuly HLA-I (z angl. *human leukocyte antigen*). Cytotoxické buňky jsou v průběhu svého vývoje edukovány pro rozpoznání těchto molekul jako molekul tělu vlastních.

Podle exprese těchto ligandů jsou pak cytotoxické buňky schopné rozpoznat buňku zdravou od buňky alterované^{28,29}.

Buňky ve stresu (nádorové, napadené virem, poškozené) mohou mít vliv na expresi různých membránových molekul. Ve 40-90 % případech buňky ve stresu snižují expresi zmíněného MHC gp. I, aby unikly buňkám adaptivního imunitního systému³⁰. Ztráta MHC gp. I ale vede k rozpoznání těchto buněk jako sobě nevlastních podle tzv. *missing-self* hypotézy³¹. Po rozpoznání pak dochází k aktivaci NK buněk a následně k lýze těchto buněk (viz **Obrázek 3B, str. 19**).

U buněk ve stresu také může dojít naopak ke zvýšení exprese určitých molekul. Většinou se jedná o molekuly vlastní, jejichž exprese je ve zdravé buňce téměř zanedbatelná a při stresu dochází k jejímu mnohonásobnému navýšení²⁸. Mezi tyto molekuly mohou patřit různé aktivační ligandy, které interagují s aktivačními receptory NK buněk, což vede k aktivaci NK buněk a lýzi buňky. Tomuto konceptu se říká tzv. *induced-self* hypotéza (viz **Obrázek 3C, str. 19**). Příkladem může být aktivace NK buněk aktivačními receptory NKG2D, které interagují s nejméně šesti různými ligandy, jejichž exprese je indukovaná stresem buňky⁹.

Další možností rozpoznání nádorových buněk je pomocí protilátek. Na NK buňkách, převážně na CD56^{dim}, je exprimovaný potenciální aktivační receptor CD16, také známý jako FcγIII³². Tento receptor rozpoznává konstantní oblast protilátek IgG a je odpovědný za cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (ADCC, z angl. *antibody-dependent cell cytotoxicity*, viz **Obrázek 3D, str. 19**).



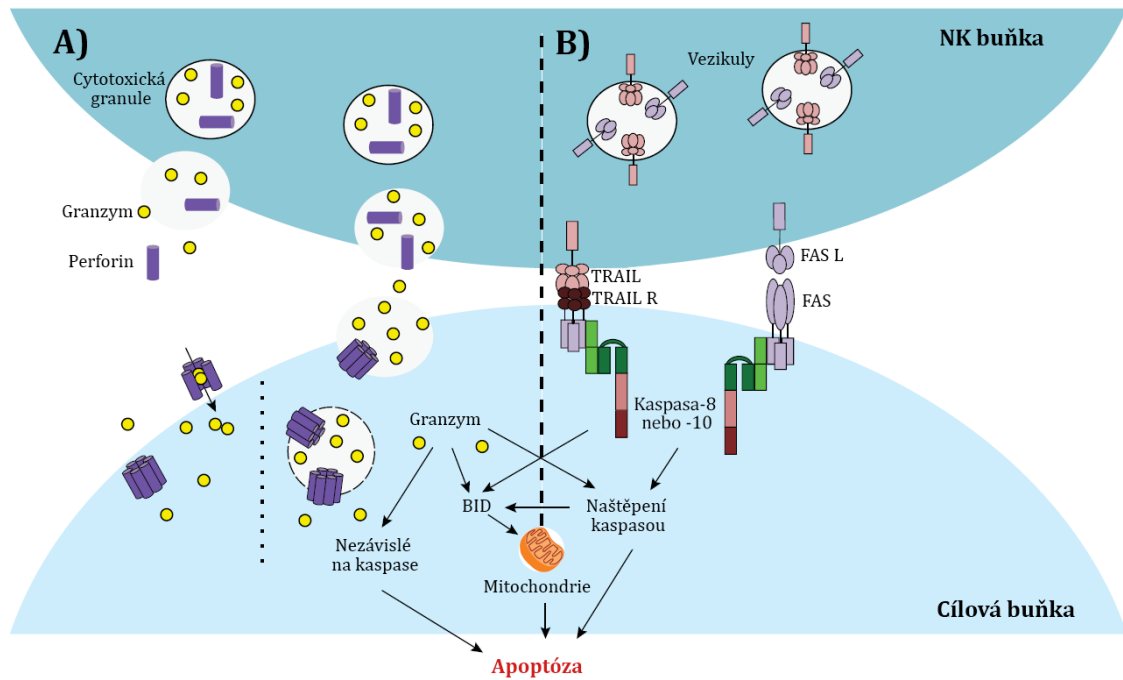
Obrázek 3: Funkce NK buněk³²: **A)** Rozpoznání a tolerance zdravé buňky na základě rovnováhy signálů aktivačních a inhibičních receptorů. NK buňka je inhibována. **B)** Nádorová buňka ovlivňuje expresi MHC gp. I. Buňka je detekována jako nevlastní „missing-self“. Dochází ke spuštění cytotoxické odpovědi NK buněk. **C)** Nádorové buňky, buňky ve stresu můžou produkovat nadměrné množství aktivačního ligandu, čímž aktivuje NK buňku. **D)** ADCC (z angl. *antigen-dependent cell cytotoxicity*) je lýze buňky zprostředkovaná vazbou protilátky mezi receptorem CD16 a antigenem na cílové buňce.

1.2.3 MECHANISMUS CYTOTOXICITY PŘIROZENĚ ZABÍJEČSKÝCH BUNĚK

NK buňka má dva hlavní mechanismy pro navození smrti cílové buňky (viz **Obrázek 4, str. 20**). Prvním mechanismem je přímé sekretování lytických granulí do mezibuněčného prostoru exocytosou³³. Tyto granule obsahují především protein perforin a serinové proteasy, granzymy. Perforiny jsou proteiny, které oligomerizací vytváří póry v membráně cílové buňky, což může vést k lýzi buňku narušením osmolarity. Granzymy se následně do cílové buňky dostávají buď skrz perforinový pór, endocytosou nebo únikem z endosomů pomocí perforinu. V cílové buňce následně navodí apoptózu, a to přímo přes mitochondrii, za pomoci kaspasy či nezávisle na kaspase³⁴. Tento mechanismus je velmi efektivní a k apoptóze cílových buněk dochází v rámci několika minut³³.

Dalším mechanismem je aktivace NK buněk pomocí apoptózu navozujících receptorů nacházejících se na povrchu cílové buňky. Těmto receptorům se říká *death* receptory, jelikož obsahují cytoplasmatickou doménu známou jako *death domain* (DD)^{34,35}. Tyto receptory interagují s ligandy exprimovanými na povrchu NK buněk po jejich aktivaci. Známe tři různé systémy receptor-ligand, které navozují apoptózu³⁴.

Mezi ně patří receptory z rodiny TNFR (z angl. *tumor necrosis factor receptor*), které interagují s faktory TNF (z angl. *tumor necrosis factor*). Dále receptor Fas (CD95), který se váže na ligand Fas (FasL) a nakonec receptory TRAIL-R1 a TRAIL-R2, které se váží na ligand TRAIL (z angl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*). NK buňky využívají všech tří systémů. Výsledkem interakce aktivace kaspas 8 a 10 a následně apoptóza cílové buňky.



Obrázek 4: Cytotoxické mechanismy NK buněk³⁴. A) Mechanismus navození apoptózy pomocí cytotoxických granulí obsahujících perforiny a granzymy. B) Mechanismus navození apoptózy pomocí death receptorů.

1.3 RECEPTORY NK BUNĚK

Receptory NK buněk můžeme dělit podle funkce na aktivační a inhibiční (viz **oddíl 1.2.1**, str. 16). A podle struktury na receptory imunoglobulinové nadrodiny a receptory podobné lektinům C-typu (CTLRs, z angl. *C-type lectin-like receptors*). Přičemž jako aktivační nebo inhibiční mohou sloužit receptory z obou rodin.

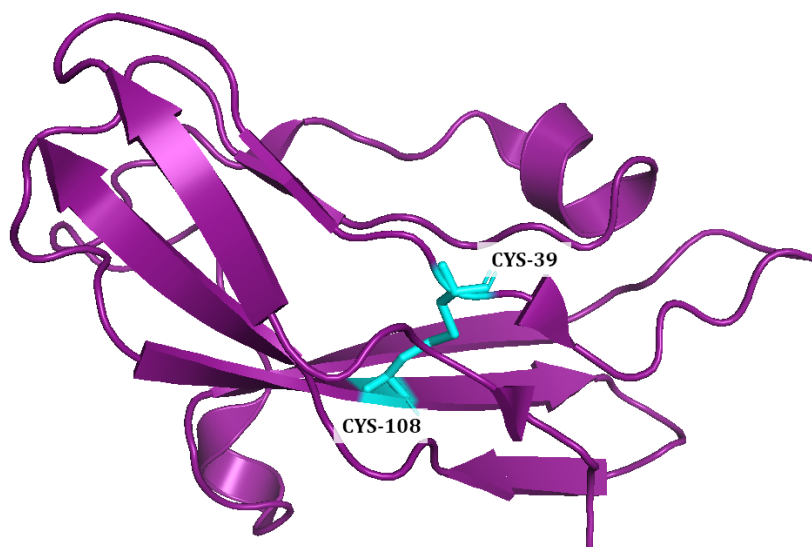
Inhibiční receptory jsou charakterizovány přítomností evolučně konzervovaného motivu ITIM (z angl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) v jejich cytoplasmatické membráně²⁷. Aktivační receptory neobsahují ITIM, ale obsahují pozitivně nabitě aminokyseliny (arginin, lysin) v transmembránové doméně a ITAM (z angl. *immunoreceptor tyrosine-based activating motif*) v cytoplasmatické doméně.

1.3.1 GENY KÓDUJÍCÍ RECEPTORY NK BUNĚK

Geny pro receptory jsou v genomu uloženy ve dvou hlavních genových komplexech: NKC (z angl. *natural killer complex*) a LRC (z angl. *leukocyte receptor complex*)^{36,37}. Komplex NKC se nachází na lidském chromozomu 12p13.1. Obsahuje přes 15 genů kódujících receptory podobné lektinům C-typu jako např. geny skupiny receptorů NKR-P1). Komplex LRC se nachází na chromozomu 19q13.4 a kóduje receptory imunoglobulinové nadrodiny. Obsahuje mnoho genů kódujících receptory KIR (z angl. *killer cell immunoglobulin-like receptors*).

1.3.2 RECEPTORY IMUNOGLOBULINOVÉ NADRODINY

Receptory imunoglobulinové nadrodiny obsahují jednu nebo více imunoglobulinových domén³⁸. Patří do ní receptory KIR, receptory leukocytů (LILR, z angl. *leukocyte immunoglobulin-like receptors*) a receptory přirozené cytotoxicity (NCR, z angl. *natural cytotoxicity receptors*). Pro imunoglobulinovou doménu je typická přítomnost čtyř antiparalelních beta listů. Příkladem receptorů imunoglobulinové rodiny může být např. receptor NKp30 (viz **Obrázek 5**).



Obrázek 5: Zástupce imunoglobulinové nadrodiny, receptor NKp30, s vyznačenými cysteiny C39 : C108 (PDB ID 6YJP³⁹, PyMOL 2.5.0a0)

1.3.3 RECEPTORY PODOBNÉ LEKTINŮM C-TYPU

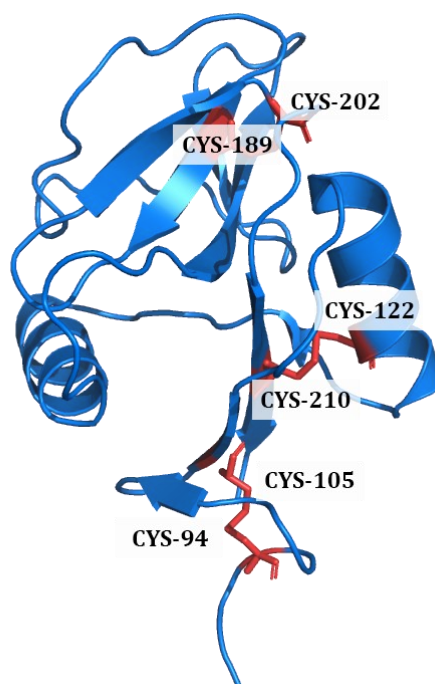
Receptory podobné lektinům C-typu (CTLR) je velká rodina transmembránových receptorů, které obsahují jednu či více aktivních karbohydrátových domén, které jsou schopné rozpoznat širokou škálu glykanů⁴⁰. Jsou pojmenované podle své podobnosti s lektiny C-typu. Jako lektiny jsou označovány glykoproteiny, které jsou schopné se reverzibilně vázat na specifické mono- a oligosacharidy⁴¹. Lektiny C-typu jsou pak

lektiny, které byly původně pojmenovány podle jejich schopnosti vázat sacharidy pouze v přítomnosti vápenatých iontů. K vazbě docházelo přes evolučně konzervované aminokyselinové motivy v extracelulární sacharid-rozpoznávající doméně (CRD, z angl. *carbohydrate-recognition domain*), která se vyskytuje pouze u lektinů C-typu u živočichů⁴². Ovšem ne všechny proteiny obsahující tuto doménu, také nazývanou lektinovou doménou C-typu, jsou schopné se vázat na glykany či vápenaté ionty⁴². Pro tyto domény byl zaveden obecný název domény podobné lektinům C-typu (CTLD, z angl. *C-type lectin-like domain*)⁴³. Proteiny s touto doménou jsou stále schopné rozpoznat sacharidy, ale jsou také schopny nezávisle na přítomnosti iontů Ca²⁺ rozpoznat širší škálu ligandů jako jsou např. lipidy, proteiny i anorganické molekuly^{42,44}.

Doména CTLD je tvořena obecně 110-130 aminokyselinovými zbytky, která má strukturu dvojité smyčky^{42,43}. První více konzervovaná smyčka tvoří vnitřní část domény a druhá naopak více variabilní tvoří tzv. dlouhou smyčku. Tyto smyčky jsou stabilizované čtyřmi vysoce konzervovanými aminokyselinovými zbytky cysteinů, které tvoří dva disulfidické můstky. Jeden můstek stabilizuje dlouhou smyčku, zatímco druhý můstek stabilizuje první smyčku a tím i celkovou doménu.

Podle přítomnosti dlouhé smyčky lze CTLD rozdělit na kanonické, kde je přítomna, a kompaktní, které ji postrádají⁴². A dále je dělíme na krátkou a dlouhou formu podle délky N-terminálního konce. U dlouhé formy CTLD jsou pak přítomny dva dodatečné cysteiny, tvořící třetí disulfidický můstek stabilizující prodlouženou část s vlásenkovitou strukturou. Typický je pro CTLD také tzv. „WIGL“ motiv, konzervovaná skupina čtyř hydrofobních aminokyselin v jádře domény⁴⁵.

Receptory podobné lektinům C-typu jsou transmembránové glykoproteiny II. typu, s N-terminální cytoplasmatickou doménou, transmembránovou doménou následovanou krčkem, tzv. „stalk“ oblast a extracelulární CTLD⁴⁶. Můžeme je najít na povrchu lymfocytů a patří mezi ně např. rodina receptorů NKR-P1 (viz **oddíl 1.3.4**, str. 23), do které patří receptory NKR-P1A (viz **Obrázek 6**, str. 23), NKp65 a NKp80.



Obrázek 6: Zástupce receptorů podobných lektinům C-typu, receptor NKR-P1A, s vyznačenými cysteiny C94:C105, C189:C202, C122:C210 (PDB ID 5MGS⁴⁷, PyMOL 2.5.0a0)

1.3.4 SKUPINA RECEPTORŮ NKR-P1

Rodina NKR-P1 (z angl. *natural killer receptor protein 1*) patří strukturně do CTLR. Je kódována v NKC geny KLRB1 (z angl. *killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1*)⁴⁸. Do rodiny patří aktivační i inhibiční receptory a zahrnuje receptory nejen lidské, ale i receptory hlodavců, např. myší a krysí. Rodina NKR-P1 je v rámci NKC unikátní, jelikož interaguje s ligandy, které padají strukturně také do CTLR⁴⁸, a geny receptorů a ligandů jsou na sebe v rámci NKC vázány.⁴⁹ (viz **Obrázek 7, str. 24**). Kromě NK buněk jsou receptory rodiny NKR-P1 exprimovány také na povrchu přirozeně zabíječských T lymfocytů (NKT, z angl. *natural killer T lymphocyte*), T lymfocytů a dendritických buněk^{50,51}.

První člen rodiny NKR-P1 byl popsán v roce 1977⁵². Jednalo se o myší receptor NK1.1 (alelová varianta receptoru NKR-P1C). Později byly v myším genomu objeveny geny (KLRB1A, B/D, C, E, F, G) kódující další členy této rodiny (NKR-P1A, B/D, C, E, F, G). U myší se tyto geny nachází na chromosomu 6 v NKC a kódují aktivační (NKR-P1A, C, F) i inhibiční (NKR-P1B/D, E, G) receptory⁵¹.

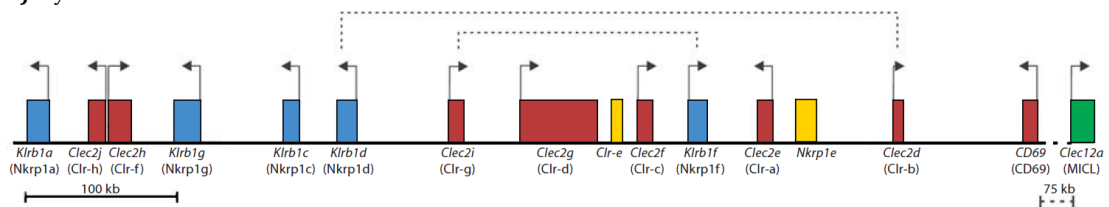
U člověka je jediným obecně uznávaným homologem ke hlodavčím členům rodiny NKR-P1 inhibiční receptor NKR-P1A (CD161) a to na základě podobnosti aminokyselinové sekvence s NKR-P1D⁴⁹. Pomocí genetické vazby mezi geny receptorů

a ligandů byly u člověka později také identifikovány aktivační receptory NKp80 a NKp65⁴⁹. Tyto receptory interagují s proteiny rodiny CLEC2 (z angl. *C-type lectin domain family 2*) a tvoří ligand:receptorové páry NKp80:AICL, NKp65:KACL a NKR-P1A:LLT1. Tyto páry jsou blíže popsány viz **Tabulka 1**.

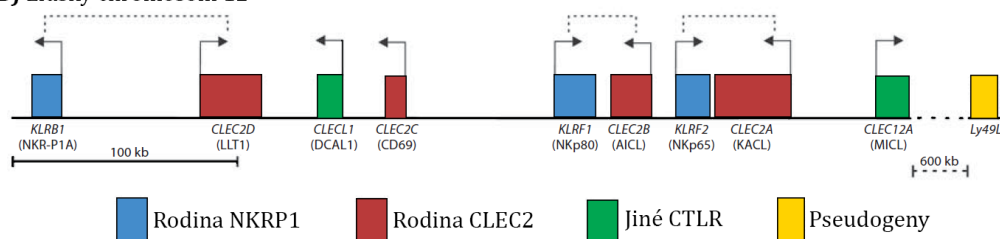
Tabulka 1: Zástupci receptorů rodiny NKR-P1A a jejich ligandy z rodiny CLEC2 a shrnutí jejich základních vlastností

Receptor	NKR-P1A	NKp80	NKp65
Gen	KLRB1 (z angl. <i>killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1</i>)	KLRF1 (z angl. <i>killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1</i>)	KLRF2 (z angl. <i>killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 2</i>)
Signalizační motiv	ITIM	typu hemi-ITAM	hemi-ITAM
Funkce	INHIBICE	AKTIVACE	AKTIVACE
Ligand	LLT1	AICL	KACL
Gen	CLEC2D (z angl. <i>C-type lectin domain family 2, member D</i>)	CLEC2B (z angl. <i>C-type lectin domain family 2, member B</i>)	CLEC2A (z angl. <i>C-type lectin domain family 2, member A</i>)
Afinita (K_D)	~ 50-100 μ M	~ 4 μ M	~ 0,01 μ M

A) Myšší chromosom 6



B) Lidský chromosom 12



Obrázek 7: Genetická vazba receptorů NKR-P1 (modrá) a jejich ligandů z rodiny (oranžová) v NKC A) u myši na chromosomu 6, B) u člověka na chromosomu 12. Šipky vyznačují směr transkripce a přerušované čáry páry ligand:receptor⁴⁹.

1.3.5 RECEPTOR NKp80

Receptor NKp80 je kódován genem KLRP1 (z angl. *killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1*) v NKC, který se nachází v orientaci „tail-to-tail“ ke genu CLEC2B svého ligandu AICL (viz **Obrázek 7, str. 24**)⁵³. Pomocí disulfidických můstků tvoří homodimer o hmotnosti přibližně 80 kDa^{46,54}. U člověka je receptor NKp80 exprimován nejen na povrchu NK buněk, ale i na podskupině CD8⁺ T lymfocytů a $\gamma\delta$ T lymfocytů. Byl identifikován také na cytotoxických lymfocytech primátů, ale nikoli u hlodavců⁵³.

Váže se na glykoprotein AICL, který se přirozeně nachází na myeloidních buňkách jako jsou makrofágy, granulocyty a monocyty, stimulovaných pomocí TLR (z angl. *toll-like receptors*)⁵⁵. Na NK buňkách slouží NKp80 jako aktivační receptor. Pokud dojde k výraznému navýšení exprese ligandu AICL, např. na nádorových buňkách, dochází po interakci s NKp80 ke spuštění cytotoxické aktivity NK buněk a uvolnění cytokinů IFN γ a TNF^{54,56}. Díky tomu je možné předpokládat, že se interakce NKp80:AICL podílí na imunitním dohledu nad buňkami myeloidní leukemie⁴⁶. Zvýšená exprese ligandu AICL byla také pozorována u glioblastomů a nádorových buněk jater, což dále podporuje předpokládanou roli interakce NKp80:AICL při imunitním dohledu nad nádorovými buňkami⁵⁷.

Ligand AICL je také uložen přímo v NK buňkách v klidovém stadiu. Je skladován v asociaci s proteinem giantinem v Golgiho komplexu⁵⁷. K jeho exprimování na povrchu NK buněk dochází působením monokinů IL-12 a IL-18. Spolu s tím ovšem dochází k postupnému utlumení exprese receptoru NKp80. Takto monokiny aktivovaná NK buňka, označena ligandem AICL, se pak sama stává terčem pro NK buňky exprimující receptor NKp80 a dochází k její cytolýze. Tato vzájemná regulace exprese AICL a NKp80 umožňuje autonomní kontrolu odpovědi NK buněk např. při zánětu či infekci.

Kromě imunitního dohledu je interakce NKp80:AICL důležitá při komunikaci mezi NK buňkami a monocyty a mezi makrofágy a cytotoxickými T lymfocyty. Tato komunikace je zprostředkována cytokiny IFN γ a TNF a je důležitá při zánětu a také při infekci.

Působením proteinu K5 herpes viru asociovaném s Kaposi sarkomem (KSHV, z angl. *Kaposi's sarcoma associated herpesvirus*) naopak dochází ke snížení exprese ligandu AICL za účelem úniku viru před imunitním systémem. Snížená exprese AICL také vede k omezené komunikaci mezi NK buňkami a monocyty, což může přispívat ke schopnosti viru udržovat v monocyttech zásobní „infekční rezervoár“⁵⁸.

1.3.5.1 SIGNALIZACE NKp80

Signalizační motiv receptoru NKp80 je podobný motivu hemi-ITAM. Motiv ITAM je typický přítomností dvou motivů Y-X-X-L/I, které jsou oddělené 6-8 aminokyselinami⁵⁹. V případě, že je tento motiv přítomný jen jednou, tak se jedná o hemi-ITAM. U typického motivu hemi-ITAM, který byl identifikovaný např. u rodin DECTIN-1 a CLEC2, se dále před sekvencí Y-X-X-L/I nachází aminokyseliny DG (tedy DGYXXL). U NKp80 ovšem sekvenci předcházejí aminokyseliny ER (ERYXXL) a tato odlišnost od typického motivu hemi-ITAM má oslabující vliv na rychlost a intenzitu signalizace⁵³.

Signalizační motiv hemi-ITAM receptoru NKp80 se nachází v cytoplasmatické doméně^{54,60}. Při interakci s ligandem AICL dochází k fosforylaci kináz rodin Syk a Src, což vede ke spuštění cytotoxické aktivity NK buněk.

1.3.5.2 DIMERIZACE RECEPTORU NKp80

Tvorba homo- či heterodimerů je typická pro CTLR kódované v NKC a pro receptory může být tvorba dimerů i podmínkou vzniku komplexu s ligandem^{46,61}. Tvorba dimerů probíhá prostřednictvím disulfidických můstků, přičemž cysteiny zodpovědné za dimerizaci se nachází převážně v intracelulární doméně či ve „stalk“ oblasti. Pro zkoumání způsobu dimerizace proteinu NKp80 byla nejprve porovnána aminokyselinová sekvence NKp80 se sekvencemi proteinů rodiny NKR-P1A a jejich ligandů z rodiny CLEC2.

Na porovnání aminokyselinových sekvencí (**Obrázek 8**, str. 27) můžeme pozorovat vyznačené cysteiny jednotlivých proteinů. U většiny receptorů NK buněk a jejich ligandů je v extracelulární doméně přítomno šest konzervovaných cysteinů, které jsou zodpovědné za stabilitu CTLD (viz **oddíl 1.3.3**, str. 21). Výjimku zde tvoří ligandy AICL, LLT1 a KACL.

U receptoru NKR-P1A dochází k dimerizaci díky cysteinu C75 ve „stalk“ oblasti⁶¹. Pro studium dimerizace receptoru NKp80 byla tedy předpokládána analogie k tomuto proteinu. Ovšem na rozdíl od receptoru NKR-P1A jsou ve „stalk“ oblasti NKp80 přítomné tři cysteiny, které se mohou podílet na tvorbě homodimerů a dosud nebylo zjištěno, které konkrétně jsou za tvorbu homodimerů odpovědné. Za tímto účelem, byla v této práci připravena řada mutantů extracelulární části receptoru, kde jednotlivé cysteiny byly nahrazeny seriny. Celkem bylo připraveno sedm mutantů s různými možnými variantami mutací tří cysteinů „stalk“ oblasti. Homodimery by pak měly tvořit pouze mutanti se správnou kombinací cysteinů.

V rámci zkoumání ligandu AICL a jeho interakce s receptorem NKp80 již byla snaha tento protein produkovat. Ovšem výtěžky tohoto proteinu byly velmi nízké. Mnohonásobného zvýšení výtěžku bylo dosaženo zavedením mutace cysteinu C87 za serin v extracelulární doméně Mgr. Jiřím Novým⁶². Ovšem je možné, že právě tento cystein je zodpovědný za dimerizaci ligandu, a tedy potřebný pro tvorbu komplexu NKp80:AICL⁶³. Je tak zřejmé, že lichý počet cysteinů má vliv na stabilitu CTLD.

U proteinu LLT1 naopak chybí jeden cystein na konzervované pozici. V rámci své práce zjistil Mgr. Jan Bláha, že zavedením mutace H176C výrazně zvýšilo výtěžek produkce⁶⁴. To dále potvrzuje důležitost sudého počtu cysteinů pro tvorby disulfidických můstků a stabilizaci CTLD.



Obrázek 8: Porovnání aminokyselinových sekvencí CTLR rodin NKR-P1 a CLEC2. Porovnání bylo provedeno v programu Jalview využitím algoritmu MUSCLE⁶⁵. Sekvence proteinů byly získány v databázi UniProt⁶⁶ pod kódy Q9UHP7 (LLT1), 6UVW9 (KACL), Q92478 (AICL), Q12918 (NKR-P1A), D3W0D1 (NKp65) A Q9NZS2 (NKp80). Predikce rozsahu domén byla určena pomocí databáze UniProt.

1.4 IMUNOTERAPIE

Imunoterapie, také známá jako imuno-onkologie, využívá kléčbě nádorových onemocnění těla vlastní imunitní systém⁶⁷. K prevenci, kontrole a eliminaci nádoru používá humorální (cytokiny, protilátky) i buněčné (T lymfocyty, NK buňky) složky imunitního systému. Mezi hlavní strategie imunoterapie patří

- terapie protirakovinnými vakcínami,
- terapie onkolytickými viry,
- adoptivní buněčná terapie (ACT, z angl. *adoptive cell therapy*),
- blokátory kontrolních bodů v imunitní odpovědi.

Protirakovinné vakcíny jsou založené na obdobném principu jako vakcíny proti infekčním nemocem^{68,69}. Je tedy potřeba určit vhodný antigen a adjuvant a zajistit, aby byl vyvolán určitý typ imunitní odpovědi a imunitní paměť. U protirakovinných vakcín je ovšem dodatečný problém, který spočívá ve schopnosti nádorových buněk potlačit imunitní systém. Protirakovinné vakcíny můžeme rozdělit do dvou základních skupin: profylaktické a terapeutické⁷⁰. Profylaktické vakcíny jsou zaměřeny proti virům, které jsou častou příčinou vzniku specifických druhů rakovin. Příkladem může být lidský papillomavirus typu 16 (HPV16, z angl. *human papillomavirus type 16*), který způsobuje rakovinu děložního čípku. Naopak terapeutické vakcíny slouží k posílení existující, ale oslabené imunitní odpovědi. Mezi tyto vakcíny patří např. vakcíny založené na dendritických buňkách nebo vakcíny založené na proteinech teplotního šoku (HSP, z angl. *heat shock protein*) nádorových buněk⁶⁹.

Terapie založená na onkolytických virech využívá přirozených či geneticky modifikovaných virů, které se selektivně replikují uvnitř rakovinné buňky a způsobí její smrt⁶⁷. Viry v organismu také pomáhají uvolnit signály nebezpečí a přispívají k zahájení protinádorové odpovědi přirozeného i adaptivního imunitního systému⁷¹.

Další možnou terapií je adoptivní buněčná terapie. Při této terapii jsou nejprve z pacienta izolovány lymfocyty, které jsou *ex vivo* namnoženy, aktivovány a poté infuzí vráceny zpět pacientovi⁶⁷. Pro jejich roli v imunitním systému bývají především využívány T lymfocyty, dendritické buňky a méně také NK buňky. V terapii založené na T lymfocytech (ATC, z angl. *adoptive T-cell therapy*), se využívá několika strategií⁷⁰. Jednou ze strategií je využití T lymfocytů izolovaných z nádorové tkáně (TILs, z angl. *tumour-infiltrating lymphocytes*), které mají na povrchu specifické T-buněčné receptory (TCR, z angl. *T cell receptor*), které již rozpoznávají specifické antigeny nádorových buněk. Pomocí TCR jsou TILs *ex vivo* aktivovány, namnoženy, a nakonec injektovány zpět pacientovi. Další, a v dnešní době jednou z neúčinnějších strategií, je transfekce T lymfocytů tzv. chimérickými antigenními receptory (CAR, z angl. *chimeric antigen receptor*). Jedná se o modifikované TCR, kde variabilní antigen-vázací doména je nahrazena doménou s vysokou afinitou vůči nádorovému antigenu, což zvyšuje efektivitu terapie.

Blokátory kontrolních bodů (CPIs, z angl. *checkpoint inhibitors*) blokují inhibiční signály nádorových buněk způsobující jejich toleranci imunitním systémem⁶⁷. Nádorové buňky k inhibici využívají některé evolučně konzervované molekuly, které regulují aktivitu T lymfocytů⁷⁰. Mezi jedny z nejsilnějších regulačních molekul patří

např. receptory CTLA-4 (z angl. *cytotoxic T-lymfocyte antigen 4*) a PD1 (z angl. *programmed cell death 1*)⁷⁰. Jako blokátory těchto molekul se používají především monoklonální protilátky.

Mezi příklady dalších strategií patří dále např. ko-stimulace buněk imunitního systému pomocí protilátek, které se specificky váží na povrch nádorové buňky. Tyto strategie se používají zvláště, ale také v kombinaci s jinými druhy terapií. Ze zmíněných jsou nejúčinnější blokátory kontrolních bodů a T lymfocyty s chimérickými antigenními receptory⁷².

1.4.1 IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA NK BUŇKÁCH

NK buňky jsou stále studovány pro využití v imunoterapii hlavně díky schopnosti NK buněk rozpoznat a eliminovat nádorové buňky bez nutnosti předchozího kontaktu s nimi. Mezi hlavní strategie založené na NK buňkách patří adoptivní buněčná terapie a modulace imunitní odpovědi poskytnutím cytokinů či protilátek.

NK buňky v adoptivní buněčné terapii jsou využívány např. při alogenní transplantaci hematopoietických kmenových buněk (HSCT, z angl. *allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*) u pacientů s akutní či chronickou myeloidní leukémií. NK buňky zde pomáhají navodit reakci štěpu proti leukemii (GvL, z angl. *graft-versus-leukemie*) a omezují život ohrožující reakci štěpu proti hostiteli (GVHD, z angl. *graft-versus-host disease*)^{28,73}.

Další strategií je využití cytokinů, které u NK buněk podporují proliferaci a efektivitu jejich protinádorových funkcí^{67,74}. Cytokiny mohou být aplikovány přímo *in vivo*, ale bývají také používány *in vitro* v adoptivní buněčné terapii. Druh cytokinu závisí na druhu NK buňky, ale obecně mezi nejčastěji používanými patří IL-2, IL-15 a IL-12 nebo jejich modifikované verze. Pro větší efektivitu jsou cytokiny často podávány kombinovaně.

Modulace imunitní odpovědi pomocí protilátek je založena na 3 různých strategiích, mezi které patří ADCC, blokace kontrolních bodů a nověji také bi/tri-specifické protilátky. Příkladem využití ADCC v imunoterapii je již zmíněná interakce CD16:FcyIII. Ale může jít také o protilátky syntetizované, např. anti-CD20⁷⁴. U blokace kontrolních bodů je jedním z cílů např. skupina inhibičních receptorů KIR, které interagují s molekulami HLA-I. Bi/Tri-specifické protilátky (BiKEs/ TriKEs, z angl. *bi-/tri-specific killer engagers*) jsou konstrukty tvořené z 2/3 Fab fragmentů se specifitou vůči antigenům nádoru či receptorům efektorové buňky^{74,75}. Slouží jako spojka mezi nádorovou a efektorovou buňkou. Příkladem může být konstrukt AFM13,

což je tetravalentní BiKE se specifitou vůči CD30 a CD16A, u kterého byl zjištěn vliv na stabilizaci onemocnění u 60-70 % pacientů, a který je ve fázi II klinických studií⁷⁶.

1.4.1.1 IMUNOTERAPIE ZALOŽENÁ NA RECEPTORU NKp80

Jak již bylo zmíněno, ligand receptoru NKp80, AICL je frekventovaně exprimován na povrchu leukemických buněk, a je tedy potenciálním cílem pro imunoterapii. Za tímto účelem byl syntetizovaný fúzní protein NKp80-Fc, který funguje na bázi ADCC. Ukázal se jako účinný potenciální lék proti leukemii a je stále ve fázi výzkumu⁴⁵.

Za účelem dalšího možného využití interakce NKp80:AICL byl připraven rekombinantní bispecifický fúzní protein AICL:antiHER2-scFv (scFv, z angl. *single-chain Fragment variable*)⁷⁷, který je tvořen extracelulární doménou ligandu AICL a fragmentem protilátky proti receptoru HER2 (z angl. *human epidermal growth factor receptor 2*), jehož exprese bývá zvýšená u 20-30 % druhů rakovin prsu⁷⁸. Z naměřených výsledků stimulace NK buněk *in vitro* je zřejmé, že syntetizovaný konstrukt způsobil lýzi až u 40 % cílových buněk⁷⁷. Tím se dále potvrzuje důležitost možného využití interakce NKp80 v imunoterapii.

2 CÍL PRÁCE

- Mutageneze vektoru pro expresi extracelulární domény receptoru NKp80.
- Produkce a purifikace receptoru NKp80 a jeho mutantů.
- Strukturní charakterizace receptoru NKp80 a jeho mutantů.

3 MATERIÁL

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I	Beckman Coulter, USA
Automatické pipety Discovery	HTL, PL
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifuga Allegra X – 22R	Beckman Coulter, USA
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
Inkubátor IR 5000	LABsystem Praha, ČR
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Kolona HiPrep™ 26/10 Desalting	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex Increase 75 GL 10/300	GE Healthcare, USA
Kolona HisTrap Excel 5 ml	GE Healthcare, USA
Koncentrátor Amicon Ultra (MW 3000)	Millipore, USA
Láhve čtyřhranné s prodyšným víčkem	P-LAB, ČR
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, US
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mikrostríkačka Hamilton	P-LAB, ČR
Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact	Optimo Moulinex, Francie
Mikrozkumavka 1,5 ml	Eppendorf, USA
Mikrozkumavka 200 µl	Eppendorf, USA
pH metr Φ 200	Beckman Coulter, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone, USA
Souprava pro SDS PAGE	Bio – Rad, Německo
Spektrofotometr	DS-11 DeNovix, US
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler T100	Bio – Rad, Německo
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka G24	New Brunswick Scientific, USA
UV prosvěcovací lampa 312 nm	UVItec, UK

Vařič	ETA, ČR
Vodní lázeň	Memmert, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí 251–2	Sigma, USA

3.2 CHEMIKÁLIE

100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkптоethanol	Sigma, USA
Agar	Sigma, USA
Agarosa	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR
Geneticin G418	Thermo Scientific, USA
APS	Serva, USA
Azid sodný	Serva, USA
Coomassie BrilliantBlue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
DMSO	Sigma, USA
dNTPs, 10mM	Top-Bio, ČR
GoodView II	Ecoli, Slovensko
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
IPEI 25 kDa	Polysciences, USA
NucleoBondXtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel, Německo
PCR H ₂ O	Top-Bio, ČR
SDS	Jersey Lab Supply, USA
TEMED	Serva, USA
Trypanová modř	Sigma, USA
Tris	Sigma, USA
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, ČR

3.3 PUFRY A ROZTOKY

Acetátový pufr pro afinitní chromatografii (20mM CH₃COONa, 100mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 4,0)

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

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

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

Eluční pufr pro afinitní chromatografii (50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, 250mM imidazol, pH 7,5)

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

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

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

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

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

Předeluční pufr pro afinitní chromatografii (50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, NaN₃, 20mM imidazol, pH 7,5)

Roztok AA pro SDS-PAGE (29% akrylamid, 1% N,N' methylenbisakrylamid)

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

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

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

Tris pufr (pH 6,8) (1M Tris, pH upraveno HCl)

Tris pufr (pH 8,8) (1,5M tris, pH upraveno HCl)

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

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

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný redukující (vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný naředěný desetinným podílem 2-merkптоethanolu)

3.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA

ExCell 293 – komerční médium (Sigma, USA), před použitím doplněno o L-glutamin (výsledná koncentrace 4mM)

LB médium - 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4

3.5 ENZYMY

Endoglykosidasa Endo F1	Mgr. Ondřej Skořepa, PřF UK, ČR
KpnI	New England Biolabs, USA
Q5 Polymerasa a pufr, GC enhancer	New England Biolabs, USA
RNAsa A	Lach-Ner, ČR

3.6 VEKTORY

pOPINTTGneo_NKp80_F1	Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha
----------------------	-------------------------------

3.7 BUNĚČNÉ LINIE A BAKTERIÁLNÍ KMENY

<i>E. coli</i> DH5 α	Thermo Scientific, USA
<i>E. coli</i> TOP10	Thermo Scientific, USA
HEK293S GnTI-	ATCC, USA

3.8 PRIMERY PRO PCR

NKp80_C70S_FW	5'-CTAAAAAGCCAAAAAGGAAGTTGTTCAAAT-3'
NKp80_C70S_REV	5'-ATTTGAACAACCTTCCTTTTTGGCTTTTTAG-3'
NKp80_C75S_FW	5'-CTAAAATGCCAAAAAGGAAGTAGTTCAAAT-3'
NKp80_C75S_REV	5'-ATTTGAACTACTTCCTTTTTGGCATTTTAG-3'
NKp80_C103S_FW	5'-TAATAAGGACCTTAGTGCTTCGAGATCTGC-3'
NKp80_C103S_REV	5'-GCAGATCTCGAAGCACTAAGGCCTTATTA-3'
NKp80_C70S_C75S_FW	5'-CTAAAAAGCCAAAAAGGAAGTAGTTCAAAT-3'
NKp80_C70S_C75S_REV	5'-ATTTGAACTACTTCCTTTTTGGCTTTTTAG-3'
pTT_FW	5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

4 METODY

4.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ

4.1.1 PŘÍPRAVA VEKTORŮ POMOCÍ CELOPLASMIDOVÉ PCR

Nejprve bylo potřeba připravit expresní vektory mutantů extracelulární domény receptoru NKp80. Aminokyselinové sekvence těchto mutantů s různými možnými kombinacemi mutací tří cysteinů můžeme vidět shrnuté v oddílu 1.3.5.2 (viz **Obrázek 10**, str. 46).

Výchozím materiálem byl vektor pOPINTTGneo_NKp80_F1 obsahující konstrukt přirozeně se vyskytující formy extracelulární domény receptoru NKp80. Mutagenese byla provedena pomocí celoplasmidové PCR, kdy byly pomocí synteticky vyrobených primerů do konstrukt zavedeny jednotlivé bodové mutace.

Reakční směs pro PCR byla připravována do 200 μ l mikrozkušavek do celkového objemu 20 μ l a obsahovala 1 μ l templátové DNA (40 ng/ μ l), 4 μ l Q5 reakčního pufru (5 \times konc.), 4 μ l GC enhanceru (5 \times konc.), 0,4 dNTPs (10mM), 2 μ l přímého a reverzního primeru (5 μ M), 6,4 μ l PCR H₂O a 0,2 μ l Q5 polymerasy (0,2-0,4 U/20 μ l).

Metodu celoplasmidové PCR bylo nejprve potřeba optimalizovat. Použitím teplotního gradientu byla zjištěna optimální nasedací teplota jednotlivých primerů. Reakce PCR pak byla provedena postupem popsáném v **Tabulce 2**.

Tabulka 2: Teplotní cyklus PCR reakce

Program	Teplota, T [°C]	Čas, t	Počet cyklů, n
1	98	3 min	1
2	98	30 s	30
	48-54	1 min	
	72	7 min	
3	72	10 min	1
4	4	∞	1

Vznik produktu byl vždy ověřen pomocí agarosové elektroforézy (viz **oddíl 4.1.2**, str. 37). V první části přípravy vektorů byly pomocí poskytnutých primerů získány plasmidové DNA čtyř mutantů: NKp80_C70S, NKp80_C75S, NKp80_C103S a NKp80_C70S_C75S.

Po ověření zavedené mutace pomocí sekvenace plasmidové DNA (viz **oddíl 4.1.6**, str. 38), byly tyto syntetizované plasmidové DNA použity jako templátová DNA pro další celoplasmidové PCR pro získání mutantů se zbylými možnými kombinacemi bodových mutací a to NKp80_C70S_C103S, NKp80_C75S_C103S a NKp80_C70S_C75S_C103S.

4.1.2 AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA

Nejprve byl připraven 0,5% gel rozpuštěním 0,32 g agarosy v 65 ml TAE pufru. Roztok byl zahřát v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy. Po ochlazení byly do roztoku přidány 3 μ l barviva GoodView II pro vizualizaci DNA pod UV světlem. Roztok byl promíchán, nalit do vaničky aparatury a do stále tekutého gelu byl vložen hřeben. Gel byl poté ponechán ztuhnout za laboratorní teploty. Po zatuhnutí byl gel převrstven dH₂O a k elektrodám byl nalit TAE pufr. Do první jamky bylo nejprve pipetováno 5 μ l 1 kb standardu a poté byly pipetovány jednotlivé vzorky, které byly připraveny smícháním 3 μ l reakční směsi z PCR, 5,3 μ l filtrované dH₂O a 1,7 μ l vzorkového pufru (6 \times konc.). Elektroforéza probíhala 20 minut při 180 V. Po skončení elektroforézy byla DNA vizualizována na transiluminátoru při 312 nm a byla pořízena fotodokumentace.

4.1.3 PŘEČIŠTĚNÍ PLASMIDOVÉ DNA Z REAKČNÍ SMĚSI PCR

Nejprve byla pomocí restriční endonukleasy DpnI naštěpena templátová DNA. K reakční směsi z PCR, byl přidán pufr CuttSmart (10 \times konc.), tak aby byl ve výsledné směsi 1 \times koncentrovaný, a ke směsi bylo přidáno přiměřené množství endonukleasy (10-20 jednotek enzymu na 1 μ g DNA). Směs byla inkubována přes noc. Poté byla endonukleasa denaturována zahřátím směsi na 80 $^{\circ}$ C po dobu 20 minut.

Plasmidová DNA byla následně přečištěna pomocí komerční sady NucleoSpin⁷⁹. Ke směsi byl nejprve přidán pětinasobný objem pufru NTI oproti objemu směsi z PCR. Směs byla následně přenesena do kolonky a centrifugována (30 s při 11 000 \times g, 20 $^{\circ}$ C). Nosič kolonky byl poté dvakrát promyt přidáním 600 μ l pufru NT3 a následnou centrifugací (30 s při 11 000 \times g, 20 $^{\circ}$ C). Následně byla kolonka centrifugována (1 min při 11 000 \times g, 20 $^{\circ}$ C) pro vysušení membrány. K DNA zachycené na membráně bylo následně přidáno 20 μ l předem předeřátého elučního NE pufru, směs byla inkubována 1 minutu při pokojové teplotě a poté byla kolonka centrifugována (1 min při 11 000 \times g, 20 $^{\circ}$ C) a eluovaná DNA byla zachycena do čisté mikrozkuhavky.

4.1.4 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK *E. COLI* TOP10 A JEJICH PRODUKCE

Pro transformaci byly použity buňky *E. coli* TOP10, které byly uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyjmutí z mrazáku byly nejprve ponechány v lázni voda-led do rozmražení. Následně byly alikvoty buněk přidány k přečištěným DNA plasmidům a byly inkubovány 10 minut v lázni při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly natřeny na SOB agarovou misku s ampicilinem o koncentraci $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ a inkubovány přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Druhý den byly na misce označeny kolonie, které byly vypíchnuty špičkou a přeneseny do 50ml zkumavek obsahujících 5 ml LB média s ampicilinem o koncentraci $100\text{ }\mu\text{g/ml}$. Zkumavky byly třepány přes noc ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 ot./min) a poté byly buňky sklizeny centrifugací (5 min při $4500 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl odlit a z pelety byla následně izolována plasmidová DNA.

4.1.5 NÍZKOOBJEMOVÁ PRODUKCE PLASMIDOVÉ DNA

Plasmidová DNA byla izolována pomocí komerční soupravy Plasmid DNA purification⁸⁰. Peleta buněk *E. coli* TOP10 (viz **oddíl 4.1.4**, str. 38) byla resuspendována v 250 μl pufru A1 s přidanou RNAsou a přenesena do 1,5ml mikrozkušavky. K suspenzi bylo přidáno 250 μl pufru A2 pro lyzaci buněk, směs byla opatrně promíchána a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo k lyzátu přidáno 300 μl pufru A3 a lyzát byl opatrně promíchán obrácením mikrozkušavky do odbarvení a vzniku husté bílé sraženiny. Lyzát byl pro odstranění sraženin centrifugován (5 min při $25\ 000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Poté byl supernatant nanesen na kolonku a centrifugován (1 min při $11\ 000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Následně byl nosič kolonky promyt nejprve přidáním 500 μl AW pufru a následnou centrifugací (1 min při $11\ 000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a poté přidáním 600 μl pufru A4 a centrifugací (1 min při $11\ 000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nosič kolonky byl vysušen další centrifugací (2 min při $11\ 000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nakonec bylo do kolonky přidáno 50 μl elučního AE pufru, inkubováno 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugováno (1 min při $11\ 000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Eluovaná plasmidová DNA byla zachycena do čisté 1,5ml mikrozkušavky.

4.1.6 SEKVENOVÁNÍ PLASMIDOVÉ DNA

Na sekvenaci byly připraveny vzorky obsahující 200 ng izolované plasmidové DNA v 7 μl a 1 μl pTT_FW primeru do celkového objemu 8 μl . Vzorky pak byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA ve výzkumném centru BIOCEV.

4.1.7 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK *E. COLI* DH5 α A JEJICH PRODUKCE

Transformace byla provedena použitím buněk *E. coli* DH5 α , které byly uchovávány při -80 °C. Alikvot buněk byl nejprve ponechán rozmrazit 10 minut v lázni voda-led a poté bylo k 25-100 μ l buněk přidáno 100-1000 ng plasmidové DNA. Směs byla inkubována v lázni 5 minut při 0 °C a poté byla rozetřena na LB agarovou misku s ampicilinem o koncentraci 100 μ g/ml. Miska byla následně inkubována přes noc při 37 °C.

Druhý den byla na misce vybrána 1 kolonie, která byla vypíchnuta špičkou a přenesena do 1l Erlenmayerovy baňky obsahující 250 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 100 μ g/ml. Zkumavky byly třepány přes noc (37 °C, 150 ot./min) a suspenze byla poté centrifugována (30 min při 4500 \times g, 4 °C), supernatant byl odlit a peleta byla resuspendována v přibližně 20 ml pufru TES. Suspenze byla přenesena do 50ml zkumavek a znovu centrifugována (10 min při 4500 \times g, 4 °C). Z výsledné pelety byla následně izolována plasmidová DNA.

4.1.8 VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE PLASMIDOVÉ DNA

Plasmidová DNA byla izolována pomocí komerční soupravy Plasmid DNA purification⁸¹. Peleta získaná postupem popsaným v oddílu 4.1.7 byla resuspendována v 12 ml pufru RES a k suspenzi bylo přidáno 12 ml pufru LYS pro lyzaci buněk. Suspenze byla poté inkubována 5 minut při pokojové teplotě. K lyzátu bylo přidáno 12 ml pufru NEU pro neutralizaci, lyzát byl opatrně promíchán obracením zkumavky do odbarvení a byl nanesen na kolonu ekvilibrovanou 12 ml pufru EQU s filtrem pro zachycení sraženin. Po prokapání lyzátu byla kolona s filtrem promyta 5 ml pufru EQU. Poté byl vyjmut filtr a kolona byla promyta podruhé 8 ml pufru EQU. Následně byla plasmidová DNA eluována 5 ml pufru ELU do čisté 15ml zkumavky.

K eluované DNA byla následně přidáno 3,5 ml isopropanolu pro precipitaci DNA a eluát byl poté krátce promíchán na vortexu a inkubován 2 minuty při laboratorní teplotě. Eluát byl následně nanesen na 0,22 μ m filtr. Filtr byl promyt 2 ml 70% ethanolu a sušen opakovaným prosáváním vzduchu. Po vysušení byla izolovaná DNA eluována do 500 μ l AE pufru.

4.1.9 URČENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY PLASMIDOVÉ DNA

Koncentrace a čistota DNA byla zjištěna pomocí měření absorbance při 260 a 280 nm na přístroji DS-11+ (DeNovix, USA). Koncentrace DNA byla vypočítána pomocí

empirického vztahu, podle kterého platí, že $A_{260} = 1$ pro koncentraci DNA 50 $\mu\text{g/ml}$. Čistota DNA byla určena podle poměru absorbance při 260 a 280 nm, kde platí, že DNA je čistá, pokud se poměr A_{260}/A_{280} pohybuje přibližně mezi 1,8 a 2,0.

4.2 EXPRESE PROTEINŮ V LINII HEK293S GnTI-

4.2.1 KULTIVACE BUNĚK

Kultivace buněk byla prováděna Mgr. Barborou Kalouskovou. Buňky byly kultivovány v médiu EXCELL293 v třepačce při 135 ot./min při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Průběžně jednou za 3-4 dny byla provedeno subkultivace buněk čerstvým médiem, aby se hustota buněk pohybovala mezi 0,2-2 · 10⁶ buněk/ml. Buňky byly kultivovány v láhvi s prodyšným víkem, kdy objem suspenze tvořil optimálně 30-40 % objemu lahve.

4.2.2 TRANSFEKCE BUNĚK A TVORBA STABILNÍ LINIE

Transfekce buněk pro získání stabilních linií byla provedena Mgr. Barborou Kalouskovou. Nejprve byla změřena hustota buněk HEK293S GnTI- v suspenzi pomocí hemocytometru pro získání celkového počtu buněk. Suspenze byla poté centrifugována (5 min při 95 × g, 20 °C). Staré médium bylo dekantováno a buňky byly resuspendovány v takovém objemu čerstvého média ExCELL293, aby byla hustota buněk rovna 20 · 10⁶ buněk/ml. Ze suspenze byla následně odebrán objem média obsahující 30 · 10⁶ buněk do jamky na 12-jamkové destičce. K těmto buňkám bylo přes 0,22 μm filtr přidáno 300 μl transfekčního mixu plasmidové DNA v pufru PBS-TK, kde mix obsahoval 1 μg buněk na 1 · 10⁶ buněk, tedy 30 μg . Nakonec bylo do jamky přidáno transfekční činidlo 1PEI v poměru 4:1 ku množství plasmidové DNA, tedy 120 μg . Transfekované buňky byly následně inkubovány 4 hodiny na třepačce (135 ot./min, 37 °C, 5 % CO₂). Poté byla suspenze naředěna médiem ExCELL293 na výslednou hustotu 1 · 10⁶ buněk/ml.

4.2.3 SELEKCE STABILNÍCH LINIÍ

Pro selekci stabilních linií byla po 48 hodinách od transfekce přidána selekční antibiotika G418. Nejprve byla změřena hustota buněk v jamce, buňky byly následně centrifugovány (5 min při 95 × g, 20 °C) a převedeny do 100ml čtverhranné lahve obsahující 30 ml směsi ExCELL293. Bylo přidáno antibiotikum G418 do výsledné koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. Poté byla přeměřována hustota buněk každé 3 dny a buňky byly vždy centrifugací převedeny do čerstvé směsi ExCELL293 a znovu byla přidána

antibiotika do stejné výsledné koncentrace. Poté, co buňky přešly do fáze růstu a dosáhly 100% viability bylo zamraženo několik alikvotů buněčné suspenze.

4.2.4 SKLÍZENÍ PROTEINU

Stabilní linie buněk byla převedena do objemu 300 ml média ExCELL293 v 1l lahvi s počáteční buněčnou hustotou mezi $1 \cdot 10^6$ - $3 \cdot 10^6$ buněk/ml a k suspenzi bylo přidáno antibiotikum pro indukci produkce proteinu. Po indukci byly buňky ponechány produkovat a poté, co došlo k poklesu viability pod 30 %, byla suspenze sklizena centrifugací (1 hod při $10\ 864 \times g$, 4 °C). Médium bylo následně přefiltrováno přes 0,22 µm filtr a zamraženo při -20 °C.

4.3 PURIFIKACE PROTEINŮ

4.3.1 AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Produkované proteiny mají na C-konci histidinovou kotvu (viz **Obrázek 10**, str. 46) a pro purifikaci byla tedy použita afinitní chromatografie. Purifikace byla provedena pomocí HPLC systému na přístroji ÄKTA prime plus a kolonky HisTrap Excel 5 ml (GE Healthcare, USA) obsahující navázané ionty Ni²⁺.

Médium bylo nejprve rozmraženo, přefiltrováno přes 0,22 µm filtr a poté zředěno pufrům PBS pro získání objemu alespoň 750 ml (zhruba v poměru 1:1). Systém byl poté převeden do pufru PBS a byla spuštěna automatizovaná metoda, kde na kolonu byly postupně přiváděny roztoky (viz **Tabulka 3**, str. 42). Proteiny byly eluovány pomocí imidazolu, přičemž nejprve byla provedena předeluce 20mM imidazolem a poté eluce s 250mM imidazolem v PBS pufru.

Tabulka 3: Automatizovaná metoda afinitní chromatografie. Složení pufrů viz oddíl 3.3, str. 34.

Roztok	Objem [ml]	Průtoková rychlost [ml/min]	Velikost sbíraných frakcí [ml]
PBS pufr	30	2,5	-
Médium : PBS (ředěno 1 : 1)	700	5,0	-
PBS pufr	30	2,5	-
předeluční pufr	30	2,5	10
eluční pufr	15	2,5	5
HEPES pufr	15	2,5	-
eluční pufr	15	2,5	10
acetátový pufr	50	2,5	-
20% ethanol	20	2,5	-

Médium prošlé přes kolonu bylo také sbíráno pro případnou repurifikaci. Eluované frakce byly přímo po chromatografii na HPLC systému ÄKTA prime plus odsoleny pomocí kolony HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare, USA). Nejprve byla kolona promyta pufrům HEPES, který byl použit jako mobilní fáze. Vzorek byl na kolonu nanášen rychlostí 2,5 ml/min, poté byla průtoková rychlost upravena na 5 ml/min.

4.3.2 KONCENTROVÁNÍ PROTEINŮ

Proteiny získané pomocí afinitní chromatografie byly koncentrovány z výchozího objemu 15 ml do výsledného 0,5 ml. Použit byl 15ml koncentrátor Amicon Ultra s propustnou membránou pro molekuly menší než 3 kDa, do kterého byly postupně přidávány jednotlivé frakce elucí. Frakce byly opakovaně centrifugovány (8 min při 3900 × g, 14 °C) a mezi jednotlivými centrifugacemi byl obsah vždy promíchán nasáváním do špičky pipety pro homogenizaci roztoku a zabránění srážení proteinu.

4.3.3 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE

K HPLC systému ÄKTAbasic byla připojena kolona Superdex Increase 75 GL 10/300 (GE Healthcare, USA). Systém byl nejprve promyt 0,1M hydroxidem sodným a poté byl převeden do pufru HEPES. Nejprve byly provedeny analytické nástřiky s vzorky 100 µg proteinu ve 300 µl s frakcemi elucí získanými při afinitní

chromatografii. Průtok systémem byl nastaven na 0,5 ml/min. Proteiny byly detekovány spektrofotricky při 280 nm.

Frakce byly následně koncentrovány (viz **oddíl 4.3.2**, str. 42) a pomocí gelové permeační chromatografie repurifikovány. Při repurifikaci byl systém v pufru HEPES a průtok byl opět 0,5 ml/min. Frakce byly sbírány po 1 ml a koncentrace proteinů byla stanovena v jednotlivých frakcích spektrofotometricky (viz **oddíl 4.3.4**). Kolona byla po ukončení měření nejprve promyta 0,1M NaOH a poté převedena do 20% ethanolu.

4.3.4 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno pomocí měření absorbance při 280 nm na přístroji DS-11+ (DeNovix, USA), kdy jako referenční vzorek byl použit čistý pufr HEPES. Pro výpočet koncentrace byla použita hodnota molekulové hmotnosti proteinu a teoretická hodnota extinkčního koeficientu získaná podle aminokyselinové sekvence v programu ExPASy ProtParam⁸².

4.3.5 DEGLYKOSYLACE PROTEINŮ

Vzorky proteinů byly deglykosylovány pomocí endonukleasy Endo F1, která byla k proteinu přidána v hmotnostním poměru 1 : 20. Vzorky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

4.3.6 SDS PAGE

Podle velikosti zkoumaného proteinu, byl připraven 15% dělicí polyakrylamidový gel a zaostřovací gel podle **Tabulky 4**.

Tabulka 4: Složení 15% separačního gelu a zaostřovacího polyakrylamidového gelu pro přípravu 1 gelu

Látka	Separací gel [ml]	Zaostřovací gel [ml]
dH ₂ O	0,90	0,70
30% akrylamid	2,00	0,25
1,5M Tris, pH 8,8	1,00	-
1,5M Tris, pH 6,8	-	0,125
10% SDS	0,040	0,010
TEMED	0,0020	0,0015
10% APS	0,040	0,010

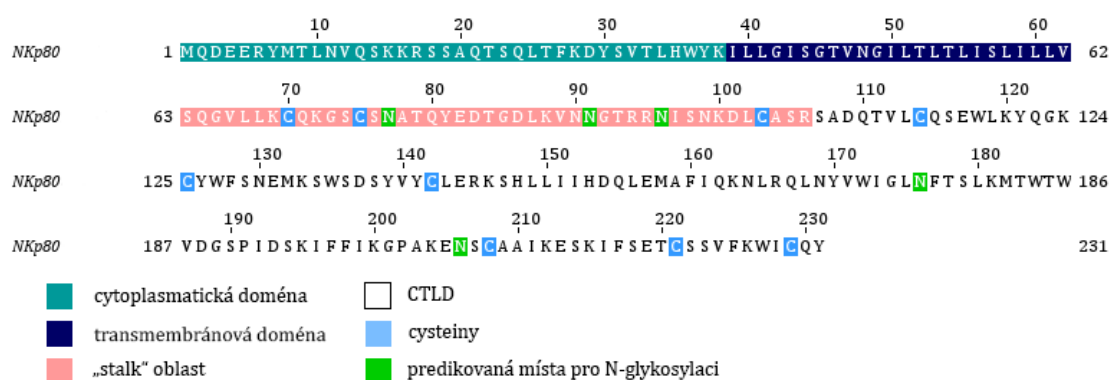
Na SDS elektroforézu byly připraveny vzorky redukující a neredukující do celkového objemu 15 μ l. Vzorky obsahovaly 1,5-3 μ g zkoumaného proteinu a objem 5 \times koncentrovaného vzorkového pufru (redukujícího či neredukujícího), aby byl ve výsledné směsi 1 \times koncentrovaný. Vzorky byly poté zahřáty v termobloku 5 minut při 98 $^{\circ}$ C a poté krátce odstředěny na minicentrifuze. Do první jamky bylo napipetováno 3 μ l standardu molekulových hmotností, poté byly napipetovány vzorky redukující a neredukující. Elektroforéza probíhala 60 minut při 200 V. Po skončení elektroforézy byl gel přesunut na 30 minut do barvicí lázně. Poté byl barvicí roztok vyměněn za odbarvovací a gel byl třepán při nízkých otáčkách do odbarvení. Poté byly gely vyfoceny pomocí UVitec (Cambridge, UK).

4.3.7 DIFERENČNÍ SKENOVACÍ FLUORIMETRIE

Diferenční skenovací fluorimetrie (dále DSF) byla provedena na přístroji Prometheus NT.48 (NanoTemper, Německo). Pro měření byly připraveny vzorky proteinů v pufru HEPES o koncentraci 1 mg/ml. Měřen byl poměr mezi intenzitou fluorescence naměřenou při 330 nm a 350 nm. Vzorky byly měřeny v rozsahu 20-95 $^{\circ}$ C s teplotním krokem 2 $^{\circ}$ C/min. Vzorky byly vyhodnoceny pomocí programu PT.ThermControl.

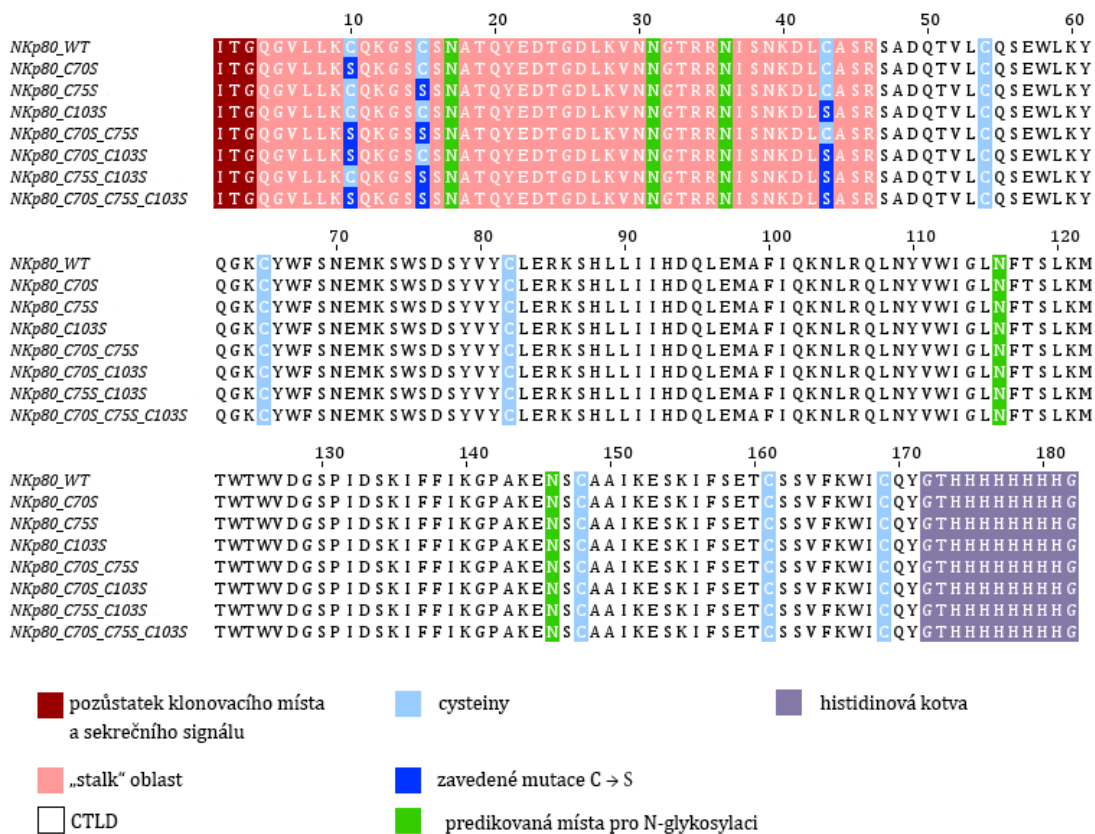
5 VÝSLEDKY

Receptor NKp80 je transmembránový protein II. typu s N-koncovou cytoplasmatickou doménou. Na povrchu NK buněk tvoří homodimery pomocí disulfidických můstků ve „stalk“ oblasti. Jak je vidět v aminokyselinové sekvenci (viz **Obrázek 9**), jsou zde přítomné tři cysteiny – C70, C75 a C103, a dosud nebylo zjištěno, které z těchto cysteinů se tvorby můstků účastní.



Obrázek 9: Aminokyselinová sekvence proteinu NKp80. Vytvořeno na základě predikce struktury v databázi UniProt⁸³.

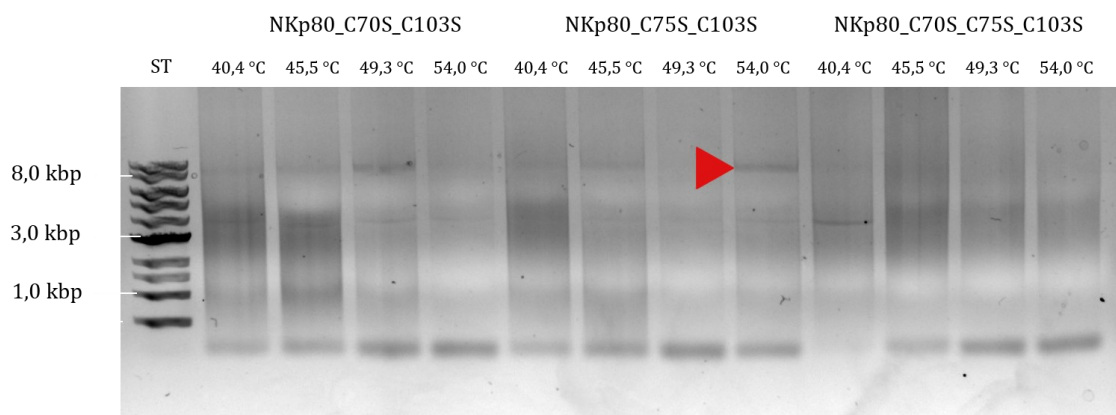
Pro studium tvorby kovalentních dimerů byla v rámci této práce připravena série celkem sedmi mutantů konstruktů extracelulární domény s různými možnými kombinacemi mutací těchto tří cysteinů ve „stalk“ oblasti. Aminokyselinovou sekvenci těchto konstruktů reprezentuje **Obrázek 10** (str. 46).



Obrázek 10: Porovnání aminokyselinových sekvencí přirozené formy extracelulární domény receptoru NKp80 a jeho mutantů.

5.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ MUTANTŮ POMOCÍ CELOPLASMIDOVÉ PCR A PRODUKCE

Pro přípravu mutantů byl Mgr. Janem Bláhou poskytnut proteinový konstrukt NKp80_WT již zaklonovaný do expresního vektoru pOPINTTGneo. Mutagenese tohoto konstruktů byla provedena pomocí celoplasmidové PCR za použití primerů s bodovými mutacemi, kde teplotu nasedání bylo nejprve potřeba optimalizovat (viz **Obrázek 11**, str. 47). Nejprve byly připraveny vektory NKp80_C70S, NKp80_C75S, NKp80_C103S a NKp80_C70S_C75S pomocí syntetizovaných primerů (**oddíl 3.8**, str. 35). Po PCR byla vždy ověřena přítomnost produktů agarosovou elektroforézou, kde očekávaná velikost linearizovaného plasmidu je přibližně 8 kb. Vektory byly přečištěny a byly jimi transformovány buňky *E. coli* TOP10 pro získání zásobního množství plasmidové DNA. U tohoto zásobního množství byla ověřena zavedená mutace sekvenací DNA. Po ověření zavedené mutace sekvenací DNA pak byly tyto vektory použity jako templátová DNA pro získání zbylých vektorů a to NKp80_C70S_C103S, NKp80_C75S_C103S a NKp80_C70S_C75S_C103S.



Obrázek 11: Agarosová elektroforéza po celoplasmidové PCR. Optimalizace teploty nasedání primerů. Předpokládaná velikost linearizovaného plasmidu pOPINTTGneo je 8 kb. ST je 1 kb standard⁸⁴.

Pro amplifikaci zásobního množství vektorů byly poté transformovány buňky *E. coli* DH5 α . Takto získaná plasmidová DNA již byla použita pro stabilní transfekci buněk HEK293S GNTI.

Expresní vektor pOPINTTGneo nese gen resistance proti geneticinu. Při stabilní transfekci dochází k integraci plasmidové DNA náhodně do genomu buňky a buňka tak získává resistenci vůči danému antibiotiku. Druhý den po transfekování byl na kulturu aplikován selekční tlak přidáním geneticinu do výsledné koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. V první fázi selekce klesla viabilita buněk a po přibližně 3-4 týdnech začala viabilita opět stoupat. V průběhu selekce byly buňky každé 3 dny přepočítány, poté byly centrifugovány a přeneseny do čerstvého média s antibiotikem. Pár alikvotů takto selektovaných buněk bylo zamraženo a umístěno do kryobanky na $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

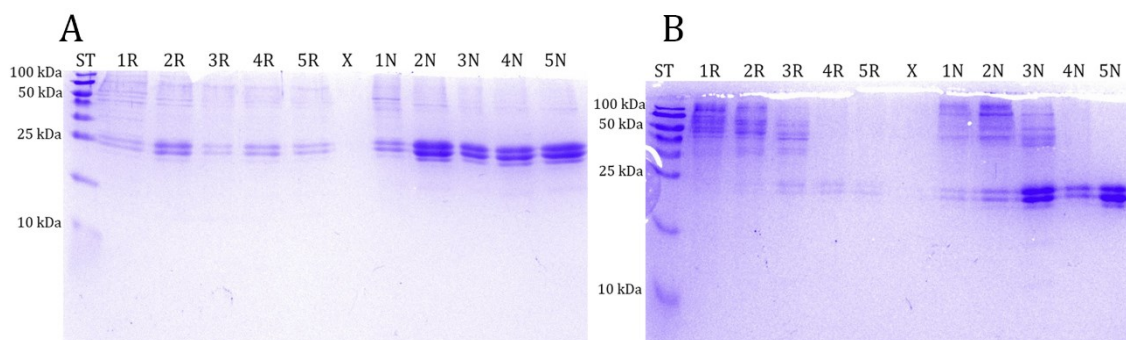
Pro produkci proteinů byla část buněk převedena do 300 ml čerstvého ExCELL293 média do počáteční hustoty mezi $0,8 \cdot 10^6$ - $1,5 \cdot 10^6$ buněk/ml a k suspenzi byl přidán geneticin do výsledné koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ pro indukci produkce proteinu. Po 10-14 dnech, kdy došlo k poklesu viability pod 30 %, byla kultura sklizena centrifugací (1 hod při $10\ 864 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$). Médium bylo následně přefiltrováno přes 0,22 μm filtr a zamraženo při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

5.2 PURIFIKACE PROTEINŮ

Proteiny byly nejprve purifikovány afinitní chromatografií na kolonce HisTrap Excel. Sklizené médium bylo naředěno 1:1 pufrém PBS a průtokem 5 ml/min nanášeno na kolonku. Proteiny byly eluovány PBS pufrém s 250mM imidazolem a odsolením převedeny do pufru HEPES na koloně HiPrep 26/10 Desalting průtokem 2,5 ml/min. Frakce eluovaných proteinů byly sbírány po 5 ml. U získaných frakcí byla

spektrofotometricky změřena koncentrace proteinů a pro kontrolu čistoty byla provedena SDS PAGE (viz **Obrázek 12A**).

Kvůli přítomnosti nečistot byly frakce eluovaných proteinů koncentrovány z 15 ml na 0,5 ml a repurifikovány pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex Increase 75 GL 10/300. Chromatografie byla provedena v pufru HEPES průtokem 0,5 ml/min a sbírány byly 1ml frakce. Po repurifikaci byla znovu zkontrolována čistota frakcí pomocí SDS PAGE (viz **Obrázek 12B**).



Obrázek 12: SDS PAGE mutantu NKp80_C70S_C75S_C103S A) po afinitní chromatografii, **B)** po repurifikaci gelovou permeační chromatografií. 15% polyakrylamidový gel, průběh elektroforézy 1 hod při napětí 200 V; ST = standard molekulových hmotností⁸⁵, X = prázdná dráha, R = vzorky v redukujícím prostředí, N = vzorky v neredukujícím prostředí. Očekávaná molekulová hmotnost proteinů bez glykosylace je 21 kDa.

Na **Obrázku 12**, panelu A můžeme vidět, že po afinitní chromatografii s využitím kolonky HisTrap Excel jsou veškeré frakce kontaminovány proteiny s vyšší molekulovou hmotností než NKp80_C70S_C75S_C103S. Po gelové permeační chromatografii pak můžeme pozorovat dané kontaminace v prvních 3 frakcích na panelu B. Přičemž poslední frakce jsou již čisté.

Na SDS PAGE je dále vidět, že protein NKp80_C70S_C75S_C103S se vyskytuje v několika glykoformách, které jsou reprezentovány jednotlivými proužky. Tyto výsledky jsou analogické i pro NKp80_WT a ostatní mutanty. Pouze z čistých frakcí, např. u varianty NKp80_C70S_C75S_C103S frakce č. 4 a 5, byl vypočítán výtěžek produkce proteinů v mg, který byl přepočítán na teoretický výtěžek proteinu z 1 l média (viz

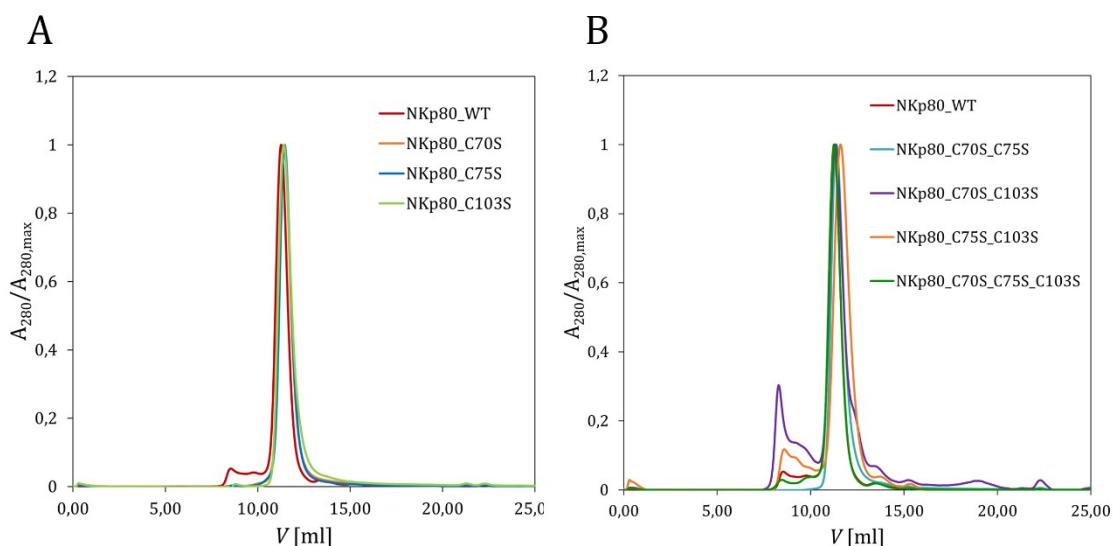
Tabulka 5, str. 50)

Tabulka 5: Teoretické výtěžky jednotlivých proteinů na 1 l média z produkce buněk HEK293S GnTI-.

Protein	<i>m</i> [mg]
NKp80_WT	3,5
NKp80_C70S	13,3
NKp80_C75S	9,7
NKp80_C103S	17,7
NKp80_C70S_C75S	10,0
NKp80_C70S_C103S	1,0
NKp80_C75S_C103S	11,7
NKp80_C70S_C75S_C103S	12,0

5.2.1 ANALYTICKÁ GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Interakci mezi proteiny můžeme sledovat pomocí analytické gelové permeační chromatografie, kde pozorujeme změnu elučního objemu při formování dimerů či dalších multimerů oproti samostatnému proteinu. Pro chromatografii byla použita kolona Superdex Increase 75 GL 10/300, která má pro danou velikost proteinu dobrou rozlišovací schopnost. Pro získání ostrého píku byly vzorky připraveny jako 100 µg proteinu ve 300 µl pufru HEPES. Záznamy gelové permeační chromatografie proteinů jsou shrnuty na **Obrázku 13**.

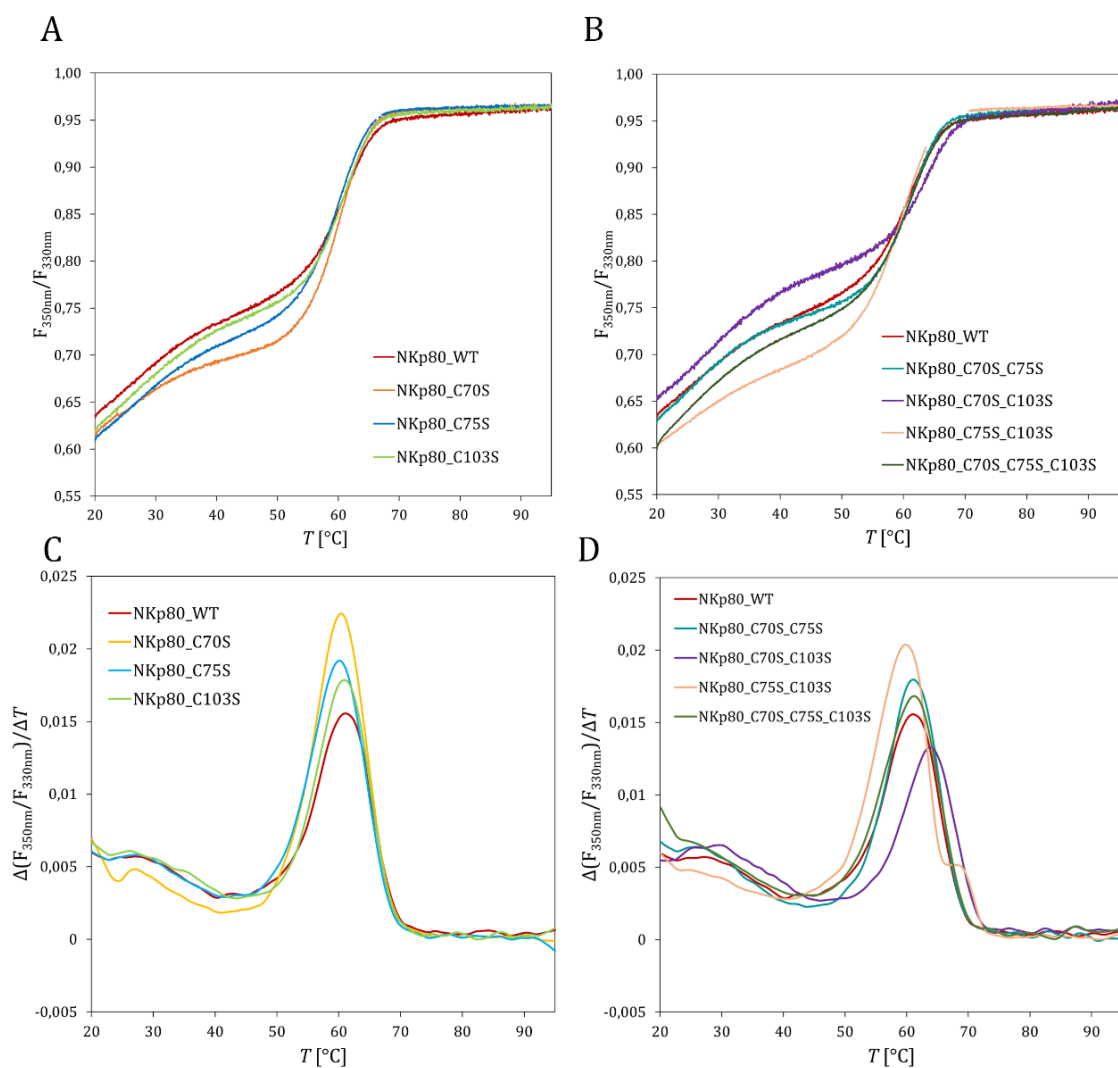


Obrázek 13: Normalizovaný záznam z gelové permeační chromatografie NKp80_WT a jeho mutantů. **A)** NKp80_WT a NKp80 mutanti s jednou mutací, **B)** NKp80_WT a mutanti se dvěma mutacemi a trojitý mutant. Kolona Superdex 75 Increase GL 10/300, mobilní fáze pufr HEPES, průtok 0,5 ml/min.

Všechny proteiny mají stejný eluční objem, a tedy stejnou molekulovou hmotnost. Přičemž na panelu B můžeme opět pozorovat kontaminaci frakcí většími proteiny, které byly gelovou permeační chromatografií odděleny od proteinů NKp80.

5.2.2 DIFERENČNÍ SKENOVACÍ FLUORIMETRIE

Se vzorky proteinů o koncentraci 1 mg/ml byla měřena DSF pro určení termální stability na přístroji Prometheus NT.48 (NanoTemper, Německo). Byl vynesena graf závislosti poměru vlnových délek na teplotě, kde je teplota tání, tedy teplota, při které se protein rozbálí, rovna inflexnímu bodu křivky. Pro přesnější určení teploty tání byly vypočteny hodnoty první derivace, kde je teplota tání rovna maximu na křivce. Porovnání vynesených křivek měřených proteinů je na **Obrázku 14**. Takto získané hodnoty teploty tání jednotlivých proteinů byly shrnuty do **Tabulky 6** (str. 53).



Obrázek 14: Záznam DSF proteinu NKp80_WT a jeho variant. Koncentrace vzorků měřených na přístroji Prometheus NT.48 (NanoTemper, Německo) byla 1 mg/ml. **A)** Závislost poměru intenzity fluorescence naměřené při 350 nm a 330 nm pro NKp80_WT a NKp80 mutanty s jednou mutací, **B)** závislost poměru intenzity fluorescence naměřené při 350 nm a 330 nm pro NKp80_WT a NKp80 mutanty s dvěma a více mutacemi, **C)** závislost první derivace poměru intenzity fluorescence naměřené při 350 nm a 330 nm na teplotě, $\Delta(F_{350nm}/F_{330nm})/\Delta T$, pro NKp80_WT a NKp80 mutanty s jednou mutací, **D)** závislost první derivace poměru intenzity fluorescence naměřené při 350 nm a 330 nm na teplotě, $\Delta(F_{350nm}/F_{330nm})/\Delta T$, pro NKp80_WT a NKp80 mutanty s dvěma a více mutacemi.

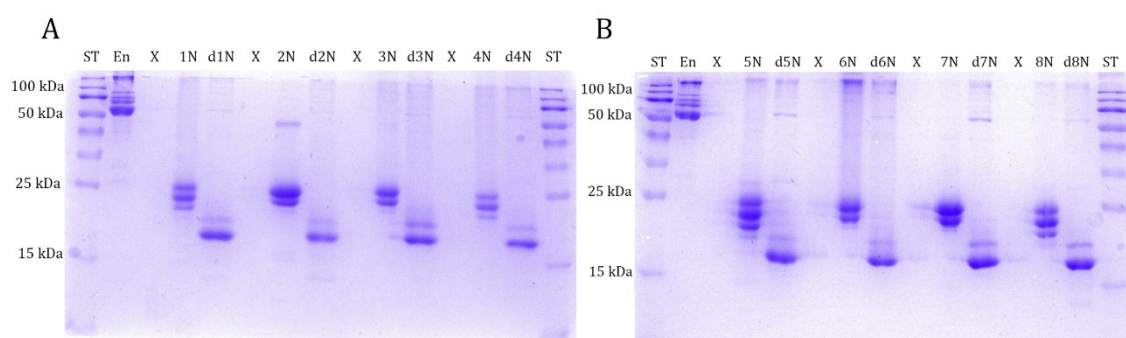
Tabulka 6: Teploty tání proteinu NKp80_WT a jeho mutantů získané pomocí DSF.

Protein	T_t [°C]
NKp80_WT	61,0
NKp80_C70S	60,3
NKp80_C75S	60,0
NKp80_C103S	60,8
NKp80_C70S_C75S	61,1
NKp80_C70S_C103S	63,8
NKp80_C75S_C103S	59,7
NKp80_C70S_C75S_C103S	61,0

Z **Tabulky 6** můžeme pozorovat, že mezi jednotlivými teplotami tání proteinu NKp80 a jeho mutantů je minimální rozdíl.

5.2.3 DEGLYKOSYLACE PROTEINŮ

Vzorky proteinů byly deglykosylovány pomocí endoglykosidasy Endo F1 v hmotnostním poměru 1:20 Endo F1 vůči hmotnosti proteinu. Enzym byl s proteinem inkubován přes noc při 37 °C.



Obrázek 15: SDS PAGE glykosylovaných a deglykosylovaných proteinů. 15% polyakrylamidový gel, průběh elektroforézy 1 hod při napětí 200 V; ST = standard molekulových hmotností⁸⁵, X = prázdná dráha, N = vzorky v neredukujícím prostředí, d = deglykosylované vzorky, En = Endo F1, **A)** 1 = NKp80_WT, 2 = NKp80_C70S, 3 = NKp80_C75S, 4 = NKp80_C103S; **B)** 5 = NKp80_C70S_C75S, 6 = NKp80_C70S_C103S, 7 = NKp80_C70S_C103S, 8 = NKp80_C70S_C75S_C103S.

Na **Obrázku 14** můžeme vidět, že u deglykosylovaných vzorků je přítomno více proužků, tedy více glykosylovaných forem. U všech vzorků je přítomný silný proužek

o velikosti přibližně 21 kDa a užší proužek okolo 22 kDa. Deglykosylace tedy nebyla úplná, přičemž rozdíl mezi jednotlivými proužky naznačuje, že je přítomna glykoforma s jedním obsazeným glykosylačním místem.

6 DISKUZE

Cílem této práce bylo připravit extracelulární doménu receptoru NKp80 a jeho sedmi mutantů s různými možnými variantami mutací tří cysteinů flexibilní části extracelulární domény proteinu, tzv. „stalk“ oblasti, a zjistit tak více o struktuře a dimerizaci daného receptoru.

Proteiny byly připraveny stabilní transfekcí buněk HEK293S GnTI-, protože v předchozích pracích byl výtěžek expresí v *E. coli* a transientní expresí v buňkách HEK293 nízký⁸⁶.

Pro purifikaci proteinů z média byla nejprve použita afinitní chromatografie za použití kolonky HisTrap Excel a po purifikaci byla provedena SDS PAGE pro kontrolu kvality purifikace. Na záznamu gelu (viz **Obrázek 12A**, str. 48) vidíme, že byly ve všech frakcích eluovaných po afinitní chromatografii a odsolení přítomné kontaminace. Z toho můžeme usoudit, že kolonka HisTrap Excel není selektivní výhradně pro proteiny s histidinovou kotvou, to potvrzuje také profil první frakce na gelu, což jsou proteiny eluované nižší koncentrací imidazolu (20mM), tedy předeluce. V těchto frakcích je možné pozorovat proteiny o vyšší molekulové hmotnosti než námi žádaného proteinu.

Z tohoto důvodu byly frakce proteinů koncentrovány a repurifikovány pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex Increase 75 GL 10/300. Po repurifikaci byla znovu provedena SDS PAGE pro kontrolu čistoty proteinů. Ze záznamu gelu po repurifikaci (viz **Obrázek 12B**, str. 48) můžeme pozorovat oddělení proteinů o vyšší molekulové hmotnosti (u NKp80_C70S_C75S_C103S jsou to frakce 1, 2 a 3) od námi žádaného proteinu (u NKp80_C70S_C75S_C103S frakce 4 a 5).

Tak byly získány repurifikované frakce, kde možné kontaminace nelze pozorovat na SDS PAGE. Ovšem pro budoucí měření, jako např. krystalizace či hmotnostní spektrometrie, bude nutné proces purifikace přehodnotit. V prvním kroku se nabízí využití nosiče Talon pro afinitní chromatografii s isokratickou nebo gradientovou elucí, což by mělo napomoci čistotě eluovaného proteinu. Standardním krokem každé purifikace pak bude gelová permeační chromatografie.

S prvními čtyřmi purifikovanými proteiny, tedy s NKp80_WT, NKp80_C70S_C103S, NKp80_C75S_C103S a NKp80_C75S_C103S, byla po první purifikaci na kolonce HisTrap Excel provedena analytická gelová permeační chromatografie na koloně Superdex Increase 75 GL10/300. Záznamy křivek těchto proteinů (viz **Obrázek 13**, str. 50) tedy ukazují přítomnost kontaminujících či

sražených proteinů v mrtvém objemu kolony, tedy kolem 8 ml. S dalšími proteiny byla tato analýza provedena po repurifikaci, proto nejsou kontaminace na ostatních křivkách přítomny.

Na záznamu analytické gelové permeační chromatografie na koloně Superdex Increase 75 GL10/300 pozorujeme vždy pouze jeden pík o elučním objemu 11 ml. Tento objem odpovídá elučnímu objemu proteinů o velikosti zhruba 40 kDa (porovnáno s elučním objemem fúzního konstruktů mCherry a nanoprotilátky dané velikosti připravené Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu). Molekulární hmotnost proteinu NKp80 je přibližně 20 kDa a nelze proto vyloučit, že protein tvoří v roztoku nekovalentní dimery. Chování je stejné pro přirozenou formu NKp80 a všechny mutanty. Pro potvrzení přítomnosti nekovalentního dimeru by bylo potřeba vzorek dále analyzovat například pomocí analytické ultracentrifugace.

Výtěžky jednotlivých proteinů byly zaznamenány do **Tabulky 5** (viz str. 50). Z uvedených hodnot výtěžků je zřejmé, že zde není nijak výrazná korelace mezi pozicí mutace či kombinací mutací a úrovní exprese či stabilitou proteinů. U většiny proteinů bylo získáno více než 3 mg od každého proteinu (až na výjimku u varianty NKp80_C70S_C103S), což je dostatečné množství proteinu pro základní měření. Zajímavý je však mutant NKp80_C103S, u kterého mutace cysteinu, který je nejbližší CTLD, zřejmě zamezí narušení disulfidového motivu v doméně lichým cysteinem „stalk“ oblasti. Výtěžek tohoto mutantu byl jeden z nejvyšších. Dále je zajímavý také mutant NKp80_C70S_C103S, jehož výtěžek byl nejnižší, zároveň vykazoval nižší čistotu na SDS PAGE (viz **Obrázek 15**, str. 53) a vyšší přítomnost agregátů na gelové permeační chromatografii (viz **Obrázek 13**, str. 50). Přitom však u něj byla naměřena nejvyšší teplota tání (viz **Tabulka 6**, str. 53). Je tedy pravděpodobné, že u tohoto mutantu nedošlo ke správnému zapojení disulfidických můstků.

Dále byla také měřena termální stabilita (teplota tání proteinů) pomocí DSF. Z výsledných hodnot v **Tabulce 6** (viz str. 53) vidíme, že teplota tání všech proteinů, tedy teplota, při které je rozbaleno 50 % proteinů, je u všech proteinů velmi podobná a pohybuje se kolem 60 °C. Při určování termální stability proteinů DSF sledujeme změnu intenzity fluorescence aromatických aminokyselin proteinu v závislosti na teplotě. K nejvyšší změně intenzity fluorescence dochází v okamžiku rozbalení domény proteinu. Pro všechny produkované proteiny platí, že mají pouze doménu CTLD, která je pro všechny proteiny stejná, proto je rozdíl termální stability mezi proteiny minimální.

Na gelech SDS PAGE je vidět více proužků, které mohou odpovídat různým glykosylačním stavům proteinu, konstrukt NKp80 totiž obsahuje celkem 5 míst pro N-vázanou glykosylaci. Pro ověření této hypotézy, byly vzorky NKp80_WT a jeho mutantů deglykosylovány pomocí endoglykosidasy Endo F1. Poté byla překontrolována deglykosylace vzorků pomocí SDS PAGE (viz **Obrázek 15**, str. 53), ve které byly vedle sebe připraveny vzorky glykosylovaného a deglykosylovaného proteinu. Ve všech deglykosylovaných vzorcích můžeme pozorovat přítomnost dvou proužků, silnějšího kolem přibližně 21 kDa a užšího kolem 22 kDa. Rozdíl mezi velikostmi proužku naznačuje, že kromě deglykosylované formy jsou přítomné proteiny s jedním obsazeným glykosylačním místem. U všech vzorků tedy nedošlo k úplné deglykosylaci všech proteinů, což mohlo být způsobeno nižší aktivitou endoglykosidasy (nejspíše způsobené stářím používané Endo F1), štěpením v neoptimálních podmínkách (ve vzorcích nebylo upravováno pH, i přes to, že optimum pro Endo F1 je v mírně kyselé oblasti) nebo z důvodu sterické nepřístupnosti některého z glykosylačních míst. Pro budoucí využití, např. pro krystalizaci či hmotnostní spektrometrii, je však dosažená míra deglykosylace již dostatečná.

Z daných výsledků je zřejmé, že mutace cysteinů ve „stalk“ oblasti měla vliv na úroveň exprese proteinu. Tento vliv je ovšem bez významné korelace. Také je zřejmé, že u žádného z mutantů nedošlo k tvorbě kovalentního dimeru, jelikož profil všech variant v redukujícím i neredukujícím prostředí na SDS PAGE ukazuje pouze proužky proteinu v různém glykosylovaném stavu pohybující se kolem předpokládané velikosti 21 kDa. Je ovšem možné, že dochází k tvorbě dimeru nekovalentního, což by bylo možné ověřit dalším měřením, např. pomocí již zmíněné analytické ultracentrifugace.

Pro budoucí biofyzikální měření je třeba produkovat dostatečné množství materiálu a zajistit jeho dostatečnou čistotu, a to především pro krystalizaci, jelikož krystalová struktura receptoru NKp80 není známá. Nejprve je třeba pomocí hmotnostní spektrometrie ověřit správné zapojení disulfidů v doméně CTLD mapováním disulfidů. Dále bude krystalizována extracelulární doména receptoru NKp80_WT a více variant mutantů, jelikož úspěšnost krystalizace je spíše náhodná, a proto je lepší zkusit více možností.

7 ZÁVĚR

- Byly připraveny expresní vektory extracelulární domény přirozeně se vyskytující varianty (WT) receptoru NKp80 a jeho sedmi mutantů.
- Bylo dosaženo úspěšné transfekce buněk HEK293S GnTI⁻ připravenými expresními vektory pro NKp80_WT a všech 7 mutantů.
- Podařilo se připravit protein NKp80_WT i všech jeho sedm mutantů.
- Proteiny byly charakterizovány analytickou gelovou permeační chromatografií a diferenční skenovací fluorimetrií.
- Bylo potvrzeno, že proteiny obsahují odštěpitelnou N-vázanou glykosylaci.
- Se získaným materiálem budou probíhat další biofyzikální měření, především krystalizace.

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Matzinger, P. The danger model: A renewed sense of self. *Science (80-.)*. **296**, 301–305 (2002).
2. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S3 (2010).
3. Vivier, E. & Malissen, B. Innate and adaptive immunity: Specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat. Immunol.* **6**, 17–21 (2005).
4. Hořejší, V. & Bartůňková, J. *Základy imunologie*. (Nakladatelství TRITON, 2009).
5. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
6. Flajnik, M. F. & Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 47–59 (2010).
7. Torang, A., Gupta, P. & Klinke, D. J. An elastic-net logistic regression approach to generate classifiers and gene signatures for types of immune cells and T helper cell subsets. *BMC Bioinformatics* **20**, 433 (2019).
8. 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.* **5**, 112–117 (1975).
9. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* **112**, 461–469 (2008).
10. Nakamura, M. C. Natural killer cells and their role in disease. *Lab. Med.* **33**, 278–282 (2002).
11. Scoville, S. D., Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. Modeling human natural killer cell development in the era of innate lymphoid cells. *Front. Immunol.* **8**, 27 (2017).
12. Mandal, A. & Viswanathan, C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* **8**, 47–55 (2015).
13. Björkström, N. K., Ljunggren, H. G. & Michaëlsson, J. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 310–320 (2016).
14. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S. & Malarkannan, S. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology* roč. 9 1 (2018).
15. Wu, Y., Tian, Z. & Wei, H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. *Front. Immunol.* **8**, 1 (2017).
16. Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J. & Vivier, E. Natural killer cells: from CD3-NKp46+ to post-genomics meta-analyses. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 365–372 (2007).
17. Cooper, M. A. *et al.* Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* **97**, 3146–3151 (2001).
18. Seren Bernardone, I. Role of NK cells and adaptive immunity in „immunoediting”: Recent developments. *Inmunologia* **27**, 141–146 (2008).
19. Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 189–220 (1999).
20. Ahmed, F., Jo, D. H. & Lee, S. H. Can Natural Killer Cells Be a Principal Player in Anti-SARS-CoV-2 Immunity? *Front. Immunol.* **11**, 3246 (2020).
21. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
22. Benichou, G., Yamada, Y., Aoyama, A. & Madsen, J. C. Natural killer cells in rejection and tolerance of solid organ allografts. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **16**, 47–53 (2011).
23. Rydzynski, C. E. & Waggoner, S. N. Boosting vaccine efficacy the natural (killer) way. *Trends Immunol.* **36**, 536–546 (2015).
24. Giancchetti, E., Delfino, D. V. & Fierabracci, A. NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmun. Rev.* **17**, 142–154

- (2018).
25. Dosiou, C. & Giudice, L. C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: Endocrine and immunologic perspectives. *Endocr. Rev.* **26**, 44–62 (2005).
 26. Lanier, L. L. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495–502 (2008).
 27. Lanier, L. L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–274 (2005).
 28. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Publ. Gr.* **12**, 239–252 (2012).
 29. Bessoles, S. *et al.* Adaptations of natural killer cells to self-MHC class I. *Front. Immunol.* **5**, 349 (2014).
 30. Cornel, A. M., Mimpfen, I. L. & Nierkens, S. MHC class I downregulation in cancer: Underlying mechanisms and potential targets for cancer immunotherapy. *Cancers* roč. 12 1–33 (2020).
 31. Ljunggren, H. G. & Kärre, K. In search of the „missing self“: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **11**, 237–244 (1990).
 32. Morvan, M. G. & Lanier, L. L. NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 7–19 (2016).
 33. Smyth, M. J. *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **42**, 501–510 (2005).
 34. Prager, I. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J. Leukoc. Biol.* 1319–1329 (2019).
 35. Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. Life and death by death receptors. *FASEB J.* **23**, 1625–1637 (2009).
 36. Carrillo-Bustamante, P., Keşmir, C. & de Boer, R. J. The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics* **68**, 3–18 (2016).
 37. Trowsdale, J. *et al.* The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol. Rev.* **181**, 20–38 (2001).
 38. Bork, P., Holm, L. & Sander, C. The immunoglobulin fold: Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* **242**, 309–320 (1994).
 39. Skořepa, O. *et al.* Natural killer cell activation receptor NKp30 oligomerization depends on its N-glycosylation. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–24 (2020).
 40. Chiffolleau, E. C-type lectin-like receptors as emerging orchestrators of sterile inflammation represent potential therapeutic targets. *Front. Immunol.* **9**, 15 (2018).
 41. Lam, S. K. & Ng, T. B. Lectins: Production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 45–55 (2011).
 42. Zelensky, A. N. & Gready, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* **272**, 6179–6217 (2005).
 43. Cummings, R. D. & McEver, R. P. C-type Lectins. in *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 784 (2009).
 44. Brown, G. D., Willment, J. A. & Whitehead, L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 374–389 (2018).
 45. Deng, G. *et al.* Generation and preclinical characterization of an NKp80-Fc fusion protein for redirected cytotoxicity of natural killer (NK) cells against leukemia. *J. Biol. Chem.* **290**, 22474–22484 (2015).
 46. 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.* **4**, 362 (2013).
 47. Skalova, T., Blaha, J., Stransky, J., Koval, T., Hasek, J., Yuguang, Z., Harlos, K., Vanek, O., Dohnalek, J. Human receptor NKR-P1 in deglycosylated form, extracellular domain. (2018).
 48. Kirkham, C. L. & Carlyle, J. R. Complexity and diversity of the NKR-P1: Clr (Klrb1: Clec2) recognition systems. *Front. Immunol.* **5**, 249 (2014).
 49. Vogler, I. & Steinle, A. Vis-à-Vis in the NKC: Genetically linked Natural killer cell receptor/ligand pairs in the Natural killer gene complex (NKC). *J. Innate Immun.* **3**,

- 227–235 (2011).
50. Appasamy, P. M., Kenniston, T. W., Brissette-Storkus, C. S. & Chambers, W. H. NKR-P1dim/TCR $\alpha\beta$ + T Cells and Natural Killer Cells Share Expression of NKR-P1A and NKR-P1D. *Nat. Immun.* **15**, 259–268 (1997).
 51. Rozbeský, D. *et al.* Nkrp1 family, from lectins to protein interacting molecules. *Molecules* **20**, 3463–3478 (2015).
 52. Glimcher, L., Shen, F. W. & Cantor, H. Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell*. *J. Exp. Med.* **145**, 1–9 (1977).
 53. Rückrich, T. & Steinle, A. Attenuated natural killer (NK) cell activation through C-type lectin-like receptor NKp80 is due to an anomalous hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif (HemITAM) with impaired syk kinase recruitment capacity. *J. Biol. Chem.* **288**, 17725–17733 (2013).
 54. Vitale, M. *et al.* Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 233–242 (2001).
 55. Hamann, J., Montgomery, K. T., Lau, S., Kucherlapati, R. & Van Lier, R. A. W. AICL: A new activation-induced antigen encoded by the human NK gene complex. *Immunogenetics* **45**, 295–300 (1997).
 56. Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I. & Steinle, A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat. Immunol.* **7**, 1334–1342 (2006).
 57. Klimosch, S. N., Bartel, Y., Wiemann, S. & Steinle, A. Genetically coupled receptor–ligand pair NKp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses. *Blood* **122**, 2380–2389 (2013).
 58. Thomas, M. *et al.* Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1656–1661 (2008).
 59. Isakov, N. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 6–16 (1997).
 60. Dennehy, K. M., Klimosch, S. N. & Steinle, A. Cutting Edge: NKp80 Uses an Atypical Hemi-ITAM To Trigger NK Cytotoxicity. *J. Immunol.* **186**, 657–661 (2011).
 61. Vaněk, O. *et al.* Production of recombinant soluble dimeric C-type lectin-like receptors of rat natural killer cells. *Sci. Rep.* **9**, 1–16 (2019).
 62. Nový, J. Příprava a studium lidského NK buněčného receptoru AICL, Univerzita Karlova (2015).
 63. Neuss, S. *et al.* Cellular Mechanisms Controlling Surfacing of AICL Glycoproteins, Cognate Ligands of the Activating NK Receptor NKp80. *J. Immunol.* **201**, 1275–1286 (2018).
 64. Bláha, J. Příprava a studium lidského lymfocytárního receptoru LLT1, Univerzita Karlova (2012).
 65. Edgar, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
 66. Bateman, A. *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**, 480–489 (2021).
 67. Farkona, S., Diamandis, E. P. & Blasutig, I. M. Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC Med.* **14**, 1–18 (2016).
 68. Thomas, S. & Prendergast, G. C. Cancer vaccines: A brief overview. *Methods Mol. Biol.* **1403**, 755–761 (2016).
 69. Finn, O. J. Cancer vaccines: Between the idea and the reality. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 630–641 (2003).
 70. Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 651–668 (2020).
 71. Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J. & Zloza, A. Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 642–662 (2015).

72. Kruger, S. *et al.* Advances in cancer immunotherapy 2019 - Latest trends. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 1–11 (2019).
73. Sentman, C. L., Barber, M. A., Barber, A. & Zhang, T. NK Cell Receptors as Tools in Cancer Immunotherapy. *Adv. Cancer Res.* **95**, 249–292 (2006).
74. Fang, F., Xiao, W. & Tian, Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin. Immunol.* **31**, 37–54 (2017).
75. Otáhal, P. & Trněný, M. Current approaches in cancer immunotherapy. *Klin. Onkol.* **28**, 3S105–3S111 (2015).
76. Bartlett, N. L. *et al.* A phase 1b study of AFM13 in combination with pembrolizumab in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* **136**, 2401–2409 (2020).
77. Peipp, M. *et al.* HER2-specific immunoligands engaging NKp30 or NKp80 trigger NK-cell-mediated lysis of tumor cells and enhance antibodydependent cell-mediated cytotoxicity. *Oncotarget* **6**, 32075–32088 (2015).
78. Mitri, Z., Constantine, T. & O'Regan, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, 1–7 (2012).
79. Macherey-Nagel. PCR clean-up Gel extraction.
80. Macherey-Nagel. NucleoSpin® Plasmid.
81. Macherey-Nagel. Plasmid DNA Purification - NucleoBond Xtra Midi, NucleoBond Xtra Maxi.
82. Duvaud, S. *et al.* Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Res* (2021).
83. KLRF1 - Killer cell lectin-like receptor subfamily F member 1 - Homo sapiens (Human) - KLRF1 gene & protein. Dostupné z: <<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NZS2>> (cit. 18. 6. 2021).
84. 1 kb DNA Ladder | NEB. *New England Biolabs* Dostupné z: <<https://international.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder#ProductInformation> (2019)> (cit. 18. 6. 2021).
85. Thermo Scientific. Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. *Thermo Sci. Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Guidel* (2017).
86. Kalousková, B. Příprava lidského NK buněčného aktivačního receptoru u NKp80 a jeho ligandu AICL, Univerzita Karlova (2016).