

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie



STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE INTRACELULÁRNÍ FORMY
MYŠÍHO Nkr-p1a PROTEINU

Structural characterization of intracellular form of mice protein Nkr-p1a

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Eliška Pospíšilová

Praha 2016

Bc. Pavla Vaňková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Nováka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Pavla Vaňková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda vyjádřila velké poděkování svému školiteli RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Elišce Pospíšilové za jejich cenné rady a ochotu vždy pomoci a být neustále k dispozici. Především ale za jejich bezmeznou trpělivost při spolupráci. RNDr. Petru Novákovi, Ph.D., jakožto vedoucímu laboratoře děkuji za umožnění vypracování diplomové práce.

Stejně velké díky patří Mgr. Michalu Rosůlkovi za pomoc s veškerým měřením na hmotnostním spektrometru. Dále Mgr. Josefu Chmelíkovi, Ph.D. za měření NMR experimentu a Tatsianě Charnavets, Ph.D. za měření CD a DLS. Za cenné rady, co se problematiky Nkr-p1 receptorů týče, pak velmi děkuji Mgr. Lucii Hernychové a Mgr. Ljubině Ivanove.

Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za vytvoření přátelského pracovního prostředí a ochotu vždy pomoci. V neposlední řadě patří velký dík mé rodině a blízkým, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

ABSTRAKT

NK buňky jsou komponentou přirozeného imunitního systému, která je odvozena od lymfoidního progenitoru. Pomocí sofistikovaného receptorového repertoáru, jež exprimují na svém povrchu, se účastní obrany organismu proti patogenním, virem infikovaným nebo nádorovým buňkám. Současně produkují cytokiny, jejichž prostřednictvím pomáhají spoluutvářet i adaptivní imunitní odpověď. Tato práce je zaměřena na studium struktury rozpustné isoformy myšního receptoru mNkr-p1a, která byla v nedávné době na transkripční úrovni identifikována členem naší laboratoře a nese pracovní označení *isoforma 2*. Cílem práce bylo vyprodukovat protein mNkr-p1a iso2 v prokaryotickém expresním systému a provést jeho renaturaci a purifikaci *in vitro*. V další fázi byl získaný produkt analyzován metodami hmotnostní spektrometrie. Ji získané výsledky nás ovšem dovedly k určitým pochybnostem, zda náš protein v roztoku nabývá definovanou 3D strukturu a nejedná se pouze o artefakt. To bylo vyvráceno dalšími biofyzikálními metodami, nukleární magnetickou rezonancí a měřením cirkulárního dichroismu a dynamického rozptylu světla.

Klíčová slova: NK buňky
Receptor mNkr - p1a
Krátká isoforma mNkr - p1a iso2
Alternativní sestřih
Biosyntéza proteinů
Produkce rekombinantních proteinů
Purifikace proteinů
Hmotnostní spektrometrie
Disulfidové vazby
Chemické zesíťení
NMR, CD, DLS

ABSTRACT

NK cells are a component of innate immunity system, which is derived from lymphoid progenitor. By a sophisticated receptor repertoire, which is expressed on their surface, they provide a surveillance against pathogenic, virus infected or tumour cells. Simultaneously they produce cytokines, thereby are involved in adaptive immune response. This work is focused on the study of structure of mice soluble mNkr-p1a isoform. Recently this short isoform was identified at the transcriptional level by a member of our laboratory and it is designated as *isoform 2*. The aim was to produce mNkr-p1a iso2 protein in the prokaryotic expression system and to perform its renaturation and purification *in vitro*. In the next phase of work, the obtained product was analyzed by the mass spectrometry methods. Received results made us think about that our protein is in unfolded state. This assumption was refuted by following biophysical methods, nuclear magnetic resonance, circular dichroism and dynamic light scattering measurement.

Keywords: NK cells
Receptor mNkr - p1a
Short isoform mNkr - p1a iso2
Alternative splicing
Protein biosynthesis
Recombinant protein production
Protein purification
Mass spectrometry
Disulfide bond
Chemical cross-linking
NMR, CD, DLS

OBSAH

PROHLÁŠENÍ	2
ABSTRAKT	4
Klíčová slova:	4
ABSTRACT	5
Keywords.....	5
SEZNAM ZKRATEK	9
1) LITERÁRNÍ ÚVOD	13
1.1 Charakterizace NK buněk	13
1.1.1 Funkce a lokalizace NK buněk	13
1.1.2 Aktivace NK buněk a jejich vliv na imunitní odpověď	14
Rozpoznávací strategie NK buněk	14
Regulace imunitní odpovědi	15
1.1.3 Vývoj NK buněk a licencování	16
1.2 Signalizace NK buněk a jejich receptory	19
1.2.1 Signalizace zprostředkovaná inhibičními receptory.....	20
1.2.2 Signalizace zprostředkovaná aktivačními receptory	21
1.2.3 Receptory imunoglobulinového typu	22
1.2.4 Receptory C–lektinového typu.....	23
1.2.5 Nkr–p1 rodina receptorů a jejich ligandy.....	24
1.3 Receptor Nkr–p1a	26
1.4 Myší Nkr–p1a iso2 molekula	28
1.5 Alternativní sestřih RNA a biosyntéza proteinů	29
1.5.1 Alternativní sestřih.....	29
1.5.2 Biosyntéza transmembránových proteinů II. typu.....	30
1.5.3 Solubilní sekretované proteiny	31

2) CÍLE PRÁCE	33
3) MATERIÁL.....	34
3.1 Přístroje a pomůcky	34
3.2 Chromatografické kolony.....	35
3.3 Chemikálie.....	35
3.4 Enzymy	37
3.5 Komerční sady.....	37
3.6 Vektory.....	37
3.7 Bakteriální kmeny	37
3.8 Roztoky a pufrý	38
4) METODY	40
4.1 Exprese rekombinantního proteinu mNkr-p1a iso2.....	40
4.1.1 Transformace produkčních kompetentních buněk.....	40
4.1.2 Výběr vhodného produkčního klonu.....	41
4.1.3 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	41
4.1.4 Nalezení vhodných produkčních podmínek.....	43
4.1.5 Velkoobjemová produkce proteinů	44
4.1.6 Izolace inkluzních tělísek	45
4.2 <i>In vitro</i> renaturace proteinu mNkr-p1a iso2	46
4.3 Zakoncentrování proteinového roztoku	46
4.4 Purifikace proteinu mNkr-p1a iso2	47
4.4.1 Ionově výměnná chromatografie	47
4.4.2 Gelová filtrace	48
4.4.3 Určení koncentrace proteinu	48
4.5 Charakterizace struktury mNkr-p1a iso2.....	49
4.5.1 Hmotnostní spektrometrie	49
4.5.2 Nukleární magnetická rezonance.....	55

4.5.3	Dynamický rozptyl světla	55
4.5.4	Cirkulární dichroismus.....	55
4.6	Predikce sekundární struktury proteinu mNkr-p1a iso2	56
5)	VÝSLEDKY	57
5.1	Exprese rekombinantního proteinu mNkr-p1a iso2.....	57
5.1.1	Transformace produkčních kompetentních buněk a výběr vhodného produkčního klonu	57
5.1.2	Nalezení vhodných produkčních podmínek	58
5.1.3	Izolace inkluzních tělísek	60
5.2	<i>In vitro</i> renaturace proteinu mNkr-p1a iso2	61
5.3	Purifikace proteinu mNkr-p1a iso2	62
5.3.1	Iontově výměnná chromatografie	62
5.3.2	Gelová filtrace následující po IEC	63
5.3.3	Gelová filtrace bez předcházející IEC	64
5.3.4	Stanovení koncentrace proteinu a celkového výtěžku	66
5.4	Charakterizace struktury mNkr-p1a iso2.....	67
5.4.1	Ověření identity proteinu mNkr-p1a iso2	67
5.4.2	Identifikace zapojení disulfidových vazeb.....	68
5.4.3	Chemické zesítnění proteinu mNkr-p1a iso2	70
5.5	Ověření přítomnosti vyšší prostorové struktury	72
5.5.1	Nukleární magnetická rezonance.....	72
5.5.2	Dynamický rozptyl světla a cirkulární dichroismus	73
5.6	Predikce struktury proteinu mNkr-p1a iso2.....	74
6)	DISKUZE	76
7)	ZÁVĚR	81
8)	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	82

SEZNAM ZKRATEK

AcN	acetonitril
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>)
APS	peroxodisíran amonný (<i>Ammonium PerSulfate</i>)
CD	cirkulární dichroismus
CDx	systematické rozdělení receptorů (<i>Cluster of differentiation</i>)
Clr	protein asociovaný s C-lektiny (<i>C-type Lectin Related</i>)
CTLD	doména podobná lektinům C-typu (<i>C-Type Lectin-like Domain</i>)
CTLR	receptory obsahující CTLD (<i>C-Type Lectin-like Receptors</i>)
DAP10/12	adaptorová molekula nesoucí aktivační motiv ITAM (<i>DNAX Activating Protein of 10/12 kDa</i>)
DC	dendritická buňka (<i>Dendritic Cell</i>)
DLS	dynamický rozptyl světla (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
DSG	disukcinimidyl glutarát
DSGD4	disukcinimidyl glutarát – deuterovaný
DSS	disukcinimidyl suberát
DSSD4	disukcinimidyl suberát – deuterovaný
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>Electrospray Ionization</i>)
EtOH	ethanol
FA	kyselina mravenčí (<i>Formic Acid</i>)
FT-ICR MS	hmotnostní spektrometrie s iontově cyklotronovou rezonancí a Fourierovou Transformací (<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i>)

GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GFP	zelený fluorescenční protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HAc	kyselina octová
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HLA	lidský leukocytární antigen (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IAA	jodacetamid (<i>IodoAcetAmide</i>)
IEC	iontově výměnná chromatografie (<i>Ion Exchange Chromatography</i>)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
ITAM	aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>)
ITIM	inhibiční motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i>)
KACL	lektin C-typu asociovaný s keratinocyty (<i>Keratinocyte-Associated C-type Lectin</i>)
KIR	aktivační a inhibiční receptory NK buněk imunoglobulinového typu (<i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor</i>)
LB médium/agar	Luria-Bertani médium/agar
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
LDS	dodecylsulfát lithný
LIR	imunoglobulinové receptory leukocytů (<i>Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors</i>)
LLT1	lidský ligand NKR-P1A (<i>Lectin-Like Transcript 1</i>)
LRC	genový klastr kódující leukocytární imunoglobulinové receptory (<i>Leukocyte Receptor Complex</i>)

MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMR	manosový receptor makrofágů (<i>Macrophage Mannose Receptor</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (<i>Mass Spectrometry</i>)
NCR	imunoglobulinové NK receptory (<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i>)
NHS ester	<i>N</i> -hydroxysukcinimid ester
NK buňka	přirozený zabíječ (<i>Natural Killer</i>)
NKC	genový komplex kódující NK receptory s CTLD doménami (<i>Natural Killer gene Complex</i>)
NMR	nukleární magnetická rezonance
Ocil	rodina lektinů inhibujících osteoklasty (<i>Osteoclast Inhibitory Lectin</i>)
OD	optická denzita
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid (<i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i>)
PSIPRED	algoritmus pro predikci sekundární struktury (<i>PSI-blast based secondary structure PREDiction</i>)
PTK	proteintyrosinkinasa
rER	hrubé endoplasmatické retikulum (<i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (<i>SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SR	receptor pro SRP protein (<i>Signal recognition particle Receptor</i>)
SRP	protein rozpoznávající signální sekvenci (<i>Signal Recognition Particle</i>)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin

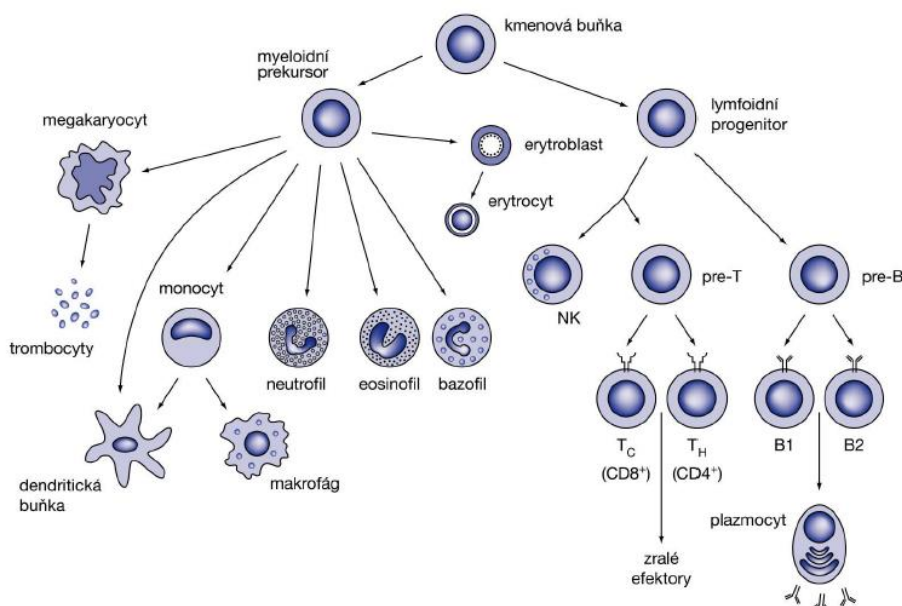
TEMED	N,N,N',N' tetramethylethyldiamin
TGF	faktor nádorového růstu (<i>Tumor Growth Factor</i>)
TLR	Toll podobný receptor (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF	faktor nádorové nekrózy (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAIL	s TNF asociovaný igand spouštějící apoptózu (<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1) LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 Charakterizace NK buněk

1.1.1 Funkce a lokalizace NK buněk

NK buňky (Natural Killer Cells), přirozeně cytotoxické buňky nebo také tzv. přirození zabíječi, jsou velké efektorové granulární lymfocyty¹. Ačkoliv jsou vedle T a B lymfocytů třetím hlavním buněčným typem lymfoidní linie (Obr. 1), obecně jsou řazeny do nespecifického imunitního systému, neboť k aktivaci efektorových funkcí není, na rozdíl od B a T lymfocytů, potřeba předcházející stimulace^{2,3}. Hrají tedy klíčovou roli při včasné obraně organismu. NK buňky rozeznávají buňky pod vlivem stresu a virově nebo parazitárně infikované buňky. Angažují se také při transplantační imunitní odpovědi⁴, v autoimunitě⁵, u alergických onemocnění⁶ nebo v reprodukci, kde se podílejí na vývoji embrya⁷.



Obr. 1⁸. Diferenciace kmenové buňky do dvou hlavních buněčných linií a jejich další dělení.

NK buňky byly poprvé popsány v roce 1975 R. Kiesslingem, který je izoloval z myší sleziny⁹. Reprezentují minoritní frakci z celkového množství lymfocytů (od 2% v myší slezině do 10% v myších plicích a od 2% do 18% v lidském periferním

krevním řečišti)¹⁰. Za běžných podmínek jsou přítomny s klesající tendencí hlavně v plicích, játrech, periferním krevním řečišti, slezině, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a thymu, kde už jsou však téměř nedetekovatelné^{10,11}. Dále byly nalezeny v omentu, tenkém střevě a placentě¹². Osídlování těchto míst není moc dobře charakterizováno. Zdá se však, že NK buňky mají vývojově regulovanou expresi určitých integrinů, které při jejich lokalizaci a stejně tak i u efektorových funkcí hrají významnou roli^{13,14}. Rovněž mohou cíleně migrovat do zánětlivé tkáně na základě gradientu nejrůznějších chemoatraktantů. NK buňky kolující jak v lidské, tak myší krvi, jsou obměňovány přibližně po dvou týdnech¹⁵⁻¹⁷.

1.1.2 Aktivace NK buněk a jejich vliv na imunitní odpověď

NK buňky na svém povrchu exprimují z funkčního hlediska dva typy receptorů, aktivační a inhibiční¹⁸⁻²¹, které rozeznávají ligandy na cílových buňkách, a oproti vysoce specifickým receptorům T a B lymfocytů nesou pouze limitovaný repertoár zárodečně kódovaných receptorů⁵, které příliš specifické nejsou. Naopak společným rysem NK buněk s ostatními lymfocyty je jejich schopnost nabývat určité formy antigenně specifické imunologické paměti^{5,28}. Dokonce se uvažuje, že by paměťové NK buňky mohly reprezentovat konečné stadium NK-buněčného dozrávání/diferenciace²⁴.

Rozpoznávací strategie NK buněk

První ze strategií užívaných NK buňkami k identifikaci svých cílů je tzv. *missing-self* rozpoznávání²⁵. Jde o proces, kdy NK buňky rozpoznávají skrze své povrchové inhibiční receptory především MHC glykoproteiny I. třídy (MHC I), které jsou běžně přítomné na všech zdravých jaderných buňkách, a poskytují NK buňkám signál potlačující jejich cytolytickou aktivitu. Mimo to mohou inhibiční receptory v této souvislosti rozpoznávat i non-MHC ligandy (např. myší receptor Nkr-p1b interagující s Clr-b²⁶ nebo lidský NKR-P1A s LLT1 (Lectin-Like Transcript) ligandem²⁷). Snížená exprese MHC I je jevem, který často doprovází nádorové transformace²⁸, bakteriální infekce²⁹ nebo určitá virová onemocnění³⁰. Buňky se tak snaží uniknout před rozpoznáním CD8⁺ cytotoxickými T lymfocyty, které jsou rovněž zaměřeny na rozpoznávání MHC I molekul v komplexu s prezentovanými peptidy, ale již nejsou schopny reagovat na jejich absenci. Pokud však inhibiční receptory

NK buněk svůj ligand na cílové buňce neidentifikují v dostatečné míře, převládnu aktivací signály, buňka je vyhodnocena jako patogenní a je proti ní zahájena imunitní odpověď. MHC molekuly se poprvé objevují u chrupavčitých ryb, a stejně tak ani NK buňky nebyly identifikovány u druhů nižších než ryby³¹.

Dalším typem NK–buněčného rozpoznávání je tzv. *stress induced–self* hypotéza, kdy jsou aktivacími receptory rozpoznávány ligandy, které jsou hojně exprimovány na buňkách vystavených stresu a dále na nádorových nebo infikovaných buňkách. Hlavním takovým receptorem je NKG2D rozpoznávající MHC I příbuzné ligandy, myší MULT1 nebo lidské MICA a MICB³². Přítomnost těchto „stresových ligandů“ na povrchu buněk podléhá posttranslační regulaci, kdy u zdravých buněk dochází k ubiquitylaci a následné lysosomální degradaci těchto stresových proteinů³².

Non–self, poslední hypotéza NK–buněčného rozpoznávání, je založena na schopnosti aktivacích a „toll–like“ receptorů (TLR)³³ NK buněk rozlišit cizorodé infekční molekuly³⁴. TLR rozeznávající pouze konzervované molekulární vzory patogenů jsou jedním z rysů propojujících vlastnosti NK buněk s myeloidní buněčnou linií.

Regulace imunitní odpovědi

NK buňky rovněž fungují jako regulátory imunitní odpovědi a využívají k tomu jak mezibuněčného kontaktu, tak sekrece cytokinů. Tímto způsobem interagují s makrofágy, dendritickými buňkami (DC), T lymfocyty a B buňkami³⁵. Aktivované NK buňky uvolňují jak prozánětlivé, tak imunosupresivní cytokiny – např. IFN- γ , TNF- α , GM-CSF (Granulocyte–Macrophage Colony–Stimulating Factor) nebo IL-10^{36–38}, kterými ovlivňují nejrůznější procesy – vyvolávají zánětlivou odpověď, modulují procesy krvetvorby, kontrolují vývoj a funkce monocytů a granulocytů a mají vliv na průběh následné adaptivní imunitní odpovědi³⁹.

Komunikace mezi DC a NK buňkami probíhá obousměrně. Zralé DC sekrecí IL-12 stimulují produkci IFN- γ NK buňkami a podporují jejich cytotoxické působení^{40,41}. Takto aktivované NK buňky pak zase produkcí IFN- γ a TNF- α indukují maturaci dalších DC⁴⁰. Významný podíl na této vzájemné aktivaci má i jejich přímý buněčný kontakt. Kromě aktivacího působení jsou NK buňky schopny nezralé DC také usmrtit. Tímto kontrolním mechanismem organismus předchází vzniku autoimunitních reakcí při absenci mikrobiálních nebo virových signálů, které by

za běžných podmínek byly prostřednictvím DC prezentovány T buňkám – při jejich nepřítomnosti mají totiž DC tendenci vystavovat na svém povrchu autoantigeny⁴². Dalším způsobem, jak mohou NK buňky tlumit T–buněčnou imunitní odpověď, je produkce inhibičních cytokinů IL–10 nebo TGF– β ⁴³. DC tedy fungují jako jakýsi spojovací článek mezi NK a T buňkami, čímž dochází k propojení vrozené a adaptivní imunity.

Jeden z mechanismů, kterým NK buňky (a také cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty) zabíjejí své cíle, spočívá v jejich schopnosti skrz aktivační receptory zahájit na perforinu závislou lýzi buněk⁴⁴. Mimo to také exprimují nízkoafinitní Fc receptor CD16, který jim umožňuje detegovat cílové buňky opsonizované protilátkou IgG a následkem toho vykazují tzv. na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC)¹⁹. Třetím typem cytotoxického působení, které je závislé hlavně na IFN– γ , je exprese ligandů TRAIL (TNF–related apoptosis–inducing ligand) a FasL z rodiny cytokinů TNF. Tyto ligandy váží tzv. „receptory smrti“ (Fas nebo TRAIL–R) na povrchu nádorových nebo infikovaných buněk, čímž u nich spouštějí kaspázovou signalizační kaskádu iniciující apoptózu cílové buňky⁴⁴.

NK buňky tudíž nereagují neměnným způsobem, ale adaptují se na stav okolního prostředí. Působí jako jakési buněčné senzory, které snímají stav buněk v organismu prostřednictvím svých receptorů a jakmile se střetnou s buňkou, kterou vyhodnotí jako abnormální, okamžitě zahájí invazi, ať už v podobě cytotoxického působení nebo stimulací buněk specifického imunitního systému pomocí cytokinů. Vzhledem ke svému buněčnému původu, receptorovému repertoáru a efektorovým funkcím se tedy NK buňky zdají být „přechodovým“ buněčným typem překlenujícím oba břehy imunitního systému, specifický a nespecifický³¹.

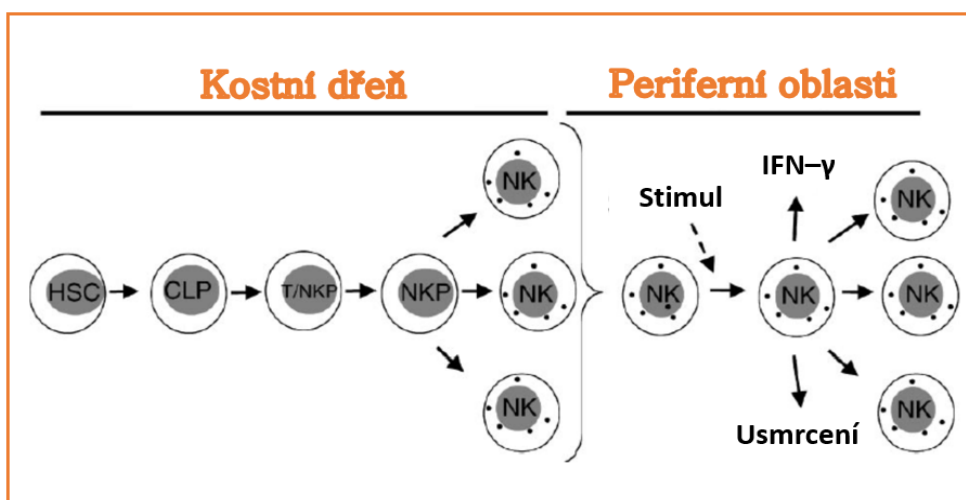
1.1.3 Vývoj NK buněk a licencování

Navzdory blízké podobnosti mezi T– a NK–buněčnými efektorovými funkcemi se NK buňky u athymických nahých myší postrádajících T lymfocyty vyvíjejí normálně^{45,46}. Lze tedy předpokládat, že podstupují svou unikátní vývojovou dráhu.

NK buňky pro svůj kompletní fenotypový a funkční vývoj nevyžadují pouze neporušené prostředí kostní dřeně, kde se vyvíjejí z pluripotentních CD34⁺ hematopoetických kmenových buněk, ale jejich vývoj může za určitých, např. lymfopenických podmínek, probíhat i extramedulárně¹⁰. Alternativním zdrojem

NK buněk mohou být lymfatické uzliny a thymus^{47,48}. Relativní příspěvek těchto orgánů k celkovému množství NK buněk není znám, ale předpokládá se, že v klidovém stavu je nízký a tvoří méně než 5 % z celkového množství¹⁰. Touto extramedulární „NK-poézou“ jsou však produkovány fenotypově odlišné NK buňky⁴⁸. NK–buněčné prekurzory pak osídlují periferní tkáně a vyvíjejí se *in situ* v závislosti na mikroprostředí⁴⁹.

Model navržený pro NK–buněčný vývojový proces odehrávající se v kostní dřeni je rozdělen do několika hlavních kroků (Obr. 2). Prvním krokem, který se odehrává v kostní dřeni, je přeměna hematopoetické kmenové buňky (HSC) na společný lymfoidní progenitor (CLP) a dále jeho diferenciaci na bipotenciální T/NK progenitor (T/NKP) (CD7+CD34+)^{50,51}. Z něj v závislosti na kultivačních podmínkách vznikají buď unipotentní NK–buněčné progenitory (NKP) předurčené stát se zralými NK buňkami, nebo T buňky. Zároveň bylo zjištěno, že při vývoji NK buněk hraje významnou roli

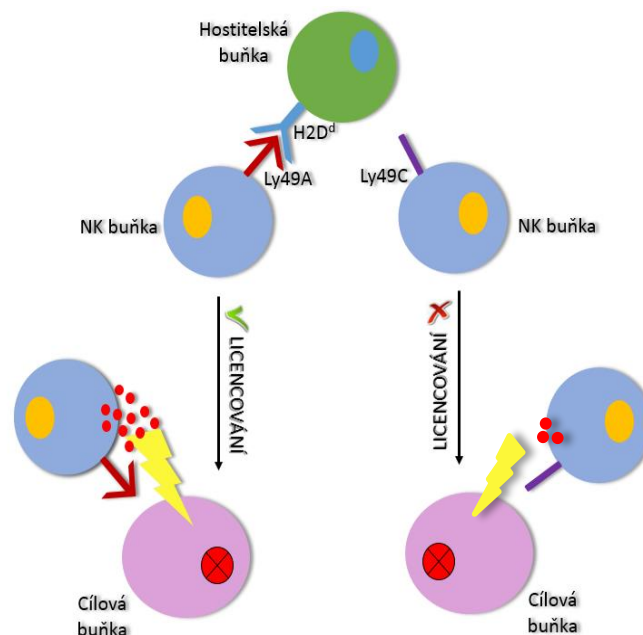


Obr. 2⁵⁰, upraveno. Zjednodušené schéma vývoje NK buněk. V kostní dřeni dochází k vývoji NK buněk z kmenové buňky (HSC) přes společný lymfoidní progenitor (CLP), bipotenciální T/NK progenitor (T/NKP) a NK progenitor (NKP); po stimulaci v periferní tkáni se z nich stanou efektorové buňky schopné zabíjení, produkce cytokinů a proliferace.

receptor pro cytokin IL–15, který podporuje jejich diferenciaci, funkční dozrání a přežití jako takové⁵². Pro vývoj myších NK buněk *in vitro* z prekurzorové populace buněk kostní dřene je zapotřebí koktejlu cytokinů sestávajícího z c–kit ligandu (faktor kmenových buněk), IL–7, flt–3 ligandu a především IL–15^{53,54}. Přítomnost těchto cytokinů sama o sobě je nicméně pro generování fenotypově

zralých NK buněk, které jsou schopny produkce IFN- γ a vykazují na perforinu závislou cytotoxicitu, nedostatečná a pro jejich maturaci je nezbytný přímý kontakt se stromálními buňkami v kostní dřeni⁵⁰. Neméně důležitý je i proces postupného nabývání funkčních receptorů v přesně daném pořadí⁵⁵. Kromě IL-15 je pro život NK buněk nezbytných dalších pět cytokinových molekul. Jmenovitě jde o IL-2, IL-12, IL-18, IL-21 a IFN I. typu.

Součástí NK-buněčného vývoje je i jejich tzv. vzdělávání neboli „licencování“ (Obr. 3). Pod tímto pojmem se skrývá jak schopnost zachovat toleranci k buňkám organismu vlastním, tak umění ovlivnit sílu cytotoxické reakce úměrně nastalé situaci ohrožení. Proces vzdělávání NK buněk se uskutečňuje prostřednictvím inhibičních receptorů specifických pro MHC I molekuly. NK buňky, které v průběhu vývoje prošly takovýmto vzdělávacím procesem, kdy je každá buňka odděleně licencována



Obr. 3 vytvořeno dle 56. **Zjednodušené schéma průběhu licencování NK buněk.** NK buňka, která byla licencována vlastním MHC I ligandem H2D^d, zahájí vůči cílové buňce silnou cytotoxickou reakci. Naproti tomu NK buňka, která se se svým MHC I ligandem nesečkala, se stává hyporesponsivní a při setkání s cílovou buňkou je výsledná cytotoxická reakce mnohem slabší.

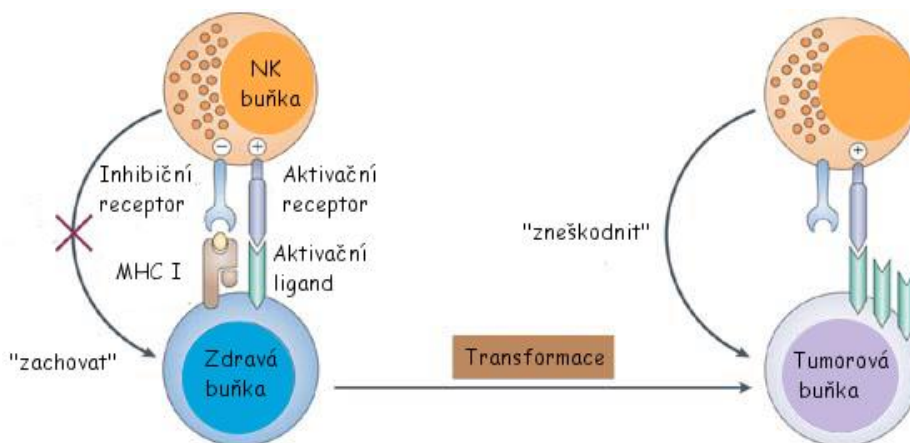
odlišnými MHC alelami v závislosti na exprimovaných inhibičních receptorech, a umí rozeznávat molekuly organismu vlastní, vykazují mnohem silnější reakci vůči patogenním buňkám oproti buňkám nelicencovaným, které si zachovávají i určitou míru tolerance k vlastním buňkám^{12,56}. Původně se mělo za to, že k licencování dochází během vývoje v kostní dřeni⁵⁷. Novější studie nicméně

ukazují, že k licencování dochází i u zralých NK buněk v perifériích. Souhrnně vzato je vzdělávání NK buněk dynamickým procesem, který se uskutečňuje v průběhu celého jejich života a lze jej považovat za rozšíření vlastní *missing-self* hypotézy⁵⁶.

1.2 Signalizace NK buněk a jejich receptory

Jak již bylo nastíněno, NK buňky na svém povrchu exprimují sofistikovaný repertoár inhibičních a aktivačních receptorů, který jim napomáhá rozlišit zdravou buňku od transformované a dle toho zahájit buď obrannou cytotoxickou reakci, nebo zachovat toleranci. Namísto signálů z identických receptorů, jako je tomu u T a B buněk, jsou NK buňky regulovány na základě komplexní integrace nespočtu různých jimi přijatých signálů. Ačkoliv termín „NK receptor“ bývá užíván pro molekuly, které byly poprvé objeveny na NK buňkách, pouze menšina těchto receptorů na povrchu NK buněk je pro ně specifická (jako např. NCR, Natural Cytotoxicity Receptors)⁵⁸ a většina z nich je exprimována i jinými buněčnými typy. Příkladem jsou T lymfocyty, zejména $\gamma\delta^+$ T buňky a aktivované $CD8^+$ T buňky³¹.

To, zda dojde k invazi NK buněk a následnému zneškodnění cílové buňky, nebo jestli zůstane ušetřena, je důsledkem souhry aktivačních a inhibičních receptorů a rozhodující je poměr jimi přijatých signálů (Obr. 4). Pokud dojde k zapojení jak

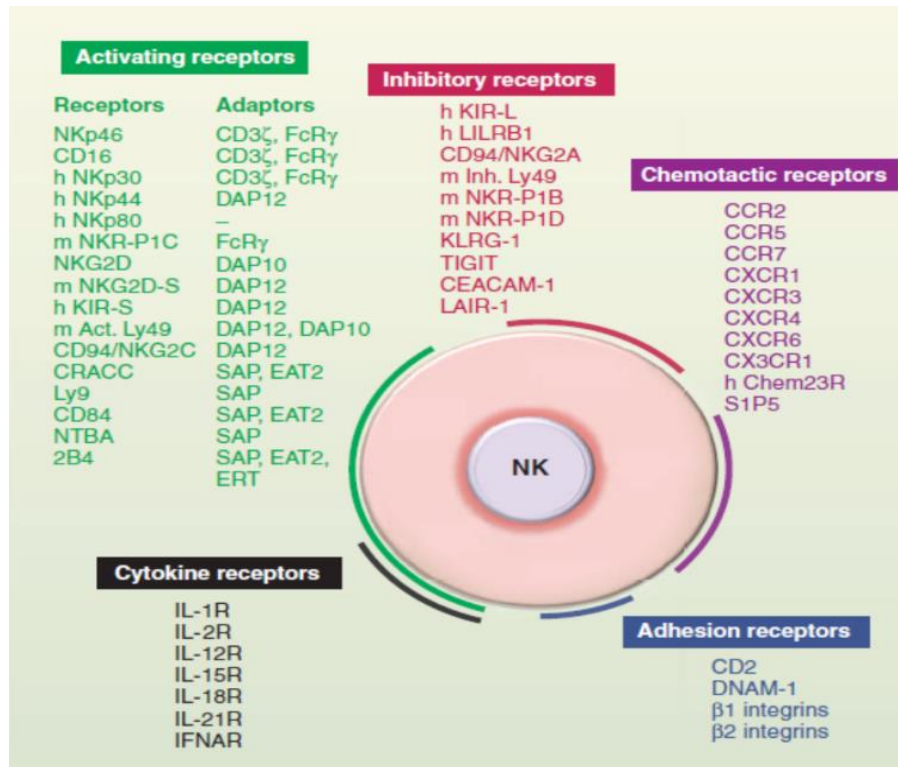


Obr. 4¹²⁴, upraveno: **Model procesu NK–buněčného rozpoznávání.**

Vlevo – zdravá buňka, na níž je přítomen MHC I ligand poskytující efektorové NK buňce inhibiční signál, jehož váha převáží signály aktivační. Vpravo – abnormální, v tomto případě tumorová, buňka s chybějícími MHC I nemůže poskytnout NK buňce inhibiční signál, buňka je tedy v aktivovaném stavu, kdy je schopna prostřednictvím cytolytických mechanismů zneškodnit svůj cíl.

inhibičních, tak aktivačních receptorů, aktivační signál je inhibičními receptory limitován a k aktivaci dojde pouze v případě, je-li překonán tzv. aktivační práh.

Mimo rozdělení receptorů na aktivační a inhibiční je lze také rozlišit dle různých vlastností na adhezivní, cytokinové a chemotaktické²² (Obr. 5). Ze strukturního hlediska pak máme receptory imunoglobulinové a C-lektinové skupiny.



Obr. 5¹²⁵. Skupiny NK–buněčných receptorů.

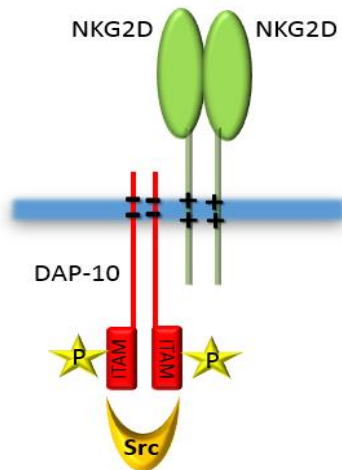
1.2.1 Signalizace zprostředkovaná inhibičními receptory

Signalizace skrz inhibiční receptory probíhá za využití konzervovaného sekvenčního motivu ITIM (tzv. imunoreceptorový inhibiční motiv založený na tyrosinu), který se nachází v intracelulární části receptorové molekuly. Tento kanonický inhibiční motiv je definován sekvencí (I/L/V/S)XYXX(L/V)⁵⁹. Ve chvíli, kdy se inhibiční receptor setká se svým ligandem, dojde k fosforylaci tyrosinových zbytků v jeho ITIM motivu proteintyrosinkinasou (PTK) z rodiny Src kinas, což má za následek zahrnutí lipidové fosfatasy SHIP-1 (která degraduje PI3P na PI2P) nebo tyrosinových fosfatasy SHP-1 a SHP-2⁶⁰ do signalizační kaskády. Tyto tyrosinové fosfatasy potlačují NK–buněčnou odpověď prostřednictvím defosforylace proteinových substrátů PTK, které jsou součástí aktivační NK–receptorové signalizační dráhy^{11,21,59}. Fyzicky jde o tyto

procesy – uzavření kanálů pro Ca^{2+} a terminaci degranulace, produkce cytokinů nebo proliferace NK buněk^{19,59}. Tyto děje jsou však pouze přechodnou záležitostí, kdy se tatáž NK buňka může po určité době stát buňkou aktivovanou. Mezi nejznámější zástupce inhibičních receptorů u myši patří většina receptorů z polymorfní rodiny Ly49 (např. Ly49A, C, E)⁶¹, nebo receptory Nkr-p1b a d. U člověka je to několik zástupců z rodin KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor) a LIR (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor), nebo receptory hNKR-P1A a CD94/NKG2A^{31,62}.

1.2.2 Signalizace zprostředkovaná aktivačními receptory

Aktivační receptory naopak ve své cytoplasmatické doméně takový signalizační motiv nenesou. V transmembránové části však obsahují kladně nabitě aminokyseliny (lysiny a argininy), jejichž prostřednictvím dochází k nekovalentní interakci



Obr. 6. Schématické znázornění nekovalentní interakce mezi NKG2D receptorem a adaptorovou molekulou v membráně NK buňky.

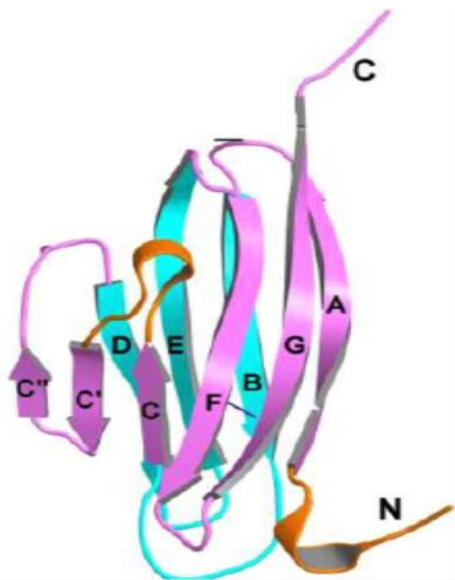
se záporně nabitými aspartátovými zbytky adaptorových proteinů, které v cytoplasmatické části molekuly nesou sekvenční ITAM motiv (tzv. imunoreceptorový aktivační motiv založený na tyrosinu) charakterizovaný sekvencí $(D/E)XXYXX(L/I)X_{6-8}YXX(L/I)$ ^{56,59} (Obr. 6).

Společně tak tvoří aktivační imunoreceptorový funkční komplex. Známý jsou tři různé adaptorové proteiny obsahující ITAM – DAP12, FcεRI-γ a CD3-ζ. Po jejich interakci s aktivačními receptory následuje fosforylace ITAM tyrosinů různými PTK rodiny Src (Lck, Fyn, Src, Yes, Lyn a Fgr), jež jsou navzájem redundantní⁵⁹.

Fosforylace vede k zapojení „druhé linie“ tandemových SH2 PTK rodiny Syk, jako jsou Syk a ZAP70^{58,59}, které aktivují další členy signalizační kaskády, jejímž důsledkem je sekrece cytokinů a aktivace cytotoxických pochodů, k jejichž regulaci dochází skrze odlišné signalizační dráhy^{63,64}. K aktivačním receptorům patří dva zástupci z rodiny Ly49 (Ly49D, Ly49H)⁶¹, zástupci rodin KIR a CD94/NKG2, NCR a receptor NKp80^{21,31}.

1.2.3 Receptory imunoglobulinového typu

Imunoglobulinové receptory jsou transmembránové proteiny I. typu a patří mezi ně receptory rodin KIR, LIR a NCR. V extracelulární oblasti tyto receptory obsahují evolučně konzervovanou imunoglobulinovou (Ig) doménu, která je tvořena dvěma antiparalelními β -listy (Obr. 7). Imunoglobulinové receptory NK buněk jsou kódovány leukocytárním Ig-receptorovým genovým komplexem (LRC), který je u lidí lokalizován na 19. chromosomu, u myši na chromosomu 7⁶⁵.



Obr. 7¹²⁶. Struktura imunoglobulinové domény.

exprese je závislá na fyziologickém stavu buňky, nebo virové proteiny (např. LIR-1 interaguje s UL18, který je homologický MHC I a je kódován lidským cytomegalovirem)^{66,69}. Pro aktivační NCR receptory jsou typické virové nebo nádorové proteiny, např. NKp30 rozeznává od tumoru odvozený B7-H7 ligand⁷⁰.

Nejrozsáhlejší a zdaleka nejpolymorfnější rodinou imunoglobulinových receptorů jsou receptory rodiny KIR (např. KIR2D nebo KIR3D se dvěma nebo třemi Ig doménami), které se nacházejí u lidí. Tyto receptory rozpoznávají především pro ně specifické HLA molekuly, které jsou analogy myších MHC glykoproteinů⁶⁶. Dalšími receptory náležejícími do této skupiny jsou NCR receptory (NKp30, NKp44 a NKp46) a rodina LIR (LIR-1-8)⁶⁷⁻⁶⁹.

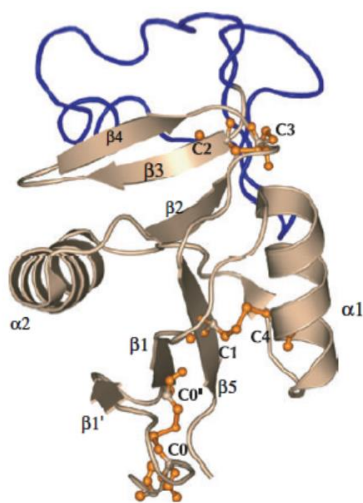
Nejběžnějšími ligandy KIR a LIR jsou klasické MHC I molekuly a na nich prezentované peptidy^{66,69}, dále hostitelské proteiny, jejichž

1.2.4 Receptory C-lektinového typu

C-lektiny jsou skupinou receptorů, která je schopna za přítomnosti Ca^{2+} iontů vázat sacharidy. Receptory NK buněk, které lze ze strukturního hlediska zařadit do této skupiny, označujeme jako CTLR (C-Type Lectin-like Receptors). Tyto receptory nezprostředkují vazbu sacharidů, nýbrž interagují s jinými proteinovými nebo peptidovými molekulami^{71,72}.

NK-buněčné CTLR se řadí mezi transmembránové proteiny II. typu. Jmenovitě jde o Ly49A – W, Nkr-p1a – g, CD94/NKG2A, –B, –C nebo –E a NKG2D⁶⁹. Každý z těchto receptorů nese v extracelulární části konzervovanou doménu C-lektinového typu (CTLD; C-type lectin-like domain). Tyto receptory jsou u myši kódovány genovým komplexem NKC na chromosomu 6, u lidí pak na chromosomu 12⁷³.

Struktura CTLD, která je s transmembránovou částí molekuly propojena krčkovou oblastí dlouhou 25–75 aminokyselinových zbytků⁶⁹, je tvořena dvěma α -helixy ($\alpha 1$ a $\alpha 2$), dvěma antiparalelními β -listy ($\beta 1'$ – $\beta 1$ – $\beta 5$ a $\beta 2$ – $\beta 3$ – $\beta 4$) a tzv. prodlouženou smyčkou (Obr. 8), která leží uvnitř domény mezi vlákny $\beta 2$ a $\beta 3$, je strukturně a evolučně flexibilní a pravděpodobně se účastní interakcí s ligandy⁷².



Obr. 8⁷². Struktura CTLD domény. Dva α -helixy; dva β -listy; modře prodloužená smyčka; oranžové disulfidové vazby.

Celá CTLD je stabilizována dvěma až třemi intramolekulárními disulfidovými vazbami a souborem konzervovaných hydrofobních a polárních interakcí. Čtyři cysteiny (C1–C4), které jsou nejvíce konzervovanými CTLD-aminokyselinovými zbytky, formují disulfidové můstky v uspořádání C1–C4 a C2–C3 (Obr. 8)⁷². V případě delší N-koncové části dochází ke stabilizaci struktury ještě třetí disulfidovou vazbou a jsou pak v uspořádání C1–C2, C3–C6 a C4–C5⁷⁴.

Některé CTLR mohou tvořit homodimery propojené disulfidovou vazbou v oblasti krčku (např. NKG2D)^{72,75}. U několika členů Nkrp1 rodiny byla rovněž prokázána jejich existence ve formě disulfidově propojených homodimerů (např. Nkr-p1d nebo hNKR-P1A)^{76,77}. O jejich existenci však panují jisté pochybnosti založené

na variabilním počtu cysteinů v oblasti krčku⁷⁸. Jak bude rozebráno níže, z rodiny myších Nkr-p1 receptorů byla zatím rozřešena struktura pouze jednoho jediného receptoru, molekuly Nkr-p1a⁷⁹.

Interakčními partnery myších receptorů Nkr-p1 jsou molekuly z rodiny Clr⁷³ (C-type lectin-related) a ligandem jediného lidského NKR-P1A receptoru je molekula LLT1²⁷, homolog myších Clr. Rodina myších receptorů Ly49 rozeznává především klasické MHC I glykoproteiny (např. Ly49-A a jeho interakční partner H-2⁶¹), dále pak aktivační receptor Ly49H interaguje s virově kódovaným ligandem m157⁸⁰ (molekula podobná MHC I glykoproteinům, kódovaná myším cytomegalovirem). Heterodimerické receptory CD94/NKG2 asociují s non-MHC molekulami (např. CD94/NKG2A u myší rozeznává Qa-1b ligand, u člověka HLA-E⁶²). Homodimerický aktivační NKG2D receptor pak váže stresem indukované ligandy MICA a MICB, homology MHC I⁶⁹.

Doposud však nebyly vytvořeny ani modely interakčních párů. Jediným případem modelu interakce dvou CTLD kódovaných uvnitř „NK-genového komplexu“ (NKC) je NKp65:KACL (KACL; Keratinocyte-Associated C-type Lectin) u člověka (kdy KACL je dimerní molekula interagující se dvěma monomery NKp65), který by mohl posloužit jako templát aplikovatelný na další interakční partnery v NKC, včetně Nkr-p1:Clr nebo NKR-P1A:LLT1⁸¹.

1.2.5 Nkr-p1 rodina receptorů a jejich ligandy

Nkr-p1 molekuly, označované také jako Klrp1, se řadí mezi receptory C-lektinového typu a byly prvními identifikovanými receptory NK buněk. Povrchový antigen NK1.1, o němž se dříve myslelo, že je pro myší NK buňky specifický a popsán již v roce 1977, byl klasifikován jako člen této rodiny. Později byl gen pro tento antigen identifikován jako Nkr-p1c. Nachází se v distální oblasti myšího chromosomu 6 označované jako NKC⁸²⁻⁸⁵. Orthology myších *Nkr-p1* genů byly posléze nalezeny u krysa na chromosomu 4⁸⁶⁻⁸⁸. V kontrastu s hlodavci, kteří mají genů pro Nkr-p1 receptory hned několik, byl v lidském genomu nalezen pouze jediný existující nepolymorfní gen *hNKR-P1A* lokalizovaný na chromosomu 12⁷⁶.

V NKC na myším chromosomu 6 bylo doposud identifikováno (ve směru od centromery k telomeře) celkem šest různých *Nkr-p1* genů: *a - g - c - b/d - f - e*; s tím, že v případě *Nkr-p1b/d* se jedná o dvě alelické formy téhož genu a *Nkr-p1e*

je pseudogenem^{89,90}. U krysa na chromosomu 4 pak byly identifikovány čtyři *Nkr-p1* geny: *Nkr-p1a, b/c, f a g*; kdy *Nkr-p1b/c* jsou rovněž dvě rozdílné alelické formy^{73,91}. Vedle NK buněk jsou *Nkr-p1* molekuly, stejně jako většina jejich receptorů, exprimovány také na povrchu NKT buněk, T lymfocytů a DC^{92,93}.

Zatímco lidský hNKR-P1A receptor je inhibiční a potlačuje cytotoxické působení NK buněk, u hlodavců je *Nkr-p1a*, stejně jako *c a f*, aktivační. Naopak *Nkr-p1b, d a g* jsou receptory inhibiční. Nejdůležitějším motivem pro následnou signalizační kaskádu všech myších NK receptorů, s výjimkou *Nkr-p1g* isoformy, je CXCP sekvence, která je součástí cytoplasmatické domény a reprezentuje vazebné místo pro Lck kinasu z rodiny Src⁹⁴, která fosforyluje tyrosiny v ITAM/ITIM sekvencích, jak bylo popsáno v kapitole 1.2. hNKR-P1A však žádný CXCP Lck-vazebný motiv nebo nabitě aminokyselinové zbytky v transmembránové oblasti neobsahuje a ačkoliv jde o receptor inhibiční, ve své sekvenci nenesí ani ITIM motiv. Bylo zjištěno, že k signalizaci využívá asociace s kyselou sfingomyelinasou, enzymem, který se účastní katabolismu sfingomyelinu a poskytuje důležitého „druhého posla“ ceramid⁹⁵. Molekulární mechanismus přenosu signálu skrze hNKR-P1A však zůstává neznámý.

Jak bylo uvedeno v kapitole 1.2.4, C-lektinové receptory obecně interagují s MHC I nebo jim příbuznými molekulami. Inhibiční *Nkr-p1b/d* však vážou na MHC nezávislé proteinové ligandy⁹⁶. Tím je v tomto případě ligand Clr-b⁹⁷, který je hojně exprimován ve všech myších tkáních kromě mozku⁹⁸ a jeho exprese je výrazně snížena při genotoxickém stresu nebo virové infekci, což je v souladu s *missing-self* hypotézou^{26,99,100}. Clr proteiny reprezentují C-lektinům příbuznou proteinovou rodinu, jinak známou jako rodina lektinů inhibujících osteoklasty (Ocil – Osteoclast inhibitory lectin), která je kódována geny uvnitř myšičího NKC²⁶ společně s *Nkr-p1* geny, a rovněž se řadí mezi membránové glykoproteiny II. typu. Aktivační *Nkr-p1f* pak váže Clr-g, -c, -d a *Nkr-p1g* ligandy Clr-d, -f, -g, přičemž exprese těchto ligandů je oproti Clr-b výrazně tkáňově omezena; např. Clr-a byl nalezen pouze v tenkém střevě; Clr-c je exprimován v jazyku, slezině, thymu, vaječnicích, varlatech a lymfatických uzlinách; Clr-d transkripty byly nalezeny jen v oku a Clr-f v játrech, ledvinách a tenkém střevě^{98,101}. Ligandy pro myší *Nkr-p1a*

a Nkr-p1c nebyly dosud identifikovány⁷³. Shrnutí známých interakčních partnerů je zobrazeno v Tabulka 1.

Tabulka 1: Znárodnění interakčních partnerů u myši a u člověka.

	Funkce - myš	Ligand - myš	Ligand - člověk
Nkr-p1a	+	?	LLT1
Nkr-p1b/d	-	Clr-b	
Nkr-p1c	+	?	
Nkr-p1e	pseudogen		
Nkr-p1f	+	Clr-c, d, g	
Nkr-p1g	-	Clr-d, f, g	

„+“ – receptory aktivační, „-“ – receptory inhibiční

1.3 Receptor Nkr-p1a

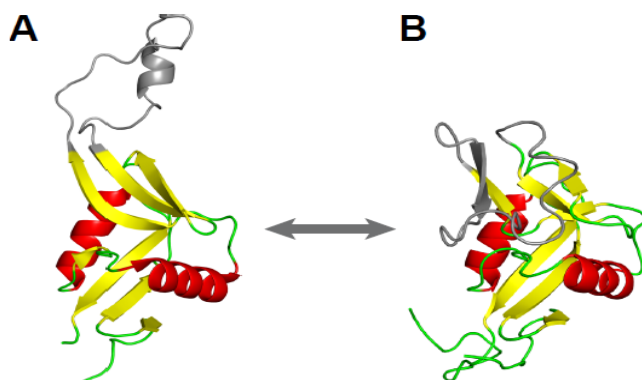
Receptor Nkr-p1a, jinak také CD161a molekula, je členem výše popsané rodiny receptorů Nkr-p1. Gen pro myši Nkr-p1a (mNkr-p1a) se nachází na chromosomu 6 jako součást NKC⁸⁹, u krys se nalézá na chromosomu 4 a u člověka na syntenickém chromosomu 12⁷⁶. Lidský NKRP1A (hNKRP1A) receptor je však prozatím u člověka jediným zástupcem, který patří do této rodiny a s myši nebo krysí Nkr-p1a molekulou sdílí 46% sekvenční homologii⁷⁶.

Zatímco u hlodavců je Nkr-p1 rodina glykoproteinů přednostně exprimována na všech NK buňkách a na T buňkách jen sporadicky, hNKRP1A je přítomen na NK buňkách pouze z 25 %; naopak na CD4⁺ a CD8⁺ T buňkách tvoří v průměru 89 % všech receptorů⁷⁶. S vysokou frekvencí je exprimován na pomocných Th17 lymfocytech, které se diferencují z CD4⁺ T buněk, a hrají důležitou roli v autoimunitních a zánětlivých onemocněních chronického charakteru (např. u revmatoidní arthritidy)¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Ligandem krysího Nkr-p1a je molekula Clr11, jejíž vazba na receptor spouští cytotoxickou aktivitu⁹¹. hNKRP1A rozeznává LLT1 molekulu, která je strukturně podobná myším Clr proteinům a je exprimována na aktivovaných NK, T, B a DC buňkách^{27,91,105}. Zatímco tato interakce inhibuje cytotoxické působení NK buněk, sekreci IFN- γ ²⁷ a je analogická interakci Nkr-p1b:Clr-b, v případě rozpoznání LLT1 ligandu na cílových buňkách T buňkami dochází ke stimulaci proliferace a zvýšené produkci IFN- γ ¹⁰⁶. Ačkoliv detailnímu mechanismu regulace

imunitní odpovědi pomocí hNKR-P1A ještě není úplně porozuměno, byla na tomto receptoru identifikována oblast zodpovědná za jeho interakci s LLT1¹⁰⁷. Jak bylo zmíněno v kapitole 1.2.5, ligand pro mNkr-p1a doposud nebyl identifikován.

Abychom mohli správně porozumět tomu, jak Nkr-p1 receptory fungují, je nezbytné charakterizovat jejich strukturu. V roce 2011 byla rozřešena první trojrozměrná struktura reprezentující Nkr-p1 rodinu, krystalová struktura extracelulární domény mNkr-p1a⁷⁹. P. Kolenkem a dalšími bylo pomocí molekulového nahrazení (s využitím extracelulární domény lidské molekuly CD69) zjištěno, že jádro C-lektinové domény je homologní s ostatními CTLD receptory a že část domény tvořící tzv. prodlouženou smyčku v krystalu interaguje se sousedící smyčkou a tvoří homodimer prostřednictvím tzv. „domain swapping“ efektu, kdy dochází ke vzniku vazby mezi (v tomto případě) dvěma proteinovými molekulami tak, že si navzájem vymění identické domény¹⁰⁸. Zatímco v krystalu je smyčka natažena do prostoru, metodou chemického zesílení v kombinaci s vodík/deuteriovou výměnou bylo zjištěno (a potvrzeno pomocí NMR), že v roztoku se smyčka nachází v těsné blízkosti



Obr. 9^{109,110}, upraveno. **Trojrozměrná struktura extracelulární lektinové domény mNKR-P1A.** Struktura A byla řešena RTG difrakcí, struktura B pomocí NMR v roztoku. Šedou barvou je vyznačena konzervovaná dlouhá smyčka, která zaujímá odlišnou konformaci.

kompaktního jádra¹⁰⁹ (Obr. 9).

Tyto konformační změny v oblasti dlouhé smyčky daly vzniknout hypotéze, podle níž by mohly být vyvolány vazbou ligandu^{109,110}. V případě

smyčky vybíhající směrem od jádra CTLD však může jít

pouze o krystalizační artefakt,

čemuž napovídá i studie interakce Nkp65:KACL,

na jejímž základě je vazba ligandu takovýmto Nkr-p1a

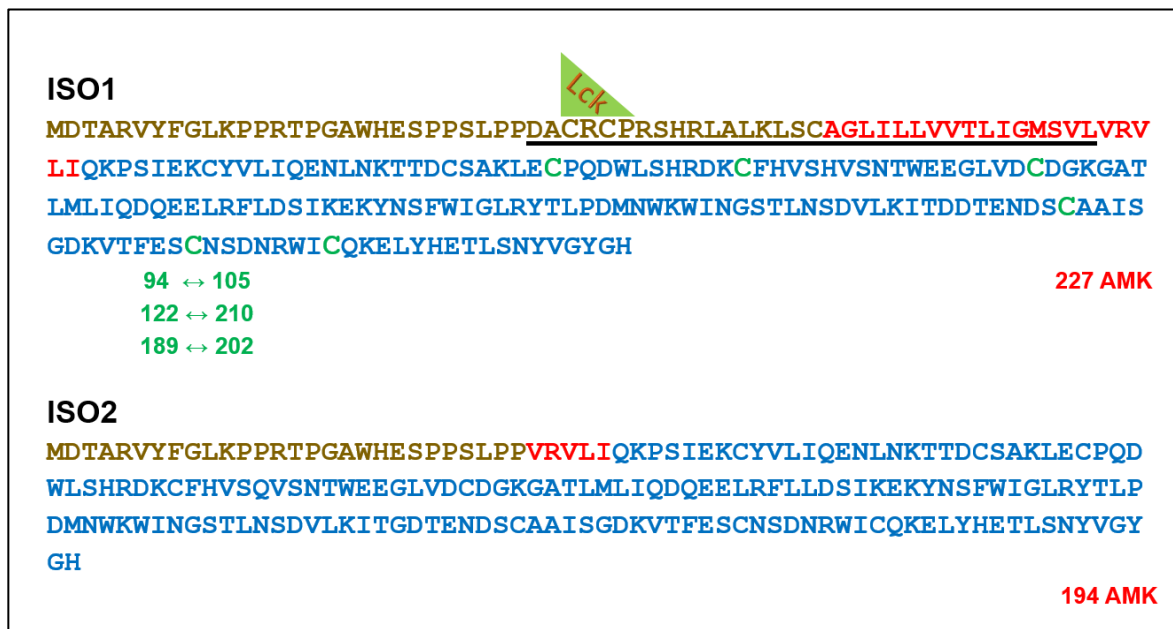
dimerem stericky vyloučena⁸¹. Existují však C-lektinové proteiny, bitiscetin a MMR4 (Macrophage Mannose Receptor 4), u nichž prodloužená smyčka rovněž vybíhá do prostoru a skutečně k interakci s ligandem slouží^{111,112}.

1.4 Myší Nkr-p1a iso2 molekula

V nedávné době byla v naší laboratoři objevena nová isoforma receptoru mNkr-p1a u myší linie C57BL/6 a prozatím je k dispozici pouze experimentální důkaz na transkripční úrovni, kdy byla exprese této mRNA detegována technikou RT-PCR v myší slezině.

Přípravou rekombinantního konstruktů pro její expresi jsem se zabývala ve své bakalářské práci. Tato forma, nazvaná mNkr-p1a iso2, postrádá na rozdíl od původní „isoformy 1“ významnou část transmembránového segmentu a menší část cytoplasmatické domény (Obr. 10). Extracelulární část je u obou isoform identická. Vlivem chybějícího cytoplasmatického úseku u krátké formy se ztrácí i důležitý signalizační vazebný motiv pro Lck kinasu, CXCP – zde CRCP (Obr. 10).

Cílem této práce bylo charakterizovat strukturu tohoto rekombinantního proteinu jednak metodou určení vzdáleností v molekule pomocí chemického zesítění, jednak mapováním přítomnosti a zapojení disulfidových vazeb – obojí technikou hmotnostní spektrometrie. U isoformy 1 byla potvrzena přítomnost disulfidových vazeb, které jsou schematicky znázorněny v Obr. 10. Struktura, lokalizace, vlastnosti a úloha mNkr-p1a iso2 jsou zatím nejasné.

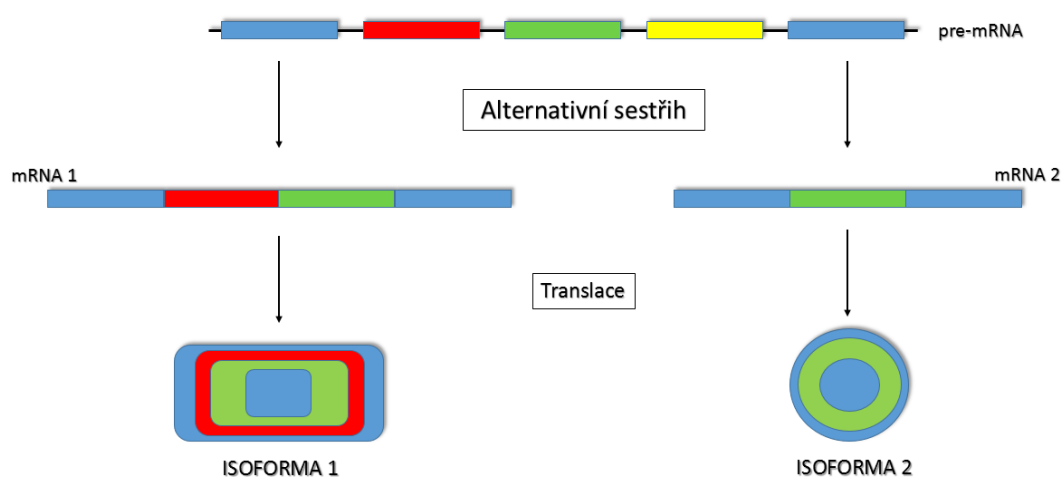


Obr. 10. Srovnání aminokyselinových sekvencí mNkr-p1a iso1 vs. iso2. Srovnání intracelulární (hnědá), transmembránové (červená) a extracelulární (modrá) oblasti. U isoformy 1 jsou zeleně vyznačeny známé disulfidové vazby a podtržena část chybějící u kratší isoformy 2. Zároveň je u isoformy 1 zobrazen cytoplasmatický motiv CRCP interagující s Lck kinasou, která následně fosforyluje tyrosiny v ITAM sekvenci adaptorového proteinu; isoforma 2 tento typický signalizační motiv postrádá.

1.5 Alternativní sestřih RNA a biosyntéza proteinů

1.5.1 Alternativní sestřih

Ke vzniku různých isoform proteinů dochází mj. vlivem rozdílného sestřihu na úrovni primárního transkriptu daného genu. Jde o tzv. posttranskripční alternativní sestřih (Obr. 11), kdy z jediného transkribovaného genu vznikne několik variant mRNA na základě různých kombinací exonů a intronů, čímž je dosaženo vyšší diverzity a komplexity proteomu. K tomuto procesu dochází pod vlivem evolučního tlaku a zároveň je takto další evoluční tlak vyvíjen. Touto cestou dochází i ke vzniku membránové a solubilní formy molekuly mNkr-p1a u myšního kmene C57BL/6.



Obr. 11. Schématické znázornění průběhu alternativního sestřihu RNA.
Touto cestou dochází ke vzniku rozdílných isoform proteinu mNkr-p1a.

Jako příklad podobné „isodvojice“ membránový vs. sekretovaný protein v rámci C-lektinových proteinů vznikající alternativním sestřihem RNA lze uvést isoformy Dectinu-2¹¹³ nebo Dectinu-1¹¹⁴. Kromě těchto dvou příkladů však existuje celý repertoár membránových proteinů II. typu z C-lektinové rodiny, které mají svou rozpustnou formu, což značí, že jde o evolučně konzervovanou vlastnost¹¹⁵.

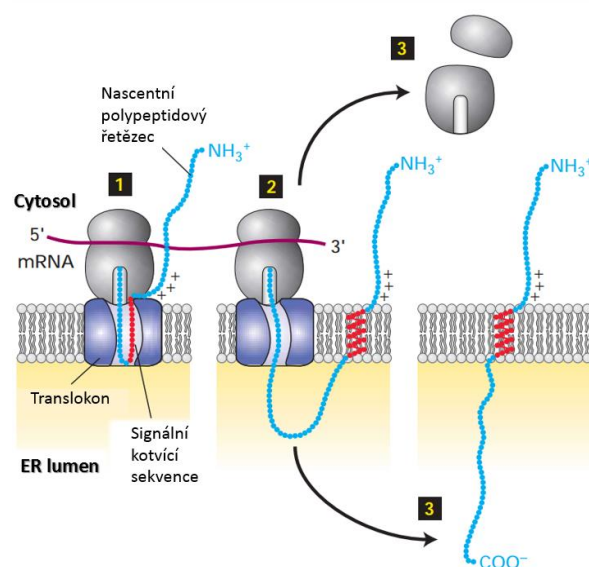
Existují případy, kdy isoformy odvozené takto z jediného genu mohou být funkčně odlišné, působit antagonisticky nebo se vzájemně regulovat. Jedním z nich je alternativně sestřižená isoforma proteinu CD40, která znemožňuje signalizaci samotné CD40 plné délky, přesný mechanismus působení však není jasný¹¹⁶.

1.5.2 Biosyntéza transmembránových proteinů II. typu

Molekula mNkr-p1a se řadí mezi membránové proteiny II. typu, pro něž je charakteristický intracelulární N-konec, zatímco C-konec směřuje ven z buňky a skrz membránu procházejí jediným α -helixem o délce 20–25 aminokyselinových zbytků.

Ribosom volně se pohybující v cytoplasmě buňky, na němž dochází k translaci ve směru od N-konce, nasedá na membránu hrubého endoplasmatického retikula (rER; Rough Endoplasmic Reticulum) bezprostředně poté, co proteinová částice rozpoznávající signál (SRP; Signal Recognition Particle) rozpozná čerstvě nasyntetizovanou tzv. *signální kotvicí sekvenci* syntetizovaného proteinu. Ta sestává zhruba z 22 hydrofobních aminokyselin

a později tvoří transmembránový segment proteinu¹¹⁷. SRP v komplexu s ribosomem a nově syntetizovaným polypeptidovým řetězcem pak interaguje s receptorem pro SRP (SR; Signal recognition particle Receptor) zanořeným v membráně rER a dochází k vložení signální kotvicí sekvence do translokonu, což je proteinový pór umožňující vstup nascentního polypeptidového řetězce do lumen rER (Obr. 12). Zatímco N-terminus zůstává ukotvený na vnější straně rER, C-konec je za využití energie z hydrolýzy GTP uvolňované během translace zasunut dovnitř.

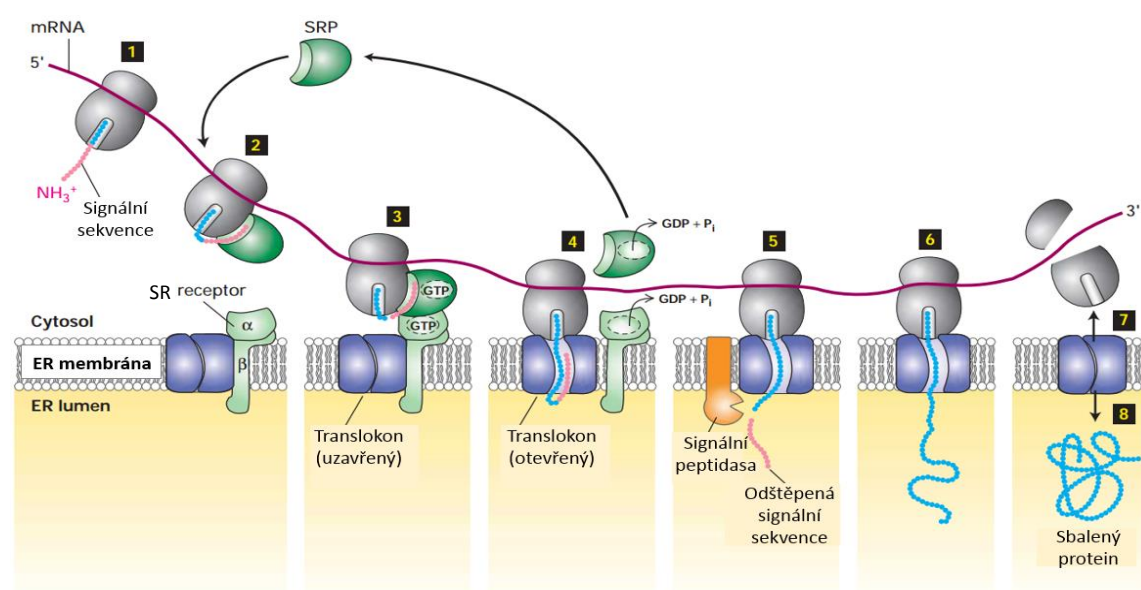


Obr. 12. Syntéza membránového proteinu II. typu. Poté co je signální kotvicí sekvence po rozpoznání SRP umístěna do translokonu (1), může jím díky své hydrofobicitě volně laterálně postupovat a polypeptidový řetězec je tak ukotven ve fosfolipidové dvojvrstvě (2). Po dokončení syntézy celého proteinového řetězce je C-konec uvolněn do lumen rER (3)¹¹⁷.

Orientace proteinového řetězce v membráně a tedy jeho topologie je determinována přítomností kladně nabitých argininů na jednom z okrajů signální kotvicí sekvence – tento konec polypeptidového řetězce (v případě proteinů II. typu N-konec) zůstává ukotven na cytoplasmatické straně membrány.

1.5.3 Solubilní sekretované proteiny

Solubilní sekretované proteiny jsou syntetizovány analogicky membránovým proteinům II. typu s tím rozdílem, že neobsahují hydrofobní signální kotvící sekvenci uvnitř rostoucího polypeptidového řetězce, ale nesou hydrofobní N-terminální signální sekvenci, která je rozpoznávána SRP¹¹⁷. Poté, co je po rozpoznání SRP v komplexu s ribosomem a nascentním řetězcem SR receptorem signální sekvence translokována do lumen rER, dochází k jejímu odštěpení transmembránovou signální peptidasou a polypeptidový řetězec je dále postupně prodlužován do doby, kdy je celý nasunut do lumen rER (Obr. 13).



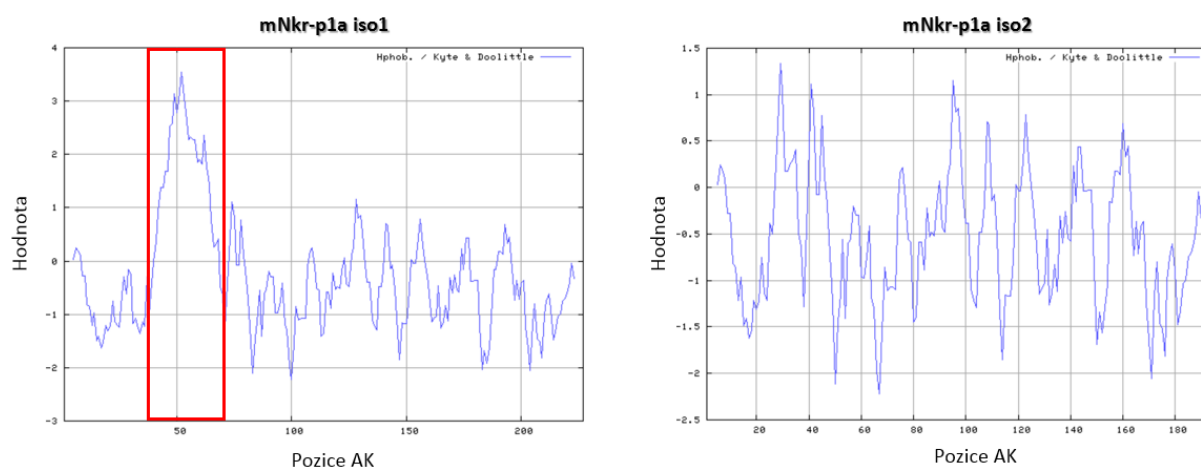
Obr. 13. Syntéza sekrečního proteinu. SRP po rozpoznání signální sekvence syntetizovaného proteinu (1) interaguje s SR receptorem (2), vlivem čehož dojde k nasednutí ribosomu na membránu rER (3). Tato vazba na membránu vyvolá konformační změnu translokátoru, do nějž je nasunut polypeptidový řetězec (4). Jakmile je signální sekvence translokována do lumen ER, je odštěpena signální peptidasou (5) a je obnoven elongační proces řetězce (6). Po nasyntetizování a translokaci celého řetězce je ribosom uvolněn z membrány ER (7). V lumen ER pak dochází k postranslačním procesům za vzniku sbalené proteinové molekuly (8)^{upraveno,117}.

Takto nasyntetizovaný protein pak podstupuje, stejně jako transmembránové proteiny, další postranslační procesy, jakými jsou postranslační modifikace proteinu, kontrola správné konformace a jeho lokalizace skrz vesikulární systém Golgiho aparátu do příslušných kompartmentů.

Pokud však protein N-terminální signální sekvenci neobsahuje, ribosom, na němž probíhá jeho proteosyntéza zůstává po celou dobu translace volně v cytoplasmě,

kam je nakonec vznikající protein uvolněn. Správné sbalení proteinu je v tomto případě zajištěno přítomností cytoplasmatických chaperonů a chaperoninů.

Z výnosu hydrofobicity (Obr. 14) lze pozorovat, že mNkr-p1a iso1 ve své sekvenci obsahuje signál typický pro hydrofobní transmembránový úsek, který u mNkr-p1a iso2 dle očekávání chybí. Zároveň je z výnosu pro mNkr-p1a iso2 patrné, že postrádá hydrofobní N-terminální signální sekvenci, která by mohla být rozpoznána SRP. Je tedy vysoce pravděpodobné, že protein mNkr-p1a iso2 se *in vivo* vyskytuje uvnitř cytoplasmy, neboť je mu v principu znemožněna translokace do rER.



Obr. 14. Výnos hydrofobicity pro proteiny mNkr-p1a iso1 a iso2. Z výnosu hydrofobicity proteinu mNkr-p1a iso1 lze pozorovat profil typický pro transmembránové proteiny II. typu. Červeně vyznačená část odpovídá transmembránové oblasti zahrnující aminokyseliny 46–66. Výnosy byly získány na základě známé aminokyselinové sekvence pomocí nástroje ProtScale¹²⁷.

2) CÍLE PRÁCE

- Produkce rekombinantního proteinu mNkr-p1a iso2 v prokaryotickém expresním systému
 - nalezení vhodných produkčních podmínek
 - renaturace *in vitro*
 - purifikace renaturovaného proteinu
 - ověření identity proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie

- Strukturní charakterizace mNkr-p1a iso2
 - 1) hmotnostně spektrometrické techniky
 - zapojení disulfidových vazeb
 - určení vzdáleností v molekule technikou chemického zesíťení

 - 2) další strukturní charakterizace
 - nukleární magnetická rezonance (NMR): potvrzení, zda má protein definovanou 3D strukturu
 - dynamický rozptyl světla (DLS): ověření homogenity proteinu
 - cirkulární dichroismus (CD): zastoupení sekundárních struktur

3) MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy AL54-IC	<i>Mettler Toledo, ČR</i>
Automatické pipety	<i>Gilson, USA</i>
Celulosevá membrána (MWCO 10 kDa)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Centrifuga Avanti J-26 XP	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga MPW 375	<i>MPW Med. Instruments, Polsko</i>
Centrifuga Spectrafuge 16M	<i>Labnet International, USA</i>
Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra	<i>Millipore, USA</i>
Dialyzační trubice Spectra/Por	<i>Spectrum Laboratories, USA</i>
Filtr na plastovou injekční stříkačku 22	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Hmotnostní spektrometr FT ICR solariX XR	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
HPLC systém BioSys 510	<i>Beckman Coulter, USA</i>
HPLC systém NGC Quest™ 10 Chromatography System	<i>Bio-Rad, USA</i>
Chladnička	<i>Zanussi, Itálie</i>
Kahan	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Magnetická míchačka Stuart CB161	<i>Keison, UK</i>
Mrazící box (-20 °C)	<i>Electrolux, Švédsko</i>
Mrazící box (-80 °C)	<i>Revco, USA</i>
Napájecí zdroj EPS 500/400	<i>Pharmacia, USA</i>
NMR spektrometr Avance III HD	<i>Bruker BioSpin, Německo</i>
pH metr Φ200	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Ploténkový vařič	<i>Eta, ČR</i>
Předvážky HF-1200G	<i>AND, USA</i>
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Souprava pro ultrafiltraci	<i>Millipore, USA</i>
Spektrofotometr DeNovix DS-11	<i>DeNovix, USA</i>
Spektrometr Chirascan CD spectrometer	<i>Applied Photophysics, UK</i>
Třepačka na Erlenmayerovy baňky	<i>Sanyo Gallenkamp Ltd., UK</i>

Třepačka na zkumavky BigGer Bill	<i>Thermolyne, USA</i>
Třepačka na zkumavky Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf, Německo</i>
Ultrazvuková lázeň Sonorex	<i>Bandelin, Německo</i>
Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer4710	<i>Cole-Parmer Instrum. Co., USA</i>
Vakuová odparka SpeedVac	<i>Jouan, Francie</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody MilliQ	<i>Millipore, USA</i>
Zetasizer Nano ZS90	<i>Malvern, UK</i>

3.2 Chromatografické kolony

Kolona Peptid MicroTrap™	<i>Michrom, USA</i>
Kolona Protein MicroTrap™	<i>Michrom, USA</i>
Kolona Magic C18AQ	<i>Michrom, USA</i>
Kolona Superdex 75 HR 10/300	<i>GE Healthcare, Německo</i>
Kolona Q Sepharose Fast Flow	<i>GE Healthcare, Německo</i>

3.3 Chemikálie

Acetonitril	<i>Merck, Německo</i>
Agar	<i>Oxoid, USA</i>
Akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Azid sodný (NaN ₃)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Bacto-trypton	<i>Oxoid, USA</i>
Bacto-yeast extrakt	<i>Oxoid, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Serva, Německo</i>
Comassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, Německo</i>
Cystamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Cysteamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Disukcinimidyl glutarát	<i>Pierce Biotechnology, USA</i>
Disukcinimidyl suberát	<i>Pierce Biotechnology, USA</i>
Dithiothreitol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Dimethyl sulfoxid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

Dodecylsulfát sodný	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Dusičnan stříbrný (AgNO ₃)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Ethanol	<i>Lachema, ČR</i>
Ethylendiamintetraoctová kyselina	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Ethylmorfolin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Fenylmethylsulfonyl fluorid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Formaldehyd (CH ₂ O)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Glycerol	<i>Lachema, ČR</i>
Glycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Guanidin-HCl	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
HEPES	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Hydroxid sodný (NaOH)	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid hořečnatý (MgCl ₂)	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid sodný (NaCl)	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid vápenatý (CaCl ₂)	<i>Lach-ner, ČR</i>
Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Jodacetamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Kanamycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Kyselina chlorovodíková (HCl)	<i>Lachema, ČR</i>
Kyselina mravenčí pro LC-MS	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Kyselina octová	<i>Lachema, ČR</i>
L-arginin	<i>Serva, Německo</i>
Leupeptin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Markery pro SDS-PAGE	
Prestained Protein Marker	<i>New England Biolabs, USA</i>
SeeBlue Pre-stained Protein Standard	<i>Life Technologies, USA</i>
Unstained Protein Marker	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
β-merkaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Methanol	<i>Lachema, ČR</i>
N,N'-metylen-bis-akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Peroxodisíran amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Q-Sepharosa	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

Sacharosa	<i>Lachema, ČR</i>
Tetracyklin	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Tetramethylethylendiamin	<i>Serva, Německo</i>
Thiosíran sodný (Na ₂ S ₂ O ₃)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Tris(2-karboxyethyl)fosfin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Tris-HCl	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Uhličitan draselný (K ₂ CO ₃)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Voda (LC/MS grade)	<i>Merck, Německo</i>

Všechny použité chemikálie byly v nejvyšší komerčně dostupné kvalitě.

3.4 Enzymy

DNAsa I (deoxyribonukleasa I)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Lysozym	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
RNAsa I (ribonukleasa I)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Trypsin	<i>Promega, USA</i>

3.5 Komerční sady

NuPAGE Electrophoresis® System	<i>Thermo Fisher Scientific, USA</i>
--------------------------------	--------------------------------------

3.6 Vektory

pET-30a(+)	<i>Novagen, USA</i>
------------	---------------------

3.7 Bakteriální kmeny

BL21-Gold(DE3) <i>E. coli</i> B F- <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	<i>Stratagene, USA</i>
---	------------------------

3.8 Roztoky a pufrы

Akrylamidová směs pro přípravu SDS-PAGE gelů: 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) N,N'-metylen-bis-akrylamid

Barvicí roztok pro SDS-PAGE: 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Dialyzační pufr: 15mM Tris-HCl, 9mM NaCl, pH 8,0

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE: 10mM Tris-HCl, 250mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

Ethylmorfolinový pufr: 100mM ethylmorfolin, pH 8,4

Gel pro SDS-PAGE - rozdělovací 15% (V=5ml): 1,1 ml dH₂O, 2,5 ml 30% roztoku akrylamidu, 1,3 ml 1,5M TRIS-HCl (pH 8,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,002 ml TEMED, 0,05 ml 10% APS

Gel pro SDS-PAGE - zaostřovací 5% (V=1ml): 0,68 ml dH₂O, 0,17 ml 30% roztoku akrylamidu, 0,13 ml 1,0M TRIS-HCl (pH 6,8), 0,01 ml 10% SDS, 0,001 ml TEMED, 0,01 ml 10% APS

Guanidinový pufr pro solubilizaci inkluzních tělísek: 6M guanidin-HCl, 100mM Tris-HCl, 10mM DTT, pH 8,0

Chromatografický pufr A pro iontově výměnnou chromatografii: 15mM Tris-HCl, 9mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 8,5

Chromatografický pufr B pro iontově výměnnou chromatografii: 15mM Tris-HCl, 1M NaCl, 1mM NaN₃, pH 8,5

Chromatografický pufr pro gelovou filtraci: 10mM HEPES, 50mM NaCl, pH 7,5

Chromatografický pufr A pro LC-MS analýzu: 2% (v/v) acetonitril, 0,1% (v/v) kyselina mravenčí

Chromatografický pufr B pro LC-MS analýzu: 98% (v/v) acetonitril, 0,1% (v/v) kyselina mravenčí

LB agar: 1,5% (w/v) agar v LB médiu

LB médium: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7,4

Odbarvovací roztok pro polyakrylamidové gely (SDS-PAGE): 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek: 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM β -merkптоethanol, 1mM NaN₃, pH 7,4

Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek: 0,5% (w/v) Triton X-100, 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM β -merkптоethanol, 1mM NaN₃, pH 7,4

Renaturační pufr: 50mM Tris-HCl, 0,4M L-arginin, 100mM CaCl₂ ·2H₂O, 9mM cysteamin, 3mM cystamin, 1mM NaN₃, pH 8,0

Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek: 25% (w/v) sacharosa, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, pH 7,4

2× Vzorkový pufr pro SDS-PAGE - neredukující: 100mM Tris-HCl, 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8

2× Vzorkový pufr pro SDS-PAGE - redukující: 100mM Tris-HCl, 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) bromfenolová modř, 200mM DTT, pH 6,8

4) METODY

4.1 Exprese rekombinantního proteinu mNkr-p1a iso2

Protein mNkr-p1a iso2 byl exprimován v bakteriálních buňkách *E. coli* kmene BL21-Gold(DE3). Tento expresní systém je založen na bakteriofágové T7 RNA polymerase kódované uvnitř bakteriálního genomu v sekvenci *lac* operonu, která poté, co je exprimována, zahajuje transkripci cílového genu svým nasednutím na T7 promotor, který je součástí expresního vektoru pET-30a(+). Nami zvolený způsob indukce bylo využití induktoru, který zabraňuje vazbě *lac* represoru na *lac* operon a tím umožňuje nasednutí RNA polymerasy s následnou transkripcí T7 RNA polymerasy, jímž je analog laktosy, isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), který je na rozdíl od laktosy nemetabolizovatelný a jeho hladina tak zůstává po celou dobu experimentu konstantní¹¹⁸.

4.1.1 Transformace produkčních kompetentních buněk

Bakteriální produkční kompetentní buňky *E. coli* BL21-Gold(DE3) byly transformovány metodou teplotního šoku plasmidem pET-30a(+) obsahujícím insert genu pro protein mNkr-p1a iso2.

Ke 100 μ l rozmražené suspenze kompetentních buněk bylo přidáno 250 ng plasmidové DNA a inkubováno na ledu po dobu 30 min. Následně byly buňky vystaveny teplotě 42 °C po dobu 45 s, a poté byly opět inkubovány 1 min na ledu. Dále byl k buňkám pipetován 1 ml sterilního LB média bez antibiotik předeřátého na 37 °C a směs byla 1 hod inkubována při 37 °C.

Buněčná suspenze byla centrifugována při laboratorní teplotě po dobu 3 min a 5 000 \times g. Následně bylo odstraněno 800 μ l přebytečného supernatantu, ve zbylém médiu byly buňky rozptýleny a asepticky rozetřeny pomocí skleněné hokejky na Petriho misku s LB agarem obsahujícím kanamycin (kan) o koncentraci 50 μ g/ml a tetracyklin (tet) o koncentraci 12,5 μ g/ml. Petriho misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Současně byla provedena negativní kontrola, kdy na misku s antibiotiky byly nanесeny kompetentní buňky, které plasmidem transformovány nebyly.

4.1.2 Výběr vhodného produkčního klonu

Bakteriální klon vhodný pro velkoobjemovou produkci byl zvolen na základě provedení testu exprese proteinu mNkr-p1a iso2.

Pro test exprese byly z Petriho misky vybrány čtyři různé bakteriální kolonie získané transformací, jimiž bylo zaočkováno 5 ml LB média s antibiotiky (kan, tet) a suspenze byly ponechány růst přes noc při 37 °C a 220 rpm.

Následující den byl vždy od každé stacionární kultury zaočkován v poměru 1:100 2 × 1 ml LB média (kan, tet). Tyto kultury byly inkubovány 1 hod při 37 °C a 220 rpm. Vždy k jedné kultuře z dvojice byl přidán induktor exprese IPTG o koncentraci 0,1mM a oba vzorky byly inkubovány za stejných podmínek další 3 hod.

Kultury byly převedeny do mikrozkušavek, v nichž byly za laboratorní teploty centrifugovány (10 min při 5 000× g). Supernatant byl odsán pod vakuem a pelety rozptýleny ve 100 µl vzorkového redukujícího pufru pro SDS-PAGE. Tyto vzorky byly 5 min vařeny a následně centrifugovány při laboratorní teplotě (10 min a 10 000× g). Takto připravené vzorky byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE, kdy byla porovnávána exprese proteinů mezi jednotlivými kulturami.

4.1.3 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Pomocí SDS-PAGE lze separovat proteiny na základě elektroforetické pohyblivosti, která je určena především molekulovou hmotností proteinu, nikoli jejím tvarem a vlastním nábojem.

SDS-PAGE byla prováděna v 15% polyakrylamidovém separačním gelu a 5% zaostřovacím gelu. Elektroforetická aparatura byla naplněna elektrodoým pufrem a na gel byly naneseny vzorky spolu s proteinovým standardem molekulových hmotností. Posléze byla aparatura připojena ke zdroji konstantního proudu (25 mA/1 sklo) a napětí bylo nastaveno na 250 V. Když čelo elektroforézy doputovalo ke spodnímu okraji skel, byla metoda ukončena.

Nakonec byly gely 15 min barveny barvicím roztokem a přebytečné barvivo odmýváno odbarvovacím roztokem, dokud nebyl viditelný výsledek.

Barvení gelů stříbrem

Pokud se při dodržení výše uvedeného postupu barvení nepodařilo výsledek vizualizovat, bylo provedeno citlivější barvení stříbrem, které dokáže detegovat až nanogramová množství, postupem uvedeným v Tabulka 2.

Tabulka 2: Postup při vizualizaci proteinů stříbrem.

Krok	Roztok	Čas/ min	
1.	30% EtOH, 10% HAc	3×30	<i>fixace</i>
2.	20% EtOH	10	<i>fixace</i>
3.	H ₂ O	10	<i>promývání</i>
4.	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃	1	<i>senzibilizace</i>
5.	H ₂ O	2×0,3	<i>promývání</i>
6.	2 g/l AgNO ₃	30	<i>impregnace</i>
7.	H ₂ O	0,2	<i>promývání</i>
8.	0,7 ml/l CH ₂ O 30 g/l K ₂ CO ₃ 10 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃	2–4	<i>vyvolání</i>
9.	50 g/l Tris-HCl, 25% HAc	1	<i>zastavení</i>

HAc = kyselina octová, EtOH = ethanol

4.1.3.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Příprava vzorků se lišila dle jejich stavu (sediment vs. kapalný vzorek) a dle prostředí elektroforézy (redukující vs. neredukující). Sedimentované vzorky byly resuspendovány v 1× koncentrovaném ne/redukujícím vzorkovém pufru, kapalně byly smíseny s 2× koncentrovaným ne/redukujícím vzorkovým puforem. Vzorky v redukujícím prostředí byly 5 min vařeny a centrifugovány při laboratorní teplotě 10 min a 10 000× g, zatímco vzorky v neredukujícím prostředí byly rovnou centrifugovány, abychom se vyvarovali jejich denaturace. Nakonec byly vzorky spolu s proteinovým standardem molekulových hmotností aplikovány na gel.

4.1.4 Nalezení vhodných produkčních podmínek

Aby bylo dosaženo co možná nejvyššího výtěžku proteinu, byly postupně optimalizovány produkční podmínky: koncentrace induktoru exprese IPTG, produkční teplota a doba exprese cílového rekombinantního proteinu.

Na základě testu exprese byl vybrán produkční klon, z něž byly připraveny stacionární kultury a pro něž byly dané podmínky testovány.

Čerstvé stacionární kultury byly připravovány vždy zaočkováním LB média (kan, tet) původní stacionární kulturou v poměru 1:1000 a třepány přes noc při 220 rpm a 37 °C.

4.1.4.1 Optimalizace

1 ml LB média (kan, tet) byl zaočkován čerstvou stacionární kulturou v poměru 1:100 a kultivován při 37 °C a 220 rpm, dokud optická denzita měřená spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm (OD_{600}), proti dH₂O jako slepému vzorku, nedosáhla hodnoty 0,6. Poté byl přidán induktor exprese a stanovovány jednotlivé optimalizované parametry. Veškerá stanovení byla provedena v duplikátu.

Koncentrace induktoru exprese

Spolu s nezaindukovanou negativní kontrolou bylo testováno osm různých koncentrací induktoru exprese IPTG: 0,01mM; 0,05mM; 0,10mM; 0,20mM; 0,30mM; 0,50mM; 0,70mM a 1,00mM. Tyto vzorky byly po indukci inkubovány dalších 2,5 hod při 37 °C a 220 rpm.

Produkční teplota

Všechny vzorky byly po nárůstu do $OD_{600} = 0,6$ zaindukovány IPTG o optimální koncentraci (0,1mM). Testovány byly teploty: 40, 37, 35, 30 a 24 °C. Indukované vzorky byly při daných teplotách a 220 rpm inkubovány po dobu 2,5 hod. Nezaindukovaná kontrola byla za stejných podmínek inkubována při 37 °C.

Doba produkce

Jednotlivé vzorky byly kultivovány do $OD_{600} = 0,6$ a posléze u nich byla IPTG o optimální koncentraci indukována exprese, která probíhala při teplotě 37 °C

a 220 rpm. Expres proteinu byla ukončena v časech: 1; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8 a 12 hod. Negativní kontrola, která nebyla indukována, byla inkubována po dobu 2,5 hod.

Výsledky optimalizace byly vyhodnoceny SDS-PAGE v redukujícím prostředí (kapitola 4.1.3).

4.1.4.2 Růstová křivka

Dvakrát 100 ml LB média (kan, tet) v půllitrových Erlenmayerových baňkách bylo zaočkováno v poměru 1:100 čerstvou stacionární kulturou vybraného produkčního klonu. V době inokulace byl odebrán první vzorek (čas t_0), pro spektrofotometrické stanovení OD_{600} (oproti dH_2O). OD_{600} pak byla u bakteriálních kultur rostoucích při 37 °C a 220 rpm proměřována každých 30 min, dokud nedosáhla hodnoty 0,6. Poté byla kultivační teplota snížena na 35 °C, jež byly zvoleny jako optimální, a vzorky stále odebírány každých 30 min. Když OD_{600} překročila hodnotu 0,8, bylo pro měření nutné buněčnou suspenzi vhodně ředit.

Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu závislosti hodnot OD_{600} na době kultivace.

4.1.5 Velkoobjemová produkce proteinů

Podmínky zvolené na základě optimalizace jako nejvhodnější byly následně použity pro produkci mNkr-p1a iso2 ve velkém objemu.

Čtyři dvoulitrové Erlenmayerovy baňky naplněné 0,5 l LB média (kan, tet) byly zaočkovány v poměru 1:100 čerstvou stacionární kulturou a třepány 220 rpm při 37 °C, dokud kultivované bakterie nedosáhly $OD_{600} = 0,6$. U takto narostlých buněk byla indukována exprese proteinu přidáním 0,1mM IPTG, přičemž produkční teplota byla snížena na 35 °C. Produkce probíhala po dobu 6 hod za stálého třepání 220 rpm.

Bakteriální suspenze byly po ukončení produkce centrifugovány 12 min, 8 000× g při 4 °C. Po odstranění supernatantu byly pelety zamrazeny na -80 °C.

Pro kontrolu exprese mNkr-p1a iso2 byly během kultivace (před přidáním IPTG) a produkce (před sklizením buněk) odebrány z každé Erlenmayerovy baňky vzorky, s nimiž byla provedena SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu dle kapitoly 4.1.3.

4.1.6 Izolace inkluzních tělísek

Vzhledem ke zvolenému expresnímu systému byl cílový protein produkován ve formě inkluzních tělísek – nerozpustných agregátů v cytoplasmě buněk, které bylo zapotřebí izolovat a protein *in vitro* renaturovat.

Peleta získaná z 0,5 l LB média byla rozptýlena v 10 ml sacharosového lyzačního pufru (SLP) (10 ml SLP/peleta z 0,5 l LB média) s přidanými inhibitory proteas (1 μ M leupeptin a 1mM fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)) a baktericidním lysozymem o koncentraci 2 ng/ml. Zatímco PMSF je inhibitorem serinových proteas, leupeptin inhibuje serinové, cysteinové a threoninové proteasy. Takto připravené směsi byly opakovaně (celkem 4 \times) zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, rozmrazeny (vodní lázeň, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$) a při každém cyklu byly buňky rozbíjeny na ledu vždy 20 \times třísekundovými pulsy ultrazvukové sondy. Po této homogenizaci byl ke každé suspenzi přidán 20mM MgCl₂, 2 μ l DNAsy I (100 U/ml) a 5 μ l RNAsy I (10 mg/ml). Tyto směsi byly inkubovány 20 min při laboratorní teplotě a během toho ještě 2 \times ošetřeny ultrazvukovými pulsy na ledu. Nakonec byla homogenizovaná buněčná suspenze centrifugována 15 min, 10 000 \times g při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ve druhém kroku byly pelety resuspendovány ultrazvukovou sondou v 10 ml pufru s detergentem s přidanými inhibitory proteas v totožném množství jako v předchozím kroku, přičemž byl navíc přidán inhibitor metaloproteas (1mM EDTA). Vzorky byly centrifugovány za stejných podmínek.

Na závěr byly sedimenty stejným způsobem promyty v 10 ml promývacího pufru bez detergentu s přidanými inhibitory proteas (leupeptin, PMSF, EDTA) a podrobeny centrifugaci opět za totožných podmínek. Výsledný sediment sestávající převážně z inkluzních tělísek byl uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po celou dobu průběhu izolace inkluzních tělísek byly odebírány vzorky, supernatanty a sedimenty po centrifugaci, s nimiž byla provedena SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu dle kapitoly 4.1.3.

4.2 *In vitro* renaturace proteinu mNkr-p1a iso2

Izolovaná inkluzní tělíska byla pomocí vortexu a pipety resuspendována v 6M guanidinovém pufru (pH 8,0) s inhibitory proteas tak, aby výsledná koncentrace inkluzních tělísek v roztoku činila 50 mg/ml. Poté byla inkluzní tělíska pro úplné rozpuštění inkubována 1 hod při 40 °C a 300 rpm. Následně byl roztok centrifugován 30 min, 30 000× g při 4 °C, a získaný supernatant obsahující solubilizovaný protein byl ihned podroben renaturaci metodou tzv. rychlého naředění.

Solubilizované inkluze byly pomalu přikapávány rychlostí 1 kapka/5 s za stálého míchání do stonásobného objemu renaturačního pufru temperovaného na 4 °C. Renaturační roztok obsahující inhibitory proteas (leupeptin, PMSF) a vysokou koncentraci L-argininu, jež napomáhá správnému sbalení proteinu a snižuje míru agregace, byl poté s proteinem ponechán míchat v chladu 1 hod.

Následně byl roztok proteinu 30 min centrifugován (30 000× g, 4 °C) a supernatant převeden do dialyzačních střeň, v nichž byl 2 hod dialyzován v chladové místnosti při 4 °C proti 8 l dialyzačního pufru. Po uplynutí této doby byl dialyzační pufr vyměněn za čerstvý a za stejných podmínek dialýza probíhala další 4 hod.

Po dialýze byl roztok centrifugován 30 min, 30 000× g při 4 °C, abychom se zbavili precipitátu. Roztok s renaturovaným proteinem byl uchováván přes noc při 4 °C.

4.3 Zakoncentrování proteinového roztoku

Po dialýze byl objem roztoku snížen pomocí ultrafiltrace v ultrafiltrační cele, kde byl při laboratorní teplotě pomalu míchán a pod tlakem 0,4 MPa inertního plynu (dusíku) filtrován přes nitrocelulosovou membránu s póry o propustnosti 10 kDa.

Na menší objemy byl roztok proteinu zakoncentrován při 4 750× g a laboratorní teplotě pomocí centrifugačních koncentrátorů Amicon Ultra-15 s limitem propustnosti rovněž 10 kDa.

4.4 Purifikace proteinu mNkr-p1a iso2

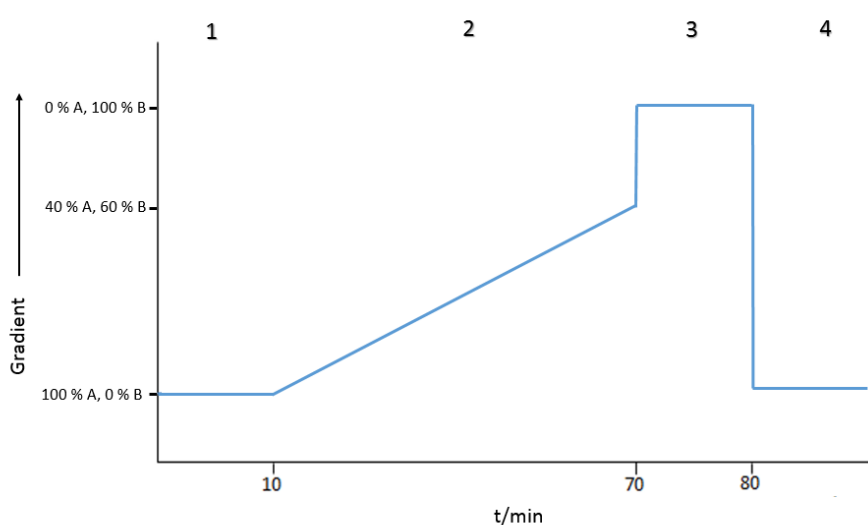
4.4.1 Iontově výměnná chromatografie

Zakoncentrovaný roztok proteinu byl nanášen na kolonu naplněnou aniontovým iontoměničem Q Sepharose Fast Flow. Tento iontoměnič nesoucí na svém povrchu kladný náboj ve formě kvarterních aminů interaguje na základě elektrostatické interakce s proteinem mNkr-p1a iso2, který na svých karboxylových skupinách při použitím pH nese náboj záporný. Pomocí nástroje Compute pI/M_w tool¹¹⁹ byl ze známé aminokyselinové sekvence (Obr. 10, str. 28) vypočten izoelektrický bod pI = 5,23.

Kolona byla nejprve promývána pufrům A a pufrům B v poměru 1:1. Následně byla ekvilibrována pufrům B a poté pufrům A. Před nanesením na kolonu byl roztok proteinu odstředěn 10 min, 10 000× g při laboratorní teplotě. Poté s ním mohla být provedena iontově výměnná chromatografie (IEC). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 3 ml/min a samotný průběh metody je znázorněn na Obr. 15.

Přítomnost proteinu v eluátu byla detegována spektrofotometricky při 280 nm. Kvalita proteinu v jednotlivých frakcích pak byla ověřena SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu dle kapitoly 4.1.3.

Výhodou této metody je to, že kromě purifikace produktu dojde také k jeho zakoncentrování na velmi malý objem v poměrně krátkém čase.



Obr. 15 Průběh metody iontově výměnné chromatografie. 1 – 10 min pufr A, 2 – 60 min gradient (100 % pufr A → 40 % pufr A + 60 % pufr B), 3 – 10 min pufr B, 4 – 10 min pufr A.

4.4.2 Gelová filtrace

Gelová filtrace je chromatografická metoda vyžívaná k purifikaci proteinů na základě rozdílu v jejich velikosti a tvaru.

Roztok proteinu byl po zakoncentrování centrifugován 10 min, 10 000× g při laboratorní teplotě pro odstranění precipitátu a následně byla provedena gelová filtrace. Separace probíhala v 10mM HEPES pufru o pH 7,5 na koloně Superdex75 HR 100/300, připojené k přístroji NGC Quest™ 10 Chromatography System. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,4 ml/min.

Čistota eluovaných frakcí byla ověřena SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu v redukujícím i neredukujícím prostředí dle kapitoly 4.1.3.

4.4.3 Určení koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu obsaženého v jednotlivých frakcích získaných gelovou filtrací byla měřena spektrofotometricky přístrojem DS-11 FX Spektrofotometr/Fluorometr. Metoda je založena na měření absorpce vzorku při vlnové délce 280 nm, při níž absorbují aromatické aminokyseliny jako tryptofan, tyrosin nebo fenylalanin. Koncentrace je zde vypočtena na základě Lambert-Beerova zákona po zadání molekulové hmotnosti ($M_w = 22210,0$ Da) a hodnoty molárního absorpčního koeficientu při vlnové délce 280 nm ($\epsilon_{280} = 49\,430$ M⁻¹.cm⁻¹), které byly vypočteny ze známé aminokyselinové sekvence pomocí nástroje *ProtParam tool*¹²⁰.

4.5 Charakterizace struktury mNkr-p1a iso2

4.5.1 Hmotnostní spektrometrie

Aby mohl být vzorek analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), musí být v iontovém zdroji převeden na ionty v plynné fázi. K ionizaci proteinových vzorků jsou využívány měkké ionizační techniky, které nezpůsobují fragmentaci. Patří mezi ně námi využívané ionizace elektrosprejem (ESI), nebo ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Vzniklé ionty jsou pak usměřňovány do hmotnostního analyzátoru, kde podléhají separaci na základě jejich poměru hmoty a náboje (m/z). V této práci byl použit analyzátor využívající iontově cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací (FT-ICR).

MS technika ESI-FT-ICR byla využita pro ověření identity rekombinantního proteinu mNkr-p1a iso2 a určení jeho přesné molekulové hmotnosti. Dále pro stanovení zapojení disulfidových vazeb v molekule a analýzu chemického zesíťení proteinu.

Veškerá měření na hmotnostním spektrometru byla prováděna Mgr. Michalem Rosůlkem.

4.5.1.1 Stanovení přesné hmoty intaktního proteinu

Stanovení přesné molekulové hmotnosti proteinu mNkr-p1a iso2 bylo provedeno pomocí ESI-FT-ICR hmotnostního spektrometru solariX XR 15T. 20 μ g proteinu získaného metodou gelové filtrace bylo zbaveno nízkomolekulárních látek na proteinové koloně MicroTrap s obrácenou fází dle postupu uvedeného v Tabulka 3.

Tabulka 3: Postup pro odsolení proteinového vzorku na proteinové koloně MicroTrap o objemu 5 μ l.

Krok	Složení roztoku	V / μ l
Promytí kolony	80% AcN, 5% HAc	250 ul
Ekvilibrace kolony	5% HAc	3 \times 250 ul
Nanáška vzorku	vzorek	250 ul
Promytí vzorku	5% HAc	3 \times 250 ul
Eluce proteinu	80% AcN, 5% HAc	50 ul
Promytí kolony	80% AcN, 5% HAc	3 \times 250 ul
Uchovávání kolony	50% AcN	500 ul

AcN = acetonitril

4.5.1.2 Identifikace zapojení disulfidových vazeb v proteinech

Při procesu sbalování bílkovin dochází bezprostředně po tzv. hydrofobním kolapsu aminokyselin a tvorbě hydrofobního jádra proteinu ke vzniku sekundárních struktur, které jsou stabilizovány různými nekovalentními a kovalentními interakcemi, jako jsou např. disulfidové vazby. Toto kovalentní propojení stabilizující konformaci proteinové molekuly vzniká mezi cysteiny, u nichž vlivem oxidačního působení okolního prostředí dochází k oxidaci sulfhydrylových skupin jejich postranních řetězců.

Díky tomu identifikace zapojení disulfidových vazeb v mNkr-p1a iso2 může poskytnout detailnější vhled do struktury této molekuly.

Řezání a odbarvení gelu

Po analýze mNkr-p1a iso2 SDS-PAGE byly jednotlivé proužky gelu obsahující protein vyříznuty, rozkrájeny na menší části (asi 1 mm³) a přeneseny do mikrozkušavek.

Gel byl v ultrazvukové lázni odbarvován směsí 100mM ethylmorfolinového pufru s acetonitrilem v poměru 1:1. Roztok byl několikrát vyměněn a nakonec po úplném odbarvení gelu odstraněn. Veškeré roztoky přidávané ke vzorkům v neredukujícím prostředí po celou dobu procesu, od odbarvení gelu až po štěpení proteinu, navíc obsahovaly jako oxidační činidlo 200 μM cystamin.

Následně byl gel vysušen ve 100 μl acetonitrilu, v němž byl 5 min inkubován v ultrazvukové lázni. Roztok byl odebrán a obsah zkumavek sesušen na vakuové odparce.

Se vzorky v redukujícím prostředí, které sloužily jako kontrola, byla provedena dodatečná redukce 20mM tris(2-karboxyethyl)fosfinem (TCEP) ve 100mM ethylmorfolinovém pufru (3 min/70 °C). Roztok TCEPu byl odstraněn a gel vysušen acetonitrilem, následně promyt ethylmorfolinovým pufrem v němž byl 5 min inkubován v ultrazvukové lázni a znovu vysušen 100 μl acetonitrilu, který byl nakonec odstraněn.

Zpětné oxidaci sulfhydrylových bylo zabráněno jejich alkylací 50mM jodacetamidem (IAA) ve 100mM ethylmorfolinovém pufru, s nímž byl gel inkubován 30 min ve tmě. IAA byl odebrán a pro odstranění přebytečného činidla byl gel 2× střídavě promyt ethylmorfolinovým pufrem a acetonitrilem. Nakonec byl přidán

50% acetonitril v LC/MS dH₂O, vzorky 5 min inkubovány v ultrazvukové lázni a sesušeny na vakuové odparce.

Štěpení proteinu proteasou

Dále byly zpracovávány vzorky v redukujícím a neredukujícím prostředí společně. K vysušenému gelu bylo přidáno 30 μ l 10% acetonitrilu v 50mM ethylmorfolinovém pufru o pH 8,4 a trypsin o koncentraci 5 ng/ μ l. Tato směs byla inkubována 2 hod při 50 °C. Roztok z mikrozkuvek byl poté odpařen na vakuové odparce. Ke gelu bylo posléze znovu přidáno 30 μ l stejného štěpícího roztoku. Vzorky byly 30 min inkubovány při 37 °C a nakonec bylo přidáno ještě dalších 30 μ l roztoku proteasy tak, aby byly kostičky gelu ponořeny. Takto ošetřené vzorky byly inkubovány při 37 °C dalších 14 hod.

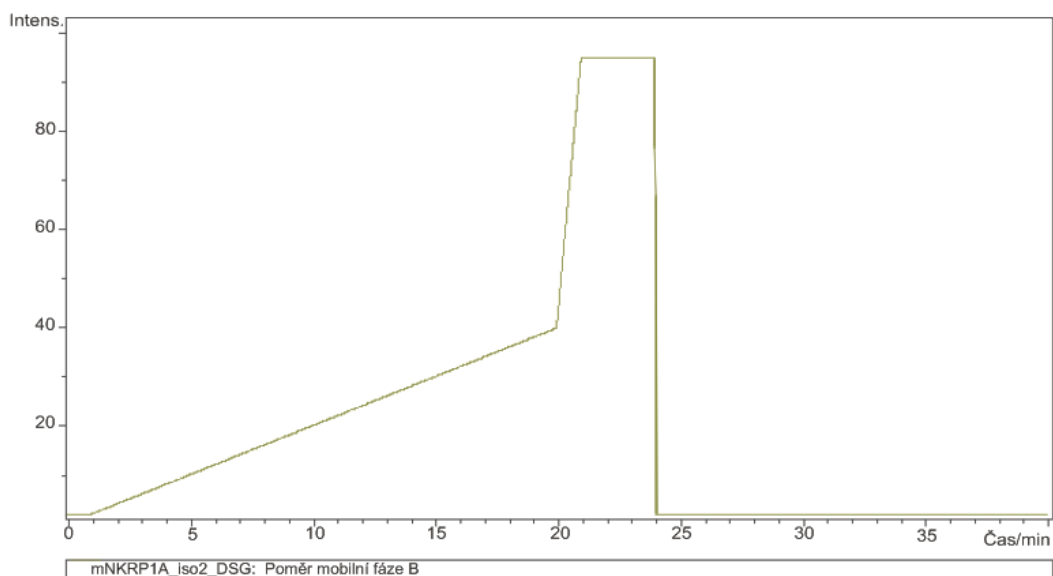
Extrakce peptidů z gelu

Po uplynutí doby potřebné ke štěpení proteinu byly mikrozkuvky centrifugovány 2 min, 5 000 \times g a odstředěný roztok byl přenesen do nových mikrozkuvek. Peptidy byly z gelu postupně extrahovány 50 μ l 80% acetonitrilu s 0,5% kyselinou mravenčí (FA) a 50 μ l 0,5% FA. Gel byl vždy 5 min vystaven ultrazvukové lázni a roztok nad gelem poté přenesen do nové mikrozkuvky. Celý postup extrakce peptidů byl ještě jednou zopakován. Obsah mikrozkuvek s roztokem extrahovaných peptidů byl sesušen na vakuové odparce.

LC-MS analýza

Před samotným měřením byly vzorky se sesušenými peptidy rozpuštěny ve 2 μ l 80% acetonitrilu s 0,5% FA. Poté byly naředěny 0,5% FA na koncentraci peptidů 0,05 μ g/ μ l a převedeny do vialek opatřených septem. Separace peptidů před vstupem do hmotnostního spektrometru probíhala na μ HPLC systému Agilent 1200. Na analytickou kolonu s obrácenou fází Magic C18AQ vyhřívanou na 50 °C byly naneseny 2 μ l vzorku. Vyplavování peptidů bylo zajištěno zvyšujícím se poměrem organického rozpouštědla v mobilní fázi. Procentuální zastoupení mobilní fáze B

v čase popisuje Tabulka 4. Gradient mobilní fáze B je zobrazen na Obr. 16.



Obr. 16. Grafické znázornění gradientu mobilní fáze B, použitého pro LC-MS.

Tabulka 4: Poměr mobilních fází A:B pro LC-MS v časech odpovídajících Obr. 16.

Čas/min	A:B / %
0 - 1	98:2
20	60:40
21 - 24	5:95
24 - 35	98:2

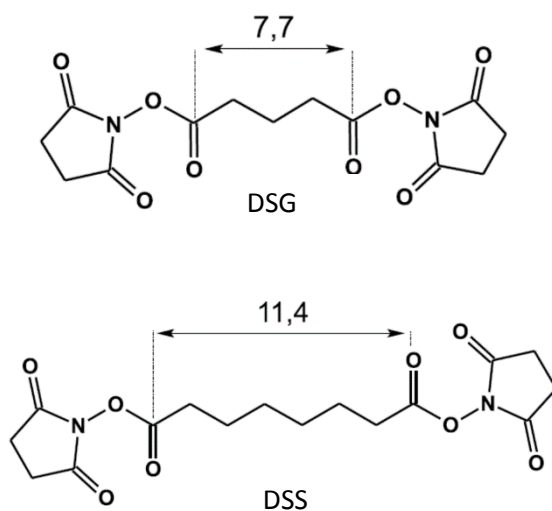
Výstup z HPLC byl přímo připojen k elektrospreji instrumentu solariX XR 15T. Měření probíhalo v pozitivním módu s akvizicí dvou milionů databodů při hmotnostním rozsahu 250 až 5 000 m/z.

MS data byla analyzována programem *Data Analysis 4.2*. Na základě monoisotopických hmot nalezených algoritmem SNAP byl sestaven soubor hmot, jejichž identifikace byla provedena na základě přesné hmoty programem *Links*.

4.5.1.3 Chemické zesítení proteinu mNkr-p1a iso2

Metoda chemického zesítení proteinů v kombinaci s MS je využívána k popisu vzdáleností funkčních skupin aminokyselin v trojrozměrné struktuře za fyziologických podmínek. Data získaná touto metodou mohou tedy napomoci k řešení této 3D struktury proteinu.

Pro zesítení proteinu mNkr-p1a iso2 byla použita homobifunkční činidla DSS (disukcinimidyl suberát) a DSG (disukcinimidyl glutarát), která na obou koncích obsahují *N*-hydroxysukcinimidovou (NHS) esterovou skupinu a jejichž struktura je spolu s délkou raménka zobrazena na Obr. 17. NHS esterová skupina umožňuje reakci činidla s primární aminoskupinou – u polypeptidu tedy s jeho *N*-koncem nebo s postranním řetězcem lysinu. Pro snadnější identifikaci zesítených peptidů byly využity rovněž 4× deuterované formy těchto činidel.



Obr. 17. Chemické vzorce použitých síťovacích činidel DSG a DSS spolu s délkou distančního raménka v Å.

Sítovací reakce

Pro každou sítovací reakci bylo použito celkem 15 μg proteinu v pufru obsahujícím 10mM HEPES (pH 7,5) a 50mM NaCl. Celkem bylo provedeno šest sítovacích reakcí: s činidlem DSS:DSSd4 i DSG:DSGd4 v 5-, 10- a 20M nadbytku činidla oproti proteinu (Obr. 18). Tyto reakční směsi byly ponechány inkubovat 1 hod při laboratorní teplotě.



Obr. 18. Schématické znázornění sítovací reakce. Protein *mNkr-p1a iso2* byl modifikován jednak směsí 1:1 deuterované a nedeuterované formy činidla DSG, jednak činidlem DSS.

Se zesíťnými vzorky proteinu byla provedena separace v komerčně dostupném gradientovém (4–12%) polyakrylamidovém gelu v prostředí aniontového detergentu dodecylsíranu lithného (LDS) (analogické SDS-PAGE – kapitola 4.1.3).

Na gel bylo aplikováno celkem 10 μg proteinu z každé reakční směsi, k nimž byl přidán komerční 4 \times koncentrovaný redukující vzorkový pufr NuPAGE. Vzorky byly před aplikací na gel denaturovány pětiminutovým povřením při 90 $^{\circ}\text{C}$ a poté 1 min centrifugovány 10 000 \times g při laboratorní teplotě.

Z gelu byly následně vyříznuty oblasti odpovídající modifikovanému monomeru proteinu *mNkr-p1a iso2*. Další zpracování gelu, příprava vzorku i samotná LC-MS analýza byly shodné s kapitolou 4.5.1.2.

4.5.2 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance byla využita pro ověření toho, zda rekombinantní protein mNkr-p1a iso2 zaujímá definovanou 3D strukturu. Jelikož není izotopově značený, bylo provedeno měření jednorozměrného NMR spektra pro atomová jádra ^1H .

Pro stanovení byl použit protein o koncentraci 0,1mM. Jako pufr posloužil 10mM HEPES s 50mM NaCl (pH 7,5), do nějž byl protein převeden během gelové filtrace (kapitola 4.4.2), s přídatkem 10% D_2O . Vzorek byl měřen při 25 °C na 600 MHz NMR spektrometru Avance III HD vybaveném $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ TCI kryosondou.

Měření NMR experimentů bylo provedeno Mgr. Josefem Chmelíkem, Ph.D.

4.5.3 Dynamický rozptyl světla

Metoda DLS, která je rychlá a nedestruktivní, byla využita za účelem ověření toho, zda je vzorek proteinu získaný gelovou filtrací monomerní a zda ani v průběhu jeho skladování při 4 °C nedochází ke vzniku agregátů.

Pro stanovení byl použit vzorek proteinu mNkr-p1a iso2 v pufru o pH 7,5 obsahujícím 10mM HEPES s 50mM NaCl. Koncentrace proteinu použitého pro měření činila 0,4 mg/ml. DLS byl měřen na přístroji Zetasizer Nano ZS90.

Měření DLS i následujícího CD bylo provedeno Tatsianou Charnavets, Ph.D.

4.5.4 Cirkulární dichroismus

Metodou CD, která je stejně jako DLS rychlá, nedestruktivní a nenáročná na množství vzorku, jsme získali informaci o tom, jaké je procentuální zastoupení jednotlivých typů sekundárních struktur, provedením analýzy v blízké UV oblasti elektromagnetického spektra (190 – 260 nm).

Abychom mohli takto odhadnout zastoupení sekundárních struktur, je nutné znát přesnou koncentraci proteinu, M_w a jeho primární strukturu. Pro analýzu, která byla provedena ve vodném roztoku obsahujícím 0,6mM HEPES a 3mM NaCl, činila koncentrace proteinu 0,1 mg/ml. Měření bylo provedeno pomocí přístroje Chirascan CD spectrometer.

4.6 Predikce sekundární struktury proteinu mNkr-p1a iso2

Ze známé aminokyselinové sekvence byly pomocí algoritmu PSIPRED^{121,122} získány predikce sekundárních struktur pro celou molekulu proteinu mNkr-p1a iso2 a pro jeho N-terminální a „extracelulární“ část sekvence. Pro všechny tyto jednotlivé části molekuly byly následně v programu *PyMol* vytvořeny predikce modelů jejich 3D struktury.

5) VÝSLEDKY

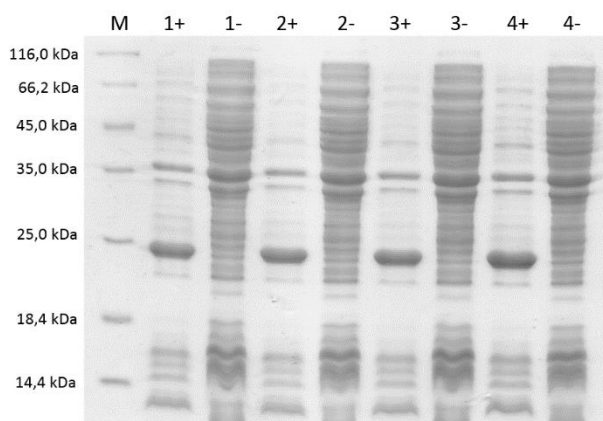
5.1 Exprese rekombinantního proteinu mNkr-p1a iso2

5.1.1 Transformace produkčních kompetentních buněk a výběr vhodného produkčního klonu

Prvním krokem při expresi rekombinantního proteinu mNkr-p1a iso2 byla transformace bakteriálních produkčních kompetentních buněk *E. coli* kmene BL21-Gold(DE3) metodou teplotního šoku (kapitola 4.1.1).

Na Petriho misce s LB agarem (kan, tet) narostlo dostatečné množství kolonií, které byly navzájem dobře rozlišitelné. Z nich byly vybrány čtyři pěkně rostlé kolonie, s nimiž bylo dále pracováno. Na kontrolní agarové misce žádné kolonie pozorovány nebyly, čímž byla vyloučena kontaminace použitých kompetentních buněk.

Vhodný produkční klon byl vybrán na základě provedení SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu (kapitola 4.1.3). Na Obr. 19 pozorujeme expresi proteinu ve všech „+“ drahách indukovaných 0,1mM IPTG a lze mezi sebou porovnávat produkceschopnost jednotlivých bakteriálních klonů.

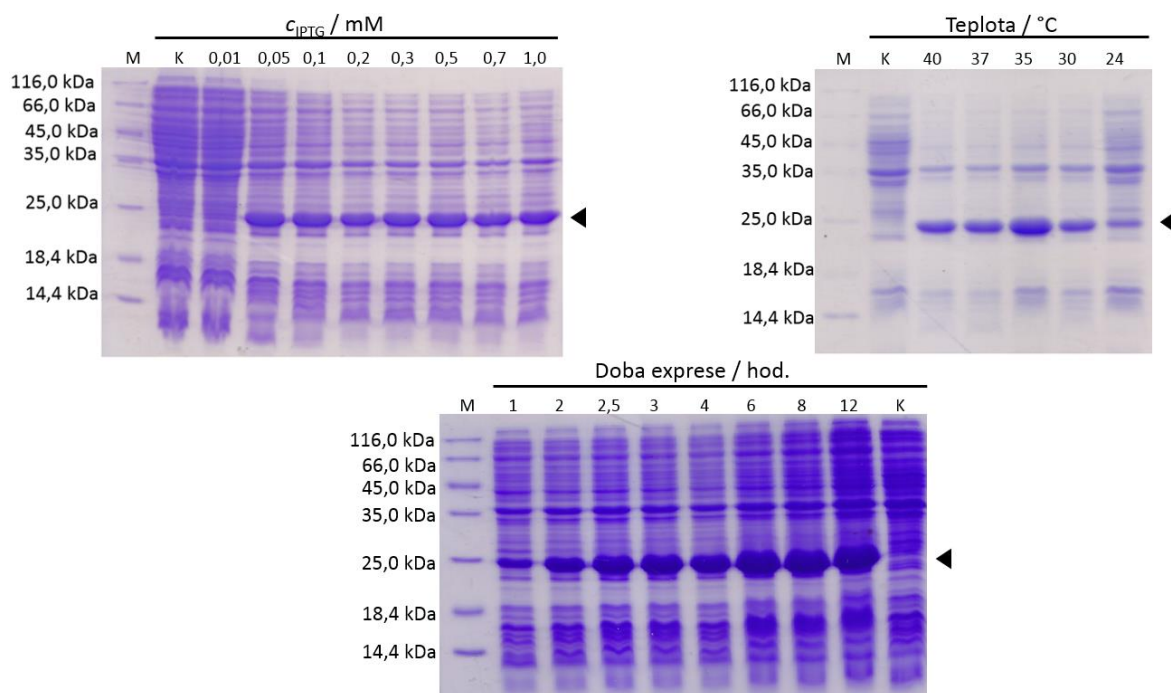


Obr. 19. Fotografie gelu z SDS-PAGE provedené za účelem výběru vhodného producenta. Dráhy označené znaménkem plus (+) obsahují indukované buňky, dráhy označené minus (-) buňky neindukované IPTG. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností. Klínkem je vyznačena pozice exprimovaného proteinu.

K optimalizaci podmínek pro produkci proteinu ve velkém objemu média byl zvolen bakteriální klon č. 1.

5.1.2 Nalezení vhodných produkčních podmínek

Vhodné podmínky pro expresi proteinu byly hledány z důvodu maximalizace výtěžku v co nejkratším časovém úseku. Testována byla koncentrace induktoru exprese IPTG (c_{IPTG}), teplota a délka produkce (kapitola 4.1.4.1). Výsledky optimalizace byly vyhodnocovány na základě provedení SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu (Obr. 20).

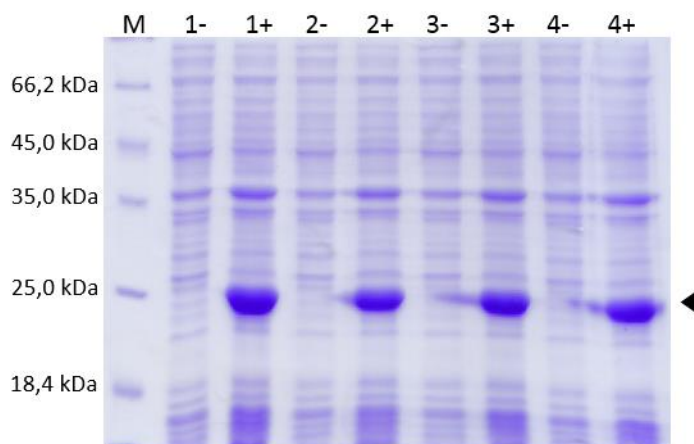


Obr. 20. Fotografie gelů z SDS-PAGE zachycující výsledky hledání vhodných produkčních podmínek pro protein mNkr-p1a iso2. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností; dráha K – neindukované buňky. Klínkem je vyznačena pozice exprimovaného proteinu.

Pro produkci ve velkém objemu pak byly zvoleny takové podmínky, při nichž byl protein produkován v obstojném množství, za současné minimální produkce ostatních proteinů. V případě koncentrace IPTG byla vybrána 0,1mM; za optimální teplotu bylo zvoleno 35 °C a délka produkce 6 hod.

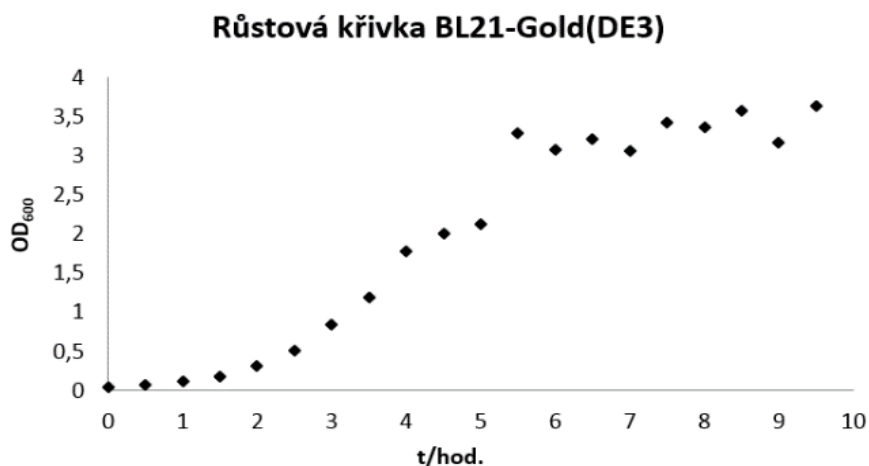
Protein byl za těchto podmínek produkován celkem ve 2 l LB média (kan, tet) dle kapitoly 4.1.5.

Exprese proteinu mNkr-p1a iso2 v jednotlivých kultivačních nádobách během velkoobjemové produkce byla potvrzena prostřednictvím SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu (Obr. 21).



Obr. 21. Fotografie gelu SDS-PAGE zachycující expresi proteinu mNkr-p1a iso2 při velkoprodukcí. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností; dráhy 1-4 – jednotlivé kultivační nádoby, dráhy minus (-) – buňky před indukcí IPTG; dráhy plus (+) – buňky před sklizením. Klínkem je vyznačena pozice exprimovaného proteinu.

Za podmínek analogických podmínkám produkce ve velkém objemu (inokulace, teplota) byla sledována růstová křivka produkčních bakterií (Obr. 22).



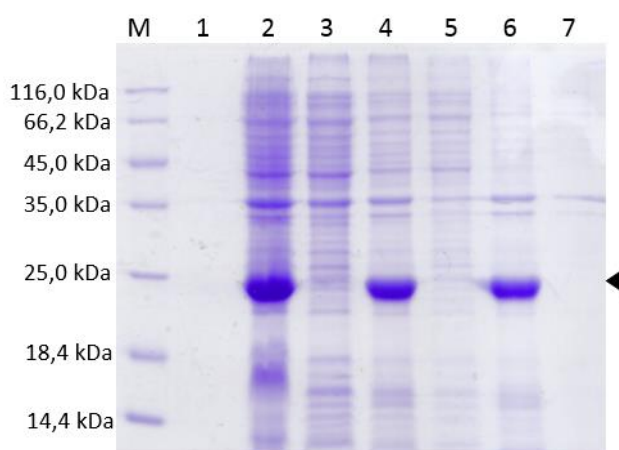
Obr. 22. Růstová křivka bakteriálního kmene *E. coli* BL21-Gold(DE3) transformovaného plasmidem pro produkci proteinu mNkr-p1a iso2. Graf závislosti OD_{600} na délce kultivace. V čase, kdy OD_{600} dosáhla hodnoty 0,6, byla kultivační teplota snížena z 37 °C na 35 °C.

5.1.3 Izolace inkluzních tělísek

Po produkci ve velkém objemu byla provedena izolace inkluzních tělísek dle postupu v kapitole 4.1.6.

Každá peleta získaná z $4 \times 0,5\text{l}$ LB média (kan, tet) byla resuspendována v sacharosovém lyzačním pufru, čímž bylo v kombinaci s ultrazvukovou sondou opakovaným zamražením/rozmražením a využitím lysozymu docíleno rozbití buněk a homogenizace buněčné suspenze. Buněčné membrány pak byly rozpuštěny v pufru s detergentem, který byl následně odstraněn promývacím pufrem.

Po celou dobu průběhu izolace inkluzních tělísek byly odebírány vzorky, supernatanty a sedimenty po centrifugaci, s nimiž byla provedena SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu dle kapitoly 4.1.3 (Obr. 23). Tak byla sledována



Obr. 23. Fotografie gelu SDS-PAGE zachycující průběh izolace inkluzních tělísek. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností; 1 – supernatant po sklizení buněk; 2 – lyzované buňky; 3 – supernatant po lýzi buněk v SLP; 4 – buněčná suspenze promytá pufrem s detergentem; 5 – supernatant po promytí pufrem s detergentem; 6 – přečištěná inkluzní tělíska; 7 – supernatant po promytí pufrem bez detergentu. Klínkem je vyznačena pozice exprimovaného proteinu.

účinnost izolace v jednotlivých izolačních krocích.

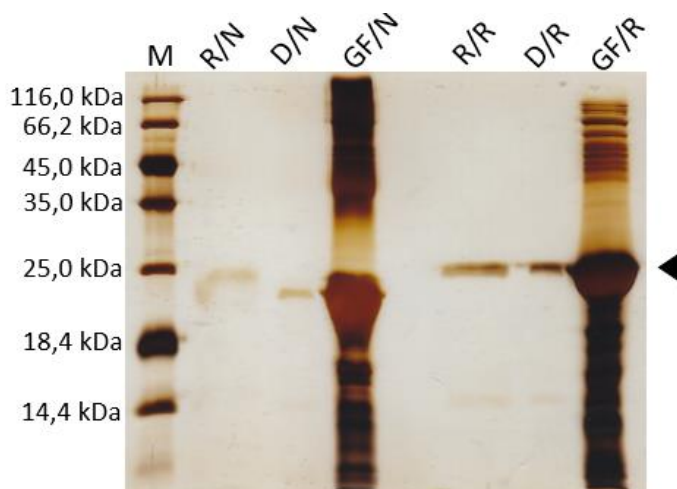
Z elektroforeogramu lze pozorovat, že z buněčného lyzátu byl postupnými kroky získán sediment obsahující převážně přečištěná inkluzní tělíska a pouze nízký obsah ostatních bakteriálních proteinů.

Z 1 l LB média (kan, tet) bylo získáno celkem 625 mg přečištěných inkluzních tělísek.

5.2 *In vitro* renaturace proteinu mNkr-p1a iso2

Po izolaci inkluzních tělísek byl protein podroben renaturaci metodou tzv. rychlého naředění podle postupu v kapitole 4.2.

Roztok proteinu byl po renaturaci a dialýze zakoncentrován pomocí ultrafiltrace a centrifugačního koncentrátoru (kapitola 4.3). Před samotným purifikačním krokem (GF) byla provedena vizualizace průběhu *in vitro* renaturace pomocí SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu (Obr. 24). Jelikož koncentrace proteinu v jednotlivých krocích byla pro detekci prostřednictvím CBB R-250 příliš nízká, bylo



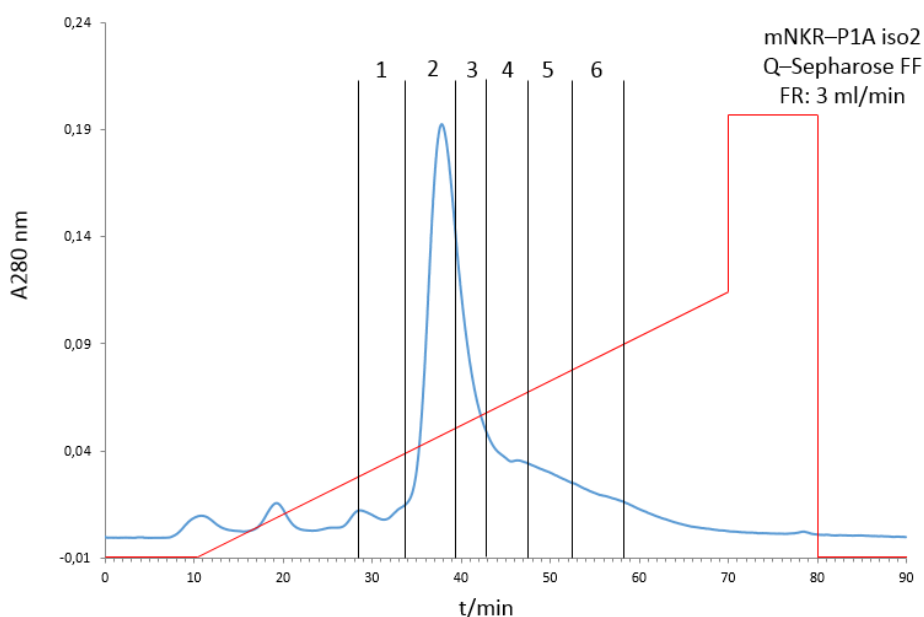
Obr. 24. Fotografie gelu SDS-PAGE zachycující průběh *in vitro* renaturace. Dráha *M* – proteinový standard molekulových hmotností; dráhy *R* – roztok proteinu po renaturaci; dráhy *D* – roztok proteinu po dialýze; dráhy *GF* – zakoncentrovaný protein, který byl dále postoupen na gelovou filtraci. Dráhy */N* značí neredukující prostředí, zatímco dráhy */R* prostředí redukující. Klínkem je vyznačena pozice renaturovaného proteinu.

potřeba provést citlivější barvení stříbrem dle kapitoly 4.1.3. Z Obr. 24 lze pozorovat, že ke sbalení proteinu a zapojení disulfidových vazeb dochází až během dialýzy, kdy je na gelu vidět rozdílná pohyblivost vzorku v neredukujícím prostředí oproti prostředí redukujícímu.

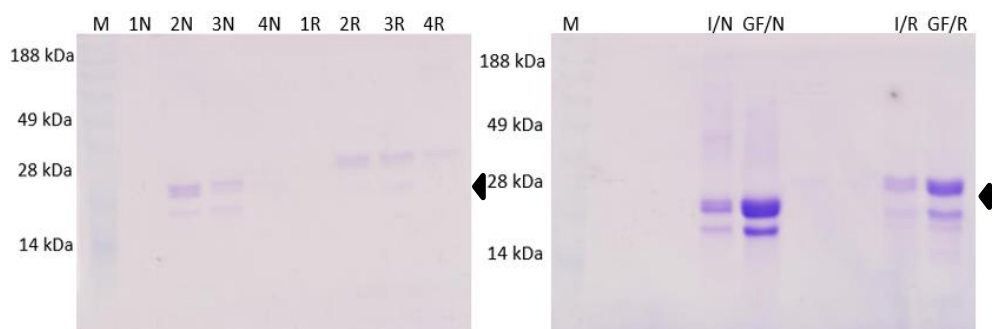
5.3 Purifikace proteinu mNkr-p1a iso2

5.3.1 Iontově výměnná chromatografie

10 ml koncentrovaného proteinu ($c = 0,7 \text{ mg/ml}$) bylo naneseno na kolonu určenou pro iontově výměnnou chromatografii. Výstup metody s vyznačenými eluovanými frakcemi je znázorněn na Obr. 25. Frakce odpovídající elučnímu maximu lze pozorovat na Obr. 26.



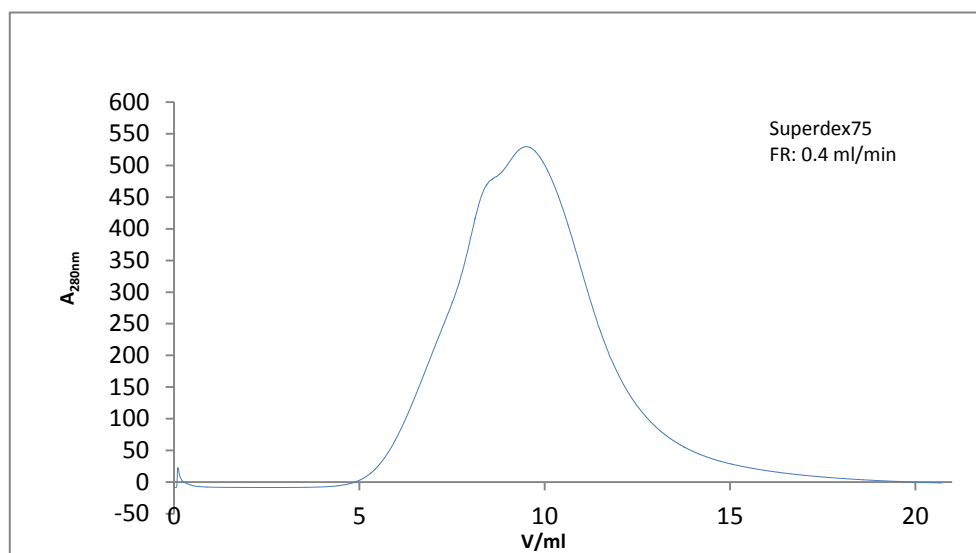
Obr. 25. Eluční profil mNkr-p1a iso2 - chromatogram iontově výměnné chromatografie. Gradient: 10 min pufr A, 60 min gradient (100 % pufr A → 40 % pufr A + 60 % pufr B), 10 min pufr B, 10 min pufr A. Frakce: 1 (28,3 – 33,8 min), 2 (33,8 – 39,4 min), 3 (39,4 – 42,9 min), 4 (42,9 – 47,5 min), 5 (47,5 – 52,3 min), 6 (52,3–58,2min).



Obr. 26. Fotografie gelů SDS-PAGE zachycující průběh iontově výměnné chromatografie. 1–4 – jednotlivé eluované frakce, I – nanáška na ionex, GF – nanáška na gelovou filtraci. Dráhy N značí neredukující prostředí, zatímco dráhy R prostředí redukující. Klínkem je vyznačena pozice monomerní formy proteinu.

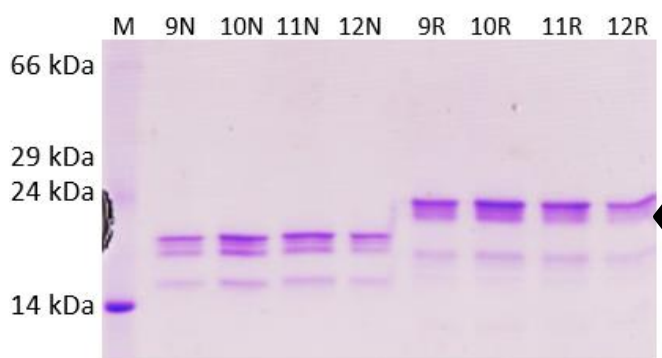
5.3.2 Gelová filtrace následující po IEC

500 μ l vzorku (GF) o koncentraci 1,0 mg/ml, zakoncentrovaného z frakcí 2 a 3 po provedení IEC a připraveného dle kapitoly 4.4.2, bylo aplikováno na kolonu Superdex75 HR 100/300, kde probíhala separace (Obr. 27). Frakce byly sbírány v objemu 1 ml.



Obr. 27. Eluční profil proteinu mNkr-p1a iso2 sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové filtrace následující po IEC. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou Superdex75 HR 100/300 byla 0,4 ml/min.

Jednotlivé eluované frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu v redukujícím i neredukujícím prostředí dle kapitoly 4.1.3 (Obr. 28).



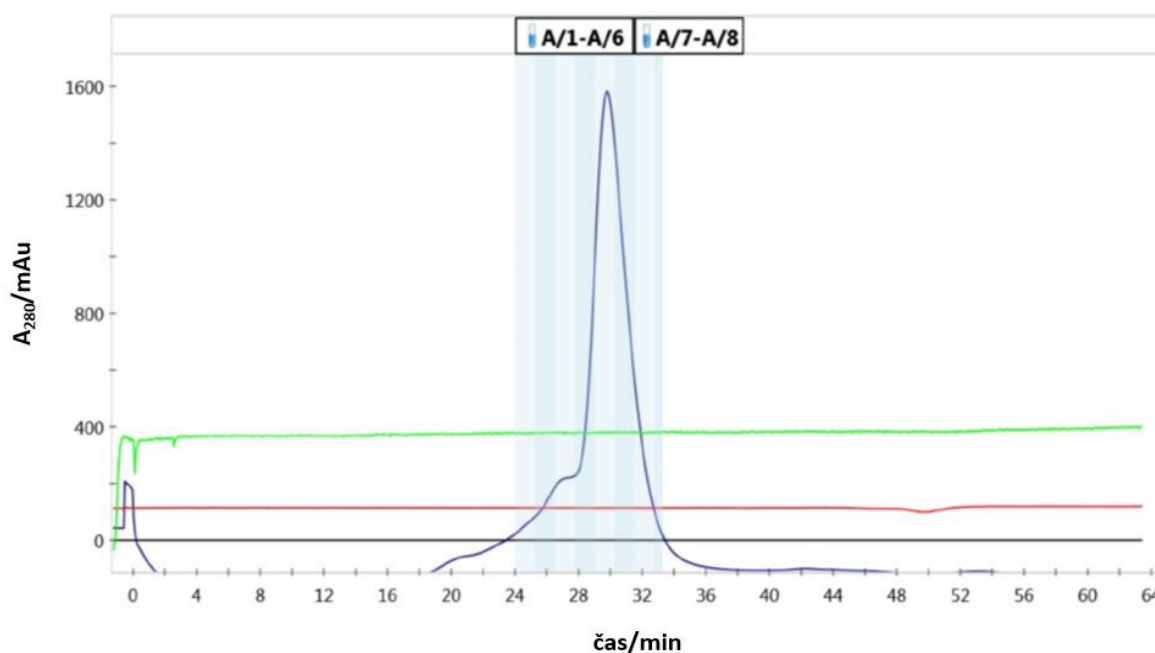
Obr. 28. Fotografie gelu SDS-PAGE zobrazující frakce získané gelovou filtrace následující po IEC. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností; dráhy 9–12 – eluované frakce. Dráhy N značí neredukující prostředí, zatímco dráhy R prostředí redukující. Klínkem je vyznačena pozice proteinu.

5.3.3 Gelová filtrace bez předcházející IEC

440 μl vzorku (GF) připravených dle kapitoly 4.4.2, u nichž byla změřena koncentrace postupem podle kapitoly 4.4.3 (Tabulka 5), bylo aplikováno na kolonu Superdex75 HR 100/300, kde probíhala separace (Obr. 29).

Tabulka 5: Celkové množství proteinu (m) aplikovaného na kolonu pro gelovou filtraci.

vzorek	V/ μl	c/mg.ml ⁻¹	m/mg
GF	440	6,3	2,7

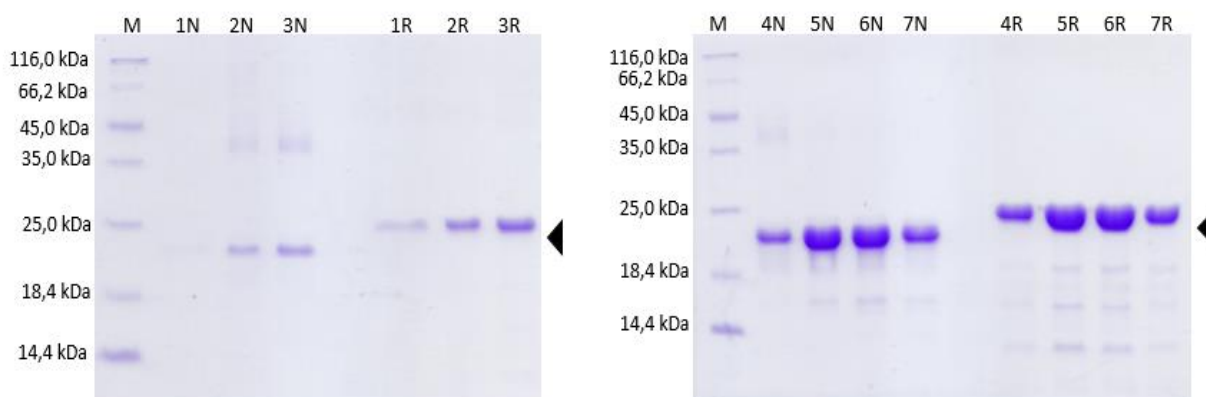


Obr. 29. Eluční profil proteinu mNkr-p1a iso2 sledovaný při vlnové délce 280 nm během gelové filtrace. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou Superdex75 HR 100/300 byla 0,4 ml/min. Eluční profil proteinu je znázorněn modrou linií. V horních rámečcích jsou zaznamenána čísla eluovaných frakcí.

Z elučního profilu proteinu lze pozorovat, že k maximální eluci monomerní formy rekombinantního mNkr-p1a iso2 dochází ve 31. minutě. Ačkoli monomerní forma ($\sim 22,0$ kDa) je výrazně v převaze, ve vzorku se vyskytoval i malý podíl dimerní formy eluované v 27. minutě ($\sim 44,0$ kDa).

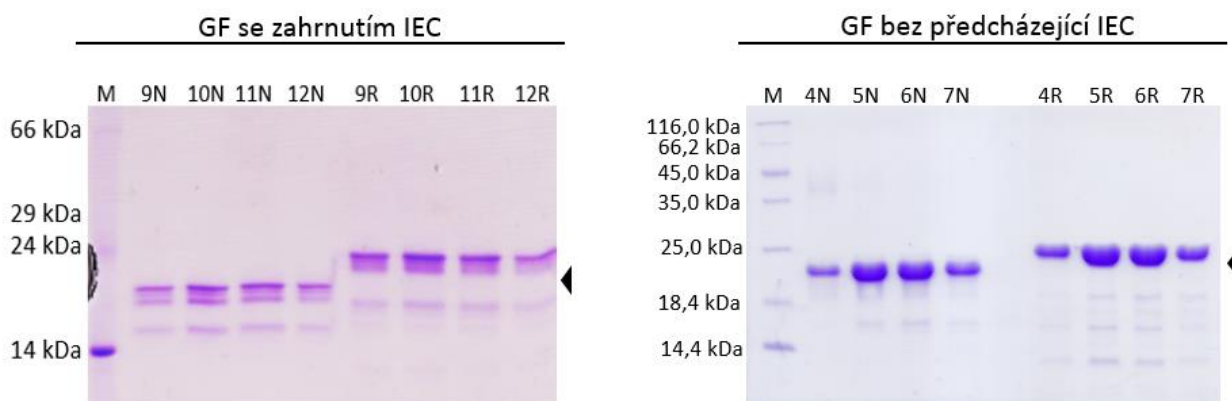
Jednotlivé eluované frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE v 15% polyakrylamidovém gelu v redukujícím i neredukujícím prostředí dle kapitoly 4.1.3 (Obr. 30, str. 65). Z elektroforeogramů lze pozorovat, že monomerní forma byla v každé z eluovaných frakcí zastoupena ve výrazném nadbytku. U frakcí v neredukujícím prostředí je pak vidět u frakce 2N,3N a 4N přítomnost dimeru.

U frakcí v neredukujícím prostředí lze oproti prostředí redukujícímu pozorovat lehkou změnu v mobilitě vlivem přítomnosti disulfidových vazeb.



Obr. 30. Fotografie gelů SDS-PAGE zobrazující frakce získané gelovou filtrací. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností; dráhy 1–7 – eluované frakce. Dráhy N značí neredukující prostředí, zatímco dráhy R prostředí redukující. Klínkem je vyznačena pozice monomerní formy proteinu.

Na základě porovnání vzorků z gelové filtrace s předcházející IEC a bez ní byla z důvodu co možná nejvyššího urychlení purifikačního procesu metoda IEC v konečném purifikačním uspořádání vynechána. Jak se totiž ukázalo, čistota výsledného produktu tím není nikterak ovlivněna a především u připravovaného proteinu nedochází k výraznější degradaci (Obr. 31).



Obr. 31. Fotografie gelu SDS-PAGE zobrazující frakce získané gelovou filtrací, která následovala po provedení IEC a její porovnání s výsledkem v uspořádání bez IEC. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností; dráhy 9–12 – eluované frakce. Dráhy N značí neredukující prostředí, zatímco dráhy R prostředí redukující. Klínkem je vyznačena pozice monomerní formy proteinu.

5.3.4 Stanovení koncentrace proteinu a celkového výtěžku

Koncentrace proteinu obsaženého v jednotlivých frakcích získaných gelovou filtrací byla měřena spektrofotometricky dle kapitoly 4.4.3. Jako vstupní parametry byla zadána teoretická $M_w = 22\,210,0$ Da a $\varepsilon_{280} = 49\,430$ M⁻¹.cm⁻¹.

Výsledná koncentrace proteinu v příslušných frakcích je uvedena v Tabulka 6, spolu s celkovým množstvím proteinu, které bylo získáno z 0,5 l LB média.

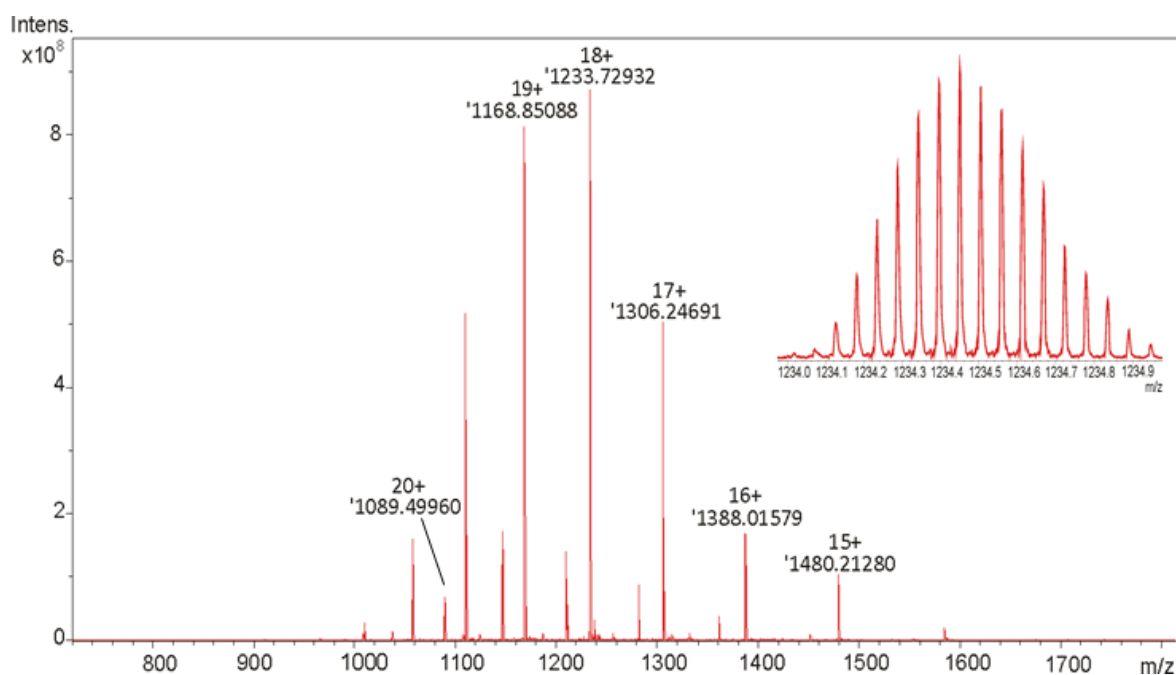
Tabulka 6: Koncentrace frakcí získaných gelovou filtrací, odpovídajících monomerní formě proteinu mNkr-p1a iso2, a v nich obsažené celkové množství proteinu.

č. frakce	c/mg.ml ⁻¹	m/mg
4	0,4	1,4
5	1,0	
6	1,0	
7	0,5	

5.4 Charakterizace struktury mNkr-p1a iso2

5.4.1 Ověření identity proteinu mNkr-p1a iso2

Po gelové filtraci byla frakce obsahující monomerní protein zbavena nízkomolekulárních kontaminant dle kapitoly 4.5.1.1, aby mohla být prostřednictvím měření intaktní hmoty metodou MS ověřena identita výsledného produktu (Obr. 32). Pomocí nástroje Compute pI/M_w tool¹¹⁹ byla ze známé aminokyselinové sekvence (Obr. 10, str. 28) vypočtena teoretická monoisotopická hmotnost v redukovaném stavu M_w = 22 195,79 Da. Po dekonvoluci hmotnostního spektra byla stanovena výsledná monoisotopická hmotnost 22 189,01 Da – ta odpovídá celkové hmotě proteinu se dvěma redukovanými cysteiny. V hmotnostním spektru byl nalezen i minoritní fragment proteinu s hmotou 21 769,87 Da bez čtyř počátečních aminokyselin – tato forma má všechny cysteiny v oxidovaném stavu.

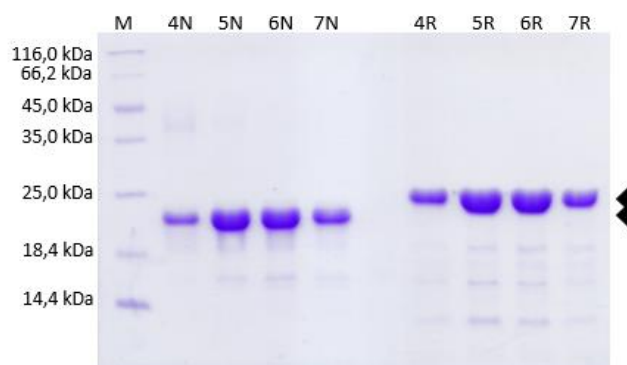


Obr. 32. Hmotnostní spektrum proteinu mNkr-p1a iso2 měřené pomocí ESI-FT-ICR MS.

5.4.2 Identifikace zapojení disulfidových vazeb

Před samotnou analýzou zapojení disulfidových vazeb v proteinu mNkr-p1a iso2 z peptidů byl na základě známé monoizotopické hmotnosti vytvořen odhad počtu cysteinů formujících disulfidovou vazbu. Jak bylo zmíněno v kapitole 5.4.1, naměřená intaktní hmota odpovídá proteinu se dvěma redukovanými cysteiny. Protože protein mNkr-p1a iso2 čítá celkem osm cysteinů, v molekule by měly být přítomny tři disulfidové vazby.

Pro vlastní mapování disulfidových vazeb byly z neredukujícího elektroforetického gelu, na němž byly vizualizovány jednotlivé frakce eluované během gelové filtrace (Obr. 30, kapitola 5.3.3), vyříznuty zóny odpovídající monomerní formě mNkr-p1a iso2 (frakce 4N – 7N a 4R – 7R pro kontrolu (Obr. 33)) a zpracovány postupem uvedeným v kapitole 4.5.1.2.



Obr. 33. Fotografie elektroforetického gelu zobrazující frakce eluované gelovou filtrací (Obr. 30, str. 65). Klínky jsou vyznačeny pozice neredukované a redukované formy monomerního proteinu, jež byly použity pro identifikaci disulfidových vazeb.

V Tabulka 7 jsou uvedeny peptidy a jim odpovídající cysteiny u nichž bylo potvrzeno propojení disulfidovou vazbou.

Tabulka 7: Cysteiny proteinu mNkr-p1a iso2 propojené disulfidovou vazbou.

mNkr-p1a iso2	
Peptidy spojené SS vazbou	Cysteiny spojené SS vazbou
41-51/52-58	C41 – C55
70-92	C72 – C89
147-163/164-174	C156 – C169

V molekule proteinu mNkr-p1a iso2 byla nalezena tato nejčastější zapojení cysteinů: první cystein s druhým, čtvrtý s pátým a šestý se sedmým. Třetí a osmý cystein jsou pravděpodobně v redukovaném stavu a zůstávají nezapojeny.

Protože je tato práce zaměřena na rozpustnou formu myšího receptoru Nkr-p1a, který se řadí mezi proteiny obsahující CTLD, je vysoce pravděpodobné, že by část sekvence odpovídající extracelulárnímu segmentu receptoru Nkr-p1a iso1, mohla rovněž obsahovat tento strukturní motiv. V Tabulka 8 jsou zobrazeny různé příklady konzervovaných disulfidových vazeb v rámci CTLD domény, které byly dohledány pomocí proteinové databáze Swiss-Prot. Pokud bychom tedy uvažovali u proteinu mNkr-p1a iso2 rovněž přítomnost CTLD, dle Tabulka 8 by odpovídalo námi identifikované zapojení cysteinů následujícímu schématu: C1*-C2* / C2-C3 / C4-C5.

Tabulka 8: Různé možnosti zapojení cysteinů v rámci CTLD.

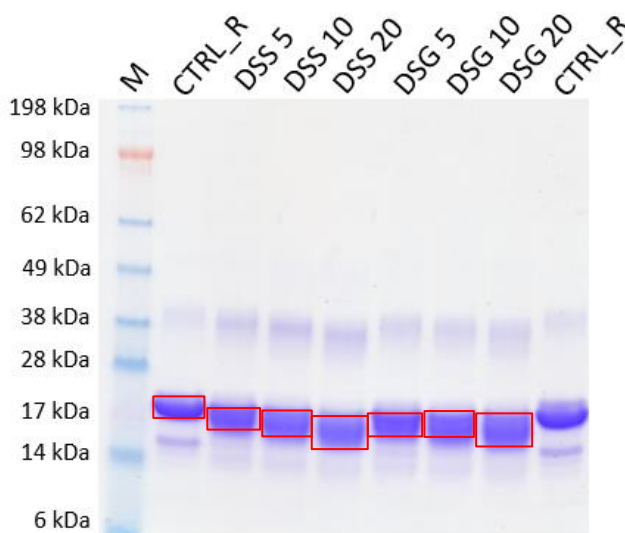
<i>Počet C v CTLD</i>	<i>Počet C v krčku</i>	<i>Počet SS vazeb</i>	<i>Schéma propojení C</i>	<i>Příklad proteinu</i>
4	1	1	C1*-C2	Clr-b
4	2	2	C1-C4 / C2-C3	Nkr-p1b/d/f
6	1	3	C1-C2 / C3-C6 / C4-C5	NKG2C
6	2	3	C1-C2 / C3-C6 / C4-C5	Nkr-p1a/c
6	1	4	C1-C2 / C3-C6 / C4-C5 / C1* ^{HD}	NKG2A
6	3	4	C1*-C1 / C2*-C2 / C3-C6 / C4-C5	NKG2D
6	3	5	C1*-C1 / C3*-C2 / C3-C6 / C4-C5 / C2* ^{HD}	CD94
8	2	4	C1-C2 / C3-C7 / C4-C8 / C5-C6	Ly49c/e/h
9	3	4	C1-C2 / C3-C7 / C4-C8 / C5-C6	Ly49a/d

* značí C z krčkové oblasti; ^{HD} molekula skrz tento Cys tvoří heterodimer

5.4.3 Chemické zesítení proteinu mNkr-p1a iso2

Pro chemické zesítení 15 µg monomerního proteinu byla použita homobifunkční činidla DSS a DSG vždy v 5-, 10- a 20molárním nadbytku oproti proteinu.

Analýza reakčních směsí (kapitola 4.5.1.3) byla provedena pomocí 4–12% gradientového Bis-Tris gelu a její výsledek je zobrazen na Obr. 34 Z něj lze pozorovat, že došlo k zesítení proteinu příslušnými činidly. Zároveň lze ve všech případech pozorovat, že dochází i ke vzniku dimerní formy. Analýza propojení odpovídajících funkčních skupin mezi jednotlivými aminokyselinami však byla provedena pouze pro monomerní formu zesíteného proteinu, jehož pozice je na Obr. 34 vyznačena červenými rámečky.



Obr. 34. Fotografie gelu z LDS elektroforézy zesíteného proteinu mNkr-p1a iso2. Nejintenzivnější zóna z každé dráhy označená červeným rámečkem byla z gelu izolována a použita k LC-MS analýze. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností; dráhy CTRL_R – kontrola v redukujícím prostředí; zbylé dráhy obsahují reakční směsi odpovídající použitému síťovacímu činidlu a jeho molárnímu nadbytku oproti proteinu. Klínkem je vyznačena pozice zesíteného proteinu mNkr-p1a iso2.

Z gelu izolované proteiny byly štěpeny trypsinem a nakonec odsoleny a předány na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Na základě této analýzy, jejíž výsledky jsou shrnuty v Tabulka 9 na následující str. 71, byla potvrzena přítomnost tří spojení mezi lysiny pro činidlo DSG i DSS. Dále byla identifikována dvě propojení lysinu s N-koncem a několik tzv. zavěšenců, které jsou navázány pouze na jeden lysin.

Tabulka 9: Výsledky MS analýzy peptidových fragmentů po chemickém síťování činidly DSG a DSS.

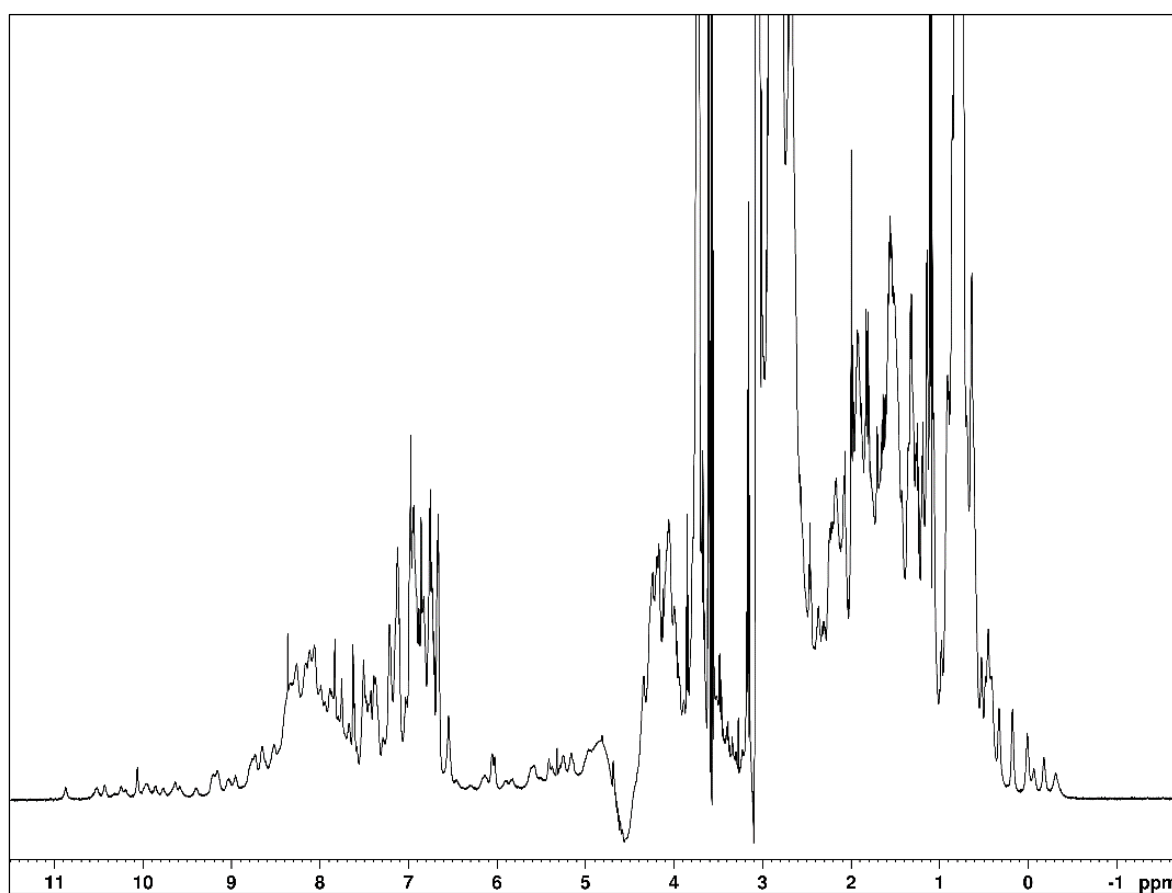
DSG		
Zesítěné peptidy	Peptidová sekvence	Zesítěné aminokyseliny
6 – 14 / 31 – 40	VYFGLKPPR - VLIQKPSIEK	K11 – K35
31 – 40 / 41 – 58	VLIQKPSIEK - CYVLIQENLNKTTDCSAK	K35 – K51
31 – 40 / 52 – 69	VLIQKPSIEK - TTDCSAKLECPQDWLSHR	K35 – K58
1 – 5 / 6 – 14	MDTAR - VYFGLKPPR	M1 – K11
1 – 5 / 31 – 40	MDTAR - VLIQKPSIEK	M1 – K35
6 – 30	VYFGLKPPRTPGAWHESPPSLPPVR	K11
31 – 40	VLIQKPSIEK	K35
41 – 58	CYVLIQENLNKTTDCSAK	K51
52 – 69	TTDCSAKLECPQDWLSHR	K58
70 – 92	DKCFHVSQVSNTWEEGLVDCDGK	K71
107 – 115	FLLDSIKEK	K113
114 – 124	EKYNFWIGLR	K115
147 – 174	ITGDTENDSCAAISGDKVTFESCNSDNR	K163
175 – 194	WICQKELYHETLSNYVGYGH	K179

DSS		
Zesítěné peptidy	Peptidová sekvence	Zesítěné aminokyseliny
6 – 14 / 31 – 40	VYFGLKPPR - VLIQKPSIEK	K11 – K35
31 – 40 / 41 – 58	VLIQKPSIEK - CYVLIQENLNKTTDCSAK	K35 – K51
31 – 40 / 52 – 69	VLIQKPSIEK - TTDCSAKLECPQDWLSHR	K35 – K58
1 – 5 / 6 – 14	MDTAR - VYFGLKPPR	M1 – K11
1 – 5 / 31 – 40	MDTAR - VLIQKPSIEK	M1 – K35
6 – 14	VYFGLKPPR	K11
31 – 40	VLIQKPSIEK	K35
52 – 69	TTDCSAKLECPQDWLSHR	K58
107 – 115	FLLDSIKEK	K113
114 - 124	EKYNFWIGLR	K115
147 – 174	ITGDTENDSCAAISGDKVTFESCNSDNR	K163
175 – 194	WICQKELYHETLSNYVGYGH	K179

5.5 Ověření přítomnosti vyšší prostorové struktury

5.5.1 Nukleární magnetická rezonance

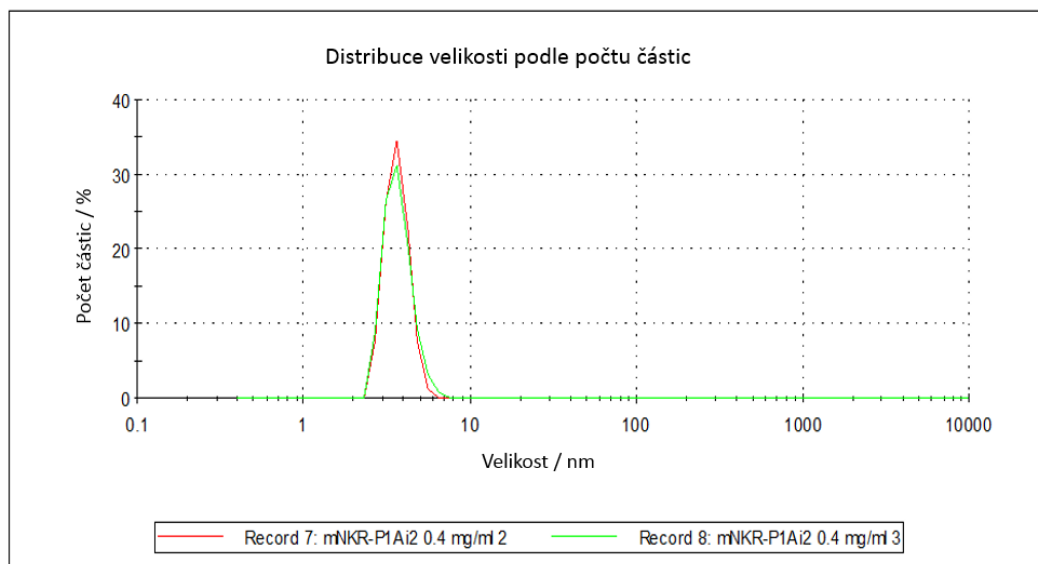
Frakce získané gelovou filtrací obsahující monomerní protein byly zakoncentrovány na 0,1mM. S tímto vzorkem pak bylo naměřeno Mgr. Josefem Chmelíkem, Ph.D. jednorozměrné ^1H -NMR spektrum, které je vidět na Obr. 35. Ze spektra lze pozorovat dobrou distribuci signálů v oblastech typických pro metylové skupiny (-0,5–1 ppm) a pro aminoskupiny (7,5–11 ppm), což odpovídá proteinu s definovanou 3D strukturou.



Obr. 35. ^1H -NMR spektrum proteinu mNkr-p1a iso2.

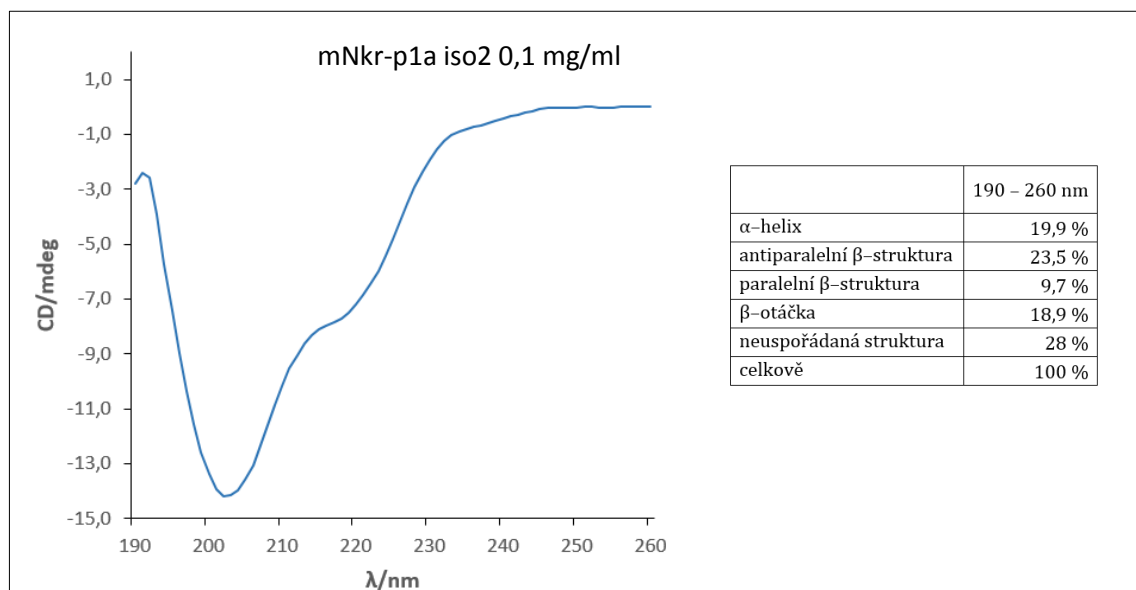
5.5.2 Dynamický rozptyl světla a cirkulární dichroismus

Měření DLS bylo potvrzeno, že vzorek proteinu mNkr-p1a iso2 je monodisperzní a nejsou v něm přítomny žádné formy agregace. Výsledek měření provedeného Tatsianou Charnavets, Ph.D. je zobrazen na Obr. 36.



Obr. 36. Výstup měření DLS.

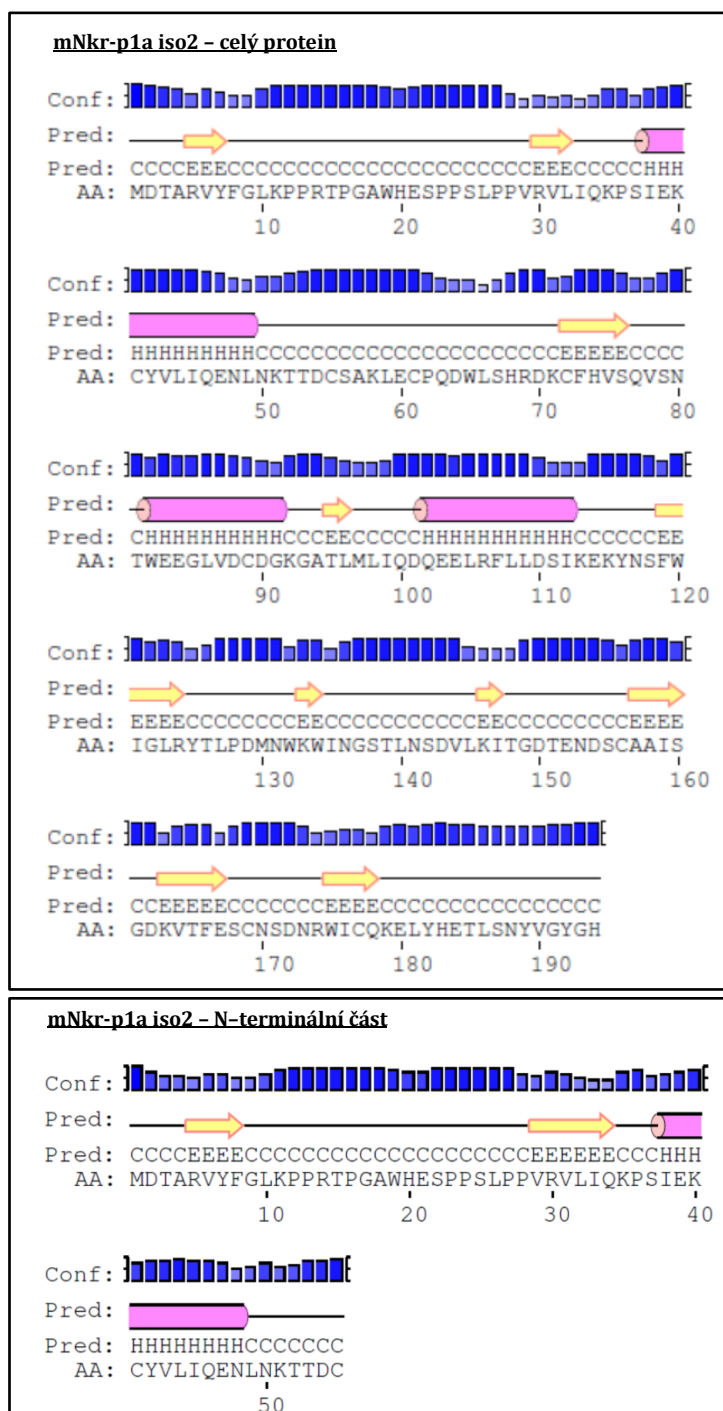
Analýza sekundární struktury metodou CD v blízké UV oblasti (190 – 260 nm) rovněž provedená Tatsianou Charnavets, Ph.D. poskytla informace o procentuálním zastoupení jednotlivých sekundárních struktur. Výsledné spektrum je právě lineární kombinací všech příspěvků změřených sekundárních struktur. Výstup metody CD je zobrazen na Obr. 37.



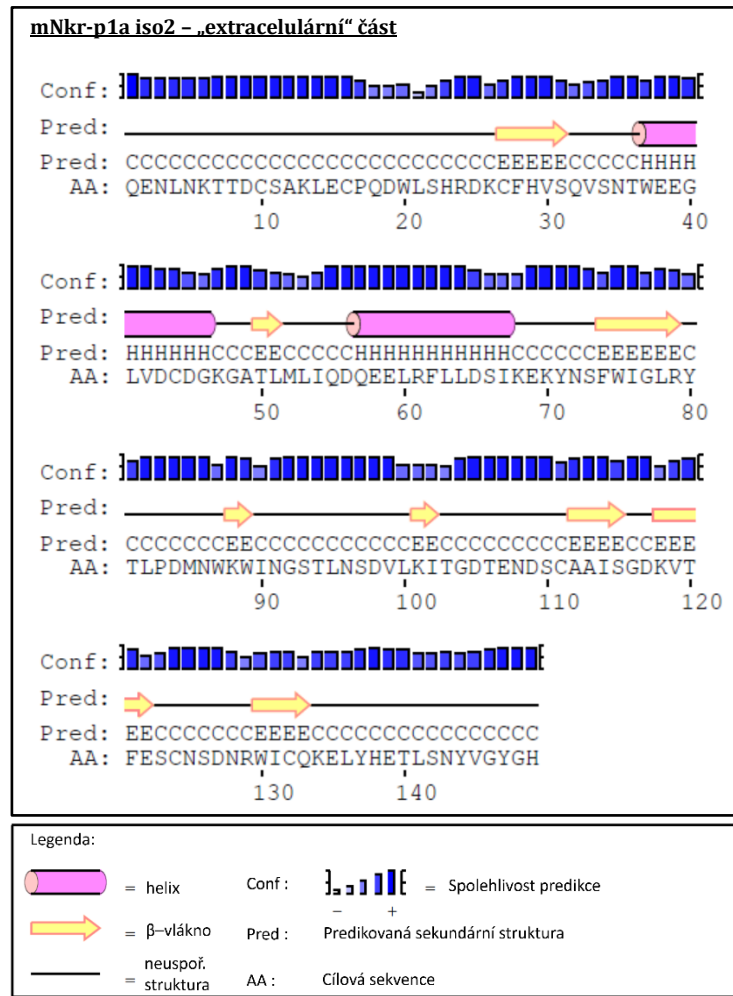
Obr. 37. Výstup z měření metodou CD. Graf závislosti molární elipticity na vlnové délce, z něj lze predikovat procentuální zastoupení elementů sekundární struktury.

5.6 Predikce struktury proteinu mNkr-p1a iso2

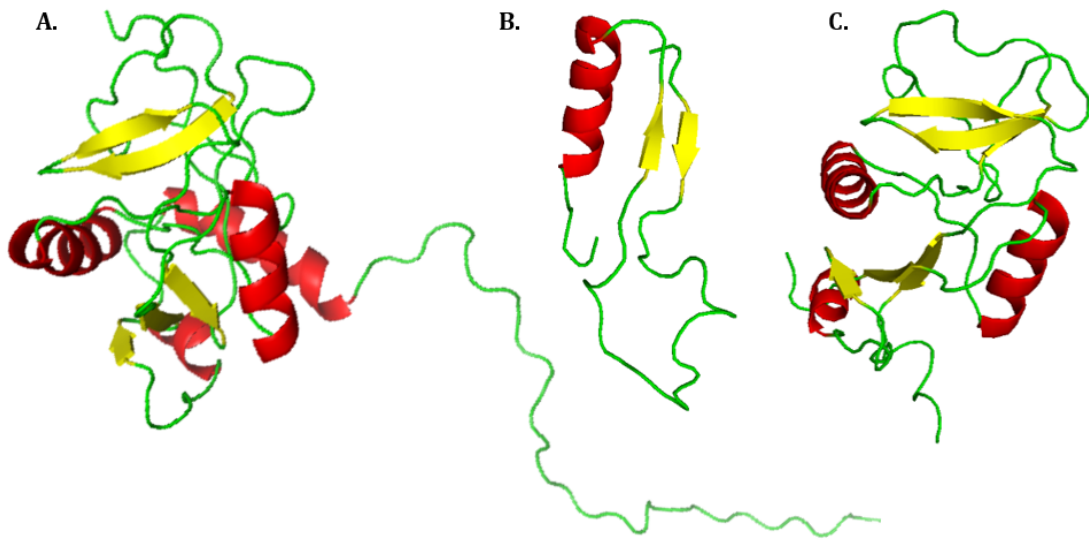
Pomocí algoritmu PSIPRED byly získány predikce sekundárních struktur pro celou molekulu proteinu mNkr-p1a iso2 a pro jeho N-terminální a „extracelulární“ část sekvence (Obr. 38). Pro všechny tyto jednotlivé části molekuly pak byly v programu *PyMol* vytvořeny modely jejich predikované 3D struktury (Obr. 39, str. 75).



Pokračování na následující straně.



Obr. 38. Sekundární struktury pro protein mNkr-p1a iso2 predikované algoritmem PSIPRED.



Obr. 39. Modely proteinu mNkr-p1a iso2. A. celý protein mNkr-p1a iso2; B. N-terminální část mNkr-p1a iso2; C. „extracelulární“ část mNkr-p1a iso2.

6) DISKUZE

Prvním krokem diplomové práce byla produkce proteinu mNkr-p1a iso2 v bakteriálním expresním systému. Krom toho, že v tomto systému byla v minulosti úspěšně vyprodukována i isoforma 1, byl zvolen zejména díky své nenáročnosti, rychlosti, vyšší výtěžnosti a v neposlední řadě také ekonomičnosti.

Bakteriální buňky *E. coli* BL21-Gold(DE3) byly transformovány plasmidem metodou teplotního šoku. Po jejich selekci na agarových plotnách s antibiotiky kanamycinem a tetracyklinem byl proveden výběr vhodného producenta. Ačkoli produkce byla po indukci roztokem IPTG velice dobrá a srovnatelná u všech vybraných bakteriálních klonů, na základě testu exprese byl zvolen produkční klon, u něhož docházelo k nejnižší produkci ostatních bakteriálních proteinů. Dále byl pro tento klon proveden výběr optimálních podmínek pro velkoobjemovou produkci z hlediska koncentrace induktoru IPTG, teploty a délky produkce.

Protein, který jsme po velkoobjemové produkci za vybraných podmínek obdrželi ve formě inkluzních tělísek, z nich byl izolován, solubilizován a renaturován metodami dle ověřeného protokolu, jež je standardně využíván naší laboratoří. Renaturovaný protein byl následně dialýzou převeden do fyziologických podmínek, při nichž byl koncentrován. Výsledek SDS-PAGE renaturovaných proteinů ukázal jednak to, že ke sbalení proteinu a zapojení disulfidových vazeb dochází až během dialýzy, jednak z něj byla zratelná přítomnost agregátů, jichž bylo zapotřebí se zbavit. To bylo v původním uspořádání realizováno zahrnutím IEC, jakožto prvního purifikačního kroku, který předcházela finální purifikaci ve formě gelové filtrace. Protože je však protein mNkr-p1a iso2 velice nestabilní a rychle se rozpadá, pro urychlení purifikačního procesu byla v závěrečném experimentálním uspořádání IEC vynechána. Jak se totiž později, na základě porovnání závěrečných výsledků z gelové filtrace s provedením IEC a bez ní, ukázalo, čistota výsledného produktu tím není nikterak ovlivněna. Gelovou filtrací byl protein zároveň převeden do HEPES pufru vhodného pro chemické zesíťení a další metody MS. Celkový výtěžek proteinu mNkr-p1a iso2 získaný tímto postupem se pohybuje okolo 3 mg/1 l LB média. Ačkoli při renaturaci, dialýze a koncentrování proteinu docházelo k jeho

výrazné precipitaci, množství, které bylo takto obdrženo, je pro následující experimenty dostačující.

To, že má protein velice krátký poločas života, bylo potvrzeno i dalším členem naší laboratoře, Mgr. Ljubinou Ivanovou (nepublikované výsledky). Při pozorování fúzního proteinu s fluorescenční značkou GFP (Green Fluorescent Protein) *in vivo* v buněčných liniích COS-7 a Jurkat bylo zjištěno, že se fúzní protein do 24 hod rozpadá. Signál, jež pozorujeme v různých buněčných kompartmentech (cytosol, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát), pravděpodobně pochází z odštěpeného GFP. Tato domněnka byla potvrzena i v následném western blotting experimentu s použitím protilátky proti GFP. Signál detekovaný na nitrocelulosoové membráně odpovídal velikosti samotného GFP, nikoli však dvakrát většímu fúznímu proteinu. Nicméně na plasmatické membráně mNkr-p1a iso2 pozorována nebyla. Pro stanovení stability proteinu je však zapotřebí dalších ověřovacích experimentů, především měření kinetiky v čase.

Na základě výnosu hydrofobicity (Obr. 14, str. 32) a faktu, že mNkr-p1a iso2 postrádá oproti iso1 většinu transmembránového segmentu a mohl by se tedy pohybovat uvnitř cytosolu, kde je redukující prostředí, bylo testováno purifikační schéma, kdy byla iso2 udržována v redukované podobě pomocí silného redukčního činidla TCEP (nepublikované výsledky). Za těchto podmínek se však náš protein rozpadal ještě mnohem rychleji než v případě, kdy u něj dochází ke vzniku disulfidového propojení. Skutečně jsou známy případy proteinů, které mají i přes redukující prostředí cytoplasmy sulfhydrylové skupiny cysteinů v oxidovaném stavu. Mimo dvě nejabundantnější molekuly tripeptidu glutathionu a thioredoxinu, které chrání buňku proti reaktivním formám kyslíku a v cytoplasmě udržují redukující prostředí tím, že ostatní molekuly redukují prostřednictvím svých sulfhydrylových skupin, byl uvnitř cytoplasmy pravděpodobně se zapojenými disulfidy identifikován protein hDectin-1E. Jedná se o isoformu lidského Dectinu-1, která vzniká alternativním sestřihem a postrádá část cytoplasmatické domény, celou transmembránovou oblast a krček. Extracelulární část sekvence, která formuje CTLD a ITAM-příbuzný signalizační motiv u ní zůstaly zachovány. Bylo prokázáno, že nedochází k sekreci této isoformy do kultivačního média, ale zůstává přítomna v cytoplasmě HEK293T buněk, kde interaguje se svým ligandem *in vitro* i *in vivo*¹¹⁴.

Dále bylo prokázáno, že k formování disulfidových vazeb uvnitř redukujícího prostředí cytoplasmy dochází pod vlivem oxidačního stresu. Redukční systémy glutathionu a thioredoxinu jsou zahlceny nebo inaktivovány a u redox-senzitivních proteinů participujících na nejrůznějších buněčných procesech, jako jsou translace, sbalování proteinů, glykolýza, buněčný růst, cytoskeletální struktura, antioxidační aktivita nebo přenos signálu, pak dochází k oxidaci sulfhydrylových skupin¹²³. Že i náš protein zůstává navzdory zapojeným cysteinům uvnitř cytoplasmy je tedy nanejvýš pravděpodobné. Pro přesné určení jeho lokalizace je však zapotřebí dalších experimentů.

Stejně tak je nejasná i jeho biologická úloha. S ohledem na to, že vlivem chybějící sekvence oproti mNkr-p1a iso1 postrádá signalizační motiv CRCP a ve své sekvenci neobsahuje ani ITIM motiv, nemá žádný zřejmý signalizační potenciál. Vzhledem ke krátkému poločasu života isoformy 2 vyvstává možnost, že by její role mohla být spíše regulačního charakteru. Rovněž lze uvažovat o tom, že exprese jedné či druhé isoformy by mohla být tkáňově specifická a podmíněna buněčným typem. Tyto domněnky je však potřeba v budoucnu důkladně prošetřit.

Měření intaktní hmoty rekombinantního proteinu a zároveň ověření jeho totožnosti bylo provedeno technikou ESI-FT-ICR MS, jíž byly získány experimentální molekulové hmotnosti. Jednak byla potvrzena majoritní přítomnost celé molekuly, jejíž hmota odpovídá šesti zapojeným cysteinům, jednak byla identifikována minoritní forma, u níž dochází ke štěpení čtyř aminokyselin od N-konce a má zapojeny čtyři disulfidové vazby.

Pozice disulfidových vazeb byly následně identifikovány pomocí štěpení specifickou proteasou trypsinem a LC-MS analýzou. U proteinu mNkr-p1a iso2 byla potvrzena přítomnost tří disulfidových vazeb: první cystein s druhým (které odpovídají cysteinům v krčkové oblasti mNkr-p1a iso1), dále čtvrtý s pátým a šestý se sedmým. Třetí a osmý cystein zůstávají v redukovaném stavu. Schéma tohoto propojení nicméně neodpovídá žádné možnosti z Tabulka 8 na straně 67, která znázorňuje různé konzervované možnosti propojení cysteinů u skupiny CTLD NK-buněčných receptorů a ligandů. Pouze jediný pár, šestý cystein se sedmým, odpovídá disulfidové vazbě C4-C5 uvnitř CTLD molekuly mNkr-p1a iso1. Mimo tato nejintenzivnější propojení cysteinů však byly identifikovány i další kombinace.

Příčinou tohoto stavu by mohl být tzv. scrambling disulfidů, kdy nedojde vlivem okolních podmínek ke správnému (nativnímu) zapojení disulfidových vazeb a sbalení proteinu, k němuž mohlo dojít při štěpení trypsinem za bazických podmínek. Protože se však může v principu jednat o úplně jiný typ proteinu, nelze říci, jaké zapojení disulfidových vazeb je či není správné.

Za účelem zjištění konkrétních vzdáleností mezi jednotlivými aminoskupinami (případně N-koncem peptidu) v molekule byla provedena metoda chemického zesíťení proteinu. Použita byla homobifunkční činidla DSG, s můstkem dlouhým 7,7 Å, a DSS, s můstkem o délce 11,4 Å, v 5-, 10- a 20M nadbytku oproti proteinu. V sekvenci se nachází celkem 13 lysinů, mezi nimiž byla identifikována tři propojení. Dále vzniká propojení s N-koncem a velké množství tzv. zavěšenců. Dvě různá propojení s N-koncem mohou značit, že N-konec není strukturovaný a v roztoku se volně pohybuje. Navíc byla detekována i přítomnost příliš dlouhých peptidových fragmentů, které obvykle obsahovaly více než jeden lysin a nešlo tedy přesně určit, které lysiny jsou mezi sebou propojeny. Do budoucna by bylo vhodné tyto experimenty zopakovat s využitím širší škály síťovacích činidel, případně použít i další proteasy.

Na základě dat získaných identifikací disulfidových vazeb a metodou chemického síťování vyvstaly pochybnosti, zda je náš protein sbalen a má definovanou 3D strukturu. To bylo ověřováno měřením 1D NMR spektra, jehož výsledkem byly naše pochybnosti vyvráceny, neboť bylo potvrzeno, že protein v roztoku definovanou 3D strukturu zaujímá. Následně bylo měřením DLS potvrzeno, že protein je i po pěti dnech skladování při 4 °C monodisperzní a nedochází ke vzniku agregátů. Technikou CD pak bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých typů sekundárních struktur. S využitím algoritmu PSIPRED byla následně provedena predikce sekundární struktury pro celou molekulu proteinu mNkr-p1a iso2 a pro jeho N-terminální a „extracelulární“ část sekvence. Pro tyto jednotlivé části molekuly byl programem *PyMol* vytvořen i predikovaný model 3D struktury. 3D model pro N-terminální a „extracelulární“ část molekuly mNkr-p1a iso2 se shoduje s predikcí poskytnutou PSIPREDEM. Dle výstupu je N-terminus strukturovaný a obsahuje jeden antiparalelní β -list a jeden α -helix, což by principiálně mohlo odpovídat výstupu z CD. Část sekvence odpovídající extracelulárnímu segmentu

mNkr-p1a iso1 molekuly dle predikce zaujímá sbalení odpovídající CTLD: doména tvořená dvěma lemuujícími α -helixy, dvěma antiparalelními β -listy a nestrukturovanou dlouhou smyčkou ležící uvnitř domény; navíc je zde přítomen jeden α -helix, což procentuálně odpovídá analýze CD. U 3D modelu pro celý protein však není (kromě jednoho α -helixu) vykreslen strukturovaný N-konec, který je u predikce sekundární struktury PSIPREDem znázorněn i v tomto případě. Zastoupení α -helikální struktury dle PSIPREDu však procentuálně odpovídá výstupu z CD, lze tedy uvažovat možnost, že α -helix by v N-terminální části molekuly mohl být skutečně přítomen a zároveň by se mohl formovat i strukturní motiv CTLD. Protože informační hodnotu dat získaných chemickým zesíťením a informací o rozložení disulfidů nelze plně využít, nebyly na modely aplikovány.

Detailnější vhled do struktury proteinu mNkr-p1a iso2 by mohla vnést např. další technika hmotnostní spektrometrie – vodík/deuteriová výměna, nebo měření dalších NMR experimentů. Tyto techniky jsou však vzhledem k vysoké nestabilitě molekuly prozatím experimentálně nedostupné.

7) ZÁVĚR

- Byly nalezeny vhodné podmínky produkce proteinového konstruktu mNkr-p1a iso2 v prokaryotickém expresním systému
- Produkovaný protein byl úspěšně *in vitro* renaturován a purifikován
- Identita proteinu byla potvrzena technikou ESI-FT-ICR MS; zároveň bylo potvrzeno štěpení prvních čtyř aminokyselin ve směru od N-konce
- Bylo popsáno zapojení disulfidových vazeb
- Došlo k zesítnění proteinu síťovacími činidly
- 1D NMR experimentem byla potvrzena přítomnost definované 3D struktury
- Měření DLS byla ověřena monodisperzita proteinového preparátu
- Měření CD bylo stanoveno procentuální zastoupení prvků sekundární struktury

8) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S. *Nat. Immunol.* **2008**, 9 (5), 503–510.
- (2) Herberman, R. B. *NK CELLS AND OTHER NATURAL EFFECTOR CELLS*; Academic: New York, 2012.
- (3) Yokoyama, W. M. *Paul, WE., editor. Fundamental Immunology*; Lippincott-Raven, 2008; pp 483–517.
- (4) Villard, J. J. *Innate Immun.* **2011**, 3 (4), 395–402.
- (5) Tian, Z.; Gershwin, M. E.; Zhang, C. J. *Autoimmun.* **2012**, 39 (3), 206–215.
- (6) Mathias, C. B. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2015**, 15 (2), 500.
- (7) Moffett-King, A. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, 2 (9), 656–663.
- (8) Hořejší, V.; Bartůňková, J. *Základy imunologie*, 4. ed.; Triton: Praha, 2009.
- (9) Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H. *Eur. J. Immunol.* **1975**, 5, 112–117.
- (10) Grégoire, C.; Chasson, L.; Luci, C.; Tomasello, E.; Geissmann, F.; Vivier, E.; Walzer, T. *Immunol. Rev.* **2007**, 220 (1), 169–182.
- (11) Moretta, A.; Bottino, C.; Mingari, M. C.; Biassoni, R.; Moretta, L. *Nat. Immunol.* **2002**, 3 (1), 6–8.
- (12) Vivier, E. *Immunol. Lett.* **2006**, 107 (1), 1–7.
- (13) Kim, S.; Iizuka, K.; Kang, H.-S. P.; Dokun, A.; French, A. R.; Greco, S.; Yokoyama, W. M. *Nat. Immunol.* **2002**, 3 (6), 523–528.
- (14) Frey, M.; Packianathan, N. B.; Fehniger, T. A.; Ross, M. E.; Wang, W. C.; Stewart, C. C.; Caligiuri, M. A.; Evans, S. S. *J Immunol* **1998**, 161 (1), 400–408.
- (15) Zhang, Y.; Wallace, D. L.; De Lara, C. M.; Ghattas, H.; Asquith, B.; Worth, A.; Griffin, G. E.; Taylor, G. P.; Tough, D. F.; Beverley, P. C. L.; Macallan, D. C. *Immunology* **2007**, 121 (2), 258–265.

- (16) Walzer, T.; Bléry, M.; Chaix, J.; Fuseri, N.; Chasson, L.; Robbins, S. H.; Jaeger, S.; André, P.; Gauthier, L.; Daniel, L.; Chemin, K.; Morel, Y.; Dalod, M.; Imbert, J.; Pierres, M.; Moretta, A.; Romagné, F.; Vivier, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (9), 3384–3389.
- (17) Jamieson, A. M.; Isnard, P.; Dorfman, J. R.; Coles, M. C.; Raulet, D. H. *J. Immunol.* **2004**, *172* (2), 864–870.
- (18) Yokoyama, W. M. *Curr. Opin. Immunol.* **1993**, *5* (1), 67–73.
- (19) Lanier, L. L. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 359–393.
- (20) Long, E. O. **1999**, 875–904.
- (21) Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Cantoni, C.; Cristina, M.; Biassoni, R.; Moretta, L. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 197–223.
- (22) Vivier, E.; Raulet, D. H.; Moretta, A.; Caligiuri, M. A.; Zitvogel, L.; Lanier, L. L.; Yokoyama, W. M.; Ugolini, S. *Science (80-.)*. **2011**, *331* (6013), 44–49.
- (23) O’Sullivan, T. E.; Sun, J. C.; Lanier, L. L. *Immunity* **2015**, *43* (4), 634–645.
- (24) Yu, J.; Freud, A. G.; Caligiuri, M. A. *Trends Immunol.* **2013**, *34* (12), 573–582.
- (25) Ljunggren, H. G.; Kärre, K. *Immunol. Today* **1990**, *11* (7), 237–244.
- (26) Carlyle, J. R.; Jamieson, A. M.; Gasser, S.; Clingan, C. S.; Arase, H.; Raulet, D. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (10), 3527–3532.
- (27) Aldemir, H.; Prod’homme, V.; Dumaurier, M.-J.; Retiere, C.; Poupon, G.; Cazareth, J.; Bihl, F.; Braud, V. M. *J. Immunol.* **2005**, *175* (12), 7791–7795.
- (28) Kasajima, A.; Sers, C.; Sasano, H.; Jöhrens, K.; Stenzinger, A.; Noske, A.; Buckendahl, A.-C.; Darb-Esfahani, S.; Müller, B. M.; Budczies, J.; Lehman, A.; Dietel, M.; Denkert, C.; Weichert, W. *Hum. Pathol.* **2010**, *41* (12), 1758–1769.
- (29) Ibana, J. A.; Schust, D. J.; Sugimoto, J.; Nagamatsu, T.; Greene, S. J.; Quayle, A. J. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2011**, *2011*, 420905.
- (30) Gainey, M. D.; Rivenbark, J. G.; Cho, H.; Yang, L.; Yokoyama, W. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (47), E3260–E3267.

- (31) Lanier, L. L. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23* (1), 225–274.
- (32) Nice, T. J.; Coscoy, L.; Raulet, D. H. *J. Exp. Med.* **2009**, *206* (2), 287–298.
- (33) Sivori, S.; Falco, M.; Della Chiesa, M.; Carlomagno, S.; Vitale, M.; Moretta, L.; Moretta, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (27), 10116–10121.
- (34) Zhang, C.; Zhang, J.; Tian, Z. *Cell. Mol. Immunol.* **2006**, *3* (4), 241–254.
- (35) Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S. *Nat. Immunol.* **2008**, *9* (5), 503–510.
- (36) Ho, E. L.; Carayannopoulos, L. N.; Kinder, J.; Plougastel, B.; Smith, H. R. C.; Yokoyama, W. M.; Poursine-laurent, J. *J. Immunol.* **2002**, *169* (7), 3667–3675.
- (37) Gosselin, P.; Mason, L. H.; Willette-Brown, J.; Ortaldo, J. R.; McVicar, D. W.; Anderson, S. K. *J. Leukoc. Biol.* **1999**, *66* (1), 165–171.
- (38) Ortaldo, J. R.; Young, H. A. *J Immunol Ref.* **2003**, *170*, 1763–1769.
- (39) Trinchieri, G. *Adv. Immunol.* **1989**, *47*, 187–376.
- (40) Gerosa, F.; Baldani-Guerra, B.; Nisii, C.; Marchesini, V.; Carra, G.; Trinchieri, G. *J. Exp. Med.* **2002**, *195* (3), 327–333.
- (41) Walzer, T.; Dalod, M.; Robbins, S. H.; Zitvogel, L.; Vivier, E. *October* **2005**, *106* (7), 2252–2258.
- (42) Raulet, D. H. *Nat. Immunol.* **2004**, *5* (10), 996–1002.
- (43) Cerboni, C.; Zingoni, A.; Cippitelli, M.; Piccoli, M.; Frati, L.; Santoni, A. *Blood* **2007**, *110* (2), 606–615.
- (44) Smyth, M. J.; Cretney, E.; Kelly, J. M.; Westwood, J. A.; Street, S. E. A.; Yagita, H.; Takeda, K.; Dommelen, S. L. H. Van; Degli-Esposti, M. A.; Hayakawa, Y. *Mol. Immunol.* **2005**, *42* (4 SPEC. ISS.), 501–510.
- (45) Kiessling, R.; Klein, E.; Pross, H.; Wigzell, H. *Eur. J. Immunol.* **1975**, *5* (2), 117–121.
- (46) Herberman, R. B.; Nunn, M. E.; Lavrin, D. H. *Int. J. cancer* **1975**, *16* (2), 216–229.
- (47) Freud, A. G.; Becknell, B.; Roychowdhury, S.; Mao, H. C.; Ferketich, A. K.; Nuovo, G. J.;

- Hughes, T. L.; Marburger, T. B.; Sung, J.; Baiocchi, R. A.; Guimond, M.; Caligiuri, M. A. *Immunity* **2005**, *22* (3), 295–304.
- (48) Vosshenrich, C. a J.; García-Ojeda, M. E.; Samson-Villéger, S. I.; Pasqualetto, V.; Enault, L.; Richard-Le Goff, O.; Corcuff, E.; Guy-Grand, D.; Rocha, B.; Cumano, A.; Rogge, L.; Ezine, S.; Di Santo, J. P. *Nat. Immunol.* **2006**, *7* (11), 1217–1224.
- (49) Takeda, K.; Cretney, E.; Hayakawa, Y.; Ota, T.; Akiba, H.; Yagita, H.; Kinoshita, K.; Okumura, K.; Smyth, M. J.; Ogasawara, K. *Blood* **2005**, *105* (5), 2082–2089.
- (50) Yokoyama, W. M.; Kim, S.; French, A. R. *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22* (11), 405–429.
- (51) Miller, J. S.; Alley, K. a; McGlave, P. *Blood* **1994**, *83* (9), 2594–2601.
- (52) Becknell, B.; Caligiuri, M. A. *Adv. Immunol.* **2005**, *86*, 209–239.
- (53) Williams, N. S.; Klem, J.; Puzanov, I. J.; Sivakumar, P. V; Bennett, M.; Kumar, V. *J. Immunol.* **1999**, *163* (5), 2648–2656.
- (54) Roth, C.; Carlyle, J.; Takizawa, H.; Raulet, D. *Immunity* **2000**, *13* (1), 143–153.
- (55) Grzywacz, B.; Kataria, N.; Sikora, M.; Oostendorp, R. A.; Dzierzak, E. A.; Blazar, B. R.; Miller, J. S.; Verneris, M. R. *Blood* **2006**, *108* (12), 3824–3833.
- (56) Elliott, J. M.; Yokoyama, W. M. *Trends Immunol.* **2011**, *32* (8), 364–372.
- (57) Kim, S.; Poursine-Laurent, J.; Truscott, S. M.; Lybarger, L.; Song, Y.-J.; Yang, L.; French, A. R.; Sunwoo, J. B.; Lemieux, S.; Hansen, T. H.; Yokoyama, W. M. *Nature* **2005**, *436* (7051), 709–713.
- (58) Vivier, E.; Nunès, J. a; Vély, F. *Science* **2004**, *306* (5701), 1517–1519.
- (59) Lanier, L. L. *Nat. Immunol.* **2008**, *9* (5), 495–502.
- (60) Ravetch, J. V; Lanier, L. L. *Science (80-.)*. **2000**, *290* (5489), 84–89.
- (61) Smith, K. M.; Wu, J.; Bakker, A. B. H.; Joseph, H.; Smith, K. M.; Wu, J.; Bakker, A. B. H.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L. *J Immunol* **1998**, *161*, 7–10.
- (62) Campbell, K. S.; Hasegawa, J. *J Allergy Clin Immunol* **2013**, *132* (3), 536–544.
- (63) Chiesa, S.; Mingueneau, M.; Fuseri, N.; Malissen, B.; Raulet, D. H.; Malissen, M.; Vivier, E.;

- Tomasello, E. *Blood* **2006**, *107* (6), 2364–2372.
- (64) Huntington, N. D.; Xu, Y.; Nutt, S. L.; Tarlinton, D. M. *J. Exp. Med.* **2005**, *201* (9), 1421–1433.
- (65) Martin, A. M.; Kulski, J. K.; Witt, C.; Pontarotti, P.; Christiansen, F. T. *Trends Immunol.* **2002**, *23* (2), 81–88.
- (66) Van Bergen, J.; Trowsdale, J. *Front. Immunol.* **2012**, *3* (DEC), 1–4.
- (67) Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Cantoni, C.; Mingari, M. C.; Biassoni, R.; Moretta, L. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 197–223.
- (68) Cantoni, C.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pessino, A.; Augugliaro, R.; Malaspina, A.; Parolini, S.; Moretta, L.; Moretta, A.; Biassoni, R. *J. Exp. Med.* **1999**, *189* (5), 787–796.
- (69) Natarajan, K.; Dimasi, N.; Wang, J.; Mariuzza, R. A.; Margulies, D. H. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 853–885.
- (70) Brandt, C. S.; Baratin, M.; Yi, E. C.; Kennedy, J.; Gao, Z.; Fox, B.; Haldeman, B.; Ostrander, C. D.; Kaifu, T.; Chabannon, C.; Moretta, A.; West, R.; Xu, W.; Vivier, E.; Levin, S. D. *J. Exp. Med.* **2009**, *206* (7), 1495–1503.
- (71) Zelensky, A. N.; Gready, J. E. *Proteins* **2003**, *52* (3), 466–477.
- (72) Zelensky, A. N.; Gready, J. E. *FEBS J.* **2005**, *272*, 6179–6217.
- (73) Kirkham, C. L.; Carlyle, J. R. *Front. Immunol.* **2014**, *5* (June), 214.
- (74) Sovová, Z.; Kopecký, V.; Pazderka, T.; Hofbauerová, K.; Rozbeský, D.; Vaněk, O.; Bezouška, K.; Ettrich, R. *J. Mol. Model.* **2011**, *17* (6), 1353–1370.
- (75) Li, P.; Morris, D. L.; Willcox, B. E.; Steinle, A.; Spies, T.; Strong, R. K. *Nat. Immunol.* **2001**, *2* (5), 443–451.
- (76) Lanier, L. L.; Chang, C.; Phillips, J. H. *J. Immunol.* **1994**, *153* (6), 2417–2428.
- (77) Iizuka, K.; Naidenko, O. V.; Plougastel, B. F. M.; Fremont, D. H.; Yokoyama, W. M. *Nat. Immunol.* **2003**, *4* (8), 801–807.
- (78) Rozbeský, D.; Kavan, D.; Chmelík, J.; Novák, P.; Vaněk, O.; Bezouška, K. *Protein Expr. Purif.* **2011**, *77* (2), 178–184.

- (79) Kolenko, P.; Rozbeský, D.; Vaněk, O.; Bezouška, K.; Hašek, J.; Dohnálek, J. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2011**, *67* (12), 1519–1523.
- (80) Smith, H. R. C.; Heusel, J. W.; Mehta, I. K.; Kim, S.; Dorner, B. G.; Naidenko, O. V.; Iizuka, K.; Furukawa, H.; Beckman, D. L.; Pingel, J. T.; Scalzo, A. A.; Fremont, D. H.; Yokoyama, W. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (13), 8826–8831.
- (81) Li, Y.; Wang, Q.; Chen, S.; Brown, P. H.; Mariuzza, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (28), 11505–11510.
- (82) Glimcher, L.; Shen, F. W.; Cantor, H. *J. Exp. Med.* **1977**, *145* (1), 1–9.
- (83) Giorda, R.; Trucco, M. *J. Immunol.* **1991**, *147* (5), 1701–1708.
- (84) Ryan, J. C.; Turck, J.; Niemi, E. C.; Yokoyama, W. M.; Seaman, W. E. *J. Immunol.* **1992**, *149* (5), 1631–1635.
- (85) Yokoyama, W. M.; Ryan, J. C.; Hunter, J. J.; Smith, H. R.; Stark, M.; Seaman, W. E. *J. Immunol.* **1991**, *147* (9), 3229–3236.
- (86) Chambers, W. H.; Vujanovic, N. L.; DeLeo, A. B.; Olszowy, M. W.; Herberman, R. B.; Hiserodt, J. C. *J. Exp. Med.* **1989**, *169* (4), 1373–1389.
- (87) Giorda, R.; Rudert, W. A.; Vavassori, C.; Chambers, W. H.; Hiserodt, J. C.; Trucco, M. *Science* **1990**, *249* (4974), 1298–1300.
- (88) Ryan, J. C.; Niemi, E. C.; Goldfien, R. D.; Hiserodt, J. C.; Seaman, W. E. *J. Immunol.* **1991**, *147* (9), 3244–3250.
- (89) Mesci, A.; Ljutic, B.; Makrigiannis, A. P.; Carlyle, J. R. *Immunol. Res.* **2006**, *35* (1-2), 13–26.
- (90) Plougastel, B.; Matsumoto, K.; Dubbelde, C.; Yokoyama, W. M. *Immunogenetics* **2001**, *53* (7), 592–598.
- (91) Kveberg, L.; Dai, K.-Z.; Westgaard, I. H.; Daws, M. R.; Fossum, S.; Naper, C.; Vaage, J. T. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39* (2), 541–551.
- (92) Appasamy, P. M.; Kenniston, T. W.; Brissette-Storkus, C. S.; Chambers, W. H. *Nat. Immun.* **1996**, *15* (5), 259–268.
- (93) Aust, J. G.; Gays, F.; Mickiewicz, K. M.; Buchanan, E.; Brooks, C. G. *J. Immunol.* **2009**, *183*

- (1), 106–116.
- (94) Chen, P.; Bélanger, S.; Aguilar, O. A.; Zhang, Q.; St-Laurent, A.; Rahim, M. M. A.; Makrigiannis, A. P.; Carlyle, J. R. *Immunogenetics* **2011**, *63* (10), 627–640.
- (95) Pozo, D.; Valés-Gómez, M.; Mavaddat, N.; Williamson, S. C.; Chisholm, S. E.; Reyburn, H. J. *Immunol.* **2006**, *176* (4), 2397–2406.
- (96) Rozbeský, D.; Ivanova, L.; Hernychová, L.; Grobárová, V.; Novák, P.; Černý, J. *Molecules* **2015**, *20* (2), 3463–3478.
- (97) Plougastel, B.; Dubbelde, C.; Yokoyama, W. M. *Immunogenetics* **2001**, *53* (3), 209–214.
- (98) Zhang, Q.; Rahim, M. M. A.; Allan, D. S. J.; Tu, M. M.; Belanger, S.; Abou-Samra, E.; Ma, J.; Sekhon, H. S.; Fairhead, T.; Zein, H. S.; Carlyle, J. R.; Anderson, S. K.; Makrigiannis, A. P. *PLoS One* **2012**, *7* (12), e50561.
- (99) Fine, J. H.; Chen, P.; Mesci, A.; Allan, D. S. J.; Gasser, S.; Raulet, D. H.; Carlyle, J. R. *Cancer Res.* **2010**, *70* (18), 7102–7113.
- (100) Williams, K. J. N.; Wilson, E.; Davidson, C. L.; Aguilar, O. A.; Fu, L.; Carlyle, J. R.; Burshtyn, D. *N. J. Immunol.* **2012**, *188* (10), 4980–4991.
- (101) Kveberg, L.; Dai, K.-Z.; Inngjerdigen, M.; Brooks, C. G.; Fossum, S.; Vaage, J. T. *Immunogenetics* **2011**, *63* (7), 429–436.
- (102) Cosmi, L.; Cimaz, R.; Maggi, L.; Santarlaschi, V.; Capone, M.; Borriello, F.; Frosali, F.; Querci, V.; Simonini, G.; Barra, G.; Piccinni, M. P.; Liotta, F.; De Palma, R.; Maggi, E.; Romagnani, S.; Annunziato, F. *Arthritis Rheum.* **2011**, *63* (8), 2504–2515.
- (103) Maggi, L.; Santarlaschi, 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.* **2010**, *40* (8), 2174–2181.
- (104) Cosmi, L.; De Palma, R.; Santarlaschi, V.; Maggi, L.; Capone, M.; Frosali, F.; Rodolico, G.; Querci, V.; Abbate, G.; Angeli, R.; Berrino, L.; Fambrini, M.; Caproni, M.; Tonelli, F.; Lazzeri, E.; Parronchi, P.; Liotta, F.; Maggi, E.; Romagnani, S.; Annunziato, F. *J. Exp. Med.* **2008**, *205* (8), 1903–1916.
- (105) Rosen, D. B.; Bettadapura, J.; Alsharifi, M.; Mathew, P. A.; Warren, H. S.; Lanier, L. L. J.

- Immunol.* **2005**, *175* (12), 7796–7799.
- (106) Germain, C.; Meier, A.; Jensen, T.; Knapnougel, P.; Poupon, G.; Lazzari, A.; Neisig, A.; Håkansson, K.; Dong, T.; Wagtmann, N.; Galsgaard, E. D.; Spee, P.; Braud, V. M. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (44), 37964–37975.
- (107) Kamishikiryo, J.; Fukuhara, H.; Okabe, Y.; Kuroki, K.; Maenaka, K. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (27), 23823–23830.
- (108) Liu, Y.; Eisenberg, D. *Protein Sci.* **2002**, *11* (6), 1285–1299.
- (109) Rozbesky, D.; Man, P.; Kavan, D.; Chmelik, J.; Cerny, J.; Bezouska, K.; Novak, P. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (2), 867–870.
- (110) Kolenko, P.; Rozbeský, D.; Vaněk, O.; Kopecký, V.; Hofbauerová, K.; Novák, P.; Pompach, P.; Hašek, J.; Skálová, T.; Bezouška, K.; Dohnálek, J. *J. Struct. Biol.* **2011**, *175* (3), 434–441.
- (111) Maita, N.; Nishio, K.; Nishimoto, E.; Matsui, T.; Shikamoto, Y.; Morita, T.; Sadler, J. E.; Mizuno, H. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (39), 37777–37781.
- (112) Feinberg, H.; Park-Snyder, S.; Kolatkar, A. R.; Heise, C. T.; Taylor, M. E.; Weis, W. I. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (28), 21539–21548.
- (113) Ariizumi, K.; Shen, G. L.; Shikano, S.; Ritter, R.; Zukas, P.; Edelbaum, D.; Morita, A.; Takashima, A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (16), 11957–11963.
- (114) Xie, J.; Sun, M.; Guo, L.; Liu, W.; Jiang, J.; Chen, X.; Zhou, L.; Gu, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347* (4), 1067–1073.
- (115) Mummidi, S.; Catano, G.; Lam, L.; Hoefle, A.; Telles, V.; Begum, K.; Jimenez, F.; Ahuja, S. S.; Ahuja, S. K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (35), 33196–33212.
- (116) Tone, M.; Tone, Y.; Fairchild, P. J.; Wykes, M.; Waldmann, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (4), 1751–1756.
- (117) Lodish, H. et al. In *Molecular Cell Biology*; Freeman W. H. & Company: New York, 2008.
- (118) Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 172.
- (119) http://web.expasy.org/compute_pi/ (poslední přístup dne 29.6.2016).

- (120) <http://web.expasy.org/protparam/> (poslední přístup dne 4.6.2016).
- (121) McGuffin, L. J.; Bryson, K.; Jones, D. T. *Bioinformatics* **2000**, *16* (4), 404–405.
- (122) <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>.
- (123) Cumming, R. C.; Andon, N. L.; Haynes, P. A.; Park, M.; Fischer, W. H.; Schubert, D. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (21), 21749–21758.
- (124) Ljunggren, H.-G.; Malmberg, K.-J. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (5), 329–339.
- (125) Vivier, E.; Raulet, D. H.; Moretta, A.; Caligiuri, M. A.; Zitvogel, L.; Lanier, L. L.; Yokoyama, W. M.; Ugolini, S. *Science* **2011**, *331* (6013), 44–49.
- (126) Dong, X.; Xu, F.; Gong, Y.; Gao, J.; Lin, P.; Chen, T.; Peng, Y.; Qiang, B.; Yuan, J.; Peng, X.; Rao, Z. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (15), 10610–10617.
- (127) <http://web.expasy.org/protscale/> (poslední přístup dne 7.7.2016).

