

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Jakub Jeníček

Příprava vazebné domény proteinu B7-H6 s vysokou afinitou

Preparation of the high-affinity binding domain of protein B7-H6

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze dne 19. 5. 2023

.....

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěl poděkovat RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za možnost pracovat v jím vedené laboratoři a vypracovávat tuto bakalářskou práci pod jeho vedením. Neméně pak děkuji Mgr. Ondřeji Skořepovi, Ph.D. za trpělivost, toleranci, laskavé vedení a ochotu mi vždy cokoli vysvětlit během mé práce v laboratoři. Dále bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře za pomoc a cenné rady. V poslední řadě bych pak chtěl vyjádřit své díky mé rodině, která mne za všech okolností podporovala a vždy mi byla oporou. Bez pomoci všech jmenovaných bylo nebylo možné, aby tato práce vznikla.

ABSTRAKT

Přírozeně zabijácké buňky jsou součástí přirozené imunity a hrají důležitou roli při ochraně organismu. Zásadní jsou v obraně před nádorovými onemocněními a případně v protinádorové terapii. Proto jsou tyto buňky dlouhodobě předmětem mnoha výzkumů, neboť nádorová onemocnění představují celosvětově jednu z nejčastějších příčin úmrtí. Léčba těchto onemocnění bývá často složitá a invazivní, a proto je výhodné hledat nové terapeutické přístupy, které by využívaly již existující obranné mechanismy.

Jedním z klíčových mechanismů, který NK buňky využívají pro rozpoznávání nádorových buněk a jejich eliminaci je receptor NKp30. Tento receptor může po vazbě aktivačního ligandu vyvolat cytotoxickou odpověď, která vede k likvidaci nádorové buňky. Jedním z aktivačních ligandů tohoto receptoru je protein B7-H6, jenž se přirozeně vyskytuje na povrchu buněk některých nádorů. Přesná podstata interakce B7-H6 a NKp30 však není dosud dokonale popsána. Tato práce se zabývá různými metodami přípravy fluorescenčně značené domény B7-H6, která by umožňovala vizualizaci receptoru NKp30 na povrchu buněk, čímž by přispěla k lepšímu popisu interakce těchto molekul.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňky, NKp30, B7-H6, sortasa A, HEK293

ABSTRACT

Natural killer cells are part of innate immunity and play a key role in defending the organism. Their role in the defense against tumors and anti-tumor therapy has been the subject of multiple research projects because tumors are among the most frequent causes of death worldwide. Tumor therapy is often complicated and invasive; therefore, finding new therapeutic approaches that target naturally occurring defense mechanisms is advantageous.

One of the key mechanisms used by NK cells to recognize tumor cells and eliminate them is signaling via their receptor NKp30. The binding of an activation ligand to this receptor can induce the activation of a cytotoxic response, leading to the elimination of the tumor cell. One of the activating ligands that can bind to NKp30 is B7-H6, a cell surface protein found on certain types of tumors. However, the interaction between B7-H6 and NKp30 has not been wholly described yet. This thesis focuses on different methods, which can be used for obtaining the B7-H6 domain bearing a fluorescent label, that could be used to visualize NKp30 on the cell surface, thus allowing for further description of the interaction between these molecules.

KEY WORDS

NK cells, NKp30, B7-H6, sortase A, HEK293

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(v/v)	Objemový podíl (z angl. volume/volume)
(w/v)	Hmotnost/objem (z angl. weight/volume)
(w/w)	Hmotnostní podíl (z angl. weight/weight)
AA	Akrylamid
ADCC	Buněčná cytotoxicita závislá na protilátce (z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity)
AF647	Alexa Fluor 647, fluorescenční barvivo
aFGF	Kyselý růstový faktor fibroblastů (z angl. acidic fibroblast growth factor)
AICL	Aktivací indukovaný lektin typu C (z angl. activation-induced C-type lectin)
AP	Alkalická fosfatasa (z angl. alkaline phosphatase)
APC	Antigen prezentující buňka (z angl. antigen presenting cell)
APS	Peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
B ₂ Srt_YWY	Konstrukt B7-H6 s vysokou afinitou a zásahovým místem pro sortasu A
B7-H6	Protein exprimovaný na povrchu některých nádorů, aktivační ligand receptoru NKp30 (z angl. B7 homologue 6)
BAG-6/BAT3	Transkript 3 příbuzný HLA-B (z angl. HLA-B associated transcript 3)
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BCR	Receptor B-lymfocytů (z angl. B-cell receptor)
BiTE	Bispecifická protilátka aktivující T-lymfocyty (z angl. bispecific T-cell engager)
BLI	Interferometrie na biovrstvě (z angl. bio-layer interferometry)
bp	Pár bází, jednotka délky DNA
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CD	Diferenciační skupina (z angl. cluster of differentiation)
CDK	Cyklin dependentní kinasa
CDR	Komplementaritu určující oblast (z angl. complementarity-determining region)
CTLR	Receptor podobný lektinu typu C (z angl. C-type lectin-like receptor)
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti

DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Směs deoxynukleotidtrifosfátů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
Fc	Krystalizovatelný fragment protilátky (z angl. fragment crystallizable)
FcR γ	Běžný Fc receptor gama
Gal-3	Galektin-3
GM-CSF	Stimulační faktor kolonií granulocytů a makrofágů (z angl. granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
HCMV	Lidský cytomegalovirus (z angl. human cytomegalovirus)
HEK293S GnTI ⁻	Buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk (z angl. human embryonic kidney), postrádá NAG-transferasu I
HEK293T	Buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk (z angl. human embryonic kidney)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HER-2	Lidský receptor epiteliálního růstového faktoru 2 (z angl. human epithelial growth factor receptor 2)
HLA	Antigen lidských leukocytů (z angl. human leukocyte antigen)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulin, též protilátka
IL	Interleukin
IPA	Isopropanol (z angl. isopropyl alcohol)
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
ITAM	Imunoreceptorový aktivační motiv založený na tyrosinu (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITC	Izotermální titrační kalorimetrie (z angl. isothermal titration calorimetry)
ITIM	Imunoreceptorový inhibiční motiv založený na tyrosinu (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)
KIR	Receptor NK buněk podobný imunoglobulinu (z angl. killer-cell immunoglobulin-like receptor)
LB	Živné médium (z angl. lysogeny broth)
LBD	Vazebná doména (z angl. ligand-binding domain)

LFA-1	Antigen spojený s funkcí lymfocytů 1 (z angl. lymphocyte function-associated antigen 1)
IPEI	Lineární polyethylenimin
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
MICA	Sekvence A příbuzná polypeptidu MHC I (z angl. MHC class I polypeptide-related sequence A)
NAG	N-acetylglukosamin
NBT	Nitro-blue tetrazolium
NCR	Receptor přirozené cytotoxicity (z angl. natural cytotoxicity receptor)
NK buňka	Přirozeně zabíjácká buňka (z angl. natural killer)
NKG2	Receptor NK buněk skupiny 2 (z angl. natural killer group 2)
NKp30	Receptor přirozeně zabíjáckých buněk (z angl. natural killer protein 30)
PBS	Fosfátem pufovaný solný roztok (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PDGF-DD	Růstový faktor DD, odvozený od destiček (z angl. platelet-derived growth factor DD)
PES	Polyethersulfon
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid (z angl. phenylmethanesulphonyl fluoride)
PPCO	Polypropylen kopolymer (z angl. polypropylene copolymer)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
scFv	Jednořetězový variabilní fragment (z angl. single-chain fragment variable)
SDS	Dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
SEC	Gelová permeační chromatografie (z angl. size-exclusion chromatography)
Siglec-7	Kyselinu sialovou vážící lektin 7 podobný imunoglobulinu (z angl. sialic acid-binding Ig-like lectin 7)
SOB	Super optimální živné médium (z angl. super optimal broth)
TAE	Tris-octan-EDTA pufr (z angl. Tris-acetate-EDTA)

TAMRA	5-karboxytetramethylrhodamin
TBS	Solný roztok pufovaný pomocí Tris (z angl. Tris buffered saline)
TCR	Receptor T-lymfocytů (z angl. T-cell receptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy alfa (z angl. tumor necrosis factor alpha)
TRE	Tetracyklinový responsní element
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VPA	Kyselina valproová (z angl. valproic acid)

OBSAH

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Klíčová slova	4
Abstract.....	5
Key words	5
Seznam použitých zkratek	6
1 Teoretický úvod	12
1.1 Imunitní systém	12
1.1.1 Základní členění.....	12
1.1.2 Adaptivní imunita	12
1.1.3 Vrozená imunita.....	14
1.1.4 Charakteristické vlastnosti NK buněk	15
1.1.5 Rozpoznávání.....	16
1.1.6 Mechanismus cytotoxicity	17
1.2 Receptory NK buněk.....	18
1.2.1 Inhibiční receptory	19
1.2.2 Aktivační receptory.....	20
1.3 NKp30 a jeho ligandy	22
1.3.1 NKp30	22
1.3.2 B7-H6	23
1.3.3 Role interakce B7-H6 a NKp30 v rakovině.....	24
1.4 Strukturní biochemie receptoru NKp30	25
1.4.1 Glykosylace.....	25
1.4.2 Stonek	26
1.4.3 Oligomerizace.....	26
1.5 Další směry výzkumu.....	27
2 Cíle práce	30
3 Materiál	31
3.1 Přístroje a pomůcky.....	31
3.2 Použité chemické látky.....	32
3.3 Enzymy.....	35
3.4 Připravené roztoky	35
3.5 Komerční soupravy	36
3.6 Použité vektory.....	36
3.7 Použité primery	36
3.8 Bakteriální kmeny a buněčné linie	37
4 Metody	38
4.1 Rekombinantní exprese proteinu B2Srt_YWY	38
4.1.1 Amplifikace genu pomocí polymerasové řetězové reakce	38
4.1.2 Elektroforéza v agarosovém gelu.....	38
4.1.3 Extrakce a přečištění DNA	39
4.1.4 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu pTW5sec	39
4.1.5 Transformace kompetentních bakterií plazmidem pTW5sec_B2Srt_YWY ..	40
4.1.6 Detekce plazmidu pTW5sec_B2Srt_YWY v koloniích.....	40
4.1.7 Nízkoobjemová produkce plazmidu pTW5sec_B2Srt_YWY	41
4.1.8 Ověření sekvence plazmidu pTW5sec_B2Srt_YWY	42
4.1.9 Velkoobjemová příprava plazmidu pTW5sec_B2Srt_YWY.....	42
4.1.10 Transientní transfekce buněk HEK293T	43

4.1.11 Purifikace proteinu.....	44
4.1.12 Analýza získaných proteinů.....	45
4.1.13 Linearizace plazmidu pUT7.....	46
4.1.14 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu pUT7.....	46
4.1.15 Transformace kompetentních bakterií plazmidem pUT7_B2Srt_YWY.....	47
4.1.16 Detekce plazmidu v koloniích pomocí PCR.....	47
4.1.17 Elektroforéza v agarosovém gelu.....	47
4.1.18 Nízkoobjemová příprava plazmidu pUT7_B2Srt_YWY.....	47
4.1.19 Ověření sekvence plazmidu pUT7_B2Srt_YWY.....	47
4.1.20 Středněobjemová příprava plazmidu pUT7_B2Srt_YWY.....	48
4.1.21 Tvorba stabilní linie buněk HEK293T pro produkci proteinu B2Srt.....	48
4.1.22 Produkce proteinu B2Srt_YWY ve stabilní linii buněk HEK293T.....	49
4.1.23 Purifikace proteinu B2Srt_YWY.....	49
4.1.24 Analýza frakcí pomocí SDS-PAGE.....	49
4.2 Produkce enzymu Sortasy A (7+) bakteriálním expresním systémem.....	50
4.2.1 Transformace kompetentních bakterií plazmidem pET30b_7+SrtA.....	50
4.2.2 Velkoobjemová produkce plazmidu pET30b_7+SrtA.....	50
4.2.3 Transformace kompetentních bakterií plazmidem pET30b_7+SrtA.....	50
4.2.4 Velkoobjemová produkce Sortasy A (7+).....	50
4.2.5 Purifikace Sortasy A (7+).....	51
4.3 Transpeptidasová reakce katalyzovaná Sortasou A (7+).....	51
4.3.1 Příprava reakční směsi.....	51
4.3.2 Analýza reakční směsi pomocí SDS-PAGE.....	51
4.3.3 Detekce produktů reakce metodou Western Blot.....	51
4.4 Izotermická titrační kalorimetrie.....	52
4.5 Nespecifické značení proteinu B7-H6_IWY.....	53
4.6 Analytická gelová permeační chromatografie.....	54
5 Výsledky.....	55
5.1 Rekombinantní exprese proteinu B2Srt_YWY pomocí transientní transfekce.....	55
5.1.1 Příprava plazmidu pTW5sec_B2Srt_YWY.....	55
5.1.2 Purifikace proteinu B2Srt_YWY.....	56
5.1.3 Analýza získaného proteinu pomocí SDS-PAGE.....	57
5.2 Rekombinantní exprese proteinu B2Srt_YWY ve stabilní linii.....	58
5.2.1 Příprava plazmidu pUT7_B2Srt_YWY.....	58
5.2.2 Produkce proteinu ve stabilní linii HEK293T_B2Srt_YWY.....	59
5.3 Produkce enzymu Sortasy A (7+) v bakteriích.....	62
5.4 Enzymová reakce katalyzovaná Sortasou A (7+).....	62
5.5 Určení varianty B7-H6 s nejvyšší afinitou k NKp30.....	65
5.6 Nespecifické fluorescenční značení proteinu B7-H6_IWY.....	66
5.7 Analytická gelová permeační chromatografie.....	66
6 Diskuse.....	68
7 Závěr.....	72
Seznam použité literatury.....	73

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 IMUNITNÍ SYSTÉM

Lidské tělo je otevřený systém, který neustále přichází do kontaktu s obrovským množstvím cizích látek a organismů. Proto je životně důležité, aby organismus uměl rozpoznat škodlivé látky od prospěšných, patogenní organismy od symbiontů, či vlastní zdravé buňky od nakažených nebo poškozených. Klíčovou roli v tomto procesu hraje komplexní imunitní systém, který zajišťuje efektivní obranu organismu před vnějšími i vnitřními riziky.

1.1.1 ZÁKLADNÍ ČLENĚNÍ

Imunitní systém lze v základu rozdělit na dvě složky, vrozenou a adaptivní, které se vzájemně doplňují a úzce spolu kooperují [1, 2].

Vrozená imunita je evolučně starší mechanismus, který poskytuje nespecifickou ochranu proti široké škále různých látek a patogenů. Tento mechanismus zprostředkovává imunitní odpověď o stále stejné intenzitě, neboť se nijak neadaptuje na daný patogen. Často proto představuje první vlnu ochrany organismu při napadení.

Oproti tomu adaptivní imunita (jak již z názvu vyplývá) se přizpůsobuje jednotlivým látkám či patogenům, a proto při opakované expozici téže hrozbě dokáže poskytnout silnější odpověď, a tedy tuto hrozbu efektivněji eliminovat. Zároveň u nich dochází k vytváření tzv. „buněčné paměti“, která umožňuje specificky reagovat na již známé hrozby.

1.1.2 ADAPTIVNÍ IMUNITA

Adaptivní větev imunitního systému se vyznačuje specifitou reakce na jednotlivé podněty, kterou zprostředkovávají B-lymfocyty a T-lymfocyty [3]. Tyto buňky nesou na svém povrchu receptory, kterými rozpoznávají tzv. „antigeny“, tj. molekuly, které vazbou na receptor imunitních buněk dokážou vyvolat imunitní odpověď. Aby organismus dovedl správně rozeznávat nebezpečné látky od těla vlastních, přirozeně se vyskytujících molekul, musí nově vzniklé buňky adaptivní imunity projít tzv. klonální selekcí [4]. Na počátku tohoto procesu dojde k mutacím úseků genomu, které kódují tři variabilní části receptorů těchto buněk. Nově vzniklé buňky s unikátní kombinací složek receptorů pak prochází dvěma stupni kontroly, při níž je ověřeno, že dokážou rozpoznávat škodlivé

látky a zároveň chybně nenapadají zdravé buňky [5]. Těmito kontrolami projde asi 5 % nově vzniklých buněk, které poté putují do krve jako naivní lymfocyty [2].

1.1.2.1 T-LYMFOCYTY

T-lymfocyty se vyznačují přítomností T-buněčného receptoru (TCR, z angl. T-cell receptor) na své cytoplazmatické membráně, s jehož pomocí interagují s peptidy vázanými na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. major histocompatibility complex). Tento proces se nazývá prezentace antigenu a je zprostředkováván tzv. antigen prezentujícími buňkami (APC, z angl. antigen-presenting cells) [6]. Schopnost T-lymfocytů vázat se na molekuly MHC je závislá na (ne)přítomnosti koreceptorů TCR [7], kterými jsou CD8 (z angl. cluster of differentiation 8, tzn. protein diferenciační skupiny 8) a CD4, které umožňují rozpoznávání endogenních (CD8) či exogenních (CD4) peptidů vázaných na MHC. Nejčastěji exprimují T-lymfocyty pouze jeden z těchto koreceptorů, což určuje jejich funkci v organismu. Podle toho je dělíme na pomocné T-lymfocyty [exprimují CD4, pomáhají tak aktivaci B-lymfocytů (viz dále)] a cytotoxické (či zabijácké) T-lymfocyty (exprimují CD8 a mohou indukovat apoptózu cílové buňky). Aktivací se z těchto buněk stávají efektorové T-lymfocyty, které do svého okolí uvolňují interleukin-2 (IL-2), pomocí něhož dále stimulují aktivitu různých složek imunitního systému [8] a po eliminaci hrozby pak v organismu setrvávají jako tzv. paměťové T-lymfocyty, které umožňují rychlejší reakci při opakované expozici antigenu [9].

1.1.2.2 B-LYMFOCYTY

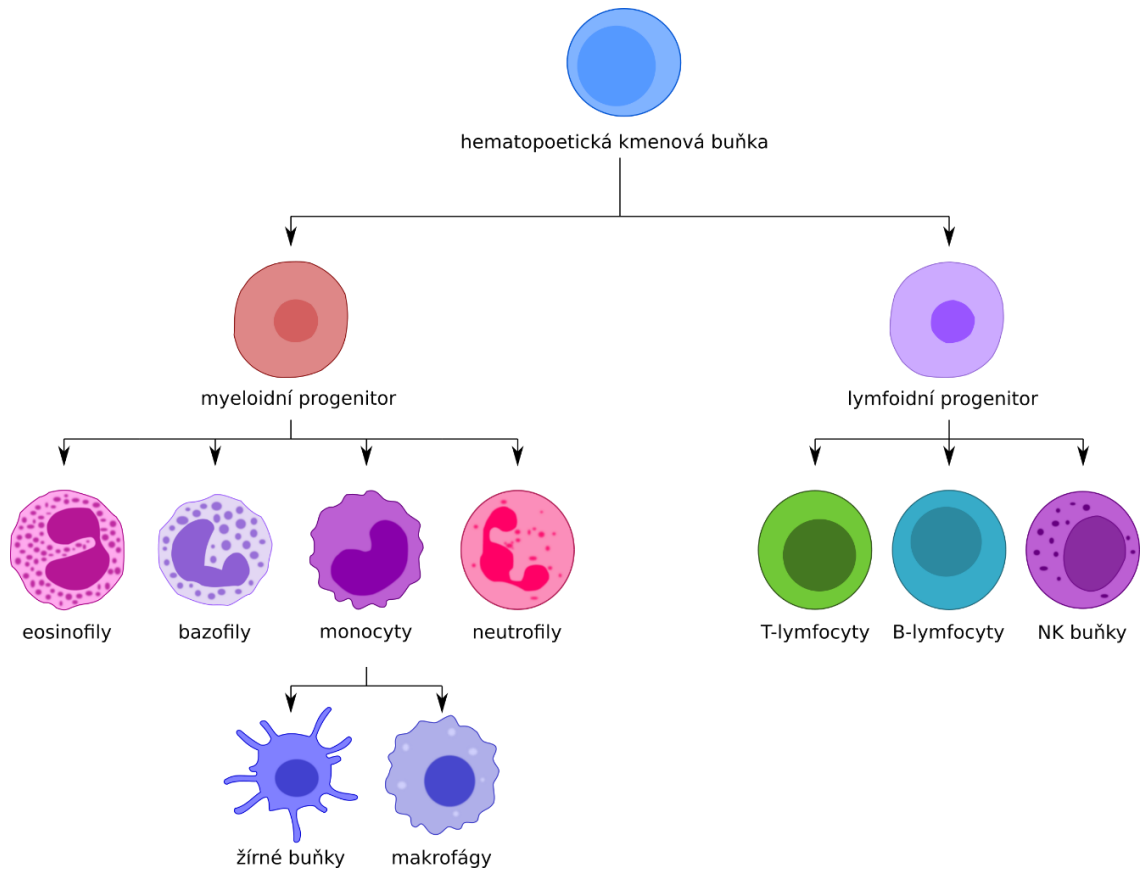
B-lymfocyty exprimují na svém povrchu B-buněčný receptor (BCR, z angl. B-cell receptor) [2, 10]. Jedná se o membránově vázaný imunoglobulin (Ig, nazývaný též protilátka), který se specificky váže na právě jeden antigen. Interakce protilátky s antigenem probíhá skrz variabilní domény, v jejichž genu dochází k výše zmíněné indukované mutaci. Při reakci s antigenem jej naivní B-lymfocyty pohltní pomocí endocytózy, degradují a vzniklé fragmenty se vážou na molekuly MHC II, které jsou vystaveny na povrchu buňky. Pomocný T-lymfocyt tyto molekuly rozeznává skrz TCR a následně skrz receptor CD40 aktivuje B-lymfocyt [11]. Takto aktivovaný B-lymfocyt se dále dělí, přičemž jedna část vzniklých klonů uvolňuje do svého okolí nízkoafinitní protilátky (nejčastěji IgM), zatímco druhá část putuje do lymfatických uzlin, kde z nich následně vznikají paměťové B-lymfocyty schopné produkovat vysokoafinitní protilátky (zpravidla IgG) proti danému antigenu [12].

1.1.3 VROZENÁ IMUNITA

Jak již bylo řečeno, vrozená imunita poskytuje stále stejně silnou odezvu na všechny signály, které zaznamenává [2]. Tento typ ochrany si jedinec nese již od narození a v průběhu jeho života se nemění. Systém vrozené imunity tvoří několik složek [13, 14], a to buněčná složka (viz dále), anatomické bariéry (zabraňují vstupu cizorodých látek dále do organismu, např. hlenová vrstva nosohltanu, či různé epiteliální buňky) a malé bioaktivní molekuly (zprostředkovávají vzájemnou komunikaci složek imunitního systému, působí prozánětlivě nebo se přímo vážou na patogen, např. cytokiny či složky komplementu).

Většina buněk vrozené imunity diferenciuje z myeloidního progenitoru, čímž vznikají žírné buňky, bazofily, eozinofily, neutrofilny a monocyty (z nichž později vznikají makrofágy nebo dendritické buňky). Do buněk vrozené imunity však řadíme i tzv. přirozeně zabíjäcké buňky (NK buňky, z angl. natural killer), které však na rozdíl od výše zmíněných buněk diferenciují z lymfoidního progenitoru. Schéma diferenciacce buněk imunitního systému je vyobrazeno na Obr. 1 (str. 15).

Při imunitní odpovědi pak buňky buď fagocytují (dendritické buňky) nebo uvolňují bioaktivní látky (bazofily, eozinofily). Makrofágy, neutrofilny a žírné buňky pak používají obě tyto strategie současně. Kromě zmíněných strategií rovněž komunikují se složkami adaptivní imunity, a to nejen uvolňováním zmíněných bioaktivních molekul, ale i přímým buněčným kontaktem. Ten zajišťují již zmíněné APC, mezi něž řadíme dendritické buňky, makrofágy a některé B-lymfocyty. Tyto buňky při procesu nazývaném prezentace antigenu pohlty cizorodou látku (resp. patogen) pomocí endocytózy (resp. fagocytózy) a po jejím rozložení na peptidové fragmenty a vazbě na molekuly MHC vystaví vzniklý komplex na své vnější membráně, kde jej rozeznávají T-lymfocyty.



Obrázek 1: Zjednodušené schéma diferenciace jednotlivých buněk imunitního systému. Způsob vyobrazení buněk (tvar a barva) neodpovídají realitě, nýbrž slouží pouze pro ilustraci. Na počátku stojí hematopoetická kmenová buňka, z níž může vzniknout jeden ze dvou progenitorů, myeloidní či lymfoidní. Z lymfoidního progenitoru vznikají diferenciální buňky adaptivní imunity (T-lymfocyty a B-lymfocyty) a NK buňky. Z myeloidního progenitoru pak diferenciují zbylé buňky vrozené imunity: eozinofily, bazofily, neutrofilny a monocyty. Poslední jmenované pak dále diferenciují buďto na makrofágy, anebo na žirné buňky. Obrázek byl převzat [15] a upraven.

1.1.4 CHARAKTERISTICKÉ VLASTNOSTI NK BUNĚK

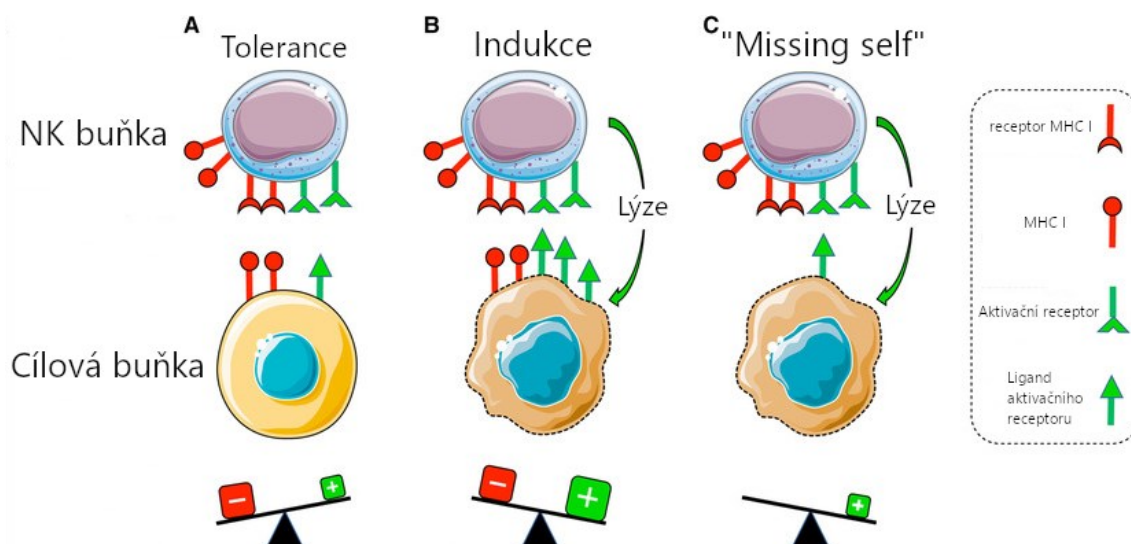
Zvláštní skupinou buněk imunitního systému jsou NK buňky. Tyto buňky stojí na pomezí vrozené a adaptivní imunity, jelikož nesou prvky typické pro obě větve imunitního systému. Protože se jedná o lymfocyty, které diferenciují z lymfoidního progenitoru [16], bylo by možné řadit NK buňky po boku B-lymfocytů a T-lymfocytů. Rovněž podobnost jejich chování se zabíjácými T-lymfocyty by podporovala tuto hypotézu. Nedávné studie navíc naznačují, že NK buňky si vytváří jistou formu buněčné paměti, podobně jako buňky adaptivní imunity [17, 18]. Po infekci některými viry (např. lidským cytomegalovirem) dojde ke dlouhodobému zvýšení počtu NK buněk nesoucích receptor NKG2C a zvýšení efektivity produkce některých cytokinů, např. interferonu gama (IFN- γ). Mechanismus paměti NK buněk však nebyl doposud zcela objasněn.

Na druhé straně však NK buňky nesou mnoho vlastností typických pro vrozenou imunitu. Předně u nich ve většině případů nedochází k žádné formě adaptace na hrozby, které eliminují, a tedy si nevytvářejí buněčnou paměť jako buňky adaptivní imunity. Výše popsané případy adaptace na hrozby jsou poměrně ojedinělé a nelze obecně prohlásit, že by se NK buňky adaptovaly na množství antigenů srovnatelné s B-lymfocyty a T-lymfocyty. Dále pak tyto buňky nijak neexprimují membránové receptory typické pro buňky adaptivní imunity (tj. TCR a BCR) [19].

1.1.5 ROZPOZNÁVÁNÍ

NK buňky jsou velké granulární lymfocyty. Jejich hlavní role v rámci imunitního systému je detekce poškození vlastních buněk a jejich eliminace. Tuto úlohu vykonávají společně s cytotoxickými T-lymfocyty [20], které rozeznávají endogenní antigeny vázané na MHC I, který je exprimován buď APC nebo napadenou buňkou organismu. Nežádá však dochází k narušení exprese MHC I (např. vlivem mutace či virové infekce), což T-lymfocytům znemožňuje správně rozeznávat a likvidovat tyto buňky [21]. K tomuto účelu slouží organismu právě NK buňky, které nerozpoznávají specifický antigen vázaný na MHC I, nýbrž reagují na (ne)přítomnost různých molekul (mj. i MHC I) na membránách buněk (tzv. „missing-self“ mechanismus) [22].

Při kontaktu buňky organismu s NK buňkou mohou nastat tři základní situace (viz Obr. 2, str. 17) [23]. Pokud se jedná o normální zdravou buňku, tak NK buňka dle přítomnosti MHC I a absence stresových molekul rozpozná, že danou buňku je žádoucí zachovat. Pokud cílová buňka neexprimuje MHC I v dostatečném množství, dojde k aktivaci NK buněčné cytotoxicity a daná buňka je zničena. Tento způsob aktivace se nazývá „missing self“ mechanismus, protože při něm NK buňky rozpoznávají absenci běžně se vyskytujících molekul. Posledním typem interakce je pak rozpoznání tzv. „stresové buňky“, která sice na svém povrchu exprimuje MHC I v dostatečné míře, avšak kvůli vnitřnímu poškození exprimuje v hojné míře i stresové signální molekuly (např. MICA, z angl. MHC class I polypeptide-related sequence A; sekvence A příbuzná polypeptidu MHC I), které slouží jako ligandy pro receptory NK buněk, skrze které opět dojde k aktivaci NK buněk a spuštění jejich cytotoxické odpovědi.



Obrázek 2: Schématické znázornění možných situací při styku NK buňky s jinou buňkou. Za stavu tolerance (A) převažuje inhibiční signál a cílová buňka je zachována v rámci autotolerance. K aktivaci NK buněk pak dochází buď mechanismem indukce (B), kdy aktivační signál převáží nad inhibičním, či tzv. „missing-self“ mechanismem (C), kdy dojde k narušení konstitutivní exprese inhibičních receptorů. Obrázek byl převzat [23] a upraven.

1.1.6 MECHANISMUS CYTOTOXICITY

Mechanismus cytotoxického působení NK buněk lze rozdělit do několika základních kroků [24]. Prvním krokem je kontakt NK buňky s cílovou buňkou, který se uskutečňuje skrze receptory. Pokud NK buňka registruje aktivační signály, dojde k její aktivaci, přičemž je dle některých zdrojů nutné, aby byl registrován signál z aktivačního receptoru za přítomnosti prozánětlivých cytokinů (např. některé interleukiny a interferony) [25]. Aktivovaná NK buňka následně adhezuje k povrchu cílové buňky za účasti adhezních receptorů. Nejvýznamnější z těchto receptorů je antigen spojený s funkcí lymfocytů 1 (LFA-1, z angl. lymphocyte function-associated antigen-1) [26], který vazbou na některý ze svých ligandů zahajuje komplexní proces adheze k cílové buňce, během něhož mj. dochází k reorganizaci aktinového cytoskeletu a změně tvaru NK buňky.

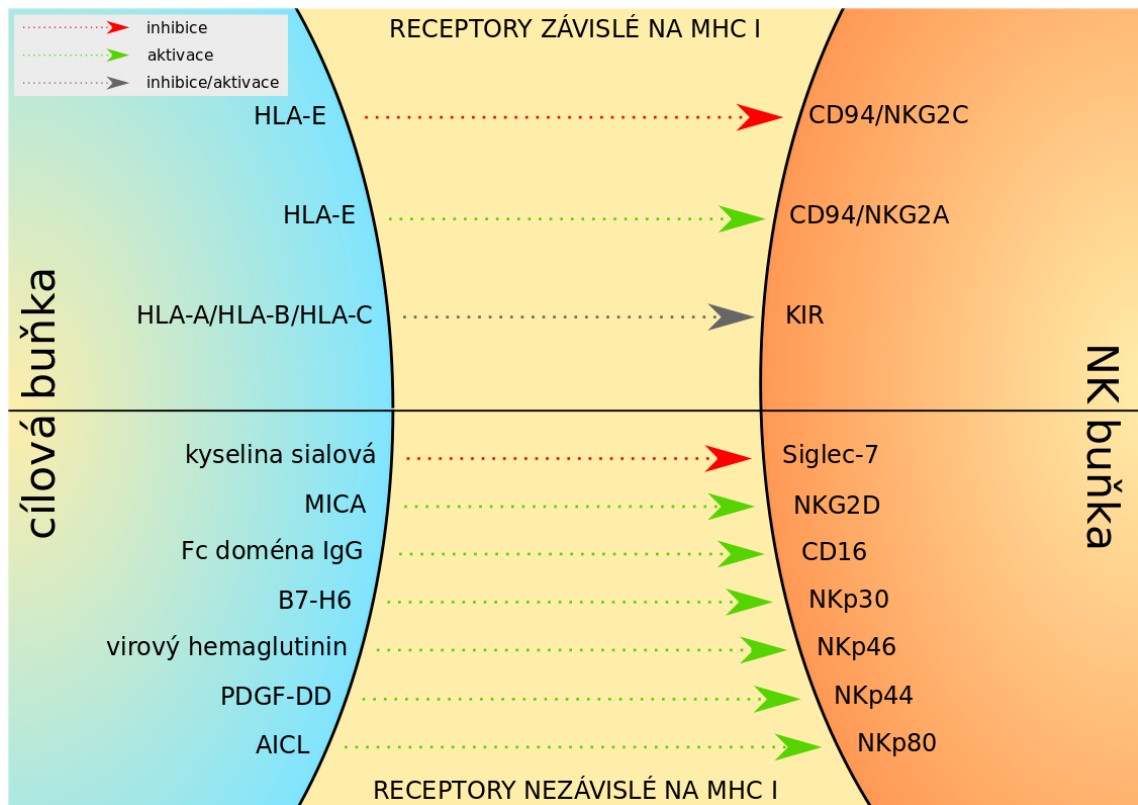
Dalším krokem je polarizace cytotoxických granulí, aktinového cytoskeletu, Golgiho aparátu a mikrotubulů v cytoplazmě NK buněk. Díky popsané polarizaci orientované směrem k cílové buňce roste síla adheze a cytotoxické granule se přesouvají směrem k oblasti buněčného kontaktu. Nakonec dochází k uvolnění obsahu cytotoxických granulí v oblasti, kde se buňky stýkají. Jejich splnutí s buněčnou membránou je závislé na koncentraci vápenatých iontů v cytoplazmě, jejichž uvolnění je indukováno signalizačními kaskádami, které jsou závislé na G-proteinech a proteinkinase C [27]. Splnutím těchto váček s membránou dojde k uvolnění cytotoxických enzymů

perforinu, granulysinu a enzymů z granzymové rodiny [28], které vytváří v membránách cílových buněk otvory (perforin, granulysin), jimiž vstupují do buňky granzymy, které svojí proteasovou aktivitou uvnitř buňky spouští různé apoptotické kaskády. Další možností indukce apoptózy je pomocí transmembránového proteinu FasL, který je součástí cytokinové rodiny TNF- α (faktory nádorové nekrózy alfa, z angl. tumor necrosis factor alpha) [29]. Tento ligand je vázán na membránách cytotoxických granulí, po jejichž splynutí s vnější membránou se FasL ocitne na vnější membráně NK buňky, což mu umožňuje interagovat s receptorem Fas na vnější straně cytoplazmatické membrány cílové buňky, čímž dojde ke spuštění apoptotické dráhy [30].

Kromě zmíněných enzymů, které jsou uvolňovány z cytotoxických granulí uvolňují NK buňky do svého okolí i molekulární signály pro komunikaci s dalšími buňkami imunitního systému. Nejvýznamnější z těchto molekul je IFN- γ , který spouští aktivační signální dráhy v B-lymfocytech, makrofázích a cytotoxických T-lymfocytech [31]. NK buňky rovněž uvolňují stimulační faktor kolonií granulocytů a makrofágů (GM-CSF, z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), jehož prostřednictvím stimuluje diferenciaci kmenových buněk na granulocyty (tj. bazofily, eozinofily a neutrofilny) a monocyty, z kterých později vznikají makrofágy nebo dendritické buňky [32].

1.2 RECEPTORY NK BUNĚK

Interakce NK buňky s buňkou organismu se účastní velké množství receptorů, které rozpoznávají různé signální molekuly exprimované cílovou buňkou [33]. Podle jejich efektu na NK buňky tyto receptory dělíme na inhibiční a aktivační. Schéma receptorů, které jsou v této práci zmiňovány, je na Obr. 3 (str. 19). Kromě těchto receptorů mají NK buňky ještě receptory, které zajišťují jejich aktivaci navázáním některého z rozpustných interleukinů, např. IL-1, IL-2, IL-12 či IL-15 [34]. Tyto molekuly jsou do okolí uvolňovány neutrofilny, makrofágy a dendritickými buňkami po jejich interakci s cizorodou látkou.



Obrázek 3: Schéma receptorů NK buněk a jejich ligandů. Ligandy na cílové buňce (vlevo) interagují s receptory NK buňky (vpravo). Dle typu ligandu může docházet k aktivaci (zeleně) nebo k inhibici (červeně) cytotoxické odpovědi. Receptory jedné z rodin pak mohou zprostředkovávat oba typy signálu v závislosti na tom, o jaký konkrétní receptor se jedná (šedě). Obrázek byl převzat [23] a upraven.

1.2.1 INHIBIČNÍ RECEPTORY

1.2.1.1 INHIBICE ZÁVISLÁ NA MHC I

Inhibiční receptory, jak vyplývá z jejich názvu, zabraňují aktivaci cytotoxické odpovědi NK buněk, nejčastěji na základě interakce s MHC I molekulami na povrchu buněk, která je zprostředkována zejména KIR receptory (receptory NK buněk podobné imunoglobulinům, z angl. killer-cell immunoglobulin-like receptors) [35, 36]. Po vazbě receptoru na MHC I dochází k fosforylaci tyrosinu v cytoplazmatických imunoreceptorových inhibičních motivech založených na tyrosinu (ITIM, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), čímž dojde ke spuštění fosforylační signalizační kaskády uvnitř NK buňky, která vede k inhibici cytotoxické odpovědi. Receptory této rodiny reagují s antigeny lidských leukocytů (HLA, z angl. human leukocyte antigen) typu A, B a C (HLA-A, HLA-B a HLA-C), které společně s mikroglobulinem $\beta 2$ vytváří komplexní molekulu MHC I [37].

Kromě těchto tří nejběžnějších typů HLA se v organismu vyskytuje i méně obvyklá varianta HLA-E, kterou NK buňky zaznamenávají pomocí heterodimerního receptoru

CD94/NKG2 [36]. Tento receptor náleží do rodiny receptorů *podobných* lektinům typu C (nejedná se přímo o lektiny), a je tvořen jednou molekulou proteinu CD94 a jednou molekulou proteinu NKG2 (NKG2A či NKG2B [23, 38]). Mechanismus přenosu signálu těmito recepty je analogický ke zmíněným KIR receptorům.

1.2.1.2 INHIBICE NEZÁVISLÁ NA MHC I

Inhibiční signál mohou NK buňky registrovat i nezávisle na MHC I, např. pomocí receptoru Siglec-7 (kyselinu sialovou vážící lektin 7 podobný imunoglobulinu, z angl. sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7), který opět přenáší signál skrz cytoplazmatickou ITIM doménu [39]. Ligandem tohoto receptoru je kyselina sialová, čehož využívají některé nádorové buňky, které silně sialylují svůj povrch, čímž inhibují NK buňky, a tak unikají imunitnímu systému [40, 41].

1.2.2 AKTIVAČNÍ RECEPTORY

1.2.2.1 DRUHY AKTIVAČNÍCH RECEPTORŮ

Aktivační receptory NK buněk jsou v mnoha ohledech podobné inhibičním receptorům. Různé receptory z rodiny KIR reagují s molekulami MHC I, díky čemuž tyto receptory asociují s membránovým proteinem DAP12, jehož intracelulární doména obsahuje imunoreceptorový aktivační motiv založený na tyrosinu (ITAM, z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif), na němž dochází k fosforylaci tyrosinu a spuštění signalizační kaskády, která vede k aktivaci cytotoxické odpovědi [42]. Tohoto mechanismu signalizace využívají i již zmíněné receptory rodiny CD94/NKG2, v tomto případě tvořené NKG2C. Stejně jako u inhibičních receptorů pak platí, že receptory rodiny KIR interagují s MHC I obsahujícím proteiny HLA-A, HLA-B či HLA-C, zatímco receptory rodiny CD94/NKG2 interagují s MHC I, který obsahuje protein HLA-E [43].

Aktivace NK buněk je rovněž zprostředkovávána nezávisle na interakci s MHC I, např. prostřednictvím zmíněné stresové signální molekuly MICA, která způsobuje aktivaci NK buněk vazbou na receptor NKG2D (který jako jediný z proteinů NKG2 netvoří dimer s CD94 [44]) Vedení signálu zprostředkovává protein DAP10 způsobem analogickým k výše popsanému proteinu DAP12 [45, 46]. Důležitým aktivačním receptorem nezávislým na MHC I je receptor CD16, který se váže na Fc doménu IgG, čímž aktivuje NK buněčnou cytotoxicitu [47]. Díky tomuto receptoru se mohou NK buňky cytotoxicky projevovat v závislosti na přítomnosti protilátek (tzv. buněčná

cytotoxicita závislá na protilátce, ADCC, z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity).

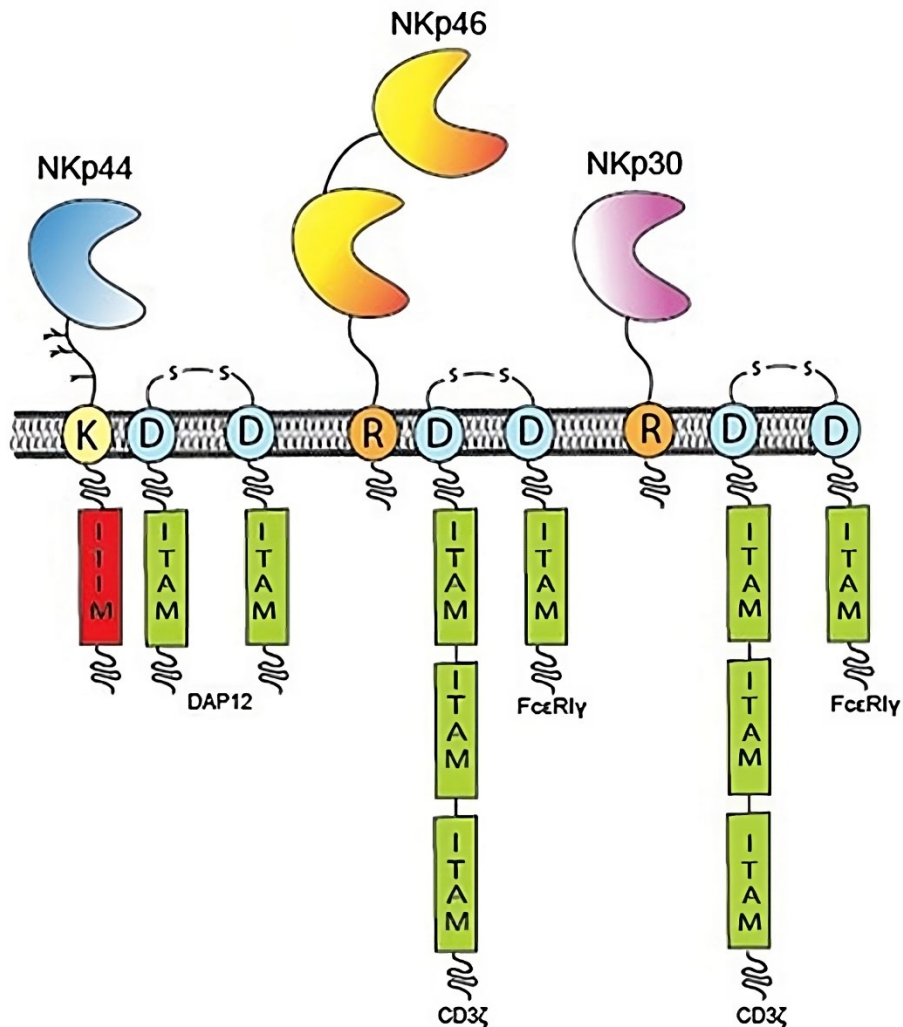
Za zmínku stojí i receptor NKp80 [48], který aktivuje NK buňky reakcí s aktivací indukovaným lektinem typu C [49] (AICL, z angl. activation-induced C-type lectin), jehož zvýšená exprese byla zaznamenána mj. i na nádorových buňkách [50]. Ačkoliv nese podobné označení jako níže zmíněné receptory přirozené cytotoxicity (1.2.2.2), NKp80 náleží do rodiny receptorů podobných lektinům typu C (CTLR, z angl. C-type lectin-like receptors).

1.2.2.2 RODINA RECEPTORŮ PŘIROZENÉ TOXICITY

Mezi aktivační receptory nezávislé na MHC I patří i rodina receptorů přirozené cytotoxicity (NCR, z angl. natural cytotoxicity receptor) [51], do níž se řadí NKp46, NKp44 a NKp30 [52]. Jak již bylo zmíněno (viz 1.2.2.1), podobně pojmenovaný receptor NKp80 náleží do rodiny CTLR, a tedy jej mezi NCR nelze řadit.

Jednotlivé receptory se však od sebe i v rámci této skupiny liší strukturou a mechanismem přenosu signálu (viz Obr. 4, str. 22). Receptor NKp46 je tvořen dvěma extracelulárními doménami podobnými C2 doméně těžkého řetězce Ig a nemá žádnou funkční intracelulární doménu. Po vazbě na ligand (např. virový hemaglutinin) přenáší aktivační signál do buňky pomocí fosforylace ITAM membránového proteinu CD3 ζ nebo Fc γ (běžný Fc receptor γ). Tyto dva proteiny jsou spojeny disulfidickým můstkem. Oproti tomu receptor NKp44 obsahuje pouze jednu extracelulární doménu podobnou V doméně Ig, ale nese i vlastní intracelulární ITIM sekvenci na své intracelulární doméně. Přenos signálu pak probíhá přes efektorový protein DAP12.

Posledním receptorem této rodiny je pak NKp30. Od objevu tohoto receptoru v roce 1999 [53] bylo zveřejněno mnoho publikací a prací, které se tímto receptorem a jeho ligandy zabývají ze strukturní či funkční perspektivy. Pro účely této práce se jedná o nejdůležitější receptor z rodiny NCR, a proto mu dále bude věnována větší pozornost než ostatním výše zmíněným receptorům této rodiny.



Obrázek 4: Přehled struktury receptorů přirozené toxicity s doménou podobnou imunoglobulinu. Receptor NKp44 je tvořen jednou doménou podobnou Ig a nese vlastní intracelulární doménu nesoucí ITIM. Receptory NKp30 a NKp46 tuto intracelulární doménu nemají. Přenos signálu dále do buňky probíhá buďto přes proteiny CD3 ζ a FcR γ , které jsou spojeny disulfidickým můstkem (NKp30 a NKp46), anebo přes dimer proteinu DAP12, jehož jednotky jsou rovněž spojeny disulfidickým můstkem (NKp44). Obrázek byl převzat [52] a upraven.

1.3 NKp30 A JEHO LIGANDY

1.3.1 NKp30

Již zmíněný receptor NKp30 nese znaky obou zmíněných receptorů NKp46 a NKp44 [53]. Stejně jako NKp44 je tvořen jedinou extracelulární doménou podobnou V doméně Ig, ale nemá intracelulární signalizační motiv, a proto přenáší signál skrz membránové efektorové proteiny CD3 ζ a FcR γ . Strukturálně lze tento receptor rozdělit na tři významné části, a to extracelulární doménu podobnou V doméně Ig, transmembránový segment a krátký řetězec o délce 15 aminokyselin, který zbylé dvě části spojuje. Tento řetězec se běžně označuje jako stonek (z angl. stalk).

Pro receptor NKp30 je typická relativní promiskuita vůči ligandům, které je schopen vázat. Bylo již popsáno několik ligandů tohoto receptoru, které vyvolávají různou odpověď NK buněk. Ačkoliv je tento receptor běžně považován za aktivační, některé jeho ligandy mají opačný efekt (tj. inhibují cytotoxickou odpověď). Mezi tyto ligandy se řadí např. galektin 3 (Gal-3), či protein pp65. Protein pp65 je součástí tegumentu lidského cytomegaloviru (HCMV, z angl. human cytomegalovirus) [54]. Vazba proteinu pp65 na NKp30 probíhá mimo aktivní místo receptoru, a tedy neznemožňuje vazbu aktivačních ligandů, avšak specifickou vazbou pp65 na NKp30 dochází k disociaci membránového komplexu NKp30:CD3 ζ , v němž se NKp30 nachází nehledě na vazbu některého ze svých aktivačních ligandů. Rozpadem tohoto komplexu pak dochází ke znemožnění přenosu aktivačního signálu dále do buňky.

Mechanismus inhibice Gal-3 spočívá v přímé vazbě na NKp30, čímž dochází ke znemožnění vazby aktivačních ligandů a aktivaci cytotoxické odpovědi [55]. Této schopnosti Gal-3 využívají různé nádorové buňky, které jej uvolňují do svého okolí, a tak unikají pozornosti NK buněk. Zároveň pak Gal-3 indukuje apoptózu T-lymfocytů vazbou na jejich receptory, čímž dále snižuje obranyschopnost organismu.

Častěji však slouží NKp30 k aktivaci NK buněk. Tento typ signálu je pak zprostředkován aktivačními ligandy, mezi které náleží zejména proteiny BAG-6 a B7-H6. Protein BAG-6 (rovněž nazývaný BAT3, z angl. HLA-B associated transcript 3) se vyskytuje v jádře buňky, kde může hrát roli při buněčné apoptóze [56]. Při poškození buňky (např. vlivem tepelného šoku), či jejím kontaktu s receptorem NKp30 se BAG-6 přesouvá do cytosolu a je rovněž z buňky uvolňován na povrchu exosomů, kde se může vázat na NK buňky a skrz receptor NKp30 tak vyvolat cytotoxickou odpověď. Je zajímavé, že tuto formu cytotoxické odpovědi se podařilo vyvolat pouze proteinem BAG-6, jenž byl z buňky uvolněn exocytózou, zatímco purifikovaný BAG-6 tuto formu odpovědi nevyvolal [56].

1.3.2 B7-H6

Protein B7-H6 je součástí rodiny imunoregulačních ligandů B7, která obsahuje velké množství různých proteinů [57]. Ačkoliv se proteiny náležící do této rodiny liší funkcí (aktivační či inhibiční) i cílovým lymfocytem, který ovlivňují vazbou na receptor, jsou si tyto molekuly strukturně podobné. Vždy jsou připojeny k membráně, a to buď svým transmembránovým segmentem (např. B7-H6 nebo B7.1 [58]), anebo pomocí

glykofosfatidylinositolové kotvy (např. B7-H4, avšak tento způsob kotvení k membráně nebyl dosud zcela potvrzen [59]).

Protein B7-H6 se přirozeně vyskytuje na membránách některých nádorových buněk a interakcí s NKp30 zprostředkovává jejich likvidaci NK buňkami [60]. Jeho přítomnost nebyla prokázána na zdravých buňkách [61]. Jedná se o transmembránový protein, který je tvořen intracelulární signalizační doménou (obsahující mj. ITIM sekvenci), krátkým transmembránovým segmentem a extracelulární částí [62]. Poslední jmenovaný segment je tvořen dvěma doménami podobnými imunoglobulinům, a to jednou doménou podobnou C doméně Ig (nachází se blíže povrchu buňky) a jednou doménou podobnou V doméně Ig (nachází se dále od buňky, na N-konci proteinu). Mezi těmito doménami se nachází pouze krátký řetězec, který je spojuje. Na základě aminokyselinové sekvence B7-H6 bylo rovněž nalezeno 6 míst, která nesou N-glykosylaci, která však nemá vliv na afinitu k NKp30 [63].

1.3.3 ROLE INTERAKCE B7-H6 A NKp30 V RAKOVINĚ

Díky své schopnosti eliminovat nádorové buňky v organismu jsou NK buňky předmětem zájmu mnoha studií, které zkoumají jejich potenciální využití v léčbě nádorových onemocnění [18]. Je však nutné, aby NK buňky působily pouze v místě nádoru a nepoškozovaly zdravou tkáň. Za tímto účelem byly zkoumány mj. aktivační receptory, včetně zmíněného receptoru NKp30 a jeho ligandů [64], z nichž byla pravděpodobně největší pozornost věnována právě B7-H6.

Bylo zjištěno, že aktivace NK buněk skrz receptor NKp30 může být (kromě BAG-6 a B7-H6) zprostředkována i dendritickými buňkami, které tímto způsobem stimulují proliferaci NK buněk a jejich produkci IFN- γ [65]. Takto aktivované NK buňky následně likvidují nezralé dendritické buňky, neboť v bezprostřední blízkosti nádorových buněk je znemožněno správné dozrávání dendritických buněk, které poté nemohou sloužit jako APC, a proto je žádoucí takové buňky zlikvidovat.

Dalším příkladem role NKp30 při tvorbě a prevenci nádorů je jeho již zmíněná interakce s Gal-3, jehož vazba na NKp30 znemožňuje vazbu dalších ligandů a zároveň negativně ovlivňuje množství IFN- γ uvolňovaného NK buňkami do jejich okolí.

Z uvedených příkladů je zřejmé, že různé ligandy receptoru NKp30 hrají klíčovou roli v tvorbě nádorů a jejich likvidaci. Ani protein B7-H6 není výjimkou a výrazně dokáže ovlivnit aktivaci NK buněk, a proto je zkoumáno jeho potenciální využití pro léčbu a

prevenci nádorových onemocnění. Chemoterapie či ozařování prokazatelně zvyšují expresi B7-H6 některými nádory, které jsou pak NK buňkami efektivněji likvidovány [66]. V rámci dalších výzkumů bylo zjištěno, že i rozpustnou formou B7-H6 či umělým pokrytím buněk tímto proteinem lze indukovat cytotoxickou odpověď [67, 68]. Zároveň však existuje hypotéza, že některé typy nádorů se cíleně zbavují B7-H6 (angl. shedding), např. pomocí metaloproteas, a tak unikají pozornosti imunitního systému [69].

V neposlední řadě pak bylo dosaženo aktivace imunitních buněk pomocí různých fúzních proteinů, které se vždy skládaly z extracelulární domény B7-H6 a scFv proteinu (jednořetězcového variabilního fragmentu, z angl. single-chain fragment variable), odvozeného např. z protilátky proti HER-2 (lidský receptor epiteliálního růstového faktoru-2, z angl. human epithelial growth factor receptor 2) [70]. Až u 30 % nádorů prsu dochází k nadměrné expresi HER-2 [71], a proto je výhodné moci tento typ nádorů likvidovat pomocí NK buněk. Analogicky pak bylo dosaženo aktivace T-lymfocytů nesoucích chimérický antigenní receptor (CAR), který nesl scFv fragment protilátky proti B7-H6 [72], či pomocí bispecifických protilátek (tzv. BiTE, z angl. bispecific T-cell engagers), které vážou zároveň B7-H6 a CD3 [73].

Díky jeho výše popsaným potenciálním oblastem využití je tedy přesný popis podstaty interakce B7-H6 s receptorem NKp30 klíčový pro design možných strategií léčby nádorů.

1.4 STRUKTURNÍ BIOCHEMIE RECEPTORU NKp30

V oblasti strukturní biochemie receptoru NKp30, jeho ligandu B7-H6 a jejich vzájemné interakce bylo již provedeno několik studií, které poskytly popis zmíněných molekul a jejich interakce. Pro funkci NKp30 se ukázaly být klíčové dva elementy: glykosylace a 15 aminokyselin dlouhý stonek (angl. stalk), který pojí jeho extracelulární doménu s transmembránovým segmentem.

1.4.1 GLYKOSYLACE NKp30

Extracelulární doména receptoru NKp30 je N-glykosylována na třech aminokyselinách (N42, N68 a N121), a nenes žádnou O-glykosylaci [74]. Tyto glykosylace hrají důležitou roli ve vazbě k B7-H6 i v následném přenosu signálu dále do buňky, a to zejména na pozici N42, jejíž odstranění zcela znemožňuje vazbu B7-H6 [74]. V tomto závěru ovšem nejsou dostupné zdroje jednotné, jelikož byla publikována studie, jejímž autorům se podařilo vyřešit krystalovou strukturu neglykosylovaného NKp30 s navázaným ligandem

B7-H6 [75]. Autoři této studie použili extracelulární část receptoru NKp30 vyprodukovanou v bakteriích *E. coli*, u nichž k N-glykosylaci proteinů nedochází.

Glykosylace NKp30 dále hraje důležitou roli v signalizaci skrz receptor NKp30 [74]. Pro přenos signálu je nutné, aby byly přítomny glykosylace na pozicích N42 a N68, jejichž odstranění signalizaci zcela znemožňuje.

1.4.2 STONEK NKp30

Dalším důležitým prvkem receptoru NKp30 se ukázal být jeho „stonek“, krátký řetězec 15 aminokyselin, spojující vazebnou doménu s transmembránovým segmentem. Pouze samotná vazebná doména (LBD, z angl. ligand-binding domain) je sice schopná vazby k B7-H6, ale výrazně slaběji, než je tomu u konstruktů obsahujících kromě LBD i „stonek“ [74, 76].

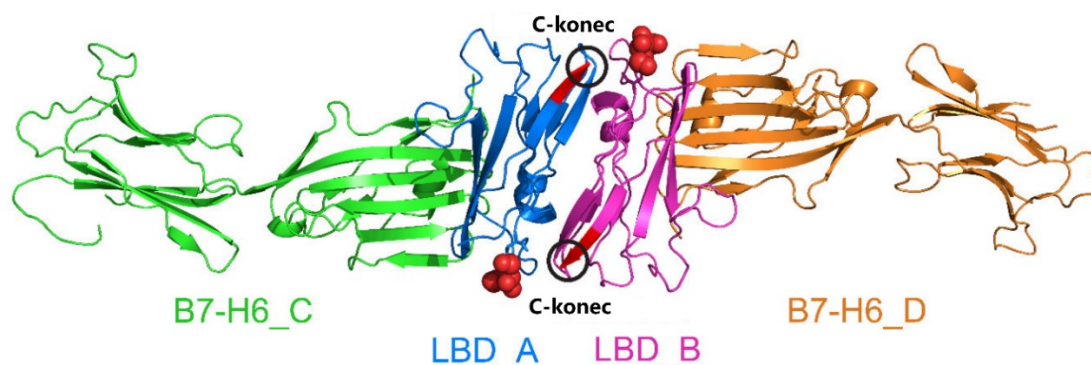
Kromě (ne)přítomnosti této části NKp30 záleží rovněž na její aminokyselinové sekvenci a délce. I sebemenší zkrácení „stonku“ výrazně snižuje schopnost vázat ligandy (nejen B7-H6, ale i BAG-6). Rovněž změny původní aminokyselinové sekvence silně ovlivňují schopnost vazby ligandů i přenosu signálu [74, 77], přičemž největší vliv na vazebné a signalizační vlastnosti mají aminokyseliny v těsném sousedství vazebné domény a transmembránového segmentu. Mutace v transmembránovém segmentu pak naopak nijak nenarušily schopnost přenosu signálu na CD3 ζ , a proto se předpokládá, že tuto roli vykonávají postranní řetězce aminokyselin stonku v těsné blízkosti membrány [77].

1.4.3 OLIGOMERIZACE NKp30

Tvorba oligomerů je další typickou vlastností NKp30. Podobně jako předchozí popsané funkční vlastnosti, i oligomerizace je silně závislá na přítomnosti glykosylace a stonkové domény. Stran důležitosti stonku se závěry dostupných studií neshodují. Je jisté, že přítomnost stonku výrazně podporuje tvorbu oligomerů [77], avšak v jeho nepřítomnosti se oligomerizační vlastnosti liší v závislosti na zvoleném způsobu exprese. Při použití hmyzí buněčné linie Sf9 byla zaznamenána tvorba oligomerů [78], zatímco u LBD vyprodukované v linii lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK293T, z angl. human embryonic kidney) nebyla zaznamenána vůbec žádná tvorba oligomerů [76]. Možnou příčinou je složení oligosacharidů, kdy hmyzí Sf9 buňky preferují jednodušší oligosacharidy [79], zatímco lidské buňky vytvářejí i komplexnější rozvětvené struktury [80]. Tyto rozdíly pak pravděpodobně ovlivnily oligomerizační schopnosti LBD, avšak

vzhledem k tomu, že NK buňky jsou součástí imunitního systému savců, lze u nich očekávat složitější typ glykosylace, a proto lze stonek považovat za zcela nezbytný pro tvorbu oligomerů. Kromě přítomnosti stonku je pak oligomerizace NKp30 závislá na různých dalších faktorech, jako je koncentrace [78] nebo již zmíněná glykosylace [76].

Tvorba oligomerů není pouze strukturální vlastností tohoto receptoru, jelikož hraje významnou roli i v jeho funkci. Při krystalizaci komplexu NKp30_LBD:B7-H6 bylo zjištěno, že komplex ligandu s receptorem krystalizuje ve formě dimeru (Obr. 5) [76]. Rovněž je známo, že v T-lymfocytech vytváří CD3 ζ dimery, které zprostředkovávají přenos signálu z TCR [81]. Tyto dva poznatky daly vzniknout teorii, že i NKp30 vytváří funkční oligomery, které umožňují přenos signálu, přičemž zmíněné dimery jsou pravděpodobně jejich základní strukturální jednotka [82].



Obrázek 5: Krystalová struktura komplexu NKp30_LBD:B7-H6. Oranžově a zeleně je znázorněn protein B7-H6, modře a růžově pak vazebné domény (LBD) NKp30, které tvoří dimer. Obrázek byl převzat [76] a upraven.

Oligomerizaci NKp30 doprovází výrazné změny jeho vazebných vlastností, a to zejména stechiometrie vazby [75, 76] a avidity interakce s B7-H6, pravděpodobně díky zesílení některých interakcí v rámci oligomeru. Tyto změny vazebných vlastností hrají možná roli v mechanismu ochrany organismu před hrozbami, neboť IL-2 způsobuje zvýšení počtu NCR na NK buňkách, což vede ke zvýšení počtu oligomerů, a tedy ke zlepšení avidity vazby k B7-H6 [78].

1.5 DALŠÍ SMĚRY VÝZKUMU

Výše uvedené poznatky byly získány zkoumáním různých rozpustných forem NKp30, a to nejčastěji ve formě fúzních proteinů [74, 77] (např. ektodoména NKp30 s Fc fragmentem Ig) nebo pouze rekombinantně vyprodukovaných částí NKp30 [76, 78]. Ze zveřejněných studií tedy lze získat poměrně dobrou představu o chování extracelulární

části NKp30 v trojrozměrném prostoru a rovněž o mechanismech funkce tohoto receptoru. Přirozeně se však tento receptor vyskytuje vázaný na membránách buněk (tj. ve víceméně dvourozměrném prostoru), kde navíc asociuje s CD3 ζ , a proto lze očekávat, že se jeho chování bude lišit od rozpustné formy, např. tvorbou oligomerů s nižším počtem jednotek.

Pro získání přesnějších informací o chování receptoru NKp30 v přirozeném prostředí je nutné sledovat tento receptor přímo na membránách buněk, a to ideálně pomocí fluorescenční mikroskopie, jelikož využití světelné či elektronové mikroskopie není kvůli velikosti sledovaných molekul a povaze vzorku možné. Pro tuto metodu existuje celá řada možných uspořádání, která umožňují dosažení rozlišení dalece přesahujících difrakční limit viditelného světla [83]. Tato metoda rovněž umožňuje na základě intenzity emitovaného signálu určit jaké množství sledovaných molekul se v daném místě momentálně nachází [84].

Pro účel této práce byl vytvořen genový konstrukt B₂Srt_YWY, který kóduje upravený protein B7-H6, jehož afinita k NKp30 byla zvýšena trojicí bodových mutací S60Y, F82W, L129Y. Tato kombinace mutací by měla poskytovat až 45 \times vyšší afinitu k NKp30 oproti přirozeně se vyskytující formě B7-H6 [85]. Lineární řetězec mezi doménami podobnými imunoglobulinu byl dále modifikován tak, aby obsahoval sekvenci aminokyselin LPETG. Tuto sekvenci rozpoznává sortasa A, transpeptidasa izolovaná z bakterie *Staphylococcus aureus*, která tento enzym využívá k vazbě proteinů na svoji buněčnou stěnu (jedná se o G⁺ bakterii) [86]. Sortasa A štěpí protein se zmíněnou sekvencí aminokyselin mezi threoninem a glycinem a následně za threonin připojuje jiný peptid, na jehož konci se nachází sekvence 1–5 glycinů [87]. Po izolaci začal být tento enzym využíván pro fluorescenční značení proteinů nesoucích specifickou aminokyselinovou sekvenci, kterou sortasa A rozpoznává [88]. V této práci je použit enzym Sortasa A (7+), který byl odvozen od přirozeně se vyskytující formy sortasy A, která byla zbavena závislosti na koncentraci vápenatých iontů v roztoku [89] a jejíž kinetické vlastnosti byly zlepšeny pomocí sedmi bodových mutací v její aminokyselinové sekvenci.

Teoreticky by tedy mělo být možné pomocí transpeptidasové reakce katalyzované Sortasou A (7+) konjugovat N-koncovou doménu zmíněného konstruktu B7-H6 (nesoucího sekvenci aminokyselin LPETG v řetězci spojujícím jeho dvě Ig domény) s

tetrapeptidem GGGK, jehož lysin nese fluorescenční barvivo 5-karboxytetramethylrhodamin (TAMRA), a tak na vazebnou doménu B7-H6 specificky přenést fluorescenční značku. Tento koncept by umožňoval tvorbu velice malých částic s uniformním fluorescenčním značením, které by v kombinaci s mutacemi, které zvyšují afinitu B7-H6 k receptoru, představovaly vhodnou fluorescenční sondu pro vizualizaci NKp30, jelikož odstraněná C-koncová doména B7-H6 není nutná pro vazbu na NKp30 [85]. Jedním z cílů této práce je ověřit, zda popsanou transpeptidasovou reakcí skutečně lze vytvořit fluorescenčně značenou doménu B7-H6 podobnou V doméně Ig.

2 CÍLE PRÁCE

- Produkce a purifikace proteinu B₂Srt_YWY pomocí rekombinantní exprese v buňkách HEK293T
- Produkce a purifikace enzymu Sortasa A (7+) pomocí bakteriálního expresního systému
- Fluorescenční značení domény B7-H6 pomocí transpeptidasové reakce katalyzované Sortasou A (7+)
- Určení mutované varianty B7-H6 s nejvyšší afinitou k NKp30
- Ověření schopnosti vazby značené domény B7-H6 na vazebnou doménu NKp30

3 MATERIÁL

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Alliance Q9	Uvitec, UK
Analytické váhy HA-180M	A&D, Japonsko
Automatická pipeta 1-5ml	Kartell, Itálie
Bürkerova komůrka, 0,100mm hloubka, 0,0025mm ²	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Avanti JXN-26 Series	Beckman Coulter, USA
Dark Reader Blue Light transiluminátor	Clare Chemical Res., USA
Elektroforetická cela Mini-PROTEAN Tetra Vertical	Bio-Rad, Německo
Fluorescenční zobrazovací zařízení Typhoon FLA 7000	GE Healthcare, USA
Generátor Sonoplus HD3100,	Bandelin, Německo
Hirschmann pipetovací nástavec	Hirschmann-Lab., Německo
Inkubátor Elite Dry Bath, EL Series	Major Science, Taiwan
Inkubátor Sanyo MCO-18AIC CO2	Sanyo, Japonsko
Izotermální titrační kalorimetr PEAQ-ITC	Malvern Panalytical, UK
Kolona HiTrap, odsolovací	Cytiva, USA
Kolona naplněná Ni-NTA agarosovým nosičem	Cube Biotech, Německo
Kolona odsolovací HiPrep 26/10	Cytiva, USA
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Koncentrátor Amicon Ultra-4 10kDa	Millipore, USA
Membránová vývěva LABOPORT N816	KNF, Německo
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR International, USA
Mikrostříkačky Hamilton	Hamilton, USA
Mikrovlnná trouba OPTICOOK Compact	Optimo Moulinex, Francie
Nitrocelulosová membrána	Pall, USA
Orbitální třepačka, víceúčelová, digitální Orbit 1000	Labnet, USA
Pipety PIPETMAN Classic	Gilson, USA
Plastové misky na pěstování bakteriálních kultur	VWR International, USA
Počítáčka buněk Corning Cell Counter	Corning, USA
Předvážky KB 1200-2N	KERN, Německo

Přístroj pro elektropřenos Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, Německo
Rolovací třepačka SCI-T6-S analog	Scilogex, USA
Rotor s fixním úhlem J-Lite 16.250	Beckman Coulter, USA
RX3 Vortex Mixer	VELP Scientifica, Itálie
Skleněné, čtverhranné lahve Duran s prodyšným víčkem	Schott, Německo
Souprava na elektroforézu v agarosovém gelu Liberty 120	Biokeystone, USA
Soustava pro HPLC ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Spektrofotometr Cary 60 UV-Vis	Agilent, USA
Spektrofotometr DS-11+ Series (typu "nanodrop")	DeNovix, USA
Stolní centrifuga EBA 12-R	Hettich, Německo
Stolní inkubační třepačka BT921	BT Lab Systems, USA
T100 Thermal cycler	Bio-Rad, různé
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
Vakuový filtr na lahev, 150 ml, vel. pórů 0,22 µm,	Corning, USA
Vakuový koncentrátor DNA CentriVap	Labconco, USA
Výkyvný rotor SX4400	Beckman Coulter, USA
Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore, USA
Zdroj napětí PS 251-2	Sigma-Aldrich, USA
3.2 POUŽITÉ CHEMICKÉ LÁTKY	
2-Merkaptoethanol	Sigma, USA
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth, Německo
Agarosa	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Alexa Fluor 647, sukcinimidylester (barvivo)	Thermo Fisher, USA
Ampicilin, ve formě sodné soli	Carl Roth, Německo
Azid sodný	Serva, Německo
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoylfosfát)	Bio-Rad, různé
Blasticidin, 10 mg/ml	InvivoGen, Francie
Bromfenolová modř	P-Lab, Česká republika
BSA (hovězí sérový albumin, lyofilizovaný)	Biowest, Francie
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, Česká republika

Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka, Švýcarsko
CutSmart buffer	New England Biolabs, USA
Deionizovaná voda pro PCR	Top-Bio, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, Česká republika
Dimethylsulfoxid, bezvodý	Thermo Fisher, USA
dNTPs pro PCR, 100mM	Sigma-Aldrich, USA
Dodecylsíran sodný (SDS)	Fluka, Švýcarsko
Doxycyklin hydrochlorid	Duchefa, Nizozemsko
DPBS modifikovaný bez Ca, Cl a MgCl ₂ ,	Sigma-Aldrich, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol, 96%	Lach-Ner, Česká republika
EX-CELL 293 médium	Sigma-Aldrich, USA
Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Serva, Německo
Gel Loading Dye Purple (6× konc.)	New England Biolabs, USA
GGGK-TAMRA	Thermo Fisher, USA
Glycerol, bezvodý	Lach-Ner, Česká republika
Glycin	Lach-Ner, Česká republika
Good View II (interkalační barvivo)	SBS Genetech, PRC
HEPES	Sigma, USA
Hydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, Česká republika
Hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát	PENTA, Česká republika
Hydrogenuhlíčitan sodný, vhodný pro tkáňové kultury	Sigma, USA
Hydroxid sodný, pecky	PENTA, Česká republika
Chlorid draselný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid hořečnatý	P-Lab, Česká republika
Chlorid hořečnatý, hexahydrát	Lachema, Česká republika
Chlorid sodný	Lach-Ner, Česká republika
Imidazol, 99%	Carl Roth, Německo
Isopropylalkohol	Lach-Ner, Česká republika
Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid	Serva, Německo
Kanamycin, ve formě sulfátu	Serva, Německo
Kvasničný extrakt	Duchefa, Nizozemsko

Kyselina chlorovodíková, 35%	Lach-Ner, Česká republika
Kyselina octová, 99%	Lach-Ner, Česká republika
Kyselina valproová	Sigma, USA
Leupeptin	Serva, Německo
Methanol, 96%	Lach-Ner, Česká republika
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Německo
N,N-methylenbisakrylamid	Fluka, Švýcarsko
NBT (Nitro Blue Tetrazolium)	Bio-Rad, různé
NEBuffer 2.1 (10x konc.)	New England Biolabs, USA
Oxid uhličitý, potravinářský, lahve	Linde Gas, Irsko
PEI - lineární polyethylenimin (25kDa) 10 mg/ml	Polysciences, USA
PEI Max - lineární polyethylenimin hydrochlorid (40kDa)	Polysciences, USA
Penicilin a Streptomycin	PAA Laboratories, Německo
Penta-His monoklonální protilátka	Qiagen, Německo
Pepstatin A	Serva, Německo
Peroxodisíran amonný	Serva, Německo
Polyklonální protilátka proti myšimu IgG konjugovaná s alkalickou fosfatasou (kozí)	Sigma, USA
Polyklonální protilátka proti myšimu IgG konjugovaná s peroxidasou (králíčí)	Sigma, USA
Puromycin, 10 mg/ml	InvivoGen, Francie
Q5 High GC Enhancer	New England Biolabs, USA
Q5 reakční pufr	New England Biolabs, USA
Quick-Load Purple 1 kbp DNA ladder, 6x	New England Biolabs, USA
Quick-Load Purple 100 bp DNA ladder, 6x konc.	New England Biolabs, USA
Síran hořečnatý, heptahydrát	PENTA, Česká republika
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher, USA
T4 DNA Ligase Reaction buffer	New England Biolabs, USA
TRIS	Serva, Německo
Triton X-100	Sigma, USA
Trypanová modř	Sigma-Aldrich, USA
Trypton (z kaseinu, pankreatický)	Biotech, Česká republika

Tween-20	Sigma-Aldrich, USA
Uhličitan sodný, bezvodý	Lach-Ner, Česká republika
3.3 ENZYMY	
Lysozym	Fluka, Švýcarsko
NheI-HF (High-Fidelity) restrikční endonukleasa	New England Biolabs, USA
PmeI restrikční endonukleasa	New England Biolabs, USA
Q5 High-Fidelity DNA-polymerasa	New England Biolabs, USA
RNAsa A, lyofilizovaná	Macherey-Nagel, Německo
T4 DNA Ligasa	New England Biolabs, USA
T4 DNA Polymerasa	New England Biolabs, USA

3.4 PŘIPRAVENÉ ROZTOKY

Barvicí roztok: 45% methanol; 10% kys. octová, 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250

Blokovací roztok: 1% BSA v TBS pufru

HEPES + 250mM imidazol: 250mM imidazol v pufru HEPES

HEPES + 25mM imidazol: 25mM imidazol v pufru HEPES

HEPES: 10mM HEPES; 150mM NaCl; 10mM NaN₃

LB médium: 10 g/l trypton; 5 g/l kvasničný extrakt; 10g/l NaCl

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE: 35% (v/v) methanol; 10% (v/v) kys. octová

PBS (5× konc.): 50mM Na₂HPO₄; 300mM NaCl; 10mM NaN₃

PBS + 200mM imidazol: 200mM imidazol v pufru PBS

PBS + 20mM imidazol: 20mM imidazol v pufru PBS

Přenosový pufr: 25mM Tris, 150 mM glycin, 10% methanol, pH 8,3

Pufr pro alkalickou fosfatasu (AP): 100mM Tris; 150mM NaCl; 1mM MgCl₂; 10mM NaN₃; pH 9,0

Roztok AA pro SDS-PAGE: 29% (w/v) akrylamid; 1% (w/v) N,N-methylenbisakrylamid

Roztok sušeného odtučněného mléka: 10% (w/v) odtučněné mléko v pufru TBS

Roztok trypanové modři: 0,4% (w/v) trypanová modř v PBS pro tkáňové kultury

Roztok uhličitanu sodného: 100mM Na₂CO₃; pH 8,3

SDS-PAGE pufr: 25mM Tris; 14,4 g/l glycin; 0,1% (w/v) SDS

SOB médium: 20 g/l trypton; 5 g/l kvasničný extrakt; 1% (v/v) SOB pufr

SOB pufr: 1M NaCl; 250mM KCl; 1M MgCl₂; 1M MgSO₄

TAE pufr: 40mM Tris; 20mM kys. octová; 1mM EDTA

TB médium: 20 g/l trypton; 24 g/l kvasničný extrakt; 0,4% (v/v) glycerol; 10% (v/v) TB pufr

TB pufr: 0,17M KH₂PO₄; 0,72M K₂HPO₄

TBS pufr: 10 mM Tris; 150mM NaCl; 10mM NaN₃; pH 7,5

TBS-Tween/Triton pufr: 20mM Tris; 500mM NaCl; 0,05% Tween 20; 0,2% Triton X-100; pH 7,5

Tris pufr pro SDS-PAGE, pH = 6,8: 1,5M Tris; pH 6,8

Tris pufr pro SDS-PAGE, pH = 8,8: 1,5M Tris; pH 8,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE, neredukující (5× konc.): 150mM Tris; 50% (v/v) glycerol; 5% (w/v) SDS; 0,025% (w/v) bromfenolová modř; 50mM NaN₃; pH 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE, redukující (5× konc.): 150 mM Tris; 50% (v/v) glycerol; 5 % (w/v) SDS; 0,025% (w/v) bromfenolová modř; 50mM NaN₃; 10% (v/v) 2-merkaptoethanol; pH 6,8

3.5 KOMERČNÍ SOUPRAVY

NucleoSpin Gel and PCR clean-up	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Plasmid Mini	Macherey-Nagel, Německo
NucleoBond Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel, Německo

3.6 POUŽITÉ VEKTORY

pTW5_aFGF	laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK
pTW5_p27	laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK
pBase	laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK
PB-RB	laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK
pET30b_7+SrtA	Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.
pTW5sec (linearizovaný)	Bc. Kristýna Pazderová
pUT7	laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK

3.7 POUŽITÉ PRIMERY

mB7H6_C_FW	TCTTGG AATTACCGGTGATCTGAAAGTA
mB7H6_L246_REV	TGGTGGT GATGGTGGGTACCCAGGGTAAAGTTGCTC
pTW5seq_REV	AAGCAGCGTATCCACATAGCG
pTT_FW	TGATATT CACCTGGCCCGATCTG
pCT5K_FW	AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGGAGAACTG
pCT5_REV	CTGATCAGCGGGTTTTTCACCCGTGGTGGTGATG

pCT5seq_REV CCTTCCACGGTGAGGGTG

pCT5seq_FW AGTCTAGCGGACCTCTGC

3.8 BAKTERIÁLNÍ KMENY A BUNĚČNÉ LINIE

E. Coli DH5 α , kompetentní Thermo Fisher Scientific,
USA

E. Coli TOP 10, kompetentní Thermo Fisher Scientific,
USA

E. Coli T7, kompetentní Thermo Fisher Scientific,
USA

HEK293T prof. A. R. Aricescu, Oxford,
UK

4 METODY

4.1 REKOMBINANTNÍ EXPRESE PROTEINU B2SRT_YWY

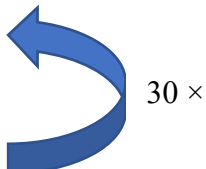
4.1.1 AMPLIFIKACE GENU POMOCÍ POLYMERASOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE

Do 200 μ l mikrozkušavky byla připravena reakční směs pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR, z angl. polymerase chain reaction) o celkovém objemu 50 μ l a složení dle Tab. 1. Mikrozkušavka byla odstředěna na stolní minicentrifuze a umístěna do termocykléru, na němž byl nastaven program dle Tab. 2.

Tabulka 1: Složení připravené reakční směsi pro amplifikaci genu B2Srt_YWY pomocí PCR.

Složka směsi	Objem (μ l)	Koncentrace zás. roztoků
Q5 reakční pufr	10	5 \times koncentrovaný
Q5 high GC enhancer	10	5 \times koncentrovaný
Q5 DNA polymerasa	1	2000 U/ml
dNTPs	1	10mM
Templát (gen B2Srt_YWY)	2	30,8 ng/ μ l
Primer mB7H6_C_FW	5	5 μ M
Primer mB7H6_L246_REV	5	5 μ M
Deionizovaná voda	16	-

Tabulka 2: Nastavení termocykléru pro amplifikaci genu B2Srt_YWY pomocí PCR.

<i>Teplota</i> (°C)	<i>Čas</i> (min)	
95	4:00	
95	0:30	
55	0:30	
72	1:20	
72	10:00	
4	∞	

4.1.2 ELEKTROFORÉZA V AGAROSOVÉM GELU

Rozpuštěním 0,65 g agarosy v 65 ml TAE pufru byl připraven 1% gel. Směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě a po ochlazení k ní byly přidány 3 μ l barviva Good View II. Roztok

byl nalit do soupravy pro agarosovou elektroforézu. Po ztuhnutí byl gel převrstven deionizovanou vodou a do elektrodového prostoru byl nalit TAE pufr.

K 50 μl PCR vzorku bylo přidáno 10 μl 6 \times koncentrovaného barviva Gel Loading Purple Dye a tento roztok byl pipetován do dvou jamek připraveného gelu. Do dalších dvou jamek bylo pak pipetováno 5 μl 100 bp a 1 kbp DNA markerů. Nakonec byla provedena elektroforetická separace při napětí 180 V po dobu 20 minut.

4.1.3 EXTRAKCE A PŘEČIŠTĚNÍ DNA

Z elektroforetického gelu byl na vyříznut fragment, který obsahoval amplifikovaný gen. DNA z gelu byla extrahována a přečištěna pomocí komerční soupravy NucleoSpin Gel and PCR clean-up.

K vyříznutému fragmentu byl přidán roztok NT1 v poměru 200 μl roztoku : 100 mg gelu. Mikroskopavka pak byla inkubována při 55 $^{\circ}\text{C}$, dokud se gel zcela nerozpustil. Roztok byl pipetován na kolonku schopnou vázat DNA a odstředěn (11000 \times g, 1 min). Filtrát byl odstraněn. Na kolonku bylo dvakrát nanášeno 700 μl pufru NT3 a kolonka centrifugována (11000 \times g, 1 min). Nakonec byla kolonka vysušena centrifugací (11000 \times g, 3 min). DNA byla eluována 2 \times 15 μl pufru NE (centrifugace při 11000 \times g, 1 min).

4.1.4 VNESENÍ GENU DO LINEARIZOVANÉHO PLAZMIDU pTW5SEC

Ve 200 μl mikroskopavce byla připravena reakční směs o celkovém objemu 20 μl a složení dle Tab. 3. Směs obsahovala 100 ng plazmidové DNA a 42 ng amplifikovaného genu. Plazmid linearizovaný restrikčními endonukleasami AgeI a KpnI poskytla Bc. Kristýna Pazderová. Reakční směs byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě a poté inkubována 10 minut na termobloku při 65 $^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro vnesení genu B₂Srt_YWY do linearizovaného plazmidu pTW5sec.

Složka směsi	Pipetovaný objem (μl)	Koncentrace zás. roztoků
Pufr pro T4 DNA ligasu	2	-
T4 DNA ligasa	1	5 U/ μl
Linearizovaný plazmid pTW5sec	0,62	161,3 ng/ μl
Gen B ₂ Srt_YWY	1,1	38 ng/ μl
Deionizovaná voda	15,28	-

4.1.5 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BAKTERIÍ PLAZMIDEM PTW5SEC_B2SRT_YWY

Suspenze kompetentních bakterií *E. coli* TOP 10 o objemu 100 µl byla vyjmuta z mrazáku, kde byla uchovávána při teplotě -85 °C, a rozmražena na vodní lázni s drceným ledem. K rozmrzlé buněčné suspenzi bylo přidáno 20 µl reakční směsi po ligaci (viz 4.1.4) a mikrozkuhavka s touto směsí byla ponechána 30 minut na vodní lázni s drceným ledem. Poté byla směs inkubována 40 sekund na termobloku nastaveném na teplotu 42 °C a vrácena zpět na vodní lázeň, kde byla ponechána dalších 10 minut stát. Nakonec byla suspenze transformovaných bakterií pipetována na misku s SOB médiem, které obsahovalo ampicilin o koncentraci 100 µg/ml, a které bylo ztuženo agarem. Miska byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C.

4.1.6 DETEKCE PLAZMIDU PTW5SEC_B2SRT_YWY V KOLONIÍCH

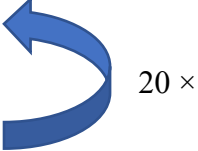
Byla provedena PCR a agarosová elektroforéza za účelem potvrzení přítomnosti insertu o správné velikosti v jednotlivých narostlých koloniích (viz 4.1.5). Pro PCR byla do mikrozkuhavky o objemu 200 µl připravena směs o složení dle Tab. 4. Teplotní program PCR byl nastaven dle Tab. 5 (str. 41).

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR analýzu jedné kolonie bakterií *E. coli* TOP 10 transformovaných plazmidem pTW5sec_B2Srt_YWY.

Složka směsi	Pipetovaný objem (µl)	Koncentrace zás. roztoků
Narostlé bakterie	-	-
Primer mB7H6_C_FW	2	500nM
Primer pTW5seq_REV	2	500nM
Combi PPP MasterMix	10	-
Deionizovaná voda	6	-

Tabulka 5: Nastavení PCR teplotního programu pro amplifikaci úseku plazmidu pTW5sec_B2Srt_YWY.

Teplota (°C)	Čas (min)
95	4:00
95	0:30
55	0:30
72	1:20
72	10:00
4	∞



Gel pro agarosovou elektroforézu byl připraven dle způsobu popsaného v odstavci 4.1.2. Ke vzorku však tentokrát nebylo potřeba přidat barvivo, neboť použitý MasterMix plní mj. i roli vzorkového barviva. Do jamek gelu bylo pipetováno pět produktů PCR jednotlivých kolonií a dále též 3 μ l 100 bp a 1kbp DNA markerů. Po elektroforetické separaci (180 V, 20 min) byl gel prosvícen UV světlem a pomocí přístroje Alliance Q9 byla pořízena fotodokumentace.

4.1.7 NÍZKOOBJEMOVÁ PRODUKCE PLAZMIDU pTW5SEC_B2SRT_YWY

Pro kolonie bakterií *E. coli* TOP 10, které byly transformovány pomocí plazmidu pTW5sec_B2Srt_YWY a v nichž byla pomocí PCR potvrzena přítomnost tohoto plazmidu (viz 4.1.6), byla následně provedena nízkoobjemová produkce plazmidu. Kolonie byla vždy přenesena do 5 ml SOB média s ampicilinem (100 μ g/ml), inkubována na třepačce (37 °C, 20 hod). Médium s bakteriemi bylo poté odstředěno (4255 \times g, 15 min).

Po odstranění supernatantu byl z pelety bakterií izolován produkovaný plazmid pomocí soupravy NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit. Peleta bakterií byla nejprve rozpuštěna ve 250 μ l pufru A1 určeného k resuspenzi a převedena do 1,5ml mikrozkušavky. Dále bylo do mikrozkušavky přidáno 250 μ l lyzačního pufru A2 a po důkladném promíchání byla směs ponechána 5 minut při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 300 μ l neutralizačního pufru A3 a vzniklá sraženina byla odstředěna (11000 \times g, 10 min). Poté byl ze zkumavky odpipetován roztok, který obsahoval plazmid uvolněný z lyzovaných buněk. Tento roztok byl nanesen na kolonku, na jejíž fritě byla zachytávána plazmidová DNA (kolonka byla součástí zmíněné komerční soupravy). Roztok DNA byl přes fritu protlačen centrifugací (11000 \times g, 1 minuta) a kolonka byla následně opláchnuta

500 µl pufru AW a 600 µl oplachového pufru A4, opět pomocí centrifugace při výše zmíněném nastavení. Poté byla kolonka osušena na centrifuze (11000× g, 2 min) a zachycená DNA byla z frity na centrifuze eluována 50 µl PCR vody o teplotě 50 °C do 1,5ml mikrozkušavky. Koncentrace DNA v získaných roztocích byla zjištěna na spektrofotometru DS-11+ typu „nanodrop“.

4.1.8 OVĚŘENÍ SEKVENCE PLAZMIDU PTW5SEC_B2SRT_YWY

Do 200µl mikrozkušavek byly připraveny směsi pro provedení sekvenační reakce. Do každé zkumavky bylo pipetováno 200 ng plazmidové DNA a 1 µl primeru (přímého či zpětného). Směs ve zkumavce byla vždy doplněna deionizovanou vodou na celkový objem 8 µl. Byly použity primery PTT_FW (přímý) a pTW5seq_REV (zpětný). Sekvenační reakce byla provedena v laboratoři DNA OMICS BIOCEV. Z obdržných výsledků byla následně pomocí programu SnapGene potvrzena správnost sekvence plazmidu.

4.1.9 VELKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDU PTW5SEC_B2SRT_YWY

Buněčná suspenze 100 µl kompetentních buněk *E. coli* DH5α byla vyndána z mrazáku (-85 °C) a rozmražena na vodní lázni s drceným ledem. Poté bylo přidáno 1,85 µl roztoku plazmidu pTW5sec_B2Srt_YWY o koncentraci 540 ng/µl (tj. přibližně 1 µg plazmidové DNA). Buněčná suspenze s plazmidem byla následně inkubována 20 minut na vodní lázni a poté byla použita k zaočkování 500 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml). Směs byla následně inkubována přes noc na třepačce (37 °C). Následující den bylo médium s bakteriemi odstředěno (4255× g, 15 min) a plazmidová DNA byla izolována pomocí sady NucleoBond Xtra Maxi Kit.

Peleta buněk byla nejprve resuspendována v 12 ml pufru RES a následně byly buňky rozloženy pomocí 12 ml lyzačního pufru LYS. Poté byl roztok ponechán 5 minut při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 12 ml neutralizačního pufru NEU a směs byla důkladně promíchána.

Kolona s papírovým filtrem (byla součástí komerční soupravy), která byla určena pro zachycení plazmidové DNA, byla promyta 25 ml ekvilibračního pufru EQU, a poté do ní byl přenesen roztok s lyzovanými buňkami. Filtr byl promyt ještě 15 ml pufru EQU a zlikvidován. Kolona se zachycenou DNA byla následně propláchnuta 25 ml oplachového pufru WASH a DNA byla z kolony eluována 15 ml elučního pufru ELU do centrifugační baňky, do níž bylo přidáno ještě 10,5 ml chlazeného isopropanolu (IPA,

z angl. isopropyl alcohol). Po centrifugaci ($4255\times g$, 30 min) byl supernatant odstraněn a do baňky byly pipetovány 4 ml 70% ethanolu. Po další centrifugaci ($4255\times g$, 5 min) byl ethanol odpařen na vakuovém koncentrátoru DNA CentriVap.

Do centrifugační baňky bylo nakonec pipetováno 1,5 ml deionizované vody (filtrované přes stříkačkový PVDF filtr, velikost pórů $0,22\ \mu\text{m}$), v níž byla na rolovací třepačce rozpuštěna plazmidová DNA. Pomocí spektrofotometru DS-11+ byla určena koncentrace plazmidové DNA v roztoku ($1770\ \text{ng}/\mu\text{l}$).

4.1.10 TRANSIENTNÍ TRANSFEKCE BUNĚK HEK293T

Pro transientní transfekci bylo do 50ml centrifugační baňky odebráno 800 mil. buněk HEK293T, které byly vypěstovány v tekutém živném médiu EX-CELL 293. Odebraný roztok byl centrifugován ($100\times g$, 5 minut), supernatant byl odstraněn a odstředěné buňky byly resuspendovány ve 34 ml média EX-CELL 293.

K suspenzi buněk bylo přidáno $800\ \mu\text{g}$ plazmidové DNA, která obsahovala plazmidy pTW5sec_B2Srt_YWY ($704\ \mu\text{g}$), pTW5_aFGF ($16\ \mu\text{g}$) a pTW5_p27 ($80\ \mu\text{g}$). Kromě plazmidu nesoucího gen pro produkci proteinu B7-H6 (pTW5sec_B2Srt_YWY) byl přidán ještě plazmid s genem pro kyselý růstový faktor fibroblastů (aFGF, z angl. acidic fibroblast growth factor), který reguluje proliferaci, a rovněž i plazmid nesoucí gen kódující enzym p27, inhibitor cyklin dependentních kinas (CDK), kvůli kterému buňky neopouští G_1 fázi, během níž nejlépe produkují proteiny. Tato směs byla připravena do 6 ml fosfátového pufru pro tkáňové kultury (PBS, z angl. Phosphate-buffered saline) a následně přefiltrována přes stříkačkový filtr (PVDF, velikost pórů $0,22\ \mu\text{m}$). Ze zásobního roztoku buněk HEK293T v médiu EX-CELL 293 bylo odebráno 800 milionů buněk, které byly od média odděleny centrifugací ($100\times g$, 5 min). Tyto buňky byly resuspendovány v médiu EX-CELL 293 na celkový objem 34 ml a bylo k nim přidáno 6 ml roztoku směsi plazmidové DNA v PBS pro tkáňové kultury, takže celková koncentrace buněk byla 20 mil./ml. Do tohoto roztoku bylo ještě přidáno $240\ \mu\text{l}$ roztoku lineárního polyethyleniminu (IPEI) o koncentraci $10\ \text{mg}/\text{ml}$, který sloužil jako transfekční činidlo. Hmotnostní poměr IPEI : DNA byl 3 : 1. Tento roztok byl následně přidán k buněčné suspenzi a inkubován na třepačce 90 minut ($37\ ^\circ\text{C}$, 135 ot./min, atmosféra 5% CO_2). Po uplynutí této doby byla suspenze naředěna médiem EX-CELL 293 na objem 400 ml a bylo k ní přidáno 1,6 ml 0,5M kyseliny valproové (VPA, z angl. valproic acid),

kteřá inhibuje dělení buněk. Nakonec byly přidány ještě 4 ml směsi penicilinu a streptomycinu (100× konc.), aby bylo zamezeno kontaminaci bakteriemi.

Tato směs byla inkubována na třepačce při výše zmíněných podmínkách po dobu šesti dnů. Buněčná koncentrace a viabilita byla zkontrolována pomocí počítací buněk CytoSmart. Bylo odebráno 20 µl roztoku, smícháno se stejným objemem 0,4% roztoku trypanové modři v PBS a tato suspenze byla pipetována do Bürkerovy komůrky. Viabilita buněk byla přibližně 20 %. Poté bylo médium s buňkami rozlito do 250ml centrifugačních baněk (Beckman Coulter) a odstředěno (100× g, 10 min). Supernatant po centrifugaci byl odebrán a odstředěn (15000× g, 1 hod). Supernatant po této centrifugaci byl filtrován na vakuovém filtru (vel. pórů 0,22 µm).

4.1.11 PURIFIKACE PROTEINU

Vyprodukovaný protein byl purifikován na soustavě ÄKTA basic (GE Healthcare). Nejprve byla PBS puřrem ekvilibrována kolona s nosičem Ni-NTA k zachycování proteinů s histidinovou kotvou (Cube Biotech) a také odsolovací kolona HiPrep 26/10. K filtrovanému roztoku proteinu nejprve bylo přidáno 100 ml PBS (5× konc.) a poté byl tento roztok pumpován skrz ekvilibrovanou kolonu s nosičem Ni-NTA při rychlosti průtoku 5 ml/min. Následně byla provedena předeluce puřrem PBS s 20mM imidazolem. Roztok vytékající z kolony byl sbírán do 50ml zkumavky. Za tuto kolonu byla následně zapojena odsolovací kolona a protein byl eluován puřrem PBS s 250mM imidazolem. Během eluce byla v programu UNICORN sledována hodnota absorbance mobilní fáze vytékající z kolon. Když stoupla tato hodnota nad stálou základní úroveň, byl vytékající roztok jímán do 50ml zkumavky, dokud hodnota absorbance opět neklesla. Takto sesbíraný roztok proteinu byl pomocí koncentrátoru Amicon (5 ml, 10kDa) na centrifuze koncentrován na celkový objem 250 µl.

Posledním krokem purifikace byla separace proteinů za použití gelové permeační chromatografie (SEC, z angl. size-exclusion chromatography). Separace byla prováděna na koloně Superdex 200 (10/300 GL), která byla nejprve ekvilibrována přibližně 30 ml HEPES puřru (pH 7,5) při průtoku 0,5 ml/min, dokud se měřená hodnota konduktivity mobilní fáze vytékající z kolony neustálila. Poté byla provedena separace proteinů obsažených v 250 µl koncentrátu. Společně s nástřikem vzorku z mikrostríkačky (Hamilton) na kolonu byl zapnut sběr 1ml frakcí roztoku vytékajícího z kolony do mikrozkuhavek. V průběhu separace byla v programu UNICORN sledována absorbance

roztoku vytékajícího z kolony. Z měřených hodnot absorbance byl sestaven chromatogram, na jehož základě byly vybrány frakce 4–11 pro další analýzu.

4.1.12 ANALÝZA ZÍSKANÝCH PROTEINŮ

Pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, z angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) byly připraveny dva 12,5% gely o tloušťce 0,75 mm. Elektroforéza byla prováděna na komerční soupravě firmy Bio-Rad. Pro přípravu gelů byla pipetována směs o složení, které popisuje Tab. 6.

Tabulka 6: Složení směsi pro přípravu dvou 12,5% gelů o tloušťce 0,75 mm pro SDS-PAGE.

Složka směsi	Pipetovaný objem
Deionizovaná voda	2,53 ml
29% akrylamid + 1% bis-akrylamid	3,36 ml
1,5M Tris pufr (pH 8,8)	2,00 ml
10% roztok SDS	80 µl
TEMED	4 µl
10% APS	80 µl

Touto směsí byl nejprve zhruba ze dvou třetin naplněn prostor mezi skly (byla součástí komerční soupravy) a po převrstvení deionizovanou vodou byl gel ponechán přibližně 30 minut utuhnout. Po uplynutí této doby byla voda odstraněna a do zbylého prostoru mezi skly byla pipetována směs pro přípravu zaostřovacího gelu o složení, jež bylo zaznamenáno do Tab. 7. Mezi skla byl rovněž zasunut hřeben pro vytvoření jamek, do nichž byly později pipetovány vzorky (viz dále).

Tabulka 7: Složení roztoku pro přípravu dvou zaostřovacích gelů.

Složka směsi	Pipetovaný objem
Deionizovaná voda	2,1 ml
29% akrylamid + 1% bis-akrylamid	0,75 ml
1,5M Tris pufr (pH 6,8)	0,375 ml
10% roztok SDS	30 µl
TEMED	4 µl
10% APS	30 µl

Následně byla provedena analýza vzorků pomocí SDS-PAGE, přičemž na jednom z gelů byly analyzovány vzorky v redukujícím prostředí a na druhém v prostředí

neredukujícím. Z jednotlivých roztoků určených k analýze bylo odebráno 20 μl a přeneseno do mikrozkušavky. Po přidání 5 μl 5 \times koncentrovaného vzorkového pufru (redukujícího či neredukujícího) byly tyto roztoky denaturovány 5 minut na termobloku při teplotě 95 $^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly poté pipetovány do jamek gelů, které byly ponořeny do pufru pro SDS elektroforézu. Elektroforéza probíhala 50 minut při napětí 200 V. Poté byly gely vyjmuty a přes noc obarveny v barvicím roztoku (45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 v deionizované vodě). Následující den byly gely odbarveny v roztoku k tomu určeném [35 % methanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v) v deionizované vodě] a pomocí přístroje Alliance Q9 byla pořízena fotodokumentace.

Pomocí spektrofotometru DS-11+ Series typu „nanodrop“ byla zjištěna koncentrace proteinu ve frakcích. Molární absorpční koeficient daného proteinu byl určen na základě aminokyselinové sekvence pomocí webového nástroje ExPASy ProtParam [90].

4.1.13 LINEARIZACE PLAZMIDU pUT7

Pro linearizaci plazmidu pUT7 byla do 200 μl mikrozkušavky připravena směs obsahující 3 μg plazmidu pUT7, restriční endonukleasy PmeI a Nhe-HF, CutSmart pufr a deionizovanou vodu o celkovém objemu 20 μl . Po inkubaci (37 $^{\circ}\text{C}$, 1 hod) a následném po přidání 4 μl barviva Gel Loading Purple Dye (6 \times konc.) byla tato směs analyzována na 1% agarosovém gelu (viz 4.1.2). Po prosvícení modrým světlem a ověření délky produktu reakce byl linearizovaný plazmid přečištěn pomocí komerční soupravy NucleoSpin Gel and PCR clean-up, viz odst. 4.1.3. Na spektrofotometru DS-11+ Series byla následně zjištěna koncentrace linearizovaného plazmidu, která činila 40 ng/ μl .

4.1.14 VNESENÍ GENU DO LINEARIZOVANÉHO PLAZMIDU pUT7

Do 200 μl mikrozkušavky byla pipetována reakční směs pro vložení genu B₂Srt_YWY do linearizovaného plazmidu pUT7. Směs o objemu 15,5 μl obsahovala 137 ng linearizovaného plazmidu, 17 ng insertu, 0,5 μl T4 DNA polymerasy (3000 U/ml), pufr NEB 2.1 a deionizovanou vodu.

Do zkušavky byly nejprve pipetovány všechny složky reakce, kromě T4 polymerasy. Poté byla reakční směs předehřata termoblokem na 50 $^{\circ}\text{C}$ a až poté byla přidána T4 polymerasa. Směs byla inkubována (50 $^{\circ}\text{C}$, 30 s) a přenesena na vodní lázeň s drceným ledem.

4.1.15 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BAKTERIÍ PLAZMIDEM PUT7_B2SRT_YWY

Suspenze kompetentních bakterií *E. coli* TOP10 o objemu přibližně 100 µl, která byla uchovávána v mrazáku (-85 °C) byla rozmrazena na vodní lázni s drceným ledem a poté k ní byl přidán roztok plazmidu pUT7_B2Srt_YWY. Směs byla inkubována na zmíněné vodní lázni (30 min) a následně natřena na misku s SOB médiem a ampicilinem (100 µg/ml), které bylo ztuženo agarem. Miska byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C.

4.1.16 DETEKCE PLAZMIDU V KOLONIÍCH POMOCÍ PCR

Z bakterií vyrostlých na misce (viz 4.1.15) bylo vybráno 18 kolonií pro analýzu pomocí PCR, aby bylo zjištěno, zda kolonie obsahují plazmid o správné velikosti. Analýza byla provedena způsobem popsaným v odst. 4.1.6 za použití 5µM zásobních roztoků primerů mB7-H6_C_FW (přímý) a pCT5seq_REV (zpětný).

4.1.17 ELEKTROFORÉZA V AGAROSOVÉM GELU

Pro analýzu produktů PCR (viz 4.1.16) byl připraven 1% gel pomocí postupu popsaného v odst. 4.1.2. Do jamek gelu bylo pipetováno vždy 7 µl reakční směsi po provedené PCR, přičemž do krajní jamky gelu bylo pipetováno 5 µl 100 bp DNA markeru. Po elektroforetické separaci (180 V, 20 min) byla na přístroji Alliance Q9 pořízena fotodokumentace.

4.1.18 NÍZKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDU PUT7_B2SRT_YWY

Kolonie, v níž byla potvrzena přítomnost plazmidu pUT7_B2Srt_YWY, byla přenesena do 5 ml SOB média s ampicilinem (100 µg/ml) a inkubována na třepačce (37 °C, přes noc). Následující den byla provedena centrifugace (4255× g, 10 min) a ze získané pelety bakterií byl pomocí komerční sady NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit izolován plazmid (postup viz 4.1.7). Po eluci plazmidu do 50 µl deionizované vody (filtrované přes stříkačkový filtr, vel. pórů 0,22 µm) byla na spektrofotometru DS-11+ Series zjištěna koncentrace plazmidu v získaném roztoku.

4.1.19 OVĚŘENÍ SEKVENCE PLAZMIDU PUT7_B2SRT_YWY

Sekvence plazmidu pUT7_B2Srt_YWY byla ověřena způsobem popsaným v odst. 4.1.8 za použití primerů pCT5seq_FW a pCT5seq_REV.

4.1.20 STŘEDNĚOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDU pUT7_B2SRT_YWY

Suspenze buněk *E. coli* DH5 α byla vyjmuta z mrazáku (-85 °C), rozmrazena na vodní lázni s drceným ledem a následně k ní byl přidán 1 μ g plazmidu pUT7_B2Srt_YWY a směs byla inkubována na vodní lázni (20 min). Do 2L Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 500 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) a následně byl přidán roztok bakterií transformovaných zmíněným plazmidem. Tato směs byla následně inkubována na třepačce (37 °C, 140 ot./min., přes noc).

Následující den byla směs odstředěna (4255 \times g, 15 min) a plazmidová DNA z ní byla získána pomocí komerční sady NucleoBond Xtra Maxi Plus (postup viz 4.1.9). Zachycená DNA byla z kolony uvolněna 5 ml elučního pufru ELU do 15ml zkumavky. Po přidání 3,5 ml IPA byl roztok promíchán na stolní třepačce a ponechán 2 minuty stát. Suspenze DNA byla poté přenesena do plastové stříkačky a přefiltrována přes filtr NucleoBond Finalizer (byl součástí komerční sady). Filtr byl propláchnut 4 ml 70% ethanolu a vysušen opakovaným protlačováním vzduchem. Zachycená DNA byla následně z filtru eluována čtyřmi proplachy 200 μ l pufru TRIS. Na spektrofotometru DS-11+ Series byla následně zjištěna koncentrace plazmidu pUT7_B2Srt_YWY v získaném roztoku.

4.1.21 TVORBA STABILNÍ LINIE BUNĚK HEK293T PRO PRODUKCI PROTEINU B2SRT

Pro tvorbu stabilní linie buněk HEK293T byla nejprve připravena směs plazmidové DNA o celkovém objemu 200 μ l, která obsahovala plazmidy pUT7_B2Srt_YWY (48 μ g), PB-RB (6 μ g) a pBase (6 μ g). Směs byla po přípravě filtrována přes stříkačkový filtr (PVDF, vel. pórů 0,22 μ m).

Ze zásobního roztoku buněk HEK293T v živném médiu EX-CELL bylo odebráno 30 ml buněk a odstředěno (100 \times g, 5 min). K buňkám bylo přidáno 100 μ l směsi plazmidů a 9,9 μ l roztoku IPEI-Max (9,1 mg/ml). Směs byla naředěna médiem EX-CELL 293 na objem 1,5 ml a přenesena do skleněné lahvičky s prodyšným víčkem. Lahvička byla umístěna na třepačku, kde byla inkubována 3 hodiny (37 °C, 135 ot./min, atmosféra 5% CO $_2$). Po uplynutí této doby byl roztok v lahvičce naředěn médiem EX-CELL na celkový objem 30 ml. Do směsi byla po dvou dnech přidána antibiotika puromycin a blastidicin na celkovou koncentraci 5 μ g/ml. Lahvička s prodyšným víčkem byla poté vrácena zpět na třepačku, kde byla za stálého míchání inkubována při výše zmíněných podmínkách.

V následujících dnech byla vždy změřena viabilita buněk (postup viz 4.1.10), suspenze buněk odstředěna ($100\times$ g, 5 min) a buňky resuspendovány v čerstvém médiu EX-CELL 293 s antibiotiky (puromycin a blasticidin, 5 $\mu\text{g/ml}$). Když byla koncentrace buněk příliš vysoká (více než 6 mil./ml), bylo ze suspenze odebráno 30 mil. buněk přeneseno do čerstvého média. Tento postup byl opakován, dokud buňky nepřestaly vlivem antibiotik silně vymírat. Poté bylo v lahvičce ponecháno 15 mil. buněk, doplněno čerstvým médiem s antibiotiky na objem 30 ml a opět inkubováno ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 135 ot./min, atmosféra 5% CO_2). Zbylých 23,5 ml suspenze buněk bylo přeneseno do 500ml skleněné lahve s prodyšným víčkem, doplněno médiem EX-CELL 293 na celkový objem 150 ml a inkubováno při zmíněných podmínkách.

4.1.22 PRODUKCE PROTEINU B2SRT_YWY VE STABILNÍ LINII BUNĚK HEK293T

Skleněná 500ml láhev se 150 ml média EX-CELL 293 a s buňkami vytvořené stabilní linie HEK293T_B2Srt_YWY (viz 4.1.21) byla inkubována 3 dny. Poté bylo médium s buňkami přelito do 50ml centrifugačních baněk, odstředěno ($100\times$ g, 5 min) a buňky byly převedeny do 1,5l skleněné lahve s prodyšným víčkem, kde byly doplněny médiem EX-CELL 293 na celkový objem 400 ml. Expres proteinu byla zahájena přidávkem doxycyklinu na celkovou koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a láhev byla inkubována 5 dní na třepačce ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 135 ot./min, atmosféra 5% CO_2).

Po pěti dnech bylo médium s buňkami pipetováno do 50ml centrifugačních baněk a odstředěno ($100\times$ g, 5 min). Supernatant byl následně přenesen do 250ml centrifugačních baněk, odstředěn ($15000\times$ g, 1 hod). a přefiltrován přes vakuový filtr (PES, velikost pórů 0,22 μm).

4.1.23 PURIFIKACE PROTEINU B2SRT_YWY

Purifikace proteinu B2Srt_YWY byla provedena stejným způsobem a za použití téže instrumentace, jako při transientní transfekci (viz odst. 4.1.11).

4.1.24 ANALÝZA FRAKČÍ POMOCÍ SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE byly pomocí komerční soupravy (Bio-Rad) připraveny dva 10% gely o tloušťce 1 mm (postup viz 4.1.12). Analýza byla prováděna v redukujícím a neredukujícím prostředí, na každém z gelů jiná. Na konec byla pomocí přístroje Alliance Q9 byla pořízena fotodokumentace obarvených gelů, z níž bylo zjištěno, že protein B2Srt_YWY byl nejvíce obsažen ve frakcích 8 a 9. Na spektrofotometru DS-11+ Series byla zjištěna koncentrace proteinu v těchto frakcích.

4.2 PRODUKCE ENZYMU SORTASY A (7+) BAKTERIÁLNÍM EXPRESNÍM SYSTÉMEM

4.2.1 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BAKTERIÍ PLAZMIDEM PET30B_7+SRTA

Suspenze kompetentních bakterií *E. coli* DH5 α byla transformována 114 μ g plazmidu pET30b_7+SrtA (poskytl Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.); postup viz odst. 4.1.5. Transformované bakterie byly po teplotním šoku (50 s, 41 °C) inkubovány 5 min na vodní lázni s drceným ledem a následně naředěny sterilním SOB médiem na objem 1 ml. Po inkubaci (37 °C, 1 hod) bylo ze směsi odebráno 100 μ l a přeneseno na misku s SOB médiem s kanamycinem (50 μ g/ml), které bylo ztuženo agarem. Miska byla inkubována do druhého dne při 37 °C.

4.2.2 VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE PLAZMIDU PET30B_7+SRTA

Byla odebrána jedna kolonie, která narostla na inkubované misce (viz 4.2.1) a byla přidána do 500 ml LB média s kanamycinem (50 μ g/ml). Láhev s tímto roztokem byla inkubována na třepačce (37 °C, 200 ot./min) do druhého dne, kdy byla provedena izolace plazmidové DNA pomocí komerční soupravy NucleoBond Xtra Maxi Kit (postup dle odst. 4.1.9).

4.2.3 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BAKTERIÍ PLAZMIDEM PET30B_7+SRTA

Transformace kompetentních bakterií *E. coli* T7 byla provedena způsobem popsáním v odst. 4.2.1.

4.2.4 VELKOOBJEMOVÁ PRODUKCE SORTASY A (7+)

Jedna z kolonií transformovaných bakterií (viz 4.2.3) byla přidána do 5 ml SOB média s kanamycinem (50 μ g/ml) a inkubována na třepačce (37 °C, přes noc). Druhý den byl z této směsi přenesen 1 ml do 500 ml TB média s kanamycinem (50 μ g/ml) ve 2l Erlenmeyerově baňce a směs byla inkubována na třepačce (37 °C, 180 ot./min). Během inkubace byla na spektrofotometru Cary 60 UV-VIS průběžně měřena optická hustota roztoku při vlnové délce 500 nm (OD_{500}). Po dosažení hodnoty OD_{500} přibližně 0,6 byla teplota snížena na 30 °C a do směsi bylo přidáno 0,5 ml 1M roztoku isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG). Směs byla poté dále inkubována (30 °C, 180 ot./min, přes noc).

Následující den byl roztok odstředěn (4255 \times g, 30 min). Pelety buněk byly resuspendovány ve 25 ml pufru HEPES (pH 7,5), čímž vznikla směs o celkovém objemu 30 ml. Do směsi bylo poté přidáno 30 μ l lysozymu (100 mg/ml), 30 μ l leupeptinu (1 mg/ml), 30 μ l pepstatinu (1 mg/ml), 6 μ l RNAsy A (10 μ g/ml), 30 μ l chloridu

hořečnatého (100mM) a 25 μ l fenylmethylsulfonyl fluoridu (PMSF, 100 mM). Následně byly bakterie sonikovány přístrojem Sonoplus osazeném sondou MS73 (1s pulsy v 1s intervalech, 27 W, 4 \times 60 sekund). Získaný buněčný lyzát byl odstředěn (4255 \times g, 40 min) a supernatant přefiltrován přes vakuový filtr (PES, vel. pórů 0,22 μ m).

4.2.5 PURIFIKACE SORTASY A (7+)

Ke 30 ml filtrátu (získaného v odst. 4.2.4) bylo přidáno 200 ml pufru HEPES (pH 7,5). Následná purifikace byla provedena způsobem popsáním v odst. 4.1.11, přičemž eluce byla v tomto případě provedena pufrům HEPES s 250mM imidazolem. Bylo zjištěno, že proteiny jsou obsaženy ve frakcích 6–13. Pro tyto frakce byla na spektrofotometru DS-11+ Series zjištěna koncentrace proteinu.

4.3 TRANSPEPTIDASOVÁ REAKCE KATALYZOVANÁ SORTASOU A (7+)

4.3.1 PŘÍPRAVA REAKČNÍ SMĚSI

Do 200 μ l mikrozkušavky byla pipetována reakční směs o celkovém objemu 20 μ l, která obsahovala protein B₂Srt_YWY (5 μ M), Sortasu A (7+) (5 μ M) a tetrapeptid GGGK, fluorescenčně značený tetramethylrhodaminem (dále GGGK-TAMRA). Koncentrace značeného peptidu v reakční směsi byla 500 μ M.

Reakce probíhala 1 hodinu při 37 °C. Poté bylo do reakční směsi přidáno 5 μ l 6 \times koncentrovaného redukovacího vzorkového pufru pro SDS-PAGE a vzniklý roztok byl denaturován na termobloku 5 min při 95 °C.

4.3.2 ANALÝZA REAKČNÍ SMĚSI POMOCÍ SDS-PAGE

Analýza metodou SDS-PAGE byla provedena pomocí komerční soupravy Bio-Rad způsobem popsáním v odst. 4.1.12. Po elektroforetické separaci (200 V, 1 hod) byl gel vyjmut ze skel a rozdělen na dvě shodné poloviny. Jedna polovina byla použita pro analýzu metodou Western blot (viz dále, odst. 4.3.3). Druhá polovina byla umístěna do odbarvovacího roztoku (viz 4.1.12) a byla pořízena fotodokumentace pomocí fluorescenčního zobrazovacího zařízení Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare). Dále byla tato polovina gelu obarvena (viz 4.1.12) a pomocí přístroje Alliance Q9 byla pořízena fotodokumentace.

4.3.3 DETEKCE PRODUKTŮ REAKCE METODOU WESTERN BLOT

Druhá polovina gelu po SDS-PAGE (viz 4.3.2) byla přenesena na nitrocelulosovou membránu (Pall) (8,5 \times 5 cm). Membrána s gelem byly z obou stran obloženy 10 kusy

filtračního papíru ($10,5 \times 7$ cm), jenž byl namočen v přenosovém pufru, a umístěny do kazety pro elektropřenos proteinů na membránu (Bio-Rad). Následně byl pomocí přístroje Trans-Blot Turbo proveden elektropřenos (25 V, 2,5 A, 15 min). Membrána byla poté vyjmuta, převrstvena 1% roztokem hovězího sérového albuminu (BSA, z angl. bovine serum albumin) v TBS pufru (z angl. Tris buffered saline) a uschována v lednici do druhého dne.

Následující den byla membrána vložena do 50ml zkumavky, opláchnuta dvakrát 5 ml TBS Tris/Tween-Triton pufru a poté ještě 5 ml TBS pufru. Oplachy byly provedeny na rolovací třepačce. Dále byla membrána vyjmuta, převrstvena 5 ml 1% BSA v TBS pufru, do něhož byly přidány 2 μ l roztoku myší monoklonální IgG protilátky Penta-His proti histidinové kotvě (Qiagen) a umístěna na orbitální třepačku. Po 30 min byla membrána opět opláchnuta výše popsáním způsobem.

Dále byla membrána vyjmuta a převrstvena 5 ml 5% roztoku sušeného mléka v TBS pufru, do něhož byly přidány 2 μ l králičí polyklonální protilátky proti myšimu IgG, konjugované s křenovou peroxidasou a 2 μ l kozí polyklonální protilátky proti myšimu IgG, konjugované s alkalickou fosfatase. Membrána s roztokem byla inkubována 30 minut na orbitální třepačce a následně opláchnuta 3×5 ml TBS pufru. Ze zkumavky byl poté odstraněn TBS pufr a nahrazen 5 ml AP pufru s 33 μ l roztoku NBT (Nitro Blue Tetrazolium, 50 mg/ml v 70% dimethylformamidu) a 16,5 μ l roztoku BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát, 50 mg/ml v dimethylformamidu). Zkumavka s membránou a roztokem byla ponechána na rolovací třepačce, dokud nedošlo k vizualizaci zachycených proteinů. Nakonec byla pomocí přístroje Alliance Q9 pořízena fotodokumentace.

4.4 IZOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ KALORIMETRIE

Měření izotermální titrační kalorimetrií (ITC, z angl. isothermal titration calorimetry) bylo prováděno pomocí přístroje PEAQ-ITC (Malvern Panalytical) v Centru Molekulární Struktury BIOCEV. Veškerá měření vykonávala Tatsiana Charnavets, Ph.D. za asistence Mgr. Ondřeje Skořepy, Ph.D. Pro měření byl připraven 160 μ M roztok NKp30 LBD (ve stříkačce) a 16,2 μ M roztoky (v cele) jednotlivých variant B7-H6 (IYY a IWY), vždy v témže pufru HEPES. Titrace byla zahájena přidávkem 0,4 μ l ze stříkačky do cely a následovalo 17 přidávků po 1,8 μ l s dobou nástřiku 3 s za míchání 750 ot./min, 25 °C a

150 s proluky mezi přídávky. Získaná data byla vyhodnocena v programech NITPIC [91], GUSI [92] a SEDPHAT [93].

4.5 NESPECIFICKÉ ZNAČENÍ PROTEINU B7-H6_IWY

Z roztoku proteinu B7-H6_IWY (poskytla Mgr. Viktorie Malá) o koncentraci 3,95 mg/ml bylo odebráno 253 μ l. Odsolovací kolonka HiPrep 26/10 byla ekvilibrována 100mM roztokem uhličitanu sodného (pH 8,3) pomocí chromatografické soustavy ÄKTA basic. Následně bylo 253 μ l roztoku proteinu nastříknuto pomocí mikrostríkačky do 500 μ l vzorkové smyčky a pumpováno na kolonu za použití zmíněného roztoku uhličitanu sodného jako mobilní fáze. Okamžité hodnoty absorbance mobilní fáze vytékající z kolony byly sledovány v programu UNICORN. Když tyto hodnoty stouply nad stálou základní úroveň, byla mobilní fáze sbírána do 15ml zkumavky, dokud se měřené hodnoty absorbance nevrátily zpět na původní úroveň. Takto bylo sesbíráno přibližně 1,25 ml roztoku o koncentraci 0,36 mg/ml. Koncentrace byla zjištěna pomocí spektrofotometru DS-11+. Tento roztok byl následně pomocí koncentrátoru Amicon (5 ml, 10kDa) koncentrován pomocí centrifugace (4255 \times g), dokud nebyla jeho koncentrace 2,4 mg/ml.

Dále byl připraven zásobní roztok pro fluorescenční značení proteinů. Bylo rozpuštěno 100 μ g sukcinimidyl esteru fluorescenčního barviva Alexa Fluor 647 ve 100 μ l bezvodého dimethylsulfoxidu (DMSO). Dále byla připravena reakční směs o objemu 275 μ l, jež obsahovala 25 μ l roztoku barviva (1 mg/ml), 208 μ l roztoku B7-H6_IWY (2,4 mg/ml) a 42 μ l roztoku uhličitanu sodného (100mM, pH 8,3). Reakce probíhala 60 min ve tmě při pokojové teplotě. Poté byla směs pomocí mikrostríkačky nastříknuta do 500 μ l vzorkové smyčky soustavy ÄKTA basic a následně byla provedena její chromatografická separace na malé odsolovací koloně HiPrep za použití 100mM roztoku uhličitanu sodného (pH 8,3) jako mobilní fáze. Během separace byly sledovány okamžité hodnoty absorbance mobilní fáze, která z kolony vytékala. Když tyto hodnoty vzrostly nad stálou základní hodnotu, byl roztok vytékající z kolony sbírán do 15ml zkumavky, dokud hodnoty neklesly zpět na původní hladinu.

Stupeň značení získaného proteinu byl zjištěn pomocí spektrofotometru DS-11+, jehož software umožňuje spočítat stupeň značení z vnitřní databáze molekulových hmotností, absorpčních vlnových délek a molárních absorpčních koeficientů mnoha komerčně dostupných barviv.

4.6 ANALYTICKÁ GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Ke chromatografické soustavě ÄKTA byla připojena kolona Superdex 200 Increase (10/300 GL), která byla následně ekvilibrována pufrům HEPES (pH 7,5). Poté byly na kolonu skrz 250 μ l vzorkovou smyčku přiváděny roztoky proteinů za použití zmíněného pufru HEPES jako mobilní fáze. Absorbance mobilní fáze vytékající z kolony byla vždy zaznamenávána do chromatogramu. Takto byla provedena analýza proteinů B7-H6_IWY, LBD, B7-H6_IWY značeného barvivem Alexa Fluor 647 (B7-H6_IWY_AF647) a následně směsí B7-H6_IWY s LBD a B7-H6_IWY_AF647 s LBD. Roztok LBD poskytl Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D. Složení roztoků, které byly postupně nastříkávány na kolonu, popisuje Tab. 8.

Tabulka 8: Přehled a složení roztoků, které byly analyzovány gelovou permeační chromatografií. Analýza probíhala na koloně Superdex 200 Increase (10/300 GL) za použití pufru HEPES (pH 7,5) jako mobilní fáze .

Směs	Složka směsi	Objem (μl)	Zás. koncentrace
B7-H6_IWY	B7-H6_IWY	63,8	0,43 mg/ml
	Pufr HEPES	6,2	-
LBD	LBD	24,8	2,3 mg/ml
	Pufr HEPES	55,2	-
B7-H6_IWY_AF647	B7-H6_IWY_AF647	63,8	0,46 mg/ml
	Pufr HEPES	6,2	-
B7-H6_IWY + LBD	B7-H6_IWY	63,8	0,43 mg/ml
	LBD	6,2	2,3 mg/ml
B7-H6_IWY_AF647 + LBD	B7-H6_IWY_AF647	63,8	0,46 mg/ml
	LBD	6,2	2,3 mg/ml

5 VÝSLEDKY

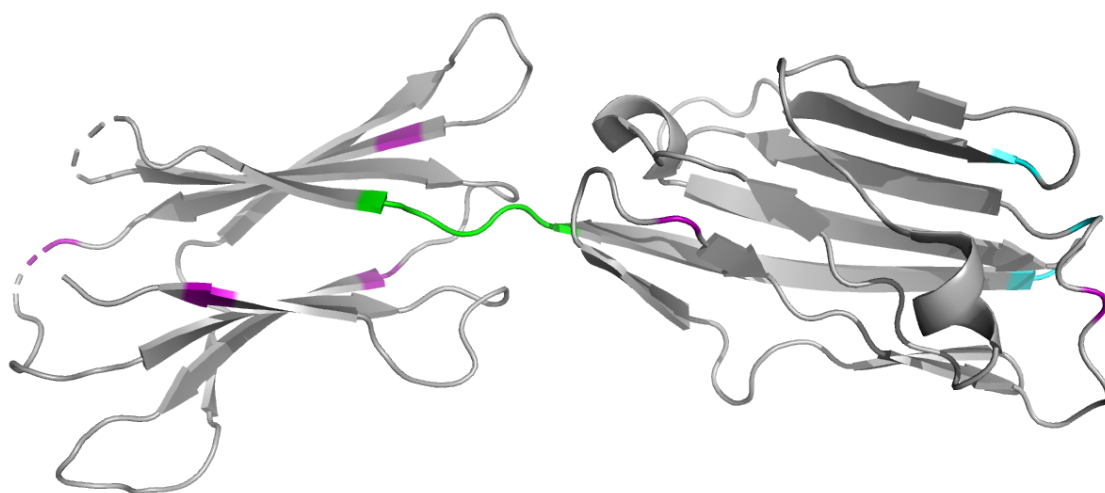
5.1 REKOMBINANTNÍ EXPRESE PROTEINU B₂SRT_YWY POMOCÍ TRANSIENTNÍ TRANSFEKCE

5.1.1 PŘÍPRAVA PLAZMIDU PTW5SEC_B₂SRT_YWY

Prvním krokem bylo vnesení genu B₂Srt_YWY do plazmidu pTW5sec. Gen B₂Srt_YWY kóduje protein B7-H6, jehož aminokyselinová sekvence je uvedena na Obr. 6. Oproti přirozeně se vyskytující formě proteinu B7-H6 byly provedeny 3 bodové mutace na interakčním rozhraní s receptorem NKp30 a rovněž byla upravena aminokyselinová sekvence krátkého lineárního řetězce, který spojuje jeho dvě domény podobné imunoglobulinu, aby obsahovala sekvenci aminokyselin LPETG, jak lze vidět na modelu struktury proteinu B7-H6 (Obr. 7).

```
ITGDLKVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQPLNITYMGITWFWKSLTFDKEVK
VFEFWGDHQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASLRLPGIQLEEAGEYRCEVVVTPYKAQG
TVQLEVLLPETGSRLLLDQVGMKENEKDYMCESSESGFYPEAINITWEKQTQKFPHPIE
ISEDVITGPTIKNMDGTFNVTSSLKLNSSQEDPGTVYQCVVRHASLHTPLRSNFTL
GTHHHHHHHH
```

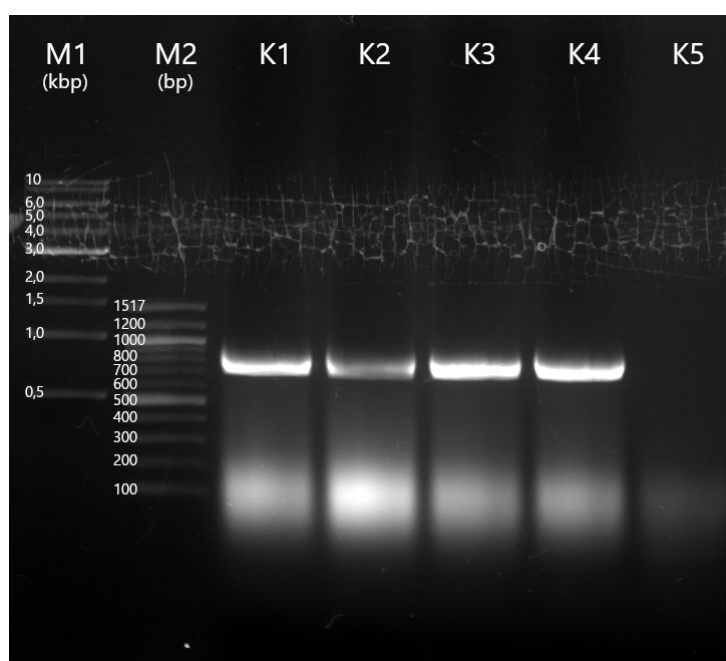
Obrázek 6: Sekvence aminokyselin v primární struktuře proteinu B₂Srt_YWY. Zeleně je označena sekvence rozeznávaná enzymem Sortasou A (7+), modře jsou označeny bodové mutace pro zvýšení afinity k receptoru NKp30 a fialově jsou označeny aminokyseliny, které mohou být glykosylovány.



Obrázek 7: Model struktury proteinu B₂Srt_YWY. Zeleně je označena sekvence rozeznávaná enzymem Sortasou A (7+), modře jsou označeny bodové mutace pro zvýšení afinity k receptoru NKp30 a fialově jsou označeny aminokyseliny, které mohou být glykosylovány. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL (PDB kód: 3PV7) [75].

Plazmid pTW5sec, linearizovaný pomocí restričních endonukleas AgeI a KpnI byl v dostatečném množství poskytnut Bc. Kristýnou Pazderovou. Gen B₂Srt_YWY bylo nejprve nutné amplifikovat PCR (viz 4.1.1). Takto se podařilo získat zásobní roztok genu o koncentraci 38 ng/μl, který byl následně vnesen do zmíněného linearizovaného plazmidu za použití T4 DNA-ligasy.

Takto připraveným plazmidem byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* TOP10, jejichž kolonie byly posléze analyzovány pomocí PCR za použití primerů mB7-H6_C_FW a pTW5seq_REV. Výsledný produkt měl mít délku 806 bp. Ve čtyřech z pěti kolonií byla potvrzena přítomnost plazmidu s genem o požadované délce (viz Obr. 8).



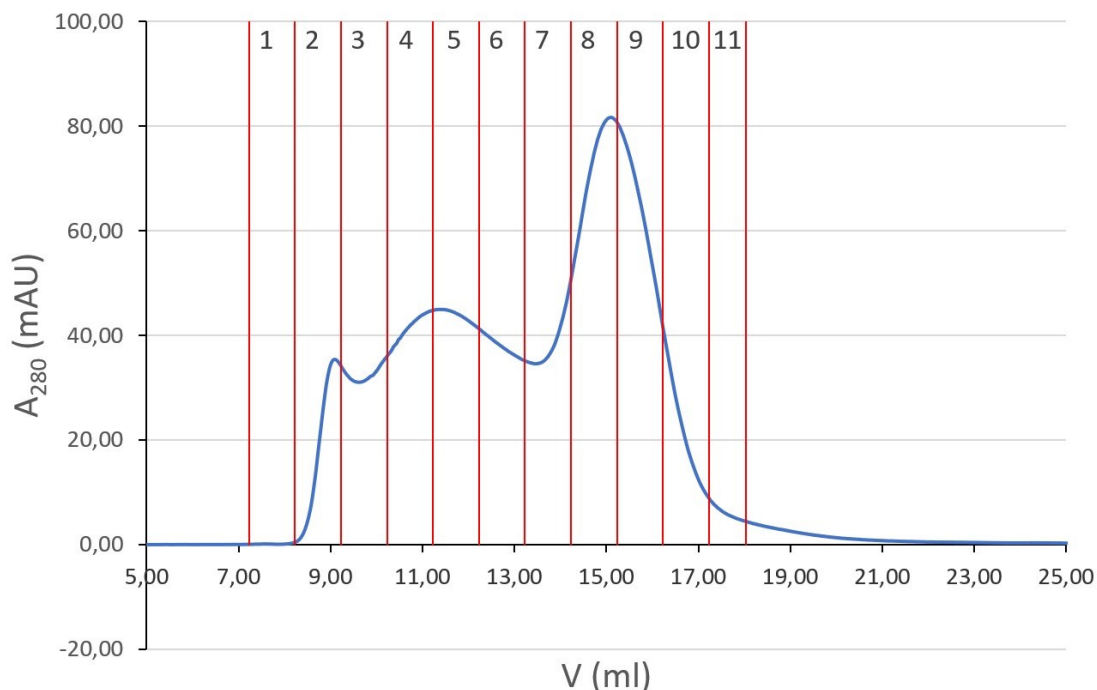
Obrázek 8: Fotodokumentace výsledků agarosové elektroforézy. M1 a M2 označuje použité markery Quick-Load Purple DNA. K1–K5 pak označuje jednotlivé kolonie, v nichž byl pomocí PCR amplifikován plazmid pTW5sec_B₂Srt_YWY (byl-li přítomen). Přítomnost tohoto plazmidu byla potvrzena v koloniích 1–4.

Po nízkoobjemové produkci a ověření sekvence plazmidu v laboratoři sekvenací byla provedena velkoobjemová produkce plazmidu pTW5sec_B₂Srt_YWY, jímž byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* DH5α. Takto byl připraven 1,5 ml roztoku o koncentraci DNA 1170 ng/μl, tedy zhruba 2,6 μg plazmidové DNA.

5.1.2 PURIFIKACE PROTEINU B2SRT_YWY

Buňky HEK293T byly transfekovány plazmidem pTW5sec_B₂Srt_YWY. Pro produkci proteinu bylo použito cca 800 mil. buněk ve 400 ml média. Po šestidenní produkci byl

vyprodukovaný protein z média izolován a rozdělen do 1ml frakcí (postup viz 4.1.11). Chromatografický záznam této separace znázorňuje Obr. 9. Ve frakcích 8, 9 a 10 byla spektrofotometricky zjištěna koncentrace proteinu. Jelikož měly jednotlivé frakce objem vždy 1 ml, bylo zjištěno, že ve frakcích 8 (0,161 mg/ml), 9 (0,230 mg/ml) a 10 (0,078 mg/ml) bylo celkem obsaženo 0,469 mg proteinu (což odpovídá 1,17 mg/l média).



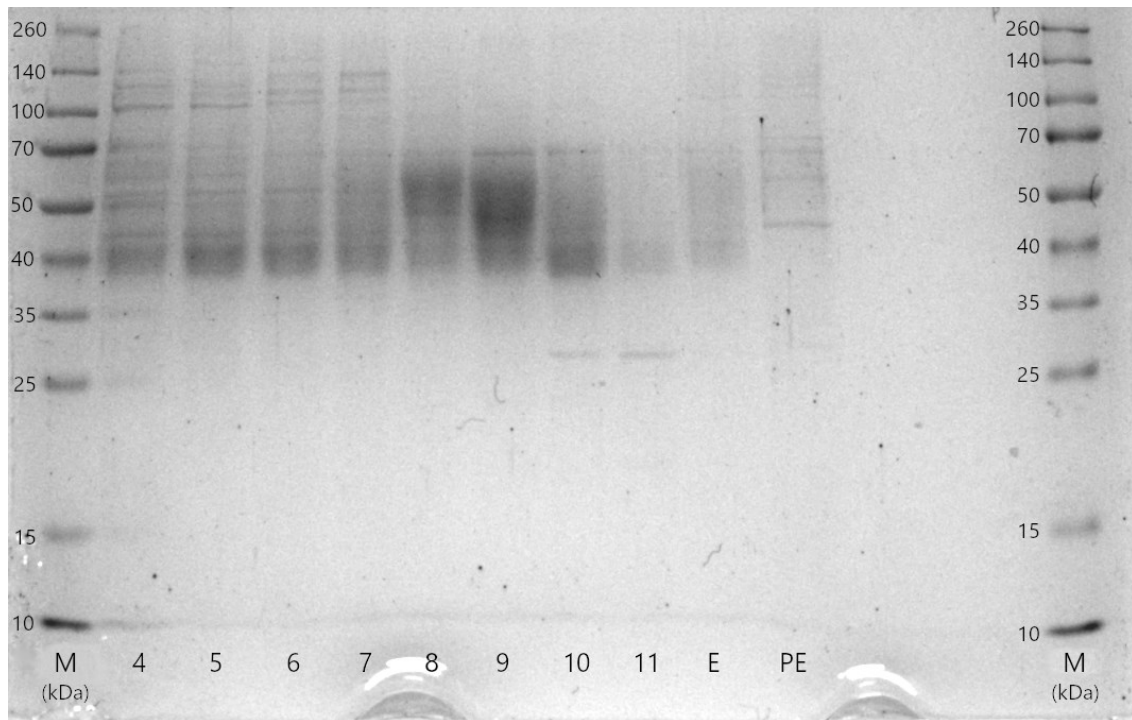
Obrázek 9: Chromatografický záznam purifikace proteinů pomocí gelové permeační chromatografie. Proteiny byly vyprodukovány v buňkách HEK293T pomocí transientní transfekce a pomocí afinitní chromatografie izolovány z média. Separace probíhala na koloně Superdex 200 (10/300 GL). Graf znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze, která protékla kolonou. Svislé čáry oddělují jednotlivé frakce, do nichž byla mobilní fáze s proteiny rozdělována.

5.1.3 ANALÝZA ZÍSKANÉHO PROTEINU POMOCÍ SDS-PAGE

Frakce 4–11 byly analyzovány SDS-PAGE. Fotodokumentace separace v redukujícím prostředí je na Obr. 10 (str. 58). Byla rovněž provedena separace v neredukujícím prostředí, ale výsledek se nijak významně nelišil od separace v redukujícím prostředí, a proto zde není uveden. Protein B7-H6 má předpokládanou molekulovou hmotnost 26,6 kDa a nese 6 míst pro N-glykosylaci, kterou jsou buňky HEK293T schopné vytvářet, proto jsou signály odpovídající tomuto proteinu na SDS-PAGE typicky neostré. Je patrné, že protein o příslušné molekulové hmotnosti se nachází zejména ve frakcích 8 a 9, méně pak ve frakci 10.

Ze spektrofotometrických dat a výsledků elektroforetické analýzy lze vyvodit závěr, že uvedeným postupem lze připravit protein o molekulové hmotnosti, která

odpovídá B7-H6, ale ve velice malém množství. Ze snímku polyakrylamidového gelu, na němž byla prováděna separace metodou SDS-PAGE je rovněž patrná nízká čistota proteinu, neboť ve všech frakcích lze pozorovat velké množství proteinů různých velikostí.

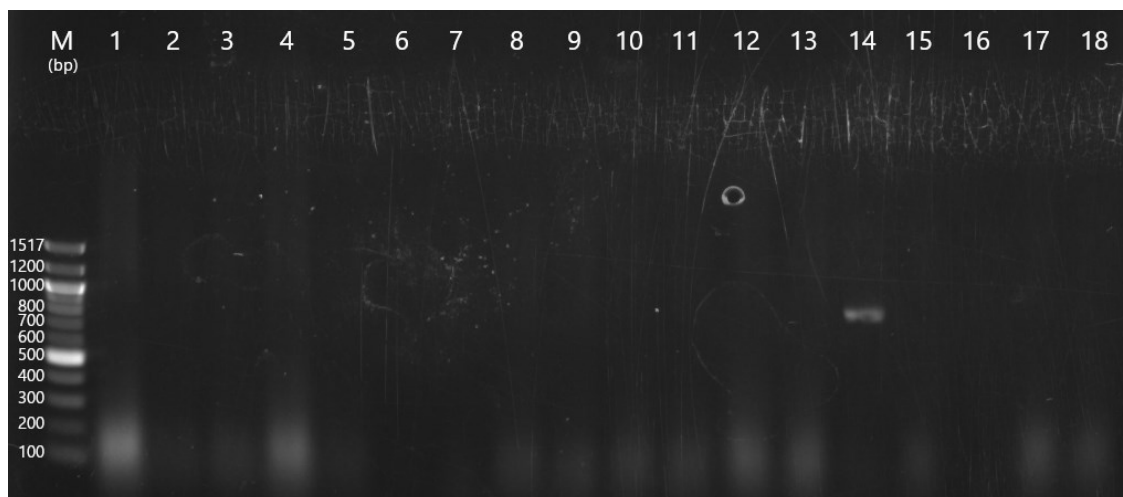


Obrázek 10: Snímek gelu po elektroforetické separaci proteinů metodou SDS-PAGE v redukujícím prostředí. Vzorky byly před separací denaturovány. M označuje marker molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Range, čísla 4–11 označují vzorky jednotlivých frakcí, E označuje eluční roztok, kterým byla po uvolnění proteinu promyta kolona s nosičem Ni-NTA. PE označuje předeluci slabě zachycených molekul pomocí PBS s 20mM imidazolem.

5.2 REKOMBINANTNÍ EXPRESE PROTEINU B2SRT_YWY VE STABILNÍ LINII

5.2.1 PŘÍPRAVA PLAZMIDU PUT7_B2SRT_YWY

Plazmid pUT7 byl linearizován a následně do něj byl vložen gen B₂Srt_YWY metodou klonování nezávislého na ligaci. Narostlé kolonie bakterií po transformaci byly analyzovány PCR. Produkty byly následně vizualizovány elektroforézou v agarosovém gelu. Produkt měl mít velikost 815 bp. Jak je patrné z fotodokumentace (Obr. 11, str. 59), produkt PCR o hledané velikosti vznikl pouze v reakci, do níž byly přidány bakterie z kolonie číslo 14, která tedy jako jediná obsahovala nově vytvořený plazmid.

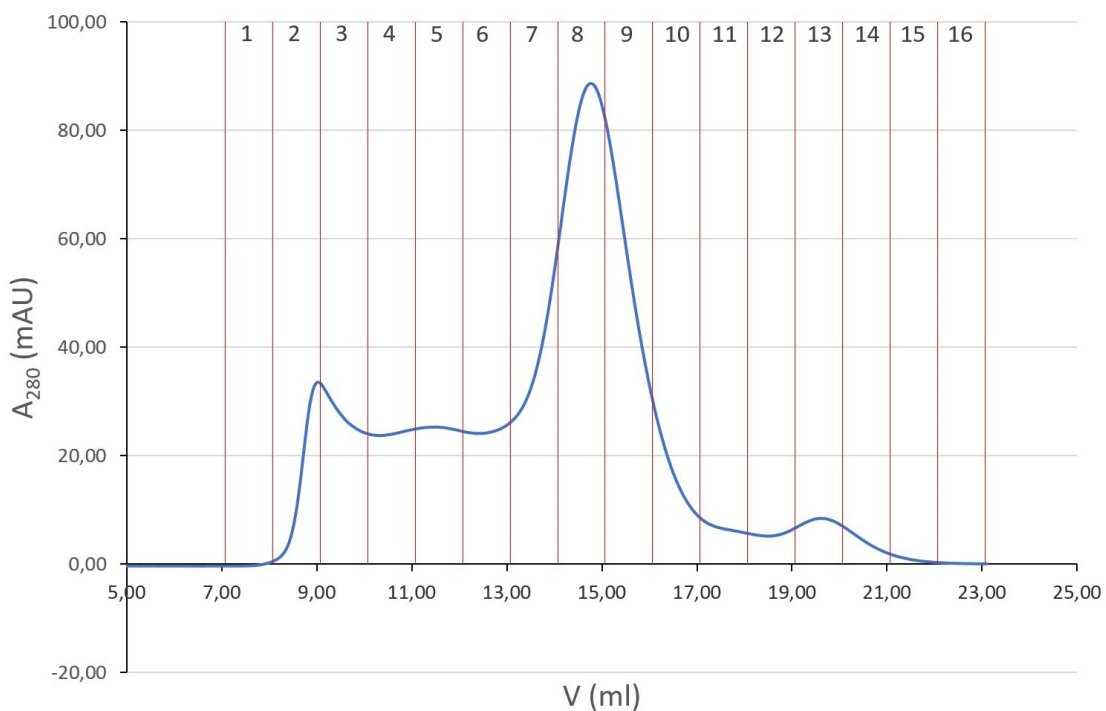


Obrázek 11: Fotodokumentace výsledků agarosové elektroforézy. Elektroforéza probíhala v 1% gelu, M označuje marker Quick-Load Purple DNA. Čísla 1–18 pak označují kolonie, v nichž měl být pomocí PCR amplifikován úsek plazmidu pUT7_B2Srt_YWY. Pouze kolonie číslo 14 tento plazmid obsahovala, a tedy došlo k amplifikaci.

Správnost klonované sekvence byla ověřena sekvenací. Dále byla provedena středněobjemová produkce, která poskytla 1,5 ml roztoku plazmidu pUT7_B2Srt_YWY o koncentraci 1470 ng/μl. Tento plazmid byl dále použit pro tvorbu stabilní linie buněk HEK293T (viz 4.1.21).

5.2.2 PRODUKCE PROTEINU VE STABILNÍ LINII HEK293T_B2SRT_YWY

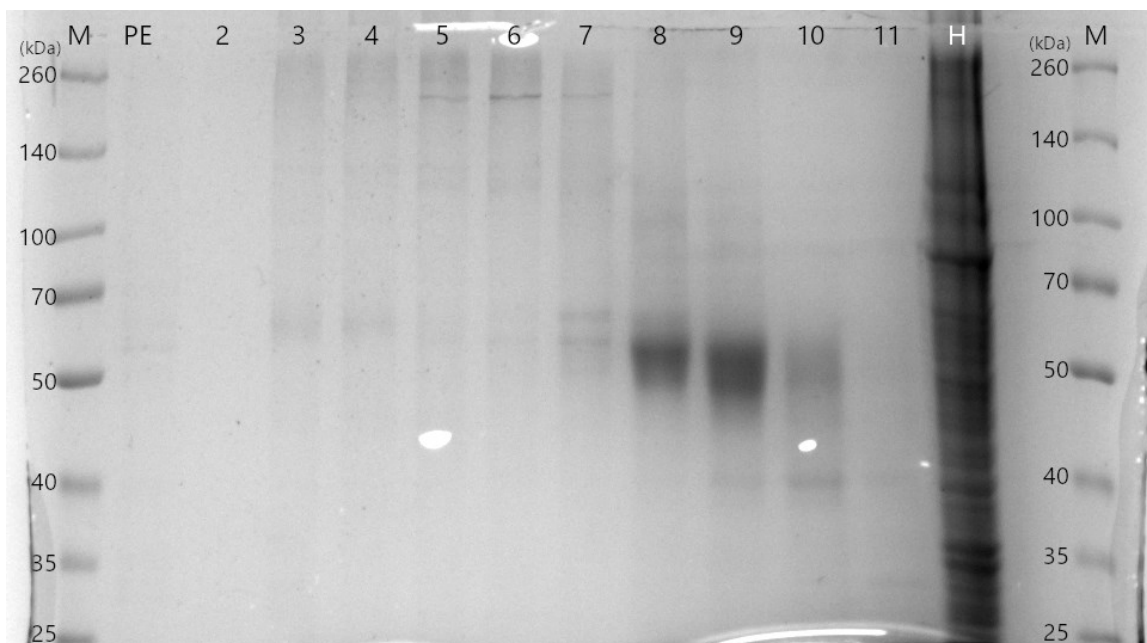
Po vytvoření stabilní linie buněk HEK293T_B2Srt_YWY byly buňky ponechány rozrůst ve 400 ml média (tzn. v nejvyšším objemu, v němž je produkce běžně prováděna) a pomocí doxycyklinu byla indukována produkce proteinu. Po šesti dnech produkce byl protein z média izolován pomocí afinitní chromatografie a gelové permeační chromatografie (postup viz 4.1.11), během čehož byl protein jímán do 1ml frakcí. Chromatografický záznam této separace je na Obr. 12 (str. 60). Koncentrace proteinu byla spektrofotometricky zjištěna ve frakcích, do nichž byl eluován hlavní pík, tj. frakce 8 a 9, jejichž koncentrace byly 0,22 mg/ml (frakce 8) a 0,27 mg/ml (frakce 9). Celkem bylo v těchto dvou frakcích získáno 0,49 mg proteinu (což odpovídá 1,23 mg/l média).



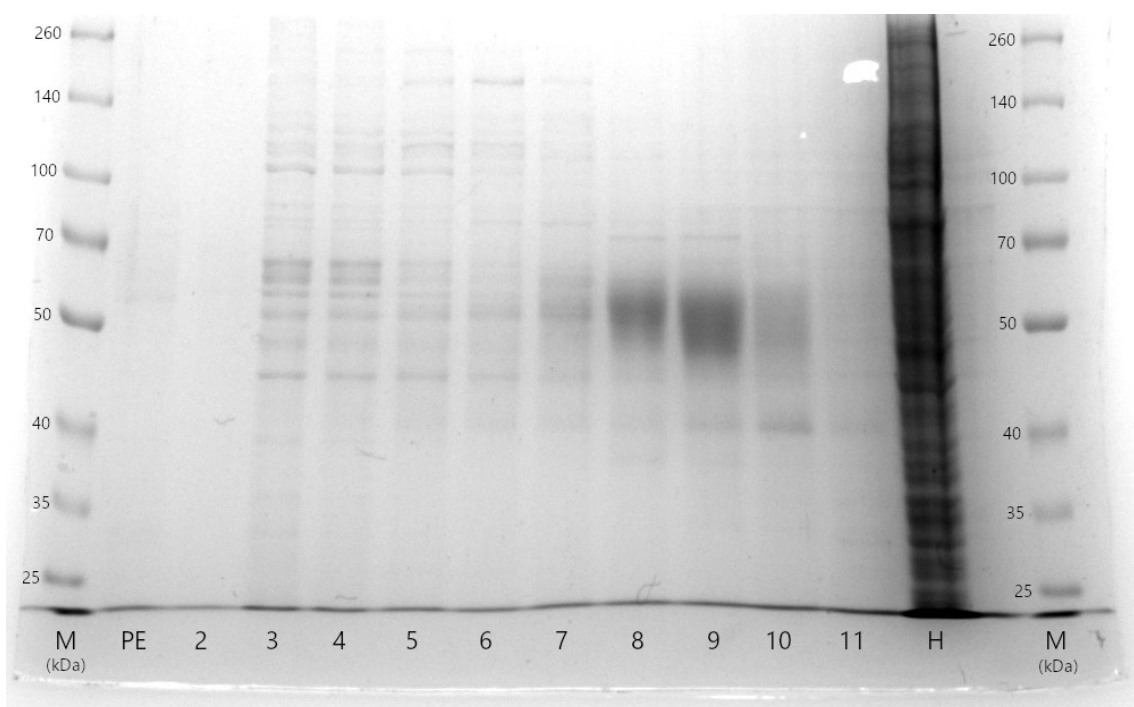
Obrázek 12: Chromatografický záznam purifikace proteinů pomocí gelové permeační chromatografie. Separace probíhala na koloně Superdex 200 (10/300 GL) za použití pufru HEPES (pH 7,5) jako mobilní fáze. Proteiny byly vyprodukovány ve stabilní linii HEK293T_B₂Srt_YWY a pomocí afinitní chromatografie izolovány z média. Graf znázorňuje závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze, která protékla kolonou. Svislé čáry oddělují jednotlivé frakce, do nichž byla mobilní fáze s proteiny rozdělována.

Pomocí SDS-PAGE byly dále analyzovány frakce 2–11, peleta buněk HEK293T_B₂Srt_YWY (100× ředěná) a rovněž roztok, jímž byla propláchnuta kolona pro afinitní chromatografii. Do posledního jmenovaného roztoku (tzv. předeluce) měly být uvolněny případné slabě vázané molekuly proteinů.

Pro elektroforetickou analýzu byly připraveny dva 10% gely o tloušťce 1 mm. Na jednom z gelů byly analyzovány vzorky v redukujícím prostředí a na druhém v prostředí neredukujícím. Výsledky elektroforetické separace v prostředí SDS byly zdokumentovány na Obr.13 a 14 (str. 61).



Obrázek 13: Fotografie gelu po provedení elektroforetické separace metodou SDS-PAGE v neredukujícím prostředí. Čísla 2–11 označují vzorky odebrané z jednotlivých frakcí, které byly před separací denaturovány, M značí marker molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Range, H označuje 100× ředěnou peletu buněk HEK293T_B₂Srt_YWY.

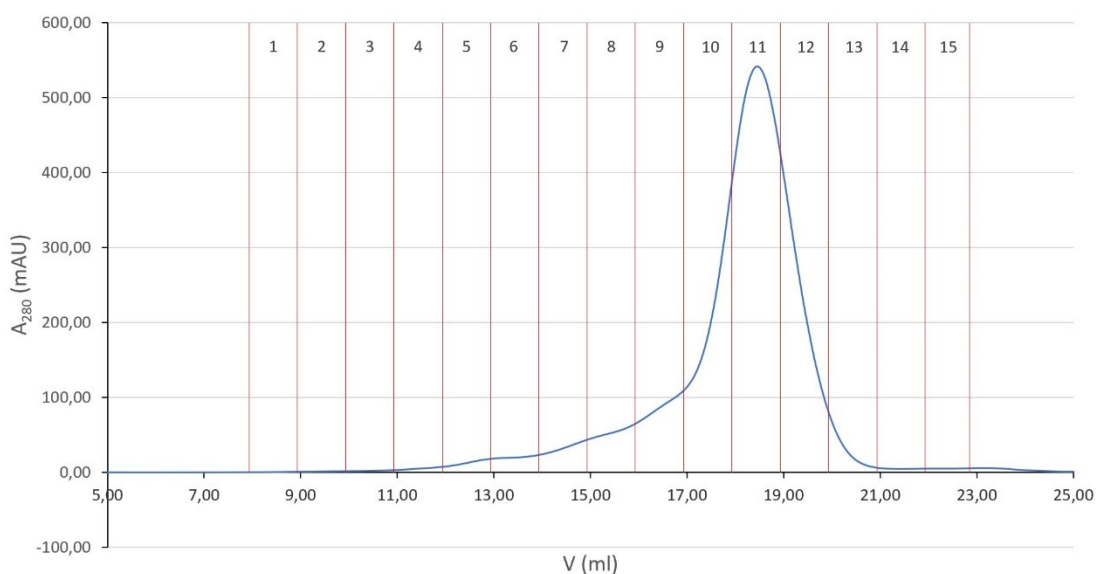


Obrázek 14: Fotografie gelu po provedení elektroforetické separace metodou SDS-PAGE v redukujícím prostředí. Čísla 2–11 označují vzorky odebrané z jednotlivých frakcí, které byly před separací denaturovány, M značí marker molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Range, H označuje 100× ředěnou peletu buněk HEK293T_B₂Srt_YWY.

Z fotodokumentace je patrné, že protein o odpovídající molekulové hmotnosti (26,6 kDa, 6× glykosylovaný) se nacházel zejména ve frakcích 8 a 9, méně pak ve frakci 10. V předeluci se téměř žádný protein nenacházel, zatímco ve 100× ředěné peletě buněk se nacházely proteiny v takovém množství, že ředění nebylo zdaleka dostatečné, a proto není možné z tohoto vzorku vyčíst žádné informace.

5.3 PRODUKCE ENZYMU SORTASA A (7+) V BAKTERIÍCH

Enzym Sortasa A (7+) byl produkován v bakteriích *E. coli* T7, které byly transformovány plazmidem pET30b_7+SrtA. Produkce probíhala přes noc v 500 ml TB média s kanamycinem (50 µg/ml). Po homogenizaci narostlých bakterií pomocí sonikace byl vyprodukovaný enzym purifikován a separován do 1ml frakcí (postup viz 4.2.5). Průběh separace byl zaznamenán na Obr. 15. Jako čisté frakce byly zvoleny fr. 10, 11 a 12, v nichž byla pomocí spektrofotometru DS-11+ zjištěna koncentrace proteinu. Ve frakcích 10 (0,898 mg/ml), 11 (3,03 mg/ml) a 12 (3,22 mg/ml) bylo celkem získáno 7,15 mg proteinu (tedy 14,3 mg/l média).



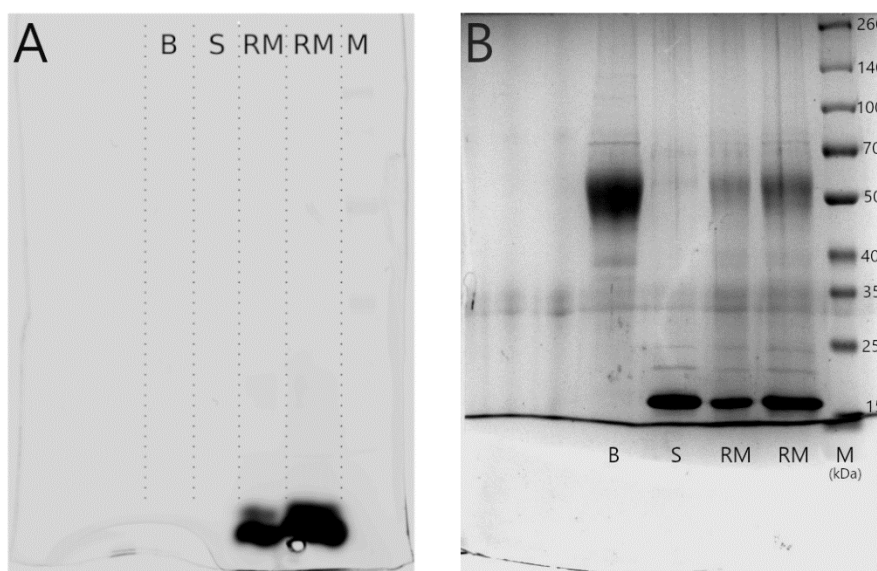
Obrázek 15: Záznam chromatografické separace proteinů vyprodukovaných v bakteriích *E. coli* T7 a izolovaných z lyzátu pomocí afinitní chromatografie. Separace probíhala na koloně Superdex 200 (10/300 GL) za použití pufru HEPES (pH 7,5) jako mobilní fáze. Graf zobrazuje závislost absorbance při vlnové délce 280 nm na objemu mobilní fáze, která protekla kolonou. Svislé čáry oddělují jednotlivé 1ml frakce, do nichž byla mobilní fáze se separovanými proteiny rozdělována.

5.4 ENZYMOVÁ REAKCE KATALYZOVANÁ SORTASOU A (7+)

Reakce katalyzovaná enzymem Sortasou A (7+) probíhala za optimalizovaných podmínek. Po proběhnutí reakce (podmínky viz kap. 4.3.1) byla reakční směs

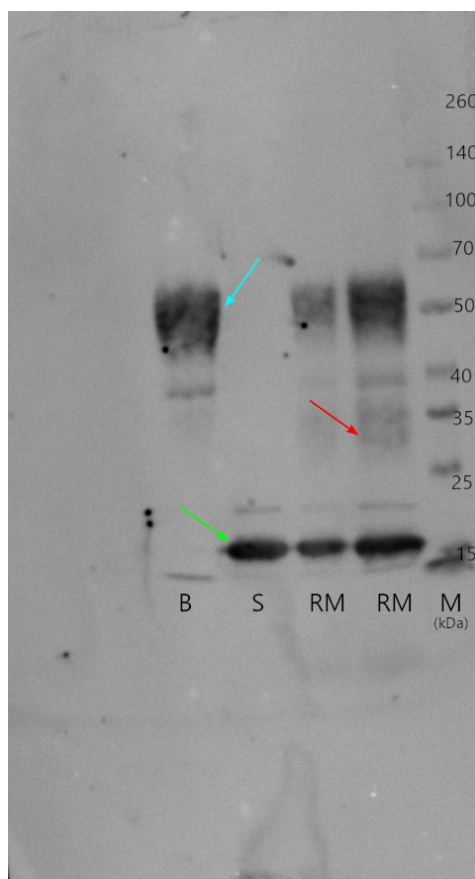
analyzována pomocí SDS-PAGE (viz 4.3.2). Gel byl následně rozdělen na dvě shodné poloviny a dále analyzován. Jedna polovina gelu byla zdokumentována za použití fluorescenční detekce (Obr. 16 A) a po obarvení rovněž pomocí fotografické techniky ve viditelném světle (Obr. 16 B).

Ze získané fotodokumentace se nepodařilo potvrdit, že reakce probíhá, neboť produkt reakce měl očekávanou molekulovou hmotnost přibližně poloviční oproti původnímu proteinu, protože mělo dojít ke štěpení mezi dvěma podobně velikými doménami podobnými imunoglobulinům, a tedy měly vzniknout dva srovnatelně velké fragmenty. Na pořízené fotodokumentaci elektroforetického gelu by tedy očekávaný fragment měl mít velikost přibližně 30 kDa. Porovnáním elektroforeticky separované reakční směsi a roztoku proteinu B₂Srt_YWY (Obr. 16) nelze pozorovat žádný nově vzniklý produkt odpovídající velikosti.



Obrázek 16: Různé metody fotodokumentace polyakrylamidového gelu. A) Fotodokumentace pomocí fluorescenční detekce na polyakrylamidovém gelu po SDS-PAGE. B značí čistý protein B7-H6, S samotný enzym Sortasa A (7+), M je marker molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Range. RM značí roztok, v němž probíhala transpeptidasová reakce katalyzovaná Sortasou A (7+), při níž mělo dojít ke štěpení B7-H6 v sekvenci LPETG mezi threoninem a glycinem a následné konjugaci vzniklého peptidu (zakončeného sekvencí aminokyselin LPET) s peptidem GGGK, který byl fluorescenčně značen barvivem TAMRA (5-karboxytetramethylrhodamin). Na snímku lze pozorovat pouze fluorescenci ve spodní části gelu, což odpovídá nenávanému peptidu GGGK-TAMRA. B) Snímek polyakrylamidového gelu, na němž byla prováděna elektroforetická separace v prostředí SDS. Jedná se o tentýž gel jako v části A), který byl focen ve stejné orientaci. Značky jednotlivých jamek mají rovněž stejný význam. Porovnáním jamek, do nichž byla pipetována reakční směs (RM) s jamkami obsahujícími pouze enzym Sortasa A (7+) (S) a pouze B7-H6 (B) je patrné, že v reakční směsi nelze pozorovat žádný vznikající produkt reakce.

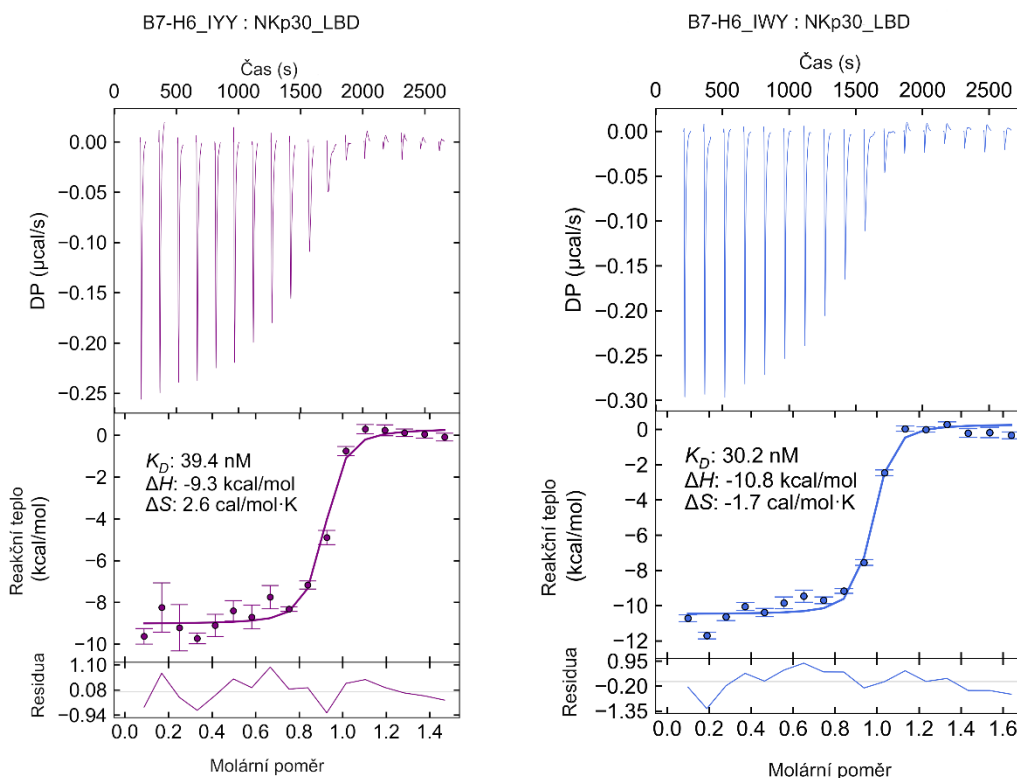
Druhá polovina gelu pak byla analyzována metodou Western Blot. Detaily provedení popisuje odst. 4.3.3. Fotodokumentaci nitrocelulosoové membrány s takto vizualizovaným proteinem pak zobrazuje Obr. 17, na němž lze pozorovat nově vzniklý fragment o velikosti přibližně 30 kDa, tedy přibližně poloviční oproti neštěpenému proteinu. Jelikož byl tento fragment detekován pouze v reakční směsi, a nikoliv v roztocích samotných složek reakce [proteinu B₂Srt_YWY a enzymu Sortasy A (7+)], lze předpokládat, že se jedná o produkt probíhající reakce. Tento produkt pravděpodobně nebyl zjištěn ze samotného polyakrylamidového gelu kvůli kombinaci nedostatečného kontrastu a silné glykosylace proteinu B₂Srt_YWY (a tedy i reakčního produktu). Glykosylace zapříčinily, že produkt reakce netvořil na gelu ostře ohraničenou zónu, což v kombinaci s nedostatečným kontrastem způsobilo, že produkt reakce nebylo možné dostatečně vizualizovat.



Obrázek 17: Snímek nitrocelulosoové membrány, na níž byly metodou Western Blot přeneseny a vizualizovány proteiny po separaci pomocí SDS-PAGE. B značí protein B7-H6, S enzym Sortasy A (7+) a M marker molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Range. Reakční směs, v níž docházelo ke konjugaci fluorescenčně značeného peptidu GGGK-TAMRA s B7-H6 štěpeným Sortasou A (7+) mezi threoninem a glycinem v sekvenci LPETG, je označena RM. V reakční směsi lze pozorovat neostrý proužek o velikosti přibližně 30kDa (označený červenou šipkou), který neodpovídá signálu B7-H6 (označen modrou šipkou) ani Sortasy A (7+) (označen zelenou šipkou). Je možné, že tento proužek představuje vznikající produkt reakce. Rozmazání proužků je způsobeno glykosylací proteinu B7-H6.

5.5 URČENÍ VARIANTY B7-H6 S NEJVYŠŠÍ AFINITOU K NKp30

U dvou ze čtyř variant proteinu B7-H6 vybraných na základě publikace Pekar *et al.*, 2021 [85] s bodovými mutacemi na pozicích S60, F82 a L129 byla pomocí ITC v minulosti již změřena afinita, a to v rámci publikace Kalousková *et al.*, 2021 [94] (B7-H6_YWY) a diplomové práce [95] (B7-H6_WYY, zároveň se dvěma dalšími navrženými konstrukty B7-H6_YYY a B7-H6_WWY), kde jsou její hodnoty uvedeny. Afinita zbývajících variant B7-H6_IWY a B7-H6_IYY byla touto metodou změřena během probíhající práce na rekombinantní expresi konstruktu B₂Srt_YWY. Měření provedla Tatsiana Charnavets, Ph.D. za asistence Mgr. Ondřeje Skořepy, Ph.D. (viz 4.4). Výsledky měření těchto dvou variant jsou znázorněny na Obr. 18.



Obrázek 18: Určení afinity dvou variant B7-H6 k vazebné doméně NKp30 pomocí izotermální titrační kalorimetrie. Termogramy vytvořil Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D. pomocí programů NITPIC [91], GUSI [92] a SEDPHAT [93] za předpokladu binární interakce $A + B \leftrightarrow AB$.

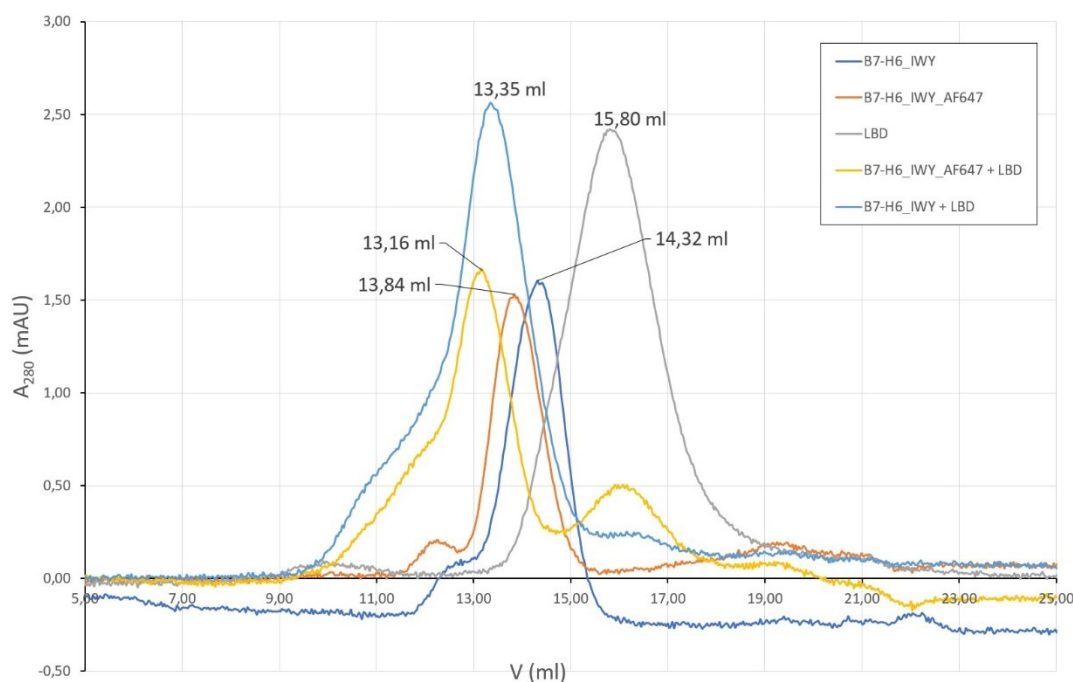
Srovnáním všech hodnot z ITC bylo zjištěno, že zatímco metodou BLI byla naměřena nejvyšší afinita pro variantu B7-H6_YWY, při měření pomocí ITC byla nejvyšší afinita naměřena pro variantu B7-H6_IWY. Z tohoto důvodu byla pro následující práci použita varianta B7-H6_IWY.

5.6 NESPECIFICKÉ FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ PROTEINU B7-H6_IWY

Pomocí sukcinimidylesteru barviva Alexa Fluor 647 bylo provedeno nespecifické fluorescenční značení 0,5 mg proteinu B7-H6_IWY. Po oddělení nenavázaného barviva pomocí odsolovací kolonky byl spektrofotometricky určen stupeň značení získaného proteinu. Naměřené hodnot odpovídaly stupni značení 2,5–3, což znamená, že na každou molekulu proteinu B7-H6_IWY byly navázány až 3 molekuly barviva.

5.7 ANALYTICKÁ GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Pomocí analytické gelové permeační chromatografie byly získány chromatogramy, které umožnily ověření vazby proteinu B7-H6_IWY (značeného či neznačeného) na vazebnou doménu receptoru NKp30 (LBD). Chromatografické záznamy jednotlivých analýz byly zaneseny do Obr. 19.



Obrázek 19: Záznam analýzy proteinů B7-H6_IWY ve značené a neznačené formě a ověření jejich vazby na LBD pomocí analytické gelové permeační chromatografie. Analýza byla prováděna na koloně Superdex 200 Increase (300/10 GL) za použití pufru HEPES (pH 7,5) jako mobilní fáze. Graf zobrazuje naměřenou závislost absorbance mobilní fáze vytékající z kolony na objemu mobilní fáze, která kolonou protekla od začátku měření. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm. Z posunů maxim chromatografických píků směsí B7-H6_IWY a LBD oproti samotným proteinům LBD a B7-H6_IWY lze usoudit, že neznačená i značená forma B7-H6_IWY vytvářely komplex s LBD.

Porovnáním objemů proteklé mobilní fáze, které odpovídaly absorpčním maximům jednotlivých píků lze určit, zda došlo k vazbě ligandu na receptor. Nástřikem samotných proteinů byly nejprve určeny jejich charakteristické eluční objemy. Je patrné, že

nespecifickým fluorescenčním značením došlo k malé změně elučního objemu oproti neznačenému proteinu B7-H6_IWY.

Následně byly zjištěny eluční objemy směsí B7-H6_IWY s LBD a B7-H6_IWY_AF647 s LBD. Jelikož B7-H6_IWY vytváří s LBD komplex ligand–receptor, dochází k eluci jejich směsi při jiném objemu, než jaký je charakteristický pro jeho samotné složky, neboť vzniklý komplex má jinou velikost než jeho samostatné součásti. Velice podobný posun v elučním objemu lze pozorovat i při analýze směsi značeného proteinu (B7-H6_IWY_AF647) s LBD, a tedy lze usuzovat, že vazba fluorescenční značky nebrání tvorbě komplexu ligand–receptor.

6 DISKUSE

Cílem této práce byla příprava vazebné domény proteinu B7-H6 s vysokou afinitou a fluorescenčním značením pro účely vizualizace receptoru NKp30 na povrchu buněk. Hlavní pozornost byla věnována konstrukt B7-H6 s vysokou afinitou a zásahovým místem pro sortasu A, který měl umožňovat uniformní fluorescenční značení domény B7-H6, která interaguje s NKp30 a která by samotná měla dostačovat pro vazbu na tento receptor.

Rekombinantní exprese tohoto konstrukt v buněčné linii HEK293T byla sice úspěšná, ale s nízkým finálním výtěžkem. Jelikož při transienční transfekci za použití lineárního polyethyleniminu jako transfekčního činidla je produkce proteinu silně ovlivněna transfekční účinností (tj. jaký podíl vypěstovaných buněk přijme dodanou DNA, a tedy bude produkovat daný protein), byla po prvotním nízkém výtěžku vytvořena stabilní linie těchto buněk, v níž je transfekční účinnost výrazně vyšší. Produkci proteinu ve stabilní linii bylo skutečně dosaženo vyššího výtěžku a lepší čistoty získaného proteinu, avšak v porovnání s předchozími produkcemi variant proteinu B7-H6 s vysokou afinitou, které byly v této buněčné linii provedeny dalšími členy laboratoře [95], byl výtěžek stále násobně nižší. Tato skutečnost může ukazovat na potenciální důležitost aminokyselinové sekvence lineárního řetězce, který spojuje domény B7-H6. Ačkoliv tento řetězec není nutnou podmínkou pro vazbu B7-H6 na NKp30, pro stabilitu tohoto proteinu má zřejmě zásadní význam. Tomu odpovídá i předchozí zkušenost, kdy se dalším členům laboratoře v minulosti nepodařilo provést expresi pouze jedné z domén B7-H6 [82].

Dalším z cílů této práce bylo provedení transpeptidasové reakce katalyzované sortasou A, při níž by došlo ke štěpení aminokyselinové sekvence LPETG, která byla vnesena do zmíněného řetězce spojujícího domény B7-H6. Získaný peptid (zakončený sekvencí LPET) by byl zároveň konjugován s fluorescenčně značeným peptidem GGGK-TAMRA. Pro tento účel byl vyprodukován enzym Sortasa A (7+), jehož aktivita byla oproti přirozeně se vyskytující variantě optimalizována sérií mutací. Volba složení reakční směsi a reakčních podmínek byla uskutečněna na základě dat uvedených výrobcem značeného peptidu a konzultace s Bc. Maxmiliánem Hejlem, který se optimalizací reakčních podmínek tohoto enzymu zabývá v rámci své diplomové práce (dosud nepublikováno).

Ani za takto zvolených podmínek však reakce téměř neprobíhala. Na SDS-PAGE gelu barveném Coomassie Blue ani při použití fluorescenční detekce barviva TAMRA nebylo možné pozorovat vznikající produkt reakce. Ten se podařilo vizualizovat až pomocí imunodetekce. Možným důvodem, proč nebylo možné pozorovat produkt reakce jinými metodami, je glykosylace proteinu B7-H6. Na dříve uvedených záznamech elektroforetických separací tohoto proteinu pomocí SDS-PAGE lze vidět, že kvůli variabilitě jeho glykosylací nedochází k tvorbě ostře ohraničené zóny separovaného proteinu, nýbrž vznikají charakteristické, neostře skvrny. Jelikož lze pozorovat variabilitu ve složení glykosylací exprimovaného proteinu, lze tuto variabilitu očekávat i u produktu transpeptidasové reakce. Tohoto produktu vzniká zřejmě jen velmi malé množství, které na polyakrylamidovém gelu nelze pozorovat právě kvůli tomu, že vytváří skvrny, do nichž se již tak malé množství produktu rozprostře. Až po specifické detekci protilátkami a zvýšení kontrastu na bílé membráně lze tento produkt pozorovat. Nemožnost detekce produktu transpeptidasové reakce pomocí fluorescence vysvětlujeme hydrolýzou B7-H6 při reakci, kdy sice dojde ke štěpení proteinu na dvě domény, ale už nedojde ke konjugaci se značeným polyglycinem.

Kvůli nízkým výtěžkům produkce a velice malému množství vznikajícího produktu transpeptidasové reakce se tento konstrukt proteinu B7-H6 nejeví jako perspektivní pro další práci. Pro vizualizaci receptoru NKp30 na povrchu buněk pomocí fluorescenční mikroskopie či průtokové cytometrie je potřeba množství značeného proteinu v řádech jednotek miligramů. Ve stabilní linii se podařilo vyrobit zhruba 0,49 mg neznačeného proteinu B₂Srt_YWY (tzn. 1,23 mg/l média), a tedy se z hlediska dlouhodobého využití nejedná o vhodný konstrukt.

K výše zmíněným skutečnostem rovněž přispívá i zjištění, že kombinace bodových mutací YWY (na pozicích S60, F82 a L129), kterou publikace Pekar *et al.*, 2021 uváděla jako variantu s nejvyšší afinitou k receptoru [85], se při použití jiné metody měření této afinity nejeví jako nejlepší z uváděných kombinací. Autoři zmíněné publikace měřili afinitu metodou BLI, při níž byl ligand imobilizován na povrchu biosenzoru, zatímco při měřeních provedených za účelem ověření poznatků této publikace byla použita metoda ITC, při níž jsou obě složky komplexu volně přítomny v roztoku, a tedy není imobilizací bráněno jejich případným interakcím.

Na základě dat z ITC byla tedy pro další práci vybrána varianta B7-H6_IWY, pro niž byla zjištěna nejvyšší afinita (resp. byla naměřena nejnižší hodnota disociační konstanty). Bylo provedeno nespecifické fluorescenční značení této varianty a následně byla provedena analytická gelová permeační chromatografie za účelem zjištění, zda toto značení nebrání vazbě na vazebnou doménu receptoru NKp30. Bylo zjištěno, že nespecifické značení použitým barvivem (Alexa Fluor 647) nijak nebrání vazbě na vazebnou doménu NKp30. Kvůli příliš vysokému stupni značení však nelze takto označený protein použít pro superrozlišovací fluorescenční mikroskopii, neboť tato metoda umožňuje lokalizaci molekul a jejich kvantifikaci pouze v případě, že fluorescenční sonda nese vždy právě jeden fluorofor, a tedy je její stupeň značení roven jedné.

Přesto však nespecificky značený protein připravený v rámci této práce lze použít pro klasickou fluorescenční mikroskopii či průtokovou cytometrii. Rovněž relativně vysoké výtěžky při předchozí produkci použitého proteinu B7-H6_IWY (19,2 mg/l média) [95] hovoří ve prospěch budoucího značení B7-H6 tímto způsobem.

Pro účely super-rozlišovací fluorescenční mikroskopie je však nutné nalézt vhodný způsob specifického značení B7-H6, kterým by bylo možné připravit značený protein v dostatečném množství. Jak již bylo řečeno, pro specifické značení proteinu je vhodné použít enzym, který rozpoznává jedinečnou sekvenci aminokyselin. Vhodným enzymem pro tento účel se stále jeví Sortasa A (7+). Je totiž možné, že jednou z příčin pro nízké množství produktu výše popsané reakce katalyzované Sortasou A (7+) je sterická nedostupnost rozeznávané sekvence aminokyselin (LPETG), která se nacházela na krátkém řetězci mezi dvěma velkými, globulárními doménami. Dle některých publikací je pak dokonce žádoucí, aby se tato sekvence aminokyselin nacházela na C-konci peptidového řetězce, či v jeho těsné blízkosti [86].

Na základě těchto poznatků se dále nabízí dva možné postupy. Buďto lze vytvořit konstrukt B7-H6, který by nesl sekvenci LPETG na svém C-konci, který by byl následně pomocí Sortasy A (7+) konjugován se značeným polyglycinem, anebo naopak konjugovat značený peptid LPETG s konstruktem B7-H6 se sekvencí aminokyselin GGG na jeho N-konci. Obě tyto metody s sebou nesou jisté výhody a nevýhody. Fluorescenční značení na C-konci je výhodné tím, že pravděpodobně neomezí schopnost vazby na NKp30. Jeho nevýhoda tkví v tom, že C-konec je relativně vzdálený od interakčního

rozhraní s NKp30, a tedy by mohl potenciálně snižovat rozlišení při vizualizaci pomocí super-rozlišovací fluorescenční mikroskopie. Značení B7-H6 na N-konci sice tento problém odstraňuje, neboť N-konec se nachází v blízkosti interakčního rozhraní s NKp30, avšak nese s sebou riziko změny vazebných vlastností v důsledku sterických interakcí nově navázaného peptidu. Rekombinantní exprese těchto konstruktů a zjišťování jejich vlastností bude předmětem navazující diplomové práce.

7 ZÁVĚR

Za použití produkce ve stabilní linii buněk HEK293T se podařilo získat malé množství proteinu B₂Srt_YWY. Transientní transfekcí těchto buněk bylo získáno menší množství proteinu o výrazně horší čistotě. Bakteriální exprese Sortasy A (7+) byla úspěšná s poměrně vysokým výtěžkem

Transpeptidasová reakce katalyzovaná Sortasou A (7+) neumožňuje při použití konstruktu B₂Srt_YWY přípravu značeného proteinu v dále použitelném množství. Metodou western blot však byl zjištěn vznikající produkt této reakce.

Pomocí ITC bylo zjištěno, že nejvyšší afinitu k NKp30 má nově navržená varianta B7-H6_IWY. Nespecifickým fluorescenčním značením proteinu B7-H6_IWY pomocí barviva Alexa Fluor 647 se podařilo získat značený protein v dostatečném množství. Toto fluorescenční značení neomezuje schopnost vazby na vazebnou doménu receptoru NKp30.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Parkin, J.; Cohen, B.: An overview of the immune system. *The Lancet*. **357**:9270, 1777–1789 (2001).
- [2] Chaplin, D. D.: Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**:2, 3–23 (2010).
- [3] Bonilla, F. A.; Oettgen, H. C.: Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**:2, 33–40 (2010).
- [4] Burnet, F. M. *The clonal selection theory of acquired immunity*. Nashville, Vanderbilt University Press, 1959.
- [5] Kurd, N.; Robey, E. A.: T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol. Rev.* **271**:1, 114–126 (2016).
- [6] Unanue, E. R.; Cerottini, J.-C.: Antigen presentation. *FASEB J.* **3**:13, 2496–2502 (1989).
- [7] Vries, J. E.; Yssel, H.; Spits, H.: Interplay between the TCR/CD3 Complex and CD4 or CD8 in the Activation of Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunol. Rev.* **109**:1, 119–142 (1989).
- [8] Liao, W.; Lin, J.-X.; Leonard, W. J.: IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 2011, **23**:5, 598–604 (2011).
- [9] Surh, C. D.; Sprent, J.: Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity*. **29**:6, 848–862 (2008).
- [10] Pleiman, C. M.; D'Ambrosio, D.; Cambier, J. C.: The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol. Today*. **15**:9, 393–399 (1994).
- [11] Laman, J. D.; Claassen, E.; Noelle, R. J.: Functions of CD40 and Its Ligand, gp39 (CD40L). *Crit. Rev. Immunol.* **16**:1, 59–108 (1996).
- [12] Seifert, M.; Küppers, R.: Human memory B cells. *Leukemia*. **30**:12, 2283–2292 (2016).
- [13] Turvey, S. E.; Broide, D. H.: Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**:2, 24–32 (2010).
- [14] Beutler, B.: Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* **40**:12, 845–859 (2004).
- [15] Mokobi, F.: *Hematopoiesis- Definition, Cells, Growth Factors, Regulation* [online]. 18. květen 2022. Dostupné z: <https://microbenotes.com/hematopoiesis/>
- [16] Abel, A. M.; Yang, C.; Thakar, M. S.; Malarkannan, S.: Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* **9**:1869 (2018).
- [17] Rölle, A.; Pollmann, J.; Cerwenka, A.: Memory of Infections: An Emerging Role for Natural Killer Cells. *PLoS Pathog.* **9**:9 e1003548 (2013).
- [18] Vivier, E.; Ugolini, S.; Blaise, D.; Chabannon, C.; Brossay, L.: Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **12**:4, 239–252 (2012).
- [19] Sivori, S.; Vacca, P.; Del Zotto, G.; Munari, E.; Mingari, M. C.; Moretta, L.: Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol.* **16**:5, 430–441 (2019).
- [20] Barry, M.; Bleackley, R. C.: Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:6, 401–409 (2002).
- [21] Dhatchinamoorthy, K.; Colbert, J. D.; Rock, K. L.: Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **12**:636568 (2021).

- [22] Kärre, K.; Ljunggren, H. G.; Piontek, G.; Kiessling, R.: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. **319**:6055, 675–678 (1986).
- [23] Quatrini, L.; Della Chiesa, M.; Sivori, S.; Mingari, M. C.; Pende, D.; Moretta, L.: Human NK cells, their receptors and function. *Eur. J. Immunol.* **51**:7, 1566–1579 (2021).
- [24] Topham, N. J.; Hewitt, E. W.: Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*. **128**:1, 7–15 (2009).
- [25] Smyth, M. J.; Cretney, E.; Kelly, J. M.; Westwood, J. A.; Street, S. E. A.; Yagita, H.; Takeda, K.; Van Dommelen, S. L. H.; Degli-Esposti, M. A.; Hayakawa, Y.: Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **42**:4, 501–510 (2005).
- [26] Dustin, M. L.; Springer, T. A.: Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* **107**:1, 321–331 (1988).
- [27] Lettau, M.; Schmidt, H.; Kabelitz, D.; Janssen, O.: Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol. Lett.* **108**:1, 10–19 (2007).
- [28] Prager, I.; Watzl, C.: Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J. Leukocyte Biol.* **105**:6, 1319–1329 (2019).
- [29] Lynch, D. H.; Ramsdell, F.; Alderson, M. R.: Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol. Today*. **16**:12, 569–574 (1995).
- [30] Peter, M. E.; Hadji, A.; Murmann, A. E.; Brockway, S.; Putzbach, W.; Pattanayak, A.; Ceppi, P.: The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ.* **22**:4, 549–559 (2015).
- [31] De Andrea, M.; Ravera, R.; Gioia, D.; Gariglio, M.; Landolfo, S.: The interferon system: an overview. *Eur. J. Paediatr. Neuro.* **6**:A41-A46 (2002).
- [32] Burgess, A.; Metcalf, D.: The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*. **56**:6, 947–958 (1980).
- [33] Lanier, L. L.: NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 359-393 (1998).
- [34] Molgora, M.; Bonavita, E.; Ponzetta, A.; Riva, F.; Barbagallo, M.; Jaillon, S.; Popović, B.; Bernardini, G.; Magrini, E.; Gianni, F.; Zelenay, S.; Jonjić, S.; Santoni, A.; Garlanda, C.; Alberto Mantovani, A.: IL-1R8 is a checkpoint in NK cells regulating anti-tumour and anti-viral activity. *Nature*. **551**:7678, 110–114 (2017).
- [35] Pende, D.; Falco, M.; Vitale, M.; Cantoni, C.; Vitale, C.; Munari, E.; Bertaina, A.; Moretta, F.; Del Zotto, G.; Pietra, G.; Mingari, M. C.; Locatelli, F.; Moretta, L.: Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front. Immunol.* **10**:1179 (2019).
- [36] Lanier, L. L.: NK Cell Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:1, 225–274 (2005).
- [37] Wiczorek, M.; Abualrous, E. T.; Sticht, J.; Álvaro-Benito, M.; Stolzenberg, S.; Noé, F.; Freund, C.: Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **8**:292 (2017).
- [38] Ryan, J. C.; Seaman, W. E.: Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells. *Immunol. Rev.* **155**:1, 79–89 (1997).
- [39] Nicoll, G.; Ni, J.; Liu, D.; Klenerman, P.; Munday, J.; Dubock, S.; Mattei, M.-G.; Crocker, P. R.: Identification and Characterization of a Novel Siglec, Siglec-7, Expressed by Human Natural Killer Cells and Monocytes. *J. Biol. Chem.* **274**:48, 34089–34095 (1999).

- [40] Hudak, J. E.; Canham, S. M.; Bertozzi, C. R.: Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nat. Chem. Biol.* **10**:1, 69–75 (2014).
- [41] Pinho, S. S.; Reis, C. A.: Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer.* **15**:9, 540–555 (2015).
- [42] Campbell, K. S.; Colonna, M.: DAP12: a key accessory protein for relaying signals by Natural Killer cell receptors. *Int. J. Biochem. Cell B.* **31**:6, 631–636 (1999).
- [43] Braud, V. M.; Allan, D. S. J.; O’Callaghan, C. A.; Söderström, K.; D’Andrea, A.; Ogg, G. S.; Lazetic, S.; Young, N. T.; Bell, J. I.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.; McMichael, A. J.: HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**:6669, 795–799 (1998).
- [44] Pegram, H. J.; Andrews, D. M.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K.; Kershaw, M. H.: Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol. Cell Biol.* **89**:2, 216–224 (2011).
- [45] Waldhauer, I.; Steinle, A.: NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene.* **27**:45, 5932–5943 (2008).
- [46] Wensveen, F. M.; Jelenčić, V.; Polić, B.: NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. *Front. Immunol.* **9**:441 (2018).
- [47] Mandelboim, O.; Malik, P.; Davis, M. D.; Jo, C. H.; Boyson, J. E.; Strominger, J. L.: Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:10, 5640–5644 (1999).
- [48] Vitale, M.; Falco, M.; Castriconi, R.; Parolini, S.; Zambello, R.; Semenzato, G.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Moretta, L.; Moretta, A.: Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* **31**:1, 233–242 (2001).
- [49] Hamann, J.; Montgomery, K. T.; Lau, S.; Kucherlapati, R.; Van Lier, R. A.: AICL: a new activation-induced antigen encoded by the human NK gene complex. *Immunogenetics.* **45**:5, 295–300 (1997).
- [50] Akatsuka, A.; Ito, M.; Yamauchi, C.; Ochiai, A.; Yamamoto, K.; Matsumoto, N.: Tumor cells of non-hematopoietic and hematopoietic origins express activation-induced C-type lectin, the ligand for killer cell lectin-like receptor F1. *Int. Immunol.* **22**:9, 783–790 (2010).
- [51] Koch, J.; Steinle, A.; Watzl, C.; Mandelboim, O.: Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* **34**:4, 182–191 (2013).
- [52] Barrow, A. D.; Martin, C.J.; Colonna, M.: The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front. Immunol.* **10**:909 (2019).
- [53] Pende, D.; Parolini, S.; Pessino, A.; Sivori, S.; Augugliaro, R.; Morelli, L.; Marcenaro, E.; Accame, L.; Malaspina, A.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Moretta, L.; Moretta, A.: Identification and Molecular Characterization of Nkp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* **190**:10, 1505–1516 (1999).
- [54] Arnon, T. I.; Ahdout, H.; Levi, O.; Markel, G.; Saleh, N.; Katz, G.; Gazit, R.; Gonen-Gross, T.; Hanna, J.; Nahari, E.; Porgador, A.; Honigman, A.; Plachter, B.; Mevorach, D.; Wolf, D. G.; Mandelboim, O.: Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* **6**:5, 515–523 (2005).
- [55] Wang, W.; Guo, H.; Geng, J.; Zheng, X.; Wei, H.; Sun, R.; Tian, Z.: 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**:48, 33311–33319 (2014).

- [56] Von Strandmann, E. P.; Simhadri, V. R.; Von Tresckow, B.; Sasse, S.; Reiners, K. S.; Hansen, H. P.; Rothe, A.; Böll, B.; Simhadri, V. L.; Borchmann, P.; McKinnon, P. J.; Hallek, M.; Engert, A.: Human Leukocyte Antigen-B-Associated Transcript 3 Is Released from Tumor Cells and Engages the NKp30 Receptor on Natural Killer Cells. *Immunity*. **27**:6, 965–974 (2007).
- [57] Collins, M.; Ling V.; Carreno, B. M.: The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* **6**:6, 223 (2005).
- [58] Henry, J.; Miller, M. M.; Pontarotti, P.: Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunol. Today* **20**:6, 285–288 (1999).
- [59] Emaldi, M.; Nunes-Xavier, C. E.: B7-H4 Immune Checkpoint Protein Affects Viability and Targeted Therapy of Renal Cancer Cells. *Cells* **11**:9, 1448 (2022).
- [60] Kaifu, T.; Escalière, B.; Gastinel, L. N.; Vivier, E.; Baratin, M.: B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**:21, 3531–3539 (2011).
- [61] Brandt, C. S.; Baratin, M.; Yi, E. C.; Kennedy, J.; Gao, Z.; Fox, B.; Haldeman, B.; Ostrander, C. D.; Kaifu, T.; Chabannon, C.; Moretta, A.; West, R.; Xu, W.; Vivier, E.; Levin, S. D.: The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* **206**:7, 1495–1503 (2009).
- [62] Chen, Y.; Mo, J.; Jia, X.; He, Y.: The B7 Family Member B7-H6: a New Bane of Tumor. *Pathol. Oncol. Res.* **24**:4, 717–721 (2018).
- [63] Xiao, L.; Guan, X.; Xiang, M.; Wang, Q.; Long, Q.; Yue, C.; Chen, L.; Liu, J.; Liao, C.: B7 family protein glycosylation: Promising novel targets in tumor treatment. *Front. Immunol.* **13**:1088560 (2022).
- [64] Pinheiro, P. F.; Justino, G. C.; Marques, M. M.: NKp30 - A prospective target for new cancer immunotherapy strategies. *Brit. J. Pharmacol.* **177**:20, 4563–4580 (2020).
- [65] Ferlazzo, G.; Tsang, M. L.; Moretta, L.; Melioli, G.; Steinman, R. M.; Münz, C.: Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells. *J. Exp. Med.* **195**:3, 343–351 (2002).
- [66] Cao, G.; Wang, J.; Zheng, X.; Wei, H.; Tian, Z.; Sun, R.: Tumor Therapeutics Work as Stress Inducers to Enhance Tumor Sensitivity to Natural Killer (NK) Cell Cytolysis by Up-regulating NKp30 Ligand B7-H6. *J. Biol. Chem.* **290**:5, 29964–29973 (2015).
- [67] Gutierrez-Franco, J.; Hernandez-Gutierrez, R.; Bueno-Topete, M. R.; Haramati, J.; Navarro-Hernandez, R. E.; Escarra-Senmarti, M.; Vega-Magaña, N.; Del Toro-Arreola, A.; Pereira-Suarez, A. L.; Del Toro-Arreola, S.: Characterization of B7H6, an endogenous ligand for the NK cell activating receptor NKp30, reveals the identity of two different soluble isoforms during normal human pregnancy. *Immunobiology.* **223**:1, 57–63 (2018).
- [68] Kellner, C.; Maurer, T.; Hallack, D.; Repp, R.; Van De Winkel, J. G. J.; Parren, P. W. H. I.; Valerius, T.; Humpe, A.; Gramatzki, M.; Peipp, M.: Mimicking an Induced Self Phenotype by Coating Lymphomas with the NKp30 Ligand B7-H6 Promotes NK Cell Cytotoxicity. *J. Immunol.* **189**:10, 5037–5046 (2012).
- [69] Schlecker, E.; Fiegler, N.; Arnold, A.; Altevogt, P.; Rose-John, S.; Moldenhauer, G.; Sucker, A.; Paschen, A.; Von Strandmann, E. P.; Textor, S.; Cerwenka, A.: Metalloprotease-Mediated Tumor Cell Shedding of B7-H6, the Ligand of the Natural Killer Cell-Activating Receptor NKp30. *Cancer Res.* **74**:13, 3429–3440 (2014).

- [70] Peipp, M.; Derer, S.; Lohse, S.; Staudinger, M.; Klausz, K.; Valerius, T.; Gramatzki, M.; Kellner, C.: HER2-specific immunoligands engaging NKp30 or NKp80 trigger NK-cell-mediated lysis of tumor cells and enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Oncotarget*. **6**:31, 32075–32088 (2015).
- [71] Mitri, Z.; Constantine, T.; O'Regan, R.: The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pract.* **2012**:743193, 1–7 (2012).
- [72] Gacerez, A. T.; Hua, C. K.; Ackerman, M. E.; Sentman, C. L.: Chimeric antigen receptors with human scFvs preferentially induce T cell anti-tumor activity against tumors with high B7H6 expression. *Cancer Immunol. Immunother.* **67**:5, 749–759 (2018).
- [73] Wu, M.-R.; Zhang, T.; Gacerez, A. T.; Coupet, T. A.; Demars, L. R.; Sentman, C. L.: B7H6-Specific Bispecific T Cell Engagers Lead to Tumor Elimination and Host Antitumor Immunity. *J. Immunol.* **194**:11, 5305–5311 (2015).
- [74] Hartmann, J.; Tran, T.-V.; Kaudeer, J.; Oberle, K.; Herrmann, J.; Quagliano, I.; Abel, T.; Cohnen, A.; Gatterdam, V.; Jacobs, A.; Wollscheid, B.; Tampé, R.; Watzl, C.; Diefenbach, A.; Koch, J.: The Stalk Domain and the Glycosylation Status of the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 Are Important for Ligand Binding. *J. Biol. Chem.* **287**:37, 31527–31539 (2012).
- [75] Li, Y.; Wang, Q.; Mariuzza, R. A.: Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *J. Exp. Med.* **208**:4, 703–714 (2011).
- [76] Skořepa, O.; Pazicky, S.; Kalousková, B.; Bláha, J.; Abreu, C.; Ječmen, T.; Rosůlek, M.; Fish, A.; Sedivy, A.; Harlos, K.; Dohnálek, J.; Skálová, T.; Vaněk, O.: Natural Killer Cell Activation Receptor NKp30 Oligomerization Depends on Its N-Glycosylation. *Cancers*. **12**:7, 1998 (2020).
- [77] Memmer, S.; Weil, S.; Beyer, S.; Zöller, T.; Peters, E.; Hartmann, J.; Steinle, A.; Koch, J.: The Stalk Domain of NKp30 Contributes to Ligand Binding and Signaling of a Preassembled NKp30-CD3 ζ Complex. *J. Biol. Chem.* **291**:49, 25427–25438 (2016).
- [78] Herrmann, J.; Berberich, H.; Hartmann, J.; Beyer, S.; Davies, K.; Koch, J.: Homooligomerization of the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 Ectodomain Increases Its Binding Affinity for Cellular Ligands. *J. Biol. Chem.* **289**:2, 765–777 (2014).
- [79] Hollister, J.; Grabenhorst, E.; Nimitz, M.; Conradt, H.; Jarvis, D. L.: Engineering the Protein N-Glycosylation Pathway in Insect Cells for Production of Biantennary, Complex N-Glycans. *Biochemistry*. **41**:50, 15093–15104 (2002).
- [80] Böhm, E.; Seyfried, B. K.; Dockal, M.; Graninger, M.; Hasslacher, M.; Neurath, M.; Konetschny, C.; Matthiessen, P.; Mitterer, A.; Scheiflinger, F.: Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **15**:1, 87 (2015).
- [81] Call, M. E.; Schnell, J. R.; Xu, C.; Lutz, R. A.; Chou, J. J.; Wucherpfennig, K. W.: The Structure of the $\zeta\zeta$ Transmembrane Dimer Reveals Features Essential for Its Assembly with the T Cell Receptor. *Cell*. **127**:2, 355–368 (2006).
- [82] Dle ústního sdělení Mgr. Ondřeje Skořepy, Ph.D. (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze).
- [83] Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X.: Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods*. **3**:10, 793–796 (2006).

- [84] Lelek, M.; Gyparaki, M. T.; Beliu, G.; Schueder, F.; Griffié, J.; Manley, S.; Jungmann, R.; Sauer, M.; Lakadamyali, M.; Zimmer, C.: Single-molecule localization microscopy. *Nat. Rev. Methods Primers*. **1**:1, 39 (2021).
- [85] Pekar, L.; Klausz, K.; Busch, M.; Valldorf, B.; Kolmar, H.; Wesch, D.; Oberg, H.-H.; Krohn, S.; Boje, A. S.; Gehlert, C. L.; Toleikis, L.; Krah, S.; Gupta, T.; Rabinovich, B.; Zielonka, S.; Peipp, M.: 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. *J. Immunol.* **206**:1, 225–236 (2021).
- [86] Kumari, P.; Bowmik, S.; Paul, S. K.; Biswas, B.; Banerjee, S. K.; Murty, U. S.; Ravichandiran, V.; Mohan, U.: Sortase A: A chemoenzymatic approach for the labeling of cell surfaces. *Biotechnol. Bioeng.* **118**:12, 4577–4589 (2021).
- [87] Marraffini, L. A.; Dedent, A. C.; Schneewind, O.: Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **70**:1, 192–221 (2006).
- [88] Parthasarathy, R.; Subramanian, S.; Boder, E. T.: Sortase A as a Novel Molecular “Stapler” for Sequence-Specific Protein Conjugation. *Bioconjugate Chem.* **18**:2, 469–476 (2007).
- [89] Jeong, H.-J.; Abhiraman, G. C.; Story, C. M.; Ingram, J. C.; Dougan, S. K.: Generation of Ca²⁺-independent sortase A mutants with enhanced activity for protein and cell surface labeling. *PLoS ONE* **12**:12 (2017).
- [90] Gasteiger, E.: ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**:13, 3784–3788 (2003).
- [91] Scheuermann, T. H.; Brautigam, C. A.: High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: New features of NITPIC. *Methods*. **76**, 87–98 (2015).
- [92] Brautigam, C. A.: Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data. In: *Methods in Enzymology*; ed. Cole, J. L.; Academic Press, 2015, str. 109-133; ISBN 978-0-12-802908-4.
- [93] Zhao, H.; Piszczek, G.; Schuck, P.: SEDPHAT – A platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods* **76**, 137–148 (2015).
- [94] Kalousková, B.; Skořepa, O.; Cmunt, D.; Abreu, C.; Krejčová, K.; Bláha, J.; Siegllová, I.; Král, V.; Fábry, M.; Pola, R.; Pechar, M.; Vaněk, O.: Tumor Marker B7-H6 Bound to the Coiled Coil Peptide-Polymer Conjugate Enables Targeted Therapy by Activating Human Natural Killer Cells. *Biomedicines* **9**:11, 1597 (2021).
- [95] Malá, V.: *Příprava mutovaných forem proteinu B7-H6*. Praha, 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.