

**UNIVERZITA KARLOVA
V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Příprava rekombinantních extracelulárních domén
lidských leukocytárních receptorů LLT1 a NKR-P1A**

**Expression of the recombinant extracellular parts
of human leukocyte receptors LLT1 and NKR-P1A**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Novák, PhD.

Konzultant: Mgr. Daniel Rozbeský

Praha 2012

Bc. František Vostárek

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Petra Nováka, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 11. 5. 2012

.....
Bc. František Vostárek

Abstrakt:

NK buňky jsou charakterizovány jako velké granulární lymfocyty, které patří mezi významné buněčné složky přirozené imunity. Dokáží zabít cílové buňky velmi rychle, v řádech minut, což je řadí do role obránců první linie. Své cíle rozpoznávají pomocí svých povrchových receptorů. Tato práce se zabývá přípravou extracelulárních domén lidských leukocytárních receptorů hNKR-P1A a jeho fyziologického ligandu LLT1. Proteiny byly produkovány v *E. coli* ve formě inkluzních tělísek a renaturovány *in vitro* metodou rychlého naředění (hNKR-P1A) a metodou pomalého naředění (LLT1). Purifikace probíhala pomocí chromatografických metod a získané proteiny byly charakterizovány technikami hmotnostní spektrometrie.

Abstract:

NK cells are characterized as large granular lymphocytes that play important role in innate immunity. They are called as „first line defense“, because of their capability to kill the target cells very fast, in a few minutes. They recognize the target cells using their surface receptors. This diploma thesis describes the preparation of extracellular domains of the human leukocyte receptor hNKR-P1A and its physiological ligand LLT1. The proteins were produced in *E. coli* as inclusion bodies, refolded *in vitro* by rapid dilution method (hNKR-P1A) and slow dilution method (LLT1). The proteins were purified by chromatography and characterized by mass spectrometry techniques. (In Czech)

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto velice poděkoval RNDr. Petru Novákovi, PhD. za skvělé odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále Mgr. Danielu Rozbeskému za praktické rady, věnovaný čas, pomoc a velkou trpělivost při nekonečných experimentech a nezdařených pokusech. V neposlední řadě patří velké díky Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracování velké části této práce v jeho laboratoři a jeho věcné rady.

Velmi rád bych poděkoval všem členům Laboratoře přirozené buněčné imunity MBÚ AV ČR za ochotu kdykoliv pomoci a to především RNDr. Danielu Kavanovi, PhD., RNDr. Hynku Mrázkovi, PhD., Mgr. Ljubině Ivanově, Mgr. Zdeňku Kukačkovi a též Bc. Martinu Čonkovi. Také velmi děkuji všem členům Laboratoře charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR, kteří mi pomáhali s experimenty, jež se týkaly hmotnostní spektrometrie, a s interpretací naměřených spekter.

Děkuji také svým rodičům za podporu, kterou mi poskytovali po dobu mého studia a bez nichž by tato práce pravděpodobně nevznikla.

OBSAH

OBSAH	5
SEZNAM ZKRATEK	8
PŘEDMLUVA	11
1. PŘEHLED LITERATURY	12
1.1 Imunitní systém	12
1.2 NK buňky	12
1.2.1 Charakterizace a vývoj NK buněk	12
1.2.2 Funkce NK buněk	15
1.2.3 Rozpoznávání cílových buněk	16
1.3 Receptory NK buněk	18
1.3.1 Signalizace NK receptorů	19
1.3.2 Receptory imunoglobulinové rodiny	21
1.3.2.1 KIR	22
1.3.3 Receptory C-lektinového typu	24
1.3.3.1 Rodina receptorů NKR-P1	25
1.3.3.2 Lidský receptor NKR-P1A	28
1.3.3.3 Rodina receptorů CLEC2	30
1.3.3.4 Lidský receptor LLT1	32
2. CÍLE PRÁCE	35
3. MATERIÁL	36
3.1 Přístroje a pomůcky	36
3.2 Chemikálie	38
3.3 Enzymy	40
3.4 Inhibitory proteas	40
3.5 Vektory	40
3.6 Bakteriální kmeny	41
3.7 Primery pro PCR	41
3.7 Roztoky a pufry	41
4. METODY	44
4.1 Příprava expresních plazmidů	44
4.1.1 Polymerasová řetězová reakce – PCR	44

4.1.2 Elektroforéza DNA v agarosovém gelu.....	45
4.1.3 Extrakce DNA z agarosového gelu	46
4.1.4 Restrikční štěpení	46
4.1.5 Ligace DNA.....	46
4.1.5.1 Ligace DNA v kombinaci s restrikčním štěpením	47
4.1.6 Transformace kompetentních buněk tepelným šokem	47
4.1.7 Modro-bílá selekce (Blue-white screening)	47
4.1.8 Minipreparativní izolace plazmidové DNA pomocí soupravy.....	48
4.1.9 Velkoobjemová izolace plazmidové DNA	48
4.1.10 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	49
4.1.11 Automatické sekvenování DNA.....	49
4.2 Produkce a izolace proteinů.....	49
4.2.1 Produkce rekombinantních proteinů v <i>E. coli</i>	49
4.2.2 Selektce produkčního klonu	50
4.2.3 Velkoobjemová produkce proteinu	51
4.2.4 Izolace inkluzních tělísek	51
4.2.5 Solubilizace inkluzních tělísek	52
4.3 Renaturace proteinů	52
4.3.1 Renaturace metodou rychlého naředění	52
4.3.2 Renaturace metodou pomalého naředění.....	52
4.3.3 Dialýza.....	53
4.3.4 Ultrafiltrace.....	53
4.3.5 Centrifugační koncentrátoři	53
4.4 Purifikace proteinů.....	54
4.4.1 Ionexová chromatografie.....	54
4.4.2 Gelová filtrace	54
4.5 Analýza proteinových vzorků.....	54
4.5.1 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	54
4.5.2 Srážení proteinů acetonem.....	55
4.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	55
4.5.4 Barvení proteinů	56
4.5.5 Štěpení proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	56
4.5.6 Izolace peptidů.....	57

4.5.7 Příprava vzorků pro určení lokalizace disulfidových vazeb.....	57
4.5.8 Odsolování peptidů.....	58
4.5.9 Odsolování proteinů	58
4.5.10 Příprava vzorku na MALDI.....	58
4.5.11 Příprava vzorků na LC/MS.....	59
4.6 Hmotnostní spektrometrie	59
5. VÝSLEDKY	60
5.1 Úvod k výsledkům	60
5.2 Příprava expresních plazmidů.....	61
5.2.1 Příprava expresního plazmidu LLT1 Q65	61
5.2.2 Příprava expresního vektoru LLT1 L71 (H176C).....	65
5.3 Příprava proteinu LLT1 L71 (H176C)	70
5.3.1 Produkce proteinu.....	70
5.3.2 Renaturace a purifikace proteinu	71
5.3.3 Charakterizace připraveného proteinu.....	73
5.4 Příprava proteinu hNKR-P1A Q80.....	75
5.4.1 Produkce proteinu.....	75
5.4.2 Optimalizace renaturace proteinu	76
6. DISKUZE	84
7. ZÁVĚR	90
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91

SEZNAM ZKRATEK

<i>AcN</i>	acetonitril
<i>ADCC</i>	cytotoxická reakce založená na protilátkách (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)
<i>AICL</i>	aktivací indukovaný lektin C-typu (Activation-Induced C-type Lectin)
<i>BSA</i>	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
<i>CCA</i>	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
<i>CD</i>	diferenční antigen (Cluster of Differentiation)
<i>CRD</i>	sacharid rozpoznávající doména (Carbohydrate-Recognition Domain)
<i>CLR</i>	protein příbuzný s lektinem C-typu (C-Lectin Related protein)
<i>CLEC</i>	receptor C-lektinového typu (C-type Lectin receptor)
<i>CTL</i>	cytotoxický T lymfocyt (Cytotoxic T-Lymphocyte)
<i>CTLD</i>	doména podobná lektinům C-typu (C-Type Lectin-like Domain)
<i>CTLR</i>	receptor podobný lektinům C-typu (C-Type Lectin-like Receptor)
<i>ddH₂O</i>	destilovaná a deionizovaná voda
<i>DC</i>	dendritická buňka (Dendritic Cell)
<i>DMSO</i>	dimethylsulfoxid
<i>DTT</i>	dithiothreitol
<i>EDTA</i>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<i>ESI</i>	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
<i>FT-ICR</i>	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
<i>GM-CSF</i>	faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor)
<i>GVHD</i>	reakce štěpu proti hostiteli (Graft Versus Host Disease)
<i>HAc</i>	kyselina octová
<i>HLA</i>	hlavní lidský (histokompatibilní) antigen (Human Leukocyte Antigen)
<i>HPLC</i>	vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
<i>IFN</i>	interferon
<i>IL</i>	interleukin
<i>IPTG</i>	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

ITAM	imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu (Immunoreceptor T yrosin-based A ctivation M otif)
ITIM	imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu (Immunoreceptor T yrosin-based I nhibition M otif)
KIR	zabíječský receptor imunoglobulinového typu (K iller cell I mmunoglobulin-like R eceptors)
KLR	receptor zabíječských buněk podobný lektinům (K iller C ell L ectin-like R eceptor)
LAK	buňky-zabíječi aktivované lymfokinem (L ymphokine A ctivated K illers)
LB medium	Luria-Bertani medium
LLT	transkript podobný lektinům (L ectin- L ike T ranscript)
LRC	genový komplex leukocytárních receptorů (L eukocyte R eceptor C omplex)
LC/MS	hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií (L iquid C hromatography/ M ass S pectrometry)
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (M atrix A ssisted L aser D esorption I onization)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (M ajor H istocompatibility C omplex)
MS	hmotnostní spektrometrie (M ass S pectrometry)
NKC	genový komplex přirozených zabíječů (N atural K iller C omplex)
NKD	doména přirozených zabíječů (N atural K iller D omain)
OCIL	inhibiční lektin osteoklastů (O steoclast I nhibitory L ectin)
OD	optická denzita (O ptical D ensity)
pI	izoelektrický bod
PLGC	poly(L-laktid-co-glykolid-co-ε-kaprolakton)
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
SDS	dodecylsírnan sodný (S odium D odecyl S ulfate)
SDS-PAGE	elektorforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TCEP	tris-(2-karboxyethyl)fosfin
TCR	receptor T lymfocytů pro antigen (T - C ell R eceptor)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TGF	transformující růstový faktor (T ransforming G rowth F actor)
T_H	pomocný T lymfocyt (H elper T C ell)

<i>TLR</i>	receptory rodiny Toll (T oll- L ike R eceptors)
<i>TNF</i>	faktor nekrotizující nádory (T umor N ecrosis F actor)
<i>TOF</i>	doba letu (T ime O f F light)
<i>Tris</i>	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>X-Gal</i>	bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid

PŘEDMLUVA

Laboratoř přirozené buněčné imunity, ve které jsem vykonával svou diplomovou práci, se zabývá expresí a studiem NK buněčných receptorů již řadu let. Každý takto připravený protein a jeho charakterizace přispívá jako střípek do mozaiky informací doposud získaných o NK buňkách a jejich receptorech. Byla připravena řada myších, potkaních nebo hovězích proteinů, největší význam pro následné využití v klinické praxi má však výzkum proteinů lidských. Má diplomová práce je zaměřena právě na přípravu lidských proteinů přesněji extracelulárních domén leukocytárních receptorů, které jsou exprimovány řadou buněk imunitního systému. Jedná se o lidský receptor hNKRP1A, který zastává významnou funkci u NK buněk a jeho fyziologický ligand LLT1. NK buňky a poznatky o jejich receptorech se v klinické praxi testují již řadu let s většími či menšími úspěchy. V posledních letech se však jejich využití začíná stále více rozšiřovat. Největší potenciál mají NK buňky v boji proti rakovinným buňkám a také hrají významnou roli při transplantacích. Příprava těchto proteinů by měla umožnit jejich další charakterizaci a studium vzájemné interakce, což by mohlo alespoň malou měrou přispět k lepšímu pochopení mechanismů imunitního systému, zejména NK buněčného rozpoznávání, a tím také případně pomoci v boji proti rakovinným buňkám nebo léčbě chorob způsobených nesprávnou funkcí některé ze složek imunitního systému.

1. PŘEHLED LITERATURY

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém lze charakterizovat jako soubor mechanismů zajišťujících integritu organismu rozpoznáváním škodlivého od neškodného. Na základě rozpoznání následně dochází k likvidaci cizích či vlastních, ale i pouze potenciálně škodlivých struktur. Mezi nejdůležitější úkoly imunitního systému patří obrana organismu proti vnějším i vnitřním škodlivinám a to zejména proti patogenům, nebezpečným cizorodým látkám (např. toxinům) a pozměněným buňkám vlastního těla (nádorovým buňkám), ale také autotolerance vůči vlastním tkáním. Hlavními mechanismy, na jejichž základě pracuje imunitní systém, a které dělíme do dvou skupin, jsou mechanismy adaptivní a přirozené. Přirozené mechanismy jsou evolučně starší a zajišťují je buněčné a humorální složky. Mezi buněčné složky řadíme buňky fagocytující a NK buňky. Humorální složky tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. Tyto buňky a molekuly nemají tzv. imunologickou paměť a jsou v organismu připraveny předem. Jejich účinnost je zajištěna tím, že reagují na společné strukturní nebo funkční rysy mnoha různých patogenů. Imunitní reakce se takto rozvíjí velmi rychle, řádově v minutách.

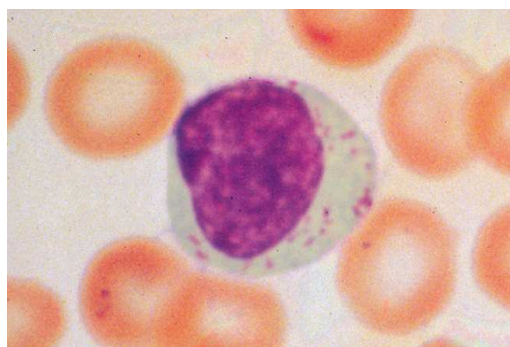
Narozdíl od přirozených mechanismů, jimiž disponují všechny mnohobuněčné organismy, jsou mechanismy adaptivní přítomny až u obratlovců. Reakce na cizorodé látky je zde zprostředkována vysoce specifickými molekulami (protilátky, antigeně specifické receptory T lymfocytů), jež se aktivují až po setkání s daným antigenem a mají tzv. imunologickou paměť. Úplný rozvoj imunitní reakce v tomto případě nastává až za několik dnů až týdnů. U obratlovců oba uvedené mechanismy vzájemně spolupracují a jsou nezbytné [1].

1.2 NK buňky

1.2.1 Charakterizace a vývoj NK buněk

Již v roce 1975 byla poprvé popsána populace lymfocytů, která se vyznačovala schopností, že bez předchozí senzitivace dokázala zabíjet buňky některých nádorových linií. Na základě své funkce získaly tyto lymfocyty označení tzv. přirození zabíječi, neboli NK buňky (angl. Natural Killers) [2].

NK buňky (obr. 1) jsou v současnosti definovány jako samostatná subpopulace lymfocytů, které jsou schopné zabít cizí, nádorové, infekcí napadené nebo jinak pozměněné buňky vlastního těla. Stručně řečeno rozeznávají zdravé buňky od nebezpečných, které likvidují téměř okamžitě, jak je rozpoznají. Účastní se také regulace krvetvorby. Svými povrchovými receptory NK buňky vyhledávají



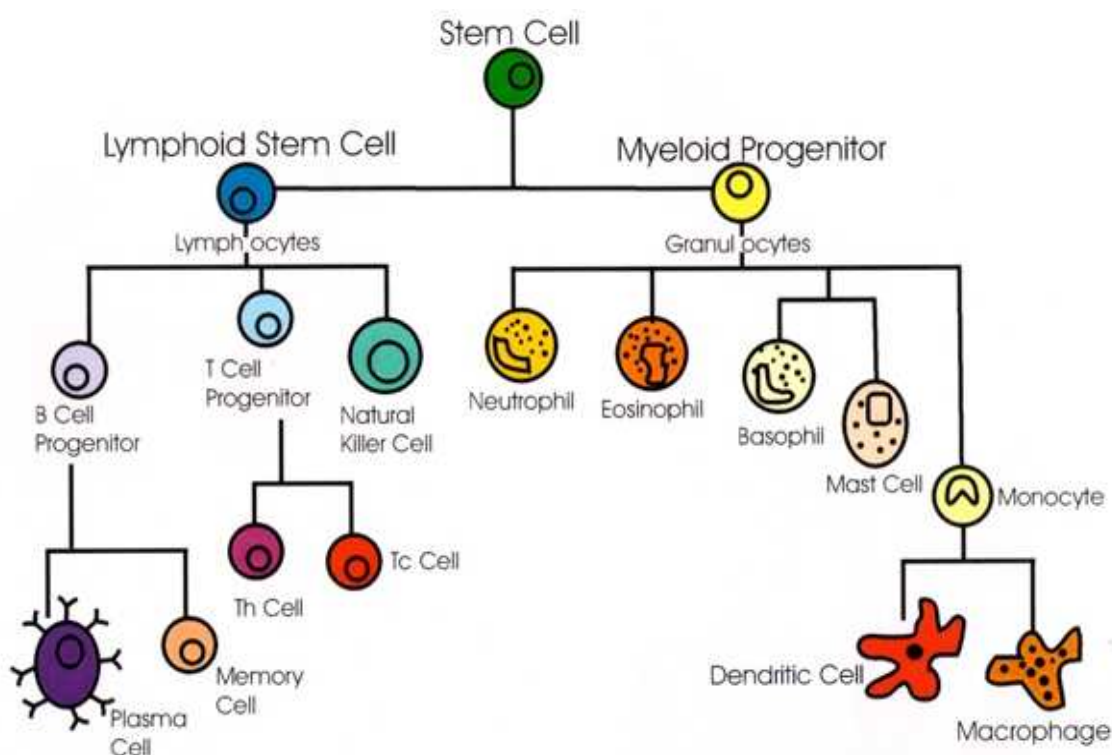
Obr. 1 Fotografie NK buňky [3].

cílové buňky se sníženou nebo žádnou expresí MHC glykoproteinů I. třídy a cytotoxickými mechanismy je likvidují [3,4,5].

NK buňky byly popsány u člověka a mnoha jiných obratlovců, ze kterých byly také izolovány. Výskyt jejich primitivnějších forem byl potvrzen i u nižších živočichů jako je hvězdice nebo dokonce žížala, kteří ještě nemají vyvinuté buňky analogické T a B lymfocytům u obratlovců. Tento fakt napovídá skutečnosti, že vznik NK buněčné aktivity pravděpodobně předcházela vývoji adaptivního imunitního systému. V periferní krvi tvoří NK buňky 10-20% všech lymfocytů, dále se hojně vyskytují také ve slezině, kostní dřeni a v játrech. Z hlediska morfologie jsou klasifikovány jako velké granulární lymfocyty. Na svém povrchu narozdíl od T a B lymfocytů nenesou antigenně specifické receptory. Poslední studie však naznačují, že určitá populace NK buněk dokonce disponuje tzv. imunologickou pamětí. Pro NK buňky je charakteristický $CD3^-CD56^+ CD16^+$ povrchový fenotyp. Tyto molekuly však nelze označit jako „marker“ NK buněk, protože je s nimi sdílí celá řada T i B lymfocytů. V současné době jsou za vysoce specifické receptory NK buněk označovány molekuly NKp30 a NKp46 [5,6,7].

Vývoj NK buněk počíná z pluripotentních buněk kostní dřeni. NK buňky se diferencují z lymfoidního progenitoru, ze kterého se vyvíjejí i další dvě hlavní subpopulace lymfocytů tedy T a B lymfocyty (obr. 2). Vývojově jsou NK buňky bližší T lymfocytům [1,8]. U myši s nevyvinutým thymem byly izolovány zralé NK buňky, které však nepocházely z běžného NK/T progenitoru, což naznačuje, že pro jejich vývoj není maturace v thymu narozdíl od T lymfocytů nezbytná [9]. Příbuznost NK buněk a T lymfocytů podtrhuje existence tzv. NKT lymfocytů, které na svém povrchu nesou jak znaky NK buněk (CD56, CD161) tak i antigenně specifické receptory (TCR), typické pro T lymfocyty [10]. NK buňky používají shodné cytotoxické mechanismy při likvidaci cílových buněk s cytotoxickými T lymfocyty (CTL). Další jejich společnou vlastností

je i produkce IFN- γ . CTL a NK buňky se v imunitním systému vzájemně doplňují. CTL se zaměřují na povrchu cílových buněk na struktury MHC I s peptidy a NK buňky rozpoznávají buňky se sníženou nebo žádnou expresí MHC I. Snížením exprese MHC I se většinou snaží maskovat některé nádorové či virem infikované buňky před CTL. Významným rozdílem mezi CTL a NK buňkami je rychlost reakce na rozpoznanou cílovou buňku. NK buňka reaguje velmi rychle, již během několika minut dochází likvidaci cílové buňky a to bez předchozí senzitivace oproti CTL. NK buňky jsou proto považovány za velmi klíčovou složku vrozené imunity [4,11,12].



Obr. 2 Vývoj buněk imunitního systému z kmenových pluripotentních buněk [8].

Lidské NK buňky se rozdělují do dvou podskupin podle typu produkovaných cytokinů na NK1 a NK2, podobně jako T_H1 a T_H2 lymfocyty [13]. Další dělení lidských NK buněk do podskupin je definováno dle úrovně exprese povrchové molekuly CD56 na $CD56^{bright}$ (vysoká exprese) a $CD56^{dim}$ (nízká exprese), jejichž fenotyp je odlišný. Buňky patřící do podskupiny $CD56^{dim}$ se vyznačují vyšší cytotoxicitou, zvýšenou expresí receptorů z imunoglobulinové rodiny a také CD16 (Fc γ receptor III) oproti podskupině $CD56^{bright}$. Buňky $CD56^{bright}$ naopak produkují vyšší množství cytokinů (IFN- γ , IL-10). Obě podskupiny v rámci přirozené imunitní odpovědi hrají odlišné role. Ačkoli jsou si lidské a myší NK buňky

velmi podobné z hlediska vývoje, u obou typů NK buněk je pro maturaci klíčové působení IL-15, a funkčnosti, zabíjením nádorových buněk a produkcí cytokinů, myší NK buňky se odlišují od lidských absencí exprese myšího homologu povrchové molekuly CD56 [14].

1.2.2 Funkce NK buněk

Mezi hlavní funkce NK buněk patří likvidace nádorových buněk, viry, bakteriemi či jinými parazity infikovaných nebo stresem pozmeněných buněk a v neposlední řadě také regulace imunitních reakcí. NK buňky jsou v některých případech označovány za určitou spojku mezi přirozenou a adaptivní imunitou. Po transplantacích je nutno počítat s jejich alloreaktivitou kvůli rejekci nového štěpu a po transplantaci hematopetických kmenových buněk hrají roli při reakci štěpu proti hostiteli tzv. GVHD [1,6,15,16]. NK buňky rovněž způsobují řadu imunopatologických reakcí a autoimunitních onemocnění [17].

Jak již bylo řečeno, NK buňky nejsou pouze „přirození zabíječi“, ale mají v organismu také významnou regulační funkci, kterou uskutečňují prostřednictvím uvolňování řady cytokinů a chemokinů do svého okolí. NK buňky na svém povrchu konstitutivně exprimují několik receptorů pro cytokiny a jsou tudíž schopny reagovat na tyto molekuly velmi pohotově. K nejdůležitějším cytokinům ovlivňujícím činnost NK buněk se řadí zejména IL-2, IL-12, IL-15 a IL-18. Samotné NK buňky produkují po předchozí stimulaci mnoho imunoregulačních faktorů jakými jsou IFN- γ , TNF- β , IL-10, IL-13, CCL3, CCL4 a GM-CSF [14,18]. Povahu a intenzitu cytokinové a cytotoxické odpovědi neurčuje pouze cytokinové mikroprostředí, ale také interakce s ostatními buňkami imunitního systému, hlavně s DC (dendritické buňky) či s makrofágy a T lymfocyty. Interakce s DC vede k aktivaci NK buněk, ke zvýšení jejich cytotoxicity a zvýšení produkce cytokinů [15,19]. Mezi nejdůležitější patří IFN- γ , jehož exprese je indukována působením IL-12. IFN- γ stimuluje vývoj T_H1 lymfocytů a je to klíčová molekula pro vrozenou i adaptivní imunitu, která výrazně ovlivňuje cytotoxicitu přirozených imunitních buněk vůči nádorovým buňkám a má významnou roli v nádorovém imunitním dozoru [18,20,21]. Navzdory velmi podobnému spektru cytokinů produkovaných CTL a T_H1 lymfocyty, nejsou NK buňky schopny exprimovat IL-2 [22]. Vysokou produkcí cytokinů je charakteristická subpopulace CD56^{bright}. U NK buněk CD56^{bright} bylo pozorováno ovlivnění produkce různých cytokinů v závislosti na působení různých kombinací cytokinů, např. kostimulace IL-12 s IL-18 vedla k nejvyšší produkci IFN- γ a IL-15 s IL-18 k nejvyšší produkci TNF- β [23]. NK buňky jsou tedy zapojeny do velmi složitých regulačních procesů a na výsledný efekt má vliv mnoho faktorů.

Řadou studií na myších i potkaních modelech *in vivo* a některých lidských buněčných liniích *in vitro* byla potvrzena schopnost NK buněk cytotoxicky zabít některé nádorové buňky [4]. Aby NK buňky byly schopny plnit své efektorové funkce, musí být tak jako makrofágy, DC a T lymfocyty, stimulovány a aktivovány. Tento jev, tzv. priming, je zprostředkován především kontaktem NK buněk s DC. Nematurované NK buňky disponují jen velmi nízkou mírou cytotoxicity a nemají osvojené všechny efektorové funkce [19]. Některé faktory ovlivňující aktivaci a cytotoxicitu NK buněk byly popsány již v předchozím odstavci. Na realizaci cytotoxické reakce má však zásadní vliv přímý kontakt a interakce s receptory cílové buňky. Zda bude NK buňka při kontaktu s jinou buňkou zabíjet či nikoli, je určeno převahou inhibičních nebo aktivačních signálů anebo jejich vzájemnou rovnováhou [24]. NK buňky využívají k zabíjení cílových buněk několik hlavních mechanismů. Jedním z nich je exocytosa cytotoxických granulí nebo mechanismus využívající tzv. receptory smrti [1,25].

Cytotoxická reakce vypadá následovně. Dojde-li po adhezi na cílovou buňku k aktivaci, tak utvoří NK buňka v místě kontaktu pevné spojení tzv. imunologickou synapsi (IS) a to zejména polymerací F-actinu. Poté dojde pomocí systému mikrotubulů k polarizaci tedy přesunu lytických granulí z cytoplasmy a následné sekreci obsahu granulí přímo do IS [26]. Cytotoxické granule (specializované lysosomy) obsahují perforin a granzymy. Perforin je protein strukturně i funkčně podobný proteinu C9 komplementového systému, který po kontaktu s cílovou membránou vytváří cirkulární homopolymerní póry o průměru do 16 nm. Tyto póry slouží především k průniku granzymů do cytoplasmy zabíjené buňky. Granzymy jsou serinové proteasy, které po vniknutí do cytoplasmy spouštějí proces vedoucí až k apoptotické smrti cílové buňky [1,27,28].

Další mechanismus využívá tzv. death receptory. NK buňky na svém povrchu exprimují ligandy těchto receptorů patřící do superrodiny TNF, jedním z nich je FasL/APO1L a dalším TRAIL/APO2L. Vazbou ligandu na death receptor dochází ke spuštění signalizačních drah končících programovanou buněčnou smrtí [29].

1.2.3 Rozpoznávání cílových buněk

Při rozpoznávání cílových buněk NK buňkami jde o souhru velkého množství faktorů. NK buňky nemají jako T a B lymfocyty určenou specifitu pouze jedním antigenně specifickým receptorem, ale disponují celou řadou aktivačních a inhibičních receptorů, což ve výsledku činí jejich rozpoznávání mnohem komplexnější. Právě převaha inhibičních

nebo aktivačních signálů rozhoduje o osudu rozpoznávané buňky. Při kontaktu NK buňky s jinou buňkou také dochází k reorientaci potřebných receptorů. Doposud bylo popsáno několik mechanismů, kterými NK buňky cílové buňky rozpoznávají.

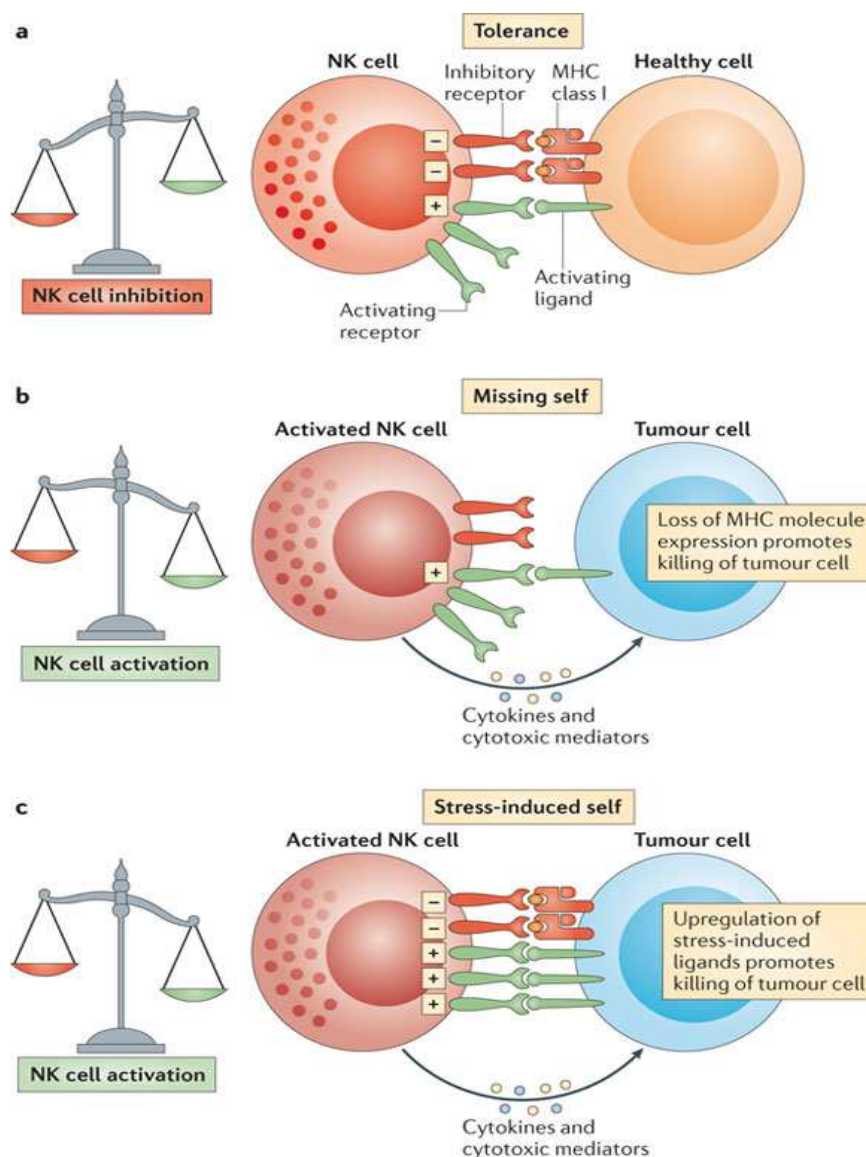
Nejdéle známým mechanismem, jež je NK buňkami používán je tzv. „missing self hypothesis” (viz. obr. 3). Je založen na snížené expresi MHC I na povrchu nádorových nebo virem infikovaných buněk, v jejich snaze ukryt se před působením CTL. Právě této skutečnosti NK buňky využívají. Pro aktivaci NK buňky však pouze snížená exprese nebo dokonce úplná absence MHC I nestačí. Aby došlo k aktivaci je nutný také kontakt ligandů s aktivačními receptory. Buňky těla vlastní exprimují také řadu ligandů inhibičních receptorů, které zprostředkovávají inhibiční signál na MHC I nezávislý. To vysvětluje skutečnost, proč NK buňky nenapadají např. buňky nervové tkáně, mající velmi nízkou expresi MHC I, anebo erytrocyty, které na svém povrchu MHC I neexprimují vůbec. Pokud NK buňka přijde do kontaktu s normální buňkou, dojde k rozpoznání MHC I a dalších ligandů specifickými inhibičními receptory, ale také dojde k vazbě ligandů s aktivačními receptory. V konečném součtu buď převáží inhibiční signály anebo dojde k rovnováze aktivačních a inhibičních signálů, což vede k inhibici cytotoxické reakce a následnému odpoutání se od rozpoznávané buňky [22,30,31].

Dalším principem je tzv. „stress-induced recognition” (obr. 3) podle něhož NK buňky eliminují zejména infikované nebo stresem pozměněné buňky vlastního těla, u kterých právě dochází ke zvýšené expresi některých povrchových molekul, jež NK buňky rozpoznávají jako ligandy pro aktivační receptory. Tyto buňky sice na svém povrchu exprimují MHC I, ale aktivační signály zde převáží nad inhibičními a dojde k cytotoxické reakci [32]. Jako příklad pro lidské buňky je možno uvést např. ligandy MICA a MICB, které rozpoznává aktivační receptor NKG2D.

Následující strategie tzv. „non-self recognition” vychází z předpokladu, že infikované buňky exprimují na svém povrchu molekuly charakteristické pro patogeny, které zdravé buňky vůbec neexprimují. Pro tento případ NK buňky ve své výbavě mají připraveny specifické aktivační receptory. Pro ilustraci jedním z těchto receptorů je u myších NK buněk Ly49H vážící ligand m157 produkovaný myším cytomegalovirem [33].

Posledním způsobem, kterým NK buňky vyhledávají a následně cytotoxicky likvidují cílové buňky je ADCC. Roli zde hrají protilátky IgG opsonizované na povrchu buněk, které NK buňky detekují pomocí povrchové molekuly CD16 tzv. Fc γ RIII receptoru. Tento receptor rozpoznává právě Fc fragment IgG. Jakmile se tak stane, dochází ke spuštění

signalizační kaskády, která spouští cytotoxickou reakci NK buňky [1,34]. U lidských NK buněk tohoto mechanismu využívá spíše podskupina CD56^{bright} [14]. Principu ADCC bylo využito při klinickém testování v boji proti rakovině, kdy byly pacientům podávány protilátky opsonizující právě rakovinné buňky [35].



Obr. 3 Rozpoznávání cílových buněk NK buňkami je založeno na několika strategiích. Při kontaktu s rozpoznávanou je výsledná reakce NK buňky určena rovnováhou mezi aktivačními a inhibičními signály [30].

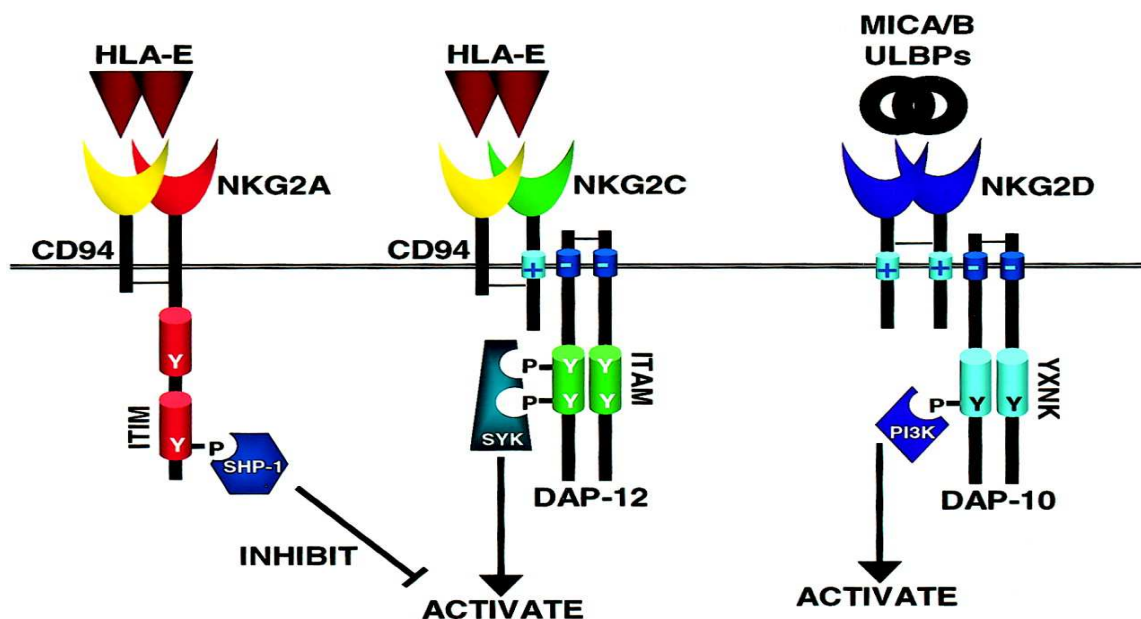
1.3 Receptory NK buněk

1.3.1 Signalizace NK receptorů

NK buněčné receptory jsou rozděleny na základě svých funkcí na aktivační a inhibiční. Dále jsou receptory NK buněk děleny do dvou velkých rodin: imunoglobulinové a C-lektinové, které budou blíže popsány v následujících kapitolách. Klíčovými prostředníky NK receptorové signalizace jsou evolučně konzervované sekvence aminokyselin, jež jsou lokalizovány zejména v cytoplasmatické části receptoru anebo také bývají součástí adaptorového proteinu, který nekovalentně interaguje s receptorem viz. obr. 4 [36,37].

Aktivační receptory slouží ke zprostředkování aktivačního signálu dovnitř do buňky, který po spuštění signalizační kaskády vyústí efektorovými funkcemi. Většinou mají velmi krátkou cytoplasmatickou doménu pro přenos signálu a proto bývají asociovány s adaptorovou molekulou, která nese jeden nebo tři tzv. ITAMy tedy „aktivační imunoreceptorové motivy tyrosinového typu“ zprostředkovávající signál dále do buňky. Pro ITAM je charakteristická konzervovaná sekvence $YxxL/Ixx(6-8)YxxL/I$, kde x značí libovolnou aminokyselinu. Adaptorové proteiny nesoucí ITAM obsahují v transmembránové části zejména zbytek kyseliny asparagové, jehož záporný náboj je potřebný kvůli interakci s kladně nabitým lysinem nebo argininem obsaženým v sekvenci asociovaného aktivačního receptoru pro tvorbu oligomerů. NK buňky exprimují tři takovéto adaptorové proteiny: DAP12, FcεRIγ a CD3ζ. Dalším z nich je DAP10, který má ovšem odlišný ITAM, jehož sekvence je $YxxM$ [38,39,40]. Navázání ligandu na aktivační receptor vede k oligomerizaci adaptorového proteinu a receptoru, což má za následek aktivaci protein-tyrosin-kinas z rodiny Src. Signál je přenášén dále do buňky prostřednictvím fosforylace tyrosinu v sekvenci ITAM adaptorové molekuly kinasami Src. Na fosfotyrosiny z ITAM se dále váží protein-tyrosin-kinasy Syk a ZAP70, které spouštějí signalizační kaskádu vedoucí až k efektorovým funkcím NK buňky [41]. Odlišnou signalizační dráhu využívá aktivační receptor NKG2D, jehož lidská forma asociuje s adaptorovým proteinem DAP10. Tato dráha se liší např. typy kinas zapojujících se do signalizační kaskády [42]

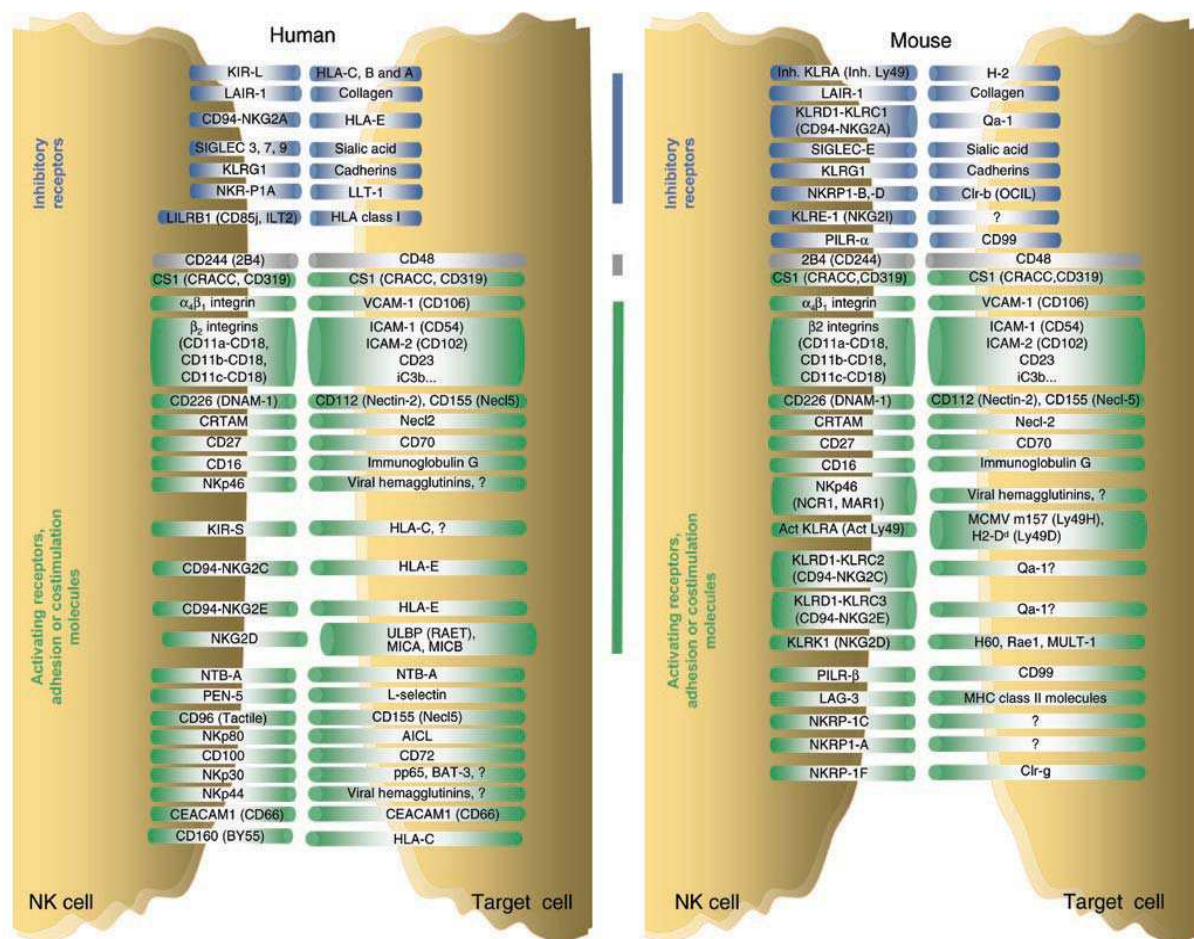
Většina doposud popsaných inhibičních receptorů je charakteristická přítomností jednoho nebo i více tzv. ITIMů tedy „inhibičních imunoreceptorových motivů tyrosinového typu“ v jejich cytoplasmatické části. ITIM je definován konzervovanou sekvencí $V/I/LxYxxL/V$, kde x je libovolná aminokyselina.



Obr. 4 Příklady aktivačních a inhibičních receptorů C-lektinového typu s rozpoznávanými ligandy. Znázorněna je interakce s adaptorovými proteiny DAP10 a DAP12, které nesou signalizační motivy, a následná signalizace [37].

Po vazbě ligandu na inhibiční receptor dochází k fosforylaci ITIMu protein-tyrosin-kinasami z rodiny Src. Fosforylace vede k navázání protein-tyrosin-fosfatů SHP-1, SHP-2 nebo fosfatasy SHIP, která defosforyluje fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát na 4,5-bisfosfát, na fosfotyrosiny ITIMu skrze jejich -SH2 domény. Tato interakce způsobuje změnu konformace fosfatů a následné rapidní zvýšení jejich aktivity, kterou je defosforylace klíčových molekul aktivačních signálních drah. Jako klíčové proteiny některých aktivačních drah je možno uvést ZAP70, FcεRIγ, Syk, Erk, PLC-γ, LAT, a Vav1. Defosforylace těchto proteinů vede k inhibici aktivačních signálních drah, což se projevuje finální inhibicí efektorových funkcí NK buněk. Ligandy inhibičních receptorů bývají hlavně molekuly MHC I, kterých existuje mnoho typů. Pro různé druhy živočichů jsou specifické různé druhy MHC I, podle čehož právě NK buňky rozpoznávají, zda je buňka tělu vlastní či nikoli. K inhibici cytotoxické reakce tedy dochází pouze, když je na povrchu rozpoznávané buňky dostatečné množství správného typu MHC I anebo jiných ligandů inhibičních receptorů [43,44].

Konečný výsledek kontaktu NK buňky s rozpoznávanou buňkou je určován právě dynamickou rovnováhou mezi aktivačními a inhibičními signály. Systém rozpoznávání pomocí NK buněčných receptorů je velmi komplexní a NK buňky k tomuto účelu exprimují na svém povrchu značně širokou paletu specifických receptorů obr. 5 [45].



Obr. 5 Porovnání většiny známých lidských a myších NK receptorů a jejich ligandů [45].

1.3.2 Receptory imunoglobulinové rodiny

U primátů jsou receptory imunoglobulinové rodiny kódovány geny nacházejícími se na lidském chromosomu 19q13.4, kde tvoří komplex genů označovaný jako tzv. LRC tedy leukocytární receptorový komplex (obr. 7 viz. str. 25). Odpovídající genový komplex byl charakterizován i u myši, kde se nachází na chromosomu 7, a dalších živočichů [46,47,48]. Pro tuto rodinu receptorů je charakteristická přítomnost jedné nebo více extracelulárních domén imunoglobulinového typu. Receptory kódované LRC jsou dále děleny do dvou různých rodin označovaných jako LILR (angl. leukocyte immunoglobulin-like receptors) a KIR (angl. killer cell immunoglobulin-like receptors). Na chromosomu 19q13.4 jsou též lokalizovány geny kódující adaptorové molekuly DAP10 a DAP12. Nejvýznamnější část receptorů imunoglobulinové rodiny představují právě KIR [46,49].

1.3.2.1 KIR

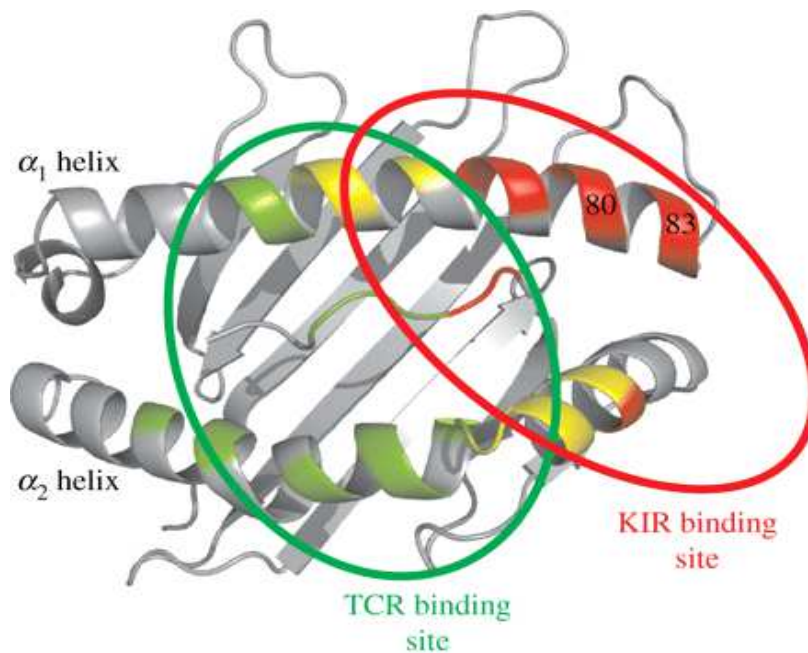
Genotyp KIR je složen ze 13 vysoce polymorfických exprimovaných genů a 2 pseudogenů. Receptory tohoto typu se vyznačují rozpoznáváním širokého repertoáru povrchových molekul MHC I, jejichž lidská forma je označována jako tzv. HLA (angl. human leukocyte antigen). HLA genový komplex je kódován na lidském chromosomu 6 a obsahuje zdaleka nejvíce polymorfismů z celého lidského genomu. Receptory KIR rozpoznávají molekuly HLA I. třídy, konkrétně izotypy HLA-A, -B a -C, které jsou mimořádně polymorfní oproti HLA-D, -E a -F [50,51].

Receptory rodiny KIR se řadí mezi transmembránové glykoproteiny I. typu (N-konec je orientován extracelulárně) a dělí se dále do dvou podrodin podle počtu extracelulárních domén imunoglobulinového typu tzv. Ig-like domén. Dvě takovéto Ig-like domény obsahuje podrodina KIR2D rozeznávající HLA-C a tři podrodina KIR3D, která rozeznává HLA-A a -B. Samotné domény jsou dále klasifikovány jako D0, D1 a D2, kde doména D0 je u KIR3D receptorů lokalizována nejbližší N-konci a poté následují domény D1 a D2. Krátký „krček“ odděluje extracelulární domény od transmembránového úseku a cytoplasmatické domény konkrétních receptorů se liší svou délkou a počtem ITIMů. Receptory s dlouhou cytoplasmatickou doménou KIR2DL a KIR3DL obsahují zpravidla jeden nebo dva ITIMy, jejichž přítomnost poukazuje na inhibiční funkci. Krátká cytoplasmatická doména aktivačních receptorů KIR2DS a KIR3DS neobsahuje ITIM vůbec. Prostřednictvím kladně nabitého lysinového zbytku uprostřed transmembránové části asociují KIR2DS a KIR3DS s adaptorovou molekulou DAP12, nesoucí ve svém cytoplasmatickém úseku ITAM, která je nezbytná pro přenos aktivačního signálu [22,52]. Vyjimku tvoří receptor KIR2DL4 disponující jak dlouhým cytoplasmatickým úsekem s jedním ITIMem, tak asociující s adaptorovou molekulou FcεRIγ nesoucí ITAM. KIR2DL4 má tedy předpoklad pro inhibiční i aktivační funkce a liší se také faktem, že rozeznává HLA-G [50,51].

Receptory KIR2DL1, KIR2DL2 a KIR2D3 rozpoznávají různé alelické formy HLA-C lišící se polymorfismy v pozicích 77 a 80 v α -1 doméně těžkého řetězce. Ligandy KIR3DL1 jsou HLA molekuly sdílející Bw4 epitop, které reprezentují okolo 50% z lidských HLA-B alel a KIR3DL2 váže HLA-A3 a HLA-A11 [52]. Pro vazebnou specifitu receptorů KIR3D s HLA-A a -B je určující aminokyselina nacházející se v pozici 83.

Dle trojrozměrné struktury je patrné, že vazebná místa KIR a $\alpha\beta$ TCR se na molekule HLA I. třídy překrývají (viz. obr. 6). Uspořádání vazebného místa určuje, že přímý kontakt

receptoru s peptidem je možný jen v pozicích 7 a 8 rozpoznávaného peptidu. Nepřímý efekt mohou také mít residua v dalších pozicích interagující s vazebnou smyčkou HLA I.



Obr. 6 Vazebná místa KIR a $\alpha\beta$ TCR na molekule HLA I. třídy. Místa přímého kontaktu jsou znázorněna pro KIR (červeně) pro KIR i $\alpha\beta$ TCR (žlutě) a pouze pro $\alpha\beta$ TCR (zeleně). Označeny jsou pozice 80 a 83 důležité pro vazebnou specifitu [50].

Překryv vazebných míst KIR a $\alpha\beta$ TCR může být způsoben individuálním selekčním tlakem vyvíjeným na HLA I. třídy NK a T buněčnou imunitou. Z toho vyplývá zajímavá skutečnost, která poukazuje na určitou „soutěživost“ mezi NK buňkami a T lymfocyty [50].

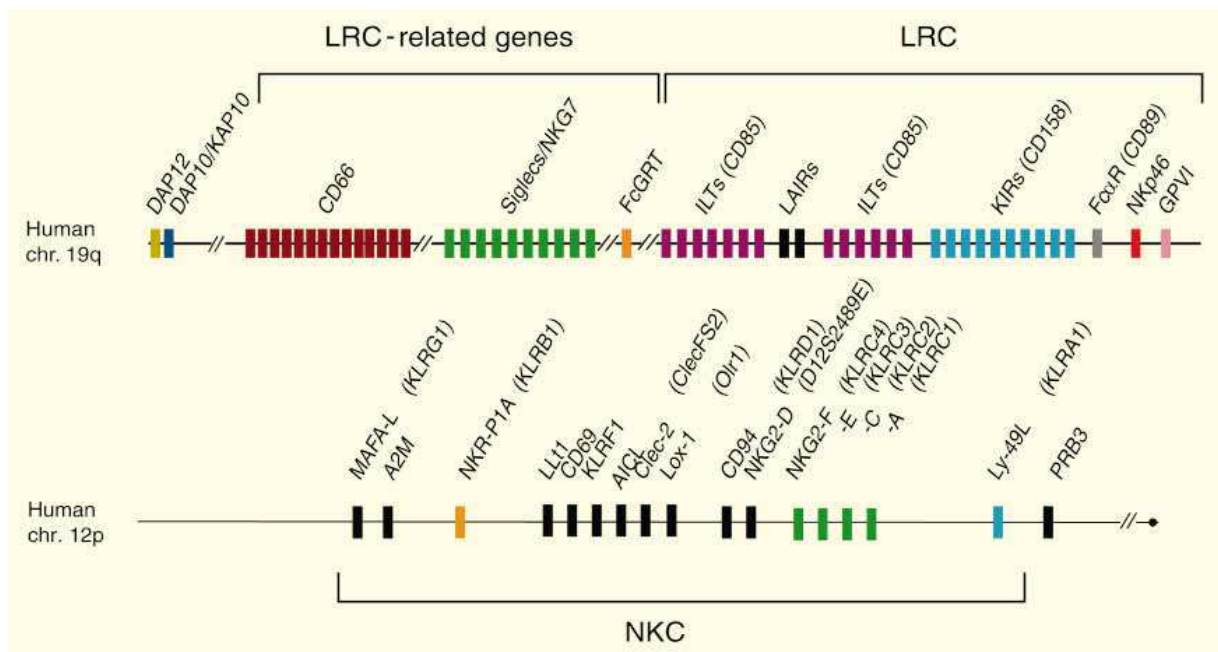
1.3.3 Receptory C-lektinového typu

Většina C-lektinů je charakterizována přítomností tzv. CRD (carbohydrate recognition domain) tedy sacharid vázající domény, která jak už název napovídá, váže sacharidový ligand. Pro C-lektiny je typická vlastnost, že pro vazebnou specifitu CRD je nutná vazba Ca^{2+} . Od této vlastnosti je odvozen také jejich název, který v plné formě zní „Calcium-type lectins”. Samotné CRD jsou rozděleny do dvou skupin podle typu preferenčně vázaných sacharidů. První skupina váže přednostně mannosu a obsahuje tzv. EPN motiv a druhá váže galaktosu a disponuje tzv. QPD motivem. C-lektiny se dále dělí na tzv. klasické a neklasické. Klasické C-lektiny obsahují ve svých CRD a vazebných místech pro Ca^{2+} konzervované sekvence aminokyselin a sdílejí konzervované motivy pro vazbu sacharidu. Oproti tomu C-lektiny neklasické nesdílejí konzervované sekvence ve svých CRD a jejich ligandy mohou být i nesacharidové povahy [53].

Ze strukturního hlediska jsou C-lektinové receptory transmembránové glykoproteiny II. typu (C-konec orientován extracelulárně) s jednou extracelulární doménou C-lektinového typu tzv. CTLD. Většina z nich se vyskytuje ve formě homo- nebo heterodimeru stabilizovaného disulfidickými můstky. Jejich struktura počíná cytoplasmatickou N-terminální doménou, pokračuje transmembránovým úsekem, dále následuje tzv. „krček“ variabilní délky, který je spojen s C-terminální CTLD. Pro CTLD je charakteristický tzv. „WIGL” motiv, složený z hydrofobních aminokyselin a dále bývají CTLD stabilizovány 6 konzervovanými cysteinovými zbytky tvořícími intramolekulární disulfidové vazby [54]. U NK buněčných receptorů C-lektinového typu je C-terminální doména pojmenovávána jako tzv. NKD (natural killer domain), která tvoří podskupinu CTLD [55].

Rodina receptorů C-lektinového typu tzv. CTLR (C-type lectin-like receptors) exprimovaných NK buňkami je kódována na lidském chromosomu 12p12.3 a na 6. chromosomu u myši. Skupina genů kódující receptory C-lektinového typu se nazývá tzv. NKC (natural killer complex) viz. obr. 7 [22]. NKC kódované geny jsou rozděleny na tzv. KLR (killer cell lectin-like receptors) geny a CLEC (C-type lectin receptor) geny. KLR geny tedy kódují CTLR na NK buňkách a CLEC geny představují ostatní geny zastoupené v NKC. Receptory C-lektinového typu kódované NKC jsou klasifikovány jako V. skupina CTLR superrodiny. Geny KLR a CLEC mohou být dále společně rozděleny do podrodin podle sekvenční podobnosti kódované CTLD. Nejdůležitějšími genovými podrodinami jsou KLRA kódující myši Ly49 receptory, KLRC

kódující receptory NKG2 (vyjma NKG2D), KLRB/F kódující NKR-P1 receptory a CLEC2 podrodina, která kóduje např. CD69, myší Clr a také lidské AICL a LLT1, jež u hlodavců chybí. Mezi nejvýznamnější rodiny receptorů kódovaných NKC tedy patří: rodina Ly49 významná hlavně u myší, jejíž receptory rozpoznávají MHC I, dále rodina NKG2, jejíž receptory jsou společně exprimovány s CD94 a tvoří s nimi disulfidicky vázané heterodimery (vyjma NKG2D - samostatný) rozpoznávající neklasické MHC I a v neposlední řadě také rodina NKR-P1 společně s receptory kódovanými CLEC2 genovou podrodinou, které se párují jako fyziologické ligandy právě s receptory NKR-P1 [54,56].



Obr. 7 Mapa chromosomálního uspořádání genů v LRC a NKC u člověka. Vzdálenosti jednotlivých genů jsou znázorněny pouze schématicky a nejsou v měřítku [46].

1.3.3.1 Rodina receptorů NKR-P1

Psal se rok 1989, když W. H. Chambers se svou pracovní skupinou identifikovali vůbec první receptor NK buněk. Učinili tak pomocí monoklonální protilátky 3.2.3 (IgG1k) připravené původně proti myším NK buňkám. Těto protilátce vystavili potkaní NK a A-LAK (adherentní lymfokiny aktivované zabíječské) buňky a zjistili, že po expozici IL-2 se rapidně zvýšila exprese této povrchové molekuly. Po navázání protilátky 3.2.3 na antigen také došlo ke zvýšení cytotoxicity a produkci enzymu souvisejícího s exocytosou cytotoxických granulí, což poukazovalo na pravděpodobnou aktivační funkci tohoto receptoru.

Analýzou imunoprecipitátů na SDS-PAGE, byl identifikován při neredukujících podmínkách protein o velikosti ~60 kDa a při redukujících ~30 kDa. Tento výsledek prokázal, že molekula se nachází ve formě dimeru [57]. Další studie tohoto receptoru popsala, že se jedná o transmembránový protein II. typu a porovnáním sekvence byla odvozena jeho příslušnost k lektinům C-typu. Receptor dostal název NKR-P1 tedy „natural killer receptor – protein 1“ [58]. A tak se zrodila rodina receptorů NKR-P1, která se mohla začít dále rozrůstat. V současnosti rodina NKR-P1 již čítá řadu členů, jejichž souhrn se zde pokusím alespoň ve stručnosti uvést.

Receptory patřící do této rodiny představují transmembránové proteiny II. typu, jež jsou řazeny do rodiny C-lektinů. Exprese těchto receptorů byla doposud popsána u NK buněk, NKT lymfocytů a T lymfocytů [59,60].

Nejvíce identifikovaných členů této rodiny představují myší homology NKR-P1 (CD161), kterých bylo do současnosti objeveno šest, a jsou jimi NKR-P1A (viz. obr. 8), B, C, D, F a G. Byl ještě objeven gen pro NKR-P1E, který se však vyskytuje jako pseudogen [61,62,63]. Pro charakterizaci a aktivaci myších NK buněk, zejména u C57BL/6 myší, byla dlouhou dobu používána monoklonální protilátka PK136 proti antigenu NK1.1. Poté se však ukázalo, že zmíněný antigen NK1.1 je kódován genem pro receptor NKR-P1C [64]. Funkci aktivační zastávají myší receptory NKR-P1A, C a F, které nesou v transmembránovém úseku pozitivně nabitý argininový zbytek důležitý pro asociaci s adaptorovým proteinem FcR γ a inhibiční roli mají receptory NKR-P1B, D a G disponující v cytoplasmatické doméně jedním ITIMem [60,65]. Jako ligandy myších receptorů NKR-P1 byly dosud identifikovány pro NKR-P1B a D molekula Clr-b, NKR-P1F preferenčně rozpoznává Clr-c, ale také molekuly Clr-g a Clr-d/x a u NKR-P1G je přednostně rozpoznávána molekula Clr-f a dále také Clr-d/x a Clr-g. Fyziologické ligandy myších NKR-P1A a C doposud popsány nebyly [66,67,68].

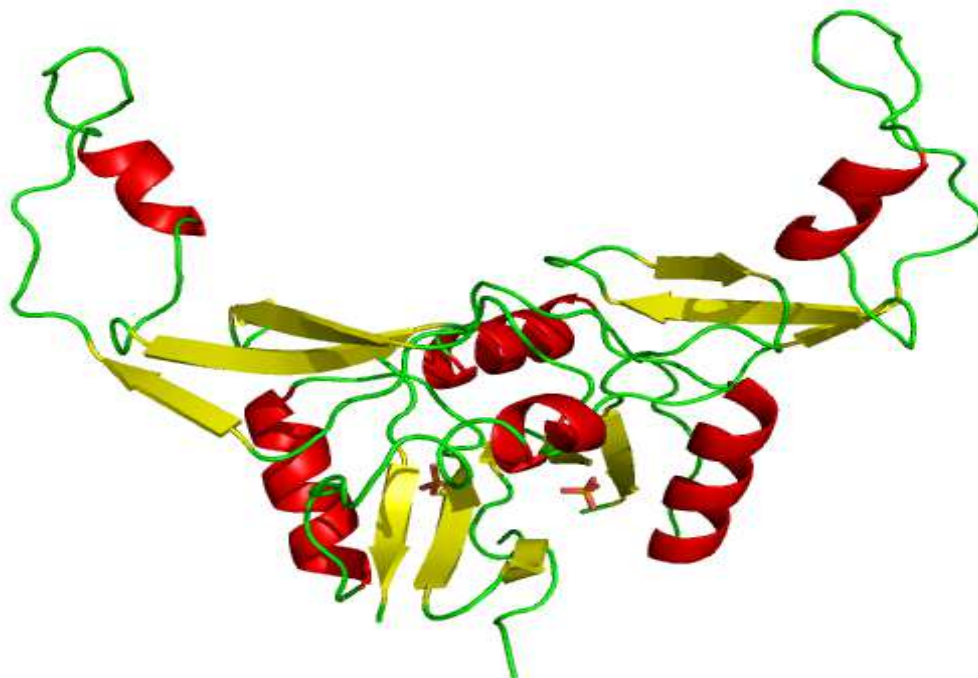
U potkana jsou nyní známy čtyři homology, a to aktivační receptory NKR-P1A, F a inhibiční NKR-P1B a G. Potkaní NKR-P1A a B u potkanů typu PVG oproti opačné funkci rozpoznávají shodný ligand, jímž byla charakterizována molekula Clr11 [68,69].

Pomocí sekvenční analýzy bylo zjištěno, že všechny myší i potkaní isoformy receptorů NKR-P1 nesou ve své cytoplasmatické doméně motiv CxCP(R/H) obsahující dva cysteinové zbytky, který je shodný i u CD4 a CD8 koreceptorů. Tento motiv slouží k asociaci s protein-tyrosin-kinasou rodiny Src a to kinasou p56^{lck}, jež se uplatňuje při signalizaci. U potkaního receptoru NKR-P1A byla přímo prokázána fyzická asociace s p56^{lck}.

Na myších NKR-P1B a C bylo mutační analýzou zjištěno, že bodová mutace C(S) v CxCP motivu vedla k rapidnímu snížení schopnosti těchto receptorů přenášet dále zprostředkovaný signál. Doposud nejlépe prozkoumaný je myší aktivační receptor NKR-P1C. Jeho zesíťení monoklonální protilátkou PK136 indukuje masivní sekreci IFN- γ . Po zesíťení dochází přesněji k signalizaci drahou počínající fosforylací tyrosinů na ITAM v adaptorové molekule FcR γ , což aktivuje protein-tyrosin-kinasy z rodiny Syk, které spínají kaskádu vedoucí až k aktivaci a cytotoxické reakci NK buňky [64].

Receptory rodiny NKR-P1 jsou NK buňkami využívány společně s jejich ligandy z rodiny CLEC2 k tzv. alternativnímu „missing self recognition“ mechanismu rozpoznávání nádorových buněk, který je založen na vzájemné interakci CTLD lektinových receptorů a principu proteinového rozpoznávání [66,67,70]. Na tomto principu funguje rozpoznávání, které je založeno např. na interakci lidského receptoru NKR-P1A a jeho ligandu LLT1 [71].

Právě na dvojici receptorů hNKR-P1A a LLT1 je zaměřena má diplomová práce. Lidskému homologu receptorů z rodiny NKR-P1 bude věnována příští samostatná kapitola a jeho ligand LLT1 bude zevrubněji popsán později.



Obr. 8 Struktura myšího receptoru NKR-P1A rozřešená na úroveň rozlišení 2,3 Å. Unikátním atributem struktury jsou chlopně lokalizované v úseku Thr71 až Ser100 [61].

1.3.3.2 Lidský receptor NKR-P1A

První podrobná studie tohoto receptoru pochází z roku 1994 od velkého průkopníka výzkumu NK buněk L. L. Laniera a jeho pracovního týmu.

Gen KLRB1 pro lidský receptor NKR-P1A (hNKR-P1A/CD161) je lokalizován na chromosomu 12 a náleží do NKC stejně jako geny ostatních členů rodiny NKR-P1. Sekvence vykázala cDNA o velikosti 738 bp s otevřeným čtecím rámcem kódujícím 225 aminokyselin dlouhý protein, s předpokládanou molekulovou hmotností 26 kDa. Jedná se o transmembránový glykoprotein II. typu patřící do rodiny C-lektinů, který se vyskytuje v podobě disulfidicky vázaného homodimeru. Část extracelulární je tvořena 158 AA. V extracelulární doméně se nachází čtyři potenciální místa N-glykosylace. V extracelulární doméně je obsaženo 7 cysteinových zbytků, z čehož 6 je lokalizováno v úseku CRD a 1 dimerizační cystein v oblasti tzv. krčku.

Exprese hNKR-P1 probíhá na 70-90% lidských NK buněk periferní krve, také na zhruba 25% maturovaných T lymfocytů ($CD4^+$ i $CD8^+$) vyskytujících se v periferní krvi a dále ho exprimují NKT lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky. Detekce hNKR-P1A se provádí pomocí monoklonální protilátky DX1. Analýza imunoprecipitátů na SDS-PAGE potvrdila, že se jedná o disulfidický homodimer. V neredukujících podmínkách byl patrný proužek o velikosti ~80 kDa a v redukujících ~40 kDa. Po deglykosylaci N-glykanasou, která odštěpuje N-glykosidicky vázané sacharidy, se snížila molekulová hmotnost proteinu detekovaná v redukujícím prostředí na SDS-PAGE na ~26 kDa a po působení neuraminidasy došlo pouze k malé změně původní elektroforetické mobility. Tyto výsledky poukázaly na pravděpodobnou přítomnost N-glykosylace a sialových kyselin. Porovnání aminokyselinové sekvence lidského NKR-P1A s myším NKR-P1D vykázalo 46% homologii. S ostatními členy rodiny C-lektinů je již podobnost nižší, homologie s lidským receptorem NKG2A je pouze 26% a s myším Ly49 a lidským CD69 ještě menší. Příslušnost hNKR-P1 k C-lektinům podtrhuje přítomnost konzervované sekvence „WIGL“ vyskytující se v CRD [54,72,73].

Po kultivaci lidských NK buněk v přítomnosti IL-12 byl pozorován rapidní nárůst exprese povrchové molekuly hNKR-P1A oproti kultivaci s IL-2 a došlo k výraznému potlačení cytolytických aktivit NK buněk zprostředkovaných receptory CD16 a p46. Tato pozorování naznačují, že by cytokinové mikroprostředí NK buňky mohlo určitým způsobem ovlivňovat funkce tohoto receptoru [73].

Lidské CD8⁺ T lymfocyty exprimující na svém povrchu hNKR-P1A tzv. NT lymfocyty se soustřeďují převážně v játrech a ve střevním epitelu oproti výskytu v periferní krvi. Byla u nich pozorována zvýšená cytotoxicita proti některým nádorovým buňkám narozdíl od hNKR-P1A⁻ T lymfocytů a také většina hNKR-P1A⁺ T lymfocytů exprimovala na svém povrchu ještě receptor CD69, což je jedna z prvních molekul exprimovaných při aktivaci T lymfocytů a NK buněk. Molekula hNKR-P1A je také označována jako „marker“ všech subpopulací T lymfocytů produkujících IL-17 [74,75,76].

Receptor hNKR-P1A je zajímavý svou schopností zastávat jak aktivační tak inhibiční role. Po vazbě monoklonální protilátky anti-CD161 na hNKR-P1A byla u NK buněk prokázána jeho inhibiční funkce vedoucí k výraznému snížení cytotoxicity a produkci IFN- γ a naopak u T lymfocytů hNKR-P1A společně s aktivovaným CD3 zesiluje sekreci IFN- γ a u NKT lymfocytů spouští proliferaci, zatímco u CD8⁺ T lymfocytů naopak inhibuje produkci TNF- α . Stejný receptor tedy spouští opačné procesy v NK buňkách a T lymfocytech, nicméně jeho role u T lymfocytů zůstává zatím stále nejasná. Fyziologickým ligandem hNKR-P1A je molekula LLT1 (lectin-like transcript 1) nebo také CLEC2D, která patří do rodiny CLEC2. Podrobněji bude tento ligand popsán v samostatné kapitole (viz 1.3.3.4) [71,77]. Nejnovější studie, publikovaná v březnu, dokonce poukazuje na aktivační funkci hNKR-P1A na NK buňkách [78].

Otázka signalizace receptoru hNKR-P1A jehož funkce jsou variabilnější než u většiny receptorů z rodiny NKR-P1 zůstávala dlouhou dobu nezodpovězena. Cytoplasmatická doména disponuje aminokyselinovou sekvencí AIY AEL, která se velmi podobá sekvenci ITIM (V/I/LxYxxL/V), avšak liší se přítomností alaninu v pozici 2- vůči tyrosinu. Tento rozdíl se zdá být nepatrný, nicméně aminokyselina v pozici 2-Tyr je dle předchozích studií pro funkci ITIMu zásadní a její mutace vede k výraznému snížení inhibičního potenciálu. Neklasický ITIM tedy vysvětluje slabý inhibiční potenciál hNKR-P1A [79]. Receptor ve své cytoplasmatické doméně oproti hlodavčím homologům také postrádá motiv CxCP, který je nutný pro asociaci s kinasou p56^{lck}, jež je nezbytná pro přenos signálu. Bylo prokázáno, že s p56^{lck} skutečně neasociuje [80]. Pomocí „yeast two-hybrid“ systému bylo identifikováno, že přenosu signálu zprostředkovaného hNKR-P1A se účastní kyselá sfingomyelinasa (aSMasa). Aktivace aSMasy vede k produkci ceramidů a následné aktivaci PKB/Akt a Rsk1/MAPKAP kinasy1 α a následné proliferaci. Receptor hNKR-P1A nese v určitém úseku cytoplasmatické domény serinové zbytky a po zesílení protilátkou je zde právě na serinu a nikoli na tyrosinu fosforylován.

Je tedy možné, že tento úsek je místem asociace s aSMasou, což však experimentálně potvrzeno nebylo [81].

Byla prokázána schopnost hNKR-P1A vázat určité sacharidové epitopy. Potvrzena byla vazba na myší laminin, který obsahuje vysoké množství N-glykosidicky vázaných oligosacharidů zakončených Gal α (1,3)Gal epitopy. Po odštěpení α Gal a následné expozici N-acetyllaktosaminu došlo ke zvýšení vazby, což poukazuje na přednostnou vazbu N-acetyllaktosaminu receptorem hNKR-P1A. Tohoto zjištění je možno využít při transplantacích, odštěpením N-acetyllaktosaminového epitopu, jako částečnou prevenci proti rejekci štěpu [82].

1.3.3.3 Rodina receptorů CLEC2

Jak zde již bylo řečeno geny kódující receptory rodiny CLEC2 (C-type lectin domain family 2) jsou lokalizovány na NKC. Patří sem lidské receptory LLT1, AICL (activation induced C-type lectin) a KACL (keratinocyte-associated C-type lectin), dále hlodavčí molekuly Clr (C-type lectin related) a také v neposlední řadě molekula CD69, která je konzervovaná u širokého spektra savců. Receptory rodiny CLEC2 jsou exprimovány jak na lymfoidních tak i myeloidních buňkách. Pro mnoho CCLR kódovaných NKC stále nebyl fyziologický ligand identifikován, avšak nedefinovaných párů receptor/ligand s postupem času stále ubývá. Mezi známé dvojice receptoru s ligandem patří u lidí hNKR-P1A a LLT1, AICL a NKp80 či KACL a NKp65. Hlodavčí receptory NKR-P1 se párují s molekulami Clr (viz. kap. 1.3.3.1) [83].

U myší kóduje členy rodiny CLEC2 nejméně 9 genů. Molekul Clr je nyní známo osm, počínaje Clr-a až po Clr-h, kde však Clr-e je pseudogen, a dále myší molekula CD69. Exprese a funkce většiny Clr molekul je dodnes prozkoumána poměrně málo, zdaleka nejvíce popsaným členem je molekula Clr-b. Protein Clr-b je exprimován na většině hematopoetických buněk a byl identifikován jako ligand pro myší receptory NKR-P1B a D. Dále byla popsána molekula Clr-g. Její transkripty byly identifikovány u DC z kostní dřeně, makrofágů, LAK a aktivovaných T lymfocytů. Byla definována jako ligand pro NKR-P1F, nejčerstvější studie však popsala, že NKR-P1F ještě lépe váže Clr-c. Transkripty Clr-f byly detekovány u IL-2 aktivovaných NK buněk a v některých tkáních. Molekula Clr-f bylo nedávno identifikována jako ligand pro myší receptor NKR-P1G. Receptory NKR-P1F a G také váží molekulu Clr-d, ale interakce je poměrně slabá [54,68].

Molekula CD69 je kódována genem CLEC2C a jak již zde bylo zmíněno, je časnou molekulou exprimovanou při aktivaci leukocytů v místě zánětu. Molekula CD69 je transmembránový glykoprotein II. typu, který tvoří 199 aminokyselin a vyskytuje se jako disulfidický homodimer s vysoce glykosylovanými podjednotkami. Exprese CD69 probíhá na většině hematopoetických buněk. Molekula CD69 po zesílení monoklonální protilátkou indukuje mobilizaci intracelulárního Ca^{2+} . Přesná role CD69 v imunitě nebyla doposud rozřešena společně s identifikací jejího fyziologického ligandu. Ačkoli předchozí studie *in vitro* naznačovaly, že CD69 je aktivační molekula u různých subpopulací leukocytů, další studie u CD69-deficientních myší podhalila nenahraditelnou roli tohoto receptoru při negativní regulaci imunitní odpovědi prostřednictvím produkce cytokinu TGF- β (transforming growth factor). Molekula CD69 má klíčový význam v patogenezi artritidy a alergického zánětu dýchacích cest při zeslabení imunitní odpovědi, což ji činí jako možné místo terapeutického zásahu [84,85,86,87].

Kromě molekuly CD69 lidské proteiny AICL, KACL a LLT1, kódované rodinou genů CLEC2, tvoří páry ligand/receptor s receptory rodiny NKR-P1. Nejčerstvějším členem rodiny CLEC2 je molekula KACL (kódovaná genem CLEC2A), jež slouží jako ligand receptoru NKp65. Transkripty KACL byly detekovány výhradně v lidské kůži oproti širokému výskytu transkriptů ostatních členů této rodiny na hematopoetických buňkách. Protein KACL specificky exprimovaný na keratinocytech se vyskytuje ve formě nedisulfidického homodimeru na rozdíl od ostatních proteinů rodiny CLEC2, které jsou homodimery disulfidickými. Prostřednictvím interakce s receptorem NKp65 stimuluje na lidských buňkách NK92MI cytotoxicitu a produkci IFN- γ . Vazba KACL na NKp65 je extrémně silná ($K_d = \sim 0,01 \mu M$) [88]. Dalším lidským proteinem, jež kóduje gen CLEC2B je AICL. Molekula AICL je fyziologickým ligandem pro receptor NKp80. Transkripty AICL jsou detekovatelné na granulocytech, monocytech a lymfocytech v periferní krvi. Přítomnost AICL byla dále prokázána na několika maligních liniích myeloidního původu, některých nehematopoetických buňkách a také na vzorcích jaterní rakovinné tkáně. Afinita AICL k NKp80 ($K_d = \sim 4 \mu M$) již není tak vysoká jako u KACL/NKp65. Interakce AICL, exprimovaného na maligních buňkách, s receptorem NKp80 stimuluje cytotoxicitu NK buněk a paměťových CD8 T lymfocytů. Na monocytech dochází ke zvýšení exprese AICL v přítomnosti lipopolysacharidů a některých prozánětlivých cytokinů. Tato interakce receptoru NKp80 s ligandem AICL také stimuluje „cross-talk“ mezi NK buňkami a monocyty a mezi paměťovými T lymfocyty a makrofágy. Význam této vazby receptor/ligand tedy

spočívá také v regulaci imunitní odpovědi v časných fázích infekce nebo chronického zánětu [54].

Posledním významným lidským receptorem rodiny CLEC2 je molekula LLT1, které bude věnována následující kapitola.

1.3.3.4 Lidský receptor LLT1

První tento receptor popsal v roce 1999 K. S. Boles se svým pracovním týmem. Učinili tak pomocí chromosomového mapování a porovnáním sekvencí. Takto předpověděli podobu lidského ortologu myších molekul Clr. Získaný insert cDNA se sestával z 850 bp s otevřeným čtecím rámcem a sekvence sestávající se ze 191 aminokyselin odpovídala transmembránovému proteinu II. typu. Intracelulární doménu mělo tvořit 30 AK, transmembránový úsek 29 AK a 132 AK extracelulární část. Byly předpovězeny dvě potenciální místa N-glykosylace [89]. Řada těchto předpokladů byla následně potvrzena.

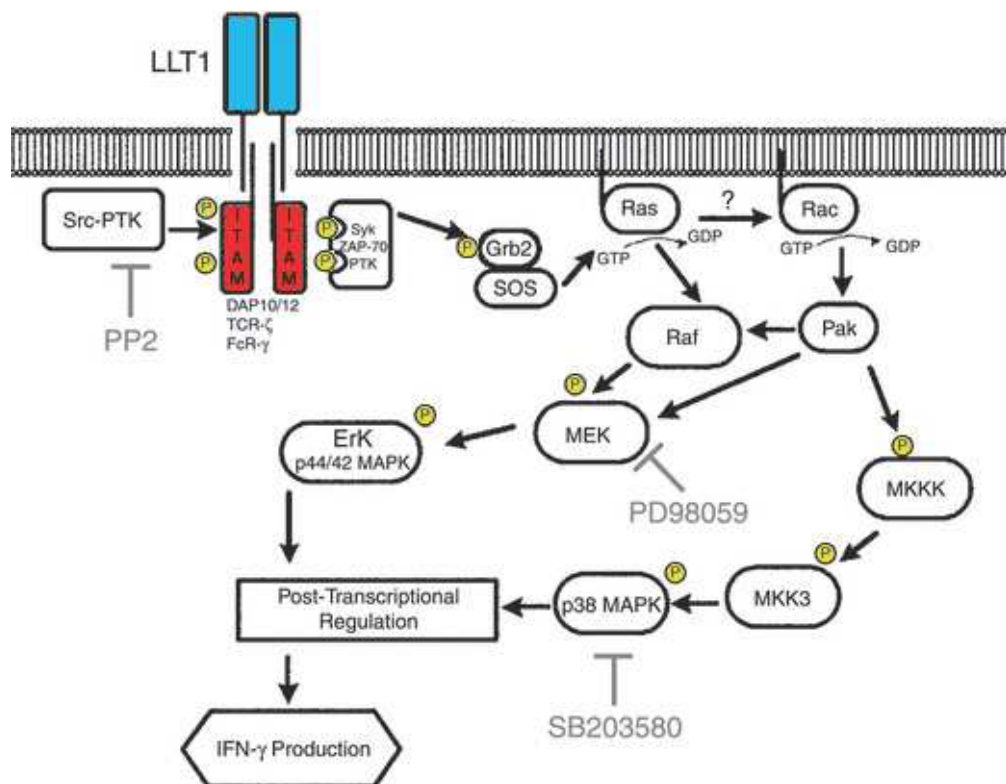
Protein LLT1 nebo také hOCIL (osteoclast inhibitory lectin) je kódován genem CLEC2D, který stejně jako sousední gen KLRB1 (kódující hNKR-P1A) leží na 12. chromosomu v NKC. Jedná se o transmembránový glykoprotein II. typu a byl popsán jako disulfidicky vázaný homodimer patřící do rodiny C-lektinů. Celou sekvenci tvoří 191 aminokyselin, z čehož extracelulární doména je tvořena 132 AK a C-lektinová doména 112 AK. Monoklonální protilátkou anti-LLT1 bylo imunoprecipitováno LLT1 a analýza na SDS-PAGE v neredukujícím prostředí vykazovala velikost proteinu ~65 kDa a v redukujícím ~35 kDa, což dokazovalo, že se jedná o disulfidický homodimer. Po štěpení neuraminidasou a PNGasou protein vykázal na redukující SDS-PAGE velikost ~25 kDa, čímž byla prokázána přítomnost glykosylace [79,90]. Míra homologie s ostatními členy rodiny CLEC2 je vcelku vysoká, s AICL (67%) s CD69 (57%) a s myšimi ortology Clr vykazuje LLT1 homologii 43-48% [91]. Právě porovnáním sekvence LLT1 s hCD69 pracovním týmem J. Kamishikiryoa byla odvozena mutace histidinu 176 za cystein, za účelem vytvoření disulfidové vazby s nepárovým cysteinem 163 a následné stabilizace C-lektinové domény [92]. Takto upravenou extracelulární doménu jsem posléze připravoval v rámci mé diplomové práce.

Protein LLT1 je exprimován zejména na B lymfocytech, DC aktivovaných ligandy TLR (toll-like receptor), NK buňkách, T lymfocytech, některých monocitech a ve zvýšené míře je exprimován aktivovanými B lymfocyty. Exprese LLT1 probíhá také na osteoblastech, chondrocytech a jiných měkkých tkáních [79,90,93,94].

Jednou z funkcí LLT1 neboli hOCIL, exprimovaného na osteoblastech (kostních buňkách), je inhibice formace a funkce osteoklastů, které odbourávají kostní tkáň. Tento protein je tedy nezbytný pro udržení nepatogenní úrovně resorpce kostí, nyní však bude brán zřetel spíše na funkce LLT1 v imunitním systému [90].

Síla interakce receptoru hNKR-P1A s jeho fyziologickým ligandem LLT1 není nijak vysoká ($K_d = 48 \mu\text{M}$) [92]. Funkční analýza prokázala, že navázání specifické monoklonální protilátky L9.7 na LLT1 na povrchu YT NK buněk, indukovalo produkci IFN- γ , ale nedošlo k ovlivnění cytotoxicity [93]. Další studie potvrdila produkci IFN- γ po interakci hNKR-P1A na NK buňkách s LLT1 na cílových buňkách, avšak prokázala inhibici cytotoxicity NK buněk. U T lymfocytů byly prokázány protichůdné účinky této interakce [71,79]. Výsledek interakce tedy zásadně ovlivňuje, na kterém typu buněk se tyto proteiny nacházejí. Expresi LLT1 na aktivovaných B lymfocytech a dendritických buňkách napovídá, že by další funkcí mohlo být ovlivnění „cross-talku“ mezi NK buňkami a antigen prezentujícími buňkami [79]. Lidské glioblastomové buňky prokázaly zvýšenou expresi LLT1 na svém povrchu, ve snaze uniknout před imunitním dozorem NK buněk, čímž chtěly využít inhibice cytotoxicity NK buněk prostřednictvím interakce LLT1 s hNKR-P1A [95]. Po aktivaci imunitních buněk exprimujících LLT1 např. přítomností patogenů nebo některými cytokiny, dochází k výraznému zvýšení exprese tohoto proteinu. U antigen prezentujících buněk zvyšuje expresi LLT1 působení IFN- γ . Při virové infekci dochází ke zvýšení exprese LLT1 u B lymfocytů, což má za následek inhibici funkcí NK buněk, ale na druhou stranu také kostimulaci proliferace T lymfocytů, produkci IFN- γ a zvýšenou sekreci IL-17 společnou souhrou aktivace CD3 a hNKR-P1A. Zjištěné poznatky poukazují, že LLT1 společně s hNKR-P1A hrají svou roli v modulaci imunitní odpovědi na patogeny [77].

Molekula LLT1 disponuje krátkým cytoplasmatickým úsekem, který postrádá ITAM i ITIM a ve svém transmembránovém úseku nese kladně nabitý argininový zbytek, což ji předurčuje k asociaci s adaptorovým proteinem a pravděpodobné aktivační funkci. Popis signalizace LLT1 popisuje následující studie na modelu produkce IFN- γ , indukované interakcí LLT1 exprimovaného buněčnou linií NK92 s hNKR-P1A exprimovaného cílovými buňkami K562. Jednotlivé signalizační molekuly byly determinovány pomocí specifických farmakologických inhibitorů. Přenos signálu prostřednictvím fosforylace zprostředkovávaly protein-tyrosin-kinasy typu rodiny Src, dále p38 MAPK a také ERK viz. obr. 9 [94].



Obr. 9 Schéma pravděpodobné signalizace receptoru LLT1 vedoucí k produkci IFN- γ u buněk NK92. Znázorněna je asociace LLT1 s adaptorovým proteinem nesoucím ITAM a dále jsou označena místa inhibice farmakologickými inhibitory [94].

Vazebné testy s různými sacharidy prokázaly, že LLT1 rozpoznává a váže sulfatované vysokomolekulární glykosaminoglykany jako např. dextran-sulfát, fukoidan nebo λ -karagenan. Pokud však nebyl dextran sulfatován LLT1 ho nevážalo, což vypovídá o důležitosti sulfatace u rozpoznávaných polysacharidů. Specificky vázané sulfatované glykosaminoglykany, které rozpoznává LLT1 se vyskytují zejména v pojivových tkáních, v kůži a v kostech, kde je také exprimováno LLT1. Tento fakt poukazuje na roli LLT1 při rozpoznávání extracelulární matrix, buněčné adhezi a mezibuněčných interakcích [96].

2. CÍLE PRÁCE

- **Produkce extracelulární domény proteinu hNKR-P1A v *E. coli*.**
- **Optimalizace renaturace a purifikace proteinu hNKR-P1A.**
- **Charakterizace proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie.**
- **Příprava expresních plazmidů pro produkci proteinu LLT1.**
- **Produkce extracelulární domény proteinu LLT1 v *E. coli*.**
- **Renaturace a purifikace proteinu LLT1.**
- **Charakterizace proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie.**

3. MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy AL54 *Mettler Toledo, USA*
- Automatické pipety P2-P1000 *Gilson, USA*
- Centrifuga Avanti J-26 XP *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga MPW-375 *Mechanika Precyzyjna, Polsko*
- Centrifuga VSMC-13 *Shelton scientific, USA*
- Centrifuga Z 233 MK-2 *Hermle, Německo*
- Centrifuga Spectrafuge 16M *Edison, USA*
- Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra *Millipore, USA*
- Dialyzační trubice Spektra/Por *Spektrum Laboratories, USA*
- Hmotnostní spektrometr ULTRAFLEX III *Bruker, Německo*
- Hmotnostní spektrometr APEX Ultra 9,4 T FT-ICR *Bruker, Německo*
- HPLC systém BioSys 510 *Beckman Coulter, USA*
- HPLC systém ÄKTAbasic *GE Healthcare, Německo*
- μ HPLC systém Agilent 1200 *Agilent, USA*
- JETQUICK Gel Extraction Spin Kit *Genomed, Německo*
- JETQUICK Plasmid Purification Spin Kit *Genomed, Německo*
- Kolona Magic C18 AQ *Michrom, USA*
- Kolona Superdex 75 10/300 GL *GE Healthcare, Německo*
- Kolona Superdex 200 10/300 GL *GE Healthcare, Německo*
- Ledovač UBE 50-35 *Ziegler, Německo*
- Luminiscentní analyzátor G-Box *Syngene, UK*
- Magnetická míchačka mM 2A *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- MicroTrap *Michrom, USA*
- Monochromátorová čtečka destiček Safire² *Tecan, Švýcarsko*
- Napájecí zdroj EPS 500/400 *Pharmacia, Švédsko*
- Napájecí zdroj MP-250V *Cleaver Scientific, USA*
- pH metr Φ 200 *Beckman Coulter, USA*

- předvážky HF-1200G *AND, USA*
- Souprava pro elektroforézu *Bio-Rad, USA*
- Souprava pro elektroforézu *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro ultrafiltraci *Sigma-Aldrich, USA*
- Spektrofotometr DU-70 *Beckman Coulter, USA*
- Termální cyklátor *Eppendorf, Německo*
- Termostatovaný mixér *Eppendorf, Německo*
- Třepačka na Erlenmeyerovy baňky *Gallenkamp Ltd., UK*
- Třepačka na zkumavky BigGer Bill *Thermolyne, USA*
- Ultracentrifuga Optima LE-80K *Beckman Coulter, USA*
- Ultrafiltrační membrány *Sigma-Aldrich, USA*
- Ultrazvuková lázeň *KRAINTEK, Slovensko*
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 *Cole-Parmer Instrum. Co., USA*
- UV lampa UVGL-58 *Science company, USA*
- Vakuová odparka Speedvac *Jouan, Francie*
- Vialky se septem *Agilent, USA*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody MilliQ *Millipore, USA*

3.2 Chemikálie

• Aceton	<i>Merck, Německo</i>
• Acetonitril	<i>Merck, Německo</i>
• Agar	<i>Oxoid, USA</i>
• Agarosa	<i>Invitrogen, USA</i>
• Ampicilin	<i>Biotika, SR</i>
• Akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• L-Arginin hydrochlorid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• ATP	<i>Fermentas, Kanada</i>
• Azid sodný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Bacto-tryptone	<i>Oxoid, USA</i>
• Bacto-yeast extract	<i>Oxoid, USA</i>
• 3-(benzyltrimethylamonium)propansulfonát	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Bromfenolová modř	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• BSA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, Německo</i>
• DMSO	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
• Cystamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Cysteamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Činidlo pro stanovení dle Bradfordové	<i>Bio-Rad, Německo</i>
• Diethylether	<i>Merck, Německo</i>
• dNTP	<i>Fermentas, Kanada</i>
• DTT	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• EDTA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Ethanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
• Ethidiumbromid	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Formaldehyd	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Glycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Glutathion (oxidovaná/redukovaná forma)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Guanidin hydrochlorid	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>

- Hydroxid sodný *Lach-Ner, ČR*
- Chlorid hořečnatý *Sigma-Aldrich, USA*
- Chlorid sodný *Lach-Ner, ČR*
- Chlorid vápenatý *Lach-Ner, ČR*
- IPTG *Sigma-Aldrich, USA*
- Isopropylalkohol *Lach-Ner, ČR*
- Kanamycin *Sigma-Aldrich, USA*
- α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina *Bruker, Německo*
- Kyselina octová *Lach-Ner, ČR*
- β -merkaptoethanol *Sigma-Aldrich, USA*
- methyl- β -cyklodextrin *Sigma-Aldrich, USA*
- *N*-ethylmorfolin *Fluka, Švýcarsko*
- *N*-laurylsarcosin *Sigma-Aldrich, USA*
- *N,N'*-metylen-bis-akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- Octan sodný *Lach-Ner, ČR*
- Peroxodisíran amonný *Sigma-Aldrich, USA*
- Q Sepharosa FF *GE Healthcare, Německo*
- Sacharosa *Lach-Ner, ČR*
- SDS *Jersey Lab Supply, USA*
- Síran hořečnatý *Sigma-Aldrich, USA*
- Standardy pro agarosovou elektroforézu *New England Biolabs, USA*
- Standardy pro SDS-PAGE *Sigma-Aldrich, USA*
- TCEP *Thermo Scientific, USA*
- TEMED *Serva, Německo*
- Tetracyklin *Jersey Lab Supply, USA*
- Thiosíran sodný *Sigma-Aldrich, USA*
- Tris *Serva, USA*
- Triton X-100 *Sigma-Aldrich, USA*
- X-Gal *Sigma-Aldrich, USA*
- Ostatní chemikálie *Lach-Ner, ČR*

Všechny použité chemikálie byly použity v nejvyšší komerčně dostupné čistotě.

3.3 Enzymy

- DNAsa I (deoxyribonukleasa I) *Sigma-Aldrich, USA*
- Deep Vent polymerasa (2 000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Glu-C *Roche, Německo*
- Chymotrypsin *Roche, Německo*
- Restrikční endonukleasa BamH I (20 000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Restrikční endonukleasa Hind III (20 000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Restrikční endonukleasa Nde I (20 000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Restrikční endonukleasa Not I (10 000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Restrikční endonukleasa Pst I (20 000 U/ml) *Sigma-Aldrich, USA*
- Restrikční endonukleasa Xba I (20 000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Restrikční endonukleasa Xho I (20 000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- RNAsa I (ribonukleasa I, 10 mg/ml) *Sigma-Aldrich, USA*
- T4 DNA ligasa (5 000 U/ml) *Fermentas, Kanada*
- Trypsin *Promega, USA*

3.4 Inhibitory proteas

- Leupeptin *Sigma-Aldrich, USA*
- Pepstatin *Sigma-Aldrich, USA*
- PMSF *Sigma-Aldrich, USA*

3.5 Vektory

- pBluescript II SK (+) *Stratagene, USA*
- pET-30a-(+) *Novagen, USA*

3.6 Bakteriální kmeny

- Nova Blue: *E. coli endA1 hsdR17(rK₁₂⁻ mK₁₂⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10] (Tet^R)
Novagen, USA*
- BL21-Gold (DE3): *E. coli B F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^f gal (DE3) endA Hte*
Stratagene, USA
- BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL strain: *E. coli B F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^f gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]*
Stratagene, USA

3.7 Primery pro PCR

- **Přímý primer:** LLT1 Q65 FW *Generi-Biotech, ČR*
5'- CGC ATA TGC AAG AGC CAT CAG - 3'
- **Reverzní primer:** LLT1 Q65 REV *Generi-Biotech, ČR*
5'- CGA AGC TTA GAC ATG TAT ATC TG - 3'
- **Přímý primer:** LLT1 L71 (H176C) FW *Generi-Biotech, ČR*
5' - GCC ATA TGC TTC AAG CTG CAT GCC CAG - 3'
- **Reverzní primer:** LLT1 L71 (H176C) REV *Generi-Biotech, ČR*
5' - CGG CGG CCG CTT AGA CAT GTA TAT CTG ATT TGG - 3'

3.7 Roztoky a pufry

- **Barvicí roztok pro SDS elektroforézu:** 45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,25 % (w/v) CBB R-250
- **Dialyzační pufr :** 15 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0
- **Elektrodový pufr:** 10 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
- **EP pufr:** 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, 15% sacharosa, 2 mg/ml lysozym, 0,2 mg/ml RNAasa, 0,1 mg/ml BSA
- **Odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu:** 35 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) kyselina octová
- **Guanidinový pufr (hNKR-P1):** 6 M Guanidin-HCl, 10 mM DTT, pH 8,0

- **Guanidinový pufr (LLT1) [92]:** 6 M Guanidin-HCl, 50 mM MES, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 6,5
- **LB agar:** 1,5% (w/v) agar v LB médiu
- **LB médium:** 1% (w/v) bacto-trypton, 0,5% (w/v) bacto-yeast extract, 1% (w/v) NaCl, pH 7,4
- **NEB 1 pufr (10 × konc.):** 10 mM Bis-Tris-propan-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,0 (*New England Biolabs, USA*)
- **NEB 2 pufr (10 × konc.):** 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,9 (*New England Biolabs, USA*)
- **NEB 3 pufr (10 × konc.):** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,9 (*New England Biolabs, USA*)
- **NEB 4 pufr (10 × konc.):** 20 mM Tris-acetát, 50 mM CH₃COOK, 10 mM (CH₃COO)₂ Mg, 1 mM DTT, pH 7,9 (*New England Biolabs, USA*)
- **N-ethylmorfolinacetátový pufr:** 100 mM N-ethylmorfolinacetát, pH 8,3
- **PCR ThermoPol buffer (10 × konc.) pro Deep Vent DNA pol.:** 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 (*New England Biolabs, USA*)
- **PD1,PM1 pufr:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RNAsa (0,1 mg/ml), pH 8,0
- **PD2, PM2 pufr:** 0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
- **PD3, PM3 pufr:** 3,1 M CH₃COONa, pH 5,5
- **PEQ pufr:** 0,1 M CH₃COONa, 0,6 M NaCl, 0,15% (v/v) Triton X-100, pH 5,0
- **PW pufr:** 0,1 M CH₃COONa, 0,8 M NaCl, pH 5,0
- **PEL pufr:** 0,1 M Tris-HCl, 1,25 M NaCl
- **PBS pufr:** 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM K₂HPO₄, pH 7,4
- **Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkaptoethanol, 1 mM NaN₃, pH 7,4
- **Pufr pro agarosovou elektroforézu -TAE pufr, 1 × koncentrovaný:** 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA
- **Pufr A pro ionexovou chromatografii:** 15 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0
- **Pufr B pro ionexovou chromatografii:** 15 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0

- **Pufr pro gelovou filtraci (hNKR-P1A):** 15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0
- **Pufr pro gelovou filtraci (LLT1 H176C):** 15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0
- **Pufr pro štěpení Glu-C:** 50 mM NH₄Ac, 10% acetonitril, pH 4,0
- **Pufr pro štěpení chymotrypsinem:** 50 mM N-ethylmorpholinacetát, 10% acetonitril, pH 7,8
- **Pufr pro štěpení trypsinem:** 50 mM N-ethylmorpholinacetát, 10% acetonitril, pH 7,8
- **Pufr pro T4 DNA ligasu (1 × konc.):** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, pH 7,5 (*Fermentas, Kanada*)
- **Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek:** 0,5% (w/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkaptoethanol, 1 mM NaN₃, pH 7,4
- **Renaturační pufr B12 [97]:** 50 mM Tris-HCl, 0,5 M L-arginin, 240 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM EDTA, 6 mM red. glutathion, 4 mM ox. glutathion, pH 9,0
- **Renaturační pufr (LLT1 H176C) [92]:** 100 mM Tris-HCl, 1 M L-arginin, 2 mM EDTA, 6,73 mM cysteamin, 3,73 mM cystamin, pH 8,0
- **Roztok L1:** NaClO₄, octan sodný, TBE (*Genomed, Německo*)
- **Roztok L2:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl (*Genomed, Německo*)
- **Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 25 % (w/v) sacharosa, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4
- **Směs akrylamidu:** 29 % (w/v) akrylamid, 1 % (w/v) N,N'-metylen-bis-akrylamid
- **Stop pufr (Loading Dye):** 50% glycerol, bromfenolová modř, ethanol, TE pufr
- **TE pufr:** 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující:** 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 2 % (v/v) β-merkaptoethanol, pH 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující:** 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8
- **Zásobní koncentrace antibiotik:**
 - ampicilin 150 mg/ml
 - kanamycin 50 mg/ml
 - tetracyklin 5 mg/ml

4. METODY

Byly použity postupy a metody, které jsou založeny na dlouhodobé praxi členů laboratoře a většina z nich je ve standardní formě uvedena v manuálu [98].

4.1 Příprava expresních plazmidů

4.1.1 Polymerasová řetězová reakce – PCR

Tato metoda je hojně využívána k amplifikaci (zmnožení) úseku DNA ohraničeného známými sekvencemi. Reakce probíhá v několika krocích, počínaje denaturací DNA na dvě vlákna při vysoké teplotě, poté nasedají primery (tzv. annealing) a nakonec probíhá samotná polymerace DNA přidanou polymerasou. Celý proces probíhá opakovaně v cyklech, poté bývá jeden krok určen pro dosyntetizování konců DNA a nakonec je reakční směs ochlazená. Amplifikace DNA byla prováděna s navrženými a komerčně dodanými oligonukleotidy (primery). Reakce byly pipetovány do konečného objemu 50 μ l a amplifikace DNA probíhala v tepelném cyklátoru Eppendorf. Složení reakční směsi viz. tab 1. Koncentrace templátu pro Q65 byla 1 μ g/ μ l a pro L71 (H176C) 4,4 μ g/ μ l.

Tabulka 1 – Složení reakční směsi pro PCR (objemy uvedeny v μ l):

plazmid	LLT1 Q65	LLT1 L71 (H176C)
ddH ₂ O	30,5	30
100 mM MgSO ₄	1,5	1,5
10 mM dNTP	1,5	1,5
10x ThermoPol buffer	5	5
5 μ M Přímý primer	5	5
5 μ M Reverzní primer	5	5
DNA templát	1	1,5
Deep Vent Dna Pol (2 U/ μ l)	0,5	0,5

Teplotu pro nasedání oligonukleotidů jsme volili přibližně o pět stupňů nižší, než byla uvedená teoretická teplota denaturace duplexu DNA. Výsledek reakce byl analyzován na 1,2% agarosovém gelu. Použité programy pro PCR jsou uvedeny v Tab 2.

Tabulka 2 – Program pro PCR (Teplotní profil)

krok	počet cyklů	teplota [°C]	čas [min]
1	1	94	2
2	30	94	0,5
		42 (50)*	0,5
		72	1
3	1	72	10
4	1	4	∞

* teploty annealingu: 42 °C pro primery LLT1 Q65 a 50 °C pro primery LLT1 L71 (H176C)

∞ setrvání při teplotě 4 °C

Po skončení programu bylo z reakční směsi odebráno 10 μ l a byly přidány 2 μ l stop pufru. Takto připravené vzorky byly naneseny na agarosový gel.

4.1.2 Elektroforéza DNA v agarosovém gelu

Tato metoda je využívána k rozdělení různě dlouhých fragmentů DNA a také je možno přibližně odhadnout i kvantitu vzorku s pomocí standardu o přesné koncentraci. Gel byl připraven rozpuštěním 0,5 g agarosy ve 40 ml TAE pufru po přejití varem. Tekutý gel byl zchlazen přibližně na 50 °C, bylo přidáno 2 μ l roztoku EtBr (10 mg/ml), byl nalit do předem připravené vaničky a po přiložení „hřebenu“ byl gel ponechán ztuhnout při laboratorní teplotě. Po odstranění hřebenu byla vanička s gelem umístěna do soupravy a převrstvena TAE puftrem. Do jednotlivých jamek potom byly naneseny analyzované vzorky.

Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V po dobu 60-90 minut. DNA nesoucí záporný náboj putuje ke kladné elektrodě a fragmenty o různé velikosti putují rozdílnou rychlostí. K vizualizaci rozdělených fragmentů DNA byla použita UV lampa. Využívá se zde fluorescence ethidiumbromidu, který interkaluje mezi vlákna dvoušroubovice DNA. Velikost fragmentů byla určena porovnáním se standardem.

4.1.3 Extrakce DNA z agarosového gelu

Dostatečné rozdělení fragmentů bylo kontrolováno na UV lampě. Pokud byla DNA z gelu dále používána, kontrola přítomnosti fragmentů byla provedena zásadně dlouhovlnným UV zářením (365 nm), protože krátkovlnné (254 nm) sice umožňuje lepší viditelnost, ale může způsobit nežádoucí mutace. Skalpelem byl vyříznut gel s izolovaným fragmentem a přenesen do mikrozkušavky. Izolace probíhala pomocí komerční soupravy firmy Genomed. Ke vzorkům gelu byl přidán roztok L1 (100 mg gelu/300 μ l L1) a proběhla inkubace 15 min při 50 °C. Roztok byl převeden do kolonky a centrifugován při 14 000 g, 1 min. Prošlý roztok byl odlit, bylo přidáno 0,5 ml roztoku L2 a odstředěno (14 000 g, 1 min). Prošlý roztok byl odlit a opět proběhla centrifugace za stejných podmínek. Bylo přidáno 50 μ l destilované vody a proběhla centrifugace (14 000 g, 2 min) do nové mikrozkušavky. Bylo získáno 50 μ l roztoku extrahované DNA.

4.1.4 Restriční štěpení

Pro kontrolu správnosti připravené DNA nebo přípravu fragmentu pro následnou ligaci se používají tzv. restriční endonukleasy, které štěpí specificky na přesně definovaných místech uvnitř řetězce DNA. Po minipreparativní izolaci plazmidové DNA nebo PCR bylo k 9 μ l roztoku DNA přidáno 1,1 μ l příslušného 10 \times koncentrovaného NEB pufru a 0,5 μ l každého restričního enzymu, případně také 0,5 μ l BSA (10 mg/l). Směs byla inkubována 1-3 hodiny při 37 °C. Štěpení bylo ukončeno přidáním Stop pufru a výsledek byl analyzován pomocí agarosové elektroforézy.

4.1.5 Ligace DNA

Při ligování inzertu je nutné, aby vektor byl linearizovaný a měl komplementární kohezní konce stejně jako vnášený inzert. Roztok inzertu (300 ng) a vektoru (100-300 ng) byl smísen se 2 μ l 10 \times koncentrovaného pufru, 0,3 μ l 20 mM ATP a 1 μ l T4 DNA ligasy

a reakční směs byla doplněna do 20 μ l ddH₂O. Inkubace probíhala přes noc při laboratorní teplotě. Poté bylo 10 μ l ligační směsi použito na transformaci kompetentních buněk.

4.1.5.1 Ligace DNA v kombinaci s restričním štěpením

Tato metoda se používá zejména při ligaci inzertu DNA s tupými konci do vektoru pBluescript SK+. Bylo smíseno 15,5 μ l roztoku po PCR a linearizovaného vektoru a bylo přidáno 2 μ l 10 \times koncentrovaného NEB4 pufru, 0,5 μ l 20 mM ATP, 0,5 μ l T4 DNA ligasy a 0,5 μ l restričního enzymu *Sma*I. Objem byl doplněn do 20 μ l ddH₂O. Reakce byla inkubována 4 hodiny při laboratorní teplotě. Poté bylo 10 μ l ligační směsi použito na transformaci kompetentních buněk.

4.1.6 Transformace kompetentních buněk tepelným šokem

Dlouhodobé skladování kompetentních buněk probíhá při -80 °C. Nejdříve byly buňky ponechány 10-20 min pozvolna roztát na ledu, potom k nim byl přidán plazmid (1 μ g/200 μ l buněk) a směs byla inkubována 30 minut na ledu. Poté byl proveden tzv. tepelný šok, bakterie byly na 40-50 s zahřáty na 42 °C ve vodní lázni a ihned potom uloženy na led. Po jedné minutě byl k suspenzi přidán 1 ml LB média bez antibiotik a následovala inkubace 1 hodinu při 37 °C. Po skončení inkubace byly buňky centrifugovány při 2 500 g po dobu 30 s a peleta byla po resuspendování v 50 μ l LB média rozetřena na misku s tuhým médiem a příslušnými antibiotiky vyžíhanou, ochlazenou skleněnou tyčinkou. Nakonec byly misky inkubovány přes noc při 37 °C. Na misce se poté namnožily pouze bakterie, které přijaly plazmid nesoucí resistenci na antibiotikum, přibližně za 15-30 hodin do vytvoření viditelných jednotlivých kolonií.

4.1.7 Modro-bílá selekce (Blue-white screening)

Pro lepší selekci klonů s přijatým plazmidem obsahující vložený inzert byla vyvinuta technika modro-bílé selekce. Je založena na vektoru pBluescript SK+, který ve svém polyklonovacím místě kóduje β -galaktosidasu štěpící X-Gal na modrý produkt. Pokud je však do vektoru vložen inzert, je gen pro β -galaktosidasu porušen. Selekcce probíhala na plotnách, na které bylo přidáno 20 μ l X-Gal (50 mg/ml v DMSO) jako substrát β -galaktosidasy a 100 μ l 100 mM IPTG pro indukci její exprese. Kolonie nesoucí plazmid s inzertem zůstaly bílé a kolonie s plazmidem bez inzertu se zbarvily do modra.

4.1.8 Minipreparativní izolace plazmidové DNA pomocí soupravy

Tomuto postupu předcházela příprava nočních bakteriálních kultur. Z misek byly aseptickými párátky vypíchnuty jednotlivé kolonie a byl jimi zaočkován 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky. Poté byly kultury třepány (220 ot./min) přes noc při 37 °C.

Vybrané noční bakteriální kultury (1 – 3 ml) byly odstředěny (12 000 g, 2 min) a z pelet byla izolována DNA pomocí komerční soupravy. K peletám bylo přidáno 200 µl roztoku PD1 a pelety resuspendovány pomocí pipety. K suspenzi bylo přidáno 200 µl roztoku PD2, směs byla promíchána opakovaným otočením mikrozkuhavky a ponechána inkubovat 2 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 300 µl roztoku PD3 a směs byla ihned promíchána stejným způsobem. Následovala centrifugace 14 000 g, 3 min. Supernatant byl převeden do kolonky uložené v mikrozkuhavce a poté byl centrifugován 14 000 g, 1 min, prošlá frakce byla odlita. Do kolonky bylo přidáno 400 µl roztoku W1 a centrifugováno 14 000 g po dobu 1 min. Poté byl prošlý roztok odlit, dále bylo přidáno 600 µl Wash roztoku a následovala centrifugace 14 000 g, 1 min. Na závěr bylo přidáno 50 µl ddH₂O (předehřáté na 65-70 °C), proběhla inkubace 2 min a na závěr následovala centrifugace 14 000 g, 3 min. Získaná DNA byla uchovávána při -20 °C. Byla použita komerční souprava firmy Genedaid.

4.1.9 Velkoobjemová izolace plazmidové DNA

Pro preparativní izolaci plazmidové DNA bylo zaočkováno 500 ml LB media s příslušnými antibiotiky a za stálého třepání (220 otáček za minutu) proběhla kultivace přes noc při 37 °C do stacionární fáze. Kultura byla sklizena (6 000 g, 10 min, 4 °C) a peleta byla resuspendována ve 25 ml PM1 roztoku. Následně bylo přidáno 25 ml PM2 roztoku a směs byla opatrně promíchána, poté bylo přidáno 25 ml PM3 roztoku a vše bylo důkladně promícháno, ne však vortexováno kvůli možné kontaminaci genomovou DNA. Dále proběhla centrifugace 11 000 g, 30 min, 25 °C. Supernatant byl přefiltrován přes filtrační papír a nanesen na kolonu s ionexovým nosičem, který byl promyt pufrům PEL a ekvilibrován pufrům PEQ. Po nanesení DNA na nosič byla kolona promyta 75 ml PW pufru, následovala eluce DNA 20 ml PEL pufru. Eluovaná DNA byla zachycena do čisté 50 ml kyvety. Posléze bylo přidáno 15 ml ledově vychlazeného isopropanolu a DNA byla ponechána srážet přes noc při -20 °C. Druhý den následovala centrifugace vysrážené DNA 15 000 g, 30 min, 4 °C. Supernatant byl opatrně odebrán pipetou a bylo přidáno 10 ml 75% (v/v) ledově vychlazeného

ethanolu, směs byla ponechána 3 min stát a poté následovala centrifugace 15 000 g, 10 min, 4 °C. Supernatant byl opatrně odebrán a kvjeta ponechána dnem vzhůru 20 min na vzduchu vysušit. Peleta byla rozpuštěna v přiměřeném objemu ddH₂O (100 µl – 1 ml) podle velikosti pelety. Nakonec byla stanovena koncentrace izolované DNA spektrofotometricky. Získaná plazmidová DNA byla uchovávána při -20°C.

4.1.10 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Spektrofotometricky lze stanovit nejen koncentraci DNA, ale i její čistotu. Měřena je absorbance vhodně zředěného roztoku při vlnové délce 260 nm, při které absorbují dusíkaté báze, a při 280 nm, při které absorbují aromatické aminokyseliny případných proteinových kontaminant. Platí zde empirický vztah vyjadřující, že jednotková absorbance při 260 nm \approx 50 µg DNA/ml roztoku. Poměr naměřených absorbancí ($A_{260/280}$) by měl u velmi čisté DNA ležet v rozmezí 1,8 až 2.

4.1.11 Automatické sekvenování DNA

Vzorek získané plazmidové DNA byl předán na sekvenační analýzu pro ověření správnosti připraveného plazmidu. Sekvenační reakce prováděl Dr. Jürgen Felsberg, Csc. (MBÚ AV ČR, sektor buněčné a molekulární mikrobiologie). Sekvence byla provedena pomocí automatického sekvenátoru ABI Prism 3100 Genetic Analyzer.

4.2 Produkce a izolace proteinů

4.2.1 Produkce rekombinantních proteinů v *E. coli*

Pro produkci rekombinantních proteinů byly použity bakteriální expresní systémy v kombinaci s expresním vektorem pET-30a(+), který kóduje tzv. T7lac promotor složený z T7 promotoru a lac operátoru. Mechanismus regulované a vysoce účinné exprese je založen na kontrole T7lac promotoru a lac promotoru lac operátorem. Použité bakteriální kmeny s označením DE3 nesly ve své genomové DNA gen kódující T7 RNA polymerasu z bakteriofága T7, která má o mnoho vyšší aktivitu než bakteriální RNA polymerasa. T7 RNA polymerasa specificky rozpoznává T7 promotor a její gen je v bakteriální DNA integrován za lac promotorem, jež je regulován lac operátorem. Exprese T7 RNA polymerasy, na které závisí exprese cílového proteinu i samotná exprese úseku DNA kódujícího cílový

protein, je tedy kontrolována *lac* operátorem. Regulace *lac* operátoru je založena na negativní regulaci *lac* represorem, což je produkt *lacI* genu obsaženého, jak v bakteriální DNA, tak v pET-30a(+) vektoru. Bez indukce je exprimován *lac* represor, který se váže na *lac* operátor a tím inhibuje transkripci genu pro T7 RNA polymerasu a také inhibuje transkripci vloženého inzertu DNA. Tato dvojí regulace je zavedena kvůli přísné kontrole exprese, neboť při expresi proteinů toxických pro bakteriální buňky nesmí před indukcí dojít ani k nepatrné expresi z důvodu zpomalení růstu kultury nebo jejího úplného odumření. Pro zamezení vazby *lac* represoru na *lac* operátor byl použit analog laktosy isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), který se váže na *lac* represor. Po indukci dojde k expresi T7 RNA polymerasy, která nasedne na T7*lac* promotor a dojde k expresi úseku plazmidu, který kóduje cílový protein. IPTG je k indukci exprese používán pro jeho snadný transport do buněk a také, protože není buňkami metabolizován a jeho koncentrace je tedy udržována na stejné úrovni po celou dobu produkce proteinu [99].

Pro expresi proteinů byly použity bakteriální kmeny *E. coli*. Pro protein LLT1 byl použit kmen BL21 Gold (DE3) [92] a pro hNKR-P1A kmen BL21 CodonPlus (DE3) RIPL [97], který nese speciální plazmidy kódující tRNA (argU, proL, ileY a leuW). Tyto tRNA se nevyskytují v *E. coli*, jsou typické pro ostatní vyšší organismy, jejichž proteiny jsou v *E. coli* heterologně exprimovány [100].

4.2.2 Selektce produkčního klonu

Nejprve byla provedena transformace některého z produkčních bakteriálních kmenů expresním plazmidem, následovaná kultivací přes noc na misce s pevným médiem a příslušnými antibiotiky při 37 °C do nárůstu jednotlivých viditelných kolonií. Pomocí aseptických párátek byl vypíchnutými koloniemi zaočkován vždy 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky a ponechán přes noc třepat při 37 °C. 50 μ l této noční kultury byl zaočkován dvakrát nový 1ml LB média s antibiotiky a následovalo třepání (220 ot./min) při 37 °C 1,5 hodiny (hNKR-P1A) respektive 2 hodiny (LLT1). Poté pro indukci exprese proteinu bylo ke kulturám přidáno 1 mM IPTG (LLT1) resp. po vytemperování na produkční teplotu 28 °C bylo přidáno 0,5 mM IPTG (hNKR-P1A). Indukován byl vždy jeden vzorek z identické dvojice, druhý byl ponechán pro srovnání negativní. Po 3 hodinách třepání při 37 °C (LLT1) resp. 4 hodinách při 28 °C byly kultury odstředěny, resuspendovány ve 130 μ l redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE a po SDS-PAGE analýze byly

porovnány pozitivní a negativní kultury. Podle nejlepší produkce proteinu byl vybrán produkční klon.

4.2.3 Velkoobjemová produkce proteinu

Produkce proteinu byla většinou prováděna v objemu 1–2 litrech LB média s příslušnými antibiotiky. Objem média zaujímal maximálně čtvrtinu objemu Erlenmayerovy baňky kvůli dostatečnému provzdušňování při třepání. Produkční médium s antibiotiky bylo zaočkováno 0,5 až 2 ml noční kultury vybraného produkčního klonu a proběhla inkubace při 37 °C za stálého třepání (220 ot./min). Ve zkracujících se časových intervalech byla odebírána produkční kultura a byla měřena její OD tedy absorbance při 550 nm. Při dosažení $OD = 0,6–0,8$ byla provedena indukce exprese inzertu, kódujícího protein LLT1, přidáním IPTG do výsledné koncentrace 1 mM [92]. Před indukcí produkce proteinu hNKR-P1A byla bakteriální suspenze nejdříve vytemperována na 28 °C a potom byl přidán IPTG do výsledné koncentrace 0,5 mM [97]. Produkce proteinu LLT1 proběhla 4 hodiny při 37 °C a produkce hNKR-P1A 6 hodin při 28 °C. Nakonec byly kultury sklizeny centrifugací 6 000 g, 10 min, 4 °C. Supernatant byl odlit a peleta byla dále použita k izolaci inkluzních tělísek.

4.2.4 Izolace inkluzních tělísek

Proteiny připravované v této práci byly produkovány do cytoplasmy ve formě nerozpustných agregátů tzv. inkluzních tělísek. Peleta sklizená po produkci proteinu z 1 litru kultury byla resuspendována ve 20 ml sacharosového lyzačního pufru a byly přidány inhibitory proteas, a to leupeptin a pepstatin (výsledná koncentrace 1 μ M) a PMSF (výsledná koncentrace 1 mM). Suspenze byla následně 4 \times zmrazena na -80 °C a rozmrazena v sonikační lázni. Poté bylo přidáno 400 μ l $MgCl_2$, 5 μ l DNAsy a 10 μ l RNAsy proběhla 40 min inkubace při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace 6 000 g, 15 min, 4 °C. Supernatant byl odlit a peleta byla resuspendována ve 20 ml pufru s detergentem s přidávanými inhibitory stejně jako v předchozím kroku. Suspenze byla 5 \times 30 s sonikována, vždy s alespoň 30 s pauzou na ledu. Následovala centrifugace 6 000 g, 10 min, 4 °C. Supernatant byl opět odlit a bylo přidáno 10 ml promývacího pufru s inhibitory. Sonikace a následná centrifugace byla opakována stejně jako v předchozím kroku. Nakonec byl odlit supernatant a získaná peleta s inkluzními tělísky byla uložena do -20 °C nebo byla přímo použita jako výchozí materiál pro renaturaci proteinu.

4.2.5 Solubilizace inkluzních tělísek

Proteinu ve formě inkluzních tělísek byl převeden do roztoku pomocí denaturace 6 M guanidinem a redukcí 10 mM DTT nebo 1 mM TCEP. Určené množství inkluzních tělísek bylo resuspendováno v odpovídajícím množství guanidinového pufru a ponecháno inkubovat 30 min při 50 °C. Suspenze byla centrifugována při 185 000 g po dobu 30 min při 20 °C. Supernatant byl odebrán a byla v něm stanovena koncentrace proteinů dle Bradfordové. Získaný roztok denaturovaného proteinu byl použit k renaturaci.

4.3 Renaturace proteinů

4.3.1 Renaturace metodou rychlého naředění

Metoda rychlého naředění je používána k renaturaci neboli obnově nativní konformace proteinu *in vitro*. Využívá rychlého zředění denaturačních činidel od „rozbalené“ molekuly proteinu, aby následně došlo ke sbalení polypeptidového řetězce a případně ke spojení disulfidových vazeb. K tomu je využíváno nízkomolekulárních chaperonů (L-arginin) a redoxního systému. Faktory ovlivňující renaturaci proteinu jsou zejména: koncentrace nízkomolekulárních chaperonů, redoxní systém, pH, iontová síla, teplota, doba renaturace, koncentrace přidávaného proteinu i konečná koncentrace proteinu v renaturačním pufru.

V roztoku solubilizovaných inkluzních tělísek byla stanovena koncentrace proteinů dle Bradfordové a upravena solubilizačním puftrem na 1 mg/ml. Připravené renaturační pufrы s přidáním PMSF (výsledná koncentrace 1 mM) byly vychlazeny a poté k nim bylo za stálého míchání přikapáno rychlostí 1 kapka za sekundu 1-10 ml roztoku denaturovaného proteinu. Roztok byl proteinu míchán 1-3 hodiny při 4 °C.

Při optimalizaci renaturačních podmínek bylo připraveno více renaturačních pufrů o menším objemu (většinou 100 ml). Optimalizován byl zejména redoxní systém, koncentrace L-argininu a pH. Případný vznik proteinových agregátů byl detekován měřením absorbance při 320 nm, kdy dochází v přítomnosti agregátů ke zvýšení absorbance roztoku. Konkrétní postup bude uveden v kapitole 5.4.2.

4.3.2 Renaturace metodou pomalého naředění

Tato metoda je založena na stejných principech jako metoda rychlého naředění. Zásadní rozdíl je v tom, že není přidáván protein do renaturačního pufru, ale naopak

je vychlazený renaturační pufr za stálého míchání pomalu přikapáván k roztoku denaturovaného proteinu. K roztoku 2,8 mg denaturovaného proteinu bylo pomalu přidáno 100 ml vychlazeného renaturačního pufru. Protein byl následně míchán 72 hodin při 4 °C.

4.3.3 Dialýza

Tato metoda je založená na omezené propustnosti dialyzačních trubic, které propouštějí pouze molekuly s $M_r < 1\,000$ Da. Dialýza je využívána k odstranění denaturačních činidel a k převedení proteinu do dialyzačního pufru pro následnou chromatografii.

Po skončení renaturace byl renaturovaný protein převeden do dialyzačních trubic. Dialýza probíhala oproti 8 l dialyzačního pufru za stálého míchání při 4 °C a po stanovené době byly trubice přemístěny do nového dialyzačního pufru a proces se opakoval. Po dialýze většinou následovala ultrafiltrace.

4.3.4 Ultrafiltrace

K redukci objemu a zvýšení koncentrace proteinového vzorku o větších objemech většinou nad 100 ml je používána filtrace při zvýšeném tlaku inertního plynu (N_2) tzv. ultrafiltrace. Používány jsou speciální membrány PLGC celulosy, které propouštějí menší molekuly i makromolekuly do určené molekulové hmotnosti. Použity byly membrány o průměru 76 mM s propustností molekul, jejichž $M_r < 10\,000$ Da. Membrána byla umístěna do soupravy pro ultrafiltraci, byl přidán roztok proteinu a zvýšen tlak plynu na 0,5 MPa. Filtrace probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě do cílového objemu.

4.3.5 Centrifugační koncentrátoři

Pro zvýšení koncentrace malých objemů proteinu byly použity centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra s propustností molekul s $M_r < 10\,000$ Da. Koncentrování probíhalo při 2 000 g, 20 °C po dobu než byl dosažen požadovaný objem.

4.4 Purifikace proteinů

4.4.1 Ionexová chromatografie

Tato metoda byla používána pro purifikaci rekombinantních proteinů. Je založena na odlišné síle iontových interakcí různých proteinů s nosičem. Proteiny jsou na kolony nanášeny při nízké iontové síle a interagují s nosičem, poté jsou postupně eluovány gradientem soli až do vysoké iontové síly. Molekuly jsou zde separovány na základě svého náboje. Použita byla kolona Q Sepharosy FF o rozměrech 1,6 × 14 cm, což je silný aniont obsahující kvartérní amoniové soli navázané na zesíťované agarose. Eluce byla provedena lineárním gradientem NaCl. Kolona byla napojena na HPLC systém Biosys 510.

4.4.2 Gelová filtrace

Jako poslední krok při purifikaci proteinů bývá často využívána gelová filtrace. Proteiny jsou zde děleny na základě své molekulové hmotnosti. Po nanesení na kolonu jsou dříve eluovány molekuly s vyšší molekulovou hmotností, protože neproniknou do struktury gelových granúl jako malé molekuly. Použity byly kolony Superdex 75 10/300 GL a Superdex 200 10/300 GL, které obsahují zesíťovaný dextranový gel, a napojeny byly na HPLC systém Biosys 510 nebo ÄKTAbasic.

U chromatografických metod byla eluce proteinů analyzována pomocí průtokového fotometrického detektoru, který měřil absorbanci při 280 nm. Jednotlivé frakce byly jímány ručně nebo sběračem frakcí a analyzovány na SDS-PAGE.

4.5 Analýza proteinových vzorků

4.5.1 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové je založeno na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein, což způsobuje posun absorpčního maxima barviva z 365 nm na 595 nm. Po porovnání s kalibrační řadou je potom možné proměřením absorbance při 595 nm stanovit přibližná koncentrace proteinu.

Stanovení probíhalo v 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Jako standardy byly pro kalibrační řadu použity roztoky BSA (0,1-0,5 mg/ml). Nejdříve do jamky bylo pipetováno 5 µl proteinu a poté přidáno 200 µl činidla. Reakce se nechala 5 min inkubovat při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno na monochromátorové čtečce destiček Safire II. Koncentrace

vzorků byly vypočteny dosazením do regresní rovnice definující přímkou lineárně proloženou kalibrační řadou.

4.5.2 Srážení proteinů acetonem

Srážení proteinů bylo využito pro přečištění vzorku proteinu od guanidinu nebo pro málo koncentrované vzorky pro SDS-PAGE. K roztoku proteinu byl přidán vymražený aceton do 70% (v/v) koncentrace a vzorek inkubován 2 hodiny při -20 °C. Poté proběhla centrifugace 14 000 g, 10 min, 4 °C. Supernatant byl odebrán a peleta opatrně opláchnuta 100 μ l vymraženého roztoku ethanol/diethylether v poměru 1:1 a roztok odebrán. Peleta byla vysušena na vzduchu a byl k ní přidán vzorkový pufr pro analýzu na SDS-PAGE.

4.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Tato metoda je základní biochemickou analýzou proteinového vzorku. Přítomný SDS udává proteinům uniformní záporný náboj a ty poté cestují rychlostí odpovídající jejich molekulové hmotnosti, tedy větší proteiny pomaleji, jsou více brzděny strukturou gelu, menší migrují rychleji. Dle očekávané velikosti proteinů je volena potřebná koncentrace rozlišovacího gelu. Složení gelů bylo převzato z manuálu [69]. Po namíchání rozlišovacího gelu odpovídající koncentrace (zpravidla 15%) byl nalit mezi sklíčka do výše cca 1 cm pod dolní okraj později přikládaného hřebenu a ihned převrstven vodou. Po ztuhnutí rozlišovacího gelu byla voda odlita, nalit připravený zaostřovací gel a ihned do něj byl ponořen hřeben až po zarážku. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byl hřeben vyjmut a jamky promyty vodou. Takto připravený gel byl umístěn do soupravy a převrstven elektrodovým pufrem. Horní zaostřovací gel je 5% s nižším pH a slouží k „zaostření“ vzorků, dolní gel je rozlišovací o určené koncentraci a vyšším pH, slouží k rozdělení proteinů dle své molekulové hmotnosti. K proteinovým vzorkům bylo přidáno odpovídající množství redukujícího nebo neredukujícího vzorkového pufru, k roztoku přidáván 2 \times koncentrovaný pufr a k sedimentu 1 \times koncentrovaný, a následovala inkubace 5 min ve vroucí vodní lázni. Poté byly vzorky centrifugovány 14 000 g, 3 min a nanášeny do jednotlivých jamek, standardy byly nanášeny do krajních pozic. Elektroforéza probíhala při konstantním proudu 50 mA na jeden gel a napětí 200 V až do doby, kdy čelo elektroforézy opustilo gel. Poté byl gel vyjmut ze soupravy a dále barven.

4.5.4 Barvení proteinů

Barvení bylo provedeno pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue R-250. Po SDS-PAGE byl gel 15 min barven v barvicím roztoku s CBB R-250 a zároveň byly proteiny v něm obsažené fixovány. Následně byl obarvený gel odbarvován v odbarvovacím roztoku do odbarvení pozadí. Přibližná molekulová hmotnost proteinů byla odhadována porovnáváním s pozicemi proužků standardu o známé molekulové hmotnosti.

Pokud bylo množství analyzovaného proteinu příliš nízké tak citlivost barvení CBB R-250 pro vizualizaci proteinu nestačila. V tomto případě bylo použito barvení stříbrem, které má vyšší citlivost. Nejdříve byl gel 3×30 min fixován v roztoku 30% (v/v) ethanolu a 10% (v/v) HAc. Dále byl 10 min inkubován v roztoku 10% (v/v) ethanolu a dalších 10 min v destilované vodě. Poté byl gel na 1 min převrstven roztokem 0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, následně byl dvakrát 20 s promyt destilovanou vodou. Následovala inkubace 30 minut v čerstvě připraveném roztoku 0,2% (w/v) AgNO_3 . Po pečlivém opláchnutí vodou byl gel inkubován ve směsi 0,037% (v/v) formaldehydu, 3% (w/v) K_2CO_3 a 0,001% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ do požadovaného zabarvení. Poté byl gel ihned přemístěn na 1 min do roztoku 4,5% (w/v) Tris a 25% (v/v) HAc pro zafixování barvení a nakonec byl uskladněn v 1% (v/v) HAc.

4.5.5 Štěpení proteinů v polyakrylamidovém gelu

Nejdříve byl z gelu vyříznut cílový proužek s proteinem, byl rozřezán přibližně na 1 mM^3 kousky a převeden do mikrozkušavky. Přidáno bylo 100 μl AcN a 100 μl N-ethylmorfolinacetátového pufru a následovala inkubace 1-4 hodiny do odbarvení gelu. Odbarvovací roztok byl odebrán, ke gelu bylo přidáno 100 μl AcN a proběhla 5 min sonikace v lázni, gel byl dehydratován. AcN byl odebrán a bylo přidáno 50 μl 50 mM TCEP v N-ethylmorfolinacetátovém pufru, gel byl hydratován. Následovala inkubace 10 min, 90 °C, proběhla redukce disulfidových vazeb. Byl odebrán roztok s TCEP, poté bylo přidáno 100 μl ddH₂O a odebráno. Dále bylo přidáno 100 μl AcN a odebráno. Bylo přidáno 50 μl 50 mM jodacetamidu v N-ethylmorfolinacetátovém pufru a inkubováno 30 min ve tmě, proběhla alkylace cysteinových zbytků. Bylo přidáno 100 μl AcN, následovala 5 min sonikace a roztok AcN s jodacetamidem byl odebrán. Poté bylo $3 \times$ opakováno (přidáno 100 μl AcN, následovala 5 min sonikace a AcN byl odebrán, bylo přidáno 100 μl ddH₂O, následovala sonikace 5 min a ddH₂O byla odebrána). Bylo přidáno 50 μl 50% (v/v) AcN a odebráno. Gel byl vysušen na vakuové odparce a bylo přidáno vhodné množství příslušného pufru

s proteasou (viz. 3.7), aby byl gel ponořený. Při štěpení trypsinem a chymotrypsinem byla koncentrace proteasy 0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a gel byl inkubován při 37 °C přes noc a při štěpení Glu-C byla koncentrace proteasy 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a inkubace probíhala přes noc při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno TFA do finální koncentrace 0,1% pro ukončení štěpení a následovala sonikace 5 min.

4.5.6 Izolace peptidů

Po štěpení proteinu v polyakrylamidovém gelu trypsinem na peptidy byl roztok okyselen TFA do 1% (v/v) koncentrace, poté byl 5 min sonikován a odebrán do nové mikrozkušavky. Poté bylo 3 \times opakováno (ke gelu byl přidán 50% AcN, aby byl gel ponořený, následovala sonikace 5 min, roztok byl odebrán a přidán do stejné mikrozkušavky z předchozího kroku. Následně byl přidán AcN, aby byl gel ponořený, následovala 5 min sonikace, roztok byl odebrán a přidán do téže mikrozkušavky). Spojené roztoky byly vysušeny na vakuové odparce. Izolované peptidy byly uchovávány při -20 °C.

4.5.7 Příprava vzorků pro určení lokalizace disulfidových vazeb

Určené množství roztoku proteinu po gelové filtraci bylo smíšeno s příslušným objemem neredukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE s přidáním cystaminem do 100 μM koncentrace. Cystamin je přidáván, aby nedošlo redukci disulfidových vazeb. Po SDS-PAGE byl vyříznut analyzovaný proužek a byl štěpen vybranými proteasami. Po rozštěpení proteinu v polyakrylamidovém gelu na peptidy byl roztok okyselen TFA do 0,1% (v/v) koncentrace, proběhla 5 min sonikace a roztok byl odebrán do nové mikrozkušavky. Ke gelu byl přidán 50% (v/v) AcN, aby byl gel ponořený, následovala sonikace 5 min, roztok byl odebrán a přidán do stejné mikrozkušavky z předchozího kroku. Byla přidána 0,1% TFA, aby byl gel ponořený, následovala 5 min sonikace, roztok byl odebrán a přidán do téže mikrozkušavky. Byl přidán roztok 80% (v/v) AcN, 0,1% (v/v) TFA, aby byl gel ponořený, následovala 5 min sonikace, roztok byl odebrán a přidán do stejné mikrozkušavky. Spojené roztoky byly vysušeny na vakuové odparce na objem cca 5 μl .

4.5.8 Odsolování peptidů

Ke vzorkům peptidů vysušených na cca 5 μ l bylo přidáno 200 μ l 2% (v/v) AcN, 0,1% (v/v) TFA, směs byla vortexována a odstředěna ve stolní centrifuze 15 s. Pro odsolení roztoku peptidů byla použita kolona Microtrap s polymerním nosičem (obrácená fáze). Kolona byla propláchnuta 250 μ l roztoku 1% (v/v) TFA, 80% (v/v) AcN, následně 250 μ l 0,1% (v/v) TFA a poté byl nanesen naředěný roztok izolovaných peptidů, prošlá frakce byla jímána do mikrozkušavky. Kolona byla propláchnuta 3 \times 250 μ l 0,1% TFA. Peptidy byly eluovány 50 μ l 1% TFA, 80% AcN do čisté mikrozkušavky. Kolona byla propláchnuta 3 \times 250 μ l 50% AcN a v témže roztoku byla uchovávána. Roztok eluovaných odsolených peptidů byl vysušen na vakuové odparce na cca 5 μ l a uložen do -20 °C.

4.5.9 Odsolování proteinů

Pro odsolení roztoku proteinu byla použita kolona Microtrap opět s polymerním nosičem o jiné porositě. Kolona byla propláchnuta 250 μ l roztoku 1% TFA, 80% AcN, následně 3 \times 250 μ l 1% (v/v) HAc a poté bylo naneseo 25 μ l proteinu o koncentraci 0,4 mg/ml, prošlá frakce byla jímána do mikrozkušavky. Kolona byla propláchnuta 3 \times 250 μ l 1% HAc. Protein byl eluován 50 μ l 1% HAc, 80% AcN do čisté mikrozkušavky a podruhé 50 μ l 5% HAc, 80% AcN do druhé mikrozkušavky. Druhá eluce roztokem s 5% HAc byla provedena pro případ, kdyby protein 1% HAc eluován nebyl. Pro odsolení dalších vzorků byl postup opakován. Nakonec byla kolona promyta 3 \times 250 μ l 1% HAc, poté 3 \times 250 μ l 50% AcN a v témže roztoku byla uchovávána. Získané roztoky proteinu byly předány RNDr. Petru Novákovi, PhD., který provedl analýzu pomocí techniky ESI/FT-ICR MS, pro určení přesné hmotnosti proteinu.

4.5.10 Příprava vzorku na MALDI

K vysušeným izolovaným peptidům bylo přidáno 30 μ l roztoku 0,1% TFA, 20% AcN, vortexováno, odstředěno. Odebrán 1 μ l z každého vzorku a naneseo na příslušnou pozici na MALDI terčik. Po zaschnutí byly vzorky na destičce převrstveny 0,8 μ l roztoku CCA matrice (0,1% TFA : 80% AcN, 0,1% TFA : nasyc. roztok CCA, v poměru 1:1:1). Po krystalizaci a zaschnutí matrice byly vzorky analyzovány pomocí techniky MALDI MS, analýzu prováděl RNDr. Petr Novák, PhD. a RNDr. Hynek Mrázek, PhD.

4.5.11 Příprava vzorků na LC/MS

K vysušeným odsoleným izolovaným peptidům byly přidány 2 μ l roztoku 1% TFA, 80% AcN, sonikace 5 min, odstředěno. Přidáno 25 μ l roztoku 0,1% TFA, vortexováno, 5 min sonikováno a odstředěno. Roztoky byly převedeny do vialek se septem a předány pro analýzu na LC/MS (ESI/FT-ICR MS) viz. 4.6. Analýzu prováděl RNDr. Petr Man, PhD.

4.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická analytická metoda, při které jsou v plynném stavu děleny ionizované částice podle poměru m/z tedy hmotnosti m ku náboji částice z . Touto metodou lze analyzovat celé molekuly nebo jejich fragmenty. Z naměřených spekter je možné vyvodit informace o přesné hmotnosti molekul, jejich chemickém složení, ale také částečně o jejich struktuře trojrozměrné. Výhodami hmotnostní spektrometrie jsou rychlost analýzy, vysoká rozlišovací schopnost, citlivost a také nízká spotřeba vzorku. Analýza biopolymerů pomocí hmotnostní spektrometrie se začala rychle rozvíjet až po zavedení měkkých ionizačních technik jako je MALDI a ESI, kdy při ionizaci nedochází k téměř žádné fragmentaci.

V této diplomové práci byly využity metody pro identifikaci proteinu, určení přesné hmotnosti proteinu a stanovení lokalizace disulfidových vazeb. Pro analýzu byly použity hmotnostní spektrometry Bruker Ultraflex III (MALDI-TOF) a Bruker APEX Ultra 9,4 T FT-ICR, který má vysokou přesnost i rozlišení a disponuje duálním iontovým zdrojem (Apollo ESI/MALDI dual ion source). Pro LC/MS analýzu byl použit kapilární μ HPLC systém Agilent 1200 a kolona s reverzní fází Magic C18 AQ.

Pro identifikaci proteinů byla použita technika MALDI MS a výsledná data byla porovnána s databází Mascot. K určení přesné hmotnosti proteinů byla použita technika ESI/FT-ICR a ke stanovení lokalizace disulfidových vazeb byla zvolena technika LC/MS ESI/FT-ICR. Tyto techniky prováděli: RNDr. Petr Novák, PhD. RNDr. Petr Man, PhD. a RNDr. Hynek Mrázek, PhD.

5. VÝSLEDKY

5.1 Úvod k výsledkům

Pro ilustraci jsou zde uvedeny celkové aminokyselinové sekvence připravovaných proteinů hNKR-P1A a LLT1. Protein hNKR-P1A je kódován 225 aminokyselinami, extracelulární doména je zobrazena červeně, transmembránový úsek černě a extracelulární doména modře, fialově je zvýrazněn motiv WIGL typický pro C-lektinovou doménu. Podtržený úsek představuje sekvenci Gln80-Ser225, která kóduje část extracelulární domény připravovanou v této diplomové práci, cysteinové zbytky v tomto úseku jsou označeny žlutě. Teoretická hmotnost tohoto úseku je 17 044,32 Da a teoretická hodnota pI 7,75.

Sekvence hNKR-P1A:

MDQQAIYAE LNLP TDSGP ESSSPSSLPRDVCQGS PWHQFALKLSCAGI ILLVLVVTGLSVSV
TSLIQKSSIEKCSVDIQQSRNK TTERPGLLNCPIYWQQLREKCLLFSHTVNPWNNSLAD CST
KESLLLLIRDKDELIHTQNLIRDKA ILFWIGLINFSLSEKNWKWINGSFLNSNDLEIRGDAKE
NSCISISQTSVYSEY CSTEIRWICQKELTPVRNKVYPD S

Protein LLT1 je kódován 191 aminokyselinami, jednotlivé úseky jsou barevně označeny analogicky s hNKR-P1A. Podtržené úseky jsou části extracelulární domény, které měly být připraveny. Podtržená sekvence v LLT1 kóduje úsek Gln65-Val191, teoretická hmotnost úseku je 14 746,39 a teoretická hodnota pI 5,90.

Sekvence LLT1:

MHDSNNVEKDITPSEL PANPGCLHSKEHSIKATLIWRLFFLIMFLTIIIVCGMVAALSAIRAN
CHQEPSVCLQAA CPESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSSQRF CDSQDADLAQVESFQELNFLLR
YKGPSDHWIGLSREQGQPWKWINGTEWTRQFPILGAGECAYLNDKGASSARHYTERKWI CSK
SDIHV

Sekvence LLT1 (H176C):

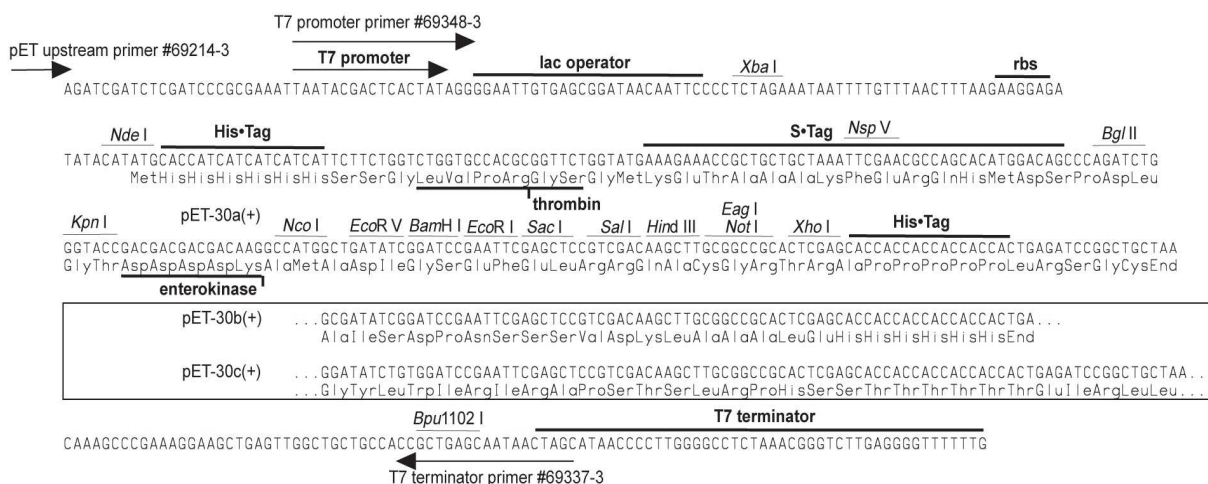
MHDSNNVEKDITPSEL PANPGCLHSKEHSIKATLIWRLFFLIMFLTIIIVCGMVAALSAIRAN
CHQEPSVCLQAA CPESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSSQRF CDSQDADLAQVESFQELNFLLR
YKGPSDHWIGLSREQGQPWKWINGTEWTRQFPILGAGECAYLNDKGASSARCYTERKWI CSK
SDIHV

Sekvence potvrzená v LLT1 (H176C) kóduje úsek Leu71-Val191 a obsahuje mutaci His176 (označen zeleně) za Cys176, která by měla stabilizovat extracelulární doménu vytvořením disulfidového můstku Cys176 s nepárovým Cys163 [92], označeno červeným můstkem. Teoretická hmotnost této části LLT1 je 14 068,68 a teoretická hodnota pI 6,12. Transmembránové úseky, vypočtené hodnoty molekulových hmotností a pI byly vygenerovány pomocí bioinformatických nástrojů Phobius a Compute pI/Mw tool [101,102].

Oba konstrukty LLT1 i konstrukt hNKR-P1A obsahují sudý počet Cys, konkrétně 6, a mělo by dojít ke spárování cysteinů v rámci jedné molekuly monomeru.

5.2 Příprava expresních plazmidů

V rámci této diplomové práce byly připraveny celkem 2 expresní plazmidy. Oba byly založeny na expresním vektoru pET-30a(+). Polyklonovací oblast vektoru pET-30a(+), kam byly ligovány inzerty kódující připravované proteiny, je znázorněna na obr. 10 [103].

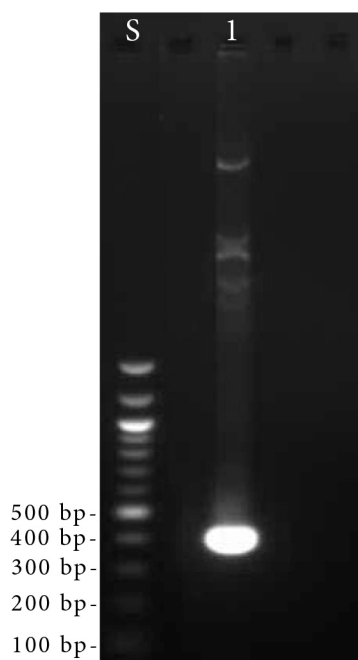


Obr. 10 Polyklonovací a následně expresní oblast vektoru pET-30a(+) [103].

5.2.1 Příprava expresního plazmidu LLT1 Q65

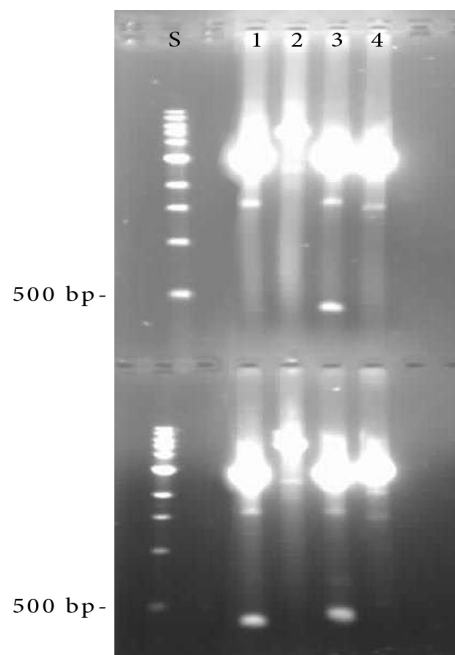
Jako výchozí materiál, dále templát, pro přípravu expresního vektoru LLT1 Q65 byl použit vektor pBluescript SK+, který obsahoval inzert kódující extracelulární doménu připravený Mgr. Branislavem Slávikem. S templátem byla provedena PCR amplifikace pomocí primerů LLT1 Q65 FW a LLT1 Q65 REV, které vymezily oblast amplifikované DNA na úsek kódující část extracelulární domény Gln65-Val191. Po PCR bylo odebráno z reakční směsi 10 µl a analyzováno na agarosové elektroforéze. Výsledek PCR amplifikace

viz. obr. 11., očekávaná délka produktu měla být 390 párů bazí (bp). Agarosová elektroforéza potvrdila přítomnost inzertu očekávané délky v dráze 1.



Obr. 11 Výsledek PCR amplifikace inzertu, očekávaná délka produktu 390 bp.
Dráha 1 – produkt PCR amplifikace, S – standard

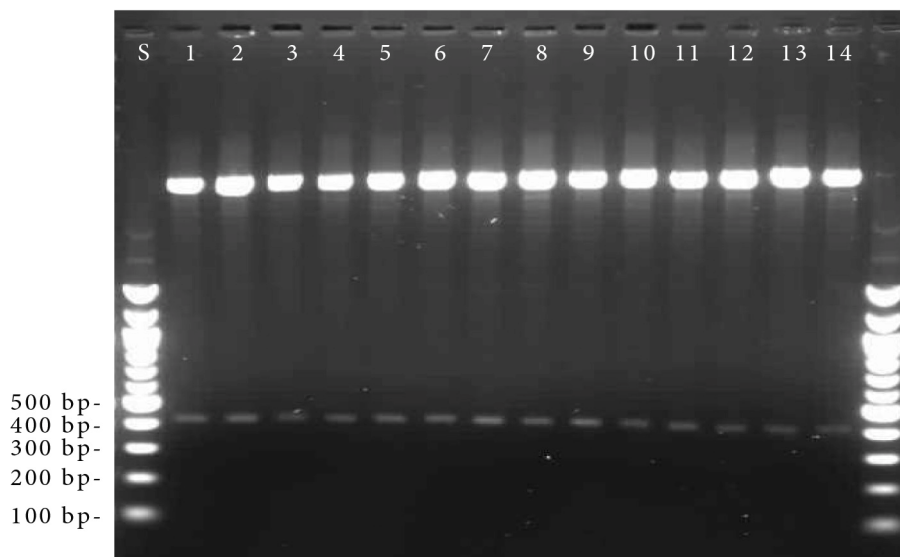
Produkt PCR byl dále ligován do vektoru pBluescript II SK(+) (pBSSK+) pomocí ligace v kombinaci restrikním štěpením. Na ligaci bylo použito 15,5 μ l PCR produktu a 1 μ l vektoru pBSSK+ ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Po ligaci byly 10 μ l ligační směsi transformovány kompetentní buňky *E. coli* Nova Blue, poté byly natřeny na agarové plotny s ampicilinem ($c = 150 \mu\text{g}/\text{ml}$), dále Amp a tetracyklinem ($c = 12,5 \mu\text{g}/\text{ml}$), dále Tet a inkubováno přes noc při 37 °C. Rezistence na Amp je kódována vektorem pBSSK+ a rezistenci na Tet mají kompetentní buňky v genomu. Z narostlých kolonií byly vypíchnuty 4 kolonie a přeočkovány do 1 ml LB média Amp, Tet a byly připraveny noční kultury. Následovala minipreparativní izolace plazmidové DNA a kontrolní restrikním štěpení vybranými restrikními endonuklasami. DNA byla štěpena dvojicemi enzymů *NdeI*, *XbaI* – očekávaná délka fragmentu 410 bp a *XbaI*, *EcoRI* – očekávaná délka fragmentu 428 bp. Přítomnost očekávaného fragmentu u obou kontrol vykazala pouze DNA izolovaná z klonu prezentovaného ve 3. dráze viz. obr. 12.



Obr. 12 Výsledek kontrolního restričního štěpení. Horní řada štěpeno *XbaI*, *NdeI*. Spodní řada štěpeno *XbaI*, *EcoRI*. S – standard

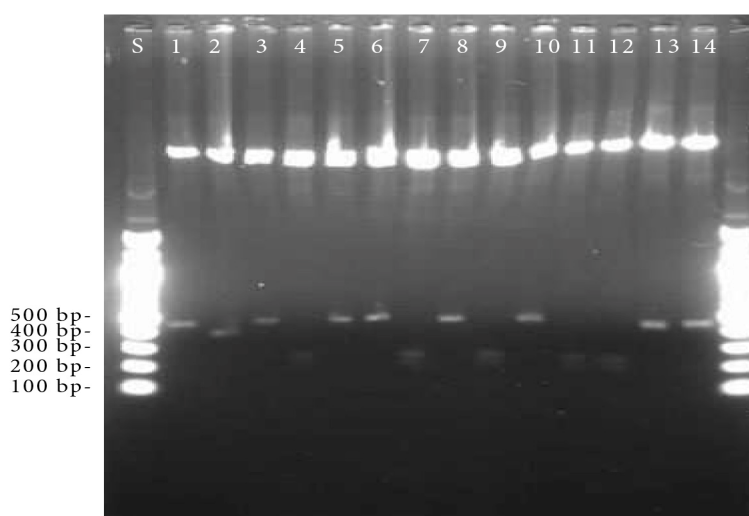
Klon nesoucí plazmid prezentovaný v dráze 3 byl namnožen v 5×4 ml LB média Amp, Tet. Byla provedena minipreparativní izolace plazmidu a získané roztoky byly spojeny. Koncentrace DNA v roztoku vektoru pBSSK+ s inzertem byla $c = 0,61 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dále bylo použito 18 μl této DNA, která byla štěpena restričními endonukleasami *NdeI* a *NotI*. Celý objem směsi po štěpení byl nanesen na agarosovou elektroforézu do spojených jamek, vizualizovaný inzert byl vyříznut v gelu a následně z gelu extrahován pomocí soupravy. Stejným postupem bylo rozštěpeno také 18 μl zásobního roztoku vektoru pET-30a(+) a z gelu byl vyextrahován linearizovaný vektor. Získáno bylo 50 μl inzertu o koncentraci $0,155 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 50 μl linearizovaného vektoru pET-30a(+) $c = 0,265 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dále byla provedena ligace inzertu do linearizovaného vektoru. Pipetovány byly dvě reakce a v obou byl poměr inzertu ku plazmidu 3:1. Ligace 1 obsahovala přibližně 300 ng inzertu a 100 ng plazmidu a ligace 2 přibližně $7 \times$ větší množství ve stejném poměru. Po ligaci byly 10 μl ligačních směsí transformovány kompetentní buňky *E. coli* Nova Blue, napěstovány na agarových plotnách s tetracyklinem a kanamycinem ($c = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$), dále Kan. Rezistenci na Kan nese vektor pET-30a(+). Bylo vypíchnuto 7 kolonií z ligace 1 a 7 kolonií z ligace 2, dále byly připraveny

2 ml noční kultury a z 1,5 ml byla provedena minipreparativní izolace plazmidové DNA. Získaná DNA byla štěpena restričními endonuklasami *NdeI*, *NotI* pro kontrolu přítomnosti inzertu v expresním vektoru pET-30a(+). Výsledek byl analyzován na agarosové elektroforéze obr. 13., očekávaná velikost vyštěpeného inzertu byla 436 bp.



Obr. 13 Výsledek kontrolního restričního štěpení enzymy *NdeI* a *NotI*. Inzerty jsou viditelně přítomny ve všech drahách. S – standard

Inzerty byly sice přítomny ve všech klonech, ale pro kontrolu správnosti připraveného vektoru bylo provedeno další štěpení restričními endonukleasami *XbaI* a *HindIII*, které mělo vykázat přítomnost fragmentů o velikosti 194 bp a 233 bp. Výsledek viz. obr. 14.



Obr. 14 Výsledek kontrolního restričního štěpení enzymy *XbaI* a *HindIII*. Očekávané fragmenty jsou viditelně přítomny v drahách 4,7,9,11 a 12. S – standard

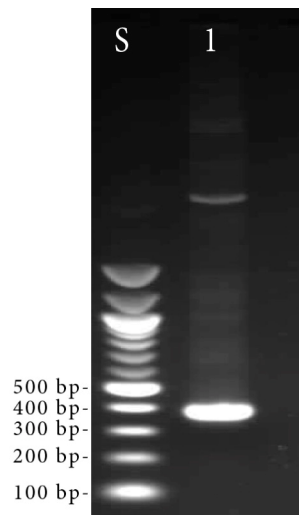
Pro potvrzení správnosti připraveného expresního vektoru sekvenací byly zvoleny klony prezentované v drahách 9 a 11. Nočními kulturami 9 a 11 byly zaočkovány kličkou agarové plotny Kan, Tet a předány na sekvenaci. Výsledky sekvenace odhalily přítomnost transverzní bodové mutace A→T měnící aminokyselinu arginin v pozici 175 na tryptofan u obou předaných vzorků. Byla provedena velkoobjemová izolace plazmidové DNA z 500 ml LB média Kan, Tet zaočkováného 100 µl kultury č. 9, výtěžek a čistota získané DNA viz. tab. 3. Izolovaná DNA sloužila jako výchozí materiál pro pokusy o opravu mutace pomocí PCR s mutačními primery. Optimalizována byla teplota nasedání primerů, jejich koncentrace a také koncentrace templátu. Žádný experiment však nebyl úspěšný, protože nikdy nevznikl produkt PCR. Tento expresní vektor tedy nemohl být použit pro rekombinantní expresi proteinu.

Tabulka 3 – Výsledky velkoobjemové izolace plazmidové DNA

plazmid	A _{260/280}	výtěžek (µg)
pET-30a(+) Q65 (R175W)	1,86	100

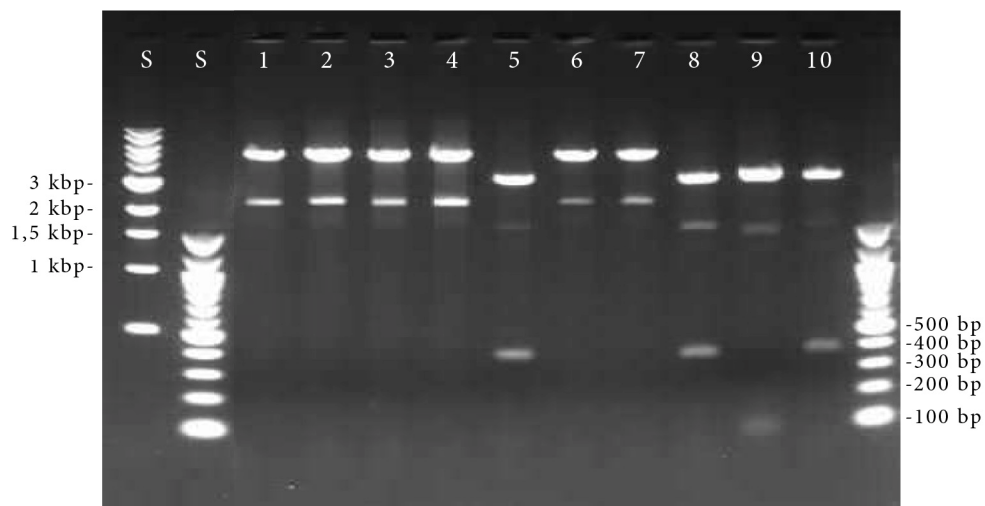
5.2.2 Příprava expresního vektoru LLT1 L71 (H176C)

Výchozím materiálem pro přípravu expresního vektoru LLT1 L71 (H176C) byl konstrukt vyrobený Bc. Janem Bláhou založený na vektoru pTT28 s inzertem kódujícím úsek extracelulární domény Gln72-Val191 s cílenou mutací H176C. S tímto templátem byla provedena PCR amplifikace pomocí primerů LLT1 L71 (H176C) FW a LLT1 L71 (H176C) REV, které byly navrženy tak, aby výsledný PCR produkt kódoval úsek Leu71-Val191. Výsledek PCR amplifikace byl proveden analýzou 10 µl reakční směsi po PCR na agarosové elektroforéze obr. 15., očekávaná délka PCR produktu byla 381 bp.



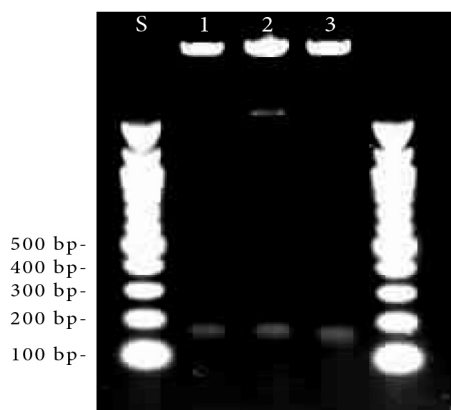
Obr. 15 Výsledek PCR amplifikace, očekávaná délka produktu 381 bp.
Dráha 1 – produkt PCR amplifikace, S – standard

Získaný PCR produkt byl ligován do vektoru pBSSK+, pomocí ligace v kombinaci s restričním štěpením *SmaI*. Ligační směs obsahovala 15,5 µl produktu PCR, 1 µg pBSSK+ a další příslušné složky. Po ligaci byly 10 µl ligační směsi transformovány kompetentní buňky *E. coli* Nova Blue, vysety na agarové plotny Amp, Tet s IPTG a X-Gal. Z narostlých kolonií bylo po modro-bílé selekci vypíchnuto 10 bílých kolonií, z každé byly připraveny 3 ml noční kultury a byla provedena minipreparativní izolace plazmidové DNA. Kontrola přítomnosti inzertu proběhla štěpením restričními endonukleasami *BamHI* a *PstI*. Výsledek byl analyzován na agarosové elektroforéze obr. 16, délka očekávaného fragmentu byla 392 bp.



Obr. 16 Výsledek kontrolního restričního štěpení plazmidu pBSSK+ se zaligovaným inzertem enzymy *BamHI* a *PstI*. Očekávané fragmenty jsou přítomny v pozicích 5, 8 a 10.
S – standard

Klony č. 5, 8 a 10, jež vykazovaly pozitivní výsledky, byly podrobeny další kontrole provedenou restriční endonukleasou *HindIII*, která by měla poskytnout fragment o velikosti 166 bp. Výsledek štěpení *HindIII* byl analyzován agarosovou elektroforézou a je zobrazen na obr. 17. Přítomnost inzertu ve vektoru pBSSK+ vykazaly všechny tři klony 5, 8 i 10.



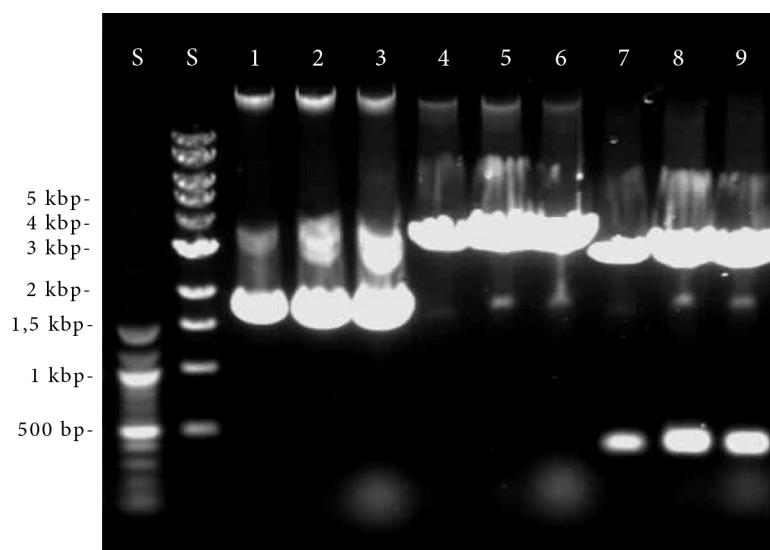
Obr. 17 Výsledek kontrolního restričního štěpení vektoru pBSSK+ se zaligovaným inzertem enzymem *HindIII*. Fragменты očekávané délky v drahách 1-3 jsou viditelně přítomny u klonů 5, 8 i 10. S – standard

Dále bylo 100 μ l noční kultury klonu 5, 8 a 10 zaočkováno pokaždě 500 ml LB média Amp, Tet. Proběhla kultivace přes noc při 37 °C a následovala velkoobjemová izolace plazmidové DNA. Množství a čistota získané DNA uvedeno v tab. 4.

Tabulka 4 – Výsledky velkoobjemové izolace plazmidů

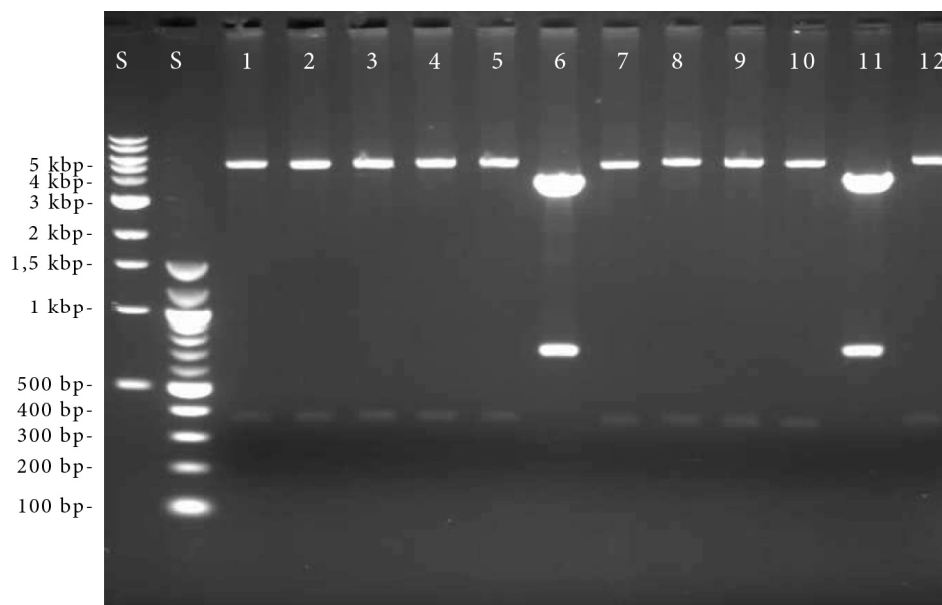
plazmid	A _{260/280}	výtěžek (mg)
pBSSK+ L71 (H176C) 5	1,83	1,06
pBSSK+ L71 (H176C) 8	1,86	2,00
pBSSK+ L71 (H176C) 10	1,87	2,60

Se získanou DNA bylo provedeno kontrolní štěpení restričními endonukleasami *BamHI* a *PstI*. Výsledek byl analyzován na agarosové elektroforéze. Na elektroforézu byly nanášeny neštěpené vektory, vektory štěpené pouze *BamHI* a vektory štěpené *BamHI* i *PstI*. Plazmid linearizovaný *BamHI* měl vykazovat délku okolo 3300 bp a fragment vyštěpený *BamHI* a *PstI* velikost 392 bp viz. obr. 18.



Obr. 18 Výsledek kontrolního restričního štěpení vektoru pBSSK+ se zaligovaným inzertem enzymy BamHI a PstI. Dráhy 1-3 neštěpený vektor, 4-6 štěpený pouze BamHI a 7-9 štěpený BamHI i PstI. Očekávané fragmenty jsou viditelně přítomny v pozicích 7, 8 a 9. S – standard

Vzorky DNA s plazmidem pBSSK+ L71 (H176C) izolovaným z klonů č. 5, 8 a 10 byly předány na sekvenaci. Výsledky sekvenace potvrdily 100% správnost sekvence pouze u plazmidu pBSSK+ L71 (H176C) 5. Pro další postup byl tedy vybrán klon č. 5. Ze zásobního roztoku vektoru pBSSK+ L71 (H176C) 5 ($c = 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) připraveného velkoobjemovou izolací plazmidu bylo odebráno 18 μl a štěpeno restričními endonuklasami *NdeI* a *NotI*, stejně bylo štěpeno také 18 μl zásobního roztoku vektoru pET-30a(+) ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Celé objemy reakčních směsí byly smíseny se stop pufrem, nanесeny do spojených jamek a byla provedena agarosová elektroforéza. Vizualizované proužky indikující inzert a linearizovaný vektor pET-30a(+) byly vyříznuty a z gelu byla vyextrahována DNA. Bylo získáno 50 μl inzertu L71 (H176C) ($c = 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 50 μl linearizovaného vektoru pET-30a(+) ($c = 0,18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Byly připraveny dvě ligační směsi, první obsahovala 300 ng inzertu a 100 ng vektoru (ligace 1) a druhá 300 ng inzertu a 300 ng vektoru (ligace 2). Dále byly 10 μl z každé ligační směsi transformovány kompetentní buňky *E. coli* BL21 Gold DE3 a nasety na agarové plotny Kan, Tet. Po inkubaci na misce s buňkami transformovanými směsí po ligaci 1 narostlo 5 kolonií a po ligaci 2 narostlo 7 kolonií. Všechny kolonie byly vypíchnuty, zaočkovány do 1 ml LB média Kan, Tet a připraveny z nich noční kultury. Následovala minipreparativní izolace plazmidové DNA. Byla provedena kontrola štěpením restričními endonukleasami *NdeI* a *NotI*. Očekávané fragmenty měly mít délku 372 bp viz. obr. 19.



Obr. 19 Výsledek kontrolního restrikčního štěpení enzymy NdeI a NotI. Inzerty jsou viditelně přítomny ve všech drahách kromě dráhy 6 a 11. S – standard

Pro další postup byl vybrán klon č. 1. Z této kultury bylo odebráno 90 μ l kultury a zaočkováno bylo 500 ml LB média Kan, Tet. Po inkubaci přes noc byla provedena velkoobjemová izolace plazmidové DNA a část tohoto vzorku byla předána na sekvenaci. Sekvence potvrdila 100% správnost připraveného expresního vektoru. Výtěžek velkoobjemové izolace plazmidu pET-30a(+) je uveden v tab. 5. Ze zbylé noční kultury klonu č. 3 bylo zaočkováno kličkou na agarovou plotnu Kan, Tet a proběhla inkubace přes noc při 37 °C. Z narostlých kolonií bylo vypíchnuto 8 kolonií, připraveny noční kultury a provedena selekce produkčního klonu viz. 5.3.1.

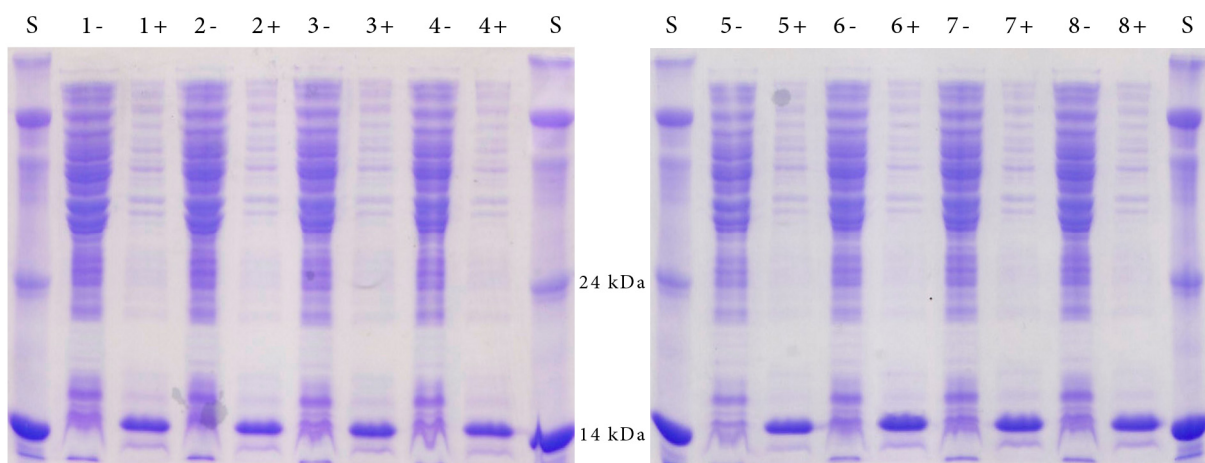
Tabulka 5 – Výsledky velkoobjemové izolace plazmidové DNA

plazmid	$A_{260/280}$	výtěžek (μ g)
pET-30a(+) L71 (H176C)	1,52	298

5.3 Příprava proteinu LLT1 L71 (H176C)

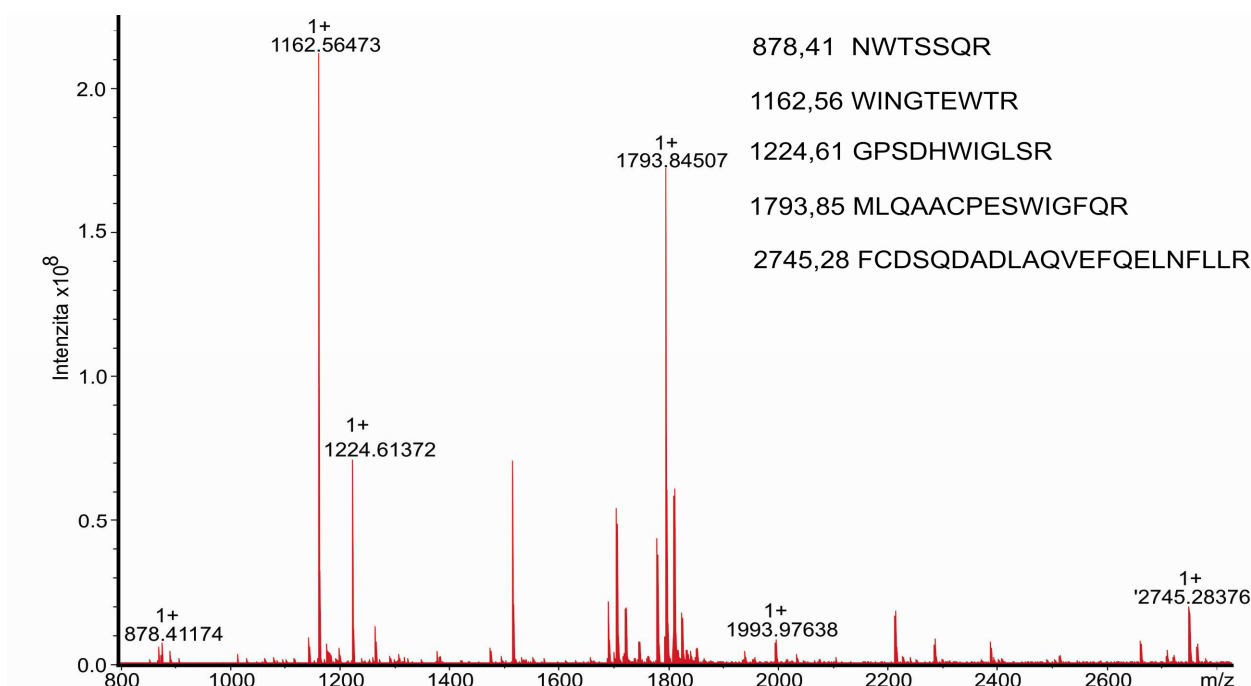
5.3.1 Produkce proteinu

Expres tohoto proteinu probíhala v kultuře *E. coli* BL21 Gold (DE3). S osmi nočními kulturami bakterií transformovaných plazmidem pET-30a(+) L71 (H176C) byla provedena selekce produkčního klonu viz . 4.2.2. Výsledek byl analyzován na SDS-PAGE obr. 20.



Obr. 20 Výsledek selekce produkčního klonu. Liché dráhy bez indukce, sudé dráhy po indukci. Jako produkční klon byl vybrán klon prezentovaný ve dráze 6+. S – standard

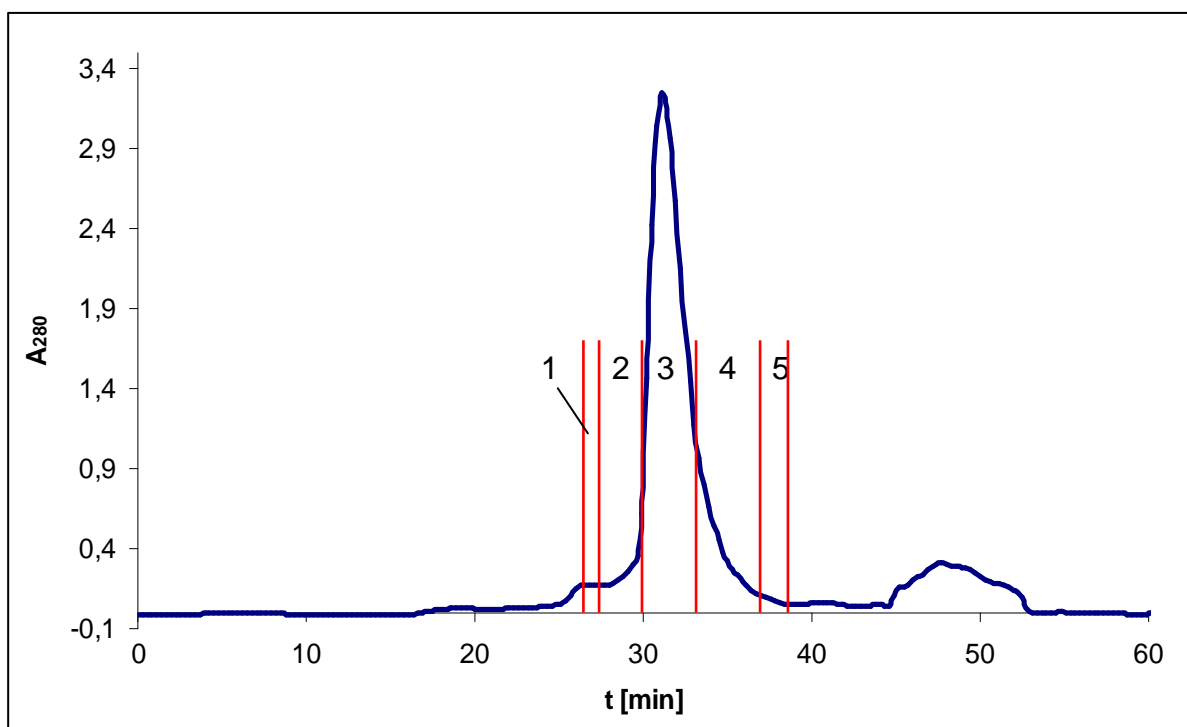
Produkce proteinu byla pozorována u všech analyzovaných klonů v dostatečné míře. Pro ověření správnosti proteinu byl vyříznut proužek označený v dráze 6+, bylo provedeno štěpení proteinu v polyakrylamidovém gelu trypsinem. Získané peptidy byly analyzovány MALDI MS a výstupní data byla porovnána s databází v programu Mascot. Protein byl identifikován jako LLT1 a pokrytí sekvence bylo 81%. MALDI MS spektrum tryptických štěpů s některými přiřazenými peptidy viz obr. 21. Měření provedl RNDr. Petr Novák, PhD. Následovala velkoobjemová produkce proteinu v 1 litru LB média Kan, Tet dle postupu viz. kap. 4.2.3. Podmínky velkoobjemové produkce proteinu byly převzaty z protokolu uvedeného v publikaci pracovní skupiny J. Kamishikiryoa [92]. Z produkční kultury byla izolována inkluzní tělíska viz. 4.2.4. Získaná inkluzní tělíska byla rozdělena na 4 stejné díly. Dále bylo postupováno dle známého protokolu z publikace [92].



Obr. 21 MALDI FT-ICR MS spektrum tryptických štěpů proteinu LLT1 L71 (H176C) s přiřazenými identifikovanými peptidy.

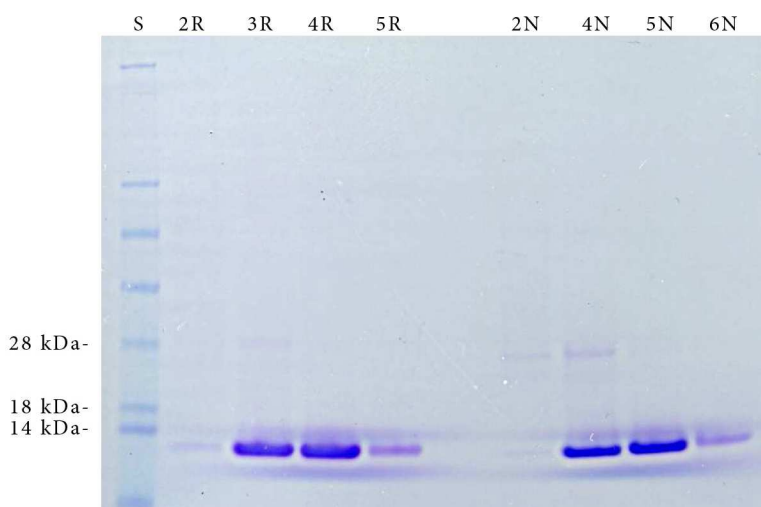
5.3.2 Renaturace a purifikace proteinu

Jeden díl inkluzních tělísek byl resuspendován a solubilizován v 1 ml guanidinového pufru viz. 3.7 Tento solubilizační roztok neobsahoval žádné redukční činidlo. Po rozpuštění sedimentu byla stanovena koncentrace proteinů v roztoku dle Bradfordové kap. 4.5.1. Koncentrace roztoku byla stanovena na 10 mg/ml, bylo odebráno 280 μ l roztoku, což odpovídalo 2,8 mg denaturovaného proteinu. Toto množství proteinu bylo renaturováno pomocí 100 ml předem vychlazeného renaturačního pufru viz. 3.7 metodou pomalého naředění kap. 4.3.2. Roztok byl po renaturaci ultrafiltrován na objem cca 40 ml, přefiltrován přes 0,22 μ m filtr a pomocí centrifugačních koncentrátů zakoncentrován na 500 μ l. Tento roztok byl centrifugován 5 min, 20 000 g. Na dně mikrozkuhavky byla pozorovatelná malá peleta, což poukazuje na částečnou precipitaci proteinu. Dále proběhla gelová filtrace na koloně Superdex 75 10/300 GL s použitím pufru pro gelovou filtraci (LLT1 H176C) viz. 3.7 při průtoku 0,4 ml/min. Supernatant byl Hamiltonovou stříkačkou nanesen na HPLC systém ÄKTAbasic s připojenou kolonou promytou puftrem. Jednotlivé frakce byly jímány do mikrozkuhovek a následně byly analyzovány na SDS-PAGE. Eluční profil gelové filtrace LLT1 L71 (H176C) viz. obr. 22.



Obr. 22 Eluční profil gelové filtrace proteinu LLT1 L71 (H176C) na koloně Superdex 75 10/300 GL při průtoku 0,4 ml/min. Jímány byly frakce označené 1-5.

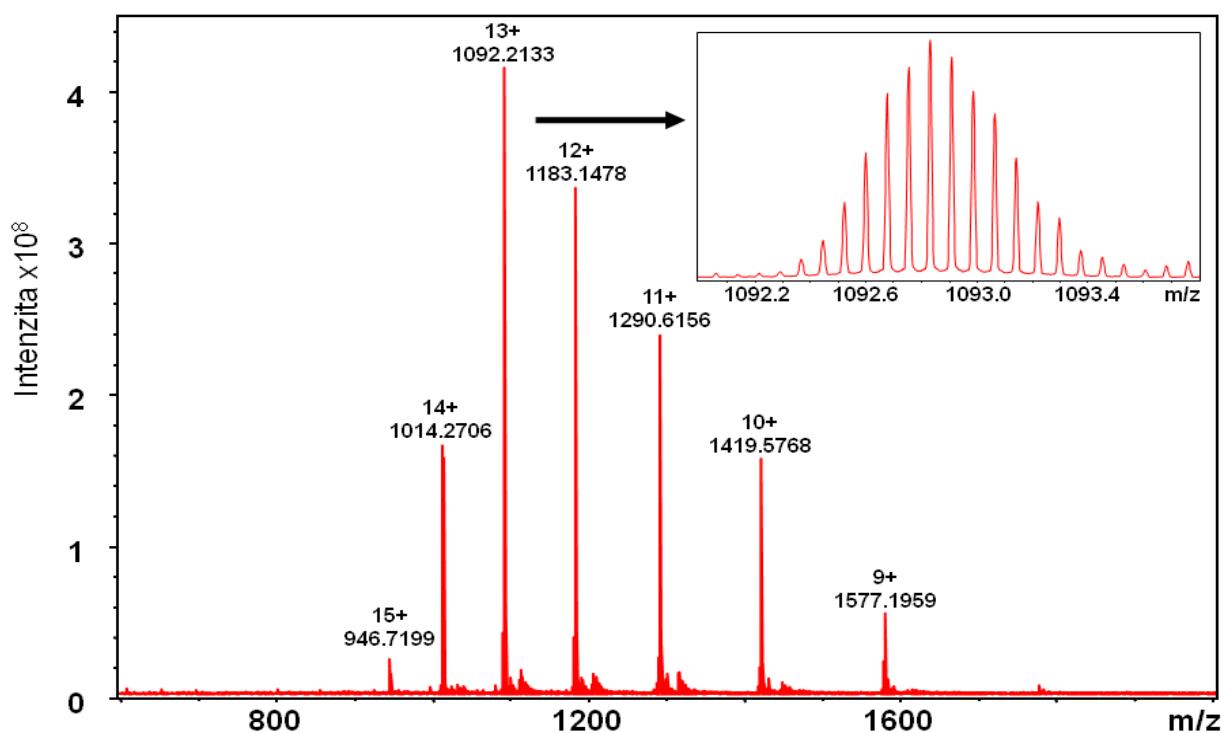
Z frakcí 2, 3, 4, a 5 bylo odebráno $2 \times 10 \mu\text{l}$ a smíšeno se stejným objemem redukujícího a neredukujícího vzorkového pufru a proběhla analýza na SDS-PAGE viz obr. 23. Nejvyšší čistotu a koncentraci proteinu vykazala frakce 4, ve které se protein vyskytoval pouze ve formě monomeru. Tato frakce byla zvolena pro změření přesné hmotnosti proteinu a pokus o určení lokalizace disulfidových vazeb.



Obr. 23 Analýza frakcí z gelové filtrace proteinu LLT1 L71 (H176C). Redukované vzorky označeny R a neredukované N. S – standard

5.3.3 Charakterizace připraveného proteinu

U jednotlivých frakcí byla stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové a celkový výtěžek proteinu byl 1,15 mg. Pro změření přesné hmotnosti bylo z frakce 4 odebráno 25 μl (10 μg), protein byl odsolen dle postupu 4.5.9 a předán RNDr. Petru Novákovi, PhD., který provedl analýzu pomocí ESI/FT-ICR MS. Výsledné spektrum viz. obr. 24. Po dekonvoluci spektra byla stanovena přesná monoizotopická hmotnost celé molekuly proteinu LLT1 L71 (H176C) $[M+H]^+$ s iniciačním methioninem a po spárování všech 6 cysteinů na 14 185,69 Da s chybou měření 1,4 ppm.



Obr. 24 ESI/FT-ICR hmotnostní spektrum proteinu LLT1 L71 (H176C). Přesná monoizotopická hmotnost celé molekuly $[M+H]^+$ byla stanovena na 14185,69 Da.

Poslední experiment provedený s proteinem LLT1 L71 (H176C) bylo stanovení lokalizace disulfidových vazeb v molekule monomeru. Tři vzorky 4 μg proteinu z frakce 4 po gelové filtraci byly připraveny dle postupu 4.5.7, štěpení probíhalo pomocí trypsinu, chymotrypsinu a Glu-C, následně byly peptidy odsoleny viz 4.5.8. Poté byly vzorky připraveny na LC/MS viz. 4.5.10 a převedeny do vialek se septem. Vzorky byly předány RNDr. Petru Manovi, PhD., který provedl měření LC/MS ESI/FT-ICR. Získané peptidy byly separovány pomocí μHPLC systému Agilent 1200 na koloně s reverzní fází. Systém byl připojen

na iontový zdroj ESI a analýza probíhala pomocí FT-ICR MS. Po štěpení proteasami vznikly také dvojice peptidů, které byly spojeny disulfidovou vazbou. Vyhodnocení spekter spočívalo v nalezení co největšího počtu signálů těchto dvojic spojených peptidů s co nejvyšší intenzitou a co nejnižší chybou. Tyto dvojice peptidů byly seřazeny dle intenzity sestupně a dle chyby vzestupně. Vyřazeny byly peptidové dvojice, u nichž chyba přesahovala 3 ppm a relativní intenzita nepřesahovala 1×10^5 . Podle zastoupení dvojic spojených cysteinů v jednotlivých dvojicích peptidů byla stanovena lokalizace disulfidových vazeb. Příklady nejprůkaznějších peptidových dvojic viz. tab. 6 (cysteiny označeny žlutě, Cys176 zeleně). Bylo prokázáno předpokládané spojení Cys163 s Cys176, který byl do sekvence vnesen cílenou mutací H176C [92]. Názorné zapojení disulfidových vazeb v celkové sekvenci připravovaného proteinu viz. obr. 25.

Tabulka 6 – Vybrané dvojice peptidů spojených disulfidovou vazbou

sekvence peptidů	spojené cysteiny	experimentální hmotnost	chyba (ppm)	rel. intenzita
C₈₆ FYFSDDTK- MLQAAC C₇₅ PESWIGFQR	Cys ₇₅ -Cys ₈₆	2875,2495	1,1	$1,06 \times 10^8$
GASSAR C₁₇₆ Y- TRQFPILGAGE C₁₆₃ AYLNDK	Cys ₁₆₃ -Cys ₁₇₆	2807,3257	0,5	$3,85 \times 10^8$
I C₁₈₄ SKSDIHV- C₁₀₃ DSQDADLAQVESFQEL	Cys ₁₀₃ -Cys ₁₈₄	2896,3000	0,7	$7,71 \times 10^7$

Sekvence LLT1 (H176C):

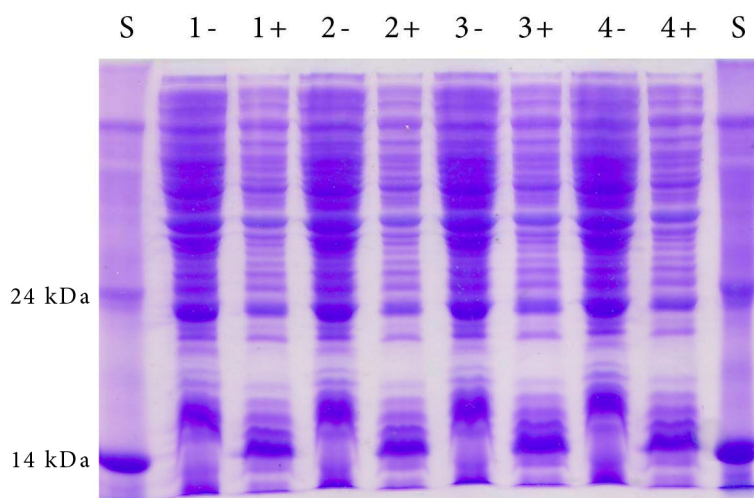
MHDSNNVEKDITPSEL PANPGCLHSKEHSIKATLIWRLFFLIMFLTIIVCGMVAALSAIRAN
 CHQEPSVCLQAAC**PESWIGFQRK****C**FYFSDDTKNWTSSQRF**C**DSQDADLAQVESFQELNFLLR
 YKGPSDHWIGLSREQQPWKWINGTEWTRQFPILGAGE**C**AYLNDKGASSAR**C**YTERKWI**C**SK
 SDIHV

Obr. 25 Zapojení disulfidových vazeb u proteinu LLT1 L71 (H176C).

5.4 Příprava proteinu hNKR-P1A Q80

5.4.1 Produkce proteinu

Produkce proteinu probíhala v kultuře *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) RIPL. Tato kultura byla transformována plazmidem pET-30a(+) obsahujícím inzert kódující úsek extracelulární domény v rozmezí Gln80-Ser225, který byl připraven Mgr. Alenou Hájkovou. Z narostlých kolonií byly vypíchnuty čtyři kolonie a byla provedena selekce produkčního klonu viz. 4.2.2, výsledek byl analyzován na SDS-PAGE obr. 26.



Obr. 26 Výsledek selekce produkčního klonu. Liché dráhy bez indukce, sudé dráhy po indukci. Jako produkční klon byl vybrán klon prezentovaný ve dráze 3+. S – standard

Produkce proteinu o přibližné velikosti 17 kDa byla pozorována u všech analyzovaných klonů v dostatečné míře. Pro ověření správnosti proteinu byl vyříznut proužek označený v dráze 3+, bylo provedeno štěpení proteinu v polyakrylamidovém gelu trypsinem. Získané peptidy byly analyzovány MALDI MS a výstupní data byla porovnána s databází v programu Mascot. Protein byl identifikován jako hNKR-P1A a pokrytí sekvence bylo 51%. Měření provedl RNDr. Hynek Mrázek, PhD. Následovala velkoobjemová produkce proteinu ve 2 l LB média Kan, Tet dle postupu viz. kap. 4.2.3. Z produkční kultury byla izolována inkluzní tělíska viz. 4.2.4., která sloužila jako výchozí materiál pro další experimenty.

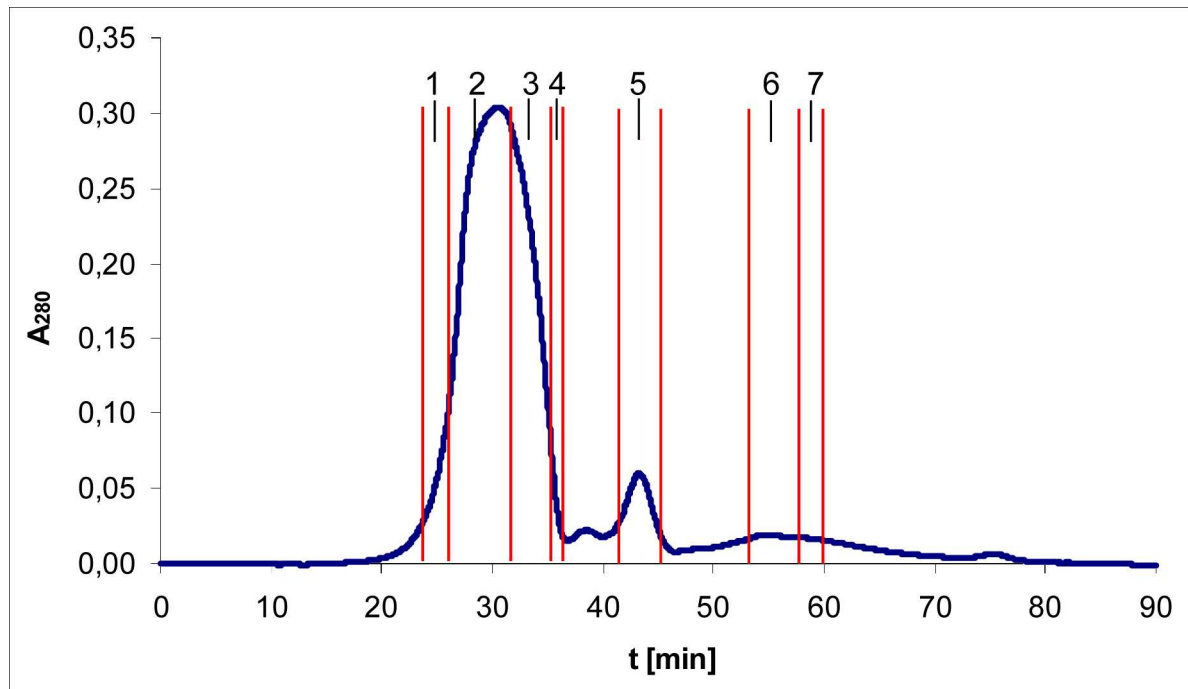
5.4.2 Optimalizace renaturace proteinu

Inkluzní tělíška získaná z 1 l produkční kultury byla resuspendována a solubilizována ve 4 ml guanidinového pufru. Na solubilizaci byl použit guanidinový pufr viz 3.7. Přítomnost DTT v pufru redukuje disulfidové vazby, aby mohly být správně spojeny redoxním systémem, a guanidin denaturuje nerozpustný protein. Poté proběhla inkubace 1 h při 45 °C, roztok byl vyčeřen centrifugací viz. 4.2.5 a vždy 1 ml supernatantu bylo za stálého míchání pomalu přikapáno do 100 ml předem vychlazeného pufru s přidáním PMSF viz. 4.2.5. Složení renaturačních pufrů viz. tab. 7. Po hodině míchání při 4 °C byly roztoky převedeny do dialyzačních trubic a dialyzovány oproti 8 l dialyzačního pufru (15 mM Tris-HCl, 9 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH shodné s renaturačním pufrům) přes noc a poté ve stejném čerstvém pufru 6 hodin. Již při renaturaci byla patrná částečná precipitace proteinu a po dialýze byla pozorována výrazná precipitace ve všech vzorcích. Následná purifikace proteinu ionexovou chromatografií na koloně Q Sepharosy FF s lineárním gradientem NaCl při průtoku 3 ml/min prokázala neúspěch renaturace rovnými elučními profily.

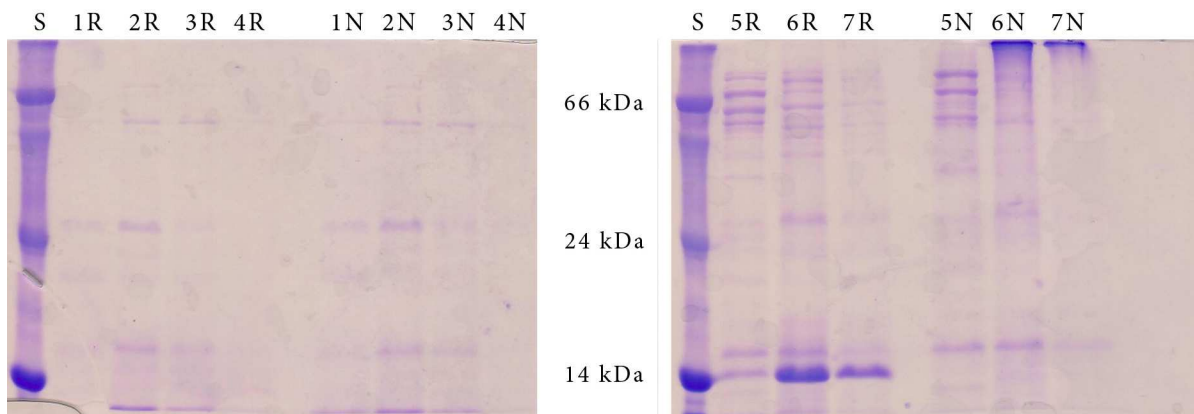
Tabulka 7 – Složení renaturačních pufrů při optimalizaci renaturace 1

pufr	č. 1	č. 2	č. 3	č. 4
Tris-HCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
CaCl ₂	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
L-Arg	1 M	1 M	0,4 M	1 M
cystamin	3 mM	3 mM	3 mM	2 mM
cysteamin	9 mM	9 mM	9 mM	4 mM
NaN ₃	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
pH	8,5	9,0	8,5	8,5

Inkluzní tělíška z 200 ml produkční kultury byla rozpuštěna ve 4 ml pufru (6 M guanidin-HCl v PBS viz. 3.7, 1 mM TCEP, 0,03% *N*-laurylsarcosin) [97]. Následovala inkubace 30 min, 50 °C. Roztok byl vyčefěn centrifugací viz. 4.2.5. Supernatant byl pomalu nakapán za stálého míchání do 200 ml vychlazeného renaturačního pufru B12 s přidaným PMSF viz. 4.2.5. Po 3 hodinách míchání při 4 °C byl roztok převeden do dialyzačních trubic a dialyzován přes noc oproti 8 l pufru B (20 mM Tris-HCl, 240 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0) a 6 hodin oproti stejnému objemu pufru A (20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0) oba pufrы viz. [97]. Žádná precipitace pozorována nebyla. Po dialýze byl roztok přefiltrován přes 0,22 μm filtr a následovala ionexová chromatografie. Kolona Q Sepharosy byla připojena na HPLC systém Biosys 510, promyta pufrém B (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0) a následně pufrém A (20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0). Roztok proteinu byl nanesen na kolonu a následně byl protein eluován lineárním gradientem NaCl od 20 mM do 1 M koncentrace za 60 min, průtok byl 3 ml/min. Eluční profil viz. obr. 27. Jednotlivé frakce byly jímány, zakoncentrovány na 500 μl a na SDS-PAGE bylo analyzováno 10 μl vzorku + 10 μl redukujícího a neredukujícího vzorkového pufru viz. obr. 28.



Obr. 27 Eluční profil ionexové chromatografie proteinu hNKR-P1A Q80 na koloně Q Sepharosy FF při průtoku 3 ml/min. Jímány byly frakce označené 1-7.



Obr. 28 Analýza zakoncentrovaných frakcí z ionexové chromatografie proteinu hNKR-PIA Q80. Redukované vzorky označeny R a neredukované N. S – standard

V redukovaných vzorcích 5, 6 a 7 je proužek proteinu jasně zřetelný, v neredukovaných však proužek očekávané velikosti pozorován nebyl. Pro další optimalizaci renaturace byly navrženy následující renaturační pufrů, složení viz. tab. 8.

Tabulka 8 – Složení renaturačních pufrů při optimalizaci renaturace 2

pufr	A	B	C	D	E
Tris-HCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
CaCl ₂	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
L-Arg	1 M	1 M	–	0,5 M	0,7 M
ox. glutahion	3 mM	0,1 mM	3 mM	3 mM	3 mM
red. glutahion	9 mM	3 mM	9 mM	9 mM	9 mM
M-β-CD*	–	–	200 mM	–	150 mM
3-(BDMA)PS*	–	–	–	0,5 M	–
NaN ₃	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
pH	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0

* M-β-CD - methyl-β-cyklodextrin

* 3-(BDMA)PS - 3-(benzyl dimethylamonium)propansulfonát

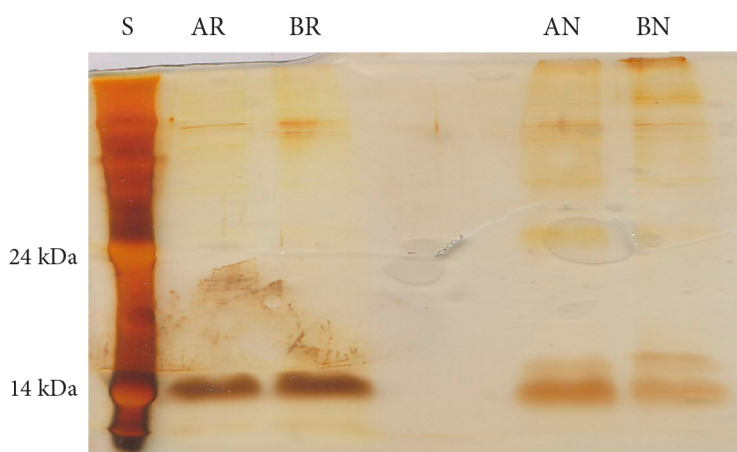
Inkluzní tělíška z 1 l produkční kultury byla rozpuštěna v 5 ml guanidinového pufru (6 M guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, 0,03% *N*-laurylsarcosin, pH 8,0), následovala inkubace 40 min, 50 °C. Roztok byl vyčeřen centrifugací viz. 4.2.5, v supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů dle Bradfordové viz. 4.5.1 a byla upravena na 1 mg/ml guanidinovým pufrem. Do předem vychlazených renaturačních pufrů A a B (V = 590 ml) bylo pomalu přikapáno za stálého míchání 10 ml denaturovaného proteinu a do pufrů C, D a E (V = 95 ml) bylo přikapáno 5 ml denaturovaného proteinu. Po 1 hodině míchání při 4 °C byly roztoky převedeny do dialyzačních trubic a dialyzovány 4 h a oproti 8 l dialyzačního pufru viz. 3.7 a následně 7 h oproti čerstvému dialyzačnímu pufru. Již při renaturaci a také po dialýze byla pozorována precipitace u vzorků C, D a E. Po dialýze byly odebrány vzorky z obsahu trubic a spektrofotometricky byla měřena absorbance při 320 nm pro detekci agregátů a při 280 nm pro přítomnost proteinu, jako pozadí byl použit pufr po dialýze. Měření probíhalo na spektrofotometru DU-70. Naměřené hodnoty absorbance uvedeny v tab. 9.

Tabulka 9 – Naměřené hodnoty absorbance vzorků po dialýze

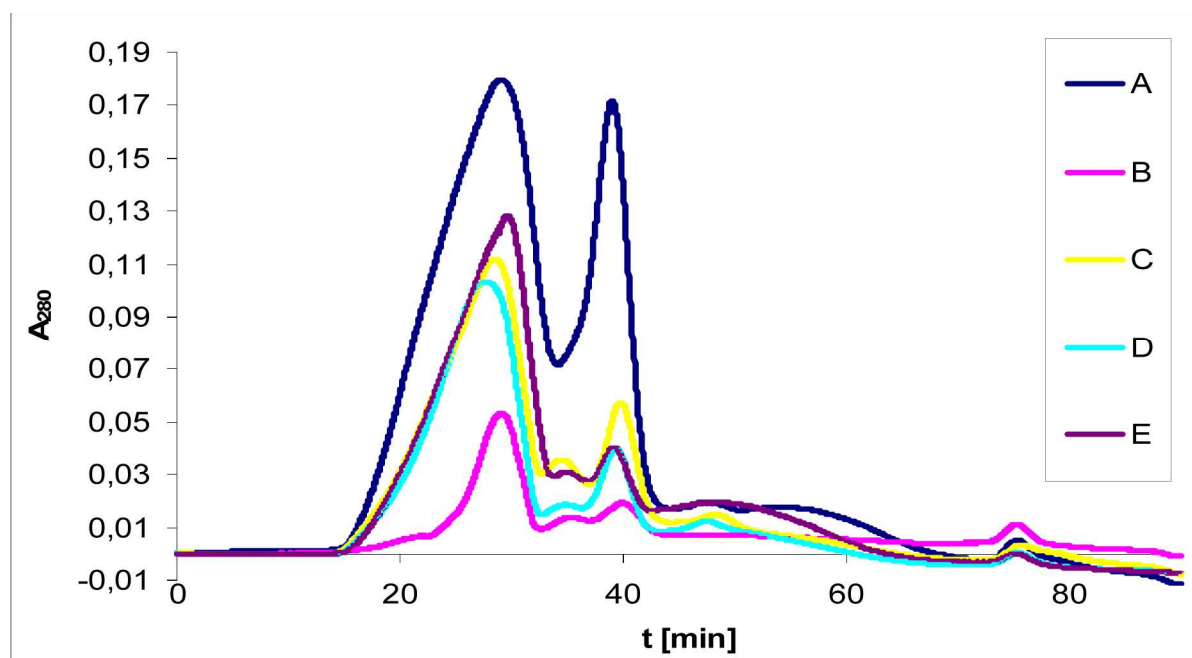
vzorek	A₂₈₀	A₃₂₀	A_{280/320}
A	0,2551	0,0287	8,88
B	0,1290	0,0311	4,15
C	0,2664	0,1227	2,17
D	0,3627	0,1541	2,35
E	0,3163	0,1116	2,83

Ze vzorků analyzovaných na spektrofotometru bylo odebráno 10 µl a smíseno se stejným objemem redukujícího a neredukujícího vzorkového pufru. Proběhla analýza SDS-PAGE a gely byly obarveny stříbrem, výsledky renaturace A a B viz. obr. 29. U vzorků C, D, E byla pozorována precipitace proteinu a analýza neprokázala přítomnost renaturovaného proteinu. Výsledky vykazaly jako předpokládanou nejúspěšnější podmínku renaturační pufr A. Vzorek byl ultrafiltrován na cca 300 ml A a vzorek B na 50 ml. Vzorky C, D, E ultrafiltrovány nebyly. Následovala ionexová chromatografie. Kolona Q Sepharosy

byla připojena na HPLC systém Biosys 510, byla promyta pufrem B (15 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0) a následně pufrem A (15 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0). Všechny nanášené roztoky proteinu byly přefiltrovány přes 0,22 μm filtr, postupně nanášeny na kolonu a následně eluovány lineárním gradientem NaCl od 50 mM do 1 M koncentrace za 60 min při průtoku 3 ml/min. Porovnání elučních profilů viz. obr. 30.

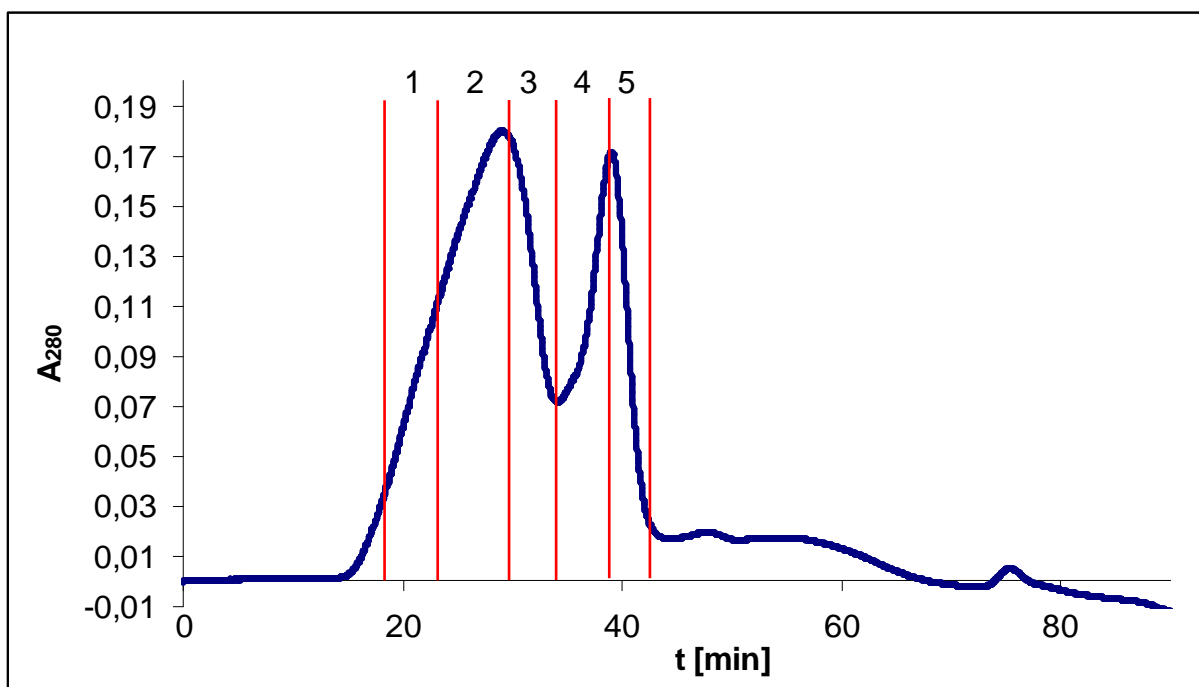


Obr. 29 Analýza optimalizace renaturace proteinu po dialýze (podmínka A a B). Redukované vzorky označeny R a neredukované N. S – standard

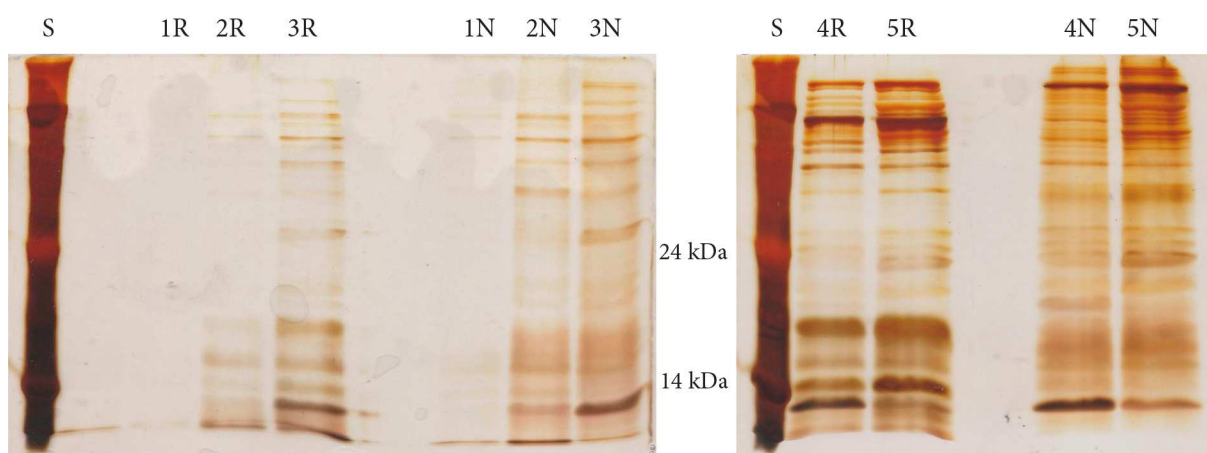


Obr. 30 Eluční profily ionexové chromatografie při optimalizaci renaturace na koloně Q Sepharosy FF při průtoku 3 ml/min.

Nejlepší výsledek po ionexové chromatografii vykázal vzorek A. Jímané frakce viz. obr. 31 byly analyzovány jako 10 × koncentrované vzorky po 10 µl se stejným objemem redukujícího a neredukujícího vzorkového pufru na SDS-PAGE viz. obr. 32.

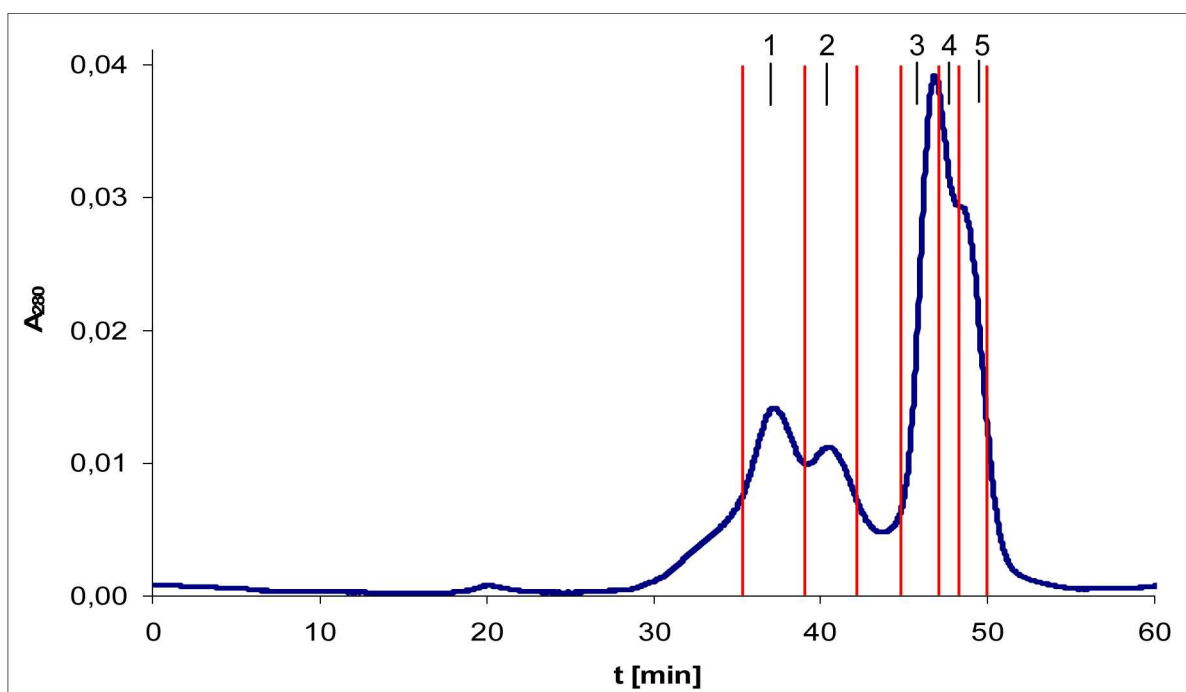


Obr. 31 Eluční profil ionexové chromatografie vzorku A na koloně Q Sepharosy FF při průtoku 3 ml/min. Jímané frakce jsou označeny 1-5.

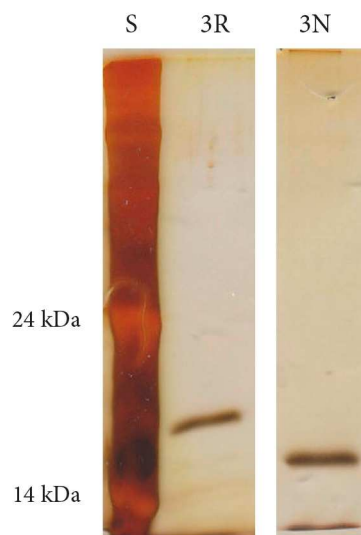


Obr. 32 Analýza jímaných frakcí 1-5 z ionexové chromatografie. Redukované vzorky označeny R a neredukované N. Barveno stříbrem. S – standard

Frakce 4 a 5 byly zakoncentrovány na 500 μ l a byla s nimi provedena gelová filtrace na koloně Superdex 200 10/300 GL, která byla připojena na HPLC systém Biosys 510. Kolona byla promyta pufrem (15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0), průtok činil 0,4 ml/min. Vzorky byly centrifugovány 16 000 g, 3 min a poté nanесeny na kolonu. Jednotlivé frakce byly jímány do mikrozkuavek. Eluční profil gelové filtrace frakce 4 z ionexové chromatografie, jehož analýza vykázála nejlepší výsledek viz. obr. 33. Jímané frakce byly zakoncentrovány na 50 μ l, vždy 10 μ l bylo smíseno se stejným objemem redukujícího a neredukujícího vzorkového pufru a analyzováno na SDS-PAGE. Analýza SDS-PAGE frakce 3 z gelové filtrace viz. obr. 34 vykázála přítomnost proužku očekávané velikosti v redukujícím i neredukujícím prostředí.



Obr. 33 Eluční profil gelové filtrace frakce 4 z ionexové chromatografie na koloně Superdex200 10/300 GL při průtoku 0,4 ml/min. Jímány frakce 1-5.



Obr. 34 Analýza SDS-PAGE frakce 3 z gelové filtrace. Redukované vzorky označeny R a neredukované N. Barveno stříbrem. S – standard

Na obr. 34 je patrná přítomnost renaturovaného proteinu. Získáno však bylo tak malé množství proteinu, odhadem v jednotkách mikrogramů, že nebyla stanovována koncentrace proteinu dle Bradfordové a proto zde není uveden přesný výtěžek.

6. DISKUZE

V širším pojetí je předkládaná diplomová práce součástí projektu, jehož cílem je zmapování interakce vazebných partnerů hNKR-P1A a LLT1 ze strukturního hlediska. Tato práce přispívá svým dílem ve formě optimalizace přípravy hNKR-P1A a přípravy LLT1 s následným ověřením správnosti získaného proteinu, jež bude sloužit jako výchozí materiál pro studium interakce. Povaha a struktura interakce bude studována zejména prostřednictvím hmotnostní spektrometrie a chemického zesíťení, dále NMR spektroskopii či povrchovou plasmonovou rezonancí. Síla interakce ($K_d = 48 \mu\text{M}$) a kinetika této interakce již stanovena byla [92], z hlediska struktury však interakce hNKR-P1A a LLT1 detailně charakterizována nebyla. Rozřešení tohoto problému by svou měrou přispělo k lepšímu pochopení v oblasti receptorového rozpoznávání buněk imunitního systému nesoucích na svém povrchu receptory hNKR-P1A a LLT1.

Prvním úkolem bylo připravit protein hNKR-P1A. Jako výchozí materiál sloužil expresní vektor pET-30a(+) obsahující inzert kódující část extracelulární domény v rozmezí Gln80-Ser225, který byl připraven Mgr. Alenou Hájkovou. Tento úsek obsahoval 6 cysteinů, což byl předpoklad pro vznik tří intramolekulárních disulfidových vazeb a měl být produkován ve formě monomeru. Produkce proteinu probíhala při 28 °C v bakteriálním kmenu *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) RIPL, který je specifický přítomností plazmidů kódujících tRNA typických pro vyšší organismy, jejichž proteiny jsou exprimovány. Tento kmen je tedy možno použít i pro proteiny, které se v jiných kmenech nedaří produkovat, jakož tomu bylo i u proteinu hNKR-P1A. Podmínky produkce byly přejaty z [97]. Byla provedena selekce produkčního klonu, protein o předpokládané velikosti cca 17 kDa byl produkován v dostatečné míře všemi klony viz. obr. 26. Jako produkční klon byl vybrán klon prezentovaný v dráze 3+, který vykázal nejvyšší produkci proteinu. Z této dráhy byla vyříznuta oblast předpokládaného proužku proteinu a byla provedena identifikace pomocí peptidového mapování. Protein byl identifikován jako hNKR-P1A s pokrytím 51% sekvence. Po velkoobjemové produkci byla izolována inkluzní tělíska, se kterými byla prováděna renaturace.

Ač byl znám renaturační pufr, který údajně protein hNKR-P1A s nepříliš valnými výsledky renaturoval [97], bylo z ekonomických důvodů přistoupeno k pokusu o optimalizaci renaturace pomocí finančně méně náročného redoxního systému cystamin/cysteamin viz. tab. 7. Protein byl renaturován metodou rychlého naředění s následnou dialýzou.

Již při renaturaci však ve všech podmínkách docházelo k precipitaci a po dialýze byla precipitace proteinu velmi silná. Purifikace renaturovaného proteinu ionexovou chromatografií vykazala ve všech vzorcích rovné eluční profily, které svědčily o neúspěchu renaturace. Proto bylo přistoupeno k renaturaci proteinu pomocí známého renaturačního pufru B12 [97].

Při renaturaci a následné dialýze precipitace pozorována nebyla. Od ultrafiltrace na malý objem bylo upuštěno, protože bylo zjištěno, že v tomto kroku dochází ke ztrátám až 75% proteinu v důsledku precipitace. Následovala ionexová chromatografie. Z analýzy jednotlivých frakcí obr. 28 s porovnáním elučního profilu viz. obr. 27 je patrné, že ve frakcích 1-4 majoritně absorbuje některá z neproteinových složek nanášeného roztoku proteinu, která se váže na nosič a je eluována gradientem NaCl. Purifikovaný protein byl obsažen částečně ve frakci 5 a ve větší míře ve frakcích 6 a 7. Z porovnání redukovaných a neredukovaných vzorků v drahách 5, 6 a 7 vyplývá, že protein se vyskytoval ve formě agregátů, které v neredukované formě zůstávají na rozhraní zaostřovacího a rozlišovacího gelu nebo vůbec nezaputují ani do gelu zaostřovacího. Agregace proteinu je většinou důsledkem nesprávného sbalování, kdy dochází k nežádoucí interakci hydrofobních aminokyselinových zbytků, což přispívá i k nesprávnému zapojení disulfidových vazeb a následnému propojení většího počtu molekul proteinu. Vznik agregátů tedy signalizuje nesprávnou renaturaci proteinu. Postup byl několikrát opakován. Ani při větších množstvích renaturovaného proteinu a větších objemech renaturačního pufru B12 nebylo purifikováno alespoň malé množství renaturovaného proteinu. Vždy docházelo ke vzniku proteinových agregátů. Bylo nutné hledat renaturační podmínky dále.

Pro detekci vzniku agregátů po renaturaci a dialýze byla zvolena metoda měření absorbance při 320 nm. Vznikají-li v denaturačním pufru při renaturaci a následné dialýze proteinové agregáty, dochází ke zvýšení absorbance při 320 nm [104]. Přítomnost rozpuštěného proteinu v roztoku byla detekována měřením absorbance při 280 nm. Čím vyšší je poměr A_{280}/A_{320} , tím větší by měl být poměr renaturovaného proteinu ku koncentraci proteinových agregátů a tedy vyšší úspěšnost renaturace. Uvedené renaturační pufrы C, D, E obsahovaly M- β -CD a 3-(BDMA)PS viz. tab. 8, což jsou látky, které by měly zamezovat nežádoucím interakcím hydrofobních aminokyselinových zbytků vedoucích k tvorbě agregátů. Dále byl optimalizován redoxní systém red./ox. glutathion a koncentrace L-Arg. Při renaturaci docházelo v pufrách C, D, E k silné precipitaci proteinu, která u pufrů A a B pozorována nebyla. Dle následné analýzy vzorků po dialýze SDS-PAGE byla patrná

přítomnost renaturovaného proteinu pouze ve vzorcích A a B viz obr. 29. Dle měření absorbance při 280 nm a 320 nm nejvyšší poměr $A_{280/320}$ vykázal vzorek A a po něm vzorek B, u vzorků C, D, E byla pravděpodobná vyšší koncentrace agregátů. Se vzorky A a B byla provedena ultrafiltrace, protože správně sbalený protein by tento krok měl projít bez komplikací. Při ultrafiltraci dochází kromě redukce objemu pufru také k částečné purifikaci vzorku od molekul, menších než je propustnost membrány, která v tomto případě byla 10 000 Da. Vzorek A byl zahuštěn na 300 ml a vzorek B na 50 ml. Následovala ionexová chromatografie, která potvrdila výsledky měření absorbance při 280 nm a 320 nm. Porovnání elučních profilů viz. obr. 30. Vyjímku tvořil vzorek B, u kterého byla ztrátovým krokem ultrafiltrace. Jímané frakce z ionexové chromatografie obr. 31 byly analyzovány na SDS-PAGE. Frakce 4 a 5 vykázaly přítomnost renaturovaného proteinu, byly však značně znečištěny dalšími proteinovými složkami. Následná purifikace gelovou filtrací měla tyto nežádoucí složky odstranit. Eluční profil gelové filtrace frakce 4 po ionexové chromatografii viz. obr. 33. Frakce 3 vykázala přítomnost čistého renaturovaného proteinu. Na gelu. obr. 34 je patrný elektroforetický posun kdy v redukujícím prostředí protein putuje pomaleji v důsledku rozpojení disulfidových vazeb a následnému rozvolnění struktury oproti neredukujícímu prostředí. Tento jev naznačuje, že protein má v renaturované podobě spojeny cysteiny disulfidovými vazbami a měl by být správně sbalený. Pozice proužků vykazují, že protein byl získán ve formě monomeru a vysoké čistotě. Pokud by byl přítomen dimer či další oligomery byly by patrné proužky okolo 34 kDa a výše. Získáno však bylo tak malé množství proteinu, odhadem v jednotkách mikrogramů, že nebyla stanovována koncentrace proteinu dle Bradfordové a proto zde není uveden přesný výtěžek.

Tento výsledek je výzvou pro další zlepšování výtěžku a optimalizaci renaturace hNKR-P1A. Cesta přes expresi v *E. coli* a následnou renaturaci *in vitro* je však značně obtížná, což naznačil i tým japonských vědců [92]. Volba exprese hNKR-P1A v eukaryotických systémech je pravděpodobně vhodnější volba, finanční náročnost této metody je však značná. Pokud by se podařilo připravit renaturovaný hNKR-P1A z bakteriálních expresních systémů v dostatečném množství, jednalo by se o výrazně levnější a dostupnější metodu přípravy proteinu pro studium interakce s LLT1.

Pro expresi proteinu LLT1 bylo nejdříve nutné vyrobit expresní plazmidy. Prvním z nich byl plazmid obsahující inzert kódující část extracelulární domény v rozsahu Gln65-Val191. Výchozím materiálem byl vektor pBluescript SK+ s inzertem kódujícím extracelulární doménu LLT1, který připravil Mgr. Branislav Slávik. S tímto templátem byla

provedena PCR amplifikace úseku vymezeného navrženými primery. Použita byla DNA polymerasa Deep Vent, která syntetizuje DNA s tupými konci. Analýza na agarosovém gelu prokázala přítomnost produktu očekávané délky obr. 11. Následovala ligace v kombinaci s restrikcí štěpením. Pro rozštěpení vektoru pBluescript SK+ byla použita restrikcí endonukleasa *SmaI* štěpící vektor na tupo. Při ligaci je nejdříve rozštěpen vektor a poté je do něj T4 DNA ligasou vložen inzert, čímž je porušeno zásahové místo pro restrikcí endonukleasu *SmaI* a ta už vektor s inzertem dále neštěpí. Inzert byl do vektoru pBluescript SK+ ligován proto, aby mohl být následně vyštěpen restrikcí endonuklasami *NdeI* a *NotI*, které štěpí v zásahových místech pouze s dostatečným přesahem sekvence. Stejnými endonukleasami byl štěpen i expresní vektor pET-30a(+), kohezní konce vzniklé štěpením vektoru i inzertu byly navzájem komplementární a byly spojeny ligasou. Restrikcí místo *NdeI* nebylo na začátku inzertu před tripletem kódujícím Gln65 voleno nahodile, protože kromě své role při štěpení obsahuje také START kodón plnící svou funkci při translaci. Na konci inzertu byl za posledním tripletem bází kódujících Val191 lokalizován STOP kodón. Po ligaci do vektoru pET-30a(+) proběhlo ověření správnosti připraveného vektoru sekvenací. Výsledky však prokázaly přítomnost transversní bodové mutace A→T měnící aminokyselinu R175W u obou předaných vzorků. Tato mutace je závažná, protože mění nabitou aminokyselinu za hydrofobní, což může mít velký vliv na strukturu proteinu. Proto byla prováděna řada pokusů mutaci opravit pomocí mutačních primerů dle protokolu Quikchange Side-Directed Mutagenesis od firmy Stratagene. Jednalo se zejména o optimalizaci teploty nasedání primerů, koncentrace primerů a templátu. Vyskytovaly se problémy s nasedáním primerů, jeden z nich dokonce pravděpodobně tvořil vlásenku, což bylo zjištěno po analýze sekvence primeru v programu OligoCalc. Žádný z pokusů o opravu mutace však nepřinesl úspěch a PCR produkt získán nebyl. Tento expresní vektor tedy nemohl být použit pro expresi proteinu.

Dále bylo přistoupeno k přípravě expresního plazmidu, který měl kódovat úsek extracelulární domény v rozmezí Leu71-Val191. Tento úsek obsahoval mutaci H176C, která měla zapříčinit spárování domutovaného Cys176 s nepárovým Cys163 a tím následně stabilizovat C-lektinovou doménu. Tato mutace byla odvozena na základě porovnání sekvencí s ostatními C-lektiny [92]. Jako templát sloužil vektor pTT28 připravený Bc. Janem Bláhou s inzertem kódujícím úsek Glu72-Val191 s vnesenou mutací H176C. Pomocí navržených primerů byla tato sekvence prodloužena o tři báze kódující Leu. Strategie při klonování byla

naprosto shodná jako u předchozí přípravy vektoru. Výsledky sekvenace potvrdily 100% správnost připraveného vektoru.

Připraveným expresním vektorem byl transformován kmen *E. coli* BL21 Gold DE3. Selektce produkčního klonu obr. 20 prokázala dostatečnou produkci proteinu o velikosti přibližně 14 kDa ve všech analyzovaných klonech. Pro velkoobjemovou produkci byl vybrán klon prezentovaný v dráze 6+, protože vykázal nejvyšší produkci proteinu. Oblast proužku s předpokládaným proteinem v dráze 6+ byla vyříznuta a byla provedena identifikace proteinu pomocí peptidového mapování. Identifikace potvrdila totožnost s LLT1 a pokrytí sekvence činilo 81%. Příklad MALDI MS spektra s některými přiřazenými identifikovanými peptidy viz. obr. 21. Renaturace probíhala metodou pomalého naředění, což je v naší laboratoři netradiční metoda, protože drtivá většina proteinů je připravována metodou rychlého naředění. Protein je zde pomalu zředován renaturačním pufrem I a vlivem snižování koncentrace denaturačních činidel dochází k jeho postupnému sbalování. Protokol renaturace byl přejat z publikace J. Kamishikiryoa a jeho skupiny [92]. Zvláštností bylo, že solubilizační roztok neobsahoval žádné redukční činidlo, což byla další odlišnost od standardního postupu v naší laboratoři. Renaturováno bylo 2,8 mg denaturovaného proteinu, protože objem renaturačního pufru činil 100 ml a maximální koncentrace proteinu uvedená v protokolu [92] byla 2 μ M. Po gelové filtraci byl získán eluční profil odpovídající sbalenému proteinu obr. 22. Jímané frakce analyzované na SDS-PAGE vykázaly přítomnost renaturovaného monomerního proteinu obr. 23. Nejvyšší čistotu prokázala frakce 4, frakce 3 obsahovala také značné množství proteinu, ale byla kontaminovaná dimerním proteinem, což lze pozorovat jako slabý proužek o velikosti přibližně 28 kDa. Celkový výtěžek renaturovaného proteinu činil 1,15 mg. Pro změření přesné hmotnosti proteinu byla zvolena nejčistší frakce 4. Hmotnostní ESI/FT-ICR spektrum celé molekuly proteinu viz obr. 24. Po dekonvoluci spektra byla stanovena přesná monoizotopická hmotnost LLT1 L71 (H176C) $[M+H]^+$ s iniciačním methioninem na 14185,69 Da s chybou měření 1,4 ppm. Nakonec bylo stanoveno zapojení disulfidových vazeb pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií ESI/FT-ICR. Protein z frakce 4 byl štěpen přímo v gelu trypsinem, chymotrypsinem a Glu-C. Nejširší sada peptidů byla získána po štěpení proteinu chymotrypsinem. Analýza byla založená na selekci peptidových dvojic propojených právě disulfidovou vazbou, které byly řazeny dle chyby a intenzity. Podle zastoupení dvojic spojených cysteinů v takto získaných peptidových dvojicích, bylo stanoveno propojení cysteinů v celé molekule zkoumaného proteinu. Příklady nejprůkaznějších peptidových dvojic

viz. tab. 6. Schéma propojení cysteinů v připravovaném úseku extracelulární domény (viz. obr. 25) odpovídá klasickému zapojení disulfidových vazeb v C-lektinové doméně. Eluční profil, analýza SDS-PAGE a zjištěné propojení disulfidových vazeb napovídají, nikoli však potvrzují, že by protein měl být správně sbalen. Jako důkaz správného sbalení LLT1 by sloužila až vazba s proteinem hNKR-P1A.

Získaný protein LLT1 L71 (H176C) lze považovat za dostatečně kvalitní výchozí materiál pro studium interakce s hNKR-P1A. K charakterizaci interakce by bylo ještě vhodné připravit část extracelulární domény LLT1 bez zmiňované mutace a porovnat zda vnesená mutace má na interakci s hNKR-P1A nějaký vliv.

Na závěr nutno zmínit, že získané informace o interakci budou mít výpovědní hodnotu, která by měla být posuzována s určitou rezervou, protože jde pouze o modelové systémy a situace na živých buňkách a jejich membráně může být odlišná. Používání modelových systémů je bezesporu velmi mocný nástroj pro charakterizaci proteinů, ale na následné porovnání s živými systémy a ryze přírodními ději by se nemělo zapomínat.

7. ZÁVĚR

- Byla produkováána část rekombinantní extracelulární domény proteinu hNKR-P1A v *E. coli*.
- Protein hNKR-P1A byl identifikován pomocí peptidového mapování.
- Připraveno bylo velmi malé množství renaturovaného proteinu hNKR-P1A.
- Byly připraveny expresní plazmidy pro extracelulární doménu proteinu LLT1.
- Byla produkováána část rekombinantní extracelulární domény proteinu LLT1 v *E. coli*.
- Protein byl renaturován a purifikován.
- Protein LLT1 byl identifikován pomocí peptidového mapování.
- Pomocí hmotnostní spektrometrie byla stanovena přesná monoizotopická hmotnost připraveného proteinu LLT1.
- Pomocí hmotnostní spektrometrie byla určena lokalizace disulfidových vazeb v připraveném proteinu LLT1.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie, Vol. 3*. Triton Praha (2005)
- [2] Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: *Eur J Immunol* 5, 112-117 (1975)
- [3] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J.: *Immunobiology*. Garland Science, New York (2005)
- [4] Trinchieri, G.: *Adv Immunol* 47, 187-376 (1989)
- [5] Robertson, M.J., Ritz, J.: *Blood* 76, 2421-2438 (1990)
- [6] Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L.: *Nat Immunol* 3, 6-8 (2002)
- [7] Sun, J.C., Lanier, L.L.: *Nat Rev Immunol* 11, 645-657 (2011)
- [8] Todar, K.: <http://www.textbookofbacteriology.net/>
- [9] Garni-Wagner, B.A., Witte, P.L., Tutt, M.M., Kuziel, W.A., Tucker, P.W., Bennett, M., Kumar, V.: *J Immunol* 144, 796-803 (1990)
- [10] Hammond, K.J., Godfrey, D.I.: *Tissue Antigens* 59, 353-363 (2002)
- [11] Lanier, L.L.: *Nat Immunol* 9, 495-502 (2008)
- [12] Yokoyama, W.M.: *Nat Immunol* 9, 481-485 (2008)
- [13] Peritt, D., Robertson, S., Gri, G., Showe, L., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G.: *J Immunol* 161, 5821-5824 (1998)
- [14] Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A.: *Trends Immunol* 22, 633-640 (2001)
- [15] Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., Moretta, L.: *Cell Death Differ* 15, 226-233 (2008)
- [16] Biron, C.A., Brossay, L.: *Curr Opin Immunol* 13, 458-464 (2001)
- [17] Paust, S., Senman, B., von Andrian, U.H.: *Immunol Rev* 235, 286-296 (2010)
- [18] Maghazachi, A.A.: *Curr Top Microbiol Immunol* 341, 37-58 (2010)
- [19] Long, E.O.: *Immunity* 26, 385-387 (2007)
- [20] Loza, M.J., Zamai, L., Azzoni, L., Rosati, E., Perussia, B.: *Blood* 99, 1273-1281 (2002)
- [21] Street, S.E., Cretney, E., Smyth, M.J.: *Blood* 97, 192-197 (2001)
- [22] Lanier, L.L.: *Annu Rev Immunol* 23, 225-274 (2005)
- [23] Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., Caligiuri, M.A.: *Blood* 97, 3146-3151 (2001)
- [24] Lanier, L.L.: *Nat Immunol* 2, 23-27 (2001)
- [25] Bradley, M., Zeytun, A., Rafi-Janajreh, A., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M.: *Blood* 92, 4248-4255 (1998)
- [26] Sanborn, K.B., Orange, J.S.: *J Clin Immunol* 30, 358-363 (2010)
- [27] Tschopp, J., Masson, D., Stanley, K.K.: *Nature* 322, 831-834 (1986)
- [28] Shi, L., Kam, C.M., Powers, J.C., Aebbersold, R., Greenberg, A.H.: *J Exp Med* 176, 1521-1529 (1992)
- [29] Ashkenazi, A.: *Nat Rev Cancer* 2, 420-430 (2002)
- [30] Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., Brossay, L.: *Nat Rev Immunol* 12, 239-252 (2012)
- [31] Bihl, F., Germain, C., Luci, C., Braud, V.M.: *Cell Mol Life Sci* 68, 3457-3467 (2011)
- [32] Raulet, D.H., Vance, R.E.: *Nat Rev Immunol* 6, 520-531 (2006)
- [33] Luci, C., Tomasello, E.: *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2335-2340 (2008)
- [34] Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N.L., Faust, J., Rumpold, H., Kraft, D., Lanier, L.L.: *J Immunol* 133, 180-189 (1984)

- [35] Clemenceau, B., Gallot, G., Vivien, R., Gaschet, J., Campone, M., Vie, H.: *J Immunother* 29, 53-60 (2006)
- [36] Barten, R., Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J., Wilson, M.J.: *Trends Immunol* 22, 52-57 (2001)
- [37] Farag, S.S., Fehniger, T.A., Ruggeri, L., Velardi, A., Caligiuri, M.A.: *Blood* 100, 1935-1947 (2002)
- [38] Humphrey, M.B., Lanier, L.L., Nakamura, M.C.: *Immunol Rev* 208, 50-65 (2005)
- [39] Vivier, E., Nunes, J.A., Vely, F.: *Science* 306, 1517-1519 (2004)
- [40] Vely, F., Vivier, E.: *Sci STKE* 2005, cm6 (2005)
- [41] Blery, M., Olcese, L., Vivier, E.: *Hum Immunol* 61, 51-64 (2000)
- [42] Lopez-Larrea, C., Suarez-Alvarez, B., Lopez-Soto, A., Lopez-Vazquez, A., Gonzalez, S.: *Trends Mol Med* 14, 179-189 (2008)
- [43] Long, E.O.: *Immunol Rev* 224, 70-84 (2008)
- [44] Verbrugge, A., Ruiters, T., Clevers, H., Meyaard, L.: *Int Immunol* 15, 1349-1358 (2003)
- [45] Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S.: *Nat Immunol* 9, 503-510 (2008)
- [46] Trowsdale, J., Barten, R., Haude, A., Stewart, C.A., Beck, S., Wilson, M.J.: *Immunol Rev* 181, 20-38 (2001)
- [47] Martin, A.M., Kulski, J.K., Witt, C., Pontarotti, P., Christiansen, F.T.: *Trends Immunol* 23, 81-88 (2002)
- [48] Storset, A.K., Slettedal, I.O., Williams, J.L., Law, A., Dissen, E.: *Eur J Immunol* 33, 980-990 (2003)
- [49] Parham, P., Abi-Rached, L., Matevosyan, L., Moesta, A.K., Norman, P.J., Older Aguilar, A.M., Guethlein, L.A.: *J Med Primatol* 39, 194-212 (2010)
- [50] Parham, P., Norman, P.J., Abi-Rached, L., Guethlein, L.A.: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 800-811 (2012)
- [51] Campbell, K.S., Purdy, A.K.: *Immunology* 132, 315-325 (2011)
- [52] Thielens, A., Vivier, E., Romagne, F.: *Curr Opin Immunol* 24, 239-245 (2012)
- [53] Kingeter, L.M., Lin, X.: *Cell Mol Immunol* 9, 105-112 (2012)
- [54] Vogler, I., Steinle, A.: *J Innate Immun* 3, 227-235 (2011)
- [55] Bezouška, K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 535-563 (2004)
- [56] Gunturi, A., Berg, R.E., Forman, J.: *Immunol Res* 30, 29-34 (2004)
- [57] Chambers, W.H., Vujanovic, N.L., DeLeo, A.B., Olszowy, M.W., Herberman, R.B., Hiserodt, J.C.: *J Exp Med* 169, 1373-1389 (1989)
- [58] Giorda, R., Rudert, W.A., Vavassori, C., Chambers, W.H., Hiserodt, J.C., Trucco, M.: *Science* 249, 1298-1300 (1990)
- [59] Yokoyama, W.M., Plougastel, B.F.: *Nat Rev Immunol* 3, 304-316 (2003)
- [60] Ljutic, B., Carlyle, J.R., Philipp, D., Nakagawa, R., Julius, M., Zuniga-Pflucker, J.C.: *J Immunol* 174, 4789-4796 (2005)
- [61] Rozbeský, D.: *Diplomová práce katedry Biochemie, PřF UK, Praha* (2009)
- [62] Li, J., Rabinovich, B.A., Hurren, R., Shannon, J., Miller, R.G.: *Int Immunol* 15, 411-416 (2003)
- [63] Hanke, T., Corral, L., Vance, R.E., Raulet, D.H.: *Eur J Immunol* 28, 4409-4417 (1998)
- [64] Mesci, A., Ljutic, B., Makrigiannis, A.P., Carlyle, J.R.: *Immunol Res* 35, 13-26 (2006)
- [65] Voehringer, D., Kaufmann, M., Pircher, H.: *Immunogenetics* 52, 206-211 (2001)
- [66] Iizuka, K., Naidenko, O.V., Plougastel, B.F., Fremont, D.H., Yokoyama, W.M.: *Nat Immunol* 4, 801-807 (2003)

- [67] Carlyle, J.R., Jamieson, A.M., Gasser, S., Clingan, C.S., Arase, H., Raulet, D.H.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3527-3532 (2004)
- [68] Kveberg, L., Dai, K.Z., Inngjerdigen, M., Brooks, C.G., Fossum, S., Vaage, J.T.: *Immunogenetics* **63**, 429-436 (2011)
- [69] Kveberg, L., Dai, K.Z., Westgaard, I.H., Daws, M.R., Fossum, S., Naper, C., Vaage, J.T.: *Eur J Immunol* **39**, 541-551 (2009)
- [70] Kolenko, P., Rozbesky, D., Vanek, O., Kopecky, V., Jr., Hofbauerova, K., Novak, P., Pompach, P., Hasek, J., Skalova, T., Bezouska, K., Dohnalek, J.: *J Struct Biol* **175**, 434-441 (2011)
- [71] Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M.J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., Braud, V.M.: *J Immunol* **175**, 7791-7795 (2005)
- [72] Lanier, L.L., Chang, C., Phillips, J.H.: *J Immunol* **153**, 2417-2428 (1994)
- [73] Poggi, A., Costa, P., Tomasello, E., Moretta, L.: *Eur J Immunol* **28**, 1611-1616 (1998)
- [74] Ishihara, S., Nieda, M., Kitayama, J., Osada, T., Yabe, T., Ishikawa, Y., Nagawa, H., Muto, T., Juji, T.: *Eur J Immunol* **29**, 2406-2413 (1999)
- [75] Iiai, T., Watanabe, H., Suda, T., Okamoto, H., Abo, T., Hatakeyama, K.: *Clin Exp Immunol* **129**, 92-98 (2002)
- [76] Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S.Q., Querci, V., Fambrini, M., Liotta, F., Levings, M.K., Maggi, E., Cosmi, L., Romagnani, S., Annunziato, F.: *Eur J Immunol* **40**, 2174-2181 (2010)
- [77] Germain, C., Meier, A., Jensen, T., Knapnougel, P., Poupon, G., Lazzari, A., Neisig, A., Hakansson, K., Dong, T., Wagtmann, N., Galsgaard, E.D., Spee, P., Braud, V.M.: *J Biol Chem* **286**, 37964-37975 (2011)
- [78] Montaldo, E., Vitale, C., Cottalasso, F., Conte, R., Glatzer, T., Ambrosini, P., Moretta, L., Mingari, M.C.: *Blood*, (2012)
- [79] Rosen, D.B., Cao, W., Avery, D.T., Tangye, S.G., Liu, Y.J., Houchins, J.P., Lanier, L.L.: *J Immunol* **180**, 6508-6517 (2008)
- [80] Exley, M., Porcelli, S., Furman, M., Garcia, J., Balk, S.: *J Exp Med* **188**, 867-876 (1998)
- [81] Pozo, D., Vales-Gomez, M., Mavaddat, N., Williamson, S.C., Chisholm, S.E., Reyburn, H.: *J Immunol* **176**, 2397-2406 (2006)
- [82] Christiansen, D., Mouhtouris, E., Milland, J., Zingoni, A., Santoni, A., Sandrin, M.S.: *Xenotransplantation* **13**, 440-446 (2006)
- [83] Spreu, J., Kienle, E.C., Schrage, B., Steinle, A.: *Immunogenetics* **59**, 903-912 (2007)
- [84] Borrego, F., Robertson, M.J., Ritz, J., Pena, J., Solana, R.: *Immunology* **97**, 159-165 (1999)
- [85] Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: *Biochemistry* **39**, 14779-14786 (2000)
- [86] Sancho, D., Gomez, M., Sanchez-Madrid, F.: *Trends Immunol* **26**, 136-140 (2005)
- [87] Hasegawa, A., Nakayama, T.: *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **33**, 189-195 (2010)
- [88] Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K.M., Schitteck, B., Steinle, A.: *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 5100-5105 (2010)
- [89] Boles, K.S., Barten, R., Kumaresan, P.R., Trowsdale, J., Mathew, P.A.: *Immunogenetics* **50**, 1-7 (1999)
- [90] Hu, Y.S., Zhou, H., Myers, D., Quinn, J.M., Atkins, G.J., Ly, C., Gange, C., Kartsogiannis, V., Elliott, J., Kostakis, P., Zannettino, A.C., Cromer, B., McKinstry, W.J., Findlay, D.M., Gillespie, M.T., Ng, K.W.: *J Bone Miner Res* **19**, 89-99 (2004)

- [91] Eichler, W., Ruschpler, P., Wobus, M., Drossler, K.: *J Cell Biochem Suppl* Suppl 36, 201-208 (2001)
- [92] Kamishikiryo, J., Fukuhara, H., Okabe, Y., Kuroki, K., Maenaka, K.: *J Biol Chem* 286, 23823-23830 (2011)
- [93] Mathew, P.A., Chuang, S.S., Vaidya, S.V., Kumaresan, P.R., Boles, K.S., Pham, H.T.: *Mol Immunol* 40, 1157-1163 (2004)
- [94] Bambard, N.D., Mathew, S.O., Mathew, P.A.: *Scand J Immunol* 71, 210-219 (2010)
- [95] Roth, P., Mittelbronn, M., Wick, W., Meyermann, R., Tatagiba, M., Weller, M.: *Cancer Res* 67, 3540-3544 (2007)
- [96] Gange, C.T., Quinn, J.M., Zhou, H., Kartsogiannis, V., Gillespie, M.T., Ng, K.W.: *J Biol Chem* 279, 29043-29049 (2004)
- [97] Hájková, A.: *Diplomová práce katedry Biochemie, Přf UK, Praha* (2009)
- [98] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
- [99] Novagen: *Manual TB055* (2003)
- [100] Stratagene: *Instruction manual rev. 085008* (2005)
- [101] <http://phobius.sbc.su.se/>
- [102] http://web.expasy.org/compute_pi/
- [103] Novagen: *Manual TB095 12/98* (1998)
- [104] Burgess, R.R.: *Methods Enzymol* 463, 259-282 (2009)

