

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

Studijní program: Biochemie



**Anastassiya Rudenko**

**Rekombinantní exprese receptoru myších NK buněk  
NKR-P1C**

**Recombinant expression of the mouse NK cell receptor NKR-P1C**

Bakalářská práce

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

Konzultant: Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu

Praha, 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto 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. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne .....

.....  
Anastassiya Rudenko

## **Poděkování**

Chtěla bych zde poděkovat všem, kdo mě podporovali a pomáhali v těžkých chvílích. Zaprvé bych chtěla poděkovat vedoucímu své práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za možnost být součástí a podílet se na týmové práci v Laboratoři strukturní biochemie imunitního rozpoznávání, a také za možnost vypracovat daný projekt. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu a zároveň i Mgr. Ondřeji Skořepovi, Ph.D., za ochotu pomoc a za veškeré rady, které sdíleli v průběhu práce. Děkuji celé laboratoři 204 za přijetí, přátelské a motivující prostředí. Určitě bych chtěla poděkovat svým nejbližším za nekonečnou podporu a motivaci, které mi darovali.

## **Abstrakt**

NK buňky (z angl. Natural Killers) představují buňky stojící v první řadě obrany organismu proti různým nebezpečím, jakými jsou například viry nebo rakovinné buňky. NK buňky mají schopnost rozpoznat a zničit nežádoucí buňky několika různými způsoby, které se hodně liší od obranných mechanismů například u T- nebo B-lymfocytů. NK buňky nesou na svém povrchu širokou škálu různých aktivačních a inhibičních receptorů, pomocí kterých dokážou rozlišit zdravé buňky od škodlivých, či infikovaných buněk.

NKR-P1 (z angl. natural killer receptor-protein 1) je první objevená rodina NK buněčných receptorů podobných lektinům C-typu, do které patří jak aktivační, tak inhibiční receptory. NKR-P1C je aktivační receptor, který je schopen tvorby homodimerů na povrchu NK buněk. Hlavními ligandy NKR-P1 rodiny receptorů jsou imunoenvasiny myšího cytomegaloviru a jiné molekuly strukturně odlišné od MHC glykoproteinů I. třídy. Tato práce se zabývá rekombinantní expresí receptorového proteinu NKR-P1C. Pomocí plazmidu pUT7 byla systémem PiggyBac připravena stabilně transfekovaná linie buněk HEK293T nesoucí gen pro expresi extracelulární části NKR-P1C spojenou s Fc fragmentem IgG, které mezi sebou nesou zásahovou sekvenci pro štěpení TEV proteasou. Protein byl purifikován pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie a jeho čistota byla následně ověřena pomocí SDS elektroforézy. Po purifikaci bylo získáno 125 mg čistého proteinu.

## **Klíčová slova**

NKR-P1C, NK buňky, HEK293T

## **Abstract**

NK cells are at the forefront of the body's defense against various threats, such as viruses or cancer cells. NK cells can recognize and destroy harmful cells in several ways that are very different from the defense mechanisms of, for example, T- or B-lymphocytes. NK cells carry a wide range of activating and inhibitory receptors on their surface that distinguish healthy cells from harmful or infected cells.

NKR-P1 (natural killer receptor-protein 1) is the first discovered family of NK cell receptors similar to C-type lectins, which includes both activating and inhibitory receptors. NKR-P1C is an activating receptor capable of forming homodimers on the surface of NK cells. The major ligands of the NKR-P1 receptor family are the immunoenvasins of murine cytomegalovirus and other molecules structurally distinct from MHC class I glycoproteins. This work focuses on the recombinant expression of the NKR-P1C receptor protein. Using the pUT7 plasmid, we prepared a stably transfected HEK293T cell line carrying the gene for expression of the extracellular domain of NKR-P1C fused to the Fc fragment of IgG using the PiggyBac system, and between them, they carry the TEV protease cleavage site. The protein was purified by affinity and gel permeation chromatography, and its purity was subsequently verified by SDS electrophoresis. After purification, 125 mg of pure protein was obtained.

## **Key words**

NKR-P1C, NK cells, HEK293T

# Obsah

1	Úvod.....	11
1.1	Imunitní systém a jeho buňky.....	11
1.2	Přirození zabíječi.....	12
1.3	Mechanismy NK buněčného rozpoznání.....	15
1.4	Mechanismy NK cytotoxické obrány.....	17
1.5	Receptory NK buněk.....	18
1.5.1	Aktivační receptory.....	19
1.5.2	Inhibiční receptory.....	20
1.6	NKR-P1 rodina receptorů.....	21
2	Cíle práce.....	24
3	Materiály.....	25
3.1	Pomůcky a přístroje.....	25
3.2	Rotory.....	26
3.3	Chemikálie.....	26
3.4	Enzymy a příslušné pufry.....	27
3.5	Bakteriální kmeny a buněčné linie.....	27
3.6	Plazmidy a vektory.....	27
3.7	Roztoky, pufry, média.....	27
3.7.1	Roztoky a média.....	27
3.7.2	Pufry.....	28
3.8	Soupravy pro izolace DNA.....	28
3.9	Oligonukleotidy.....	28
4	Metody.....	29
4.1	Příprava rekombinantního konstruktů.....	29
4.1.1	Restrikční štěpení.....	29
4.1.2	Polymerázová řetězová reakce.....	29
4.1.3	Elektroforéza v agarosovém gelu.....	30
4.1.4	Izolace DNA z agarosového gelu.....	30
4.1.5	Měření koncentrace plazmidové DNA.....	31
4.1.6	Klonování nezávislé na sekvenci a ligaci.....	31
4.1.7	Transformace bakterií plazmidovou DNA.....	31
4.1.8	PCR z kolonií.....	31

4.1.9	Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA .....	32
4.1.10	Sekvenace DNA .....	33
4.1.11	Velkoobjemová izolace plazmidové DNA.....	33
4.2	Produkce proteinů ve stabilně transfekované linii HEK293T .....	34
4.2.1	Kultivace buněk .....	34
4.2.2	Transfekce buněk a tvorba stabilní linie .....	34
4.2.3	Selekce stabilních buněčných linií .....	35
4.2.4	Sklizení proteinů .....	35
4.3	Purifikace receptorového proteinu NKR-P1C.....	35
4.3.1	Afinitní chromatografie využívající protein A.....	35
4.3.2	Koncentrování proteinů.....	36
4.3.3	Gelová permeační chromatografie .....	36
4.3.4	Stanovení koncentrace proteinů .....	36
4.3.5	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS .....	36
5	Výsledky .....	38
5.1	Příprava expresního vektoru myšního receptoru NKR-P1C .....	38
5.1.1	Příprava inzertů DNA a linearizace plazmidu.....	38
5.1.2	PCR z kolonií a nízkoobjemová izolace plazmidové DNA .....	40
5.1.3	Vysokoobjemová izolace plazmidové DNA.....	41
5.2	Produkce proteinu ve stabilně transfekované buněčné linii HEK293T.....	41
6	Diskuse.....	44
7	Závěr .....	46
8	Použitá literatura .....	47

## Seznam použitých zkratek

ADCC	Buněčná cytotoxicita závislá na protilátce (z angl. antibody-dependent cell cytotoxicity)
CD	Diferenční skupina (z angl. cluster of differentiation)
CIML	Paměťovým podobné buňky indukované cytokiny (z angl. cytokine-induced memory-like)
CLR	Receptor z rodiny lektinů C-typu (z angl. C-type lectin receptor)
cNK	Konvenční NK buňky
CTL	Cytotoxický T-lymfocyt (z angl. cytotoxic T-lymphocyte)
CTLD	C-lektinům podobná doména (CTLD, z angl. C-type lectin-like domain)
CTLR	Receptory podobné lektinům C-typu (z angl. C-type lectin-like receptor)
DAP	Protein asociovaný se smrtí (z angl. death-associated protein)
Fas	Receptor z rodiny receptorů smrti
FasL	Ligand receptoru Fas
Fc	Konstantní fragment protilátky (z angl. fragment crystallizable region)
FcεRIγ	Vysokoafinitní receptor pro IgE (z angl. Fc epsilon receptor type I gamma chain)
HEK293	Buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (z angl. human embryonic kidney 293 cell line)
HLA	Lidský leukocytární antigen (z angl. human leukocyte antigen)
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulin
IL	interleukin
ILC	Vrozené lymfoidní buňky (z angl. innate lymphoid cells)
ITAM	Imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrosinu (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activating motif)
ITIM	Imunoreceptorový inhibiční motiv na bázi tyrosinu (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)



ITSM	Imunoreceptorový přepínací motiv na bázi tyrosinu (z angl. immunoreceptor tyrosine-based switch motif)
KIR	Imunoglobulinový receptor zabíječských buněk (z angl. killer immunoglobulin-like receptor)
LIR	Receptor lymfocytu podobný imunoglobulinu (z angl. leukocyte immunoglobulin-like receptor)
MCMV	Myší cytomegalovirus (z angl. murine cytomegalovirus)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
MICA/B	Stresem indukovaný antigen příbuzný s polypeptidovou sekvencí MHC-I (z angl. MHC class I polypeptide-related sequence A/B)
NCR	Receptory přirozené cytotoxicity (z angl. natural cytotoxicity receptors)
NK	Přirozený zabíječ (z angl. natural killer)
NKC	Genový komplex přirozených zabíječů (z angl. natural killer gene complex)
NKG2	Skupina 2 receptorů přirozených zabíječů (z angl. natural killer group 2)
NKR-P1	Receptorový protein přirozených zabíječů 1 (z angl. natural killer receptor – protein 1)
NKT	Přirozeně zabíječské T lymfocyty (z angl. natural killer T cells)
Oc1	Lektin inhibující formaci osteoklastů (z angl. osteoclast inhibitory lectin)
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (z angl. phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PLC	Fosfolipáza C (z angl. phospholipase C)
SDS	Dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulphate)
SH2	Src-homologní doména (z angl. Src-homology domain)
SHP	Protein tyrosin fostatasa obsahující SH2 doménu (z angl. SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase)
SLIC	Klonování nezávislé na sekvenci na ligaci (z angl. sequence and ligation independent cloning)
TEV	Virus tabákové mozaiky (z angl. tobacco etch virus)

TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor $\beta$ (z angl. transforming growth factor $\beta$ )
Th-1	T-pomocný lymfocyt (z angl. T-helper-1)
TNF	Faktor nádorové nekrózy (z angl. tumour necrosis factor)
TRAIL	Ligand indukující apoptózu, člen rodiny receptorů TNF (z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand)
trNK	Tkáňové specifické přirozeně zabíječské buňky (z angl. tissue-resident natural killers)
ULBP	UL-16 vazebný protein (z angl. UL-16 binding protein)

# 1 Úvod

## 1.1 Imunitní systém a jeho buňky

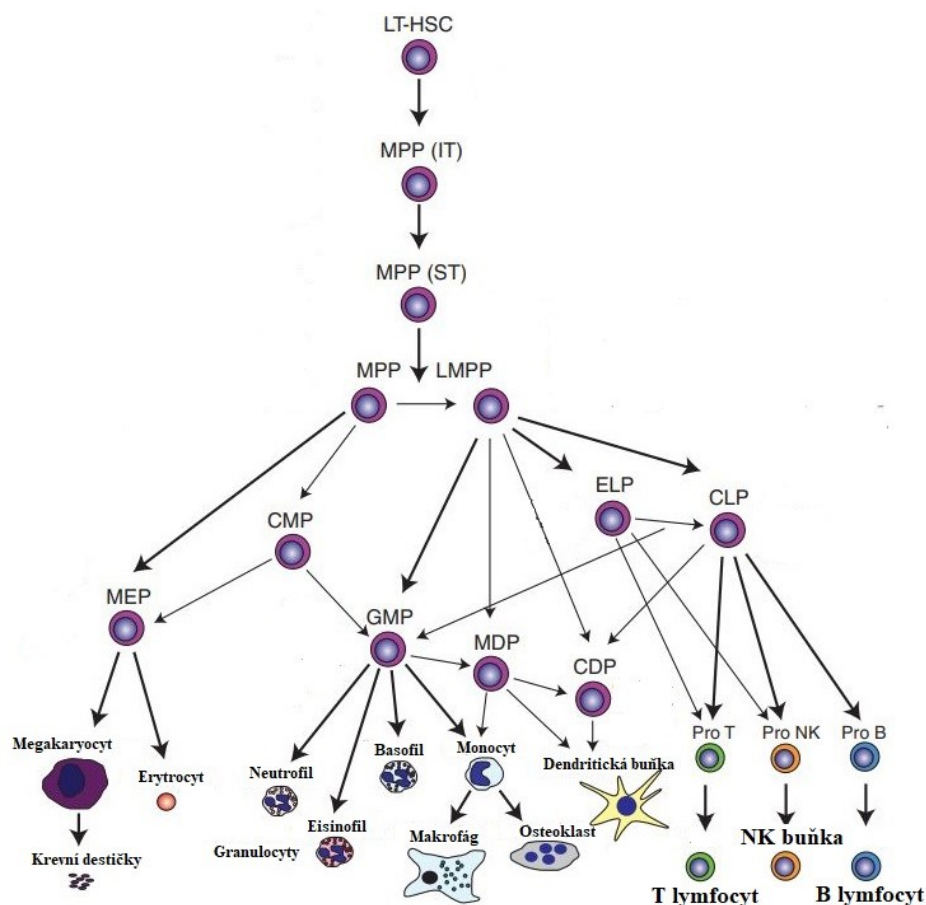
Imunitní systém je jedním ze základních mechanismů, které udržují homeostázu lidského organismu a integritu živého systému [1,2]. Jeho hlavními funkcemi jsou schopnosti obrany proti vnějším škodlivinám – bakteriím a virům, rozpoznávání vlastních somatických buněk (autotolerance) a odbourávání starých a mutovaných buněk [1].

Imunitní systém se skládá ze dvou částí podle toho, jak rychle a jaké typy buněk reagují na podnět: z imunity vrozené a adaptivní [3]. Vrozená imunita je evolučně starší, a její reakce na podnět zprostředkovávají molekuly a buňky již přítomné v organismu bez potřeby další proliferace. V důsledku toho je odpověď vrozené imunity rychlá – k reakci zpravidla dochází v řádu minut. Buněčnou složku vrozené imunity představují především buňky schopné fagocytózy a cytotoxické buňky; humorální složku pak komplementový systém, interferony, lektiny a jiné molekuly [1].

Adaptivní neboli antigenně specifická imunita je založena na odpovědi organismu na podnět za pomoci molekul s vysokou specifitou – protilátek, které reagují pouze na charakteristický antigen. Má však i buněčnou složku, kterou představují T- a B-lymfocyty. I když je odpověď adaptivní imunity pomalejší ve srovnání se vrozenou, obranné mechanismy adaptivní imunity jsou více specifické ve výběru mezi buňkami nebo látkami těla vlastními oproti cizím. Vrozené mohou totiž poškodit zdravé lidské buňky, k čemuž – až na několik výjimek – nedochází u adaptivního systému. Adaptivní imunita má také schopnost zvykat si na opakující se setkání s daným antigenem. Je schopna učení, což vede k formování tzv. imunologické paměti [1,3]. Mezi vrozeným a adaptivním systémem probíhá neustálá komunikace, která zajišťuje efektivní spolupráci obou systémů [1].

Buňky imunitního systému se souhrnně nazývají imunocyty, které představují bílé krvinky neboli leukocyty. Všechny typy leukocytů vychází z pluripotentních kmenových buněk kostní dřeně, které jsou zde po celou dobu života přítomné v malém množství [1,2]. Z nich vznikají dvě hlavní linie, ze kterých se pak odvíjejí ostatní typy buněk: myeloidní a lymfoidní. Myeloidní linie vede k diferenciaci na monocyty, dendritické buňky, makrofágy, granulocyty (tj. neutrofily, eozinofily, bazofily) a zároveň z ní vznikají prekurzory erytrocytů a trombocytů. Lymfoidní linie pak vede k diferenciaci na ostatní typy buněk imunitního systému, a to na buňky přirozených zabíječů (NK, z angl. natural killer cells) patřící do rodiny ILC (ILC, z angl. innate lymphoid cells) a prekurzory B- i T-lymfocytů (obrázek 1, str. 12). Po stimulaci a genové přestavbě z tzv. naivních T a B lymfocytů (pre-T a pre-B) pak vznikají různé druhy plně funkčních lymfocytů, např. cytotoxické T-lymfocyty

(CTL, z angl. cytotoxic T-lymphocytes), které jsou svými funkcemi komplementární NK buňkám [1].



**Obrázek 1: Vývojové linie různých typů lymfocytů vycházejících z kmenových buněk.** Prostřednictvím hematopoézy vycházející z hematopoetické kmenové buňky (LT-HSC, z angl. long-termed hematopoetic stem cell) vznikají dva důležité progenitory pro myeloidní a lymfoidní typy buněk. Ze společného lymfoidního progenitoru (CLP, z angl. common lymphoid progenitor) vznikají NK buňky a T- a B-lymfocyty, ze společného myeloidního progenitoru vznikají ostatní důležité buňky organismu. Převzato a upraveno z [4].

## 1.2 Přirození zabíječi

NK buňky jsou velké granulární lymfocyty a jsou jednou z hlavních komponent vrozeného imunitního systému. Vykazují cytotoxické funkce jednak proti viry nebo bakteriemi infikovaným buňkám, jednak proti stresovaným buňkám, například rakovinným [1,5]. Byly popsány již v 70. letech minulého století [6]. V poslední době se také zjistilo, že existují i dlouhodobě žijící NK buňky se schopností imunologické paměti antigenně specifického rozpoznávání, což naznačuje, že tento typ buněk se uplatňuje i na regulaci

homeostázy organismu tak, že ovlivňuje adaptivní imunitní systém [7–9]. Jako příklad mohou sloužit NKG2C<sup>+</sup> NK buňky, k jejichž aktivní produkci dochází u osob nakažených lidským cytomegalovirem (HCMV, z angl. human cytomegalovirus). Takové buňky se potom nazývají CIML (paměťovým podobné buňky indukované cytokiny, z angl. cytokine-induced memory-like) NK buňky [10]. Studie prováděné na myších také ukazují, že NK buňky mohou zabíjet i jiné typy aktivovaných buněk imunitního systému hostitele, v důsledku čeho mohou zabránit nadměrné imunitní odpovědi [7].

Díky jejich značně rychlé odpovědi na nádorové bujení v jeho počátečním stádiu se zvyšuje zájem o studium NK buněk. Toto pozorování vedlo vědce k myšlence, že by se nádorová terapie mohla provádět převážně pomocí endogenní imunitní odpovědi založené na NK buňkách [11,12].

Zastoupení NK buněk v lymfoidních orgánech je největší v periferní krvi (10 – 20 % celkového počtu lymfocytů) a slinivce břišní (15 % celkového počtu lymfocytů). NK buňky zastoupené v krvi a slinivce se nazývají konvenční [5,13,14]. V nelymfoidních orgánech je potom větší zastoupení jiného typu NK buněk, a to tkáňově specifických trNK (z angl. tissue-resident NK) lymfocytů. Největší zastoupení NK buněk je v játrech (30 – 40 % celkového počtu lymfocytů) a placentě (50 – 80 % celkového počtu lymfocytů), ale najdeme je také v kůži a v ledvinách [5,14–16].

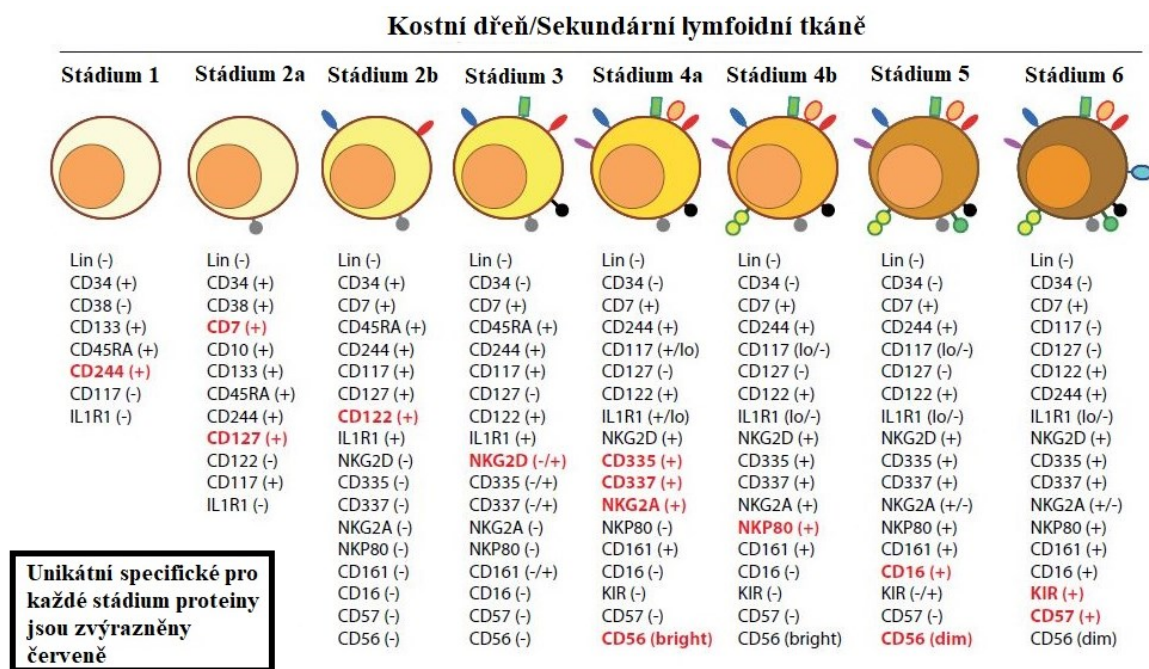
NK buňky se donedávna řadily do rodiny ILC1 buněk kvůli své schopnosti produkovat interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Dle novějších dat jsou takové NK buňky zařazeny do skupiny konvenčních cNK buněk. Hlavní rozdíl cNK a ILC1 je ve mnohem silnější cytotoxické aktivitě, kterou vykazují cNK [14]. cNK jsou zároveň funkčně a morfologicky komplementární cytotoxickým T-lymfocytům, které mají shodné mechanismy obrany organismu a sdílejí mnoho společných morfologických znaků [17].

Díky své schopnosti reagovat na cytokiny a produkovat je, jsou NK buňky schopny aktivovat i jiné komponenty adaptivního imunitního systému, především T-lymfocyty [7,11,18]. NK buňky vystavené působení interleukinů IL-2 nebo IL-12 začnou produkovat cytokiny jako IFN- $\gamma$  nebo faktor nádorové nekrózy  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , z angl. tumour necrosis factor- $\alpha$ ), a tím aktivují diferenciaci a proliferaci T-lymfocytů na Th1 pomocné lymfocyty (z angl. T-helper-1) [7,11,17]. IFN- $\gamma$  vyvolá aktivaci dendritických buněk, které začnou produkovat ještě více IL-12 do prostředí, čímž indukují CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty [17]. IL-18 má schopnost vyvolávat proliferaci NK buněk na speciální typ, který exprimuje CD83, CCR7 a CD25 a má lepší migrační schopnosti v lymfatických uzlinách. Tyto NK buňky lépe napomáhají dendritickým buňkám v produkci IL-12, který dále ovlivňuje aktivitu T-lymfocytů [17].

Přestože morfologicky jsou NK buňky lymfocyty, nemají jako cytotoxické T-lymfocyty nebo B-lymfocyty antigenně specifické receptory na svém povrchu. Místo toho mají řadu aktivačních a inhibičních receptorů, které stimulují, resp. inhibují aktivitu NK buněk (obrázek 2) [1,19].

Během maturace a proliferace z hematopoetického progenitoru NK buňky v různých stádiích svého rozvoje exprimují různé typy fenotypických markerů (obrázek 2) [20]. Jedním z nejdůležitějších povrchových markerů je CD56. Podle míry exprese se buňky ve finále dělí na CD56<sup>bright</sup> a CD56<sup>dim</sup>. CD56<sup>bright</sup> typ buněk je schopen produkovat větší množství cytokinů, CD56<sup>dim</sup> buňky mají aktivní cytotoxické schopnosti a exprimují na svém povrchu i více receptoru CD16, který je zodpovědný za buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách [7,12,21].

Rodina receptorů NKR-P1 důležitá pro tuto práci je v následujícím obrázku zastoupena lidským receptorem CD161 (NKR-P1A) [22].

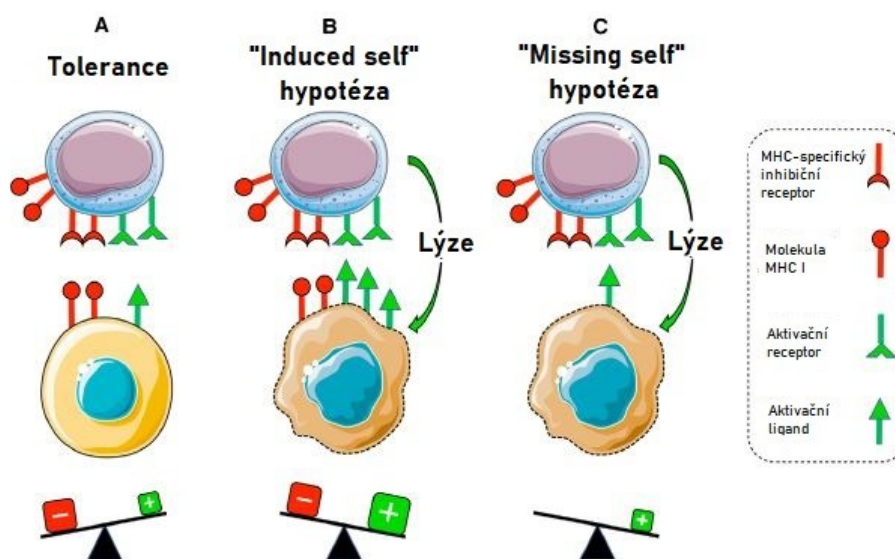


**Obrázek 2: Maturace lidských NK buněk od stádia hematopoetického prekurzoru.** Hlavními fenotypickými markery NK buněk v průběhu jejich maturace jsou markery vyznačené červeně. Mezi známé představitele povrchových markerů patří NKG2A receptor, receptor přirozené cytotoxicity NKp80 a také CD161 neboli NKR-P1A. Převzato a upraveno z [20].

### 1.3 Mechanismy NK buněčného rozpoznávání

Jednou z hlavních funkcí NK buněk je schopnost imunitního dohledu a rozpoznání škodlivých buněk. Kvůli tomu, že NK buňky nemají na rozdíl od T- a B-lymfocytů antigenně specifické receptory, mohou zabíjet buňky jak defektní (nezdravé, infikované), tak i tělu vlastní [1,20]. Místo antigenně specifických receptorů mají řadu aktivačních a inhibičních receptorů. Exprimované receptory mohou být na povrchu buňky v nejrůznějších kombinacích aktivačních a inhibičních zástupců. Podle některých studií bylo stanoveno, že v jednom organismu lze najít od 6000 až do 30000 fenotypů NK buněk podle kombinací 35 povrchových antigenů [20]. Pro zajištění NK buněčné autotolerance, která by mohla být narušena v důsledku nerovnováhy v expresi aktivačních a inhibičních receptorů, se musejí NK buňky tzv. licencovat. Cytotoxicky aktivní jsou většinou jen ty buňky, které alespoň jednou obdržely inhibiční signál přes inhibiční receptor [1,23]. Nelicencované buňky mají ovšem neopomenutelnou roli např. v eliminaci buněk nakažených cytomegaloviry [11].

Při NK buněčném rozpoznávání dochází k vazbě ligandů na NK buněčné receptory a akumulaci obou typů signálů: jak aktivačního, tak inhibičního. Podle poměru těchto signálů efektorová buňka rozhodne, zdá má cílovou buňku zabít nebo nechat naživu (obrázek 3) [1].



**Obrázek 3: Schematické zobrazení NK buněčného rozpoznávání.** Rozpoznání NK buňkou přes její aktivační receptory, které jsou zobrazené zelenými šipkami, vede k převážení aktivačního signálu nad inhibičním. To pak vede k cytotoxickému útoku a lýzi cílové buňky. Převzato a upraveno z [9].

Nežádoucímú zabití vlastních buněk pomocí NK buněčné aktivity brání MHC glykoproteiny I. třídy (dále jen MHC-I), které exprimují všechny jaderné buňky. Díky těmto molekulám buňky vystavují na svém povrchu krátké aminokyselinové sekvence, části proteinů, které jsou pro danou buňku vlastní. Jednou ze základních funkcí NK buněk je jejich schopnost rozpoznávat buňky se sníženou expresí MHC-I a zabíjet je. Těmi mohou být buňky s potlačenou nebo jen minimální expresí MHC-I v důsledku virové infekce nebo maligní transformace. Maligní buňky v důsledku potlačení exprese MHC-I sice unikají před T-lymfocyty, ale zároveň zvyšují pravděpodobnost rozpoznání NK buňkami [1,9,24]. Je to projev tzv. „missing-self“ hypotézy. V případě maligní transformace nebo infekce může také dojít ke zvýšené expresi aktivačních ligandů (MICA, MICB, ULBP) na povrchu cílové buňky která vede k rozpoznání buňky jako škodlivé podle „induced-self“ hypotézy [1,9]. Výsledkem obou typů rozpoznávání je cytotoxické zničení cíle [9].

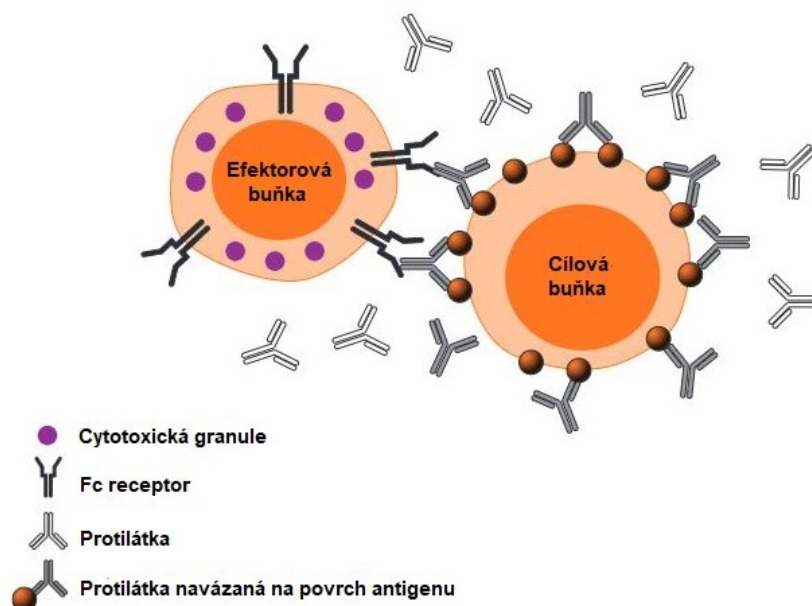
Rakovinné buňky jsou schopné nejen potlačit expresi MHC-I na svém povrchu, ale rovněž se ukázalo, že dokážou ukrýt aktivační ligandy před rozpoznáním aktivačními receptory mechanismem tzv. „shedding“ nebo „shielding“ a současně zvýšit expresi inhibičních ligandů [12,25]. „Shielding“ dobře demonstruje příklad galektinu-3, jenž je vylučován nádorovými buňkami a dokáže učinit vazebné místo NKG2D receptoru nedostupným pro aktivační ligand MICA [25]. Nádory ve svém mikroprostředí vyvolávají imunosupresivní podmínky například tím, že vytváří prostředí chudé na kyslík nebo vylučují kromě galektinu-3 i různé cytokiny, rozpustné faktory specifické pro nádory jako třeba TGF- $\beta$ , prostaglandiny, interleukiny 6 a 10 a jiné látky. Přítomnost daných látek v okolí NK buňky vede ke snížení aktivace a exprese IFN- $\gamma$  a zároveň i k potlačení exprese aktivačních receptorů [12].

Rozpoznání NK buňkami může být nežádoucí například při alogenní transplantaci tkáně. Buňky alogenně transplantované tkáně sice exprimují molekuly MHC-I, které se u člověka označují jako lidské leukocytové antigeny (HLA, z angl. human leukocyte antigen), ale v důsledku obrovské polymorfie v alelách pro HLA v celé populaci může dojít k rozpoznání transplantované tkáně jako cizí, protože HLA má (byť nepatrně) jinou sekvenci než hostitelská [26,27]. Na aloreaktivitě se z velké části podílejí KIR inhibiční receptory NK buněk, jež u člověka rozpoznávají HLA-A/-B/-C molekuly [10,28,29].

Zajímavé je, že NK buňky mají na svém povrchu receptory, které jsou schopné rozeznávat Fc-fragmety například opsonizovaných buněk. Tento typ receptorů je zastoupen molekulou aktivačního receptoru Fc $\gamma$ IIIa neboli CD16, což je to klíčová molekula pro buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátce (ADCC, z angl. antibody-dependent cell cytotoxicity) (obrázek 4, str. 17) [7,30,31]. Tento typ rozpoznávání pak stejně jako u ostatních aktivačních receptorů vede k cytotoxickému zabití cílové buňky pomocí



cytotoxických granulí a je využíván v imunoterapii nádorů [30,31]. K aktivaci cytotoxických mechanismů dochází tak, že při interakci Fc-fragmentu protilátky obklopující patogen s receptorem dochází ke konformační změně Fc-fragmentu, čímž se afinita protilátky k tomuto receptoru zvyšuje. Gamma-podjednotka Fc $\gamma$ IIIA receptoru je následně fosforylována ve své intracelulární části pomocí Src kinas, čímž se spustí několik možných signálních drah, které vedou k vyloučení cytotoxických granulí [30].



**Obrázek 4: Schematické znázornění NK buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách.** Efektorová buňka nesoucí na svém povrchu receptory CD16 rozeznává protilátky vázané na povrch opsonizované cílové buňky. Tato interakce následně vede k cytotoxické odpovědi a eliminaci cílové buňky. Převzato a upraveno z [30].

## 1.4 Mechanismy NK cytotoxické obrány

NK buňky, jako i spousta dalších typů buněk imunitního systému, jsou schopny po interakci s cílovou buňkou produkovat prozánětlivé cytokiny, jakými například jsou IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  nebo různé typy interleukinů, a tímto způsobem aktivovat imunitní systém [7]. NK buňky využívají ke zničení cílové buňky několik způsobů, ze kterých je nejvíce prostudovaný mechanismus zabití cytotoxickými granulemi obsahujícími perforin, granzymy (B, A, K, M, H) a také granulysin [7,10,32]. Granzymy A a B jsou ze zmíněných molekul při cytotoxickém odstranění cílové buňky nejpotentnější, kdežto granzymy K, M a H vyvolávají paralelní reakce a spouštějí jiné signální kaskády [10]. Složky granulí jsou po polarizaci efektorové buňky vyloučeny a vyvolávají pak buněčnou smrt a apoptózu štěpením kaspasy [30,32]. Perforin v extracelulárním prostředí bohatém na Ca<sup>2+</sup> vytváří

svoji agregací póry v buněčné membráně a narušuje tím integritu buňky. Granulysin má stejnou funkci jako perforin, i když přes jiné mediátory, které vyvolávají narušení buněčné membrány a zároveň alteraci mitochondriální membrány [10]. Granzymy vstupují perforinem vytvořenými póry do buňky, kde fungují jako proteasy [21,32]. Zabití působením cytotoxických váčků se uplatňuje i při ADCC. Tento způsob ničení má vysokou efektivitu, jelikož pro postačující efekt vedoucí k buněčné smrti stačí vyprázdnit obsah 2 – 4 lytických granulí [32].

Druhá varianta ničení nežádoucích buněk je z hlediska aktivace delší a spočívá v zapojení tzv. receptorů smrti TRAIL-R1/-R2 (ligand vyvolávající apoptózu závislý na TNF, z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1) nebo CD95, které jsou aktivovány pomocí tzv. ligandů smrti TRAIL a FasL [21,32]. Spolu s TRAIL a FasL se jako ligand pro receptory smrti označuje i TNF- $\alpha$ . Nedávno byl objeven také ligand LT $\alpha$  [10,21]. Stejně jako cytotoxické granule mohou aktivovat kaspasu a vést tak k apoptóze buňky. FasL je uskladňován ve váčcích které pak tento ligand dopravují na povrch NK buňky. U TRAIL není zatím jasný způsob, jakým je uskladňován a exprimován. Zabití zprostředkované přes FasL na rozdíl od TRAIL vede k programované smrti buňky, aktivace přes TRAIL může vést i k cytotoxickému zabití [32].

Kinetika těchto dvou způsobů likvidace cílových buněk se významně liší. Cytotoxické granule mohou být vyloučeny v řádu minut po kontaktu s cílovou buňkou, zatímco signalizace přes ligandy/receptory smrti může do eliminace buňky trvat i dvě hodiny [32].

Jedna z důležitých schopností NK buněk je schopnost sériového zabíjení, které bylo také pozorováno u T cytotoxických lymfocytů. Limitací tohoto jevu je ztráta aktivačních receptorů z povrchu NK buňky s časem. Důležitá je zároveň i skutečnost, že první skupina cílových buněk je při sériovém zabití likvidována pomocí cytotoxických granulí, a až následně převáží i mechanismus likvidace buněk přes FasL. Bylo také zjištěno, že za většinu zabíjených buněk je zodpovědná vždy jen malá skupina NK buněk. Charakterizace této skupiny pak může hrát klíčovou roli pro rozvoj protinádorové terapie [32].

## **1.5 Receptory NK buněk**

Receptory NK buněk lze třídit podle efektu který tyto receptory vykazují a podle molekulární podstaty jejich struktury [1,5]. Dle funkce jsou tedy děleny na aktivační a inhibiční, strukturně pak na receptory imunoglobulinového typu nebo C-lektinového typu [1,7]. Navíc lze receptory NK buněk třídit podle toho, jestli rozpoznávají ligandy odlišné od MHC-I, nesouvisející s MHC-I ligandy nebo rozpoznávají přímo MHC-I [11].

Hlavními odlišnostmi NK aktivačních a inhibičních receptorů, které jsou pro funkci přirozených zabíječů z hlediska jejich aktivity více podstatné než strukturní, jsou signalizační motivy na bázi tyrosinu: ITAM (imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrosinu, angl. immunoreceptor tyrosine-based activating motif), ITIM (imunoreceptorový inhibiční motiv na bázi tyrosinu, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) a ITSM (imunoreceptorový přepínací motiv na bázi tyrosinu z angl. immunoreceptor tyrosine-based switch motif). Sekvence ITAM má následující charakteristiky: YXXL/IX<sub>6-8</sub>YXXL/I, kde X je libovolná aminokyselina, podobnou konzervovanost vykazuje ITIM motiv: I/V/LXYXXL/V, kde X je libovolná aminokyselina, a ITSM: S/TCYXXL/I, kde X je libovolná aminokyselina [33–35]. Aktivační receptory ve své intracelulární části mohou obsahovat ITAM nebo ITSM motiv, kdežto inhibiční receptory mají ITIM [7,33,36]. Ke známým zástupcům aktivačních receptorů patří receptory z rodiny receptorů přirozené cytotoxicity (NCR, z angl. natural cytotoxicity receptors), dále NKG2C a NKG2D receptory, některé z receptorů rodiny Ly49 a také z rodiny NKR-P1 receptorů. K inhibičním pak patří dimerní forma receptoru NKG2A, receptory z rodiny imunoglobulinových receptorů zabíječských buněk (KIR, z angl. killer-immunoglobulin-like receptors) a také některé jiné receptory NKR-P1 rodiny jako například NKR-P1B/D [33].

Aktivační a inhibiční receptory spolupracují v signalizaci [7]. Pro aktivitu některých receptorů je důležitá asociace dvou receptorových homo- nebo hetero- podjednotek obsahujících motivy s tyrosinovými zbytky, například asociace dvou obsahujících ITAM FcγR podjednotek nebo CD3ζ podjednotek u CD16 receptoru a NCR receptorů s výjimkou NKp44 [33]. NKp44 je asociován s adaptorovým homodimerním proteinem DAP12, jehož každá podjednotka nese ITAM motiv [33]. S DAP12 je také asociována rodina receptorů KIR a CD94-NKG2 receptorů. Na rozdíl od ostatních, NKG2D receptor spolupracuje s DAP10, který místo ITAM má jen krátký tyrosinový aktivační motiv YXXM [33]. DNAM-1 receptor nepotřebuje spolupracovat s žádným adaptorovým proteinem, po své aktivaci fosforyluje jen konzervované Tyr a Asn v cytosolické části receptoru [33]. Fosforylační motivy u svých receptorů mají nejen NK buňky, ale také i T- a B- lymfocyty [33,36].

### 1.5.1 Aktivační receptory

Při aktivaci je nejprve ITAM motiv fosforylován kinasou z rodiny Src, následně přes SH2 doménovou interakci jsou do kaskády zapojeny protein kinasa 70 asociována se Z-podjednotkou (ZAP-70) a Syk tyrosinové kinasy. Ty se podílejí na fosforylaci transmembránového adaptorového proteinu, což pak vyvolává reakce, vedoucí ke vzniku signálních intermediátů za pomoci například PI3K (fosfoinositid 3-kinasy), PCL-γ1

(fosfolipasy gamma) nebo  $\gamma 2$ , a nakonec i guanin nukleotidových výměnných faktorů Vav-1, -2, -3 [33]. Lze se ale setkat i s výjimkou, kterou představuje NKG2D receptor, který spolupracuje s DAP10 adaptorovým proteinem, jež neobsahuje ITAM motiv, ale i přesto je aktivační. Po fosforylaci krátkého motivu obsahující jeden zbytek tyrosinu Src kinasou NKG2D může do signalizace zapojit buď PI3K, Grb2 adaptorový protein, který najdeme v cytosolu nebo PLC- $\gamma$  [33,37]. Všechny signalizační kroky pak vedou k mobilizaci a změně koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů uvnitř a vně buňky, sekreci IFN- $\gamma$  a nakonec k cytotoxickému účinku NK buněk [37].

Některé z aktivačních receptorů hrají roli koreceptorů amplifikujících signál získaný od primárních receptorů, například od NKG2D nebo receptorů rodiny NCR [29]. Tyto koreceptory jsou např. 2B4, NTB-A, DNAM-1, CD59 a NKp80 [29].

### 1.5.2 Inhibiční receptory

Pro imunitu organismu, a to obzvláště z hlediska autoimunitních reakcí, jsou důležité inhibiční receptory, které chrání tělu vlastní buňky před cytotoxickým atakem NK buňkami [7,36]. Inhibiční efekt byl poprvé pozorován u myšičího receptorů Fc $\gamma$ RIIb, který potlačuje aktivitu B-lymfocytů a je jediným Fc receptorem s inhibičním efektem [33].

Inhibiční receptory byly dlouho považovány za koreceptory, kdy podstata jejich účinku měla spočívat v tom, že deaktivují aktivované receptory obsahující ITAM motiv [7,33]. Novější studie ale ukazují, že mohou signalizovat i samostatně, bez zapojení jiných receptorů [33]. Mohou bránit aktivaci NK buněk hned na několika úrovních jako jsou například asociace aktivačních receptorů, polarizace buňky a ovlivňují též výměnu  $Ca^{2+}$  mezi buňkou a okolím [33].

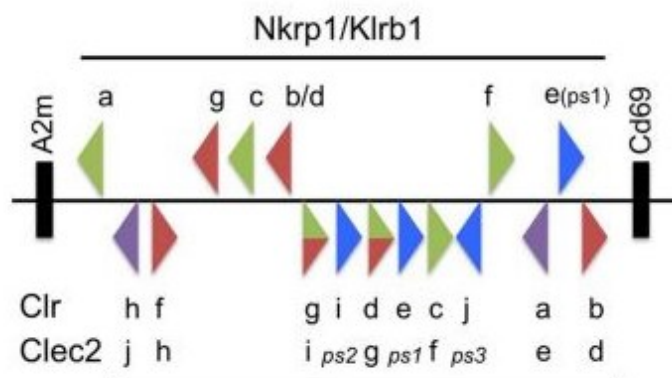
Nejdůležitější receptory s inhibičním působením jsou specifické pro MHC-I. Lidské NK buňky mají na svém povrchu jejich tři hlavní zástupce, a to KIR receptory, leukocytový receptor 1 podobný imunoglobulinům (LIR-1, z angl. leukocyte immunoglobulin-like receptor) a CD94-NKG2A heterodimer [33]. U myši plní roli KIR rodiny receptory Ly49 [7,33].

Při interakci s inhibičním ligandem je tyrosinový zbytek v ITIM motivu fosforylován jednou kinasou z rodiny Src [33]. Na něho se pak naváže SHP-1/2 doména inositol lipid 5-fosfatasy 1 (SH2 doménové fosfatasy) [5,7,36]. SHP-1 je obvykle upřednostňována [33]. Tyto fosfatasy zprostředkovávají inhibici tím, že mohou defosforylovat důležité signální mediátory, například Lck, Fyn, Syk, Zap70, Vav-1 a fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát, který je klíčovou složkou pro aktivaci PLC- $\gamma$ , která v konečném důsledku způsobuje degranulaci a cytotoxicitu [7,36]. Fosfatasy asociované s fosforylovaným ITIM motivem tedy

defosforylují mediátory čímž přerušují aktivační kaskádu NK buňky [5,7,36]. Zásadní mediátor NK receptorů Vav-1 [33]. Vav-1, -2 a -3 jsou důležité signální molekuly představující GTP výměnný faktor rodiny malých Rho GTPas, které regulují signalizaci cytotoxických buněk a podílí se také na maturaci T- a B-lymfocytů [37,38].

## 1.6 NKR-P1 rodina receptorů

NKR-P1 (angl. natural killer receptor-protein 1) rodina receptorů byla objevena jako první ze všech nyní známých NK receptorových proteinů. Tato rodina receptorů obsahuje jak aktivační, tak i inhibiční zástupce patřící do strukturní rodiny receptorů podobných lektinům C-typu [1]. Geny pro NKR-P1 se nachází v NKC genovém komplexu na chromozomu 6 u myši, chromosomu 4 u krys a chromosomu 12 u člověka a patří do *Klrbl* (neboli též *Nkrp1*) rodiny [22,39,40]. NKC komplex byl také pozorován u psů, dobytka a kuřat, ale může se vyskytnout na odlišných chromozomech. Ligandy k NKR-P1 receptorům lze najít ve stejném genovém komplexu, jsou zastoupeny *Clec2* skupinou genů a patří do stejné strukturní kategorie proteinů podobných lektinům C-typu (CTLR, a angl. C-type lectin-like receptors ) (obrázek 5) [39,40].



**Obrázek 5: Myší genový komplex NKC.** Nachází se vedle genů pro NKG2 a Ly49 NK buněčné receptory. Nad čarou jsou zobrazeny geny pro receptory rodiny NKR-P1, pod čarou jsou zobrazeny geny pro jejich ligandy. Převzato a upraveno z [39].

U myši bylo identifikováno celkem 7 genů pro NKR-P1 receptory: *Nkrp1a*, *-b*, *-c*, *-d*, *-e*, *-f*, *-g* geny, ze kterých *Nkrp1b* a *Nkrp1d* kódují stejný inhibiční receptor u myšího kmene B6 a *Nkrp1e* je pseudogen [39]. U krys byly identifikovány zatím jen čtyři geny, které by mohly být orthologické k myším *Nkrp1a/c*, *Nkrp1b/d*, *Nkrp1f*, a *Nkrp1g* genovým sekvencím [39]. U člověka byl od roku 1994 identifikován zatím jen jeden gen pro NKR-P1A receptor (též CD161 / KLRB1 / CLEC5B) spolu se svým ligandem LLT1 (neboli CLEC2D / OCIL / CLAX), rovněž ze strukturní rodiny proteinů podobných lektinům C-typu. Je zajímavé, že CTLR jsou značně polymorfní a vykazují nízkou homologii jak

mezidruhově, tak i v rámci jednoho druhu. Myší NKR-P1C má například jen 46% homologii s krysími a 46 – 47% homologii s jinými myšími NKR-P1 proteiny [39,41]. Ligandů k NKR-P1 rodině receptorů bylo nalezeno více než receptorů samotných. Deset genů pro tyto ligandy bylo pojmenováno stejným způsobem jako u genů pro receptory: *Clr* (také *Ocil/Clec2*) -a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, -h, -i, -j. Stejně jako u receptorů NKR-P1, *Clr-e* a také i *Clr-i* jsou považovány za pseudogeny. Některé ligandy z výše uvedených zatím nemají definované receptory, a navíc nejsou známy ani jejich fyziologické funkce. Dobře definované páry u B6 a BALB/c myších kmenů jsou NKR-P1B/D:Clr-b, NKR-P1F:Clr-c, -d, -g, a NKR-P1G:Clr-d, -f, -g [39].

U hlodavců jsou receptory rodiny NKR-P1 k nalezení na všech typech NK/NKT buněk [42]. Myší NKR-P1C lze nalézt v každé NK a NKT buňce, exprese NKR-P1B/D lze pozorovat jen u omezeného počtu NK buněk (50 – 70 %) a jen málo u NKT buněk (10 %) [39,42,43].

Strukturně patří NKR-P1 receptory do skupiny CTLR, receptorů podobných lektinům C-typu. Konzervované cysteinové zbytky schopné vzájemného propojení jsou klíčové pro tvorbu dimerů těchto proteinů. U CTLR však najdeme i jiné zbytky Cys schopné tvořit intramolekulární disulfidické můstky [44–46]. Strukturní studie uvádí, že NKR-P1 proteiny jsou homodimery propojené disulfidickými můstky a mají molekulové hmotnosti přibližně 90 kDa (dimery) v neredukujícím a 45 kDa (protomery) v redukujícím prostředí. Jejich ligandy Clr jsou též schopné tvořit jak homo-, tak i hetero- dimery [48]. NKR-P1 patří do skupiny transmembránových glykoproteinů II. třídy s C-koncovou C-lektinům podobnou doménou (CTLD, z angl. C-type lectin-like domain) v extracelulárním prostoru. V cytoplazmě buněk pak lze nalézt N-koncovou krátkou doménu [41]. Jako první byla struktura identifikována u myšího NKR-P1A receptoru. Ten obsahoval CTLD s prodlouženou smyčkou mezi  $\beta$ -listy, která se podílí na vazbě ligandů [49]. Struktura receptoru se skládá z několika antiparalelních  $\beta$ -listů, které tvoří jakési tělo receptoru a jsou na konci obklopeny krátkými  $\beta$ -listy a dvěma nebo třemi  $\alpha$ -helixy v závislosti na isoformě receptoru [39,41]. Nejvíce konzervované je tělo receptoru skládající se  $\beta$ -listů, méně konzervovaný úsek je smyčková část [41].

NKR-P1C receptor je první identifikovaný z celé rodiny receptorů. Je často nazýván NK1.1 antigenem, protože NKR-P1C receptor byl danou protilátkou rozeznán jako morfologický znak NK buněk [29,50]. Je to transmembránový protein II. typu podobný lektinům C-typu, který tvoří homodimery prostřednictvím disulfidických můstků stejně jako ostatní zástupci této rodiny receptorů [50]. Podle studií sekvence NKR-P1C receptoru v NKC komplexu bylo zjištěno, že gen má šest exonů a pět intronů. První exon v genu pro NKR-P1C v NKC komplexu kóduje N-terminální část proteinu nacházející se v cytoplazmě,

druhý exon kóduje transmembránový úsek, třetí je zodpovědný za variabilní smyčkovou část a zbytek exonů kóduje CRD doménu [50]. U NKR-P1C byly nalezeny tři intramolekulární disulfidické můstky [51] (obrázek 6).



**Obrázek 6: Model struktury NKR-P1C receptoru navržený na základě homologie a dat z hmotnostní spektrometrie.** Struktura modelovaná dle homologie s krystalovou strukturou NKR-P1A a na základě dat z hmotnostní spektrometrie chemického kroslinkování fragmentů NKR-P1C, mapování disulfidů a vodík/deuteriové výměny. Oranžově je zobrazena smyčka, která je pravděpodobně zodpovědná za vazbu ligandů, žlutě antiparalelní  $\beta$ -stuktury, červeně  $\alpha$ -helixy, zeleně jsou vyznačeny disulfidické můstky. Převzato a upraveno z [51].

Myší NKR-P1C je exprimován na povrchu všech myších NK buněk. Zároveň lze ho najít i u NKT lymfocytů [50]. Je to aktivační receptor, jehož aktivace ligandem stimuluje buněčnou cytotoxicitu pomocí změny metabolismu fosfatidylinositolu a koncentrace intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  v organismu. Dále ovlivňuje kinasovou aktivitu například kinas  $\text{p56}^{\text{Lck}}$  a Lck a stimuluje produkci cytokinů pro aktivaci dalších složek imunitního systému [51,52]. Interakce s kinasou z rodiny Lck byla NKR-PC zajištěná pomocí dicysteinového motivu CXCP. Při narušení tohoto motivu nebo jeho mutaci ztrácí receptor svoji funkci [52].

## 2 Cíle práce

- Příprava expresního vektoru myšního receptoru NKR-P1C.
- Exprese receptoru NKR-P1C ve stabilně transfekované buněčné linii HEK293T.
- Purifikace receptoru NKR-P1C pomocí afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie.



### 3 Materiály

#### 3.1 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Avanti JXN-26	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12 R	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Hemocytometr CytoSMART	Corning, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor CO <sub>2</sub> 18AIC	Sanyo, Japonsko
Inkubátor Lab Companion	Schoeller Instruments, Německo
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona HiTrap Protein A	GE Healthcare, USA
Koncentrátory Amicon Ultra	Milipore, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	Schott Duran, Německo
Laminární box Clean Air	PMV, Nizozemsko
Magnetická míchačka ESP	VELP Scientifica, Itálie
Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	VWR, USA
Mikrovlňná trouba	Optimo Moulinex, Francie
NucleoBond Xtra Maxi Maxiprep Kit	Macherey Nagel, USA
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit	Macherey Nagel, USA
pH metr $\Phi$ 200	Beckman Coulter, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, Švýcarsko
Vodní lázeň	Memmert GmbH & Co., Německo
Vortexový mixér VELP	Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí PS 251-2	Sigma-Aldrich, USA
Zobrazovací zařízení Alliance Q9	UVItec, UK

### 3.2 Rotory

F0630	Beckman Coulter, USA
JLA-16.250	Beckman Coulter, USA
SX4400	Beckman Coulter, USA

### 3.3 Chemikálie

Agar	Roth, Německo
Agarosa	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR
APS	Serva, Německo
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Blasticidin	Serva, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
Dihydrogenfosforečnan sodný	Lach-Ner, ČR
Deoxyribonukleotidtrifosfáty	Top-Bio, ČR
DMSO	Sigma, USA
Doxycyklin	Serva, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Lach-Ner, ČR
GoodView II	Ecoli, Slovensko
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
Isopropanol	Lach-Ner, ČR
Kvasničný extrakt	Duchefa, Nizozemsko
Kyselina valproová	Sigma-Aldrich, USA
Lineární polyethylenimin, 25 kDa	Polysciences, Kanada
<i>N,N'</i> -metylenbisakrylamid	Serva, USA
PCR H <sub>2</sub> O	Top-Bio, ČR
Puromycin	Serva, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Standard Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific. USA
Standard DNA 100bp	New England Biolabs, UK
Standard DNA 1kbp	New England Biolabs, UK

TEMED	Serva, Německo
Tris	Carl Roth, Německo
Trypanová modř	Sigma, USA
Trypton	Duchefa, Nizozemsko

### 3.4 Enzymy a příslušné pufr

Combi PPP Master Mix	Top-Bio, ČR
NEB pufr 2.1	New England Biolabs, UK
NheI-HF	New England Biolabs, UK
PmeI	New England Biolabs, UK
Q5 DNA polymerasa	New England Biolabs, UK
Q5 GC Enhancer	New England Biolabs, UK
Q5 reakční pufr	New England Biolabs, UK
rCutSmart pufr	New England Biolabs, UK

### 3.5 Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>Escherichia coli</i> DH5a	Thermo Scientific, USA
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Thermo Scientific, USA
HEK293T	Prof. Radu Aricescu, UK

### 3.6 Plazmidy a vektory

PBase	Sanger Institute, UK
PB-RB	Prof. James M. Rini, Ph.D., Kanada
pUT7	Prof. James M. Rini, Ph.D., Kanada
pYD5_N1	Mgr. Helena Pucholtová, PřF UK, ČR

### 3.7 Roztoky, pufr, média

#### 3.7.1 Roztoky a média

ExCELL293 médium: komerční médium, před použitím doplněno L-glutaminem na výslednou 4 mM koncentraci

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

Roztok akrylamidu pro SDS: 29 % akrylamid, 1 % *N,N'*-methylenebisakrylamid

SOB médium: 2 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0

Tris 1,5M, pH 6,8 a Tris 1,5M, pH 8,8

### 3.7.2 Pufry

Citrátový pufr: 100 mM citrát, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 3,0

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE (10× koncentrovaný): 250 mM Tris, 1,9 M glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3

HEPES pufr: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5

Neutralizační pufr: 1,5 M Tris, pH 8,8

PBS pufr: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

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

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

TES pufr: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 8,0

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

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující (5× koncentrovaný): 31,5 mM Tris, 10 % (v/v) glycerol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % bromfenolová modř, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 10 % (v/v) 2-merkaptoethanol, pH 6,8

## 3.8 Soupravy pro izolace DNA

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

Macherey-Nagel, Německo

NucleoSpin® Plasmid

Macherey-Nagel, Německo

NucleoBond® Xtra Maxi Plus

Macherey-Nagel, Německo

## 3.9 Oligonukleotidy

pYC5K\_FW: 5' – AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGAGACAGAC – 3'

pYC5\_REV: 5' – CTGATCAGCGGGTTTTTCGGGGGATCAGGTACC – 3'

pCT5seq\_FW: 5' – TCAGATCGCCTGGAGACG – 3'

pCT5seq\_REV: 5' – GTGGGAGTGGCACCTTCC – 3'

## 4 Metody

### 4.1 Příprava rekombinantního konstruktů

#### 4.1.1 Restriční štěpení

Plazmid pUT7 byl linearizován restričními endonukleasami PmeI a NheI-HF. Do 1,5ml zkumavky bylo přidáno 5 µg plazmidu pUT7, 5 µl 10× koncentrovaného pufru rCutSmart, 20 U PmeI, 10 U NheI-HF a zbytek objemu byl doplněn PCR H<sub>2</sub>O do celkového objemu 50 µl. Reakční směs byla inkubována přes noc v inkubátoru při 37 °C.

#### 4.1.2 Polymerasová řetězová reakce

Zprvce byly pro PCR reakci navrženy primery pomocí počítačového programu SnapGene. Přímé a reverzní primery byly navrženy s 15 bp přesahem, aby produkt z polymerasové řetězové reakce měl vhodné přesahy pro následující klonovací reakci. Templátová DNA byla vektor pYD5\_N1 obsahující konstrukt extracelulární části myšního receptoru NKR-P1C. Do 200µl mikrozukavky byly přidány složky reakční směsi v objemech, které jsou uvedené v tabulce 1 (str. 29). Nastavení PCR termocyklu je uvedeno v tabulce 2 (str. 30).

**Tabulka 1: Složky reakční směsi pro PCR reakci.**

Složka	Zásobní koncentrace	Objem (µl)
Templát pYD5_N1	40 ng/µl	1,0
Přímý primer	5 µM	2,0
Reverzní primer	5 µM	2,0
GC Enhancer	5× konc.	4,0
dNTPs	10 mM	0,4
Q5 reakční pufr	5× konc.	0,2
Q5 polymerasa	2000 U/ml	0,2
PCR H <sub>2</sub> O	-	6,4

**Tabulka 2: Nastavení PCR termocyklieru.**

Cykly	Teplota	Čas
1	95 °C	5 min
30	95 °C	30 s
	54 °C	30 s
	72 °C	1 min
1	72 °C	5 min

#### 4.1.3 Elektroforéza v agarosovém gelu

Po restrikcím štěpení a PCR amplifikaci byla provedena DNA agarosová elektroforéza pro ověření efektivity štěpení plazmidové DNA a amplifikace genu pro NKR-P1C. Pro 0,75% gel bylo naváženo 0,49 g agarosy a rozpuštěno v 65 ml TAE pufru. Roztok s agarosou byl zahřát v mikrovlnné troubě až se agarosa rozpustila. Po ochlazení byly do roztoku pak přidány 3  $\mu$ l interkalačního činidla GoodView II. Roztok byl nalit do předem sestavené aparatury s elektrodami, kde ztuhl. Do vzorků byl přidán vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu, kdy ke štěpenému plazmidu bylo přidáno 5  $\mu$ l vzorkového pufru a k PCR produktu 2  $\mu$ l vzorkového pufru. Jako molekulové standardy byly použity 1 kb a 100 bp standardy. Po pipetování vzorků do jamek gelu byla aparatura připojena ke zdroji napětí. Napětí bylo nastaveno na 180 V, s max. proudem až do 500 mA, doba trvání činila 20 min. Po elektroforéze byly vzorky vizualizovány pomocí UV lampy a gel byl vyfocen na zobrazovacím zařízení UVITEC.

#### 4.1.4 Izolace DNA z agarosového gelu

DNA z gelu byla izolována pomocí komerční soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Na každé 100 mg gelu bylo přidáno 200  $\mu$ l pufru NTI. Směs byla inkubována při 50 °C do úplného rozpuštění gelu. Roztok bylo pipetováno do kolonky a stočen na centrifuze 1 minutu při 11000  $\times$  g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn. Kolona byla dvakrát promyta 700  $\mu$ l pufru NT3 a centrifugována při stejném nastavení centrifugy, supernatant byl po každém promytí vylit. Po promytí následovalo sušení kolonové membrány centrifugací 3 minuty při stejném přetížení. Pro lepší sušení byla kolona s membránou postavena na 5 minut do zahřívacího bloku nastaveného na 70 °C. Pro eluci byla využita sterilní destilovaná voda, která byla přehřívána na 70 °C. Eluce byla provedena na dvakrát s tím, že bylo pipetováno vždy po 15  $\mu$ l do kolonky, inkubováno 5 minut a následně stočeno 1 minutu při 11000  $\times$  g a 20 °C. Roztok DNA byl jímán do plastových mikrozkušavek. Koncentrace

získaných roztoků byla změřená na spektrofotometru DS-11+ (Denovix) oproti elučnímu pufru.

#### 4.1.5 Měření koncentrace plazmidové DNA

Měření koncentrace DNA na spektrofotometru DS-11+ bylo provedeno při dvou vlnových délkách 260 a 280 nm s tím, že  $A_{260} = 1$  odpovídá koncentraci DNA 50  $\mu\text{g/ml}$ . Poměr absorbancí při 260 a 280 nm, když spadá do rozmezí hodnot 1,8 – 2,0, vypovídá o dostatečné čistotě vzorku. Jako slepý vzorek byl využit eluční pufr.

#### 4.1.6 Klonování nezávislé na sekvenci a ligaci

Klonování nezávislé na sekvenci a ligaci (SLIC, z angl. sequence and ligation independent cloning) je metoda, která dovoluje vložit inzert zájmu do linearizovaného plazmidu na základě komplementarity bází na jejich koncích. T4 DNA polymerasa používaná při SLIC reakci v důsledku své 3' – 5' exonukleasové aktivity odstraní nukleotidy z jednoho vlákna každého úseku jak vektoru, tak inzertu, a vytvoří tak lepivé konce, které se na základě komplementarity spojí. Složení reakční směsi pro SLIC reakci je uvedeno v tabulce 3 (str. 31). Přípravená směs byla stočena a inkubována v 50 °C po dobu 45 s. Po inkubaci byl vzorek přenesen na led na 30 minut.

**Tabulka 3: Složení reakční směsi pro SLIC reakci.**

Složka	Zásobní koncentrace	Objem ( $\mu\text{l}$ )
T4 polymerasa	3000 U/ml	2,0
Linearizovaný pUT7	91,6 ng/ $\mu\text{l}$	1,5
Inzert	48,8 ng/ $\mu\text{l}$	1,7
NEB 2.1 pufr	10 $\times$ konc.	2,0
PCR H <sub>2</sub> O	-	12,8

#### 4.1.7 Transformace bakterií plazmidovou DNA

Po inkubaci v předchozím kroku bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  suspenze kompetentních buněk *Escherichia coli* TOP10. Po 1 hodině inkubace buněk na ledu byla směs za aseptických podmínek rozetřena na misku s LB médiem a ampicilinem (výsledná koncentrace 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Miska byla inkubována při 37 °C přes noc.

#### 4.1.8 PCR z kolonií

Z misky s narostlými bakteriálními koloniemi byly 20  $\mu\text{l}$  špičkami vytknuté vždy tři náhodné kolonie, každá špička byla potom samostatně vložena 200  $\mu\text{l}$  mikrozkušavky. Do

zkumavky bylo potom přidáno 10  $\mu$ l 2 $\times$  koncentrovaného Combi PPP MasterMix (obsahující reakční pufr, dNTPs, polymerasu a glycerol s barvivem), 1  $\mu$ l přímého a 1  $\mu$ l zpětného sekvenačního primeru (zásobní koncentrace 5  $\mu$ M). Roztok byl doplněn PCR H<sub>2</sub>O do výsledného objemu 20  $\mu$ l. Bakterie byly do směsi přidány špičkou, která byla schována pro další použití. PCR reakce byla provedena při následujícím nastavení (tabulka 4, str. 32). Po PCR z kolonií byla ověřena úspěšnost pomocí agarosové elektroforézy. Agarosový gel byl udělán podle stejného postupu popsaného v 4.1.3 (str. 30).

**Tabulka 4: Nastavení PCR z kolonii termocykléru.**

Cykly	Teplota	Čas
1	95 °C	5 min
20	95 °C	30 s
	54 °C	30 s
	72 °C	1 min
1	72 °C	5 min

#### 4.1.9 Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA

Po provedení elektroforézy na agarosovém gelu byla vybrána jedna pozitivní kolonie ze tří a využita pro inokulaci média. Špička byla vložena do 50ml zkumavky. Následně bylo přidáno 5 ml SOB média a 5  $\mu$ l ampicilinu (zásobní koncentrace 100 mg/ml) a tento roztok byl inkubován 14 hodin na třepačce při 210 ot./min a 37 °C.

Plazmidová DNA byla izolována podle návodu komerční soupravy NucleoSpin® Plasmid DNA Purification Kit. Po inkubaci byla bakteriální suspenze centrifugována 10 min při 4000  $\times$  g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn, peleta byla resuspendována v 250  $\mu$ l resuspendačního (A1) pufru. Do zkumavky bylo následně přidáno 250  $\mu$ l lyzačního (A2) pufru, obsah byl jemně promíchán opakovaným převrácením a byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Po pěti minutách bylo k směsi přidáno 300  $\mu$ l neutralizačního (A3) pufru, a roztok byl znovu jemně promíchán do úplného odbarvení. Roztok byl následně centrifugován 5 minut při 11000  $\times$  g, 20 °C. Supernatant byl převeden do kolonky a následně 1 minutu centrifugován při 11000  $\times$  g a 20 °C. Eluát byl vždy odstraněn. Membrána byla promyta jednou 500  $\mu$ l AW promývacího pufru a následně 500  $\mu$ l A4 promývacího pufru. Kolona byla následně vysušena centrifugací 2 minuty při 11000  $\times$  g, 20 °C. Eluce DNA byla provedena na dvakrát po 25  $\mu$ l do čisté mikrozkušavky předem zfiltrovanou destilovanou vodou, která byla také předehřáta na 70 °C pro lepší výtěžek. Kolonka byla centrifugována při 11000  $\times$  g, 20 °C 1 minutu. Koncentrace získaného roztoku DNA byla změřena spektrofotometricky (viz 4.1.5, str. 31).



#### 4.1.10 Sekvence DNA

Reakční směs pro sekvenaci byla vytvořena ve dvou variantách, které se lišily typem přidaného primeru. Byly využity dva sekvenační primery, a to přímý pUT7 primer a reverzní pUT7 primer. Do reakční směsi bylo vždy přidán 1  $\mu$ l jednoho z primerů (zásobní koncentrace 5  $\mu$ M), 200 ng vzorkové DNA a zbytek objemu byl doplněn PCR vodou do 8  $\mu$ l. Sekvenační reakce byla provedena v laboratoři sekvenace DNA Př.F. UK ve výzkumném centru BIOCEV.

#### 4.1.11 Velkoobjemová izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA zkontrolovaná sekvenací byla použita k transformaci kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . K buňkám bylo přidáno 100 – 500 ng plazmidové DNA. Roztok byl inkubován na ledové vodní lázni 20 minut. Následně byla buněčná suspenze zahřívána 45 s na 42 °C. Petriho miska s LB médiem a ampicilinem byla předeřhřata na teplotu 37 °C. Po 10 minutách inkubace reakční směsi na ledové vodní lázni byla směs v aseptickém prostředí rozetřena na misku. Miska s agarem byla inkubována při 37 °C přes noc. Následující den byla z narostlých kolonií vybrána jedna, která byla očkovaná do 500 ml LB média s 500  $\mu$ l ampicilinu (výsledná koncentrace 100  $\mu$ g/ml) ve 2l Erlenmeyerově baňce. Baňka byla inkubována na třepačce 15 hodin při 37 °C a 205 ot./min.

Buněčná suspenze byla centrifugována 30 minut při 4000  $\times$  g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn, peleta byla resuspendována v 50 ml TES pufru a převedena do 50 ml plastové zkumavky. Roztok byl znovu centrifugován 15 minut při stejném nastavení. Z bakteriální pelety byla izolována plazmidová DNA pomocí komerční soupravy NucleoBond® Xtra Maxi Plus. Peleta byla resuspendována ve 12 ml resuspendačního (RES) pufru. Do RES pufru byla předem přidána RNAsa do finální koncentrace 60  $\mu$ g/ml. Dále bylo k roztoku přidáno 12 ml lyzačního (LYS) pufru a roztok jemně zamíchán. Roztok byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Během inkubace byla pomocí ekvilibračního (EQU) pufru ekvilibrována kolona s vloženým papírovým filtrem tak, že po stranách kolony krouživými pohyby bylo postupně přidáváno 25 ml EQU pufru. Po uplynutí doby inkubace byl roztok obsahující LYS pufr neutralizován přidáním 12 ml neutralizačního pufru a jemně promíchán do úplného odbarvení modrého indikátoru. Buněčný lyzát byl vnesen do kolony a kolona byla promyta 15 ml EQU pufru. Filtr byl odstraněn a kolona byla promyta 25 ml promývacího pufru. Eluce DNA byla provedena do 50ml plastové zkumavky na dvakrát po 7,5 ml elučního pufru. Pro precipitaci DNA z roztoku k němu bylo přidáno 10,5 ml vychlazeného isopropanolu (-20 °C) a suspenze DNA byla centrifugována 30 minut při 11000  $\times$  g, 20 °C. Supernatant byl po centrifugaci odstraněn, peleta byla promyta 4 ml 70% ethanolu. Následovala poslední centrifugace na 5 minut při 11000  $\times$  g, 20 °C. Vzniklá peleta

byla sušena a rozpuštěna v 1 ml zfiltrované destilované vody a převedena do plastové mikrozkuřavky. Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometricky (viz sekci 4.1.5, str. 31).

## **4.2 Produkce proteinů ve stabilně transfekované linii HEK293T**

### **4.2.1 Kultivace buněk**

Kultivace buněk byla prováděna Mgr. Celeste de Sousa Santos Abreu. Pro kultivaci buněk bylo využito ExCELL293 médium a láhev s prodyšným víkem. Médium s buňkami bylo uchovááno na inkubační třepačce při 135 ot./min a 37 °C v 5 % atmosféře CO<sub>2</sub>. Každý 3 – 4 den byla kontrolována hustota buněčného roztoku pomocí automatického hemocytometru Corning Cell Counter, kdy buňky byly za účelem vizualizace obarvovány roztokem trypanové modři. Mrtvé buňky se zabarví do modrá v důsledku pronikání modři dovnitř jejich poškozené struktury, živé buňky se jeví neobarvené. Hustota byla vždy udržována v rozmezí 0,5 – 2 × 10<sup>6</sup> buněk/ml, a celý objem roztoku nepřesahoval 30 – 35 % objemu láhve.

### **4.2.2 Transfekce buněk a tvorba stabilní linie**

Stabilní transfekce je způsob, jak do hostitelské DNA dlouhodobě vložit gen zájmu. Pro stabilní transfekci byl využit transposonový systém PiggyBac, který obsahuje tři plazmidy. První z těchto plazmidů nese gen pro transposasu, která dokáže rozpoznat určité sekvence nukleotidů, vyštěpit je a integrovat do hostitelského genomu. Druhý plazmid v tomto systému je představen PB-RB nesoucím gen pro rezistenci k blasticidinu, což pak dovoluje selektivně kultivovat jen transformované buňky. Druhý plazmid zároveň nese sekvenci, která dovoluje zahájit expresi proteinu pomocí doxycyklinu. Třetí plazmid nese gen zájmu, který je potřeba integrovat.

Pro stabilní transfekci byla nejprve spočtena hustota buněčné suspenze pomocí automatického hemocytometru. Ze zásobního roztoku bylo odebráno 30 × 10<sup>6</sup> buněk. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 minut při 100 × g a 20 °C. Buněčná peleta byla resuspendována v přibližně 1 ml ExCELL293 média, a výsledná suspenze byla přemístěna do jamky 12-jamkové destičky, kam pak bylo přidáno 500 μl sterilní transfekční směsi v PBS-TK. Složení transfekční směsi je uvedeno v tabulce 5 (str. 35). Do takové směsi bylo pak přidáno přibližně 1 ml PBS-TK. Do buněk s transfekční směsí bylo pak přidáno 12 μl transfekčního činidla IPEI (10 μg/μl v PBS-TK) v poměru 4:1 (120 μg: 30 μg) k DNA. Buňky byly inkubovány 90 minut na třepačce při 135 ot./min, 37 °C a v 5 % atmosféře CO<sub>2</sub>. Po inkubaci byla buněčná suspenze převedena do 100ml láhve s prodyšným víkem a

doplněna na 30 ml čistým ExCELL293 médiem. Výsledná koncentrace takového buněčného roztoku potom činila  $1 \times 10^6$  buněk/ml.

**Tabulka 5: Složení transfekční směsi pro buněčnou linii HEK293T.**

Složka	Zásobní koncentrace ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Množství ( $\mu\text{g}$ )	Objem ( $\mu\text{l}$ )
pUT7_NKR-P1C	1,297	24	18,5
PB-RB	0,554	3	5,4
PBase	3,26	3	0,9

#### 4.2.3 Selektce stabilních buněčných linií

Po 48 hodinách od okamžiku transfekce byla k buněčným liniím přidána selekční antibiotika (puromycin a blastidicin, každý na výslednou koncentraci  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Hustota a životaschopnost buněk byla průběžně kontrolována každé 3 – 4 dny a udržována na hustotě  $2 \times 10^6$  buněk/ml. Poté co byl evidován stabilní růst životaschopnosti buněk až do přibližně 100 %, buněčná suspenze byla rozdělena do alikvotů o koncentraci  $5 \times 10^6$  buněk/ml v ExCELL293 médiu s 10 % DMSO. Alikvoty byly zmrazeny a uchovány při teplotě  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.4 Sklizení proteinů

Zbytek buněk byl převeden do 1l láhve a doplněn do celkového objemu 300 ml. Po dosažení buněčné hustoty  $2 \times 10^6$  buněk/ml byla zahájena exprese proteinu přidáním k roztoku  $150 \mu\text{l}$  doxycyklinu (zásobní koncentrace  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Po šesti dnech byla produkce proteinu sklizena centrifugací 15 minut při  $20000 \times g$ ,  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant byl přefiltrován a zředěn pufrům PBS v poměru zhruba 1:1 (v/v).

### 4.3 Purifikace receptorového proteinu NKR-P1C

#### 4.3.1 Afinitní chromatografie využívající protein A

Pomocí HPLC chromatografického systému ÄKTAbasic se dvěma stejnými 5ml kolonami HiTrap Protein A zapojenými na sebe byl purifikován zředěný supernatant. Před zaváděním vzorku byl systém nejprve promyt zfiltrovanou destilovanou vodou, následně 0,1M roztokem NaOH a znovu vodou. Kolony byly ekvilibrovány pufrům PBS. Protein byl eluován citrátovým pufrům o  $\text{pH} = 3$ , eluát byl sbírán do plastových mikrozkuvek s  $0,5 \text{ ml}$  neutralizačního pufru (1,5 M Tris,  $\text{pH} 8,8$ ).

### 4.3.2 Koncentrování proteinů

Proteinové frakce byly koncentrovány centrifugací při  $4000 \times g$ ,  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut v 50ml proteinovém koncentrátoru Amicon Ultra (MWCO 30 kDa). Opakovalo se do to doby, než se výsledný objem nerovnal přibližně 500  $\mu\text{l}$ . Po každé jednotlivé centrifugaci byl zakoncentrovávaný roztok opatrně promíchán.

### 4.3.3 Gelová permeační chromatografie

Pro gelovou chromatografií bylo využito kolony Superdex 200 10/300 GL připojené k HPLC systému ÄKTAbasic. Kolona byla převedena do pufru HEPES. Před aplikací vzorku na kolonu byl vzorek 5 minut centrifugován při  $20000 \times g$ . Pomocí injekční stříkačky Hamilton bylo do chromatografické pumpy převedeno přibližně 500  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu. Eluát byl sbírán do plastových mikrozkuavek. Objem sbíraných frakcí byl 1 ml a protein byl detekován pomocí měření absorbance při 280 nm.

### 4.3.4 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace každé jednotlivé frakce byla změřena spektrofotometricky na spektrofotometru DS-11+ při vlnové délce 280 nm. Pomocí webového programu Expasy ProtParam na základě aminokyselinové sekvence proteinu byl vypočten extinkční koeficient. Jako slepý vzorek při měření koncentrace byl použit HEPES pufr.

### 4.3.5 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Hlavním cílem elektroforézy v polyakrylamidovém gelu bylo ověření úspěšnost purifikace proteinu. Elektroforéza byla provedena na 10 % rozdělovacím gelu pro dva typy vzorků. Byly připraveny vzorky v redukujícím a neredukujícím prostředí tak, že 10  $\mu\text{l}$  každé frakce bylo smícháno s 2  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru (aby ve výsledku byl  $1\times$  koncentrovaný). Při pipetování byly roztoky pořádně promíchány, následně byly stočeny na stolní centrifuze a inkubovány v termobloku při  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minut. Do jedné jamky bylo pipetováno 5  $\mu\text{l}$  standardu proteinových hmotností Spectra BR Multicolor, do ostatních jamek byly pipetovány 3  $\mu\text{l}$  vzorku. Nastavení zdroje bylo 180 V, proud do 500 mA, doba trvání byla 75 minut. Složení pro jeden rozdělovací a jeden zaostřovací gel je uvedeno v tabulce 6 (str. 37). Po provedení elektroforézy byl gel obarvován přes noc na třepačce při 65 ot./min v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Následující den byl gel odbarven a vyfocen na přístroji UVITEC.

**Tabulka 6: Složení zaostřovací a rozdělovacího SDS gelu (pro jeden gel).**

<b>Složka</b>	<b>Objem</b>	
	<b>Rozdělovací 10% gel</b>	<b>Zaostřovací gel</b>
<b>Destilovaná voda</b>	2,00 ml	1,40 ml
<b>30% Akrylamid</b>	1,66 ml	500 $\mu$ l
<b>1,5M Tris pufr, pH 8,8</b>	1,25 ml	-
<b>1,5M Tris pufr, pH 6,8</b>	-	25 $\mu$ l
<b>10 % SDS</b>	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	2,5 $\mu$ l	3 $\mu$ l
<b>10 % APS</b>	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l

## 5 Výsledky

### 5.1 Příprava expresního vektoru myšního receptoru NKR-P1C

Cílem této práce je příprava myšního NKR-P1C receptorového proteinu. Klíčovými metodami pro přípravu byly klonování nezávislé na sekvenci a ligaci, které pomohlo vložit do pUT7 expresního vektoru sekvenci pro NKR-P1C, stabilní transfekce buněčné linie HEK293T s následnou expresí přirozeně glykosylovaného proteinu a jeho následná purifikace pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie.

#### 5.1.1 Příprava inzertů DNA a linearizace plazmidu

Příprava inzertu byla založena na amplifikaci genu pro myší receptor NKR-P1C prostřednictvím polymerázové řetězové reakce. Jako templát byl použit plazmid pYD5, do kterého byla Mgr. Helenou Pucholtovou vpravená sekvence myšního NKR-P1C.

Namnožený konstrukt obsahoval sekreční signál, Fc fragment lidského IgG pro purifikaci pomocí afinitní chromatografie, bezprostředně následující sekvenci NKR-P1C a místo štěpení TEV proteázy k odstranění Fc fragmentu. Tento konstrukt obsahuje extracelulární část NKR-P1C CTLD a dimerizační úsek. Experimentálně bylo potvrzeno, že extracelulární doména receptoru obsahuje tři *N*-glykosylační místa a Fc-fragment obsahuje ještě jedno. U dimeru receptoru tím pádem lze dohromady nalézt osm *N*-glykosylačních míst (obrázek 7).

METDTLLLLWVLLLWVPGSTGAGSTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
ASGAGSTTENLYFQGTGQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQV  
SNTWEEGQADGRKGATLLLIQDQEELRFLLDSEIKEYNSFWIGLRFTLPDMNWKWINGTTF  
NSDVLKITGVTENGSCASILGDKVTPESCASDNRWICQKELNHETPSNDSGT

**Obrázek 7: Sekvence NKR-P1C fúzního konstruktů. Sekreční signál, Fc fragment, místo pro štěpení TEV proteasou, sekvence mNKR-P1C s extracelulární částí, potvrzená glykosylační místa a zvyrazněné cysteiny tvořící disulfidy.**

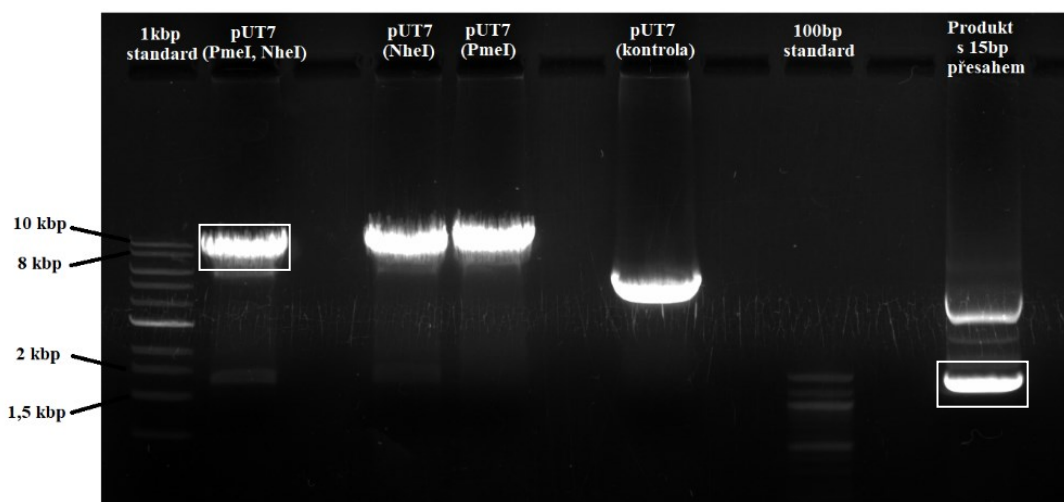
Vektor pUT7 byl linearizován pomocí dvou restričních endonukleas PmeI a NheI. Do linearizovaného vektoru byl vložen amplifikovaný gen pro myší NKR-P1C. Pro PCR amplifikaci NKR-P1C byly navrženy primery s přesahem. Přesah v 15 bp byl potřeba pro vložení inzertu do vektoru metodou klonování nezávislého na ligaci a sekvenci, která využívá principu komplementarity nukleových bází (obrázek 8, str. 39).

**Přímý pYC5K\_FW:** AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGAGACAGAC

**Reverzní pYC5\_REV:** CTGATCAGCGGGTTTTTCGGGGGATCAGGTACC

**Obrázek 8. Navržené primery pro PCR reakci.** Přesahy jsou vyznačené modře.

Restrikční endonukleasy použité pro linearizaci tvoří různý typ konců u DNA. PmeI štěpí dvojvlákno tak, že vzniká tupý konec, NheI tvoří lepivý konec. Pro kontrolu, zda jsou enzymy stále aktivní, byly vytvořeny dvě reakční směsi obsahující jen jeden enzym. Po provedení linearizace a PCR reakce byly všechny vzorky DNA podrobeny agarosové elektroforéze. Výsledek elektroforézy je uveden na Obrázek 9, kde je vidět, že oba enzymy byly dobře schopné linearizovat plazmid. Také je vidět, že DNA odpovídající štěpenému vektoru je velikostně větší než nelinearizovaná forma vektoru. Restrikčně štěpený plazmid odpovídá přibližně 8 kb, kdežto neštěpený plazmid lze vidět na úrovni přibližně 4 kb. Je to dáno superšroubovicovým vinutím nelinearizovaného plazmidu, jenž dělá plazmid kompaktnější, a ten má jinou elektroforetickou pohyblivost, než linearizovaný plazmid.



**Obrázek 9: Agarosová elektroforéza DNA z restrikčního štěpení pUT7 a z PCR reakce pro konstrukt NKR-P1C.** Vzorky zleva doprava: 1 kb hmotnostní standard, pUT7 štěpený dvěma restrikčními endonukleasami, pUT7 štěpení jen PmeI, pUT7 štěpený jen NheI, 100 bp hmotnostní standard, PCR produkt s 15 bp přesahem.

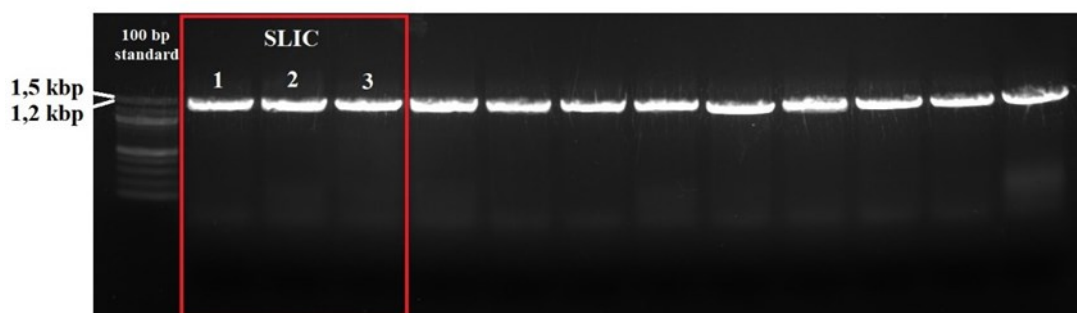
Po elektroforéze byly DNA fragmenty izolovány (jen u vektoru linearizovaného pomocí obou enzymů a PCR produktu) a koncentrace změřeny spektrofotometricky. Naměřené hodnoty pro vektor a inzert jsou uvedeny v tabulce 7 (str. 40).

**Tabulka 7: Koncentrace inzertu a linearizovaného pUT7 vektoru po izolaci z gelu.**

Složka	Koncentrace	A <sub>260/280</sub>
Linearizovaný pUT7	91,6 ng/μl	1,84
Inzert	41,8 ng/μl	1,90

### 5.1.2 PCR z kolonií a nízkoobjemová izolace plazmidové DNA

Po provedení SLIC reakce a transformace byly narostlé kolonie podrobeny PCR z kolonií, aby bylo zjištěno, které kolonie obsahují úspěšně klonovaný plazmid. Při vizualizaci výsledku klonování pomocí agarosové elektroforézy bylo zjištěno, že všechny vybrané kolonie byly pozitivní a obsahovaly genetickou informaci o přibližné velikosti 1,5 kb, což je v souladu s předpokládanou velikostí vzniklého konstruktů (obrázek 10).



**Obrázek 10: Výsledek elektroforézy v agarosovém gelu po PCR z kolonií.** Všechny vzorky byly pozitivní. Dráhy s označením 1, 2 a 3 obsahují vzorky pozitivních bakteriálních kolonií, které byly dále zpracovány pro minipreparaci plazmidové DNA a sekvenaci. Očekávaná velikost amplifikovaného produktu z pUT7\_NKR-P1C je přibližně 1,5 kb.

Ze trojice bakteriálních kolonií na jedné misce byly vybrány tři a podrobeny maloobjemové kultivaci. Dvě kultury byly zamrazeny jako záloha a z jedné kultury izolována DNA. Její koncentrace byla změřena spektrofotometricky. Hodnoty jsou vyneseny do tabulky 8.

**Tabulka 8: Koncentrace plazmidové DNA z nízkoobjemové produkce.**

Složka	Koncentrace	A <sub>260/230</sub>	A <sub>260/280</sub>
pUT7_NKR-P1C	285,7 ng/μl	2,26	1,88

Pro kontrolu získané plazmidové DNA byla provedena sekvenační reakce. Podle výsledků sekvenace byl plazmid využit pro tvorbu zásobního roztoku DNA.



### 5.1.3 Vysokoobjemová izolace plazmidové DNA

Následující krok velkoobjemové kultivace bakterií začínal transformací bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  plazmidem pUT7\_NKR-P1C s následnou extrakcí DNA z narostlé buněčné kultury. Výsledná koncentrace a čistota získaného roztoku DNA jsou uvedeny v tabulce 9.

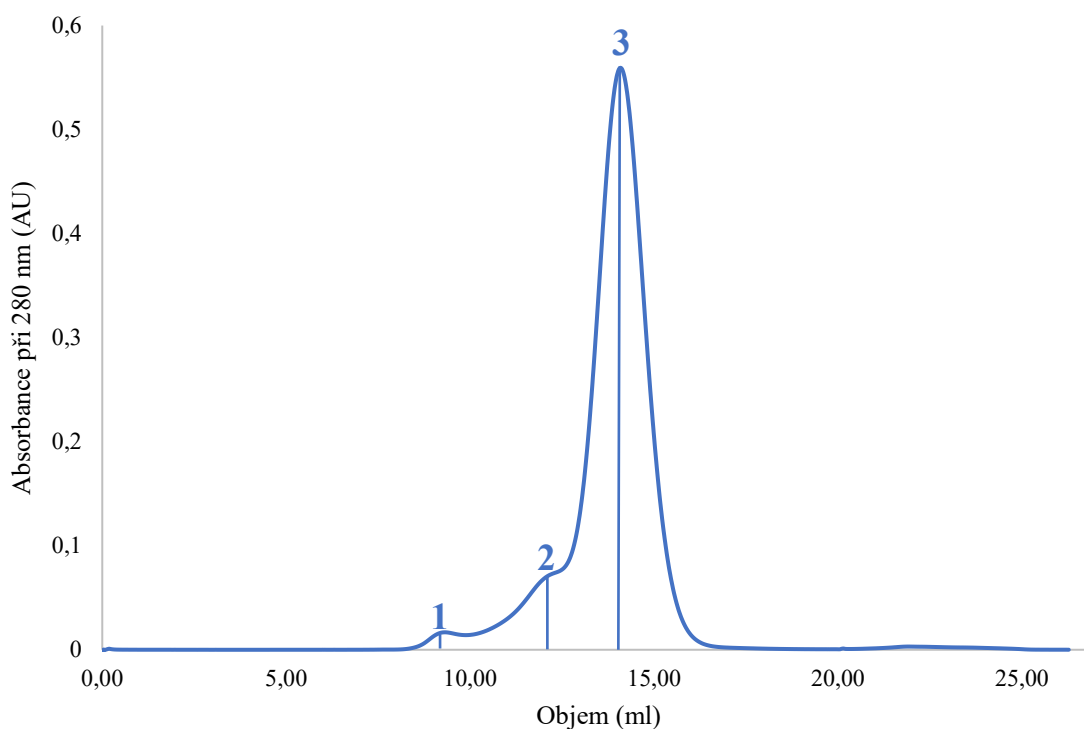
**Tabulka 9: Koncentrace zásobního roztoku plasmidovou DNA z velkoobjemové produkce.**

Složka	Koncentrace	A <sub>260/230</sub>	A <sub>260/280</sub>
pUT7_NKR-P1C	1,296 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,95	1,87

## 5.2 Produkce proteinu ve stabilně transfekované buněčné linii

### HEK293T

Stabilní transfekce do hostitelské DNA vložit gen zájmu pomocí tří plazmidů. Tyto tři plazmidy jsou součástí transposonového systému PiggyBac. První z nich nese gen pro transposasu, která rozpoznává určité nukleotidové sekvence a trvalé integruje úseky DNA do hostitelské. Druhý plazmid PB-RB pak nese selekční marker a doxycyklinový transaktivátor pro expresi proteinu. Třetí plazmid pak nese gen zájmu. Transfekce se prováděla v eukaryotické buněčné linii HEK293T, která má schopnost glykosylovat exprimované proteiny, což je vhodné pro studium proteinových ligandů a jejich interakcí s příslušnými proteiny. Protein byl nejprve purifikován afinitní chromatografií na proteinu A, kde bylo využito toho, že konstrukt obsahoval Fc-fragment lidského IgG. Kvůli vysokému výtěžku a obav z možné precipitace byly proteinové frakce z afinitní chromatografie rozděleny do tří skupin, koncentrovány do výsledného objemu 500  $\mu\text{l}$  a následně purifikovány pomocí gelové permeační chromatografie. Gelová permeační chromatografie byla provedena na chromatografickém systému ÄKTAbasic s kolonou Superdex 200 10/300 GL. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min, množství sbíraného proteinu ve frakcích bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Reprezentativní chromatogram gelové permeační chromatografie je uveden na obrázku 11 (str. 42). Objem sbíraných frakcí činil 1 ml.



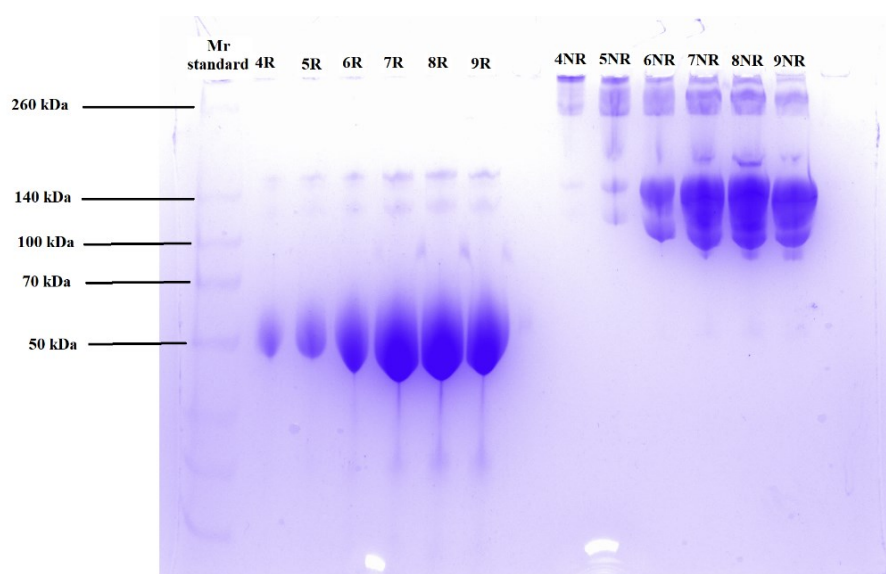
**Obrázek 11: Chromatogram z gelové permeační chromatografie.** Byla použita kolona Superdex 200 10/300 GL. První pík označuje signál v mrtvém objemu kolony, druhý pík možný dimer celého Fc-fúzního konstruktu a třetí pík monomer celého Fc fúzního konstruktu Fc-NKR-P1C.

Na základě aminokyselinové sekvence NKR-P1C byl spočítán jeho extinkční koeficient, který byl roven  $144655 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , a také molekulová hmotnost, která byla přibližně rovná 91 kDa (pro Fc-fúzní NKR-P1C, který dimerizuje skrz sekvenci Fc fragmentu). Celkový výtěžek proteinu po purifikace činil přibližně 125 mg. Přechištění proteinu bylo úspěšné, u sbíraných frakcí byla následně spektrofotometricky změřena koncentrace a poměr absorbance při 260 a 280 nm. Koncentrace jednotlivých frakcí jsou uvedeny v tabulce 10.

**Tabulka 10: Koncentrace proteinových frakcí po gelové permeační chromatografii.**

Frakce	Koncentrace (mg/ml)	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>
4	0,095	0,1672	0,3701
5	0,153	0,2677	0,5874
6	0,633	1,1092	1,0832
7	1,257	2,2043	0,5492
8	1,078	1,8893	0,5203
9	0,166	0,2914	0,4731

Proteinové frakce byly následně podrobeny SDS elektroforéze v redukujícím a neredukujícím prostředí. Očekávaná molekulová hmotnost monomerního proteinu podle jeho aminokyselinové sekvence činí 45,5 kDa a 91 kDa pro dimerní formu v neredukujícím prostředí. Důležité je, že tento NKR-P1C konstrukt má tři předpokládaná místa pro glykosylaci plus jedno na Fc fragmentu. Různé glykany se pak liší svojí molekulovou hmotností. U monomerů NKR-P1C pak lze očekávat, že protein se může jevit jako protein až o velikosti  $4 \times 0 - 4$  kDa větší než protein bez glykosylace, u dimerů pak lze najít glykosylované formy NKR-P1C větší až o  $8 \times 0 - 4$  kDa. Výsledek SDS elektroforézy je uveden na obrázku 12.



**Obrázek 12: Výsledek elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS.** Dráhy zleva doprava: Mr, standard molekulových hmotností; proteinové frakce 4. až 9. v redukujícím prostředí; proteinové frakce 4. až 9. v neredukujícím prostředí.

## 6 Diskuse

Cílem této práce byla produkce myšního receptorového NKR-P1C proteinu. Po přípravě vektoru s genem pro expresi Fc(IgG)-fúzního NKR-P1C receptoru a následné stabilní transfekci buněčné linie HEK293T a expresi byl protein purifikován chromatografickými metodami, afinitní a gelové permeační chromatografie. Následně byla pomocí polyakrylamidové elektroforézy ověřena čistota proteinu.

Rekombinantně připravený protein byl exprimován v eukaryotní buněčné linii HEK293T, která se vyznačuje svojí schopností přirozené glykosylace proteinu. Tato buněčná linie dovoluje exprimovat proteiny pro další studium jejich chování například v prostředí ligandu, což bude navazovat na tuto práci v dalším studiu. V důsledku toho, že fúzní konstrukt NKR-P1C obsahuje sekreční signál, byl veškerý protein sekretován do kultivačního média. Snaha o provedení stabilní transfekce byla podmíněna malým výtěžkem proteinu při tranzientní transfekci v minulosti. Rozdíl v množství produkovaného proteinu pomocí těchto dvou metod je obrovský. Tranzientní transfekce NKR-P1C myšního proteinu před osmi lety poskytla 1,4 mg, zatímco stabilní transfekce přibližně 125 mg proteinu z jedné produkce [53].

Po expresi byl protein nejprve podroben afinitní chromatografii na proteinu A a eluován kyselým prostředím citrátového pufru. Frakce byly sbírány do zkumavek s neutralizačním pufrům, který úspěšně zabránil sražení proteinu.

Frakce 4 – 9 po gelové permeační chromatografii byly podrobeny analýze SDS-PAGE. Gel byl zjevně přetížen množstvím aplikovaného proteinu, v důsledku čehož nejsou na gelu dobře definované proužky odpovídající formám proteinu o konkrétní proteinové velikosti. Signál zároveň odpovídá množství proteinu z chromatogramu na obrázku 11 (str. 42). V neredukujícím prostředí (obrázek 12, str. 43) drží protein svojí dimerní formu o velikosti přibližně 91 kDa. Lze si však všimnout, že je na gelu vidět jen minimum proužků, odpovídajících hmotnosti 95–100 kDa. Je to pravděpodobně dáno glykosylací receptoru na několika potenciálních místech. (obrázek 7, str. 38). Většinu proteinu v neredukujícím prostředí (dráhy 8–13) lze vidět na úrovni hmotnostního standardu odpovídajícího 140 kDa, což může být dáno glykosylací, případně neideální elektroforetickou mobilitou. Také se lze všimnout, že se v daných dráhách objevují i další pruhy o větších hmotnostech, které jsou pravděpodobně agregáty celého proteinu.

V redukujícím prostředí lze vidět, že většina proteinu byla redukována do monomerní formy, která má velikost okolo 45,5 kDa, což je v naprostém souladu s tím, co je vidět na gelu. Objevují se zde ovšem u další formy proteinu o velikostech okolo 140 kDa, které

mohou být kontaminující proteiny, nebo pravděpodobněji glykosylované dimery, které nebyly dokonale redukovány. Pro lepší rozlišení se nabízí nižší nanáška při dalším provedení SDS-PAGE a také delší doba inkubace proteinu v redukujícím prostředí.

V budoucnu bude produkován protein využit pro hledání jeho přirozeného ligandu pomocí průtokové cytometrie. Dále bude provedena stabilní transfekce linie HEK293S GnTI, která má vyřazený gen pro *N*-acetylglucosaminyltransferasu I a nemůže tak tvořit složité *N*-glykany. Tento typ eukaryotních buněk exprimuje proteiny bez složité glykosylace, což je vhodné pro proteinovou krystalografii v navazujícím studiu.

## 7 Závěr

- Byl připraven expresního vektor Fc-fúzního myšího receptoru NKR-P1C.
- Receptor byl úspěšně exprimován ve stabilně transfekované linii HEK293T.
- Protein byl purifikován pomocí afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie s vysokým výtěžkem.
- Fc-fúzní NKR-P1C bylo analyzováno SDS-PAGE, kde byla potvrzena jeho čistota.

## 8 Použitá literatura

- 1 Hořejší, V., Bartuňková, J., Brdička, T. and Špišek, R. (2017) *Základy imunologie*. Triton, Praha.
- 2 Jílek, P. (2019) *Imunologie stručně, jasně, přehledně*, Grada Publishing, a.s., Praha.
- 3 Parkin, J. and Cohen, B. (2001) An overview of the immune system. *The Lancet*, Elsevier **357**, 1777–1789.
- 4 Rieger, M. A. and Schroeder, T. (2012) Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a008250.
- 5 K. Abbas, A., H. Lichtman, A. and Pillai, S. (2022) *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Science & Technology, Washington.
- 6 Kaifu, T., Escalière, B., Gastinel, L. N., Vivier, E. and Baratin, M. (2011) B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3531–3539.
- 7 Vivier, E., Di Santo, J. and Moretta, A. (2016) *Natural Killer Cells*, Springer International Publishing, Cham.
- 8 O'Brien, K. L. and Finlay, D. K. (2019) Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 282–290.
- 9 Quatrini, L., Della Chiesa, M., Sivori, S., Mingari, M. C., Pende, D. and Moretta, L. (2021) Human NK cells, their receptors and function. *Eur. J. Immunol.* **51**, 1566–1579.
- 10 Cantoni, C., Wurzer, H., Thomas, C. and Vitale, M. (2020) Escape of tumor cells from the NK cell cytotoxic activity. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 1339–1360.
- 11 Wu, S. Y., Fu, T., Jiang, Y. Z. and Shao, Z. M. (2020) Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol. Cancer* **19**, 120.
- 12 Khan, M., Arooj, S. and Wang, H. (2020) NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. *Front. Immunol.* **11**, 167.
- 13 Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S. L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., Moretta, A. and Münz, C. (2004) The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *J. Immunol.* **172**, 1455–1462.
- 14 Sojka, D. K., Yang, L. and Yokoyama, W. M. (2019) Uterine Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* **10**, 960.
- 15 Koopman, L. A., Kopcow, H. D., Rybalov, B., Boyson, J. E., Orange, J. S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C. J., Schachter, A. D., Park, P. J., et al. (2003) Human Decidual Natural Killer Cells Are a Unique NK Cell Subset with Immunomodulatory Potential. *J. Exp. Med.* **198**, 1201–1212.
- 16 Peng, H. and Tian, Z. (2016) Tissue-resident natural killer cells in the livers. *Sci. China Life Sci.* **59**, 1218–1223.
- 17 Cruz-Muñoz, M. E., Valenzuela-Vázquez, L., Sánchez-Herrera, J. and Santa-Olalla Tapia, J. (2019) From the "missing self" hypothesis to adaptive NK cells: Insights of NK cell-mediated effector functions in immune surveillance. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 955–971.

- 18 Konjević, G. M., Vuletić, A. M., Mirjačić Martinović, K. M., Larsen, A. K. and Jurišić, V. B. (2019) The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine*. **117**, 30–40.
- 19 Becker, P. S. A. (2016) Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 477-484.
- 20 Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S. and Malarkannan, S. (2018) Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* **9**, 1869.
- 21 Grudzien, M. and Rapak, A. (2018) Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. *J. Immunol. Res.* **2018**, 4868417.
- 22 Mesci, A., Ljusic, B., Makrigiannis, A. P. and Carlyle, J. R. (2006) NKR-P1 Biology: From Prototype to Missing Self. *Immunol. Res.* **35**, 13–26.
- 23 Shaffer, B. C. and Hsu, K. C. (2016) How important is NK alloreactivity and KIR in allogeneic transplantation?. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **29**, 351–358.
- 24 Masuda, K. and Kawamoto, H. (2021) Possible NK cell-mediated immune responses against iPSC-derived cells in allogeneic transplantation settings. *Inflamm. Regen.* **41**, 2.
- 25 Wang, W., Guo, H., Geng, J., Zheng, X., Wei, H., Sun, R. and Tian, Z. (2014) Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *J. Biol. Chem.* **289**, 33311–33319.
- 26 Nordquist, H. and Jamil, R. T. (2022) *Biochemistry, HLA Antigens*. Stat. Pearls Publishing, Treasure Island.
- 27 Hurley, C. K., Kempenich, J., Wadsworth, K., Sauter, J., Hofmann, J. A., Schefzyk, D., Schmidt, A. H., Galarza, P., Cardozo, M. B. R., Dudkiewicz, M., et al. (2020) Common, intermediate and well-documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0. *HLA*. **95**, 516–531.
- 28 Hamby, K., Trexler, A., Pearson, T. C., Larsen, C. P., Rigby, M. R. and Kean, L. S. (2007) NK cells rapidly reject allogeneic bone marrow in the spleen through a perforin- and Ly49D-dependent, but NKG2D-independent mechanism. *Am. J. Transplant.* **7**, 1884–1896.
- 29 Sivori, S., Vacca, P., Del Zotto, G., Munari, E., Mingari, M. C. and Moretta, L. (2019) Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 430–441.
- 30 Reichert J.M. (2014) Antibody Fc : Linking Adaptive and Innate Immunity. *MAbs*. **6**, 619–621.
- 31 Cheng, Z. F., Li, H. K., Yang, H. P., Lee, C. Y., Tang, S. W., Lin, Y. L. and Hsiao, S. C. (2021) A novel endogenous CD16-Expressing Natural Killer Cell for cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Rep.* **26**, 100935.
- 32 Prager, I. and Watzl, C. (2019) Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 1319–1329.
- 33 Kumar, S. (2018) Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*. **154**, 383–393.
- 34 Geer, M. J., van Geffen, J. P., Gopalasingam, P., Vögtle, T., Smith, C. W., Heising, S., Kuijpers, M. J. E., Tullemans, B. M. E., Jarvis, G. E., Eble, J. A., et al. (2018)



- Uncoupling ITIM receptor G6b-B from tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 disrupts murine platelet homeostasis. *Blood*. **132**, 1413–1425.
- 35 Wu, W., Zhou, Q., Masubuchi, T., Shi, X., Li, H., Xu, X., Huang, M., Meng, L., He, X., Zhu, H., et al. (2020) Multiple Signaling Roles of CD3 $\epsilon$  and Its Application in CAR-T Cell Therapy. *Cell*. **182**, 855–871.
- 36 Crute, B. W., Sheraden, R., Ott, V. L., Harley, I. T. W., Getahun, A. and Cambier, J. C. (2020) Inhibitory Receptor Trap: A Platform for Discovery of Inhibitory Receptors That Utilize Inositol Lipid and Phosphotyrosine Phosphatase Effectors. *Front. Immunol.* **11**, 592329.
- 37 Cella, M., Fujikawa, K., Tassi, I., Kim, S., Latinis, K., Nishi, S., Yokoyama, W., Colonna, M. and Swat, W. (2004) Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **200**, 817–823.
- 38 Chan, G., Hanke, T. and Fischer, K. D. (2001) Vav-1 regulates NK T cell development and NK cell cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2403–2410.
- 39 Kirkham, C. L. and Carlyle, J. R. (2014) Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrbl:Clec2) Recognition Systems. *Front. Immunol.* **5**, 214.
- 40 Rogers, S. L. and Kaufman, J. (2016) Location, location, location: the evolutionary history of CD1 genes and the NKR-P1/ligand systems. *Immunogenetics*. **68**, 499–513.
- 41 Sovová, Z., Kopecký, V., Pazderka, T., Hofbauerová, K., Rozbeský, D., Vaněk, O., Bezouška, K. and Etrich, R. (2011) Structural analysis of natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) extracellular domains suggests a conserved long loop region involved in ligand specificity. *J. Mol. Model.* **17**, 1353–1370.
- 42 Zhang, Q., Rahim, M. M. A., Allan, D. S. J., Tu, M. M., Belanger, S., Abou-Samra, E., Ma, J., Sekhon, H. S., Fairhead, T., Zein, H. S., et al. (2012) Mouse Nkrp1-Clr Gene Cluster Sequence and Expression Analyses Reveal Conservation of Tissue-Specific MHC-Independent Immunosurveillance. *PLoS ONE*. **7**, e50561.
- 43 Aust, J. G., Gays, F., Mickiewicz, K. M., Buchanan, E. and Brooks, C. G. (2009) The expression and function of the NKRP1 receptor family in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* **183**, 106–116.
- 44 Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* **263**, 9557–9560.
- 45 Hao, L., Klein, J. and Nei, M. (2006) Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3192–3197.
- 46 Chiffolleau, E. (2018) C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets. *Front. Immunol.* **9**, 227.
- 47 Hu, Y. S., Zhou, H., Myers, D., Quinn, J. M. W., Atkins, G. J., Ly, C., Gange, C., Kartsogiannis, V., Elliott, J., Kostakis, P., et al. (2004) Isolation of a human homolog of osteoclast inhibitory lectin that inhibits the formation and function of osteoclasts. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **19**, 89–99.

- 48 Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H. and Yokoyama, W. M. (2003) Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nat. Immunol.* **4**, 801–807.
- 49 Kolenko, P., Rozbeský, D., Vaněk, O., Bezouška, K., Hašek, J. and Dohnálek, J. (2011) Structure of the H107R variant of the extracellular domain of mouse NKR-P1A at 2.3 Å resolution. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 1519–1523.
- 50 Ljutic, B., Carlyle, J. R. and Zúñiga-Pflücker, J. C. (2003) Identification of Upstream cis-Acting Regulatory Elements Controlling Lineage-specific Expression of the Mouse NK Cell Activation Receptor, NKR-P1C. *J. Biol. Chem., Elsevier.* **278**, 31909–31917.
- 51 Rozbesky, D., Sovova, Z., Marcoux, J., Man, P., Ettrich, R., Robinson, C. V. and Novak, P. (2013) Structural model of lymphocyte receptor NKR-P1C revealed by mass spectrometry and molecular modeling. *Anal. Chem.* **85**, 1597–1604.
- 52 Ljutic, B., Carlyle, J. R., Filipp, D., Nakagawa, R., Julius, M. and Zúñiga-Pflücker, J. C. (2005) Functional requirements for signaling through the stimulatory and inhibitory mouse NKR-P1 (CD161) NK cell receptors. *J. Immunol.* **174**, 4789–4796.
- 53 Pucholtová, H. (2014) Produkce myšního NK buněčného receptoru NKR-P1C a hledání jeho ligandu, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.

