

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Biochemie



Kateřina Krejčová

PŘÍPRAVA NÁDOROVÉHO LIGANDU B7-H6 S COILED-COIL
KOTVOU A OVĚŘENÍ JEHO VAZBY NA RECEPTOR NKp30

Preparation of tumour ligand B7-H6 with coiled-coil tag and verifying of its binding to
receptor NKp30

Bakalářská práce

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

Praha 2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 13. 8. 2017

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za trpělivost a za cenné odborné rady a připomínky k mé bakalářské práci. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Michalovi Rosůlkovi za vedení hmotnostně spektrometrické části. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Barboře Kalouskové za velikou pomoc s experimentální částí a ochotu kdykoliv pomoci a poradit. V neposlední řadě děkuji celému osazenstvu laboratoře 204 za příjemné a přátelské prostředí a své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

ABSTRAKT

NK buňky jsou přirozené zabíječské buňky (z angl. natural killer cells) podílející se na protinádorové imunitě. Tyto buňky jsou schopny zabránit vzniku virové infekce či nádorového onemocnění, a to bez předešlé senzitivace antigenem. Mechanismus aktivace NK buněk je založen na principu snížené exprese MHC gp I molekul na povrchu nádorových buněk. Na povrchu NK buněk jsou přítomny receptory, které jsou schopny rozlišit jak aktivační, tak inhibiční signály, které rozhodují o tom, zda dojde k aktivaci NK buněk a zabití cílové buňky, či nikoliv. NKp30 je transmembránový receptor I. typu, který rozeznává stresem indukovaný buněčný ligand B7-H6. Interakce těchto proteinů je signálem pro imunitní systém k zahájení imunitní odpovědi.

Tato práce se zaměřuje na přípravu buněčného ligandu B7-H6 s peptidovou coiled-coil kotvou v liniích lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293S GnTI⁻ a HEK293T. Byl úspěšně připraven protein s coiled-coil kotvou na C-konci proteinu, což bylo ověřeno hmotnostní spektrometrií. Rovněž byla pomocí sedimentační analýzy potvrzena interakce připraveného proteinu s receptorem NKp30.

Klíčová slova: NK buňky, rekombinantní exprese, B7-H6, HEK293, coiled-coil

ABSTRACT

Natural killer cells (NK cells) are part of innate antitumor immunity. These cells have the capacity to prevent viral infection or malignant transformation without prior antigen sensitization. Activation of NK cells consist of different recognition strategies. Mechanism of activation is based on down-regulated expression of MHC gp I molecules on the cell surface. NK cells possess both activation and inhibitory receptors that transmit activation or inhibitory signals which determine if NK cells are activated or not, and thus whether the target cell will be lysed or spared. NKp30 is a type I transmembrane receptor which recognize the stress-induced cell surface ligand B7-H6. Interaction of these two proteins leads to the initiation of immune response.

The main aim of this thesis is the preparation of cell ligand B7-H6 with coiled-coil peptide tag in human embryonic kidney cell lines HEK293 GnTI⁻ and HEK293T. Successful preparation of B7-H6 with coiled-coil tag on its C-terminus was verified by mass spectrometry. Its interaction with natural cytotoxicity receptor NKp30 was also proven by sedimentation analysis.

Key words: NK cells, recombinant expression, B7-H6, HEK293, coiled-coil

(This thesis is written in Czech)

SEZNAM ZKRATEK

ACT	adoptivní buněčná terapie, z angl. adoptive cellular therapy
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách, z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity
APC	buňky prezentující antigen, z angl. antigen presenting cells
APS	peroxodisíran amonný, z angl. ammonium persulfate
B7-H6	buněčný ligand z rodiny B7
CD	diferenciační skupina, z angl. cluster of differentiation
dH ₂ O	deionizovaná voda
dNTPs	deoxynukleotidtrifosfáty
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová, z angl. ethylenediaminetetraacetic acid
Fc	část molekuly protilátky, z angl. fragment crystallizable
GnTf	buňky deficientní na N-acetylglukosaminyltransferasu I
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk číslo 293, z angl. human embryonic kidney 293
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HLA	lidský leukocytární antigen, z angl. human leukocyte antigen
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. high-performance liquid chromatography
HPSG	proteoglykan heparan sulfátu, z angl. heparan sulfate proteoglycan
IgG	imunoglobulin G
INF γ	interferon γ
ITAM	imunoreceptorový aktivační motiv tyrosinového typu, z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	imunoreceptorový inhibiční motiv tyrosinového typu, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
KIR	receptor zabíječských buněk podobný imunoglobulinům, z angl. killer-cell immunoglobulin-like receptors
LB	kultivační médium, z angl. lysogeny broth
LBD	doména vázající ligand, z angl. ligand binding domain
IPEI	lineární polyethylenimin
mB7-H6	B7-H6 s mutací cysteinu na pozici 212

mB7-H6CC	mB7-H6 s coiled-coil kotvou
mB7-H6CC_C	mB7-H6 s coiled-coil kotvou na C terminálním konci
mB7-H6CC_N	mB7-H6 s coiled-coil kotvou na N terminálním konci
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MHC gp I	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy, z angl. major histocompatibility complex glycoproteins class I
MS	hmotnostní spektrometrie, z angl. mass spectrometry
NCR	receptory přirozené cytotoxicity, z angl. natural cytotoxicity receptors
NK buňky	přirozené zabíječské buňky, z angl. natural killer cells
NKG2	rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu, z angl. natural killer group 2
NKp30	receptor NK buněk o velikosti 30 kDa, z angl. natural killer cell protein 30 kDa
NKp44	receptor NK buněk o velikosti 44 kDa, z angl. natural killer cell protein 44 kDa
NKp46	receptor NK buněk o velikosti 46 kDa, z angl. natural killer cell protein 46 kDa
OV	onkolytické viry, z angl. oncolytic viruses
PBS	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline
PCR	polymerasová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
SDS	dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová elektroforéza
TAA	antigeny asociované s nádory, z angl. tumor-associated antigen
TAE	tris-acetátový pufr s EDTA
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin, z angl. tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	antigeny specifické pro nádory, z angl. tumor-specific antigens

OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD	10
1.1	Imunitní systém	10
1.1.1	Buňky imunitního systému v protinádorové imunitě	10
1.1.2	Biologie NK buněk	11
1.1.3	Aktivace NK buněk	11
1.1.4	Receptory NK buněk	12
1.1.5	Aktivace NK buněk	13
1.1.6	Receptory přirozené cytotoxicity	14
1.1.7	B7-H6 a NKp30	15
1.2	Imunoterapie	16
1.2.1	Vakcíny	17
1.2.2	OV imunoterapeutika	17
1.2.3	Adoptivní buněčná terapie	18
1.2.4	Blokace imunitního kontrolního bodu	18
1.2.5	Kombinovaná terapie	18
1.2.6	NK buňky v imunoterapii	19
1.3	Coiled-coil motiv	19
2	CÍLE PRÁCE	22
3	MATERIÁL	23
3.1	Přístroje a pomůcky	23
3.2	Chemikálie	24
3.3	Enzymy	24
3.4	Bakteriální kmeny a buněčné linie	25
3.5	Vektory	25
3.6	Oligonukleotidy pro PCR	25
3.7	Roztoky	25
3.8	Kultivační média	26
4	METODY	27
4.1	Izolace zásobního množství plazmidové DNA	27
4.2	Linearizace vektoru	27
4.3	Amplifikace inzertu pomocí PCR reakce	28
4.4	Elektroforéza v agarosovém gelu	29
4.5	Extrakce DNA z agarosového gelu	29

4.6	Infusion reakce	30
4.7	Transformace plazmidové DNA a její velkoobjemová produkce	30
4.8	Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA	30
4.9	Stanovení koncentrace DNA.....	31
4.10	Sekvenování DNA	31
4.11	PCR z kolonií	32
4.12	Kultivace buněčných linií HEK293S GnTI- a HEK293T	32
4.13	Transfekce buněčné linie HEK293S GnTI-	33
4.14	Sklizení produkci.....	33
4.15	Afinitní chromatografie	33
4.16	Zkoncentrování proteinů po afinitní chromatografii	33
4.17	Gelová permeační chromatografie.....	34
4.18	Stanovení koncentrace proteinů	34
4.19	SDS-PAGE.....	34
4.20	Sedimentační analýza	35
4.21	Hmotnostní spektrometrie	35
5	VÝSLEDKY	37
5.1	Sekvence expresních konstruktů.....	37
5.2	Příprava expresních vektorů.....	38
5.3	Produkce mB7-H6 s coiled-coil kotvou v linii HEK293S GnTI-	40
5.4	Produkce mB7-H6CC_C v linii HEK293T	42
5.5	Sedimentační analýza vazby mB7-H6CC_C na NKp30	45
5.6	Hmotnostní spektrometrie.....	47
6	DISKUZE	48
7	ZÁVĚR	50
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je vnímán jako efektorový orgán, jehož hlavní funkcí je udržování stálého vnitřního prostředí organismu, ochrana před patogeny a imunitní dohled [1,2]. Pro jeho správnou funkci je nutné, aby přijímal a správně rozpoznal velké množství podnětů (antigenů) z vnějšího (exoantigeny) i vnitřního prostředí (autoantigeny) [3].

1.1.1 Buňky imunitního systému v protinádorové imunitě

Protinádorová imunita je zajištěna různými typy buněk, jedná se jak o buňky vrozené imunity (ke své funkci využívají nespecifické mechanismy), zahrnující makrofágy, neutrofilny, bazofily, eosinofily, žírné buňky, supresorové buňky, dendritické buňky a NK buňky (z angl. natural killer cells, lze přeložit jako přirozené zabíječské buňky), pak o buňky adaptivní (využívající specifické mechanismy), kam jsou řazeny T a B lymfocyty. Tyto buňky mezi sebou komunikují a brání tvorbě nádorů buď přímým kontaktem s cílovými patogenními buňkami nebo za pomoci cytokinů či chemokinů [4].

Buňky imunitního systému jsou tedy teoreticky schopny rozeznat a případně zničit rakovinotvorné buňky před vznikem nádorů, ale také během jejich vývoje. Hypotéza popisující tuto jejich vlastnost je označována jako imunitní dohled. I přes to může u nádorových buněk docházet k nekontrolovatelnému dělení, což je způsobeno jednak imunitní tolerancí, jednak únikem před imunitním systémem (angl. tumor immunescape) [5,6]. Hypotéza imunitního dohledu byla dále rozvinuta pojmem imunitní editace (z angl. immunoediting), tedy vzájemné ovlivňování imunitního systému a nádorových buněk. Imunitní systém tedy pouze nechrání organismus před maligní transformací buněk, ale také přispívá ke změnám v imunogenicitě nádoru. Proces immunoeditace se skládá ze tří fází: eliminace, rovnováha a únik. Fáze eliminace probíhá dle klasického konceptu imunitního dohledu, během rovnováhy jsou buňky kontrolovány, nedochází však k jejich eliminaci. Může ovšem nastat situace, že nádorové buňky zcela uniknou dohledu imunitního systému, což vede k jejich nekontrolovatelnému množení a nemoc se tak projeví v celém svém rozsahu [1,7]. Nádorové buňky se mohou buď lišit od buněk „normálních“ natolik málo, že je imunitní systém nerozezná jako škodlivé látky, nebo tyto buňky chrání mechanismy, které znemožní imunitnímu systému správně reagovat vytvořením imunosupresivního prostředí [1].

1.1.2 Biologie NK buněk

NK buňky hrají zásadní roli při vrozené obraně organismu proti patogenům a jsou rovněž součástí imunitního dohledu při vzniku nádorů a při prevenci nádorových metastáz [8]. Tyto buňky jsou schopny rozeznat virové a nádorové buňky, a to bez předešlé senzitivace. Na rozdíl od T a B lymfocytů tyto buňky ovšem na svém povrchu nemají receptory specifické pro antigeny, avšak jsou schopny zabránit virové infekci spuštěním neadaptivní imunitní odpovědi [1,9].

NK buňky se vyskytují především v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a v dalších nelymfoidních orgánech jako jsou plíce, játra, slinivka nebo děloha [8,10]. Mohou se přesunout přímo do místa zánětu a sekundárních lymfoidních orgánů, kde tvoří první linii při obraně proti patogenům, jelikož jsou schopné zničit virovou infekci nebo transformované buňky za pomoci cílené buněčné lýzy, aktivace nespecifických hematopoetických buněk, aktivace dendritických buněk nebo primárních adaptivních leukocytů jako jsou T a B lymfocyty [11]. Po aktivaci tyto buňky uvolňují cytokiny nebo chemokiny, které indukují odpověď na záněty, podporují aktivaci a proliferaci granulocytů, čímž zesilují imunitní odpověď na infekci a rovněž stimulují krvetvorbu [10].

NK buňky na svém povrchu exprimují povrchové antigeny CD16 a CD56. Naprostá většina těchto buněk je CD56^{dim}, právě ty vyvolávají cytotoxicitu. Dále existují NK buňky CD^{bright}, které řídí sekreci cytokinů [12].

1.1.3 Aktivace NK buněk

NK buňky jsou aktivovány cílovými buňkami, které zaznamenají změnu v expresi MHC gp I molekul (z angl. major histocompatibility complex glycoproteins class I) [13]. Tímto způsobem jsou tedy NK buňky schopny rozpoznat buňky nádorové od buněk zdravých. Zdravé buňky totiž exprimují určitou hladinu MHC gp I molekul, které jsou receptory rozeznány a nedochází tak k zabití těchto buněk imunitním systémem. Naproti tomu virově infekční buňky stejně jako buňky nádorové mají tuto expresi potlačenou a NK buňky tedy rozeznají sníženou hladinu MHC gp I molekul a nastartují tak proces buněčné lýzy [9].

Dalším důležitým mechanismem při ničení nežádoucích buněk je rozeznání stresovaných buněk pomocí aktivačních receptorů. Aby totiž nedošlo k zabití buněk zdravých v aktivační či proliferační fázi vyvolávající stres, je udržována nebo i zvýšena povrchová exprese MHC gp I, kdežto buňky infikované virem nebo buňky nádorové mají

expresi ligandů rozpoznávaných aktivačními receptory doprovázenou úbytkem MHC gp I. V důsledku této skutečnosti není při aktivaci NK buněk potlačena aktivita inhibičních receptorů [8].

Efektorová funkce NK buněk je regulována rovnováhou mezi protichůdnými signály vysílanými inhibičními receptory pro MHC gp I a aktivačními receptory odpovědnými za aktivaci NK buněk [14]. Tyto buňky po ligaci aktivačních receptorů s molekulami na povrchu membrán okolních tkání prochází blastogenezí, tvorbou cytokinů, a migrují k cílovým buňkám [14]. Cytokiny poté způsobují proliferaci NK buněk a také napomáhají spuštění cytotoxicity a produkci interferonu gama (IFN- γ). IFN- γ je cytokin, který hraje zásadní roli při potlačení výskytu patogenů v počátečním stádiu infekce [9].

1.1.4 Receptory NK buněk

Na rozdíl od T a B lymfocytů NK buňky nemají antigenně specifické receptory, ale obsahují soubor receptorů kódovaný zárodečnou linií (angl. germ-line encoded proteins), které řídí jejich vývoj a funkci. Tyto receptory zprostředkovávají aktivační nebo naopak inhibiční signály, což následně určuje, jakým způsobem NK buňka interaguje s cílovou buňkou [15].

V lidském organismu existují dvě hlavní třídy inhibičních receptorů. Do první třídy spadá CD94:NKG2A heterodimer. Obě části tohoto receptoru patří do superrodiny receptorů podobných lektinům C-typu (angl. C-type lectin-like superfamily). Do druhé třídy patří imunoglobulinové receptory KIR (z angl. killer-cell immunoglobulin-like receptors). Tyto skupiny receptorů využívají různé strategie pro rozpoznání MHC gp I, kvůli značné diverzitě tohoto komplexu. Například CD94:NKG2A rozeznává základní sekvence signálního peptidu většiny HLA molekul třídy I (z angl. human leukocyte antigen class I). Tyto proteiny jsou poté vázány na HLA-E molekuly a tento komplex je tedy samotným ligandem CD94:NKG2A receptoru. Na druhou stranu KIR receptory využívají právě značné diverzity MHC gp I tím, že vyvinuly vysoce variabilní systém, který je srovnatelný s variabilitou systému MHC gp I a dokáže tak rozeznat jeho různé polymorfní molekuly. Rozpoznání jednotlivých molekul HLA třídy I NK buňkami je zprostředkováno extracelulární částí KIR. Intracelulární část zase zajišťuje přenos jak aktivačních, tak inhibičních signálů. V podstatě by tedy mělo být možné tímto způsobem analyzovat každou expresi MHC molekul a tak zamezit šíření infekce způsobené sníženou tvorbou MHC gp I [16].

Společným znakem všech inhibičních receptorů NK buněk přítomným v jejich cytoplazmatické doméně je sekvence aminokyseliny Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val, kde x může nahradit jakákoliv aminokyselina, neboli tzv. ITIM motiv (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Po navázání ligandu je tento motiv fosforylován [17].

Na proti tomu na některých aktivačních receptorech NK buněk je možné sledovat společný motiv ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Využívají tedy společnou signalizační cestu s T a B lymfocyty. ITAM má také specifickou sekvenci aminokyseliny, a to Asp/Glu-x-x-Tyr-x-x-Leu/Ile-x₆₋₈-Tyr-x-x-Leu/Ile, kde x opět značí jakoukoliv aminokyselinu [17].

Aktivační signály jsou zprostředkovány aktivačními receptory několika skupin jako DNAM-1, NKG2 nebo NCR [18]. Aktivační receptory jsou schopny rozeznat tzv. stresové ligandy na virových případně maligně transformovaných buňkách. Příkladem takového receptoru je NKG2D, který se vyskytuje na povrchu všech NK buněk a je schopen rozeznat dvě skupiny proteinů, za prvé řetězce A a B podobné MHC gp I (MICA a MICB) a dále proteiny z rodiny UL16. Existují rovněž receptory přirozené cytotoxicity jako NKp30, NKp44 a NKp46, ty se váží například na virové ligandy nebo nádorové antigeny.

1.1.5 Aktivace NK buněk

Jedním z hlavních mechanismů aktivace NK buněk je aktivace za pomoci Fc receptoru CD16 na povrchu NK buněk. Tento proces je označován jako buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Při něm dochází k stimulaci CD16 protilátkami, což vyvolá zvýšení hladiny vápníkových iontů, produkci cytokinů (IFN- γ) a likvidaci buněk, na jejichž povrchu je daná protilátka navázána [15,19].

Životnost NK buněk není příliš vysoká, v periferní krvi přežívají maximálně 10 dnů. V organismu se tak neustále tvoří z kmenových buněk buňky nové, a tak je přítomno velké množství nezralých NK buněk. Ty musí podstoupit proces zvaný licencování (angl. licensing). Dozrálé buňky totiž musí být schopné rozpoznat rozdíl mezi buňkami tělu vlastními a buňkami cizími.

V případě, že je hladina exprese MHC gp I receptorů normální, je k NK buňkám vyslán inhibiční signál, který tyto buňky inaktivuje. Z toho vyplývá, že pokud je snížena exprese MHC gp I, inhibiční signál je potlačen a NK buňka je aktivována [18].

1.1.6 Receptory přirozené cytotoxicity

NCR je skupina transmembránových receptorů NK buněk, aktivních při protinádorové a protivirové imunitě. Jediným výlučně aktivačním receptorem z této rodiny je NKp46, receptory NKp30 a NKp44 mohou být jak aktivační, tak inhibiční, v závislosti na ligandech [20]. Zde je jako příklad možné uvést ligand PCNA (z angl. proliferating cell nuclear antigen), který po navázání na NKp44 inhibuje funkci NK buněk, naopak aktivačním ligandem je NKp44L (tabulka 1). Ligandy receptoru NKp46 jsou HPSG (z angl. heparan sulfate proteoglykan), heparin a vimentin. Vimentin je protein používaný jako marker epiteliálních buněk procházejících přeměnou na buňky mezenchymální, což probíhá například při tvorbě metastáz.

Aktivace NKp30 závisí na převládající isoformě tohoto receptoru na povrchu NK buněk. Mohou to být jednak aktivační isoformy NKp30a,b nebo inhibiční isoforma NKp30c [21]. Tyto receptory se od sebe ovšem značně odlišují, i přes to, že patří do stejné skupiny. Gen kódující NKp46 (NCR1) obsahuje 2 extracelulární Ig domény, kdežto geny pro receptory NKp30 a NKp44, tedy geny NCR2 a NCR3, mají pouze jednu extracelulární doménu. Další odlišností je fakt, že receptory NKp46 a NKp30 jsou exprimovány na všech NK buňkách, kdežto NKp44 je exprimován pouze na aktivovaných cirkulujících NK buňkách. Tato aktivace probíhá za pomoci cytokinu interleukinu 2 (IL-2). Povrchová exprese NKp44 je zvýšena i dalším cytokinem, a to IL-15 [22].

Transmembránová oblast každého z těchto receptorů je spojena s adaptorovými molekulami. Tyto molekuly po ligaci NCR s ligandem spouští aktivační signalizaci pomocí aktivačních motivů (ITAM) v případě NKp30 a NKp44, případně inhibičních motivů (ITIM) u receptoru NKp46 [22].

Tabulka 1: Receptory rodiny NCR spolu se svými ligandy.

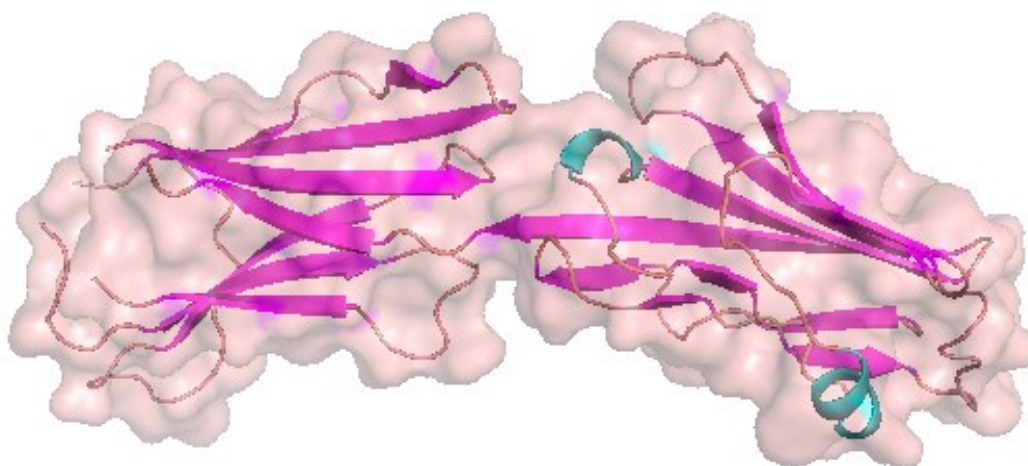
Receptor	NKp30		NKp44	NKp46	
	NKp30a,b	NKp30c			
Ligand	B7-H6, BAG6, BAT3	B7-H6, BAG6	NKp44L	PCNA HPSG, heparin, vimentin	
Typ signalizace	aktivační	inhibiční	aktivační	inhibiční	aktivační

1.1.7 B7-H6 a NKp30

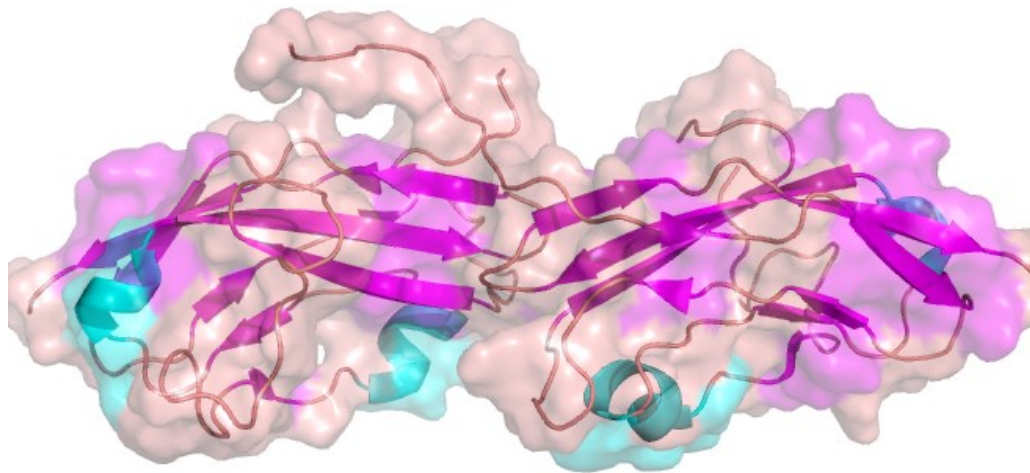
B7-H6 je transmembránový protein typu I. Jedná se o stresem indukovaný buněčný ligand patřící do rodiny B7, který je rozeznáván NCR receptorem NKp30. Tento ligand je možné nalézt pouze u nádorových buněk či jinak stresovaných buněk, nikoliv však na buňkách zdravých [23]. Spojení B7-H6 s aktivačním receptorem NKp30 je signálem pro imunitní systém k zahájení imunitní odpovědi [24,25].

Protein B7-H6, stejně jako ostatní proteiny z rodiny B7, je složen ze dvou Ig domén, jak je možné pozorovat na obr. 1 [26]. Extracelulární část tohoto proteinu je složena z membránové distální domény podobné písmenu V (V-like distal domain) a proximální domény podobné písmenu C (C-like proximal domain). Na těchto doménách je společně možné nalézt šest N-vázaných glykosylačních míst (2 na V a 4 na C doméně) [23,24].

NKp30 je transmembránový glykoprotein s jednou extracelulární doménou podobnou imunoglobulinům (Ig-like extracellular domain), která je spojena transmembránovou částí s intracelulární doménou. Extracelulární doména se skládá ze dvouvrstvého β -sendviče. Současně je také u tohoto receptoru možné pozorovat struktury dvou α -helixů. Jeden z těchto helixů, konkrétně α_1 , je jedinečný právě pro NKp30 (obr. 2, str. 16) [24].



Obrázek 1: Struktura B7-H6. Na tomto obrázku je možné pozorovat dvě Ig domény. Fialovou barvou je znázorněn β -skládaný list, světle modrou α -helix a části spojující tyto struktury jsou vyznačeny oranžově. Obrázek byl vytvořen v programu MacPyMOL dle krystalové struktury B7-H6 (PDB kód 3PV7 [24]).



Obr. 2: Struktura NKp30. Fialovou barvou je znázorněn β -skládaný list, světle modrou α -helix a části spojující tyto sktruktury jsou vyznačeny oranžově. Obrázek byl vytvořen v programu MacPyMOL dle krystalové struktury NKp30 (PDB kód 3NOI)[27] .

1.2 Imunoterapie

Tento způsob terapie funguje na principu podpory vlastního imunitního systému pacienta při boji a následném zničení nádorových buněk a zabránění jejich rozvoji [28]. Jedná se o expresi nádorově specifických povrchových antigenů nádorovými buňkami a jejich rozeznání imunitním systémem. Tyto antigeny se dělí do dvou kategorií, a to antigeny specifické pro nádory (angl. tumor-specific antigen, TSA) a antigeny asociované s nádory (angl. tumor-associated antigen, TAA) [1]. Antigeny specifické pro nádory, někdy též označované jako neoantigeny, jsou odvozeny od mutovaných proteinů typických pro jednotlivé nádory [29].

I přes fakt, že by měl být imunitní systém sám schopen rozeznat patogenní buňky a zničit je, nádorové buňky jsou schopné uniknout jeho dohledu. Vyvinuly totiž několik mechanismů rezistence jako například indukci tolerance, systémové narušení signalizace T buněk nebo lokální únik imunitě [28].

Rovněž i imunoterapie využívá různé přístupy jako stimulaci efektorových mechanismů nebo potlačení inhibičních a supresorových mechanismů. Pro aktivaci efektorových imunitních buněk lze využít jednak k očkování pacienta nádorovými antigeny či zvýšení počtu antigenů tak, aby imunitní systém pacienta sám vyvolal imunitní odpověď.

Jedním z přístupů imunoterapie je tedy přímé podání imunitních buněk pacientovi, tzv. adoptivní buněčná terapie (adoptive cellular therapy, ACT) nebo podání onkolytických

virů (oncolytic viruses, OV), které spustí systematickou protinádorovou imunitu. Dále lze také využít protilátky k zesílení signálů vedoucích k zvýšení aktivity T buněk [30].

Jak již bylo zmíněno, cílem imunoterapie je nastartovat imunitní systém tak, aby byl schopen rozpoznat a následně zabít nádorové buňky. Je ovšem nutné regulovat výši aktivace imunitního systému, aby nedošlo k vzniku autoimunitních reakcí [31].

1.2.1 Vakcíny

Vakcíny patří k prvním používaným imunoterapeutikům, které se snaží aktivovat hostitelské T buňky proti nádorovým antigenům. Využívají funkci dendritických buněk, na které je nutné zacílit vysoké množství antigenů. Právě volba vhodných antigenů je hlavním úskalím při vývoji nových vakcín [32]. Vakcíny by tedy měly obsahovat širokou škálu antigenů asociovaných s nádorem získaných přímo z rakovinných buněk. Tato terapeutika mívají ovšem nízkou nádorovou specifitu. V případě ideálních antigenů by měla být zajištěna specifita tím, že by neměly být přítomny v normálních buňkách a měly by být esenciální pro růst a přežití rakovinných buněk. Tím by se rovněž minimalizovalo riziko úniku imunitnímu systému z důvodu snížené regulace exprese antigenu [33].

Výše zmíněné dendritické buňky, patřící mezi antigen prezentující buňky (antigen presenting cells, APC), jsou v porovnání s jinými buňkami APC velmi účinné při vystavení antigenu a indukci T buněk, proto jsou využívány při vyvíjení terapeutik. Dendritické buňky jsou izolovány z jednojaderných buněk periferní krve, poté jsou k nim přidány cytokiny a antigeny, buňky jsou tak aktivovány a následně vráceny zpět pacientovi [34,35].

1.2.2 OV imunoterapeutika

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2, OV imunoterapie je založena na principu infikování pacienta virem, který se zreplikuje v nádorové buňce a zničí ji. Imunitní odpověď poté probíhá jedním ze dvou mechanismů, selektivní replikací neoplastických buněk, což přímo vede k lýze nádorových buněk, a spuštěním systémové protinádorové imunity pomocí T buněk. Jakým z těchto mechanismů nakonec imunitní reakce proběhne závisí na velkém množství faktorů jako například typu rakovinných buněk, typu virového vektoru, a druhu interakce mezi mikroprostředím nádorové buňky, virem a imunitním systémem [36].

Výhodami této metody je, že je jednak velice specifická, každý nádor je totiž možné využít jako zdroj antigenů, což slouží k vyvolání vysoce specifické imunitní odpovědi, a

také jelikož probíhá replikace virů v nádorových buňkách, minimalizuje se riziko toxicity pro ostatní tkáň. Také je relativně snadná modifikace virového genomu, což může napomoci ke snížení patogenity a snazší protinádorové aktivaci [37].

Hlavní překážkou této léčby by mohla být příliš rychlá imunitní reakce hostitele na virus, což by mělo za následek zničení viru ještě předtím, než se stačí v nádorové buňce replikovat. Této reakci organismu je ovšem možné předejít například kovalentní konjugací virové částice s polyethylenglykolem, což zabrání navázání protilátek. Dalším problémem je nutnost injekčního podání viru přímo do zasaženého orgánu, jelikož je k některým orgánům velmi těžké se injekční cestou dostat [28].

1.2.3 Adoptivní buněčná terapie

Tato imunoterapie využívá protinádorové vlastnosti lymfocytů jako je rozpoznání a zničení primárních a metastatických nádorových buněk [38]. Lymfocyty jsou nejprve izolovány z pacientovy periferní krve, zmnoženy, aktivovány a následně vráceny zpět. Snahou této metody je odvrácení poškození nádorově specifických T lymfocytů, které je způsobeno imunopresí prostředí nádoru [28]. Nevýhodami jsou časová i finanční náročnost při pěstování vhodné buněčné populace [39].

1.2.4 Blokáce imunitního kontrolního bodu

Další možností cílené protinádorové léčby je blokáce imunně-inhibičních cest aktivovaných nádorovými buňkami. Nádorové buňky jsou totiž schopné vyvinout si toleranci vůči nádorově specifickým T lymfocytům a rovněž mohou exprimovat ligandy, které se naváží na inhibiční receptory a utlumit tak funkci T buněk [28]. Hlavním centrem zájmu je inhibiční receptor CTLA-4, který zpomaluje iniciační fázi aktivace T lymfocytů, a PD1 receptor, který inhibuje proliferaci T buněk, uvolnění cytokinů a cytotoxicitu [40].

1.2.5 Kombinovaná terapie

Bohužel u některých pacientů nestačí k úplnému vyléčení pouze jedna metoda imunoterapie, ale je třeba ji kombinovat s dalšími přístupy. Jako příklad je možné uvést kombinaci terapie cílící jak na CTLA-4 inhibiční receptory, tak také na PD1. Oba se sice vyskytují na povrchu T buněk, ovšem každý využívá jinou signální cestu.

Imunoterapii lze také kombinovat s nějakou z klasických protinádorových terapií jako například s chemoterapií. Ta může usnadnit protinádorovou odpověď uvolněním řady nádorových antigenů, stejně tak jako eliminací imunopresivní aktivity nádoru [41].

1.2.6 NK buňky v imunoterapii

Adoptivní přenos buněk lze kromě T lymfocytů (kapitola 1.2.3) provést také s NK buňkami. I v tomto případě se jedná o odebrání autologních nebo allogenicých NK buněk, jejich expanze *ex vivo* a následné podání těchto buněk zpět pacientovi, což by mělo vyvolat protinádorovou imunitní odpověď.

Problémem autologních NK buněk, tedy buněk odebraných přímo z pacientovy krve, je, že tyto buňky již mají vyvinutý mechanismus úniku nádoru imunitnímu systému, jsou totiž umlčovány po setkání s vlastními antigeny MHC gp I [42]. Rovněž vykazují nižší cytotoxicitu vůči nádorům než buňky odebrané ze zdravého jedince. Ukazuje se tedy, že slibnější výsledky by mohlo vykazovat použití „cizích“ allogenicých NK buněk [43]. U těch ovšem hrozí riziko nepřijetí ze strany imunitního systému pacienta (tzv. reakce štěp versus hostitel, vedoucí k odvržení transplantované tkáně). Další možností by mohlo být využití embryonálních tělních buněk nebo získání a imortalizace buněk z pacienta s NK buněčným lymfomem [42].

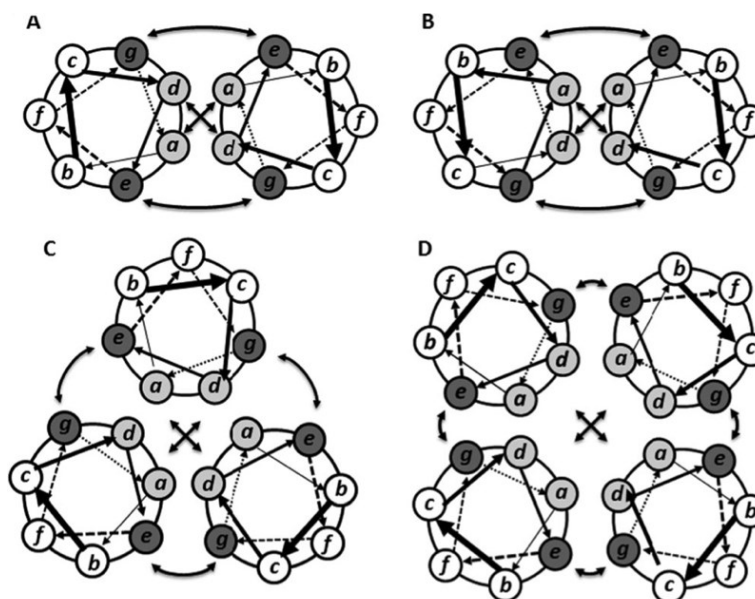
Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC) vyvolaná NK buňkami je naopak jednou z výhod jejich využití v imunoterapii. NK buňky exprimují na svém povrchu receptory CD16, které se váží k Fc části IgG protilátek, právě vazba k tomuto fragmentu spouští cytotoxicitu těchto buněk a této vlastnosti je využito při léčbě.

Tyto metody je rovněž vhodné kombinovat s dalšími jednak imunoterapeutickými metodami jako je blokáce imunitního inhibičního kontrolního bodu, s monoklonálními protilátkami, nebo se standardní léčbou, například chemoterapií či radioterapií [43].

1.3 Coiled-coil motiv

Coiled-coil motiv je superhelikální proteinový strukturní motiv, který se skládá ze 2 a více α -helikálních peptidů. Ty se kolem sebe obtáčí a tak tvoří superhelikální strukturu. Primární struktura tohoto motivu je složena z heptády opakujících se aminokyselinových zbytků $(a-b-c-d-e-f-g)_n$, kde n značí počet opakování. Pozice a a d jsou obvykle obsazeny hydrofobními aminokyselinami tvořícími hydrofobní jádro samotné coiled-coil struktury.

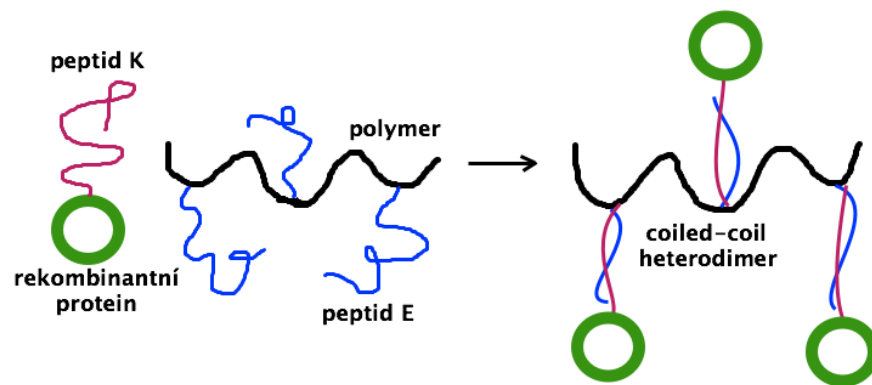
Na pozicích e a g se vyskytují většinou aminokyseliny s nabitými postranními řetězci, které mohou vzájemně interagovat za vzniku stabilizujících solných můstků mezi jednotlivými vlákny (obr. 3) [44].



Obr. 3: Helikální diagramy heptády coiled-coil motivů popisující jejich vzájemné interakce. Písmenem A je označena struktura paralelního coiled-coil dimeru, písmenem B antiparalelního coiled-coil dimeru, C paralelního coiled-coil trimeru a D paralelního coiled-coil tetrameru. Zahnuté šipky představují solné můstky, zkřížené šipky hydrofobní interakce. Převzato z [44].

Coiled-coil motiv je možné využít pro návrh a přípravu systémů doručujících léky, tedy pro nekovalentní spojení dvou makromolekul [45]. Byla prokázána možnost použití heterodimerní coiled-coil kotvy jako spojovacího článku mezi biologicky aktivními proteiny a syntetickým polymerním nosičem. Této skutečnosti je možné využít ke zlepšení farmakokinetiky proteinů, prodloužení jeho výskytu v krevním oběhu, snížení nežádoucí imunogenicity, zpomalení proteolytické degradace nebo zvýšení akumulace makromolekulárních terapeutik v nádorech [46].

V publikaci z roku 2011 je popsán návrh a následná syntéza peptidů tvořících coiled-coil heterodimer ve vodném prostředí při ekvimolární směsi obou forem peptidů popsaných níže [46]. Jedná se o peptid E (VAALEKE)₄, který je přímo napojen na polymerní nosič a peptid K (VAALKEK)₄, který je možné vložit do struktury rekombinantního proteinu, jak je znázorněno na obrázku 4, str. 21. Je nutné, aby byl coiled-coil heterodimer stabilní za fyziologických podmínek, tedy aby nedošlo k spontánní disociaci heterodimeru. Vlastnosti vzniklého komplexu může rovněž ovlivnit orientace jednotlivých peptidových řetězců. Favorizována je především antiparalelní struktura oproti struktuře paralelní vzhledem ke sterickým požadavkům cílového ligandu a polymeru [45].



Obr. 4: Připojení rekombinantního proteinu na polymerní nosič pomocí coiled-coil interakce. Opačně nabité peptidy K – (VAALKEK)₄ na rekombinantním proteinu a peptid E – (VAALEKE)₄ spolu po vzájemné interakci tvoří heterodimerní coiled-coil superhelikální strukturu a umožňují tak stabilní nekovalentní připojení proteinu na polymerní nosič pouhým smísením jejich dvou roztoků [46].

2 CÍLE PRÁCE

- Příprava proteinu mB7-H6 s coiled-coil kotvou na N- nebo C-konci v expresním systému HEK293
- Zkoumání interakce připraveného proteinu mB7-H6 s coiled-coil kotvou s NK buněčným receptorem NKp30

3 MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytická ultracentrifuga ProteomeLab XL-I	Beckman Coulter, USA
Autokláv Varioklav 400 E	HP Labotechnik GmbH, Německo
Automatické pipety Discovery	HTL, Polsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	Sigma, USA
Elektroforetická souprava Liberty 120	Biokeystone, USA
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Fotoaparát Cyber-shot DSC W570	SONY, Japonsko
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid, USA
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, USA
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor CO ₂ MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Inkubátor IR 1500	LABsystem Praha, ČR
Kahan Fuego SCS	VERKON, ČR
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona HiTrap Talon Crude 5 ml	GE Healthcare, USA
Koncentrátor Amicon Ultra (MWCO 10000)	Millipore, USA
Lahve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-Lab, ČR
Laminární box Labox BIO 126	LABOX, ČR
MicroTrap	Optimize Technologies, USA
Mikrocentrifuga Ministar Silverline	VWR, USA
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Německo
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
SolariX XR	Bruker Daltonics, USA
Souprava SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Spektrofotometr DS-11+	DeNovix, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler T100	Bio-Rad, Německo
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko

Třepačka Multitron Cell
UV prosvěcovací lampa 300 nm
UV prosvěcovací lampa 312 nm
Vaříč
Vortexový mixér
Zdroj deionizované vody Milli Q
Zdroj napětí EC 250-90 EC
Zorbax 300SB-C18 5 µm

Infors HT, Švýcarsko
Ultra-Lum, USA
UVItec, UK
ETA, ČR
VELP Scientifica, Itálie
Millipore, USA
Apparatus Corporation, UK
Agilent Technologies, USA

3.2 Chemikálie

100 bp DNA standard
1 kb DNA standard
Agarosa
Akrylamid
Ampicilin
APS
Combi PPP Master Mix
Coomassie Brilliant Blue R-250
dNTPS 10 mM
EDTA
GoodView II
Isopropanol
Kyselina valproová
IPEI 25 kDa
Pufr NEB1
PCR H₂O
Standard pro SDS-PAGE
SDS
TEMED

New England Biolabs, USA
New England Biolabs, USA
Sigma, USA
Sigma, USA
Biotika, SR
Serva, USA
Top-Bio, ČR
Fluka Chemika, Švýcarsko
Top-Bio, ČR
Jersey Lab Supply, USA
Ecoli, Slovensko
Lach-Ner, ČR
Sigma, USA
Polysciences, USA
New England Biolabs, USA
Top-Bio, ČR
Thermo Scientific, USA
Jersey Lab Supply, USA
Serva, USA

3.3 Enzymy

Infusion enzym
Q5 DNA polymerasa
Age I
Kpn I

Biotool, USA
New England Biolabs, USA
New England Biolabs, USA
New England Biolabs, USA

RNAsa A

Serva, USA

3.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie

E. coli DH5- α

Invitrogen, USA

HEK293S GnTI-

ATCC, USA

HEK293T

Dr. Radu Aricescu, University of Oxford, UK

3.5 Vektory

pTCCsecC

Mgr. Barbora Kalousková, Katedra biochemie PřF UK

pTCCsecN

Mgr. Barbora Kalousková, Katedra biochemie PřF UK

pTW5sec_mB7-H6

Mgr. Samuel Pažický, Katedra biochemie PřF UK

3.6 Oligonukleotidy pro PCR

mB7H6_C_FW

5'-TCTTGAATTACCGGTGATCTGAAAGTA-3'

mB7H6_C_REV

5'-TTCAGCGCTGCTACGGTACCGGTAAAGTTGCT-3'

mB7H6_N_FW

5'-GAAAGAAAAAACCGGTGATCTGAAAGTAG-3'

mB7H6_N_REV

5'-TGGTGGTGTGGTGGGTACCGGTAAAGTTGCT-3'

pTT_FW

5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

pTW5seq_REV

5'-AAGCAGCGTATCCACATAGCG-3'

3.7 Roztoky

Barvicí směs pro SDS-PAGE: 45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% CBB R-250

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE 10 \times konc.: 0,25M Tris, 1,9M glycin, 1% (w/v) SDS, pH 8,3

Eluční pufr pro TALON: 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, 0,25M imidazol, pH 7,0

MES pufr: 20mM MES, 100 mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 5,0

HEPES pufr: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 7,5

Odbarvovací roztok na SDS-PAGE: 35% ethanol, 10% kyselina octová

PBS: 50mM Na₂HPO₄, 1M NaCl, 10mM NaN₃, pH 7,5

PBS-TK: 10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH 7,0

Roztok AA pro SDS-PAGE: 29% akrylamid, 1% N,N' methylenbisakrylamid

Roztok IPEI: 10 mg/ml IPEI v PBS-TK

Roztoky pro izolaci zásobního množství plazmidu:

RES: 50mM Tris-HCl, 100 μ g/ml RNAsa A, pH 8,0

LYS: 0,2M NaOH, 1% SDS

NEU: 3,1M CH₃COOK, pH 5,5

EQ1: 0,1M CH₃COONa, 0,6M NaCl, 0,15% Triton X-100, pH 5,0

Wash: 0,1M CH₃COONa, 825mM NaCl, pH 5,0

ELU: 100mM Tris-HCl, 1,25M NaCl, pH 8,5

TAE pufr pro agarosovou elektroforézu: 40mM Tris, 20mM CH₃COOH, 1mM EDTA

TES pufr: 10mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 8,0

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

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný neredukující: 31,5mM Tris, 10% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) bromfenolová modř, 10mM NaN₃, pH 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný redukující: k 900 µl 5× koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru bylo přidáno 100 µl 2-merkaptoethanolu

3.8 Kultivační média

ExCELL 293: komerční médium (Sigma, USA), před použitím doplněno o L-glutamin o výsledné 4mM koncentraci

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

F17 médium: zakoupeno hotové médium (Gibco Invitrogen, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsledná koncentrace 4 mM) a o Pluronic F-68 (výsledná koncentrace 0,1%)

4 METODY

4.1 Izolace zásobního množství plazmidové DNA

Pro přípravu zásobního množství DNA byla zvolena komerční souprava Nucleobond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Německo). Peleta byla nejprve resuspendována v 18 ml RES pufru s přidanou RNAsou (0,1 mg/ml). Poté byl roztok rovnoměrně rozdělen do dvou 30ml kyvet typu Oak Ridge. Poté bylo přidáno 9 ml Lys pufru, kyvety byly důkladně promíchány a po 5 minutách inkubace při pokojové teplotě bylo přidáno 9 ml neutralizačního pufru. Kyvety byly následně promíchány a centrifugovány 10 minut při $20000 \times g$ a 20°C . Mezitím byly ekvilibrovány kolony dle návodu, tedy nové kolony byly promyty 2×25 ml ekvilibračního pufru, kolony použité byly promyty nejprve dH_2O , poté 15 ml elučního pufru, opět dH_2O a následně rovněž ekvilibrovány 2×25 ml ekvilibračního pufru. Na takto připravené kolony byl přes skládaný filtr přenesen supernatant po centrifugaci. Kolona byla následně promyta 25 ml Wash roztoku. Plazmidová DNA byla eluována 15 ml elučního pufru do čistých Oak Ridge kyvet. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu o pokojové teplotě. Tento roztok byl následně za pomoci 30 ml stříkačky převeden kapku po kapce přes mikrofiltr, aby došlo k zachycení plazmidové DNA. Následně byl mikrofiltr promyt 4 ml 70% ethanolu a poté byl vysušen za pomoci proudu vzduchu nasátého stříkačkou asi desetkrát. Na závěr proběhla eluce DNA do čisté mikrozkušavky 1 ml elučního pufru. Pro vyšší výtěžek byla eluce provedena třikrát, ovšem vždy s předem získaným eluátem, aby celkový objem činil stále 1 ml.

4.2 Linearizace vektoru

Linearizace plazmidu byla provedena pomocí restričních endonukleas Age I a Kpn I. Do reakční směsi o celkovém objemu 20 μl byly nejprve přidány 2 μl $10 \times$ koncentrovaného NEB1 pufru a 2 μl BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Dále byl přidán takový objem plazmidu, aby ho výsledně ve směsi bylo přítomno 2 μg . Dále bylo do 200 μl mikrozkušavky přidáno 2 μl reakčního pufru CutSmart, obě endonukleasy a zbylý objem do 20 μl byl doplněn dH_2O . Reakční směs byla poté inkubována 90 minut při 37°C . Po uplynutí doby inkubace byl linearizovaný plazmid nanesen na agarosový gel pro elektroforézu.

4.3 Amplifikace inzertu pomocí PCR reakce

Pro zmnožení genu byla využita metoda PCR (z angl. polymerase chain reaction, polymerasová řetězová reakce). Do 200 μl mikrozkušavky byly přidány postupně následující roztoky dle tabulky 2, tedy dH_2O , Q5 reakční pufr, templátová DNA, primery, roztok obsahující směs deoxynukleotidtrifosfátů a na závěr polymerasa Q5. Templátové DNA bylo přidáno takové množství, aby její koncentrace ve výsledné směsi o objemu 50 μl byla 100 ng. Primery byly ve směsi v nadbytku, jejich koncentrace ve výsledném roztoku činila 200nM. Následně byl vzorek centrifugován na stolní centrifuze přibližně 30 s, aby se odstranily bubliny.

Zkušavka byla poté umístěna do termocykleru, kde byly nastaveny jednotlivé teploty, doba trvání, počet opakování cyklů a objem zkušavky (tabulka 3). Teplotu nasedání primerů je možné spočítat pomocí online kalkulátoru New England Biolabs [47]. Po ukončení posledního cyklu byl vzorek uchován při teplotě 4°C a následně analyzován agarosovou elektroforézou.

Tabulka 2: Složení PCR reakce.

Templátová DNA	4 μl (100 ng)
Přední primer	5 μl
Reverzní primer	5 μl
Pufr Q5	0,5 μl
Směs dNTPs	1,5 μl
dH_2O	25 μl

Tabulka 3: Průběh PCR reakce. Po 4. kroku došlo k navrácení ke kroku 2. Takto proběhlo 30 opakování tohoto cyklu a po 30. opakování proběhl krok 5 a následně 6, ve kterém vzorky zůstaly do doby vyzvednutí z termocykleru.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Doba trvání [s]
1.	95	180
2.	95	30
3.	54	30
4.	72	60
6.	72	300
7.	4	∞

4.4 Elektroforéza v agarosovém gelu

Na agarosovou elektroforézu byl připraven 1% gel. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,65 g agarosy a převrstveno 65 ml TES pufru. Roztok byl následně krátce povařen v mikrovlnné troubě. Jakmile gel zchladl na teplotu, kdy bylo možné na baňku přiložit ruku, byly přidány 3 μ l barviva Good View. Gel byl poté přelit do předem připravené aparatury s hřebenem. Po ztuhnutí byl odebrán hřeben a gel byl převrstven 200 ml dH₂O a do míst pro elektrody bylo přidáno 60, resp. 180 ml TAE pufru. Byly rovněž připraveny jednotlivé vzorky smícháním 10 μ l vzorku s 2 μ l 6 \times koncentrovaného vzorkového pufru. Poté byly vzorky nanесeny na elektroforézu a byly přidány 100 bp i 1 kb standardy velikosti DNA molekul, každý po 5 μ l. Elektroforéza probíhala 20 minut při stejnosměrném napětí 180 V. Následně byly vzorky prohlédnuty pod UV lampou a byla provedena fotodokumentace.

4.5 Extrakce DNA z agarosového gelu

Aby nedošlo k poškození vzorku DNA, byla snížena doba pozorování gelu pod UV lampou na minimum. K samotné extrakci byla využita komerční souprava Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, USA). Pruh gelu, který počtem párů bází odpovídal žádané DNA (v případě nečistot byly na elektroforéze přítomny ještě slabší proužky) byl vyříznut těsně u okrajů, aby nedošlo k zanesení nečistot, ovšem současně aby bylo získáno co největší množství DNA. Získaný vzorek gelu byl zvážen na analytických vahách a následně byl umístěn do mikrozkuřavky. Poté k němu bylo přidáno 500 μ l DF pufru, roztok byl inkubován 10 minut při 60°C. Každé 2-3 minuty byl vzorek promíchán, dokud se zcela nerozpustil.

Pro navázání DNA byla použita kolonka umístěná do mikrozkuřavky a na membránu byl pipetován rozpuštěný gel a centrifugován 30 s při 16000 \times g. Následně bylo přidáno 400 μ l W1 pufru, aby došlo k promytí kolonky, a opět proběhla centrifugace za stejných podmínek. Kolonka byla promyta ještě 600 μ l Wash pufru a opět centrifugována 30 s při 16000 \times g. Poté byla membrána vysušena centrifugací při 16000 \times g po dobu 1 minuty. Posledním krokem byla eluce DNA z kolonky s použitím 30 μ l elučního pufru (předehřátého na 60 °C), minutovou inkubací při pokojové teplotě a centrifugací při 16000 \times g také 1 minutu.

4.6 Infusion reakce

Tato reakce slouží k vnesení inzertu (genu) do daného vektoru (plazmidu). Do 200 μ l mikrozkuhavky byl přidán takový objem roztoku plazmidu, aby byla jeho celková hmotnost v reakční směsi 100 ng. Poté bylo přidáno množství inzertu vypočítané dle rovnic (1) a (2). Dále bylo přidáno 2 μ l Infusion reakčního pufru a 0,5 μ l Infusion enzymu a reakční směs byla doplněna dH₂O do výsledného objemu 10 μ l. Tato reakční směs byla následně 30 minut inkubována při teplotě 37°C a poté byla transformována do kompetentních buněk *E. coli* DH5- α .

$$\frac{2 \times bp_{insert}}{bp_{vektor}} = x \quad (1)$$

V této rovnici bp_{insert} označuje počet párů bází inzertu, bp_{vektor} počet párů bází vektoru a x označuje poměr.

$$insert = x \times vektor \quad (2)$$

4.7 Transformace plazmidové DNA a její velkoobjemová produkce

Pro transformaci byly využity kompetentní buňky *E. coli* DH5- α , které byly skladovány při -80°C. Přibližně 50 μ l těchto buněk bylo na ledu smícháno s 20-100 ng plazmidové DNA a inkubováno na ledu asi 30 minut. Po inkubaci byla buněčná suspenze rozetřena na předem připravené agarové misky s ampicilinem o výsledné koncentraci tohoto antibiotika 100 μ g/ml. Petriho misky byly inkubovány přes noc při 37°C.

Po inkubaci byly narostlé kolonie resuspendovány 2 ml LB média a následně byla tato suspenze přenesena do 2 l Erlenmayerových baněk s 500 ml LB média s přidáním ampicilinem (100 μ g/ml). Baňky byly třepány na třepačce při 220 ot./min a 37°C přes noc.

Buněčná suspenze byla stočena na centrifuze ve dvou 250ml centrifugačních kyvetách. Centrifugace probíhala při 3900 \times g při 20°C po 30 minut. Pelety byly následně resuspendovány ve 20 ml TES pufru na vortexovém mixéru, spojeny do jedné kyvety a centrifugovány při stejných otáčkách a teplotě 10 minut. Vzniklá peleta byla následně použita pro izolaci zásobního množství plazmidové DNA nebo byla uchována při -20°C.

4.8 Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA

Nejprve bylo nutné izolovat jednotlivé kolonie. Ty byly odebrány pomocí sterilní špičky v laminárním boxu. Každá špička byla nejprve 2-3 \times promyta v mikrozkuhavce s 6 μ l sterilní dH₂O a poté umístěna do 50 ml zkuhavky Falcon, která obsahovala 5 ml LB média s přidáním ampicilinem (100 μ g/ml). Tato suspenze v LB médiu byla poté

inkubována přes noc na třepače při 37°C. Suspenze v mikrozkušavkách byla následně použita pro PCR z kolonií.

Pro nízkoobjemovou přípravu plazmidové DNA byla použita komerční souprava High-Speed Plasmid Mini Kit a postup byl proveden dle přiloženého návodu. Suspenze vzniklá z inkubace jednotlivých kolonií v LB médiu byla nejprve centrifugována 1 min při 16000 × g. Vzniklá peleta byla dále resuspendována ve 200 µl RES pufru (PD1 pufr) s přidanou RNAsou, směs byla poté promíchána na vortexovém mixéru a suspenze byla poté přenesena pomocí automatické pipety do 1,5 ml mikrozkušavky. Pro lýzu buněk bylo přidáno 200 µl PD2 pufru a směs byla promíchána opakovaným otočením zkumavky dnem vzhůru a ponechána stát 2 min při pokojové teplotě. Poté bylo pipetováno 300 µl PD3 pufru pro neutralizaci směsi a promícháno opět pouze otáčením zkumavky. Následně byla suspenze centrifugována 3 min při 16000 × g a supernatant byl přenesen na kolonku, která byla umístěna do 2ml sběrných zkumavek a supernatant byl centrifugován 30 s při 16000 × g. Pro přečistění DNA bylo na membránu přidáno 600 µl Wash pufru a centrifugováno opět 30 s při 15000 × g. Sušení membrány bylo provedeno centrifugací při 16000 × g po dobu 3 minut. Pro eluci DNA byly kolonky umístěny do čistých mikrozkušavek a bylo přidáno 50 µl elučního pufru předehřátého na 70°C a ponecháno stát při pokojové teplotě alespoň 2 minuty. Následně proběhla centrifugace za stejných podmínek jako při sušení. Poté byla změřena koncentrace DNA.

4.9 Stanovení koncentrace DNA

Stanovení koncentrace DNA bylo provedeno spektrofotometricky. Jako slepý vzorek byl obvykle volen eluční pufr, ve kterém byla daná DNA uchovávána. Koncentrace DNA byla vypočítána spektrofotometrem na základě srovnání s empirickým vztahem, podle kterého má dvouvláknová DNA o koncentraci 50 µg/ml absorbanci rovnou 1. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát za sebou pro minimalizaci chyby způsobenou šumem měření. Čistota vzorků byla stanovena z poměru absorbancí při 260 a 280 nm. Čistá DNA má totiž obvykle hodnotu poměru A_{260}/A_{280} přibližně 1,8.

4.10 Sekvenování DNA

Vzorky pro sekvenaci byly připraveny smícháním takového objemu DNA, které odpovídalo množství 200 ng plazmidové DNA, jednoho ze dvou primerů (do každé

zkumavky buď přímý nebo zpětný primer) a směs byla doplněna do výsledného objemu 8 μl dH₂O. Sekvence vzorků DNA proběhla v Laboratoři sekvenace DNA ve výzkumném ústavu BIOCEV.

4.11 PCR z kolonií

Pro ověření pozitivních kolonií bylo nejprve nutné izolovat jednotlivé klony. Proto byly jednotlivé kolonie odebrány stejným způsobem, jak bylo zmíněno v kapitole 4.8.

Pro přípravu vzorků na PCR bylo do mikrozkušavek s 6 μl buněčné suspenze přidáno po 2 μl od každého primeru a 10 μl roztoku Combi PPP Master Mix. Směs byla promíchána a centrifugována na stolní centrifuze přibližně 20 s. Poté byly zkumavky umístěny do termocykleru a byl spuštěn program, jehož průběh je uveden v tabulce 4. Následně byly vzorky analyzovány elektroforeticky v agarosovém gelu.

Tabulka 4: Průběh PCR reakce z bakteriálních kolonií.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Doba trvání [s]
1.	95	180
2.	95	30
3.	54	30
4.	72	60
6.	72	300
7.	4	∞

4.12 Kultivace buněčných linií HEK293S GnTI⁻ a HEK293T

Kultivace buněk probíhala ve čtverhranných lahvích s prodyšným víčkem, které byly umístěny na třepačce Celltron při 135 ot./min v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Subkultivace probíhala jednou za 3-4 dny. Jako kultivační médium byla používána směs média ExCELL293 a Freestyle F17 v poměru 1:1. Byla prováděna kontrola buněčné hustoty pomocí hemocytometru a kontrolována případná kontaminace. K části buněčné suspenze bylo následně přidáno čerstvé kultivační médium, aby bylo dosaženo výsledné hustoty buněk 0,2·10⁶-0,3·10⁶ buněk/ml. Pokud původní suspenze zabírala více než 10 % objemu lahve, byla centrifugována 5 minut při 95 × g a 21 °C. Poté byla v médiu resuspendována vzniklá peleta. Objem suspenze však nikdy nepřesahoval 40 % celkového objemu lahve, aby bylo zajištěno dostatečné provzdušnění.

4.13 Transfekce buněčné linie HEK293S GnTI⁻

Nejprve proběhla centrifugace buněčné suspenze HEK293S GnTI⁻ při $95 \times g$, 20°C po dobu 5 min. Poté byla převedena do ExCELL293 média o výsledné hustotě $23,5 \cdot 10^6$ buněk/ml. Do média byla následně přidána transfekční směs PBS-TK a DNA o takovém objemu, aby byla výsledná hustota $20 \cdot 10^6$ buněk/ml. Bylo přidáno takové množství DNA, aby 1 μg odpovídal $1 \cdot 10^6$ buněk. Dále byl přidán lPEI v poměru DNA:lPEI 1:3. Suspenze byla poté vložena na třepačku v inkubátoru při 135 ot./min, 37°C a 5% CO_2 , kde byla ponechána 4 hodiny. Následně byl přidán takový objem ExCELL293 média, aby byla výsledná hustota buněčné suspenze $1 \cdot 10^6$ buněk/ml (při tranzientní expresi byla buněčná hustota $2 \cdot 10^6$ buněk/ml a byla přidána kyselina valproová do výsledné 2mM koncentrace). Produkce následně probíhala 1 týden.

4.14 Sklizení produkci

Produkce žádaného proteinu v buňkách HEK293S GnTI⁻ byla nejprve rozdělena do centrifugačních kyvet Oak Ridge a následně centrifugována při $20000 \times g$ po dobu 10 minut, následně byla zfiltrována a uložena do lednice v případě purifikace v následujících dnech. V případě, že byla purifikace provedena po delší době, byly vzorky uchovávány v mrazničce při -20°C .

4.15 Afinitní chromatografie

Pro chelatační afinitní chromatografii byly použity kolony Talon nabité kobaltnatými ionty a přístroj ÄKTA basic. Na konstruktu mB7-H6CC je přítomna histidinová kotva, která je schopna se během purifikace navázat na kobaltnaté ionty a dochází tak k přečistění proteinu. Médium, ve kterém se protein nacházel, bylo nejprve zfiltrováno přes $0,22 \mu\text{m}$ filtr a naředěno v poměru 1:1 PBS pufrem o pH 7,0 a následně bylo nanášeno na kolonu rovněž ekvilibrované v PBS při průtoku 5 ml/min. Po nanášení veškerého objemu vzorku byla kolona promyta PBS pufrem a následně byl snížen průtok na 2 ml/min a nastala eluce PBS pufrem s imidazolem o 250mM koncentraci. Frakce byly sbírány do 50 ml zkumavek typu Falcon. Kolona byla následně promyta MES pufrem, PBS, dH_2O a 20% ethanol, ve kterém byla uchovávána.

4.16 Zkoncentrování proteinů po afinitní chromatografii

Pro nanášení proteinu na gelovou permeační chromatografii bylo nutné vzorek zkoncentrovat na objem maximálně 300 μl . Tento proces byl proveden za použití

koncentrátoru Amicon Ultra (MWCO 10000, Millipore, USA) centrifugací při $3900 \times g$ a 20°C opakovaně vždy po dobu 5-10 minut. Mezi každým přidáním vzorku byl koncentrovaný protein promíchán pomocí pipety. Takto se pokračovalo až do požadovaného objemu maximálně 200 μl , který byl následně použit ke gelové permeační chromatografii.

4.17 Gelová permeační chromatografie

Tato chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300 GL na přístroji ÄKTA basic. Kolona uchovávaná ve 20% ethanolu byla nejprve ekvilibrována HEPES pufrem. Jakmile se ustálily hladiny konduktivity a absorbance při 280 nm došlo k promytí nástřikové smyčky o objemu 1 ml HEPES pufrem. Následně byl do smyčky nanesen vzorek pomocí stříkačky s jehlou s tupým koncem. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min, tlakový limit na 1,5 MPa. Jednotlivé frakce, které byly sledovány na počítači jakožto křivka absorbance při 280 nm, byly jímány do mikrozkuumavek a kolona byla po průběhu chromatografie opět převedena do 20% ethanolu.

4.18 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena na přístroji DeNovix. Jako slepý vzorek byl použit pufr, kterým byl protein eluován, tedy HEPES. Jednotlivé frakce byly proměřeny vždy $3\times$ za sebou, aby se zredukovala chyba způsobená přístrojem a výsledná koncentrace byla zvolena jako průměr těchto hodnot. Samotné určení koncentrace bylo provedeno přístrojem na základě zadaného teoretického extinkčního koeficientu a molekulové hmotnosti proteinu.

4.19 SDS-PAGE

Čistota získaných proteinů byla zkoumána pomocí elektroforézy v 12,5% polyakrylamidovém gelu. Nejprve bylo tedy nutné vyrobit gely. Oba gely byly připraveny smícháním roztoků podle tabulky 5, str. 35, APS bylo přidáno jako poslední a poté byl gel rovnou pipetován do předem připravené elektroforetické aparatury a převrstven dH_2O , aby došlo k vytvoření rovného okraje gelu. Gel zaostřovací byl připraven rovněž podle tabulky 5 a byl pipetován na gel rozdělovací po jeho ztuhnutí. Následně byl do něj umístěn hřeben.

Z každé frakce bylo odebráno $2 \times 10 \mu\text{l}$ vzorku do samostatných mikrozkuumavek a k jednomu z nich bylo přidáno 2,5 μl $5\times$ koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru a ke druhému stejný objem neredukujícího vzorkového pufru. Tyto vzorky byly

následně na 10 minut umístěny do vroucí vodní lázně a poté centrifugovány při $15000 \times g$, 20°C po 3 minuty. Vzorky byly nanесeny na gel spolu s $5 \mu\text{l}$ standardu. Napětí bylo nastaveno na 200 V a elektroforéza probíhala přibližně 50 minut, respektive dokud se čelo nedostalo asi 0,5 cm od spodního okraje gelu.

Tabulka 5: Složení gelů pro SDS-PAGE. Uvedené objemy slouží k přípravě 1 gelu.

Zaostřovací gel		Rozdělovací 12,5% gel	
dH₂O	0,7 ml	dH₂O	1,3 ml
Akrylamid 30%	0,25 ml	Akrylamid 30%	1,7 ml
1,5M Tris pufr o pH 8,8	125 μl	1M Tris pufr o pH 6,8	1 ml
SDS	10 μl	SDS	40 μl
TEMED	1,5 μl	TEMED	2 μl
APS	10 μl	APS	40 μl

4.20 Sedimentační analýza

Sedimentační analýza byla provedena na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) v rotoru An50-Ti metodou sedimentační rychlosti [48]. Vlastní měření i vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Jako vzorek byly použity proteiny mB7-H6CC a NKp30 po gelové permeační chromatografii, jako reference byl použit pufr pro gelovou permeační chromatografii. Do centrifugačních kyvet bylo pipetováno 400 μl roztoků proteinů o 20 μM koncentraci zvlášť i ve směsi (celková koncentrace směšného vzorku tedy byla 40 μM) a 400 μl reference. Data byla sbírána při 48000 ot./min a 20°C , bylo snímáno 158 snímků po 4 min s pomocí absorbanční detekce při vlnové délce 280 nm a s pomocí interferenční detekce. Hustota a viskozita referenčního pufru a parciální specifický objem proteinu byly predikovány pomocí programu Sednterp [49] a sedimentační data byla vyhodnocena pomocí programu Sedfit [50] metodou kontinuální distribuce sedimentačního koeficientu $c(s)$.

4.21 Hmotnostní spektrometrie

Množství 300 pmol deglykosylovaného proteinu bylo redukováno 10 minut při 60°C v 50 mM TCEP. Následně bylo veškeré množství okyseleno 1M glycinovým pufrem na výslednou koncentraci 3 μM a nanесeno na kolonu s imobilizovanou proteasou pepsin, kde došlo k nespecifickému štěpení. Vznikající peptidy byly zachyceny a odsoleny na koloně s

reverzní fázi (peptidový MicroTrap, Optimize Technologies). Peptidy byly poté separovány během 16 minut pomocí analytické kolony s reverzní fázi (Zorbax 300SB-C18 5 μ m, 0.5 \times 35 mm, Agilent Technologies) gradientem acetonitrilu od 10 do 25%. Výstup analytické kolony byl přímo spojen s elektrosprejovým zdrojem 15T FT-ICR hmotnostního spektrometru SolariX XR (Bruker Daltonics) operujícím v pozitivním data-dependentním MS-MS modu. Kolizní data byla prohledána pomocí algoritmu MASCOT proti mB7-H6CC_C sekvenční databázi. Jako variabilní modifikace byly uvažovány oxidace methioninu, HexNAc N-glykosylace asparaginu a dehydrogenace cysteinu.

5 VÝSLEDKY

5.1 Sekvence expresních konstruktů

Prvním cílem práce bylo připravit v rozpustné formě vazebnou doménu nádorového ligandu B7-H6 s tzv. coiled-coil kotvou. Tato peptidová kotva umožňuje díky heterodimerní nekovalentní interakci s komplementární peptidovou sekvencí nesoucí opačný náboj připojení takto označeného proteinu na syntetický polymerní nosič, může tedy sloužit jako spojovací článek mezi proteiny a např. syntetickou polymerní nanočásticí [46]. Samotný protein B7-H6 byl již v laboratoři úspěšně připraven dříve a pro jeho stabilní expresi se osvědčilo zavést bodovou mutaci cysteinu na pozici 212 za serin [51]. Pro rekombinantní expresi proteinů s coiled-coil kotvou bylo nejprve nutno navrhnout a připravit vhodné expresní vektory, které by umožňovaly připojení coiled-coil kotvy na N- i C-konci proteinu. Tyto vektory byly již dříve připraveny Mgr. Barborou Kalouskovou, jejich základem je plazmid pTW5sec a byly označeny jako pTCCsecN a pTCCsecC.

Pro produkci proteinu mB7-H6 s coiled-coil kotvou byly navrženy expresní konstrukty pTCCsecN_mB7-H6 a pTCCsecC_mB7-H6. Aminokyselinová sekvence celého proteinu B7-H6 je znázorněna na obrázku 5. Tento protein se tedy skládá z extracelulární, transmembránové a intracelulární části. Expresní konstrukty mB7-H6 zahrnují pouze extracelulární část tohoto proteinu, jelikož tato část postačuje pro následné zkoumání interakce NK buněčného receptoru s tímto ligandem. Jejich sekvence jsou znázorněny na obrázku 6, str. 38 přičemž cystein v pozici 212 je mutovaný na serin (mB7-H6).

```
MTWRAAASTCAALLILLWALTTEGDLKVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQ
PLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGDHQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASLR
LPGIQLEEAGEYRCEVVVTPLKAQGTVQLEVVASPARLLLDQVGMKENEKDY
MCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPPIEISEDVITGPTIKNMDGTFNVTSCCLKNS
SQEDPGTVYQCVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDNFSIHWWPISFI
GVGLVLLIVLIPWKKICNKSSSAYTPLKCILKHWNSFDTQTLKKEHLIFFCTRAWP
SYQLQDGEAWPPEGSVNINTIQQLDVFQRQEGKWSEVPYVQAFFALRDNPDLC
QCCRIDPALLTVTSGKSIDDNSTKSEKQTPREHSDAVPDAPILPVSPIWEPPPATT
STTPVLSSQPPTLLLPLQ
```

Obr. 5: Primární sekvence proteinu B7-H6. V této sekvenci jsou zvýrazněny **signální peptid**, **expresní konstrukt**, **extracelulární část**, **transmembránová část** a intracelulární část.

Konstrukt mB7-H6 s coiled-coil kotvou na N-konci:

MGELLLLLLLGLRLQLSLGIVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKEKTGDLKV
EMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFG
DHQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASLRLPGIQLEEAGEYRCEVVVTPKAQGTVQ
LEVVASPASRLLLDQVGMKENEKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHPIE
SEDVITGPTIKNMDGTFNVTSSLKLNSSQEDPGTVYQCVVRHASLHTPLRSNFT
LGTHHHHHHHH

Konstrukt mB7-H6 s coiled-coil kotvou na C-konci:

MGELLLLLLLGLRLQLSLGITGDLKVEEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQLNI
TSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGDHQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASLRLPGI
QLEEAGEYRCEVVVTPKAQGTVQLEVVASPASRLLLDQVGMKENEKYMCE
SSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHPIEISEDVITGPTIKNMDGTFNVTSSLKLNSSQE
DPGTVYQCVVRHASLHTPLRSNFTLGTVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALK
EKHHHHHHHH

Obr. 6: Sekvence konstruktů mB7-H6 s coiled-coil kotvou na N- a C-konci. *Sekreční signál*, který je odštěpen během produkce, **expresní konstrukt mB7-H6 s coiled-coil kotvou a histidinovou kotvou**, **mutace C212S**, cysteiny tvořící disulfidické můstky, predikovaná místa připojení N-glykosylace.

Sekvence expresních kazet plazmidů pTCCsecN a pTCCsecC, do nichž byla vkládána sekvence kódující konstrukt mB7-H6, jsou znázorněny na obrázku 7. Tato sekvence DNA byla následně i s vloženým inzertem překládána do aminokyselinové sekvence výsledného proteinu, během jehož sekrece do média došlo k odštěpení sekrečního signálu.

pTCCsecN:

ATGGGAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCCTTCAGCTGAGT
CTTGGAATTGTAGCAGCGCTGAAAGAGAAGGTCGCGGCCTTAAAGGAAAAAG
TGGCCGCTTAAAGGAAAAGGTTGCTGCATTGAAAGAAAAAACCGGTATACT
AGATCATATGATAGATTAGGTACCACCATCACCACCATCACCACCACTGA

pTCCsecC:

ATGGGAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCCTTCAGCTGAGT
CTTGGAATTACCGGTATACTAGATCATATGATAGATTAGGTACCGTAGCAGC
GCTGAAAGAGAAGGTCGCGGCCTTAAAGGAAAAGTGGCCGCTTAAAGGAA
AAGGTTGCTGCATTGAAAGAAAAACACCATCACCACCATCACCACCACTGA

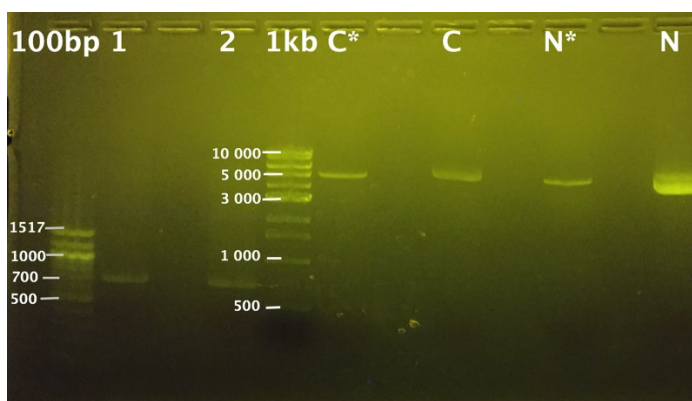
Obr. 7: **Expresní kazeta plazmidů pTCCsecN a pTCCsecC**. Barevně jsou označena tato místa: *sekreční signál*, **restrikční místo pro Age I**, **místo pro vložení inzertu**, **restrikční místo pro Kpn I**, **coiled-coil kotva**, **histidinová kotva**, **terminační kodon**.

5.2 Příprava expresních vektorů

Vektory pTCCsecN i pTCCsecC byly nejprve linearizovány pomocí restrikčních endonukleas Age I a Kpn I. Úspěšnost linearizace byla ověřena elektroforeticky

v agarosovém gelu znázorněném na obrázku 8. Očekávaná velikost linearizovaného plazmidu byla přibližně 5 kb. Linearizované plazmidy byly dále použity pro Infusion inzerci požadovaného genu mB7-H6.

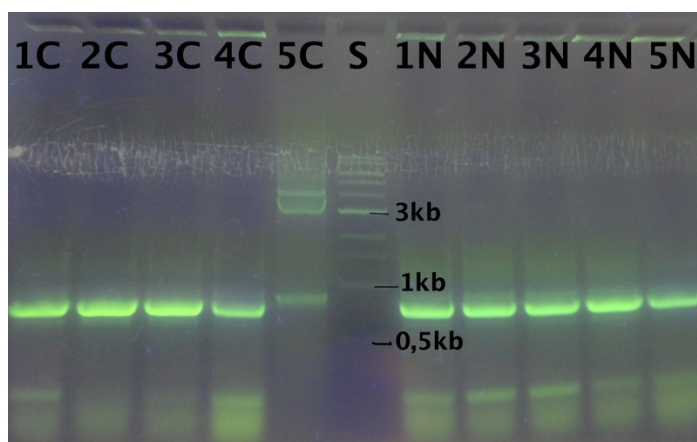
Pro amplifikaci inzertu byl použit již dříve připravený plazmid pTW5sec_mB7-H6 obsahující gen pro mB7-H6.[51] Amplifikace inzertu proběhla PCR reakcí (viz kapitola 4.3) za použití Q5 polymerasy, primerů mB7-H6_C_FW, mB7-H6_C_REV pro inzert následně vkládaný do plazmidu pTCCsecC a mB7-H6_N_FW, mB7-H6_N_REV pro inzert následně vkládaný do plazmidu pTCCsecN. PCR produkty byly rovněž vyhodnoceny pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 8) a následně z gelu extrahovány a přečištěny. Takto připravené inzerty byly dále vloženy do linearizovaných vektorů reakcí Infusion.



Obr. 8: Agarosová elektroforéza PCR produktů a štěpených vektorů. Zleva je možné pozorovat 100 bp standard, v dráze 1 a 2 PCR produkty mB7-H6_C a mB7-H6_N, 1 kb standard, v dráhách C a N plazmidy pTCCsecC a pTCCsecN, hvězdičkou jsou označeny linearizované formy plazmidů. Očekávaná velikost linearizovaných plazmidů byla 5 kb, PCR produktů mB7-H6 723 bp.

Reakční směsi byly transformovány buňky *E. coli* DH5- α a vzniklá suspenze byla poté nanášena na misku s LB agarem obsahujícím antibiotikum ampicilin. Po inkubaci přes noc bylo odebráno z každé misky 5 kolonií. K selekci klonů, které obsahují vektor s vloženým inzertem, byla využita metoda PCR z kolonií (viz kapitola 4.11). K této reakci byly použity primery použité pro předchozí amplifikaci navržených konstruktů. Vzorky byly poté analyzovány elektroforeticky (Obr. 9, str. 40). Z obrázku je patrné, že v případě plazmidu pTCCsecN_mB7-H6 byly všechny odebrané kolonie pozitivní, zatímco pro plazmid pTCCsecC_mB7-H6 byly 4 kolonie pozitivní a jedna negativní. Z pozitivních kolonií byla následně provedena nízkoobjemová izolace DNA (viz kapitola 4.8) a sekvence byla

ověřena sekvenací DNA. Správnost sekvencí vložených inzertů byla potvrzena porovnáním se známou nukleotidovou sekvencí ligandu mB7-H6.



Obr. 9: Agarosová elektroforéza PCR z kolonií. Na obrázku je písmenem S označen 1 kb standard. Písmenem C jsou označeny jednotlivé kolonie odebrané po transformaci buněk *E. coli* DH5- α plazmidem pTCCsecC_mB7-H6, písmenem N kolonie odebrané po transformaci plazmidem pTCCsecN_mB7-H6.

Následně byla provedena velkoobjemová příprava expresních vektorů a změřena koncentrace plazmidové DNA (viz kapitoly 4.1 a 4.9). Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Koncentrace plazmidové DNA získané z velkoobjemové izolace.

Vzorek	c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	A_{260}/A_{280}
pTCCsecC_mB7-H6	2,5	1,8
pTCCsecN_mB7-H6	2,7	1,8

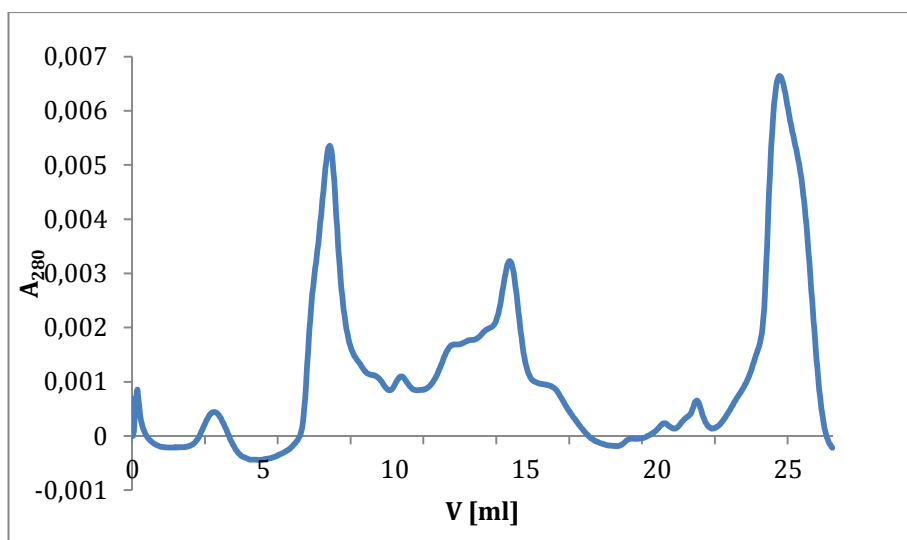
5.3 Produkce mB7-H6 s coiled-coil kotvou v linii HEK293S GnTI⁻

Pro produkci obou konstruktů mB7-H6 byla zvolena tranzientní transfekce buněčné linie HEK293S GnTI⁻. Tato buněčná linie se vyznačuje tím, že má potlačenou aktivitu N-acetylglukosaminyltransferasy I (GnTI), což znemožňuje tvorbu komplexních N-vázaných oligosacharidových řetězců. Všechny proteiny produkované touto buněčnou linií mají jednotnou homogenní manosovou glykosylaci typu GlcNAc₂Man₅ [52].

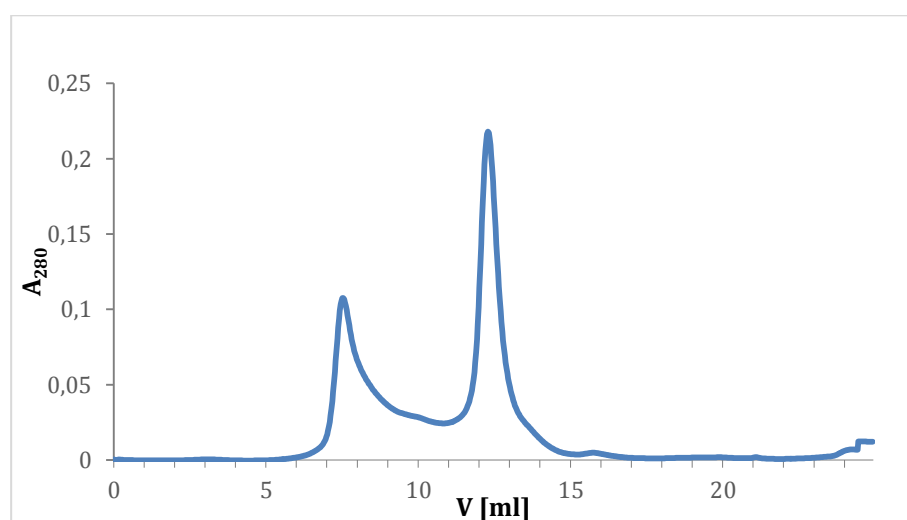
Tato linie byla transfekována expresními vektory mB7-H6 s coiled-coil kotvou umístěnou na N- i na C-konci proteinu (pTCCsecN_mB7-H6 a pTCCsecC_mB7-H6), aby

bylo možné srovnat úspěšnost produkce obou proteinů a rozhodnout, který z nich bude dále používán pro sledování jeho interakce s receptorem NKp30 a s polymerním nosičem.

Po týdenní inkubaci v objemu 75 ml byly produkce sklizeny a purifikovány pomocí afinitní chromatografie na kolonách HiTrap Talon Crude na základě koordinační vazby histidinové kotvy na ionty Co^{2+} , které jsou na tomto nosiči chelatovány. Získaný eluát byl zkoncentrován na objem přibližně 200 μl a následně purifikován pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL. Výsledný záznam průběhu gelové permeační chromatografie z obou produkcí je znázorněn na obrázcích 10 a 11.



Obrázek 10: Průběh gelové permeační chromatografie mB7-H6CC_N produkovaném v linii HEK293S GnTI. Kolona Superdex 200 10/300 GL.



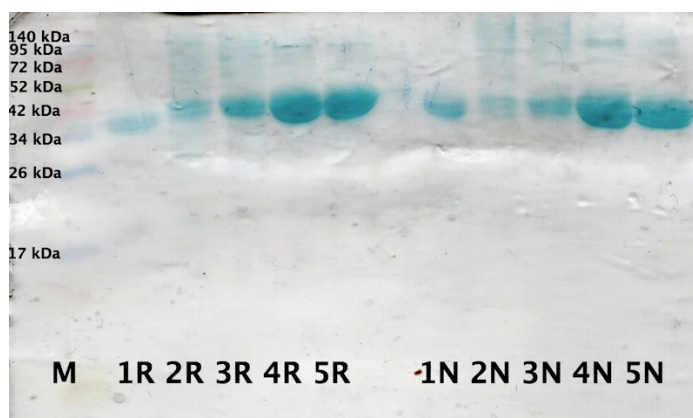
Obr. 11: Průběh gelové permeační chromatografie mB7-H6CC_C produkovaném v linii HEK293S GnTI. Kolona Superdex 200 10/300 GL, bylo získáno 5 frakcí po 0,5 ml.

Ze srovnání průběhu gelové permeační chromatografie mB7-H6CC_N a mB7-H6CC_C je patrné, že k úspěšné produkci proteinu došlo pouze v druhém případě. Protein s coiled-coil kotvou umístěnou na N-konci byl tedy pro další použití zavrhnut a následné pokusy byly prováděny pouze s mB7-H6CC_C.

Z gelové permeační chromatografie tohoto proteinu bylo odebráno 5 frakcí po 0,5 ml, u kterých byla změřena koncentrace proteinu a rovněž provedena SDS elektroforéza v 12,5% polyakrylamidovém gelu v redukujícím i neredukujícím prostředí (tabulka 7, obrázek 12). Frakce 1 a 2 byly získány mezi 7. a 8. ml elučního objemu a frakce 3-5 od elučního objemu 12 ml do 13,5 ml.

Tabulka 7. Koncentrace mB7-H6CC_C produkovaného v linii HEK293S GnTI v jednotlivých frakcích získaných z gelové permeační chromatografie.

Frakce	Koncentrace [mg/ml]	Výtěžek [mg]
1	0,347	0,173
2	0,377	0,188
3	0,402	0,201
4	0,782	0,391
5	0,655	0,327



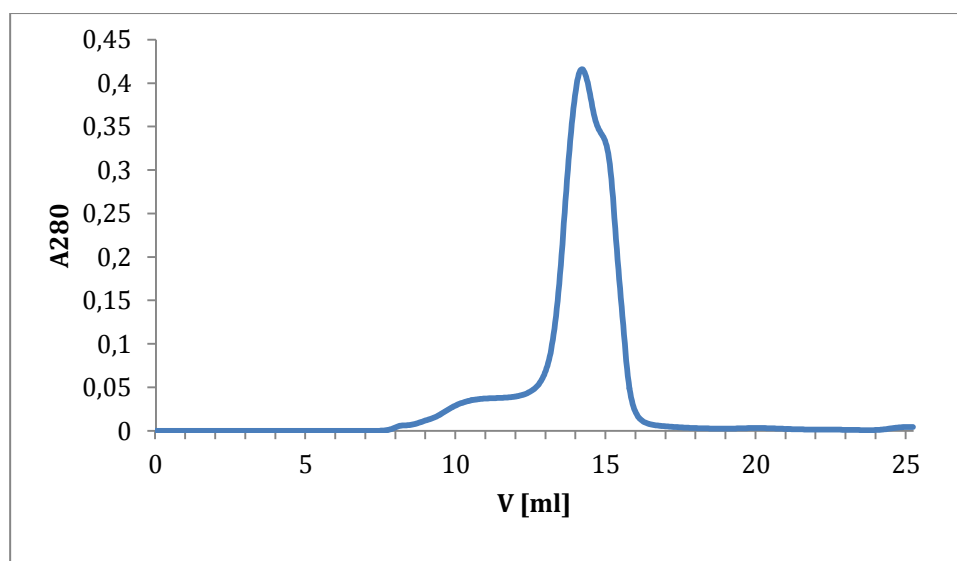
Obr. 12: SDS elektroforéza proteinu mB7-H6CC_C produkovaném v linii HEK293S GnTI. 12,5% polyakrylamidový gel, M – standard, R – vzorky frakcí 1-5 z gelové permeační chromatografie v redukujícím vzorkovém pufru, N – v neredukujícím vzorkovém pufru.

5.4 Produkce mB7-H6CC_C v linii HEK293T

Tato buněčná linie exprimuje T-antigen viru SV40. Ten umožňuje episomální replikaci plazmidů, které obsahují replikační počátek SV40 [53]. Od linie HEK293S GnTI se však liší především tím, že proteiny v ní produkované mají přirozenou N-glykosylaci

komplexního typu, což je výhodné pro v budoucnu zamýšlené pokusy zahrnující živé NK buňky. Naopak homogenní N-glykosylace poskytovaná HEK293S GnTf linií je vhodná nejen pro výzkum struktury, ale i pro charakterizaci připravených proteinů, protože takto připravené proteiny lze deglykosylovat a tím snížit komplexitu charakterizovaných vzorků, což je důležité např. pro hmotnostní spektrometrii.

Produkce proteinu mB7-H6CC_C, který se podařilo připravit v buněčné linii HEK293S GnTf, byla tedy provedena rovněž v expresním systému HEK293T. Bylo transfekováno 300 ml buněčné kultury a po týdenní inkubaci byly buňky sklizeny za stejných podmínek jako při produkci proteinu v buněčné linii HEK293S GnTf. Následně byla provedena afinitní chromatografie, eluát byl opět zkoncentrován na 200 μ l a nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL pro gelovou permeační chromatografii. Bylo získáno 17 frakcí po 0,5 ml. První frakce byla odebrána v objemu 8,5 ml. Záznam chromatografie je uveden na obrázku 13.

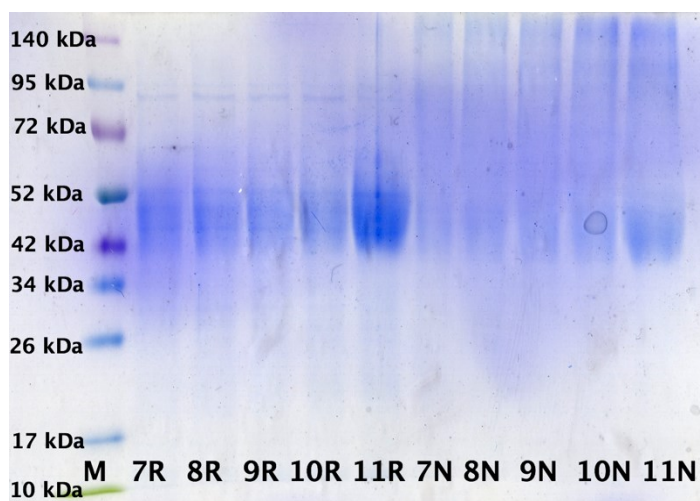


Obr. 13: Průběh gelové permeační chromatografie mB7-H6CC_C produkovaném v linii HEK293T. Kolona Superdex 200 10/300 GL, bylo získáno 17 frakcí po 0,5 ml od elučního objemu 8,5 ml.

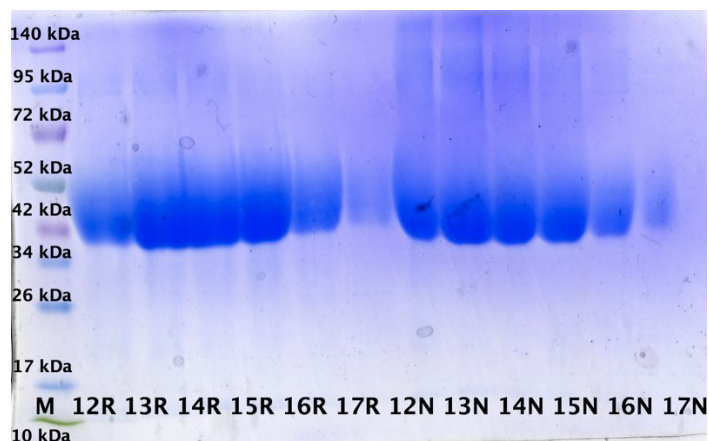
U všech vzorků byla následně změřena koncentrace (tabulka 8, str. 44) a s frakcemi 7-17 byla provedena SDS elektroforéza ve 12,5% gelu v redukujícím i neredukujícím prostředí (Obr. 14 a 15, str. 44-45).

Tabulka 8: Koncentrace proteinu mB7-H6CC_C produkovaného v linii HEK293T ve frakcích získaných z gelové permeační chromatografie.

frakce	Koncentrace [mg/ml]	Výtěžek [mg]
1	0,00	0,00
2	0,00	0,00
3	0,04	0,02
4	0,05	0,03
5	0,13	0,75
6	0,14	0,70
7	0,17	0,85
8	0,20	0,10
9	0,20	0,10
10	0,26	0,13
11	0,52	0,26
12	1,65	0,825
13	2,24	1,12
14	2,20	1,10
15	1,70	0,85
16	0,7	0,35
17	0,2	0,1



Obr. 14: SDS elektroforéza proteinu mB7-H6CC_C produkovaném v linii HEK293T. 12,5% polyakrylamidový gel, M – standard, R – vzorky frakcí 7-10 z gelové permeační chromatografie v redukujícím vzorkovém pufru, N – v nerdukujícím vzorkovém pufru.



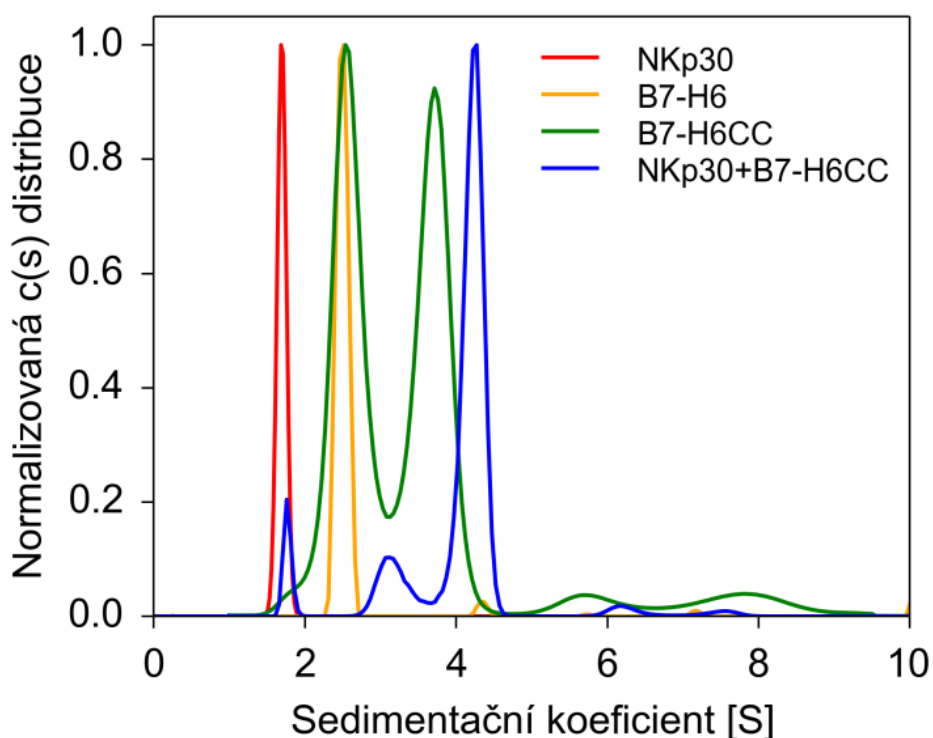
Obr. 15: SDS elektroforéza proteinu mB7-H6CC_C produkovaném v linii HEK293T. 12,5% polyakrylamidový gel, M – standard, R – vzorky frakcí 12-17 z gelové permeační chromatografie v redukujícím vzorkovém pufru, N – v neredukujícím vzorkovém pufru.

5.5 Sedimentační analýza vazby mB7-H6CC_C na NKp30

Sedimentační analýza byla provedena metodou sedimentační rychlosti [48]. Tato analýza nám poskytuje údaje o velikosti částic a o jejich zastoupení v roztoku. Na makromolekuly v roztoku působí velká odstředivá síla, díky které se začnou pohybovat směrem ke dnu kyvety. V roztoku se tak vytvoří rozhraní mezi roztokem s makromolekulami a čistým pufrem. Pohyb rozhraní je sledován sérií snímků a lze tak určit sedimentační koeficient (a dále pak velikost) dané makromolekuly.

Sedimentační analýzu provedl na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, USA) RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Proteiny byly analyzovány při 20 μM koncentraci, v případě směšného vzorku byla tedy celková koncentrace proteinů 40 μM . Byly analyzovány proteiny NKp30, mB7-H6CC_C (produkovaný buněčnou linií HEK293S GnT1) a pro srovnání i mB7-H6 (bez coiled-coil kotvy), a ekvimolární směs NKp30 s mB7-H6CC_C. Normalizovanou distribuci sedimentačních koeficientů zobrazuje obrázek 16, str. 46. Protein NKp30 má pozorovanou hodnotu sedimentačního koeficientu přepočtenou na standardní podmínky (20 $^{\circ}\text{C}$, čistá voda) $s_{20,w} = 1,77 \text{ S}$, pro protein mB7-H6 pozorujeme $s_{20,w} = 2,51 \text{ S}$. Na základě srovnání naměřeného sedimentačního koeficientu a teoretické hodnoty odpovídající sedimentaci částice tvaru koule o stejné molekulové hmotnosti lze odvodit, že oba proteiny se v roztoku nachází ve formě monomerů mírně protáhlého tvaru, což odpovídá očekávání i v laboratoři již dříve naměřeným výsledkům.

Pro protein mB7-H6CC_C pak pozorujeme dvě částice, první sedimentující při hodnotě $s_{20,w} = 2,67$ S odpovídající opět monomernímu proteinu, a druhou při hodnotě $s_{20,w} = 3,90$ S, která s největší pravděpodobností odpovídá homodimeru mB7-H6CC_C. Tvorba takového dimeru způsobená vzájemnou interakcí řetězců coiled-coil kotvy byla pro stejnou sekvenci této kotvy pozorována již dříve [46]. Síla této interakce je ovšem slabší než při tvorbě coiled-coil páru s komplementární sekvencí nesoucí opačný náboj [46]. Pro směs obou proteinů pozorujeme tvorbu částice odpovídající komplexu NKp30 s mB7-H6CC_C. V distribuci sedimentujících částic (na obrázku 16 modrá křivka) lze rozeznat tři vrcholy – první při $s_{20,w} = 1,86$ S odpovídá zbytkovému volnému NKp30, druhý při 3,35 S odpovídá monomeru mB7-H6CC_C v komplexu s NKp30, a třetí při 4,44 S pak dimeru mB7-H6CC_C s navázaným NKp30. Dochází tedy ke vzniku kýženého komplexu mezi receptorem a jeho modifikovaným ligandem.



Obr. 16: Sedimentační analýza vazby proteinu mB7-H6CC_C na NKp30. Graf zobrazuje normalizovanou distribuci sedimentačního koeficientu částic přítomných v analyzovaných vzorcích pozorovanou pomocí absorbanční detekce při 280 nm.

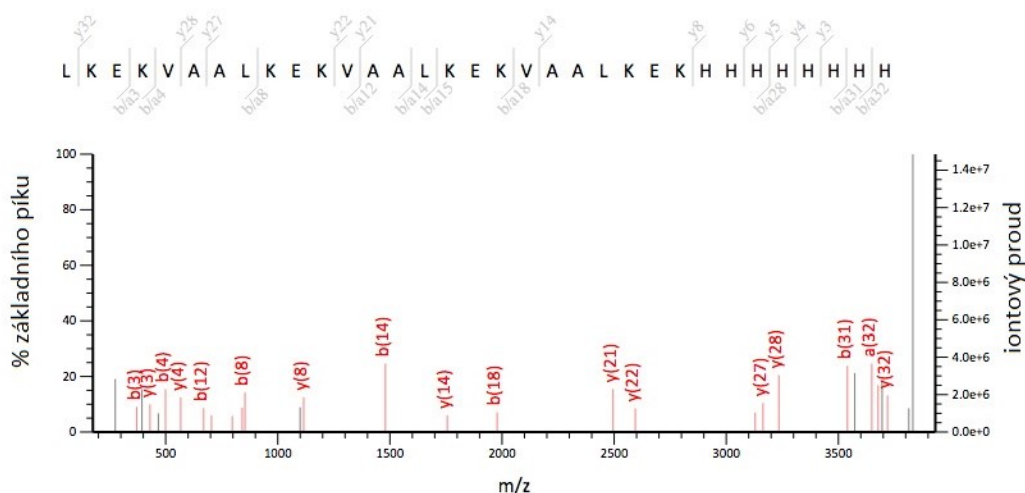
5.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní analýzu provedl Mgr. Michal Rosůlek (Centrum molekulární struktury, BIOCEV, MBÚ AV ČR) za účelem ověření přítomnosti coiled-coil kotvy v připraveném proteinu mB7-H6CC_C. Bylo provedeno srovnání sekvence konstruktu mB7-H6CC_C s identifikovanými peptidy. Toto sekvenční pokrytí je znázorněno na obr. 17.

1 **ITGDLK**VEMM AGGTQITPLN DNVTIFCNIF YSQPLNITSM GITWFWKSLT
 51 FDKEVKV**FEF FGDHQEAFRP GAIVSPWRLK SGDASLRLPG IQLEEAGEYR**
 101 CEVVVTPLKA QGTVQ**LEVVA SPASRLLLDQ VGMKEN**EDKY MCESSGF**YPE**
 151 **AINITWEKQT QKFPHP**IEIS **EDVITGPTIK NMDGTFN**VS **SLKLNSSQED**
 201 PGTVYQCVVR HASLHTPLRS NFTLGTVAAL **KEKVAALKEK VAALKEKVAA**
 251 **LKEKHHHHHH HH**

Obr. 17: Sekvenční pokrytí mB7-H6CC_C při jeho analýze hmotnostní spektrometrií. Je znázorněna celá sekvence konstruktu, červeně jsou zvýrazněny identifikované peptidy. Sekvenční pokrytí je 54%. Celá oblast C-konce proteinu s coiled-coil kotvou byla dobře pokryta.

Dále byla přítomnost samotné coiled-coil kotvy vyhodnocena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, kdy bylo získáno fragmentační hmotnostní spektrum C-koncového peptidu, které je znázorněno na obrázku 18. Ze získaného fragmentačního spektra je zřejmá přítomnost peptidu z coiled-coil kotvy.



Obr. 18: Fragmentsy peptidu z coiled-coil kotvy získané hmotnostní spektrometrií. Nahoře je vyznačena sekvence coiled-coil kotvy. Na ose x je m/z , kde m je hmotnost iontu a z je počet elementárních nábojů. Na osách y je zaznamenán iontový proud a procenta základního signálu. Signály odpovídají identifikovaným fragmentům a číslo v závorce udává pořadí fragmentů.

6 DISKUZE

Účelem této práce byla příprava proteinu mB7-H6 s coiled-coil kotvou v buněčné linii HEK293 a následné testování vazby tohoto ligandu s NK buněčným receptorem NKp30. Bylo rovněž nutno rozhodnout, zdali bude pro další použití vybrán mB7-H6 s coiled-coil kotvou na N- či C-konci proteinu na základě porovnání úspěšnosti jejich produkce.

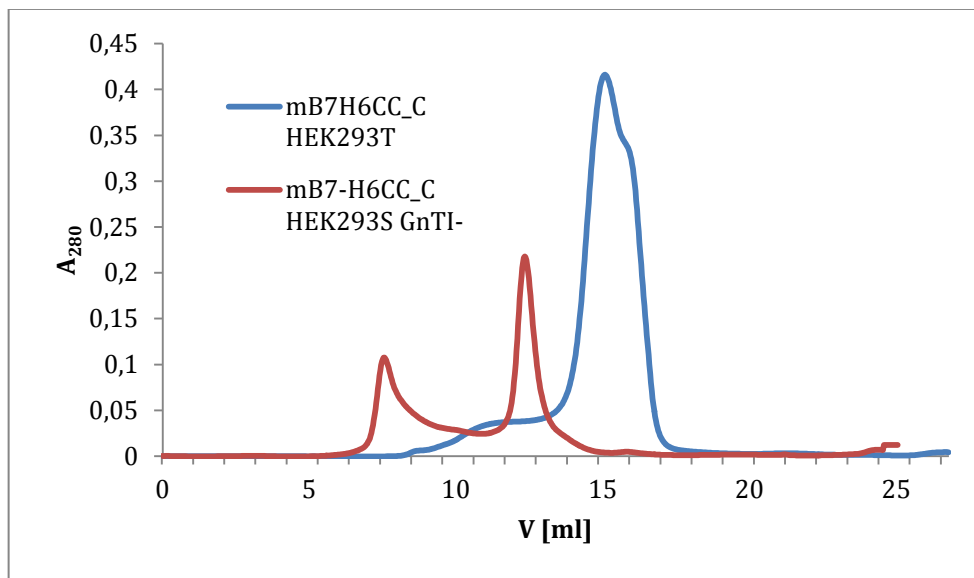
Buněčná linie HEK293S GnTI⁻ byla transfekována plazmidy obsahujícími gen pro mB7-H6 s coiled-coil kotvou na N- i C-konci. Po purifikaci získaných proteinů bylo evidentní, že k úspěšné produkci došlo pouze v případě mB7-H6CC_C, a tak byl tento expresní konstrukt použit pro další práci.

Na průběhu gelové permeační chromatografie tohoto proteinu je možné pozorovat dva vrcholy. První menší vrchol odpovídá svou pozicí mrtvému objemu kolony a jedná se tedy nejspíše o sražený protein. Hlavní vrchol svou pozicí odpovídá homodimerní formě tohoto proteinu, která je pravděpodobně tvořena interakcí mezi coiled-coil motivy dvou proteinů.

Produkce proteinu mB7-H6CC_C buněčnou linií HEK293T byla rovněž úspěšná. Na obrázku 19 str. 49 je možné pozorovat srovnání záznamů z gelové permeační chromatografie z produkcí proteinů v obou buněčných liniích. Transfekcí buněčné linie HEK293T byl získán vyšší výtěžek požadovaného proteinu, ovšem je třeba mít na paměti, že produkce probíhala v 300 ml oproti 75 ml, jako tomu bylo v případě produkce v HEK293S GnTI⁻ linii. Na průběhu chromatografie je ovšem zřejmé, že oproti produkci v HEK293S GnTI⁻ je u proteinu z produkce v HEK293T nižší vrchol homodimerní formy, což může souviset s rozdílem v glykosylaci obou proteinů, která je u mB7-H6 poměrně značného rozsahu a může tedy ovlivnit i chování coiled-coil kotvy. Dalo by se tedy usuzovat, že v tomto expresním systému je produkce žádaného proteinu výhodnější.

Z vyhodnocení sedimentační analýzy je možné usuzovat, že protein mB7-H6CC_C produkovaný buněčnou linií HEK293S GnTI⁻ tvoří v roztoku homodimer prostřednictvím vzájemné vazby coiled-coil kotvy dvou proteinů. Tento jev byl pozorován již dříve při průběhu gelové permeační chromatografie. Ze srovnání produkce proteinu v obou buněčných liniích (obr. 19, str. 49) je možné usuzovat, že v případě analýzy proteinu získaného z linie HEK293T by bylo pozorováno menší množství homodimeru. Byla rovněž prokázána tvorba komplexu NKp30 a mB7-H6CC_C v monomerní i dimerní formě ligandu.

Předmětem dalšího bádání v tomto projektu by mělo být zkoumání interakce připraveného ligandu s coiled-coil kotvou (produkovaného v buněčné linii HEK293T) na polymerní nosič, což by mohlo vést k přípravě nové skupiny účinných protinádorových imunoterapeutik.



Obr. 19: Srovnání průběhu gelové permeační chromatografie proteinu mB7-H6CC_C produkovaného v buněčných liniích HEK293S GnTI- a HEK293T. Obě produkce však byly prováděny v různých objemech, 75 ml v případě linie HEK293S GnTI- a 300 ml u HEK293T.

7 ZÁVĚR

- Buněčný ligand mB7-H6CC byl produkován v buněčných liniích HEK293S GnTI- a HEK293T.
- Produkce proteinu mB7-H6CC_C byla oproti mB7-H6CC_N určena jako vhodnější pro další práci.
- Hmotnostní spektrometrií byla ověřena úspěšná produkce proteinu mB7-H6CC_C.
- Pomocí sedimentační analýzy byla potvrzena interakce mezi buněčným receptorem NKp30 a jeho ligandem mB7-H6 s coiled-coil kotvou.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Hořejší, V. (2013) *Základy imunologie* (Triton, Praha).
2. Husband, A.J. (1995) The immune system and integrated homeostasis. *Immunol. Cell Biol.* **73**, 377–82.
3. Urton, M.M. (2017) Immune system. *Salem Press Encyclopedia of Science* .
4. de Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L.M. (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer* **6**, 24–37.
5. Arum, C.-J., Anderssen, E., Viset, T., Kodama, Y., Lundgren, S., Chen, D., Zhao, C.-M. (2010) Cancer Immunoediting from Immunosurveillance to Tumor Escape in Microvillus-Formed Niche: A Study of Syngeneic Orthotopic Rat Bladder Cancer Model in Comparison with Human Bladder Cancer. *Neoplasia* **12**, 434–42.
6. Reiman, J.M., Kmiecik, M., Manjili, M.H., Knutson, K.L. (2007) Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* **17**, 275–87.
7. Haen, S.P., Rammensee, H.-G. (2013) The repertoire of human tumor-associated epitopes--identification and selection of antigens and their application in clinical trials. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 277–83.
8. Moretta, L., Pietra, G., Vacca, P., Pende, D., Moretta, F., Bertina, A., Mingari, M.C., Locatelli, F., Moretta, A. (2016) Human NK cells: From surface receptors to clinical applications. *Immunology Letters* **178**, 15–19.
9. Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., Dommelen, S.L.H. van, Degli-Esposti, M.A., Hayakawa, Y. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology* **42**, 501–10.
10. Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L. (2002) What is a natural killer cell? *Nature Immunology* **3**, 6–8.
11. Huntington, N.D., Voshenrich, C.A.J., Di Santo, J.P. (2007) Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature Reviews Immunology* **7**, 703–14.
12. Rezvani, K., Rouse, R.H. (2015) The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer. *Frontiers in Immunology* **6**.

13. Shi, F.-D., Ljunggren, H.-G., La Cava, A., Van Kaer, L. (2011) Organ-specific features of natural killer cells. *Nature Reviews Immunology* **11**, 658–71.
14. Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 197–223.
15. Knorr, D.A., Bachanova, V., Verneris, M.R., Miller, J.S. (2014) Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Seminars in Immunology* **26**, 161–72.
16. Vilches, C., Parham, P. (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 217–51.
17. Lanier, L.L. (2005) NK CELL RECOGNITION. *Annual Review of Immunology* **23**, 225–74.
18. Xu, X., Narni-Mancinelli, E., Cantoni, C., Li, Y., Guia, S., Gauthier, L., Chen, Q., Moretta, A., Vély, F., Eisenstein, E., Rangarajan, S., Vivier, E., Mariuzza, R.A. (2016) Structural Insights into the Inhibitory Mechanism of an Antibody against B7-H6, a Stress-Induced Cellular Ligand for the Natural Killer Cell Receptor NKp30. *Journal of Molecular Biology* **428**, 4457–66.
19. Ravetch, J.V., Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–90.
20. Campbell, K.S., Purdy, A.K. (2011) Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations: Structure/function of human KIR. *Immunology* **132**, 315–25.
21. Konjević, G., Vuletić, A., Mirjačić Martinović, K. (2016) Natural killer cell receptors: alterations and therapeutic targeting in malignancies. *Immunologic Research* **64**, 25–35.
22. Hudspeth, K., Silva-Santos, B., Mavilio, D. (2013) Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells. *Frontiers in Immunology* **4**.
23. 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. (2009) 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**, 1495–1503.
24. Li, Y., Wang, Q., Mariuzza, R.A. (2011) Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *The Journal of Experimental Medicine* **208**, 703–14.
25. 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. (2012) Mimicking an induced self phenotype by coating lymphomas with the NKp30 ligand B7-H6 promotes NK cell cytotoxicity. *J. Immunol.* **189**, 5037–46.
26. Kaifu, T., Escalière, B., Gastinel, L.N., Vivier, E., Baratin, M. (2011) B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 3531–39.
27. Joyce, M.G., Tran, P., Zhuravleva, M.A., Jaw, J., Colonna, M., Sun, P.D. (2011) Structure of the Natural Killer cell activating receptor NKp30 and dissection of ligand binding site. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* .
28. Farkona, S., Diamandis, E.P., Blasutig, I.M. (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* **14**.
29. Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2004) The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **21**, 137–48.
30. Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J.D., Allison, J.P. (2011) Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 805–12.
31. Chen, D.S., Mellman, I. (2013) Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10.
32. Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G. (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–89.
33. Yaddanapudi, K., Mitchell, R.A., Eaton, J.W. (2013) Cancer vaccines: Looking to the future. *Oncoimmunology* **2**, e23403.
34. Fong, L., Engleman, E.G. (2000) Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 245–73.

35. Gilboa, E., Nair, S.K., Lyerly, H.K. (1998) Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **46**, 82–87.
36. Kaufman, H.L., Kohlhapp, F.J., Zloza, A. (2015) Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 642–62.
37. Dharmadhikari, N., Mehnert, J.M., Kaufman, H.L. (2015) Oncolytic Virus Immunotherapy for Melanoma. *Current Treatment Options in Oncology* **16**.
38. Hinrichs, C.S., Rosenberg, S.A. (2014) Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol. Rev.* **257**, 56–71.
39. Shi, H., Qi, X., Ma, B., Cao, Y., Wang, L., Sun, L., Niu, H. (2015) The status, limitation and improvement of adoptive cellular immunotherapy in advanced urologic malignancies. *Chin. J. Cancer Res.* **27**, 128–37.
40. Sharma, P., Allison, J.P. (2015) Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* **161**, 205–14.
41. Mahoney, K.M., Rennert, P.D., Freeman, G.J. (2015) Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 561–84.
42. Klingemann, H., Boissel, L., Toneguzzo, F. (2016) Natural Killer Cells for Immunotherapy – Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Frontiers in Immunology* **7**.
43. Shevtsov, M., Multhoff, G. (2016) Immunological and Translational Aspects of NK Cell-Based Antitumor Immunotherapies. *Frontiers in Immunology* **7**.
44. Apostolovic, B., Danial, M., Klok, H.-A. (2010) Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials. *Chemical Society Reviews* **39**, 3541.
45. Pechar, M., Pola, R., Laga, R., Braunová, A., Filippov, S.K., Bogomolova, A., Bednářová, L., Vaněk, O., Ulbrich, K. (2014) Coiled Coil Peptides and Polymer–Peptide Conjugates: Synthesis, Self-Assembly, Characterization and Potential in Drug Delivery Systems. *Biomacromolecules* **15**, 2590–99.
46. Pechar, M., Pola, R., Laga, R., Ulbrich, K., Bednářová, L., Maloň, P., Siegllová, I., Král, V., Fábry, M., Vaněk, O. (2011) Coiled Coil Peptides as Universal Linkers for the

Attachment of Recombinant Proteins to Polymer Therapeutics.

Biomacromolecules **12**, 3645–55.

47. <http://tmcalculator.neb.com/#!/>.

48. Vaněk, O., Bezouška, K. Analytická ultracentrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy* **2010**, 1155–62.

49. Sednterp; <http://www.jphilo.mailway.com/default.htm>.

50. Sedfit; <http://www.analyticalultracentrifugation.com>.

51. Pažický, S. (2016) Study od NKp30 oligomerization and its interaction with B7-H6, Diplomová práce, PŘF UK Praha.

52. Reeves, P.J., Callewaert, N., Contreras, R., Khorana, H.G. (2002) Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13419–24.

53. Thomas, P., Smart, T.G. (2005) HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **51**, 187–200.

