

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Samuel Pažický

Příprava expresních vektorů pro receptor NKp30 a
jeho ligandy B7-H6 a BAG-6

Preparation of expression vectors for receptor Nkp30 and its
ligands B7-H6 and BAG-6

Bakalářská práce

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

Praha 2014

Prohlášení

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

V Praze.....

Podpis.....

Poděkování

V první řadě bych se rád poděkoval svému školiteli RNDr. Ondřejovi Vaňkovi, PhD. za odborné vedení práce, trpělivost a předání užitečných vědomostí, které se mi jistě budou hodit do budoucnosti. Dále děkuju Mgr. Janu Bláhovi za nespočet teoretických i praktických rad, které mi práci ulehčily. Děkuji i všem členům laboratoře 204 na Katedře biochemie PŘF UK a také ostatním členům katedry, kteří byli vždy ochotni poradit, či pomoci a tvořili příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

NK buňky, buňky neadaptivního imunitního systému, jsou schopny za pomoci celé řady inhibičních a aktivačních receptorů rozeznat především virem infikované a nádorové buňky a následně je eliminovat. Pro NKp30, aktivační receptor NK buněk ze skupiny receptorů NCR (*Natural Killer Cell Receptors*), byla v poslední době identifikována několik ligandů, mezi které patří také membránový protein B7-H6 exprimovaný na nádorových buňkách a BAG-6, jaderný protein se širokým spektrem funkcí.

Cílem mé bakalářské práce bylo připravit expresní vektory kódující receptor NKp30 a jeho ligandy B7-H6 a BAG-6, které by umožňovaly produkovat tyto proteiny v expresním systému HEK293.

Klíčová slova: NK buňka, plasmid, receptor, NKp30, B7-H6, BAG-6

Abstract

NK cells, the cells of non-adaptive immune system, are able to recognise virally infected or oncogenous cells by many inhibiting and activating receptors that are expressed on their surface and eliminate them consequently. NKp30, activating receptor of NK cells included in NCR (Natural Killer Cell Receptors) family, lately there were identified several ligands, including membrane protein B7-H6 expressed on oncogenous cells surface and BAG-6, cell core protein with wide spectrum of functions.

Aim of this thesis was preparation of expression vectors coding for receptor NKp30 and his ligands B7-H6 and BAG-6, enabling expression of these proteins in HEK293 cell line.

Keywords: NK cell, plasmid, receptor, NKp30, B7-H6, BAG-6

Obsah

	Seznam zkratk	1
1.	TEORETICKÝ ÚVOD	4
1.2.	NK buňky	4
1.2.1.	Receptory NK buněk	5
1.2.2.	Aktivační receptory NK buněk	5
1.2.2.1.	NKp30	6
1.2.3.	NKp44	9
1.2.4.	NKp46	10
1.2.5.	NKG2D a jeho ligandy	10
1.3.	B7 rodina	13
1.3.1.	B7-H6	14
1.4.	BAG rodina	16
1.4.1.	BAG-6	17
1.5.	Využití fúzních proteinů v léčbě rakoviny	20
1.5.1.	Fúzní protein B7-H6:7D8	20
1.5.2.	Fúzní proteiny NKp30-Ig a NKp46-Ig	21
1.5.3.	Chimérické antigenní receptory založené na NKp30	21
1.5.4.	ULBP2-aCEA	21
1.5.5.	CD16xCD30	21
2.	CÍL PRÁCE	23
3.	MATERIÁL	24
3.1.	Pomůcky a přístroje	24
3.2.	Chemikálie	25
3.2.1.	Enzymy	25
3.2.2.	Bakteriální kmeny	25
3.2.3.	Vektory	25

3.2.4.	Primery pro PCR	25
3.2.5.	Roztoky a média	26
3.2.6.	Ostatní běžné chemikálie	26
4.	METODY	27
4.1.	PCR amplifikace	27
4.2.	Agarosová elektroforéza	28
4.3.	Izolace z agarosového gelu	28
4.4.	Srážení	28
4.5.	Restrikční štěpení plasmidu	29
4.6.	Restrikční štěpení PCR produktů	29
4.7.	Ligace	29
4.8.	Transformace	30
4.9.	PCR z kolonií	30
4.10.	Miniizolace plasmidové DNA	31
4.11.	Měření koncentrace a čistoty DNA	31
4.12.	Sekvence	31
4.13.	Příprava zásobního množství plasmidů	32
5.	Výsledky práce	33
6.	Diskuze	38
7.	Závěr	39
8.	Citovaná literatura	40

Seznam zkratek

ADAM	metaloproteinasa (<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>)
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátce (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AIF	faktor indukující apoptosu (<i>apoptosis inducing factor</i>)
APC	antigen prezentující buňka (<i>antigen presenting cell</i>)
ATM	serin-threoninová kinasa (<i>ataxia telangiectasia mutated</i>)
ATR	serin-threoninová kinasa (<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>)
BAG-6	athanogen asociovaný s BCL-2 6 (<i>BCL-2-associated athanogen 6</i>)
Bat3	transkript 3 asociovaný s HLA-B (<i>HLA-B associated transcript 3</i>)
BCL-2	protein lymfomy B-lymfocyту (<i>B cell lymphoma protein</i>)
BORIS	transkripční represor (<i>brother of the regulator of imprinted sites</i>)
bp	jeden pár bazí (<i>base pair</i>)
BRCA-1	protein nádoru prsu (<i>breast cancer 1, early onset</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTLA	atenuátor B a T lymfocytů (<i>B and T lymphocyte attenuator</i>)
CD	označení povrchových molekul leukocytů (<i>cluster of differentiation</i>)
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CEA	karcinoembryonální antigen (<i>carcinoembryonic antigen</i>)
CIITA	transaktivátor druhé třídy (<i>class II transactivator</i>)
CTLA-4	antigen cytotoxického T-lymfocyту 4 (<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
DAP	protein aktivující DNAX (<i>DNAX activation protein</i>)
dH₂O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNAM-1	molekula připojující se k DNAX (<i>DNAX accessory molecule</i>)
dNTPs	směs deoxynukleotidtrifosfátů
DUF	domena s neznámou funkcí (<i>domain of unknown function</i>)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctoá
ERp5	protein 5 endoplasmatického retikula (<i>endoplasmatic reticulum protein 5</i>)
FasL	ligand receptoru Fas
Fc	doména molekuly protilátky (<i>fragment crystallizable</i>)
FcεRI	vysoce afinitní receptor pro IgE
GPI	glykofosfatidil inositol
HA	hemaglutinin
HCMV	lidský cytomegalovirus (<i>human cytomegalovirus</i>)
HEK293	lidská embryonální ledvinná linie 293 (<i>human embryonic kidney 293 cells</i>)
HIV	lidský retrovirus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA	lidský leukocytární antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HN	hemaglutinin-neuraminidasa
Hsp	protein tepelného šoku (<i>heat shock protein</i>)
ICOS	indukovatelný kostimulátor T buněk (<i>inducible T-cell costimulator</i>)
iDC	nezralá dendritická buňka (<i>immature dendritic cell</i>)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin

IgG	imunoglobulin typu G
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
KIR	imunoglobulinový receptor zabijčských buněk (<i>killer cell Ig-like receptor</i>)
KLRK1	lektinový receptor NK buněk (<i>killer cell lectin-like receptor subfamily K member 1</i>)
LB	název média podle Luria-Bertaniho
LPS	lipopolysacharid, složka buněčné stěny gram-negativních bakterií
mDC	zralá dendritická buňka (<i>mature dendritic cell</i>)
MHC gp I	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy
MHC gp II	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy
MIC	MHC gp I-řetězcu příbuzný protein (<i>MHC class I chain-related protein</i>)
miRNA	mikroRNA
NCR	receptory přirozených zabijčů (<i>natural cytotoxicity receptors</i>)
NK	přirozený zabijč (<i>natural killer</i>)
NKG2	rodina receptorů NK buněk podobných lektinům C-typu (<i>natural killer group 2</i>)
NKG2D-L	ligandy NKG2D
NKp	receptor skupiny NCR (<i>natural killer cell protein</i>)
NKR-P1	receptor NK buněk (<i>natural killer cell receptor protein 1</i>)
NKT	NK-T lymfocyty (<i>natural killer T cells</i>)
NLS	jaderný lokalizační signál (<i>nuclear localisation signal</i>)
PBMC	jednojaderné bunky periferní krve (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCNA	jaderní antigen proliferaující buňky (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
PCR	polymerasová řetězcová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	protein programované buněčné smrti (<i>programmed cell death protein 1</i>)
pp65	protein virové obálky (<i>phosphoprotein 65</i>)
PUMA	modulátor apoptosy regulovaný proteinem p53 (<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
sB7-H6	rozpuštná forma B7-H6 (<i>soluble B7-H6</i>)
scFv	jednovláknový variabilní fragment protilátky (<i>single chain fragment variable</i>)
SH	protein homologní se Src (<i>Src Homology</i>)
Src	kinasy sarkomové rodiny (<i>sarcoma family kinases</i>)
ssRNA	jednovláknová RNA (<i>single-stranded RNA</i>)
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA
T_c	cytotoxický T-lymfocyt (<i>T cytotoxic cell</i>)
TCR	receptor T-lymfocytu (<i>T cell receptor</i>)
T_H	pomocný T-lymfocyt (<i>T helper cell</i>)
Tim-3	imunoglobulin a mucinovou doménu obsahující molekula 3 (<i>the immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3</i>)
TLR	receptor podobný proteinu Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
TRAIL	cytokin příbuzný TNF iniciující apoptosu (<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>)
TRC	komplex rozeznávající TMD (<i>TMD-recognition complex</i>)

TREM	spouštěcí receptory exprimované na myeloidních buňkách (<i>triggering receptors expressed on myeloid cells</i>)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UBL	doména podobná ubiquitinu (<i>ubiquitin-like domain</i>)
UL16	protein podobný ubiquitinu 16 (<i>ubiquitin-like protein 16</i>)
ULBP	UL16 vázající protein (<i>UL16 binding protein</i>)
WPRE	regulační element transkripce RNA (<i>Woodchuck posttranscriptional regulatory element</i>)

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Imunita

Imunitní systém je jedním ze základních homeostatických mechanismů organismu. Udržuje celistvost organismu rozpoznáváním patogenního od fyziologického a chrání ho tak před patogenními účinky prostřednictvím obranyschopnosti (rozpoznáváním a eliminací patogenů), autotolerance (snášenlivosti vlastních tkání) a imunitního dohledu (eliminací vlastních starých, poškozených nebo nefunkčních tkání) [1]. Reakce na antigen (rozeznávanou látku) může probíhat přes evolučně starší nespecifickou, neadaptivní imunitu anebo přes specifické, adaptivní mechanismy. Nespecifická imunita je tvořena humorálními a buněčnými (fagocytujícími a přirozeně cytotoxickými) složkami a kromě nich se na ní podílejí neimunitní obranné mechanismy kůže a sliznic. Evolučně mladší adaptivní imunitní odpověď je reakcí na v organismu přítomnou cizorodou strukturu za pomoci vysoce specifických receptorů T-lymfocytů prostřednictvím humorálních (protilátky) anebo buněčně zprostředkovaných složek imunitního systému, přičemž se od neadaptivní odpovědi liší schopností imunologické paměti [1].

1.2. NK buňky

NK buňky (*natural killer cells*, přirození zabíječi) patří morfologicky mezi velké granulární lymfocyty, postrádají však antigenně specifické receptory [1]. Pocházejí z hematopoetických prekursorových buněk, odkud putují do různých tkání, včetně sekundárních lymfatických orgánů [2]. Jsou charakterizovány dva hlavní podtypy NK buněk, jeden nacházející se v nereaktivních lymfatických uzlinách, s nízkou produkcí perforinů a CD16 receptoru, druhý nacházející se v periferní krvi, s vysokou produkcí perforinů a expresí CD16 receptoru [2]. NK buňky obecně rozeznávají buňky s abnormálně malým množstvím MHC glykoproteinů první třídy (MHC gp I) na jejich povrchu, mezi které patří některé nádorové a virově infikované buňky, kterých exprese MHC gp I je v důsledku mutace nebo přítomností patogenu výrazně eliminována pro obranu před rozeznáváním cytotoxickými T lymfocyty (T_C lymfocyty). Aktivace NK buněk vede k cytotoxické odpovědi zprostředkované buď degranulací a uvolněním štěpících enzymů (granzymy, perforiny), nebo ligandy pro receptory spouštějící apoptosu (FasL, TNF- α , TRAIL) [3]. Kromě toho jsou

do prostředí uvolňovány cytokiny a chemokiny a to především IFN- γ , který inhibuje proliferaci, angiogenezi, limituje metabolickou aktivitu nádorových buněk, snižuje množství antiapoptotických receptorů a podporuje adaptivní imunitní odpověď zprostředkovanou pomocnými T lymfocyty 1 (T_H1) spojenou s aktivací makrofágů [3].

1.2.1. Receptory NK buněk

Na povrchu NK buněk se vyskytují dva typy buněčných receptorů – stimulační a inhibiční [1]. Stimulační (aktivační) receptory po navázání ligandu podněcují cytotoxickou odpověď, která může být závislá na protilátkách (ADCC, *antipody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Receptorem zprostředkujícím ADCC je Fc-receptor CD16, jenž váže na antigen navázanou protilátku IgG. Inhibiční receptory rozeznávají MHC gp I a zprostředkují signál inhibující cytotoxickou odpověď. Některé z těchto receptorů rozeznávají s nižší afinitou MHC gp I s navázanými abnormálními peptidy pocházejícími z některých virových proteinů. Strukturně jsou rozlišitelné dvě skupiny inhibičních receptorů: imunoglobulinové inhibiční receptory, nazývány KIR (*killer cell Ig-like receptors*), jsou založeny na asociaci s cytoplasmatickými fosfatasami inhibujícími signalizační dráhy aktivované stimulačními receptory asociovanými s proteinkinasami. Inhibiční receptory podobné C-lektinům (*C-type lectin-like receptors*) jsou známy jak u myších (skupina receptorů Ly-49), tak u lidských NK-buněk (několik typů heterodimerů CD94/NKG2). Výsledná reakce NK-buňky na setkání s jinou buňkou je dána součtem stimulačních a inhibičních signálů [1].

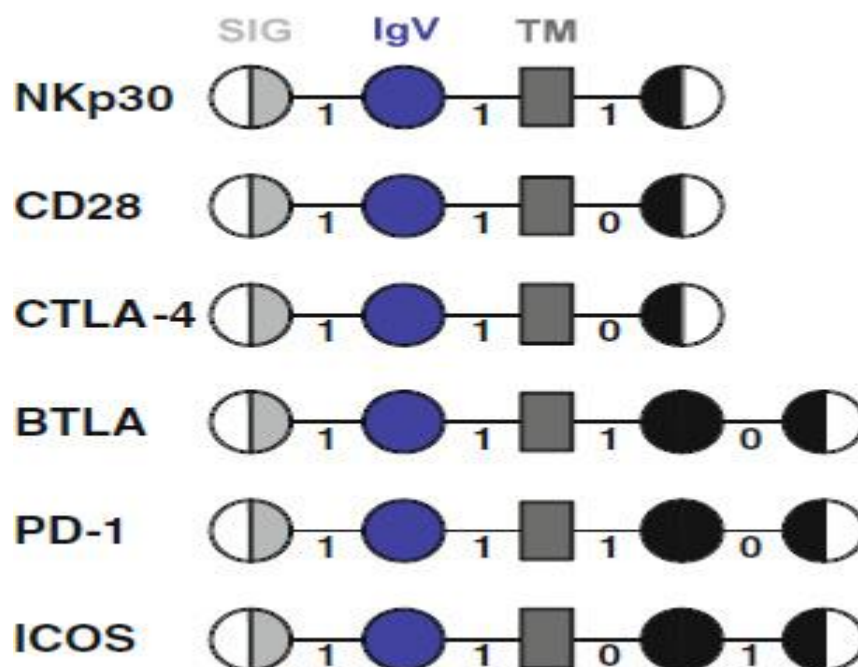
1.2.2. Aktivační receptory NK buněk

Kromě již zmíněných aktivačních receptorů exprimují NK buňky skupinu receptorů NCR (receptory přirozených zabíječů, *natural cytotoxicity receptors*), které jsou asociovány se signálními molekulami založenými na sekvenčním imunoreceptorovém tyrosinovém aktivačním motivu ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) [2]. Skupina NCR seskupuje receptory NKp30, NKp44 a NKp46 (*natural killer cell protein*). Všechny pozůstávají z extracelulární vazebné domény, transmembránové domény a krátké cytosolické domény, která ale nemá žádnou známou funkci [4, 5]. Další aktivační receptory jsou NKG2D (*natural killer group 2, protein D*), který přenáší signál

přes molekuly DAP10 nebo DAP12 (*DNAX activation protein*), DNAM-1 (*DNAX accessory molecule*), který signál zprostředkuje přímo, kostimulační receptor 2B4, NKp80 a CD94 (NKG2C) [2, 4].

1.2.2.1. NKp30

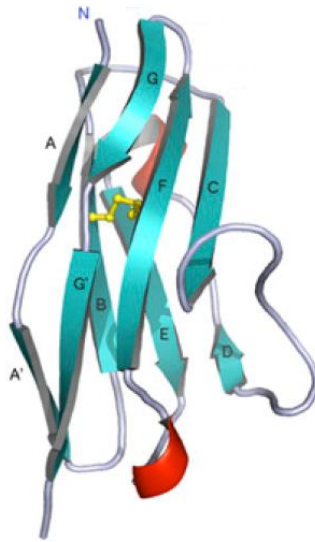
NKp30 (NCR3, CD337) je imunoglobulinový aktivační receptor NK buněk ze skupiny NCR objevený v roce 1999 jako mediátor cytotoxické odpovědi [1, 2]. Jeho gen je kódován ve vysoce polymorfním telomerním regionu lokusu lidského MHC třetí třídy na šestém chromosomu, mezi geny pro proteiny s jinými imunologickými funkcemi. Na základě struktury je zařazován do CD28 rodiny proteinů (obr. 1) [2, 4].



Obr. 1: Porovnání struktury genu pro NKp30 a jiné proteiny z rodiny CD28. „TM“ – transmembránová doména, „IgV“ – imunoglobulinová doména tvaru V, „SIG“ – N-koncová signální sekvence, nepřekládané regiony jsou vyznačené jako bílé, ostatní domény jako černé, „1“ mezi doménami značí přítomnost intronu [5].

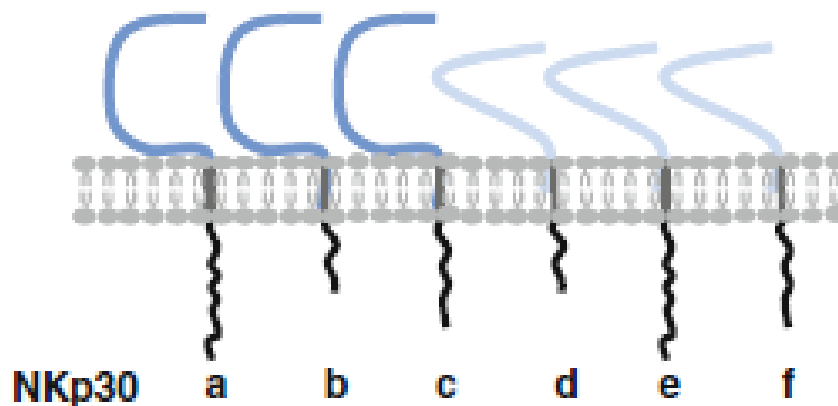
Obsahuje jednu imunoglobulinovou (Ig) extracelulární doménu napojenou přes krátkou spojovací doménu na transmembránovou část asociující s CD3 ζ nebo FcR γ nesoucí sekvenční motiv ITAM a krátkou intracelulární část bez signálního motivu [5]. Detailní struktura a identifikace vazebného místa NKp30 byly získány metodou

rentgenostrukturní analýzy v jak nevázaném stavu (obr. 2), tak v komplexu s ligandem B7-H6 [6].



Obr. 2: Struktura extracelulární domény NKp30 v nevázaném stavu [6].

Alternativním sestřihem může být dosaženo šesti transkriptů genu pro NKp30, tři s Ig doménou typu V (NKp30a, b, c) a tři s Ig doménou typu C (NKp30d, e, f), přičemž silně převládají isoformy s Ig doménou typu V. V závislosti na překládaném exonu 4 mohou být tyto Ig domény spojeny s třemi různými intracelulárními doménami (obr. 3) [5].



Obr. 3: Schematické porovnání délky a tvaru domén jednotlivých alternativních transkriptů NKp30 [5].

Studiem a porovnáváním NKp30 s Ig doménou typu V byly zjištěny značné rozdíly v odpovědi NK buněk na jimi zprostředkovaný signál [7]. Zatímco vazba ligandu na imunostimulační formy NKp30a a b vedla k produkci interferonu γ (IFN- γ) a interleukinu 2 (IL-2) a rozpoznání nezralých dendritických buněk (iDC), u NKp30c tyto účinky nebyly zaznamenány. Při kontaktu se zralými dendritickými buňkami (mDC) byla pozorována

produkce IFN- γ NK buňkami a IL-12 dendritickými buňkami v největším rozsahu při NKp30a, v nejmenším u NKp30c. Při vazbě na B7-H6 nádorových buněk jako jediné působily cytotoxicky NK buňky s NKp30a, u buněk s NKp30b byla zaznamenána jen produkce IFN- γ , naopak, buňky s NKp30c produkovaly inhibiční IL-10. Pozorovány byly i rozdíly v asociaci isoform NKp30 s CD3 ζ a korelace mezi pacienty s gastrointestinálním sarkomem a mírou produkce imunosupresivní NKp30c [7].

Vazba ligandů na NKp30 je ovlivněna přítomností flexibilní spojovací domény a glykosylací receptoru [8]. Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla *in vitro* zjištěna oligomerizace NKp30, která pozitivně koreluje s afinitou vazby na B7-H6, přičemž oligomerizace je ovlivněna právě přítomností spojovací domény [9]. NKp30 má tři N-glykosylační místa, která se sice nenacházejí přímo na vazebním místě, avšak glykosylace na Asn68 se ukazuje být esenciální pro vazbu ligandu BAG-6 (*BCL-2-associated athanogen 6*) a glykosylace na Asn42 a 68 jsou esenciální pro intracelulární signalizaci, což naznačuje, že mohou jemně zasahovat do konformačních změn ve vazebné doméně [8].

Jako jeden z prvních ligandů NKp30 byl označen protein pp65 (*phosphoprotein 65*) hlavní obálky cytomegaloviru z rodiny *Herpesviridae* [10]. Vazbou na NKp30 inhibuje cytotoxickou odpověď NK buněk na jím infikované buňky a to disociací CD3 ζ a tedy přerušením aktivační signalizační dráhy. Protein pp65 se k povrchu NK buněk dostává především po lyzi infikovaných buněk. To jsou nejčastěji nezralé dendritické buňky, které jsou normálně eliminovány NK buňkami za pomoci vazby NKp30 na membránovou formu BAG-6, inhibice cytotoxické odpovědi virem je proto pravděpodobně evoluční adaptací viru na imunitní odpověď [10]. Obdobně, funkce zprostředkované receptorem NKp30 jsou inhibovány hemaglutininem pocházejícím z viru *Vaccinia* [4].

Dalšími identifikovanými ligandy NKp30 jsou proteoglykany heparin a heparan sulfát, jejichž množství na buněčném povrchu je relativně vysoké u rakovinných buněk a které aktivují cytotoxickou odpověď NK buněk [4, 11]. Bylo prokázáno, že alternativní glykosylace rozpustných chimérách proteinů s extracelulární doménou NKp30 exprimovaných v různých buněčných liniích značně ovlivňuje vazbu těchto ligandů a může jí dokonce i zcela inhibovat [11]. Ukázalo se, že proteiny s nepravidelnější a větší glykosylací mají vazebnou schopnost na heparin a heparan sulfát značně omezenou [11].

BAG-6, multifunkční jaderný protein, byl také identifikován jako ligand pro NKp30, přičemž jeho rozpustná forma inhibuje cytotoxickou odpověď NK buněk [12]. Ukotven na membráně naopak NK buňky aktivuje. BAG-6 navíc rozeznává na NKp30 jiné vazebné místo, než pp65 [12].

Posledním identifikovaným ligandem NKp30 je B7-H6, receptor vyskytující se na nádorových buňkách, který vůči nim aktivuje cytotoxickou odpověď NK buněk [13].

1.2.3. NKp44

NKp44 (NCR2, CD336) je členem rodiny TREM (*triggering receptors expressed on myeloid cells*), což je skupina aktivačních receptorů, které hrají roli při odpovědi na zánět a při sepsi [4]. Jeho gen je kódován ve stejném regionu, jako NKp30, ale jeho exprese je detekovatelná pouze na základě aktivace NK buňky pomocí stimulace interleukinem 2. Transmembránová část NKp44 je asociována s ITAM obsahující podjednotkou DAP12 [4]. Extracelulární Ig doména tvoří dimer s pozitivně nabitým žlábkem, který je na základě topologie a dostupnosti známé z krystalografické struktury identifikován jako nejpravděpodobnější vazebné místo [14].

Cytotoxickou odpověď inhibující ligand pro NKp44 je PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), jaderný intracelulární protein ve větší míře exprimovaný na nádorových buňkách, který je transportován na jejich membránový povrch [4].

Pozitivně stimulující ligandy pro NKp44 jsou sialylované a sulfatované buněčné proteoglykany, hemaglutinin viru chřipky, hemaglutinin-neuraminidasa viru *Sendai* a doposud neznámá složka bakteriální buněčné stěny [4, 15].

Dalším ligandem NKp44 je NKp44L na povrchu CD4⁺ T lymfocytů, který aktivuje cytotoxickou odpověď NK buněk [16]. Exprese tohoto ligandu na povrchu buněk infikovaných virem HIV-1 (*human immunodeficiency virus*) byla potlačena účinkem proteinu Nef, což je molekulární podstatou úniku HIV-1 před imunitní odpovědí zprostředkovanou NK buňkami [16].

NKp44 hraje také sekundární roli při aktivaci NK buněk po vazbě složek buněčné stěny bakterie *Mycobacterium tuberculosis* na TLR-2 (*toll-like receptor 2*) [17].

1.2.4. NKp46

Receptor NKp46 (NCR1, CD335) se od ostatních členů NCR liší tím, že obsahuje dvě extracelulární imunoglobulinové domény typu C2 (orientované oproti sobě v úhlu 85 °) a jeho gen je lokalizován na chromosomu 19 [4, 18]. Podobně jako NKp30, jeho transmembránová část asociuje přes nabitou aminokyselinu s CD3 ζ řetězcem a s γ -řetězcem Fc ϵ RI. [4, 18]. Též byla rozluštěna krystalografická struktura extracelulární části NKp46 [19].

Pro NKp46 byl jako pro jediný protein skupiny NCR nalezen orthologní protein u myši a jiných druhů, což naznačuje, že jde o evolučně primární receptor zahrnutý v rozeznávání virem infikovaných a nádorových buněk [4].

NKp46 rozeznává β -buňky pankreatu a hvězdicovité buňky jater, přičemž vyvolaná odpověď NK buněk může vést k vývoji diabetu typu I, ne však u zdravých jedinců, u kterých se NK buňky v pankreatu nevyskytují [4]. Glykosylace NKp46 hraje důležitou roli při vazbě β -buněk a HA, přičemž HA spolu s HN jsou společnými ligandy pro NKp44 a NKp46 [20]. Navíc, pro vazbu HA je esenciální sialylace na druhé extracelulární doméně NKp46 a tuto vazbu neovlivňuje blokáce distální extracelulární domény specifickou protilátkou. [21].

Na druhou stranu, HA mohou být infikovanou buňkou vypuzené do prostředí a po vstupu do NK buněk mohou způsobit disociaci řetězců CD3 ζ a tak eliminovat signální kaskády iniciované vazbou aktivačních ligandů na NKp30 a NKp46 [4].

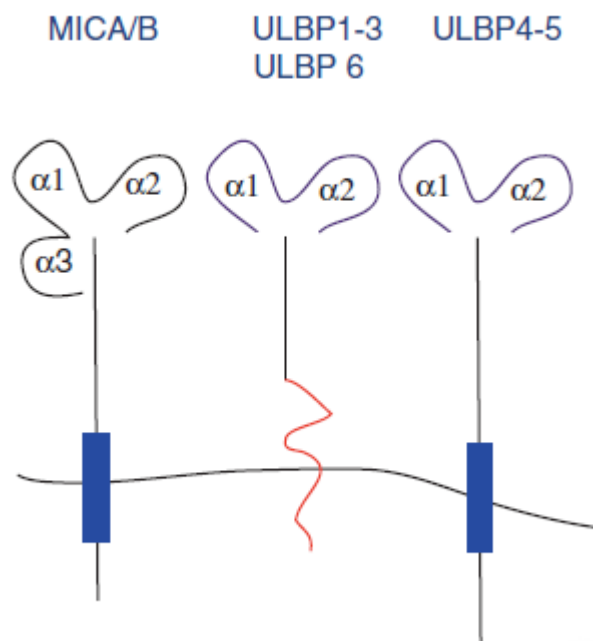
1.2.5. NKG2D a jeho ligandy

Aktivační receptor NKG2D je transmembránový receptor typu II a receptor podobný lektinu typu C, který je exprimován jako homodimer spojený disulfidickým můstkem [22]. Je kódován evolučně vysoko konzervovaným genem *KLRK1* na 12. chromosomu a kromě NK buněk se nachází na většině NKT buněk (*natural killer T cells*), lidských CD8⁺ a některých CD4⁺ a $\gamma\delta$ T buňkách [22].

NKG2D je alternativním sestřihem exprimován v dlouhé formě, jejíž transmembránová doména asociuje s proteinem DAP10, a v krátké formě, jejíž

transmembránová doména asociuje jak s DAP10, tak i s DAP12, přičemž každý z těchto přenašečů signálu aktivuje jinou signální kaskádu. Každý homodimer NKG2D asociuje s dvěma dimery daného přenašečového proteinu [22, 23]

Ligandy NKG2D tvoří širokou paletu proteinů vzdáleně příbuzných MHC gp I (obr. 4) [22]. Proteiny MICA a MICB (*MHC class I chain-related protein A, B*), podobně jako MHC gp I, mají tři extracelulární imunoglobulinové α -podjednotky. Ostatním ligandům NKG2D chybí v extracelulární části α 3 podjednotka – jde o glykoproteiny 1-6 vázající UL16 (ULBP1-6, *UL16 glycoprotein binding protein*), kódované ve společném genovém klastru na 6. chromosomu, a o myší rodinu proteinů H60 (H60a, H60b a H60c). Liší se také zachycením na membráně – zatímco ULBP1, 2, 3 a 6 jsou ukotvené glykofosfatidylinositolovou (GPI) kotvou, ostatní ligandy NKG2D jsou transmembránové proteiny s krátkým cytosolickým C-koncem. Všechny, ale především MICA a B, vykazují vysoký stupeň polymorfismu, což se odráží i na variabilní afinitě různých alelických variant k NKG2D [22]. Jako esenciální pro povrchovou expresi MICA a B se ukázala jejich N-glykosylace [24].



Obr. 4: Znárodnění zakotvení a struktury NKG2D ligandů [22].

Vysoká variabilita ligandů NKG2D je vysvětlována evolučním tlakem působícím na imunitní systém [22]. Například buňky infikované lidským cytomegalovirem (HCMV,

human cytomegalovirus) reagují zvýšenou expresí ligandů NKG2D, z nichž jsou však některé udržovány v cytosolu virovým proteinem H16 [22]. To sice neplatí pro ligand MICA, pro ten však byl v průběhu evoluce vyvinut jiný virový protein, UL142, který zabraňuje jeho expresi na povrchu infikovaných buněk. Existuje však vysoce frekventovaná alela proteinu MICA bez cytosolického C-konce, která je proto proti této virové strategii rezistentní, což ukazuje selektivní tlak HCMV na lidskou populaci [22, 25].

U zdravých jedinců byla sice transkripce genů pro ligandy NKG2D (NKG2D-L) zaznamenána na mnoha zdravých tkáních, jejich exprese je však v důsledku posttranslačních mechanismů příliš nízká pro aktivaci NK buněk po navázání na receptor NKG2D [22]. Zvýšená exprese byla nalezena pouze v některých proliferujících buňkách (např. v buňkách mozku myšího embrya), dále v některých primárních buněčných liniích a v souvislosti s některými autoimunitními chorobami [22].

Molekulární podstata modulace exprese NKG2D-L viry není doposud známá, možnostmi jsou přímé ovlivňování transkripce nebo indukce produkce cytokinů a interferonů. Bylo prokázáno, že vlivem produktu HIV genu *vpr* je indukována exprese ULBP1-3, na druhé straně HIV protein Nef je schopen produkci NKG2D-L utlumit. Infekce lidských dendritických buněk v pokusu také vedla k pozitivní regulaci exprese ULBP1-3 [22].

Mnoho typů nádorových buněk konstitutivně exprimuje zvýšené množství ligandů NKG2D a to především MICA, přičemž je jejich zvýšená exprese např. v případě rakoviny tlustého střeva přímo úměrná pozitivní prognóze progresu choroby. NKG2D-L na většině nádorových buněk vyvolává imunitní odpověď [22]

Na transkripční úrovni mohou být NKG2D-L regulovány prostřednictvím rozpoznání léze DNA (především dvouvláknového zlomu a zastavení replikace) protein kinasami ATM a ATR, které spouštějí kaskádu vedoucí k opravě poškozené DNA, přičemž na této kaskádě je neznámým molekulárním mechanismem závislé zvýšení exprese NKG2D-L. Také byla zjištěna pozitivní regulace transkripce NKG2D-L po navázání lipopolysacharidu (LPS) na TLR u makrofágů, protichůdný efekt byl zaznamenán při stimulaci různými cytokiny [23]. Další molekuly ovlivňující expresi ligandů MICA a B jsou histondeacetylasy, jejichž inhibice vede ke značnému zvýšení exprese těchto ligandů [26].

Jako původce suprese MICA a B umlčením genu (*silencingem*) byly identifikovány jak endogenní mikroRNA (miRNA), tak miRNA pocházející z HCMV, obě vázající se na 3'-konec nepřepisovaného regionu mediátorové RNA [22].

Po aktivaci NK buněk navázáním ligandu na NKG2D bylo prokázáno spuštění produkce cytokinů (např. IFN- γ), kostimulace některých T lymfocytů, či eliminace rakovinných buněk dendritickými epidermálními T lymfocyty *in vitro* [22].

Překvapivě, konstitutivní exprese ligandů NKG2D vede ke snížení funkce nejen NKG2D, ale také signalizačních drah nezávislých na NKG2D [22]. To může být zapříčiněno obsazením receptorů NK buněk rozpustnými formami ligandů, které mohou vznikat buď procesem zvaným „shedding“, čili proteolytickým odštěpením extracelulární části NKG2D-L, nebo alternativním sestřihem. Shedding byl doložen snížením koncentrace rozpustných forem NKG2D-L po aplikaci širokospektrého metaloproteasového inhibitoru a inhibitorů proteasas ADAM10 a 17 [22]. Navíc bylo zjištěno, že na povrchu buněk interaguje disulfidickou vazbou s MICA chaperon ERp5, jenž tak mění konformaci v $\alpha 3$ podjednotce receptoru MICA a usnadňuje jeho shedding. Exprese Erp5 je zvýšena v nádorových buňkách a byl identifikován motiv tvořený šesti aminokyselinami na $\alpha 3$ doméně MICA, kritický pro interakci s ERp5 [22, 26].

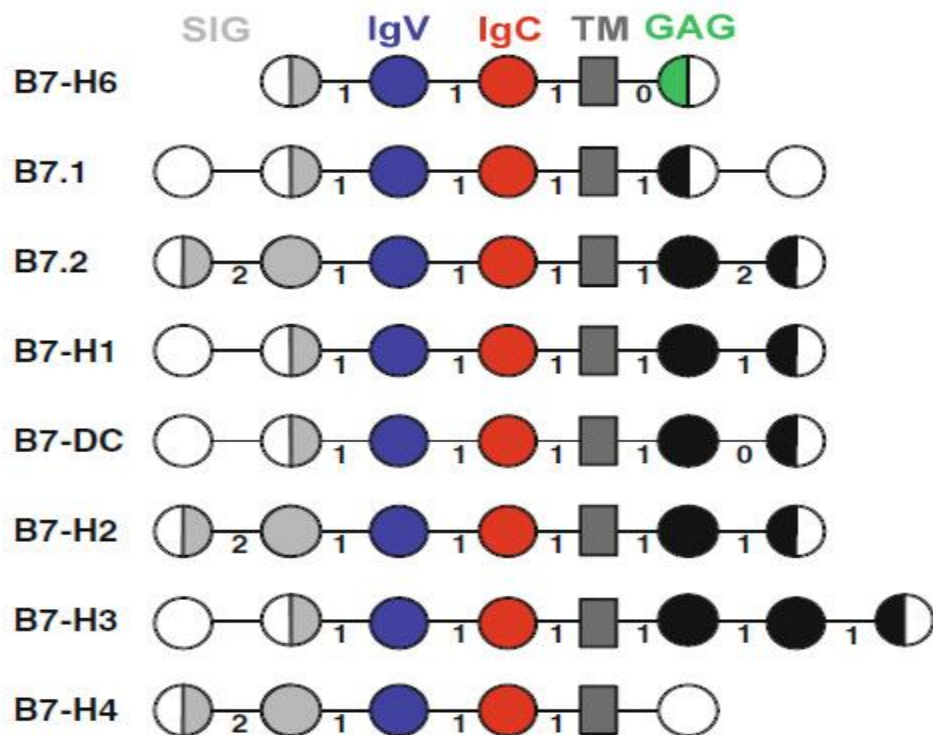
1.3. B7 rodina

Proteiny rodiny B7 jsou kostimulační a koinhibiční transmembránové receptory ovlivňující regulaci imunitní odpovědi [5]. První objevení zástupci, proteiny B7-1 (CD80) a B7-2 (CD86) jsou významné receptory na povrchu některých antigen prezentujících buněk (APC, *antigen presenting cells*), především makrofágů a dendritických buněk, které vazbou s transmembránovým receptorem naivních T lymfocytů CD28 kostimulují vazbu MHC gp II APC s TCR na T lymfocytech a napomáhají tak jejich diferenciaci a proliferaci [1, 5]. Na druhé straně vazba s transmembránovým receptorem na povrchu pomocných T lymfocytů CTLA-4 (*cytotoxin T-lymphocyte antigen 4*) působí na jejich aktivaci inhibičně [1, 5]. Ostatní proteiny ze skupiny B7 (B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-DC) jsou strukturními homology B7-1 a B7-2 se širším spektrem funkcí a méně omezenou distribucí [5]. B7-H1 a B7-H4 po navázání ligandu inhibičně tlumí imunitní odpověď, přičemž jejich exprese na různých typech lidských rakovinných buněk může způsobovat

inhibici imunitního systému [5]. B7-H2 působí kostimulačně, funkce B7-H3 se z tohoto hlediska liší při různých experimentálních podmínkách [5]. Doposud posledním identifikovaným proteinem rodiny B7 je transmembránový protein B7-H6 [13].

1.3.1. B7-H6

B7-H6 je nedávno (2009) objevený protein, identifikovaný jako ligand pro receptor NKp30, jehož nejbližšími strukturními homology jsou proteiny B7-H1 a B7-H3, díky čemuž byl zařazen do rodiny B7 (obr. 5) [13]. Podobně jako ostatní členové rodiny B7 pozůstává z dvou imunoglobulinových extracelulárních domén (IgC a IgV), N-terminální signální sekvence, transmembránové části a intracelulární domény. Ta je u B7-H6 homologní GAG polyproteinu a obsahuje různé signální motivy, jako ITIM (imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) nebo SH2- (Src homology) a SH3-vázající motivy, které jsou schopny iniciovat signalizaci po navázání ligandu na receptor [13].



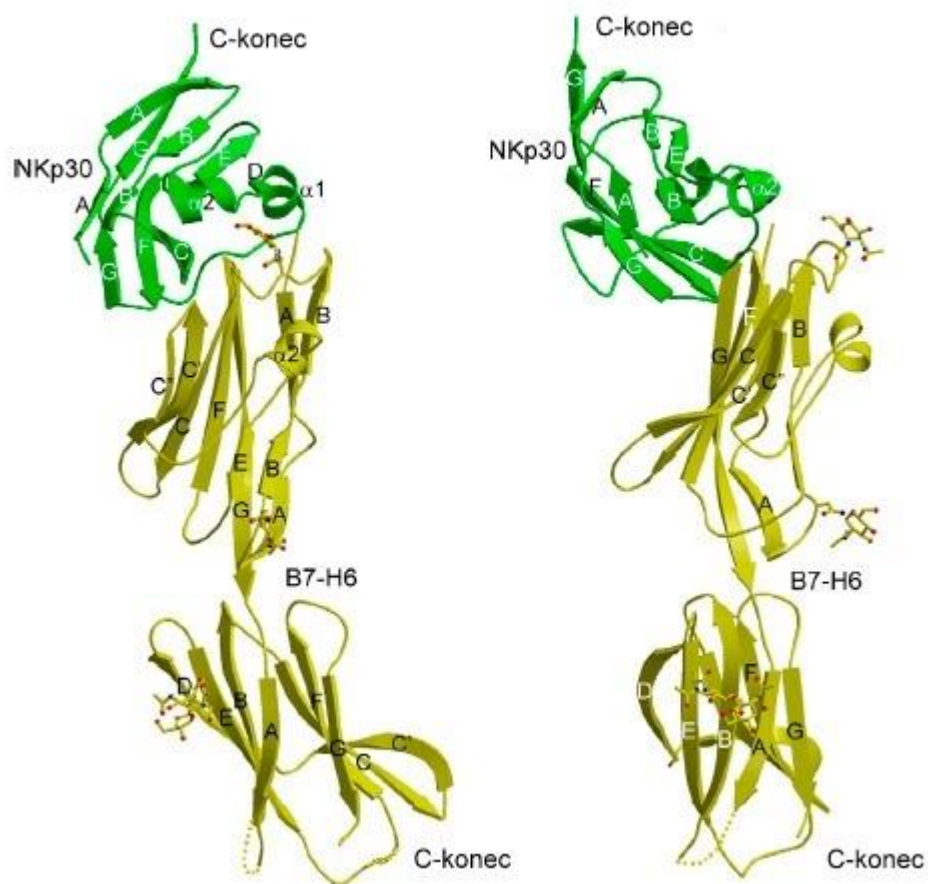
Obr. 5: Porovnání struktury genu pro B7-H6 a jiné proteiny z rodiny B7. „TM“ – transmembránová doména, „IgV“ – imunoglobulinová doména tvaru V, „IgC“ – imunoglobulinová doména tvaru C, „GAG“ – GAG doména, „SIG“ – N-koncová sekvence, nepřekládané regiony jsou vyznačené jako bílé, ostatní domény jako černé, číslo mezi doménami značí počet intronů [5].

Fylogenetickou analýzou sekvence B7-H6 bylo zjištěno, že B7-H6 je vysoce konzervován u primátů, ne však u ostatních savců, u kterých chybí GAG doména [5]. Navíc, u myši *Mus musculus* byla nalezena jen sekvenční homologie s prvním exonem lidského B7-H6, takže funkční B7-H6, podobně jako v případě NKp30, není u tohoto druhu exprimován [13].

Překvapivě, konstitutivní exprese B7-H6 nebyla detekována v žádných zdravých tkáních, byla však nalezena ve 24 ze 119 rakovinných buněčných linií, včetně T a B lymfomů, myeloidní leukémie, melanomů a karcinomů. [5, 13]. Indukovaná exprese však byla pozorována na jednojaderných buňkách periferní krve (PMBCs, *peripheral blood mononuclear cells*) *in vitro* po stimulaci některými ligandy transmembránových receptorů TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 (LPS, flagelin a jiné ligandy bakteriálního původu) a endosomálního receptoru TLR8, jehož ligandem je jednovláknová RNA (ssRNA, *single-strand RNA*) [27]. Indukce exprese B7-H6 byla se stejnou kinetikou zjištěna i po stimulaci prozánětlivými cytokiny TNF α a IL-1 β . Indukce exprese byla pozorována na purifikovaných CD14⁺ CD16⁺ monocitech, přičemž tyto monocyty byly následně schopné aktivovat NKp30⁺ buňky. Slabá exprese po indukci byla také pozorována na neutrofilech. Monocyty i neutrofile navíc vykazovaly produkci rozpustné formy B7-H6 (sB7-H6, *soluble B7-H6*). Klinické studie ukázaly, že B7-H6 byl přítomen téměř u poloviny pacientů se syndromem systematické zánětlivé odpovědi (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*) a to u pacientů trpících navíc sepsí. U těchto pacientů byla zároveň detekovaná přítomnost sB7-H6 a to u pacientů s infekcí způsobenou gram-negativními bakteriemi [27].

Jako jediný ligand B7-H6 byl identifikován NKp30, přičemž nebyla prokázána vazba B7-H6 na NKG2D a nebo jiný protein ze skupin CD28 a NCR [13]. Také vazba NKp30 na jiný protein rodiny B7 nebyla detekována, proto je B7-H6 považován za specifický ligand pro NKp30 [13].

Na základě rentgenostrukturální analýzy byla určena struktura B7-H6 jak v nevázaném, tak ve vázaném stavu s NKp30 (obr. 6, str. 16), který je v rámci celkové organizace a detailních meziatomových interakcí odlišný od jiných aktivačních komplexů receptorů B7 rodiny [28].



Obr. 6: Struktura NKp30 s vázaným B7-H6, struktury jsou vůči sobě otočeny o 90 ° podél vertikální osy [28].

B7-H6 je sice ligand aktivující odpověď NK buněk, nádorové buňky ho však pravděpodobně mohou zneužít pro obranu proti imunitě proteolytickým odštěpením jeho extracelulární části (tzv. shedding), která pak blokuje vazebná místa receptorů NKp30 [4].

1.4. BAG rodina

Proteinová rodina BAG (*BCL2-associated athanogen*) je skupina proteinů BAG-1, BAG-2, BAG-3, BAG-4 a BAG-6, jejichž společnou vlastností je přítomnost jedné C-terminální BAG domény [29]. Výjimku tvoří BAG-5 obsahující čtyři BAG domény. Obecně fungují jako adaptorové proteiny tvořící komplexy proteinů vazbou signálních molekul a vazbou svého N-terminálního konce na chaperony. Účastní se mnoha buněčných pochodů, jakými jsou odpověď na stres, proliferace, migrace a apoptosa [29].

1.4.1. BAG-6

BAG-6 neboli Bat3 (*HLA-B associated transcript 3*) je multifunkční protein z rodiny BAG-proteinů, kódovaný genem lokalizovaným v regionu imunorelevantních genů lidského hlavního histokompatibilního komplexu na chromosomu 6. Alternativním sestřihem exprimován ve dvou isoformách [29].

Jeho třídímenzionální struktura je známá jen pro N-terminální doménu podobnou ubikvitinu (UBL, *ubiquitin-like domain*, AK 13-87). Další identifikované úseky jsou doména s neznámou funkcí (DUF, *domain of unknown function*, AK 273-394), dlouhá doména bohatá na prolin (AK 195-681) a C-terminální BAG doména (AK 1055-1111). Sekvence BAG-6 také kóduje nukleární lokalizační signál (NLS, AK 1030-1054) (obr. 7) [29].



Obr. 7: Organizace domén v BAG-6, UBL – ubiquitin like domain, DUF – *domain of unknown function*, NLS – *nuclear localisation signal*, BAG – BAG doména [29].

Lokalizace BAG-6 v buňce se podle okolností různí – může být ovlivněna alternativním sestřihem, maskováním NLS interakcí s jinými proteiny, což vede k upřednostnění lokalizace v cytosolu, může být lokalizován na plasmatické membráně a při buněčném stresu je uvolňován na povrchu exosomů [29, 30]. Způsob jeho ukotvení na membránu zůstává doposud nevysvětlený, protože na základě primární struktury není předpokládána žádná transmembránová doména. Vysvětlení může spočívat buď ve spolupráci s Hsp70 (protein tepelného šoku, *heat shock protein*), nebo vazbou na adaptorový protein, který doposud nebyl identifikován [29, 30].

V klidových podmínkách zastává antiapoptotickou funkci – vazbou N-terminálního konce na 26S podjednotku proteasomu aktivuje proteasomální degradaci proapoptotických faktorů [29]. Ve stresových podmínkách však může apoptosu indukovat – po inaktivaci proteasomu je z BAG-6 odštěpen C-terminální úsek kaspasou-3, což navozuje apoptosu. Kromě toho, cytosolický BAG-6 interakcí s AIF (faktor indukující

apoptosu, *apoptosis-inducing factor*) reguluje jeho stabilitu a lokalizaci. Také byla pozorována neonatální letalita myši s delecí genu pro BAG-6, zapříčiněná vývojovými vadami způsobenými apoptosou a nedostatečnou buněčnou proliferací [29].

Po poškození DNA vlivem UV záření tvoří BAG-6 komplex s nukleárním proteinem p300 a proteinem p53 a tak indukuje acetylaci p53, který pak na transkripční úrovni indukuje expresi proteinů p21, zastavujícího buněčné dělení tvorbou komplexu s CDK2, a proteinu PUMA (modulátor apoptosy regulovaný proteinem p53, *p53 upregulated modulator of apoptosis*), způsobujícího apoptosu [29, 31]. Při poškození DNA vlivem ionizačního záření byla potřebná fosforylace kinasami ATM a ATR pro indukci apoptosy [29]. Navíc BAG-6 v komplexu s proteinem BRCA-1 (protein nádoru prsu, *breast cancer 1, early onset*) zprostředkuje homologní rekombinací opravu poškozeného DNA [29].

BAG-6 v komplexu s histon-lysin N-methyltransferasou SET1A a transkripčním faktorem BORIS (*brother of the regulator of imprinted sites*) demethyluje lysin K4 na histonu H3, mění tak poměr methylace na lysinech K4 a K9 a přes protein BORIS, který nasedá na promotory některých prokarcinogenů, pozitivně moduluje jejich expresi [32].

BAG-6 hraje též významnou roli i při kontrole kvality a degradaci proteinů [29]. UBL doména je zodpovědná za degradaci proteinů a BAG doména je schopna interagovat s Hsp70. BAG-6 je potřebný pro akumulaci Hsp70, které pak iniciují jeho degradaci, což staví BAG-6 do role hlavního regulátoru koncentrace Hsp70 v buňce. Navíc také reguluje stabilitu proteinu Hsp2A při spermatogenezi [29].

Další funkce BAG-6 spočívá v integraci proteinů do membrány C-koncem, který je hydrofobní a je obalován proteiny (Hsp40, Hsp70, Get3 u *Saccharomyces cerevisiae* a TCR40 (*TMD-recognition complex*) u savců) [29, 33]. Na příkladě tímto způsobem ukotveného proteinu Sec61 β byl popsán komplex BAG-6 a TRC40, který se vázal na hydrofobní C-konec Sec61 β a byl nezbytný pro pozdější fáze jeho integrace do membrány endoplasmatického retikula [29, 33].

Souvislost mezi kontrolou kvality proteinů a BAG-6 je zjevná vzhledem k přítomnosti domény UBL [29]. V této souvislosti BAG-6 váže komponentu 26S proteasomu, což způsobuje degradaci proapoptotických proteinů a váže jeden ze substrátů proteasomu, což také vyústí v degradaci proteasomu. Nově syntetizované

defektní ribozomální produkty asociují s BAG-6, který působí jako platforma pro přenos substrátů na 26S proteasom, přičemž tyto produkty jsou hlavním zdrojem peptidů vystavených na MHC gp I, což vysvětluje zjištěnou korelaci mezi absencí BAG-6 a sníženou prezentací antigenů za pomoci MHC gp I. Rychlou degradaci špatně sbalených nebo delokalizovaných proteinů řeší BAG-6 jejich navázáním a vložením do membrány anebo proteasomální degradací zprostředkovanou ubikvitinylací [29].

Studie také ukázaly, že BAG-6 je důležitý i pro regulaci jak nespecifického, tak i specifického imunitního systému. BAG-6 se váže na inhibiční receptor Tim-3 (imunoglobulin a mucinovou doménu obsahující molekula 3, *the immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3*) nacházející se na povrchu T-lymfocytů při infekci HIV-1 a hepatitidě C, čímž zabraňuje jejich buněčné smrti a podporuje produkci prozánětlivých cytokinů [29]. V rakovinných buňkách produkujících MHC gp II a v makrofázích byla pozorována synchronizovaná pozitivní regulace exprese BAG-6 s proteinem CIITA (*class II transactivator*), který reguluje expresi MHC gp II, po stimulaci IFN- γ . V *in vitro* podmínkách byl makrofág po tepelném šoku sekretován BAG-6, což utlumilo sekreci oxidu dusnatého a prozánětlivých cytokinů i navzdory stimulaci IFN- γ a LPS. Apoptosa makrofágů a epiteliálních buněk navozená bakterií *Mycobacterium tuberculosis* byla inhibována aktivací anti-apoptického proteinu BCL2 (*B-cell lymphoma 2*), jeho navázáním na BAG-6. Pohlcení apoptických buněk napomáhá BAG-6 stabilizací proteinu kaskádové dráhy, která končí uvolněním fosfatidyl serinu rozpoznávaného právě makrofágy [29].

Na iDC slouží BAG-6 jako aktivační ligand pro receptor NKp30 NK buněk aktivovaných už zralými dendritickými buňkami, což pravděpodobně zařizuje selekci imunologicky efektivnějších zralých dendritických buněk [29].

Zajímavý je antagonistický efekt rozpustné a membránové formy BAG-6 ve vztahu k vazbě na NKp30. Zatímco rozpustný BAG-6 se ukazuje jako inhibitor cytotoxicity NK-buněk, což bylo prokázáno na pokusech se sérem pacientů s diagnostikovaným Hodgkinovým lymfomem nebo chronickou lymfatickou leukémií, BAG-6 ukotvený na cytoplasmatické nebo exosomální membráně aktivuje NK buňky, přičemž jeho relokační z jádra na povrch buněk byla pozorována po kontaktu NK buněk s cílovými buňkami

zprostředkovaného prostřednictvím jiných receptorů (např. NKG2D NK buněk a MICA cílových buněk) [29, 34].

1.5. Využití fúzních proteinů v léčbě rakoviny

Navzdory široké paletě ligandů aktivačních receptorů NK buněk exprimovaných rakovinnými a virem infikovanými buňkami častokrát není imunitní reakce dostatečná pro jejich eliminaci, což je zapříčiněno různými mechanismy úniku před imunitním systémem popsanými výše [35]. Proto byly vyvinuty imunoterapeutické metody založené na rekombinantních proteinových konstruktech, které mají za úlohu zefektivnit nebo nabudit imunitní odpověď. Do dnešní doby bylo syntetizováno množství efektivních fúzních proteinů založených na aktivačních receptorech NK buněk, jejich ligandech a proti nim vyvinutých protilátkách [35].

1.5.1. Fúzní protein B7-H6:7D8

Fúzní protein pozůstává z extracelulární domény B7-H6 schopné vázat NKp30 a CD20-specifického jednovláknového variabilního fragmentu protilátky (*scFv*, *single chain fragment variable*) [36]. I když jeho vazba na NKp30 exprimující buňky byla sotva pozorovatelná (což je vysvětlováno nízkou afinitou NKp30 na B7-H6), B7-H6:7D8 byl specificky vázán na CD20 a bivalentní fúzní protein NKp30-Fc složený z extracelulární domény NKp30 a lidského IgG₁ Fc fragmentu. B7-H6:7D8 vyvolal produkci TNF- α a IFN- γ jenom u malé frakce NK buněk při vazbě na jejich NKp30 receptor, cytotoxická odpověď byla indukována až po jeho navázání i na CD20 receptor. Fúzní protein vyvolal lyzi odebraných rakovinných buněk pacientů jak s vysokou, tak ve většině případů i se střední nebo nízkou expresí CD20. Účinek B7-H6:7D8 byl v porovnání s ULBP2:7D8 (podobný fúzní protein s extracelulární doménou ligandu pro NKG2D, ULBP2, místo extracelulární domény B7-H6) nižší, což je připisováno vyšší vazebné afinitě CD20 na ULBP2:7D8 a nižší expresí NKp30 ve srovnání s NKG2D. Oba fúzní proteiny působily při eliminaci nádorových buněk synergicky a dosáhly vyšší efektivity. Podobně bylo dosaženo vyšší efektivity kombinací B7-H6:7D8 s komerčně dostupnou protilátkou proti CD20 rituximab. V obou případech jsou synergický účinek a absence kompetice dvou substrátů pro CD20

vysvětlovány dostatečnou koncentrací CD20 molekul pro vázání dostatečných množství obou substrátů [36].

1.5.2. Fúzní proteiny NKp30-Ig a NKp46-Ig

Tyto fúzní proteiny byly vyrobeny fúzí extracelulární části NCR a konstantní části protilátky IgG [37]. Jak vazba na nádorové buňky *in vitro*, tak i vyvolání imunitní reakce zprostředkované makrofágy v myších *in vivo* byly detekovány jen při použití NKp30-Ig. To autoři připisovali podstatně nižší stabilitou fúzního proteinu NKp46-Ig [37]. Studie však byla provedena před objevením ligandu NKp30 B7-H6 [13], což může být dalším vysvětlením odlišných pozorování.

1.5.3. Chimérické antigenní receptory založené na NKp30

V další studii byly modifikovanými primárními T lymfocyty exprimovány fúzní proteiny s extracelulární doménou z NKp30 a různými transmembránovými (TM) a cytosolickými (CYT) částmi: NKp30-3 ζ (TM a CYT část z CD3 ζ -řetězce), NKp30-CD8(TM)-3 ζ (TM část CD8 α a CYT CD3 ζ -řetězce), NKp30-CD28-3 ζ (TM a CYT část CD28 + CYT část CD3 ζ) a NKp30-CD28(TM)-3 ζ (TM část CD28 a CYT část CD3 ζ) [38]. Všechny takto upravené T lymfocyty vykazovaly vazbu na nádorové buňky, expresi IFN- γ (i po stimulaci dendritickými buňkami) a cytotoxickou aktivitu v spojení s eliminací nádorových buněk [38].

1.5.4. ULBP2-aCEA

Další fúzní protein byl syntetizován z extracelulární části ULBP-2 a scFv protilátky proti karcinoembryonálnímu antigenu (CAE, carcinoembryonic antigen) [39]. Obě části proteinu se vážou specificky na NKG2D, resp. na CAE. ULBP2-aCEA v *in vitro* podmínkách aktivoval eliminaci nádorových buněk tlustého střeva, *in vivo* indukoval aktivitu imunitního systému (modulace exprese CD69 na NK, T a NKT buňkách) a eliminaci nádorových buněk [39].

1.5.5. CD16xCD30

Bispecifická protilátka, vzniklá fúzí protilátky proti receptoru CD16A NK, T buněk a monocytů a protilátky proti CD30 receptoru, jehož exprese je zvýšena na buňkách

Hodgkinova lymfomu, byla testována *in vitro* jak na vazbu na rozpustné formy receptorů CD30 a CD16A, tak na buňkách izolovaných z krve pacientů i zdravých lidí [40]. Oba přístupy dokázaly specifickou vazbou protilátky na oba receptory a obnovu cytotoxicity NK-buněk, jejichž aktivita byla předtím utlumena rozpustnými formami ligandů NKG2D(tzv. shedding, viz kap. 1.2.5., str. 13) [40].

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je příprava expresních vektorů receptoru NKp30 a jeho ligandů B7-H6 a BAG-6 pro jejich expresi v buněčné linii HEK293 a studium jejich interakcí.

3. MATERIÁL

3.1. Pomůcky a přístroje

Aparatura pro filtraci	<i>Sigma-Aldrich, Německo</i>
Autokláv Varioklav 400 E	<i>H+P Labortechnik GmbH, Německo</i>
Automatické pipety Discovery	<i>HTL, Polsko</i>
Automatické pipety Pipetman	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra X-22	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga EBA 12 R	<i>Hettrich, Německo</i>
Fotoaparát Cyber-shot DSC W570	<i>SONY, Japonsko</i>
High-Speed Plasmid Mini Kit	<i>Geneaid, USA</i>
Inkubátor IR 5000	<i>Flow Laboratories, USA</i>
Kahan	<i>Závod Votice, ČR</i>
Koncentrátor Amicon Ultra 10 kDa	<i>Millipore, USA</i>
Laminární box Clean Air Technik B. V.	<i>PMV, Belgie</i>
Lednice 225 R	<i>Calex, ČR</i>
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Magnetická míchačka Stirrer Varimag	<i>H+P Labortechnik GmbH, Německo</i>
Mono Grey	
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	<i>VWR, USA</i>
Mrazící box (-20 °C)	<i>Calex, ČR</i>
Mrazící box (-80 °C)	<i>Sanyo, Japonsko</i>
Nucleobond® Xtra Maxi	<i>Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Německo</i>
pH metr 3310	<i>Jenway, UK</i>
Předvážky KB1200-2	<i>Kern, Německo</i>
Rotační vak. odparka SpeedVac DNA 110	<i>Savant, USA</i>
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Bioekystone, USA</i>
Spektrofotometr NanoVue Plus	<i>GE Healthcare, UK</i>
Termoblok LS1	<i>VLM, Německo</i>
Termocykler Progene	<i>Techne, UK</i>
Termocykler Techgene	<i>Techne, UK</i>
Termostat LS1	<i>VLM, Německo</i>
UV prosvěcovací lampa (300 nm)	<i>Ultra-Lum, USA</i>
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	<i>Uvitec, UK</i>
Vařič	<i>ETA, ČR</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, Německo</i>

3.2. Chemikálie

3.2.1. Enzymy

Agel	<i>New England Biolabs, USA</i>
Deep Vent DNA polymerasa	<i>New England Biolabs, USA</i>
KpnI	<i>New England Biolabs, USA</i>
Q5 [®] High-Fidelity polymerasa	<i>New England Biolabs, USA</i>
RNAsa A	<i>New England Biolabs, USA</i>
T4 DNA ligasa	<i>New England Biolabs, USA</i>

3.2.2.

Bakteriální kmeny

E. coli DH5 α

RNDr. Marek Ingr, Ph.D., Praha, ČR

3.2.3.

Vektory

pTW5sec

Bc. Lukáš Slavata [41]

pMOWS_plus B7-H6 eGFP

Dr. Maren Klaus, Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors

pcDNA3.1 myc-his B Bat3v2 fl

Prof. Dr. rer. nat. Elke Pogge von Strandmann

pTW5sec_NKp30

Mgr. Jan Bláha

3.2.4. Primery pro PCR

NKp30_LBD_FW

5'-AAAAACCGGTCTGTGGGTTTCTCAGCCGCCGG-3'

NKp30_LBD_REV

5'-TTTTGGTACCTTCTTCTCCACAACCAGACGAGTGCCG-3'

B7-H6_1_FW

5'-AAAAACCGGTGATCTGAAAGTAGAGATGATGGCAGG-3'

B7-H6_1_REV

5'-TTTTGGTACCCACAACCTCAAGCTGGACTGTTCCC-3'

B7-H6_2_REV

5'-TTTTGGTACCCAGGGTAAAGTTGCTCCTCAAGGG-3'

BAG6_FW

5'-AAAAACCGGTGGTCTTGAGAGCCTGTCACCG-3'

BAG6_REV

5'-TTTTGGTACCCCTGCGAACGTATCTGAGAATGGC-3'

pTT5_FW

5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

pTW5sec_REV

5'-AAGCAGCGTATCCACATAGCG-3'

3.2.5. Roztoky a média

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	<i>New England Biolabs, USA</i>
TAE pufr, 1x konc.	10 mM Tris, 20 mM CH ₃ COOH, 1 mM EDTA
STOP pufr	<i>New England Biolabs, USA</i>
ThermoPol pufr, 1x konc.	<i>New England Biolabs, USA</i>
Pufr pro T4 DNA ligasu, 1x konc.	<i>Fermentas, Kanada</i>
Roztoky pro miniizolaci plasmidové DNA	<i>Geneaid, USA</i>
Roztoky pro extrakci z gelu	<i>Geneaid, USA</i>
Roztoky pro pročištění PCR produktů	<i>Geneaid, USA</i>
Roztoky pro přípravu zásobního množství plasmidů	<i>MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Německo</i>

3.2.6. Ostatní běžné chemikálie

Ampicilin	<i>Biotika, Slovensko</i>
dNTP's	<i>Top-Bio, ČR</i>
GoodView	<i>Ecoli, Slovensko</i>
MgSO₄	<i>New England Biolabs, USA</i>
PCR H₂O	<i>Top-Bio, ČR</i>
Standart pro agarosovou elektroforézu	<i>New England Biolabs, USA</i>
Tris	<i>Roth, Německo</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Trypton	<i>Oxoid, UK</i>

4. METODY

4.1. PCR amplifikace

V 0,2ml PCR mikrozukmavkách byly smíchány primery, templáty, reakční pufr, směs deoxynukleotid trifosfátů, ddH₂O, případně 3M MgSO₄ a polymerasy dle tabulky 1, přičemž polymerasy byly pipetovány vždy jako poslední. Reakce probíhaly v celkovém objemu 50 µl.

Tab. 1: Objemy reaktantů v PCR.

	LBD	B7-H6_1
Přímý primer (0,5µM)	5,0 µl NKp30_LBD_FW	5,0 µl B7-H6_1_FW
Reverzní primer (0,5µM)	5,0 µl NKp30_LBD_REV	5,0 µl B7-H6_1_REV
Templát	6,0 µl del	5,0 µl pMOWS_plus B7-H6 eGFP
dNTPs	1,5 µl	1,5 µl
100mM MgSO₄	-	1,5 µl
Q5 Enhancer	10 µl	-
Pufr	10 µl Q5 reakční pufr	5 µl Thermopol pufr
dH₂O	12 µl	26,5 µl
Polymerasa	0,5 µl Q5 high fidelity polymerasa	0,5 µl Deep Vent DNA polymerasa
	B7-H6_2	BAG-6
Přímý primer (0,5µM)	5,0 µl B7_H6_1_FW	5,0 µl BAG6_FW
Reverzní primer (0,5µM)	5,0 µl B7-H6_2_REV	5,0 µl BAG6_REV
Templát	6,0 µl pMOWS_plus B7-H6 eGFP	1,0 µl
dNTPs	1,5 µl	1,5 µl
100mM MgSO₄	-	-
Q5 Enhancer	10 µl	10 µl
Pufr	10 µl Q5 reakční pufr	11 µl Q5 reakční pufr
dH₂O	12 µl	17 µl
Polymerasa	0,5 µl Q5 high fidelity polymerasa	0,5 µl Q5 high fidelity polymerasa

Reakce proběhla v termocykleru s následujícím termálním profilem:

- I. 1 cyklus: 5 min, 94 °C
- II. 30 cyklů:
 - a. 30 s, 94 °C
 - b. 30 s, 56 °C
 - c. 1 min, 72 °C
- III. 1 cyklus: 10 min, 72 °C

Zkumavky zůstávaly do vyjmutí při teplotě 4 °C.

4.2. Agarosová elektroforéza

Produkty PCR byly analyzovány nebo izolovány pomocí agarosové elektroforézy. Vzorky pro analýzu produktů LBD a B7-H6_1 byly připraveny smícháním 5 μ l produktu s 0,5 μ l DNA vzorkového pufru. K 50 μ l produktů B7-H6_2 a BAG6 bylo přidáno 5 μ l DNA vzorkového pufru.

Rozpuštěním 0,8 g agarosy v 65 ml TAE pufru, zahříváním v mikrovlnné troubě po dobu 1,30 min, přidavkem 3 μ l roztoku fluorescenční DNA detekční barvy GoodView po vychlazení roztoku na přibližně 40 °C a nalitím roztoku do aparatury na elektroforézu s následně přidaným hřebínkem byl připraven 1,25% agarosový gel, který byl ponechán tuhnout při laboratorní teplotě 15 – 20 min. Do prostoru elektrod byl nalit TAE pufr a gel byl převrstven 200 ml dH₂O.

Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 5,5 μ l vzorků určených pro analýzu (LBD, B7-H6_1), 55 μ l PCR produktů B7-H6_2 a BAG6 bylo rozděleno do třech jamek po 20, 20 a 15 μ l. Vedle vzorků byl pipetován 100 bp standard. Elektroforéza probíhala 15 min při napětí 190 V.

Správnost velikosti PCR produktů byla ověřena vizualizací na UV prosvěcovací lampě při 312 nm a porovnáním se standardem.

4.3. Izolace z agarosového gelu

Části gelu obsahující PCR produkty B7-H6_2 a BAG6 byly vyříznuty a kvantitativně převedeny do 1,5ml mikrozkušavky. Dle manuálu dodavatele byla provedena extrakce pomocí soupravy Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (*Geneaid*) [42] a fragmenty DNA byly eluovány do 1,5ml mikrozkušavek předem vyhřátou 65°C sterilní dH₂O. Roztoky byly nakonec odpařeny na odpařovači SpeedVac na objem 15 μ l.

4.4. Srážení

45 μ l PCR produktů LBD a B7-H6_1 bylo sráženo nejprve přidavkem 125 μ l 100% ethanolu a 5 μ l 3M octanu sodného při teplotě -20 °C po dobu 25 min. Při teplotě 4 °C byla sraženina oddělena centrifugací (20 min, 20 000 \times g) a dekantací. Sraženina byla resuspendována v 200 μ l 70% ethanolu a vzniklá suspenze byla centrifugována po dobu

15 minut při stejných podmínkách. Po slití supernatantu byla DNA vysušena na odpařovači SpeedVac po dobu 10 minut. Peleta DNA byla rozpuštěna v 15 μl sterilní dH_2O .

4.5. Restrikční štěpení plasmidu

0,3 μl plasmidu bylo smícháno s 2 μl BSA (1 mg/ml), 2 μl NEB1 pufru a 14,7 μl sterilní dH_2O , k roztoku bylo přidáno po 0,5 μl restrikčních endonukleas Agel a KpnI. Plasmid byl štěpen při 37 °C 60 min a enzymy byly deaktivovány při 65 °C 20 min. Správnost délky štěpeného plasmidu byla ověřena agarosovou elektroforézou, následně byl plasmid izolován (5.1.3.).

4.6. Restrikční štěpení PCR produktů

K 15 μl PCR-produktů byly přidány 2 μl 10x BSA, 2 μl NEB1 pufru a po 0,5 μl Agel a KpnI restrikčních endonukleas. Restrikce probíhala 60 min při teplotě 37 °C. Inaktivace enzymu Agel probíhala 20 min při 65 °C a štěpené PCR-produkty byly následně přečištěny (kap. 4.3.).

4.7. Ligace

Ligace byly provedeny v objemu 20 μl , s přídávkem 5 μl linearizovaného plasmidu, 2 μl ligačního pufru, 1 μl T4 DNA ligasy a objemy štěpených PCR produktů a sterilní dH_2O zřehledněnými v tabulce 2.

Tab. 2: Ligační směsi

	Štěpený PCR-produkt	Sterilní dH_2O
LBD	6 μl	6 μl
B7-H6_1	10 μl	2 μl
B7-H6_2_1	5 μl	7 μl
B7-H6_2_2	10 μl	2 μl
BAG6_1	5 μl	7 μl
BAG6_2	10 μl	2 μl

Reakce probíhala při laboratorní teplotě jednu hodinu.

4.8. Transformace

Pro transformaci byly použity kompetentní bakterie *Escherichia coli* kmene DH5 α uchovávané při -80 °C. Po jejich roztátí na ledu následovala 30min inkubace při 0 °C. Ligační směsi byly hned po ukončení ligace přidány k 50 μ l buněk a inkubovány 30 min při 0 °C. S výjimkou směsi s B7-H6_1 byla celá směs asepticky napipetována na agarem ztužené LB médium na Petriho misce s přidavkem ampicilinu (100 μ g/ml) a rovnoměrně rozetřena po misce „hokejkou“. V případě B7-H6_1 byl po 30min inkubaci při 0°C proveden tepelný šok ponořením směsi do 42°C vodné lázně na 1 min a zpětným umístěním na led. Do suspenze byl hned přidán 1 ml 37°C předeřátého LB média a suspenze byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Následně byla centrifugována 3 min při 3000 x g, supernatant byl slit a peleta resuspendována ve zbytku supernatantu. Vzniklá suspenze byla pipetována na Petriho misku se s agarem ztuženým LB médiem s přidavkem ampicilinu (100 μ g/ml). Petriho misky byly inkubovány v termostatu při 37 °C 16 hod a vyrostlé kolonie byly uskladněny v lednici při 4 °C.

4.9. PCR z kolonií

Z jednotlivých Petriho misek bylo pomocí automatické pipety vybráno několik kolonií, z kterých každá byla resuspendována v 6 μ l sterilní dH₂O v 0,2ml mikrozkušavce a posléze bylo touže špičkou zaočkováno 5 ml LB média s ampicilinem (100 μ l/ml) v 50ml plastové zkumavce s víčkem. Kultury v plastových zkumavkách byly inkubovány na třepačce 16 – 20 hod při 37 °C a rychlosti 220 ot./min.

Do suspenze izolovaných kolonií s 6 μ l sterilní dH₂O bylo pipetováno 10 μ l 2x koncentrované PPP PCR reakční směsi, 2 μ l přímého primeru pTT5_FW a 2 μ l reverzního primeru pTW5sec_REV. PCR proběhla v termocykleru s následujícím termálním profilem:

- I. 1 cyklus: 5 min, 94 °C
- II. 20 cyklů:
 - a. 30 s, 94 °C
 - b. 30 s, 56 °C
 - c. 1 min, 72 °C
- III. 1 cyklus: 10 min, 72 °C

Zkumavky byly do odebrání ponechány při teplotě 4 °C. Ze vzorků bylo pipetováno po 5 µl na agarosovou elektroforézu (4.2.).

4.10. Miniizolace plasmidové DNA

Natřepané kultury z kolonií byly po inkubaci odstředěny v 1,5ml mikrozukmavkách postupně po 1 ml vždy 1 min při 15000 x g, přičemž supernatant byl pokaždé slit. Peleta byla resuspendována na vortexu v 200 µl PD1 pufru s přidanou RNAsou A z komerčního kitu High-Speed Plasmid Mini Kit (*Geneaid*, USA) [43] a při izolaci plasmidové DNA bylo postupováno podle návodu z kitu. Plasmidová DNA byla nakonec eluována 50 µl sterilní vody předeštěné na 65°C.

4.11. Měření koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota izolovaných plasmidových DNA byly měřeny na spektrofotometru NaNo Vue Plus, kde se pro měření používá 3 µl vzorky. Jako reference byla použita sterilní dH₂O. Čistota DNA je měřena jako poměr absorbcí při vlnové délce 260 a 280 nm, přičemž vzorek je za čistý považován při hodnotě 1,8. Nižší čísla naznačují přítomnost proteinu nebo jiných kontaminantů, silně absorbujících při vlnové délce 280 nm.

4.12. Sekvenace

V 0,2ml mikrozukmavkách byly smíchány sekvenační primery, sterilní dH₂O a izolované plasmidy v poměrech uvedených v tabulce 3 (str. 32).

Do každé zkumavky bylo poté přidáno v Laboratoři sekvenace DNA PŘF UK RNDr. Štěpánkou Hrdou 6 µl sekvenační a reakční směsi. Analýza byla provedena přístrojem Genetic Analyzer 3130 (*Applied Biosystems*) s 16 kapilárami.

Tab. 3: Objemy reaktantů pro sekvenaci.

Plazmidová DNA	0,2ml zkumavka	Primer	Plazmidová DNA	ster. dH ₂ O
LBD	LBD_FW	pTT5_FW	3 µl	4 µl
	LBD_REV	pTW5sec_REV	3 µl	4 µl
B7-H6_1_A	B7-H6_1_A_FW	pTT5_FW	5 µl	2 µl
	B7-H6_1_A_REV	pTW5sec_REV	5 µl	2 µl
B7-H6_1_B	B7-H6_1_B_FW	pTT5_FW	7 µl	-
	B7-H6_1_B_REV	pTW5sec_REV	7 µl	-
B7-H6_2_A	B7-H6_2_A_FW	pTT5_FW	6 µl	1 µl
	B7-H6_2_A_REV	pTW5sec_REV	6 µl	1 µl
B7-H6_2_B	B7-H6_2_B_FW	pTT5_FW	4 µl	3 µl
	B7-H6_2_B_REV	pTW5sec_REV	4 µl	3 µl
BAG6_A	BAG6_A_FW	pTT5_FW	5 µl	2 µl
	BAG6_A_REV	pTW5sec_REV	5 µl	2 µl
BAG6_B	BAG6_B_FW	pTT5_FW	4 µl	3 µl
	BAG6_B_REV	pTW5sec_REV	4 µl	3 µl

4.13. Příprava zásobního množství plasmidů

Kolonie byly rozetřeny v přibližně 5 ml LB média a přeneseny do 2l Erlenmeyerových baněk s 500 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml). Kultury byly inkubovány na třepačce 16 hod při 37 °C a 220 ot./min). Posléze byly centrifugovány v 250ml kyvetách po dobu 15 minut při 4500 x g, pelety byly resuspendovány na vortexovém mixéru v 30 ml TES pufru a suspenze byla opět centrifugována 15 minut při 4500 x g. Dále byl postup dodržován podle návodu komerčního kitu PureLink™ HiPure Plasmid DNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Německo) [44]. Koncentrace a čistota izolovaných plasmidů byla opět měřena na spektrofotometru Nano Vue Plus.

5. Výsledky práce

Na základě dostupné literatury byly nejprve navrženy vhodné konstrukty pro geny proteinů NKp30, B7-H6 a BAG-6. Konstrukt LBD odpovídá extracelulární vazebné doméně NKp30 bez jeho spojovací domény, dlouhé 112 aminokyselin (obr. 8) [6, 8], konstrukty B7-H6_1 a B7-H6_2 odpovídají extracelulární části B7-H6 s jednou (116 aminokyselin), resp. s oběma (221 aminokyselin) imunoglobulinovými doménami (obr. 9) [28]. Konstrukt BAG6 odpovídá 251 aminokyselin dlouhému úseku G₆₈₆-R₉₃₆, jehož vazba na NKp30 byla prokázána jako dostačující pro inhibici NK buněk přes navázání na NKp30 (obr. 10, str. 34) [45].

MAWMLLL I L I MVHPGSCALWVSQPPE I RTLEGSSAFLPCSFNASQGRLA I GS
VTWFRDEVVPGKEVRNIGTPEFRGRLAPLASSRFLHDHQAELH I RDVRGHDAS
I YVCRVEVLGLGVGTGNIGTRLVVEKEHPQLGAGTVLLLRAGFYAVSFLSVAV
GSTVYYQGKCLTWKGP RRQLPAVVPAPLPPPCGSSAHLPPVPGG

Obr. 8: Sekvence proteinu NKp30: modře je označena signální sekvence, žlutě konstrukt LBD, zeleně spojovací doména, oranžově transmembránová doména, červeně cytosolická doména, fialově glykosylační místa, šedě disulfidické můstky.

MTWRAAASTCAALL I LLWALTTEGDLKVE MMAGGTQ I TPLNDNVT I FCN I FY
SQPLN I TSMG I TFWKSLTFDKEVKVFEFFGDHQEAFRPGA I VSPWRLKSGD
ASLRLPG I QLEEAGEYRCEVVV TPLKAQGT VQLEVVASPARLLLDQVGMKE
NEDKYMCESSGFYPEA I N I TWEKQTQKFPHP I E I SEDV I TGPT I KNMDGTFN
VTSCLKLNSSQEDPGTVYQCVVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDN
FS I HWWP I SF I GVGLVLL I VL I PWKK I CNKSSSAYTPLKC I LKHWNSFDTQT
LKKEHL I FFCTRAWPSYQLQDGEAWPPEGSVN I NT I QQLDVF CRQEGKWSEV
PYVQAFFALRDNPDL CQCCR I DPALL TVTSGKS I DDNSTKSEKQTPREHSDA
VPDAP I LPVSP I WEPPPATTSTTPVLSSQPPTLLLPLQ

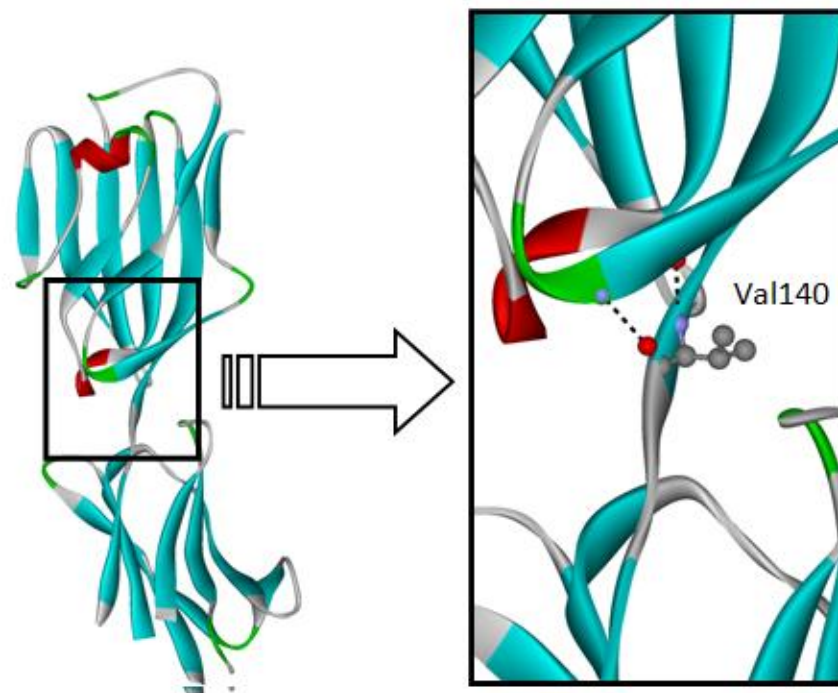
Obr. 9: Sekvence proteinu B7-H6: Modře je označena signální sekvence, žlutě s podtrhnutím konstrukt B7-H6_1, žlutě konstrukt B7_H6_2, tyrkysově transmembránová doména, červeně cytosolická doména, fialově N-glykosylační místa, šedě disulfidické můstky.

MEPNDSTSTAVEEPDSLEVLVKTLDSTQTRTF I VQAQMNVKEFKEH I AASVS I
PSEKQRL I YQGRVLQDDKKLQEYNVGGKV I HLVERAPPQTHLPSGASSGTGS
ASATHGGGSPPGTRGPGASVHDRNANSYVMVGTFNLPDGSASVDVH I NMEQA
PIQSEPRVRLVMAQHMI RD IQTLLSRMETLPYLQCRGGPQPQHSQPPPQPPA
VTPEPVALSSQTSEPVSEAPPREPMEAEVEERAPAQNPELTPGPAPAGPT
PAPETNAPNHPSPAEYVEVLQELQRLESRLQPFLQRYEVLGAAATTDYNNN
HEGREEDQRL I NLVGESLRLLGNTFVALSDLRCNLACTPPRHLHVVRPMSHY
TTPMVLQQAAP I Q I NVGTTVTMTGNGTRPPPTPNAEAPPPGPGQASSVAPS
STNVESSAEGAPPPGPAPPPATSHPRV I R I SHQSVEPVMMHMN I QDSGTQP
GGVPSAPTGPLGPPGHGQTLGQQVPGFPTAPTRVV I ARPTPPQARPSHPGGP
PVSQTLQGAGLGTNASLAQMVSLVGLLQMPVLVAQGTPGMAPPPAPATAS
ASAGTTNTATTAGPAPGGPAQPPPTPQPSMADLQFSQLLGNLLGPAGPGAGG
SGVASPT I TVAMPGVPAFLQGMTDFLQATQTAPPPPPPPPPPPAPEQQTMP
PPGSPSGGAGSPGGLGLESLPEFFTSVVQGVLSLLGSLGARAGSSES I AA
F I QRLSGSSN I FEPGADGALGFFGALLSLLCQNFMSVDVVMLLHGHFQPLQR
LQPQLRSFFHQHYLGGQEPTPSN I RMATHTL I TGLEEYVRESFSLVQVQPGV
DI I RTNLEFLQEQFNS I AAHVLHCTDSGFGARLLELCNQGLFECLALNLHCL
GGQMEAAV I INGR I RRMSRGVNPVSLVSWLTTMMGLRLQVVLEHMPVGPDA I
LRYVRRVGDPPQPLPEEPMEVQGAERASPEPQRENASPPAGTTAEAMSRGP
PPAPEGGSRDEQDGASAETEPWAAAVPPEWVP I IQQDIQSQRKVKPQPPLSD
AYLSGMPAKRRKTMQGEQPQLLSEAVSRAAKAAGARPLTSPELSRDLEAP
EVQESYRQQLRSD I QKRLQEDPNYSPQRFPNAQRAFADDP

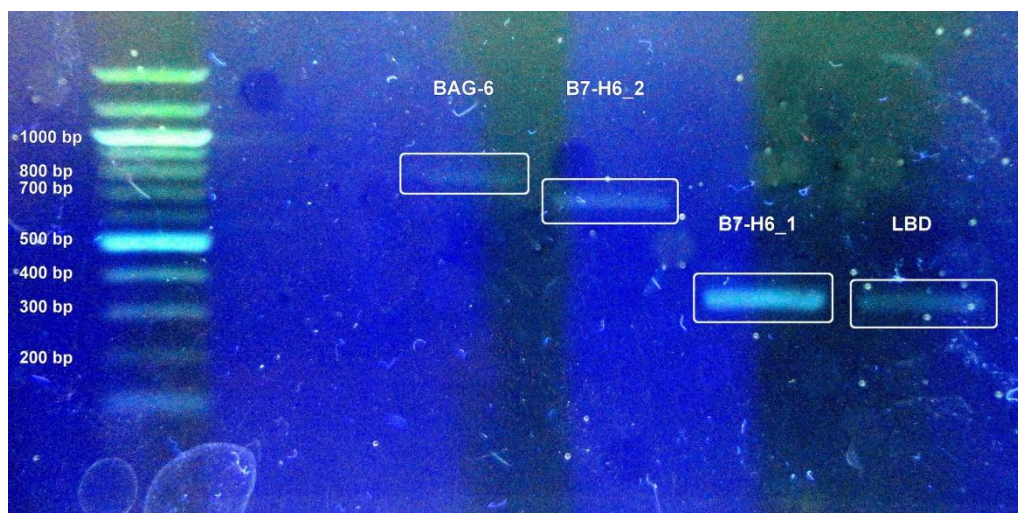
Obr. 10: Sekvence proteinu BAG-6: modře je označena doména UBL, oranžově doména bohatá na prolin, oranžově s podtrhnutím DUF, žlutě konstrukt BAG6, červeně NLS, fialově BAG doména, červeně fosforylace, šedě N-acetylace.

Konstrukty B7-H6_1 a B7-H6_2 byly navrženy na základě krystalografické struktury extracelulární domény proteinu B7-H6 tak, aby zůstaly zachovány všechny vodíkové vazby v konstruktu B7-H6_1 odpovídajícím proximální extracelulární části (obr. 11, str. 35). Poslední aminokyselinou konstruktu B7-H6_1 je Val140, který tvoří dva vodíkové můstky s aminokyselinou v proximální extracelulární doméně.

Tyto konstrukty byly pomocí PCR amplifikovány z dostupných templátů (kap 3.2.5.), přičemž správnost jejich délky byla ověřena na agarosové elektroforéze (obr. 12, str. 35).



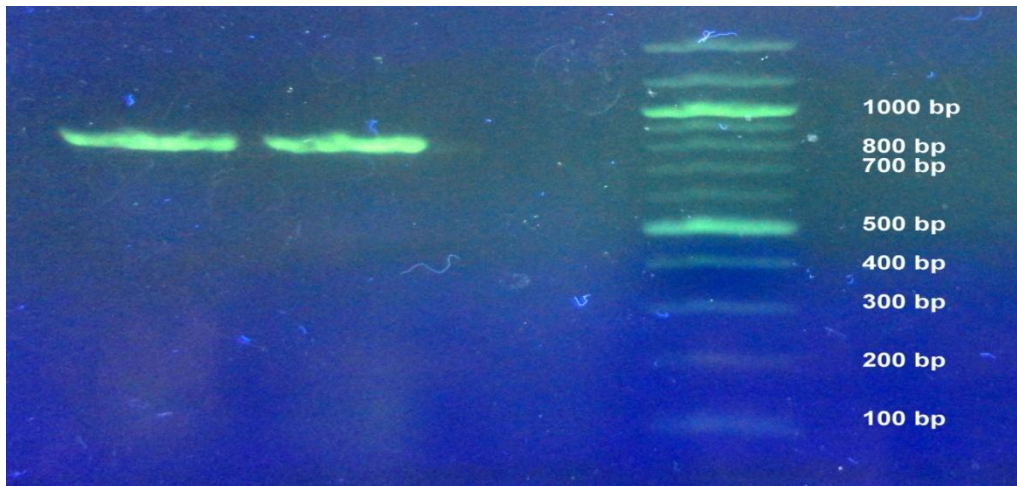
Obr. 11: Struktura B7-H6 (vlevo) [28] a hranice mezi jeho dvěma extracelulárními domény (vpravo): zelenými stuhami jsou vyznačeny β -listy, červenými α -helixy, zelenými β -ohyby, černě jsou zaznačeny vodíkové vazby.



Obr. 12: Velikost produktů PCR reakce ověřena na agarosové elektroforéze: BAG6 – 773 bp, B7-H6_2 – 683 bp, B7-H6_1 – 368 bp, LBD – 356 bp.

Vzorky byly přečištěny izolací z gelu, případně srážením (LBD, B7-H6_1). Následně bylo provedeno jejich restriční štěpení restričními endonukleasami Agel a KpnI a tyto enzymy byly eliminovány zvýšenou teplotou (65 °C) a přečištěním přes kolonku. Dále byla provedena ligace naštěpených vzorků s naštěpeným plasmidem a transformace do bakterií *E. coli* kmene DH5 α .

Bakterie byly kultivovány na agarem ztuženém LB médiu s přidavkem ampicilinu a další den z nich byly vybrány reprezentativní kolonie, které byly kultivovány přes další den v tekutém LB médiu s ampicilinem a ze kterých byla pomocí PCR z kolonií a agarosové elektroforézy určena správnost délky vložených insertů vložených do plasmidů (obr. 13).



Obr. 13: PCR z dvou kolonií B7-H6_2, správná velikost 834 bp.

Plasmid pTW5sec (obr. 14, str. 37) byl vytvořen z původního plasmidu pTT5 [41, 46]. Obsahuje eukaryotní replikační počátek pro replikaci v buněčné linii HEK293, prokaryotní replikační počátek pro replikaci plasmidu v bakteriích, promotory zvyšující expresi genu v eukaryotním systému (promotor lidského cytomegaloviru, hlavní pozdní promotor adenoviru a sekvenci WPRE₁, *Woodchuck posttranscriptional regulatory element*), sekvenci zvyšující translaci mRNA, gen pro β-laktamasu zajišťující rezistenci bakterií na ampicilin, dále polyadenylační signál, Kozakovu sekvenci zajišťující ribozomální translaci, histidinovou kotvu pro usnadnění purifikace exprimovaných proteinů, sekreční signál a AgeI a KpnI restrikční místa pro vkládání genových konstruktů [45, 46].

```
TGATATTCACCTGGCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCA
CTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTATCGCCAC
CATGGGAGAACTGCTGCTGCTCCTTCTGCTGGGGCTGCGGCTTCAGCTGAGT
CTTGGAATTACCGGT_X_GGTACCACCATCACCACCATCACCACCACGGGT
GATCAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCT
TAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTT
```

Obr. 14: Úsek nukleotidové sekvence plasmidu pTW5sec: **zeleně** je označen iniciační kodon, **tyrkysově** AgnI a KpnI restrikční místa, **žlutě** místo pro genový konstrukt, **fialově** sekvence kódující histidinovou kotvu, **červeně** terminační kodon, **šedě** signální sekvence.

Z kultivovaných bakterií byly následně izolovány plasmidy. Po ověření úspěšnosti ligace pomocí sekvenace byly plasmidy opět transformovány do DH5 α *E. coli*, které byly kultivovány nejprve na ztuženém médiu a až poté byly vyrostlé kolonie převedeny do 0,5 l LB média, ve kterém byly ponechány růst 15 hodin. Plasmidy byly nakonec opět izolovány a koncentrace a čistota zásobních roztoků plasmidů byly změřeny spektrofotometricky (tab. 4).

Tab. 4: Naměřená koncentrace (c) a čistota (260/280) izolovaných plasmidů.

	c [mg/ml]	260/280
pTW5sec_LBD	1,65	1,06
pTW5sec_B7-H6_1	0,66	1,83
pTW5sec_B7-H6_2	0,92	1,78
pTW5sec_BAG-6	1,02	1,81

6. Diskuze

Příprava expresních vektorů v konečném důsledku trvala mnohem déle, než bylo plánováno, což bylo způsobeno opakovanými negativními výsledky u jednotlivých kroků. Zpočátku byla pro PCR používána Deep Vent DNA polymerasa, ale pozitivní výsledky vizualizované na agarosové elektroforéze byly ve třech případech (kromě B7-H6_1) dosaženy až po použití Q5 polymerasy. Q5 polymerasa, na rozdíl od ostatních běžně komerčně dostupných polymeras, obsahuje doménu Sso7d, která stabilizuje primery při jejich nasedání na templát, což mohlo v tomto případě výrazně ovlivnit úspěšnost PCR [47].

Větší problémy nastávaly při transformaci legačních reakcí, protože na miskách kromě bakterií s bezproblémovým pTW5sec_B7-H6_1 dlouho nenarostly žádné kolonie a když narostly, tak na agarosové elektroforéze po PCR z kolonií nebyl viditelný žádný produkt správné velikosti. Výměna antibiotika za nové, delší čas ligace a ani nový štěpený plasmid výsledky nezlepšily, kolonie však začaly růst poté, co byla provedena změna již na začátku postupu – produkty PCR byly místo srážení izolovány z gelu – byly tak odděleny od primerů pro PCR, které pravděpodobně svou přítomností kompetičně inhibovaly jejich štěpení.

Po ověření správných sekvencí byl už postup bez vážnějších komplikací, zvláštní jsou relativně nízké výtěžky izolovaných plasmidů a neobjasněný je též důvod nižší naměřené čistoty plasmidu pTW5sec_LBD.

7. Závěr

Byly připraveny čtyři expresní vektory, jeden pro produkci extracelulární domény receptoru NKp30, dva pro produkci jedné, resp. obou extracelulárních domén receptoru B7-H6 a jeden pro produkci rozpustného fragmentu jaderného proteinu BAG-6.

8. Citovaná literatura

- [1] Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špíšek, R.: *Základy imunologie*, 5. vydání, Triton, Praha (2013)
- [2] Bellora, F., Castriconi, R., Dondero, A., Carrega, P., Mantovani, A., Ferlazzo, G., Moretta, A., Bottino, C.: *Immunol Lett*, doi: 10.1016/j.imlet.2013.12.009 (2013)
- [3] Lotze, M. T., Thomson, A. W.: *Natural Killer Cells*, Elsevier, Londýn (2010)
- [4] Koch, J., Steinle A., Watzl, C., Mandelboim, O.: *Trends Immunol* 34, 182-191 (2013)
- [5] Kaifu, T., Escaliere, B., Gastinel, L. N., Vivier E., Baratin M.: *Cell Mol Life Sci* 68, 3531-3539 (2011)
- [6] Joyce, M. G., Tran, P., Zhuravlevaa, M. A., Jaw, J., Colonna, M., Sun, P. D.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6223-6228 (2011)
- [7] Zitvogel, L., Kroemer, G., Lecesne, A., Vivier, E., Emile, J. F. et al: *Nat Med* 17, 700-707 (2011)
- [8] Hartmann, J., Tran, T., Kaudeer, J., Oberle, K., Quagliano, I., Abel, T., Cohnen, A., Gatterdam, V., Jacobs, A., Wollscheid, B., Tampé, R., Watz, C., Diefenbach, A., Koch, J.: *J Biol Chem* 287, 31527-31539
- [9] Herrmann, J., Berberich, H., Hartmann, J., Beyer, S., Davies, K., Koch, J.: *J Biol Chem* 289, 765-777 (2014)
- [10] Arnon, T. I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Naharis, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorachs, D., Wolf, D. G., Mandelboim, O.: *Nat Immunol* 6, 515-523, (2005)
- [11] Hershkovitz, O., Jarahian, M., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Landau, G., Jivov, S., Tekoah, Y., Glicklis, R., Gallagher, J. T., Hoffmann, S. C., Zer, H., Mandelboim, O., Watzl, C., Momburg, F., Porgador, A.: *Glycobiology* 18, 28-41 (2008)
- [12] von Strandmann, E. P., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Böll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M., Engert, A.: *Immunity* 27, 965-974 (2007)
- [13] Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S. D.: *J Exp Med* 206, 1495-1503 (2009)
- [14] Cantoni, C., Ponassi, M., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M., Bordo, D.: *Structure* 11, 725-734 (2003)
- [15] Arnon, T. I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., Mandelboim, O.: *Eur J Immunol* 31, 2680-2689 (2001)
- [16] Fausther-Bovendo, H., Sol-Foulon., N., Candotti, D., Agut, H., Schwartz, O., Debré, P., Vieillard, V.: *AIDS* 23, 1077-1087 (2009)
- [17] Esin, S., Counoupas, C., Aulicino, A., Branctisano, F. L., Maisetta, G., Bottai, D., Di Luca, M., Florio, W., Campa, M., Batoni, G.: *Scand J Immunol* 77, 460-469 (2013)

- [18] Mandelboim, O., Porgador, A.: *Int J Biochem Cell Biol* 33, 1147-1150 (2001)
- [19] Foster, C. E., Colonna, M., Sun, P. D.: *J Biol Chem* 278, 46081-46086 (2003)
- [20] Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., Porgador, A.: *Nature* 409, 1055-1062 (2001)
- [21] Arnon, T. I., Achdout, H., Lieberman, N., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Katz, G., Bar-Ilan, A., Bloushtain, N., Lev, M., Joseph, A., Kedar, E., Porgador, A., Mandelboim, O.: *Blood* 103, 664-672 (2004)
- [22] Champsaur, M., Lanier, L. L.: *Immunol Rev* 235, 256-285 (2010)
- [23] López-Larrea, C., Suárez-Alvarez, B., López-Soto, A., López-Vásquez, A., Gonzales, S.: *Trends Mol Med* 14, 179-189 (2008)
- [24] Andresen, L., Skovbakke, S. L., Persson, G., Hagemann-Jensen, M., Hansen, K. A., Jensen, H., Skov, S.: *J Immunol* 188, 1847-1855 (2012)
- [25] Ashiru, O., Bennett, N. J., Boyle, L. H., Thomas, M., Trowsdale, J., Wills, M. R.: *J Virol* 83, 12345-12354 (2009)
- [26] González, S., López-Soto, A., Suarez-Alvarez, B., López-Vásquez, A., López-Larrea, C.: *Trends Immunol* 29, 397-403 (2008)
- [27] Matta, J., Baratin, M., Chiche, L., Forel, J. M., Cognet, C., Thomas, C., Farnarier, C., Piperoglou, C., Papazian, L., Chaussabel, D., Ugolini, S., Vély, F., Vivier, E.: *Blood* 122, 394-404 (2013)
- [28] Li, Y., Wang, O., Mariuzza, R. A.: *J Exp Med* 208, 703-714 (2011)
- [29] Binici, C., Koch, J.: *Cell Mol Life Sci* 71, 1829-1837 (2014)
- [30] Simhadri, V. R., Reiners, K., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., Kufer, T. A., Engert, A., von Strandmann, E. P.: *PloS One* 3, e3377 (2008)
- [31] Sasaki, T., Gan, E. C., Wakeham, A., Kornbluth, S., Mak, T. W., Okada, H.: *Genes Dev* 21, 848-861 (2007)
- [32] Nguyen, P., Bar-Sela, G., Sun, L., Bisht, K. S., Cui, H., Kohn, E., Feinberg, A. P., Gius, D.: *Mol Cell Biol* 28, 6720-6729 (2008)
- [33] Leznicki, P., Clancy, A., Schwappach, B., High, S.: *J Cell Sci* 123, 2170-2178 (2010)
- [34] Reiners, K. S., Topolar, D., Henke, A., Simhadri, V. R., Kessler, J., Sauer, M., Bessler, M., Hansen, H. P., Tawadros, S., Herling, M., Krönke, M., Hallek, M., von Strandmann, E. P.: *Blood* 121, 3658-3665 (2013)
- [35] Vyas, M., Koehl, U., Hallek, M., von Strandmann, E. P.: *Trends Mol Med* 20, 72-82 (2013)
- [36] Kellner, C., Maurer, T., Hallack, D., Repp, R., van de Winkel, J. G., Parren, P. W., Valerius, T., Humpe, A., Gramatzki, M., Peipp, M.: *J Immunol* 189, 5037-5046 (2012)
- [37] Arnon, T. I., Markel, G., Bar-Ilan, A., Hanna, J., Fima, E., Benchetrit, F., Galili, R., Cerwenka, A., Benharroch, D., Sion-Vardy, N., Porgador, A., Mandelboim, O.: *PloS One* 3, e2150 (2008)

- [38] Zhang, T., Wu, M. R., Sentman, C. L.: J Immunol 189, 2290-2299 (2012)
- [39] Rothe, A., Jachimowicz, R. D., Borchmann, S., Madlener, M., Keßler, J., Reiners, K. S., Sauer, M., Hansen, H. P., Ullrich, R. T., Chatterjee, S., Borchmann, P., Yakazi, P., Koslowsky, T. C., Engert, A., Heukamp, L. C., Hallek, M., von Strandmann, E. P.: Int J Cancer 134, 2829-2840 (2014)
- [40] Reiners, K. S., Kessler, J., Sauer, M., Rothe, A., Hansen, H. P., Reusch, U., Hucke, C., Köhl, U., Dürkop, H., Engert, A., von Strandmann, E. P.: Mol Ther 21, 896-903 (2013)
- [41] Slavata, L.: Příprava plazmidů pro expresi interleukin 2-fúzní monoklonální protilátky: Bakalářská práce, PŘF UK, Praha, 46-49 (2013)
- [42] <http://www.geneaid.com/products/gel-extraction/gel-extraction-kit> (22. 5. 2014)
- [43] <http://www.geneaid.com/products/plasmid-dna-purification/plasmid-kit-miniprep> (22. 5. 2014)
- [44] <http://www.mn-net.com/tabid/1479/default.aspx> (22. 5. 2014)
- [45] Binici, J., Hartmann, J., Herrmann, J., Schreiber, C., Beyer, S., Güler, G., Vitali, V., Tumulka, F., Abele, R., Mäntele, W., Koch, J.: J Biol Chem 288, 34295-34303 (2013)
- [46] Poláchová, E.: Příprava expresních vektorů regulujících buněčný cyklus a apoptózu pro optimalizaci expresního systému HEK293 buněčné linie: Bakalářská práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, 10-11 (2014)
- [47] <https://www.neb.com/products/m0491-q5-high-fidelity-dna-polymerase> (22. 5. 2014)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka