

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Barbora Mikulová

Příprava expresních vektorů pro NKp65 a KACL, nových zástupců rodiny lidských NK buněčných receptorů

Preparation of expression vectors for NKp65 and KACL,
new members of human NK cell receptor family

Bakalářská práce

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

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením mého školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně ocitovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za všestrannou pomoc při experimentální práci, trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnoval při sepisování této práce. Mé velké díky patří také Mgr. Janu Bláhovi a všem členům laboratoře 204 za příjemnou spolupráci a pomoc, kterou mi během mé práce ochotně poskytli. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia a v neposlední řadě děkuji svým rodičům za dlouholetou podporu v mé cestě za vzděláním.

ABSTRAKT

NK buňky (natural killer cells, „přirození zabíječi“) jsou významnou složkou vrozeného imunitního systému a mají schopnost rozpoznat a zabít především nádorové a virem infikované buňky. Na svém povrchu mají celou řadu inhibičních a aktivačních receptorů, pomocí kterých rozhodují o osudu cílových buněk. Imunitní odpověď je nejčastěji spuštěna po navázání NK buněčného receptoru na svůj ligand. Takovými receptor-ligandovými systémy jsou např. NKp80-AICL a NKRP1-LLT1 na lidských lymfocytech.

Další receptor-ligandový pár představují NKp65 a KACL, dva nedávno objevené lektinové receptory lidských imunocytů. NKp65, blízký příbuzný NKp80, je glykoprotein, který funguje jako aktivační imunoreceptor na NK92MI buňkách. KACL je posledním objeveným členem lidské rodiny receptorů CLEC2 a je lokalizován téměř výhradně v kůži. Pomocí povrchové plazmonové rezonance bylo zjištěno, že NKp65 je vysokoafinitní receptor pro KACL.

Cílem mé bakalářské práce bylo připravit expresní vektory kódující lidské NK buněčné receptory NKp65 a KACL, produkovat tyto proteiny v expresním systému HEK293T buněk a provést jejich purifikaci.

Klíčová slova: NKp65, KACL, NK buňka, lektin, receptor, plazmid

ABSTRACT

Natural killer cells create an important part of innate immune system. Their importance lies in their ability to recognize and kill abnormal cells, especially tumour cells and virally infected ones, without previous activation. To recognize their targets, NK cells use a wide variety of surface receptors, both activating and inhibitory. If a ligand binds to an NK receptor, immune response is triggered. Examples of such ligand-receptor pairs are NKp80-AICL and NKR1P1-LLT1 on human lymphocytes.

Another ligand-receptor system of this kind is NKp65 and KACL, two recently discovered lectin receptors on human immunocytes. KACL is the last and most recently characterized member of CLEC2 receptor family in humans. Its expression is almost exclusively restricted to skin. NKp65, a close relative of NKp80, is a glycoprotein which stimulates NK92MI cell cytotoxicity upon KACL engagement. NKp65 has been shown to bind to KACL with a fairly high affinity by surface plasmon resonance measurement.

This thesis aims at describing the cloning of expression vectors coding for NK cell receptors NKp65 and KACL, expression of these proteins in HEK293T cell line and their purification.

Keywords: NKp65, KACL, NK cell, lectin, receptor, plasmid

(in Czech)

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1. LITERÁRNÍ ÚVOD	11
1.1 Imunitní systém.....	11
1.2 Druhy imunitních mechanismů	11
1.2.1 <i>Nespecifické mechanismy</i>	11
1.2.2 <i>Specifické mechanismy</i>	12
1.3 Složky imunitního systému	12
1.3.1 <i>Lymfatické tkáně a orgány</i>	12
1.3.2 <i>Buňky imunitního systému</i>	12
1.4 NK buňky	14
1.4.1 <i>Funkce NK buněk</i>	14
1.4.2 <i>Rozpoznávání cílových buněk NK buňkami</i>	15
1.4.3 <i>Cytotoxické mechanismy NK buněk</i>	15
1.5 Receptory NK buněk.....	17
1.5.1 <i>Geny pro receptory NK buněk</i>	18
1.5.2 <i>Mechanismus aktivace</i>	18
1.5.3 <i>Mechanismus inhibice</i>	19
1.5.4 <i>Receptory imunoglobulinové nadrodiny</i>	19
1.5.5 <i>Receptory podobné lektinům C-typu</i>	20
1.5.6 <i>Rozdělení genů v NK genovém komplexu</i>	22
1.5.7 <i>Rodina receptorů NKRP1</i>	23
1.5.7.1 <i>Receptor NKRP1A</i>	24
1.5.7.2 <i>Receptor NKp80</i>	24
1.5.7.3 <i>Receptor NKp65</i>	24
1.5.7.4 <i>Receptor S1P1</i>	25
1.5.8 <i>Receptory CLEC2 rodiny</i>	25
1.5.8.1 <i>Receptor LLT1</i>	26
1.5.8.2 <i>Receptor CD69</i>	26
1.5.8.3 <i>Receptor AI1CL</i>	26
1.5.8.4 <i>Receptor KACL</i>	27
2. CÍL PRÁCE.....	28
3. MATERIÁL	29
3.1 Přístroje a pomůcky	29
3.2 Chemikálie	30
3.3 Enzymy	31
3.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie	32
3.5 Vektory.....	32
3.6 Primery pro PCR.....	32
3.7 Roztoky a média.....	33
4. METODY	35
4.1 PCR amplifikace	35
4.2 Agarosová elektroforéza	36

4.3 Příprava inzertů	36
4.4 Preparativní elektroforéza	37
4.5 Přečištění inzertů	37
4.6 Ligace inzertů do vektoru pTT28.....	37
4.7 Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> tepelným šokem.....	37
4.8 Selektce klonů	38
4.9 PCR z kolonií	38
4.10 Izolace plazmidové DNA	38
4.11 Sekvenování DNA	39
4.12 Příprava zásobního množství plazmidu	39
4.13 Izolace zásobního množství plazmidové DNA	39
4.14 Stanovení koncentrace DNA.....	40
4.15 Velkoobjemová produkce proteinu	40
4.16 Chelatační chromatografie	41
4.17 Zkoncentrování proteinů	41
4.18 Gelová permeační chromatografie	41
4.19 Stanovení koncentrace proteinů	42
4.20 SDS elektroforéza	42
5. VÝSLEDKY	43
5.1 Příprava expresních vektorů.....	43
5.2 Produkce proteinů	48
5.3 Purifikace proteinů.....	48
6. DISKUZE	51
7. ZÁVĚR	54
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	55

SEZNAM ZKRATEK

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátce (<i>antibody dependent cell cytotoxicity</i>)
bp	pár bazí (jednotka délky řetězce DNA, <i>base pair</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	označení povrchových molekul leukocytů (<i>cluster of differentiation</i>)
CLEC	lektinové receptory typu C (<i>C-type lectin receptor</i>)
CBB R-250	barva Coomassie Brilliant Blue R-250
CRD	lektinová doména vázající sacharid (<i>carbohydrate-recognition domain</i>)
DMEM	kultivační médium pro tkáňové kultury (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	směs deoxynukleotidtrifosfátů
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
F17	kultivační médium pro tkáňové kultury
Fc	část molekuly protilátky (<i>Fragment, crystallizable</i>)
HEK293	označení buněčné linie lidských embryonálních ledvinných buněk číslo 293 (<i>human embryonic kidney 293</i>)
HLA	hlavní lidský histokompatibilní antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IFN	interferon
IL	interleukin
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
kbp	tisíc párů bazí (jednotka délky řetězce DNA, <i>kilobase pair</i>)
KIR	imunoglobulinový receptor zabíječských buněk (<i>killer cell Ig-like receptor</i>)
KLRB, F, G	označení povrchového leukocytárního receptoru (<i>killer cell lectin-like receptor subfamily B, F, G</i>)

LB	název média podle Luria-Bertaniho
LILR	imunoglobulinový receptor leukocytů (<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor</i>)
LRC	komplex genů pro receptory leukocytů (<i>leukocyte receptor complex</i>)
Ly49	rodina receptorů podobných lektinům C-typu (<i>lymphocyte antigen 49</i>)
M-CSF	faktor stimulující tvorbu osteoklastů (<i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MHC gp I	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (<i>major histocompatibility complex type I glycoproteins</i>)
NCR	skupina aktivačních receptorů z imunoglobulinové nadrodiny (<i>natural cytotoxicity receptor</i>), = NKp
NK	přirozený zabíječ (<i>natural killer</i>)
NKC	NK genový komplex (<i>NK-gene complex</i>)
NKG2	rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu (<i>natural killer group 2</i>)
NKp30	receptor ze skupiny NCR (<i>natural killer cell p30-related protein</i>)
NKRP1	rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu (<i>natural killer cell receptor protein 1</i>)
NKT	NK-T lymfocyty (<i>natural killer T cells</i>)
PCR	polymerasová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
SHIP	inositol polyfosfát 5'-fosfatasa (<i>SH2-domain containing inositol polyphosphate 5' phosphatase</i>)
SHP	proteinová tyrosinová fosfatasa (<i>SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>)
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA
T _c	cytotoxický T-lymfocyt (<i>T cytotoxic cell</i>)
TE	Tris pufr s EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TES	Tris pufrovaný fyziologický roztok s EDTA
T _H	pomocný T-lymfocyt (<i>T helper cell</i>)
TNF	faktor nekrotizující nádory (<i>tumor necrosis factor</i>)

Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je homeostatický mechanismus, který se vyvinul na ochranu organismu před škodlivinami z vnějšího i vnitřního prostředí¹. Činnost imunitního systému je podmíněna přirozenou nestálostí vnitřního prostředí organismu, buněčnou a orgánovou diferenciací, odcizováním vlastních buněk stárnutím a prostupem prvků z vnějšího prostředí². Jeho funkcí je udržovat integritu organismu tím, že rozpoznává škodlivé od neškodného a tato funkce se projevuje jako obranyschopnost (schopnost imunitního systému rozpoznat vnější škodliviny a chránit organismus před patogenními mikroorganismy a jejich toxickými produkty), autotolerance (imunitní systém je schopen rozpoznat vlastní tkáň organismu a udržovat vůči nim toleranci) a imunitní dohled (schopnost imunitního systému rozpoznat a odstranit vnitřní škodliviny, tj. buňky staré, poškozené a zmutované)³.

1.2 Druhy imunitních mechanismů

Imunitní mechanismy jsou rozděleny do dvou základních skupin na tzv. mechanismy nespecifické (neadaptivní, vrozené) a specifické (adaptivní, získané), které spolu navzájem spolupracují a tím chrání organismus. Dalším obranným mechanismem organismu je neporušený povrch kůže a sliznic a jejich přirozené neimunitní obranné mechanismy, které lze rozdělit na mechanické (pohyb řasinek), chemické (přítomnost enzymů, kyselá pH žaludku a moči) a mikrobiální (přítomnost nepatogenních mikroorganismů)³.

1.2.1 Nespecifické mechanismy

Mechanismy nespecifické jsou evolučně starší, založené na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připravené předem a bývají účinné proti různým patogenům. Nespecifické imunitní mechanismy jsou zastoupeny jednak buněčnými systémy a jednak systémy humorálními. Mezi buněčné nespecifické systémy jsou řazeny fagocytující buňky a přirozené cytotoxické buňky, tzv. NK buňky, *natural killer* („přirození zabíječi“). Systémy humorální jsou tvořeny komplementovým systémem, interferony, lektiny a jinými

sérovými proteiny. Tyto systémy nejsou ovlivněny předchozím setkáním s antigenem, nemají tzv. imunologickou paměť³.

1.2.2 Specifické mechanismy

Specifické mechanismy jsou evolučně mladší, na přítomnost cizorodé struktury v organismu reagují pomocí vysoce specifických molekul. Mezi specifické mechanismy patří humorální systémy (protilátky) a systémy buněčně zprostředkované (T lymfocyty). Na rozdíl od nespecifických mechanismů je zde přítomna tzv. imunologická paměť³.

1.3 Složky imunitního systému

Přítomností mnoha druhů buněk a molekul v organismu a jejich vzájemnou interakcí jsou zprostředkovávány imunitní reakce. Tyto buňky spolu s pojivovými buňkami a jinými strukturami tvoří lymfatické tkáně a orgány³.

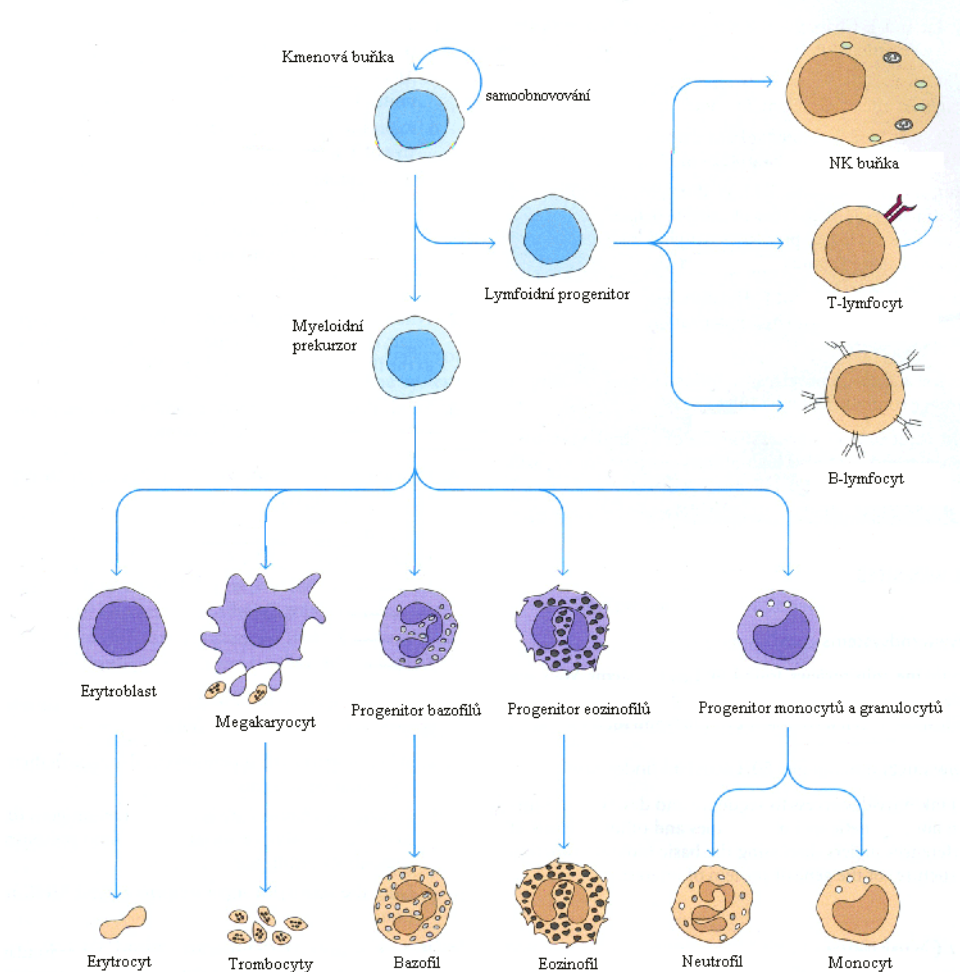
1.3.1 Lymfatické tkáně a orgány

Lymfatické orgány jsou rozděleny na primární a sekundární. Primární lymfatické orgány, kostní dřev a thymus, jsou místem vzniku, diferenciaci a zrání imunokompetentních buněk. Jako sekundární lymfatické orgány jsou označovány slezina, lymfatické uzliny a jejich organizované shluky (apendix). Mezi lymfatické tkáně patří zejména slizniční lymfatická tkáň (MALT, *mucous associated lymphoid tissue*). Specifické imunitní reakce jsou realizovány v sekundárních lymfatických orgánech³.

1.3.2 Buňky imunitního systému

Imunitní systém je tvořen různými druhy leukocytů (bíléch krvinek), pocházejících z hematopoetických kmenových buněk, které jsou přítomny v kostní dřev. V dřev se kmenové buňky nacházejí po celý život a část z nich se diferencuje na různé typy leukocytů, úbytek kmenových buněk je kompenzován dělením. Kmenové buňky jsou rozděleny do dvou základních linií, myeloidní a lymfoidní (Obr. 1.1 na str. 13). Diferenciální linie myeloidní vznikají monocyty (cirkulující v krvi a ve tkáních se diferencující na makrofágy) a tři typy granulocytů. Granulocyty jsou dále děleny na neutrofilů, eozinofilů a bazofilů (tkáňovou formou bazofilů jsou žírné buňky-mastocyty), poslední skupinou řazenou do této vývojové linie jsou dendritické buňky. Nespecifické

části imunitního systému jsou tvořeny všemi druhy myeloidních buněk, většina z nich má schopnost fagocytovat, produkovat cytokiny a další rozpustné mediátory.



Obr. 1.1: Diferenciace různých druhů leukocytů.

Z hematopoetických kmenových buněk samoobnovováním vznikají dvě základní linie: myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie vznikají diferenciací erythrocyty, trombocyty, bazofily, eozinofily, neutrofil, monocyt a některé dendritické buňky (nejsou zobrazeny na obrázku). Buňky lymfoidní linie se diferencují na NK buňky, B lymfocyty, T lymfocyty a dendritické buňky (nejsou zobrazeny na obrázku)^{4, 12}.

Důležitá skupina buněk označována jako buňky prezentující antigen (APC, *antigen presenting cells*) pro T lymfocyty, zahrnující dendritické buňky, monocyt a makrofágy, spojuje vrozenou část a antigeně specifickou část imunitního systému. Z myeloidní linie dále vznikají erythrocyty (červené krvinky) a trombocyty (krevní destičky), mající určitý význam při zánětu, ale jejich hlavní funkce je odlišná. Diferenciací linie lymfoidní vznikají

NK buňky a lymfocyty B a T. B lymfocyty se vyvíjejí v kostní dřeni a poté se transportují do sekundárních lymfoidních orgánů, kde se setkávají s antigenem, a jejich vývoj je zde dokončen. Konečné stadium B lymfocytů se označuje jako plazmatické buňky (plazmocyty). Většina T lymfocytů se vyvíjí v brzlíku (thymus), z nich vzniknou dvě fenotypově odlišné subpopulace: prekurzory pomocných T buněk (Th), mající na povrchu receptor CD4, a prekurzory cytotoxických T buněk (Tc), které mají receptor CD8. Na povrchu vhodných APC se prekurzory T lymfocytů setkávají s antigenem. U prekurzorů Th buněk dochází k diferenciaci na zralé efektorové Th, jejichž funkcí je produkce cytokinů regulujících jiné buňky; Tc prekurzory se po setkání s antigenem diferencují na efektorové Tc buňky, které jsou schopné cytotoxičky zabít jiné buňky. Třetí skupinou patřící mezi subpopulaci lymfocytů jsou NK buňky³.

1.4 NK buňky

NK buňky představují významnou epistemologickou skupinu v imunologii, která byla nejprve považována za shluk T lymfocytů, následně byla však od této skupiny oddělena za vzniku zcela nové skupiny. NK buňky byly objeveny před více než 30 lety a charakterizovány jako buňky schopné zabít nádorové buňky *in vitro* bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci⁵. Později byly uznány jako zvláštní druh velkých granulárních lymfocytů⁶, které se nacházejí v lymfatických orgánech, jako jsou kostní dřeň, slezina a brzlík, a nelymfoidní tkáni, jako jsou plíce a játra^{7, 8}. NK buňky byly odděleny od B a T lymfocytů na základě nepřítomnosti antigenně specifických receptorů, neměly klonálně distribuovanou specifitu ani imunologickou paměť⁹. NK buňky pocházejí z CD34⁺ buněčných prekurzorů a vznikají diferenciací v kostní dřeni. Za správný růst, vývoj a dělení zodpovídají různé typy cytokinů, jako interleukin 15 (IL-15), který je důležitým faktorem pro diferenciaci NK buněk^{10, 11}. Markery NK buněk jsou CD2 (adhezní molekula zprostředkovávající přenos signálu do buňky), CD45 (molekula umožňující přenos signálu do buňky), CD56 (adhezní molekula), CD16 (nízkoafinitní receptor pro Fc část IgG) a CD5 (funkce je neznámá)¹².

1.4.1 Funkce NK buněk

NK buňky jsou důležitou složkou vrozené imunity. Jejich aktivita je stimulována interferony α a β , které jsou produkovány různými buňkami po virové infekci. NK buňky

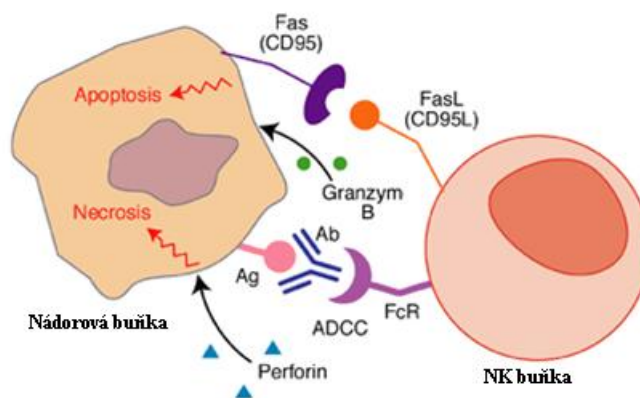
jsou schopny rozpoznat a zabít hostitelské buňky nádorové, virem infikované, stresované, transplantované či pokryté protilátkami³. Rozeznávají různé typy nádorů i mikrobiálních infekcí, zamezují jejich šíření a následnému poškození tkání. NK buňky mají také určité regulační schopnosti, jsou schopné vzájemně interagovat s buňkami dendritickými, endotelovými, T lymfocyty a makrofágy. Je zřejmé, že mohou také omezovat či zhoršovat imunitní odpovědi. Jsou zdrojem mnoha druhů cytokinů stimulujících adaptivní imunitu (kap. 1.4.3). Bylo zjištěno, že NK buňky zlepšují schopnost přijetí transplantovaných orgánů, dále pak ovlivňují zánětlivé a autoimunitní poruchy^{3, 12, 13}.

1.4.2 Rozpoznávání cílových buněk NK buňkami

NK buněčné rozpoznávání je od B a T buněčného zcela odlišné, jelikož u NK buněk chybí antigenně specifické receptory. Po dlouhou dobu nebylo známo, jakým způsobem jsou NK buňky schopné rozpoznávat cílové buňky³. Ve své doktorské práci roku 1981 Klas Kärre navrhl tzv. „missing-self“ hypotézu¹⁴. V této práci se však spíše zabýval rezistencí cílových buněk než citlivostí buněk napadených. Zjistil, že NK buňky jsou schopny rozpoznávat poškozené buňky na základě nepřítomnosti určitých povrchových molekul, které se nacházejí na buňkách zdravých^{15, 16}. Postupně byla tato hypotéza publikována a rozšiřována až do podoby, jakou známe dnes. NK rozpoznávání zdravých buněk umožňují inhibiční receptory mající ligandy ze skupiny MHC glykoproteinů I. třídy (MHC gp I)^{17, 18}.

1.4.3 Cytotoxické mechanismy NK buněk

Imunitní mechanismy NK buněk mají zásadní význam při obraně organismu především proti nádorovým a virem infikovaným buňkám. NK buňky využívají různé způsoby vedoucí k usmrcení cílové buňky (Obr. 1.2 na str. 16)³.



Obr. 1.2: Cytotoxické mechanismy NK buněk.

Na tomto obrázku jsou znázorněny různé cytotoxické mechanismy, které NK buňka využívá k usmrcení cílové buňky. V horní části obrázku je znázorněna vazba receptor-ligandového páru Fas/FasL. Černými šipkami je naznačena přítomnost cytotoxických granulí (perforin a granzymy) v cytoplazmě NK buněk. Dále je zde uvedena vazba Fc části protilátky (Ab, *antibody*) na antigen (Ag), který se nachází na povrchu nádorové buňky. Protilátka je vázána na Fc receptor NK buňky, tyto vazby představují cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (ADCC)¹⁹.

Jak již bylo uvedeno, jsou NK buňky schopny produkovat různé cytokiny, které mají především regulační funkci, ale svojí přítomností napomáhají i cytotoxické aktivitě. Významným cytokinem je interferon- γ (IFN- γ), mající významné imunomodulační a protinádorové účinky. IFN- γ zabraňuje šíření infekce po napadení organismu patogenem stimulací adaptivní imunity a také je schopen omezit nádorovou angiogenezi. Dalším cytokinem NK buněk je faktor nekrotizující nádory (TNF, *tumor necrosis factor*), především TNF α , jehož vazbou na apoptotické receptory z rodiny TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) na povrchu cílové buňky aktivují kaspasy, čímž je spuštěna signalizační kaskáda vedoucí k programované smrti buňky. Mezi receptory TNFR, nazývané také *death* receptory, patří mimo jiné již uvedený Fas (CD95), obsahující intracelulární *death* doménu (DD), jejímž prostřednictvím jsou právě aktivovány kaspasy, což vede k zahájení apoptotického programu^{20, 21}. NK buňky mají na svém povrchu protein zvaný FasL (Fas-ligand), jehož struktura je podobná cytokinům TNF. NK buňka využívá přítomnosti apoptotického receptoru Fas na povrchu mnoha typů buněk, umožňující vytvoření vazby mezi Fas a FasL a přenos signálu přes Fas receptor do cílové buňky³.

Dále mezi cytokiny vylučované NK buňkami patří interleukin 12 (IL-12), jehož hlavní funkcí je stimulace pomocných T lymfocytů (Th1, *helper T cell*) a NK buněk, IL-22, inhibující Th2, IL-26, jehož funkce je neznámá, IL-3 a M-CSF³.

NK buňky mají ve své cytoplazmě velké množství cytotoxických granulí, které obsahují protein perforin a serinové proteasy granzymy. Adhezivní molekuly zprostředkovávají adhezi na poškozenou buňku, cytotoxické granule putují k plazmatické membráně NK buňky a následně dochází k degranulaci jejich obsahu do úzké štěrbině mezi oběma buňkami. V přítomnosti Ca^{2+} iontů perforin polymeruje v cytoplazmatické membráně cílové buňky a tím jsou v ní vytvořeny póry, které mohou způsobit úplné proděravění membrány, vedoucí k smrti buňky osmotickou lyzí. Většinou však tyto póry slouží k prostupu granzymů do cytoplazmy cílové buňky, kde štěpí prekurzory proteas ze skupiny kaspas, čímž je aktivují. Kaspasy poté působí na další cytoplazmatické proteiny a tím je spuštěna kaskáda reakcí vedoucí k buněčné apoptotické smrti^{3, 22}.

Cytotoxická reakce závislá na protilátkách, ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*), je další nezávislý proces umožňující spustit cytotoxickou aktivitu NK buněk. NK buňky mají na svém povrchu membránový Fc receptor (CD16), zprostředkovávající vazbu s Fc fragmentem molekuly protilátky třídy IgG, se kterým se NK buňka setkává na povrchu protilátkami opsonizovaných cílových buněk. Vazba CD16 na Fc fragment způsobí aktivaci proteinových tyrosinových kinas ze skupiny Src vedoucí k přenesení signálu. Tento přenos zahájí cytotoxickou aktivitu NK buněk^{3, 23, 24}.

1.5 Receptory NK buněk

Buňky mají na svém povrchu celou řadu dobře definovaných molekul, které do buňky přivádějí nejrůznější signály. Obecně jsou tyto molekuly označovány jako receptory. NK buňky jakožto složky vrozeného imunitního systému pomocí sady specializovaných receptorů rozhodují o osudu cílových buněk, o tom, mají-li být zachovány, či zničeny. Nejčastěji tyto receptory mapují přítomnost virů, intracelulárních bakterií a parazitů. Receptory NK buněk se dělí do dvou základních skupin na tzv. stimulační (pozitivní, aktivační) a inhibiční (negativní)^{23, 25-31}. Odpověď NK buněk je regulována jemnou rovnováhou mezi pozitivními a negativními signály z membránových receptorů⁹. Je nepravděpodobné, že by jeden NK receptor zodpovídal za všechny biologické funkce, které NK buňka zprostředkovává proti cílové buňce, naopak, NK buňka

používá řadu receptorů pro spuštění stejné funkce, v závislosti na povaze cílové buňky¹⁰. NK receptory se na povrchu cílové buňky setkávají se svými ligandy a dovnitř NK buňky je následně veden signál. Konečná reakce je pak výsledkem integrace signálů ze všech receptorů^{29, 32}.

1.5.1 Geny pro receptory NK buněk

Geny pro receptory NK buněk jsou v genomu uloženy na dvou místech, jednak v NK genovém komplexu (NKC, *natural killer receptor gene complex*) a jednak v komplexu genů pro receptory leukocytů (LRC, *leukocyte receptor complex*). V NKC jsou uloženy geny pro receptory patřící do nadrodiny receptorů podobných lektinům C-typu³³⁻³⁸. Geny v NKC se nalézají na chromozómu 6 u myši³⁹, 4 u potkana⁴⁰ a 12p13 u člověka⁴¹. V případě, že jsou receptory kódovány v LRC, nacházejícím se na chromozómu 7 u myši a 19q13.4 u člověka, patří do imunoglobulinové nadrodiny^{35, 37, 38, 42}.

1.5.2 Mechanismus aktivace

Aktivační NK receptory obsahují v intracelulárních doménách aktivační motiv ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, Asp/Glu-X-X-Tyr-X-X-Leu/Ile-X₍₆₋₈₎-Tyr-X-X-Leu/Ile, kde X značí libovolnou aminokyselinu)⁴³. Některé aktivační NK receptory nemají ITAM, ale asociují s adaptorovými proteiny, které ITAM motiv mají: FcεRIγ⁴⁴, CD3ζ⁴⁵ a DAP12 (*DNAX-activating protein of 12 kDa*⁴⁶, nazývaný také jako KARAP – *killer activating receptor associated protein*⁴⁷). První identifikovaný a nejlépe prozkoumaný aktivační receptor NK buněk je CD16, nízkoafinitní receptor pro Fc část IgG^{23, 24, 48, 49}. U člověka asociuje s FcεRIγ⁴⁴ a/nebo CD3ζ⁵⁰, u myši pak s FcεRIγ⁵¹. Po navázání ligandu dojde k fosforylaci tyrosinu v ITAM a následuje aktivace tyrosinových kinas Syk a ZAP70, což vede k NK buněčné aktivaci^{52, 53}. Aktivační NK receptory mohou asociovat také s DAP10 (*DNAX-activating protein of 10 kDa*, známý také jako KAP10, *killer activating protein 10*), obsahujícím ve své intracelulární doméně namísto motivu ITAM krátkou sekvenci aminokyselin Tyr-X-X-Met, kde X označuje libovolnou aminokyselinu. Fosforylace zbytků tyrosinu dává vznik aktivačnímu místu pro fosfatidylinositol-3'-kinasu aktivující Vav1, GTPasy z rodiny Rho a fosfolipasu C, což opět vede k aktivaci NK buňky^{54, 55}.

1.5.3 Mechanismus inhibice

Všechny dobře definované inhibiční receptory NK buněk mají ve svých cytoplazmatických doménách jednu nebo více shodných sekvencí (Ile/Val/Leu/Ser-X-Tyr-X-X-Leu/Val, kde X značí libovolnou aminokyselinu), které jsou nazývány ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). Tento opakující se motiv byl poprvé popsán na doménách FcγRIIb, Fc receptoru pro IgG nacházejícím se na B lymfocytech, který je odpovědný za potlačení signalizace prostřednictvím povrchových imunoglobulinů⁵⁶. Motivy ITIM nebyly nalezeny jen u inhibičních receptorů NK buněk, ale i na buňkách vznikajících z hematopoetických buněk⁵⁷. Po navázání ligandu je tyrosinový zbytek v ITIM fosforylován prostřednictvím kinasy z rodiny Src. Následně jsou aktivovány fosfatasy obsahující SH2-domény, buď proteinové tyrosinové fosfatasy SHP1 a SHP2 nebo SHIP (inositol polyfosfát-5'-fosfatasa) - aktivace příslušné fosfatasy závisí na konkrétním receptoru. Funkcí SHIP je degradovat fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát na fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát, čímž brání signalizaci závislé na Ca²⁺ iontech. Po aktivaci SHP1 a SHP2 dochází ke snížení fosforylace různých intracelulárních signálních proteinů, např. FcεRIγ, ZAP70, Syk, PLCγ1, PLCγ2, Shc, LAT, SLP76 a Vav-1⁵⁷⁻⁶².

NK buněčné receptory mohou být děleny nejen podle své funkce, ale také podle své struktury, a to na dvě hlavní kategorie⁶³. Jednou z nich jsou receptory imunoglobulinové nadrodiny, zahrnující především rodinu lidských receptorů KIR (*killer Ig-like receptor*), a druhou skupinou jsou receptory podobné lektinům C-typu, obsahující například rodinu myších receptorů Ly49 či rodinu receptorů NKG2 a CD94⁶⁴⁻⁶⁷.

1.5.4 Receptory imunoglobulinové nadrodiny

Do této skupiny je řazena rodina lidských receptorů KIR (*killer Ig-like receptor*, CD158), které jsou kódovány 15 různými geny a 2 pseudogeny nacházejícími se na chromozomu 19q13.4⁶⁸. Receptory KIR jsou přítomny jak na NK buňkách^{69, 70}, tak na T lymfocytech^{71, 72}. Přestože je většinou uváděno, že KIR jsou lidské receptory, geny pro tyto receptory byly též identifikovány u primátů⁷³, koně⁷⁴ a krávy⁷⁵. KIR jsou transmembránové proteiny I. typu mající dvě (KIR2D) nebo tři (KIR3D) imunoglobulinové domény v extracelulární části molekuly⁷⁶⁻⁷⁸. Receptory KIR2D i KIR3D obsahují různě dlouhé cytoplazmatické domény. Jedná-li se o KIR s dlouhými (L) doménami (KIR2DL, známý jako p58, a KIR3DL, nazývaný p70), které mají jednu nebo dvě ITIM sekvence, jsou tyto receptory inhibiční. Naopak KIR s krátkými (S) doménami

(KIR2DS a KIR3DS) neobsahují v cytoplazmatické doméně žádnou ITIM sekvenci, ale spojují se s adaptorovým proteinem DAP12, majícím ITAM sekvenci, následně pak tedy dochází k aktivaci NK buněk. Výskyt aktivačních KIR není tak běžný jako výskyt inhibičních KIR, rozpoznávajících MHC gp I (tj. u člověka HLA-A, HLA-B a HLA-C)³².

Dalším typem imunoglobulinových receptorů je rodina lidských receptorů LILR (*leukocyte immunoglobulin-like receptor*, známá též jako LIR, ILT či CD85). LILR receptory jsou kódovány 13 různými geny, které se opět nacházejí na chromozomu 19q13.4. Pouze dva typy inhibičních receptorů LILR (LILRB1 a LILRB2) rozpoznávají MHC gp I, ale LILRB2 nejsou exprimovány na NK buňkách. LILRB1 obsahuje čtyři imunoglobulinové domény v extracelulární části molekuly a čtyři ITIM sekvence v cytoplazmatické doméně^{79, 80}.

Mezi receptory imunoglobulinové nadrodiny patří také tzv. NCR (*natural cytotoxicity receptors*), které byly poprvé objeveny na lidských NK buňkách. Jedná se o NKp46 (NCR1, CD335), NKp44 (NCR2, CD336) a NKp30 (NCR3, CD337)⁸¹⁻⁸³. NCR jsou integrální proteiny I. typu mající jednu (NKp30 a NKp44) nebo dvě (NKp46) imunoglobulinové domény v extracelulární části molekuly. Obsahují nabitě transmembránové zbytky, které asociují s ζ - γ heterodimery (NKp30 a NKp46) a DAP12 (NKp44), u nichž se v cytoplazmatické doméně nachází motiv ITAM. NCR jsou tedy aktivačními receptory^{84, 85}.

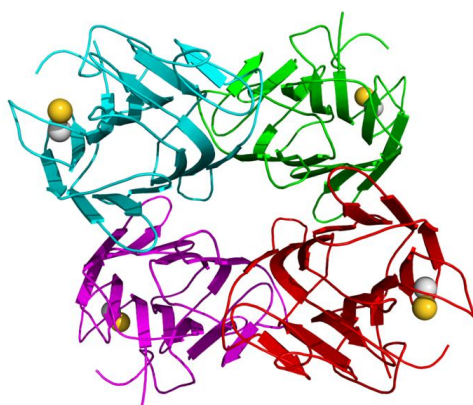
1.5.5 Receptory podobné lektinům C-typu

Lektiny byly objeveny na počátku 19. století a jejich název je odvozen z latinského slova *legere* (vybrat, zvolit). Jedná se o strukturně bohatou skupinu proteinů, které jsou schopny rozpoznávat a vázat nekovalentně, reverzibilně a s vysokou specifitou mono- a oligosacharidy, ať už volné, nebo vázané na glykoproteinech, glykolipidech nebo oligosacharidových zbytcích na povrchu buněk. Lektiny nevykazují žádnou katalytickou aktivitu a nejsou produktem imunitního systému jako protilátky^{86, 87}. Lze je najít u mnoha organismů: u virů, bakterií, kvasinek, rostlin i živočichů. Schopnost vazby lektinu na sacharidové struktury je využívána např. patogeny pro rozpoznávání a vazbu na sacharidové složky povrchu hostitelské buňky nebo zajišťuje různé biologické procesy⁸⁸.

Receptory lektinového typu jsou multidoménové proteiny využívající pro vazbu sacharidu tzv. doménu rozpoznávající sacharid (CRD, *carbohydrate recognition domain*)⁸⁹⁻

⁹¹. Zástupci této heterogenní skupiny proteinů se liší velikostí, strukturou a stechiometrií svých CRD domén, lze však najít určité podobnosti v aminokyselinových sekvencích⁸⁷.

Pro rozdělení lektinů lze použít různá kritéria. Jedno z rozdělení může být na základě jejich původu na bakteriální, virové, rostlinné a živočišné. Bakterie produkují celou řadu lektinů, které jsou schopny rozpoznat povrch hostitelské buňky⁹². Rostlinné lektiny jsou nejrozsáhlejší skupinou, avšak jejich funkce není ještě zcela známa. Předpokládá se, že mohou být zapojeny do obrany rostliny před infekcí. Nejprozkoumanější skupinou jsou lektiny rostlin ze skupiny *Legume* (luštěniny), jejichž hlavním zástupcem je *konkanavalin A* (ConA, z fazole), vázající manosu a glukosu (Obr. 1.3). Mezi živočišné lektiny patří galektiny, vážící β -galaktosidy nezávisle na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Galektiny se účastní mnoha biologických procesů (buněčný růst, apoptóza, aktivace T lymfocytů). Dalším typem živočišných lektinů jsou lektiny C-typu. Jedná se o extracelulární proteiny, u nichž pro vazbu sacharidu je nutná přítomnost Ca^{2+} iontů a které se podílejí na řadě biologických funkcí (neutralizace patogenů, adheze, endocytóza). Lze je dále rozdělit na endocyklické lektiny, které jsou vázány v buněčných membránách a jsou schopny rozpoznat galaktosu, manosu, fukosu a *N*-acetylglaktosamin, a na selektiny, které umožňují adhezi cirkulujících leukocytů na výstelku cévních stěn^{87, 88}.



Obr. 1.3: Krystalová struktura konkanavalinu A.

Konkanavalin A (ConA, z fazole) je člen rostlinných lektinů ze skupiny *Legume* (luštěniny). ConA je tetramer, jehož jednotlivé monomery jsou označeny azurově, zeleně, červeně a purpurově. Kuličkami jsou znázorněny žlutě vápenaté ionty a šedě ionty manganaté^{89, 90}.

Dále mohou být lektiny členěny na jednoduché a mozaikovitě. Jednoduché lektiny mají molekulovou hmotnost nižší než 40 kDa a vedle CRD obsahují i jiné domény. Patří sem všechny rostlinné lektiny a z živočišných lektinů jen galektiny. Mezi skupinu

mozaikovitých patří lektiny C-typu, P-typu (rozpoznávající D-manosu-6-fosfát), I-typu (rozpoznávající kyselinu sialovou), atd. Existuje i skupina tzv. intracelulárních lektinů, které hrají důležitou roli při třídění a transportu glykoproteinů na povrch buňky. Takovým lektinem je např. kalnexin v endoplazmatickém retikulu (ER), který se váže na terminální D-glukosu nezralých *N*-glykoforem proteinů a zabraňuje tak nesprávně poskládaným či glykosidasou dosud neopracovaným glykoproteinům ER opustit⁸⁷.

CRD domény lektinů C-typu patří do skupiny proteinových domén, které jsou označovány jako CTLD (*C-type lectin-like domain*)⁹³. Proteiny obsahující CTLD byly K. Drickamerem v roce 1993 rozděleny do 7 skupin podle jejich doménové architektury a fylogenetické příbuznosti: (I) Proteoglykany, (II) Transmembránové receptory II. typu, (III) Kolektiny, (IV) Selektiny, (V) Receptory NK buněk, (VI) Manosové receptory makrofágů a (VII) Volné sacharid vázající domény⁹⁴. Následně pak v roce 2002 on sám tyto kategorie rozšířil ještě o dalších 7 skupin⁹⁵. Poslední 3 skupiny byly doplněny Zelenským a Greadym v roce 2004⁹⁶. Dnes je tedy známo 17 skupin lektinů C-typu⁹⁷.

Skupina (V) Receptory NK buněk obsahuje i receptory, které nejsou exprimovány výhradně jen na NK buňkách. Mezi takové patří CD72, který se nalézá na B lymfocytech⁹⁸, CD69, který je exprimován celou řadou krvetvorných buněk⁹⁹, KLRG1 (MAFA), nacházející se na bazofilech a NK buňkách¹⁰⁰, CLEC1, produkováný dendritickými buňkami, CLEC2 v játrech¹⁰¹, atd. Jedná se o evolučně mladou skupinu, která zahrnuje transmembránové proteiny II. typu tvořící homo- i heterodimery, které jsou stabilizovány disulfidickými můstky a které specificky rozpoznávají a váží sacharidové či proteinové ligandy, avšak pro vazbu ligandu není přítomnost Ca²⁺ iontů nezbytná^{97, 102, 103}.

1.5.6 Rozdělení genů v NK genovém komplexu

Geny v NKC jsou na základě vzájemné podobnosti rozděleny do dvou podskupin: geny pro lektinům podobné receptory NK buněk (KLR, *killer cell lectin-like receptor*) a geny pro receptory podobné lektinům C-typu (CLEC, *C-type lectin receptor*)³⁶. Do první podskupiny patří např. geny KLRB/F, kódující receptory z rodiny NKRP1 a NKp65 či NKp80, do druhé podskupiny např. rodina CLEC2, zahrnující geny pro KACL, AICL, CD69 a LLT1. Receptory NKRP1 (kap. 1.5.7) interagují s receptory z CLEC2 rodiny (kap. 1.5.8) za vzniku receptor-ligandových párů (Tab. 1.1 na str. 23), které navozují různou reaktivitu NK buněk a jiných lymfocytů¹⁰⁴.

Tab. 1.1: Receptor-ligandové páry rodiny lidských receptorů KLR a CLEC2.

Receptor (gen v NKC)	Ligand (gen v NKC)
NKp65 (KLRF2)	KACL (CLEC2A)
NKp80 (KLRF1)	AICL (CLEC2B)
S1P1R	CD69 (CLEC2C)
NKRP1A (KLRB1)	LLT1 (CLEC2D)

1.5.7 Rodina receptorů NKRP1

Do rodiny NKRP1 (*natural killer receptor protein 1 = KLRB1, killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1*) patří aktivační i inhibiční receptory NK buněk podobné lektinům C-typu. Tato rodina zahrnuje nejen lidské, ale i myši a potkaní receptory. Geny pro NKRP1 se nacházejí na centromerickém konci NKC¹⁰⁴. Už před více než 30 lety byl popsán první aktivační receptor NKRP1A u potkana díky monoklonální protilátce modulující aktivitu NK buněk. Mezi NKRP1 je řazen polymorfní antigen NK1.1 (NKRP1C), známý sérologický marker NK buněk myšičího kmene C57BL/6, který je schopen identifikovat i některé jiné myšičí kmeny¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Myšičí receptory NKRP1A, C a F mají v intracelulární doméně motiv ITAM a v transmembránové části molekuly obsahují kladně nabitý arginin, kterým asociují s adaptorovou molekulou FcεRIγ, tyto molekuly jsou tedy aktivačními receptory¹⁰⁸. Naopak inhibičními receptory u myši jsou NKRP1B a D (jehož gen je alelou NKRP1B), mající v intracelulární doméně motiv ITIM^{109, 110}. NKRP1E je pravděpodobně pseudogenem, tj. jeho gen není již v buňce přepisován, ale je příbuzný jiným funkčním genům. Ligandy pro rodinu myšičích NKRP1 jsou molekuly z rodiny Clr (*C-type lectin-related molecule*), což jsou orthology lidské CLEC2 rodiny¹⁰⁴.

Doposud byla v lidském NKC nalezena jen jediná molekula z rodiny NKRP1, a to NKRP1A (hNKRP1), tvořící receptor-ligandový pár NKRP1A-LLT1, avšak na základě studií geneticky vázaných receptor-ligandových párů v NKC je navrženo, aby byly do rodiny NKRP1 připojeny i lidské receptory NKp80 a NKp65, tvořící receptor-ligandové páry NKp80-AICL a NKp65-KACL, a to vzhledem k několika následujícím charakteristikám: (1) jedná se o geneticky pevně spojené receptor-ligandové páry, (2) v rámci receptorů lidské CLEC2 rodiny (AICL, KACL a LLT1) a myšičích molekul Clr byly nalezeny specifické sekvence pro tyto receptory, (3) přítomnost amino-terminálního tyrosinu 7 v intracelulárních doménách rodiny receptorů NKRP1 (NKp80, NKp65 a NKRP1A) a většiny myšičích receptorů NKRP1 umožňujících signalizaci¹⁰⁴. Proto jsou i

v rámci této bakalářské práce receptory NKp80 a NKp65 zařazeny do rodiny receptorů NKRP1.

1.5.7.1 Receptor NKRP1A

Molekula NKRP1A (CD161) je tedy prozatím jediným plně uznaným receptorem rodiny NKRP1 u člověka. Její aminokyselinová sekvence je ze 46 % homologní s myším NKRP1. NKRP1A je kódován genem KLRB1, který se nachází na centromerickém konci lidského NKC¹⁰⁸. NKRP1A je exprimován na NK buňkách a na T lymfocytech⁴¹. Ačkoliv v intracelulární doméně NKRP1A nebyl nalezen motiv ITIM, spojení s jeho ligandem LLT1 (kap. 1.5.8.1) způsobuje inhibici cytotoxické aktivity NK buněk¹¹¹⁻¹¹³.

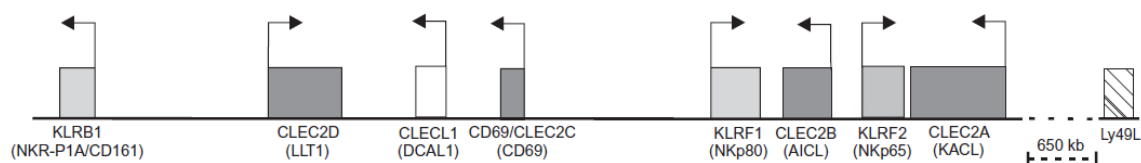
1.5.7.2 Receptor NKp80

Receptor NKp80 je kódován genem KLRF1 (*killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1*) v NKC. Mohlo by se jednat o aktivační protiklad NKRP1A. Byl objeven v roce 2001, jedná se o disulfidický homodimer o přibližné velikosti 80 kDa a nachází se na všech zralých leukocytech, NK buňkách, NKT buňkách a T lymfocytech^{114, 115}. V transmembránové doméně neobsahuje žádné nabitě aminokyselinové zbytky. V doméně intracelulární nebyl nalezen ani motiv ITAM ani motiv ITIM, avšak po objevení motivu hemITAM (tj. DEDGYxxL, kde x představuje libovolnou aminokyselinu) v cytoplazmatické doméně NKp65 (kap. 1.5.7.3) byla tato sekvence objevena i u NKp80¹¹⁶. Jeho přirozeným ligandem je receptor AICL z CLEC2 rodiny (kap. 1.5.8.3)¹¹⁷.

1.5.7.3 Receptor NKp65

NKp65 je nedávno objevený receptor, který je kódován genem KLRF2 (*killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 2*) v NKC (Obr. 1.4 na str. 25). Je složený z šesti exonů v rozpětí více než 15 kbp a je lokalizován mezi geny CLEC2B a CLEC2A. Byl objeven J. Spreu a jejími kolegy v roce 2010. Jedná se o transmembránový glykoprotein II. typu o molekulové hmotnosti přibližně 32 kDa tvořený 207 aminokyselinami. Jeho CTLD doména má podobný motiv jako ostatní členové lidských CTLD receptorů, největší podobnost byla pozorována s NKp80. NKp65 byl první z NK buněčných receptorů, u kterého byla nalezena tzv. hemITAM sekvence v cytoplazmatické doméně, dříve známá jen u receptorů myeloidní linie. Je tedy zřejmé, že NKp65 je aktivační imunoreceptor.

Znalost jeho fyziologie je prozatím omezená. NKp65 není pravděpodobně exprimován hematopoetickými buňkami, protože jeho obsah v lidské periferní krvi je velmi malý. NKp65 je nedisulfidický homodimer umožňující aktivaci NK buněčné cytotoxicity a produkci cytokinů. NKp65 má vysokou afinitu ke KACL (11 nM dle SPR), tudíž bylo usouzeno, že se jedná o receptor-ligandový pár (kap. 1.5.8.4). Pro interakci NKp65 s KACL byla stanovena poměrně vysoká interakční konstanta ($K_D \sim 0,01 \mu\text{M}$ při 25 °C), která je přibližně 400 x větší než pro pár NKp80/AICL¹¹⁸.



Obr. 1.4: NKp65 je kódován v NKC genem KLRF2 sousedícím s geny CLEC2A a CLEC2B.

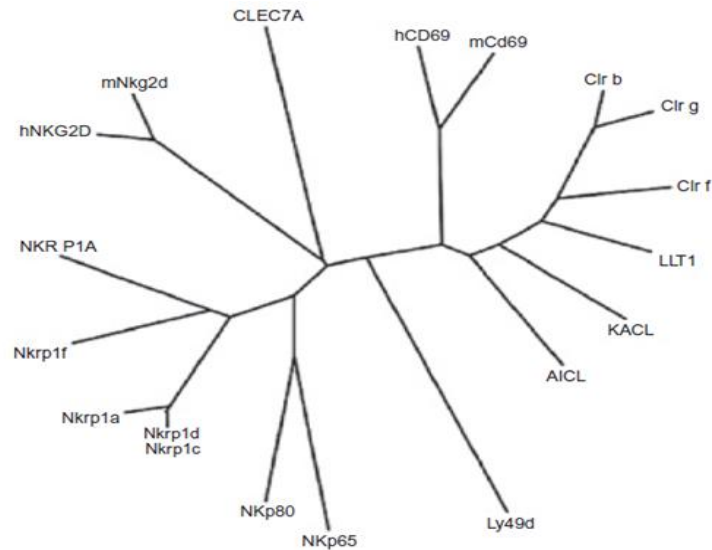
Obdélníky představují geny pro rodiny CLEC2 (tmavě šedá) a NKRP1 (světle šedá) a šipky naznačují směr transkripce¹¹⁸.

1.5.7.4 Receptor S1P1

Sfingosin-1-fosfátový receptor 1 (S1P1) patří do rhodopsinové rodiny receptorů spřažené s G proteinem (GPCRs, *G-protein coupled receptors*). S1P1 se řadí do podrodiny původně nazvané EDG (*endothelial differentiation gene*). Tato podrodina byla přejmenována na S1P, po zjištění, že ligandem pro receptory této podrodiny je sfingosin-1-fosfát¹¹⁹. Receptor S1P1 hraje důležitou roli v uvolňování T a B lymfocytů¹²⁰. S1P1 tvoří komplex s CD69 (kap. 1.5.8.2), který S1P1 negativně reguluje a dochází k zadržování lymfocytů v lymfoidních orgánech¹²¹.

1.5.8 Receptory CLEC2 rodiny

Geny pro receptory CLEC2 rodiny se nacházejí v lidském NKC na chromozomu 12, tato skupina zahrnuje CLEC2A (KACL), CLEC2B (AICL), CLEC2C (hCD69) a CLEC2D (LLT1). Myší rodina receptorů CLEC2 pak obsahuje molekuly z rodiny Clr, kterými jsou Clr-b, Clr-g, Clr-f a mCD69. Tyto jednotlivé receptory slouží jako ligandy pro rodinu receptorů NKRP1 (Obr. 1.5 na str. 26)¹⁰⁴. Receptory CLEC2 byly objeveny jak na NK buňkách, B a T lymfocytech, tak na buňkách myeloidního původu^{109, 122, 123}.



Obr. 1.5: Evoluční strom rodiny receptorů NCRP1 a CLEC2 u člověka a myši.

Tento fylogenetický evoluční strom znázorňuje určité podobnosti mezi členy rodiny receptorů NCRP1 a CLEC2 u člověka a myši. Byl sestaven na základě analýzy sekvencí jednotlivých CTLD domén. NKG2D, CLEC7A a Ly49d jsou uvedeny pro srovnání¹¹⁸.

1.5.8.1 Receptor LLT1

Molekula LLT1 (*lectin-like transcript-1*) je ligandem pro receptor NCRP1A. LLT1 je exprimován na NK buňkách, dendritických buňkách a B lymfocytech¹²⁴ a je kódován genem CLEC2D, který se v NKC nachází přibližně 60 kbp od genu KLRB1^{111, 112}.

1.5.8.2 Receptor CD69

CD69 je jeden z prvně popsanych receptorů nacházejících se v NKC, je kódován genem CLEC2C¹²⁵⁻¹²⁷. Jedná se o disulfidický homodimer, který je exprimován krátce po aktivaci lymfocytů (T a B lymfocytů, NK buněk, makrofágů, neutrofilů, eozinofilů atd.), proto je využíván jako marker jejich aktivace¹²⁸.

1.5.8.3 Receptor AICL

Receptor AICL (*activation-induced C-type lectin*) je kódován genem CLEC2B v NKC. Geny KLRF1 a CLEC2B se nacházejí jen 7 kbp od sebe v orientaci ocas k ocasu¹²³. AICL je disulfidický homodimer, který je exprimován B a T lymfocyty, NK buňkami i buňkami myeloidního původu. Vytvořením receptor-ligandového páru NKp80-

AICL je stimulována sekrece IFN- γ , cytotoxická aktivita NK buněk a podpořena imunitní odpověď během časných fází infekce i během chronických zánětů^{117, 118, 129}.

1.5.8.4 Receptor KACL

Lektinový receptor KACL (*keratinocyte-associated C-type lectin*) je doposud posledním nalezeným členem lidské CLEC2 rodiny, který je kódován genem CLEC2A v NKC. Tento transmembránový glykoprotein II. typu byl objeven J. Spreu a jejími kolegy v roce 2007 a byl připojen do této skupiny na základě podobnosti s ostatními členy CLEC2 rodiny. Byly pozorovány podobné motivy aminokyselinových sekvencí jejich CTLD domén. Porovnáním těchto sekvencí bylo zjištěno, že největší podobnost má KACL s LLT1, následně s CD69 a nejméně s AICL. Gen CLEC2A, který je lokalizován mezi CLEC2B (AICL) a CLEC12A (M1CL), je složen z pěti exonů oddělených čtyřmi dlouhými introny v rozpětí přibližně 33,7 kbp. KACL je exprimován hematopoetickými buňkami převážně myeloidního původu. Je to nedisulfidický homodimer o velikosti kolem 30 kDa a nachází se v malém množství v mononukleárních buňkách periferní krve, kostní dřeni, slezině, vaječníku a varlatech, největší zastoupení má však na kůži v keratinocytech. KACL je schopen stimulovat cytotoxicitu lidských NK92MI buněk^{118, 130}. V roce 2008 byla jinou skupinou nezávisle objevena transmembránová molekula PILAR (*proliferation-induced lymphocyte-associated receptor*, označena také jako CLEC2A), o které se předpokládalo, že se jedná o druhý ligand pro receptor NKRP1A¹³¹, nyní již víme, že se namísto toho váže na receptor NKp65^{118, 132}.

2. CÍL PRÁCE

- příprava expresních vektorů kódujících geny pro receptor NKp65 a jeho ligand KACL
- rekombinantní příprava a purifikace proteinů NKp65 a KACL
- ověření velikosti a oligomerního stavu připravených proteinů

3. MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	AND, USA
Aparatura pro filtraci	Sigma-Aldrich, Německo
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	H+P Labortechnik GmbH, Německo
Automatické pipety Discovery	HTL, Polsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12 R	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	Corning, UK
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570	SONY, Japonsko
Hemocytometr	Sigma-Aldrich, Německo
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, USA
HPLC systém AKTAbasic	GE Healthcare, USA
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Německo
Kahan	Závod Votice, ČR
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Koncentrátory Amicon Ultra 10000	Millipore, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	P-LAB, ČR
Laminární box Clean Air Techniek B.V.	PMV, Belgie
Lednice 225 R (4 °C)	Calex, ČR
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, USA
Mrazicí box (-20 °C)	Calex, ČR
Mrazicí box (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
Nosič pro chromatografii Talon	Clontech, USA
pH metr ino Lab	Schoeller, Německo
Plastik pro tkáňové kultury	TPP, Švýcarsko
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo

PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxi kit	<i>Invitrogen, USA</i>
Rotační vak. odparka SpeedVac DNA 110	<i>Savant, USA</i>
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Biokeystone, USA</i>
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Spektrofotometr NanoVue Plus	<i>GE Healthcare, UK</i>
Termoblok LS1	<i>VLM, Německo</i>
Termocykler 0,5 ml x 20	<i>Techne, UK</i>
Termocykler 0,2 ml x 25	<i>Techne, UK</i>
Termostat LS1	<i>VLM, Německo</i>
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	<i>Gallenkamp, Německo</i>
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	<i>Uvitec, UK</i>
UV prosvěcovací lampa (300 nm)	<i>Ultra-Lum, USA</i>
UV/VIS spektrometr UV2 Series	<i>Unicam, UK</i>
Vařič	<i>ETA, ČR</i>
Vodní lázeň	<i>Memmert, Německo</i>
Vodní lázeň TW2	<i>Julabo, Německo</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>
Zdroj napětí PS 251-2	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

3.2 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly minimálně čistoty p.a.

Agar	<i>Oxoid, UK</i>
Agarosa	<i>Sigma, USA</i>
Akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
Ampicilin	<i>Biotika, Slovensko</i>
Azid sodný	<i>Serva, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
BSA	<i>New England Biolabs, USA</i>
Combi PPP Master Mix	<i>Top-Bio, ČR</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, USA</i>
Činidlo dle Bradfordové	<i>Bio-Rad, Německo</i>

DMSO	<i>Sigma, USA</i>
dNTPs	<i>Top-Bio, ČR</i>
DTT	<i>Serva, USA</i>
EDTA	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
ExCELL293 médium	<i>Sigma, USA</i>
F17 médium	<i>Gibco, USA</i>
Glutamin	<i>Sigma, USA</i>
Glycin	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
GoodView	<i>Ecoli, Slovensko</i>
Kifunensin	<i>Cayman, Estonsko</i>
MgSO ₄	<i>New England Biolabs, USA</i>
PCR H ₂ O	<i>Top-Bio, ČR</i>
PEI 25 kDa lineární	<i>Polysciences, USA</i>
Penicilin	<i>Sigma, USA</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Standard pro agarosovou elektroforézu	<i>New England Biolabs, USA</i>
Standard pro SDS-PAGE	<i>Serva, USA</i>
Streptomycin	<i>Sigma, USA</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
ThermoPol pufr, 10× konc.	<i>New England Biolabs, USA</i>
Tris	<i>Roth, Německo</i>
Triton X-100	<i>Serva, USA</i>
Trypton	<i>Oxoid, Anglie</i>
Trypton N1	<i>Organotechnie, Francie</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

3.3 Enzymy

AgeI	<i>New England Biolabs, USA</i>
Deep Vent DNA polymerasa	<i>New England Biolabs, USA</i>
KpnI	<i>New England Biolabs, USA</i>
Lysozym	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
RNasa A	<i>Serva, USA</i>
T4 DNA ligasa	<i>New England Biolabs, USA</i>

3.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie

E. coli: DH5 α

RNDr. Marek Ingr, Ph.D., PřF UK Praha, ČR

HEK293T

A. Radu Aricescu, University of Oxford, UK

3.5 Vektory

pTT28 (1 μ g/ μ l)

Y. Durocher, CNRC Montreal, Kanada

pGH_KACL_1

Generay Biotechnology, Shanghai, Čína

pGH_NKp65_1

Generay Biotechnology, Shanghai, Čína

3.6 Primery pro PCR

KACL_2_A47_FW

5´-AAAAAAACCGGTCACCACCATCACCATCACGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGCCACCT
GGTCCAAGCAC-3´

KACL_2_L174_REV

5´-TTTTTTGGTACCTCACAGGAAATACTTGGGCTTGCTACA-3´

NKp65_2_K54_FW

5´-AAAAAAACCGGTCACCACCATCACCATCACGAAAACCTGTATTTTCAGGGAAAATTTT
GGCACAAAAGATGGACTTCAGC-3´

NKp65_2_V207_REV

5´-TTTTTTGGTACCTCACACGCCGGAAGTGCCGTT-3´

pTT28_FW

5´-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3´

pTT28_REV

5´-TATGTGGTTCCGAGTGAGAG-3´

3.7 Roztoky a média

- **AA:** 29 % akrylamid, 1 % N,N'-metylen-bis-akrylamid
- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 % CBB R-250
- **DMEM/F17 médium:** byla použita směs DMEM média¹³³ připraveného Bc. Romanou Čuperkovou a F17 média v poměru 1:1
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE – 10 x koncentrovaný:** 3 % Tris, 14,4 % glycin, 1 % SDS, pH = 8,3
- **ExCELL293 médium:** zakoupeno hotové médium (*Sigma*, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsl. konc. 4 mM)
- **F17 médium:** zakoupeno hotové médium (*Gibco*, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsl. konc. 4 mM) a Pluronic F-68 (výsl. konc. 0,1 %)
- **LB agar s ampicilinem:** 1,5 % agar v LB médiu, 100 µg/ml ampicilinu
- **LB médium:** 1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH = 7,4
- **NEB1 pufr – 1 x koncentrovaný:** 10 mM bis-Tris-propan, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH = 7,0 (*New England Biolabs*, USA)
- **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35 % ethanol, 10 % CH₃COOH
- **PBS pufr:** 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH = 7,0
- **PBS pufr s imidazolem:** 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 250 mM imidazol, pH = 7,0
- **PBS-TK pufr:** 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH = 7,0
- **PCR pufr – ThermoPol, 1x konc.:** 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton[®] X-100, pH = 8,8 (*New England Biolabs*, USA)
- **Pufr pro agarosovou elektroforézu – TAE pufr, 1x konc.:** 40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA
- **Pufr pro gelovou chromatografii – HEPES pufr:** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH = 7,0
- **Pufr pro T4 DNA ligasu – 1x konc.:** 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, pH = 7,5 (*Fermentas*, Kanada)
- **Roztok L1:** NaClO₄, octan sodný, TBE (*Genomed*, Německo)
- **Roztok L2:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris (*Genomed*, Německo)
- **STOP pufr:** 30 % glycerol, bromfenolová modř, TE pufr

- **TE pufr:** 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH = 8,0
- **TES pufr:** 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH = 8,0
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující – 2× konc.:** 100 mM Tris, 20 % glycerol, 4 % SDS, 0,2 % bromfenolová modř, pH = 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující – 2× konc.:** 100 mM Tris, 20 % glycerol, 4 % SDS, 0,2 % bromfenolová modř, 100 mM DTT, pH = 6,8
- **PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxi Kit (Invitrogen, USA):**
 - Roztok E4** (eluční pufr): 100 mM Tris-HCl (pH = 8,5), 1,2 M NaCl
 - Roztok EQ1** (ekvilibrační pufr): 0,1 M octan sodný (pH = 5,0), 0,6 M NaCl, 0,15 % (v/v) Triton® X-100
 - Roztok L7** (lyzační pufr): 0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS
 - Roztok N3** (neutralizační pufr): 3,1 M octan draselný, pH = 5,5
 - Roztok R3** (resuspenzní pufr): 50 mM Tris (pH = 8,0), 10 mM EDTA, 20 mg/ml RNasa A
 - Roztok W8** (promývací pufr): 0,1 M octan sodný (pH = 5,0), 825 mM NaCl

4. METODY

4.1 PCR amplifikace

Pro přípravu konstruktu NKp65_2 (P2) byly paralelně provedeny dvě reakce. Pro každou z nich bylo smícháno 5 μ l PCR pufru (10 \times konc.), 1,5 μ l 10 mM dNTPs, 1,5 μ l 100 mM MgSO₄, 5 μ l 5 μ M přímého primeru, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru, 3 μ l 10ng/ μ l templátu (Tab. 4.1 na str. 36) a 0,5 μ l Deep Vent DNA polymerasy. Do první zkumavky bylo přidáno 1,5 μ l DMSO a 24 μ l PCR H₂O a do druhé zkumavky byly přidány 3 μ l DMSO a 22,5 μ l PCR H₂O. PCR proběhla v termocykleru, zvoleny byly následující cykly:

- 1) 5 minut – 94 °C
- 2) 30 cyklů: 30 sekund – 94 °C → 30 sekund – 48 °C → 1 minuta – 72 °C
- 3) 10 minut – 72 °C

Pro konstrukt KACL_2 (K2) byly také provedeny dvě reakce. Pro každou z nich bylo smícháno 5 μ l PCR pufru (10 \times konc.), 1,5 μ l 10 mM dNTPs, 1,5 μ l 100 mM MgSO₄, 5 μ l 5 μ M přímého primeru, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru, 1 μ l 10ng/ μ l templátu (Tab. 4.1 na str. 36) a 0,5 μ l Deep Vent DNA polymerasy a do jedné ze zkumavek bylo přidáno 1,5 μ l DMSO a 29 μ l PCR H₂O, do druhé zkumavky 3 μ l DMSO a 27,5 μ l PCR H₂O. PCR proběhla v termocykleru, zvoleny byly následující cykly:

- 1) 5 minut – 94 °C
- 2) 30 cyklů: 30 sekund – 94 °C → 30 sekund – 52 °C → 1 minuta – 72 °C
- 3) 10 minut – 72 °C

Následně byla teplota v termocykleru snížena na 4 °C až do doby, kdy byly zkumavky vyjmuty. Výsledné produkty byly detekovány pomocí agarosové elektroforézy. Vzorek byl vždy připraven smícháním 5 μ l PCR produktu a 1 μ l STOP pufru.

Tab. 4.1: Amplifikace konstruktů KACL_2 a NKp65_2.

V tabulce jsou uvedeny dvojice primerů, které byly použity pro přípravu konstruktů K2 a P2 z konstruktů K1, resp. P1, sloužících jako templát. K1 a P1 byly synteticky vyrobeny tak, aby je ohraničovala restriční místa AgeI a KpnI nezbytná pro následné vložení do plazmidu pTT28.

Konstrukt	Přímý primer	Reverzní primer	Templát
KACL_2 (K2)	KACL_A47_FW	KACL_L174_REV	pGH_KACL_1
NKp65_2 (P2)	NKp65_K54_FW	NKp65_V207_REV	pGH_NKp65_1

4.2 Agarosová elektroforéza

Gel pro agarosovou elektroforézu byl připraven rozpuštěním 0,65 g agarosy v 65 ml TAE pufru. Tato směs byla 2 minuty povařena a ponechána zchladnout asi na 40-50 °C. Následně byly do této směsi přidány 3 µl barvy GoodView a směs byla nalita do vaničky elektroforetické aparatury a ihned byl vložen hřeben pro vytvoření jamek pro vzorky. Po ztuhnutí gelu byl gel zalit dH₂O, k elektrodám byl nalit TAE pufr a do jednotlivých jamek byly pipetovány zkoumané vzorky a standard. Elektroforéza probíhala 15 minut při 200 V. Pro vizualizaci DNA bylo použito UV záření vlnové délky 312 nm.

4.3 Příprava inzertů

Pro přípravu inzertů K1 a P1 bylo smícháno vždy 10 µl roztoku příslušného neředěného plazmidu pGH_KACL_1, resp. pGH_NKp65_1 s 2 µl NEB1 pufru (10× konc.), 2 µl BSA (c = 10 µg/µl), 0,5 µl enzymu AgeI, 0,5 µl enzymu KpnI a 5 µl dH₂O. Směs byla inkubována 30 minut při teplotě 37 °C ve vodní lázni.

Pro přípravu inzertů K2 a P2 byly nejprve PCR produkty přesráženy ethanolem v kyselém prostředí. K 50 µl reakce bylo přidáno 125 µl 100% ethanolu a 5 µl 3M octanu sodného, inkubováno 30 min při -20 °C a centrifugováno 15000 × g, 1 min. Supernatant byl opatrně odstraněn pipetou a peleta opláchnuta 100 µl 70% ethanolu, opět centrifugován, supernatant byl opět opatrně odstraněn pipetou, pelet vysušen na vzduchu při laboratorní teplotě a nakonec rozpuštěn v 15 µl dH₂O. Následně bylo přidáno vždy 2 µl NEB1 pufru (10× konc.), 2 µl BSA (c = 10 µg/µl), 0,5 µl enzymu AgeI a 0,5 µl enzymu KpnI. Směs byla promíchána a inkubována 30 minut při teplotě 37 °C ve vodní lázni.

4.4 Preparativní elektroforéza

Po restriční reakci bylo k 20 μl roztoku vždy přidáno 5 μl STOP pufru a takto připravený vzorek byl nanesen do jamky agarosového gelu (viz odstavec 4.2). Výsledek byl detekován pod UV lampou a část gelu, která obsahovala inzert, byla vyříznuta a přenesena do 1,5 ml mikrozkuhavky.

4.5 Přečištění inzertů

Inzerty byly přečištěny pomocí soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit za použití návodu od dodavatele. K části vyříznutého gelu bylo přidáno 500 μl roztoku L1 na každých 100 mg gelu. Následovala inkubace po dobu 15 minut při teplotě 50 °C, každé 3 minuty byl vzorek protřepán. Vzorek byl poté pipetou nanesen na kolonku vloženou do mikrozkuhavky a centrifugován při 14000 \times g 1 minutu. Roztok z mikrozkuhavky byl odstraněn. Následně byla kolonka promyta 500 μl roztoku L2 a centrifugována dvakrát při 14000 \times g 1 minutu. Kolonka byla vložena do čisté mikrozkuhavky a DNA byla eluována 50 μl dH₂O přehřáté na 70 °C, vzorek byl centrifugován při 14000 \times g 2 minuty.

4.6 Ligace inzertů do vektoru pTT28

Ligační směs byla připravena smícháním 1 μl pufru pro T4 DNA ligasu (10 \times konc.), 1 μl T4 DNA ligasy, 4 μl 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ plazmidu pTT28 linearizovaného enzymy AgeI a KpnI (připravený plazmid poskytl Mgr. Jan Bláha), 13 μl inzertu a 1 μl dH₂O. Ligační reakce probíhala 30 minut za laboratorní teploty.

4.7 Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* tepelným šokem

Kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5 α byly ponechány roztát na ledu přibližně po dobu 30 minut. Ke každé ligační směsi bylo na ledu přidáno 100 μl těchto buněk. Směs byla 30 minut inkubována na ledu, následně ponořena do vodní lázně o teplotě 42 °C na právě 1 minutu a vrácena na led. Poté byl ke směsi přidán 1 ml sterilního LB média a směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C, poté centrifugována při 1500 \times g 5 minut a většina supernatantu byla odstraněna. Ve zbývajícím supernatantu o objemu 100-200 μl byla vzniklá peleta resuspendována a nanesená na Petriho misku obsahující tuhý LB agar

s ampicilinem. Petriho misky s nanesenými bakteriemi byly inkubovány 17 hod při 37 °C. Následně byly Petriho misky s narostlými koloniemi uchovávány v chladničce při 4 °C.

4.8 Selektce klonů

Od každého konstruktů bylo vybráno šest kolonií. Každá kolonie byla odebrána pipetou a resuspendována v 10 µl zásobního roztoku (viz odstavec 4.9) v PCR zkumavce. Stejná špička pipety obsahující výslednou suspenzi byla použita pro zaočkování 5 ml LB média s ampicilinem v 50 ml zkumavce s víčkem. Zkumavky byly třepány rychlostí 220 ot/min po dobu 6 hodin při 18 °C, 14 hodin při 37 °C a poté při 4 °C do vyzvednutí.

4.9 PCR z kolonií

Byl připraven zásobní roztok obsahující 150 µl PCR H₂O, 50 µl 5 µM přímého primeru pTT_FW a 50 µl 5 µM reverzního primeru pTT_REV. Do každé PCR zkumavky bylo pipetováno 10 µl uvedeného zásobního roztoku, z Petriho misky byla pipetou odebrána kolonie, která byla v tomto roztoku resuspendována (viz odstavec 4.8), a následně bylo přidáno 10 µl 2× konc. Combi PPP Master Mix směsi. PCR proběhla v termocykleru, zvoleny byly následující cykly:

- 1) 5 minut – 94 °C
- 2) 30 cyklů: 30 sekund – 94 °C → 30 sekund – 50 °C → 1 minuta – 72 °C
- 3) 10 minut – 72 °C

Následně byla teplota v termocykleru snížena na 4 °C až do doby, kdy byly zkumavky vyjmuty. Produkty byly detekovány pomocí agarosové elektroforézy (viz odstavec 4.2).

4.10 Izolace plazmidové DNA

Vybrané bakteriální kultury byly centrifugovány při 14000 × g 30 sekund při 20 °C. Ze vzniklé pelety byla izolována plazmidová DNA pomocí komerčně dodávané soupravy High-Speed Plasmid Mini Kit. Do mikrozkušavky s peletou bylo přidáno 200 µl PD1 pufru obsahujícího RNasu A a buněčná peleta byla resuspendována na vortexovém mixéru. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 200 µl PD2 pufru, směs byla opatrně promíchána a byla 5 minut inkubována při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 300 µl PD3 pufru, směs

byla opatrně promíchána a centrifugována při $14000 \times g$ 3 minuty při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl převeden na kolonku vloženou do mikrozkušavky a centrifugován při $14000 \times g$ 30 sekund při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na kolonku bylo pipetováno $400\ \mu\text{l}$ W1 pufru, kolonka byla centrifugována při $14000 \times g$ 30 sekund při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté bylo na kolonku pipetováno $600\ \mu\text{l}$ Wash pufru a kolonka byla centrifugována při $14000 \times g$ 30 sekund při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla kolonka naprázdno centrifugována pro odstranění zbytkového Wash pufru. Kolonka byla vložena do nové sterilní mikrozkušavky a bylo na ni pipetováno $50\ \mu\text{l}$ dH_2O o teplotě $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se kterou byla inkubována po dobu 2 minut. Následovala centrifugace při $14000 \times g$ 2 minuty při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a spektrofotometrem NanoVue byla změřena koncentrace plazmidů.

4.11 Sekvenování DNA

Sekvence získaných plazmidů byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK. Pro další práci byly vybrány klony, u kterých nebyla nalezena žádná chyba v nukleotidové sekvenci.

4.12 Příprava zásobního množství plazmidu

Pro přípravu zásobního množství plazmidu byla provedena transformace kompetentních buněk *E. coli* kmene DH5 α vybranými plazmidy. Bylo přidáno vždy $5\ \mu\text{l}$ izolovaného plazmidu (viz odstavec 4.10) k $50\ \mu\text{l}$ těchto buněk a transformace dále probíhala dle postupu uvedeného v odstavci 4.7. Po inkubaci bylo na každou Petriho misku obsahující bakteriální kolonie pipetováno 2-3 ml LB média, v němž byly bakterie resuspendovány a poté převedeny do 0,5 l LB média s ampicilinem. Kultury byly třepány 220 ot/min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 12 hodin a až do následujícího zpracování chlazeny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly centrifugovány při $4500 \times g$ 15 minut při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelety byly resuspendovány ve 40 ml TES pufru a následně centrifugovány při $10000 \times g$ 5 minut při $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.13 Izolace zásobního množství plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA byla použita komerčně dodávaná souprava PureLinkTM HiPure Plasmid DNA Maxi. Jednotlivé kroky byly prováděny podle návodu dodavatele. K bakteriální peletě bylo přidáno 8 ml R3 pufru obsahujícího RNasu A a peleta byla resuspendována na vortexovém mixéru. Následně bylo přidáno 8 ml L7 pufru, suspenze byla mírně promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo

k lyzátu přidáno 8 ml N3 pufru a celá směs byla okamžitě promíchána převrácením. Směs byla centrifugována při $15000 \times g$ 10 minut při laboratorní teplotě. Během této doby byla připravena kolona, která byla promyta 30 ml EQ1 pufru. Supernatant vzniklý při centrifugaci byl nanesen na kolonu. Kolona byla promyta dvakrát 30 ml W8 pufru. Pod kolonu byla vložena čistá eluční zkumavka a plazmidová DNA byla z kolony eluována 15 ml E4 pufru. Následně byl změřen objem v eluční zkumavce a byl přidán isopropanol v množství 10,5 ml na 15 ml vzorku. Následně byla směs ponechána v mrazicím boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do následujícího dne. Sraženina byla poté centrifugována při $15000 \times g$ 30 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odstraněn, peleta byla opláchnuta 5 ml 70 % ethanolu a opět centrifugována při $15000 \times g$ 5 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odstraněn a peleta byla ponechána 10 minut vyschnout na vakuové odparce a rozpuštěna v 1 ml sterilní dH_2O .

4.14 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Byla měřena absorbance roztoků při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Bylo pipetováno 10 μl vzorku do celkového objemu 3 ml dH_2O . Koncentrace DNA byla vypočítána z empirického vztahu, který říká, že roztok dvouvláknové DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ má absorbanci při 260 nm rovnu jedné a že u čisté DNA je poměr absorbancí A_{260}/A_{280} roven 1,8.

4.15 Velkoobjemová produkce proteinů

Buňky HEK293T rostoucí ve 400 ml ExCELL293/F17 média byly spočítány a byl odebrán takový objem suspenze, aby jedné produkci odpovídalo 439 milionů buněk. Buňky byly centrifugovány třikrát ve čtyřech 50 ml zkumavkách při $200 \times g$ 5 minut. Buněčné pelety byly resuspendovány ve 4×25 ml média DMEM/F17. Následně bylo pipetováno 20 ml této suspenze do každé ze čtyř 1 l čtverhranných lahví. Transfekční směs byla připravena vždy tak, aby v každé produkci bylo 439 μg plazmidu. Bylo smícháno příslušné množství plazmidu s 10 ml PBS-TK pufru a tato směs byla zfiltrována přes 0,22 μm sterilní filtr injekční stříkačkou do čisté zkumavky. Poté bylo přidáno 1,32 ml sterilního roztoku IPEI (1 mg/ml v PBS-TK), směs byla protřepána a inkubována 15 minut za laboratorní teploty. Tato směs byla přidána k buněčné suspenzi, která byla doplněna do celkového objemu 200 ml médiem DMEM/F17 a směs byla poté inkubována 4 hodiny při 135 ot/min na třepače v inkubátoru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5 % CO_2 . Poté bylo přidáno 200 ml

ExCELL293 média, 3 ml roztoku antibiotik (penicilin a streptomycin, oba 10 mg/ml v dH₂O) a do produkce transfekované plazmidem pTT28_K1 bylo přidáno ještě 400 µl kifunensinu (1 mg/ml v dH₂O). Po 48 hodinách bylo přidáno 10 ml roztoku tryptonu N1 (20 % v F17 médiu). Transfekovaná buněčná kultura byla inkubována na třepačce při 135 ot/min 5 dní při 37 °C, 5 % CO₂. Poté bylo produkční médium centrifugováno při 13000 × g 30 minut při laboratorní teplotě a ihned dále zpracováno.

4.16 Chelatační chromatografie

Pro chelatační chromatografii byl použit nosič nabitý kobaltnatými ionty (TALON Metal Affinity Resin, Clontech, USA), který byl promyt destilovanou vodou a PBS pufrem. Médium z produkce bylo zfiltrováno přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm, poté byl přidán PBS pufr v poměru 1:1 a do této směsi byl přidán nosič v poměru 2-3 ml nosiče na 400 ml produkčního média. Směs byla třepána v 2 l Erlenmeyerových láhvích při 110 ot/min 60 minut za laboratorní teploty. Suspenze byla převedena na kolonu s fritou, po zachycení nosiče byla kolona promyta PBS pufrem. Eluce byla provedena 2 × 3 ml a 1 × 2 ml PBS s 250 mM imidazolem.

4.17 Zkoncentrování proteinů

Pro zkoncentrování frakcí bylo použito koncentrátorů Amicon Ultra obsahujících membránu propustnou pro molekuly o M_r < 10000. Frakce byly centrifugovány při 4500 × g za laboratorní teploty a zkoncentrovány na objem přibližně 200 µl. Koncentrátory byly před i po použití promyty destilovanou vodou, ve které byly také uchovávány, aby membrána nevysychala.

4.18 Gelová permeační chromatografie

HPLC systém byl nejprve promyt destilovanou vodou, následně byla připojena kolona Superdex 200 10/300 GL při průtoku 0,5 ml/min a nastaveném tlakovém limitu 1,5 MPa. Kolona byla promyta destilovanou vodou, 1 M NaOH, opět destilovanou vodou a HEPES pufrem pro gelovou chromatografii. Zkoncentrovaný eluát z chelatační chromatografie byl nastříknut na ekvilibrovanou kolonu a byly jímány frakce.

4.19 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla orientačně stanovena metodou dle Bradfordové. Stanovení bylo prováděno po chelatační chromatografii i po gelové permeační chromatografii. Pro stanovení byla použita 96ti jamková destička, po chelatační chromatografii bylo pipetováno 20 μ l roztoku proteinu a bylo přidáno 200 μ l činidla dle Bradfordové. Směs byla ponechána 5 minut inkubovat za laboratorní teploty. Po gelové chromatografii bylo smícháno 5 μ l roztoku proteinu a 200 μ l činidla dle Bradfordové, směs byla opět ponechána 5 minut inkubovat za laboratorní teploty. Pomocí kalibrační řady připravené z roztoků BSA v rozmezí koncentrací 0-1 mg/ml byla vizuálně stanovena koncentrace proteinu.

4.20 SDS elektroforéza

Frakce jímané při gelové chromatografii obsahující stejný protein byly smíchány, zkoncentrovány na objem 500 μ l pomocí koncentrátorů Amicon Ultra (viz odstavec 4.17) a analyzovány pomocí SDS elektroforézy.

Byl připraven 15 % separační gel pipetováním 1,8 ml dH₂O, 4 ml 30 % AA, 2 ml 1,5 M Tris o pH = 8,8, 80 μ l 10 % SDS, 80 μ l 10 % APS a 4 μ l TEMED. Zaostřovací gel byl připraven pipetováním 1,4 ml ddH₂O, 0,5 ml 30 % AA, 0,25 ml 1 M roztoku Tris o pH = 6,8, 20 μ l 10 % SDS, 20 μ l 10 % APS a 3 μ l TEMED. Uvedená množství vystačí pro přípravu 2 gelů.

Redukující vzorek pro SDS elektroforézu byl připraven smícháním 20 μ l roztoku proteinu s 20 μ l 2 \times konc. redukujícího vzorkového pufru a neredukující vzorek pro SDS elektroforézu byl připraven smícháním 20 μ l roztoku proteinu s 20 μ l 2 \times konc. neredukujícího pufru. Vzorky byly 5 minut povařeny a odstředěny na stolní centrifuze. Z připravených vzorků bylo na gel nanášeno vždy 10 μ l společně s 5 μ l standardu. Elektroforéza probíhala při 200 V po dobu 45 minut. Po skončení elektroforézy byl gel barven 10 minut v barvicí lázni a následně ponechán odbarvit v odbarvovací lázni do úplného odbarvení.

5. VÝSLEDKY

5.1 Příprava expresních vektorů

Pro každý z proteinů byl nejprve navržen jeden konstrukt na základě předpokládaného rozložení jednotlivých domén a přítomnosti cysteinů v primární struktuře proteinů KACL a NKp65 (Obr. 5.1).

KACL: MINPELRDGRADGF^{Zeleně}IHRIVPKLI^{Zeleně}QNWKIGLMCFLSIIITTVCIIMIATWSKHAKPVA^{Žlutě}CSG
DWLGVRDK^{Žlutě}FYFSDDRNWTASKIF^{Žlutě}SLQKAELAQIDTQEDMEFLKRYAGTDMHWIGLSRKQGDSW
KWTNGTTFNGWFEIIGNGSFAFLSADGVHSSRGRFIDIKWI^{Žlutě}SKPKYFL

NKp65: MENEDGYMTLS^{Zeleně}FKNRCKSKQKSKDFSLYPQYYCLLLIFGCIVILIFIMTGIDLKF^{Zeleně}WHKKM
DFSQNVNVSSLSGHNYL^{Žlutě}PNDWLLNEGK^{Žlutě}YWFSTSFKTWKESQRD^{Žlutě}CTQLQAHLLVIQNLDELEFIQ
NSLKPGHFGWIGLYVTFQGNLMMWIDEHFLVPELFSVIGPTDDRS^{Žlutě}CAVITGNWVYSED^{Žlutě}CSSTFKGI
^{Žlutě}QRDAILTHNGTSGV

Obr. 5.1: Aminokyselinové sekvence KACL a NKp65.

^{Zeleně} je vyznačena intracelulární doména, transmembránová doména je označena ^{hnědě} a extracelulární doména ^{modře}. Cysteiny, které jsou v rámci CTLD domény vysoce konzervovány, jsou označeny ^{žlutě}. Navržené konstrukty odpovídají v obou případech extracelulární doméně proteinu.

Pro protein KACL byl navržen konstrukt kódující sekvenci od Ala₄₇ do Leu₁₇₄ a pro protein NKp65 konstrukt kódující sekvenci tohoto proteinu od Lys₅₄ k Val₂₀₇ (Obr. 5.1, obě sekvence jsou vyznačeny modře a odpovídají extracelulární doméně proteinů). Sekvence syntetických genů byla optimalizována pro expresi v savčích liniích (Obr. 5.2 na str. 44). Tyto konstrukty byly synteticky vyrobeny a dodány firmou Generay a následně vloženy do expresního plazmidu pTT28 (viz dále). V dalším textu jsou takto vzniklé konstrukty označovány jako KACL_1 (zkráceně K1) a NKp65_1 (zkráceně P1).

KACL	ACCGGTGCCACATGGTCCAAGCATGCTAAACCTGTGGCATGTTACAGGGGACTGGCTTGGA	60
Generay	ACCGGTGCCACCTGGTCCAAGCACGCCAAGCCGTGGCTGCTCCGGCGACTGGCTGGGC	60
KACL	GTGAGAGATAAGTGTTCCTATTTTCTGTGATGATACCAGAAATGGACAGCCAGTAAAATA	120
Generay	GTGAGGGACAAGTGCTTCTACTTCAGCGACGACACCAGGAACTGGACAGCCTCCAAGATT	120
KACL	TTTGTAGTTTGCAGAAAGCAGAAGCTTGCTCAGATTGATACACAAGAAGACATGGAATTT	180
Generay	TTCTGCAGCCTGCAAAGGCCGAGCTGGCCAGATTGATACCCAGGAAGACATGGAATTT	180
KACL	TTGAAGAGGTACGCAGGAACTGATATGCACTGGATTGGACTAAGCAGGAAACAAGGAGAT	240
Generay	CTGAAGAGGTACGCCGGGACAGACATGCACTGGATCGGCCTGAGCAGGAAAGCAGGGGGAC	240
KACL	TCTTGAAATGGACAAATGGCACCACATTCATGGTTGGTTTGAATTATAGGGAACGGA	300
Generay	AGCTGGAAATGGACCAATGGCACAACCTTCAACGGCTGGTTCGAGATCATCGGCAACGGC	300
KACL	TCCTTTGCTTTCTTGAGTGCTGATGGAGTCCATAGTCCAGAGGATTTATGATATCAAG	360
Generay	AGCTTCGCCTTCTGAGCGCAGACGGAGTGCACAGCTCCAGGGGCTTCATCGACATCAAG	360
KACL	TGGATTTGCAGCAAACCTAAATATTTTGTAGGTACC	396
Generay	TGGATCTGTAGCAAGCCCAAGTATTTCTGGGTACC	396
NKp65	ACCGGTAAGTCTGGCATAAAAAAATGGATTTCTCCAGAAATGTAACGTCAGCAGTCTA	60
Generay	ACCGGTAAATTTGGCACAAAAAGATGGACTTCAGCCAGAACGTCACGTCAGCAGCCTG	60
NKp65	TCAGGACACAATTACTTGTGCCCAAATGACTGGCTGTTGAACGAAGGAAATGTTACTGG	120
Generay	AGCGGGCACAATTACTGTGCCCAAACGACTGGCTGCTGAATGAGGGCAAGTGCTACTGG	120
NKp65	TTTTCAACTTCTTTTAAACGTTGGAAAGAGAGTCAACGTGATTGTACACAGCTACAGGCA	180
Generay	TTCAAGCACAAGCTTCAAGACCTGGAAGGAAAGCCAGAGAGATTGCACACAGCTGCAGGCC	180
NKp65	CATTTACTGGTGATTCAAAATTTGGATGAGCTGGAGTTCATACAGAACAGTTTAAACCT	240
Generay	CACCTGCTGGTCATCCAGAATCTGGACGAGCTGGAGTTTATCCAAAATAGCCTGAAGCCC	240
NKp65	GGACATTTGGTTGGATTGGACTATATGTTACATTCCAAGGGAACCTATGGATGTGGATA	300
Generay	GGACACTTCGGCTGGATCGGCCTGTATGTGACCTTCCAAGGCAACCTGTGGATGTGGATC	300
NKp65	GATGAACACTTTTTAGTTCAGAATTTGTTTTCAAGTATTGGACCAACTGATGACAGGAGC	360
Generay	GACGAGCATTTCTGGTGCCCGAGCTGTTCAAGCGTCATCGGCCCAACCGACGATAGGTCC	360
NKp65	TGTGCCGTTATCACAGGAAACTGGGTGTATTCTGAAGACTGTAGCTCCACATTTAAGGGC	420
Generay	TGCGCCGTCATTACCGGCAACTGGGTGTACAGCGAGGACTGCAGCAGCACCTTCAAGGGC	420
NKp65	ATTTGCCAGAGAGATGCGATCTTGACGCACAATGGAACCAAGTGGTGTGGGTACC	474
Generay	ATCTGTCAGAGGGACGCAATCTGACCACAACGGCACTTCGGCGTGGGTACC	474

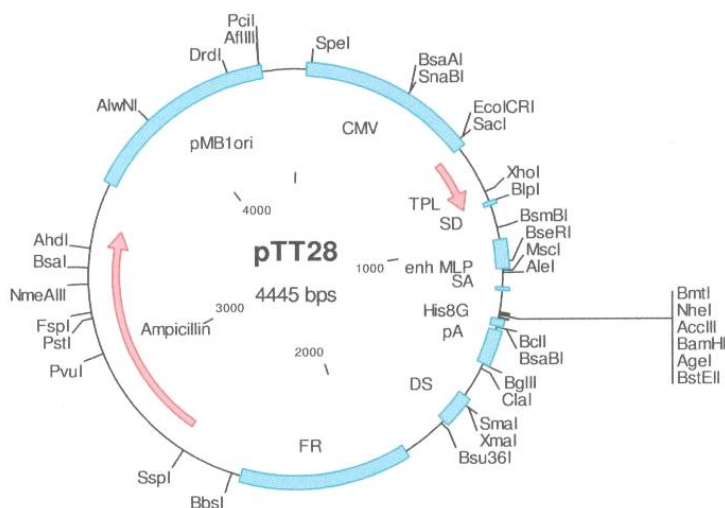
Obr. 5.2: Optimalizace nukleotidových sekvencí KACL a NKp65.

Porovnání přirozených a optimalizovaných nukleotidových sekvencí KACL a NKp65, neshodující se místa jsou vyznačena zeleně pro KACL a hnědě pro NKp65. Optimalizace byla provedena pro zvýšení účinnosti transkripce a translace v savcích buňkách firmou Generay.

Konstrukty KACL_2 (K2) a NKp65_2 (P2) byly připraveny pomocí polymerázové řetězové reakce. Jako templát pro PCR amplifikaci byly použity DNA synteticky vyrobených konstruktů K1 a P1 a dále byly použity dvojice primerů, které jsou uvedeny

v kapitole 4.1 a jejichž celé sekvence se nacházejí v kapitole 3.6. Výsledné produkty PCR amplifikace byly analyzovány agarosovou elektroforézou.

Plazmid pTT28 obsahuje sekvenci Kozakové, která hraje důležitou roli při iniciaci translačního procesu, a dále sekreční signální sekvenci, jež zajišťuje sekreci produkovaného proteinu do média (Obr. 5.3). Konstrukty K1, P1 a jednotlivé PCR produkty K2, P2 byly za pomoci restričních enzymů AgeI, KpnI a T4 DNA ligasy vloženy do expresního vektoru pTT28 (Obr. 5.4). Konstrukty K1 a P1 mají histidinovou kotvu C-terminální. Konstrukty K2 a P2 byly pomocí PCR amplifikace upraveny tak, že histidinová kotva je u nich N-terminální a lze ji odštěpit pomocí TEV proteasy (Obr. 5.5 na str. 46).



Obr. 5.3: Mapa původního expresního vektoru pTT28.

TGATATTCACCTGGCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCT
 CCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTATCGCCACCATGGGAGAAGCTGCTGCTGCTCCTTCTG
 CTGGGGCTGCGGCTTCAGCTGAGTCTTGAATTACCGGT – **inert** – GGTACCAAGCACCATCACCA
 CCATCACCAACACGGGTGATCAAGATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTT
 TCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATA

Obr. 5.4: Okolí klonovacího místa v upraveném plazmidu pTT28¹³⁴.

Zeleně je vyznačen START kodon, modře sekreční signální sekvence, růžově štěpné místo pro enzym AgeI, fialově štěpné místo pro enzym KpnI, oranžově C-terminální histidinová kotva a červeně STOP kodon. Podtržené sekvence jsou místa nasedání pro primery pro PCR z kolonií.

KACL, konstrukt K1:

ITGATWSKHAKPVA^CSGDWLGVRDK^CFYFSDDTRNWTASKIF^CSLQKAELAQIDT
 QEDMEFLKRYAGTDMHWIGLSRKQGDSWKWTNGTTFNWFEIIGNGSFAFLSAD
 GVHSSRGFIDIKWIC^CSKPKYFLGTK^{HHHHHHHHG}

KACL, konstrukt K2:

ITG^{HHHHHHH}ENLYF^QGATWSKHAKPVA^CSGDWLGVRDK^CFYFSDDTRNWTASKI
 F^CSLQKAELAQIDTQEDMEFLKRYAGTDMHWIGLSRKQGDSWKWTNGTTFNW
 FEIIGNGSFAFLSADGVHSSRGFIDIKWIC^CSKPKYFL

NKp65, konstrukt P1:

ITGKFWHKKMDFSQNVNVSSLSGHNYL^CPNDWLLNEGK^CYWFSTSFKTWKESQR
 D^CTQLQAHLLVIQNLDELEFIQNSLKPFGHFGWIGLYVTFQGNLWMWIDEHFLVPE
 LFSVIGPTDDRS^CCAVITGNWVYSED^CSSTFKGI^CQRDAILTHNGTSGVGTK<sup>HHHHH
 HHHG</sup>

NKp65, konstrukt P2:

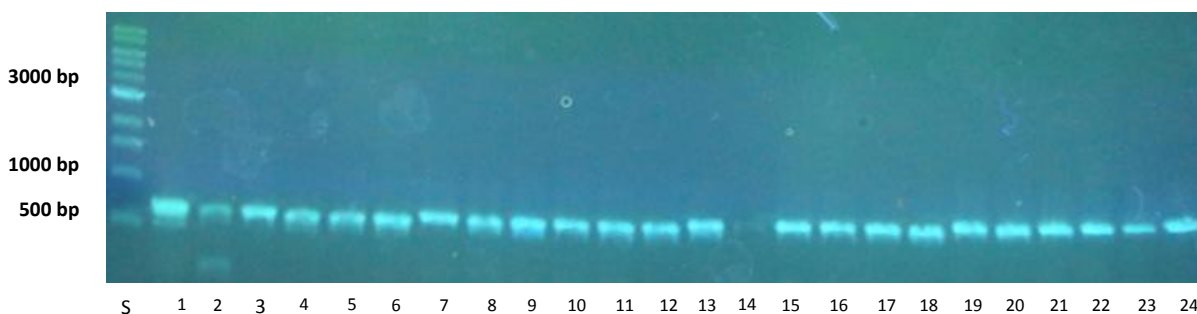
ITG^{HHHHHHH}ENLYF^QGKFWHKKMDFSQNVNVSSLSGHNYL^CPNDWLLNEGK^CY
 WFSTSFKTWKESQRD^CTQLQAHLLVIQNLDELEFIQNSLKPFGHFGWIGLYVTFQGN
 LWMWIDEHFLVPELFSVIGPTDDRS^CCAVITGNWVYSED^CSSTFKGI^CQRDAILTHN
 GTSGV

Obr. 5.5: Aminokyselinové sekvence konstruktů KACL (K1 a K2) a NKp65 (P1 a P2).

Na obrázku jsou uvedeny jednotlivé výsledné aminokyselinové sekvence konstruktů KACL a NKp65 po odštěpení sekrečního signálu. **Zeleně** je vyznačena histidinová kotva, která je v případě konstruktů K1 a P1 C-terminální a v případě konstruktů K2 a P2 N-terminální. N-terminální histidinovou kotvu v konstruktech K2 a P2 je možno odštěpit TEV proteasou; štěpné místo pro TEV proteasu je vyznačeno **hnědě**. Cysteiny, které jsou v rámci CTLD domény vysoce konzervovány, jsou označeny **žlutě**. Kurzívou jsou zvýrazněny všechny *nepůvodní aminokyseliny*.

Po restrikci byly výsledné produkty přečištěny preparativní elektroforézou, následně byla provedena extrakce inzertů z gelu. Jednotlivé inzerty byly přečištěny a byly použity pro přípravu ligační směsi s T4 DNA ligasou. Ligační směsi byly transformovány bakterie *E. coli* kmene DH5 α , a to metodou tepelného šoku. Tyto bakterie byly nanášeny na misky s LB agarem obsahujícím ampicilin. Do druhého dne vyrostly na miskách kolonie, z nichž byly některé vybrány pro PCR z kolonií. Jednotlivé konstrukty mají velikost 486 bp (K1), 489 bp (K2), 564 bp (P1) a 567 bp (P2). Selekcce byla realizována pomocí postupu uvedeného v kapitole 4.8 a poté byla provedena polymerázová řetězová reakce z kolonií, jejíž produkty byly analyzovány agarosovou elektroforézou (Obr. 5.6 na

str. 47). Na jejím základě byly identifikovány pozitivní klony a pro další práci byly vybrány klony K1_1, 3, 5, K2_1, 3, 5, P1_1, 3, 5 a P2_1, 3, 5.



Obr. 5.6: PCR z kolonií.

Dráha S představuje standard. Dráhy 1-6 obsahují vzorky z PCR z kolonií pro K1_1-6, dráhy 7-12 vzorky K2_1-6, dráhy 13-18 vzorky P1_1-6 a dráhy 19-24 vzorky pro P2_1-6.

Z vybraných pozitivních klonů byla pomocí soupravy High-Speed Plasmid Mini Kit izolována plazmidová DNA. Poté byla orientačně stanovena koncentrace jednotlivých plazmidů. Pro sekvenování byly vybrány vzorky K1_1, K2_1, P1_1 a P2_1, které byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK. Správnost nukleotidových sekvencí jednotlivých inzertů byla ověřena pomocí databáze BLAST (PubMed) na základě porovnání se známými nukleotidovými sekvencemi příslušných genů. Tím byla potvrzena správnost všech připravených plazmidů. Na základě této skutečnosti bylo podle návodu v kapitole 4.12 připraveno zásobní množství plazmidu. Pomocí soupravy PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Maxi byla izolována a přečištěna plazmidová DNA, u které byla měřena absorbance při 260 a 280 nm (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Stanovení koncentrace DNA připravených zásobních roztoků plazmidů.

Tabulka obsahuje naměřené hodnoty A_{260} , A_{280} , koncentrace zásobního roztoku plazmidu a poměr A_{260}/A_{280} , vyjadřující čistotu příslušného plazmidu.

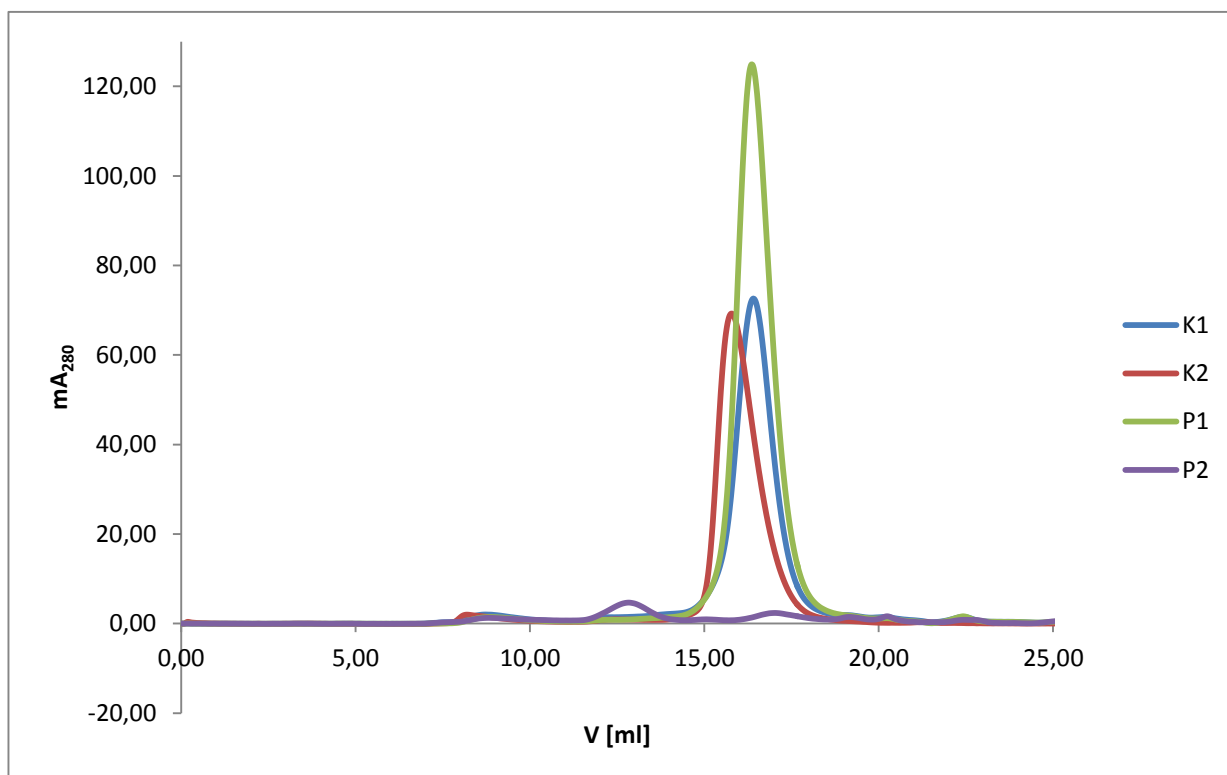
Plazmid	A_{260}	A_{280}	c [mg/ml]	A_{260}/A_{280}
pTT28_K1	0,185	0,114	2,78	1,62
pTT28_K2	0,338	0,194	5,07	1,74
pTT28_P1	0,297	0,172	4,45	1,73
pTT28_P2	0,211	0,124	3,16	1,70

5.2 Produkce proteinů

V jaké míře jsou buňky HEK293T schopny produkovat studované proteiny je obvykle vhodné ověřit nejprve v malém měřítku pomocí tzv. expresního testu. Nicméně z časových důvodů bylo rovnou přistoupeno k velkoobjemové produkci. Po předchozích úspěšných produkcích jiných proteinů se přistoupeno k produkci ve 400 ml suspenzní buněčné kultury kultivované v 1 l čtyřhranné láhvi, pro transfekci byl zvolen poměr DNA:PEI 1:3 a bylo použito 1 μg plazmidu na $1 \cdot 10^6$ buněk. Produkční média byla sklizena po 5 dnech.

5.3 Purifikace proteinů

Prvním krokem purifikace proteinů byla chelatační chromatografie. Tato metoda umožňuje odstranit většinu nečistot ze vzorku a je založena na reverzibilní interakci histidinového řetězce proteinu s kobaltnatými ionty, které se nacházejí na nosiči. Pro chelatační chromatografii byly použity pufrы PBS jako promývací a PBS s 250 mM imidazolem jako eluční. Jednotlivé frakce, které byly chelatační chromatografií získány, byly smíchány a zkoncentrovány pomocí koncentrátorů, aby bylo možné je aplikovat na kolonu Superdex 200 10/300 GL a provést tak gelovou permeační chromatografii, jejíž průběh byl sledován měřením absorpance při 280 nm (Obr. 5.7 na str. 49). Na kolonu připojenou k HPLC systému byly postupně aplikovány všechny připravené proteiny, tj. K1, K2, P1 i P2. Detekovány byly pouze proteiny K1, K2 a P1, protein P2 se patrně nepodařilo připravit. Při porovnání s elučními objemy dalších proteinů připravovaných v laboratoři mého školitele se zdá, že eluční objemy připravovaných konstruktů odpovídají spíše monomerním proteinům.



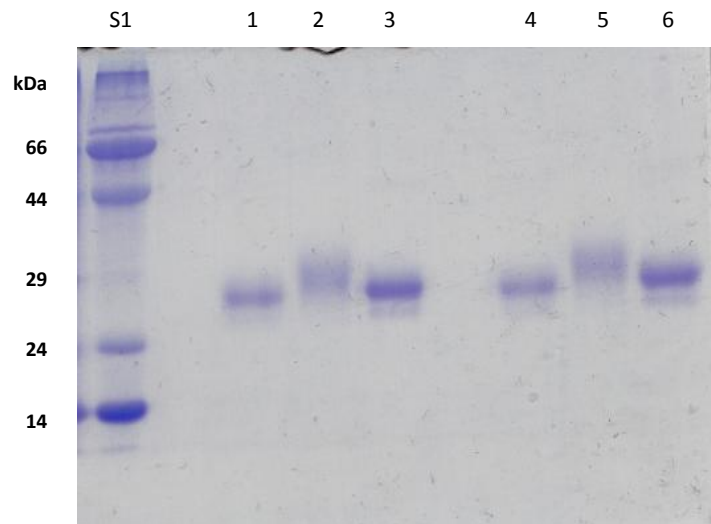
Obr. 5.7: Záznam z gelové permeační chromatografie připravených proteinů.

Modře je uveden záznam pro protein KACL (konstrukt K1), červeně pro protein KACL (konstrukt K2), zeleně pro protein NKp65 (konstrukt P1). Přezkoumání záznamu z průběhu gelové chromatografie pro protein NKp65 (konstrukt P2), který je označen fialově, potvrdilo, že protein P2 se nepodařilo připravit.

Následně byly jednotlivé frakce po gelové chromatografii opět zkoncentrovány a byla stanovena orientační koncentrace proteinů dle Bradfordové, která byla 0,30 mg/ml pro K1, 0,35 mg/ml pro K2 a 0,40 mg/ml pro P1.

Pro ověření čistoty připravených proteinů byla použita SDS elektroforéza, která byla připravena a provedena podle kapitoly 4.20 a její výsledek je uveden na Obr. 5.8 na str. 50. Tato metoda potvrdila přítomnost proteinů K1, K2 a P1.

Teoretická molekulová hmotnost proteinů K1 a K2 se pohybuje okolo 16,5 kDa, teoretická molekulová hmotnost proteinu P1 je 19,5 kDa. Proužky na gelu odpovídají proteinům o velikosti okolo 28 kDa – rozdíl mezi teoretickou molekulovou hmotností a tímto pozorováním představuje glykosylace. Všechny připravené proteiny putují v gelu jako monomery, a to jak v neredukujícím, tak i v redukuujícím prostředí.



Obr. 5.8: SDS elektroforéza připravených proteinů.

Dráha S1 představuje standard. Dráhy 1 a 4 obsahují vzorek K1, dráhy 2 a 5 vzorek K2 a dráhy 3 a 6 vzorek P1, všechny vzorky v drahách 1-3 jsou v redukujícím prostředí, na rozdíl od vzorků 4-6, které jsou v nereduujícím prostředí.

6. DISKUZE

NK buňkami a hlavně jejich receptory se dlouhodobě zabývají někteří členové katedry biochemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze a také studenti pod vedením RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. V rámci mé bakalářské práce byly připraveny dva lidské receptory podobné lektinům C-typu, které společně tvoří receptor-ligandový pár. Konkrétně se jednalo o receptor lidských NK buněk NKp65 a jeho přirozený ligand KACL. Zajímavostí tohoto systému je, že pro něj byla naměřena neobvykle vysoká interakční konstanta, což naznačuje, že by tento komplex mohl být poměrně stabilní a vhodný i pro studium jeho struktury^{118, 130}.

První částí této bakalářské práce bylo navržení konstruktů pro NKp65 a KACL. Pro každý z těchto proteinů byl navržen jeden konstrukt odpovídající extracelulární doméně a obsahující všechny její konzervované cysteiny. V případě NKp65 se jedná o šest cysteinů a konstrukt kóduje sekvenci tohoto proteinu od Lys₅₄ k Val₂₀₇ a v případě KACL jde o čtyři cysteiny a konstrukt kóduje sekvenci proteinu od Ala₄₇ do Leu₁₇₄. Následovalo převedení konstruktů do plazmidu pTT28 - tímto způsobem byla na C-konec proteinu vložena histidinová kotva (konstrukty P1 a K1). Poté bylo přistoupeno k přípravě expresních vektorů P2 a K2. Cesta k přípravě konstruktů P2 a K2 nebyla jednoduchá. PCR amplifikace se musela několikrát opakovat a nakonec byly konstrukty připraveny odděleně, tj. každý za jiné teploty pro nasedání primerů. Tyto konstrukty byly také vloženy do plazmidu pTT28, ale na rozdíl od konstruktů P1 a K1 mají histidinovou kotvu na N-konci proteinu a je možno ji odštěpit pomocí TEV proteasy (Obr. 5.5 na str. 46).

Pro produkci proteinů byl zvolen expresní systém savčích buněk. Exprese rekombinantního proteinu v savčích buňkách je výhodná v tom, že umožňuje posttranslační modifikace, často důležité pro správnou funkci proteinu, a není třeba vzniklý protein izolovat z inkluzních tělísek a provádět jeho renaturaci, jako je tomu často v případě využití bakteriálního expresního systému. Na rozdíl od přípravy v bakteriích je však produkce v savčích buňkách relativně náročná, a to nejen časově, ale také finančně, a výtěžek exprese nemusí být vždy vysoký - to ale platí pro renaturaci také. V rámci této práce byly proteiny produkovány v expresním systému HEK293T buněk. Bylo přistoupeno k produkci v suspenzní buněčné kultuře. Tento proces, který je podrobně popsán v kapitole 4.15, byl navržen podle předchozích úspěšných produkcí jiných proteinů. Pro úspěšnou

transfekci je nutné sledovat řadu parametrů, jako je např. buněčná hustota a viabilita buněk před a po transfekci, poměr DNA a transfekčního činidla, celkové množství DNA použité k transfekci daného množství buněk, délka inkubace transfekční směsi a způsob jejího přidání k buňkám a další.

Proteiny byly exprimovány z expresního vektoru pTT28, který obsahuje signální sekvenci, která umožňuje sekreci proteinů do média. Všechny proteiny byly podrobeny purifikaci pomocí chelatační chromatografie. Principem této metody je reverzibilní interakce histidinového konce proteinu s kobaltnatými ionty, které jsou imobilizovány na chelatačním nosiči (agarosové kuličky). Dále byla provedena gelová permeační chromatografie, jejíž záznam je uveden na Obr. 5.7 na str. 49 a ukazuje úspěšnou produkci proteinu KACL (konstrukty K1 a K2) a proteinu NKp65 (konstrukt P1). Soudě dle elučních profilů dalších proteinů studovaných v naší laboratoři, eluční objemy pro proteiny K1, K2 i P1 odpovídají spíše monomernímu stavu připravených proteinů. V rozporu s naším pozorováním J. Spreu a kol. popsali, že při gelové chromatografii KACL i NKp65 putují jako nekovalentní homodimery¹¹⁸. Zde je nutné si uvědomit, že námi připravovaný konstrukt receptorů se liší od konstruktů používaných ve výše zmíněné studii - ty obsahovaly jiné a delší kotvy, což může tendenci proteinů tvořit dimery významně ovlivňovat. Nicméně mimo rámec této bakalářské práce byla mým školitelem provedena sedimentační analýza mnou připravených proteinů na analytické ultracentrifuze, která prokázala, že při koncentraci 0,2 mg/ml se studované konstrukty nachází v roztoku v rovnováze monomer - dimer s výraznou převahou monomeru. Tato pozorování bude v budoucnu vhodné ověřit za vyšší koncentrace analyzovaných proteinů.

Pro ověření čistoty proteinů byla provedena SDS elektroforéza (Obr 5.8 na str. 50). Na polyakrylamidovém gelu putují v redukujícím i neredukujícím prostředí všechny připravené proteiny jako monomery. Z pozice proužků na gelu je možno usoudit, že se jedná o glykoproteiny, a to poměrně silně glykosylované. Sacharidová složka představuje v případě proteinů KACL_1 a KACL_2 asi 12 kDa, v případě proteinu NKp65_1 asi 8 kDa. Tato pozorování jsou ve shodě s publikovanými výsledky¹¹⁸.

Je nutné říci, že po úspěšné produkci těchto proteinů se nacházíme opět na začátku, stále zůstává nezodpovězena celá řada otázek týkajících se např. biochemických vlastností jednotlivých proteinů. V dalším výzkumu mohou být receptory podrobeny tzv. metodě peptidového mapování pomocí hmotnostní spektrometrie. Dále mohou být ověřeny vazebné schopnosti receptoru a jeho ligandu, to, zda se skutečně receptor váže jen na tento

jediný ligand či naopak, s jakou afinitou, jaké je optimální pH této vazby apod. Nejvyšším cílem je získání krystalových struktur receptoru, ligandu nebo receptoru s navázaným ligandem.

7. ZÁVĚR

Byly připraveny expresní vektory kódující lidský NK buněčný receptor NKp65 a jeho ligand KACL.

Proteiny byly produkovány v expresním systému HEK293T buněk.

Proteiny byly purifikovány a byla ověřena jejich čistota, velikost a oligomerní stav.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., Roitt, I.: Introduction to the Immune System, v knize Immunology, 7th Edition, Mosby Elsevier, Canada (2006)
2. Šterzl, J.: Fyziologie imunitního systému, v knize Imunitní systém a jeho fyziologické funkce, Česká imunitní společnost, Praha, str. 11-12 (1993)
3. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie. 4. vydání, Triton, Praha (2009)
4. Fitzakerley, J., University of Minnesota Medical school Duluth: <http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/CytAnt/Cytokines/HematopoieticAgents.html> (8.5.2012)
5. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: Eur. J. Immunol. 5, 112-117 (1975)
6. Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J. J., Tutt, M., Kumar, V.: J. Immunol. 137, 2735-2739 (1986)
7. Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Fuchs, A., Colonna, M., Caligiuri, M. A.: Trends Immunol. 25, 47-52 (2004)
8. Ferlazzo, G., Munz, C.: J. Immunol. 172, 1333-1339 (2004)
9. Trinchieri, G.: Adv. Immunol. 47, 187-376 (1989)
10. Mingari, M. C., Poggi, A., Biassoni, R., Bellomo, R., Ciccone, E., Pella, N., Morelli, L., Verdiani, S., Moretta, A., Moretta, L.: J. Exp. Med. 174, 21-26 (1991)
11. Rodewald, H. R., Moingeon, P., Lucich, J. L., Dosiou, C., Lopez, P., Reinherz, E. L.: Cell 69, 139-149 (1992)
12. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A.: Kuby Immunology. 6th Edition, W. H. Freeman and Company, New York (2007)
13. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S.: Nat. Immunol. 9, 503-510 (2008)
14. Kärre, K.: On the immunobiology of natural killer cells. Doktorská práce. Karolinska Institute (1981)
15. Kärre, K.: Scand. J. Immunol. 55, 221-228 (2002)
16. Kärre, K.: Nat. Immunol. 9, 477-480 (2008)
17. Hao, L., Klein, J., Nei, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 3192-3197 (2006)
18. Parham, P.: Curr. Biol. 10, R195-R197 (2000)

19. http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_03/S1462399403005623sup005.pdf (7.4.2013)
20. Cerwenka, A., Lanier, L. L.: *Nat. Rev. Immunol.* 1, 41-49 (2001)
21. Gravestein, L. A., Borst, J.: *Semin. Immunol.* 10, 423-434 (1998)
22. Liu, C. C., Walsh, C. M., Young, J. D. E.: *Immunol. Today* 16, 194-201 (1995)
23. Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* 16, 359-393 (1998)
24. Ravetch, J. V., Bolland, S.: *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290 (2001)
25. Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C., Moretta, L.: *Annu. Rev. Immunol.* 14, 619-648 (1996)
26. Yokoyama, W. M.: *Curr. Opin. Immunol.* 10, 298-305 (1998)
27. Long, E. O., Wagtmann, N.: *Curr. Opin. Immunol.* 9, 344-350 (1997)
28. Vivier, E., Daëron, M.: *Immunol. Today* 18, 286-291 (1997)
29. Parham, P.: *Immunol. Rev.* 155, 1-221 (1997)
30. Yokoyama, W. M.: *Curr. Opin. Immunol.* 5, 67-73 (1993)
31. Scott, P., Trinchieri, G.: *Curr. Opin. Immunol.* 7, 34-40 (1995)
32. Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225-274 (2005)
33. Ryan, J. C., Seaman, W. E.: *Immunol. Rev.* 155, 79-89 (1997)
34. Yokoyama, W. M., Seaman, W. E.: *Annu. Rev. Immunol.* 11, 613-635 (1993)
35. Colonna, M., Moretta, A., Vély, F., Vivier, E.: *Immunol. Today* 21, 428-431 (2000)
36. Hao, L., Klein, J., Nei, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3192-3197 (2006)
37. Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F. M.: *Nat. Rev. Immunol.* 3, 304-316 (2003)
38. Trowsdale, J.: *Immunity* 15, 363-374 (2001)
39. Giorda, R., Trucco, M.: *J. Immunol.* 147, 1701-1708 (1991)
40. Dissen, E., Ryan, J. C., Seaman, W. E., Fossum, S.: *J. Exp. Med.* 183, 2197-2207 (1996)
41. Lanier, L. L., Chang, C., Phillips, J. H.: *J. Immunol.* 153, 2417-2428 (1994)
42. Baker, E., D'Andrea, A., Phillips, J. H., Sutherland, G. R., Lanier, L. L.: *Chromosome Res.* 3, 511-515 (1995)
43. Reth, M.: *Nature* 338, 383-384 (1989)
44. Hibbs, M. L., Selvaraj, P., Carpen, O., Springer, T. A., Kuster, H.: *Science* 246, 1608-1611 (1989)
45. Anderson, P., Caligiuri, M., Ritz, J., Schlossman, S. F.: *Nature* 341, 159-162 (1989)

46. Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C., Phillips, J. H.: *Nature* 391, 703-707 (1998)
47. Olcese, L., Cambiaggi, A., Semenzato, G., Bottino, C., Moretta, A., Vivier, E.: *J. Immunol.* 158, 5083-5086 (1997)
48. Perussia, B., Starr, S., Abraham, S., Fanning, V., Trinchieri, G.: *J. Immunol.* 130, 2133-2141 (1983)
49. Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L., Babcock, G. F.: *J. Immunol.* 131, 1789-1796 (1983)
50. Lanier, L. L., Yu, G., Phillips, J. H.: *Nature* 342, 803-805 (1989)
51. Kurosaki, T., Gander, I., Ravetch, J. V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 3837-3841 (1991)
52. Colucci, F., Schweighoffer, E., Tomasello, E., Turner, M., Ortaldo, J. R.: *Nat. Immunol.* 3, 288-294 (2002)
53. Zompi, S., Hamerman, J. A., Ogasawara, K., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. L.: *Nat. Immunol.* 4, 565-572 (2003)
54. Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B. H., Bauer, S., Groh, V.: *Science* 285, 730-732 (1999)
55. Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J., Leibson, P. J.: *Nat. Immunol.* 4, 557-564 (2003)
56. Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M. C., Ravetch, R. V.: *Nature* 368, 70-73 (1994)
57. Ravetch, J. V., Lanier, L. L.: *Science* 290, 84-89 (2000)
58. Valiante, N. M., Phillips, J. H., Lanier, L. L., Parham, P.: *J. Exp. Med.* 184, 2243-2250 (1996)
59. Binstadt, B. A., Brumbaugh, K. M., Dick, C. J., Scharenberg, A. M., Williams, B. L.: *Immunity* 5, 629-638 (1996)
60. Binstadt, B. A., Billadeau, D. D., Jevremovic, D., Williams, B. L., Fang, N.: *J. Biol. Chem.* 273, 27518-27523 (1998)
61. Palmieri, G., Tullio, V., Zingoni, A., Piccoli, M., Frati, L.: *J. Immunol.* 162, 7181-7188 (1999)
62. Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N., Long, E. O.: *Mol. Cell. Biol.* 23, 6291-6299 (2003)
63. Berke, G.: *Annu. Rev. Immunol.* 12, 735-773 (1994)
64. Leibson, P. J.: *Immunity* 6, 655-661 (1997)

65. Lanier, L. L.: *Immunity* 6, 371-378 (1997)
66. Moretta, A.: *Cell* 90, 13-18 (1997)
67. Yokoyama, W. M.: *J. Exp. Med.* 186, 1803-1808 (1997)
68. Vilches, C., Parham, P.: *Annu. Rev. Immunol.* 20, 217-251 (2002)
69. Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G.: *J. Exp. Med.* 172, 1589-1598 (1990)
70. Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J. H., Lanier, L. L.: *J. Exp. Med.* 180, 537-543 (1994)
71. Phillips, J. H., Gumperz, J. E., Parham, P., Lanier, L. L.: *Science* 268, 403-405 (1995)
72. Ferrini, S., Cambiaggi, A., Meazza, R., Sforzini, S., Marciano, S.: *Eur. J. Immunol.* 24, 2294-2298 (1994)
73. Viliante, N. M., Lienert, K., Shilling, H. G., Smits, B. J., Parham, P.: *Immunol. Rev.* 155, 155-164 (1997)
74. Takahashi, T., Yawata, M., Raudsepp, T., Lear, T. L., Chowdhary, B. P.: *Eur. J. Immunol.* 34, 773-784 (2004)
75. Storset, A. K., Slettedal, I. O., Williams, J. L., Law, A., Dissen, E.: *Eur. J. Immunol.* 33, 980-990 (2003)
76. Collona, M., Samaridis, J.: *Science* 268, 405-408 (1995)
77. Wagtmann, N., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Malnati, M. S.: *Immunity* 2, 439-449 (1995)
78. D'Andrea, A., Chang, C., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Phillips, J. H., Lanier, L. L.: *J. Immunol.* 155, 2306-2310 (1995)
79. Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kibin, M., Chin, W.: *Immunity* 7, 273-282 (1997)
80. Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P.: *J. Exp. Med.* 186, 1809-1818 (1997)
81. Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L.: *J. Exp. Med.* 186, 1129-1136 (1997)
82. Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C.: *J. Exp. Med.* 188, 953-960 (1998)
83. Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S.: *J. Exp. Med.* 187, 2065-2072 (1998)
84. Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M.: *J. Exp. Med.* 189, 787-796 (1999)
85. Pende, D., Parolini, S., Pessino, A.: *J. Exp. Med.* 190, 1505-1516 (1999)
86. González De Mejía, E., Prisecaru, V. I.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 425-445 (2005)
87. Moravcová, J., Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/004.pdf> (20.3.2013)

88. Lis, H., Sharon, N: *Chem. Rev.* 98, 637-674 (1998)
89. http://en.wikipedia.org/wiki/Concanavalin_A (14.4.2013)
90. Hardman, K. D., Ainsworth, C. F.: *Biochemistry* 11, 4910-4919 (1972)
91. Drickamer, K.: *J. Biol. Chem.* 263, 9557-9560 (1988)
92. Drickamer, K., Dordal, M. S., Reynolds, L.: *J. Biol. Chem.* 264, 6878-6887 (1986)
93. Rivkin, E., Tres, L. L., Kaplan-Kraicer, R., Shalgi, R., Kierszenbaum, A. L.: *Mol. Reprod. Dev.* 56, 401-411 (2000)
94. Drickamer, K.: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 45, 207-232 (1993)
95. Drickamer, K., Fadden, A. J.: *Biochem. Soc. Symp.* 69, 59-72 (2002)
96. Zelensky, A. N., Gready, J. E.: *BMC Genomics* 5, 22 (2004)
97. Zelensky, A. N., Gready, J. E.: *FEBS J.* 272, 6179-6217 (2005)
98. Sato, H., Boyse, E.: *Immunogenetics* 3, 565-572 (1976)
99. Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., Santoni, A.: *Immunol. Today.* 15, 479-483 (1994)
100. Butcher, S., Arney, K. L., Cook, G. P.: *Eur. J. Immunol.* 28, 3755-3762 (1998)
101. Colonna, M., Samaridis, J., Angman, L.: *Eur. J. Immunol.* 30, 697-704 (2000)
102. Matsumoto, N., Ribaldo, R. K., Abastado, J. P., Margulies, D. H., Yokoyama, W. M.: *Immunity* 8, 245-254 (1998)
103. Brown, G. D., Gordon, S.: *Nature* 413, 36-37 (2001)
104. Vogler, I., Steinle, A.: *J. Innate Immun.* 3, 227-235 (2011)
105. Glimcher, L., Shen, F. W., Cantor, H.: *J. Exp. Med.* 145, 1-9 (1977)
106. Chambers, W. H., Vujanovic, N. L., DeLeo, A. B., Olszowy, M. W., Herberman, R. B., Hiserodt, J. C.: *J. Exp. Med.* 169, 1373-1389 (1989)
107. Carlyle, J. R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L. H., Rousselle, E., Troke, A. D., Proteau, M. F., Makrigiannis, A. P.: *J. Immunol.* 176, 7511-7524 (2006)
108. Arase, N., Arase, H., Park, S. Y., Ohno, H., Ra, C., Saito, T.: *J. Exp. Med.* 186, 1957-1963 (1997)
109. Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M.: *Nat. Immunol.* 4, 801-807 (2003)
110. Ljutic, B., Carlyle, J. R., Filipp, D., Nakagawa, R., Julius, M., Zuniga-Pflucker, J. C.: *J. Immunol.* 174, 4789-4796 (2005)
111. Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M. J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., Braud, V. M.: *J. Immunol.* 175, 7791-7795 (2005)

112. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. A., Warren, H. S., Lanier, L. L.: *J. Immunol.* 175, 7796-7799 (2005)
113. Pozo, D., Vales-Gomez, M., Mavaddat, N., Williamson, S. C., Chisholm, S. E., Reyburn, H.: *J. Immunol.* 176, 2397-2406 (2006)
114. Roda-Navarro, P., Arce, I., Renedo, M., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Fernandez-Ruiz, E.: *Eur. J. Immunol.* 30, 568-576 (2000)
115. Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A.: *Eur. J. Immunol.* 31, 233-242 (2001)
116. Dennehy, K. M., Klimosch, S. N., Steinle, A.: *J. Immunol.* 186, 657-661 (2011)
117. Kuttruff, S., Koch, S., Kelp, A., Pawelec, G., Rammensee, H. G., Steinle, A.: *Blood* 113, 358-369 (2008)
118. Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K. M., Schitteck, B., Steinle, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 5100-5105 (2010)
119. Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S. M., Schuerer, S. C., Sanna, M. G., Han, G. W., Kuhn, P., Rosen, H., Stevens, R. C.: *Science* 335, 851-855 (2012)
120. Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., Cyster, J. G.: *Nature* 427, 355-360 (2004)
121. Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdickova, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G., Matloubian, M.: *Nature* 440, 540-544 (2006)
122. Sancho, D., Gomez, M., Sanchez-Madrid, F.: *Trends Immunol.* 126, 136-140 (2005)
123. Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., Steinle, A.: *Nat. Immunol.* 7, 1334-1342 (2006)
124. Rosen, D. B., Cao, W., Avery, D. T., Tangye, S. G., Liu, Y. J., Houchins, J. P., Lanier, L. L.: *J. Immunol.* 180, 6508-6517 (2008)
125. Hamann, J., Fiebig, H., Strauss, M.: *J. Immunol.* 150, 4920-4927 (1993)
126. López-Cabrera, M., Santis, A. G., Fernández-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F.: *J. Exp. Med.* 178, 537-547 (1993)
127. Ziegler, S. F., Levin, S. D., Johnson, L., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Baker, E., Sutherland, G. R., Feldhaus, A. L., Ramsdell, F.: *J. Immunol.* 152, 1228-1236 (1994)
128. Sánchez-Mateos, P., Cebrián, M., Acevedo, A., López-Botet, M., De Landázuri, M. O., Sánchez-Madrid, F.: *Immunology* 68, 72-79 (1989)

129. Akatsuka, A., Ito, M., Yamauchi, C., Ochiai, A., Yamamoto, K., Matsumoto, N.: *Int. Immunol.* 22, 783-790 (2010)
130. Spreu, J., Kienle, E. C., Schrage, B., Steinle, A.: *Immunogenetics* 59, 903-912 (2007)
131. Huarte, E., Cubillos-Ruiz, J. R., Nesbeth, Y. C., Scarlett, U. K., Martinez, D. G., Engle, X. A., Rigby, W. F., Pioli, P. A., Guyre, P. M., Conejo-Garcia, J. R.: *Blood* 112, 1259-1268 (2008)
132. Germain, C., Bihl, F., Zahn, S., Poupon, G., Dumaurier, M. J., Rampanarivo, H. H., Padkjær, S. B., Spee, P., Braud, V. M.: *J. Biol. Chem.* 285, 36207-36215 (2010)
133. Čuperková, R.: Optimalizace kultivačního média HEK293 buněčné linie. Bakalářská práce, katedra biochemie PřF UK Praha (2012)
134. Celadová, P.: Rekombinantní příprava receptorů potkaních NK buněk v expresním systému HEK293T. Diplomová práce, katedra biochemie PřF UK Praha (2010)

