

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**  
Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



**Anna Dmytrivna Maksimova**

**Produkce rozpustné formy lidského NK buněčného receptoru NKR-P1 a jeho ligandu LLT1**

Production of a soluble form of the human NK cell receptor NKR-P1 and its ligand LLT1

**Bakalářská práce**

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

Konzultant: Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D.

**Praha, 2024**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. a konzultanta Mgr. Ondřeje Skořepy, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, *21.08.2024*

Anna Dmytrivna Maksimova

**Poděkování:**

Tímto bych ráda vyjádřila své upřímné poděkování všem, kteří přispěli ke vzniku této bakalářské práce. Na prvním místě děkuji svému vedoucímu práce RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a možnost vypracovat tuto práci pod jeho vedením. Dále děkuji svému konzultantovi Mgr. Ondřeji Skořepovi, Ph.D. za ochotu konzultovat se mnou mé otázky a postupy. Mé poděkování patří také všem členům Laboratoře strukturní biochemie imunitního rozpoznávání, kteří byli ochotni kdykoliv poradit, nabídnout pomoc a podpořit ve dnech neúspěšných experimentů.

**Abstrakt:**

Tato bakalářská práce se zaměřuje na přípravu rozpustné formy receptoru NKR-P1 (receptor lidských přirozeně zabíječských buněk) a jeho ligandu LLT1. NK buňky hrají klíčovou roli v imunitním systému, přičemž receptor NKR-P1 a jeho ligand LLT1 jsou důležitými molekulami v regulaci jejich aktivity. Cílem této práce bylo exprimovat a purifikovat tyto dva proteiny v rozpustné formě. Práce popisuje úspěšnou produkci a purifikaci rozpustné formy receptoru NKR-P1 a jeho ligandu LLT1.

Následně budou tyto proteiny využity pro produkci specifických nanoprotilátek, které budou označeny fluorescenčními markery. Fluorescenčně značené nanoprotilátky umožní detailní studium interakcí mezi NKR-P1 a LLT1 na úrovni jednotlivých molekul pomocí mikroskopie s vysokým rozlišením založené na lokalizaci jedné molekuly. Tento přístup může přinést poznatky o mechanismech, kterými NK buňky rozpoznávají cílové buňky, což je důležité pro vývoj nových terapeutických strategií v léčbě rakovinných a autoimunitních onemocnění.

**Klíčová slova:**

NK buňky, NKR-P1, LLT1, HEK293T, piggyBac

**Abstract:**

This bachelor's thesis focuses on the preparation of a soluble form of the NKR-P1 human natural killer cell receptor and its ligand LLT1. NK cells play a crucial role in the immune system, with the NKR-P1 receptor and its ligand LLT1 being important molecules in regulating their activity. The aim of this work was to express and purify these two proteins in a soluble form. The thesis describes the successful production and purification of the soluble form of the NKR-P1 receptor and its ligand LLT1.

Subsequently, these proteins will be used for the production of specific nanobodies, which will be labeled with fluorescent markers. Fluorescently labeled nanobodies will enable detailed study of the interactions between NKR-P1 and LLT1 at the single-molecule level using super-resolution microscopy based on single-molecule localization. This approach can provide insights into the mechanisms by which NK cells recognize target cells, which is important for the development of new therapeutic strategies in the treatment of cancer and autoimmune diseases.

**Keywords:**

NK cells, NKR-P1, LLT1, HEK293T, piggyBac

*Seznam zkratek*

**AICL** (z angl. *activation-induced C-type lectin* = aktivací indukovaný lektin typu C)

**ATP** (z angl. *adenosine triphosphate* = adenosin trifosfát)

**CTLD** (z angl. *C-type lectin-like domain* = doména podobná lektinům typu C)

**CTLR** (z angl. *C-type lectin-like receptor* = receptor podobný lektinům typu C)

**EDTA** (z angl. *ethylenediaminetetraacetic acid* = ethylendiamintetraoctová kyselina)

**FACS** (z angl. *fluorescence activated cell sorting* = fluorescencí aktivované buněčné třídění; průtoková cytometrie)

**HPLC** (z angl. *high-performance liquid chromatography* = vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

**IFN $\gamma$**  Interferon gama

**IL-2** Interleukin 2

**IMAC** (z angl. *immobilized metal affinity chromatography* = afinitní chromatografie na imobilizovaném kovu)

**ITAM** (z angl. *immunoreceptor tyrosine-based activating motif* = imunoreceptorový aktivační motiv závislý na tyrosinu)

**ITIM** (z angl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* = imunoreceptorový inhibiční motiv závislý na tyrosinu)

**KIR** (z angl. *killer cell immunoglobulin-like receptor* = imunoglobulinům podobné receptory NK buněk)

**LDS** (z angl. *lithium dodecyl sulfate* = dodecylsulfát lithný)

**LLT1** (z angl. *lectin-like transcript 1* = transkript 1 podobný lektinu)

**MHC** (z angl. *major histocompatibility complex* = hlavní histokompatibilní komplex)

**mRNA** (z angl. *messenger ribonucleic acid* = mediátorová ribonukleová kyselina)

**NK buňky** (z angl. *natural killer cells* = přirozeně zabijácké buňky)

**NKC** (z angl. *natural killer gene complex* = komplex genů přirozených zabijáků)

**NKR-P1** (z angl. *natural killer receptor protein 1* = receptor přirozených zabijáků – protein 1)

**PTK** protein tyrosin kináza

**rDNA** (z angl. *ribosomal deoxyribonucleic acid* = ribozomální deoxyribonukleová kyselina)

**UCOE** (z angl. *ubiquitous chromatin opening element* = všudypřítomný chromatin-otevřející element)

# 1 Obsah

<b>2</b>	<b>Úvod</b>	<b>10</b>
2.1	Základní charakteristika NK buněk	10
2.2	Přehled hlavních receptorů NK buněk	10
2.2.1	Dělení podle funkce	10
2.2.2	Dělení receptorů podle struktury	12
2.3	Receptor NKR-P1	15
2.3.1	Struktura a funkce lidského NKR-P1	15
2.4	Ligand LLT1	16
2.4.1	Struktura LLT1	17
2.5	Organizace genů pro proteiny LLT1 a NKR-P1	18
2.6	Interakce NKR-P1:LLT1	19
2.7	Role NKR-P1:LLT1 v rakovinném bujení a autoimunitních onemocnění	20
2.8	Metody selekce vazebných domén	21
2.8.1	<i>In vitro</i> evoluce	21
<b>3</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Materiály</b>	<b>26</b>
4.1	Chemikálie a buněčné linie	26
4.2	Přístroje	27
<b>5</b>	<b>Metody</b>	<b>29</b>
5.1	Transformace kompetentních buněk	29
5.2	Kultivace bakterií ve velkém objemu	29
5.3	Izolace DNA	29
5.4	Tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T	30
5.5	Stabilní transfekce buněčné linie HEK293T	30
5.6	Sklizení buněčné suspenze HEK293T	31
5.7	Purifikace proteinů	32
5.8	Charakterizace proteinů	33
5.8.1	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí LDS	33
<b>6</b>	<b>Výsledky</b>	<b>35</b>
6.1	NKR-P1 H4	35
6.2	LLT1 L2	40



<b>7</b>	<b>Diskuze</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Závěr</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>Literatura</b>	<b>48</b>

## 2 Úvod

### 2.1 Základní charakteristika NK buněk

NK buňky (z angl. *natural killer* = přirození zabijáci) jsou buňky vrozeného imunitního systému odvozené od lymfocytárního progenitoru. NK buňky zprostředkovávají cytotoxickou odpověď a sekrecí cytokinů stimulují imunitní odpověď dalších složek adaptivního imunitního systému<sup>1</sup>.

Na rozdíl od T- nebo B-lymfocytů, které patří do adaptivního imunitního systému, NK buňky nemají na svém povrchu receptory specifické pro antigeny, ale jsou vybaveny širokým repertoárem inhibičních a aktivačních receptorů. Mechanismus cytotoxické odpovědi NK buněk tak probíhá na základě porušení rovnováhy inhibičních a aktivačních signálů<sup>2</sup>.

Aktivační signál vzniká interakcí aktivačního receptoru NK buňky s jeho ligandem na cílové buňce. Ligandy interagující s aktivačními receptory NK buněk jsou exprimovány na patogenních a stresovaných buňkách<sup>3</sup>.

Inhibiční signál je tvořen interakcí inhibičních receptorů NK buňky s jejich ligandy exprimovanými na cílové buňce. Ligandy inhibičních receptorů NK buněk se fyziologicky vyskytují na nepoškozených tělu vlastních buňkách. Při buněčném stresu nebo při maligní transformaci buňky dochází k snížení exprese inhibičních ligandů<sup>3</sup>. Patologicky dochází k expresi inhibičních receptorů na rakovinných buňkách. Expresí inhibičních receptorů na maligních buňkách může docházet k úniku před imunitní odpovědí.

Studium mechanismů interakce NK receptorů s jejich ligandy je klíčové ve snaze o zlepšení imunoterapeutických metod spojených s rakovinou anebo autoimunitními poruchami organismu.

### 2.2 Přehled hlavních receptorů NK buněk

#### 2.2.1 Dělení podle funkce

Podle charakteru poskytovaného signálu jsou NK receptory děleny na aktivační a inhibiční receptory<sup>3</sup>.

### *Aktivační receptory*

Obecnou charakteristikou aktivačních receptorů je přítomnost sekvence imunoreceptorového aktivačního motivu závislého na tyrosinu (ITAM, z angl. *immunoreceptor tyrosine-based activating motif*). V kontextu imunitní odpovědi ITAM spouští kaskádu enzymových dějů, které vedou k aktivaci imunitní odpovědi buňky<sup>4</sup>. Při imunoreceptorové interakci dochází k aktivaci protein tyrosin kinázy (PTK) z proteinové rodiny Src. Protein tyrosin kináza je enzym, který přenáší fosfát z ATP na tyrosin. Fosforylací tyrosinu na ITAM vzniká vazebné místo pro SH-doménu proteinů, které spouští signalizační kaskádu proteinů z rodiny Syk a ZAP-70 vedoucí ke zvýšené funkci těchto enzymů<sup>4</sup>.

ITAM je sekvence aminokyselin nacházející se na intracelulární straně receptoru imunitních buněk. V ITAM se dvakrát opakují sekvence tyrosinu a leucinu nebo izoleucinu, které jsou odděleny dvěma libovolnými aminokyselinami. Sekvence YxxL/I (kde Y je tyrosin, L je leucin, I je izoleucin a x značí libovolnou aminokyselinu) je oddělná šesti až osmi libovolnými aminokyselinami<sup>5,6</sup>. Obecný sekvenční zápis pro ITAM je následovný YxxL/I(x)<sub>6-8</sub>YxxL/I<sup>6</sup>.

Příkladem aktivačního receptoru je lidský receptor NKp80 (z angl. *natural killer protein 80*), který zprostředkovává aktivační signál vedoucí k cytotoxické odpovědi skrz interakci s aktivací indukovaným lektinem typu C (AICL, z angl. *activation-induced C-type lectin*) exprimovaném na cílové buňce<sup>3</sup>.

### *Inhibiční receptory*

Obecnou charakteristikou inhibičních receptorů je přítomnost imunoreceptorového inhibičního motivu závislého na tyrosinu (ITIM, z angl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). Vzájemná interakce inhibičního receptoru s jeho ligandem na povrchu cílové buňky vede k inhibičnímu signálu a potlačení cytotoxické odpovědi NK buňky.

Princip přenesení signálu přes ITIM je podobný přenesení signálu přes ITAM. V prvním kroku stejně jako u ITAM dochází k fosforylaci tyrosinu na ITIM na základě stimulu interakce inhibičního receptoru s rozpoznáním ligandem. Avšak na rozdíl od ITAM u ITIM není přesně jasné, jaká kináza z rodiny Src odpovídá za fosforylaci. Možnými kandidáty uvedenými v odborné literatuře jsou proteiny Lck a Fyn<sup>7</sup>.

ITIM je sekvence aminokyselin nacházející se na intracelulární straně receptoru imunitních buněk. Stejně tak jako ITAM i ITIM je sekvence aminokyselin v určitém

funkčním pořadí. Sekvence pro ITIM je V/IxYxxL/V (kde V je valin, I je izoleucin a Y je tyrosin)<sup>8</sup>. Srovnáním sekvence ITIM (V/IxYxxL/V) a ITAM (YxxL/I(x)<sub>6-8</sub>YxxL/I) jsou patrná dvě fakta. ITIM je kratší než ITAM a také ITIM obsahuje oproti ITAM pouze jeden tyrosin.

Většinou je ITIM asociovaný s SHP-1 nebo SHP-2 fosfatázou, i když v prvním popsaném případě to tak nebylo. První popis ITIM byl uskutečněn na základě pozorování rozeznání myších B-lymfocytů NK buňkami. U myšního modelu je ITIM spřažen s SHIP fosfatázou<sup>4</sup>.

Dvě fosforylované ITIM oddělené přibližně 26 aminokyselinami poskytnou vazebné místo pro SH-doménu SHP-1. SHP-1 navázaná na fosforylovaný ITIM je aktivována. Aktivovaná forma SHP-1 defosforyluje guanin nukleotidový výměnný faktor Vav-1 a zároveň dochází k fosforylaci adaptorového proteinu Crk<sup>8</sup>. Fosforylovaná forma Crk je následně uvolněna ze signálního komplexu vytvořeného během aktivace imunitní odpovědi buňky. Souhra popsaných procesů vede ke vzniku inhibičního signálu.

Příkladem inhibičního receptoru je lidský NK receptor NKR-P1 (z angl. *natural killer receptor protein 1*), který interaguje s receptorem LLT1 (z angl. *lectin-like transcript 1*) exprimovaným na cílové buňce<sup>9</sup>. Vzájemná interakce vede k inhibičnímu signálu a potlačení cytotoxické odpovědi NK buňky.

## 2.2.2 Dělení receptorů podle struktury

Na základě struktury jsou NK receptory děleny do dvou skupin, imunoglobulinům podobných receptorů a receptorů podobných lektinům typu C<sup>10</sup>. Skupina receptorů podobných imunoglobulinům zahrnuje jak aktivační, tak inhibiční NK buněčné receptory. Stejně tak skupina receptorů podobných lektinům typu C zahrnuje aktivační i inhibiční NK buněčné receptory.

### ***Imunoglobulinům podobné NK receptory***

Imunoglobulinům podobné receptory NK buněk (KIR, z angl. *killer cell immunoglobulin-like receptor*) jsou transmembránové glykoproteiny exprimované na NK buňkách a subpopulaci T-lymfocytů<sup>11</sup>. Struktura KIR je tvořena dvěma nebo třemi extracelulárními imunoglobulinům podobnými doménami a intracelulární doménou spojenou s ITIM nebo ITAM<sup>8</sup>. Intracelulární doména může být krátká nebo dlouhá v rámci skupiny KIR. ITAM se vyskytuje na krátké intracelulární doméně KIR a převádí aktivační signál. ITIM se naopak vyskytuje na dlouhé intracelulární doméně KIR a převádí inhibiční signál. Existuje i výjimka, KIR2DL4 je receptor s dlouhou intracelulární doménou, která je spřažená s ITAM a poskytuje aktivační signál<sup>12</sup>.

KIR receptory rozpoznávají ligandy hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. *major histocompatibility complex*) I. třídy<sup>13</sup>, jejichž hlavní funkcí je prezentace antigenu na buněčné membráně. Antigen prezentující proteiny MHC I. třídy jsou exprimovány na každé zdravé buňce. Buněčná tolerance je zprostředkována vazbou KIR inhibičních receptorů na MHC I proteiny cílové buňky.

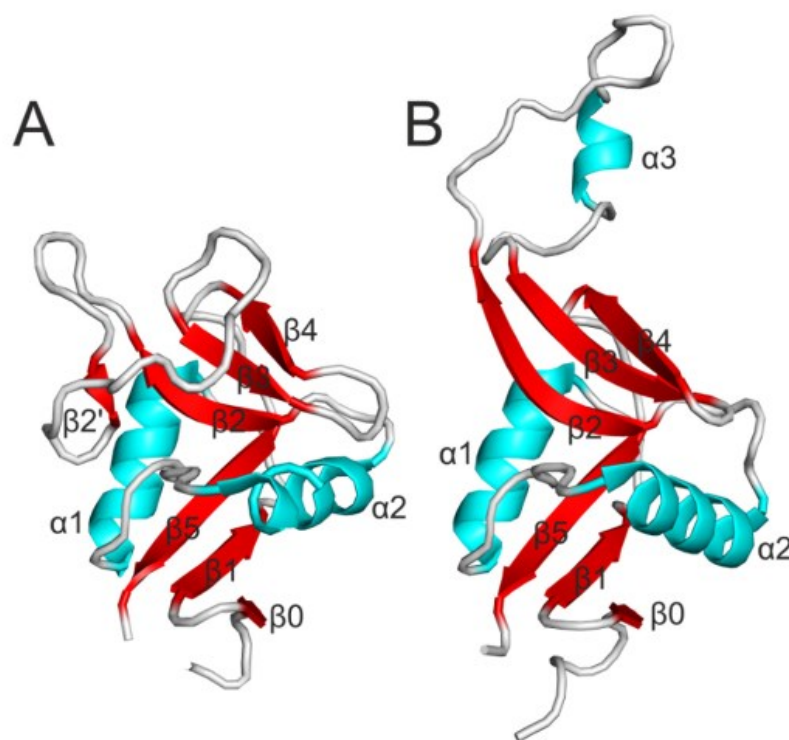
Virově infikovaná nebo onkogenní buňka může potlačovat expresi MHC I proteinů. Potlačení exprese MHC I proteinů prezentujících antigen buňka uniká odpovědi imunitního systému. Proces, kdy dochází ke snížené expresi MHC I proteinů na patogenní buňce a dojde ke spuštění cytotoxické odpovědi NK buňky, se označuje pojmem „missing-self recognition“. „Missing-self recognition“ bylo pozorované u imunitní odpovědi na některé onkogenní buňky<sup>14</sup>.

### ***Receptory podobné lektinům typu C***

Receptory podobné lektinům typu C (CTLR, z angl. *C-type lectin-like receptor*) jsou transmembránové receptory, pomocí kterých dochází k buněčnému rozpoznávání. CTLR jsou strukturně podobné proteinové rodině lektinů C-typu. V rámci lektinů typu C byly také popsány receptory podílející se na imunitní odpovědi (např. dektin 1). Proteinová rodina lektinů typu C stejně tak jako proteinová rodina proteinů podobných lektinům typu C obsahuje typickou doménu podobnou lektinům typu C (CTLD, z angl. *C-type lectin-like domain*). Avšak způsob interakce receptoru s ligandem se u těchto dvou proteinových skupin liší.

Interakce mezi lektiny typu C a jejich ligandy je na rozdíl od interakce CTLR a jejich ligandů závislá na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech, kdy extracelulární doména lektinů typu C tvoří komplex receptor:ligand prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$  iontu a hydroxylových skupin cukerných jednotek ligandu. Nezávislost interakce CTLR receptoru na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech umožňuje rozpoznání jak cukerných jednotek, tak proteinových i lipidových jednotek.

Struktura CTLR je tvořena extracelulární CTLD doménou, která je připojena přes krček k transmembránové doméně. Intracelulární doména obsahuje sekvenci ITIM nebo ITAM. CTLD je tvořena dvěma  $\alpha$ -helixy ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ), dvěma antiparalelně uspořádanými  $\beta$ -skládanými listy, z nichž jeden je tvořen  $\beta 0$ ,  $\beta 1$  a  $\beta 5$  vlákny, a druhý  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  a  $\beta 4$  vlákny, a tzv. „long loop“ řetězcem, který odpovídá oblasti mezi vlákny  $\beta 2$  a  $\beta 3$  (viz Obrázek 1)<sup>10</sup>. „Long loop“ oblast CTLD některých CTLR může vázat  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a tak zprostředkovávat interakci receptor:ligand a nebo se může účastnit doménového přesmyku. Při doménovém přesmyku dochází k interakci „long loop“ oblastí dvou CTLD domén a následně ke vzniku dimeru. Vznik dimeru byl popsán v krystalové struktuře myšího NKR-P1A, kde je „long loop“ oblast vysunuta od centra CTLD domény<sup>15</sup>. Naopak v roztoku byla pozorovaná sbalená konformace „long loop“ oblasti přispívající ke stabilizaci CTLD domény. Avšak hlavními stabilizačními prvky CTLD domény jsou vysoce konzervované cysteinové páry (C1-C2 a C3-C4)<sup>10</sup>.



Obrázek 1: A) **Diagram typické CTLD** je tvořen dvěma  $\alpha$ -helixy (znázorněno červenou barvou) a dvěma  $\beta$ -skládanými listy (znázorněno modrou barvou). Mezi aminokyselinovými řetězci  $\beta 2$  a  $\beta 3$  se nachází tzv. „long loop“ oblast, která je kompaktně sbalená. B) **Struktura CTLD myšího NKR-P1A v krystalu** s prodlouženou „long loop“ oblastí obsahující  $\alpha 3$ -helix. Převzato z reference<sup>10</sup>.

## 2.3 Receptor NKR-P1

Rodina NKR-P1 (z angl. *natural killer receptor protein 1*) obsahuje jak inhibiční, tak aktivační proteiny exprimované na myších, potkaních nebo lidských NK buňkách.

U myši byly popsány tři hlavní podskupiny NKR-P1 receptorů: NKR-P1A, NKR-P1B a NKR-P1C. Zatímco podskupiny NKR-P1A a NKR-P1C se podílí na aktivaci cytotoxické odpovědi NK buňky, podskupina NKR-P1B má inhibiční charakter<sup>10</sup>.

U potkanů byly popsány tři hlavní podskupiny NKR-P1 receptorů: NKR-P1A, NKR-P1B a NKR-P1F. Podobně jako u myši má i potkaní podskupina NKR-P1A aktivační charakter. Aktivační charakter má i potkaní podskupina NKR-P1F. Avšak potkaní NKR-P1B má inhibiční charakter<sup>10</sup>.

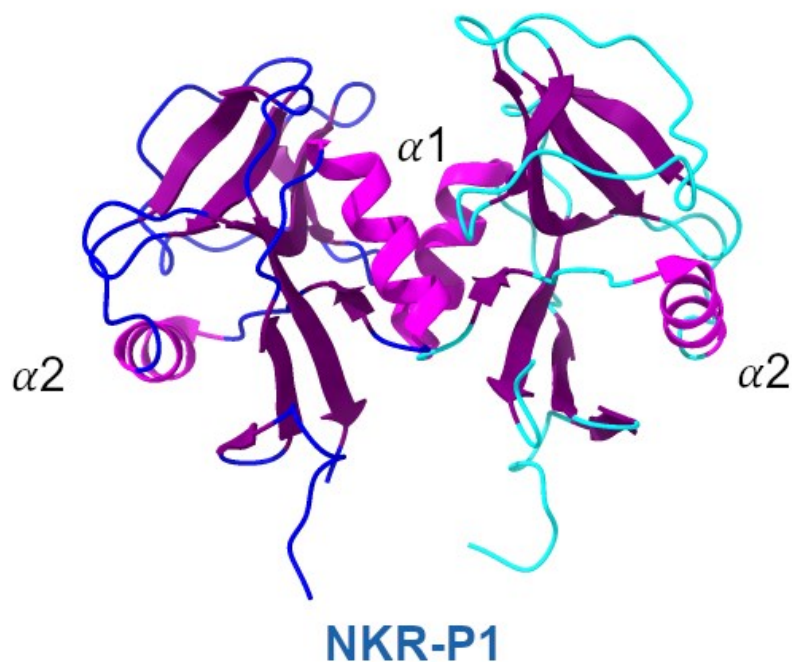
V rámci lidské podskupiny NKR-P1 receptorů je nejvýznamnější a nejlépe popsán receptor NKR-P1. Tato práce se zabývá přípravou lidského NK buněčného receptoru NKR-P1, proto bude text níže soustředěn převážně na popis lidského proteinu NKR-P1.

### 2.3.1 Struktura a funkce lidského NKR-P1

NKR-P1 je lidský inhibiční receptor exprimovaný na NK buňkách. Náleží do transmembránových proteinů II. třídy. NKR-P1 obsahuje cytoplazmatickou část, transmembránovou část a extracelulární část, která je tvořena CTLD doménou ukotvenou přes krček na transmembránovou část proteinu<sup>10</sup>.

CTLD NKR-P1 je strukturně podobná výše zmíněné obecné struktuře CTLD vyskytující se u CTLR. Avšak CTLD NKR-P1 má prodlouženou „long loop“ oblast, která byla pozorovaná v krystalu ve sbalené kompaktní formě. Spekuluje se, že „long loop“ oblast má značný podíl na specifitě receptorového rozpoznávání.

NKR-P1 tvoří homodimery prostřednictvím  $\alpha$ 1-helixů CTLD domén stejně jako dektin-1 (viz Obrázek 2), který sdílí s NKR-P1 podobnost aminokyselinové sekvence CTLD domény pouze 32 %<sup>16</sup>. Homodimer NKR-P1 má menší dimerizační plochu v porovnání s homodimerem LLT1, který dimerizuje prostřednictvím  $\alpha$ 2-helixů CTLD domén. Malá dimerizační plocha může být stabilizována skrze N-glykosylaci NKR-P1.



Obrázek 2: **Deglykosylovaný homodimer NKR-P1 v krystalové formě.** Interakcí  $\alpha$ 1-helixů CTLD domén NKR-P1 monomeru vzniká dimerní forma NKR-P1. Stejným způsobem tvoří homodimery i dektin-1, který sdílí s NKR-P1 podobnost aminokyselinové sekvence CTLD domény pouze 32 %<sup>16</sup>.

## 2.4 Ligand LLT1

LLT1 je ligand k NK buněčnému lidskému receptoru NKR-P1<sup>9</sup>. Za fyziologického stavu je receptor LLT1 exprimovaný na aktivovaných lymfocytech, antigen-prezentujících buňkách a makrofázích. Fyziologická exprese LLT1 je typická i pro imunologicky privilegované orgány například na dendritických buňkách v mozku nebo na buňkách placenty<sup>17</sup>. Patologicky je LLT1 exprimován na maligních buňkách glioblastomu, buňkách rakoviny prsou, buňkách rakoviny prostaty a HPV-negativních orofaryngeálním karcinomu<sup>17</sup>.

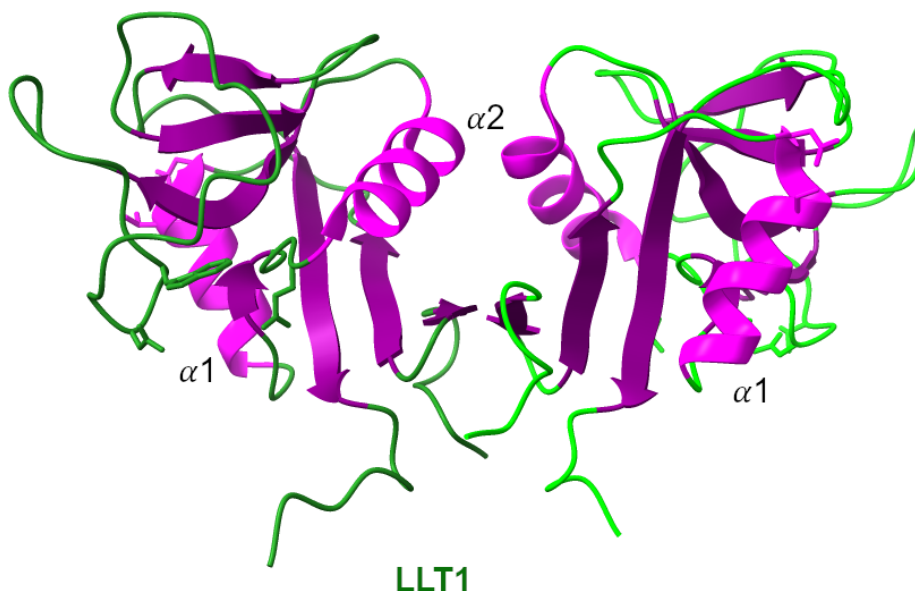


Problémová je jak snížená exprese tak zvýšená exprese LLT1. Snížená exprese LLT1 na zmíněných imunologicky privilegovaných orgánech může být příčinou autoimunitního onemocnění. Naopak zvýšená exprese LLT1 může napomáhat maligním buňkám unikat před imunitním systémem. Pochopení funkce a struktury LLT1 má z výše zmíněných důvodu velký význam pro terapeutické využití.

### 2.4.1 Struktura LLT1

LLT1, stejně jako jeho receptor NKR-P1, je transmembránový glykoprotein II. třídy, patřící do CTLR. N-konec proteinu LLT1 se nachází na intracelulární straně, která je propojená transmembránovou částí o velikosti 23 aminokyselin. Tato transmembránová část na své extracelulární straně nese "krček". Na krčku se nachází CTLD typická pro proteinovou rodinu CTLR.

CTLD proteinu LLT1 obsahuje ve své aminokyselinové doméně pět cysteinů (Cys75, Cys86, Cys103, Cys184, Cys163). Interakcí cysteinů (Cys75-Cys86, Cys103-Cys184) vznikají disulfidické můstky, které stabilizují CTLD<sup>18</sup>. Cys163 na CTLD na přirozeně exprimovaném LLT1 pravděpodobně usnadňuje agregaci<sup>19</sup>. V aminokyselinové sekvenci CTLD proteinu LLT1 se nachází tři asparaginy, které mohou být glykosylovány. N-glykosylace je obligátní pro tvorbu homodimerů LLT1<sup>20</sup>. Homodimerní forma LLT1 je na rozdíl od homodimeru NKR-P1 zprostředkována prostřednictvím  $\alpha 2$ -helixů CTLD domén monomerů LLT1 (viz Obrázek 3).

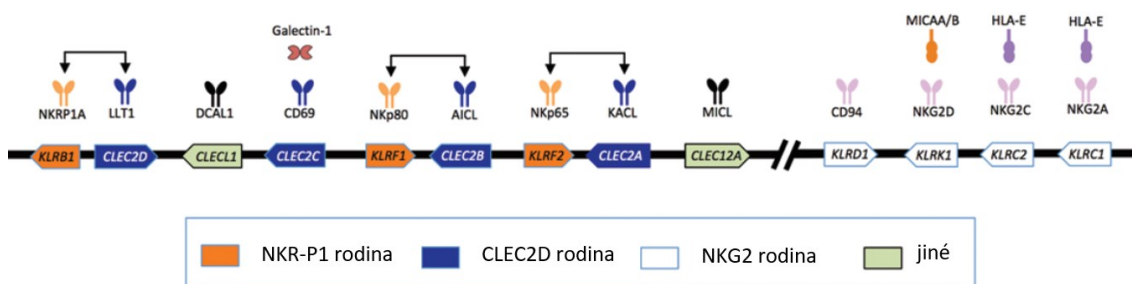


Obrázek 3: **Homodimer LLT1**. Homodimer LLT1 je tvořen prostřednictvím interakce  $\alpha 2$ -helixů CTLD domén<sup>18</sup>.

## 2.5 Organizace genů pro proteiny LLT1 a NKR-P1

Na krátkém raménku 12. lidského chromozomu se nachází komplex genů přirozených zabijáků (NKC, z angl. *natural killer gene complex*) pro CTLR NK buněk<sup>21</sup>. NKC kóduje proteiny NKG2 rodiny, CLEC2D rodiny a NKR-P1 rodiny. Lidský receptor NKR-P1 je součástí KLRB1 rodiny, kdežto jeho ligand LLT1 je součástí proteinové rodiny CLEC2D<sup>22</sup>.

Zajímavá je skutečnost, že gen pro lidský receptor NKR-P1 (KLRB1) se nachází v těsné blízkosti genu pro jeho ligand LLT1 (CLEC2D) (viz Obrázek 4). Zmíněné uspořádání v rámci NKC však není jedinečné. Gen pro receptor NKp80 (KLRF1) a gen pro jeho ligand AICL (CLEC2B) se také vyskytují v těsné blízkosti<sup>22</sup>.



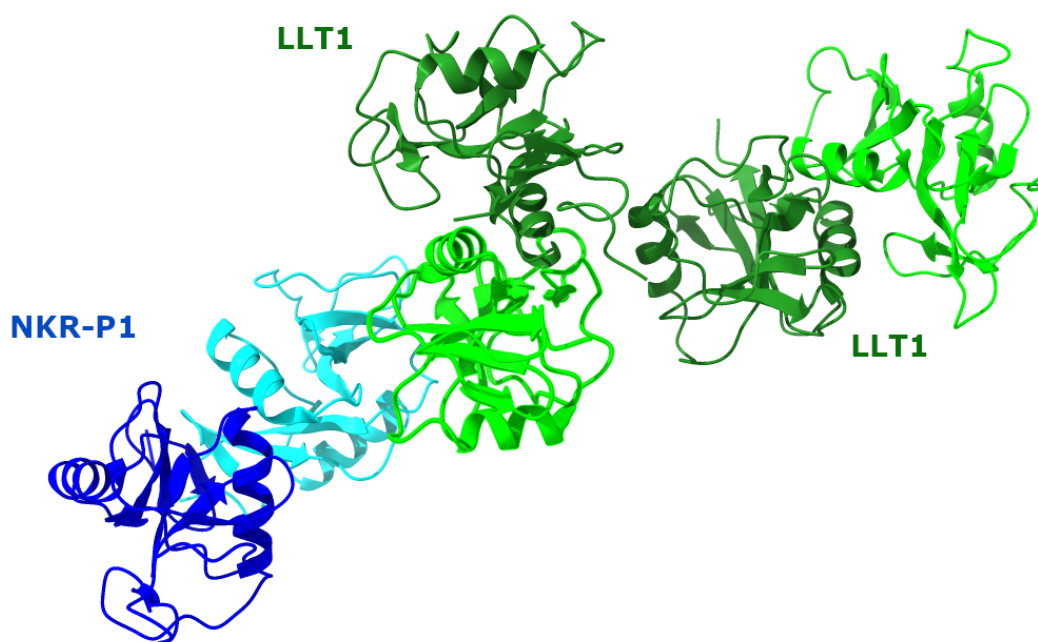
Obrázek 4: Schéma umístění genů pro NK receptory a jejich ligandy v rámci NKC na chromozomu 12. KLRB1 geny kódující NK receptory jsou umístěny v těsné blízkosti vůči CLEC2D genům kódující ligandy příslušných NK buněčných receptorů. Převzato z reference<sup>22</sup>.

Gen pro NKR-P1 se nachází u různých druhů na jiném chromozomu. Gen pro myši NKR-P1 je umístěn na 6. chromozomu a gen pro potkaní NKR-P1 se vyskytuje na 4. chromozomu. Podobnost genové sekvence pro lidský NKR-P1, myši NKR-P1 a potkaní NKR-P1 je značně zachována. Lidský NKR-P1 má procentuální shodu genové sekvence s myším NKR-P1 46-47 % a potkaním NKR-P1 46 %. Zajímavá je snížená podobnost genové sekvence pro lidský NKR-P1 a ostatních CTLR NK buněk<sup>21</sup>.

## 2.6 Interakce NKR-P1:LLT1

Interakce NKR-P1:LLT1 je doposud nejlépe popsanou interakcí lidského NK receptoru s jeho ligandem. Význam tvorby komplexu NKR-P1:LLT1 je nejvíce patrný při regulaci imunitní odpovědi. Převaha NKR-P1:LLT1 inhibičních signálů nad aktivačními signály NK buňky inhibuje cytotoxickou odpověď NK buňky. Kromě imunologické odpovědi interakce NKR-P1:LLT1 se podílí i na udržení homeostázy při rekonstrukci kostní tkáně.

V porovnání s jinými NK buněčnými receptory a jejich ligandy má NKR-P1 nízkou afinitu ke svému ligandu LLT1. Afinita je však zvýšena klastrováním proteinových komplexů NKR-P1:LLT1 (viz Obrázek 5). Podjednotka homodimeru LLT1 interaguje bivalentně s podjednotkou NKR-P1<sup>16</sup>.



Obrázek 5: **Deglykosylovaný komplex NKR-P1:LLT1.** Homodimer NKR-P1 (znázorněno odstíny modré barvy) interaguje jednou svojí podjednotkou (znázorněno světle modrou barvou) s jednou podjednotkou homodimerem LLT1 (znázorněno světle zelenou barvou). Homodimer LLT1 (znázorněno odstíny zelené barvy) současně interaguje pomocí druhé podjednotky (znázorněno tmavě zelenou barvou) s dalším homodimerem LLT1<sup>16</sup>.

Byly popsány dvě formy interakce NKR-P1 s LLT1, primární a sekundární, které jsou nezbytné pro efektivní zprostředkování inhibičního signálu. Primární interakce je shodná s interakcí popsanou u komplexu NKp65:KACL a je zprostředkována Y201, S199, K148 a R181 NKR-P1 podjednotky s E162, Y177, S129 a E179 podjednotky LLT1 dimeru (písmeno odpovídá příslušné aminokyselině podle jednopísmenného kódu, číslo odpovídá pořadí v aminokyselinovém řetězci)<sup>16</sup>. Sekundární interakce NKR-P1:LLT1 je zcela jedinečná a je zprostředkována S199, D147 a R181 podjednotky NKR-P1 dimeru s K169, R153 a N120 podjednotkou LLT1 dimeru<sup>16</sup>.

## **2.7 Role NKR-P1:LLT1 v rakovinném bujení a autoimunitních onemocnění**

Zvýšená exprese LLT1 na cílových buňkách pomáhá buňkám unikat před cytotoxickou odpovědí NK buněk. Není překvapující, že z tohoto důvodu je pozorována vyšší míra exprese mRNA pro LLT1 u některých typů rakovinných buněk se sníženou expresí MHC I, například u trojnásobně negativní rakoviny prsou nebo rakoviny prostaty<sup>23,24</sup>. Zvýšená exprese LLT1 byla popsána i u glioblastomu<sup>24</sup>.

Na druhou stranu snížená exprese LLT1 potlačuje toleranci NK buněk vůči organismu vlastním buňkám. Například snížená exprese LLT1 na buňkách placenty může vést k poškození plodu imunitním systémem matky<sup>17</sup>.

Pochopení vzniku struktury komplexu NKR-P1:LLT1 a mechanismu vzniku inhibičního signálu je důležité pro vývoj imunoterapeutik. Jednou ze zkoumaných možností regulace správné tvorby komplexu NKR-P1:LLT1 je kompetitivní reakce se specifickými protilátkami.

Calderon *et al.* připravili specifickou protilátku KW7.3.7 pro komplex NKR-P1:LLT1. Protilátka KW7.3.7 byla testována na třech různých rakovinných buněčných liniích NALM-1, Toledo, Raji. Byla pozorována zvýšená sekrece IL-2 a IFN $\gamma$  T-lymfocyty vůči všem třem druhům rakovinných buněčných linií v přítomnosti KW7.3.7 oproti přítomnosti nescifických izotypů protilátek. Přítomnost KW7.3.7 vedla i ke zvýšené cytotoxické aktivitě NK buněk vůči rakovinným buňkám<sup>25</sup>.

## 2.8 Metody selekce vazebných domén

### 2.8.1 *In vitro* evoluce

Ribozomální zobrazení (z angl. *ribosome display*), zobrazení pomocí fága (*phage display*) nebo zobrazení pomocí kvasinek (*yeast display*) jsou používány pro izolaci nebo syntézu protilátek či jejich vazebných domén. Společným rysem zmíněných zobrazovacích metod je propojení genotypu v podobě plazmidu kódujícího gen a fenotypu v podobě proteinu exprimovaného na povrchu ribozomu či buňky<sup>26</sup>.

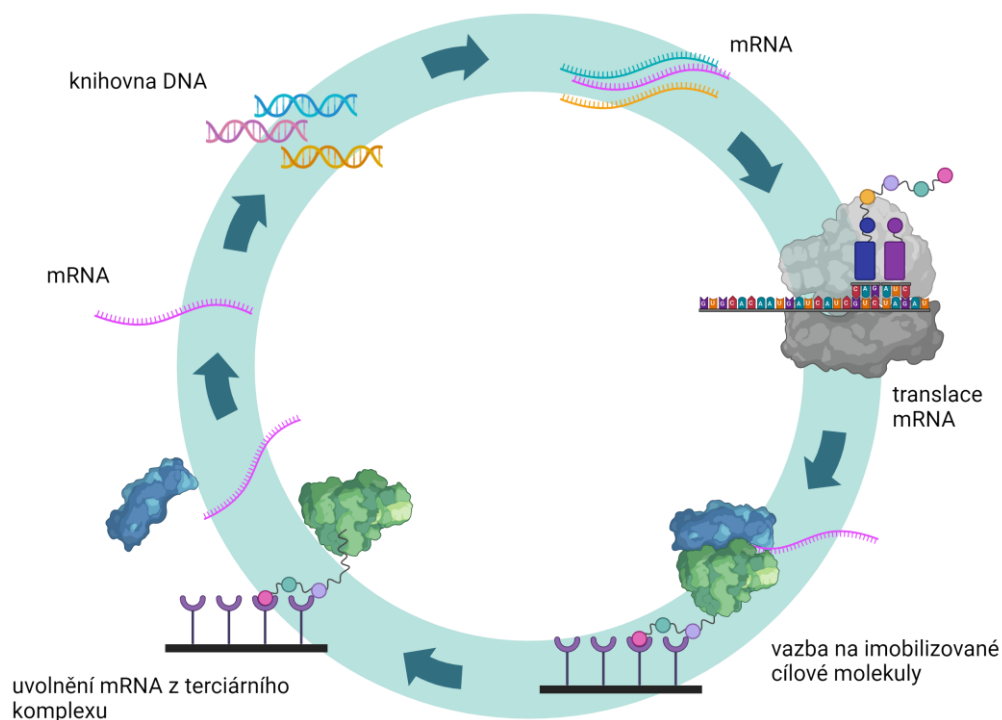
#### Ribozomální zobrazení

Princip metody ribozomálního zahrnuje vytvoření terciárního komplexu tvořeného aminokyselinovou sekvencí, ribozomem a mediátorovou RNA (mRNA, z angl. *messenger RNA*)<sup>27</sup>. Vytvoření komplexu předchází několik kroků. Prvním je transkripce DNA z knihovny. DNA obsahuje promotor T7, specifické místo pro nasednutí ribozomu (RBS, z angl. *ribosome binding site*) a náhodně mutovaný gen. Náhodně mutovaný gen vymezuje na 5' konci DNA F místo a na 3' konci „spacer“<sup>28</sup>. „Spacer“ je místo na DNA kódující gen pro peptid, jenž není předmětem našeho zájmu, ale jeho existence je nezbytná pro ribozomální zobrazení.

Transkripce DNA je spuštěna nasednutím T7 RNA polymerasy na T7 promotor. Transkripce probíhá ve směru od 5' konce ke 3' konci. Vytvořená mRNA obsahuje smyčky v oblasti za T7 místem a na konci „spacer“ místa. Smyčky na RNA iniciují nasednutí ribozomu na RBS<sup>29</sup>. Translace probíhá ve směru od 3' konce k 5' konci mRNA. Kvůli absenci stop kodonu na mRNA probíhá translace až do konce mRNA vlákna a dochází k vytvoření terciárního komplexu. Terciární komplex je navíc stabilizován přidávkem  $Mg^{2+}$  iontů do reakční směsi<sup>30</sup>.

Terciární komplex se pomocí peptidového řetězce váže na imobilizovanou cílovou molekulu. Schopnost terciárního komplexu se vázat na imobilizovanou cílovou molekulu je dána povahou náhodně mutovaného peptidu<sup>29</sup>. Nevázané komplexy jsou z reakční směsi odstraněny promytím.

Následné působení polyaminokarboxylové kyseliny (např. EDTA) způsobí disociaci ribozomálních podjednotek a uvolnění mRNA<sup>28</sup>. Uvolněná mRNA je zpětně transkribovaná do DNA. Pro zvýšení efektivity metody je cyklus (viz Obrázek 6) opakován nejméně čtyřikrát, než může být výsledná DNA použita pro jiné účely<sup>31</sup>.

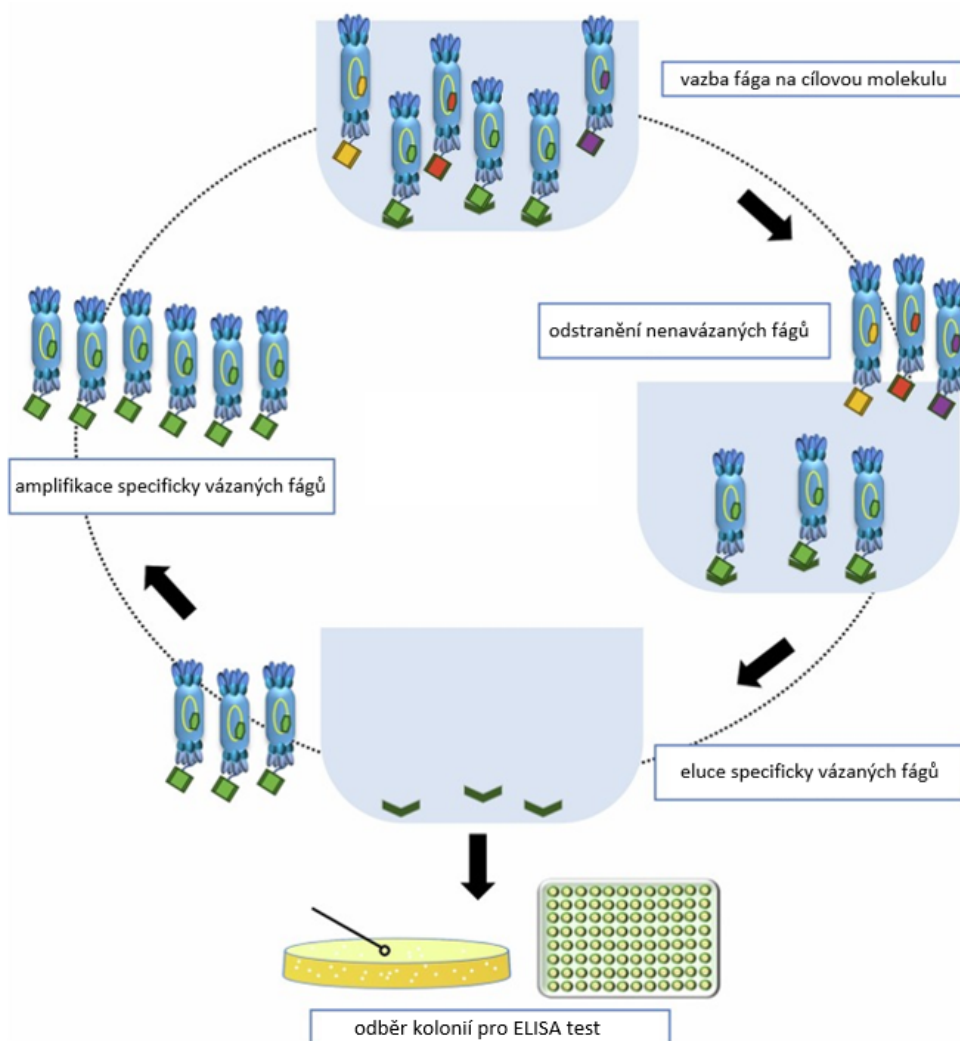


Obrázek 6: **Schéma ribozomálního zobrazení.** V prvním kroku dochází k *in vitro* translaci mRNA. Kvůli absenci stop kodonu vzniká komplex mRNA:ribozom:aminokyselinová sekvence. V dalším kroku se komplex selektivně váže na imobilizované cílové molekuly. Volné komplexy jsou odstraněny z reakční směsi promytím. Následné působení kyselinou polyaminokarboxylovou způsobí disociaci komplexu a uvolnění mRNA, která je zpětně transkribována do DNA. Získaná DNA je amplifikována.

### Zobrazení pomocí fága

Zobrazení pomocí fága je metoda, která využívá širokou knihovnu bakteriofágů, virů infikující bakteriální buňky, k selekci specifických proteinů. Knihovna bakteriofágů je vytvořena umělým vnesením oligonukleotidové sekvence do genomu bakteriofágu. Pokud bakteriofágy infikují bakteriální buňky, ty exprimují vloženou oligonukleotidovou sekvenci na povrchu kapsidy viru<sup>32</sup>. Povrchové proteiny mohou specificky vázat na imobilizované ligandy, což umožňuje identifikaci a selekci fágů s aminokyselinovou sekvencí, která má vysokou afinitu k cílovým ligandům (viz Obrázek 7)<sup>33,34</sup>.

Fágy vázané na ligandy jsou pak izolovány a použity k reinfekci bakteriálních buněk, což vede k amplifikaci fágů obsahujících žádané geny. Tento proces se často opakuje v několika cyklech, aby se zvýšila specifita a afinita vybraných bakteriofágů k cílovým ligandům. Výsledkem je populace bakteriofágů, která exprimuje proteiny s optimalizovanými vlastnostmi pro konkrétní aplikace, jako jsou terapeutické protilátky nebo enzymy pro biotechnologické využití.

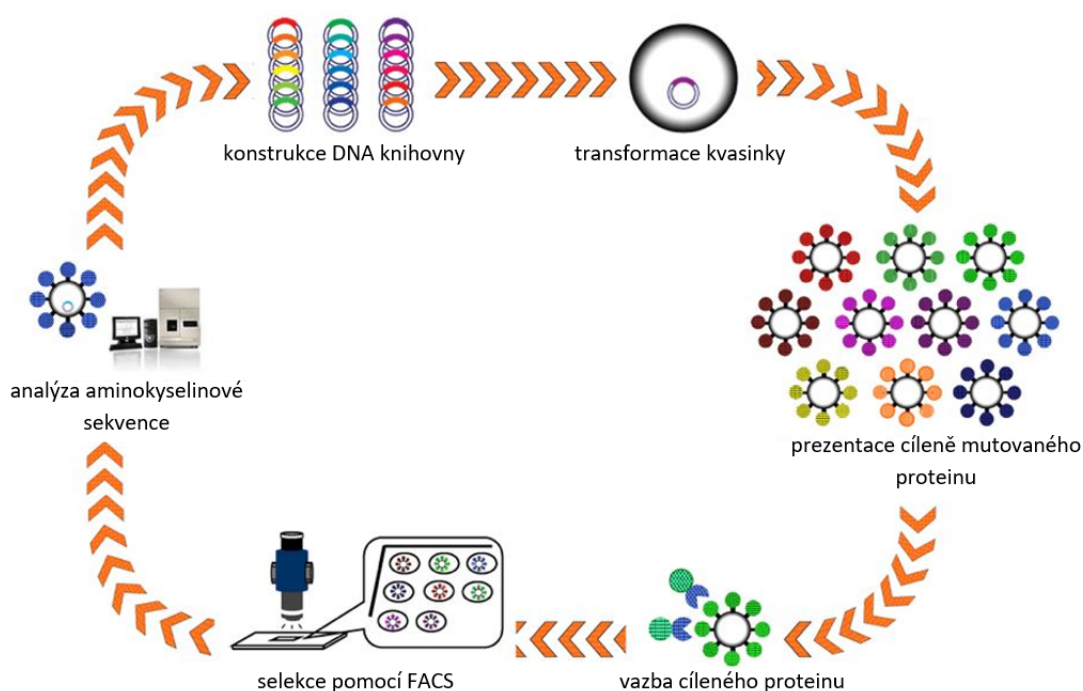


Obrázek 7: **Zobrazení pomocí bakteriofágů.** Na imobilizované cílové proteiny jsou specificky vázány pouze některé fágy z knihovny. Specificky vázané fágy jsou eluovány a následně amplifikovány. Převzato a upraveno z reference<sup>30</sup>.

## Zobrazení pomocí kvasinek

Zobrazování proteinů na povrchu kvasinek je proces, při kterém jsou kvasinky geneticky modifikovány tak, aby na svém povrchu exprimovaly náhodně mutované proteiny. Tento proces začíná vložením DNA kódující náhodně mutovaný protein do kvasinkové buňky prostřednictvím vektoru. Vektor obsahuje genetickou informaci nejen o samotném proteinu, ale také o sekvenci, která zajišťuje, že protein bude transportován na povrch kvasinkové buňky.

Když je DNA vnesena do kvasinkové buňky, začne se transkribovat a překládat do proteinu, který je poté transportován na buněčný povrch pomocí sekvencí signálních peptidů. Tyto peptidy zajišťují, že protein projde přes buněčnou membránu a ukotví se na proteinu buněčné stěny kvasinky. Na povrchu kvasinky je protein prezentován ve své funkční formě, což umožňuje jeho interakci s dalšími molekulami<sup>26</sup>. Cílový protein se váže na náhodně mutovaný protein, který je vystaven na kvasince. Vázané proteiny jsou následně fluorescenčně nebo magneticky značeny a separovány pomocí magnetického pole anebo fluorescenčně aktivované buněčné separace (FACS, z angl. *fluorescence-activated cell sorting*) neboli průtokové cytometrie (viz Obrázek 8)<sup>35</sup>.



Obrázek 8: **Zobrazení pomocí kvasinek.** Kvasinky jsou transformovány plazmidy se sekvencí kódující náhodné proteiny. Náhodně mutovaný protein je následně vystaven na povrchu kvasinky. V přítomnosti cílového proteinu dochází ke specifické vazbě. Specificky vázané proteiny jsou fluorescenčně značeny a analyzovány pomocí FACS. Převzato a upraveno z reference<sup>31</sup>.



### **3 Cíle práce**

Cílem této bakalářské práce byla příprava rozpustné formy extracelulární domény lidského receptoru NK buňky, NKR-P1, a jeho ligandu LLT1.

## 4 Materiály

### 4.1 Chemikálie a buněčné linie

#### *Plazmidy*

**PB-RB:** laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK

**pCVM\_hyPBase:** Wellcome Sanger Institute, Anglie

**pTT28-L2:** Mgr. Jan Bláha, Ph.D., laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK

**pUT7-H4:** laboratoř 204, katedra biochemie, PřF UK

#### *Buněčné linie*

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

**Escherichia coli DH5 $\alpha$ :** Thermo Fisher Scientific, USA

#### *Pufry a média*

**EQU pufr:** 5-20 % ethanol, 1-10 % KCl; Macherey-Nagel, Německo

**EX-CELL 293:** Sigma-Aldrich, USA; před použitím doplněno o L-glutamin do výsledné 4mM koncentrace

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

**HEPES pufr + 25mM imidazol:** 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, 25mM imidazol, pH 7,5

**HEPES pufr + 250mM imidazol:** 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, 250mM imidazol, pH 7,5

**LB médium:** 10 g/l trypton, 5 g/l kvasničný extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,4

**LDS pufr:** se zvýšeným obsahem glycerolu, obsahuje dodecylsulfát lithný, pH 8,5; Sigma-Aldrich, USA

**LYS pufr:** 0,1-5 % NaOH, 0,1-1 % dodecylsíran sodný; Macherey-Nagel, Německo

**MOPS pufr:** 50mM MOPS, 50mM Tris báze, 0,1% SDS, 1mM EDTA, 0,01-0,09% N,N-dimethylformamid, pH 7,7; Sigma-Aldrich, USA

**NEU pufr:** 25-45 % CH<sub>3</sub>COOH/Na/K · 2 H<sub>2</sub>O; Macherey-Nagel, Německo

**Octanový pufr:** 50mM octan sodný, 10nM NaN<sub>3</sub>, pH 4,0

**PBS pufr:** 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,0

**PBS-TK pufr:** PBS pufr používaný ve tkáňové místnosti; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4; Sigma-Aldrich, USA

**RES pufr:** Macherey-Nagel, Německo

**WASH pufr:** 5-20 % ethanol, 1-10 % KCl; Macherey-Nagel, Německo

### *Antibiotika*

**Ampicilin:** Carl Roth, Německo

**Blasticidin,** 10 mg/ml: InvivoGen, Francie

**Doxycyklin hydrochlorid:** Duchefa, Nizozemsko

**Puromycin,** 10 mg/ml: InvivoGen, Francie

### *Jiné*

**2-merkaptoethanol:** Sigma-Aldrich, USA

**Broad Range Spectra Multicolor Protein Ladder:** Thermo Fisher, USA

**Ethanol,** 96 %: Lach-Ner Česká republika

**Isopropanol:** Lach-Ner, Česká republika

**IPEI:** lineární polyethylenimin (25 kDa) 10 mg/ml; Polysciences, USA

## **4.2 Přístroje**

**Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad,** New Brunswick Scientific, USA

**Analytické váhy,** AND, USA

**Automatické pipety,** Gilson, USA

**Centrifuga 5415 R,** Eppendorf, Německo

**Centrifuga Allegra X-22R,** Beckman Coulter, USA

**Centrifugační zkušavky Oak Ridge,** Sigma-Aldrich, USA

**Filtry pro sterilizaci 0,22 μm,** TPP, Švýcarsko

**HPLC systém ÄKTAbasic,** Amersham Biosciences, Švédsko

**Inkubátor CO<sub>2</sub> MC0-18AIC,** Sanyo, UK

**Kahan Fuego SCS**, WLD-TEC, Německo

**Kolona Superdex 200 10/300 GL (1 × 30 cm)**, Amersham Biosciences, Švédsko

**Koncentrátory Amicon Ultra**, Millipore, USA

**Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky**, P-LAB, ČR

**Laminární box Clean Air**, PMV, Nizozemí

**Mrazicí box (-20 °C)**, Zanussi, Itálie

**Mrazicí box (-80 °C) MDF-U53V**, Sanyo, Japonsko

**Mrazicí kontejner Mr. Frosty**, Sigma Aldrich, USA

**pH metr Φ 240**, Beckman Coulter, USA

**Předvážky KB1200-2**, KERN, Německo

**PureLink HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit**, Invitrogen, USA

**Třepačka Orbit 1000**, Labnet, USA

**Třepačka Orbi-safe TS NetWise**, Schoeller, Německo

**UV prosvěcovací lampa**, UltraLum, USA

**Vodní lázeň**, Memmert, Německo

## 5 Metody

### 5.1 Transformace kompetentních buněk

Pro transformaci plazmidy (pTT28-L2 a pUT7-H4) byl použit chemokompetentní kmen bakterií *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Kompetentní bakterie byly před transformací uchovávány v mrazničce při teplotě -85 °C. Bakterie byly rozmrazeny na ledové lázni. K rozmrazeným bakteriím byl přidán 1  $\mu$ g plazmidu a směs byla inkubována po dobu 20 minut. Současně byla přehřívána LB-agarová plotna s přidavkem ampicilinu (100  $\mu$ g/ml) v inkubátoru při 37 °C. Po 20 minutách inkubace byly transformované bakterie rozetřeny na teplou agarovou plotnu. Ta byla následně umístěna do inkubátoru na 16 hodin při 37 °C. Tato teplota je optimální pro růst bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$ . Po inkubaci byla plotna s koloniemi uchovávána v lednici při 4 °C.

### 5.2 Kultivace bakterií ve velkém objemu

Z Petriho misky byla špičkou odebrána kolonie transformovaných bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$ . Odebraná kolonie byla přenesena do 0,5 l LB média s přidavkem 500  $\mu$ l zásobního roztoku ampicilinu (100 mg/ml). Pro optimální růst transformovaných bakterií byla tato suspenze třepána na třepačce při 37 °C a 200 otáčkách za minutu po dobu 16 hodin. Následně byly narostlé bakterie sklizeny a použity pro izolaci příslušné plazmidové DNA.

### 5.3 Izolace DNA

Suspenze bakterií určená pro izolaci plazmidové DNA byla centrifugována při 4000  $\times$  g po dobu 10 minut. Supernatant byl slit a buněčná peleta byla lyzována podle návodu pro velkoobjemovou přípravu plazmidu pro transientní transfekci (NucleoBond Xtra Maxi Kit) od výrobce Macherey-Nagel. Peleta buněk byla resuspendována ve 12 ml RES pufru dodávaného výrobcem. Přidavkem 12 ml LYS pufru byly buňky lyzovány. Roztok byl protřepán a ponechán při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 12 ml NEU pufru. Směs byla jemně promíchána několikerým převrácením zkumavky. Roztok lyzovaných buněk byl nanesen na papírovou filtr vložený do kolony, která byla promyta 25 ml EQU pufru. Z důvodu zvýšení výtěžku získané plazmidové DNA z roztoku byl papírový filtr promyt 15 ml EQU pufru. Následně byl papírový filtr vložený

do kolonky odstraněn. Kolonka byla promyta komerčně dodávaným WASH pufrům. Filtrát byl odstraněn a kolonka byla vložena do čisté zkumavky. Následně byla plazmidová DNA eluována nanesením 15 ml ELU pufru na kolonku a poté v eluátu vysrážena přidávkem 10,5 ml isopropanolu; následovala centrifugace při  $20000 \times g$  po dobu 1 hodiny při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant byl slit a peleta byla resuspendována ve 4 ml 70% ethanolu vychlazeného na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Roztok byl centrifugován při  $15000 \times g$  po dobu 10 minut při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant byl slit a peleta byla sušena po dobu minimálně 20 minut při laboratorní teplotě. Plazmidová DNA byla rozpuštěna v 1 ml sterilní deionizované vody.

Izolovaná DNA pUT7-H4 byla rozpuštěna ve filtrované ultra čisté vodě. Spektroskopicky byla stanovena koncentrace a čistota DNA. Pro čistou DNA je dán v praxi poměr  $A_{260}/A_{280}=1,8$  až  $1,9$ . Poměr absorbancí menší než  $1,6$  indikuje možnou přítomnost proteinů, které hojně absorbují při vlnové délce  $280 \text{ nm}$  kvůli přítomnosti tryptofanu a tyrosinu. Naopak poměr vyšší než  $2,0$  může indikovat přítomnost RNA.

## 5.4 Tranzientní transfekce buněčné linie HEK293T

Z důvodu nedostatku času byla tranzientní transfekce provedena Mgr. Ondřejem Skořepou, Ph.D., dle následujícího postupu.

Pro vysokohustotní tranzientní transfekci buněk HEK293T bylo ze zásobní suspenze odebráno  $800 \times 10^6$  buněk v EX-CELL 293 médiu. Buněčná kultura byla centrifugována při  $100 \times g$  po dobu 5 minut a následně resuspendována ve 34 ml média EX-CELL 293. Do 1l čtyřhranné láhve bylo pipetováno 6 ml plazmidové DNA ( $800 \mu\text{g}$ ) v PBS-TK, následně 34 ml buněčné suspenze a  $240 \mu\text{l}$  IPEI ( $10 \text{ mg/ml}$ ). Buněčná hustota tak činila  $20 \times 10^6$  buněk/ml. Láhev byla umístěna na orbitální třepačku na 90 minut při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 135 rpm, 5%  $\text{CO}_2$ .

Suspenze transfekovaných buněk byla po inkubaci doplněna na 400 ml EX-CELL 293 médiem a umístěna na třepačku při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 135 rpm, 5%  $\text{CO}_2$ . Kultura byla sklizena po 6 dnech od transfekce.

## 5.5 Stabilní transfekce buněčné linie HEK293T

Stabilní transfekce buněčné linie HEK293T byla provedena s využitím transpozasového systému piggyBac. Nejprve byla připravena transfekční směs smícháním celkem  $60 \mu\text{g}$  plazmidů pUT7-H4, PB-RB a pCVM\_hyPBase v hmotnostním poměru 8:1:1, který odpovídá objemům  $72,6 \mu\text{l} : 19,2 \mu\text{l} : 8,2 \mu\text{l}$  do celkového objemu  $600 \mu\text{l}$

v PBS-TK. Směs plazmidů byla přefiltrována přes sterilní 0,22  $\mu\text{m}$  filtr a pro transfekci bylo použito 300  $\mu\text{l}$  roztoku, což odpovídá 30  $\mu\text{g}$  plazmidové DNA (tedy 1  $\mu\text{g}$  na 1 milion transfekovaných buněk).

Pro stabilní transfekci buněk HEK293T bylo ze zásobní suspenze odebráno  $30 \times 10^6$  buněk v EX-CELL 293 médiu. Buněčná kultura byla centrifugována při  $100 \times g$  po dobu 5 minut a následně resuspendována v 1,2 ml média EX-CELL 293.

Do jedné jamky na 6-jamkové destičce bylo pipetováno 300  $\mu\text{l}$  transfekční směsi plazmidové DNA, následně 1,2 ml buněčné suspenze a 12  $\mu\text{l}$  IPEI (10 mg/ml). Kladně nabitý IPEI interaguje se záporně nabitou DNA, čímž usnadňuje vazbu DNA na záporně nabitou buněčnou membránu a její následný příjem do buňky pinocytózou. Destička byla umístěna na orbitální třepačku na 90 minut při 37 °C, 135 rpm, 5% CO<sub>2</sub>.

Suspenze transfekovaných buněk byla po inkubaci přelita do 100ml 4hranné láhve a doplněna EX-CELL 293 médiem na 30 ml a následně umístěna třepačku na 48 hodin při 37 °C, 135 rpm, 5% CO<sub>2</sub>.

Po dvou dnech byla k suspensi přidána selekční antibiotika puromycin a blasticidin, vždy do koncentrace v suspenzi 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Následně byla sledována viabilita a buněčná hustota transfekovaných buněk. Suspenze byla subkultivována tak, aby nedošlo k přerůstání buněk nad hodnotu  $4 \times 10^6$  buněk/ml a při výměně média byla vždy doplněna selekční antibiotika. Po ustálení růstu a dělení buněk cca jednou za 24 hodin byla nyní už selektovaná buněčná linie zmrazena a část zásobní suspenze nechána rozrůst v objemu 400 ml do buněčné hustoty  $2 \times 10^6$  buněk/ml pro zahájení exprese proteinu.

Pro spuštění exprese proteinu NKR-P1 (konstrukt H4) byl do 400 ml stabilně transfekované linie přidán doxycyklin do celkové koncentrace 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Kultura byla sklizena po 6 dnech od zahájení exprese.

## 5.6 Sklizení buněčné suspenze HEK293T

Kultura buněk HEK293 po tranzientní anebo stabilní expresi byla zpracována stejným způsobem. Suspenze byla centrifugována 30 minut při  $20000 \times g$ . Supernatant obsahující sekretovaný protein byl zředěn PBS puftrem v poměru 1:1 a ihned purifikován, nebo skladován v mrazničce při -20 °C.

## 5.7 Purifikace proteinů

Purifikace proteinů byla prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, z angl. *high-performance liquid chromatography*) na přístroji ÄKTA basic metodou chelatační afinitní a gelové permeační chromatografie.

### *Chelatační afinitní chromatografie*

Pro chelatační afinitní chromatografii (IMAC, z angl. *immobilized metal affinity chromatography*) byla použita kolona Indigo-NTA 5 ml obsahující  $\text{Ni}^{2+}$  ionty. Na tyto ionty se selektivně reverzibilně váže protein svou histidinovou kotvou na C-konci. Celý program pro afinitní chromatografii byl nastaven na průtok 1 ml/min při maximálním tlaku 0,5 MPa. Pokud byla hodnota tlaku rovna 0 MPa byl urychlen průtok až na 5 ml/min. Průběh chromatografie byl detekován měřením konduktivity a absorbance při vlnové délce 280 nm.

Před nanesením vzorku byla kolona Indigo-NTA 5 ml promyta HEPES pufrem. Následně bylo na kolonu nanášeno zfiltrované kultivační médium a kolona byla promyta HEPES pufrem. Pro zvýšení čistoty proteinu byla provedena předeluce 50 ml HEPES pufru s 25mM imidazolem a následně opět HEPES pufrem. Po ustálení hodnot absorbance a konduktivity byla kolona Indigo-NTA nahrazena odsolovací kolonou HiPrep 26/10 Desalting, jež byla také promyta HEPES pufrem.

Promytá kolona HiPrep 26/10 Desalting byla nasazena za kolonu Indigo-NTA 5 ml. Eluce proteinu s histidinovou kotvou byla provedena HEPES pufrem s 250mM imidazolem přímo do odsolovací kolony, takže jímáný protein byl už zbaven imidazolu. Imidazol kompetuje o vazebné místo na  $\text{Ni}^{2+}$  iontech s histidinovou kotvou proteinu. Eluovaný protein byl jímán do 15ml zkumavek.

Po skončení práce byly kolony Indigo-NTA 5 ml a HiPrep 26/10 Desalting promyty octanovým pufrem o pH 4,0,  $\text{dH}_2\text{O}$  a převedeny do 20% ethanolu.

### *Koncentrování proteinů*

Před gelovou permeační chromatografií byl vzorek proteinů koncentrován na minimálně 0,5 ml pomocí koncentrátoru Amicon Ultra. Roztok byl převeden na koncentrátor Amicon Ultra a následně centrifugován po dobu 5 minut při  $4000 \times g$ . Pokud objem koncentrovaného roztoku přesahoval 0,5 ml, byl roztok proteinu promíchán špičkou pipety a opět centrifugován. Následně byl zkoncentrovaný roztok proteinu převeden pipetou do 1ml mikrozkušavky. Před nanesením na kolonu byl vzorek centrifugován při  $20000 \times g$  po dobu 5 minut, aby se odstranily agregáty a větší částice, které by kolonu mohly znečistit.



### *Gelová permeační chromatografie*

Gelová permeační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300 GL. Kolona byla promyta roztokem PBS při max. průtoku 0,5 ml/min a max. tlaku 1 MPa. Injekční mikrostríkačkou typu Hamilton byl na systém HPLC ÄKTA basic nanesen koncentrovaný protein přes septum v šesticestném nástřikovém ventilu. Frakce roztoku proteinu byly jímány po 1ml do mikrozkušavek automatickým sběračem frakcí. Po ukončení práce byla kolona převedena do 20% ethanolu.

## **5.8 Charakterizace proteinů**

### **5.8.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí LDS**

#### *Příprava vzorku pro LDS-elektroforézu*

Pro přípravu vzorku v neredukujícím prostředí byl použit 4× koncentrovaný vzorkový pufr dodecylsulfátu lithného (LDS, z angl. *lithium dodecyl sulfate*). K 5  $\mu$ l vzorku proteinu bylo tedy přidáno 1,25  $\mu$ l pufru LDS. Roztok byl umístěn do termobloku vyhřátého na 94 °C na 5 minut za účelem denaturace proteinu. Pro přípravu vzorku v redukujícím prostředí, byl do vzorkového pufru LDS přidán 2-merkptoethanol do koncentrace 5 %.

#### *Příprava gelu pro LDS elektroforézu*

Na základě předpokládané velikosti proteinu (16-17 kDa) byl pro LDS elektroforézu připraven 13,5% gel o tloušťce 1 mm. Gel byl připraven dle návodu pro mPAGE Lux Bis-Tris Gel Casting System (Merck, USA). Smícháním 3,3 ml rozdělovacího roztoku a 1,7 ml rozpouštědla v ztmavené 50ml kónické zkumavce byl připraven roztok pro rozdělovací gel. Roztok pro rozdělovací gel byl promíchán několikerým otočením ztmavené 50ml kónické zkumavky.

Dále byla sestavena skleněná kazeta pro gel tak, že skla aparatury byla umístěna do nalévacího rámečku. Sestavená aparatura byla umístěná do UV prosvěcovací stanice mPAGE Lux Curing Station. Na skleněnou kazetu byl 5ml pipetou nanesen po rysku připravený rozdělovací gel. Po okraje skel byl na rozdělovací gel nanesen 5ml pipetou zaostřovací gel. Mezi skla byl umístěn hřeben a následně byl gel polymerován působením UV záření v prosvěcovací stanici.

#### *LDS elektroforéza*

Připravený gel byl umístěn do vodivostní aparatury, která byla doplněna MOPS pufrem. Do každé dráhy gelu bylo pipetováno 5  $\mu$ l připraveného vzorku a 5  $\mu$ l standardu Broad

Range Spectra Multicolor Protein Ladder. Elektroforéza byla spuštěna na 40 minut při 200 V. Následně byl gel vyjmut a barven v barvicí lázni Coomassie.

## 6 Výsledky

### 6.1 NKR-P1 H4

Cílem této bakalářské práce je příprava rozpustné formy konstruktů NKR-P1 H4. Konstrukt NKR-P1 H4 se sestává z extracelulární domény receptoru NKR-P1, zbytku sekrečního signálu pro produkci v buněčné linii HEK293T, restričního místa pro působení enzymů AgeI a KpnI a histidinovou kotvu speciálně navrženou pro purifikaci proteinu (viz Obrázek 9).

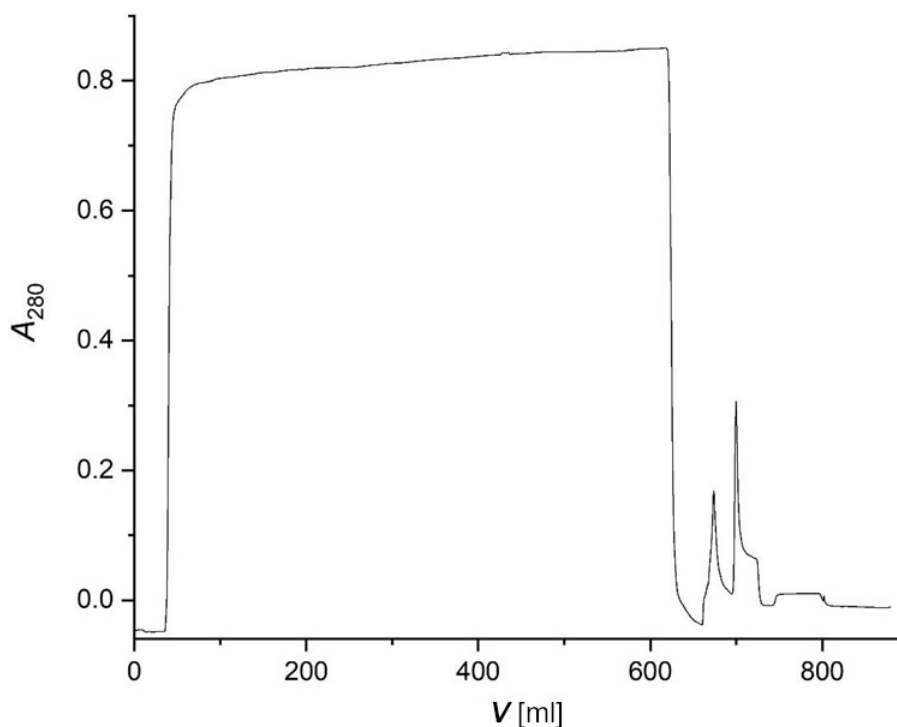
```
GELLLLLLGLRLQLSLGITGGLLNCPIYWQQLREKCLLFSHTVNPWNN  
SLADCSSTKESLLLRDKDELIHTQNLIRDKAILFWIGLNFSLSEKNW  
KWINGSFLNSNDLEIRGDAKENSISISQTSVYSEYCSSTEIRWICQKEL  
TPVRNKVYPDSGTKHHHHHHHHHG
```

Obrázek 9: Aminokyselinová sekvence rozpustné formy extracelulární domény proteinu NKR-P1, konstrukt H4, s histidinovou kotvou. Fialově je vyznačen sekreční signál pro produkci proteinu, kde kurzívou je vyznačená část, která je během produkce buňkou odštěpena. Modře je vyznačené restriční místo pro působení AgeI. Žlutě je vyznačené místo pro působení KpnI. Červeně jsou vyznačena místa N-glykosylace. Růžově jsou vyznačeny cysteiny, které se podílí na vytváření disulfidických můstků stabilizujících extracelulární doménu proteinu. Zeleně je vyznačena histidinová kotva.

Izolací plazmidové DNA z transformovaného bakteriálního kmene *E. coli* DH5 $\alpha$  bylo získáno 662  $\mu$ g plazmidu pUT7\_H4. Čistota plazmidové DNA byla spektrofotometricky stanovena jako absorbance vodného roztoku plazmidové DNA při vlnových délkách 280 nm, 260 nm a 230 nm. Byl zjištěn poměr absorbancí  $A_{260/280} = 1,90$  a  $A_{260/230} = 2,26$ .

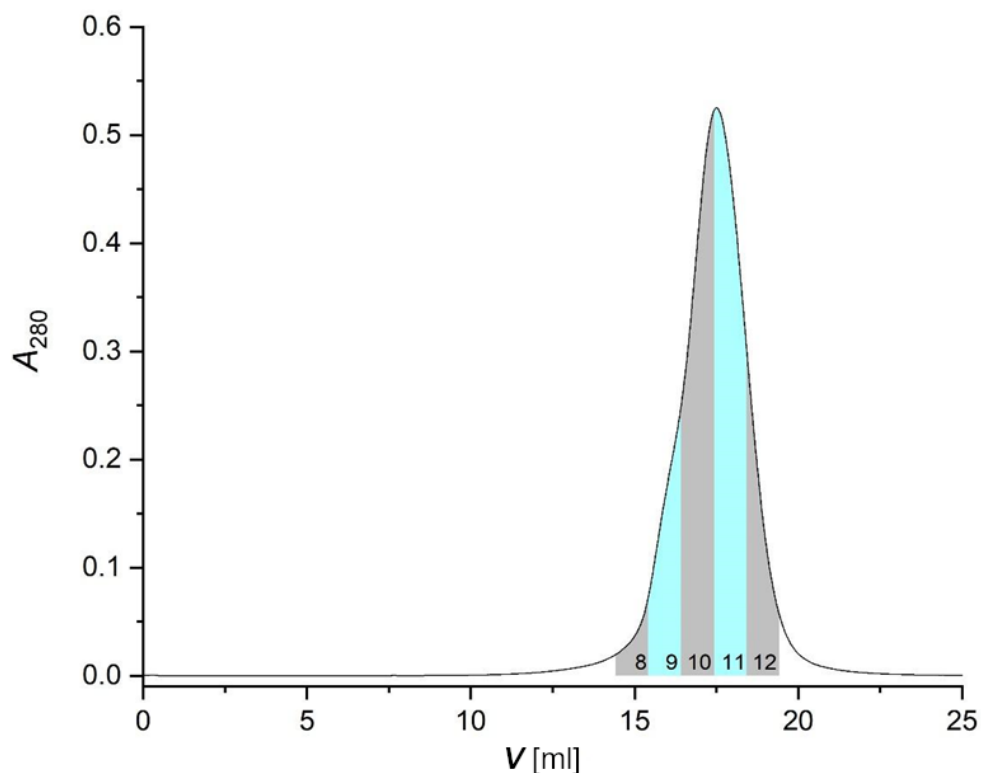
Kotransfekcí plazmidy pUT7\_H4 (nesoucí gen pro NKR-P1) spolu s plazmidem pro tranzientní produkci piggyBac transpozasy (plazmid hyPBBase) a plazmidem nesoucím gen pro reversní tetracyklinový transaktivátor (plazmid PB-RB) byla úspěšně stabilně transfekována buněčná linie HEK293T užitím transpozasového systému piggyBac. Selektce probíhala po dobu 16 dnů na antibiotika puromycin a blasticidin. Produkce byla spuštěna přidáním doxycyklinu a kultura sklizena po 6 dnech při viabilitě buněk 99,5 %. Celkově bylo získáno 400 ml buněčného média obsahujícího sekretovaný protein NKR-P1.

Filtrované médium z exprese s přidavkem PBS bylo purifikováno chelatační afinitní chromatografií (IMAC). Pro zvýšení čistoty proteinu byla provedena předeluce pufrém s 25mM imidazolem s píkem v elučním objemu 674 ml (viz Obrázek 10). Následně byla provedena eluce pufrém s 250mM imidazolem s píkem v elučním objemu 701 ml (viz Obrázek 10).



Obrázek 10: **Chelatační afinitní chromatografie proteinu NKR-P1 H4.** Chromatogram zobrazuje průběh nanesení média po produkci proteinu NKR-P1, konstruktu H4 na kolonu indigo-NTA (oblast 50-600 ml), následnou předeluci pufrém s 25mM imidazolem (eluční objem píku roven 674 ml) a eluci pufrém s 250mM imidazolem (eluční objem píku roven 701 ml). Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm.

Získaný roztok proteinu NKR-P1 byl koncentrován na >0,5 ml a nanesen na HPLC s připojenou kolonou Superdex 200 10/300 GL pro další purifikaci. Protein byl přítomný ve frakcích 8-12 (viz Obrázek 11) s výtěžkem uvedeným v Tabulce 1. Celkově bylo získáno 8,0 mg čistého proteinu NKR-P1.

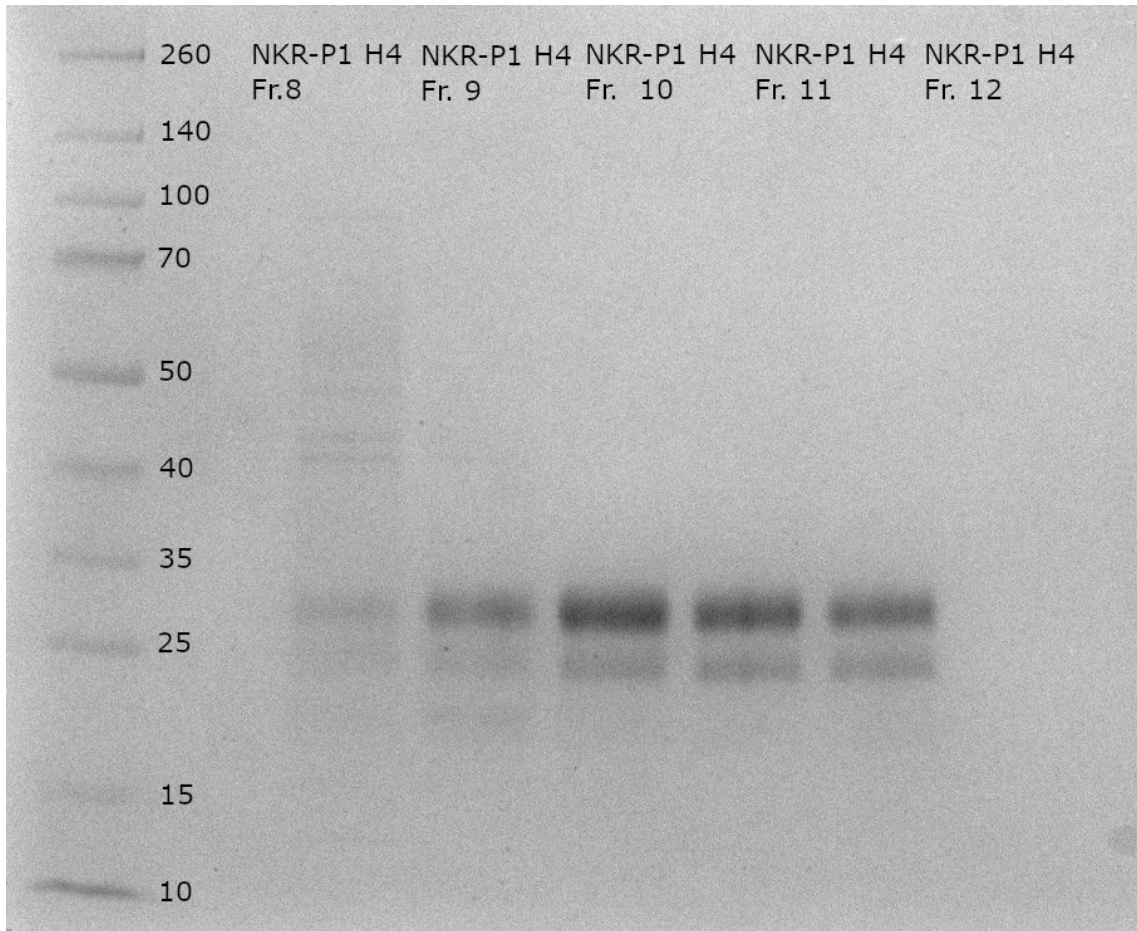


Obrázek 11: **Gelová permeační chromatografie proteinu NKR-P1 H4.** Graf zobrazuje průběh purifikace NKR-P1 H4. Gelová permeační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 10/300 GL. Barevně vyznačená plocha zobrazuje frakce obsahující NKR-P1 H4. Jednotlivé frakce jsou označeny čísly 8-12. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm.

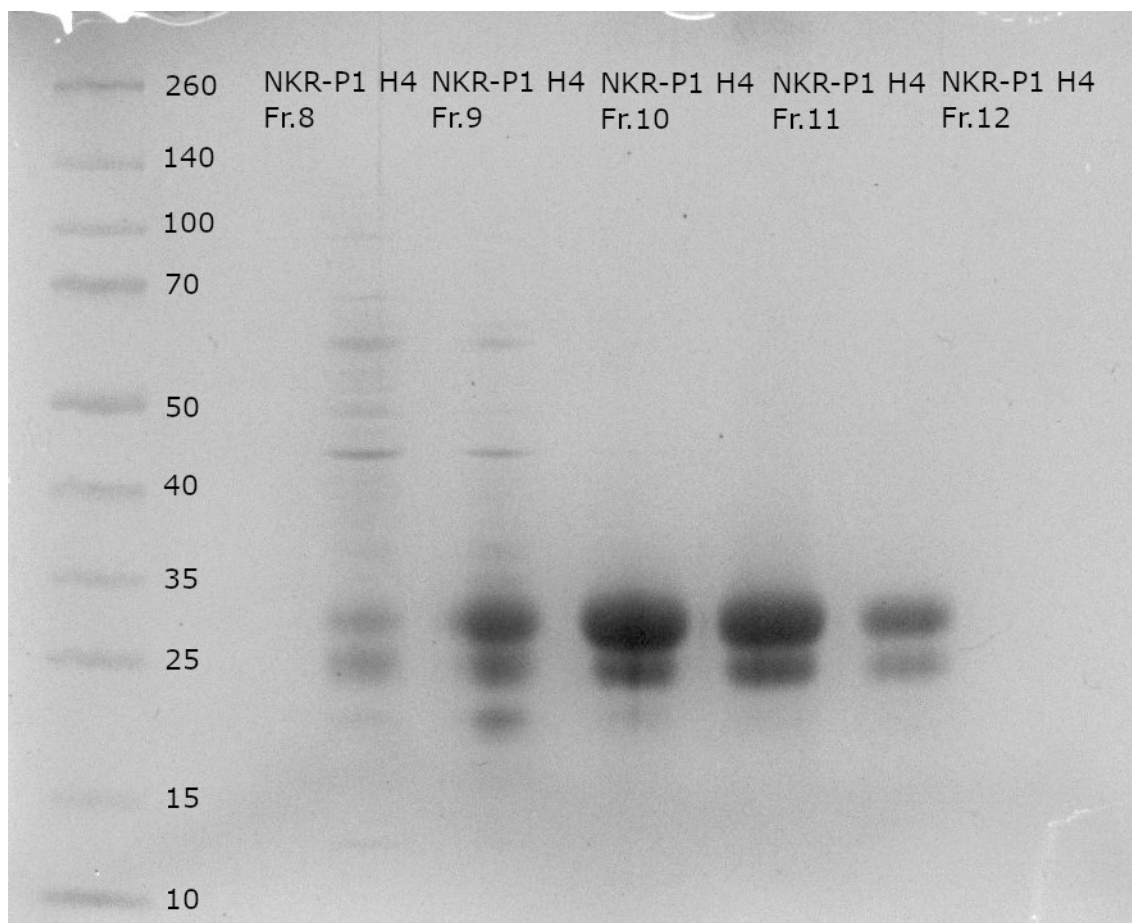
Tabulka 1: **Tabulka výtěžku proteinu NKR-P1 H4 z frakcí 8-12.** V tabulce jsou uvedeny jednotlivé objemy frakcí (8-12) a koncentrace obsaženého proteinu NKR-P1 H4 v jednotlivých frakcích (8-12). Celkový výtěžek proteinu NKR-P1 činil 8,0 mg (což odpovídá 20 mg/l buněčné kultury).

č. frakce	V [ml]	$c_{NKR-P1\ H4}$ [mg/ml]	$m_{NKR-P1\ H4}$ [mg]
8	1	0,50	0,50
9	1	1,10	1,10
10	1	3,10	3,10
11	1	2,80	2,80
12	1	0,51	0,51

Frakce 8-12 byly analyzovány provedením LDS elektroforézy v neredukujícím prostředí (viz Obrázek 12) a v redukujícím prostředí (viz Obrázek 13). Očekávaná mol. hmotnost konstruktu H4 rozpustné formy extracelulární domény proteinu NKR-P1 (17557 Da) byla vypočítána podle aminokyselinové sekvence v programu ProtParam (Obrázek 9). Produkovaný protein obsahuje tři místa N-glykosylace a tak bude jeho pozorovaná mol. hmotnost zvýšena o cca 10-15 kDa v důsledku přirozené glykosylace přítomné v lidské buněčné linii HEK293T.



**Obrázek 12: Snímek gelu LDS elektroforézy proteinu NKR-P1 H4 v neredukujícím prostředí.** Dráhy jsou označené pořadím frakce (8-12), z které byl odebrán protein pro provedení LDS elektroforézy. V levé části jsou uvedeny mol. velikosti standardu proteinů v kDa. Očekávaná velikost produkované rozpustné formy NKR-P1, konstruktu H4 je 17557 Da + cca 10-15 kDa díky přítomnosti N-glykosylace. Proužky pak odpovídají jednotlivým glykosylovaným formám proteinu.



Obrázek 13: Snímek gelu LDS elektroforézy proteinu NKR-P1 H4 v redukujícím prostředí. Dráhy jsou označeny pořadím frakce (8-12), z které byl odebrán protein pro provedení LDS elektroforézy. V levé části jsou uvedeny mol. velikosti standardu proteinů v kDa. Očekávaná velikost produkované rozpustné formy NKR-P1, konstruktů H4 je 17557 Da + cca 10-15 kDa díky přítomnosti N-glykosylace. Proužky pak odpovídají jednotlivým glykosylovaným formám proteinu.

## 6.2 LLT1 L2

Cílem této bakalářské práce je příprava rozpustné formy konstruktu LLT1 L2. Konstrukt LLT1 L2 se sestává z extracelulární domény proteinu LLT1, zbytku sekrečního signálu pro produkci v buněčné linii HEK293T a histidinovou kotvu speciálně navrženou pro purifikaci proteinu (viz Obrázek 14). Konstrukt LLT1 L2 obsahuje mutovaný histidin na cystein na pozici 176<sup>20</sup>. Mutace byla vytvořena pro stabilizaci konstruktu třetím disulfidickým můstkem (viz Obrázek 14).

```
GELLLLLLGLRLQLSLGITGQAACPESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSS
QRFCDSDADLAQVESFQELNLLRYKGPSDHWIGLSREQGQPWK
WINGTEWTRQFPILGAGECAYLNDKGASSARCYTERKWCPSKSDIH
VGTKHHHHHHHHHG
```

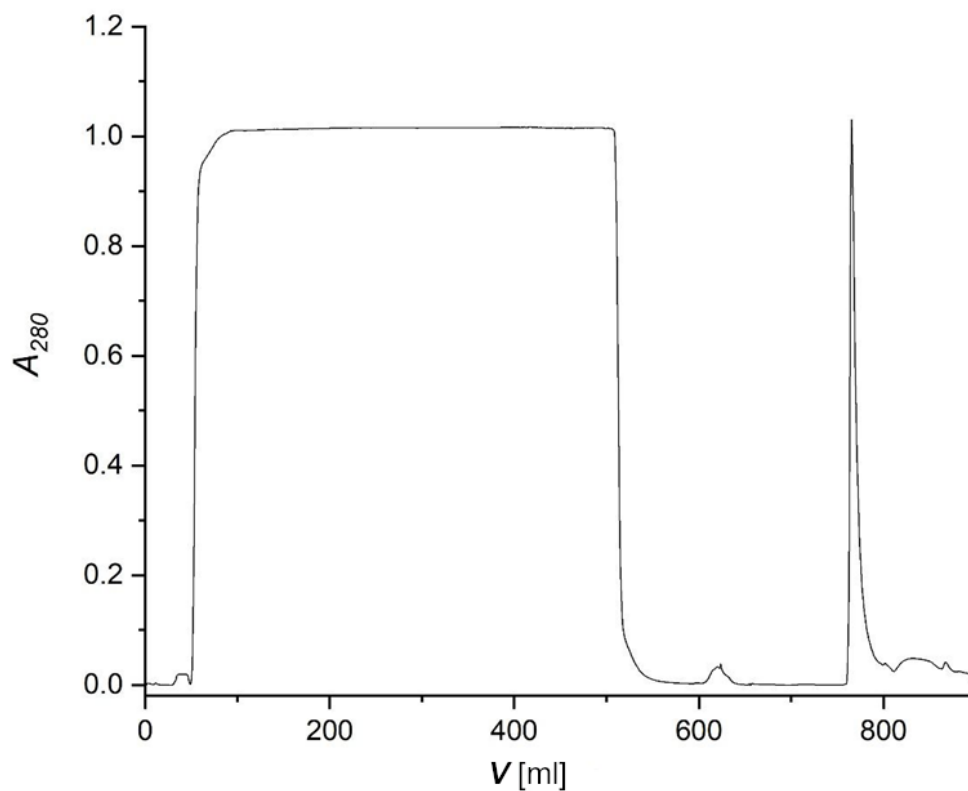
Obrázek 14: Aminokyselinová sekvence rozpustné formy extracelulární domény proteinu LLT1, konstrukt L2 s histidinovou kotvou. Fialově je vyznačen sekreční signál pro produkci proteinu, kde kurzívou je vyznačená část, která je během produkce buňkou odštěpena. Modře je vyznačené restrikční místo pro působení AgeI. Žlutě je vyznačené místo pro působení KpnI. Červeně jsou vyznačena místa N-glykosylace. Růžově jsou vyznačeny cysteiny, které se podílí na vytváření disulfidických můstků stabilizujících extracelulární doménu proteinu. Zeleně je zvýrazněna histidinová kotva.

Izolací plazmidové DNA z transformovaného bakteriálního kmene *E. coli* DH5 $\alpha$  bylo získáno 1,33 mg plazmidu pTT28\_L2 kódujícího rozpustnou formu extracelulární domény proteinu LLT1, konstrukt L2 (viz Obrázek 14).

Tranzientní transfekcí buněčné linie HEK293T plazmidem pTT28\_L2 bylo získáno 400 ml média obsahujícího sekretovaný protein, které bylo sklizeno při viabilitě buněk 99,6 %.

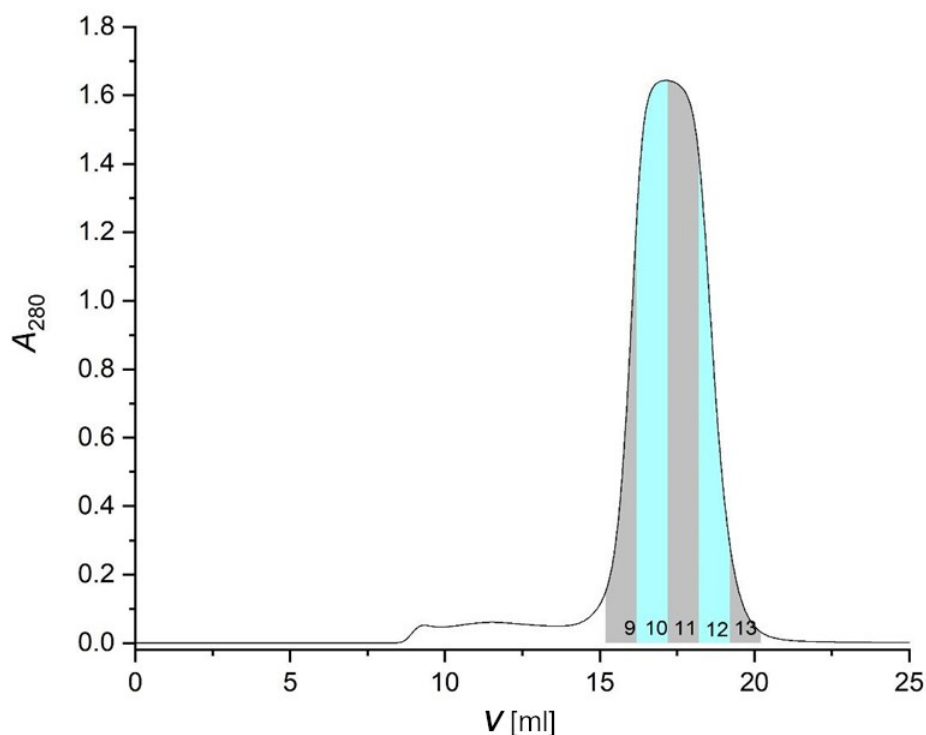
Filtrované médium zředěné přídatkem PBS pufru bylo purifikováno chelatační afinitní chromatografií (IMAC). Pro zvýšení čistoty proteinu byla provedena předeluce pufrům s 25mM imidazolem s píkem v elučním objemu 621 ml (viz Obrázek 15). Následně byla provedená eluce pufrům s 250mM imidazolem s píkem v elučním objemu 765 ml (viz Obrázek 15).





**Obrázek 15: Chelatační afinitní chromatografie proteinu LLT1 L2.** Chromatogram zobrazuje průběh nanesení média po produkci proteinu LLT1, konstruktu L2 na kolonu indigo-NTA (oblast 50-500 ml), následnou předeluci pufrem s 20mM imidazolem (eluční objem píku roven 621 ml) a eluci pufrem s 250mM imidazolem (eluční objem píku roven 765 ml). Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm.

Provedením gelové permeační chromatografie na HPLC na koloně Superdex 200 10/300 byly získány frakce 7-12 obsahující protein LLT1 L2 (viz Obrázek 16 a Tabulka 2). Celkový výtěžek proteinu byl 13,7 mg.



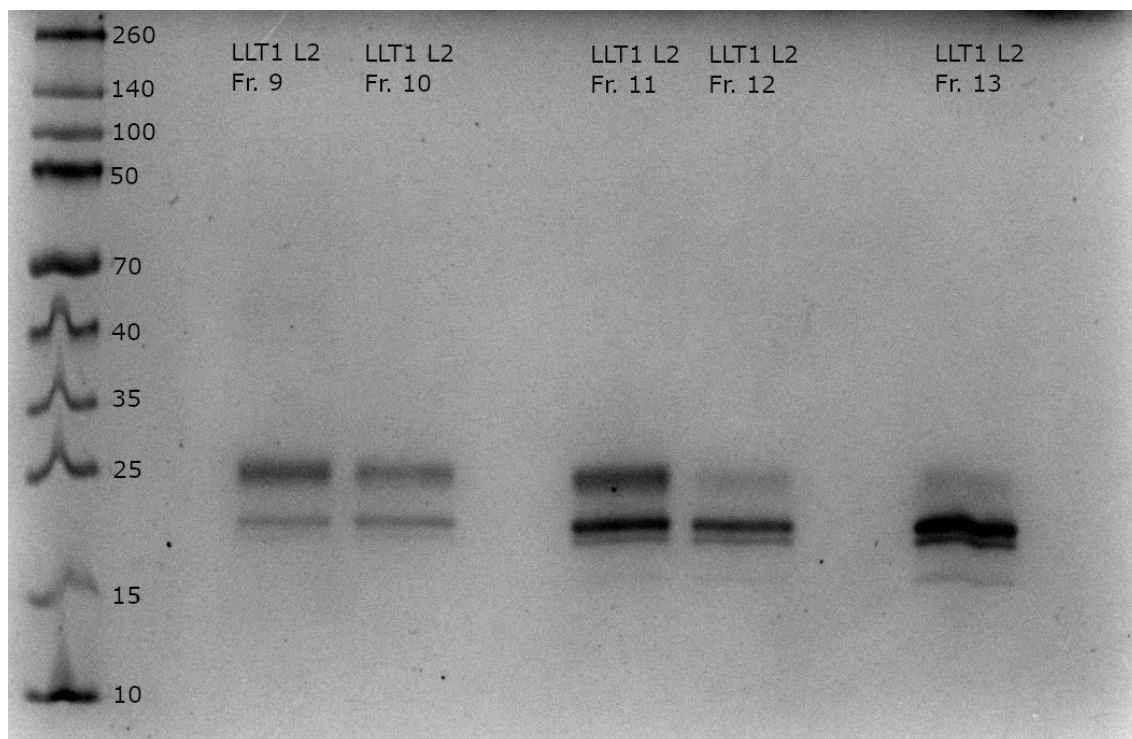
Obrázek 16: **Gelová permeační chromatografie proteinu LLT1 L2.** Gelová permeační chromatografie byla provedena na koloně Superdex 200 10/300. Barevně vyznačená plocha zobrazuje frakce obsahující LLT1 L2. Jednotlivé frakce jsou označeny čísly 9-13. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280 nm.

Tabulka 2: **Tabulka výtěžku proteinu LLT1 L2 z frakcí 9-13.** V tabulce jsou uvedeny jednotlivé objemy frakcí (9-13) a koncentrace obsaženého proteinu LLT1 L2 v jednotlivých frakcích (9-13). Celkový výtěžek proteinu LLT1 L2 činil 13,7 mg (což odpovídá 34,2 mg/l buněčné kultury).

č. frakce	V [ml]	$c_{\text{LLT1 L2}}$ [mg/ml]	$m_{\text{LLT1 L2}}$ [mg]
9	1	0,56	0,56
10	1	3,90	3,90
11	1	6,10	6,10
12	1	2,70	2,70
13	1	0,40	0,40

Frakce 9-13 byly analyzovány provedením LDS elektroforézy v neredukujícím prostředí (viz Obrázek 17). Očekávaná mol. hmotnost rozpustné formy extracelulární domény proteinu LLT1, konstruktu L2 (15667 Da) byla vypočítána podle aminokyselinové

sekvence v programu ProtParam (viz Obrázek 14). Produkovaný protein obsahuje dvě místa N-glykosylace a tak bude jeho pozorovaná mol. hmotnost zvýšena o cca 5-10 kDa v důsledku přirozené glykosylace přítomné v lidské buněčné linii HEK293T.



Obrázek 17: Snímek gelu LDS elektroforézy proteinu LLT1 L2 v neredukujícím prostředí. Dráhy jsou označeny pořadím frakce (9-13), z které byl odebrán protein pro provedení LDS elektroforézy. V levé části jsou uvedeny mol. velikosti standardu proteinů v kDa. Očekávaná velikost produkované rozpustné formy LLT1, konstruktu L2 je 15667 Da + cca 5-10 kDa díky přítomnosti N-glykosylace. Proužky pak odpovídají jednotlivým glykosylovaným formám proteinu.

## 7 Diskuze

Bláha *et al.* popsali produkci NKR-P1 v tranzientně transfekované buněčné linii HEK293T<sup>36</sup> a produkci LLT1 v buněčné linii HEK293S GnTI a buněčné linii HEK293T<sup>20</sup>. Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D. v rámci své diplomové práce optimalizoval transpozasový systém piggyBac pro stabilní produkci proteinu NKR-P1, konstruktu H4 v buněčné linii HEK293T. Tato stabilně transfekovaná linie HEK293T však nebyla schopná produkce proteinu po zmrazení a následném rozmrazení. V laboratoři RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. byl do plazmidu pUT7 vložen tzv. všudypřítomný chromatin-otevřející element (UCOE, z angl. *ubiquitous chromatin opening element*) za účelem zvýšení exprese a snížení utišování genové exprese<sup>37</sup>. V rámci této bakalářské práce byl použit připravený plazmid pUT7 obsahující UCOE pro přípravu stabilně transfekované buněčné linie HEK293T exprimující konstrukt H4 rozpustné formy NK buněčného receptoru NKR-P1 a byla zopakována tranzientní produkce proteinu LLT1 v buněčné linii HEK293T.

### *Produkce a transfekce*

Bylo připraveno dostatečné množství plazmidové DNA pUT7\_H4 (662  $\mu$ g), která kóduje extracelulární doménu proteinu NKR-P1, a plazmidové DNA pTT28\_L2 (1,33 mg), která kóduje protein LLT1.

### *Purifikace*

Purifikace pomocí HPLC byla efektivní. Předeluce byla nezbytná pro zvýšení čistoty izolovaného proteinu. Při produkci mohlo dojít ke vzniku vedlejších produktů obsahujících histidin ve své aminokyselinové sekvenci, který se mohl specificky vázat na Ni<sup>2+</sup> ionty na koloně. Účinnost předeluce 25mM imidazolem a eluce 250mM imidazolem dokládají dobře definované píky v chromatogramu pro NKR-P1 (viz Obrázek 10) i pro LLT1 (viz Obrázek 15).

Gelová permeační chromatografie rozdělila purifikovaný protein na frakce 8-12 pro NKR-P1 a 9-13 pro LLT1. Přítomnost pouze jednoho jasně definovaného píku v chromatogramu pro NKR-P1 (viz Obrázek 11) a pro LLT1 (viz Obrázek 16) je dalším ukazatelem efektivní purifikace. Na základě těchto chromatogramů lze usuzovat, že v buněčném médiu nedošlo ke tvorbě agregátu proteinu NKR-P1 ani jeho ligandu LLT1.

Produkcí a následnou purifikací bylo získáno dostatečné množství receptoru NKR-P1 (8,0 mg) a jeho ligandu LLT1 (13,7 mg) pro další výzkum.

Pro charakterizaci připravených proteinů byla provedena LDS elektroforéza NKR-P1 v redukujícím a neredukujícím prostředí a LDS elektroforéza LLT1 pouze v neredukujícím prostředí.

#### *LDS elektroforéza – NKR-P1*

Srovnáním pozic pruhů na LDS gelu NKR-P1 v neredukujícím a redukujícím prostředí nepozorujeme patrné posuny pozic pruhů (viz Obrázek 12 a Obrázek 13). Z tohoto lze usuzovat, že byla připravena monomerní forma extracelulární domény NKR-P1. V redukujícím i neredukujícím prostředí pozorujeme ve všech dráhách dva pruhy, které se významně odchyľují od předpokládané velikosti proteinu. Tato odchylka je pravděpodobně způsobená glykosylací proteinu. Z aminokyselinové sekvence byla predikována tři N-glykosylační místa (viz Obrázek 9). V programu NetOGlyc 4.0 byla navíc predikována i dvě O-glykosylační místa. Glykosylaci lze ověřit působením specifických glykosylas na protein a následnou SDS elektroforézou nebo užitím hmotnostní spektrometrie.

Analýza LDS elektroforézou potvrdila vyšší zastoupení glykosylovaného NKR-P1 v prvních frakcích (odpovídá intenzivnějšímu pruhu v LDS gelu), což je důkazem efektivního provedení gelové permeační chromatografie.

#### *LDS elektroforéza – LLT1*

Z LDS gelu je patrné, že velikost připraveného proteinu se liší od vypočítané velikosti (viz Obrázek 17). Zvýšená molekulová hmotnost proteinu je opět způsobena jeho posttranslačními modifikacemi, resp. glykosylací. V savčích buňkách, jako jsou HEK293T, často dochází k N-glykosylaci a většinou vznikají komplexní nebo hybridní N-glykany. Jeden N-glykan komplexního typu může zvýšit hmotnost proteinu až o 3-5 kDa<sup>38</sup>. V aminokyselinové sekvenci extracelulární domény proteinu LLT1 existují dvě N-glykosylační místa (viz Obrázek 14). Kromě N-glykosylace je možná i O-glykosylace proteinu. Tudíž na LDS gelu pravděpodobně pozorujeme dvakrát N-glykosylovaný protein (pruh o přibližné velikosti 25 kDa), jednou N-glykosylovaný protein (pruh o přibližné velikosti 20 kDa) a protein bez glykosylace (pruh o přibližné velikosti 16 kDa). Pruh okolo 20 kDa je dvojitý, to by mohlo naznačovat přítomnost i O-glykosylace předpovězené z aminokyselinové sekvence pomocí programu NetOGlyc 4.0. Pro potvrzení této teorie by však bylo nutné provést další experimenty.

Analýza LDS elektroforézou potvrdila vyšší zastoupení glykosylovaného LLT1 v prvních frakcích, což je rovněž důkazem efektivního provedení gelové permeační chromatografie.

#### *Význam produkce NKR-PI a LLT1*

Produkované proteiny budou použity v projektu podporovaném Grantovou agenturou České republiky. V rámci projektu budou proteiny použity pro tvorbu nanoprotilátek výzkumnou skupinou prof. Aria de Marca (Univerzita Nova Gorica, Slovinsko). Následně použitím fluorescenčně značených nanoprotilátek bude výzkumnou skupinou Dr. Maria Brameshubera na Technické univerzitě ve Vídni provedena mikroskopie s vysokým rozlišením založená na lokalizaci jedné molekuly. Cílem projektu je detailněji popsat způsob interakce NK buněčných receptorů a ligandů.

## 8 Závěr

V rámci této bakalářské práce bylo získáno 662  $\mu\text{g}$  plazmidu pUT7\_H4 a 1,33 mg plazmidu pTT28\_L2. Expresí plazmidové DNA v transfekovaných buněčných liniích HEK293T byly vyrobeny rozpustné formy extracelulární domény NKR-P1 a LLT1. Purifikací bylo získáno 8,01 mg NKR-P1 a 13,66 mg LLT1.

## 9 Literatura

- (1) Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S. Functions of Natural Killer Cells. *Nat. Immunol.* **2008**, *9* (5), 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>.
- (2) Vivier, E.; Nunès, J. A.; Vély, F. Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science* **2004**, *306* (5701), 1517–1519. <https://doi.org/10.1126/science.1103478>.
- (3) Pegram, H. J.; Andrews, D. M.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K.; Kershaw, M. H. Activating and Inhibitory Receptors of Natural Killer Cells. *Immunol. Cell Biol.* **2011**, *89* (2), 216–224. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.78>.
- (4) Kumar, S. Natural Killer Cell Cytotoxicity and Its Regulation by Inhibitory Receptors. *Immunology* **2018**, *154* (3), 383–393. <https://doi.org/10.1111/imm.12921>.
- (5) Latour, S.; Veillette, A. Proximal Protein Tyrosine Kinases in Immunoreceptor Signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, *13* (3), 299–306. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00219-3).
- (6) Singh, J.; Shah, R.; Singh, D. Targeting Mast Cells: Uncovering Proliferative Therapeutic Role in Myriad Diseases. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *40*, 362–384. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.09.019>.
- (7) Binstadt, B. A.; Brumbaugh, K. M.; Dick, C. J.; Scharenberg, A. M.; Williams, B. L.; Colonna, M.; Lanier, L. L.; Kinet, J.-P.; Abraham, R. T.; Leibson, P. J. Sequential Involvement of Lck and SHP-1 with MHC-Recognizing Receptors on NK Cells Inhibits FcR-Initiated Tyrosine Kinase Activation. *Immunity* **1996**, *5* (6), 629–638. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80276-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80276-9).
- (8) Long, E. O. Negative Signaling by Inhibitory Receptors: The NK Cell Paradigm. *Immunol. Rev.* **2008**, *224* (1), 70–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00660.x>.
- (9) Rosen, D. B.; Bettadapura, J.; Alsharifi, M.; Mathew, P. A.; Warren, H. S.; Lanier, L. L. Cutting Edge: Lectin-Like Transcript-1 Is a Ligand for the Inhibitory Human NKR-P1A Receptor. *J. Immunol.* **2005**, *175* (12), 7796–7799. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7796>.
- (10) Rozbeský, D.; Ivanova, L.; Hernychová, L.; Grobárová, V.; Novák, P.; Černý, J. Nkrp1 Family, from Lectins to Protein Interacting Molecules. *Molecules* **2015**, *20* (2), 3463–3478. <https://doi.org/10.3390/molecules20023463>.
- (11) Campbell, K. S.; Purdy, A. K. Structure/Function of Human Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors: Lessons from Polymorphisms, Evolution, Crystal Structures and Mutations: Structure/Function of Human KIR. *Immunology* **2011**, *132* (3), 315–325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x>.
- (12) Vilches, C.; Parham, P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20* (1), 217–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942>.
- (13) Yen, J.-H.; Moore, B. E.; Nakajima, T.; Scholl, D.; Schaid, D. J.; Weyand, C. M.; Goronzy, J. J. Major Histocompatibility Complex Class I-Recognizing Receptors Are Disease Risk Genes in Rheumatoid Arthritis. *J. Exp. Med.* **2001**, *193* (10), 1159–1168. <https://doi.org/10.1084/jem.193.10.1159>.
- (14) Bartel, Y.; Bauer, B.; Steinle, A. Modulation of NK Cell Function by Genetically Coupled C-Type Lectin-Like Receptor/Ligand Pairs Encoded in the Human Natural Killer Gene Complex. *Front. Immunol.* **2013**, *4*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00362>.
- (15) Rozbeský, D.; Adámek, D.; Pospíšilová, E.; Novák, P.; Chmelík, J. Solution Structure of the Lymphocyte Receptor Nkrp1a Reveals a Distinct Conformation of the Long Loop Region as



- Compared to in the Crystal Structure: Solution Structure of the Receptor Nkrp1a. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2016**, *84* (9), 1304–1311. <https://doi.org/10.1002/prot.25078>.
- (16) Bláha, J.; Skálová, T.; Kalousková, B.; Skořepa, O.; Cmunt, D.; Grobárová, V.; Pazický, S.; Poláchová, E.; Abreu, C.; Stránský, J.; Koval', T.; Dušková, J.; Zhao, Y.; Harlos, K.; Hašek, J.; Dohnálek, J.; Vaněk, O. Structure of the Human NK Cell NKR-P1:LLT1 Receptor:Ligand Complex Reveals Clustering in the Immune Synapse. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 5022. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32577-6>.
- (17) Sanchez-Canteli, M.; Hermida-Prado, F.; Sordo-Bahamonde, C.; Montoro-Jiménez, I.; Pozo-Agundo, E.; Allonca, E.; Vallina-Álvarez, A.; Álvarez-Marcos, C.; Gonzalez, S.; García-Pedrero, J. M.; Rodrigo, J. P. Lectin-Like Transcript 1 (LLT1) Checkpoint: A Novel Independent Prognostic Factor in HPV-Negative Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicines* **2020**, *8* (12), 535. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120535>.
- (18) Skálová, T.; Bláha, J.; Harlos, K.; Dušková, J.; Koval', T.; Stránský, J.; Hašek, J.; Vaněk, O.; Dohnálek, J. Four Crystal Structures of Human LLT1, a Ligand of Human NKR-P1, in Varied Glycosylation and Oligomerization States. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71* (3), 578–591. <https://doi.org/10.1107/S1399004714027928>.
- (19) Kita, S.; Matsubara, H.; Kasai, Y.; Tamaoki, T.; Okabe, Y.; Fukuhara, H.; Kamishikiryo, J.; Krayukhina, E.; Uchiyama, S.; Ose, T.; Kuroki, K.; Maenaka, K. Crystal Structure of Extracellular Domain of Human Lectin-like Transcript 1 (LLT1), the Ligand for Natural Killer receptor-P1A. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45* (6), 1605–1613. <https://doi.org/10.1002/eji.201545509>.
- (20) Bláha, J.; Páchl, P.; Novák, P.; Vaněk, O. Expression and Purification of Soluble and Stable Ectodomain of Natural Killer Cell Receptor LLT1 through High-Density Transfection of Suspension Adapted HEK293S GnTI- Cells. *Protein Expr. Purif.* **2015**, *109*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.01.006>.
- (21) Kirkham, C. L.; Carlyle, J. R. Complexity and Diversity of the NKR-P1:Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems. *Front. Immunol.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00214>.
- (22) Białoszewska, A.; Malejczyk, J. Biological and Clinical Significance of Human NKR1A/LLT1 Receptor/Ligand Interactions. *Crit. Rev. Immunol.* **2018**, *38* (6), 479–489. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2019029559>.
- (23) Braud, V. M.; Meghraoui-Kheddar, A.; Elaldi, R.; Petti, L.; Germain, C.; Anjuère, F. LLT1-CD161 Interaction in Cancer: Promises and Challenges. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 847576. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.847576>.
- (24) Mathew, S. O.; Chaudhary, P.; Powers, S. B.; Vishwanatha, J. K.; Mathew, P. A. Overexpression of LLT1 (OCIL, CLEC2D) on Prostate Cancer Cells Inhibits NK Cell-Mediated Killing through LLT1-NKRP1A (CD161) Interaction. *Oncotarget* **2016**, *7* (42), 68650–68661. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11896>.
- (25) Alvarez Calderon, F.; Kang, B. H.; Kyrasyuk, O.; Zheng, S.; Wang, H.; Mathewson, N. D.; Luoma, A. M.; Ning, X.; Pyrdol, J.; Cao, X.; Suvà, M. L.; Yuan, G.-C.; Wittrup, K. D.; Wucherpfennig, K. W. Targeting of the CD161 Inhibitory Receptor Enhances T-Cell-Mediated Immunity against Hematological Malignancies. *Blood* **2024**, *143* (12), 1124–1138. <https://doi.org/10.1182/blood.2023022882>.
- (26) Angelini, A.; Chen, T. F.; De Picciotto, S.; Yang, N. J.; Tzeng, A.; Santos, M. S.; Van Deventer, J. A.; Traxlmayr, M. W.; Wittrup, K. D. Protein Engineering and Selection Using Yeast Surface Display. In *Yeast Surface Display*; Liu, B., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1319, pp 3–36. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2748-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2748-7_1).

- (27) Hammerling, M. J.; Fritz, B. R.; Yoesep, D. J.; Kim, D. S.; Carlson, E. D.; Jewett, M. C. In *In Vitro Ribosome Synthesis and Evolution through Ribosome Display*. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1108. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14705-2>.
- (28) Yan, X.; Xu, Z. Ribosome-Display Technology: Applications for Directed Evolution of Functional Proteins. *Drug Discov. Today* **2006**, *11* (19–20), 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.08.012>.
- (29) Plückthun, A. Ribosome Display: A Perspective. In *Ribosome Display and Related Technologies*; Douthwaite, J. A., Jackson, R. H., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2012; Vol. 805, pp 3–28. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-379-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-379-0_1).
- (30) Yanagida, H.; Matsuura, T.; Yomo, T. Ribosome Display for Rapid Protein Evolution by Consecutive Rounds of Mutation and Selection. In *In Vitro Mutagenesis Protocols*; Braman, J., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 634, pp 257–267. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-652-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-652-8_19).
- (31) Mattheakis, L. C.; Bhatt, R. R.; Dower, W. J. An in Vitro Polysome Display System for Identifying Ligands from Very Large Peptide Libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91* (19), 9022–9026. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.9022>.
- (32) Rahumatullah, A.; Abdul Karim, I.; Noordin, R.; Lim, T. Antibody-Based Protective Immunity against Helminth Infections: Antibody Phage Display Derived Antibodies against BmR1 Antigen. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (11), 2376. <https://doi.org/10.3390/ijms18112376>.
- (33) Li, C.; Li, J.; Xu, Y.; Zhan, Y.; Li, Y.; Song, T.; Zheng, J.; Yang, H. Application of Phage-Displayed Peptides in Tumor Imaging Diagnosis and Targeting Therapy. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2021**, *27* (1), 587–595. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10108-5>.
- (34) Song, B. P. C.; Ch'ng, A. C. W.; Lim, T. S. Review of Phage Display: A Jack-of-All-Trades and Master of Most Biomolecule Display. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *256*, 128455. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128455>.
- (35) Gera, N.; Hussain, M.; Rao, B. M. Protein Selection Using Yeast Surface Display. *Methods* **2013**, *60* (1), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.03.014>.
- (36) Bláha, J.; Kalousková, B.; Skořepa, O.; Pažický, S.; Novák, P.; Vaněk, O. High-Level Expression and Purification of Soluble Form of Human Natural Killer Cell Receptor NKR-P1 in HEK293S GnTI- Cells. *Protein Expr. Purif.* **2017**, *140*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.07.016>.
- (37) Neville, J. J.; Orlando, J.; Mann, K.; McCloskey, B.; Antoniou, M. N. Ubiquitous Chromatin-Opening Elements (UCOEs): Applications in Biomanufacturing and Gene Therapy. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35* (5), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.004>.
- (38) Silva, F. D.; Oliveira, J. E.; Freire, R. P.; Suzuki, M. F.; Soares, C. R.; Bartolini, P. Expression of Glycosylated Human Prolactin in HEK293 Cells and Related N-Glycan Composition Analysis. *AMB Express* **2019**, *9* (1), 135. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0856-8>.