

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program/obor: Klinická a toxikologická analýza



**Bc. Viktorie Malá**

**Příprava mutovaných forem proteinu B7-H6**  
**Preparation of mutated forms of protein B7-H6**

**Diplomová práce**

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

Konzultant: Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.

Praha, 2022

## Prohlášení

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

V Praze, 23. 8. 2022

Bc. Viktorie Malá

Podpis

\_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za vedení mé práce, důvěru a trpělivost a za cenné odborné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala mému konzultantovi Mgr. Ondřeji Skořepovi, Ph.D. za velikou pomoc s experimentální částí v laboratoři 204, poskytnutí cenných rad a ochotu kdykoliv pomoci.

## Abstrakt

Přirození zabijáci zvaní NK buňky (z angl. Natural Killers) jsou velmi podstatnou součástí imunitního systému. Jsou to tzv. přirození zabijáci, nesou na svém povrchu řadu receptorů. Pro imunitní dohled jsou zásadní dva typy receptorů dle funkce zvané inhibiční a aktivační. Inhibiční receptory zajišťují autotoleranci. Druhým typem jsou aktivační receptory, jejichž aktivace vede ke spuštění cytotoxické odpovědi, případně k zapojení dalších složek imunitního systému (např. makrofágů).

Aktivační receptor NKp30 (označovaný také jako NCR3 nebo CD337) je protein z rodiny přirozeně cytotoxických receptorů (NCR, z angl. Natural Cytotoxicity Receptors). Je jedním z hlavních lidských NK-buněčných aktivačních receptorů s potenciálním využitím v cílené protinádorové terapii.

Aktivačním ligandem receptoru NKp30 je protein B7-H6, který se běžně nevyskytuje na povrchu zdravých buněk. Vyskytuje se výhradně na buňkách, které jsou výrazně stresované, tedy např. na infikovaných nebo maligně transformovaných buňkách. Nese-li maligně transformovaná buňka na svém povrchu B7-H6, dojde ve většině případů k jejímu rozpoznání a eliminaci takřka ihned při jejím vzniku. Protože však ne všechny nádorové buňky jsou B7-H6 pozitivní, nabízí se možnost jejich zviditelnění pro imunitní systém právě skrz dekoraci proteinem B7-H6. Takový ligand navíc může být upraven, aby zesiloval imunitní odpověď.

Tato práce vychází z publikace Pekar L. *et al.* (2020), ve které byly popsány mutace vazebného místa B7-H6 pro NKp30, které zvyšují afinitu. Na základě jejich výsledů jsme připravili pět mutovaných forem celé extracelulární domény B7-H6 v lidské buněčné linii HEK293T a vazebnou afinitu ověřili izotermální titrační kalorimetrií.

**Klíčová slova:** NK buňky, B7-H6, NKp30, HEK293T, ITC

## Abstract

NK cells are an essential part of the immune system. They are the so-called natural killers and carry several receptors on their surface. Two types of receptors are crucial for immune surveillance, according to their function, called inhibitory and activating. Inhibitory receptors provide auto-tolerance. The second type is activating receptors, whose activation signals toward initiating a cytotoxic response or involving other immune system components (e.g., macrophages).

The activating receptor NKp30 (also known as NCR3 or CD337) is a protein of the Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) family. It is one of the primary human NK cell activating receptors with potential use in targeted anticancer therapy.

NKp30 has an activating ligand protein B7-H6, which is not found on the surface of healthy cells. It is exclusively found on highly stressed cells, e.g., infected or malignantly transformed cells. If a malignantly transformed cell carries B7-H6 on its surface, in most cases, it is recognized and eliminated almost at its formation. Not all tumour cells are B7-H6 positive, so it is possible to visualize them to the immune system through surface decoration with B7-H6. Moreover, such a ligand can be modified to amplify the immune response.

This work is based on Pekar L. *et al.* (2020) publication, which described mutations that increase the affinity of the B7-H6 binding site for NKp30. Based on their results, we prepared five mutant forms of the entire extracellular domain of B7-H6 in the human cell line HEK293T and measured binding affinity by isothermal titration calorimetry.

**Keywords:** NK cells, B7-H6, NKp30, HEK293T, ITC

## OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	8
ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	10
1.1 Imunitní systém.....	10
1.1.1 Vrozená imunita .....	10
1.1.2 Adaptivní imunita.....	11
1.2 Buňky imunitního systému v protinádorové imunitě .....	11
1.3 NK buňky.....	11
1.3.1 Aktivace NK buněk .....	12
1.3.2 Receptory NK buněk .....	13
1.3.3 Receptory přirozené cytotoxicity .....	15
1.4 Receptor NKp30 .....	15
1.4.1 Struktura NKp30 .....	15
1.4.2 Genetika a isoformy.....	16
1.4.3 Ligandy NKp30 .....	16
1.5 B7-H6.....	17
1.6 Klinický význam NKp30 a B7-H6 .....	17
1.7 Imunoterapie .....	19
1.7.1 NK buňky v imunoterapii.....	19
2 CÍLE PRÁCE.....	21
3 MATERIÁLY .....	22
3.1 Přístroje a pomůcky .....	22
3.2 Chemikálie .....	23
3.3 Roztoky, pufrы a kultivační média.....	25
3.4 Enzymy, proteiny .....	26
3.5 Bakteriální kmeny a buněčné linie.....	26
3.6 Vektory .....	26
3.7 Oligonukleotidy pro PCR .....	27
4 METODY .....	28
4.1 Štěpení plazmidu restrikčními endonukleasami Age I a Kpn I .....	28
4.2 Agarosová elektroforéza .....	28
4.3 Klonování nezávislé na ligase.....	28
4.4 Ligace T4 DNA ligasou .....	29
4.5 Transformace bakterií <i>E. coli</i> TOP10 .....	29
4.6 Polymerasová řetězová reakce z kolonií.....	29

4.7	Polymerasová řetězová reakce genu pro haB7-H6 IWY .....	30
4.8	Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA .....	30
4.9	Příprava vzorku pro sekvenování DNA .....	31
4.10	Transformace bakterií <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	31
4.11	Velkoobjemová příprava plazmidové DNA .....	31
4.12	Rozmražení a kultivace buněčné linie HEK293T.....	32
4.13	Transientní transfekce linie HEK293T .....	33
4.14	Sklízení buněčné kultury .....	33
4.15	Afinitní chromatografie a odsolení .....	33
4.16	Koncentrování proteinů .....	34
4.17	Gelová permeační chromatografie.....	34
4.18	Stanovení koncentrace proteinů.....	34
4.19	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	34
4.20	Izotermální titrační kalorimetrie .....	36
5	VÝSLEDKY .....	37
5.1	Návrh konstruktů afinitně maturovaného B7-H6 .....	37
5.2	Molekulární klonování.....	38
5.2.1	Štěpení plazmidu pTW5sec_S4B6 .....	38
5.2.2	Klonování nezávislé na ligase .....	39
5.2.3	Ligace T4 DNA ligasou.....	40
5.3	Produkce a purifikace proteinu haB7-H6 .....	41
5.4	Izotermální titrační kalorimetrie .....	44
6	DISKUZE .....	45
7	ZÁVĚR .....	47
8	SEZNAM LITERATURY .....	48

## SEZNAM ZKRATEK

ACT	Adoptivní buněčná terapie (z angl. Adoptive Cellular Therapy)
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity (z angl. Acquired Immunodeficiency Syndrome)
APC	Antigen prezentující buňka (z angl. Antigen Presenting Cell)
BAG-6	Athanogen 6 asociovaný s B-buněčným lymfomem (z angl. B-cell Lymphoma 2 Associated Athanogen 6)
bp	Pár bází (z angl. Base Pair)
CD	Diferenční skupina (z angl. Cluster of Differentiation)
CLR	Receptor podobný lektinům C-typu (z angl. C-type Lectin-like Receptor)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
Fab	Fragment vázající antigen (z angl. Fragment antigen binding)
Fc	Část protilátky – krystalizovatelný fragment (z angl. Fragment Crystallizable)
fcEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erytrocytový membránový protein 1 (z angl. <i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein-1)
GAG	skupinově specifický antigen (z angl. Group-specific Antigen)
HEK293T	Označení linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (z angl. Human Embryonic Kidney Cell Line 293)
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. Human Immunodeficiency Virus)
HLA	Lidský leukocytární antigen (z angl. Human Leukocyte Antigen)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-Performance Liquid Chromatography)
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
IFN $\gamma$	Interferon gama
ITAM	Imunoreceptorový aktivační motiv tyrosinového typu (z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)
ITIM	Imunoreceptorový inhibiční motiv tyrosinového typu (z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)



IPEI	Lineární polyethylenimin
KIR	Inhibiční receptor imunoglobulinové skupiny (z angl. Killer-Cell Ig-Like Receptor)
LB	Kultivační médium (z angl. Lysogeny Broth)
LFC	Klonování nezávislé na ligase (z angl. Ligation-Free Cloning)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major Histocompatibility Complex)
NCR	Receptory přirozené cytotoxicity (z angl. Natural Cytotoxicity Receptors)
NK buňky	Přirození zabíječi (z angl. Natural Killers)
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (z angl. Phosphate-Buffered Saline)
PCNA	Jaderný antigen proliferující buňky (z angl. Proliferating Cell Nuclear Antigen)
PCR	Polymerasová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného (z angl. Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SH-2/3	Src-homologní doména 2/3 (z angl. Src Homology 2/3 domain)
SOB	Superoptimální médium (z angl. Super Optimal Broth)
TAA	Antigen asociovaný s nádorem (z angl. Tumour-Associated Antigen)
TAE	Pufr obsahující Tris, kyselinu octovou a EDTA
TSA	Antigen specifický pro nádor (z angl. Tumour-Specific Antigen)

# ÚVOD

## 1 TEORETICKÁ ČÁST

### 1.1 Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním mechanismům udržujícím stálost vnitřního prostředí v našem organismu. Dokáže správně rozpoznat škodlivé od neškodného a chrání tak organismus před exogenními škodlivinami, patogenními organismy a jejich toxickými produkty.

Důležitou funkcí imunitního systému je autotolerance, což je tolerance vůči vlastním buňkám a tkáním. Dále také imunitní dohled, kdy imunitní systém rozpoznává endogenní škodliviny, např. staré, nebo poškozené (mutované) buňky, což mohou být například rakovinné buňky, jež jsou imunitním systémem průběžně odstraňovány<sup>1,2</sup>.

#### 1.1.1 Vrozená imunita

Nespecifické imunitní mechanismy (přirozené, neadaptivní) jsou vrozené a evolučně starší<sup>1</sup>. Vrozená imunita v zásadě funguje na principu molekul a buněk již připravených v organismu předem. Ty mohou rychle reagovat na patogeny. Mechanismy vrozené imunity jsou tvořeny humorální a buněčnou složkou<sup>1</sup>.

Humorální složku nespecifické imunity tvoří cytokiny a komplementový systém. Cytokiny obstarávají komunikaci mezi buňkami a navádějí je do míst, kde je infekce, stimulují tvorbu protilátek a jiných proteinů, které aktivují komplementový systém. Nespecifické imunitní složky reagují na přítomnost antigenu během několika minut či hodin<sup>1-3</sup>. Buněčná složka je zastoupena fagocytujícími buňkami (makrofágy a neutrofilny), NK buňkami, dendritickými buňkami, žírnými buňkami a basofilními i eosinofilními granulocyty<sup>1</sup>.

Fagocyty mají schopnost pohlcovat patogeny. Neutrofilny mají ve své cytoplazmě granula, které mají po vyloučení z buňky antimikrobiální funkci. Naopak makrofágy jsou schopny dlouho přežít a jsou také schopny nahradit roli antigen prezentující buňky (APC, z angl. antigen-presenting cell), jež umísťují na svém povrchu fragmenty fagocytovaného materiálu jako antigen pro další imunitní buňky. NK buňky mají cytotoxickou funkci a uplatňují se zejména při virových infekcích či protinádorové imunitě. Dendritické buňky mají schopnost fagocytózy a fungují jako hlavní APC buňky. Žírné buňky a basofily jsou si

poměrně hodně podobné. Oboje mají schopnost vyvolat zánětlivé procesy, obzvláště pak v souvislosti s alergickými reakcemi a astmatem. Eosinofily mají také schopnost fagocytózy a prosazují se v imunitní reakci proti parazitům<sup>1,3</sup>.

### 1.1.2 Adaptivní imunita

Mechanismy adaptivní (získané) imunity jsou evolučně mladší, antigeně specifické, reagují na patogeny prostřednictvím protilátek a antigeně specifických receptorů T lymfocytů. Aktivují se po setkání s antigenem<sup>1</sup>.

Během těchto reakcí může dojít ke vzniku tzv. imunologické paměti. Tento stav umožňuje následně mnohem rychlejší imunitní odpověď v případě opakované infekce. Adaptivní složka imunity také může v některých případech nežádoucím způsobem zaměřit odpověď na antigeny, které jsou organismu vlastní a kvůli tomu dochází k rozvoji autoimunitních onemocnění<sup>1</sup>.

## 1.2 Buňky imunitního systému v protinádorové imunitě

K maligní transformaci buňky dochází mnoha odlišnými způsoby v důsledku selhání mechanismů regulace buněčného dělení<sup>1</sup>. Protinádorovou imunitu zajišťují buňky vrozené (nespecifické) imunity, tedy NK buňky, neutrofil, bazofil, eozinofil, makrofág, dendritická buňka a žírná buňka<sup>1,4</sup>. Významnou roli hrají i adaptivní imunitní buňky (T a B lymfocyty). Obě složky mezi sebou komunikují a brání tvorbě nádorů, a to buď přímou interakcí, nebo za pomoci cytokinů či chemokinů<sup>4</sup>. Buňky imunitního systému mají tedy schopnost rozeznat a následně zničit rakovinotvorné buňky, než dojde ke vzniku nádoru, ale také během jeho vývoje. Tato jejich vlastnost je označována jako imunitní dohled<sup>5</sup>.

### 1.3 NK buňky

NK buňky hrají velmi významnou roli ve vrozené obraně proti patogenům, především proti virům a nádorům. Jsou to velké granulární lymfocyty schopné produkovat zánětlivé cytokiny a spontánně zabíjet maligní, infikované nebo stresované buňky, a to bez předešlé senzitivace<sup>6</sup>.

Mají schopnost okamžité cytotoxicity, časně produkce cytokinů (faktor nádorové nekrózy a interferon- $\gamma$ ) a chemokinů, které pomáhají vytvářet a udržovat zánětlivé prostředí. NK buňky se vyskytují především v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a v dalších nelymfoidních orgánech – v plicích, játrech, děloze nebo slinivce<sup>6,7</sup>. Mohou se přesunout rovnou do místa zánětu a sekundárních lymfoidních orgánů, kde tvoří první linii

při obraně proti patogenům, jelikož jsou schopné přímo eliminovat viry infikované nebo transformované buňky prostřednictvím Fas ligandu, perforinu a granzymů. Dále umí aktivovat nespecifické hematopoetické buňky (neutrofilů a makrofágy), aktivovat dendritické buňky nebo primární adaptivní leukocyty jako jsou T a B lymfocyty, uvolňováním rozpustných zesilujících faktorů<sup>7</sup>.

NK buňky mají na svém povrchu povrchové antigeny diferenciacní skupiny CD16 (z angl. Cluster of Differentiation) a CD56. Přibližně 90 % těchto buněk je CD56<sup>dim</sup>, jež vyvolávají cytotoxicitu. Dále existují NK buňky CD56<sup>bright</sup>, které se nacházejí převážně v lymfoidních orgánech a řídí sekreci cytokinů<sup>8</sup>.

### 1.3.1 Aktivace NK buněk

NK buňky jsou aktivovány po detekci chybějící nebo změněné exprese histokompatibilních MHC glykoproteinů I. třídy (z angl. Major Histocompatibility Complex Glycoproteins Class I)<sup>9</sup>.

Aktivace NK buněk může probíhat několika mechanismy. Jeden z hlavních mechanismů je detekce Fc (z angl. Fragment Crystallizable) části protilátek IgG (z angl. Immunoglobulin G) na buňkách skrz receptor CD16. Dále je to detekce molekul, které se nevyskytují na povrchu zdravých buněk, a detekce zánětlivého prostředí bohatého na cytokiny (jako jsou např. interleukin-12 nebo interferon typu I)<sup>9</sup>. Cytotoxicita vůči infikovaným nebo transformovaným buňkám a produkce cytokinů jsou hlavními efektorovými funkcemi NK buněk<sup>9</sup>.

Takto jsou NK buňky schopny rozpoznat buňky nádorové od buněk zdravých. Na rozdíl od nádorových buněk zdravé buňky exprimují jistou hladinu MHC gp I molekul, jež jsou následně rozeznány inhibičními receptory, které zajišťují autotoleranci. Naopak infikované či nádorové buňky mají tuto expresi potlačenou, NK buňky rozeznají sníženou hladinu MHC gp I molekul a spustí proces buněčné lýzy, resp. apoptosy<sup>6</sup>. Dalším mechanismem detekce nežádoucích buněk je rozpoznání stresovaných buněk pomocí aktivačních receptorů. Aby však nedošlo ke zničení zdravých buněk v aktivační nebo proliferační fázi, jež vyvolávají stres, je udržována nebo dokonce i zvýšena povrchová exprese MHC gp I, a zdravé buňky jsou chráněny před usmrcením<sup>6</sup>. Na druhou stranu, v případě nádorových nebo virem infikovaných buněk je exprese ligandů rozpoznávaných aktivačními receptory doprovázena ztrátou MHC gp I. V důsledku toho není aktivace NK buněk potlačena aktivitou inhibičních receptorů<sup>6</sup>. Tyto dva mechanismy představují velmi důležité kontrolní body v řízení aktivace a funkce NK buněk<sup>6</sup>.

Efektorová funkce NK buněk je regulována rovnováhou mezi protichůdnými signály vysílanými aktivačními receptory odpovědnými za aktivaci NK buněk a inhibičními receptory pro MHC gp I. třídy. Interakce aktivačních receptorů NK buňky s membránově vázanými molekulami na okolních tkáních může vyústit v blastogenezi, produkci cytokinů, cytotoxicitu a migraci k cílovým buňkám. Cytokiny následně způsobují proliferaci buněk imunitního systému a též pomáhají spustit cytotoxicitu a tvorbu interferonu gama (IFN- $\gamma$ ), což je cytokin hrající zásadní roli při potlačování patogenů v počátečním stadiu infekce<sup>9,10</sup>.

### 1.3.2 Receptory NK buněk

Na rozdíl od T nebo B lymfocytů, NK buňky obsahují sadu receptorů kódovanou zárodečnou linií, které řídí jejich vývoj a jejich funkci. Tyto receptory přenášejí buď aktivační, nebo inhibiční signály. Integrace všech těchto navazujících signálních drah určuje, jakým způsobem bude NK buňka interagovat s cílovou buňkou<sup>11</sup>.

V lidském organismu existují dvě hlavní kategorie NK buněčných inhibičních receptorů. Do první třídy se řadí heterodimer CD94:NKG2A<sup>12</sup>. Obě složky receptoru patří do superrodiny proteinů podobných lektinům typu C (CLR, angl. C-type Lectin-like Receptor). Do druhé třídy patří imunoglobulinové receptory KIR (z angl. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors), vyskytující se na povrchu lidských NK buněk a v malém množství také T lymfocytů<sup>12</sup>. Tyto dvě skupiny receptorů používají rozdílné postupy pro rozpoznání MHC gp I. třídy. Molekula CD94:NKG2A rozpoznává sekvenční prvek signálního peptidu, který je konzervovaný napříč většinou molekul lidského leukocytárního antigenu třídy I (HLA, angl. Human Leukocyte Antigen class I)<sup>13–16</sup>. Peptidy obsahující tento prvek jsou pak vázány HLA-E a tento komplex je ligandem pro receptor CD94:NKG2A. Oproti tomu KIR rozpoznávají MHC gp I v jejich rozmanitosti díky vlastní vysoké variabilitě a polymorfismu. Systém KIR má totiž diverzitu srovnatelnou s diverzitou MHC gp I. třídy<sup>17</sup>. Rozpoznání samostatných molekul HLA třídy I NK buňkami je zajištěno extracelulární částí KIR. Intracelulární část naopak zajišťuje přenos aktivačních či inhibičních signálů<sup>12</sup>.

Společný znak inhibičních receptorů NK buněk nacházejících se v jejich cytoplazmě je sekvence aminokyselin Ile/Val/Leu/Ser-X-Tyr-X-X-Leu/Val, kde X může nahradit jakákoliv aminokyselina, čili tzv. ITIM motiv (z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Navázáním ligandu je následně tento motiv fosforylován<sup>18</sup>.

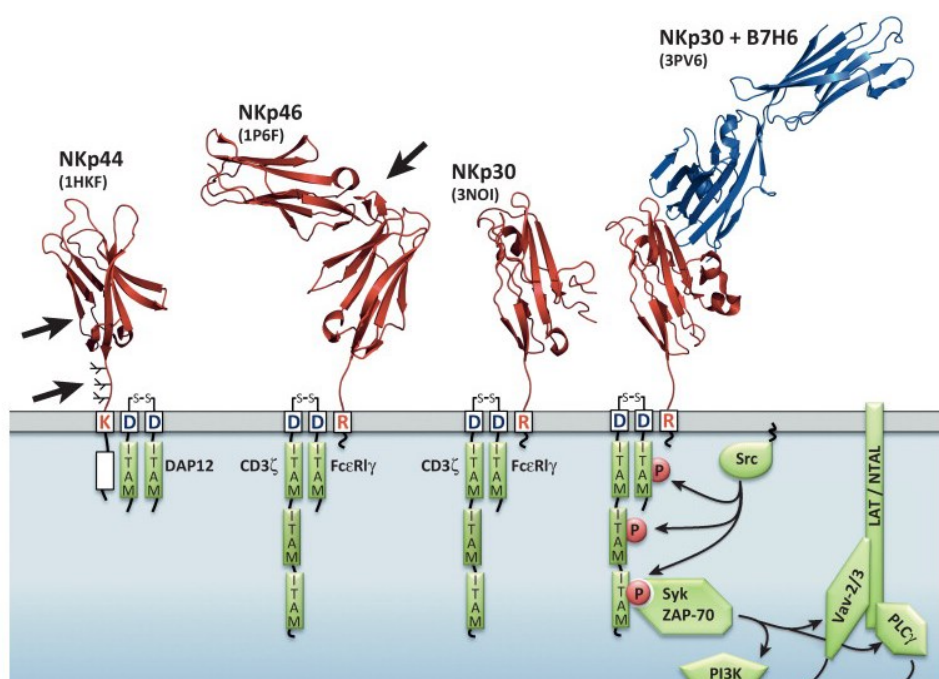
Oproti inhibičním receptorům, na některých aktivačních receptorech NK buněk je možné sledovat společný aktivační motiv ITAM (z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based

Activation Motif), kdy receptory užívají společnou signalizační cestu s T a B lymfocyty. ITAM má také specifickou sekvenci aminokyselin – Asp/Glu-X-X-Tyr-X-X-Leu/Ile-X<sub>6-8</sub>-Tyr-X-X-Leu/Ile, kde X může opět nahradit jakákoliv aminokyselina<sup>18</sup>.

Dalším mechanismem, kterým se NK buňky aktivují, je interakce nízkoafinitního aktivačního receptoru FcγRIIIa (CD16a) na NK buňkách s buňkami opsonizovanými protilátkami IgG, případně bispecifickými protilátkami v rámci cílené imunoterapie<sup>17</sup>.

O tom, jestli se NK buňka aktivuje, ve výsledku rozhoduje rovnováha aktivačních a inhibičních signálů. NK buňky jako takové mají endogenní schopnost odlišit zdravou tkáň od nemocné<sup>19</sup>.

Aktivační signály jsou zprostředkovány aktivačními receptory několika skupin jako NKG2D, NCR (NKp30, NKp44 a NKp46, viz obr. 1) nebo DNAM-1. Aktivační receptory umí rozeznat tzv. stresové ligandy na infikovaných či nádorových buňkách<sup>11,12</sup>.



**Obrázek 1: Schematické znázornění uspořádání domén lidských NCR: NKp30, NKp44 a NKp46.** Všechny NCR jsou transmembránové proteiny typu I. NKp44 obsahuje v cytoplazmatické části jeden inhibiční motiv ITIM, který však nemusí být úplně funkční (bílý obdélník na cytosolické sekvenci NKp44). Pro signalizaci se NCR spojují s adaptorovými proteiny prostřednictvím kontaktu s opačným nábojem v příslušných transmembránových segmentech (kontaktní aminokyseliny v jednopísmenném kódu). Intracelulární aktivační motivy ITAM adaptorových molekul jsou označeny jako rámečky. U NKp30 jsou zobrazeny struktury nenavázané extracelulární domény podobné imunoglobulinu a komplexu s ektodoménou jeho buněčného ligandu B7-H6. U NKp44 a NKp46 jsou zobrazeny struktury nenavázaných imunoglobulinových extracelulárních domén<sup>56</sup>.

### 1.3.3 Receptory přirozené cytotoxicity

Skupinu receptorů přirozené cytotoxicity NCR tvoří proteiny NK buněk NKp30, NKp44, NKp46. Všechny tři strukturou patří do rodiny receptorů podobných imunoglobulinům. Mimo strukturní podobnost byly seskupeny pro svou schopnost aktivovat NK buňky k cytotoxické odpovědi. Všechny tři jsou transmembránové proteiny typu I, které se skládají z jedné nebo dvou imunoglobulinových extracelulárních domén, transmembránového  $\alpha$ -helixu s kladně nabitou aminokyselinou umožňující interakci se signálním adaptorovým proteinem a krátké C-koncové domény<sup>20</sup>.

Jediným výhradně aktivačním receptorem z této skupiny je NKp46. Receptory NKp30 a NKp44 mohou být jak aktivační, tak inhibiční, a to v závislosti na ligandu a isoformě. Příkladem je ligand PCNA (z angl. Proliferating Cell Nuclear Antigen), jež po navázání na NKp44 inhibuje funkci NK buněk, naopak ligand NKp44L aktivuje NK buňky<sup>20,21</sup>.

## 1.4 Receptor NKp30

NK-buněčný protein 30 (NKp30, NCR3 a také CD337) je aktivační receptor NK buněk podobný imunoglobulinu, který byl objeven v roce 1999. Spolu s NKp44 a NKp46 je NKp30 členem rodiny receptorů přirozené cytotoxicity<sup>22</sup>.

### 1.4.1 Struktura NKp30

NKp30 je transmembránový glykoprotein typu I. Skládá se z N-koncové imunoglobulinové domény, krátké 15-aminokyselinové domény, která je označována jako „stalk“ doména, dále z transmembránového  $\alpha$ -helixu a C-koncové cytoplazmatické domény. Strukturně je NKp30 součástí rodiny proteinů CD28<sup>22,23</sup>.

Všechny proteiny z rodiny CD28 mají N-koncovou signální sekvenci, jež se odštěpuje během transportu proteinu, dále jednu transmembránovou doménu, jednu imunoglobulinovou doménu typu IgV a jednu nebo dvě intracelulární domény. Poměrně zajímavé je to, že členové rodiny CD28 se váží na proteiny rodiny B7, což platí i pro NKp30<sup>23</sup>.

Struktura NKp30 byla vyřešena pomocí rentgenové krystalografie jak pro volné NKp30<sup>24</sup>, tak i v komplexu s ligandem B7-H6<sup>25,26</sup>.

### 1.4.2 Genetika a isoformy

U člověka je NKp30 kódován genem umístěným na 6. chromozomu<sup>22</sup>. Zde je kódováno značné množství imunologicky významných molekul, jako jsou molekuly komplementu, cytokiny a proteiny tepelného šoku<sup>22</sup>. Různým sestřihováním mohou vznikat odlišné isoformy NKp30, jež jsou odlišné tvarem imunoglobulinové domény (IgC, IgV) a délkou svého C-konce (tři varianty)<sup>27</sup>.

Následnou kombinací vzniká šest různých isoform, které jsou označovány NKp30x. Písmeno x označuje přesnou isoformu. NKp30a-c mají doménu IgV a NKp30d-f mají doménu IgC. Mezi isoformami typu IgV jsou funkční rozdíly: NKp30a i NKp30b zesilují produkci IFN $\gamma$  a interleukinu 2 (IL-2) po stimulaci NK buněk *ex vivo*, zatímco NKp30c nikoli<sup>27</sup>. Něco podobného se děje také po inkubaci s nádorovými buňkami exprimujícími B7-H6, kdy NK buňky transfekované NKp30c nevykazovaly žádné projevy aktivace ve srovnání s ostatními NK buňkami. Na druhou stranu NKp30c-transfekované buňky po stimulaci produkovaly inhibiční interleukin IL-10. Tyto rozdíly ve výsledné funkci jsou způsobeny slabým spojením NKp30c s jeho adaptorovou signální molekulou CD3 $\zeta$ . Je také známo, že lidé s gastrointestinálním sarkomem mají horší terapeutickou prognózu, pokud je hladina exprese NKp30c poměrně vyšší<sup>27</sup>.

### 1.4.3 Ligandy NKp30

Nejdříve bylo identifikováno jen několik nebuněčných ligandů NKp30<sup>28</sup>: heparin a heparan sulfát působící jako koligandy se vážou pouze na glykosylovaný NKp30<sup>29</sup>, dále membránový protein fcEMP1 (z angl. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1)<sup>28,30</sup>. Ačkoli tyto ligandy mají aktivační účinky vůči NK buňkám, jiné nebuněčné ligandy mají inhibiční účinek – virové ligandy hemaglutinin viru ektromélie a protein pp65 uvolněný z lidského cytomegaloviru<sup>28</sup>.

Později byly identifikovány tři specifické buněčné ligandy NKp30<sup>28</sup>. První byl athanogen 6 asociovaný s B-buněčným lymfomem (BAG6, z angl. B-cell Lymphoma 2 Associated Athanogen 6). Dále membránový protein B7-H6, který je konstitutivně exprimován na některých nádorových buněčných liniích a nádorových buňkách<sup>31</sup>. Nejnověji objeveným ligandem je galektin-3, který téměř zcela blokuje cytotoxicitu NK buněk<sup>32</sup>. Všechny se nacházejí na povrchu či v okolí nádorů, ale zatímco BAG6 a B7-H6 většinou aktivují cytotoxicitu NK buněk, galektin-3 ji zcela blokuje<sup>28,31,33</sup>.



## 1.5 B7-H6

Protein B7-H6 byl objeven jako vazebný partner NKp30 v roce 2009<sup>31</sup>. B7-H6 je transmembránový protein typu I podobný imunoglobulinu. Jedná se o stresem indukovaný buněčný ligand, který patří do rodiny B7, který je rozeznáván receptorem přirozené cytotoxicity NKp30. Je pozoruhodné, že konstitutivní exprese B7-H6 nebyla zaregistrována u žádných zdravých buněk, avšak byla zjištěna u několika nádorových buněčných linií jak *ex vivo*, tak i *in vivo*, což z B7-H6 činí ukázkového adepta na marker pro rozpoznání nádoru<sup>34</sup>. Spojení proteinu B7-H6 s aktivačním receptorem NKp30 je signálem pro imunitní systém k zahájení imunitní odpovědi<sup>19</sup>.

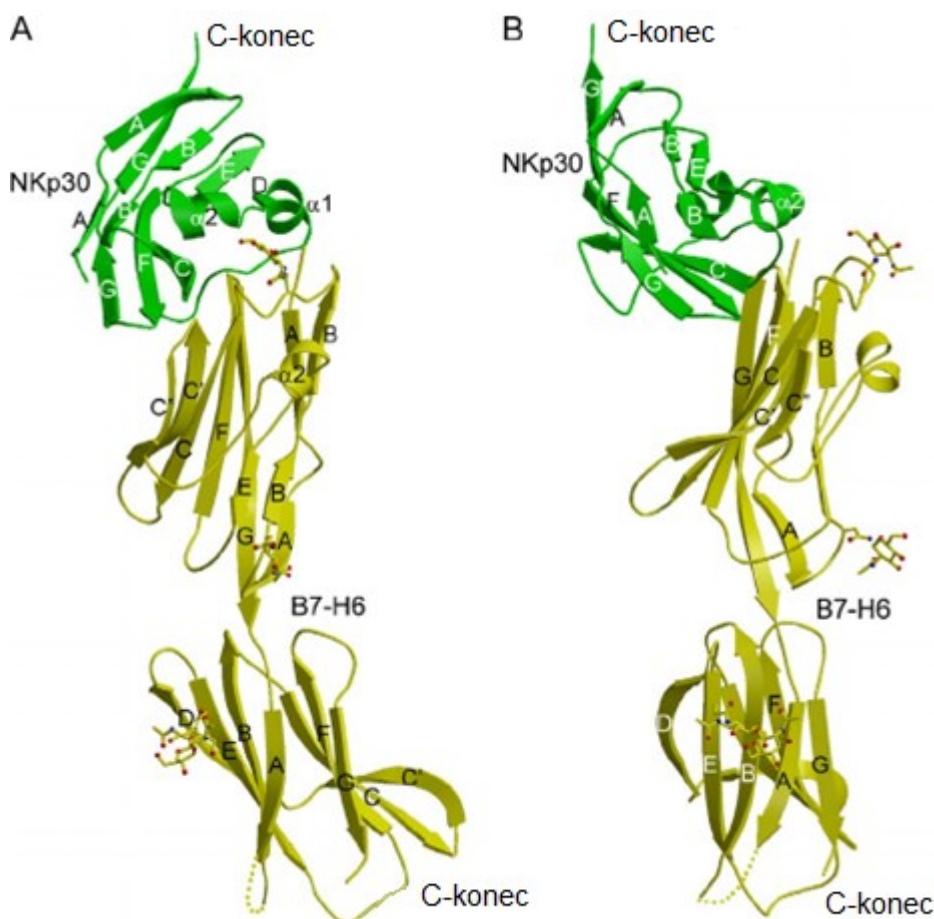
B7-H6 obsahuje šest potenciálních *N*-vázaných glykosylačních míst. Jeho extracelulární část se skládá z membránové distální domény podobné IgV a membránové proximální domény podobné IgC a krátké C-terminální sekvence homologní se skupinově specifickým antigenem (GAG, z angl. Group-specific Antigen) (viz obr. 2, str. 18). Na základě struktury se předpokládá, že cytoplazmatická doména B7-H6 obsahuje různé signální motivy, jako je například ITIM, dále vazebná doména homologní se Src proteinem 2 a 3 (SH-2, -3, z angl. Src Homology 3 / 2 Domain)<sup>35,36</sup>.

Dle publikace Pekar L. *et al.* (2021) byly popsány mutace vazebného místa B7-H6 pro NKp30, které zvyšují afinitu. Za účelem zesílení vazby na NKp30 byla vazebná doména IgV B7-H6 podrobena afinitní maturaci na kvasinkách metodou tzv. „yeast surface display“. Zapojení afinitně maturovaných ligandů pro receptory, které aktivují NK buňky (zde B7-H6 a NKp30), by mohlo být poměrně efektivní strategií pro tvorbu účinných terapeutických proteinů se specifickými efektorovými funkcemi v imunoterapii rakoviny<sup>19</sup>. Ze zmíněné publikace jsou pro tuto práci důležité varianty B7-H6 s vysokou afinitou k NKp30 (haB7-H6): S60I, F82W, L129Y ( $K_D = 1,24 \times 10^{-8}$  M); S60I, F82Y, L129Y ( $K_D = 1,49 \times 10^{-8}$  M); S60W, F82Y, L129Y ( $K_D = 6,52 \times 10^{-8}$  M). Největší afinita byla naměřena pro variantu S60Y, F82W, L129Y ( $K_D = 9,06 \times 10^{-9}$  M)<sup>19</sup> a ta je dále diskutována v kapitole 6, Diskuse.

## 1.6 Klinický význam NKp30 a B7-H6

Expres B7-H6 byla zjištěna u astrocytomy<sup>37</sup> nebo také u karcinomu žaludku<sup>38</sup>. V těchto případech výše exprese nesouvisela s patologickým stavem pacienta nebo s velikostí nádoru, ale souvisela s diferenciací nádorových buněk<sup>39</sup>. Také bylo zjištěno, že exprese B7-H6 souvisí s progresí nádoru a pak také s přežitím u karcinomu vaječníku<sup>39</sup>, dále že B7-H6 je exprimován na slinných epiteliálních buňkách pacientů se Sjögrenovým

syndromem, autoimunitním onemocněním postihujícím drobné slinné žlázy. NK buňky se zde hromadí a pravděpodobně způsobují zánět v závislosti na vazbě NKp30/B7-H6 <sup>39</sup>. Exprese NKp30 na NK buňkách také negativně koreluje s výskytem syndromu získané imunodeficience (AIDS) u pacientů infikovaných HIV <sup>40</sup>. Dále je exprese NKp30 zvýšena také u pacientů s akutním nechronickým selháním jater a u pacientů s virem hepatitidy B. Naopak pacienti, kteří mají virus hepatitidy C 2, mají expresi NKp30 sniženou <sup>41,42</sup>.



**Obrázek 2: Dva pohledy na komplex NKp30-B7-H6.** Extracelulární doménu NKp30 tvoří převážně antiparalelní beta struktura (označena písmeny) a dva krátké  $\alpha$ -helixy označené  $\alpha$ -1 a  $\alpha$ -2. Tyto obrázky jsou založeny na struktuře deponované v proteinové databance (PDB; Protein Data Bank) pod číslem 3PV6. Pohled vpravo je po otočení o 45° kolem svislé osy <sup>33</sup>.

Stále ovšem platí, že poměr úrovní exprese různých isoform NKp30 je důležitý u některých patologických stavů. Například u pacientů, kteří mají vysoce rizikový neuroblastom, byly sníženy aktivační isoformy NKp30a a NKp30b, nikoli však inhibiční NKp30c <sup>43</sup>.

## 1.7 Imunoterapie

Imunoterapie funguje na principu podpory imunitního systému pacienta při rozpoznávání a ničení nádorových buněk a zabraňuje jejich vzniku<sup>44</sup>. Smyslem imunoterapie je spustit imunitní systém tak, aby byl schopen rozpoznat a následně zabít nádorové buňky<sup>45,46</sup>. Nádorové buňky často exprimují specifické povrchové antigeny, které mohou být rozeznány imunitním systémem. Tyto povrchové antigeny dělíme do dvou skupin – antigeny asociované s nádory (TAA, angl. Tumour-Associated Antigen) a antigeny specifické pro nádory (TSA, angl. Tumour-Specific Antigen). Antigeny specifické pro nádory mohou být někdy též označovány jako neoantigeny<sup>1,47</sup>.

Bohužel se může stát, že se nádorové buňky vyhnou dohledu imunitního systému i přesto, že by měl sám rozeznat všechny patogenní buňky a následně je zničit. Existuje několik mechanismů rezistence – systémové narušení signalizace T buněk, indukce tolerance nebo lokální únik imunitě<sup>44</sup>.

Imunoterapie využívá různé přístupy: potlačení inhibičních a supresorových mechanismů nebo aktivaci efektorových mechanismů. Pro stimulaci efektorových imunitních buněk se dá použít buď očkování pacienta nádorovými antigeny anebo zvýšení počtu antigenů, a to tím způsobem, aby imunitní systém sám vyvolal imunitní odpověď.

Jednou z pokročilých variant imunoterapie je přímé podání imunitních buněk pacientovi, tzv. adoptivní buněčná terapie (ACT, z angl. Adoptive Cellular Therapy) nebo podání onkolytických virů. Ty následně spustí systematickou protinádorovou odpověď<sup>45</sup>.

Přes veliký potenciál, který imunoterapie nabízí, je nutné mít na paměti možnou vysokou toxicitu (např. při použití interleukinu-2 pro stimulaci lymfocytů), či autoreaktivitu související s rozvojem autoimunitních onemocnění<sup>46</sup>.

### 1.7.1 NK buňky v imunoterapii

NK buňky bývají občas opomíjeny, protože prezentují "pouze" cca 12 % krevních lymfocytů<sup>48</sup>. Avšak stále více výzkumníků se domnívá, že NK buňky získané z periferní krve pacienta (autologní) nebo zdravého dárce (alogenní), mohou představovat bezpečnější efektorové buňky pro cílenou buněčnou terapii nádorových onemocnění než T lymfocyty<sup>49</sup>. Mají jedinečnou schopnost rychle identifikovat a eliminovat transformované nebo stresované buňky. Aplikace krevních NK buněk však naráží na biologické, logistické a finanční problémy. Problémem je, že autologní NK buňky obvykle nejsou příliš účinné, protože jsou funkčně utlumeny po setkání s vlastními antigeny MHC gp I, a jsou také často ohroženy samotným onemocněním a jeho léčbou<sup>49</sup>. Také projevují nižší cytotoxicitu vůči

nádorům než buňky odebrané ze zdravého jedince. Je tedy lepší použít „cizí“ alogenní NK buňky, protože jejich použití by mohlo vykazovat slibnější výsledky<sup>50</sup>. Avšak u alogenních buněk hrozí, že imunitní systém pacienta je nepřijme a dojde tedy k odvržení transplantované tkáně<sup>49,50</sup>. Mezi další možnosti by se dalo zařadit využití kmenových buněk nebo přenos linie imortalizovaných cytotoxických NK buněk odvozených z NK buněčného lymfomu<sup>49</sup>.

## 2 CÍLE PRÁCE

- Příprava plazmidů pro expresi pěti variant proteinu B7-H6 s mutacemi pro zvýšenou afinitu vůči receptoru NKp30.
- Rekombinantní exprese pěti mutovaných forem proteinu B7-H6 v lidské buněčné linii HEK293T.
- Purifikace mutovaných forem B7-H6 pomocí afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie.
- Charakterizace vazby mutovaných variant B7-H6 na NKp30 izotermální titrační kalorimetrií.

### 3 MATERIÁLY

#### 3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Automatický sběrač frakcí	GE Healthcare, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Avanti JXN-26	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifugační kyvety 85 ml	Nalgene, USA
Centrifugační kyvety 250 ml PPCO	Nalgene, USA
Centrifugační zkumavky Oak Ridge 30 ml	Sigma-Aldrich, USA
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
Erlenmeyerovy baňky 2l	Simax, ČR
Filtry pro sterilizaci 0,22 $\mu$ m	TPP, Švýcarsko
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor IR 5000	LABsystem Praha, ČR
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Kahan Fuego SCS	Verkon, ČR
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona INDIGO-Ni	Cube Biotech, USA
Koncentrátor Amicon Ultra	Millipore, USA
Kónické zkumavky 50 ml a 15 ml	VWR, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	VWR, USA
Lahve 1 l, 500 ml, 100 ml	P-Lab, ČR
Mikrokalorimetr MicroCal PEAQ-ITC	Malvern Panalytical, UK
Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	P-LAB, ČR
Mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 $\mu$ m	TPP, Švýcarsko
Mikrostríkačka Hamilton	P-LAB, ČR

Mikrovlánná trouba	Optimo Moulinex, Francie
Mikrozkumavka 1,5 ml	Axygen, USA
Mikrozkumavka 200 $\mu$ l	Axygen, USA
Mikrozkumavky pro PCR 500 $\mu$ l	Axygen, USA
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
Odsolovací kolona HyPrep 26/10	Cytiva, USA
PBS pro tkáňové kultury	Cytiva, USA
Petriho misky	Corning, Německo
pH metr $\Phi$ 200	Beckman Coulter, USA
Počítáčka buněk CytoSMART	Corning, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone, USA
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Stříkačkový mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 $\mu$ m	Carl Roth, Německo
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler T100	Bio-Rad, USA
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
UV prosvěcovací lampa 312 nm	UVItec, UK
Vortexový mixér	Velp Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj stejnosměrného napětí EC250-90	E-C Apparatus Corporation, UK
Zobrazovací zařízení Alliance Q9	UVItec, UK

### 3.2 Chemikálie

1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkaptoethanol	Sigma, USA
Agar	Oxoid, Anglie

Agarosa	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR
APS	Serva, USA
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, ČR
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Lach-Ner, ČR
Ethanol denaturovaný	Lach-Ner, ČR
GoodView II	Ecoli, Slovensko
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
Hydroxid sodný	Penta, ČR
Chlorid draselný	Lach-Ner, ČR
Chlorid hořečnatý	Lach-Ner, ČR
Chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
Imidazol	Carl Roth, Německo
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
Kvasničný extrakt	Duchefa, Nizozemsko
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner, ČR
Kyselina octová	Lach-Ner, ČR
Kyselina valproová	Sigma-Aldrich, USA
L-glycin	Lach-Ner, ČR
Lineární polyethylenimin, 25 kDa	Polysciences, Kanada
N,N'-methylenbisakrylamid	Serva, USA
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Německo



NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Plazmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel, Německo
Octan sodný	Sigma-Aldrich, USA
Penicilin	Carl Roth, Německo
PCR H <sub>2</sub> O	Top-Bio, ČR
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific. USA
Streptomycin	Carl Roth, Německo
TEMED	Serva, USA
Trypton	Duchefa, Nizozemsko
Trypanová modř	Sigma, USA
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, ČR

### 3.3 Roztoky, pufry a kultivační média

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

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

ExCELL 293 (komerční médium, před použitím doplněno o L-glutamin do výsledné koncentrace 4 mM; Sigma-Aldrich, USA)

20 mM imidazol (v PBS)

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

Octanový pufr (20 mM octan sodný, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 4)

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE (35 % ethanol, 10 % kys. octová)

PBS pufr (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5)

PBS-TK (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0)

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

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

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

Roztok ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml

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

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný neredukující (31,5 mM Tris, 10 % (v/v) glycerol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8)

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

### 3.4 Enzymy, proteiny

CutSmart pufr	New England Biolabs, USA
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, ČR
Ligation-free cloning kit	ABM, USA
Q5 enhancer	New England Biolabs, USA
Q5 reakční pufr	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleasa Age I	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleasa Kpn I	New England Biolabs, USA
T4 ligasa	New England Biolabs, USA
Pufr pro T4 ligasu, 10× koncentrovaný	New England Biolabs, USA
Protein NKp30	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D., PřF UK, Katedra biochemie

### 3.5 Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>Escherichia coli</i> TOP10	New England Biolabs, USA
<i>Escherichia coli</i> DH5α	New England Biolabs, USA
HEK293T	prof. Radu Aricescu, UK

### 3.6 Vektory

pTW5sec_mB7-H6	Mgr. Samuel Pažický, Ph.D., PřF UK, Katedra biochemie
pTW5sec_S4B6	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D., PřF UK, Katedra biochemie
pTW5_p27	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK, Katedra biochemie
pTW5_aFGF	Mgr. Edita Poláchová, PřF UK, Katedra biochemie
Syntetické geny	Thermo Fisher Scientific, USA

### 3.7 Oligonukleotidy pro PCR

pTT\_FW 5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

pTW5seq\_REV 5'-AAGCAGCGTATCCACATAGCG-3'

mB7H6\_C\_FW 5'-TCTTGGAATTACCGGTGATCTGAAAGTA-3'

mB7H6\_L246\_REV 5'-TGGTGGTGATGGTGGGTACCCAGGGTAAAGTTGCTC-3'

## 4 METODY

### 4.1 Štěpení plazmidu restričními endonukleasami Age I a Kpn I

Do reakční směsi celkového objemu 20  $\mu\text{l}$  bylo přidáno 3,8  $\mu\text{g}$  plazmidu pTW5sec\_S4B6 (zde 1  $\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  reakčního pufru CutSmart a restriční endonukleasy Age I (0,5  $\mu\text{l}$ ) a Kpn I (1  $\mu\text{l}$ ). Zbytek do celkového objemu byl doplněn 15,5  $\mu\text{l}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$ . Celá tato směs byla inkubována přes noc při 37 °C. Po uplynutí doby inkubace byl linearizovaný plazmid nanesen na agarosový gel pro elektroforézu. Podobným způsobem byl štěpen i PCR produkt haB7-H6 IWY (viz kapitola 4.7).

### 4.2 Agarosová elektroforéza

Na agarosovou elektroforézu byl připraven 1 % gel. V Erlenmeyerově baňce bylo rozpuštěno 0,65 g agarosy v 65 ml TAE pufru. Roztok byl následně krátce povařen v mikrovlnné troubě cca 1 min. Jakmile gel zchladl na teplotu přibližně 40 °C, byly přidány 3  $\mu\text{l}$  barviva GoodView. Toto barvivo slouží k zvýraznění DNA v modrém a UV světle. Gel byl následně nalit do předem připravené aparatury a do ještě teplého gelu byl umístěn hřeben k vytvoření jamek. K elektrodám byl nalit TAE pufr, po ztuhnutí byl odebrán hřeben a celý gel byl nakonec převrstven  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Ke vzorkům byl přidán vzorkový pufr (6 $\times$  koncentrovaný). Do prvních dvou jamek byly nejdříve po 5  $\mu\text{l}$  pipetovány 100 bp a 1 kb standardy. Jako kontrola, zda byl plazmid linearizován, byl mezi vzorky i výchozí neštěpený plazmid pTW5sec\_S4B6 (1,5  $\mu\text{g}$  celkem) v objemu 11  $\mu\text{l}$ . Do dalších jamek bylo pipetováno 22  $\mu\text{l}$  štěpeného plazmidu \*pTW5sec a PCR produktu.

Elektroforéza probíhala 20 minut při stejnosměrném napětí 180 V. Následně byly vzorky prohlédnuty s UV prosvěcovací lampou a byla provedena fotodokumentace. Následně byla provedena extrakce z gelu s pomocí soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean-up podle návodu výrobce.

### 4.3 Klonování nezávislé na ligase

Klonování nezávislé na ligase (LFC, z angl. Ligation-Free Cloning) slouží k vnesení inzertu (genu) do daného vektoru (plazmidu). Reakce byla provedena na ledové lázni při 0 °C ve 200 $\mu\text{l}$  mikrozkušavkách. Do celkového objemu 20  $\mu\text{l}$  bylo jako první pipetováno

10,6  $\mu\text{l}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$ , 40 ng inzertu (4  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku), následně 100 ng linearizovaného vektoru (1,4  $\mu\text{l}$  roztoku plazmidu \*pTW5sec štěpeného restrikcí endonukleasami), nakonec byla směs doplněna 4  $\mu\text{l}$  LFC enzymového mixu. Směs byla inkubována 40 min na ledové lázni. Následovala transformace kompetentních bakterií *E. coli* TOP10.

#### 4.4 Ligace T4 DNA ligasou

Pro ligaci bylo do mikrozkušavky pipetováno do celkového objemu 20  $\mu\text{l}$  nejprve 100 ng štěpeného \*pTW5sec plazmidu. K tomu bylo přidáno 40 ng štěpeného PCR produktu haB7-H6 IWY a voda pro PCR. Dále byl přidán T4 DNA ligasový pufr (10 $\times$  koncentrovaný). Ke směsi byla na závěr přidána T4 DNA ligasa (1  $\mu\text{l}$ ). Tato směs byla inkubována 10 min při pokojové teplotě. Následovala transformace kompetentních bakterií *E. coli* TOP10.

#### 4.5 Transformace bakterií *E. coli* TOP10

Pro transformaci bylo využito 50  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze bakterií *Escherichia coli* TOP10. Do LFC reakční směsi (viz kapitola 4.3), případně do ligační směsi (viz kapitola 4.4) v mikrozkušavce bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze a směs byla inkubována 20 minut na ledové lázni. Poté byl proveden teplotní šok v termobloku při 42  $^{\circ}\text{C}$  po 1 min. Po teplotním šoku byla mikrozkušavka vložena zpět do ledové lázně na 5 minut. Po skončení inkubace byla suspenze rozetřena na agarovou misku obsahující ampicilin o koncentraci 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a inkubována přes noc při 37  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6 Polymerasová řetězová reakce z kolonií

Po transformaci (viz kapitola 4.5) narostly na agarové misce kolonie bakterií. PCR z narostlých kolonií primárně sloužila k ověření, zda byl požadovaný gen úspěšně vložen do plazmidu, kterým byly bakterie *E. coli* TOP10 transformovány.

Do PCR mikrozkušavky bylo pipetováno do celkového objemu 20  $\mu\text{l}$  nejprve 6  $\mu\text{l}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{l}$  přímého primeru mB7H6\_C\_FW, 2  $\mu\text{l}$  zpětného primeru mB7-H6\_L246\_REV a 10  $\mu\text{l}$  směsi Combi PPP Master Mix (reakční pufr obsahující i DNA polymerasu). Do mikrozkušavky s reakční směsí byla vložena špička s vypíchnutou kolonií z inkubované kultivační plotny a bakterie byly ve směsi resuspendovány. Poté byl nastaven program na termocykleru pro PCR reakci: 3 min při 95  $^{\circ}\text{C}$ , následně 20 cyklů, každý cyklus 30 s při 95  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s při 54  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min při 72  $^{\circ}\text{C}$ , poté 5 min při 72  $^{\circ}\text{C}$  a následně byla teplota

termocyklieru udržována až do vyjmutí na 12 °C. Výsledky byly následně zobrazeny pomocí agarosové elektroforézy.

Špička s vypíchnutou kolonií byla vložena do 50ml zkumavky obsahující 5 ml SOB média a 5  $\mu$ l ampicilinu (100 mg/ml). Bakterie byly inkubovány přes noc na třepačce při 37 °C a 200 ot./min.

#### **4.7 Polymerasová řetězová reakce genu pro haB7-H6 IWY**

Do PCR mikrozkušavky bylo pipetováno do celkového objemu 20  $\mu$ l nejprve 6  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l přímého primeru mB7H6\_C\_FW, 2  $\mu$ l zpětného primeru mB7-H6\_L246\_REV, 4  $\mu$ l Q5 reakčního pufru, 4  $\mu$ l Q5 enhanceru, 1  $\mu$ l (100 ng) syntetického genu pro haB7-H6 IWY a 1  $\mu$ l směsi deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTPs). Na závěr byl přidán 0,5  $\mu$ l Q5 polymerasy. Poté byl nastaven program na termocyklieru pro PCR reakci: 3 min při 95 °C, následně 30 cyklů, každý cyklus 30 s při 95 °C, 30 s při 54 °C, 1 min při 72 °C, poté 5 min při 72 °C a následně byla teplota termocyklieru udržována až do vyjmutí na 12 °C. Výsledky byly následně zobrazeny pomocí agarosové elektroforézy.

#### **4.8 Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA**

Pro nízkoobjemovou izolaci plazmidové DNA z bakterií byla použita komerční souprava NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit a postup byl proveden dle přiloženého návodu výrobce. Zkušavka s narostlou kulturou v LB médiu byla nejprve centrifugována při 11000  $\times$  g, 1 min. Supernatant byl odlit a získaná peleta resuspendována v 250  $\mu$ l pufru A1 obsahujícím RNAsu. Suspenze byla následně přenesena do nové 1,5ml zkumavky, do které byl přidán lyzační pufr A2 (modrý) o objemu 250  $\mu$ l. Zkušavka byla opatrně promíchána pouze lehkým převrácením a následně inkubována po dobu 5 min při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 300  $\mu$ l neutralizačního pufru A3. Zkušavka byla opět několikrát lehce promíchána převrácením, dokud nezmizela všechna modrá barva a vznikla bílá suspenze, která byla centrifugována 5 min při 11000  $\times$  g.

Poté bylo přeneseno 600  $\mu$ l supernatantu na kolonku vázající DNA, která byla umístěna do 2ml sběrných zkumavek a supernatant byl centrifugován 1 min při 11000  $\times$  g. Filtrát byl odlit pryč a kolonka dvakrát promyta AW pufrem o objemu 500  $\mu$ l (centrifugace 1 min, 11000  $\times$  g). Pro přečištění DNA bylo na membránu přidáno 600  $\mu$ l Wash pufru A4, kolonka byla centrifugována opět stejným způsobem. Po odstranění filtrátu byla kolonka vysušena centrifugací 2 min, 11000  $\times$  g.

Pro eluci DNA byla kolonka umístěna do čisté zkumavky, následně bylo přidáno 50  $\mu$ l elučního pufru AE předeřátého na 50 °C. Inkubace probíhala při pokojové teplotě přibližně 1 min. Poté byla centrifugována za stejných podmínek. Na závěr byla změřena koncentrace získaných vzorků DNA na spektrofotometru DS-11+ (DeNovix).

#### 4.9 Příprava vzorku pro sekvenování DNA

Vzorky pro sekvenaci byly připraveny vždy do dvou mikrozkuvek. Celkový objem vzorku tvořil 8  $\mu$ l. Zkumavky obsahovaly plazmidovou DNA po 200 ng. Do jedné zkumavky se vzorkem byl přidán přímý primer pTT\_FW a do druhé zkumavky zpětný primer pTW5seq\_REV a to po 1  $\mu$ l. Zbytek objemu byl doplněn PCR H<sub>2</sub>O.

Sekvenace vzorků DNA proběhla v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK ve výzkumném ústavu BIOCEV. Po získání výsledků byla sekvenace vyhodnocena v programu SnapGene.

#### 4.10 Transformace bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$

Transformace bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  probíhala stejným způsobem, jako transformace bakterií *E. coli* TOP10 (viz. kap. 4.5). Tento kmen bakterií byl použit z důvodu větších výtěžků plazmidové DNA, což je vhodné pro velkoobjemovou produkci plazmidu.

Do mikrozkuvky s 50  $\mu$ l rozmrazené buněčné suspenze byly pipetovány 2  $\mu$ l plazmidové DNA. Tato směs byla inkubována 20 min na ledové lázni. Dále byl proveden tepelný šok po dobu 1 min při 42 °C. Následně byla směs umístěna zpět na ledovou lázeň na 5 min. Po inkubaci byla směs pipetována a rozetřena na SOB agarovou misku s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml a inkubována přes noc při 37 °C.

Následující den byly kolonie pomocí špičky přeneseny do baňky s 0,5 l LB média a s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml. V této baňce byly inkubovány přibližně 12 hod na třepače při 37 °C a 200 ot./min.

#### 4.11 Velkoobjemová příprava plazmidové DNA

Narostlá bakteriální kultura o objemu 0,5 l byla přenesena do dvou 250 ml kyvet a následně centrifugována v centrifuze předchlazené na 4 °C po dobu 15 min při 4000  $\times$  g. Pro izolaci plazmidové DNA byla použita komerční souprava NucleoBond Xtra Maxi dle návodu výrobce. Po 15 min centrifugace buněčné kultury byl supernatant opatrně odlit a peleta resuspendována RES pufrem o objemu 12 ml a promíchána na orbitální třepače. Následně byla suspenze přenesena do nové 50ml zkumavky, do které bylo pipetováno 12 ml

lyzačního LYS pufru (modrý). Roztok byl opatrně promíchán převrácením a inkubován 5 min při pokojové teplotě. Během inkubace byly do stojánku připraveny kolonky s filtry, které bylo potřeba promýt 25 ml EQU pufru. Po inkubaci bylo do 50ml zkumavky přidáno 12 ml neutralizačního NEU pufru a roztok byl opět opatrně promíchán převrácením, dokud nezmizela modrá barva. Poté byl celý roztok převeden na filtrační kolonku, aby prokapal. Když se všechen roztok přefiltroval, byl celý filtr kolony promyt 15 ml EQU pufru. Poté byl filtr z kolony odstraněn a kolona byla promyta 25 ml WASH pufru. Následně byl roztok eluován do čisté zkumavky 15 ml ELU pufru. K tomu bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu předchlazeného na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zkumavka byla promíchána na orbitální třepače a suspenze sražené plazmidové DNA centrifugována v centrifuze předchlazené na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $15000 \times g$ , 30 min. Všechny supernatant byl odstraněn a peleta opláchnuta 4 ml 70% etanolu předchlazeného na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následovala centrifugace 25 min při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $15000 \times g$ . Supernatant byl odstraněn a zkumavka vysušena ve vakuové odparce 5 min při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Vysušená peleta plazmidové DNA byla rozpuštěna v 1 ml sterilní přefiltrované  $\text{dH}_2\text{O}$ . Roztok plazmidu byl přenesen do čisté mikrozskumavky. Poté byla změřena koncentrace DNA ve vzorku pomocí spektrofotometru.

#### **4.12 Rozmražení a kultivace buněčné linie HEK293T**

Práce s buněčnou linií probíhala vždy pouze ve sterilním prostředí laminárního boxu. Buněčná suspenze HEK293T byla uchovávána v 1 ml alikvotech s přídavkem 10 % DMSO při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Alikvot byl rozmrazen a buněčná suspenze přenesena do 10 ml čistého ExCELL 293 média předehřátého na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v plastové zkumavce. Suspenze byla centrifugována 5 min při  $100 \times g$ . Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 10 ml ExCELL 293 média a přenesena pipetou na sterilní Petriho misku. Po čtyřech dnech byla kultura resuspendována sérologickou pipetou. Ze suspenze byl odebrán 1 ml a zředěn 9 ml čerstvého média ExCELL 293 na nové misce. Po dvou subkultivacích na misce byla kultura přenesena do 100ml lahve s čtvercovým dnem do 30 ml média. Kultivace buněk probíhala v těchto lahvích s prodyšným víčkem, které byly umístěny na třepačku v inkubátoru při 135 ot./min,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5 %  $\text{CO}_2$ . Subkultivace dále probíhaly jednou za 3 – 4 dny.

Buňky pro transfekci byly rozrůstány rovněž ve čtvercových lahvích. Celkový objem kultury v médiu ExCELL 293 byl 200 nebo 400 ml. Kulturu byla v několika následujících dnech pravidelně kontrolována pod mikroskopem (koncentrace buněk a jejich viabilita).



### 4.13 Transientní transfekce linie HEK293T

Před transfekcí byly buňky HEK293T pěstovány ve větším objemu (200 nebo 400 ml) média, aby bylo dosaženo dostatečného množství buněk. Objem média, který obsahoval 800 milionů buněk, byl převeden do 50ml zkumavek a odstředován po dobu 5 minut při  $100 \times g$ . Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 34 ml média ExCELL 293 a přeneseny do čisté skleněné čtvercové láhve. Transfekce byla prováděna v poměru 1  $\mu\text{g}$  DNA na 1 mil. buněk. Směs DNA pro transfekci tvořilo 88 hm% expresního plazmidu pTW5sec s daným genem pro vysokoafinitní B7-H6, 10 hm% plazmidu pTW5\_p27 a 2 hm% pTW5\_aFGF.

DNA v roztoku PBS pro tkáňové kultury byla filtrována přes 0,22 $\mu\text{m}$  filtr do baňky s buňkami. Následně byl přidán lineární 25 kDa polyethylenimin (IPEI, 10 mg/ml), aby bylo dosaženo poměru DNA:IPEI 1:3. Buňky byly inkubovány na třepačce v inkubátoru po dobu 90 minut při 37 °C a poté bylo přidáno 1,6 ml 0,5 M kyseliny valproové, 4 ml roztoku antibiotik (penicilin a streptomycin) a médium ExCELL 293 do objemu 400 ml. Buňky byly sklizeny přibližně po sedmi dnech produkce.

### 4.14 Sklizení buněčné kultury

Buněčná suspenze po produkci žádaného proteinu byla rozdělena do 250 ml centrifugačních kyvet a poté centrifugována 10 min při  $100 \times g$ . Supernatant byl přelit do čistých kyvet a následně centrifugován při  $25000 \times g$ , 15 °C, po dobu 30 – 60 min. Poté byl zfiltrován přes 0,22 $\mu\text{m}$  filtr, zředěn pufrům PBS a zpracován nebo uložen do lednice v případě purifikace v následujícím dnu. V případě, kdy by purifikace měla být provedena až po delší době, bylo zfiltrované médium uchováváno v mrazáku při -20 °C.

### 4.15 Afinitní chromatografie a odsolení

Rekombinantní proteiny byly vyrobeny s histidinovou kotvou, což umožnilo purifikaci proteinů pomocí afinitní chromatografie s cheláty kovů. Pro afinitní chromatografii byla využita kolona INDIGO-Ni připojená k HPLC systému ÄKTA basic. Než byla kolona použita, byl nastaven tlakový limit 0,5 MPa a maximální průtok na 10 ml/min.

Kolona byla nejprve ekvilibrována 50 ml PBS. Následně byl nanesen filtrovaný vzorek média a kolona byla promyta PBS pufrům. Byla provedena předeluce 20mM imidazolem v PBS. Za afinitní kolonku byla připojena 50ml odsolovací kolona HiPrep 26/10 ekvilibrovaná v HEPES pufru. Cílový protein byl eluován 250mM imidazolem v PBS. Při nárůstu absorbance při 280 nm byly sbírány frakce do 50ml zkumavek, dokud se křivka

absorbance opět neustálila. Kolona byla následně promyta octanovým pufrům, PBS, dH<sub>2</sub>O, 20% ethanolem a uložena v lednici. Odsolovací kolona byla promyta dH<sub>2</sub>O a 20% ethanolem.

#### **4.16 Koncentrování proteinů**

Ke koncentrování proteinů byly použity koncentrátoři Amicon Ultra (MWCO 10000), které byly naplněny roztokem proteinu a centrifugovány při 4000 × g, 10 °C, 10 min. Filtrát byl odstraněn a zbylý roztok proteinu byl doplněn a opět centrifugován. Celý postup se opakoval několikrát, dokud nebyl v koncentrátoři zkoncentrován celý roztok proteinu a objem se nesnížil na 200 – 250 µl. Před nástřikem na kolonu v dalším kroku byl vzorek přenesen do mikrozkuřavky a centrifugován 5 min při 20000 × g.

#### **4.17 Gelová permeační chromatografie**

Gelová permeační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300 GL, připojené k HPLC systému ÄKTA basic. Před purifikací byla kolona ekvilibrována mobilní fází (HEPES pufr). Mobilní fází byla také promyta injekční smyčka na 1 ml vzorku a odstředěný vzorek byl nastříknut na kolonu. Vzorek byl na koloně separován a jednotlivé frakce byly sbírány do mikrozkuřavek po 1 ml. Po skončení gelové permeační chromatografie byla koncentrace proteinu ve frakcích stanovena spektrofotometricky.

#### **4.18 Stanovení koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometricky jako absorbance při 280 nm na přístroji spektrofotometru DS-11+ (DeNovix). Molární extinkční koeficienty a molekulová hmotnost proteinů byly vypočteny z aminokyselinové sekvence a na základě těchto hodnot a změřené absorbance byla vypočtena koncentrace proteinu.

#### **4.19 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Pro zobrazení jednotlivých frakcí z preparativní chromatografie byl použit 15 jamkový 10% polyakrylamidový gel se zaostřovací a rozdělovací částí. Pro ověření čistoty a homogenity vzorku bylo pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu použito dvakrát 5 µl každé frakce, jednou v redukujícím a jednou v neredukujícím prostředí.

Rozdělovací i zaostřovací gely byly připraveny podle rozpisu uvedeného v tabulce 1, str. 34. Nejprve byl smíchán rozdělovací gel a po polymeraci byl nad něj přidán zaostřovací gel. Do gelu byl vložen hřeben na vzorky, který vytvořil jamky, do kterých byly posléze

pipetovány vzorky. Polymerizované gely byly umístěny do aparatury. Vzorky byly připraveny ve dvou formách – s redukujícím a s neredukujícím vzorkovým pufrům. 5  $\mu$ l redukujícího / neredukujícího vzorkového pufru bylo smícháno s 20  $\mu$ l vzorku. Vzorky byly 5 min zahřívány v termobloku při teplotě 95 °C, následně centrifugovány 1 min při 11000  $\times$  g a pipetovány do jamek polyakrylamidového gelu. Kvůli odlišným koncentracím vzorků byly pro elektroforézu na gely nanášeny různé objemy (viz tabulka 2) tak, aby celkové množství proteinu bylo 5  $\mu$ g. Nakonec byl do jedné jamky vložen proteinový standard.

Elektroforéza trvala cca 70 minut při 220 V. Na závěr byly gely obarveny barvicím roztokem (nejméně 20 min) a odbarveny (dvakrát 60 min) a následně vyfoceny.

**Tabulka 1: Příprava gelů pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu.**

<i>SLOŽKY GELU</i>	<i>ROZDĚLOVACÍ GEL</i>	<i>ZAOSTRŔOVACÍ GEL</i>
dH <sub>2</sub> O	1,6 ml	0,7 ml
30% AA	1,33 ml	0,25 ml
Tris (pH 8,8)	1,0 ml	-
Tris (pH 6,8)	-	125 $\mu$ l
10% SDS	40 $\mu$ l	10 $\mu$ l
10% APS	40 $\mu$ l	10 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l

**Tabulka 2: Objemy vzorků pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu.**

<i>Vzorek</i>	<i>Objem</i>
WWY	2 $\times$ 10 $\mu$ l
WYY	2 $\times$ 4 $\mu$ l
YYY	2 $\times$ 3,5 $\mu$ l
IWY	2 $\times$ 3,5 $\mu$ l
IYY	3 $\mu$ l, 2 $\mu$ l

## 4.20 Izotermální titrační kalorimetrie

Pro měření termodynamických parametrů vazby NKp30:B7-H6 byl použit kalorimetr MicroCal PEAQ-ITC. Měření byla provedena ve spolupráci s Dr. Tatsianou Charnavets v Centru molekulární struktury ve výzkumném ústavu BIOCEV. Protein NKp30\_LBD poskytl pro měření Dr. Ondřej Skořepa a jeho příprava je popsána jinde <sup>26</sup>.

Jako první bylo stanoveno kontrolní teplo pomocí 19 vstříků 2  $\mu$ l pufru HEPES ze stříkačky do stejného pufru v cele. Pro měření vazby proteinů bylo použito 16,2  $\mu$ M haB7-H6 v cele a 16,2 mM NKp30\_LBD ve stříkačce. Po počátečním vstříku 0,4  $\mu$ l NKp30 následovaly vstříky po 1,8  $\mu$ l NKp30. Doba trvání vstříku trvala 3,6 s a rozestupy mezi dalšími vstříky 150 s. Data byla vyhodnocena pomocí programů NITPIC <sup>51,52</sup>, SEDPHAT <sup>53</sup> a GUSI <sup>54</sup>.

## 5 VÝSLEDKY

V této práci bylo připraveno pět mutovaných forem celé extracelulární domény haB7-H6 v lidské buněčné linii HEK293T. Vazebná afinita byla ověřena izotermální titrační kalorimetrií.

### 5.1 Návrh konstruktů afinitně maturovaného B7-H6

Obrázek 3 znázorňuje výchozí sekvenci konstruktů proteinu B7-H6 zahrnující jeho extracelulární část v rozmezí aminokyselin D25-L245. Konstrukt obsahuje mutaci C212S, která zabraňuje vzniku kovalentního dimeru skrz lichý cystein a zároveň zvyšuje výtěžky exprese v linii HEK293.

**ITGDLKVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQLNITSMGITWFWKSLTFDKEVK  
VFEFFGDHQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASLRPLPGIQLLEEAGEYRCVWVTPLKA  
QGTVQLEVVASPARLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKF  
PHPIEISEDVITGPTIKNMDGTFNVTSSLKLNSSQEDPGTVYQCVVRHASLHTPL  
RSNFTLGTHHHHHHHHG**

**Obrázek 3: Aminokyselinová sekvence použitého konstruktů proteinu B7-H6.** Počáteční černý úsek znázorňuje zbytek sekrečního signálu a zbytek po štěpení restriční endonukleázou. Zeleně je znázorněná sekvence D25-L245 B7-H6. Černě vyznačené GT znázorňuje restriční místo a poté histidinovou kotvu. Žlutým podbarvením jsou vyznačené cysteiny, které jsou zapojeny do disulfidických můstků C48-C122 a C136-C228. Červeně je označeno šest asparaginů, na kterých byla potvrzena přítomnost *N*-vázané glykosylace. Modře je označeno místo mutace C212S.

Celá extracelulární část B7-H6 je sestavena ze dvou domén podobných Ig. Každá doména podobná Ig obsahuje jeden disulfidický můstek. První disulfid je tvořen Cys48 a Cys122, druhý Cys136 a Cys228 (viz obr. 3, značené žlutě). Asn43, 57, 148, 208, 216 a 242 tvoří potvrzené *N*-vázané glykosylace (viz obr. 3, značené červeně). C-koncová doména obsahuje jeden lichý cysteinový zbytek (Cys212). Tento lichý cystein, který při expresi tvoří nežádoucí kovalentní dimer B7-H6, byl již dříve mutován na serin. Vznikla tedy mutovaná forma mB7-H6 C212S. Tato mutace vedla ke zvýšení exprese B7-H6, kdy byl podpořen jeho výtěžek až na 50 mg na litr buněčné kultury.

Do tohoto konstruktů mB7-H6 byly v rámci této práce vloženy mutace, které na základě předchozí publikace Pekar L. *et al.* (2021) měly zvýšit afinitu vůči NKp30. Mutovaná místa v této sekvenci se týkala vždy S60, F82, L129. Jednotliví mutanti haB7-H6 a mutované úseky jsou uvedeny v tabulce 3, str. 38.

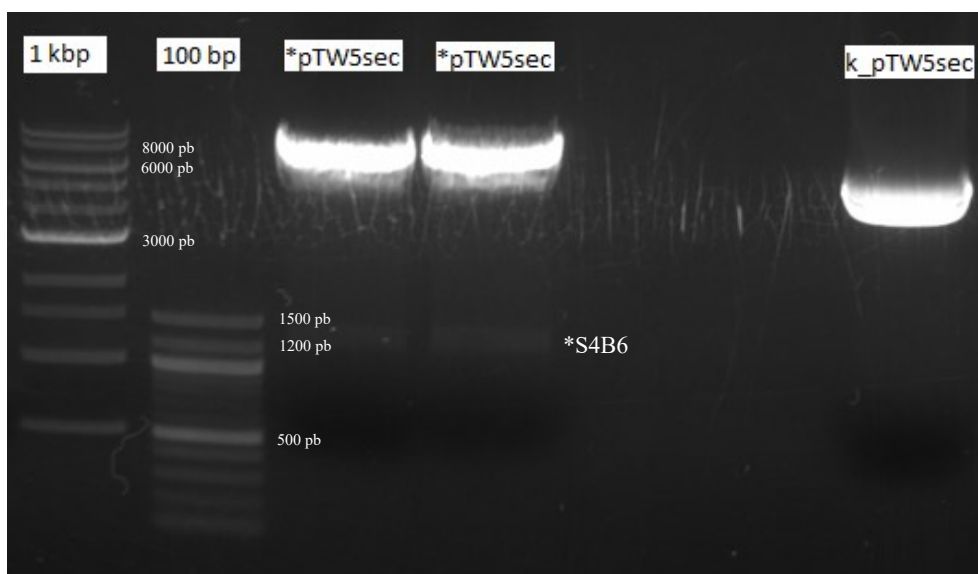
**Tabulka 3: Pět vysokoafinitních mutantů B7-H6.** V levém sloupci jsou jednotliví mutanti haB7-H6, v pravém sloupci jsou uvedeny mutované úseky, včetně označení použitým v publikaci Pekar L. *et al.* (2021).

MUTANT	TYP MUTACE
B-IWY	Klon 3_15; S60I, F82W, L129Y
B-IYY	Klon 3_24; S60I, F82Y, L129Y
B-WYY	Klon 3_25; S60W, F82Y, L129Y
B-YYY	Tato práce; S60Y, F82Y, L129Y
B-WWY	Tato práce; S60W, F82W, L129Y

## 5.2 Molekulární klonování

### 5.2.1 Štěpení plazmidu pTW5sec\_S4B6

Plazmid pTW5sec\_S4B6 byl štěpen pomocí restrikčních endonukleas Age I a Kpn I. Plazmid pTW5sec\_S4B6 byl poskytnut Dr. Ondřejem Skořepou, avšak mimo štěpení s touto prací nesouvisí. Pro potvrzení linearizace plazmidu byla provedena agarosová elektroforéza (obr. 4). Byl vyštěpen fragment odpovídající 1200 – 1500 bp, což odpovídá genu pro S4B6. Pro kontrolu byl do poslední dráhy elektroforézy přidán neštěpený plazmid pTW5sec\_S4B6.



**Obrázek 4: Linearizace plazmidu pTW5sec\_S4B6.** Agarosová elektroforéza, v první pozici zleva se nachází 1 kb standard, v druhé 100 bp standard. Ve třetí a čtvrté jamce je štěpený plazmid pTW5sec\_S4B6 (\*pTW5sec). Vyjmutý fragment (gen S4B6) má velikost 1200 – 1500 bp. V poslední dráze je pro kontrolu výchozí neštěpený plazmid pTW5sec\_S4B6 (k\_pTW5sec).

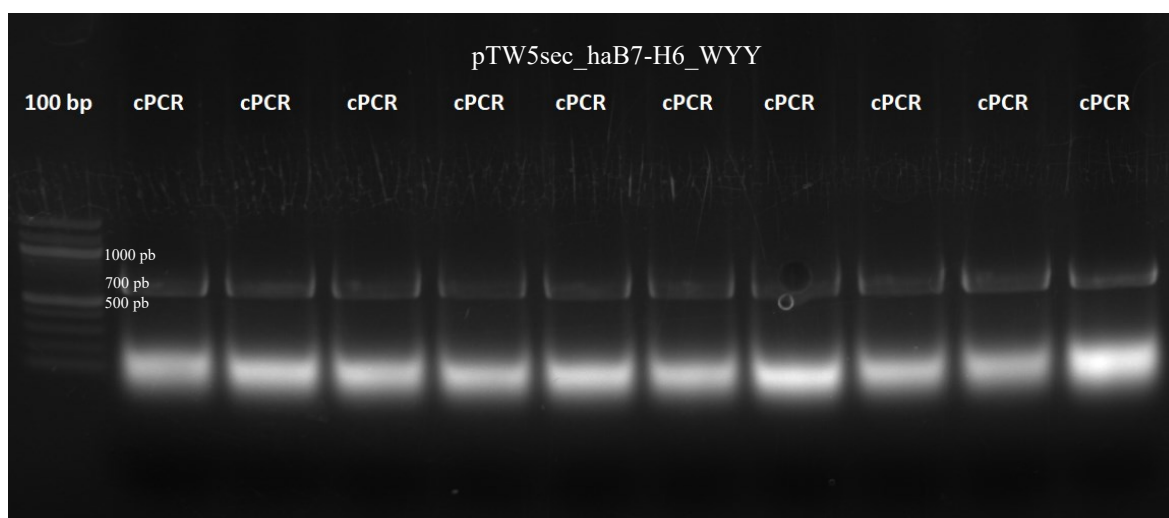
Po kontrole agarosovou elektroforézou byla provedena extrakce z gelu. Výsledná koncentrace štěpeného plazmidu \*pTW5sec byla 72 ng/μl.

### 5.2.2 Klonování nezávislé na ligase

Pro všech pět variant haB7-H6 byly objednány syntetické geny. Ty měly přesahy 15 bp od restrikčních míst ve vektoru, aby mohly být použity pro klonování nezávislé na ligase. Objednané syntetické geny byly dodány ve vysušené formě a byly rozpuštěny na koncentraci 100 ng/μl.

Syntetické geny sloužily jako vstupní materiál do LFC reakce (viz kap. 4.3). Avšak zaklonovat se touto metodou se podařilo pouze čtyři z pěti genů. Z toho důvodu byl gen IWY do plazmidu vložen klasickým klonováním pomocí T4 DNA ligasy (viz kapitola 5.2.3).

Po provedení LCF a následující transformaci bakterií *E. coli* TOP10 (viz kap. 4.4) byla celá suspence nanášena na agarovou plotnu s ampicilinem. Plazmid pTW5sec jako součást své genetické informace obsahuje také gen pro rezistenci na ampicilin. Důkazem, že byla LFC i transformace bakterií zdárně provedena, byly kolonie narostlé i v přítomnosti tohoto antibiotika. Poté byla provedena PCR z kolonií (viz kap. 4.6), abychom si ověřili, zda byl gen vložen do plazmidu. Na obrázku 5 je výsledek reprezentativní agarosové elektroforézy cPCR pTW5sec\_WYY, pro ostatní geny vypadal výsledek analogicky.



**Obrázek 5: PCR z kolonií pro konstrukt pTW5sec\_WYY.** V první jamce se nachází 100 bp standard, ve druhé až jedenácté jamce jsou produkty PCR z kolonií (cPCR) nesoucí DNA plazmidu pTW5sec\_haB7-H6\_WYY. Postup reakce viz kap. 4.6. Předpokládaný úsek měl mít velikost 699 bp, čemuž odpovídá výsledek elektroforézy.

Z pozitivních kolonií byla následně provedena nízkoobjemová izolace plazmidové DNA (viz kap. 4.6). Výsledné koncentrace jsou zobrazeny v tabulce 4, str. 40.

**Tabulka 4: Výsledné koncentrace po nízkoobjemové izolaci plazmidové DNA.**

<b>VZOREK pTW5sec_haB7- H6</b>	<b>VÝSLEDNÁ KONCENTRACE</b>
<b>YYY</b>	384 ng/μl
	460 ng/μl
<b>IYY</b>	401 ng/μl
<b>WYY</b>	342 ng/μl
	449 ng/μl
<b>WWY</b>	427 ng/μl
	402 ng/μl

Následně byly vzorky připraveny na sekvenaci DNA (viz kap. 4.7). Správnost sekvence byla potvrzena porovnáním se známou nukleotidovou sekvencí plazmidu pTW5sec\_haB7-H6. Následovaná velkoobjemová přípravou plazmidové DNA. Výsledné koncentrace plazmidu po velkoobjemové přípravě plazmidu jsou uvedeny v tabulce 6.

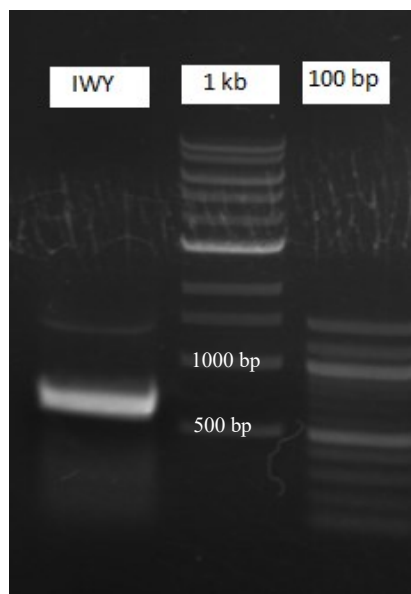
**Tabulka 6: Výsledné koncentrace po velkoobjemové izolaci plazmidové DNA.**

<b>VZOREK pTW5sec_haB7- H6</b>	<b>VÝSLEDNÁ KONCENTRACE</b>
<b>YYY</b>	2582 ng/μl
<b>IYY</b>	1250 ng/μl
<b>WYY</b>	2759 ng/μl
<b>WWY</b>	1624 ng/μl

### 5.2.3 Ligace T4 DNA ligasou

Vzhledem k omezenému množství syntetického genu pro haB7-H6\_IWY, byl tento gen nejprve amplifikován PCR (obr. 6, str. 41). Produkt byl následně štěpen restričními endonukleasami Age I a Kpn I (viz kap. 4.1).





**Obrázek 6: PCR amplifikace genu haB7-H6\_IWY.** Agarosová elektroforéza, zleva v první jamce PCR produkt amplifikace insertu haB7-H6\_IWY, následuje 1 kb a 100 bp DNA standard. Předpokládaná velikost produktu měla být 699 bp, čemuž odpovídá nejsilnější pruh v analyzovaném vzorku.

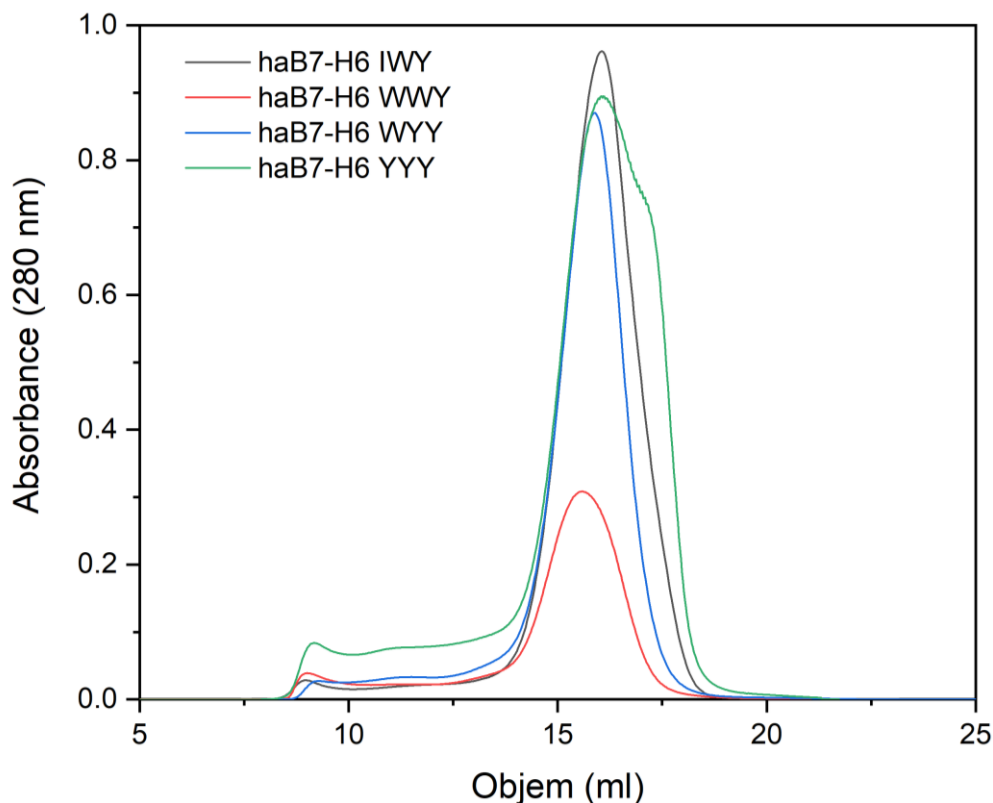
Dále byla provedena extrakce z gelu. Následovala ligace štěpeného plazmidu pTW5sec a štěpeného insertu haB7-H6\_IWY pomocí T4 DNA ligasy (viz kap. 4.4), transformace, PCR z kolonií, extrakce DNA, sekvenace a velkoobjemová extrakce DNA analogicky jako tomu bylo u klonování nezávislého na ligase. Výsledná koncentrace velkoobjemové extrakce DNA haB7-H6\_IWY byla 3 536 ng/μl.

### 5.3 Produkce a purifikace proteinu haB7-H6

Pro produkci konstruktů haB7-H6 byla zvolena tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T. Bylo transfekováno 400 ml buněčné kultury (viz kap. 4.11) a po sedmidenní inkubaci byly buňky sklizeny (viz kap. 4.12).

Následně byla provedena chelatační afinitní chromatografie na koloně INDIGO-Ni s pomocí HPLC systému ÄKTA basic. Eluát byl zkoncentrován na 150-200 μl a nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL pro gelovou permeační chromatografii (viz kap. 4.15). Chromatogramy jsou uvedeny na obrázku 7, str. 42.

Od každého proteinu byly sbírány frakce po 1 ml, avšak byly ponechány pouze 4 frakce o nejvyšší koncentraci. Výsledné koncentrace proteinů byly spektrofotometricky změřeny a jsou uvedeny v tabulce 7, str. 42.



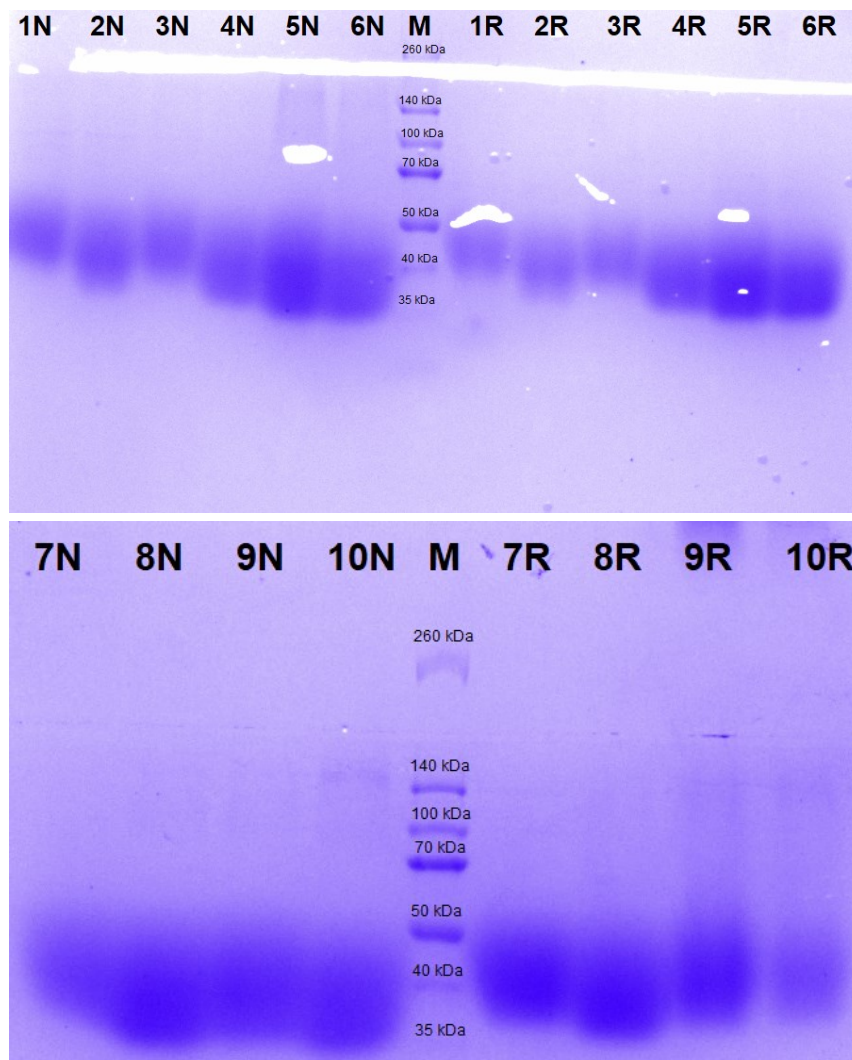
**Obrázek 7: Průběh gelové permeační chromatografie konstruktů haB7-H6.** Kolona Superdex 200 10/300 GL. Na chromatogramu jsou zobrazeny čtyři konstrukty haB7-H6 z pěti. Eluční objemy jednotlivých konstruktů: černě IWY = 16,05 ml; červeně WWY = 15,57 ml; modře WYY = 15,89 ml; zeleně YYY = 16,11 ml. U posledního konstruktů IYY nedošlo k uložení v programu, přestože byl rovněž purifikován; chromatogram měl však obdobný průběh. Avšak koncentrace všech pěti jsou znázorněny v tabulce 7 níže.

**Tabulka 7: Koncentrace frakcí pro jednotlivé konstrukty haB7-H6.** Zvýrazněné frakce byly použity pro analýzu SDS-PAGE.

WWY	WYY	IYY	YYY	IWY
<b>0,23 mg/ml</b>	0,45 mg/ml	1,30 mg/ml	2,06 mg/ml	0,67 mg/ml
<b>0,84 mg/ml</b>	<b>1,94 mg/ml</b>	<b>3,85 mg/ml</b>	<b>3,36 mg/ml</b>	<b>2,74 mg/ml</b>
<b>0,88 mg/ml</b>	<b>2,61 mg/ml</b>	<b>5,07 mg/ml</b>	<b>2,94 mg/ml</b>	<b>3,24 mg/ml</b>
<b>0,22 mg/ml</b>	0,71 mg/ml	1,32 mg/ml	0,67 mg/ml	1,02 mg/ml

Celkový výtěžek na litr média činil pro haB7-H6\_WWY: 5,4 mg; haB7-H6\_WYY: 14,3 mg; haB7-H6\_IYY: 28,9 mg; haB7-H6\_YYY: 22,6 mg; haB7-H6\_IWY: 19,2 mg.

Dvě frakce s nejvyšší koncentrací byly následně použity pro vizualizaci pomocí SDS-PAGE (obr. 8). Předpokládaná velikost proteinů predikovaná z aminokyselinové sekvence odpovídá 26,5 kDa, pozorovaná velikost je ovšem vyšší díky přítomnosti šesti řetězců *N*-vázané glykosylace komplexního typu.

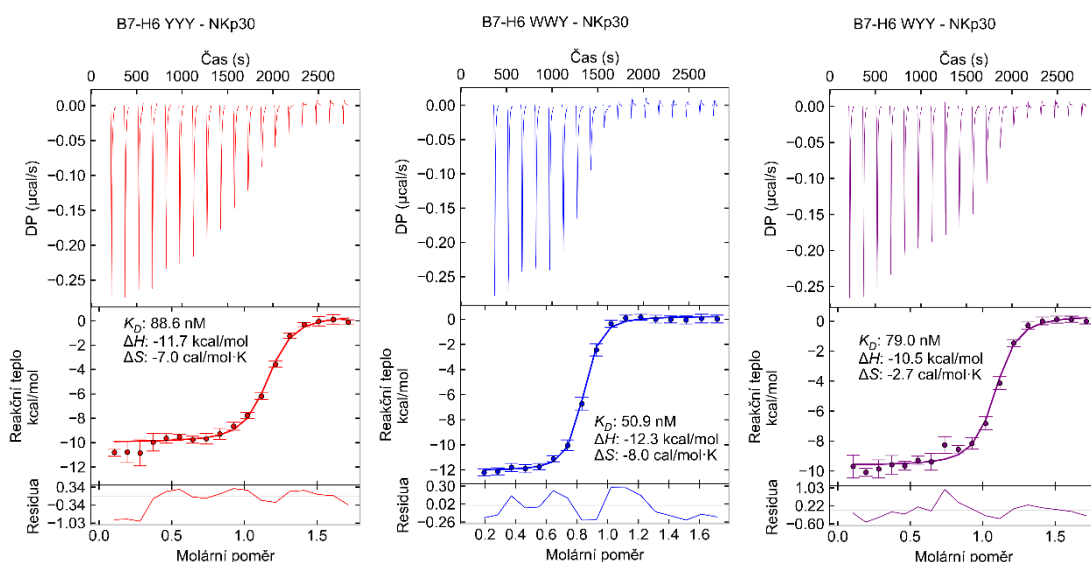


**Obrázek 8: SDS-PAGE konstruktů haB7-H6 po gelové permeační chromatografii.**

N – neredukující prostředí, R – redukující prostředí, M – standard molekulových hmotností. Dráhy 1 a 2: haB7-H6\_WWY, 3 a 4: haB7-H6\_WYY, 5 a 6: haB7-H6\_YYY, 7 a 8: haB7-H6\_IWY, 9 a 10: haB7-H6\_IYY. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinů je 26,5 kDa, pozorovaná velikost je ovšem vyšší díky přítomnosti šesti řetězců *N*-vázané glykosylace komplexního typu.

## 5.4 Izotermální titrační kalorimetrie

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC, z angl. isothermal titration calorimetry) byla měřena v Centru molekulární struktury ve výzkumném ústavu BIOCEV ve spolupráci s Dr. Tatsianou Charnavets. Pro měření termodynamických parametrů touto metodou byly použity tři varianty vysokoafinitního B7-H6 (YYY, WWY a WYY) a jako ligand rozpustná ektodoména NKp30 (L19-E128) produkovaná v linii HEK293T, kterou pro měření poskytl Dr. Ondřej Skořepa (obr. 9).



**Obrázek 9: Izotermální titrační kalorimetrie interakce NKp30 s haB7-H6\_YYY, WWY a WYY.** Na obrázku jsou zobrazeny termogramy haB7-H6\_YYY (červeně), WWY (modře) a WYY (fialově). Základní hodnota tzv. „baseline“ byla stanovena pomocí programu NITPIC, data reakčního tepla vynesena v závislosti na molárním poměru NKp30 a B7-H6 v programu SEDPHAT, kde byla fitována na binární interakci  $A+B \Rightarrow AB$ . Obrázky byly vytvořeny v programu GUSSI. Hodnoty disociačních konstant  $K_D$  jsou pro haB7-H6\_YYY: 88,6 nM; haB7-H6\_WWY: 50,9 nM; haB7-H6\_WYY: 79 nM.

Výsledkem byly především změřené disociační konstanty  $K_D$ , jejichž hodnoty jsou pro haB7-H6\_WYY: 79 nM; haB7-H6\_YYY: 88,6 nM; haB7-H6\_WWY: 50,9 nM.

## 6 DISKUZE

Podstatnou částí této práce byla příprava dostatečného množství pěti variant vysokoafinitního proteinu B7-H6. Konstrukty s vysokou afinitou k NKp30 byly analyzovány z toho důvodu, aby bylo možné posoudit, zda dříve popsané mutace skutečně zvyšují afinitu B7-H6 vůči NKp30. Podařilo se zaklonovat všech pět vybraných vysokoafinitních mutantů B7-H6 do plazmidu pTW5sec, který je uzpůsobený pro tranzientní rekombinantní expresi v savčích buněčných liniích. Plazmid pTW5sec\_haB7-H6\_IWY bylo potřeba připravit ligací, na rozdíl od ostatních čtyř plazmidů, které se podařilo zaklonovat nezávisle na ligase. Na vině byl pravděpodobně špatně syntetizovaný gen (ze sekvenace falešně pozitivních kolonií bylo zřejmé, že obsahuje zkrácenou část, která by v proteinu odpovídala C-koncové histidinové kotvě), což se podařilo vyřešit amplifikací PCR za použití primeru, který nasedal ještě před problematickou sekvencí, kterou během PCR opravil. Tři z pěti navržených konstruktů vychází z publikace Pekar L. *et al.* (2021). Jedná se o mutanty haB7-H6\_IWY, IYY, WYY. Další dvě varianty byly navrženy zcela nově tak, aby logicky doplnily chybějící varianty na stejných místech v sekvenci, tedy haB7-H6\_YYY a WWY.

Produkce probíhala v 400 ml média. Celkový výtěžek přepočtený na litr média jednotlivých proteinů byl pro haB7-H6\_WWY: 5,4 mg; haB7-H6\_WYY: 14,3 mg; haB7-H6\_IYY: 28,9 mg; haB7-H6\_YYY: 22,6 mg; haB7-H6\_IWY: 19,2 mg. Ve srovnání s publikovanou hodnotou nativního B7-H6 (C212S), která byla až 50 mg/l ve stejném produkčním systému<sup>26</sup>, jsou tyto hodnoty poměrně nižší, ovšem stále dostatečné pro veškeré další experimenty, včetně ITC, která má vysoké nároky na množství vzorku.

V publikaci Pekar L. *et al.* (2021) má nejvyšší afinitu vůči NKp30 B7-H6 s mutacemi S60Y, F82W, L129Y (YWY) a to 9,06 nM. Tato varianta byla v naší laboratoři již dříve rovněž připravena a analyzována pomocí ITC a výsledkem byla naměřená hodnota 115 nM, jež byla i publikována (Kalousková B. *et al.* (2021))<sup>55</sup>. Tento konstrukt jsme tedy již znovu neměřili, avšak pro porovnání s jinými mutanty je vhodný. Parametry disociační konstanty  $K_D$  naměřené pro vysokoafinitní varianty B7-H6 interagující s NKp30 v naší ITC analýze byly pro haB7-H6\_WYY: 79 nM; haB7-H6\_YYY: 88,6 nM; haB7-H6\_WWY: 50,9 nM. Dosud tedy byly měřeny tři varianty z pěti a další budou následovat. Zajímavé je, že v publikaci Pekar L. *et al.* (2021) je afinita konstruktů WYY (65,2 nM) podobná námi změřené (79 nM), zatímco u nejslibnější varianty YWY byl v měřených afinitách významný rozdíl (9,06 nM vs. 115 nM). To mohlo být pravděpodobně způsobeno tím, že ve studii Pekar L. *et al.* (2021) používali proteinový konstrukt, který obsahoval pouze afinitně maturovanou

N-koncovou IgV doménu B7-H6, jež byla připojena namísto jednoho Fab fragmentu na terapeutickou protilátku. Ostatní domény takového proteinu tedy mohou alterovat interakci s NKp30, zároveň je celý konstrukt dimerní, což může vést k zesílení vazby, a to zvláště s ohledem na jimi použitou metodu stanovení afinity interakce. Tou byla ve zmíněné publikaci interferometrie na biologických vrstvách (tzv. „biolayer interferometry“, BLI), která využívá NKp30 vázané k povrchu sondy, čímž je méně vhodná kvůli potenciální oligomerizaci NKp30, a tedy měření aviditního příspěvku oligomeru k vazbě ligandu. Naproti tomu ITC jakožto metoda měřící interakci molekul obou proteinů ve volném stavu přímo v roztoku může poskytnout nezkreslená data o skutečné vzájemné afinitě a jejích změnách způsobených vnesenými mutacemi. Z tohoto hlediska se zatím jeví jako nejlepší varianta pro další experimenty na NK buňkách námi navržená a dosud nepublikovaná varianta haB7-H6\_WWY, ovšem až poté, co budou pomocí ITC doměřeny zbývající dvě varianty, a stávající výsledky budou také validovány opakováním měření či i jinou vhodnou biofyzikální metodou, například analytickou ultracentrifugací či termoforézou.

## 7 ZÁVĚR

Byly připraveny plazmidy pTW5sec\_haB7-H6 pro expresi pěti různých variant proteinu B7-H6 s mutacemi pro zvýšenou afinitu vůči receptoru NKp30. Všech pět mutovaných forem proteinu B7-H6 bylo exprimováno v lidské buněčné linii HEK293T. Po transientní transfekci byla provedena purifikace mutovaných forem B7-H6 pomocí afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie. Bylo získáno dostatečné množství proteinů (výtěžky v rozmezí 10 – 20 mg na litr produkční kultury) pro další experimenty včetně izotermální titrační kalorimetrie, která má vysokou spotřebu analyzovaných proteinů. S pomocí izotermální titrační kalorimetrie byla změřena afinita pro zatím tři z pěti vysokoafinitních konstruktů a potvrdila přibližně desetkrát vyšší afinitu haB7-H6 k NKp30 vůči nemutované formě B7-H6.

## 8 SEZNAM LITERATURY

1. Hořejší V. a kol. *Základy Imunologie*. 6. vydání. Triton, 2017.
2. Husband AJ. The immune system and integrated homeostasis. *Immunology and Cell Biology*. 1995;73(4):377-382. doi:10.1038/ICB.1995.58
3. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018;14(2). doi:10.1186/S13223-018-0278-1
4. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(1):24-37. doi:10.1038/nrc1782
5. Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Seminars in Cancer Biology*. 2007;17(4):275-287. doi:10.1016/j.semcancer.2007.06.009
6. Moretta L, Pietra G, Vacca P, et al. Human NK cells: From surface receptors to clinical applications. *Immunology Letters*. 2016;178:15-19. doi:10.1016/j.imlet.2016.05.007
7. Huntington ND, Vosshenrich CAJ, di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(9):703-714. doi:10.1038/nri2154
8. Rezvani K, Rouce RH. The application of natural killer cell immunotherapy for the treatment of cancer. *Frontiers in Immunology*. 2015; 6:578. doi:10.3389/fimmu.2015.00578
9. Shi FD, Ljunggren HG, la Cava A, van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(10):658-671. doi:10.1038/nri3065
10. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*. 2001;19:197-223. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.197



11. Knorr DA, Bachanova V, Verneris MR, Miller JS. Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Seminars in Immunology*. 2014;26(2):161-172. doi:10.1016/j.smim.2014.02.002
12. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:217-251. doi:10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942
13. Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(9):5199-5204. doi:10.1073/PNAS.95.9.5199
14. Braud VM, Allan DSJ, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391(6669):795-799. doi:10.1038/35869
15. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *Journal of Experimental Medicine*. 1998;187(5):813-818. doi:10.1084/JEM.187.5.813
16. Rowe M, Khanna R, Jacob CA, et al. Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *European Journal of Immunology*. 1995;25(5):1374-1384. doi:10.1002/eji.1830250536
17. Valiante NM, Lienert K, Shilling HG, Smits BJ, Parham P. Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution. *Immunological Reviews*. 1997;155:155-164. doi:10.1111/J.1600-065X.1997.TB00948.X
18. Lanier LL. NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*. 2005;23:225-274. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526

19. Pekar L, Klausz K, Busch M, et al. Affinity Maturation of B7-H6 Translates into Enhanced NK Cell–Mediated Tumor Cell Lysis and Improved Proinflammatory Cytokine Release of Bispecific Immunoligands via NKp30 Engagement. *Journal of Immunology*. 2021;206(1):225-236. doi:10.4049/jimmunol.2001004
20. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 2011;132(3):315-325. doi:10.1111/J.1365-2567.2010.03398.X
21. Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural cytotoxicity receptors: Broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:69. doi:10.3389/fimmu.2013.00069
22. Pende D, Parolini S, Pessino A, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1999;190(10):1505-1516. doi:10.1084/jem.190.10.1505
23. Kaifu T, Escalière B, Gastinel LN, Vivier E, Baratin M. B7-H6/NKp30 interaction: A mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011;68(21):3531-3539. doi:10.1007/s00018-011-0802-7
24. Joyce MG, Paul T, Zhuravleva MA, Jaw J, Colonna M, Sun PD. Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor NKp30 and identification of its ligand binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(15):6223-6228. doi:10.1073/PNAS.1100622108
25. Li Y, Wang Q, Mariuzza RA. Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(4):703-714. doi:10.1084/jem.20102548
26. Skořepa O, Pazický S, Kalousková B, et al. Natural Killer Cell Activation Receptor NKp30 Oligomerization Depends on Its N-Glycosylation. *Cancers*. 2020;12(7):1-24. doi:10.3390/CANCERS12071998

27. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, et al. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature Medicine*. 2011;17(6):700-707. doi:10.1038/NM.2366
28. Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology & Cell Biology*. 2014;92(3):221-229. doi:10.1038/ICB.2013.98
29. Hershkovitz O, Jarahian M, Zilka A, et al. Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology*. 2008;18(1):28-41. doi:10.1093/glycob/cwm125
30. Mavoungou E, Held J, Mewono L, Kreamsner PG. A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(10):1521-1531. doi:10.1086/515579
31. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(7):1495-1503. doi:10.1084/jem.20090681
32. Wang W, Guo H, Geng J, et al. Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(48):33311-33319. doi:10.1074/JBC.M114.603464
33. Li Y, Wang Q, Mariuzza RA. Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(4):703-714. doi:10.1084/JEM.20102548
34. Matta J, Baratin M, Chiche L, et al. Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions. *Blood*. 2013;122(3):394-404. doi:10.1182/blood-2013-01-481705
35. Chen Y, Mo J, Jia X, He Y. The B7 Family Member B7-H6: a New Bane of Tumor. *Pathology & Oncology Research*. 2018;24(4):717-721. doi:10.1007/S12253-017-0357-5

36. Banu N, Riera-Leal A, Haramati J, et al. B7-H6, an immunoligand for the natural killer cell activating receptor NKp30, reveals inhibitory effects on cell proliferation and migration, but not apoptosis, in cervical cancer derived-cell lines. *BMC Cancer*. 2020;20(1). doi:10.1186/S12885-020-07608-4
37. Guo JG, Guo CC, He ZQ, Liu ZG, Wang Y, Mou YG. Clinical significance of B7-H6 protein expression in astrocytoma. *OncoTargets and Therapy*. 2016;9:3291-3297. doi:10.2147/OTT.S103771
38. Chen XJ, Shen J, Zhang GB, Chen WC. B7-H6 protein expression has no prognostic significance in human gastric carcinoma. *Pathology and Oncology Research*. 2014;20(1):203-207. doi:10.1007/s12253-013-9686-1
39. Rusakiewicz, Sylvie, Gaetane nocturne, Thierry lazure, et al. NCR3/NKp30 Contributes to Pathogenesis in Primary Sjögren's Syndrome. *Science Translational Medicine*. 2013;5(195):195. doi: 10.1126/scitranslmed.3005727.
40. Bisio F, Bozzano F, Marras F, di Biagio A, Moretta L, de Maria A. Successfully treated HIV-infected patients have differential expression of NK cell receptors (NKp46 and NKp30) according to AIDS status at presentation. *Immunology Letters*. 2013;152(1):16-24. doi:10.1016/j.imlet.2013.03.003
41. Zou Y, Chen T, Han M, et al. Increased Killing of Liver NK Cells by Fas/Fas Ligand and NKG2D/NKG2D Ligand Contributes to Hepatocyte Necrosis in Virus-Induced Liver Failure. *Journal of Immunology*. 2010;184(1):466-475. doi:10.4049/jimmunol.0900687
42. Mantovani S, Mele D, Oliviero B, Barbarini G, Varchetta S, Mondelli MU. NKp30 isoforms in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Immunology*. 2015;146(2):234-242. doi:10.1111/imm.12495
43. Semeraro M, Rusakiewicz S, Minard-Colin V, et al. Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients. *Science Translational Medicine*. 2015;7(283):283. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2327.
44. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*. 2016;14(1). doi:10.1186/S12916-016-0623-5

45. Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, Allison JP. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(11):805-812. doi:10.1038/NRC3153
46. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10. doi:10.1016/J.IMMUNI.2013.07.012
47. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-148. doi:10.1016/J.IMMUNI.2004.07.017
48. Pascal V, Schleinitz N, Brunet C, et al. Comparative analysis of NK cell subset distribution in normal and lymphoproliferative disease of granular lymphocyte conditions. *European Journal of Immunology*. 2004;34(10):2930-2940. doi:10.1002/EJI.200425146
49. Klingemann H, Boissel L, Toneguzzo F. Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Frontiers in Immunology*. 2016 Mar 14;7:91. doi:10.3389/FIMMU.2016.00091
50. Shevtsov M, Multhoff G. Immunological and Translational Aspects of NK Cell-Based Antitumor Immunotherapies. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:492. doi:10.3389/FIMMU.2016.00492
51. Keller S, Vargas C, Zhao H, Piszczek G, Brautigam CA, Schuck P. High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Analytical Chemistry*. 2012;84(11):5066-5073. doi:10.1021/AC3007522
52. Scheuermann TH, Brautigam CA. High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: new features of NITPIC. *Methods*. 2015;76:87-98. doi:10.1016/J.YMETH.2014.11.024
53. Zhao H, Piszczek G, Schuck P. SEDPHAT--a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods*. 2015;76:137-148. doi:10.1016/J.YMETH.2014.11.012

54. Brautigam CA. Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data. *Methods Enzymol.* 2015;562:109-133.  
doi:10.1016/BS.MIE.2015.05.001
55. Kalousková B, Skořepa O, Cmunt D, et al. Tumor marker b7-h6 bound to the coiled coil peptide-polymer conjugate enables targeted therapy by activating human natural killer cells. *Biomedicines.* 2021;9(11). doi:10.3390/biomedicines9111597/S1
56. Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in Immunology.* 2013;34(4):182-191. doi:10.1016/J.IT.2013.01.003