

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Petra Kozojedová**

**Příprava reportérové buněčné linie pro ověření biologické aktivity  
rekombinantních proteinů**

Preparation of reporter cell line for validation of recombinant protein biological activity

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

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

Konzultant: *Mgr. Barbora Kalousková*

Praha 2021

## Prohlášení

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

V Praze, 21. 6. 2021

Podpis:

## Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi Ph.D., za možnost vypracování této bakalářské práce v laboratoři 204, za cenné rady a konzultace. Dále děkuji Mgr. Barboře Kalouskové za velkou pomoc při experimentální práci, za předání mnoha cenných zkušeností a za ochotu kdykoliv pomoci a poradit. Děkuji celému kolektivu laboratoře 204 za vytvoření příjemného a inspirativního pracovního prostředí a za ochotu kdykoliv poradit a pomoci. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

## Abstrakt

NK buňky patří mezi imunitní buňky zprostředkovávající nespecifickou imunitní odpověď organismu. Exprimují na svém povrchu řadu ligand-specifických aktivačních či inhibičních receptorů, mezi které patří přirozeně cytotoxický aktivační receptor NKp30, indukující po interakci s ligandem cytotoxickou odpověď. Receptor NKp30 má jednu ligand vazebnou imunoglobulinu podobnou extracelulární doménu s krátkou „stalk“ doménou, která umožňuje oligomerizaci extracelulární domény receptoru NKp30, což vede k posílení interakce ligand-receptor a ovlivnění signalizace vedoucí k aktivaci buňky.

Tato práce se zabývá přípravou konstruktů inspirovaných technologií chimerních antigenních receptorů nesoucích extracelulární doménu receptoru NKp30 se „stalk“ doménou či pouze ligand vaznou doménu pro ověření biologické aktivity konstruktů po expresi na buněčné membráně. Byly připraveny dva vektory pro expresi konstruktů inspirovaných chimerními antigenními receptory s geny pro extracelulární doménu receptoru NKp30. Pro ověření biologické aktivity různých konstruktů byla plasmidová DNA kódující připravené konstrukty transientně transfekována do buněk Jurkat.

**Klíčová slova:** NK buňky, NKp30, reportérová buněčná linie, rekombinantní protein, chimerní antigenní receptor

## Abstract

Natural killer cells belong to immune cells mediating non-specific immune response. On their surface, natural killer cells express many ligand-specific activation or inhibition receptors, among which belongs natural cytotoxicity activation receptor NKp30, which is able to trigger cytotoxic immune response upon interaction with its ligands. Natural cytotoxicity receptor NKp30 comprises of one immunoglobulin-like ligand-binding extracellular domain with short stalk domain, allowing the extracellular domain of NKp30 receptor to form oligomers, which leads to strengthening of ligand-receptor interaction. Furthermore, signalization leading to cell activation is affected by oligomerization of the extracellular domain of NKp30 receptor.

This thesis focuses on preparation of constructs inspired by chimeric antigen receptor theory that carry extracellular domain of NKp30 receptor with stalk domain or only with ligand-binding domain and on validation of biological activity of prepared constructs after expression on the cell membrane. Two vectors for expression of the constructs inspired by chimeric antigen receptors carrying genes for extracellular domain of NKp30 receptor were prepared and to validate their biological activity, they were transfected into Jurkat cells.

**Key words:** NK cells, NKp30, reporter cell line, recombinant protein, chimeric antigen receptor

(Thesis written in Czech)

# Obsah

Prohlášení .....	2
Poděkování .....	3
Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Seznam zkratk.....	8
1 Teoretický úvod.....	10
1.1 Imunitní systém .....	10
1.2 Buňky imunitního systému.....	11
1.2.1 Lymfoidní buněčná linie .....	11
1.2.2 Myeloidní buněčná linie.....	13
1.3 Mezibuněčné interakce a regulace imunitní odpovědi.....	14
1.4 Receptory buněk imunitního systému a jejich ligandy .....	16
1.4.1 Receptory aktivující a inhibující imunitní odpověď .....	16
1.4.2 Antigen-specifické versus ligand-specifické receptory.....	17
1.4.3 T-buněčný receptor.....	19
1.4.4 Aktivační receptor NK buněk NKp30.....	20
1.5 Buněčná signalizace na úrovni imunitních buněk.....	21
1.5.1 Signalizační dráha aktivačního receptoru NK buněk NKp30 .....	22
1.5.2 Signalizační dráha antigenně specifického receptoru T lymfocytů.....	23
1.6 Chimerní antigenní receptor .....	23
1.6.1 Využití CAR v terapii .....	24
1.7 Využití reportérových genů pro studium biologické aktivity a funkce proteinů	25
2 Cíle .....	27
3 Materiál .....	28
3.1 Přístroje a pomůcky.....	28
3.2 Enzymy a příslušné pufry.....	29
3.3 Chemikálie a komerční soupravy .....	29
3.3.1 Chemikálie .....	29
3.3.2 Komerční soupravy .....	30
3.4 Pufry .....	30
3.5 Kultivační média .....	30
3.6 Bakteriální kmeny a buněčné linie .....	31
3.7 Primery pro PCR .....	31
3.8 Plasmidy .....	31
4 Metody .....	32
4.1 Příprava CAR konstruktů .....	32
4.1.1 Amplifikace DNA insertů .....	32

4.1.2	Elektroforéza v agarosovém gelu a extrakce DNA z gelu.....	33
4.1.3	Linearizace plasmidu pomocí celoplasmidové PCR .....	34
4.1.4	Linearizace plasmidu pomocí restrikčních endonukleas .....	34
4.1.5	Vložení insertu do linearizovaného vektoru .....	35
4.1.6	Transformace bakterií plasmidovou DNA.....	35
4.1.7	PCR z bakteriálních kolonií .....	36
4.1.8	Nízkoobjemová produkce plasmidové DNA a sekvenace.....	37
4.1.9	Vysokoobjemová produkce plasmidové DNA .....	38
4.2	Práce s buněčnou linií Jurkat .....	39
4.2.1	Rozmrazování .....	39
4.2.2	Kultivace .....	39
4.2.3	Zmrazování .....	40
4.3	Optimalizace transfekce buněčné linie Jurkat.....	40
4.3.1	Příprava vzorků pro měření na průtokovém cytometru .....	41
5	Výsledky .....	42
5.1	Příprava CAR konstruktů.....	42
5.1.1	Příprava DNA insertů .....	44
5.1.2	Příprava universálního vektoru .....	44
5.1.3	Příprava CAR konstruktů s receptorem NKp30 .....	45
5.2	Transfekce buněčné linie Jurkat a průtoková cytometrie .....	48
6	Diskuse.....	50
7	Závěr .....	55
8	Použitá literatura .....	56

## Seznam zkratek

APC	Antigen-prezentující buňky (z angl. antigen presenting cells)
BCR	B buněčný receptor (z angl. B cell receptor)
CAR	Chimerní antigenní receptor (z angl. chimeric antigen receptor)
CAR-NK	Přirozeně zabíječské buňky s chimerním antigenním receptorem (z angl. chimeric antigen receptor natural killer cells)
CAR-T	T lymfocyty s chimerním antigenním receptorem (z angl. chimeric antigen receptor T cells)
CD	Diferenciační skupina (z angl. cluster of differentiation)
CILP	Společný progenitor přirozených lymfoidních buněk (z angl. common innate lymphoid cell progenitor)
CLP	Společný progenitor lymfoidních buněk (z angl. common lymphoid cell progenitor)
CTLRs	Receptory podobné lektinům typu C (z angl. C-type lectin-like receptors)
DCs	Dendritické buňky (z angl. dendritic cells)
dH <sub>2</sub> O	Deionizovaná voda
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)
GFP	Zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
GMP	Granulocytární/monocytární progenitorové buňky (z angl. granulocyte/monocyte progenitor cells)
HLA	Lidský leukocytární antigen (z angl. human leukocyte antigen)
HSC	Hematopoetické kmenové buňky (z angl. hematopoietic stem cells)
IFN	Interferon
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgE	Imunoglobulin E
IgH	Těžký řetězec imunoglobulinu (z angl. immunoglobulin heavy chain)
IgL	Lehký řetězec imunoglobulinu (z angl. immunoglobulin light chain)
ILC	Vrozené lymfoidní buňky (z angl. innate lymphoid cells)



ITAM	Aktivační motiv na bázi tyrosinu (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
KIRs	Zabíječské imunoglobulinům-podobné receptory (z angl. killer immunoglobulin-like receptors)
LTi	Buňky indukující tvorbu lymfoidních tkání (z angl. lymphoid tissue inducer)
MDP	Monocytní/dendritické progenitorové buňky (z angl. monocyte/dendritic cell progenitors)
MCP	membránový proximální spojující peptid (z angl. membrane-proximal connecting peptide)
MHC I	Molekula hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (z angl. main histocompatibility complex class I)
MHC II	Molekula hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (z angl. main histocompatibility complex class II)
NCR	Receptor NK buněk (z angl. natural killer cell receptor)
NF $\kappa$ B	Nukleární transkripční faktor $\kappa$ B
NFAT	Nukleární transkripční faktor aktivovaných T lymfocytů
NKp30	Receptor NK buněk o molekulové hmotnosti 30 kDa (z angl. natural killer cell protein 30 kDa)
NKp44	Receptor NK buněk o molekulové hmotnosti 44 kDa (z angl. natural killer cell protein 44 kDa)
NKp46	Receptor NK buněk o molekulové hmotnosti 46 kDa (z angl. natural killer cell protein 46 kDa)
PAMPs	Molekulární motivy asociované s patogenem (z angl. pathogen associated molecular patterns)
PCR	Polymerázová řetězcová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PRRs	Receptory rozpoznávající vzory (z angl. pattern recognition receptors)
TCR	T buněčný receptor (z angl. T cell receptor)
TNF	Faktor nádorové nekrózy (z angl. tumor necrosis factor)

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Imunitní systém

Imunitní systém sestává z lymfatických tkání, imunitních buněk a molekul tvořících vzájemně se ovlivňující systém, jehož hlavní funkci tvoří schopnost rozlišit mezi složkami těla vlastními a cizorodými, vyvolávat imunitní odpověď na cizorodé patogeny a chránit tak organismus před nemocemi. Neméně důležitou funkcí imunitního systému je tolerance k vlastním tkáním a látkám daného organismu, tedy neschopnost vyvolávat vůči nim destruktivní imunitní odpověď. Na základě odlišné rychlosti a specifity imunitní odpovědi lze imunitu dělit na vrozenou a získanou, jež mezi sebou interagují [1, 2]. Vrozená, nespecifická imunita je evolučně starší a skládá se ze všech imunitních mechanismů, které nejsou schopné imunitní paměti, imunitní odpověď složek vrozené imunity se tedy nemění v závislosti na setkání s patogenem [3]. Primární mechanismus nespecifické imunity tvoří vnější tělesné bariéry: kůže a sliznice [3]. Mechanismy nespecifické imunity jsou založeny na molekulách (komplementový systém, interferony - IFN, lektiny a další), fagocytujících buňkách (neutrofilní a eozinofilní granulocyty, makrofágy a dendritické buňky), NK buňkách (přirozeně zabíječské buňky z angl. natural killer cells) a dalších buňkách, které jsou v organismu předem připravené a reagují na mnoho různých patogenů. Reakce mechanismů nespecifické imunity na mnoho různých patogenů je umožněna díky strukturním či funkčním rysům společným pro tyto patogeny [5].

Získaná, adaptivní imunita za využití specializovaných buněk, T a B lymfocytů, specificky rozpoznává patogen a vytváří imunologickou paměť proti dané infekci. Specifická imunitní odpověď je spuštěna pokud není infekce zničena mechanismy nespecifické imunity [6]. Antigeny, struktury specifické pro daný patogen jsou rozpoznávané buňkami specifické imunity a mají komplementární strukturu k receptorům na povrchu těchto buněk. Buňky specifické imunity mají schopnost produkovat protilátky, které jsou klíčové pro propojení specifické a nespecifické imunitní odpovědi. Struktura protilátek umožňuje protilátkám specificky se vázat na antigen pomocí variabilní domény, a pomocí stabilní domény se vázat na komponenty nespecifické imunity a aktivovat tak její funkce. Buňky specifické imunity mají také schopnost přímo zabít infikované buňky organismu, tj. buněčnou cytotoxicitu [7].

## 1.2 Buňky imunitního systému

Imunitní buňky tvoří nedílnou součást imunitního systému, přičemž specifická a nespecifická imunitní odpověď je zprostředkována určitými druhy buněk, které mezi sebou komunikují a vzájemně spolupracují. Imunitní systém je z podstatné části tvořen různými druhy leukocytů pocházejících z hematopoetických kmenových buněk (HSC, z angl. hematopoietic stem cells) kostní dřeně, které diferencují právě na různé typy leukocytů. Tyto buňky lze rozdělit do dvou základních linií, lymfoidní a myeloidní. Mezi buňky imunitního systému patří ale i buňky nepříbuzné dříve zmíněným buňkám pocházejícím z HSC, například folikulární dendritické buňky [5, 8].

### 1.2.1 Lymfoidní buněčná linie

Mezi buňky lymfoidní buněčné linie patří jak buňky podílející se na specifické imunitě, tak buňky podílející se na adaptivní imunitě. Prekurzorem všech lymfoidních buněk je společný progenitor lymfoidních buněk (CLP, z angl. common lymphoid cell progenitor), ze kterého diferencují prekursory jednotlivých buněčných typů [9].

#### 1.2.1.1 Vrozené lymfoidní buňky a NK buňky

Vrozené lymfoidní buňky (ILC, z angl. innate lymphoid cells) tvoří skupinu lymfocytů účastnících se nespecifické imunitní odpovědi. Diferencují z CLP na několik skupin, přičemž nomenklatura z roku 2013 dělila ILC do tří skupin [10]. Do první spadaly cytotoxické NK buňky a ILC1 buňky, do druhé pouze ILC2 buňky, do třetí skupiny spadaly buňky indukující tvorbu lymfoidních tkání (LTi, z angl. lymphoid tissue inducer) a také populace buněk odlišných od LTi, mezi které patřily buňky nesoucí receptor NK buněk (NCR, z angl. natural killer cell receptor) o molekulové hmotnosti 46 kDa (NKp46, z angl. natural killer cell protein 46 kDa), tzv. NCR<sup>+</sup>ILC3 buňky, ale také ILC3 buňky, které nenesou NKp46, tzv. NCR<sup>-</sup>ILC3. Další výzkum ale ukázal, že vývoj ILC z CLP probíhá přes společný progenitor přirozených lymfoidních buněk (CILP, z angl. common innate lymphoid cell progenitor) [11]. Pod vlivem určitých faktorů je CILP schopen diferenciovat na NK buňky, které stojí jako samostatná skupina ILC. Pod vlivem odlišných faktorů může CILP diferenciovat také na společný progenitor pomocných přirozených lymfoidních buněk, který může diferenciovat na LTi, jež lze také považovat za samostatnou skupinu ILC. Dál může společný progenitor pomocných přirozených

lymfoidních buněk diferenciovat na ILC1, ILC2 a ILC3, další tři samostatné skupiny, což znamená že ILC dnes dělíme na pět samostatných skupin [12].

Pokud nebereme v úvahu slabou cytotoxicitu ILC1, jsou NK buňky jediné cytotoxické ILC. Přírodně zabíječské buňky hrají významnou roli v protinádorové imunitě a celkově jako složka nespecifické imunitní odpovědi. Aktivace NK buněk je přísně regulována signály přicházejícími do buňky skrz receptory exprimované na jejich povrchu, které lze dělit na aktivační, rozpoznávající například ligandy na nádorových buňkách, což vede ke spuštění cytotoxické odpovědi, a inhibiční. Mezi aktivační receptory patří například receptor NK buněk o molekulové hmotnosti 30 kDa (NKp30, z angl. natural killer cell protein 30 kDa) a další. Inhibiční receptory NK buněk rozpoznávají především molekuly hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (MHC I, z angl. main histocompatibility complex class I) na zdravých buňkách, nebo na nádorových buňkách, které exprimují MHC I a vyhýbají se tak cytotoxické odpovědi, přičemž absence MHC I na povrchu buněk je jeden z faktorů vedoucí k aktivaci cytotoxické odpovědi NK buněk [13,14]. NK buňky a ILC1 sdílí i přes odlišný vývoj některé společné charakteristiky, jako například produkci interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [12].

Necytotoxické ILC1, ILC2 a ILC3 připomínají pomocné T lymfocyty jak funkčně, tak transkripční aktivitou, ačkoli ILC nemají T buněčný receptor [15]. Do tří skupin jsou tyto ILC rozděleny na základě odlišných transkripčních faktorů potřebných pro vývoj, expresi efektorových cytokinů a odlišných efektorových funkcí [14]. Poslední skupinou ILC jsou LT<sub>i</sub>, které jsou aktivní hlavně v prenatálním stádiu vývoje [9].

### 1.2.1.2 T a B lymfocyty

T lymfocyty, efektorové buňky imunitní odpovědi, vznikají z CLP, které opouští kostní dřeň a putují do brzlíku, kde maturují [15]. V brzlíku dojde na thymocytech diferencujících z progenitorových buněk k expresi receptorů diferenciačních skupin (CD, z angl. cluster of differentiation) CD4 a CD8, z nichž po selekci zůstane na jedné buňce jen jeden z nich a také k expresi T buněčného receptoru (TCR, z angl. T cell receptor) s potenciálem rozpoznávat různé antigeny. Buňka mající tyto vlastnosti je považovaná za maturovaný, avšak naivní CD4 pozitivní pomocný (stále schopný indukovat cytotoxický „program“ [18]), či CD8 pozitivní cytotoxický T lymfocyt a opouští brzlík [19]. K aktivaci naivních T lymfocytů dochází po rozpoznání antigenu prezentovaného pomocí

antigen-presentující buňky (APC, z angl. antigen presenting cell), načež dochází k rychlému růstu, proliferaci a vzniku efektorových a paměťových T lymfocytů [20].

B lymfocyty jsou důležité pro humorální imunitu organismu, neboť mají schopnost produkce protilátek. Jejich vývoj probíhá z HSC v kostní dřeni přes několik stádií, která jsou charakteristická expresí specifických povrchových znaků, přeskupením segmentů genů pro složky imunoglobulinových řetězců a následnou expresí prekursoru pro B buněčný receptor. Později vznikají naivní B lymfocyty, jež na svém povrchu nesou B buněčný receptor (BCR, z angl. B cell receptor) a mohou migrovat do sleziny, kde maturují [19]. Po setkání s antigenem se mohou přeměnit na plazmatické buňky produkující specifické protilátky, nebo na paměťové B lymfocyty. Dlouho žijící plazmatické buňky sekretují protilátky po dlouhou dobu a stávají se tak součástí paměťové B buněčné imunitní odpovědi. Mohou putovat zpět do kostní dřene a v ní přežívat po mnoho let [20].

### 1.2.2 Myeloidní buněčná linie

Buňky myeloidní buněčné linie diferencují z HSC sídlících v kostní dřeni. Obdobně jako u lymfocytů zde nacházíme společný myeloidní progenitor. Diferenciace ze společných myeloidních progenitorových buněk probíhá na dvě subpopulace progenitorových buněk, granulocytní/monocytární progenitorové buňky (GMP, z angl. granulocyte/monocyte progenitor cells), nebo monocytární/dendritické progenitorové buňky (MDP, z angl. monocyte/dendritic cell progenitors), ze kterých vznikají efektorové buňky [23].

Monocyty, vznikající z GMP, se nachází v krevním řečišti a mají schopnost fagocytózy, tedy schopnost pohlcovat různé látky, buňky a mikroorganismy. Při uchycení ve tkáních maturují na makrofágy, které mají větší schopnost fagocytózy, hlavně po aktivaci molekulami uvolňovanými při imunitní odpovědi. Makrofágy a monocyty mají funkci i jako APC. Nejefektivnější skupinou APC jsou však dendritické buňky (DCs, z angl. dendritic cells) vznikající z druhé skupiny progenitorových buněk, MDP. Z MDP diferencují na tři subtypy s odlišnou specializací. Po aktivaci antigenem putují do lymfoidních tkání, kde stimulují naivní T lymfocyty samotnou prezentací antigenu ale i sekrecí cytokinů indukující proliferaci T lymfocytů. Speciálním druhem DCs jsou folikulární dendritické buňky, které nefagocytují, ale zdají se být vhodné pro jako APC pro B lymfocyty [23].

Granulocyty (nazývané též polynukleární myeloidní buňky), vznikající z GMP, jsou specifickým druhem bílých krvinek se segmentovaným jádrem a grany v cytoplasmě, díky nimž jsou jednotlivé subpopulace granulocytů rozlišitelné. Dělí se na tři skupiny, neutrofilů, eosinofilů a basofilů [24]. Neutrofilů tvoří nejpočetnější skupinu granulocytů v krvi a jejich hlavní funkcí v imunitní odpovědi je fagocytóza. Migrují krevním řečištěm a jejich aktivace začíná při interakci s povrchovými receptory epiteliálních buněk adhezí neutrofilu, který může a nemusí projít mezi, nebo skrz buňky epitelu k místu infekce, což záleží na signalizaci mezi neutrofilem a intracelulární adhezí molekulou 1. Eosinofily mají různé funkce díky cytosolárním granulím, které obsahují cytokiny, růstové faktory a další proteiny, a mohou být vypouštěny z buněk skrz plazmatickou membránu. Eosinofily hrají důležitou roli v imunitní regulaci, mohou sloužit jako APC a podporovat proliferaci T lymfocytů. Basofily jsou nejméně frekventované a nejméně prozkoumané leukocyty. Jsou to jediné granulocyty účastníci se specifické i nespecifické imunity. Stejně jako žírné buňky mají receptory pro imunoglobulin E (IgE), při jehož interakci s antigenem dojde k vypuštění granulí. Jsou schopné produkovat cytokiny pomocných T lymfocytů typu 2 a regulovat tak jejich imunitní odpověď [25].

Poslední skupinou imunitních buněk jsou žírné buňky. Žírné buňky, patřící také mezi polynukleární buňky, diferencují z HSC v kostní dřeni, ale nejsou považovány za pravé leukocyty [25]. V cytoplasmě mají mnoho sekrečních granulí obsahujících histamin, cytokiny (hlavně faktor nádorové nekrózy - TNF, z angl. tumor necrosis factor), proteoglykany, lysosomální enzymy a další. Stimulované žírné buňky také mohou vypouštět produkty oxidace arachidonové kyseliny. Ve tkáních hrají důležitou roli při alergických reakcích. Také se účastní obrany proti parazitům [26].

### 1.3 Mezibuněčné interakce a regulace imunitní odpovědi

Imunitní buňky s cílem zajistit co nejlepší ochranu organismu před patogeny musí navzájem interagovat, ať už jde o zajištění nespecifické, či specifické imunity. Interakce imunitních buněk zahrnující interakce mezi sítí imunitních buněk, imunitní odpověď na úrovni jedné buňky, spouštění buněčné signalizace jako výsledek interakce receptoru a ligandu a mechanismy regulující genovou expresi poskytují organismu schopnost komplexní imunitní odpovědi [27].

Mezi interakce na úrovni buněčného kontaktu patří například prezentace antigenu skrz imunitní buňky. Prezentace antigenů pocházejících z intracelulárních patogenů je schopna většina buněčných typů, ale prezentace extracelulárních patogenů jsou schopné pouze několik typů APC. Třetí cestou prezentace antigenu je tzv. „cross-prezentace“ intracelulárního antigenu, která je unikátní pouze pro několik typů APC. Proces klasické prezentace antigenu z intracelulárního patogenu začíná produkcí antigenových peptidů z patogenu v proteasomu, následuje translokace do endoplasmatického retikula, kde jsou tyto peptidy štěpeny aminopeptidasou, jsou napojeny na nově syntetizované MHC I, a tento komplex putuje na buněčný povrch k prezentaci cytotoxickým T lymfocytům [28]. Prezentace extracelulárních patogenů přímou cestou jsou schopné buňky exprimující molekulu hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy (MHC II, z angl. main histocompatibility complex class II) mezi které patří DCs, makrofágy, B lymfocyty a při zánětlivých podmínkách i některé epiteliální a endoteliální buňky. Tyto buňky jsou schopné internalizace extracelulárních patogenů, které jsou v lysozomu rozloženy a putují do kompartmentu obsahujícího MHC II, který do tohoto kompartmentu putuje po tom, co je syntetizován. Po navázání antigenů ze štěpeného patogenu na MHC II putují vzniklé komplexy na buněčný povrch, kde dochází k prezentaci antigenů pomocným T lymfocytům [28,29]. Třetího způsobu prezentace antigenu, „cross-prezentace“ jsou schopné například DCs, přičemž schopnost „cross-prezentace“ se liší napříč poddruhy DCs. Extracelulární patogen přijatý fagocytózou může putovat do proteasomu, kde je štěpen, vzniklé antigeny potom do endoplasmatického retikula, kde jsou napojeny na MHC I jako v prvním případě. Může ale docházet i k alternativnímu způsobu, kdy je fagocytovaný patogen degradovaný v potravní vakuole ve které byl přijat a kde dojde i k napojení na MHC I, vzniklý komplex následně opouští potravní vakuolu a putuje k buněčnému povrchu [30].

K interakcím mezi imunitními buňkami zprostředkovaným chemickou cestou patří například komunikace ILC a myeloidních buněk založená na cytokinech. Monocyty, makrofágy a DCs jsou schopny rozpoznávat patogeny, antigeny a signály nebezpečí, a při takovéto stimulaci sekretují cytokiny za účelem aktivace rezidentních ILC ve tkáni. Polynukleární myeloidní buňky, konkrétně basofily, neutrofilů, eosinofilů a žírné buňky, rozpoznávají poškozenou tkáň, parazitické infekce či komplexy antigenu a IgE protilátek. Při setkání s antigenem vypouští sekreční granule s mediátory zánětu (deriváty kyseliny arachidonové) a další chemikálie následované cytokiny, aby upozornily ostatní myeloidní buňky [31]. Mezi tyto interakce patří i komunikace mezi NK buňkami a DCs

zprostředkovaná pomocí cytokinů, jako například interleukinu 12 sekretovaného DCs stimulujícími NK buňky k sekreci IFN- $\gamma$  jako agens účinné protivirové obrany. Po aktivaci skrz své aktivační receptory NK buňky sekretují velké množství TNF a IFN- $\gamma$ , které mohou ovlivňovat maturaci DCs, přičemž TNF v rozpustné formě podporuje expresi ko-stimulačních molekul na DCs a spolu s IFN- $\gamma$  podporuje produkci interleukinu 12. Po stimulaci interleukinem 12 a interleukinem 18 mohou NK buňky společně s DCs indukovat diferenciaci pomocných T lymfocytů [32].

## 1.4 Receptory buněk imunitního systému a jejich ligandy

Receptory imunitních buněk interagují s patogeny, respektive s antigeny různými nespecifickými či specifickými interakcemi za účelem spuštění imunitní odpovědi. Skrz receptory imunitních buněk může zároveň probíhat kontrola, protože například molekuly MHC I jsou exprimované na povrchu téměř všech buněk v organismu, tudíž jejich absenci na buněčném povrchu lze považovat za patologický jev. Receptory některých imunitních buněk dokážou rozpoznat například stresové proteiny sekretované buňkami jako signál abnormálních procesů [7].

### 1.4.1 Receptory aktivující a inhibující imunitní odpověď

Buňky nespecifické imunity, jako DCs, makrofágy a neutrofilie jsou aktivovány skrz receptory rozpoznávající vzory (PRRs, z angl. pattern recognition receptors), které rozpoznávají molekulární motivy asociované s patogenem (PAMPs, z angl. pathogen-associated molecular patterns), jež jsou esenciální pro životní cyklus patogenu, ale na buňkách organismu se nevyskytují, nebo jsou kompartmentalizované uvnitř buňky. Interakce PAMPs s PRRs vyúsťuje v indukci zánětlivé imunitní odpovědi. Za PRRs se dnes považují rozličné druhy receptorů, například receptory odvozené od Toll receptoru, receptory podobné RIG receptorům, receptory podobné receptorům s nukleotid-vaznou oligomerizující doménou a také cytosolární receptory pro DNA [33]. Skupinou buněk, které nesou řadu aktivačních a inhibičních receptorů jsou NK buňky. Jejich hlavními aktivačními NCR jsou receptory přirozené cytotoxicity a receptory podobné lektinům typu C (CTLRs, z angl. C-type lectin-like receptors) patřící do rodiny NKG2, např. NKG2D. Ligandy těchto aktivačních receptorů jsou elementy nadměrně exprimované nebo syntetizované *de novo* jako následek buněčného stresu, infekce nebo transformací spojených s nádorovým bujením. Neméně důležité jsou inhibiční NK buněčné receptory



zabraňující autoreaktivitě NK buněk a možnému poškození zdravých buněk, ke kterým by při jejich absenci mohlo docházet. Mezi inhibiční NCR se řadí také některé zabíječské imunoglobulinům podobné receptory (KIRs, z angl. killer immunoglobulin-like receptors) a NK buněčné CTLRs patřící do rodiny NKG2, např. NKG2A [34].

#### 1.4.2 Antigen-specifické versus ligand-specifické receptory

B a T lymfocyty rozpoznávají specifické antigeny pomocí receptorů na svém povrchu. Základní rozdíl ve schopnosti rozpoznávat antigeny skrz BCR a TCR se liší v tom, že BCR je díky imunoglobulinové extracelulární doméně schopen rozpoznávat volné antigeny, ale T lymfocyty pomocí TCR rozpoznávají pouze antigeny prezentované na MHC molekulách na povrchu APC [7]. B lymfocyty exprimují repertoár různých BCR nesoucích ligand vazebnou imunoglobulinovou doménu s lehkými (IgL, z angl. immunoglobulin light chain) a těžkými (IgH, z angl. immunoglobulin heavy chain) řetězci kódovaných geny pro BCR skládajícím se z části variabilní, diverzní a propojující. Rekombinace variabilní, diverzní a propojující částí genu zajišťuje diverzitu imunoglobulinu na BCR. Při interakci s antigenem a aktivaci B lymfocytu dojde ke dvěma procesům. Prvním je proces „somatické hypermutace“, kdy dojde k bodovým mutacím na IgL a IgH a expresi BCR s těmito mutovanými IgL a IgH, což umožní selekci B lymfocytů produkujících protilátku s vysokou afinitou k antigenu. Druhým procesem je výměnná rekombinace jednoho typu IgH konstantní domény za jiný, což umožní expresi různých druhů imunoglobulinů [35]. Maturovaný BCR nese membránový imunoglobulin M nebo imunoglobulin D napojený na krátkou spojku následovanou intracelulární doménou propojenou s heterodimerem  $Ig\alpha/Ig\beta$  obsahujícím aktivační motiv na bázi tyrosinu (ITAM, z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif). V klidovém stavu se BCR vyskytuje jako monomer, při navázání antigenu však dochází ke změně konformace a oligomerizaci [36].

Naivní T lymfocyt nese heterodimery TCR kódované stejně jako v případě BCR genem s variabilní, diverzní a propojující částí. Pro expresi TCR s různou specifitou je klíčové alternativní poskládání hypervariabilních regionů variabilních, diverzních a propojujících segmentů genu, nedokonalosti při tomto ději a vkládání aditivních nukleotidů, což zajišťuje odlišnou antigenní specifitu TCR. Na rozdíl od B lymfocytů zde nemůže po interakci s antigenem docházet k mutacím genů pro TCR. Při efektivní

interakci TCR naivního T lymfocytu s antigenem prezentovaným APC dochází k maturaci T lymfocytu, klonální expanzi a migraci do cílové tkáně [37,38].

NK buňky také nesou na svém povrchu řadu receptorů. Exprese NCR probíhá přepisem z genetické informace pro aktivační a inhibiční receptory zakódované v genomu buňky a nedochází k alternativnímu skládání genetické informace, jako tomu je u T a B lymfocytů [39].

Mezi aktivační NCR patří receptory přirozené cytotoxicity, transmembránové proteiny I. třídy mající řadu extracelulárních a intracelulárních ligandů. Prvním identifikovaným receptorem přirozené cytotoxicity je NKp46, mezi jehož extracelulární ligandy patří například hemaglutinin, nebo ligandy nacházející se na melanocytech [34,40]. Druhým receptorem přirozené cytotoxicity je receptor NK buněk o molekulové hmotnosti 44 kDa (NKp44, natural killer cell protein 44 kDa), protein mající jednu extracelulární imunoglobulinovou doménu napojenou přes „stalk“ doménu na transmembránovou doménu následovanou krátkou cytoplasmatickou doménou s aminokyselinovou sekvencí reprezentující inhibiční motiv na bázi tyrosinkinasy, který je funkční pouze při interakci NKp44 s určitými ligandy. Intracelulární doména NKp44 interaguje též s ITAM-obsahujícím adaptorovým proteinem přenášejícím aktivační signály. Mezi ligandy NKp44 patří hemaglutinin, komponenty *M. tuberculosis*, ale také celulární antigeny jako například nukleární antigen proliferujících buněk. Poslední z přirozeně cytotoxických receptorů je NKp30 [41].

Další skupinou NCR jsou aktivační a inhibiční CTLRs. Sem patří aktivační receptor NKp80 exprimovaný téměř všemi NK buňkami a některými skupinami cytotoxických T lymfocytů. Ligandem NKp80 je aktivací indukovaný lektin typu C. Cytotoxická odpověď je u NKp80 spouštěna skrz neobvyklý sekvenční motiv hemITAM, který vůbec, nebo jen velmi slabě, asociuje se Syk tyrosinkinase, která je u dalších aktivačních CTLRs NK buněk mediátorem signalizace. Další z aktivačních CTLRs, NKG2D, váže stresem indukované molekuly podobné MHC I a zapříčiňuje lýzi buněk exprimujících tyto aktivační ligandy [42]. Mezi inhibiční CTLRs patří NKG2A, jehož ligandy jsou lidské leukocytární antigeny třídy E (HLA, human leukocyte antigen), jejichž navázáním na NKG2A dochází k přenosu inhibičních signálů. Blokace NKG2A může zvýšit efektivitu imunoterapie, protože HLA-E je nadměrně exprimován na některých nádorových buňkách [43].

Další rodina NCR, KIRs, která pochází z imunoglobulinové superrodiny, také obsahuje inhibiční i aktivační receptory nesoucí na extracelulární doméně dvě nebo tři

imunoglobulinu-podobné domény. Mezi inhibiční KIRs se řadí například KIR2DL1 vázající HLA-C C2, KIR2DL2 a KIR2DL3 vázající též některé z HLA-C molekul, ale i další receptory vázající molekuly z řad HLA, nebo receptory mající dosud neznámé ligandy. Intracelulární doména KIRs nese inhibiční motivy na bázi tyrosinu zprostředkovávající přenos inhibičních signálů. Aktivační KIRs tyto motivy neobsahují, signalizace je zprostředkována přes signalizační adaptorový protein KARAP/DAP12, který obsahuje ITAM. Zástupci aktivačních KIRs jsou například KIR2DS1 vážící stejně jako KIR2DL1 HLA-C C2 (s nižší afinitou), KIR2DS2 rozpoznávající HLA-C C1, HLA - A\* 11:01 a také povrchový protein některých karcinogenních linií [44].

### 1.4.3 T-buněčný receptor

Povrchový receptor T lymfocytů, TCR je zásadní pro imunitní odpověď T lymfocytů na patogeny a nádorové antigeny. Na buněčné membráně se TCR vyskytuje v komplexu s CD3 transmembránovými doménami jako heterooktamer. Extracelulární doména je tvořena antigen rozpoznávajícím  $\alpha\beta$  TCR (popř.  $\gamma\delta$  u tzv.  $\gamma\delta$  T lymfocytů), heterodimerními podjednotkami nekovalentně asociujícími s CD3 dimery CD3 $\epsilon$ -CD3 $\gamma$ , CD3 $\epsilon$ -CD3 $\delta$  a homodimerem CD3 $\zeta$ -CD3 $\zeta$ , které zodpovídají za transdukcii aktivačních signálů T lymfocytu.  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky extracelulární části TCR nesou každá variabilní a konstantní imunoglobulinovou doménu, membránový proximální spojující peptid (MCP, z angl. membrane-proximal connecting peptide), jednu transmembránovou doménu a krátkou cytoplasmatickou část. Podobné uspořádání zaujímají i podjednotky CD3 $\epsilon$ -CD3 $\gamma$  a CD3 $\epsilon$ -CD3 $\delta$ , každá nesoucí jednu imunoglobulinovou doménu, MCP, jednu transmembránovou doménu a cytoplasmatický ITAM. Naopak CD3 $\zeta$  má pouze krátkou extracelulární část připojenou k MCP a transmembránové doméně a cytoplasmatickým regionům [45]. Interakce s antigenem navázaným na MHC molekule probíhá skrz klíčky komplementarity určujících regionů  $\alpha$  a  $\beta$  domén. Protože  $\alpha\beta$ TCR nemá žádné signalizační podjednotky, je přenos signálu po interakci  $\alpha\beta$ TCR s antigenem asociovaným s MHC molekulou závislý na CD3  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\zeta$  doménách obsahujících ITAM. Struktura TCR je na obrázku 1 na straně 20.



**Obrázek 1: Receptor T lymfocytů v komplexu s CD3 doménami.** Struktura TCR v komplexu s CD3 doménami získaná pomocí elektronové mikroskopie. Tyrkysově CD3 $\zeta$  doména, fuchsiově CD3 $\delta$ , růžově CD3 $\epsilon$ , šedě CD3 $\gamma$ , fialově  $\alpha$  podjednotka TCR a oranžově  $\beta$  podjednotka TCR. Vytvořeno v programu PyMol [47]. PDB kód 6JXR [46].

#### 1.4.4 Aktivační receptor NK buněk NKp30

Aktivační receptor NK buněk NKp30, který se podílí na zprostředkování cytotoxické imunitní odpovědi NK buněk, patří mezi imunoglobulinu podobné receptory. Receptor se skládá z extracelulární domény tvořené jednou imunoglobulinu podobnou ligand vazebnou doménou následovanou krátkou „stalk“ doménou nasedající na transmembránovou doménu propojenou s intracelulárním CD3 $\zeta$ -CD3 $\zeta$  homodimerem. Struktura extracelulární domény NKp30 ve stavu bez navázaného ligandu je na obrázku 2 na straně 21 [48]. Ligand vazebná doména NKp30 se může vyskytovat jako monomer či oligomer, což dle *in vitro* studií záleží na přítomnosti „stalk“ domény a N-glykosylaci. Pokud není NKp30 exprimován se „stalk“ doménou vyskytuje se pouze jako monomer, v přítomnosti „stalk“ domény se vyskytuje jako oligomer, ale pouze pokud je N - glykosylován. Oligomerizace ligand vazebné domény má pozitivní vliv na interakci s ligandem [49]. Mezi ligandy NKp30 patří mnoho molekul, které ne vždy sdílí stejné strukturní motivy, například molekuly exprimované nádorovými buňkami, virové a parazitické proteiny. Příkladem dvou strukturně odlišných ligandů NKp30 jsou proteiny B7-H6 a BAT3. Přestože se NKp30 řadí mezi aktivační NK buněčné receptory, některé jeho ligandy způsobují opačný efekt. Mezi tyto ligandy patří hemaglutinin, který se při

vazbě na NKp30 chová jako antagonist, a protein lidského cytomegaloviru pp65, který se na rozdíl od hemaglutininu váže na NKp30 tak, že neblokuje interakci NKp30 s jeho aktivačními ligandy, ale stále dochází k potlačení buněčné aktivity a cytotoxické odpovědi NK buněk [50]. Dalším inhibičním ligandem je galektin-3, člen rodiny lektinů vázající  $\beta$ -galaktosidy často exprimovaný nádorovými buňkami. Navázání galektinu-3 na NKp30 má důležitou roli v úniku nádoru imunitnímu dohledu, protože se specificky váže na NKp30 a inhibuje cytotoxickou odpověď [51].



**Obrázek 2: Extracelulární doména NKp30.** Struktura extracelulární domény NKp30 bez navázaného ligandu získaná rentgenostrukturní analýzou. Vytvořeno v programu PyMol [47]. PDB kód 3NOI [48].

## 1.5 Buněčná signalizace na úrovni imunitních buněk

Buňky vrozené imunity interagují s patogeny přes PRRs, které váží PAMPs. Mezi PRRs patří mimo PRRs zmíněné v kapitole 1.4.1 na straně 16 také CLRy, synthasa cyklického adenosin a guanosin monofosfátu a stimulator interferonových genů. Rozpoznávání patogenů a spouštění nespecifické imunitní odpovědi se odehrává na úrovni interakce PRRs s patogenem na povrchu buňky, i na úrovni rozpoznávání patogenů uvnitř buňky. V obou případech dochází při aktivaci PRRs ke spuštění intracelulární signalizační kaskády vedoucí k regulaci exprese genů pro zánětlivé cytokiny, IFN typu I a antivirální proteiny [53]. Aktivované PRRs využívají spolu s receptory vázícími cytokiny signalizační dráhu využívající komplex IKK kinasy, která umožňuje translokaci nukleárního transkripčního faktoru  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) do buněčného jádra, kde iniciuje transkripci genů pro zánětlivé cytokiny a další výše zmíněné složky humorální imunity. Signalizační dráha využívající NF $\kappa$ B jako iniciátor transkripce je využívána například i receptory pro TNF [53]. Signalizační dráhy pro aktivaci NK buněk skrz aktivační

receptory využívají různých adaptorových cytoplasmatických proteinů obsahujících ITAM, majících schopnost signalizovat směrem k buněčnému jádru, což vyúsťuje v indukci exprese genů pro zánětlivé cytokiny a chemokiny. Některé signalizační dráhy aktivačních receptorů NK buněk mají společné znaky se signalizačními drahami antigenně specifických BCR a TCR, ale na rozdíl od nich není u NK buněk jedna dominantní signalizační dráha. Inhibiční NCR naopak přes asociované adaptorové proteiny, které obsahují inhibiční motivy na bázi tyrosinu, indukují inhibiční imunitní odpovědi NK buňky [54]. Aktivace buněk adaptivní imunity B a T lymfocyty je úzce propojena. B lymfocyty vyžadují pro plnou aktivaci a možnost diferenciaci po rozpoznání antigenu přijetí druhého signálu od antigen-specifických pomocných T lymfocytů, což vede k aktivaci buňky. Výsledkem signalizační dráhy aktivující B lymfocyt je zvýšení metabolické aktivity zahrnující oxidační fosforylaci a glykolýzu a také diferenciaci B lymfocytů na plasmatické buňky [55]. Diferenciaci T lymfocytů závisí na TCR ale i na receptoru pro cytokiny, přičemž po interakci antigenu s TCR se spouští signalizační kaskáda využívající proteiny s ITAM, ale při interakci cytokinu s receptorem pro cytokiny se spouští signalizační kaskáda využívající Janus kinasy (kinasy patřící do tyrosinkinase superrodiny) [56].

### 1.5.1 Signalizační dráha aktivačního receptoru NK buněk NKp30

Stejně jako ostatní receptory přirozené toxicity NK buněk, aktivační receptor NKp30 buněk postrádá intracelulární signalizační doménu a signály přenáší přes membránový nabitý zbytek aminokyseliny na adaptorové proteiny s ITAM. Po interakci s některým z aktivačních ligandů musí dojít k asociaci NKp30 s adaptorovými proteiny obsahujícími ITAM, v tomto případě se jedná o homodimer CD3 $\zeta$ -CD3 $\zeta$ , a také na vysokoafinitní IgE receptor  $\gamma$ . Dalším krokem je fosforylace ITAM Src kinasami, což vede k zapojení proteinkinasy asociované s  $\zeta$  řetězcem ZAP-70 a Syk kinas, které fosforylují adaptorové proteiny (LAT a NTAL) v membráně. Fosforylace těchto adaptorových membránových proteinů vede k aktivaci signálních molekul jako je inositol-1,4,5-trifosfát, přeskupení buněčného cytoskeletu a influxu vápenatých iontů, což vyúsťí v aktivaci buňky, sekreci cytokinů IFN- $\gamma$  a TNF $\alpha$ , a cytotoxickou odpověď [57]. Signalizace NKp30 přes adaptorové proteiny může vést k cytotoxické odpovědi NK buněk skrz NF $\kappa$ B, který se v NK buňce v klidovém stavu nachází v cytosolu v neaktivní formě s navázaným represorem. Po aktivaci NK buňky je represor fosforylován, ubikvitinylován a

degradován, NFκB je aktivován a může být translokován do jádra, kde indukuje genovou expresi vedoucí k syntéze proteinů a k imunitní odpovědi NK buňky [58].

### 1.5.2 Signalizační dráha antigenně specifického receptoru T lymfocytů

Po interakci TCR s antigenem prezentovaným T lymfocytu jako součást MHC na APC dochází k agregaci více TCR v komplexu s CD3, ke spuštění signalizační dráhy směrem k jádru a aktivaci T lymfocytu. Antigen se váže na TCR a také na pomocné koreceptory (u pomocných T lymfocytů CD4, u cytotoxických T lymfocytů CD8), které jsou nepostradatelné pro navázání MHC s antigenem a také poskytují TCR tyrosinkinasu Lck, která je zodpovědná za fosforylaci ITAM na CD3. Další kinasa, která je fosforylována tyrosinkinasou Lck je ZAP-70, která je do signalizační dráhy zapojena právě po fosforylaci ITAM na CD3, a také adaptorový protein LAT, jehož fosforylace indukuje sestavení proximálního komplexu obsahujícího proteiny, které se vážou na adaptor SLP-76, jehož podjednotky, pokud je SLP-76 fosforylován ZAP-70 kinasou, mohou interagovat s fosfatidylinositolem-3,4,5-trifosfátem [58]. Spolu s adaptorem SLP-76 je k fosfatidylinositolu-3,4,5-trifosfátu přiváděna i fosfolipasa C-γ1 štěpící fosfatidylinositol - 3,4,5-trifosfát na druhý posel inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol. Inositol - 1,4,5- trifosfát spouští uvolňování vápenatých iontů z buněčných zásob, což způsobuje následné otevření kanálu pro influx vápenatých iontů do buňky z extracelulárního prostoru. Vápenaté ionty jsou nepostradatelné pro aktivaci nukleárního transkripčního faktoru aktivovaných T lymfocytů (NFAT) a NFκB [60]. Poté, co se aktivovaný NFAT translokuje do jádra, indukuje expresi interleukinu 2. Po translokaci do jádra NFκB indukuje expresi genů pro proteiny důležité pro přežití a udržení homeostázy T lymfocytu. Vzniklý diacylglycerol aktivuje kinasu Ras, potřebnou k aktivaci mitogenem aktivovaných proteinkinasy a extracelulárním signálem regulované kinasy 1 a 2. Kinasa Ras se také účastní aktivace transkripčního komplexu aktivačního proteinu 1 a zvýšení exprese CD69 na povrchu buněk [61].

### 1.6 Chimerní antigenní receptor

Chimerní antigenní receptory (CAR, chimeric antigen receptor) jsou fúzní konstrukty, nesoucí extracelulární antigen-specifickou doménu, často tvořenou antigen

rozpoznávajícím fragmentem monoklonální protilátky. Fragment monoklonální protilátky bývá následován úsekem dodávajícím extracelulární části větší flexibilitu, tzv. „spacerem“. V membráně je CAR ukotven pomocí transmembránové domény, která propojuje cytosolární část s částí extracelulární. Transmembránová doména je tvořena hydrofobním  $\alpha$ -helixem (v současnosti je za nejvhodnější považován CD28 transmembránový protein) [62,63]. Transmembránovou doménu následuje v cytosolu kostimulační doména zajišťující plnou aktivaci intracelulární signalizační domény a spuštění odpovědi buňky, která je modifikována CAR. Kostimulační domény se při návrhu CAR začaly používat, neboť CAR bez kostimulační domény vykazovaly nízkou úroveň přenosu signálu a aktivace buněk. Intracelulární signalizační doména musí být tvořena z elementů schopných spouštět signalizační kaskádu zodpovědnou za indukci aktivace požadovaných buněčných funkcí. Dnes se využívá nejčastěji CD3 $\zeta$  element TCR, protože hlavním využitím CAR je vkládání těchto konstruktů do imunitních buněk za cílem efektivní protinádorové terapie [64].

### 1.6.1 Využití CAR v terapii

Hlavním využitím CAR je antigeně specifická nádorová imunoterapie, spočívající v použití transgenních imunitních lymfocytárních buněk exprimujících CAR, jelikož většina nádorových antigenů je endogenního původu a díky tomu nádorové buňky unikají imunitnímu dohledu organismu. Při použití transgenních lymfocytů s antigeně specifickým CAR v protinádorové imunoterapii lze tomuto problému předejít, efektivně cílit na nádorové antigeny a pomocí CAR spouštět cytotoxickou imunitní odpověď. Buňkami nejčastěji modifikovanými CAR jsou cytotoxické T lymfocyty a NK buňky. Hlavním cílem takto upravených buněk je spouštět imunitní odpověď proti endogenním nádorovým antigenům, ale použití CAR modifikovaných buněk by mohlo mít potenciál i pro léčbu autoimunitních onemocnění [63]. Nyní používané imunoterapie založené na T lymfocytech s chimerním antigenním receptorem (CAR-T, chimeric antigen receptor T cells) cílí pouze na hematologické malignity. Dalším krokem ve vývoji těchto léčiv je tedy návrh konstruktů cílících na pevné nádory. Imunoterapie využívající CAR-T, jež je schválená a používaná cílí na povrchový znak CD19 na nádorových buňkách pomocí fragmentu monoklonální protilátky na extracelulární doméně CAR. Nevýhodou je neurotoxicita CAR-T terapie a také syndrom uvolnění cytokinů v návaznosti na CAR-T terapii [65].



Využití modifikovaných NK buněk s chimerním antigenním receptorem (CAR - NK, chimeric antigen receptor NK cells) pro nádorovou imunoterapii slibuje nižší neurotoxicitu a žádný/minimální syndrom uvolnění cytokinů díky rozdílnému spektru sekretovaných cytokinů než u CAR-T. Další výhodou CAR-NK by mohl být fakt, že NK buňky jsou cytotoxické vůči nádorovým buňkám i antigeně nespecificky, tudíž CAR - NK by mohly vykazovat cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám specificky díky CAR a zároveň nespecificky svými vlastními mechanismy. Oproti CAR-T jsou CAR-NK jednodušeji získatelné, jelikož je pro modifikaci možné využít jak NK buňky z periferní krve, tak NK buňky derivované od indukovaných pluripotentních kmenových buněk, NK buněčnou linií NK-92 nebo i NK buňky z pupečnickové krve [66]. Použití buněčné linie NK-92 by umožňovalo sice rychlejší přípravu CAR-NK bez nutnosti buňky nejprve pacientovi odebrat, ale jelikož se jedná o buněčnou linii derivovanou od NK buněčného lymfomu vyvstává otázka, zda je použití linie NK-92 pro CAR-NK terapii bezpečné. Jako CAR konstrukty pro CAR-NK jsou většinou používány konstrukty optimalizované pro aktivaci T lymfocytů, které často obsahují „hinge“ (CD8 $\alpha$ ) a transmembránovou doménu (CD28 transmembránový protein) nepřírodnou pro NK buňky. Tento fakt musí být brán v potaz při návrhu CAR konstruktů pro NK buňky [67]. Žádná CAR-NK není nyní využívána v klinické praxi, ale probíhá několik klinických studií testujících CAR-NK zacílených na lymfomy a leukémie, ale i na pevné nádory. Mezi testované CAR-NK patří například CAR-NK s CAR cílícím na CD33, znak akutní myeloidní leukémie, klinicky testované na pacientech s recidivou akutní myeloidní leukémie s použitím linie NK-92 i primárních NK buněk [67,68], a dále CAR-NK s CAR cílícím na ligandy NKG2D, testované též s použitím linie NK-92 i primárních NK buněk [69].

## 1.7 Využití reportérových genů pro studium biologické aktivity a funkce proteinů

Monitorování činností buňky jako je například genová exprese nebo přenos signálu je v buněčných kulturách, ale i ve zvířecích a rostlinných modelových organismech možné za pomoci tzv. reportérových genů. Reportérové geny jsou využívány, protože vykazují po expresi v buňce lehce měřitelné vlastnosti, jako například fluorescenci nebo luminiscenci. Pro tyto účely se používá například zelený fluorescenční protein (GFP, green fluorescent protein), který při vystavení ultrafialovému záření zeleně fluoreskuje, enzym luciferasa katalyzující reakci s proteinem luciferinem produkující viditelné světlo, ale i například

$\beta$  - galaktosidasa detekovatelná pomocí modrého zbarvení bakteriálních kolonií při kultivaci s 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktopyranosidem (chromogenický substrát pro  $\beta$  - galaktosidasu). Pokud je reportérový gen vhodně zvolený, je možné kvantitativně monitorovat expresi cílového genu. Reportérové geny jsou většinou vpravovány do buněk jako DNA sekvence, často kruhové DNA v podobě plasmidu, spolu s DNA sekvencí pro cílový gen a společně s ním jsou v buňce exprimovány, nebo jsou pomocí nástrojů genetického inženýrství umísťovány před promotorovou sekvencí daného genu, aby docházelo ke společné expresi cílového genu a reportérového genu. Reportérové geny jsou široce používané ve výzkumu technik genové terapie a biomedicínského výzkumu obecně, ale i v molekulární biologii a biochemii. Gen pro reportérový protein může být inkorporován do chromosomální DNA (využíváno např. při studiu technik genové terapie), ale může být umístěn i v sekvenci DNA nacházející se mimo genom buňky [70].

Příkladem využití reportérového genu je studium buněk buněčné linie Jurkat (imortalizovaná buněčná linie odvozená od lymfocytů) modifikovaných CD19 a ROR1 specifickým CAR konstruktem za účelem zjištění, zda CAR konstrukt aktivuje NFAT a NF $\kappa$ B. Tyto nukleární transkripční faktory byly opatřeny reportérovými geny pro GFP a tyrkysový fluorescenční protein. Aktivační studie těchto reportérových buněk inkubovaných s nádorovými buněčnými liniemi nebo s tetradecanoylphorbol acetátem a ionomycinem produkovaly specifický signál přes reportérové geny detekovatelný pomocí průtokové cytometrie, potvrzující, že NFAT a NF $\kappa$ B jsou v těchto reportérových buňkách aktivní součástí signalizační dráhy [70].

Dalším příkladem využití reportérových genů je studium dalších funkcí IFN mimo jejich funkce antivirové aktivity, jako například inhibici buněčné proliferace, regulace buněčných funkcí, diferenciaci a imunomodulaci. Byly vytvořeny hybridní DNA sekvence nesoucí IFN-responzivní geny propojené s geny pro jednoduše měřitelné enzymy. Tento model byl použit pro studium lidské glioblastomální buněčné linie stabilně transfekované promotorem gliálního fibriálního proteinu napojeného na reportérový gen pro  $\beta$ -galaktosidasu bakterie *E. coli*. Gliální fibriální protein je za normálních okolností exprimován na transfekovaných buňkách konstitutivně a IFN zde funguje jako inhibitor  $\beta$ -galaktosidasové aktivity [72].

## 2 Cíle

- Připravit univerzální vektor pro přípravu reportérových buněčných linií inspirovaných CAR technologií
- Připravit vektor pro expresi CAR s extracelulární doménou NKp30 (NKp30 CAR)
- Kultivace a chemická transfekce buněčné linie Jurkat NKp30 CAR konstrukty
- Ověření biologického modelu, tedy zda je možné takto měřit míru signalizace přes receptor NKp30 CAR

## 3 Materiál

### 3.1 Přístroje a pomůcky

0,22 µm filtry	TPP, Švýcarsko
Aparatura pro elektroforézu v agarosovém gelu	Biokeystone, USA
Automatické pipety	Pipetman Gilson, USA
Centrifuga Allegra X – 22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
Inkubátor IR 5000	LABsystem Praha, ČR
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Kultivační lahve hranaté s prodyšným víčkem	P-LAB, ČR
Laminární box	Clean Air Technik B. V., Nizozemsko
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact	Optimo Moulinex, Francie
Mikrozkumavka 1,5 ml	Eppendorf, USA
Mikrozkumavka 200 µl	Eppendorf, USA
Mrazicí kontejner CoolCell LX	Corning, USA
pH metr φ200	Beckman Coulter, USA
Pipetovací nástavec Hirschmann® Pipetus®	Sigma-Aldrich, USA
Průtokový cytometr BD LSR II	BD Biosciences, USA
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Stolní minicentrifuga Ministar Silverline	VWR, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler T100	Bio-Rad, Německo
Transiluminátor s modrým světlem runVIEW MINI	Cleaver Scientific, UK
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka na 50ml zkumavky	Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd, Čína
UV lampa	Cambridge, UK
Varič	ETA, ČR
Vortexový mixér	Velp Scientifica, Itálie

Zdroj stejnosměrného napětí 251-2

Zkumavka 15 ml

Zkumavka 50 ml

Sigma-Aldrich, USA

Eppendorf, USA

Eppendorf, USA

## 3.2 Enzymy a příslušné pufry

Combi PPP Master Mix

CutSmart Buffer

EcoRI

KpnI-HF

Ligation-free cloning master mix

NEB 1.0 pufr

Q5 polymerasa

Q5 reakční pufr

Top-Bio, ČR

New England Biolabs, USA

New England Biolabs, USA

New England Biolabs, USA

ABM, USA

New England Biolabs, USA

New England Biolabs, USA

New England Biolabs, USA

## 3.3 Chemikálie a komerční soupravy

### 3.3.1 Chemikálie

1 kb DNA standard

100 bp DNA standard

Agar

Agarosa

Ampicilin

BSA

GoodView II

DMSO

Gel loading dye

dNTPs

Ethanol

Fetální hovězí sérum

Isopropanol

Kvasničný extrakt

L-glutamin

PCR dH<sub>2</sub>O

Penicilin

New England Biolabs, USA

New England Biolabs, USA

Sigma, USA

Sigma, USA

Biotika, SR

Sigma, USA

Ecoli, SR

Sigma, USA

New England Biolabs, USA

Top-Bio, ČR

Lach-Ner, ČR

Sigma-Aldrich, USA

Lach-Ner, ČR

Imuna Pharm, SR

Sigma, USA

Top-Bio, ČR

Sigma, USA

Streptomycin	Sigma, USA
Trypanová modř	Sigma, USA
Trypton	Oxoid, UK
XtremeGENE™ 360 Transfection Reagent	Sigma-Aldrich, USA

### 3.3.2 Komerční soupravy

#### Kit and Buffer Set

Mix & Go! <i>E. coli</i> Transformation	Zymo Research, USA
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	MACHENERY-NAGEL, Německo
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHENERY-NAGEL, Německo
NucleoSpin® Plasmid	MACHENERY-NAGEL, Německo

### 3.4 Pufry

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

**TAE** – 40 mM Tris, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH, 1 mM EDTA

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

### 3.5 Kultivační média

**LB agar** – LB médium s přídavkem 1,5 % agaru a ampicilinu ve výsledné koncentraci 100 µg/ml

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

**RPMI** – komerční médium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) s přídavkem penicilinu ve výsledné koncentraci 100 U/ml, streptomycinu ve výsledné koncentraci 100 mg/ml a 2 mM L-Glutaminu

**SOB agar** – SOB médium s přídavkem 1,5 % (w/v) agaru a ampicilinu ve výsledné koncentraci 100 µg/ml

**SOB médium** – 2 % trypton (w/v), 0,5 % kvasničný extrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>

### 3.6 Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Thermo Scientific, USA
<i>E. coli</i> TOP10	Thermo Scientific, USA
Jurkat	Mgr. Karel Vališ, Ph. D., BIOCEV

### 3.7 Primery pro PCR

Všechny sekvence jsou uvedeny ve směru 5'→3'

pNKCAR\_Hinge\_FW: ATTCAAGTAACAGGAGAATTCGGTACCACCACAACG

pNKCAR\_Hinge\_REV: AAAGGGCTTAGAAGGATCACAGGCGAAGTC

pNKCAR\_NKp30\_L19\_FW: CAAGTAACAGGAATTCTCTGGGTGTCCCAG

pNKCAR\_NKp30\_E130\_REV:

GCGGGCGTTGTGGTGCCTTCTTTCTCCACCACCAG

pNKCAR\_NKp30\_R143\_REV: GCGGGCGTTGTGGTGCCCCGAAGGAGGAGGAC

pNKCAR\_BbsI\_lin\_FW: CCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGG

pNKCAR\_BbsI\_lin\_REV:

TCCTGTACTTGAATTGAAGGAATAAGTTGAGAGCCAA

pNKCAR\_seq\_FW: GGGTGGGGGAGAACCGTATATAAG

pTW5seq\_REV: AAGCAGCGTATCCACATAGCG

### 3.8 Plasmidy

pSLCAR_CD19_28z	addgene plasmid č.135991
pTTo-GFPq	prof. Y. Durocher, University of Montreal, Kanada
NKp30_cDNA_ORF clone	Sino Biological, Čína, HG10480-UT

## 4 Metody

### 4.1 Příprava CAR konstruktů

#### 4.1.1 Amplifikace DNA insertů

Inserty DNA potřebné pro přípravu CAR konstruktů byly amplifikovány za použití polymerázové řetězcové reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction). Přehled amplifikovaných templátových DNA je uveden v tabulce 1 spolu s použitými primery. Reakce probíhala v celkovém objemu 20  $\mu$ l. Pipetované objemy jednotlivých komponent jsou uvedeny v tabulce 2 na straně 33. Reakční směs byla po připravení krátce centrifugována ve stolní centrifuze a umístěna do termocyklu. Reakce proběhla podle schématu v tabulce 3 na straně 33. Teplota nasedání se lišila pro různé primery a byla vypočítána pomocí on-line nástroje Tm Calculator výrobce Q5 polymerasy [74]. Po proběhnutí reakce byly výsledky ověřeny pomocí elektroforézy v agarosovém gelu.

**Tabulka 1: Přehled amplifikovaných úseků DNA**

Amplifikovaný úsek DNA	Templát	Přední primer	Zpětný primer
CD8 Hinge	pSLCAR_CD19_28z	pNKCAR_Hinge_FW	pNKCAR_Hinge_REV
NKp30_Stalk	NKp30_cDNA_ORF_clone	pNKCAR_NKp30_L19_FW	pNKCAR_NKp30_R143_REV
NKp30_LBD	NKp30_cDNA_ORF_clone	pNKCAR_NKp30_L19_FW	pNKCAR_NKp30_E130_REV



**Tabulka 2: Pipetované objemy jednotlivých komponent pro PCR amplifikaci**

doplněno dH <sub>2</sub> O na objem 20 µl	Koncentrace zásobního roztoku	Pipetovaný objem
Templátová DNA	40 ng/µl	1 µl
Přední primer	5 µM	2 µl
Zpětný primer	5 µM	2 µl
dNTPs	10 mM	0,4 µl
Q5 DNA polymerasa	2000 U/ml	0,2 µl
Q5 reakční pufr	5×	4 µl
Q5 GC enhancer	5×	4 µl

**Tabulka 3: Časový a teplotní průběh PCR reakce**

Krok	Teplota [°C]	Doba trvání
1	95	30 s
2 (opakování 30 ×)	95	30 s
	Teplota nasedání primeru	30 s
	72	1 min
3	72	8 min
4	4	-

#### 4.1.2 Elektroforéza v agarosovém gelu a extrakce DNA z gelu

Příslušné množství agarosy (0,33 g pro 0,5% gel) bylo rozpuštěno v 65 ml pufru TAE krátkým povařením v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí byly do směsi přidány 3 µl detekční barvy pro DNA GoodView. Směs byla nalita do elektroforetické soupravy. Po zatuhnutí byl gel převrstven dH<sub>2</sub>O a do prostoru elektrod byl nalit pufr TAE. Ke vzorkům bylo přidáno příslušné množství DNA vzorkového pufru „Gel Loading Dye“ ze 6 × koncentrovaného zásobního roztoku. Takto připravené vzorky byly naneseny do jamek v gelu. Do jedné z jamek bylo naneseno 5 µl DNA standardu (100 bp či 1 kb). Elektroforéza probíhala za působení stejnosměrného elektrického proudu po dobu 20 minut při napětí 180 V. Po proběhnutí elektroforézy byl gel prosvícen transiluminátorem, produkty o správné velikosti byly vyříznuty a umístěny do mikroskopu.

DNA byla z agarosového gelu izolována pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up [75]. Do mikrozkušavky bylo přidáno ke každým asi 100 mg gelu 200 µl pufru NTI a vzorek byl inkubován 10 minut při 50 °C za občasného promíchání na vortexu. Po rozpuštění veškerého gelu byl roztok nanesen na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a kolonka s roztokem byla centrifugována 1 minutu při 11000 × g. Kolonka byla následně dvakrát promyta 700 µl pufru NT3 centrifugací 1 minutu při 11000 × g. Sušení kolonky bylo provedeno centrifugací 1 minutu při 11000 × g a následným sušením po dobu 5 minut při 70 °C. DNA byla z kolonky eluována 30 µl pufru NE předehřátého na 70 °C, se kterým byla inkubována 5 minut při 70 °C. Samotná eluce byla poté provedena centrifugací po dobu 1 minuty při 11000 × g. Koncentrace produktu byla změřena na spektrofotometru DS-11+ oproti elučnímu pufru.

#### 4.1.3 Linearizace plasmidu pomocí celoplasmidové PCR

Komerční plasmid pSLCAR\_CD19\_28z byl linearizován za použití celoplasmidové PCR. Jako přední primer byl pro celoplasmidovou PCR použit pNKAR\_BbsI\_lin\_FW a jako zpětný pNKAR\_BbsI\_lin\_REV. Reakční směs byla připravena stejně jako v kapitole 4.1.1 na straně 32 a reakce proběhla podle reakčního schématu uvedeného v tabulce 4.

**Tabulka 4: Časový a teplotní průběh celoplasmidové PCR**

Krok	Teplota [°C]	Doba trvání
1	98	3 min
2 (opakování 35 ×)	98	30 s
	65	30 s
	72	30 s
3	72	7 min
4	8	-

#### 4.1.4 Linearizace plasmidu pomocí restričních endonukleas

Pro vložení dalšího insertu na specifické místo v sekvenci plasmidu byl plasmid štěpen restričními endonukleasami EcoRI a KpnI-HF. Linearizace pomocí restričních endonukleas byla provedena následovně: K 8 µg neštěpeného plasmidu pSLCAR\_CD19\_28z bylo přidáno 100 U enzymu EcoRI (zásobní koncentrace

20000 U/ml), 5  $\mu$ l NEB 1.0 pufru (10  $\times$  koncentrovaný zásobní roztok), 0,5  $\mu$ l hovězího sérového albuminu (100  $\times$  koncentrovaný zásobní roztok), směs byla doplněna na 50  $\mu$ l PCR dH<sub>2</sub>O a hodinu a půl inkubována při 37 °C. Poté byl enzym EcoRI tepelně inaktivován zahřátím na 65 °C po dobu 20 minut a štěpení bylo ověřeno pomocí elektroforézy v agarosovém gelu oproti neštěpenému plasmidu. Plasmidová DNA byla izolována z gelu pomocí soupravy NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.2 na stránce 33. Byla změřena koncentrace DNA, bylo přidáno příslušné množství enzymu KpnI-HF, pufru CutSmart (10  $\times$  koncentrovaný zásobní roztok), směs byla doplněna na 50  $\mu$ l PCR dH<sub>2</sub>O a inkubována 1 a půl hodiny při 37 °C.

#### 4.1.5 Vložení insertu do linearizovaného vektoru

Do komerčního plasmidu pSLCAR-CD19-28z byla (po vyštěpení některých nesouvisejících původních sekvencí) nejdříve vnášena „hinge“ doména CD8h, do takto vzniklého plasmidu pak NKp30\_Stalk nebo NKp30\_LBD, všechny jako produkty PCR amplifikace. Do celkového objemu 20  $\mu$ l bylo k 100 ng plasmidové DNA pipetováno takové množství DNA insertů, aby bylo dosaženo požadovaného poměru koncentrací. Pipetované objemy jsou uvedeny v tabulce 5. Do směsi bylo přidáno 4  $\mu$ l roztoku „Ligation-free cloning master mix“ a směs byla doplněna na 20  $\mu$ l PCR dH<sub>2</sub>O. Směs byla ponechána 1 hodinu při 0 °C. Takto připravené vzorky byly použity pro transformaci kompetentních bakteriálních buněk.

**Tabulka 5: Pipetované objemy DNA insertů vkládaných do linearizovaného vektoru**

Připravovaný konstrukt	Insert	Zásobní koncentrace [ng/ $\mu$ l]	Pipetovaný objem [ $\mu$ l]
pNKCAR_CD8h	CD8h	17	0,6
pNKCAR_NKp30_Stalk	NKp30_Stalk	9	2,2
pNKCAR_NKp30_LBD	NKp30_LBD	33	0,7

#### 4.1.6 Transformace bakterií plasmidovou DNA

Plasmidová DNA získaná pomocí postupu uvedeného v kapitole 4.1.5 byla transformována do kompetentních bakterií *E. coli* TOP10 připravených pomocí soupravy Mix & Go Competent *E. coli* Cells [76]. Alikvot kompetentních bakterií byl vyjmut z mrazicího boxu (-80 °C) a ponechán asi 10 minut při 0 °C, aby obsah rozmrzl. Následně

byl celý objem alikvotu (100 µl) smíchán s připravenou plasmidovou DNA a směs byla 10 minut inkubována při 0 °C. Po uplynutí této doby byla směs rozetřena na Petriho misky se SOB agarem sterilní skleněnou hokejkou. Misky s bakteriemi byly inkubovány přes noc v inkubátoru při 37 °C.

#### 4.1.7 PCR z bakteriálních kolonií

Z kolonií narostlých na Petriho miskách bylo vybráno 6, u nichž bylo ověřeno vložení požadovaného DNA konstrukt. Tyto kolonie byly nabrány sterilními špičkami, které byly následně promyty v 6 µl PCR dH<sub>2</sub>O. K 6 µl PCR dH<sub>2</sub>O s bakteriální DNA bylo přidáno 10 µl roztoku „Combi PPP Master Mix“, 2 µl předního a 2 µl zpětného primeru podle tabulky 6. Vzorky byly vloženy do termocykleru a proběhla PCR podle schématu v tabulce 7. Po ukončení PCR reakce byla provedena elektroforéza na 0,5% agarosovém gelu stejným způsobem jak je uvedeno v kapitole 4.1.2 na straně 33. Do jamek byl pipetován celý objem vzorku a také 5 µl 100 bp DNA standardu. Produkty PCR reakce byly po proběhnutí elektroforézy vizualizovány UV lampou a přítomnost DNA konstrukt byla ověřena porovnáním délky produktu s jeho očekávanou délkou.

**Tabulka 6: Použité primery pro PCR z bakteriálních kolonií pro jednotlivé DNA konstrukty**

DNA konstrukt	Přední primer	Zpětný primer
pNKCAR_CD8h	pNKCAR_Hinge_FW	pTW5seq_REV
pNKCAR_NKp30_Stalk	pNKCAR_seq_FW	pNKp30_R143_REV
pNKCAR_NKp30_LBD	pNKCAR_seq_FW	pNKp30_E130_REV

**Tabulka 7: Teplotní a časový průběh PCR z bakteriálních kolonií**

Krok	Teplota [°C]	Doba trvání
1	95	3 min
2 (opakování 20 ×)	95	30 s
	54	30 s
	72	1 min
3	72	5 min
4	4	-

#### 4.1.8 Nízkoobjemová produkce plasmidové DNA a sekvenace

Špičky použité k nabrání těch kolonií, jejichž PCR produkt byl pozitivní byly umístěny do 50ml zkumavky, bylo přidáno 5 ml LB média a 5  $\mu$ l ampicilinu (výsledná koncentrace 100  $\mu$ g/ml). Takto připravené vzorky byly inkubovány přes noc na třepačce při 37 °C při rychlosti otáčení 175 ot./min.

Následující den byly zkumavky vyjmuty z třepačky a buněčná suspenze byla centrifugována 5 minut na 4500  $\times$  g při laboratorní teplotě. Supernatant byl slit, byla vyjmuta špička a z buněčné pelety byla pomocí soupravy NucleoSpin® Plasmid [77] izolována plasmidová DNA. Buněčná peleta byla resuspendována v 250  $\mu$ l pufru A1 s přídáním RNAsou a roztok byl přemístěn do mikrozukavky. Následně bylo přidáno 250  $\mu$ l lyzačního pufru A2, který obsahuje SDS, hydroxid sodný a barevný pH indikátor. Směs byla opatrně promíchána překlápěním mikrozukavky a 5 minut inkubována při laboratorní teplotě. Bylo přidáno 300  $\mu$ l neutralizačního pufru A3 obsahujícího octan draselný a roztok byl promícháván překlápěním mikrozukavky, dokud nedošlo k neutralizaci indikované ztrátou modré barvy vzorku. Následně byl roztok centrifugován 10 minut při 20000  $\times$  g. Supernatant byl nanesen na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugován 1 minutu při 11000  $\times$  g. Kolonka byla promyta 500  $\mu$ l pufru AW předehřátého na 50 °C centrifugací 1 minutu při 11 000  $\times$  g. Dále bylo přidáno 600  $\mu$ l promývacího pufru A4 a kolonka byla promyta centrifugací po dobu 1 minuty při 11000  $\times$  g. Následně byla kolonka sušena centrifugací při 11 000  $\times$  g po dobu 2 minut. Eluce plasmidové DNA byla provedena do čisté mikrozukavky 50  $\mu$ l pufru AE se kterým byla DNA inkubována po dobu 1 minuty. Po inkubaci byla DNA eluována centrifugací při 11000  $\times$  g po 1 minutu. Koncentrace byla změřena na spektrofotometru DS-11+, jako blank byl použit eluční pufr.

Pro sekvenační reakci bylo mícháno do celkového objemu 8  $\mu$ l 200 ng plasmidové DNA, 1  $\mu$ l primeru a na 8  $\mu$ l byl objem doplněn dH<sub>2</sub>O. Podle délky sekvenovaného úseku DNA (v bp) byl pro daný vzorek zvolen pouze přední nebo pouze zpětný primer, nebo byly připraveny dvě směsi, přičemž do jedné byl přidán přední a do druhé zpětný primer. Primery použité pro příslušné vzorky jsou uvedeny v tabulce 8 na straně 38. Takto připravené vzorky byly odeslány do Laboratoře sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty UK. Výsledky byly vyhodnocovány v programu SnapGene [78].

**Tabulka 8: Použité primery pro jednotlivé plasmidové DNA konstrukty**

Plasmidová DNA	Pipetovaný objem [μl]	Zás. koncentrace [ng/μl]	Přední primer	Zpětný primer
pNKCAR_CD8h	0,27	718	pNKCAR_seq_F W	–
pNKCAR_NKp30 _Stalk	0,34	581	pNKCAR_seq_F W	pNKCAR_Hinge_R EV
pNKCAR_NKp30 _LBD	0,33	606	pNKCAR_seq_F W	pNKCAR_Hinge_R EV

#### 4.1.9 Vysokoobjemová produkce plasmidové DNA

Plasmidová DNA, jejíž sekvence byla ověřena sekvenací, byla použita pro transformaci kompetentních bakterií *E. coli* DH5α. Alikvot buněčné suspenze byl vyjmut z mrazícího boxu chladícího na -80 °C, ponechán 10 minut při 0 °C a poté bylo přidáno 100 ng DNA k 50-100 μl buněčné suspenze. Po inkubaci na ledu po dobu 10 minut byla směs natřena na Petriho misku s LB agarem sterilní hokejkou. Misky byly ponechány v inkubátoru při 37 °C přes noc. Následující den byla vybrána 1 kolonie, která byla z Petriho misky setřena sterilní špičkou a naočkována do 2l Erlenmayerovy baňky s 500 ml LB média s 500 μl ampicilinu (o zásobní koncentraci 100 mg/ml) a baňka byla inkubována přes noc (14 - 16 h) na třepačce při 37 °C a rychlosti 175 ot./min.

Následující den byla buněčná suspenze centrifugována po dobu 30 minut při 4500 × g za laboratorní teploty. Supernatant byl slit. Buněčná peleta byla opláchnuta od LB média resuspendací v 40 ml TES pufru a následně byla suspenze centrifugována po dobu 10 minut při 4500 × g. Supernatant byl slit a plasmidová DNA byla izolována pomocí soupravy Nucleobond® Xtra Maxi Kit [79]. Peleta byla resuspendována v 15 ml resuspendačního pufru s RNAsou A s výslednou koncentrací 60 μg/ml. Bylo přidáno 15 ml lyzačního pufru s modrým indikátorem pH, směs byla promíchána převrácením zkumavky a 5 minut inkubována při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 15 ml neutralizačního pufru a směs byla promíchávána převrácením do ztráty modré barvy indikátoru. Filtr a kolona byly promyty 15 ml ekvilibračního pufru. Po protečení ekvilibračního pufru byl na kolonu nanesen buněčný lyzát a po protečení veškeré tekutiny byl filtr promyt 15 ml ekvilibračního pufru a poté byl odstraněn. Kolona byla promyta

25 ml promývacího pufru a poté byla provedena eluce 15 ml elučního pufru. Eluovaná DNA byla srážena smícháním s 10,5 ml isopropanolu, míchána na vortexu a ponechána 2 minuty inkubovat. Eluát s isopropanolem byl nabrán do injekční stříkačky a protlačen přes filtr NucleoBond Finalizer Large, na který se navázala plasmidová DNA. Filtr byl promyt 4 ml 70% ethanolu a následně vysušen protlačováním vzduchu přes filtr pomocí injekční stříkačky. Eluce DNA z filtru byla provedena pomocí 1 ml elučního pufru AE, který byl natažen do čisté injekční stříkačky a několikrát protlačen přes filtr. Poté byla změřena koncentrace eluované DNA na spektrofotometru DS-11+ oproti elučnímu pufru.

## 4.2 Práce s buněčnou linií Jurkat

K práci byla vybrána buněčná linie Jurkat, immortalizovaná buněčná linie odvozená od T lymfocytů. Veškerá práce probíhala v místnosti určené pouze pro práci s tkáňovými kulturami. Manipulace s buněčnou linií byla prováděna v aseptických podmínkách v laminárním boxu.

### 4.2.1 Rozmrazování

Alikvot buněčné suspenze ( $1 \times 10^6$  buněk v 1 ml média) uchovávaný v kryozkumavce při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  byl vyjmut z chladícího boxu a umístěn do vodní lázně vyhřívané na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ve které byla suspenze rozmrazena. Následně byla buněčné suspenze přenesena do 10 ml média RPMI vytemperovaného též na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a centrifugována 5 minut na  $100 \times g$  při  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  za účelem opláchnutí 10% dimethylsulfoxidu (DMSO) používaného jako kdyoprotektivní činidlo. Buněčná peleta byla následně resuspendována v 5 ml média RPMI s 10 % (v/v) tepelně inaktivovaného fetálního hovězího séra (FBS, z angl. fetal bovine serum) do hranaté kultivační lahve vhodné pro kultivaci suspenzních buněk s filtrem na víčku a umístěna do inkubátoru ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5% nasycení  $\text{CO}_2$ ).

### 4.2.2 Kultivace

Buňky linie Jurkat byly kultivovány v komerčním médiu RPMI v inkubátoru při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5% nasycení  $\text{CO}_2$ . Každé 3 až 4 dny byly buňky ředěny na výslednou buněčnou hustotu  $0,15 \times 10^6$  buněk/ml odebráním části buněčné suspenze a přidáním čerstvého média RPMI s 10 % (v/v) FBS. Výpočet buněčné hustoty byl prováděn následovně: Z kultivační lahve bylo odebráno 20  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze, ke kterým bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  0,4% roztoku trypanové modři, suspenze tak byla  $2 \times$  zředěna. Takto připravený vzorek byl pipetován

mezi sklíčka hemocytometru a pod mikroskopem byly buňky spočítány. Buněčná hustota byla poté vypočítána podle vzorce:

$$\text{buněčná hustota} = \frac{\text{počet buněk} \times \text{ředění}}{\text{počet velkých čtverců}} \times 10^4,$$

kde  $10^4$  vyjadřuje objemový faktor vycházející z objemu komůrky hemocytometru.

### 4.2.3 Zmrazování

Takový objem média, jenž obsahoval potřebný počet buněk, byl centrifugován 5 minut při  $100 \times g$  a  $20^\circ\text{C}$ . Vzniklá buněčná peleta byla resuspendována v takovém objemu čerstvého RPMI média s přidavkem 10 % (v/v) FBS a 10 % (v/v) DMSO, aby výsledná koncentrace byla  $2 \times 10^6$  b/ml. Suspenze byla pipetována po 1 ml do kryozkumavek, které byly umístěny do mrazícího kontejneru CoolCell LX a umístěny do chladícího boxu s teplotou  $-80^\circ\text{C}$ .

## 4.3 Optimalizace transfekce buněčné linie Jurkat

Jurkat buňky kultivované podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.2 byly transiентně transfekovány plasmidovými DNA pNKCAR\_NKp30\_Stalk a pTTo-GFPq (plasmid nesoucí gen pro GFP exprimované do cytosolu) za 12 různých transfekčních podmínek. Ve všech případech bylo transfekováno  $0,5 \times 10^6$  buněk 500 ng plasmidové DNA. Plasmidová DNA byla ředěna na koncentraci 100 ng/ $\mu\text{l}$  PBS puforem a v laminárním boxu přefiltrována přes sterilní 0,22  $\mu\text{m}$  filtr. Jako transfekční činidlo bylo použito XtremeGENE™ 360 Transfection Reagent. 5  $\mu\text{l}$  DNA (zásobní koncentrace 100 ng/ $\mu\text{l}$ ) bylo smícháno s 50  $\mu\text{l}$  PBS pufru nebo s 50  $\mu\text{l}$  RPMI média a bylo přidáno transfekční činidlo v hmotnostním poměru DNA:transfekční činidlo 1:1, 1:3 a 1:6 podle tabulky 9 na straně 41, směs byla promíchána a takto připravený transfekční mix byl 30 minut inkubován při laboratorní teplotě. Potřebný objem buněčné suspenze byl 5 minut centrifugován při  $100 \times g$  a  $20^\circ\text{C}$ , supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány v takovém objemu média RPMI s 10 % (v/v) FBS a RPMI média bez přidaného FBS, aby výsledná koncentrace byla  $0,5 \times 10^6$  buněk/ml a přenesené do 24-jamkové destičky s plochým dnem. Na 1 ml buněčné suspenze byl nakapán připravený transfekční mix a směs byla promíchána. Jako kontroly byly použity Jurkat buňky v médiu RPMI bez FBS,



Jurkat buňky v médiu RPMI s 10 % (v/v) FBS, Jurkat buňky s pNKCAR\_NKp30\_Stalk DNA bez transfekčního činidla, Jurkat buňky bez přidané DNA v médiu RPMI s 10 % (v/v) FBS s objemem transfekčního činidla odpovídajícím nejvyššímu hmotnostnímu poměru DNA:transfekční činidlo. Transfekované buňky a kontroly byly poté dva dny inkubovány při 37 °C a 5 % nasycením CO<sub>2</sub>. Ideální transfekční podmínky byly vybrány za použití průtokové cytometrie.

**Tabulka 9: Pipetované objemy transfekčního činidla XtremeGENE™ 360 a plazmidové DNA**

Molární poměr transfekční činidlo:DNA	Pipetovaný objem XtremeGENE™ 360 [μl]	Pipetovaný objem DNA (zásobní koncentrace 100 ng/μl) [μl]
1:1	0,5	5
1:3	1,5	5
1:6	3,0	5

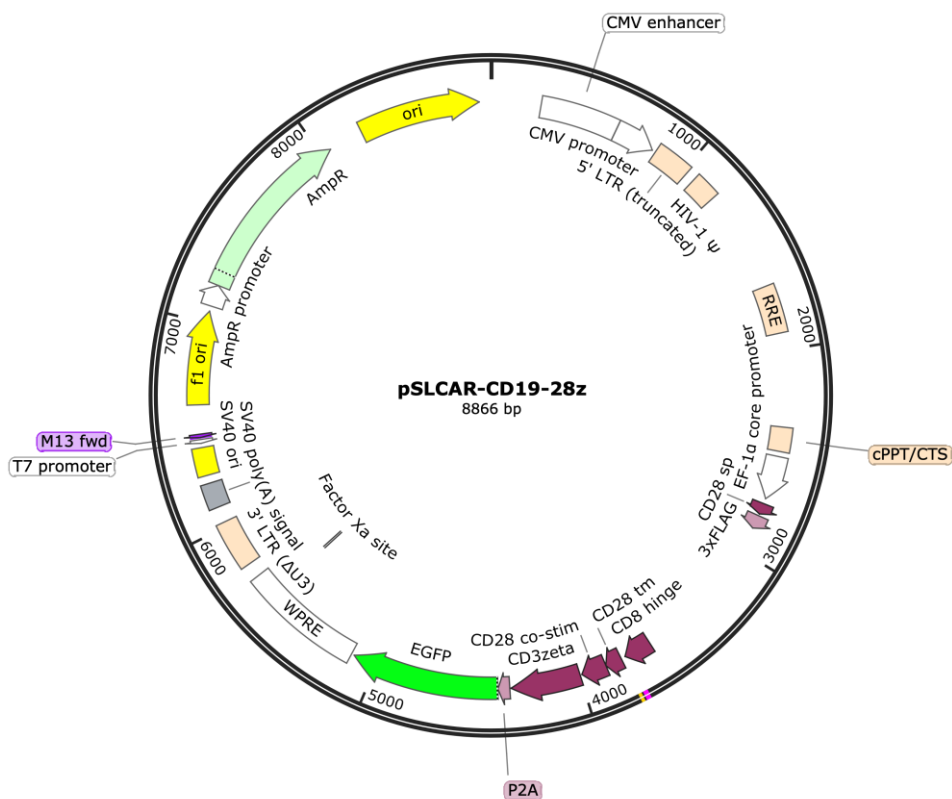
#### 4.3.1 Příprava vzorků pro měření na průtokovém cytometru

Z použitých transfekčních podmínek pro transientní transfekci pNKCAR\_NKp30\_Stalk a pTTo-GFPq do buněčné linie Jurkat byla vybírána nejvhodnější podmínka pomocí průtokové cytometrie. Po dvou dnech inkubace ve 24-jamkové destičce s plochým dnem byly vzorky transfekovaných buněk a kontrol pipetovány po 200 μl do 96-jamkové destičky, bylo přidáno též 200 μl Jurkat buněk z kultivační lahve. Vzorky byly 5 minut centrifugovány při 300 × g a 4 °C, supernatant byl slit a vzorky byly resuspendovány ve 150 μl PBS pufru. Suspenze byla znovu centrifugována za stejných podmínek a poté byly vzorky resuspendovány ve 120 μl PBS pufru. Takto připravené vzorky byly použity pro měření na průtokovém cytometru. Měření bylo provedeno v Laboratoři průtokové cytometrie PřF UK na přístroji BD LSR II, měření provedla Mgr. Barbora Kalousková. Cílem měření bylo určit množství živých GFP pozitivních buněk.

## 5 Výsledky

### 5.1 Příprava CAR konstruktů

Konstrukty CAR byly připravovány za použití komerčního plasmidu pSLCAR\_CD19\_28z, který byl poskytnut laboratoří profesora Scotta McComba [73]. Komerční plasmid pSLCAR\_CD19\_28z, jehož mapa je na obrázku 3, nese geny pro cytosolární domény CAR (kostimulační doménu CD28 a signalizační doménu CD3 $\zeta$ ), transmembránovou doménu CAR (CD28 tm), CD8 „hinge“ doménu a signální peptid CD28. Dále nese gen pro GFP, který se při expresi odpojuje od CAR konstruktů a zůstává v cytosolu. Plasmid pSLCAR\_CD19\_28z nese rezistenci na ampicilin.

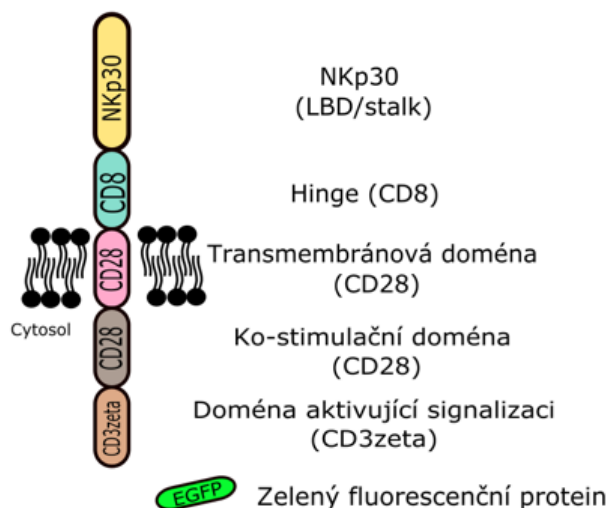


**Obrázek 3: Mapa výchozího plasmidu pSLCAR\_CD19\_28z**

Plasmid nese geny pro zelený fluorescenční protein (EGFP), CD3 $\zeta$  (CD3zeta), kostimulační doménu CD28 (CD28 co-stim), transmembránovou doménu CD28 (CD28 tm), „hinge“ doménu CD8 (CD8 hinge), signální peptid (CD28 sp) a gen pro rezistenci na ampicilin (AmpR). Vytvořeno v programu SnapGene [78].

Plasmid pSLCAR\_CD19\_28z byl použit pro přípravu universálního vektoru a dvou CAR konstruktů nesoucích geny pro extracelulární doménu receptoru NKp30 se „stalk“ doménou nebo bez ní, určených pro transientní transfekci buněčné linie Jurkat.

Schéma připravených CAR konstruktů exprimovaných na buněčné membráně je uvedeno na obrázku 4. Aminokyselinové sekvence receptoru NKp30 se „stalk“ doménou nebo pouze s ligand vazebnou doménou jsou na obrázku 5.



**Obrázek 4: Schéma CAR konstruktů exprimovaných na buněčné membráně.** Zelený fluorescenční protein (EGFP) se při expresi odpojuje od CAR konstruktů, zůstává v cytosolu a může tak sloužit jako indikátor úrovně exprese CAR na buněčné membráně. Interakce extracelulární domény CAR konstruktů (NKp30 LBD/Stalk) s ligandy či specifickou protilátkou by měla vést ke spuštění intracelulární signalizační dráhy přes CD3 $\zeta$  doménu CAR indukující expresi povrchového znaku CD69, jehož přítomnost lze ověřit pomocí průtokové cytometrie. Tímto způsobem lze sledovat biologickou aktivitu ligandů receptoru NKp30.

NKp30 stalk:

LWWSQPPEI RTLEGSSAFLPCSFNASQGRLAI GSVTWFRDEVPGKEVRNGTPEFRGRLAPLASSRFL  
 HDHQAELHI RDVRGHDASI YVCRVEVLGLGVGTGNGTRLVVEKEHPQLGAGTVLLL RAGFYAVSFLSV  
 AVGSTVYYQGKCLTWKGP RRQLPAVVPAPLPPPCGSSAHL LPPVPGG

NKp30 LBD:

LWWSQPPEI RTLEGSSAFLPCSFNASQGRLAI GSVTWFRDEVPGKEVRNGTPEFRGRLAPLASSRFL  
 HDHQAELHI RDVRGHDASI YVCRVEVLGLGVGTGNGTRLVVEAGFYAVSFLSVAVGSTVYYQGKCLTW  
 KGP RRQLPAVVPAPLPPPCGSSAHL LPPVPGG

**Obrázek 5: Aminokyselinová sekvence receptoru NKp30**

Aminokyselinová sekvence receptoru NKp30 se „stalk“ doménou (NKp30 stalk), aminokyselinová sekvence proteinu NKp30 pouze s ligand vazebnou doménou, (NKp30 LBD). Červeně ligand vazebná doména, modře „stalk“ doména, zeleně transmembránová doména, fialově intracelulární doména.

### 5.1.1 Příprava DNA insertů

DNA insertů byla amplifikována pomocí PCR. Použité primery vnesly na konce amplifikovaných úseků DNA přesahy pro vložení do linearizovaného vektoru. Po PCR reakci byla přítomnost produktu ověřována pomocí elektroforézy v 0,5% agarosovém gelu. Produkty o správné velikosti byly izolovány podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.2 na straně 33 a byla změřena jejich koncentrace, jež je uvedena v tabulce 10.

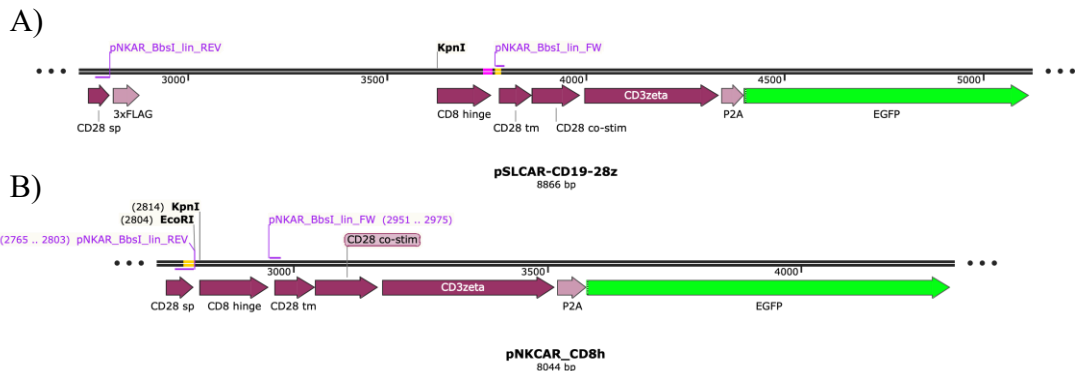
**Tabulka 10: Výsledné koncentrace úseků DNA po PCR amplifikaci a extrakci z agarosového gelu**

Amplifikovaný úsek DNA	Koncentrace [ng/μl]
CD8h	17
NKp30_Stalk	9
NKp30_LBD	33

### 5.1.2 Příprava universálního vektoru

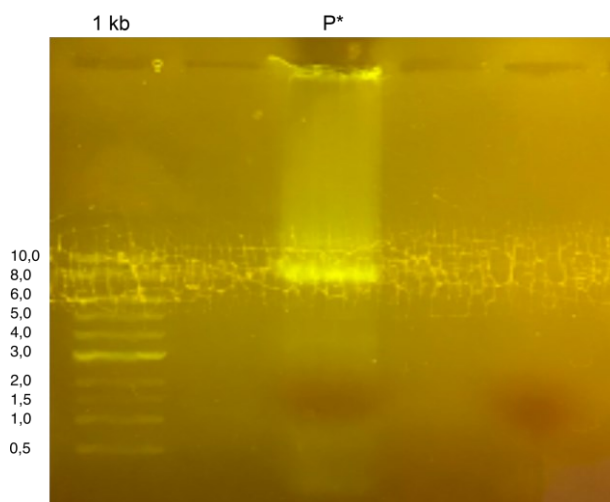
Výchozí plasmid pSLCAR-CD19-28z byl linearizován pomocí celoplasmidové PCR podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.3 na straně 34. Primery pro celoplasmidovou PCR pNKCAR\_BbsI\_lin\_FW a pNKCAR\_BbsI\_lin\_REV byly navrženy tak, aby přední primer nasedal v místě transmembránové domény CD28 tm a zpětný primer nasedal v místě signálního peptidu CD28 sp, byly tak vynechány některé nesouvisející původní sekvence a původní sekvence CD8 „hinge“ domény. Do linearizovaného plasmidu byla vložena amplifikovaná CD8 hinge doména. Schéma sekvencí výchozího plasmidu a universálního vektoru lze vidět na obrázku 6 na straně 45. Přítomnost produktu o správné velikosti byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy v 0,5% gelu, jak je vidět na obrázku 7 na straně 45. Byla amplifikována oblast plasmidu nesoucí geny pro CAR konstrukt bez původní „hinge“ domény CD8h. DNA linearizovaného plasmidu byla extrahována z gelu, koncentrace byla 11 ng/μl. Při PCR amplifikaci byly na plasmidu vytvořeny komplementární přesahy pro vložení amplifikované CD8h domény, která byla do linearizovaného plasmidu vložena podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.5 na straně 35. Takto připravený konstrukt byl transformován do kompetentních bakterií *E. coli* TOP10. Byla provedena PCR z bakteriálních kolonií, z pozitivních kolonií byla připravena nízkoobjemová produkce DNA. Správnost sekvence DNA byla ověřena pomocí sekvenace a poté byla provedena vysokoobjemová produkce plasmidu

pSLCAR\_CD19\_28z s CD8h doménou (dále jako pNKCAR\_CD8h). Koncentrace plasmidové DNA pNKCAR\_CD8h z vysokoobjemové produkce byla 2,6 µg/µl.



**Obrázek 6: Schéma sekvencí výchozího plasmidu a univerzálního vektoru.**

A) Schéma míst nasedání primerů pNKCAR\_BbsI\_lin\_FW a pNKCAR\_BbsI\_lin\_REV na DNA plasmidu pSLCAR\_CD19\_28z pro účely celoplasmidové PCR. B) Schéma výsledné DNA sekvence univerzálního vektoru pNKCAR\_CD8h. Vytvořeno v programu SnapGene [78].

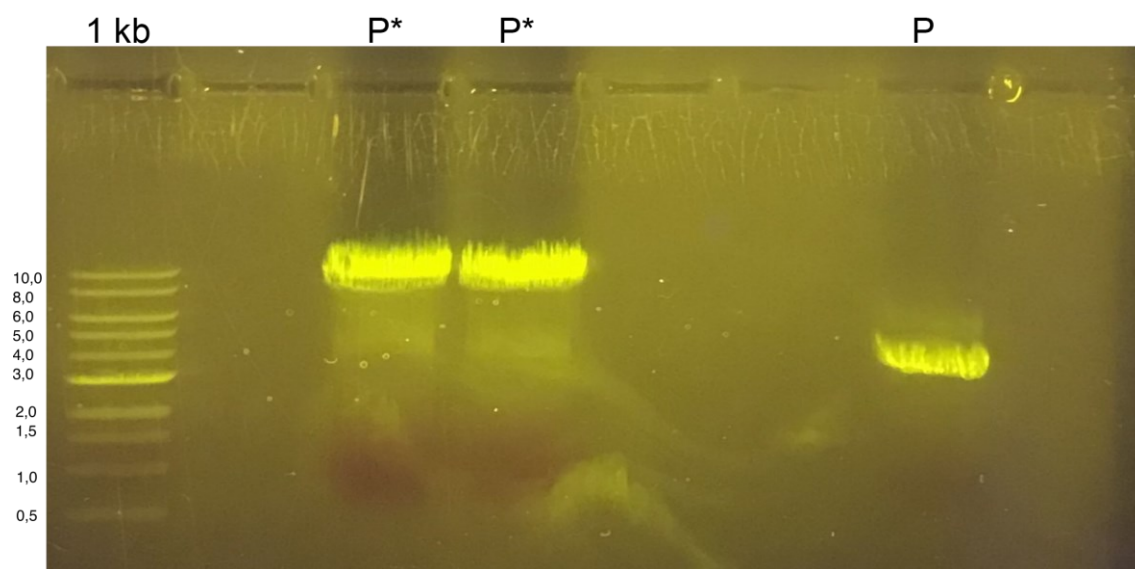


**Obrázek 7: Elektroforéza v agarosovém gelu linearizovaného plasmidu pSLCAR\_CD19\_28z po celoplasmidové PCR. V první dráze zleva 1 kb DNA standard (1 kb) ve třetí dráze linearizovaný plasmid pSLCAR\_CD19\_28z (P\*), 0,5% agarosový gel, očekávaná velikost PCR produktu je 7897 bp.**

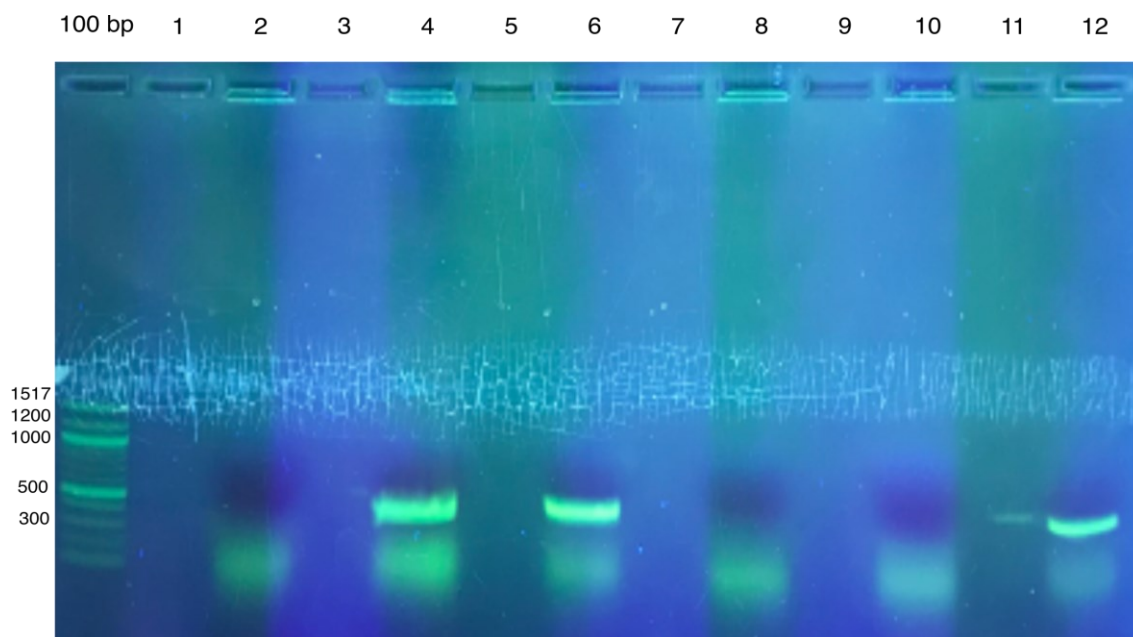
### 5.1.3 Příprava CAR konstruktů s receptorem NKp30

Pro přípravu CAR konstruktů byla použita plasmidová DNA univerzálního konstruktu pNKCAR\_CD8h a DNA kódující extracelulární doménu receptoru NKp30. Plasmid pNKCAR\_CD8h byl štěpen pomocí restričních endonukleas EcoRI a KpnI-HF a byly tak vytvořeny komplementární přesahy pro DNA NKp30, která byla amplifikována s regionem kódujícím stalk doménu receptoru NKp30 nebo bez tak, aby měla komplementární přesahy pro vnesení do linearizovaného vektoru pNKCAR\_CD8h. Štěpení plasmidu restriční endonukleasou EcoRI bylo ověřeno pomocí elektroforézy v

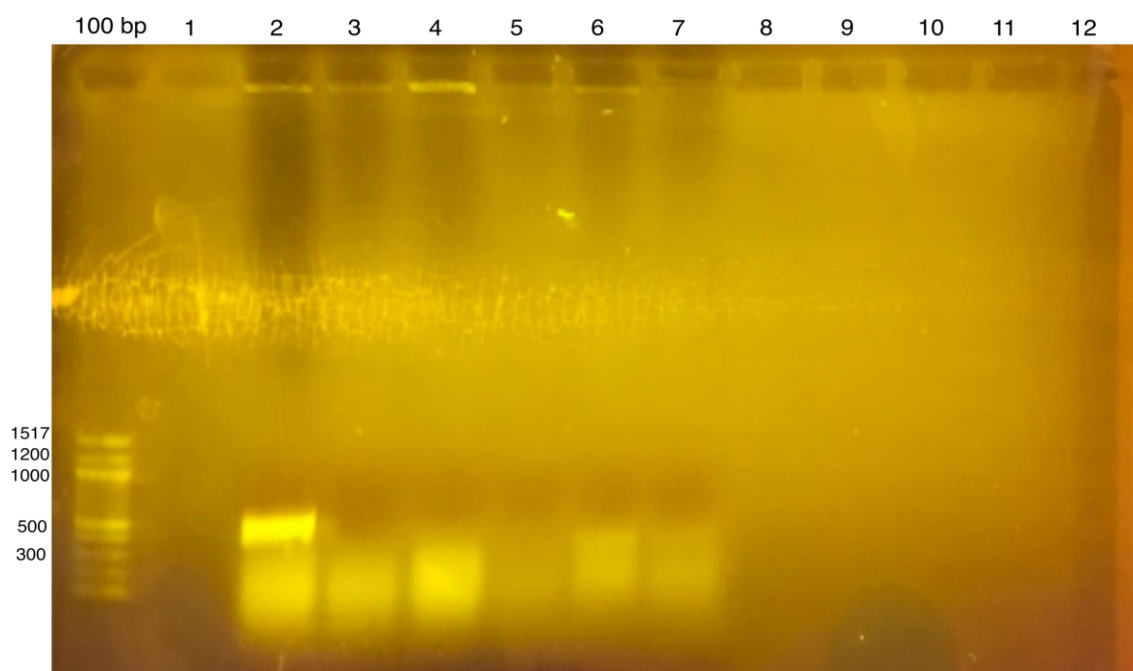
0,5% agarosovém gelu oproti neštěpenému plasmidu, výsledek elektroforézy je na obrázku 8. Vektor s vneseným insertem byl transformován do kompetentních bakterií *E. coli* TOP10, které byly nanášeny na Petriho misky se SOB médiem s ampicilinem jako antibiotikem selektujícím pozitivní klony. Pro ověření přítomnosti insertu byla provedena PCR z bakteriálních kolonií a elektroforéza v 0,5% agarosovém gelu s produkty PCR, výsledky elektroforézy jsou na obrázku 9 a 10 na straně 47. Pozitivní klony byly použity pro přípravu nízkoobjemové produkce DNA. Správnost sekvence byla ověřena sekvenací a byla připravena vysokoobjemová produkce DNA. Byly tak vytvořeny dva vektory nesoucí geny pro CAR, pNKCAR\_NKp30\_LBD a pNKCAR\_NKp30\_Stalk. Koncentrace DNA z vysokoobjemových produkcí jsou uvedeny v tabulce 11 na straně 48 a mapy plasmidů nesoucí geny pro výsledné CAR konstrukty na obrázku 11 na straně 48.



**Obrázek 8: Elektroforéza plasmidu pNKCAR\_CD8h štěpeného restrikční endonukleasou EcoRI. 1 kb standard (1 kb), zleva v dráze 3 a 4 štěpený plasmid (P\*), v dráze 7 kontrola-neštěpený plasmid (P), 0,5% agarosový gel, očekávaná velikost produktu je 8044 bp.**



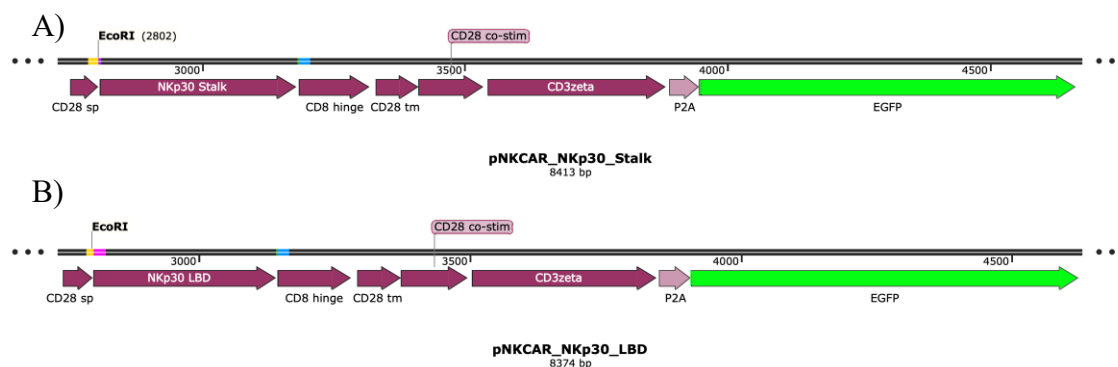
**Obrázek 9: Elektroforéza PCR z bakteriálních kolonií konstruktů pNKCAR\_NKp30\_LBD.** 100 bp standard (100 bp), 0,5% agarosový gel, očekávaná velikost PCR produktu je 514 bp. Jako pozitivní byly vyhodnoceny vzorky v dráze 4, 6 a 12.



**Obrázek 10: Elektroforéza v agarosovém gelu PCR z bakteriálních kolonií konstruktů pNKCAR\_NKp30\_Stalk.** 0,5% agarosový gel, očekávaná velikost PCR produktu je 553 bp. Jako pozitivní byl vyhodnocen vzorek v dráze 2.

**Tabulka 11: Koncentrace vysokoobjemové produkce plasmidové DNA pNKCAR\_NKp30\_LBD a NKp30\_Stalk**

DNA	koncentrace [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
pNKCAR_NKp30_LBD	2,6
pNKCAR_NKp30_Stalk	2,9

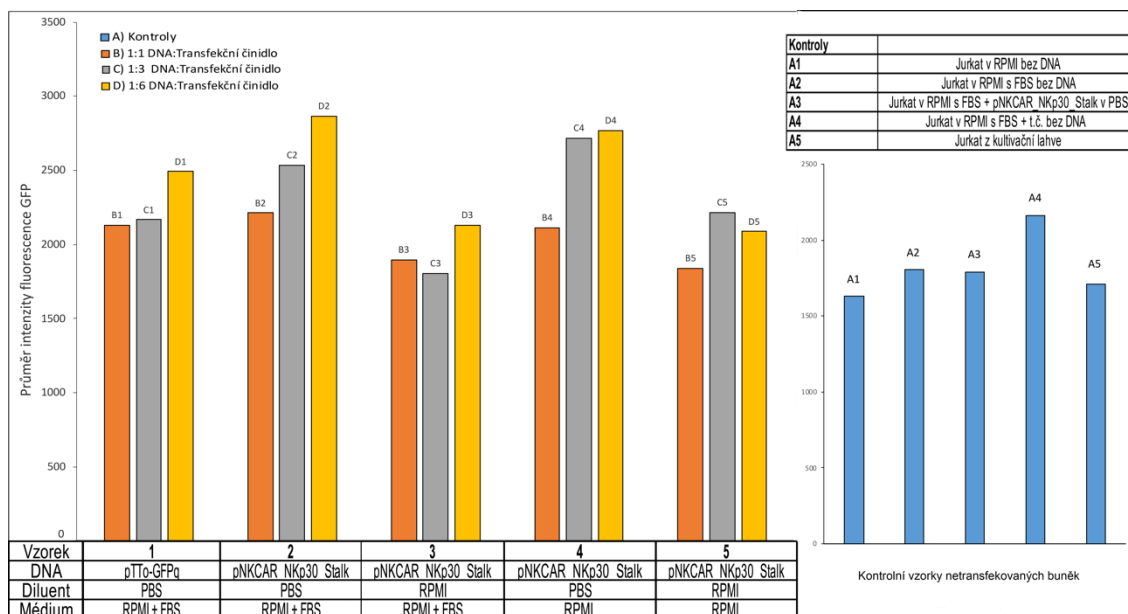


**Obrázek 11: Mapy plasmidů nesoucích geny pro CAR konstrukt. A) pNKCAR\_NKp30\_Stalk. B) pNKCAR\_NKp30\_LBD. Konstrukty se liší pouze přítomností „stalk“ domény. Vytvořeno v programu SnapGene [78].**

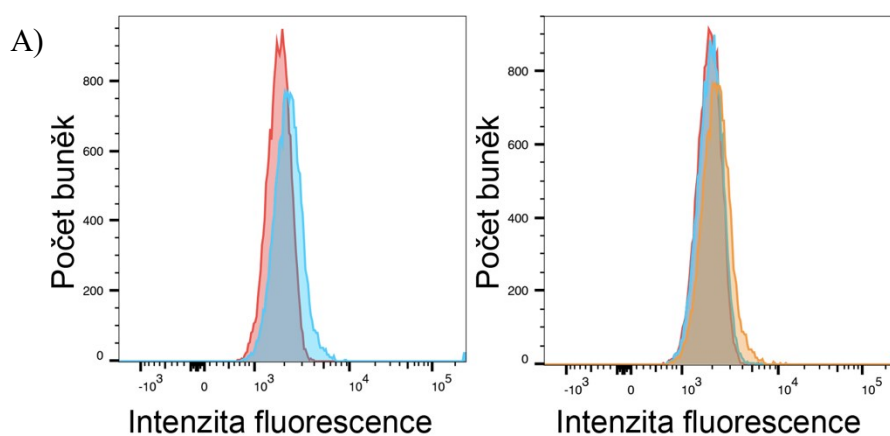
## 5.2 Transfekce buněčné linie Jurkat a průtoková cytometrie

Buňky linie Jurkat byly transiентně transfekovány pomocí XtremeGENE™ 360 Transfection Reagent. Optimalizační transfekce byla provedena pouze s konstruktem pNKCAR\_NKp30\_Stalk a kontrolním plasmidem pTTo-GFPq při 12 různých podmínkách. Oba plasmidy nesou gen pro GFP, které je exprimováno do cytosolu a slouží jako indikátor úrovně exprese. Nejvhodnější transfekční podmínka byla určována pomocí průtokové cytometrie a byla vybrána ta podmínka, ze které byl získán nejvyšší průměr intenzity fluorescence GFP. Transfekční podmínky a podmínky kultivace kontrolních vzorků jsou uvedeny v spolu s průměry intenzit fluorescence GFP transfekovaných buněk a kontrolních vzorků netransfekovaných buněk získaných z měření pomocí průtokové cytometrie na obrázku 12 na straně 49. Histogramy intenzit fluorescence GFP z měření pomocí průtokové cytometrie vybraných vzorků jsou na obrázku 13 na straně 49. Jako nejvhodnější se jevila podmínka D2 (viz obrázek 13), ale vzhledem k nízkým rozdílům průměrné intenzity fluorescence GFP mezi jednotlivými zvolenými podmínkami pro transfekci a průměrných intenzit fluorescence kontrolních vzorků netransfekovaných buněk lze soudit, že transfekce se příliš nezdařila.





**Obrázek 13: Graf průměru intenzit fluorescence GFP v buňkách linie Jurkat transfekovaných plasmidovými DNA pTTo-GFP a pNKCAR\_NKp30\_Stalk.** Transfekční mix byl připraven v hmotnostních poměrech DNA:Transfekční činidlo 1:1, 1:3 a 1:6. Jurkat buňky transfekované transfekčním mixem s plasmidovou DNA uvedenou v kolonce "DNA" řaděnou spolu s transfekčním činidlem do média RPMI nebo do pufru PBS (viz kolonka "Diluent") a po transfekci inkubovány za odlišných podmínek (viz kolonka "Médium"). Kontrolní vzorky netransfekovaných buněk (A1-A5).



**Obrázek 12: Porovnání intenzity fluorescence GFP v transfekovaných buňkách linie Jurkat.**

A) Porovnání buněk kultivovaných v RPMI médiu s pNKCAR\_NKp30\_Stalk DNA bez transfekčního činidla (červená) a buněk transfekovaných pNKCAR\_NKp30\_Stalk pomocí XtremeGENE™ 360 Transfection Reagent v hmotnostním poměru DNA:transfekční činidlo 1:6 kultivovaných v RPMI médiu (modrá).

B) Porovnání intenzity fluorescence GFP v buňkách transfekovaných XtremeGENE™ 360 Transfection Reagent (t. č.) v různých hmotnostních poměrech DNA:transfekční činidlo – 1:1 (červená), 1:3 (modrá),

## 6 Diskuse

Cílem této bakalářské práce byla příprava expresních vektorů kódující geny sekvencí elementů CAR s extracelulární doménou přirozeně cytotoxického receptoru NK buněk NKp30 se „stalk“ doménou nebo pouze s ligand vazebnou doménou a ověření biologické aktivity těchto konstruktů na buněčné membráně pomocí funkčních studií na buňkách linie Jurkat transfekovaných připravenými konstrukty. Pro měření účinnosti transfekce bylo využito GFP vnesené spolu s vektory jakožto reportérový gen a pro ověření aktivity biologického konstruktu měl být použit povrchový znak CD69 exprimovaný na povrchu buněk po aktivaci buňky po interakci NKp30 CAR s ligandem.

Pro tyto účely byl zakoupen komerčně dostupný plasmid pSLCAR\_CD19\_28z již kódující optimalizovaný CAR konstrukt (viz obrázek 3 na straně 42). Z komerčního plasmidu pSLCAR\_CD19\_28z byl připraven universální vektor vyštěpením původní sekvence CD8h pomocí celoplasmidové PCR. Celoplasmidová PCR byla pro přípravu universálního vektoru zvolena z důvodu neobvyklých štěpících míst pro restriční endonukleasy na plasmidu pSLCAR\_CD19\_28z, pro které nebyly v laboratoři k dispozici restriční endonukleasy a bylo ekonomičtější zvolit celoplasmidovou PCR, přestože její provedení bylo časově náročnější a poskytovalo nižší výnosy DNA štěpeného plasmidu vzhledem k vkládanému množství plasmidové DNA do jedné PCR reakce. Díky vhodnému navržení primerů byla do DNA sekvence mezi CD8h a signální peptid CD28 sp vložena sekvence pro restriční endonukleasu EcoRI poblíž již přítomného restričního místa pro endonukleasu KpnI, což zjednodušilo vkládání dalších insertů do vzniklého universálního vektoru pNKCAR\_CD8h.

Další inserty vkládané do universálního vektoru byly geny pro extracelulární doménu receptoru NKp30 amplifikované pomocí PCR z genu pro celý receptor NKp30 se „stalk“ doménu nebo pouze s ligand vazebnou doménou, které byly do universálního vektoru pNKCAR\_CD8h úspěšně vloženy a byly připraveny dva expresní konstrukty pNKCAR\_NKp30\_Stalk a pNKCAR\_NKp30\_LBD. Tento přístup byl zvolen z důvodu očekávaných odlišných intenzit interakcí CAR konstruktů exprimovaných na membráně buněk s ligandy NKp30, vyústující v odlišnou míru signalizace a aktivace buněk, jelikož „stalk“ doména receptoru NKp30 podporuje homooligomerizaci extracelulární domény vedoucí k silnějším interakcím s ligandy díky vyšší aviditě oligomerního komplexu [80]. „Stalk“ doména též pozitivně ovlivňuje signalizaci receptoru NKp30 přes CD3ζ doménu

a přímo se podílí na vazbě ligandů [81]. Předpokládá se, že díky těmto vlastnostem „stalk“ domény receptoru NKp30 se receptor NKp30 exprimovaný bez „stalk“ domény vyskytuje na membráně pouze jako monomer či dimer, naopak NKp30 exprimovaný se „stalk“ doménou na buněčné membráně oligomerizuje. Důležitou roli v interakci receptoru NKp30 s ligandem hraje též N - glykosylace na ligand vazebné doméně [49]. Zkoumání schopnosti receptoru NKp30 vázat ligandy v závislosti na N-glykosylaci nebylo předmětem této bakalářské práce.

Buněčná linie Jurkat byla jako modelová zvolena, jelikož je to buněčná linie odvozená od lymfocytů a disponuje obdobnými vlastnostmi jako NK buňky (například signalizací vedoucí k aktivaci buňky skrz CD3ζ doménu a expresi povrchového znaku CD69 po aktivaci buněk), ale neexprimuje na svém povrchu receptor NKp30, což se podařilo ověřit pomocí měření na průtokovém cytometru s Jurkat buňkami inkubovanými s anti-NKp30 monoklonální protilátkou (data nejsou součástí této práce). Zároveň mají všechny buňky této linie stejné vlastnosti, protože se jedná o imortalizovanou buněčnou linii. Pro práci mohl být použit i jiný druh buněk, například primární T lymfocyty izolované z krve dárců, jejichž izolace je ale časově náročná a kvalita imunitních buněk dárců je proměnlivá. Mohla být zvolena i některá z NK-buněčných linií, což by pro měření exprese NKp30 CAR na buněčné membráně vyžadovalo vyřazení genu pro NKp30, protože NK buňky běžně exprimují receptor NKp30.

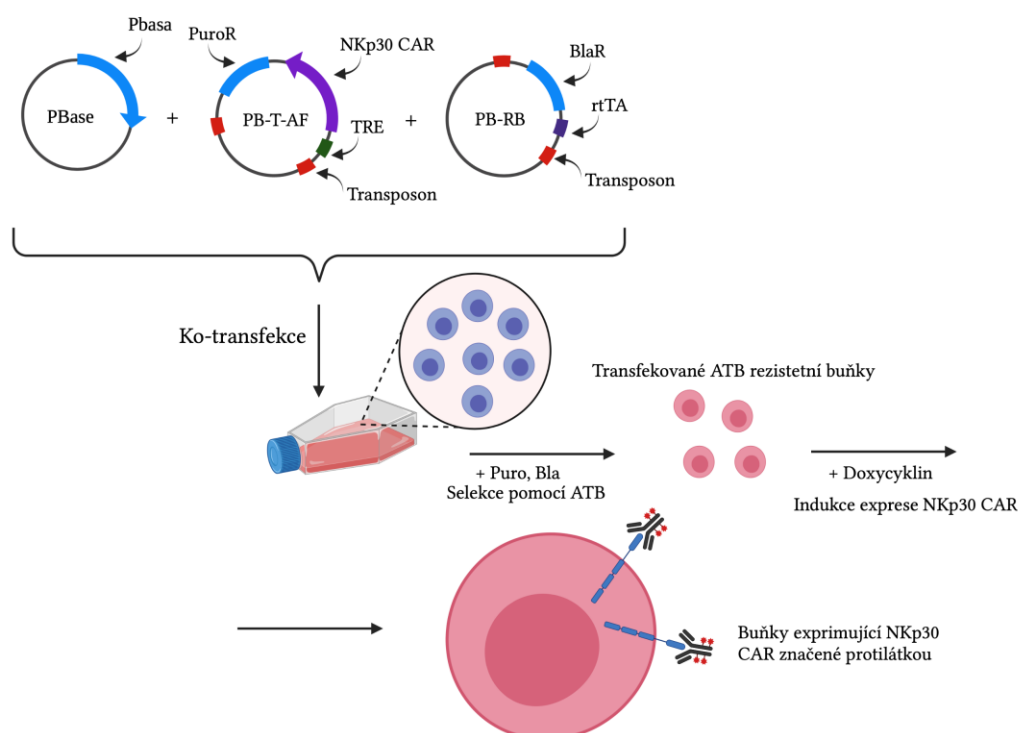
Vektory byly do buněk linie Jurkat vnášeny pomocí transienční chemické transfekce. Transienční transfekce je výhodná z důvodů úspory času, jelikož výsledky jsou známy během několika dní, zároveň pokud je její úspěšnost nízká nelze selektovat pozitivní klony selekčním tlakem, kdy je následně populace transfekovaných buněk expandována, protože vnesená DNA není součástí genomu buňky a nepřenáší se na další generace. Pro transfekci bylo zvoleno transfekční činidlo na bázi kationických lipidů, XtremeGENE™ 360 Transfection Reagent. Přestože výrobce deklaruje vysokou účinnost transfekce buněk linie Jurkat tímto činidlem, byla účinnost transfekce, jež byla měřena pomocí průtokové cytometrie skrz intenzitu fluorescence GFP exprimovaného do cytosolu, nízká. Rozdíly v průměrech intenzity fluorescence GFP, dle kterých byla účinnost transfekce vyhodnocována napříč zvolenými podmínkami pro optimalizační transfekci konstruktem pNKCAR\_NKp30\_Stalk, kontrolním plasmidem pTTo-GFPq a netransfekovanými buňkami byly nízké (viz obrázek 12 na straně 49). Měření rušila i vysoká autofluorescence Jurkat buněk v oblasti vlnových délek emise fluorescence GFP. Byla provedena další transfekce s oběma připravovanými konstrukty pouze v

podmínkách, které byly při optimalizační transfekci stanovené jako nejvhodnější, bohužel s obdobným výsledkem pro oba konstrukty. Příčinou nízké účinnosti transfekcí mohlo být nevhodné médium či pufr ve kterém byl připravován transfekční mix, roli mohlo hrát i stáří transfekčního činidla. Negativní vliv na úspěšnost transfekce mohla mít antibiotika, která byla přítomna v médiu a dalším faktorem, který mohl negativně ovlivnit transfekci, mohla být i doba inkubace, jejíž zkrácení či prodloužení mohlo též ovlivnit výsledky. Při prováděných experimentech byly buňky inkubovány s transfekčním činidlem vždy po dobu 48 hodin bez výměny média. Použití jiného typu chemického transfekčního činidla by mohlo též zlepšit výtěžek transfekce. Z provedených měření se zároveň zjistilo, že je vhodnější připravovat transfekční mix do pufru, není potřeba přidávat do média ve kterém jsou transfekované buňky inkubovány transfekčním mixem FBS a minimální hmotnostní poměr DNA:transfekční činidlo by měl být alespoň 1:3.

Pro další experimenty za účelem ověření biologické aktivity NKp30 CAR konstruktů na buněčné membráně byla zvolena stabilní chemická transfekce buněčné linie Jurkat vektory s NKp30 CAR receptory. Principem stabilní transfekce je inkorporace genu pro cílový protein do buněčného chromozomu, díky čemuž další generace buněk tento gen dědí, gen může být stabilně exprimován, a i při nízké účinnosti transfekce lze získat velké množství pozitivních buněk selekcí a expanzí pozitivní populace. Stabilní transfekci lze provést mnoha způsoby, například pomocí lentivirové infekce, což je metoda úspěšná jak u jednoduše transfekovatelných buněk, tak u obtížně transfekovatelných buněk (mezi které patří buňky linie Jurkat a lymfocyty obecně). Lentivirová infekce však přináší jistá úskalí, protože součástí procesu je práce s infekčním materiálem. Z tohoto důvodu byl pro stabilní transfekci z dostupných možností vybrán systém piggyBac, nevirální transpozonový kotransfekční systém umožňující indukci exprese proteinu na povrchu buňky pomocí indukce doxycyklinem, což zajistí dostatečnou expresi proteinu na povrchu buněk.

Kotransfekce pomocí systému piggyBac se provádí pomocí tří plasmidů, dvou nesoucích geny rozpoznávané transposasou a třetí nesoucí gen pro transposasu. První plasmid se sekvencemi rozpoznávanými transposasou (modifikovaný PB-T-PAF) kóduje gen pro puromycinovou rezistenci, promotor reagující na tetracyklin (nebo jeho deriváty) pod který je vložen gen pro cílový protein (zde NKp30 CAR). Druhý plasmid opět obsahuje sekvence rozpoznávané transposasou (PB-RB) kóduje blasticidinovou rezistenci a reversní tetracyklinový transaktivační induktor, který v přítomnosti doxycyklinu indukuje expresi cílového proteinu. Geny, které nesou tyto dva plasmidy

jsou inkorporovány do chromozomu buněk pomocí transposasy (PBasa), která je kódována na třetím plasmidu (PBase), který je transfekován pouze transientně. Transposasa vnáší sekvence z plasmidů PB-T-PAF a PB-RB ohraničené transposony do buněčného chromozomu. Buňky, do jejichž chromosomů byla DNA úspěšně vložena, jsou následně selektovány pomocí kultivace s neomycinem a blasticidinem. Po selekci je možné indukovat expresi proteinu doxycyklinem a úroveň exprese je možné upravovat přidáním různého množství doxycyklinu [82]. Schéma transfekce je uvedeno na obrázku 14.



**Obrázek 14: Schéma kotransfekce pomocí kotransfekčního systému piggyBac s expresí indukovatelnou pomocí doxycyklinu.** Plasmid PBase nese transposasu (Pbase), plasmid PB-T-AF nese DNA sekvence pro NKp30 CAR, puromycinovou rezistenci (PuroR) a promotor reagující na tetracyklin (TRE) ohraničené transposony. Plasmid PB-RB nese sekvence pro blasticidinovou rezistenci (BlaR) a reversní tetracyklinový transaktivační induktor (rtTA). Vytvořeno pomocí on-line nástroje Biorender [83].

Z připravených vektorů pNKCAR\_NKp30\_Stalk a pNKCAR\_NKp30\_LBD byly NKp30 CAR konstrukty amplifikovány pomocí PCR a vloženy do linearizovaného vektoru PB-T-PAF, byly připraveny nízkoobjemové produkce a správnost sekvencí byla ověřena sekvenační reakcí. Dalším krokem bude stabilní transfekce pomocí piggyBac kotransfekčního systému, selekce pozitivních klonů, následně bude ověřena přítomnost NKp30 CAR konstruktů na membráně a schopnost aktivace buněk skrz NKp30 CAR po

interakci s ligandy přes expresi CD69 na buněčné membráně, které budou ověřeny značením monoklonálními protilátkami anti-NKp30 a anti-CD69 s fluorescenční značkou pomocí měření na průtokovém cytometru.

## 7 Závěr

- Podařilo se připravit universální vektor pro přípravu reportérových linií inspirovaných CAR technologií
- Podařilo se připravit vektory nesoucí DNA sekvence kódující CAR s extracelulární ligand vazebnou doménou NKp30 se „stalk“ doménou nebo pouze s ligand vazebnou doménou
- Nepodařilo se chemicky transientně transfekovat Jurkat buňky
- Podařilo se připravit vektory kódující NKp 30 CAR konstrukty pro transfekci pomocí piggyBac kotransfekčního systému

## 8 Použitá literatura

1. Huston, D.P. (1997) The Biology of the Immune System. *JAMA* **278**, 1804–14.
2. Parkin, J., Cohen, B. (2001) An overview of the immune system. *The Lancet* **357**, 1777–89.
3. Delves, P.J., Roitt, I.M. (2000) The Immune System. *N. Engl. J. Med.* **343**, 37–49.
4. Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., Castillo Ferrer, C. (2016) Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* **148**, 125–39.
5. Hořejší, V., Bartůňková, J. (2003) *Základy imunologie*. 3. vyd., Triton, Praha.
6. Nicholson, L.B. (2016) The immune system. *Essays Biochem.* **60**, 275–301.
7. Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., Roitt, I.M. (2011) in *Roitt's Essential Immunology*. 11. vyd., John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken, Spojené království. S 35–96.
8. Paul, W.E. (2012) *Fundamental Immunology*. 7. vyd., Wolters Kluwer, Filadelfie, USA. S 47–67.
9. Artis, D., Spits, H. (2015) The biology of innate lymphoid cells. *Nature* **517**, 293–301.
10. Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E. (2013) Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 145–49.
11. Kansler, E.R., Li, M.O. (2019) Innate lymphocytes—lineage, localization and timing of differentiation. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 627–33.
12. Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Spits, H. (2018) Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* **174**, 1054–66.
13. Lanier, L.L. (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495–502.
14. Kumar, S. (2018) Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology* **154**, 383.
15. Diefenbach, A., Colonna, M., Koyasu, S. (2014) Development, Differentiation, and Diversity of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* **41**, 354–65.
16. Spits, H., Di Santo, J. (2011) The expanding family of innate lymphoid cells: Regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* **12**, 21–27.



17. Zúñiga-Pflücker, J.C. (2004) T-cell development made simple. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 67 – 72.
18. Taniuchi, I. (2018) CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 579–601.
19. Kumar, B.V., Connors, T., Farber, D.L. (2018) Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity* **48**, 202–13.
20. Kaech, S.M., Wherry, E.J., Ahmed, R. (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 251–62.
21. Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K., Rizzi, M. (2014) B cell Biology: An Overview. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **14**, 434.
22. Kurosaki, T. (2010) B-lymphocyte biology. *Immunol. Rev.* **237**, 5–9.
23. Virella, G. (2019) *Medical Immunology*. 7. vyd., Taylor & Francis Group, Milton, Spojené království, s 11-23.
24. Siemińska, I., Poljańska, E., Baran, J. (2021) Granulocytes and Cells of Granulocyte Origin—The Relevant Players in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3801.
25. Keohane, E.M., Otto, C.N., Walenga, J.M. (2015) *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. 5. vyd., Elsevier Health Sciences, Amsterdam, Nizozemsko. S. 149-160.
26. Porwit, A., McCullough, J., Erber, W.N. (2011) *Blood and Bone Marrow Pathology E-Book*. 2. vyd., Elsevier Health Sciences, Amsterdam, Nizozemsko.
27. Subramanian, N., Torabi-Parizi, P., Gottschalk, R.A., Germain, R.N., Dutta, B. (2015) Network representations of immune system complexity. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **7**, 13–38.
28. Kotsias, F., Cebrian, I., Alloatti, A. (2019) Antigen processing and presentation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **348**, 69–121.
29. Valečka, J., Almeida, C.R., Su, B., Pierre, P., Gatti, E. (2018) Autophagy and MHC-restricted antigen presentation. *Mol. Immunol.* **99**, 163–70.
30. Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., Amigorena, S. (2012) Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 557–69.
31. Mortha, A., Burrows, K. (2018) Cytokine Networks between Innate Lymphoid Cells and Myeloid Cells. *Front. Immunol.* **9**.
32. Ferlazzo, G., Morandi, B. (2014) Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **5**.

33. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011) Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* **30**, 16–34.
34. Sivori, S., Vacca, P., Del Zotto, G., Munari, E., Mingari, M.C., Moretta, L. (2019) Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 430–41.
35. Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.-L., Guo, C., Schwer, B. (2013) Mechanisms of Programmed DNA Lesions and Genomic Instability in the Immune System. *Cell* **152**, 417–29.
36. Treanor, B. (2012) B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology* **136**, 21 – 27.
37. von Essen, M.R., Kongsbak, M., Geisler, C. (2012) Mechanisms behind Functional Avidity Maturation in T Cells. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**.
38. Turner, S.J., Doherty, P.C., McCluskey, J., Rossjohn, J. (2006) Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 883–94.
39. Carrillo-Bustamante, P., Keşmir, C., de Boer, R.J. (2016) The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics* **68**, 3–18.
40. Cagnano, E., Hershkovitz, O., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Golder, A., Sion-Vardy, N., Bogdanov-Berezovsky, A., Mandelboim, O., Benharroch, D., Porgador, A. (2008) Expression of Ligands to NKp46 in Benign and Malignant Melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 972–79.
41. Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., Vivier, E. (2014) Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 221–29.
42. Rückrich, T., Steinle, A. (2013) 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**, 17725–33.
43. Haanen, J.B., Cerundolo, V. (2018) NKG2A, a New Kid on the Immune Checkpoint Block. *Cell* **175**, 1720–22.
44. Pende, D., Falco, M., Vitale, M., Cantoni, C., Vitale, C., Munari, E., Bertaina, A., Moretta, F., Del Zotto, G., Pietra, G., Mingari, M.C., Locatelli, F., Moretta, L. (2019) Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front. Immunol.* **10**.
45. Mariuzza, R.A., Agnihotri, P., Orban, J. (2020) The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J. Biol. Chem.* **295**, 914–25.

46. Dong, D., Zheng, L., Lin, J., Zhang, B., Zhu, Y., Li, N., Xie, S., Wang, Y., Gao, N., Huang, Z. (2019) Structural basis of assembly of the human T cell receptor–CD3 complex. *Nature* **573**, 546–52.
47. The Pymol Molecular Graphics System (Schrödinger, LLC), URL <https://pymol.org/2/> [Viděno 6. 6. 2021].
48. Joyce, M.G., Tran, P., Zhuravleva, M.A., Jaw, J., Colonna, M., Sun, P.D. (2011) Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor NKp30 and identification of its ligand binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 6223–28.
49. Skořepa, O., Pazický, S., Kalousková, B., Bláha, J., Abreu, C., Ječmen, T., Rosůlek, M., Fish, A., Sedivy, A., Harlos, K., Dohnálek, J., Skálová, T., Vaněk, O. (2020) Natural Killer Cell Activation Receptor NKp30 Oligomerization Depends on Its N - Glycosylation. *Cancers* **12**.
50. Pinheiro, P.F., Justino, G.C., Marques, M.M. (2020) NKp30 - A prospective target for new cancer immunotherapy strategies. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 4563–80.
51. Wang, W., Guo, H., Geng, J., Zheng, X., Wei, H., Sun, R., Tian, Z. (2014) Tumor-released Galectin-3, a Soluble Inhibitory Ligand of Human NKp30, Plays an Important Role in Tumor Escape from NK Cell Attack. *J. Biol. Chem.* **289**, 33311–19.
52. Taguchi, T., Mukai, K. (2019) Innate immunity signalling and membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **59**, 1–7.
53. Dorrington, M.G., Fraser, I.D.C. (2019) NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front. Immunol.* **10**.
54. Lanier, L.L. (2004) Nk cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–74.
55. Kwak, K., Akkaya, M., Pierce, S.K. (2019) B cell signaling in context. *Nat. Immunol.* **20**, 963–69.
56. Huang, W., August, A. (2015) The signaling symphony: T cell receptor tunes cytokine-mediated T cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 477–85.
57. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., Mandelboim, O. (2013) Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* **34**, 182–91.
58. Pandey, R., DeStephan, C.M., Madge, L.A., May, M.J., Orange, J.S. (2007) NKp30 ligation induces rapid activation of the canonical NF-κB Pathway in NK Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 7385–96.
59. Kannan, A., Huang, W., Huang, F., August, A. (2012) Signal Transduction via the T cell Antigen Receptor in naïve and effector/memory T cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2129–34.

60. August, A., Ragin, M.J. (2012) Regulation of T-cell Responses and Disease by Tec Kinase Itk. *Int. Rev. Immunol.* **31**, 155–65.
61. Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S. (2009) T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619.
62. Zhang, C., Liu, J., Zhong, J.F., Zhang, X. (2017) Engineering CAR-T cells. *Biomark. Res.* **5**.
63. Ramos, C.A., Dotti, G. (2011) Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 855–73.
64. Oldham, R.A.A., Medin, J.A. (2017) Practical considerations for chimeric antigen receptor design and delivery. *Expert Opin. Biol. Ther.* **17**, 961–78.
65. Sermer, D., Brentjens, R. (2019) CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematol. Oncol.* **37**, 95–100.
66. Xie, G., Dong, H., Liang, Y., Ham, J.D., Rizwan, R., Chen, J. (2020) CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine* **59**, 102975.
67. Pfefferle, A., Huntington, N.D. (2020) You Have Got a Fast CAR: Chimeric Antigen Receptor NK Cells in Cancer Therapy. *Cancers* **12**, 706.
68. Tang, X., Yang, L., Li, Z., Nalin, A.P., Dai, H., Xu, T., Yin, J., You, F., Zhu, M., Shen, W., Chen, G., Zhu, X., Wu, D., Yu, J. (2018) First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am. J. Cancer Res.* **8**, 1083–89.
69. Xiao, L., Cen, D., Gan, H., Sun, Y., Huang, N., Xiong, H., Jin, Q., Su, L., Liu, X., Wang, K., Yan, G., Dong, T., Wu, S., Zhou, P., Zhang, J., Liang, W., Ren, J., Teng, Y., Chen, C., Xu, X.H. (2019) Adoptive Transfer of NKG2D CAR mRNA-Engineered Natural Killer Cells in Colorectal Cancer Patients. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **27**, 1114–25.
70. Debnath, M., Prasad, G.B.K.S., Bisen, P.S. (2010) in *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*, Debnath, M., Prasad, G.B.K.S., Bisen, P.S. (Springer Netherlands, Dordrecht), s 71–84.
71. Rydzek, J., Nerreter, T., Peng, H., Jutz, S., Leitner, J., Steinberger, P., Einsele, H., Rader, C., Hudecek, M. (2019) Chimeric Antigen Receptor Library Screening Using a Novel NF- $\kappa$ B/NFAT Reporter Cell Platform. *Mol. Ther.* **27**, 287–99.
72. Meager, A. (2002) Biological assays for interferons. *J. Immunol. Methods* **261**, 21–36.

73. Bloemberg, D., Nguyen, T., MacLean, S., Zafer, A., Gadoury, C., Gurnani, K., Chattopadhyay, A., Ash, J., Lippens, J., Harcus, D., Pagé, M., Fortin, A., Pon, R.A., Gilbert, R., Marcil, A., Weeratna, R.D., McComb, S. (2020) A High-Throughput Method for Characterizing Novel Chimeric Antigen Receptors in Jurkat Cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **16**, 238–54.
74. NEB Tm Calculator, URL: <https://tmcalculator.neb.com/#!/main> [Viděno 30. 3. 2021].
75. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Mini kit for gel extraction and PCR clean up, URL: <https://www.mn-net.com/media/pdf/02/1a/74/Instruction-NucleoSpin-Gel-and-PCR-Clean-up.pdf> [Viděno 4. 6. 2021].
76. Mix & Go E. coli Transformation Kit & Buffer Set (2021), URL: [https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_t3001\\_t3002\\_mix\\_go\\_e.\\_coli\\_transformation\\_kit\\_buffer\\_set.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_t3001_t3002_mix_go_e._coli_transformation_kit_buffer_set.pdf) [Viděno 4. 6.2021].
77. NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA, URL: <https://www.mn-net.com/media/pdf/45/51/02/Instruction-NucleoSpin-Plasmid.pdf> [Viděno 4. 6. 2021].
78. SnapGene<sup>®</sup> software (Insightful Science), URL <https://www.snapgene.com/> [viděno 4. 6. 2021].
79. NucleoBond Xtra Maxi kit for transfection-grade plasmid DNA, URL: <https://www.mn-net.com/media/pdf/ed/82/0f/Instruction-NucleoBond-Xtra.pdf> [Viděno 9. 6. 2021].
80. Herrmann, J., Berberich, H., Hartmann, J., Beyer, S., Davies, K., Koch, J. (2014) Homooligomerization of the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 Ectodomain Increases Its Binding Affinity for Cellular Ligands. *J. Biol. Chem.* **289**, 765–77.
81. Hartmann, J., Tran, T.-V., Kaudeer, J., Oberle, K., Herrmann, J., Quagliano, I., Abel, T., Cohnen, A., Gatterdam, V., Jacobs, A., Wollscheid, B., Tampé, R., Watzl, C., Diefenbach, A., Koch, J. (2012) The Stalk Domain and the Glycosylation Status of the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 Are Important for Ligand Binding. *J. Biol. Chem.* **287**, 31527–39.
82. Li, Z., Michael, I.P., Zhou, D., Nagy, A., Rini, J.M. (2013) Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 5004–9.
83. BioRender, URL: <https://biorender.com/> [Viděno 2. 6. 2021].