UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta
Katedra Biochemie

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie

Maxmilián Hejl

Optimalizace *in vitro* testů zaměřených na aktivaci NK buněk

Optimization of *in vitro* tests focused on activation of NK cells

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Barbora Kalousková

Praha, 2021

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

V Praze dne …….

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto způsobem poděkoval Mgr. Barboře Kalouskové za trpělivost, všudypřítomnou ochotu učit mě novým metodám, pomoc při sestavování pokusů, měření na průtokovém cytometru a poskytnutí potřebných materiálů. Další velký dík patří vedoucímu laboratoře č. 204 RNDr. Ondřejovi Vaňkovi, Ph.D. za jeho cenný čas, který mi věnoval při předávání zkušeností a během supervize mé teoretické i praktické činnosti. V neposlední řadě nesmím opomenout Mgr. Ondřeje Skořepu, Matouše Tulpu a celý kolektiv, jenž mi byl inspirací a vytvářel příjemnou nejen pracovní atmosféru. Poslední poděkování bych rád věnoval mé rodině a přátelům za nesmírnou podporu při studiu.

ABSTRAKT

Nádorová onemocnění každým rokem obsazují horní příčky v příčinách úmrtí lidí napříč všemi kontinenty. Mezi slibné potenciální léčebné metody, kromě hledání nových léků cílících selektivněji na nekontrolovatelně dělící se buňky, patří i tzv. imunoterapie. Cílem tohoto druhu léčby je zvýšení cytotoxicity efektorových buněk, například NK buněk či T lymfocytů. Tohoto efektu je možné docílit inkubací efektorů s vybranými cytokiny nebo ligandy, které přitáhnou efektory k cílovým buňkám a navodí zvýšení počtu aktivačních receptorů společně.

Tato práce se zabývá hledáním vhodných koncentrací, kombinací a poměrů aktivačních ligandů NK buněk s cytokiny za účelem zvýšení procenta aktivovaných NK buněk. K aktivaci NK buněk byl použit povrch destičky dekorovaný aktivačními ligandy, který nahrazoval povrch ideální nádorové buňky. Míra aktivace byla měřena detekcí molekuly CD107a, povrchového znaku aktivace NK buněk. Vznikl tak jednoduchý syntetický systém schopný ověřit biologickou aktivitu rekombinantně připravených NK buněčných aktivačních ligandů. Možné budoucí využití výsledků této práce je při dalším zkoumání připravených bispecifických fúzních proteinů, které mají terapeutický potenciál aktivovat NK buňky.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňky, cytotoxické testy, průtoková cytometrie, nanoprotilátky, imunoterapie

ABSTRACT

Every year, cancer tops the list of causes of death for people across all continents. Promising potential therapies, in addition to finding new drugs targeting more selectively the uncontrollably dividing cells, include so-called immunotherapy. The aim of this type of treatment is to increase the cytotoxicity of the effector cells, such as natural killer cells or T lymphocytes. This effect can be achieved by incubating effectors with selected cytokines or ligands that induce an increase in the number of activating receptors as well as to attract effectors to cancer cells.

The main focus of this thesis was finding appropriate concentrations, combinations and ratios of natural killer cells activating ligands with cytokines to increase the percentage of activated NK cells. A plate surface coated with activation ligands was used to activate NK cells as a ment of an ideal tumour cell. The range of activation was measured by detecting the molecule CD107a, a surface marker of NK cell activation. This resulted in a simple synthetic system capable of verifying the biological activity of recombinantly prepared NK cell activation ligands. A possible future application of the results of this work is in further investigation of prepared bispecific fusion proteins that have therapeutic potential to activate NK cells.

KEY WORDS

NK cells, cytotoxic assays, flow cytometry, nanobodies, immunotherapy

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(v/v)	objem/objem (z angl. volume/volume)
(w/v)	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)
(w/w)	hmotnost/hmotnost (z angl. weight/weight)
AA	akrylamid
AFC	allofykocyanin, fluorescenční barvivo
APC	buňky předkládající antigen (z angl. antigen presenting cell)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulphate)
bp	páry bazí (z angl. base pair)
BiKe	bispecifické molekuly přitahující NK buňky k nádorovým buňkám (z angl. bipecific killer cell engagers)
CAR	chimérni antigenní receptor (z angl. chimeric antigen receptor)
CD	diferenciační skupina, základ nomenklatury znaků exprimovaných na povrchu buňek (z angl. cluster of diferentiation)
Da	Dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
dH_2O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	směs deoxynukleosidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
FBS	fetální hovězí sérum, získané z krve plodu, doplněk pro výživu buněčné kultury (z angl. fetal bovine serum)
HEK293T	linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (z angl. human embryonic kidney 293 cells)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula třídy 1 (z angl. intercellular adhesion molecule 1)
IgR	imunoglobulinový receptor nacházející se na lymfocytech
IL	interleukin, základ nomenklatury signálních molekul buněk imunitního systému, řadí se pod cytokiny
INF-γ	interferon gamma, cytokin
ITAM	imunoreceptorový aktivační motiv využívající tyrosiny, součást signální kaskády NK buněk (z angl. immunereceptor tyrosine-based activating motif)
ITIM	imunoreceptorový inhibiční motiv využívající tyrosiny, součást signální kaskády NK buněk (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)
JAK	Janusovy kinázy, součást signální kaskády NK buněk
kbp	kilobáze (jednotka délky DNA) (z angl. kilobase pair)

KIR	NK buněčné inhibiční receptory podobné imunoglobulinům (z angl. killer cell immunoglobulin-like receptors)
LAMP-1	lysozomálně asociovaný membránový protein 1, v terminologii diferenciačních skupin má značení CD107a, jedná se o aktivační receptor (z angl. lysosomal-associated membrane protein 1)
LFA-1	antigen spojený s funkcí lymfocytů 1 (z angl. lymphocyte function-associated antigen 1)
MHC glykoprotein	glykoprotein hlavního histokompatibilního komplexu
MICA	ligand NK buněčného receptoru NKG2D podobný glykoproteinům hlavního histokopatibilního komplexu první třídy (z angl. MHC class 1 polypeptide-related sequence A)
MICB	ligand NK buněčného receptoru NKG2D podobný glykoproteinům hlavního histokopatibilního komplexu první třídy (z angl. MHC class 1 polypeptide-related sequence B)
NK buňky	přirozeně zabijácké buňky (z angl. natural killer)
NKT buňky	přirozeně zabijácké T buňky (z angl. natural killer T cells)
NKG2D	receptor NK buněk skupiny 2D (z angl. natural killer group 2D)
PBS	fosfátem pufrovaný solný roztok (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z polymerase chain reaction)
scFv	fragment protilátky složený z variabilního segmentu lehkého a těžkého řetězce (z angl. single-chain fragment variable)
SDS	dodecylsíran sodný (z angl. sodium dodecyl sulphate)
SDS elektroforéza	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného
STAT	signální transduktory a aktivátory trakripce (z angl. signal transducer and activator of transcription)
TCR	T buněčný receptor (z angl. T cell receptor)
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGF-β	transformační růstový faktor β, cytokin (z angl. transforming growth factor β)
TNF-α	tumor nekrotizující faktor alfa, cytokin
Treg	regulační T lymfocyty
TriKe	trispecifické molekuly přitahující NK buňky k nádorovým buňkám s navázaným interleukinem (z angl. trispecific killer cell engagers)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ **3**

ABSTRAKT **4**

KLÍČOVÁ SLOVA **4**

ABSTRACT **5**

KEY WORDS **5**

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK **6**

1. TEORETICKÝ ÚVOD **10**

1.1. IMUNITNÍ SYSTÉM 10
1.1.1. Vrozená imunita *10*
1.1.2. Adaptivní imunita *10*
1.2. B LYMFOCYTY 11
1.3. T LYMFOCYTY 12
1.4. NK BUŇKY 13
1.4.1. Adheze NK buněk *15*
1.4.2. Inhibiční receptory *15*
1.4.3. Aktivace NK buněk *16*
1.4.4. Polarizace *17*
1.4.5. Degranulace a cytolytické procesy *18*
1.5. CYTOKINY 18
1.5.1. Interleukin-2 ..... *19*
1.5.2. Interleukin-12 (IL-12) *20*
1.5.3. Interleukin-15 ..... *21*
1.6. TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ NK BUNĚK V BOJI PROTI RAKOVINĚ 22
1.6.1. Genetické modifikace NK buněk *22*
1.6.2. Použití bispecifických proteinů *22*

2. CÍLE PRÁCE **24**

3. MATERIÁL **25**

3.1. PŘÍSTROJE A POMŮCKY 25
3.2. CHEMIKÁLIE A KOMERČNÍ SOUPRAVY 26
3.3. ENZYMY 27
3.4. PROTILÁTKY 27
3.5. PŘIPRAVENÉ PUFRY A ROZTOKY 27
3.6. BAKTERIÁLNÍ KMENY A BUNĚČNÉ LINIE 28
3.7. BAKTERIÁLNÍ KMENY A BUNĚČNÉ LINIE 28
3.9. POUŽITÉ VEKTORY 29
3.9. POUŽITÉ PRIMERY A JEJICH SEKVENCE 29

4. METODY **30**

4.1. AMPLIFIKACE GENU POLYMERÁZOVOU ŘETĚZOVOU REAKCÍ 30
4.2. AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA 31
4.3. RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ PRODUKTŮ PCR A EXPRESNÍCH PLAZMIDŮ 31

4.4. EXTRAKCE A PŘEČIŠTĚNÍ DNA Z GELU 32
4.5. VNESENÍ GENU DO LINEARIZOVANÉHO PLAZMIDU 32
4.6. TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BAKTERIÍ 33
4.7. NÍZKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDOVÝCH DNA 33
4.8. NÍZKOOBJEMOVÁ IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA 33
4.9. VELKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDOVÉ DNA A JEJÍ IZOLACE 34
4.10. POČÍTÁNÍ A TRANSFEKCE BUNĚK HEK293T 35
4.11. AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE A KONCENTROVÁNÍ PROTEINU 36
4.12. GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE A MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINU VE FRAKCÍCH 36
4.13. VÝPOČET MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI ICAM-1 37
4.14. SDS ELEKTROFORÉZA 37
4.15. STANOVENÍ CYTOTOXICITY NK BUNĚK 38
4.15.1. Izolace NK buněk 38
4.15.2. Počítání NK buněk a jejich inkubace s interleukiny 39
4.15.3. Pokrytí jamek proteiny a in vitro aktivace NK buněk 39
4.15.7. Průtoková cytometrie 42

5. VÝSLEDKY 43

5.15. PŘÍPRAVA PLAZMIDŮ PRO PRODUKCI PROTEINŮ 43
5.16. PRODUKCE A PURIFIKACE PROTEINŮ 47
5.17. IZOLACE NK BUNĚK Z KRVE 49
5.18. OPTIMALIZACE CYTOTOXICKÝCH POKUSŮ POMOCÍ PŘIPRAVENÝCH REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ ICAM-1 A MICA 50

6. DISKUZE 54

7. ZÁVĚR 57

POUŽITÁ LITERATURA 58

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. IMUNITNÍ SYSTÉM

Všechny organismy se nachází v nepředstavitelně komplexní síti vztahů, přičemž každý jednotlivec se snaží identifikovat a neutralizovat hrozby, které mu hrozí. Přes celou lidskou historii se setkáváme s pandemiemi, které měly za následky hromadné vymírání. Abychom zvládli tuto hrozbu do budoucna, musíme pochopit, jak maximalizovat potenciál tohoto sofistikovaného obranného mechanismu [1].

1.1.1. Vrozená imunita

První obrannou linii tvoří fyzické bariéry, jako jsou epiteliální buňky propojené těsnými spoji, řasinkovým epitelem či vrstvy hlenu, které převrstvují např. gastrointestinální či dýchací trakt [2]. Následuje aktivní obrana, tou se rozumí vrozená imunita, jejichž složky jsou zakódovány v genomu, selektují se a předávají napříč celou evolucí [2,3]. Mezi vrozenou imunitu se řadí fagocytující buňky (neutrofily, monocyty a makrofágy), buňky uvolňující zánětlivé mediátory (bazofily, žírné buňky a eozinofily) a přirozeně zabijácké (z angl. natural killer, NK) buňky [4,5].

Makrofágy derivované z monocytů pohlcují potenciální patogeny, mrtvé nebo jinak stresem poškozené buňky, čímž zachovávají homeostázi organismu. Fagocytované mikroorganismy jsou vystaveny širokému spektru toxických intracelulárních molekul např. kyselině chlorné, radikálům kyslíku, oxidu dusnatému či lytickým enzymům [6].

Langerhansovy buňky, které patří k dendritickým buňkám, endocytují extracelulární antigeny. Při setkání se s patogenem se tyto buňky aktivují a pomocí složitých mechanismů se změní na buňky prezentující antigen (z angl. antigen presenting cells, APC) [6,7]. Další způsob jejich aktivace spočívá přes receptorové rozpoznání přítomnosti molekul interferonu-α, které se uvolňují z buněk napadených viry. Výsledkem je produkce cytokinů, jenž mobilizují složky adaptivní imunity [6,8].

Zvláštním případem jsou přirozeně zabijácké buňky. Obvykle jsou řazeny pod vrozenou imunitu, avšak vykazují i vlastnosti adaptivní imunity, jako je např. imunologická paměť [9,10].

Již zde je vidět, že adaptivní a vrozená imunita nepůsobí samostatně, nýbrž obě kooperují společně. Obvykle však vrozená odezva představuje první obranný mechanismus a adaptivní odezva se stává prominentní po několika dnech [2,4].

1.1.2. Adaptivní imunita

Vrozený imunitní systém sice poskytuje okamžitou ochranu, ale v nejlepším případě má krátkodobou paměť [3]. Tou se rozumí schopnost imunitního systému připomenout si setkání s určitým specifickým antigenem a kvantitativně i kvalitativně vyvolat

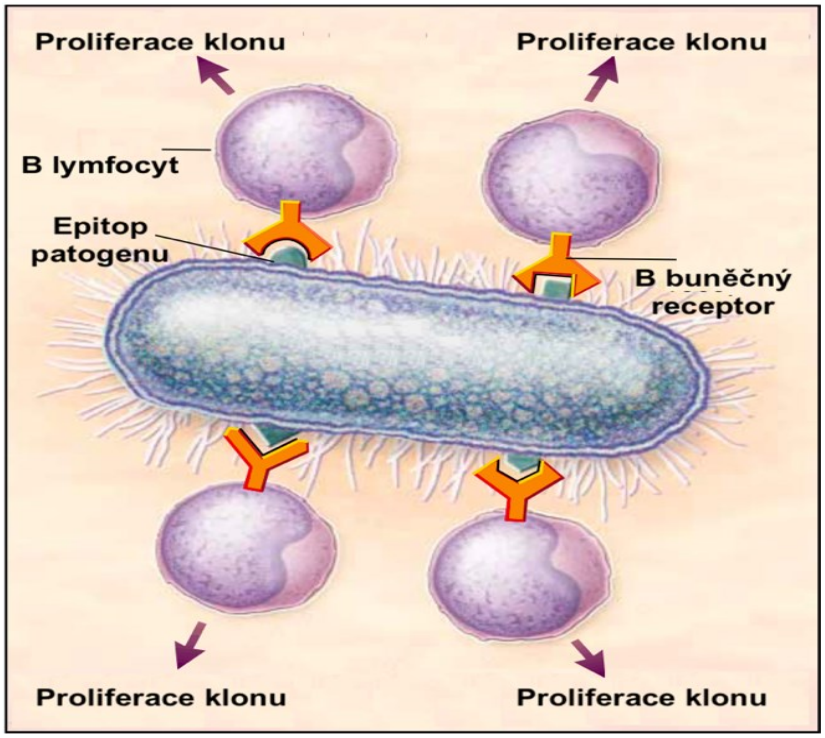
efektivnější odpověď [4]. Namísto nasazení rychlejší a efektivnější odezvy při opakovaném setkání s patogenem, začíná vrozená imunita pokaždé od nuly [3]. Obrovská variabilita antigenů a schopnost patogenů mutovat vedla k vývoji adaptivního imunitního systému.

Představitelé tohoto druhu imunity jsou T lymfocyty, které jsou efektory buněčné odpovědi a B lymfocyty produkující protilátky [11]. Oba tyto typy buněk exprimují na svém povrchu antigen-specifické receptory, jejichž geny jsou sestaveny somatickým přeskupením několik set genových prvků pocházejících ze zárodečné linie. Tímto vznikají miliony kombinací a výsledkem je genetický kód pro expresi receptoru na membráně, kdy každý má jedinečnou specifitu pro jeden antigen [2,11].

1.2. B LYMFOCYTY

B lymfocyty exprimují membránově ukotvený imunoglobulin (Ig) vždy pro jeden určitý antigen [2]. Každá B buňka je naprogramovaná tak, aby exprimovala pouze jednu konkrétní protilátku z obrovského počtu různých potenciálních protilátek. Zároveň při střetu s patogenem (a jeho internalizaci) si B lymfocyty vytváří molekuly glykoproteinového histokompatibilního komplexu (z angl. glycoprotein histocompatible complex, MHC) druhé třídy, jejichž účel spočívá ve vytvoření imunochemické synapse s T buňkami. K imunologické odpovědi jsou vybrané takové klony, které nesou receptor vázající se na antigen patogenu s nejvyšší afinitou. Tomuto procesu se říká klonální selekce [5,12]. Antigenem vybrané buňky proliferují za účasti cytokinů, což zefektivní boj proti patogenu [4].

Většina odpovědí zahrnuje účast mnoha různých klonů, protože i relativně jednoduché antigeny nesou několik různých epitopů, kdy každý má schopnost vázat se na jedinečný B-buněčný klon. Tento způsob vypořádání se s patogenem je znázorněn na obr. 1 str. 12.



Obr. 1 – ***Použitím protilátek jako receptorů rozpoznají B lymfocyty epitopy na povrchu antigenu.*** *Pokud dojde k navázání s vysokou afinitou, B buňky proliferují a klony vylučují protilátku, která je taktéž specifická pro každý B lymfocyt. Obrázek byl převzat a upraven [4].*

1.3. T LYMFOCYTY

T buňky dozrávají v brzlíku z běžných lymfoidních progenitorů pocházejících z kostní dřeně či jater plodu [10]. Vyznačují se expresí T buněčného receptoru (angl. T cell receptor, TCR) na svém povrchu. Jedná se o transmembránový heterodimerní protein vázající antigen prezentovaný na APC. Pokud k této vazbě dojde, výsledkem je klonální expanze T lymfocytů [2].

T buňky zahrnují různé podskupiny včetně naivních T buněk se schopností reagovat na nové antigeny, paměťových T buněk odvozených z přechozích interakcí s patogeny, přirozeně zabijáckých T buněk (z angl. natural killer T cell, NKT buňky) a regulačních T (Treg) buněk, které udržují imunitní odpověď pod kontrolou [13]. Mechanismus imunologické obrany spočívá v setkání se naivních T buněk s antigeny a kostimulačními ligandy prezentovanými na APC. To vede k produkci interleukinu-2 (IL-2), díky čemuž se změní naivní buňky na efektorové, které cestují do lokace patogenu [14,15]. V těchto místech působí T buňky jako specifické antigeny pro B lymfocyty, které po vzájemném kontaktu produkují imunoglobuliny G a M. Zároveň nastává síťování imunoglobulinových receptorů (IgR) na B lymfocytech, což značí jejich aktivaci.

T lymfocyty také produkují různé typy cytokinů, které upravují vlastnosti B buněk, NK buněk i fagocytujících monocytů [10]. Po síťování IgR jsou schopny B buňky vytvořit imunologickou synapsi s T buňkami, která je zprostředkována molekulami

MHC glykoproteinu druhé třídy [10,16]. Po propojení se B buňky mohou například diferenciovat na krátce žijící plazmatické buňky se schopností sekretovat protilátky nebo na paměťové B buňky, které uchovávají informace o antigenu pro případ dalšího kontaktu s patogenem [16].

1.4. NK BUŇKY

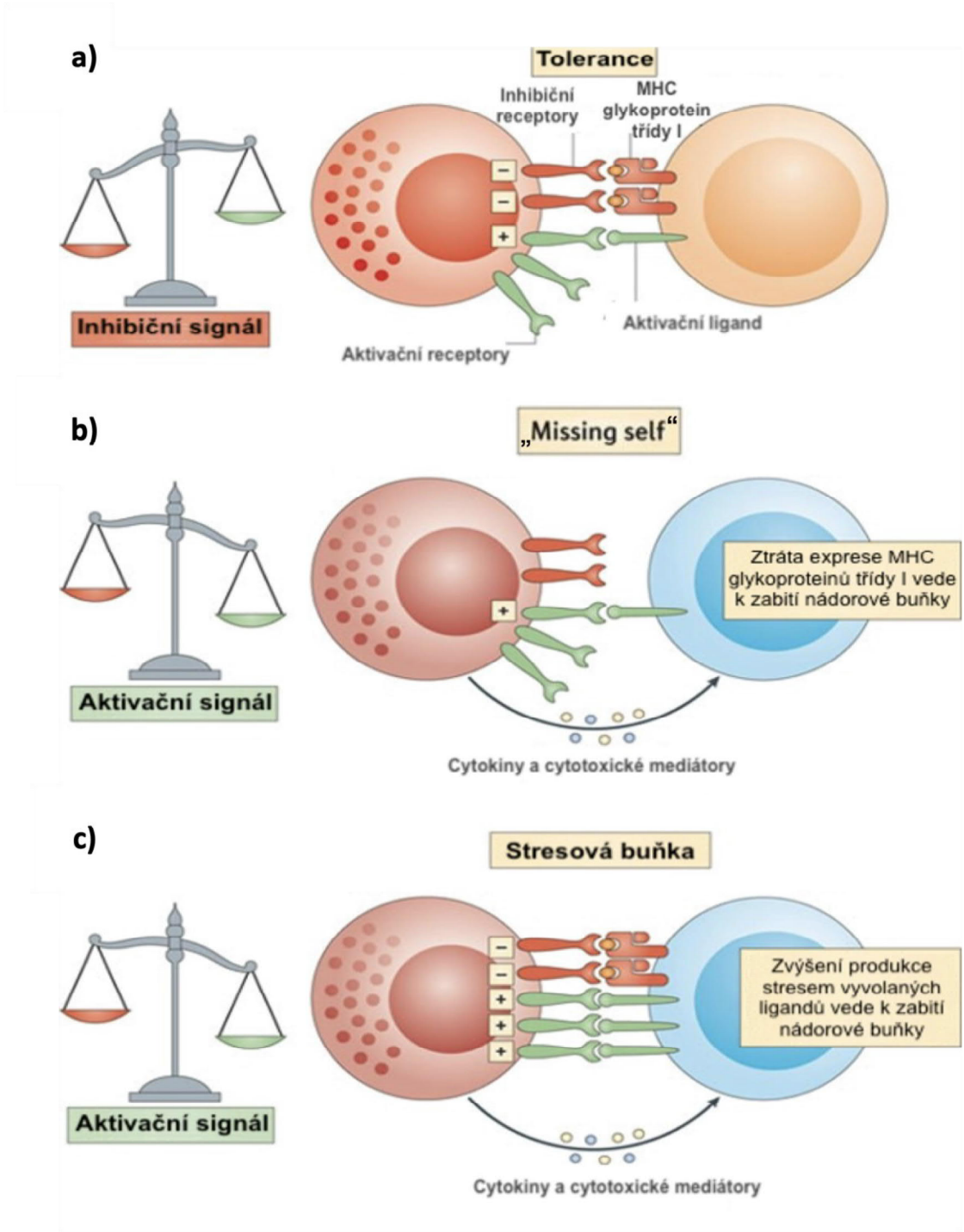
Hrozby ovšem nepřichází pouze z vnějšího prostředí. Pokaždé, když se buňka našich těl rozdělí, existuje malá šance, že se u ní vyvine nepředvídatelná mutace, která může způsobit rakovinu, která má fatální následky pro organismus [17]. Taková buňka se navenek většinou jeví jako tělu vlastní, ale dochází u ní ke změnám, jež v lepším případě mohou vést k jejímu rozpoznání a zahubení imunitním systémem [18].

V sedmdesátých letech Rudolf Kiessling s kolegou Hugh Prossem zaznamenali objev nového typu vrozených lymfocytů, u nichž bylo prokázáno, že jsou schopné spontánně poznat a zabíjet nádorové buňky, přičemž se nejednalo ani o T či B lymfocyty [20,21]. Po několik dalších dekád se vědci snažili odhalit mechanismus detekce a způsob likvidace cílových buněk. Výsledkem bylo, že na rozdíl od jiných lymfocytů je tento druh buněk schopen zabíjet i jiné abnormální buňky, které společně s cizími buňkami exprimují velmi nízké či nulové hladiny tělu vlastních molekul MHC glykoproteinu první třídy. Tyto typy proteinů se nachází na vnější straně cytoplazmatické membrány u zdravé tkáně [22,23].

Pro jejich přirozeně se vyskytující cytotoxicitu bez nutnosti přítomnosti jiných lymfocytů byly tyto buňky pojmenovány jako „přirozeně zabijácké buňky“ [19].

Nyní je známo, že se morfologicky jedná o velké granulární lymfocyty, které na rozdíl od T a B lymfocytů nemají na cytoplazmatické membráně TCR nebo IgR [2]. NK buňky exprimují na svém povrchu repertoár aktivačních a inhibičních receptorů, který je kalibrován tak, aby zajistil vlastní toleranci a současně umožnil účinnou obranu proti útokům na organismus, jako je například virová infekce [5]. Na straně 14 obr. 2 jsou znázorněny možné interakce s cílovými buňkami. Každá NK buňka je svým způsobem originální, jelikož si vytváří vlastní formu specifické imunologické paměti. Záleží tudíž na tom, s jakými buňkami se doposud setkala [9]. Právě díky imunologické paměti mohou vykonávat sofistikované biologické funkce, které jsou atributy vrozené i adaptivní imunity. Tím stírají hranice mezi těmito dvěma větvemi imunitní odpovědi [5].

Efektivní cytotoxická odpověď vyžaduje adhezi k cílové buňce a kombinaci signálů pro polarizaci, degranulaci a aktivaci. Všechny tyto fáze NK buněčné odpovědi jsou důležité a nedokáže je spustit jediný stimul. Např. integrin LFA-1 zprostředkovává polarizaci, receptor CD16 (z angl. cluster of differentiation 16) samostatně nebo v synergické kombinaci s receptorem NKG2D (z angl. natural killer group 2D, NKG2D) či receptorem 2B4 indukuje degranulaci [23].



Obr. 1 – ***Rozpoznávání cílových buněk NK buňkami:***

(a) *NK buňky jsou tolerantní ke zdravým hostitelským buňkám, dochází k inhibici cytotoxicity pomocí navázání MHC glykoproteinů první třídy na inhibiční receptory.*

(b) *Nádorové buňky mohou snížit expresi MHC glykoproteinů první třídy. NK buňky se aktivují v reakci na tyto buňky, jelikož nejsou udržovány pod kontrolou inhibičními signály. Tento typ spuštění aktivace se nazývá „chybějící já“ (z angl. missing-self).*

(c) *Aktivace přirozeného zabijáka stresovou buňkou, která exprimují na svém povrchu aktivační ligandy ve velké míře oproti MHC glykoproteinům první třídy, které působí na inhibiční receptory.*

V případě ***(b)*** *a* ***(c)*** *dochází k eliminaci nádoru přímo (lytické enzymy NK buněk) nebo nepřímo (produkce prozánětlivých cytokinů, jako je například interferon-γ (INF- γ). Obrázek byl převzat a upraven [24].*

1.4.1. Adheze NK buněk

Po setkání se s cílovou buňkou vede několik odlišných molekulárních mechanismů k adhezi, která je považována jako předpoklad pro efektorové funkce NK buněk. Její regulace musí být dynamická, jelikož pro lymfocyty je nutné i uvolnění se při lymfocytárním pohybu [26].

Pro adhezi jsou klíčové dvě rodiny receptorů: integriny a receptory imunoglobulinové superrodiny. Do první skupiny se řadí antigen spojený s funkcí lymfocytů 1 (z angl. lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1) a CD11b (z angl. cluster of differentiation 11b), který je exprimován na povrchu pouze u NK buněk. Zástupcem druhé skupiny je receptor CD2. Všechny tyto receptory jsou schopny po navázání na své ligandy mobilizovat cytoskelet za účelem změny tvaru buňky a reorganizace receptorů na buněčném povrchu [27].

Bylo zjištěno, že pro dosažení adheze stačí potažené destičky proteinem „intercelulární adhezní molekula 1“ (z angl. intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), který je ligandem pro receptor LFA-1. Stejných výsledků bylo dosaženo u kombinace NK buněk a buněk octomilek, které byly upraveny tak, aby exprimovaly ICAM-1 na svém povrchu [26].

ICAM-1 je vysoce glykosylovaný protein řadící se do imunoglobulinové superrodiny. Jedná se o transmembránový protein, který má dominantní extracelulární část. Skládá se z 5 Ig podobných domén, kdy každá má strukturu β-listu stabilizovaného disulfidickými můstky. Jeho míra exprese na povrchu převážně endoteliálních buněk je regulována přítomností různých typů cytokinů [27].

Samotná adheze pomocí LFA-1 je vysoce organizovaný proces. Při navázání ligandů na aktivační receptory je možné zvýšení afinity ke svému ligandu. I avidita se mění při aktivaci cytotoxicity, receptory LFA-1 se přesouvají blíž k cílové buňce, kde se kumulují. Oba tyto faktory přispívají ke zesílení adheze [28].

1.4.2. Inhibiční receptory

V boji s patogeny musí NK buňky dosáhnout specifického rozpoznání infikovaných nebo jinak poškozených buněk. Přesto si musí zachovat toleranci vůči sobě samým či buňkám vlastního organismu. K tomu slouží sada inhibičních receptorů pro MHC glykoproteiny první třídy [3,24]. Hojně zastoupeným představitelem jsou NK buněčné dimerní receptory podobné imunoglobulinům (z angl. killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR), které váží ligand HLA-1. Po navázání ligandu na KIR je zprostředkována fosforylace SHP-1 na cytoplazmatických imunoreceptorových inhibičních motivech využívajících tyrosiny (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM) [30]. Dalším receptorem je NKG2A, který váže ligand HLA-E, což je

MHC glykoprotein první třídy. Inhibice cytotoxicity je opět zakončena další kinázou, jenž fosforyluje proteiny s motivem ITIM [29].

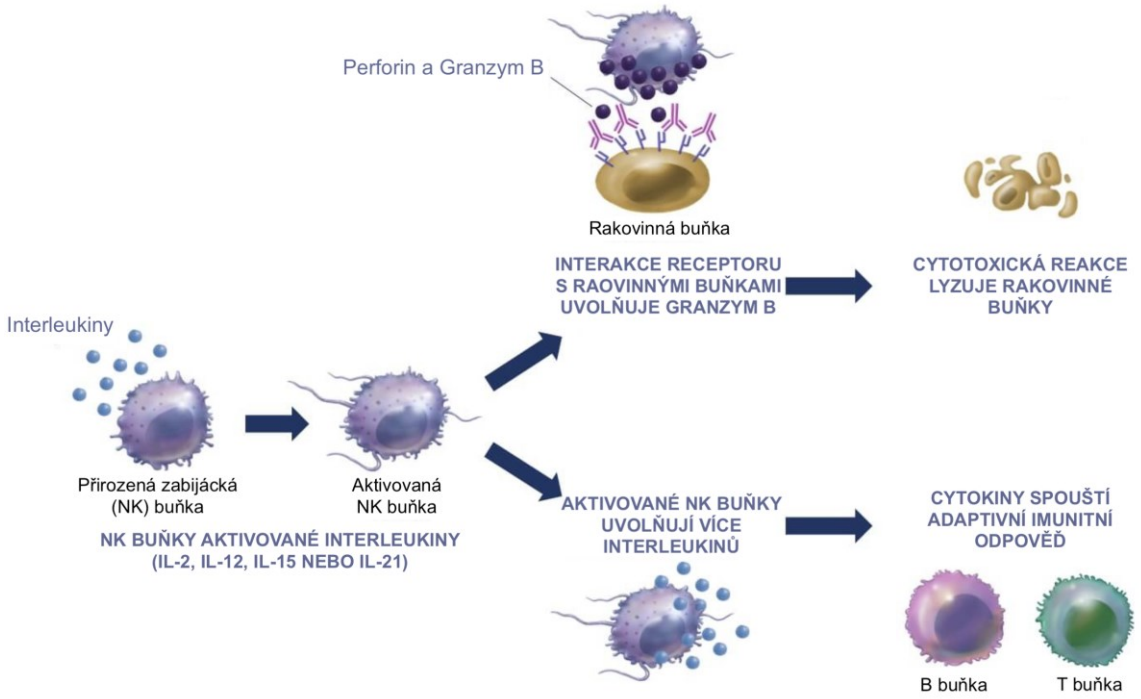
Existují ovšem i inhibiční receptory, které neváží MHC glykoproteiny, ale jejich signalizační dráha končí opět u ITIM. Jedná se o receptory podobné lektinům, které váží všudypřítomné proteiny rodiny kadherinů, jenž se nacházejí v buněčných spojích [31,32].

1.4.3. Aktivace NK buněk

Pro aktivaci NK buněk jsou dle některých studií potřeba alespoň dva signály. Díky tomu je zahájena produkce INF-γ, tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF-α) a lytických proteinů, kterými jsou perforin, granzym B či Fas ligandy. Jako další efekt může být sekrece cytokinů za účelem aktivace jiných lymfocytů viz obr. 3 [24,33,34].

Prvním ze signálů pro aktivaci bývá nejčastěji navázání interleukinu-12 (IL-12) na interleukin-12 receptor (IL-12R). Druhá složka potřebná pro aktivaci je opět interleukin (IL), ale zde najdeme již vyšší variabilitu (např. IL-1,-2,-15 nebo -18) [23,35,36].

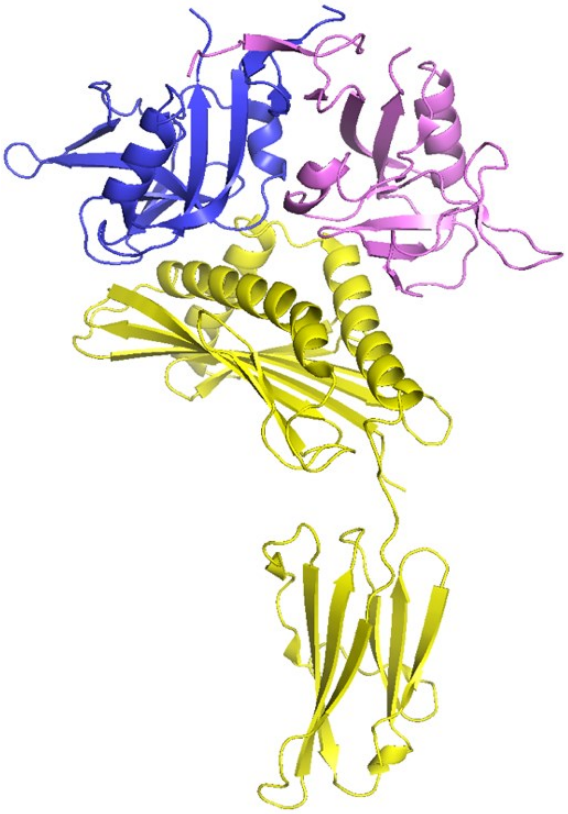
Další možnost aktivace NK buněk spočívá v navázání ligandu ideálně na více aktivujících receptorů současně, jako jsou například NKG2D, 2B4, NKp30 nebo CD16 [24,37]. Tyto receptory mezi sebou vykazují tzv. koaktivační synergii. Samy o sobě nemusí indukovat silné aktivační signály, ale společně zesilují aktivaci cytotoxických funkcí NK buněk [23].



Obr. 3 – ***Schéma aktivace NK buněk pomocí interleukinů a jejich následná interakce s adaptivní imunitou či rakovinnými buňkami.*** *Obrázek byl převzat a upraven [36].*

Mnoho lidských rakovinných buněk exprimuje jako důsledek poškození jejich genomu na svém povrchu tzv. stresové proteiny, jakými jsou MICA (z angl. MHC class 1 polypeptide-related sequence A, ligand NK buněčného receptoru NKG2D podobný glykoproteinům hlavního histokopatibilního komplexu první třídy) a MICB (z angl. MHC class 1 polypeptide-related sequence B, ligand NK buněčného receptoru NKG2D podobný glykoproteinům hlavního histokopatibilního komplexu první třídy). To umožňuje eliminaci těchto rakovinných buněk pomocí lymfocytů. Konkrétně MICA je ligandem pro NK buněčný receptor NKG2D [38,39].

Struktura vazby je znázorněna na obr. 4. Pokročilé rakoviny unikají z dosahu imunitního systému odštěpením MICA za použití metaloproteáz a sulfidických proteáz v procesu nazývanému tzv. shedding [38].



*Obr. 4 – **Ilustrace komplexu NKG2D:MICA.** Žlutě je znázorněný protein MICA navázaný na NKG2D homodimer, který je zabarvený modro-fialově (PDB kód 1HYR) [40]. MICA obsahuje zásahové místo pro proteázy nacházející se mezi doménou α_3 a doménami α_1, α_2, které spojují receptor. Po odštěpení metaloproteázami u rakovinných buněk není možná vazba ligandu na receptor [38].*

1.4.4. Polarizace

U lymfocytů obecně předchází samotnou cytotoxicitu tzv. polarizace sekrečních lysozomů s perforiny a granzymem B. Aktivaci buněk doprovází kromě zesílení adheze i k přesunu cytotoxických granulí blíž k rozhraní s cílovou buňkou. Tomu dochází díky změnám v cytoskeletu [41].

1.4.5. Degranulace a cytolytické procesy

Degranulace vyžaduje zvýšení koncentrace vápenatých kationtů v cytoplazmě, je indukována drahami závislými na proteinkinázách C a G proteinech. Mechanismus spočívá v exocytóze lytických enzymů jakými jsou například perforin či granzym B [26].

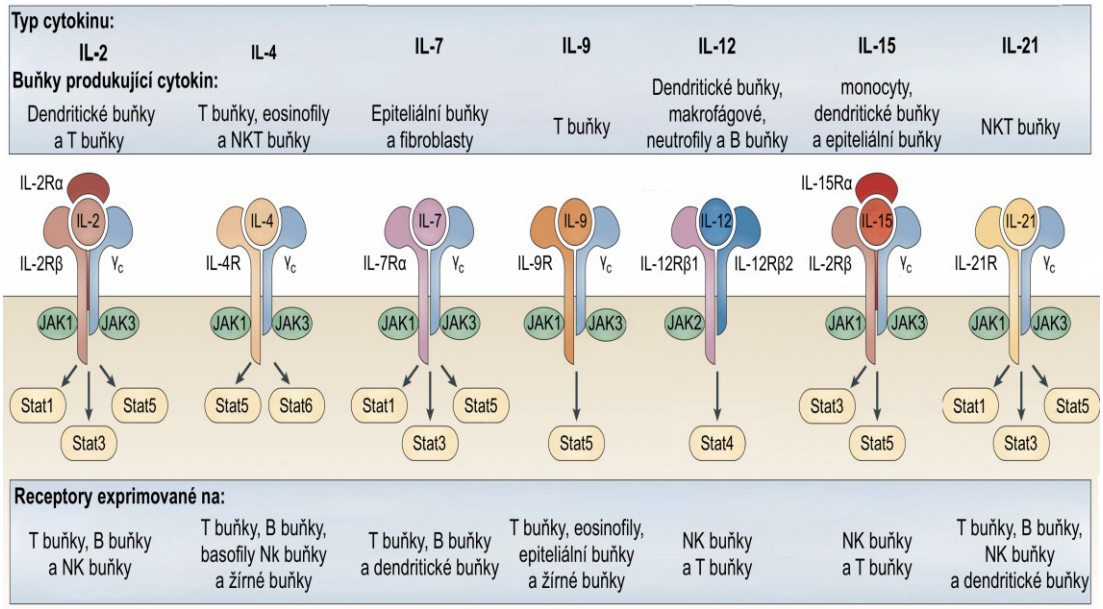
Cytotoxicitu lze měřit pomocí aktivity zmíněných enzymů v supernatantu nebo fluorescenčně detekcí CD107a jinak známé jako lysozomálně asociovaný membránový protein 1 (z angl. lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP-1). Jedná se o membránový protein, který se nachází společně s perforinem v cytotoxických granech. Na membránu se LAMP-1 dostává během degranulace při fúzování lysozomu s cytoplazmatickou membránou při exocytóze [27,42]. CD107a je tudíž znakem degranulace NK buněk.

1.5. CYTOKINY

Jedná se o hlavní regulátory vrozeného i adaptivního imunitního systému, které umožňují leukocytům komunikaci na krátké vzdálenosti parakrinním či autokrinním způsobem [44,45]. Cytokiny kontrolují u bílých krvinek proliferaci, diferenciaci, efektorové funkce a schopnost přežít [43–47]. Do této velké skupiny proteinů patří interleukiny (IL), granulocyty stimulující kolonie a interferon α [48].

Vzhledem ke schopnostem imunitního systému rozpoznat a ničit rakovinné buňky existuje v posledních desetiletích značný zájem o využití cytokinů pro léčbu rakoviny [48]. Interleukiny IL-2 a IL-15 se primárně váží na receptor IL-2Rαβγ (viz obr. 5 na straně 19), který se nachází na regulujících T-lymfocytech, Treg buňkách. Ty v přítomnosti těchto molekulárních poslů snižují aktivitu T buněk i NK buněk. Navzdory tomu stejné typy interleukinů zvyšují či snižují aktivaci a sekreci jiných cytokinů nebo proliferaci NK buněk [21,49]. Pro vyšší efektivnost byly snahy vytvořit tzv. „superkiny“, které by aktivovaly pouze NK buňky, nikoliv však regulující T lymfocyty [48].

Účinnost imunoterapie zprostředkované NK buňkami lze zvýšit použitím vybraných interleukinů v kombinacích společně s chimérními antigenními receptory, což výrazně zvýší jejich protinádorovou aktivitu [20].

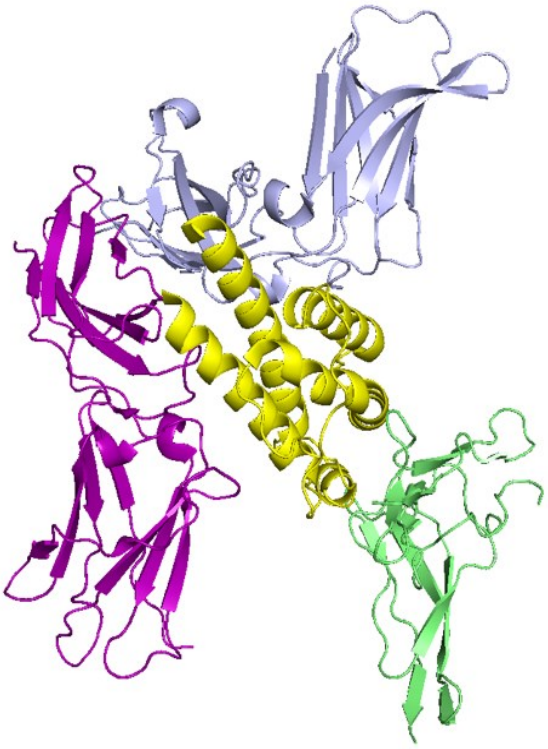


Obr. 5 – ***Schéma vybraných cytokinových receptorů a seznam buněk produkujících interleukiny či exprimujících jejich receptory.*** *Receptory pro IL-2, -4, -7, -9, -15 a -21 obsahují společnou podjednotku γ_c. Heterotrimerní receptory IL-2R a IL-15R sdílí doménu IL-2Rβ. Obrázek byl převzat a upraven [62].*

1.5.1. Interleukin-2

IL-2 je 15,5 kDa globulární glykoprotein patřící do skupiny cytokinů [50,51]. Jedná se o první z cytokinů, u kterého byly pozorované klasické charakteristiky hormonů např. vysoká afinita ke svému receptoru, stereospecifita a saturovatelnost. Jeho účinky spočívají ve zvýšení cytotoxicity NK buněk. Využití IL-2 limituje toxicita, jelikož vyšší dávky způsobují poškození endoteliální výstelky či orgánů [52]. IL-2 se skládá ze čtyřech antiparalelních α-helixů a váže se na interleukin-2 receptor (IL-2R), který je exprimován na NK buňkách, B lymfocytech i T lymfocytech [53].

IL-2R je heterotrimer složený z podjednotek IL-2Rα (CD25), IL-2Rβ (CD122) a γc řetězce (CD132) [49,54]. Samotná α-podjednotka je schopna vázat IL-2 s velmi malou afinitou. Navzdory tomu heterodimer složený z CD122 a CD132 váže ligand silněji a zároveň je schopen přenosu intracelulárního signálu. Celý receptor jako heterotrimer má nejvyšší afinitu k IL-2, zároveň při navázání ligandu dochází k fosforylaci tyrosinů na Janusových kinázách (JAK) konkrétně JAK1 a JAK3. Na závěr se informace přenáší na transduktory a aktivátory transkripcí (z angl. signal tranducer and activator of transcription, Stat) [53,55]. Signalizační kaskáda je znázorněna na obr. 5. Ani jedna z podjednotek nemá vlastní kinázovou aktivitu, tu zprostředkovávají cytoplazmatické kinázy reagující s podjednotkami receptoru [55,56]. Struktura IL-2R s navázaným IL-2 je zobrazena na obr. 6 str. 20.



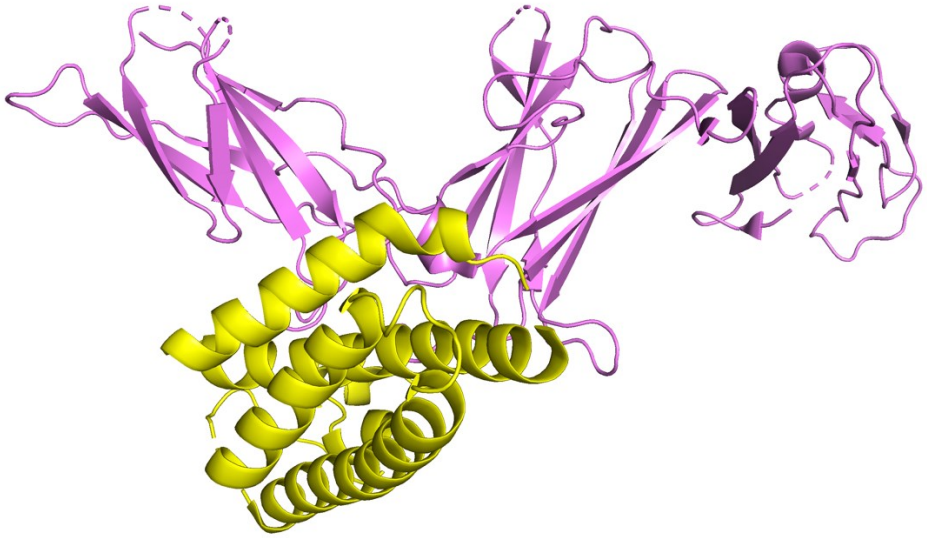
*Obr. 6– **Struktura lidského IL2-R signalizačního komplexu s navázaným IL-2.** Tento cytokin (4 helixy znázorněné žlutě) se váže do kavity receptoru, jenž se nachází na rozhraní IL-2Rβ (modrá podjednotka) a γc řetězce (fialová podjednotka). IL-2Rα (zelená struktura) uzavírá celou strukturu z vrchní části a neinteraguje s ostatními podjednotkami receptoru. Vytvořeno v programu PyMOL (kód PDB: 2ERJ) [53].*

1.5.2. Interleukin-12 (IL-12)

Interleukin-12 (IL-12) je složen ze dvou podjednotek (viz obr. 7 str. 21) a APC jej sekretují při kontaktu s patogenem [55]. Účastní se jako cytokin při diferenciaci a dozrávání naivních pomocných T lymfocytů [44]. Působí také na NK buňky, zvyšuje jejich schopnost zabíjet tělu cizí buňky. IL-12 po navázání na receptor indukuje signalizační kaskádu (viz obr. 5 strana 19), čímž započne syntéza cytokinů [55]. Ty jsou exocytózou vypuštěny do mezibuněčného prostoru, kde aktivují T lymfocyty společně s B lymfocyty v boji proti daným patogenům [57].

Účinky IL-12 také zahrnují regulaci exprese buněčných receptorů NK buněk, jako je NKp46, aniž by to ovlivňovalo expresi inhibujícího receptoru KIR3DL1, což usnadňuje rozpoznávání cílových buněk a jejich likvidaci [55,58].

Receptor pro interleukin-12 (IL-12R) se skládá z dvou podjednotek. První, IL-12Rβ1, interaguje s ligandem, zatímco druhá, IL-12Rβ2, slouží pro přenos signálu na Stat4 [44,48].



*Obr. 7 – **Struktura lidského IL-12.** Jedná se o heterodimer složený z podjenotky p35 (znázorněn žlutě) a druhé podjednotky p40 (zbarvena fialově). Monomery jsou spojeny disulfidickými můstky. Stejně jako u IL-2 zde nalezneme čtyři α-helixy. Vytvořeno v programu PyMol (PDB kód: 1F45) [58].*

1.5.3. Interleukin-15

Interleukin-15 (IL-15) stejně jako IL-2 stimuluje proliferaci T-lymfocytů, indukuje cytotoxicitu u lymfocytů a zapříčiňuje expanzi NK buněk [59]. Společně při inkubaci NK buněk s oběma interleukiny bylo sledováno zvýšení exprese NKG2D, NKp30, NKp46 a CD16 [60]. Nicméně u mnoha odpovědí adaptivní imunity mají tyto interleukiny rozdílné účinky. IL-15 na rozdíl od IL-2 neaktivuje Treg lymfocyty, což rozšiřuje možnost jeho použití například na imunoterapii. Byly snahy sledovat i synergický efekt s použitím monoklonálních protilátek proti aktivačním receptorům NK buněk *in vitro*. Bohužel takto kombinovaná terapie výrazně oddálila účinek ve srovnání s oběma látkami samostatně [59].

Strukturně je opět tvořen čtyřmi α-helixy a váže se na interleukin-15 receptor (IL-15R), který se skládá z tří různých podjednotek: IL-15Rα, IL-15Rβ a γc řetězec [55]. β-podjednotka je společná s IL-2R. Zároveň je γc řetězec společný pro receptory interleukinu-2, -4, -7, -9 a -21 [55]. Signální kaskáda využívá JAK1 a JAK3, které přenáší informaci až na Stat3 a Stat5 (viz obr. 5 str.19).

Na myších modelech s chybějícím genem pro expresi Stat3 selektivně pouze pro NK buňky bylo zjištěno, že signalizace IL-15 indukuje časnou aktivaci Stat3 pro zahájení produkce interleukinu-10 (IL-10) [61]. Ten je sekretován ještě makrofágy a pomocnými T lymfocyty. Současně je IL-10 často nazýván jako inhibiční faktor syntézy cytokinů. Snižuje počet makrofágů, snižuje aktivitu antigen prezentujících buněk a funguje jako antagonista aktivace NK buněk [48,58].

1.6. TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ NK BUNĚK V BOJI PROTI RAKOVINĚ

Imunitní systém má klíčovou roli při rozpoznávání vzniku nádorového bujení, nebo v boji s již v těle rozvinutým onemocněním. Když však selhává jak vrozený, tak adaptivní imunitní systém, může být imunoterapie stále cílena na NK buňky [63]. Rozumí se tím široké spektrum možností od genetických modifikací NK buněk s jejich adoptivním přenosem po aktivaci cytokiny až po použití bispecifických proteinů [63,64]. Nádory mají specializované mechanismy, jak se bránit imunitní odpovědi. Jedním z nich je snížení exprese aktivačních ligandů nebo nepřímou cestou uvolněním transformačního růstového faktoru β (z angl. transforming growth factor β, TGF-β). Ten působí na T lymfocyty a NK buňky jako imunosupresivum, snižuje jejich aktivitu a proliferaci. Proto se neutralizace TGF-β nabízí jako další z možností, jak zefektivnit boj proti rakovině [63].

1.6.1. Genetické modifikace NK buněk

V imunoterapii znamenala osmdesátá léta minulého století odrazový můstek pro imunoterapeutické léčby [63]. Jedny z prvních slibných výsledků zaznamenala adoptivní buněčná terapie, která je založena na odběru periferní krve z pacienta, následném expandování lymfocytů *ex vivo* ve směsi cytokinů IL-2, IL-12 a IL-15 a jejich zpětnou infuzi do krve pacienta [65]. Tento postup vyvolal časem několik výzev v optimalizacích těchto metod včetně blokování Treg buněk inhibujících NK buňky v přítomnosti IL-2. Nabízí se i možnost využití genového inženýrství a upravení počtu inhibičních receptorů, které tlumí aktivaci (viz kapitola 1.4.2. inhibiční receptory, str. 15) [63].

Obstojných výsledků dosahují geneticky upravené T buňky exprimující na svém povrchu chimérní antigenní receptory (z angl. chimeric antigen receptors, CAR) [8]. Stejné modifikace můžeme dosáhnout i u NK buněk, které byly transdukovány tak, aby exprimovaly na svém povrchu CAR.

Tyto uměle vytvořené receptory se skládají z extracelulární domény rozpoznávající specifické antigeny na nádorech (nejčastěji vytvořené z fragmentu protilátky), transmembránové části a signalizační intracelulární domény, která je upravena tak, aby zvýšila sílu aktivačního signálu [66]. Schéma receptoru je zobrazeno na obr. 8, strana 23. Nové typy CAR, tzv. CAR čtvrté generace při aktivaci stimulují produkci IL-12 pro další zvýšení cytotoxického účinku.

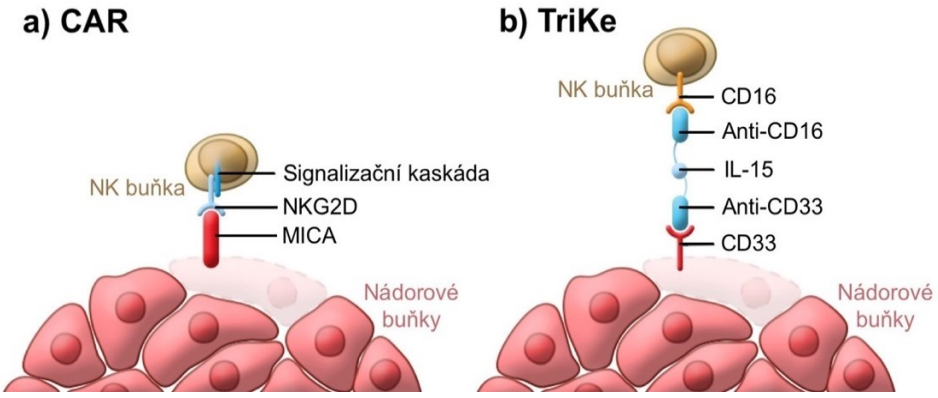
Vzhledem ke své kratší životnosti mohou být geneticky upravené NK buňky lepší než T buňky. Přirození zabijáci nepotřebují „sebevražedné geny“ k omezení jejich expanze, jelikož neprodukují autokrinní růstové faktory [63].

1.6.2. Použití bispecifických proteinů

Molekuly zvané „bispecifičtí zprostředkovatelé přirozených zabijáků“ (z angl. bispecific killer cell engagers, BiKe) se vyznačují schopností síťovat NK buňky s nádory [64]. Jsou

to látky uměle zkonstruované a obsahují jedno-řetězcovou doménu variabilního fragmentu (z angl. single chain fragment variable, scFv) specifickou pro aktivující NK buněčný receptor CD16 spojenou krátkým řetězcem s druhou scFv specifickou pro antigen exprimovaný na nádoru (např. CD19, CD33). Konkrétní antigen může být například od akutní myeloidní leukémie [64,67].

Novou verzí těchto bispecifických fúzních proteinů se staly trispecifičtí zprostředkovatelé přirozených zabijáků (z angl. trispecific killer cell engagers, TriKe), u kterých došlo k integrování molekuly IL-15 do stávajícího BiKe viz obr. 8. Díky tomu může TriKe vykonávat tři klíčové funkce: (a) nasměrovat NK buňky do nádorů usnadněním tvorby intercelulárních synapsí (b) spustit cytotoxicitu přes CD16 a (c) řídit *in vivo* expanzi buněk. IL-15 byl vybrán kvůli lepší toleranci organismem a také proto, že neaktivuje Treg buňky [64]. Tato značná výhoda IL-15 se může obrátit v neprospěch, jelikož u akutní myeloidní leukémie by mohlo dojít k nekontrolovatelné proliferaci maligních T buněk. Další rizika spočívají v *in vitro* aktivaci přirozených zabijáků, coby efektorů, za vzniku škodlivých imunitních reakcí. Více ukáží až klinické studie, přesto BiKe a TriKe ukazují nové cesty pro imunoterapeutickou léčbu rakoviny [64,67].



Obr. 8 – ***Schéma strategií pro překonání účinku mikroprostředí nádoru: a)*** *Použití CAR receptoru složeného ze speciální signalizační kaskády a aktivačního receptoru NKG2D, který tvoří komplex s ligandem MICA exprimovaným na nádorových buňkách.* ***b)*** *Schéma fúzního proteinu TriKe, který se skládá z protilátky proti CD16 a protilátky proti CD33 s integrovaným IL-15. Obrázek byl převzat a upraven [68].*

2. CÍLE PRÁCE

- Příprava expresního vektoru pro produkci ICAM-1 s coiled coil kotvou na C-konci a ICAM-1 s coiled coil kotvou na N-konci
- Produkce proteinů ICAM-1 a obou variant ICAM-1 s coiled coil kotvou v expresním systému HEK293T a jejich následná purifikace
- Optimalizace *in vitro* stanovení využívajících rekombinantní proteiny připravené pro aktivaci čerstvě izolovaných NK buněk

3. MATERIÁL

3.1. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Analytické váhy	AND, USA
Alliance Q9	UVItec, UK
Automatické pipety	Discovery HTL, Polsko
Automatické pipety	Pipetman Gilson, USA
Automatický pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
Centrifuga Allegra X-22R Centrifuge	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	Sigma, USA
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor CO_2 MCO-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Inverzní mikroskop AE31	Motic, Německo
Kahan Fuego SCS	VERKON, ČR
Kolona HisTrap Excel 5 ml	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Koncentrátory Amicon Ultra, MWCO 10000	Millipore, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-LAB, ČR
Laminární box Clean Air	PMV, Nizozemí
Laminární box BIO 126	LABOX, ČR
Mikrostříkačka HAMILTON	Hamilton, USA
Mikrocentrifuga Ministar Silverline	VWR, USA
Mikrofiltr s póry o velikosti 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Mikrovlnná trouba OPTICOOK compact	Optimo Moulinex, Francie
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
pH metr φ200	Beckman Coulter, USA
Pipetovací nástavec Hirschmann® Pipetus®	Sigma-Aldrich, USA
Plastik pro tkáňové kultury	Sigma, USA
Průtokový cytometr BD LSR II	BD Biosciences, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Počítadlo buněk Corning®	Corning, NLD
Rolovací třepačka	Scilogex, USA
RosetteSep™ Human NK Cell Enrichment Cocktail	STEMCELL Technologies, Kanada
Souprava pro agarosovou elektroforézu Liberty 120	Biokeystone, USA

Souprava pro SDS elektroforézu	Bio-Rad, Německo
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler T100	Bio-Rad, Německo
Transiluminátor s modrým světlem Dark Reader	Clare Chemical Research, USA
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, Švýcarsko
UV prosvěcovací lampa 312 nm	UVItec, UK
Vařič	ETA, ČR
Vodní lázeň WNB 29	Memmert, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj stejnosměrného napětí 251-2	Sigma-Aldrich, USA

3.2. CHEMIKÁLIE A KOMERČNÍ SOUPRAVY

8 jamkové proužky (tzv. „stripy“)	Thermo Fisher Scientific, USA
96 jamkové destičky	Thermo Fisher Scientific, USA
100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
1 kb DNA standard	New England Biolabs, US
2-merkaptoethanol	Sigma, USA
Agar	Sigma, USA
Agarosa	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR
APS	Serva, USA
Azid sodný	Serva, USA
BSA	New England Biolabs, USA
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka Chemika, Švýcarsko
DMSO	Sigma, USA
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, ČR
EDTA	Jersey Lab supply, USA
EmeraldAmp GT PCR Mastermix	Takara Bio, USA
Ficoll	Sigma-Aldrich, USA
GoodView II	Ecoli, Slovensko
HSA	Sino Biological, Čína
FBS	Sigma, USA
Ionomycin a PMA	eBioscience, USA
InFusion reakční pufr	Takara Bio, USA

Isopropanol	Lach-Ner, ČR
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, SR
Kyselina valproová	Sigma, USA
L-glutamin	Sigma, USA
lPEI 25 kDa	Polysciences, USA
NEB pufr 1	New England Biolabs, USA
Nucleobond Xtra Maxi kit	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Gel and PCR clean-up	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel, Německo
N, N´-methylenbisakrylamid	Serva, USA
PCR deionizovaná voda	Top-Bio, ČR
Penicilin	Sigma, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Standard molekulových hmotností Spectra BR	Thermo Fisher Scientific, USA
Streptomycin	Sigma USA
TEMED	Serva, USA
Trypanová modř	Sigma, USA
Trypton	Oxoid, UK

3.3. ENZYMY

AgeI	New England Biolabs, USA
KpnI	New England Biolabs, USA
Q5 DNA polymeráza, GC enhancer	New England Biolabs, USA
RNAsa A	P-lab, ČR
T4 DNA ligasa	New England, USA

3.4. PROTILÁTKY

Anti-CD107a konjugovaná s allofykocyaninem, klon H4A3	Life Technologies, ČR
Anti-CD3ε konjugovaná s fluorosceinem, klon UCHT1	R&D Systems, USA
Anti-CD161 konjugovaná s barvivem Alexa Fluor, klon HP-3G10	BioLegend, USA

3.5. PŘIPRAVENÉ PUFRY A ROZTOKY

AA: 29 % akrylamid, 1 % N,N´-methylenbisakrylamid

Barvící roztok pro SDS elektroforézu: 45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 %

barivo Coomassie Brilliant Blue R-250

Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu 10× koncentrovaný: 0,25M Tris, 1,9M glycin, 1% (w/v) SDS, pH 8,3

Eluční pufr pro kolonku: 50mM Na_2HPO_4, 300mM NaCl, 10mM NaN_3, 250mM imidazol, pH 7,0

Odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu: 35% ethanol, 10% kyselina octová

PBS pufr: 50mM Na_2HPO_4, 300mM NaCl, 10mM NaN_3, pH 7,0

PBStk: 10mM Na_2HPO_4, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH_2PO_4, pH 7,0

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

TAE pufr: 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA

Tris pufr (pH 6,8): 1M Tris, pH sníženo pomocí HCl

Tris pufr (pH 8,8): 1,5M tris, pH sníženo pomocí HCl

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

Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu, 5× koncentrovaný, neredukující: 31,5mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10mM NaN_3, pH 6,8

Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu, 5× koncentrovaný, redukující: 31,5mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10mM NaN_3, pH 6,8, 10 % (v/v) 2-merkaptoethanol

3.6. BAKTERIÁLNÍ KMENY A BUNĚČNÉ LINIE

E. coli DH5α	Thermo Fisher Scientific, USA
HEK293T	prof. Radu Aricescu, Oxford UK
Krevní konzervy	anonymizovaní dárci, ÚHKT, ČR

3.7. BAKTERIÁLNÍ KMENY A BUNĚČNÉ LINIE

Ex Cell 293: komerční médium, před použitím doplněn L-glutaminem na 4mM koncentraci, výrobce: Sigma, USA

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

LB agar: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasniční extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7,4, 1,5% (w/v) agar

SOB médium: 2% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 20mM $MgSO_4$

3.9. POUŽITÉ VEKTORY

Plazmid pTW5sec_ICAM-1	Denis Cmunt, Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK, ČR
Plazmid pTCCsecC	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK, ČR
Plazmid pTCCsecN	Laboratoř 204, katedra biochemie PřF UK, ČR

3.9. POUŽITÉ PRIMERY A JEJICH SEKVENCE

pTT_FW	TGATATTCACCTGGCCCGATCTG
pTW5seq_rev	AAGCAGCGTATCCACATAGCG

*Oligonukleotidy byly zakoupeny od společnosti Sigma

4. METODY

Prvním cílem bylo připravit protein ICAM-1 ve třech verzích. Ve všech případech se jednalo o extracelulární část proteinu, kdy u každého vzorku byla navázána histidinová kotva na C-konec. U dalších dvou vzorků byl navíc připojen coiled coil motiv na C-konec nebo na N-konec proteinu.

Dalším cílem byla izolace NK buněk a hledání nejlepších podmínek pro aktivaci NK buněk společně s ověřením biologické aktivity proteinů MICA a ICAM-1 pomocí průtokové cytometrie.

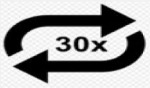
4.1. AMPLIFIKACE GENU POLYMERÁZOVOU ŘETĚZOVOU REAKCÍ

Reakční směs o složení, viz tab. 1 byla pipetována do 200µl mikrozkumavky (plazmid pTW5sec_ICAM-1 byl poskytnut Mgr. Denisem Cmuntem), následně byla odstředěna na stolní minicentrifuze Ministar Silverline (VWR) po dobu pár vteřin za účelem vytlačení nežádoucích bublin, jež vznikly během pipetování zásobních reagencií. Vzorek ICAM-1 byl vložen do termocykleru nastaveného dle tab. 2 na str. 31 pro polymerázovou řetězovou reakci (z angl. polymerase chain reaction, PCR). Po posledním cyklu byla mikrozkumavka odejmuta a byl odebrán vzorek pro agarovou elektroforézu.

Tab. 1 – Pipetované objemy pro PCR insertu ICAM-1 z plazmidu pTW5sec_ICAM-1 pro následné štěpení a vložení do expresních plazmidů.

Složky reakčních směsí	Koncentrace zásobních roztoků	Pipetované objemy pro přípravu
Q5 DNA polymeráza	2000 U/ml	0,5
Q5 reakční pufr	5 × koncentrovaný	10
Q5 GC enhancer v DMSO	5 × koncentrovaný	10
dNTPs	10 µM	1
templátový plazmid pTW5sec_ICAM-1	40 ng/µl	2,5
přímý primer pTT_FW	5 µM	5
zpětný primer pTW5seq_rev	5 µM	5
dH_2O	-	16
Celkový objem reakce	-	50

Tab. 2 – časový a teplotní průběh PCR amplifikace expresních vektorů.

Krok	Teplota kroků	Časy kroků
1. Denaturace DNA	95 °C	5 min
2.Nasednutí primerů Syntéza polymerázy Denaturace DNA 	54 °C 72 °C 95 °C	30 sec 30 sec 1 min
3. Dosyntetizování fragmentů	72 °C	10 min
4. Zchlazení	4 °C	∞

4.2. AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA

Pro analýzu DNA vzorku byla zvolena agarosová elektroforéza. Prvním krokem byla příprava 0,5% agarosového gelu. Bylo odváženo 0,33 g agarosy, která byla kvantitativně převedena do 65 ml pufru TAE v Erlenmayerově baňce. Tato směs byla povařena v mikrovlnné troubě (Optimo Moulinex) a po ochlazení byly přidány 3 µl barviva GoodView II (Ecoli). Tekutina byla nalita do aparatury pro gelovou elektroforézu (Biokeystone, USA) s předem přidanými elektrodami. Do roztoku byl zasunut hřeben a gel byl ponechán 10 minut zatuhnout.

Mezitím byly připraveny vzorky pipetováním DNA, 6 × koncentrovaného vzorkového pufru a popř. deionizované vody ve vhodném objemu.
Poté byl hřeben vyndán a gel byl převrstven deionizovanou vodou. Prostory elektrod byly doplněny pufrem TAE.

Vzorky byly pipetovány do jamek gelu společně se 5 µl vhodného standardu (New England Biolabs). Elektroforéza byla zapnuta na 180 V po dobu 20 min a DNA v gelu byla vizualizována pomocí UV světla nebo transiluminátorem Alliance Q9 (UVItec) s modrým světlem, pokud se jednalo o preparativní elektroforézu.

4.3. RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ PRODUKTŮ PCR A EXPRESNÍCH PLAZMIDŮ

Štěpení univerzálního produktu PCR amplifikace plazmidu pTW5sec_ICAM-1 bylo provedeno v zásahových místech enzymy KpnI (New England Biolabs) o aktivitě 10 U/µl a AgeI (New England Biolabs) s aktivitou 20 U/µl, kdy do reakční směsi byly přidány složky dle tab. 3 na straně 32. Dále bylo přidáno 5 µl pufru NEB buffer 1 (New England Biolabs) za účelem vytvoření vhodných podmínek pro štěpící enzymy. Reakční směs byla inkubována při 37 °C přes noc.

Linearizace recipientních plazmidů pTCCsecC a pTCCsecN byla provedena stejnými endonukleázami. Pro kontrolu správnosti byly připraveny vzorky plazmidů pro produkci smícháním 1 µl daného plazmidu a 49 µl deionizované vody. Výsledek štěpení byl ověřen na velkém 0,5% agarosovém gelu pomocí agarosové elektroforézy dle kap. 4.2. Gel byl vytvořen rozpuštěním 0,475 g agarosy v 95 ml pufru TAE.

Tab. 3 – Restrikční štěpení produktů PCR reakce endonukleázami Kpn1 a AgeI.

Složky směsí pro restrikční štěpení	Koncentrace zásobních roztoků	Pipetované objemy pro vzorek PCR [µl]	Pipetované objemy pro vzorek pTCCsecC[µl]	Pipetované objemy pro vzorek pTCCsecN[µl]
Množství DNA	-	25 (celkově 600 ng)	10 (celkově 5 µg)	10 (celkově 5 µg)
KpnI	10 U/µl	1	1	1
AgeI	20 U/µl	0,5	0,5	0,5
NEB buffer 1	10 × koncentrovaný	5	5	5
BSA	10 × koncentrovaný	5	5	5
dH_2O	-	13,5	28,5	28,5
Celkový objem reakce	-	50	50	50

4.4. EXTRAKCE A PŘEČIŠTĚNÍ DNA Z GELU

Byla provedena agarosová preparativní elektroforéza pro všechny vzorky s analogickým postupem dle kap. 4.2. na straně 31. Každý vzorek po přečištění od nežádoucí templátové DNA a restrikčních enzymů byl smíchán ve vhodném poměru s pufrem obsahující barvivo GoodView II (Ecoli). Po ukončení elektroforézy byly vzorky vizualizovány pomocí transiluminátoru Alliance Q9 s modrým světlem (UVItec), aby nedošlo k poškození DNA vlivem UV záření.

Pro přečištění a extrakci DNA byla použita komerční souprava NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel), která obsahovala všechny potřebné pufry i extrakční kolonky. Nejprve byly zóny z gelu vyříznuty a přendány do mikrozkumavky. Rozpuštění tuhého gelu proběhla pomocí solubilizačního pufru, který byl přidán poměrově (100 mg gelu na 200 µl pufru). Dále byl vzorek inkubován v termobloku nastaveném na 55 °C, dokud nedošlo ke kompletnímu rozpuštění agarosového gelu. Následně byl vzorek pipetován na kolonku zapuštěnou v další mikrozkumavce. Následovala centrifugace po dobu 1 minuty na 11000 × *g*. Supernatant byl odstraněn a kolonka se zachycenou DNA byla dvakrát promyta 600 µl promývacího pufru a opět centrifugována při stejném nastavení. Supernatant byl vždy odstraněn. Nakonec byla kolonka centrifugována 3 minuty při stejných otáčkách pro vysušení DNA od ethanolu jako srážecího činidla. Eluce byla provedena 30 µl elučního pufru.

4.5. VNESENÍ GENU DO LINEARIZOVANÉHO PLAZMIDU

Pro ligaci byla vybrána T4 DNA ligáza. Směsi byly namíchány v molárním poměru 1:3 (vektor ku inzertu). Vždy bylo pipetováno 40 ng insertu, ke kterému bylo přidáno následně 50 ng vektoru, 1 µl T4 DNA ligázy a 2 µl reakčního pufru. Reakce byly

doplněny deionizovanou vodou na objem 20 µl a inkubovány při laboratorní teplotě 60 minut.

4.6. TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BAKTERIÍ

Ke každé transformaci plazmidy pTCCsecC_ICAM-1 a pTCCsecN_ICAM-1 bylo použito 100 µl buněčné suspenze kompetentních buněk *E. coli* D5Hα. Alikvoty byly předem zmrazeny na cca −80 °C a po vytažení ponechány přibližně 10 minut při 0 °C k rozmrznutí na ledu. K buňkám byla přidána plazmidová DNA a směs byla inkubována na ledu po dobu 10 minut. Poté byly směsi rozetřeny hokejkou na agarové misky obsahující ampicilin (LB médium povařené s 1,5% (w/v) agarem, kdy po ochlazení bylo přidáno antibiotikum ampicilin o výsledné koncentraci 100 µg/ml). Kultivační misky byly inkubovány dnem vzhůru přes noc ve 37 °C.

Následující den byly kolonie narostlé na bakteriologické kultivační misce opatrně nabrány pipetační špičkou a resuspendovány v objemu 6 µl deionizované vody uvnitř 200µl mikrozkumavky, dále byly přidány 2 µl reverzních, 2 µl přímých primerů (o výsledné koncentraci 500 nM) a na závěr bylo přidáno 10 µl směsi EmeraldAmp GT PCR Mastermix (Takara Bio). Připravené reakční směsi byly vloženy do cykleru, který byl nastaven na program viz tab. 2. str. 32. Pro ověření úspěšnosti transformace byla použita agarosová elektroforéza, která je popsaná v kap. 4.2. na straně 31.

4.7. NÍZKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDOVÝCH DNA

Den po transformaci kompetentních buněk *E. coli* D5Hα bylo setřeno několik kolonií z každé misky pipetační špičkou z povrchu agaru a umístěno do 50 ml centrifugační zkumavky s 5 ml LB média obsahujícího ampicilin o koncentraci 100 µg/ml. Každý ze vzorků byl inkubován přes noc při 37 °C na třepačce nastavené na 180 ot./min.

4.8. NÍZKOOBJEMOVÁ IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

Druhý den byla izolována DNA z kultury s pomocí komerční soupravy NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit (Macherey-Nagel) [69]. Jednotlivé centrifugační zkumavky byly odstředěny 5 minut při 11000 × *g*. Buňky přisedlé ke dnu byly resuspendovány ve 250 µl pufru A1, do kterého byla předem přidána RNAsa. Následovalo pipetování dalších 250 µl modrého lyzačního pufru značeného A2. Směsi byly opatrně promíchány opětovným nasátím automatickou pipetou. Suspenze buněk a pufrů A1 s A2 byly inkubovány a po 5 minutách bylo přidáno 300 µl neutralizačního pufru A3 s následným opatrným promícháním až do odbarvení roztoku na mléčně bílou. Poté byly směsi centrifugovány 5 minut při 20000 × *g*. Čiré supernatanty byly pipetovány do 2ml mikrozkumavek s vloženými kolonkami a opět centrifugovány 1 minutu na 11000 × *g*. Po odstředění byly

supernatanty odstraněny z mikrozkumavek a na kolonky bylo pipetováno 500 µl pufru AW, který byl předem vyhřátý v termobloku na 50 °C. Následovala centrifugace 1 minutu při 11000 × *g* a poté bylo pipetováno 500 µl pufru A4. Kolonky byly centrifugovány opět 1 minutu na 11000 × *g* a na závěr byl přidán pufr AE, se kterým byly vzorky inkubovány 1 minutu za laboratorní teploty. Kolonka byla přesunuta do čisté mikrozkumavky, odstředěna 1 minutu při 11000 × *g* a eluovaným vzorkům byla změřena koncentrace.

Množství DNA bylo proměřeno na přístroji DeNovix DS-11+ (UVItec), na kterém byl nastaven program DNA. Nejprve byl proměřen slepý vzorek pipetováním 1,5 µl elučního pufru. Následovalo pipetování 1,5 µl jednotlivých vzorků pTCCsecC_ICAM-1 a pTCCsecN_ICAM-1 a zjištění koncentrace a čistoty DNA.

Pro ověření správné transformace byly připravené vzorky na sekvenaci, které obsahovaly 300 ng plazmidu, 1 µl reverzibilního (pTW5seq_rev) nebo přímého (pTT_FW) primeru a deionizovanou vodu, která doplnila reakční směs na výsledný objem 8 µl. Sekvenace proběhla v laboratoři sekvenace DNA PřF UK nacházející se ve výzkumném středisku BIOCEV. Výsledky byly porovnány se sekvencemi vytvořenými *in silico*.

4.9. VELKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDOVÉ DNA A JEJÍ IZOLACE

Z narostlé kultivační misky byly odebrány kolonie sterilními špičkami, ty byly vhozeny do 2l Erlenmayerových baňek s 500 ml LB média obsahujícího ampicilin o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Vzorky byly inkubovány na třepačce Infors HT Multitron Standard (Infors HT) cca 20 hodin při 37 °C a 180 ot./min.

Druhý den byla provedena izolace plazmidové DNA pomocí komerční soupravy NucleoBond Xtra Midi/Maxi Plus (Macherey-Nagel) [70]. Buňky byly odstředěny za laboratorní teploty v plastových centrifugačních zkumavkách 30 minut při 4500 × *g*. Supernatanty byly odstraněny a buňky každého vzorku byly resuspendovány v 15 ml vychlazeného pufru RES obsahující předem přidanou RNAsu. Pufr byl dlouhodobě uschováván v lednici. Dále bylo přidáno 15 ml modrého lyzačního pufru LYS. Směsi o objemu 30 ml byly inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. V tomto čase byly ekvilibrovány papírové filtry v kolonkách 25 ml pufru EQU. Následovala neutralizace směsí obsahujících již lyzované buňky 15 ml pufru NEU. Roztoky byly opatrně pipetou promíchány do odbarvení na mléčně bílou. Směs obsahující bílé koagulanty byla přenesena na papírové ekvilibrované filtry v kolonkách, kdy tekutá složka prokapala gravitací přes kolonku. Po prokapání bylo pipetováno po stěnách 15 ml pufru EQU a filtry společně s bílými sraženinami byly odstraněny. Následovalo promytí 15 ml pufru WASH. Po odkapání kapaliny bylo pipetováno 15 ml pufru ELU na kolonky. Eluce byla sbírána do připravených 50ml centrifugačních zkumavek.

Ke každé cca 15ml eluci bylo přidáno cca 10,5 ml isopropanolu vytemperovaného na pokojovou teplotu a vzorky byly promíchány vortexovým mixérem, kdy došlo k zakalení původně čirého roztoku. Vzorky byly kvantitativně převedeny do velkých stříkaček a směsi byly převedeny přes 0,22µm filtry do čistých centrifugačních zkumavek. Na závěr bylo pipetováno 4 až 5 ml 70% ethanolu do stříkačky k vysušení DNA. Následovalo několikanásobné prosátí vzduchu jedním směrem přes filtr k dosušení vzorků. Eluce byla provedena 1 ml pufru TRIS. Následně byla změřena koncentrace DNA, viz kapitola 4.7. na straně 33.

4.10. POČÍTÁNÍ A TRANSFEKCE BUNĚK HEK293T

Buňky byly poskytnuty Mgr. Barborou Kalouskovou. Na transfekci jednoho proteinu v 200 ml média bylo použito 400 milionů buněk HEK293T. Postup pro ostatní proteiny byl analogický.

Pro zjištění počtu buněk bylo odebráno 20 µl buněčné suspenze, která byla devětkrát naředěna 160 µl trypanové modři. Vzniklý roztok byl pipetován do komůrky hemocytometru. Pod mikroskopem byly buňky spočítány v devíti čtvercích o rozměrech 1 mm^2 a následně přepočítány dle rovnice 1 na koncentraci v 1 ml. Sledována byla také jejich viabilita, což je poměr živých buněk vůči celé populaci.

Rovnice 1 – **přepočet buněk v devíti čtvercích na koncentraci v 1 ml média:**

$$koncentrace\ buněk = \frac{n_b \cdot 10^4 \cdot n}{n_č},$$

kde n_b značí počet buněk v čtvercích, n ředění a $n_č$ počet čtverců v komůrce.

Z buněčné suspenze byl odebrán objem odpovídající 400 milionům buněk do centrifugačních zkumavek a odstředěn 5 minut při 96 × g. Buňky byly resuspendovány ve 34 ml média ExCell293, poté bylo přidáno 6 ml předem připraveného transfekčního mixu obsahující 400 µg plazmidové DNA. To odpovídá výsledné koncentraci 1 µg DNA na 1 milión buněk. 400 µg DNA mixu obsahovalo 2 % (w/w) plazmidu pTW5_aFGF, 10 % (w/w) plazmidu pTW5_p27 a 88 % (w/w) námi připraveného expresního plazmidu (pTW5sec_ICAM-1, pTCCsecC_ICAM-1 či pTCCsecN_ICAM-1). Směs byla doplněna pufrem PBS na výsledný objem 6 ml.

Po smíchání transfekčního mixu a 34 ml média s resuspendovanými buňkami bylo přidáno 120 µl 10 × koncentrovaného lineárního polyethyleniminu v poměru 1:3 (w/w) k DNA. Buněčná suspenze byla převedena do čtverhranných lahví s prodyšným víčkem a ponechána hodinu v inkubátoru Infors Multitron Cell (Infors HT) s 5% nasycením CO_2 za stálého třepání 135 ot./min. Poté byla suspenze doplněna do 200 ml médiem ExCell293 a byla přidána kyselina valproová na výslednou 2mM koncentraci

a odpovídající množství 100 × koncentrovaného mixu antibiotik penicilin (Sigma) a streptamicin (Sigma).

Buněčné kultury byly sklizeny šest dnů po provedení transfekce centrifugací 30 minut na 10000 × *g*. Supernatanty s produkovanými proteiny byly přefiltrovány přes 0,22µm filtrační nástavec, který byl napojen na vývěvu. Filtrát byl zředěn pufrem v poměru 1:1 a tento roztok byl purifikován.

4.11. AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE A KONCENTROVÁNÍ PROTEINU

Námi produkované proteiny nesou na svém C-konci histidinovou kotvu, kvůli tomu byla pro purifikaci zvolena kolonka HisTrap Excel (GE Healthcare), která byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic (GE Healthcare). Před použitím byla kolonka uchovávána v 20% ethanolu, tudíž musela být ekvilibrována. K tomu byl použit PBS pufr, průtok byl nastaven na 5 ml/min. Každý protein ve zfiltrovaných roztocích byl nanesen na kolonku rychlostí 5 ml/min. Dále proběhl oplach PBS pufrem rychlostí 5 ml/min a byla provedena předeluce PBS pufrem obsahujícím 20mM imidazol pro odstranění nečistot nespecificky vázaných na koloně. Posledním krokem byla eluce proteinu PBS pufrem s 250mM imidazolem, průtok byl nastaven na 2,5 ml/min.

Protein byl v elučním pufru postupně koncentrován v koncentrátoru Amicon Ultra (Millipore) pomocí centrifugace při 3900 × *g* a 15 °C po dobu 6 minut. Ke koncentrované části byla přidána další část eluce a filtrát byl odstraněn. Následovala opět centrifugace po stejný časový úsek se shodným nastavením. Celý tento proces byl opakován, dokud nezbylo přibližně 500 µl koncentrovaného proteinu. Tento vzorek bylo již možno nanést na gelovou permeační chromatografii, která je dalším krokem při purifikaci.

4.12. GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE A MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINU VE FRAKCÍCH

HPLC systém ÄKTA basic (GE Healthcare) s připojenou kolonou Superdex^{TM} 200 Increase 10/300GL (GE Healthcare) uchovávanou v 20% ethanolu byl zapnut, kolona byla ekvilibrována pufrem PBS o průtoku 0,5 ml/min a tlak dosahoval maximální hodnoty 2 MPa. Při snížení tlaku byl mírně zvýšen průtok, aby tlak uvnitř kolony nepřesahoval původní hodnotu. Tento postup byl opakován, dokud nebylo dosáhnuto výsledného průtoku 0,75 ml/min. Následně byla dvakrát propláchnuta 2ml nástřiková smyčka pufrem PBS pomocí stříkačky typu Hamilton (Hamilton). Poté byl nanesen koncentrovaný vzorek. Jednotlivé frakce obsahující protein (detekováno absorbanci při 280 nm) byly jímány do mikrozkumavek.

Pro zjištění koncentrace proteinu byl použit spektrofotometr DeNovix DS-11+ (UVItec). Byla nutná znalost molekulové hmotnosti proteinu a molárního absorpčního

koeficientu. Vlnová délka byla programem nastavena na 280 nm, proměřeno bylo ovšem celé spektrum.

Bohužel při purifikaci proteinů s coiled coil sekvencemi nebylo detekováno žádné množství vyprodukovaného proteinu. Další práce se věnuje pouze proteinu ICAM-1 bez coiled coil kotvy.

4.13. VÝPOČET MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI ICAM-1

Molekulární hmotnost extracelulární části proteinu ICAM-1 byla stanovena v programu ProtParam na 50,6 kDa [71]. Jedná se o výpočet dle sekvence aminokyselin, který neuvažuje posttranslační modifikace, jako jsou např. glykosylace či fosforylace.

4.14. SDS ELEKTROFORÉZA

Jednotlivé frakce odpovídající píkům při gelové permeační chromatografii byly ověřeny elektroforézou v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíranem sodným (z angl. sodium dodecyl sulphate, SDS) jako denaturačním činidlem.

Nejprve byly připraveny dva 12,5% rozdělovací gely. Každý obsahoval 1,265 ml deionizované vody, 1,675 ml 29% AA s 1% N,N´-methylen-bis-akrylamidem, 1 ml Tris (pH = 8,8), 40 µl 10% SDS, 2 µl tetramethylethylendiaminu (TEMED) pro řízení polymerázové reakce a 40 µl peroxodisíranu amonného (z angl. ammonium persulfate) jako činidla pro nastartování polymerázové reakce. Následně čerstvě připravený roztok byl pipetován mezi dvě skla do aparatury a byl převrstven deionizovanou vodou.

Po zatuhnutí obou gelů byla voda vylita. Následně byl připraven vrchní gel, zaostřovací, smícháním 0,7 ml deionizované vody, 0,25 ml 29% akrylamidem s 1% N,N´-methylen-bis-akrylamidem, 0,125 ml 1M Tris (pH = 6,8), 10 µl 10% SDS, 1,5 µl TEMED a 10 µl APS. Čerstvě připravený roztok byl pipetován do aparatury tak, že převrstvil rozdělovací gel. Do zaostřovacího gelu byl vložen hřeben a směs byla ponechána 20 minut. Po zatuhnutí byl odejmut hřeben a skla s gelem byla upevněna do stojánku, který byl vložen do elektroforetické vany. Stojánek byl převrstven elektrodovým pufrem po výšku obou gelů a vana byla naplněna stejným pufrem po rysku označující minimální hladinu pro dva pufry.

Byly připraveny dvě sady vzorků, redukující a neredukující. První byla vytvořena smícháním 2,5 µl frakce, 10 µl PBS pufru a 5 µl 5× koncentrovaného neredukujícího pufru obsahujícího SDS a barvivo pro sledování průběhu elektroforézy. Druhá sada byla připravena smícháním 2,5 µl frakce, 10 µl PBS pufru a 5 µl 5 × koncentrovaného redukujícího pufru, který obsahoval SDS, barvivo a 2-merkaptoethanol pro redukci disulfidických můstků.

Následně byly vzorky zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut a pipetovány do jamek gelu po 10 µl. Poté byla elektroforetická vana zakryta víčkem s kontakty a zdroj byl nastaven na 200 V, max. 500 mA po dobu 55 minut.

Po skončení elektroforézy byly vyjmuty gely ze sklíček a špachtlí přeneseny do plastové krabičky, ve kterých byly obarveny barvícím roztokem tři dny. Následně byly gely čtyřikrát odbarveny odbarvovacím roztokem, dokud byly zřetelné pouze zóny obsahující protein.

Gel byl nafocen a upraven na přístroji Alliance Q9 (UVItec).

4.15. STANOVENÍ CYTOTOXICITY NK BUNĚK

Pro ověření biologické aktivity námi produkovaného proteinu ICAM-1 byly použity čerstvě izolované NK buňky a jako metoda byla vybrána metoda průtokové cytometrie (z angl. fluorescence-activated cell sorting, FACS).

4.15.1. Izolace NK buněk

Princip izolace spočívá v negativní selekci z krve dárce. Pro oddělení NK buněk od ostatních krevních derivátů byla použita souprava RosetteSep (Stemcell) [72].

Z krevní konzervy bylo odebráno 10 ml a pipetováno do 50ml centrifugační zkumavky a bylo přidáno 0,5 ml komerčního přípravku „RosetteSep Cocktail“, který obsahuje protilátky vázající erytrocyty a lymfocyty k sobě. Jedinou výjimku tvoří NK buňky. Směs byla inkubována za laboratorní teploty po dobu 10 minut.

Během inkubace bylo do speciální centrifugační zkumavky pipetováno 15 ml gradientového média ficoll (Sigma-Aldrich). Po deseti minutách inkubace byla směs krve a protilátky naředěna 1:1 pufrem PBStk a byla pipetována po stěně do speciální centrifugační zkumavky tak, aby došlo k převrstvení gradientového média. Následovala centrifugace po dobu 20 minut na 1200 × *g*. Dále bylo odejmuto přibližně 10 ml jemně žluté vrchní vrstvy zóny obsahující krevní plazmu s krevními destičkami, viz obr. 9 str. 39.

Mléčně zabarvená zóna nad spodní rudou vrstvou s označením (viz obr. 9 str. 39) byla odpipetována do čisté 50ml centrifugační zkumavky a byla naředěna 40 ml pufru PBStk. Následovala centrifugace na 10 minut a 300 × *g*. Růžovo-červená peleta byla resuspendována v 5 ml vychlazeného lyzačního pufru pro odstranění kontaminace erytrocyty. Poté byla směs centrifugována 10 minut při 300 × *g*. Již bílá peleta byla resuspendována v 5-10 ml předehřátého RPMI média s 20% fetálním hovězím sérem (z angl. fetal bovine serium, FBS).

Obr. 9 – Ukázka vytvořených zón po centrifugaci plné krve s RosetteSep přes ficoll jako gradientové médium.

4.15.2. Počítání NK buněk a jejich inkubace s interleukiny

NK buňky byly spočítány na počítadle buněk Corning Cell Counter (Corning), který stanovil počet miliónů buněk v 1 ml média. Po zjištění koncentrace buněk byla resuspendovaná směs buněk v RPMI s 20% FBS naředěna stejným médiem na koncentraci 1 až 2 miliony buň./ml. Následně byly roztoky s NK buňkami rozpipetovány do 96 jamkové destičky po 100 µl, byly k nim přidány jednotlivé koncentrace interleukinů a byly inkubovat při 37 °C. Výsledný počet NK buněk se pohyboval v rozmezí od 100000 do 200000 v každé podmínce.

4.15.3. Pokrytí jamek proteiny a *in vitro* aktivace NK buněk

Byla připravena 96 jamková destička, do které byly podle schémat pipetovány předem připravené zředěné roztoky proteinů (dle tab. 4, tab. 5 a tab. 6 na str. 40-41). Následně byl obsah jamek pipetován na tři 8 jamkové proužky (tzv. „stripy“) s navázaným nosičem typu Ni-NTA na povrchu. Roztoky byly inkubovány hodinu na třepačce s nastavenými otáčkami na hodnotu 90 ot./min za účelem nachytání proteinu na dno jamek. Po uplynutí šedesáti minut byly „stripy“ třikrát propláchnuty 150 µl pufru PBS. Po posledním oplachu byl pufr odstraněn a do jamek na stripech byly pipetovány suspenze NK buněk, jež byly inkubovány s interleukiny přes noc na 96 jamkové destičce nebo v kultivační lahvi. Buňky byly inkubovány ve „stripech“ s navázanými proteiny 4 hodiny na třepačce Multitron Cell (Infors HT). K pozitivním kontrolám byl přidán mix

500 × koncentrovaného ionomycinu a PMA ve vhodném ředění, inkubace těchto podmínek trvala taktéž 4 hodiny.

Po uplynutí doby potřebné k aktivaci NK buněk proteiny na povrchu „stripů“ byla suspenze kvantitativně převedena do nové 96 jamkové destičky, která byla centrifugována 5 minut při 300 × *g*. V mezičase byla připravena ledová lázeň, po odstředění byl supernatant odstraněn a peleta byla resuspendována ve 2 µl monoklonální protilátky anti-CD107a s konjugovaným barvivem allofykocyaninem (AFC) pro sledování aktivace NK buněk pomocí průtokové cytometrie. Jedna z kontrol byla resuspendována v 1 µl monoklonální protilátky anti-CD161 s konjugovaným barvivem Alexa Fluor. Kontrola kontaminace T lymfocyty byla respuspendována ve 2 µl monoklonální protilátky anti-CD3ε s kojugovaným barvivem fluorosceinem. Po resuspendování byly buňky inkubovány 30 minut ve tmě na ledu.

Poté bylo do každé jamky pipetováno 150 µl pufru PBS s 1% FBS a následovaly 2 oplachy 150 µl pufru PBS s 1% FBS, centrifugace na 5 minut při 300 × *g* a odstranění supernatantu. Na závěr byla peleta buněk resuspendována v 120 µl pufru PBS s 1% FBS a vzorky na 96 jamkové destičce přeneseny v krabici s ledem do laboratoře průtokové cytometrie PřF UK.

4.15.4. První série aktivačních pokusů

Postup při první sérii byl analogický dle kapitoly 4.15.3 na str. 39. Pro pokus bylo pipetováno 100000 buněk do každé podmínky. Proteiny pokrývající jednotlivé jamky jsou společně s koncentracemi použitých interleukinů zaznamenány v tab. 4.

Tab. 4 – Schéma podmínek pro první sérii pokusů obsahující rozdílné koncentrace interleukinů (IL-2, IL-12 a IL-15) pro inkubaci s NK buňkami přes noc a proteinem MICA (50 pmol na jamku) 4 hodiny před měřením. Podmínky zahrnující aktivaci mimo destičku, přítomnost T lymfocytů, pozitivní a negativní kontrolu nejsou zaznamenány v tabulce.

Druh interleukinu **Koncentrace IL [ng/ml]**	Aktivace samotnou destičkou	160 IL-2	Aktivace samotnou destičkou	40 IL-2	80 IL-2	160 IL-2	100 IL-12	200 IL-12
Proteiny na povrchu jamek	-	-	MICA	MICA	MICA	MICA	MICA	MICA
Druh interleukinu **Koncentrace IL [ng/ml]**	250 IL-15	500 IL-15	1000 IL-15	80 IL-2 500 IL-15	100 IL-12 500 IL-15	80 IL-2 100 IL-12	200 IL-12 250 IL-15	1000 IL-15 50 IL-12
Proteiny na povrchu jamek	MICA	MICA	MICA	MICA	MICA	MICA	MICA	MICA

4.15.5. Druhá série aktivačních pokusů

V druhém případě bylo postupováno analogicky dle kapitoly 4.15.3. na straně 39 a schéma pokusu je zobrazeno, viz tab. 5, kdy pro jednotlivé podmínky bylo použito 200000 buněk.

Tab. 5 – Schéma podmínek pro druhou sérii pokusů obsahující koncentrace IL-2 pro inkubaci s NK buňkami přes noc a proteiny MICA, HSA nebo ICAM-1 každého z proteinů vždy bylo 50 pmol na jamku (v případě dvou proteinů tedy celkem 100 pmol). NK buňky byly inkubované s proteiny 4 hodiny před měřením. Podmínky zahrnující aktivaci mimo destičku, přítomnost T lymfocytů, pozitivní a negativní kontrolu nejsou zaznamenány v tabulce. Čísla v závorkách značí frakce z gelové permeační chromatografie

Druh interleukinu **Koncentrace IL [ng/ml]** **Proteiny na povrchu jamek**	Aktivace samotnou destičkou Bez IL -	160 IL-2 HSA	160 IL-2 MICA	160 IL-2 MICA HSA	160 IL-2 HSA ICAM-1 (9)	160 IL-2 MICA ICAM-1 (9)	160 IL-2 HSA ICAM-1 (11)	160 IL-2 MICA ICAM-1 (11)
Druh interleukinu **Koncentrace IL [ng/ml]** **Proteiny na povrchu jamek**	160 IL-2 HSA ICAM-1 (12)	160 IL-2 MICA ICAM-1 (12)	160 IL-2 HSA ICAM-1 (13)	160 IL-2 MICA ICAM-1 (13)	160 IL-2 HSA ICAM-1 (14)	160 IL-2 MICA ICAM-1 (14)	160 IL-2 HSA ICAM-1 (16)	160 IL-2 MICA ICAM-1 (16)

4.15.6. Třetí série pokusů

I v závěrečné sérii měření bylo postupováno dle kapitoly 4.15.3. na straně 39, přesné složení jednotlivých podmínek pipetovaných v triplikátech je v tab. 6. Každá podmínka obsahovala 200000 buněk ve 100 µl.

Tab. 6 – Schéma podmínek pro třetí sérii pokusů obsahující koncentrace IL-2 pro inkubaci s NK buňkami přes noc a proteiny MICA, HSA nebo nejúčinnější frakce ICAM-1. Každého z proteinů vždy bylo 50 pmol na jamku (v případě dvou proteinů tedy celkem 100 pmol). Pipetováno bylo v triplikátech. Proteiny byly inkubované s NK buňkami 4 hodiny před měřením. Podmínky zahrnující aktivaci mimo destičku, přítomnost T lymfocytů, pozitivní a negativní kontrolu nejsou zaznamenány v tabulce. Čísla v závorkách značí frakce sesbírané z gelové permeační chromatografie.

Druh interleukinu **Koncentrace IL [ng/ml]** **Proteiny na povrchu jamek**	Aktivace samotnou destičkou Bez IL	160 IL-2 HSA	160 IL-2 MICA HSA	160 IL-2 HSA ICAM-1 (12)	160 IL-2 MICA ICAM-1 (12)	160 IL-2 HSA ICAM-1 (13)	160 IL-2 MICA ICAM-1 (13)

4.15.7. Průtoková cytometrie

Analyzované buňky byly značeny protilátkami s fluorescenčními značkami. Měření bylo provedeno na předem kalibrovaném přístroji BD LSDR II (BD Biosciences). Použit byl červený excitační laser s vlnovou délkou 637 nm a emisním filtrem R1 670/30 nm. Měření bylo provedeno na 96 jamkové destičce Mgr. Barborou Kalouskovou za použití módu HTS. Výsledná data byla vyhodnocena v programu FlowJo.

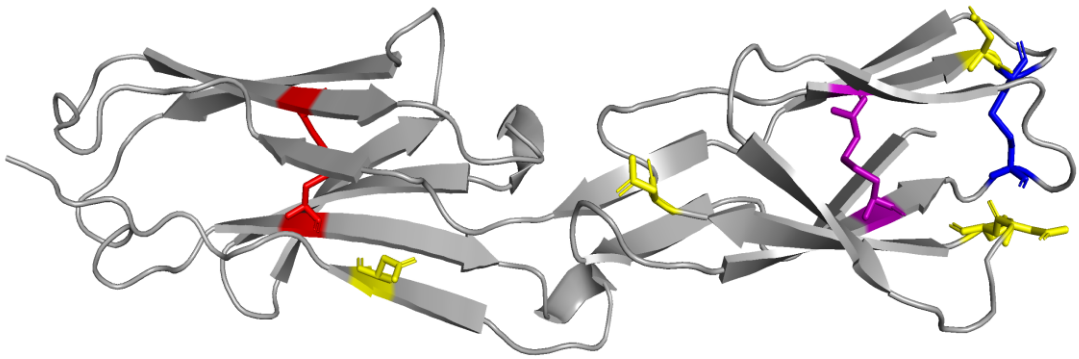
5. VÝSLEDKY

5.15. PŘÍPRAVA PLAZMIDŮ PRO PRODUKCI PROTEINŮ

První z cílů byl připravit expresní vektor pro extracelulární část proteinu ICAM-1 s coiled coil motivem na C-konci a ICAM-1 s coiled coil motivem na N-konci. Všechny proteiny obsahovaly navíc His kotvu a sekvenci pro sekreci do média. Aminokyselinová sekvence našeho proteinu ICAM-1 je zobrazena na obr. 10.

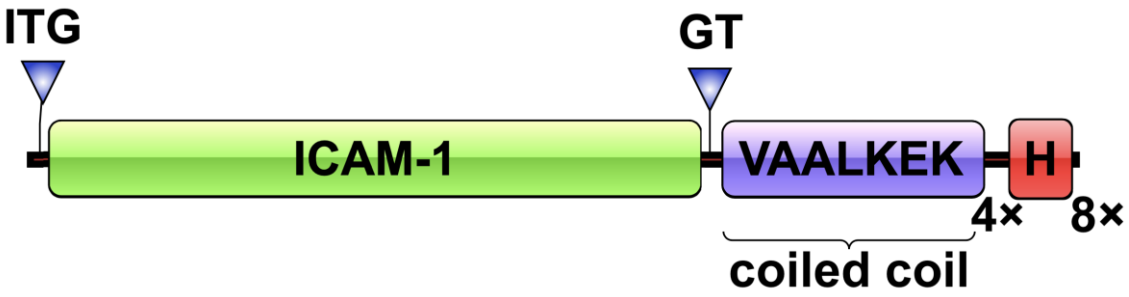
MGELLLLLLLGLRLQLSLGITGQTSVSPSKVILPRGGSVLVTCSTSCDQPKLLGIET
PLPKKELLLPGNNRKVYELSNVQEDSQPMCYSNCPDGQSTAKTFLTVYWTPERVELA
PLPSWQPVGKNLTLRCQVEGGAPRANLTVVLLRGEKELKREPAVGEPAEVTTTVLVR
RDHHGANFSCRTELDLRPQGLELFENTSAPYQLQTFVLPATPPQLVSPRVLEVDTQG
TVVCSLDGLFPVSEAQVHLALGDQRLNPTVTYGNDSFSAKASVSVTAEDEGTQRLTC
AVILGNQSQETLQTVTIYSFPAPNVILTKPEVSEGTEVTVKCEAHPRAKVTLNGVPA
QPLGPRAQLLLKATPEDNGRSFSCSATLEVAGQLIHKNQTRELRVLYGPRLDERDCP
GNWTWPENSQQTPMCQAWGNPLPELKCLKDGTFPLPIGESVTVTRDLEGTYLCRARS
TQGEVTRKVTVNVLSPRYEGTHHHHHHHH

Obr. 10 – Aminokyselinová sekvence extracelulární části ICAM-1 se sekrečním signálem pro produkci do média a navázanou histidinovou kotvou. cysteiny zabarvené modře (48↔92), fialově (52↔56), červeně (135↔186), oranžově (332↔371), šedě (403↔419) a růžově (431↔457) tvoří v extracelulární části disulfidické můstky a jsou zobrazena graficky na obr. 11. Protein je 8× N-glykosylován na asparaginech (pozice 130, 145, 183, 202, 267, 296, 385, 406, 521 a 530) [73,74,75], jenž jsou zaznačeny žlutě. Teoretická velikost proteinu s histidinovou kotvou bez glykosylace byla stanovena online programem ProtParam na hodnotu 50,6 kDa [71].

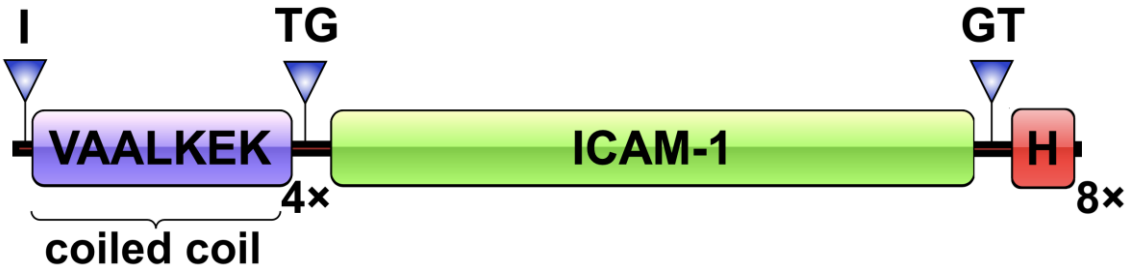


Obrázek 11 – Krystalová struktura dvou N-terminálních domén proteinu ICAM-1. Sekundární struktura je zobrazena stuhovým značením. Žlutě jsou značeny asparaginy (poz. 130, 145, 183 a 202) jako místa pro N-glykosylaci. Cysteinovy tvořící disulfidickou vazbu jsou zabarveny modře (48↔92), fialově (52↔56), a červeně (135↔186). (Kód PDB: 1IAM) [73,74,75].

Schéma zobrazující extracelulární část ICAM-1, na jehož C-konec je navázán coiled coil motiv i histidinová kotva, je zobrazeno společně se sekrečním signálem na obr. 12, druhá varianta proteinu s coiled coil sekvenci nalézt na N-konci, se nachází na obr. 13.



Obr. 12 – ***Schéma aminokyselinové sekvence expresního konstruktu ICAM1 s coiled coil motivem na C-konci*** *a na něj navázanou histidinovou kotvou. Triplet aminokyselin ITG značí pozůstatek sekrečního signálu a zbytek restrikčního klonovacího místa AgeI. GT je pozůstatek restrikčního klonovacího místa pro KpnI. Schéma bylo připraveno v programu IBS [76].*



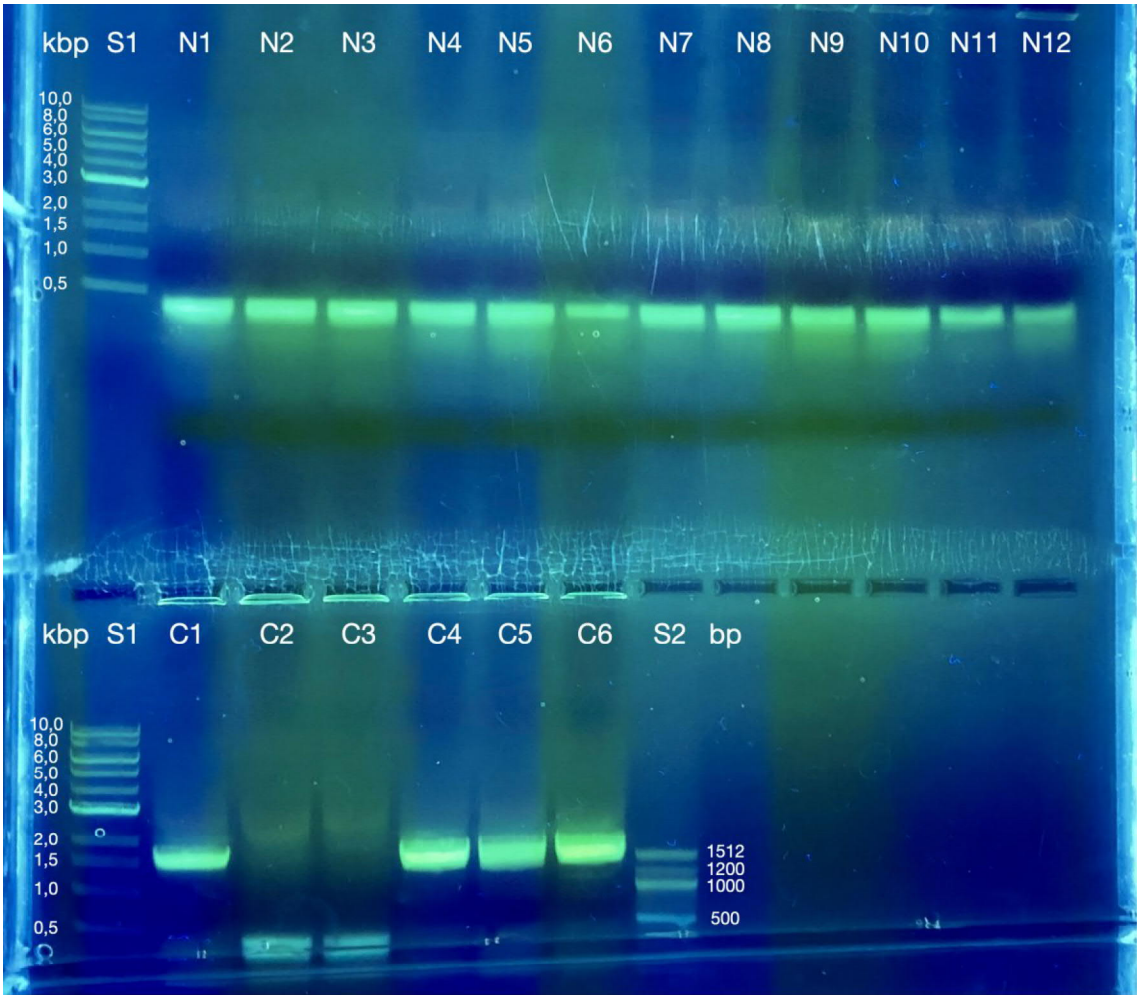
Obr. 13 – ***Schéma aminkokyselinové sekvence expresního konstruktu ICAM-1 s coiled coil motivem na N-konci,*** *na který navazuje sekvence ICAM-1 a histidinová kotva. Aminokyselina I je zbytek sekrečního signálu, TG značí pozůstatek restrikčního místa pro enzym AgeI a GT je pozůstatek restrikčního místa enzymu KpnI. Schéma bylo připraveno v programu IBS [76].*

Prvním krokem bylo vyštěpení inzertu ICAM-1 z poskytnutého donorového plazmidu (pTW5sec_ICAM-1) pomocí endonukleáz AgeI a KpnI. Linearizace recipientních plazmidů pro vložení sekvence extracelulární domény ICAM-1 s coiled coil sekvencemi (pTCCsecC a pTCCsecN) byla provedena pomocí stejných enzymů. Následovalo přečištění DNA pomocí agarosové elektroforézy a její izolace z gelu. Koncentrace jednotlivých fragmentů DNA použitých pro ligaci jsou zapsány v tab. 7.

Tab. 7 – Koncentrace restrikčně štěpeného insertu a plazmidů po přečištění agarosovou elektroforézou.

Plazmid po štěpení restrikčními endonukleázami	Koncentrace [ng/µl]
Inzert ICAM-1	16,8
pTCCsecN	15,9
pTCCsecC	34,3

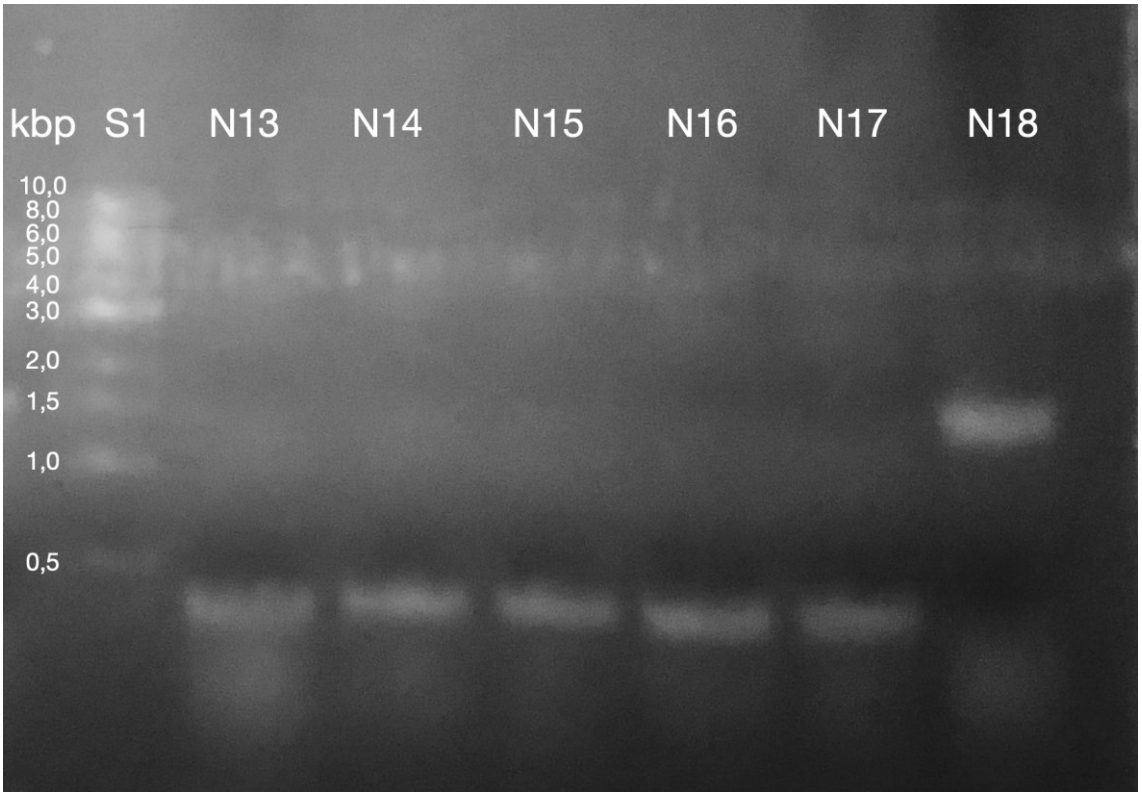
Inzert (ICAM-1) byl smíchán společně s linearizovanými recipientními plazmidy (pTCCsecC a pTCCsecN) ve vhodných poměrech pro ligační reakci. Ke směsi byla přidána T4 DNA ligáza a po inkubaci byly vloženy do kompetentních buněk *E. coli* a ponechány na miskách přes noc. Vyrostlé kolonie obsahující již ligované produkty pTCCsecC_ICAM-1 a pTCCsecN_ICAM-1 na bakteriologické kultivační misce byly setřeny a byla provedena PCR kolonií pro ověření přítomnosti insertu ICAM-1 v plazmidech. Počet kolonií byl výrazně vyšší u pTCCsecN_ICAM-1. Následně byla pro vizualizaci správnosti ligace provedena agarosová elektroforéza, jejíž výsledek je zobrazen na obr. 14.



Obr. 14 – ***Záznam agarosové elektroforézy po PCR z kolonií v 0,5 % gelu.*** *Čísla 1-13 značí čísla vybraných narostlých kolonií na kultivační misce, písmeno C značí ligovaný expresní vektor pTCCsecC_ICAM-1 a písmeno N představuje pTCCsecN_ICAM-1. Očekávaná velikost expresních vektorů je 1467 párů bazí (bp). Úspěšná amplifikace proběhla pouze u vzorků C1, C4, C5 a C6. V drahách S1 a S2 jsou standardy molekulových hmotností (New England Biolabs).*

Protože v případě pTCCsecN_ICAM-1 nebyla žádná z analyzovaných kolonií pozitivní, byla provedena další PCR kolonií s novými vybranými koloniemi. Výsledek je

zobrazen na Obr. 15 na str. 46. Úspěšnost ligace u sekvence s N-koncovým coiled coil motivem byla výrazně nižší, nežli tomu bylo u druhé verze.



*Obr. 15 – **Záznam agarosové elektroforézy PCR kolonií.** Písmeno N značí expresní vektor pTCCsecN_ICAM-1 a číslo náhodně vybrané kolonie narostlé na kultivační misce. V dráze S1 se nachází standard molekulových hmotností (New England Biolabs). Ligace byla úspěšná u vzorku N18, kdy velikost ligovaného plazmidu je 1467 bp.*

Z pozitivních klonů byla izolována plazmidová DNA, která byla pro ověření správnosti sekvenována. Po kontrole bylo pozitivními koloniemi zaočkováno LB médium s antibiotikem za účelem izolace zásobního množství DNA pro následnou transfekci. Médium bylo inkubováno při 37 °C na třepačce přes noc. Z narostlých kultur byla velkoobjemově izolována DNA, jejíž koncentrace je uvedena v tab. 8.

Tab. 8 – Koncentrace DNA, Absorbance při 260 nm a čistota DNA z velkoobjemové produkce plazmidů pro pTCCsecC_ICAM-1 a pTCCsecN_ICAM-1.

Plazmid	Koncentrace [μg/μl]	A_{260}	$A_{260/280}$
pTCCsecC_ICAM-1	1,3	40,6	1,92
pTCCsecN_ICAM-1	2,0	25,9	1,87

5.16. PRODUKCE A PURIFIKACE PROTEINŮ

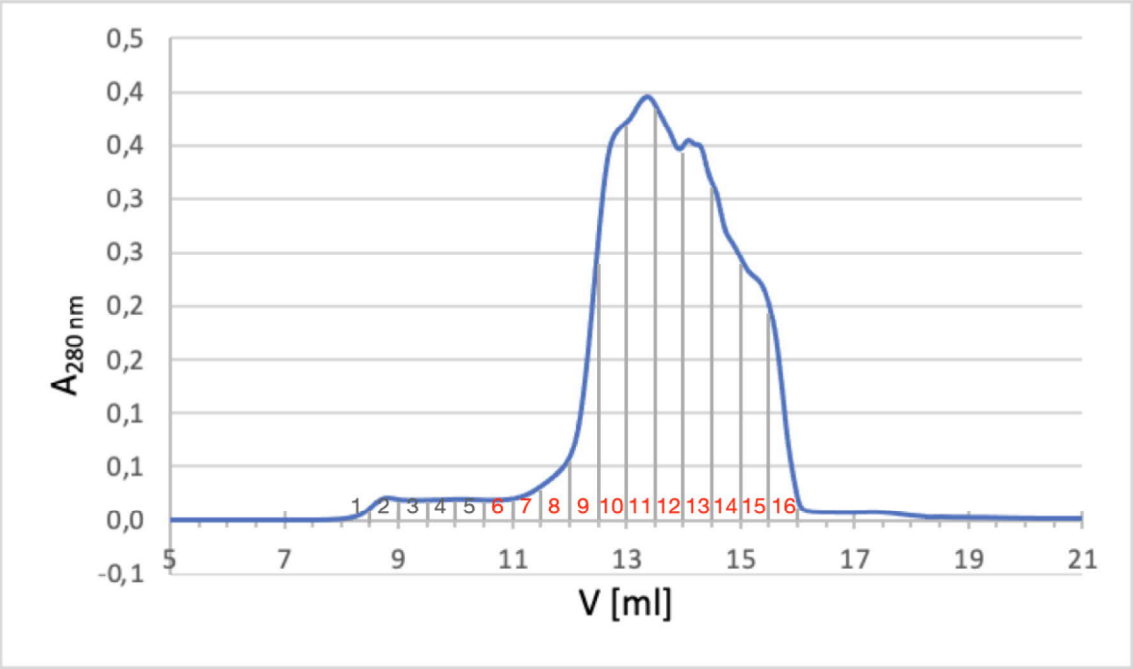
DNA pocházející z velkoobjemové produkce byla použita na tranzientní transfekci lidské buněčné linie HEK293T viz kapitola 4.10. na straně 35. Tato expresní linie lidských buněk byla zvolena, jelikož proteiny jsou posttranslačně významě glykosylačně upravovány, což prokaryotické buňky neumožňují. Po hodinové inkubaci suspenze buněk a transfekčního mixu na třepačce byly přidány antibiotika a kyselina valproová. Buňky byly ponechány v inkubátoru s přívodem oxidu uhličitého a při teplotě 37 °C. Takto byly exprimovány proteiny ICAM-1 (expresní vektor pTW5sec_ICAM-1), ICAM-1 s coiled coil kotvou na C-konci (pTCCsecC_ICAM-1) a na N-konci (pTCCsecN_ICAM-1).

Šestý den od tranzientní transfekce s 400 milióny buněk ve 200 ml média byly kultury z inkubátoru sklizeny centrifugací viz str. 36 kap. 4.11. Supernatant s proteinem byl zmražený pro pozdější purifikaci.

Námi produkované proteiny jsou sekretovány do média a nesou na svém C-konci histidinovou kotvu, což je sekvence 8 histidinů jdoucích po sobě. Proto pro purifikaci byla zvolena afinitní chromatografie, jejíž nosič obsahuje nikelnaté či kobaltnaté ionty s vysokou afinitou k imidazolovému kruhu, který je obsažen v histidinu.

Před samotnou purifikací bylo médium s proteinem přefiltrováno a naředěno 1:1 pufrem PBS. Pro izolaci byla vybrána kolonka s nosičem typu Ni-NTA, jež obsahuje chelatované nikelnaté ionty. Předeluce byla provedena 20mM imidazolem v pufru PBS a slouží pro zvýšení čistoty proteinu. Zároveň byla sbírána pro případ uvolnění proteinu již za nižší koncentrace imidazolu, k tomuto jevu ovšem nedošlo. Eluce byla provedena 250mM imidazolem v pufru PBS. Při afinitní chromatografii byla sledována změna absorbance při 280 nm. Při této hodnotě absorbuje tryptofan, což poukazuje na přítomnost proteinu.

U vzorků transfekovaných plazmidy pTCCsecC_ICAM-1 a pTCCsecN_ICAM-1 nebyla zjištěna přítomnost proteinu v médiu. Tudíž pouze eluovaný ICAM-1 byl koncentrován centrifugací přes koncentrátor na výsledný objem cca 0,5 ml (viz str. 36 kap. 4.11). Přečištění bylo provedeno pomocí gelové permeační chromatografie. Postup je popsán na straně 36 v kapitole 4.12. a záznam je uveden na obr. 16 str. 48.



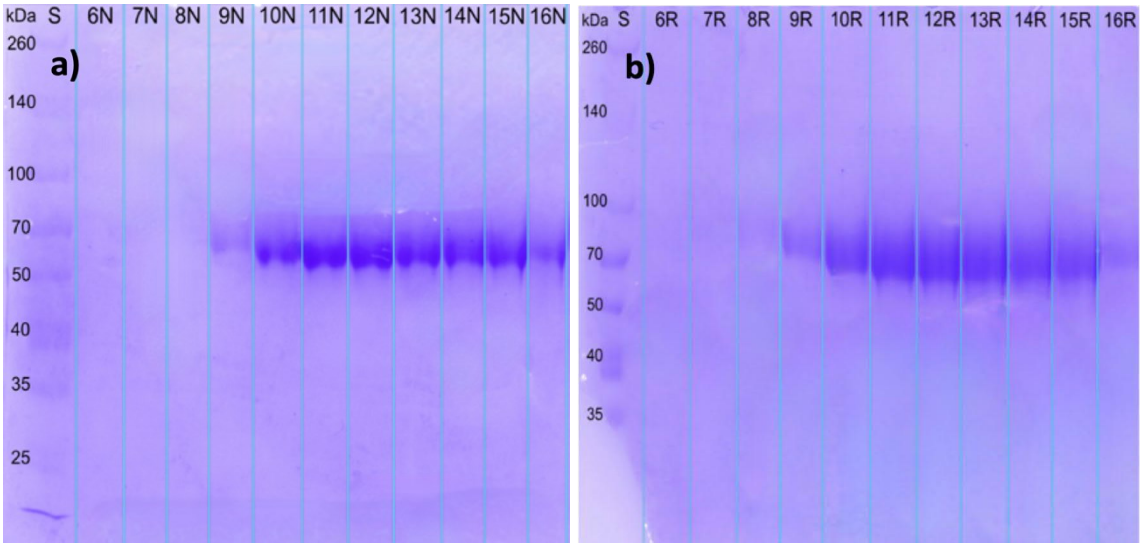
Obr. 16 – ***Záznam gelové permeační chromatografie proteinu ICAM-1,*** *Produkce proteinů byla v objemu 200 ml (400 milionů buněk). Byla použita kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL. Šedě značené zóny s čísly (1-16) představují frakce o objemu 0,5 ml. Sbírány byly červeně značené frakce v elučním objemu 10,5 ml až 16,0 ml.*

Koncentrace a výtěžky vybraných sesbíraných frakcí proteinu ICAM-1 (6-16) byly změřeny na spektrofotometru DS-11 (DeNovix) dle kap. 4.12. na straně 36 a jsou zobrazeny v tab. 9 na str. 49. Celkové množství námi připraveného proteinu bylo 8,33 mg. Pro kontrolu čistoty jednotlivých frakcí byly z eluátu následně připraveny redukované a neredukované vzorky pro SDS elektroforézu v 10% gelu (viz 4.14. str. 37). Důvod pro redukci vzorku byl zjistit možnou dimerizaci proteinu přes disulfidické vazby. Ta ovšem nebyla potvrzena.

Hmotnost proteinu byla spočítána v programu ProtParam, který určil z primární sekvence proteinu ICAM-1 a na něj navázané histidinové kotvy hodnotu 50,6 kDa [71]. Tento online-dostupný program neuvažuje ko/posttranslační modifikace jako jsou například O-/N-glykosylace. Motiv N-glykosylace je dán sekvencí N-X-S/T, kdy X je libovolná aminokyselina kromě prolinu [74]. Místa pro navázání sacharidových řetězců se nachází na asparaginech v pozicích 130, 145, 183, 202, 267, 296, 385, 406 [74,75]. O-glykosylace je na tomto proteinu pouze predikována na dvou místech programem NetOGlyc 4.0, ovšem doposud nebyla experimentálně prokázána. Celková hmotnost celého proteinu může dosahovat při plném obsazení všech glykosylačních míst velikosti v rozmezí 80-114 kDa [27], náš protein byl ovšem složen pouze z extracelulární části a na ní navázané histidinové kotvy. Na SDS PAGE však pozorujeme hmotnost odpovídající 70 kDa (viz obr. 17 na straně 49). Zároveň protein tvoří poměrně široký proužek, což odpovídá přítomnosti několika proteinů s velice blízkými molekulovými hmotnostmi. Tento efekt byl způsoben přítomností přirozené komplexní glykosylace savčího typu.

Tab. 9 – Koncentrace a výtěžky vybraných frakcí proteinu ICAM-1, které byly následně vybrány pro SDS elektroforézu. Frakce jsou zaznačené na chromatogramu (obr. 16 na straně 48). Celkové množství námi purifikovaného proteinu činilo 8,33 mg.

Číslo frakce	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**
Koncentrace [mg/ml]	0,12	0,20	0,25	0,80	1,80	2,62	2,69	2,75	2,46	1,84	1,10
Výtěžek [mg]	0,06	0,10	0,13	0,40	0,90	1,31	1,35	1,38	1,23	0,92	0,55



*Obr. 17– **záznam SDS PAGE elektroforézy vzorků ICAM-1 v 10% polyakrylamidovém gelu.** Vzorky 6-16 odpovídají frakcím sbíraným z gelové permeační chromatografie (viz obr. 16 na str. 48). Do dráhy značené S byl pipetován standard molekulových hmotností. Molekulární hmotnost proteinu ICAM-1 byla spočítána dle aminokyselinové sekvence na 50,6 kDa programem ProtParam, který ovšem nezahrnuje glykosylace [71]. Vzorky na gelu **(a)** značené písmenem N byly připravené v neredukujícím pufru. Naproti tomu, druhý gel **(b)** obsahuje vzorky značené R, které byly připravene v redukujícím pufru za přítomnosti činidla 2-merkaptoethanol. Dimerizace proteinů přes disulfidické můstky nebyla potvrzena.*

5.17. IZOLACE NK BUNĚK Z KRVE

Pro izolaci NK buněk z krve dárců byla vybrána metoda negativní selekce. Použitý izolační kit (RosetteSep) spojuje všechny lymfocyty, kromě NK buněk, s červenými krvinkami pomocí tetravalentních protilátek, které při následné centrifugaci sedimentují pod použité gradientové médium ficoll. Možná kontaminace červenými krvinkami byla následně odstraněna přidáním lyzačního pufru a následnou centrifugací. Kontrola kvality izolovaných NK buněk byla jednak vizuální při počítání buněk a také pomocí fluorescenčně značených protilátek proti T lymfocytům při průtokové cytometrii.

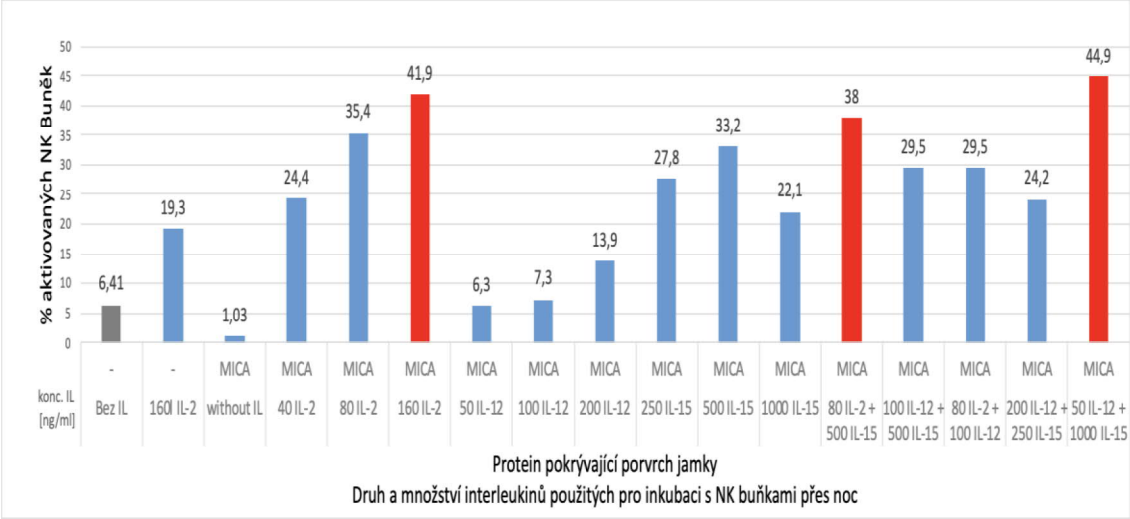
Úspěšně izolované NK buňky byly preinkubovány přes noc s vybranými interleukiny za účelem nalezení nejvhodnějších aktivačních podmínek (viz kap. 5.18 str. 50).

5.18. OPTIMALIZACE CYTOTOXICKÝCH POKUSŮ POMOCÍ PŘIPRAVENÝCH REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ ICAM-1 A MICA

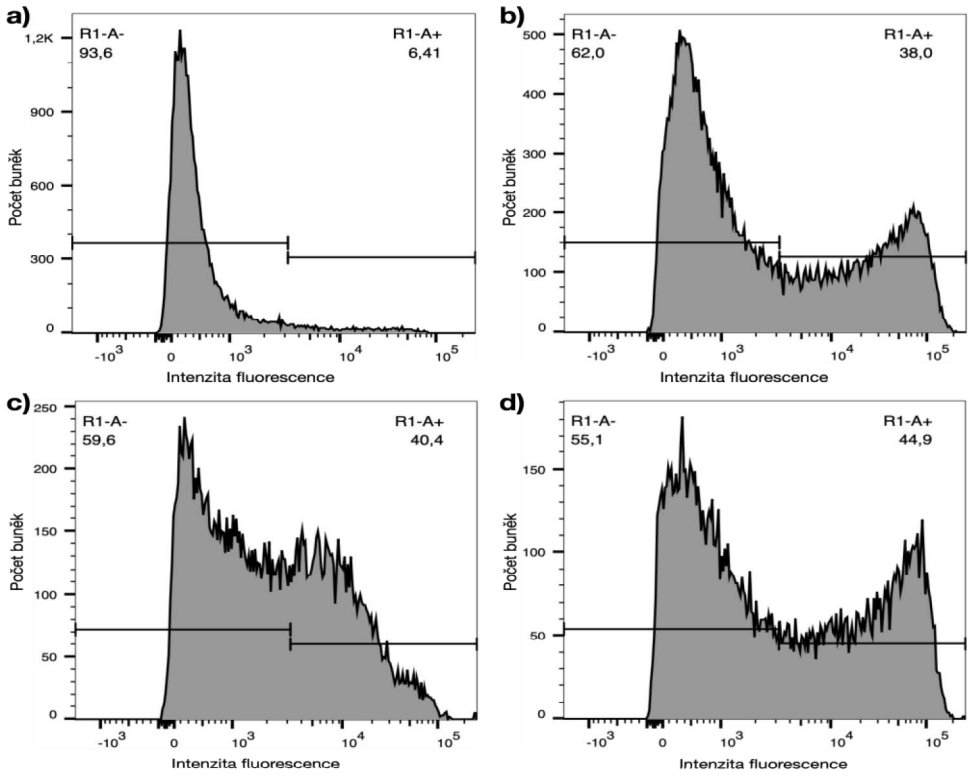
Aktivované NK buňky se liší od neaktivovaných množstvím a druhy exprimovaných receptorů či jiných znaků (například CD107a) na svém povrchu, které je možné značit protilátkami s fluorescenčními značkami. To je detekovatelné pomocí metody průtokové cytometrie.

Buňky byly čerstvě izolovány den před měřením a inkubovány s různými koncentracemi a kombinacemi interleukinů přes noc (viz kap. 4.15.2 a 4.15.3 str. 39). Preaktivace NK buněk s cytokiny je nutná, aby byly buňky schopné aktivace při kontaktu s ligandy aktivačních receptorů. Míra aktivace přirozených zabijáků byla měřena pomocí protilátky proti znaku degranulace NK buněk, molekule CD107a, která byla značena fluorescenční značkou AFC. Jako pozitivní kontrola preaktivace buněk sloužila fluorescenčně značená protilátka anti-CD161. Pro kontrolu zjištění míry kontaminace T lymfocyty byla vybrána protilátka anti-CD3ε, která fluorescenčně značí receptor, jenž se nachází pouze u T buněk na cytoplazmatické membráně.

Cíl prvního měření bylo stanovit optimální podmínky pro inkubaci NK buněk s jednotlivými interleukiny či jejich kombinacemi (IL-2, IL-12 a IL-15), Aktivace byla zprostředkována pomocí ligandu MICA, kterým byly pokryty povrchy „stripů“ (viz kap. 4.15.3 str. 39). Samotné měření destičky bylo provedeno Mgr. Barborou Kalouskovou na přístroji BD LSR II (BD Biosciences) v Laboratoři cytometrie PřF UK (viz kap. 4.15.3. str. 39). Použité fluorofory jsou excitovány červeným laserem při 640 nm a pozorovány s emisním filtrem R1 o hodnotách 670/30 nm. Všechny výsledky prvního měření jsou shrnuty do grafu (viz obr. 18 na str. 51) a histogramy nejúspěšnějších podmínek z této série pokusů jsou ukázány na obr. 19 str. 51.



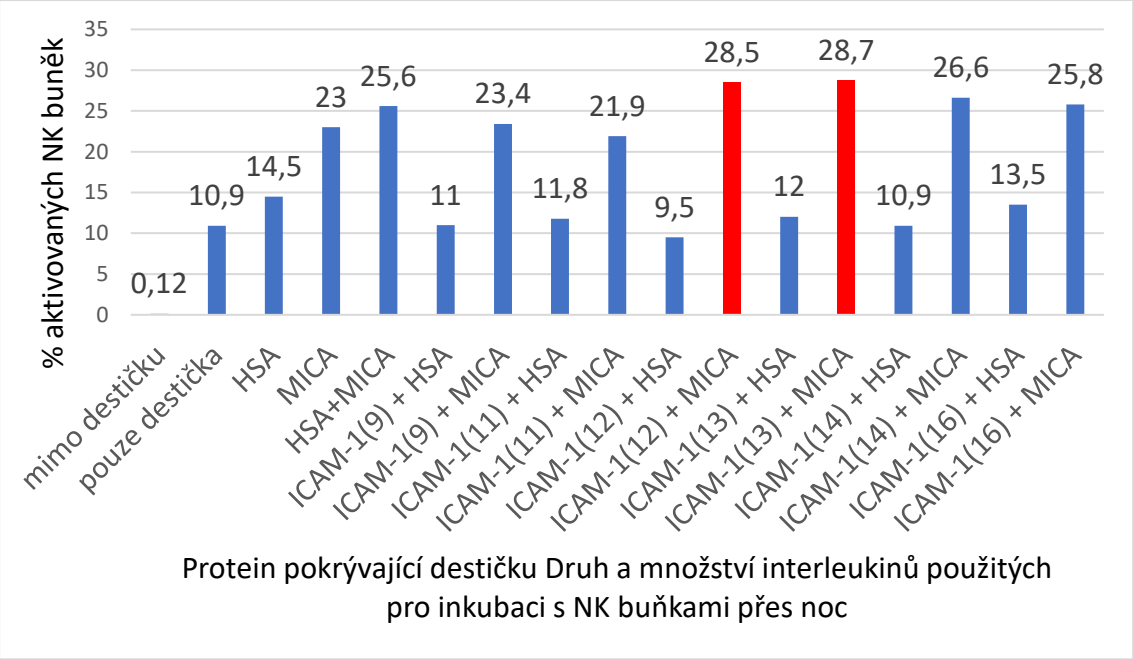
Obr. 18 – ***Optimalizace aktivace NK buněk proteinem MICA po předchází kultivaci interleukiny.*** *Preinkubace čerstvě izolovaných NK buněk proběhla přes noc s různými koncentracemi a kombinacemi IL-2, IL-12 a IL-15. Aktivace proteinem MICA proběhla přes navázaný protein na povrchu jamek. Šedě a červeně značené pokusy jsou zobrazeny formou histogramů na obr. 19.*



Obr. 19 – ***Příklady histogramů cytotoxických pokusů s NK buňkami, které jsou fluorescenčně značeny protilátkou antiCD107a s AFC.*** *Obrázek značený* ***(a)*** *zobrazuje NK buňky inkubované bez interleukinu i bez proteinu MICA;* ***(b)*** *ukazuje inkubaci NK buněk přes noc s kombinací 80 ng/ml IL-2 + 500 ng/ml IL-15 a následnou čtyřhodinovou inkubaci s proteinem MICA ;****(c)*** *zde byly NK buňky inkubovány přes noc s IL-2 o koncentraci 160 ng/ml a následnou čtyřhodinovou inkubaci s proteinem MICA;* ***(d)*** *zde se jedná o nejúspěšnější kombinaci interleukinů o koncentracích 50 ng/ml IL-12 +1000 ng/ml IL-15 následnou čtyřhodinovou inkubaci s proteinem MICA. Přestože na obr. 18 je podmínka* ***(c)*** *značená jako velmi úspěšná, histogramy u podmínek* ***(b)*** *a* ***(d)*** *lépe oddělují aktivované buňky od neaktivovaných.*

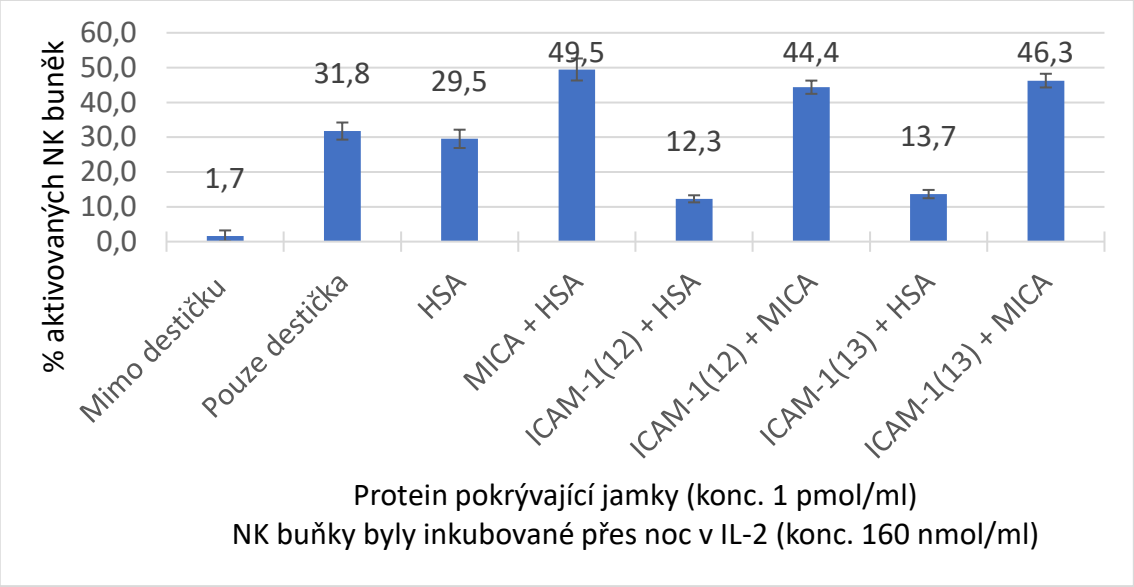
Po zjištění optimálních podmínek pro aktivaci NK buněk byla vybrána inkubace 160 ng/ml IL-2 přes noc pro následující sérii měření. I když tato podmínka nebyla v absolutních číslech nejlepší (tou byla kombinace IL-12 a IL-15), z hlediska nákladů na použité interleukiny je nejvýhodnější a biologický efekt je srovnatelný.

Úkolem pro druhou sérii měření bylo ověřit po čtyřhodinové inkubaci s proteiny biologickou aktivitu jednotlivých frakcí ICAM-1 sesbíraných z gelové permeační chromatografie. Jako nejúspěšnější frakce se jevila dvanáctá a třináctá v kombinaci s proteinem MICA, viz obr. 20. Lidský sérový albumin (HSA) s histidinovou kotvou byl přidán v ekvivalentní koncentraci, aby doplnil celkové množství proteinu na ekvivalentní hodnotu, jako tomu je u podmínek obsahujících ligand MICA. Proteiny se zachytí na destičku pomocí histidinové kotvy. V případě použití kombinace dvou proteinů dochází ke kompetici o volné skupiny, proto bylo nutné některé z podmínek doplnit o HSA, aby byl výsledek porovnatelný.



Obr. 20 – ***Výsledky aktivace pomocí jednotlivých frakcí proteinu ICAM-1 v kombinaci s MICA či HSA.*** *NK buňky byly preinkubovany přes noc se 160 ng/ml IL-2 a na „stripech" s navázanými proteiny 4 hodiny před měřením. Nejvíce aktivující podmínky jsou zaznačeny červeně a byly použity pro poslední sérii měření. Čísla v závorkách značí různé frakce proteinu ICAM-1.*

Pro poslední sérii testů byla využila stejná metoda aktivace NK buněk *in vitro*. Jejím úkolem bylo proměřit nejúspěšnější podmínky z předchozí série pokusů (viz červené sloupce na obr. 20). Jednalo se o frakce 12 a 13, které byly použity pro aktivaci NK buněk. Pokusy byly pipetovány a měřeny v triplikátech. Výsledky jsou zaznamenány na obr. 21 str. 53. Z dat vycházejících z posledního měření vyplývá, že pro protein MICA v kombinaci s ICAM-1 nezvyšuje povrchovou expresi receptoru CD107a, tudíž pravděpodobně nepřispívá k cytotoxické aktivitě NK buněk.



Obrázek 21 – ***Výsledky optimalizace dvou nejlépe aktivujících frakcí proteinu ICAM-1 v kombinaci s MICA či HSA****. NK buňky byly preinkubovány přes noc se 160 ng/ml IL-2 a následně s proteiny ICAM-1, HSA či MICA 4 hodiny před měřením. Čísla v závorkách značí odebranou frakci ICAM-1 z gelové permeační chromatografie.*

6. DISKUZE

Cílem této práce byla příprava proteinu ICAM-1 v různých verzích a testování jeho biologické aktivity společně s proteinem MICA, který mi byl poskytnut Mgr. Barborou Kalouskovou. Ověření vlivu proteinů na cytotoxicitu probíhalo pomocí *in vitro* pokusů s NK buňkami, které exprimují na svém povrchu aktivační receptory pro oba proteiny. NK buňky byly čerstvě izolovány z krevní konzervy od anonymních dárců. Po izolaci byly NK buňky přes noc ponechány k inkubaci s vybranými cytokiny před každým měřením. Testovány byly vlivy různých koncentrací jak jednotlivých interleukinů, tak jejich kombinací, protože je zde možnost jejich synergického působení.

Produkce všech tří variant extracelulární části ICAM-1 byla provedena v lidském expresním systému využívající linii lidských ledvinných buněk (HEK293T), které se jako eukaryota vyznačují schopností zavést komplexní glykosylaci na proteiny.

Byla snaha připravit verze rozšířené o coiled coil motiv za účelem následného navázání na syntetický polymer s využitím pro terapeutické účely. Bohužel ani jedna z variant nebyla úspěšně produkována. Jako řešení negativní exprese proteinu se nabízí využití jiného expresního systému nebo optimalizace tranzientní transfekce. Příčinou neúspěchu může být také přidaná coiled coil sekvence, jež mohla narušit stabilní strukturu rekombinantně připravené extracelulární části ICAM-1.

Pro purifikaci přirozené formy extracelulární části byla zvolena afinitní chelatační chromatografie, jelikož námi připravený protein má navázanou histidinovou kotvu na C-konci. Eluce byla provedena 250mM imidazolem a nebyly pozorovány žádné náznaky sraženého proteinu. Následovala gelová chromatografie, na jejímž chromatogramu se objevuje pík, který však není jednoduše symetrický a má více menších vrcholů, viz obr. 16 na straně 48. Bylo tedy nutné ověřit, jestli je protein čistý a jestli celý objem píku odpovídá proteinu ICAM-1.

Pro zjištění případných kontaminací byla provedena SDS elektroforéza v redukujícím i neredukujícím prostředí. Vzniklé zóny se nevyznačovaly klasickými diskrétními proužky (obr. 17 str. 49), nýbrž jejich hrany by se daly charakterizovat jako rozpité. Buňky HEK293T glykosylují proteiny neuniformě, což způsobuje neostrost zón na gelu. To zapříčiňuje různé výsledné velikosti proteinů v závislosti na míře využití potenciálních glykosylačních míst a vysoké variabilitě připojovaných sacharidových řetězců. Velikost proteinu v neredukujícím prostředí (cca 70 kDa) byla určena z přibližných středů zón a byla porovnána s teoretickou hodnotou, která byla stanovena dle primární struktury na 50,6 kDa, tato kalkulace však nebere v potaz glykosylaci. U redukujících vzorků došlo k posunu velikosti na vyšší hodnoty. Možným vysvětlením může být snížení pohyblivosti proteinů díky redukci cysteinových můstků, čímž se může změnit tvar proteinu, který je už tak rozbalený v přítomnosti SDS. Výsledným efektem je

snížení pohyblivosti vzorků přes póry v gelu. Zároveň u žádné z odebraných frakcí proteinu ICAM-1 po gelové permeační chromatografii nebyla potvrzena dimerizace.

Biologická aktivita ICAM-1 byla ověřena *in vitro* pomocí NK buněk na průtokové cytometrii, která je schopna rozpoznat změny na povrchu buněk. Cílem bylo navýšit počet aktivovaných NK buněk, jejichž schopnost degranulace je závislá na adhezi a následné polarizaci buněk. Tento mechanismus závisí na přítomnosti receptoru LFA-1 a jeho navázání na ligand ICAM-1. Spuštění cytotoxicity vyžaduje také přítomnost aktivačních receptorů.

Pro aktivaci NK buněk je nutná preinkubace s interleukiny a následně pak kontakt s aktivačními ligandy, například MICA, jehož receptor NKG2D je hojně exprimován na povrchu NK buněk.

První série pokusů byla koncipována za účelem nalezení nejúčinnější koncentrace interleukinů či jejich směsi pro preaktivaci NK buněk přes noc a následným kontaktem s proteinem MICA po dobu čtyř hodin před měřením. Sledována byla pouze exprese receptoru CD107a, jehož zvýšená exprese značí aktivované NK buňky. Jako nejúspěšnější podmínka dle obr. 18 na straně 51 (44,9 % aktivovaných NK buněk) se ukázala kombinace 50 ng/ml IL-12 a 1000 ng/ml IL-15, u které došlo k synergickému efektu. Pro pokusy obsahující zvlášť 50 ng/ml nebo 1000 ng/ml platí, že dosahují mnohem nižšího procenta aktivace, což jednoznačně svědčí o synergickém působení. Druhá nejúspěšnější varianta obsahovala pouze IL-2 o nejvyšší zvolené koncentraci 160 ng/ml. Tato koncentrace byla vybrána pro inkubaci u následných pokusů z důvodu vysokých nároků na množství použitého IL-15 u nejúspěšnější podmínky.

Další pokus se zaměřoval na nalezení nejlépe aktivující frakce proteinu ICAM-1, viz obr. 20. str. 52, kterému byly NK buňky vystaveny společně s proteinem MICA. Zároveň byly vytvořeny shodné podmínky s MICA a HSA, aby bylo výsledné množství proteinu pipetovaného do jamky stejné. Z výsledků druhé série měření je patrné (obr. 20, str. 52), že protein ICAM-1 přidává na aktivaci NK buněk ligandem MICA pouze jednotky procent oproti pokusu obsahujícím proteiny MICA a HSA. Oproti podmínce aktivace NK buněk pouze destičkou jsou aktivace proteiny MICA a ICAM-1 více než dvojnásobně vyšší. Verze frakcí ICAM-1 a HSA nezvyšují procenta aktivovaných NK buněk oproti aktivaci samotnou destičkou, což podporuje tvrzení, že tento ligand receptoru LFA-1 způsobuje pouze adhezi s polarizací cytotoxických gran, nikoliv však samotnou cytotoxicitu [23].

Poslední série měření byla na rozdíl od optimalizačních pokusů provedena v technických triplikátech. Navzdory druhému měření nepotvrdil závěrečný pokus (obr. 21 str. 53) procentuální zvýšení aktivovaných NK buněk proteinem ICAM-1 v kombinaci s MICA oproti variantě HSA s MICA. Navázání ligandu na receptor LFA-1 může způsobit zvýšení exprese jiných aktivačních receptorů, které nebyly sledovány v naší optimalizaci.

Rekombinantně připravený ICAM-1 tedy nezvyšuje procento aktivovaných NK buněk receptorem MICA. Hypotézu, že indukováním buněčné adheze dojde v syntetickém systému na destičce, která imobilizuje proteiny s histidinovou kotvou, se nepodařilo potvrdit. Buňky byly analyzovány průtokovou cytometrií, byla tedy analyzována pouze ta část buněk, kterou se podařilo z aktivační jamky přemístit pro následné barvení a FACS analýzu. Nelze tedy vyloučit, že silně aktivované buňky se zároveň nejsilněji drží destičky a jsou tedy vyloučeny z FACS analýzy. Tuto část buněk by šlo analyzovat pomocí fluorescenční mikroskopie, jako v případě modifikovaných povrchů s imobilizovaným MICA [77]. Použité destičky však nejsou pro přímou mikroskopii vhodné, zároveň z kontroly na mikroskopu vyplývá, že každá z jamek je pokryta jiným množstvím buněk, v podmínkách bez ICAM-1 buňky téměř nejsou, proto se tento způsob vyhodnocení nejeví jako vhodný.

Připravený ICAM-1 však lze použít pro přípravu povrchů, které mají mimikovat buněčný povrch a indukovat buněčnou adhezi například pro pokusy superresoluční fluorescenční mikroskopie, kdy jsou receptory imobilizovány na umělé membráně [78].

Dalším bodem k diskuzi je způsob testování, kdy aktivace probíhala přes protein adherovaný na stěnách jamek v jednoduchém syntetickém *in vitro* experimentu. Při pokusech na buňkách karcinomu prsu či hmyzích buňkách arteficialně exprimujících ligandy pro aktivační receptory by mohly výsledky aktivace být poněkud odlišné, jelikož připojení ligandu k receptoru LFA-1 zesiluje adhezi NK buněk k cílové buňce, což může zefektivnit proces degranulace, kdy jsou grana exocytována v přímé blízkosti cílové buňky, a tím je eliminace a cytotoxicita efektivnější.

Pro pokusy s proteinem ICAM-1 byly použity čerstvě izolované NK buňky, jež byly inkubovány s 160 ng/ml IL-2 přes noc. Využití jiných koncentrací čipoměrů jak proteinů, tak interleukinů by mohlo vést k následnému zvýšení exprese CD107a na povrchu NK buněk. Dalším faktorem ovlivňující výsledky je různorodost původu izolovaných zabijáků z anonymních dárců, napříč kterými se jejich vlastnosti výrazně mění. Dokonce i roční období ovlivňuje aktivovatelnost NK buněk, poněvadž v zimě se člověk setkává s mnoha patogeny. Buňky v této části roku jsou více „ve střehu“, tzn. jsou jednodušeji aktivovatelné nebo předem až příliš aktivované. Tuto velkou variabilitu lze pokrýt pouze několikanásobným opakováním experimentů s využitím několika dárců tak, aby bylo možné získat dostatečné množství výsledků, které lze dále statisticky zpracovat. Což je časově i finančně náročné, ale pro získání ověřených dat nevyhnutelné.

Bylo ověřeno, že jednoduchý syntetický systém, u kterého je povrch destičky schopen vázat vybrané aktivační ligandy NK buněk s histidinovou kotvou se dá použít pro rychlou kontrolu biologické aktivity rekombinantně připravených ligandů. Je však nutné pracovat s tím, že se jedná pouze o izolovaný systém, který nemůže plně nahradit buněčné testy. Práce do budoucna by měla obsahovat testování dalších ligandů pro aktivační receptory.

7. ZÁVĚR

- Příprava proteinů byla úspěšná v případě proteinu ICAM-1 pouze s histidinovou kotvou, verze ICAM-1 s coiled coil sekvencí se nepodařilo exprimovat
- Porovnáním vlivu IL-2, IL-12 a IL-15 na cytotoxickou odpověď NK buněk byla vybrána optimální podmínka pro preaktivaci NK buněk pro následující experimenty
- Podařilo se aktivovat NK buňky pomocí aktivačního ligandu MICA imobilizovaného na povrchu destičky a následně aktivaci analyzovat průtokovou cytometrií
- Protein ICAM-1 neovlivňuje aktivaci NK buněk sledovanou pomocí míry exprese CD107a na povrchu NK buněk v přítomnosti ligandu MICA

POUŽITÁ LITERATURA

[1] L. B. Nicholson, „The immune system", *Essays Biochem.*, **60**:3, 275–301, (2016).

[2] D. D. Chaplin, „Overview of the immune response", *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**:2, S3-S23 (2010).

[3] K. M. Yatim a F. G. Lakkis, „A brief journey through the immune system", *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**:7, 1274–1281 (2015).

[4] P. J. Delves a I. M. Roitt, „First of Two Parts THREE LEVELS OF DEFENSE",**343**:1, 37–49 (2000).

[5] E. Vivier D. H. Raulet, A Moretta, M. A. Caliguiuri, L. Zitvogel, L. L. Lanier, W. M. Yokoyama a S. Ugolini, „Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells", *Science*, **331**: 6013, 44–49 (2011).

[6] J. Savill, „Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis", *Br. Med. Bull.*, **53**:3, 491–508 (1997).

[7] P. Matzinger, „An innate sense of danger", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **10**:, 341–342, (2002)

[8] K. Rezvani, R. Rouce, E. Liu a E. Shpall, „Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy", *Mol. Ther.*, **25**:8, 1769–1781 (2017).

[9] J. C. Sun, S. Madera, N. A. Bezman, J. N. Beilke, M. H. Kaplan a L. L. Lanier, „Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory", *J. Exp. Med.*, **209**:5, 947–954 (2012).

[10] F. A. Bonilla a H. C. Oettgen, „Adaptive immunity", *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**:2, S33–S40 (2010).

[11] M. C. Carrol, Complement and humoral immunity, *Vaccine*, **26**:8, 128-133 2008.

[12] F. M. Burnet, *The clonal selection theory of acquired immunity.* Nashville,: Vanderbilt University Press, 1959.

[13] B. V Kumar, T. Connors a D. L. Farber, „Human T Cell Development, Localization, and Function Throughout Life", **48**:2, 202–213 (2019).

[14] P. Saule, J. Trauet, V. Dutriez, V. Lekeux, J.-P. Dessaint a M. Labalette, „Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment.", *Mech. Ageing Dev.*, **127**:3, 274–281 (2006).

[15] M. L. Dustin, „The cellular context of T cell signaling.", *Immunity*, **30**:4, 482–492 (2009)

[16] C. D. C. Allen, T. Okada, a J. G. Cyster, „Germinal-center organization and cellular dynamics.", *Immunity*, **27**:2, 190–202 (2007).

[17] L. M. E. Janssen, E. E. Ramsay, C. D. Logsdon a W. W. Overwijk, „The immune system in cancer metastasis: Friend or foe?", *J. Immunother. Cancer*, **5**:1, 1–14 (2017)

[18] D. Kirschner a J. C. Panetta, „Modeling immunotherapy of the tumor - Immune interaction", *J. Math. Biol.*, **37**:3, 235–252 (1998).

[19] R. Kiessling, E. Klein a H. Wigzell, „‚Natural´ killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype.", *Eur. J. Immunol.*, **5**:2, 112–117 (1975).

[20] W. Hu, G. Wang, D. Huang, M. Sui a Y. Xu, „Cancer immunotherapy based on natural killer cells: Current progress and new opportunities", *Front.*

Immunol., **10**:1205, 1–16 (2019).
[21] J. R. Ortaldo a R. B. Herberman, „Heterogeneity of natural killer cells.", *Annu. Rev. Immunol.*, **2**, 359–394 (1984).
[22] E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer a S. Ugolini, „Functions of natural killer cells", *Nat. Immunol.*, **9**:5, 503–510, (2008).
[23] Y. T. Bryceson, M. E. March, H.-G. Ljunggren a E. O. Long, „Activation, co–activation, and co–stimulation of resting human NK cells", *Immunol. Rev.*, **214**, 73–91 (2006)
[24] E. Vivier, S. Ugolini, D. Blaise, C. Chabannon a L. Brossay, „Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer", *Nat. Rev. Immunol.*, **12**:4, 239–252 (2012)
[25] D. F. Barber a E. O. Long, „Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells.", *J. Immunol.*, roč. **170**:1, 294–299, (2003).
[26] Y. T. Bryceson, M. E. March, D. F. Barber, H.-G. Ljunggren a E. O. Long, „Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells.", *J. Exp. Med.*, **202**:7, 1001–1012, (2005).
[27] C. Lawson a S. Wolf, „ICAM-1 signaling in endothelial cells.", *Pharmacol. Rep.*, **61**:1, 22–32, (2009).
[28] M. Kim, C. V Carman a T. A. Springer, „Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins.", *Science*, **301**:5640, 1720–1725, (2003)
[29] S. Butcher, K. L. Arney a G. P. Cook, „MAFA-L, an ITIM-containing receptor encoded by the human NK cell gene complex and expressed by basophils and NK cells.", *Eur. J. Immunol.*, **28**:11, 3755–3762 (1998).
[30] D. Voehringer, M. Koschella a H. Pircher, „Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1).", *Blood*, **100**:10, 3698–3702, (2002).
[31] C. Gründemann, M. Bauer, O. Schweier, N. v. Oppen, U. Lässing, P. Saudan, K.-F. Becker, K. Karp, T. Hanke, M. F. Bachmann a H. Pircher „Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1.", *J. Immunol.*, **176**:3, 1311–1315 (2006).
[32] M. Ito, T. Maruyama, N. Saito, S. Koganei, K. Yamamoto a N. Matsumoto, „Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity.", *J. Exp. Med.*, **203**:2, 289–295, (2006).
[33] J. A. Trapani a M. J. Smyth, „Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.", *Nat. Rev. Immunol.*, **2**:10, 735–747, (2002).
[34] G. Bossi a G. M. Griffiths, „CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle.", *Semin. Immunol.*, **17**:1, 87–94, (2005).
[35] M. A. Cooper, T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson a M. A. Caligiuri, „Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset.", *Blood*, **97**:10, 3146–3151 (2001).
[36] R. Parihar, J. Dierksheide, Y. Hu a W. E. Carson, „IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells.", *J. Clin. Invest.*, **110**:7, 983–992 (2002).
[37] NKMax Health: „Natural Killer (NK) Cells",dostupné z URL: https://nkmaxhealth.com/natural-killer-cells/, [cit. 17.4.2021].
[38] L. F. De Andrade, R. E. Tay, D. Pan, A. M. Luoma, Y. Ito, S. Badrinath, D.

Tsoucas, B. Franz, K. F. May Jr, C. J. Harvey, S. Kobold, J. W. Pyrdol, C. Yoon, G.-C. Juan, F. S. Hodi, G. Dranoff a K. W. Wucherpfennig, „Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity", *Science*, **359**:6383, s. 1537–1542 (2018).

[39] D. H. Raulet, S. Gasser, B. G. Gowen, W. Deng a H. Jung, „Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor.", *Annu. Rev. Immunol.*, **31**, 413–441 (2013).

[40] P. Li, D. L. Morris, B. E. Willcox, A. Steinle, T. Spies a R. K. Strong, „Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA.", *Nat. Immunol.*, **2**:5, 443–451, (2001).

[41] A. T. Ting, R. A. Schoon, R. T. Abraham a P. J. Leibson, „Interaction between protein kinase C-dependent and G protein-dependent pathways in the regulation of natural killer cell granule exocytosis.", *J. Biol. Chem.*, **267**:33, 23957–23962, (1992).

[42] G. Alter, J. M. Malenfant a M. Altfeld, „CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity.", *J. Immunol. Methods*, **294**:(1–2), 15–22, (2004).

[43] D. Goldstein a J. Laszlo, „The role of interferon in cancer therapy: a current perspective.", *CA. Cancer J. Clin.*, **38**:5, 258–277, (1988).

[44] S. Lee a K. Margolin, „Cytokines in cancer immunotherapy.", *Cancers (Basel).*, **3**:4, 3856–3893, (2011).

[45] G. Dranoff, „Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy.", *Nat. Rev. Cancer*, **4**:1, 11–22, (2004).

[46] C. Nicholas a G. B. Lesinski, „Immunomodulatory cytokines as therapeutic agents for melanoma.", *Immunotherapy*, **3**:5, 673–690, (2011).

[47] M. Ardolino, J. Hsu a D. H. Raulet, „Cytokine treatment in cancer immunotherapy", *Oncotarget*, **6**:23, 19346–19347 (2015).

[48] K. C. Conlon, M. D. Miljkovic a T. A. Waldmann, „Cytokines in the Treatment of Cancer", *J. Interf. Cytokine Res.*, **39**:1, 6–21 (2019).

[49] T. R. Malek a I. Castro, „Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity", *Immunity*, **33**:2, 153–165 (2010).

[50] T. A. Waldmann, „The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes.", *Science*, **232**:4751, 727–732 (1986).

[51] T. Taniguchi a Y. Minami, „The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview.", *Cell*, **73**:1, 5–8 (1993).

[52] R. Ghasemi, E. Lazear, X. Wang, S Arefanian, A. Zheleznyak, B. M. Carreno, R. Higashikubo, A.E. Gelman, D. Kreisel. D. H. Fremont a A. S. Krupnick, „Selective targeting of IL-2 to NKG2D bearing cells for improved immunotherapy.", *Nat. Commun.*, 7:12878, 1-15 (2016).

[53] D. J. Stauber, E. W. Debler, P. A. Horton, K. A. Smith a I. A. Wilson, „Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**:8, 2788–2793 (2006).

[54] A. J. Brown, I. Snapkov, R: Akbar, M. Pavlović, E. Miho, G. K. Sandve a V. Greiff, „Augmenting adaptive immunity: Progress and challenges in the quantitative engineering and analysis of adaptive immune receptor repertoires", *Mol. Syst. Des. Eng.*, **4**:4, 701–736 (2019).

[55] T. A. Waldmann, „Cytokines in cancer immunotherapy", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**:12, 1–23 (2018).

[56] X. Wang, M. Rickert a K. C. Garcia, „Structure of the quaternary complex of

interleukin-2 with its alpha, beta, and gammac receptors.", *Science*, **310**:5751, 1159–1163 (2005).
[57] N. W. Zwirner a C. I. Domaica, „Cytokine regulation of natural killer cell effector functions", *BioFactors*, **36**:4, 274–288 (2010).
[58] C. Yoon, S. C. Johnston, J. Tang, M. Stahl, J. F. Tobin a W. S. Somers, „Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12", *EMBO J.*, **19**:14, 3530–3541 (2000).
[59] M. Zhang, B. Wen, O. M. Anton, Z. Yao, S. Dubois, W. Ju, N. Sato, D. J. DiLillio, R. N. Bamford, J. V. Ravetch a T. A. Waldmann, „IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**:46, E10915–E10924 (2018).
[60] J. A. Wagner, M. Rosario, R. Romee, M. M. Berrien-Elliott, S. E. Schneider, J. W. Leong, R. P. Sullivan, B. A. Jewell, M. Becker-Hapack, T. Schappe, S Abdel-Latif, A. R. Ireland, D. Jaidhankar, J. A. King, R. Vij a D. Cement, „CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming", *J. Clin. Invest.*, **127**:11, 4042–4058 (2017).
[61] S. E. Clark, K. S. Burrack, S. C. Jameson, S. E. Hamilton a L. L. Lenz, „NK Cell IL-10 Production Requires IL-15 and IL-10 Driven STAT3 Activation", *Front. Immunol.*, **10**:2087, 1–16 (2019).
[62] Y. Rochman, R. Spolski a W. J. Leonard, „New insights into the regulation of T cells by γc family cytokines", *Nat. Rev. Immunol.*, **9**:7, 480–490 (2009).
[63] L. Lewis, „NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks", *Nat. Rev. Cancer*, **16**, 7-16 (2016).
[64] S. S. Tay, H. Carol a M. Biro, „TriKEs and BiKEs join CARs on the cancer immunotherapy highway", *Hum. Vaccines Immunother.*, **12**:11, 2790–2796 (2016).
[65] S. Farkona, E. P. Diamandis a I. M. Blasutig, „Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer?", *BMC Med.*, **14**:1, 1–18 (2016).
[66] W. Wang, J. Jiang a C. Wu, „CAR-NK for tumor immunotherapy: Clinical transformation and future prospects", *Cancer Lett.*, **472**, 175–180 (2020).
[67] M. Felices, T. R. Lenvik, Z. B. Davis, J. S. Miller, a D. A. Vallera, „Generation of BiKEs and TriKEs to improve NK cell-mediated targeting of tumor cells", *Methods Mol. Biol.*, **1441**, 333–346 (2016).
[68] J. J. Hodgins, S. T. Khan, M. M. Park, R. C. Auer, a M. Ardolino, „Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control", *J. Clin. Invest.*, **129**:9, 3499–3510 (2019).
[69] Macherey-Nagel: „*Plasmid DNA Purification User Manual Extraction*", dostupné z URL: https://www.mn-net.com/media/pdf/45/51/02/Instruction-NucleoSpin-Plasmid.pdf, [cit. 17.4.2021]
[70] Macherey-Nagel: „*Plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi)*", dostupné z URL: https://www.mn-net.com/media/pdf/ed/82/0f/Instruction-NucleoBond-Xtra.pdf, [cit. 17.4.2021]
[71] Expasy: „*Protparam*" dostupné z URL: https://web.expasy.org/protparam, [cit. 18.6.2021]
[72] RosetteSep™: „*RosetteSepTM Human NK Cell Enrichment Cocktail*", dostupné z URL: https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/28574-PIS_1_3_1.pdf?_ga=2.141121906.1193311838.1618666728-1785131335.1618666728, [cit. 17.4.2021]
[73] J. Bella, P. R. Kolatkar, C. W. Marlor, J. M. Greve, a M. G. Rossmann, „The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how

it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**:8, 4140–4145, (1998).

[74] M. Shimaoka, T. Xiao, J. H. Liu, Y. Yang, Y. Dong, C.D. Jun, A. McCormack, R. Zhang, A, Joachimiak, J. Takagi, J. H. Wang a T. A. Springer, „Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation.", *Cell*, **112**:1, 99-111 (2003).

[75] Y. Yang, C.D. Jun, R. Zhang, A. Joachimiak, T. A. Springer a J. H. Wang, „Structural basis for dimerization of ICAM-1 on the cell surface.", *Mol. Cell*, **14**:2, 269-276 (2004).

[76] The CUCKOO Workgroup: „*An illustrator for the presentation and visualization of biological sequences*", dostupné z URL: http://ibs.biocuckoo.org/index.php, [cit. 31.5.2021]

[77] G. Le Saux, N. Bar-Hanin, A. Edri, U. Hadad, A. Porgador a M. Schvartzman, „Nanoscale Mechanosensing of Natural Killer Cells is Revealed by Antigen-Functionalized Nanowires", Adv. Mater, **31**:4, 1-10 (2019)

[78] M. Axmann, G. J. Schütz a J. B. Huppa, „Single Molecule Fluorescence Microscopy on Planar Supported Bilayers", J Vis Exp, **31**:105, 1-16 (2015)