

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



KLONOVÁNÍ A AMPLIFIKACE ISOFOREM  
B, D A F PROTEINU NKR-P1,  
RECEPTORU MYŠÍCH NK BUNĚK

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Ondřej Vaněk

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Praha 2008

MARTINA HOLUBOVÁ

Přírodovědecká fakulta UK  
KNIHOVNA CHEMIE



3233218465

**UNIVERZITA KARLOVA v Praze**  
Přírodovědecká fakulta  
Oborová knihovna chemie  
Albertov 6, 128 43 Praha 2  
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208  
UK 22

*řič. 968/08 stud  
(biochemie)*

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Mgr. Ondřeji Vaňkovi za vstřícné vedení, cenné odborné rady a velkou ochotu a trpělivost při zpracovávání této bakalářské práce. Dále chci poděkovat Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracování bakalářské práce a cenné rady a připomínky, jimiž přispěl ke vzniku této práce. Děkuji také všem členům laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc a rady při experimentální části práce. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a všem svým blízkým za jejich podporu po celou dobu mého studia.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele  
Mgr. Ondřeje Vaňka a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne: .....*4.6.2008*.....

Podpis: .....*Holubová M.*.....

Martina Holubová

## SEZNAM ZKRATEK

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátce proti cílové struktuře (antibody dependent cell cytotoxicity)
APC	buňky prezentující antigen (antigen-presenting cells)
$\beta_2m$	$\beta_2$ – mikroglobulin
bp	počet párů bazí (jednotka délky řetězce DNA)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CD	označení povrchových molekul leukocytů (cluster of differentiation)
cDNA	komplementární DNA vzniklá reversní transkripcí mRNA
Clr	C-lectin related
CRD	doména rozpoznávající sacharid (carbohydrate recognition domain)
DAP12	12kDa protein aktivující DNAX (DNAX-activating protein of 12kDa)
dNTP	směs deoxynukleotidtrifosfátů
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Fas	apoptotický receptor CD95
FcR $\gamma$	signalizační protein asociující s NKR-P1
FDC	folikulární dendritické buňky (follicular dendritic cells)
FW	přímý primer (forward primer)
HLA	hlavní lidský histokompatibilní antigen (human leukocyte antigen)
H-2	hlavní myší histokompatibilní komplex
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
IL-3	interleukin 3
ILT	imunoglobulinový transkript (immunoglobulin-like transcript)
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)
KIR	imunoglobulinový zabíječský inhibiční receptor (killer inhibitory

	receptor)
Klrb1	lektinový receptor zabíječských buněk podrodiny B (killer cell lectin-like receptor subfamily B =NKR-P1)
KLRF1	lektinový receptor zabíječských buněk podrodiny F1 (killer cell lectin-like receptor subfamily F1)
LB	název média dle Luria-Bertaniho
LAIR	inhibiční receptor asociovaný s leukocyty (leukocyte-associated inhibitory receptor)
LRC	komplex genů leukocytárních receptorů (leukocyte-receptor complex)
mAb	monoklonální protilátka (monoclonal antibody)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
mNKR-P1	myší NKR-P1
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NKC	NK genový komplex (NK-gene complex)
NKG2	skupina receptorů zabíječských buněk 2 (natural killer group 2)
NKR-P1	receptorový protein NK buněk 1 (natural killer cell receptor protein 1)
Ocil	osteoklastický inhibiční lektin (osteoclast inhibitory lectin)
PCR	polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PIR	párovaný imunoglobulinový receptor (paired Ig-like receptor)
p56 <sup>lck</sup>	tyrosin kinasa příbuzná Src (Src-related nonreceptor protein tyrosin kinase)
REV	zpětný primer (reverse primer)
rpm	počet otáček za minutu
RT	reversní traskriptasa
SHP1 (2)	tyrosin fosfatasa obsahující SH2 doménu (SH2 (Src homology 2) - domain containing protein tyrosine phosphatase 1 (2))
SHIP	SH2-domain containing inositol polyphosphate 5'phosphatase
T <sub>C</sub> , T <sub>H</sub>	cytotoxický T lymfocyt (cytotoxic), pomocný T lymfocyt (helper)
TCR	T-buněčný receptor (T-cell receptor)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

# OBSAH

Seznam zkratek.....	4
Obsah.....	6
<b>1. Literární úvod.....</b>	<b>8</b>
1.1 Imunitní systém	
- 1.1.1 Funkce imunitního systému.....	8
- 1.1.2 Základní druhy imunitních mechanismů.....	8
- 1.1.3 Buňky imunitního systému.....	9
1.2 NK buňky.....	10
1.3 Receptory NK buněk	
- 1.3.1 Inhibiční a aktivační receptory.....	11
- 1.3.2 MHC glykoproteiny třídy I.....	12
- 1.3.3 NKC a LRC.....	13
1.4 NKR-P1 a jeho isoformy.....	14
<b>2. Cíl práce.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Materiál.....</b>	<b>18</b>
3.1 Přístroje a pomůcky.....	18
3.2 Chemikálie	
- 3.2.1 Primery pro PCR.....	18
- 3.2.2 Enzymy.....	19
- 3.2.3 Bakteriální kmeny.....	19
- 3.2.4 Vektory.....	19
- 3.2.5 Chemikálie.....	19
- 3.2.6 Roztoky a média.....	20
<b>4. Metody .....</b>	<b>21</b>
4.1 Návrh a syntéza oligonukleotidových primerů.....	21
4.2 Příprava RNA z myších slezin.....	21
4.3 Syntéza cDNA.....	21
4.4 PCR.....	22
4.5 Detekce produktů PCR pomocí agarosové elektroforesy.....	23

4.6 Purifikace PCR produktů.....	23
4.7 Ligace získaných genů do klonovacího vektoru.....	23
4.8 Transformace kompetentních buněk.....	23
4.9 Mini-preparace plasmidové DNA.....	24
4.10 Restrikční analýza.....	24
4.11 Analýza DNA fragmentů elektroforesou na agarosovém gelu.....	24
4.12 Uchování bakteriálních kultur nesoucích požadovaný plasmid, příprava kultur pro DNA sekvenování .....	25
4.13 DNA sekvenování.....	25
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>27</b>
5.1 Návrh primerů, PCR amplifikace, detekce PCR produktů.....	27
5.2 Purifikace PCR produktů.....	30
5.3 Ligace genů do klonovacího vektoru, transformace kompetentních buněk, izolace plasmidové DNA.....	30
5.4 Restrikční analýza, analýza vzniklých DNA fragmentů agarosovou elektroforesou ...	31
5.5 DNA sekvenování.....	33
<b>6. Diskuse.....</b>	<b>36</b>
<b>7. Závěr.....</b>	<b>38</b>
<b>8. Přehled citované literatury.....</b>	<b>39</b>
<b>9. Přílohy</b>	
Příloha 1 – Nukleotidová sekvence mNKR-P1B	
Příloha 2 – Nukleotidová sekvence mNKR-P1D	
Příloha 3 – Nukleotidová sekvence mNKR-P1F	



# 1.LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1 IMUNITNÍ SYSTÉM

### 1.1.1 Funkce imunitního systému

Imunitní systém je jedním ze základních homeostatických mechanismů organismu, jehož funkcí je zachování integrity organismu prostřednictvím rozpoznání škodlivin vnitřního i vnějšího původu a ochrany organismu proti těmto škodlivinám. Mezi projevy této funkce patří

1) obranyschopnost

(imunitní systém rozpoznává škodliviny vnějšího původu a zprostředkovává ochranu organismu proti patogenním mikroorganismům a toxickým produktům jejich metabolismu)

2) autotolerance

(imunitní systém zajišťuje toleranci vůči vlastním tkáním organismu)

3) imunitní dohled

(imunitní systém rozpoznává škodliviny vnitřního původu, např. staré, poškozené či mutované buňky, a průběžně zajišťuje jejich odstraňování)<sup>1</sup>

### 1.1.2 Základní druhy imunitních mechanismů

Rozlišujeme dva základní druhy imunitních mechanismů, a to mechanismy nespecifické (neadaptivní) a antigenně specifické (adaptivní).

Evolučně starší nespecifické mechanismy jsou založeny na molekulách a buňkách reagujících na strukturní či funkční rysy, které jsou společné mnoha různým patogenům. Nespecifická imunita je tvořena buněčnými a humorálními složkami. Buněčné nespecifické systémy jsou představovány fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami, zatímco humorální složky nespecifické imunity tvoří komplementový systém, lektiny, interferony a další sérové proteiny. Charakteristickým rysem nespecifických imunitních mechanismů je rychlá reakce na přítomnost škodliviny a neexistence imunologické paměti

(tzn. že nespecifické složky imunity nejsou ovlivněny předchozím setkáním se škodlivinou).<sup>1</sup>

Evolučně mladší specifické mechanismy reagují na cizorodé struktury prostřednictvím vysoce specifických molekul, jako jsou protilátky či antigenně specifické receptory T lymfocytů, a aktivují se teprve po setkání s příslušným antigenem. K plnému rozvoji imunitní reakce dochází až po několika dnech až týdnech a charakteristickým rysem těchto reakcí je imunologická paměť. Mezi adaptivní mechanismy patří humorální mechanismy založené na protilátkách a buněčně zprostředkované mechanismy, které jsou založeny především na T lymfocytech.<sup>1</sup>

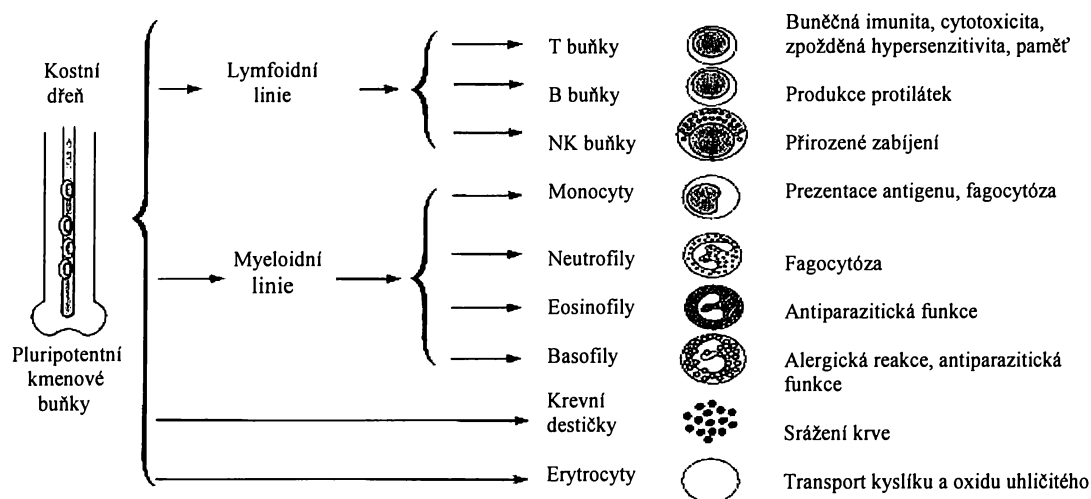
### **1.1.3 Buňky imunitního systému (imunocyty)**

Nejdůležitější část imunitního systému tvoří různé druhy leukocytů, pocházející z pluripotentních kmenových buněk kostní dřeně. Část těchto buněk se pod vlivem nejrůznějších faktorů diferencuje na různé typy leukocytů, přičemž vznikají dvě základní linie, myeloidní a lymfoidní<sup>1</sup> (obr. 1 na str. 10).

Z myeloidní linie vznikají monocyty, granulocyty (neutrofil, eosinofil, basofil) a dendritické buňky; všechny tyto buňky jsou základem nespecifické části imunitního systému, obvykle jsou schopny fagocytózy a produkují cytokiny a další rozpustné mediátory, navíc působí jako APC buňky (buňky prezentující antigen) pro T lymfocyty.<sup>1</sup>

Z lymfoidní linie vznikají NK buňky a dále lymfocyty B (jejichž konečným diferenciačním stadiem jsou plazmocyty produkující protilátky) a lymfocyty T (které se dělí na pomocné T buňky T<sub>H</sub> a cytotoxické T buňky T<sub>C</sub>). Část B a T lymfocytů se v důsledku setkání s antigenem diferencuje v paměťové buňky zodpovídající za imunologickou paměť.<sup>1</sup>

Kromě výše uvedených buněk pocházejících z hematopoetických kmenových buněk hrají v imunitním systému důležitou roli folikulární dendritické buňky (FDC), které stimulují B lymfocyty, a endoteliální buňky tvořící výstelku cév, které zprostředkovávají migraci leukocytů z krevního oběhu do tkání.<sup>1</sup>



**Obr. 1: Diferenciace krevních buněk z pluripotentních kmenových buněk kostní dřeně.** V pravém sloupci jsou u jednotlivých druhů buněk uvedeny jejich hlavní funkce. Obrázek byl převzat ze zdroje [2] a upraven.

## 1.2 NK BUŇKY

NK buňky (přirozené zabíječské buňky – natural killer cells) tvoří subpopulaci velkých granulárních lymfocytů, charakteristickou přítomností snadno barvitelných azurofilních granul.<sup>3</sup> Spolu s B a T buňkami se diferencují z lymfoidní linie pluripotentních kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni.<sup>1</sup> NK buňky mají schopnost rozpoznávat buňky infikované virem nebo buňky nádorové a následně indukovat jejich lyzi, a to bez předchozí senzitivizace nebo restrikce MHC.<sup>3</sup> Podstatnou skutečností je, že NK buňky brání nádorovému bujení i infekcím tímto mechanismem.<sup>4</sup>

Indukce lyze cílových buněk NK buňkami může probíhat dvěma způsoby: jednak v nepřítomnosti protilátek mechanismem označovaným jako přirozená cytotoxicita, a následně prostřednictvím buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách proti cílové struktuře (ADCC – antibody dependent cell cytotoxicity).<sup>5</sup> Důležitým rysem obou těchto cytotoxických programů je skutečnost, že jejich iniciace závisí na expresi molekul MHC třídy I cílovými buňkami.<sup>5</sup> NK buňky exprimují na svém povrchu aktivační receptory, které zprostředkovávají rozpoznání a lyzi cílových buněk a jejichž účinky mohou být potlačeny

vlivem inhibičních receptorů rozpoznávajících molekuly MHC třídy I na povrchu cílových buněk.<sup>6</sup> Citlivost buněk vůči přirozené cytotoxicitě je tedy nepřímou úměrnou expresi molekul MHC třídy I cílovými buňkami<sup>4</sup>, což vysvětluje tzv. „missing-self“ hypotéza, podle níž NK buňky prohledávají tkáň a ověřují normální expresi molekul MHC třídy I.<sup>7</sup> Nádorové buňky i některé buňky infikované viry se totiž brání napadení T<sub>C</sub> buňkami tím, že potlačují povrchovou expresi MHC glykoproteinů třídy I.<sup>1</sup> Jestliže tedy NK buňky tyto molekuly, které jsou u zdravých buněk všudypřítomné, nenajdou („missing-self“), jsou oprostěny od negativního vlivu molekul MHC třídy I a cílovou buňku zabijí.<sup>7</sup>

Hlavními cytotoxickými nástroji NK buněk jsou cytotoxické granule obsahující perforin a proteasy označované jako granzymy, které štěpí v cytoplasmě cílové buňky prekurzory proteas ze skupiny caspas. Aktivované caspasy spouštějí kaskádu reakcí vedoucí k apoptotické smrti cílové buňky. NK buňky jsou zdrojem cytokinů IFN- $\gamma$ , IL-3 a dalších.<sup>1</sup> Dalším možným cytotoxickým mechanismem je tzv. Fas-Fas ligand cesta. Na povrchu NK buněk je exprimován protein označovaný jako Fas-ligand (FasL), který se váže na apoptotický receptor Fas (CD95) přítomný na povrchu celé řady různých typů buněk. Signály přenesené přes receptor Fas do buňky aktivují kaskádu reakcí vedoucí k apoptotické smrti buňky.<sup>1</sup>

Zvláštním typem lymfocytů jsou NK-T lymfocyty, které sice exprimují T-buněčné receptory (TCR), ale kromě toho také celou řadu stimulačních i inhibičních receptorů charakteristických pro NK buňky. NK-T lymfocyty mají důležité regulační funkce a jsou významným zdrojem cytokinů.<sup>1</sup>

## **1.3 RECEPTORY NK BUNĚK**

### **1.3.1 Inhibiční a aktivační receptory**

NK buňky exprimují na svém povrchu tři typy receptorů: aktivační, inhibiční a kostimulační. Efekt inhibičních receptorů zřejmě převládá nad efektem receptorů aktivačních.<sup>4</sup>

Účinek inhibičních receptorů je zprostředkován prostřednictvím motivu ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) v jejich cytoplasmatické doméně. Po navázání ligandu je tyrosin ITIM motivu (Val/Ile-X-X-Tyr-X-X-Leu/Val) fosforylován tyrosin kinasou z SRC rodiny a následně aktivuje další fosfatasy, jako např. SHP1, SHP2 nebo SHIP. Specifické cíle těchto aktivovaných fosfatů dosud nejsou známy, nicméně se předpokládá, že inhibují funkci NK buněk přerušением raných fosforylačních drah odpovědných za aktivaci NK buněk.<sup>4</sup>

Extracelulární domény aktivačních a inhibičních receptorů vykazují značnou podobnost, ale aktivační receptory postrádají intracelulární ITIM motiv. Namísto něj však obsahují nabitě transmembránové zbytky, jejichž prostřednictvím mohou asociovat se signalizačními řetězci obsahujícími ITAM motiv (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Mezi tyto signalizační (adaptorové) molekuly se řadí např. protein DAP12. Následkem fosforylace tyrosinu ITAM motivu (Asp/Glu-X-X-Tyr-X-X-Leu/Ile-X<sub>(6-8)</sub>-Tyr-X-X-Leu/Ile) je indukce cytotoxicity a produkce cytokinů.<sup>4</sup>

### 1.3.2 MHC glykoproteiny třídy I

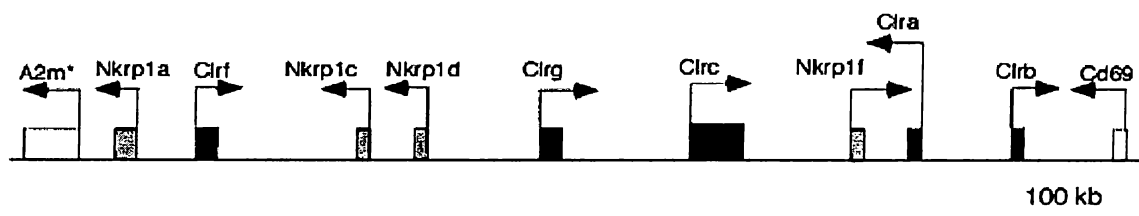
Receptory NK buněk rozpoznávají různé formy MHC glykoproteinů třídy I. Za normálních podmínek mohou být na buněčných površích exprimovány čtyři formy MHC glykoproteinů třídy I, z nichž nejběžnější je trimolekulární komplex tvořený těžkým H řetězcem, který obsahuje vazebné místo pro peptidy, dále nekovalentně asociovaným  $\beta_2$ -mikroglobulinem ( $\beta_2m$ ) a peptidem  $p_H$ , který se s vysokou afinitou váže na molekuly MHC třídy I (tedy komplex  $p_H$ -H- $\beta_2m$ ). Kromě tohoto komplexu byly nalezeny tři nestabilní formy H- $\beta_2m$ ,  $p_H$ -H a H.<sup>6</sup> Funkcí MHC glykoproteinů je vazba peptidových fragmentů proteinů produkovaných, resp. pohlcených buňkou, a jejich vystavení na buněčném povrchu tak, aby byly potenciálně rozeznatelné buňkami imunitního systému, především T lymfocyty a NK buňkami.<sup>1</sup> Lidské MHC molekuly se označují jako HLA (human leukocyte antigen), jejich myší homology se označují jako H-2. Kromě klasických MHC molekul existují tzv. „neklasické“ MHC molekuly, které se vyznačují strukturální podobností klasickým molekulám, jsou však méně polymorfní a obvykle se specializují na vazbu zvláštních ligandů.<sup>1</sup>

### 1.3.3 NKC a LRC

Inhibiční a aktivační receptory NK buněk jsou kódovány geny ve dvou genových komplexech, a to jednak NK genovém komplexu NKC, jednak v komplexu LRC (leukocyte-receptor complex/cluster).<sup>8</sup>

Receptory kódované LRC patří do imunoglobulinové superrodiny. Příkladem receptorů spadajících do této skupiny mohou být inhibiční KIR receptory, obsahující obvykle dvě ITIM sekvence. Geny kódující KIRs byly nalezeny u člověka, nikoliv však u hlodavců.<sup>8</sup> Dalšími zástupci jsou receptory ILT, SIRP, PIR, LAIR nebo gp49, či aktivační receptory NKp44 a NKp46.<sup>5</sup>

Geny NK-genového komplexu jsou lokalizovány na myším chromosomu 6, potkaním chromosomu 4 a lidském chromosomu 12p12-13.<sup>8</sup> Receptory kódované těmito geny jsou lektinové receptory typu C, transmembránové proteiny typu II (C-terminální konec vně membrány) vykazující sekvenční homologii s lektiny C-typu (název souvisí se závislostí jejich vazebné aktivity na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů), které jsou exprimovány jako dimery spojené disulfidovými můstky. V extracelulární doméně těchto receptorů se vyskytuje šest cysteinových zbytků tvořících intramolekulární disulfidové vazby, flexibilní spojení mezi transmembránovou doménou a extracelulární lektinovou doménou (CRD doménou) zajišťuje stonek.<sup>4</sup> Receptory kódované geny v rámci jednotlivých rodin se vyznačují vysokou vzájemnou podobností (běžná je více než 80% identita aminokyselinové sekvence). Příbuzné geny tvoří cluster oddělené od clusterů genů dalších rodin.<sup>9</sup> Jedinou známou výjimkou jsou geny kódující NKR-P1 a Clr (Ocil), které se nacházejí blízko sebe a jsou navzájem promíchány (angl. intertwined genes).<sup>9</sup> Jejich organizace v centromerické části NK genového komplexu je naznačena na obr. 2.



**Obr. 2: Organizace genů kódujících NKR-P1 a Clr v centromerické části NKC.** Uvedený diagram se týká myšího kmene C57BL/6 (B6). Geny jsou zobrazeny v podobě obdélníků, šipky naznačují směr transkripce. Obrázek byl převzat ze zdroje [7].

Mezi nejdůležitější NKC rodiny patří například:

- Ly49 rodina – je tvořena zatím 16 známými geny a pseudogeny (Ly49a-Ly49q) identifikovanými u myšího kmene C57BL/6.
- NKR-P1 rodina – u myšího kmene C57BL/6 byly identifikovány čtyři NKR-P1 transkripty (NKR-P1 A, C, D, F), viz dále. V lidském NK-genovém komplexu je kódována pouze jedna forma NKR-P1 (A), vykazující 45% identitu aminokyselinové sekvence s myšími NKR-P1 transkripty.
- NKG2 rodina a CD94 – pro expresi na buněčném povrchu a umožnění signalizační funkce musí molekula rodiny NKG2 nejprve vytvořit heterodimer s molekulou CD94
- KLRF1 – znám také jako NKp80, na rozdíl od dalších receptorů kódovaných geny v NK genovém komplexu obsahuje cytoplasmatické tyrosinové zbytky, které nejsou součástí typické ITIM či ITAM sekvence.<sup>4</sup>

#### 1.4 NKR-P1 A JEHO ISOFORMY

Receptor NK buněk NKR-P1 (NK cell receptor protein 1), také označovaný jako CD161 či Klrb1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily B), reprezentuje skupinu lektinových receptorů C-typu s transmembránovou orientací typu II exprimovaných v podobě disulfidicky vázaných homodimerů na povrchu většiny NK buněk a podskupiny T buněk.<sup>10</sup> Jako první byl popsán aktivační potkaní receptor NKR-P1A díky charakterizaci monoklonální protilátky mAb 3.2.3 rozpoznávající tento receptor<sup>11</sup>; dále byly popsány myší a lidské NKR-P1, přičemž se tyto receptory vyznačují vysokou mezidruhovou konzervovaností.<sup>10</sup>

Dosud bylo nalezeno pět isoform myšího receptoru NKR-P1 (mNKR-P1), a to NKR-P1 A/B/C/D/F<sup>12</sup>, které jsou kódovány geny NK-genového komplexu v distální části chromosomu 6.<sup>9</sup> Ze sekvenční analýzy těchto isoform vyplývá, že součástí cytoplasmatických domén všech z nich je tzv. CxCP motiv (Cys-X-Cys-Pro) umožňující asociaci s tyrosinkinasou p56<sup>lck</sup>. V případě aktivačních receptorů (NKR-P1A/C/F)

fosforyluje tyrosinkinasa p56<sup>lck</sup> asociovaná s cytoplasmatickou doménou receptoru NKR-P1 tyrosin ITAM motivu, který je součástí adaptorového (signalizačního) proteinu FcR $\gamma$ <sup>10</sup> asociovaného s NKR-P1 prostřednictvím nabitého argininového zbytku v jeho transmembránové doméně.<sup>9</sup> Následkem je signalizační kaskáda vedoucí k indukci cytotoxicity a produkci cytokinů.<sup>10</sup>

V případě inhibičních receptorů (NKR-P1B/D) hraje p56<sup>lck</sup> také důležitou roli, a to při iniciaci inhibičního signálu - zprostředkovává fosforylaci tyrosinu cytoplasmického ITIM motivu receptoru NKR-P1, čímž vytvoří vazebné místo pro SH2 doménu SHP-1 kinasy, což vede k defosforylaci a inhibici proximálních kinas.<sup>10</sup>

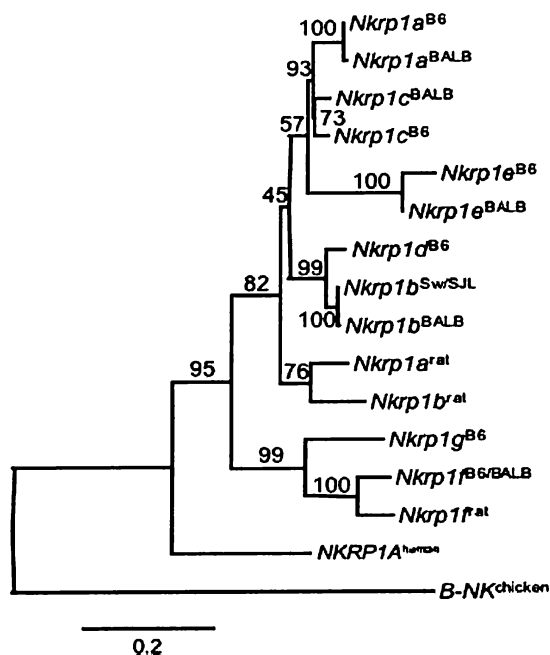
Na rozdíl od dalších receptorů kódovaných geny NK-genového komplexu, které rozpoznávají molekuly hlavního histokompatibilního komplexu třídy I (MHC třídy I), myší receptory NKR-P1B/D a NKR-P1F, které jsou předmětem této práce, rozpoznávají a váží specifické lektinům příbuzné molekuly (Clr).<sup>7</sup>

Inhibiční receptory NKR-P1B, resp. D specificky rozpoznávají Clrb, zatímco aktivační receptor NKR-P1F rozpoznává Clrg. Na rozdíl od zbývajících dosud identifikovaných ligandů NKC-kódovaných receptorů nejsou Clrb a Clrg strukturně příbuzné MHC glykoproteinům; jedná se o členy Clr rodiny, kterou tvoří lektinům příbuzné transmembránové proteiny typu II, blíže příbuzné NKR-P1 molekulám.<sup>7</sup>

Zatímco MHC glykoproteiny jsou všudypřítomné, exprese Clr je omezena na epiteliální a mesenchymatické buňky<sup>13</sup> a dále dendritické buňky a makrofágy - má tedy zvláštní význam pro neadaptivní imunitu. Interakce NKR-P1 proteinů s Clr jsou nezávislé na molekulách MHC třídy I (ať už na povrchu cílových či NK buněk); zdá se tedy, že tyto interakce reprezentují novou úroveň regulace funkce NK buněk.<sup>7</sup>

Podle článku J.R. Carlyla a kol.<sup>14</sup> (2006) se zdá, že v případě genů kódujících myší receptory NKR-P1B a NKR-P1D se jedná pouze o dvě různé alely téhož genu, přičemž gen pro NKR-P1B se vyskytuje u kmene myší BALB/c a Swiss/SJL, zatímco gen pro NKR-P1D se vyskytuje u kmene C57BL/6, z něž vycházela tato práce.





**Obr. 3: Fylogenetický strom zobrazující srovnání kódujících sekvencí cDNA kódujících NKR-P1 v různých myších kmenech a dále u potkana, člověka a kuřete. Značení kmenů myší – B6 = C57BL/6, Sw/SJL = Swiss/SJL, BALB = BALB/c. Bootstrapping (metoda randomizace znaků sloužící k vyjádření důvěryhodnosti vytvořeného fylogramu) s 1000 datovými soubory byl proveden pomocí programu PHYLIP. Délky větví fylogramu naznačují podobnost mezi jednotlivými cDNA, číselné hodnoty u jednotlivých uzlů jsou tzv. bootstrap values (procento pravděpodobnosti, že se příslušný uzlový bod vyskytne ve fylogramu v uvedené podobě). NKR-P1G<sup>B6</sup> transkript byl předpovězen pro kmen C57BL/6. Obrázek byl převzat ze zdroje [14].**

Nukleotidové sekvence genů kódujících receptory NKR-P1B, D a F spolu s přiřazenými aminokyselinovými sekvencemi příslušných proteinů jsou uvedeny v přílohové části této práce (přílohy 1, 2 a 3).

## 2.CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo:

- Na základě dostupných literárních údajů navrhnout oligonukleotidové primery vhodné pro klonování a amplifikaci isoform B, D a F receptoru NKR-P1 myších přirozených zabíječských buněk
- Amplifikovat geny pro jednotlivé receptory NKR-P1B, NKR-P1D a NKR-P1F pomocí PCR z cDNA získané přepisem RNA izolované ze slezin myší kmene C57/BL6
- Ligovat získané geny (PCR produkt) do vhodného klonovacího vektoru a následně izolovat plasmidovou DNA
- Ověřit správnost sekvencí získaných genů restrikční analýzou a sekvenací
- Sekvenci získaného insertu srovnat s bioinformatickými databázemi

### 3. MATERIÁL

#### 3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Tab. 1: Seznam použitých přístrojů a pomůcek s uvedením jejich výrobců.

Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety	Gilson, USA
Automatický termocykler	Eppendorf, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga VSMC-13	Shelton Scientific, USA
Centrifuga stolní Spectrofuge 16M	Edison, USA
Ledovač UBE 50-35	Ziegra, Německo
Luminiscenční analyzátor LAS-1000 CH	Fuji photo film, Japonsko
Mrazicí box (-20 °C)	Zannusi, Itálie
Mrazicí box (-80 °C) Bio Freezer	Forma scientific, USA
pH-metr Φ 200	Beckman, Německo
Předvážky HF-1200 G	AND, USA
Souprava pro agarosovou elektroforesu	Sigma, USA
Sušička	Jouan, Francie
Termocykler	Eppendorf, Německo
Termostat BT 120M	Lab. přístroje Praha, CR
Třepačka	VELP Scientifica, Itálie
UV lampa UVGL-58	Science Company, USA
Vortex	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí BM 551	Tesla, ČR

#### 3.2 CHEMIKÁLIE

##### 3.2.1 Primery pro PCR

mNKR-P1BD\_FW: 5´ ACATATGGATTCAACAACACTGGTCTATGCA 3´  
mNKR-P1B\_REV: 5´ TAAGCTTAGGAGTCATTACTCGGGGTTTCAT 3´  
mNKR-P1D\_REV: 5´ TAAGCTTAGGAGTCATTACACGGGGTTTCAT 3´  
mNKR-P1F\_FW: 5´ ACATATGGACACATCAAAGGTCCATGGC 3´  
mNKR-P1F\_REV: 5´ TAAGCTTAGACATGTATCAGGGTCTTTTGGC 3´

Navržené primery byly syntetizovány firmou Generi-Biotech v Hradci Králové, ČR.



### 3.2.6 Roztoky a média

- Acetátový pufr  
3 M octan sodný, pH = 5,2
- Agarosový gel 1%  
0,5 g agarosy, 50 ml TAE pufru, 2 µl ethidiumbromidu
- EcoRI pufr  
50 mM TrisCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,02% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA
- EP (lysis buffer)  
0,5 ml 1 M TrisCl (pH 8,0); 0,1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); 7,5 g sacharosy; 100 mg lysozymu; 10 mg pankreatické RNasy; 5 mg BSA; destilovaná voda do 50 ml
- LB agar  
15 g agaru na 1000 ml LB média
- LB agar s kanamycinem  
100 µl kanamycinu na 100 ml LB agaru
- LB médium  
1% bacto-tryptone; 0,5% kvasničného hydrolyzátu; 1% NaCl; ddH<sub>2</sub>O
- LB médium s kanamycinem  
70 µl kanamycinu na 100 ml LB média
- PCR pufr (Thermo Pol Buffer 10x)  
10 mM KCl; 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20 mM Tris-HCl; 2mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1% Triton-X100; pH 8,8
- SOC médium  
20 g bacto-tryptone; 5 g bacto-yeast extract; 0,5 g NaCl; 2,5 ml 1M KCl; ddH<sub>2</sub>O do 1000 ml
- Stop roztok (loading buffer)  
bromfenolová modř; 50% glycerol; ethanol; TE pufr
- TE pufr  
10 mM TrisCl (pH 7,5 ); 0,5 mM EDTA
- TAE pufr  
40 mM Tris; 20 mM CH<sub>3</sub>COOH; 1 mM EDTA

## 4. METODY

### 4.1 NÁVRH A SYNTÉZA OLIGONUKLEOTIDOVÝCH PRIMERŮ

Oligonukleotidové primery byly navrženy na základě imunologických publikací popisujících klonování a sekvenování myších NKR-P1 receptorů. Na základě nukleotidových sekvencí těchto receptorů uvedených v přílohách 1, 2 a 3 byly zvoleny následující primery sloužící pro amplifikaci jednotlivých receptorů:

- Pro mNKR-P1B

forward primer 5´ACATATGGATTCAACAACACTGGTCTATGCA 3´

reverse primer 5´ TAAGCTTAGGAGTCATTACTCGGGGTTTCAT 3´

- Pro NKR-P1D byl zvolen tentýž forward primer jako pro NKR-P1B,

reverse primer 5´ TAAGCTTAGGAGTCATTACACGGGGTTCAT 3´

- Pro NKR-P1F

forward primer 5´ ACATATGGACACATCAAAGGTCCATGGC 3´

reverse primer 5´ TAAGCTTAGACATGTATCAGGGTCTTTTGGC 3´

Všechny navržené primery byly syntetizovány firmou Generi-Biotech v Hradci Králové.

### 4.2 PŘÍPRAVA RNA Z MYŠÍCH SLEZIN

RNA byla izolována z myších slezin, které byly laskavě poskytnuty z laboratoře MUDr. Anny Fišerové, CSc. Ihned po odběru byly sleziny z myši C57BL/6 zmrazeny a RNA byla získána pomocí kitu RNA blue (TOP BIO, Praha) dle návodu poskytnutého výrobcem. Postup je založen na upravené metodě podle Chomczynského a Sacchi<sup>15</sup>. Čistota a intaktnost získané RNA byla ověřena denaturující agarosovou elektroforesou v přítomnosti 5 % formaldehydu.

### 4.3 SYNTÉZA cDNA

Syntéza cDNA byla provedena pomocí reversní transkriptasy SuperScript III (Invitrogen). Směs 1 µl 50 µM oligo(dT)<sub>12-18</sub>, 5 µl RNA (1µg/5 µl), 1 µl 10 mM směsi dNTP a 6 µl sterilní destilované vody byla ve sterilní, nukleas prosté mikrozkumavce po dobu 5 minut

zahřívána na teplotu 65 °C a následně po dobu 1 minuty inkubována na ledu. Obsah mikrozkuhavky byl krátce zcentrifugován. Poté byl přidán 1 µl 0.1 M DTT, 4 µl 5X First-Strand Buffer<sup>TM</sup> (Invitrogen), 1 µl RNaseOUT<sup>TM</sup> (inhibitor RNAs, Invitrogen) a 1 µl SuperScript<sup>TM</sup> III RT (reverzní transkriptasa, Invitrogen), reakční směs byla opatrně promíchána, po dobu 5 minut inkubována při laboratorní teplotě a poté po dobu 60 minut při teplotě 50 °C. Reakce byla ukončena zahřátím směsi na 70 °C po dobu 15 minut. cDNA byla použita jako templát pro PCR amplifikaci.

#### 4.4 PCR

PCR byla provedena v automatickém termocykleru s použitím primerů uvedených v odstavci 4.1 a Platinum Taq DNA Polymerasy (Invitrogen) s využitím technologie „Hot Start“, jejímž principem je zablokování aktivního centra polymerasy proteinovým inhibítorem, k jehož disociaci dojde až v okamžiku první denaturace v termálním cyklátoru. Tento postup snižuje úroveň nespecifického nasedání primeru. Bylo provedeno 30, resp. 35 cyklů PCR amplifikace podle standardního protokolu dodávaného výrobcem.<sup>16</sup> Složení směsi pro PCR je uvedeno v tab. 4, termální profil pro PCR amplifikaci NKR-P1B a NKR-P1D je uveden v tab. 5, termální profil pro PCR amplifikaci NKR-P1F v tab. 6.

Tab. 4: Složení směsi pro PCR

Složka	cDNA	PTP	dNTPs	MgSO <sub>4</sub>	Pufr	DMSO	ddH <sub>2</sub> O	FW	REV
V [µl]	1	0,5	1	4	5	3	31,5	2	2

PTP-Platinum Taq polymerasa , Pufr-Thermo Pol Buffer, FW-přímý primer, REV- zpětný primer

Tab. 5: Termální profil pro PCR (NKR-P1B/D)

Počet cyklů	1	35	35	35	1
Čas	2 min	30 s	30 s	1 min	10 min
Teplota	94 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C

Tab. 6: Termální profil pro PCR (NKR-P1F)

Počet cyklů	1	30	30	30	1
Čas	2 min	30 s	30 s	1 min	10 min
Teplota	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C

Pozn.: PCR amplifikace byla provedena při teplotách nasedání primerů 60 °C a 65 °C, k další práci byly použity pouze PCR produkty získané při 60 °C.

#### 4.5 DETEKCE PRODUKTŮ PCR POMOCÍ AGAROSOVÉ ELEKTROFORESY

5 µl výsledné PCR směsi bylo analyzováno elektroforesou v 1% agarosovém gelu při 110-130 V po dobu 30 minut. Jako fluorescenční indikátor DNA byl použit ethidiumbromid. Standardem byl 100 bp DNA žebřík. Detekce vzorků pomocí UV lampy při 365 nm, gel byl vyfotografován pomocí videokamery a transiluminátoru při vlnové délce 254 nm.

#### 4.6 PURIFIKACE PCR PRODUKTŮ

Do mikrozkušavky s 25 µl PCR produktu bylo přidáno 35 µl TE pufru, 30 µl fenolu a 30 µl chloroformu. Směs byla krátce zcentrifugována; po odebrání vodné fáze byl přidán 96% ethanol a 5 µl acetátového pufru, roztok byl promíchán pomocí vortexu a po 20 min v mrazáku 20 min centrifugován v předchlazené centrifuze (-10 °C, 22 000 rpm). Byl odebrán supernatant a přidáno 400 µl 70% ethanolu, obsah mikrozkušavky byl promíchán pomocí vortexu a centrifugován 4 min při -1 °C (15 000 rpm). Poté byl znovu odebrán supernatant a mikrozkušavka s peletou byla po dobu 15 min ponechána v sušičce. Po přidání 10 µl sterilní dest. vody byl získaný roztok použit k ligaci do klonovacího vektoru.

#### 4.7 LIGACE ZÍSKANÝCH GENŮ DO KLONOVACÍHO VEKTORU

K ligaci do klonovacího vektoru byla použita komerčně dodávaná sada TOPO TA Cloning® Kit firmy Invitrogen (USA), přičemž byl dodržen protokol dodaný výrobcem.<sup>17</sup> Ligační směs o složení uvedeném v tab. 7 byla po promíchání inkubována po dobu 5 min při laboratorní teplotě, uložena na led a ihned použita k transformaci kompetentních buněk.

Tab. 7: Složení ligační směsi

Složka	PCR produkt	Salt Solution	TOPO® vektor	ddH <sub>2</sub> O
Objem [µl]	1	1	1	3

#### 4.8 TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK

K transformaci bylo využito metody tepelného šoku. Ke kompetentním buňkám *E. coli* (TOP10, Invitrogen) uchovávaným po rozmrazení na ledu byly přidány 2 µl ligační směsi;



po opatrném promíchání byla směs po dobu 20 min inkubována na ledu, následně zahřáta na vodní lázni na teplotu 42 °C po dobu 30 s (heat-shock) a ihned zchlazena na ledu. K buňkám bylo přidáno 250 µl S.O.C. média vytemperovaného na teplotu laboratoře, poté byly buňky po dobu jedné hodiny inkubovány při teplotě 37 °C. 100 µl transformované bakteriální kultury bylo rozetřeno na LB-agarové misky s kanamycinem, 5 µl 1 M IPTG a 25 µl X-Gal rozpuštěného v DMSO (0,09 mg/ µl) - blue-white screening. Misky s bakteriální kulturou byly inkubovány do druhého dne při teplotě 37 °C. Pomocí sterilních párátek byly vypíchnuty bílé kolonie a přeneseny do zkumavek s 1 ml sterilního LB média s kanamycinem. Zkumavky byly do dalšího dne ponechány na třepačce při teplotě 37 °C.

#### **4.9 MINIPREPARACE PLASMIDOVÉ DNA**

Minipreparační příprava plasmidové DNA byla provedena metodou tzv. „Easyprepu“ podle publikované metody.<sup>18</sup> 0,8 ml bakteriální kultury bylo centrifugováno po dobu 30 s (6 000 rpm), byl odsát supernatant a peleta byla resuspendována v 30 µl EP pufru. Zkumavky se suspenzí byly povařeny na vodní lázni po dobu 90 s a 10 min inkubovány na ledu. Poté byl jejich obsah centrifugován při 4 °C a maximálních otáčkách (22 000 rpm) po dobu 10 min.

#### **4.10 RESTRIKČNÍ ANALÝZA**

K 9 µl plasmidové DNA bylo přidáno 0,5 µl EcoRI a 1 µl pufru pro EcoRI. Reakční směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 2 µl stop roztoku (vzorkového pufru pro agarosovou gelovou elektroforesu) a získané fragmenty DNA byly podrobeny elektroforesi na agarosovém gelu.

#### **4.11 ANALÝZA DNA FRAGMENTŮ ELEKTROFORESOU NA AGAROSOVÉM GELU**

Elektroforesa byla provedena v 1% agarosovém gelu při 120 V, byla ponechána probíhat po dobu cca 30 minut. Jako fluorescenční indikátor DNA byl použit ethidiumbromid. Standardem byl 100 bp DNA žebřík, na gel byly dále jako standard nanoseny 2 µl PCR produktu. Detekce vzorků v temnu pomocí UV lampy při 365 nm.

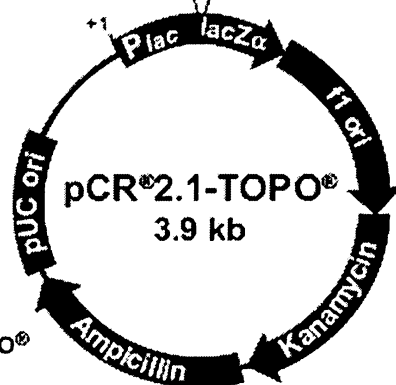
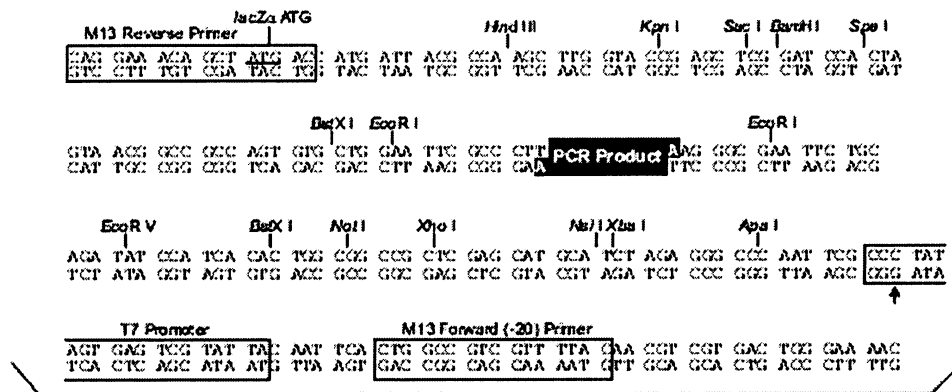
#### **4.12 UCHOVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH KULTUR NESOUČÍCH POŽADOVANÝ PLASMID; PŘÍPRAVA KULTUR PRO DNA SEKVENOVÁNÍ**

Podle restrikční analýzy byly identifikovány bakteriální kultury úspěšně transformované požadovaným plasmidem. Část každé z těchto kultur byla rozetřena na LB agarovou misku k sekvenaci, zbytek byl smíchán s glycerolem (20% obj.) a uchován v mrazáku při -20 °C.

#### **4.13 DNA SEKVENOVÁNÍ**

Po identifikaci pozitivních klonů obsahujících insert správné délky (odst. 4.10, 4.11) byly bakterie *Escherichia coli* kmene TOP10 transformované příslušným plasmidem rozetřeny na čerstvou misku obsahující médium LB s kanamycinem a miska byla inkubována přes noc při 37°C. Druhý den byla miska s narostlými koloniemi předána do DNA sekvenační laboratoře MBÚ AV ČR v.v.i. dr. Jürgenu Felsbergovi, který zajistil přípravu plasmidové DNA s použitím purifikačního kitu firmy Genomed, a dále DNA sekvenování insertů v obou směrech zahájené z míst specifických primerů obsažených v klonovacím vektoru (obr. 4 na str. 26), M13 forward a M13 reverse primeru. K sekvenování byla použita Sangerova dideoxynukleotidová metoda v provedení vhodném pro automatický DNA sekvenátor firmy Applied Biosystems ABI Prism 3100.

K vyhodnocení výsledků zaslanych ve formě úplných chromatogramů (soubory .ab1) byl využit volně dostupný program Chromas verze 1.45 (Griffith University, Southport, Queensland, Austrálie). S jeho pomocí byl vytvořen textový soubor, který byl poté přeložen do aminokyselinových sekvencí pomocí programu Translate dostupného na webové stránce [www.expasy.org](http://www.expasy.org). Získaná sekvence s nejdelším čtecím rámcem byla zadána do programu BLAST dostupného na webové stránce [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Nakonec byly k aminokyselinovým sekvencím dohledány nukleotidové sekvence a bylo provedeno srovnání experimentální sekvence s nejbližší sekvencí odečtenou z databázi.



Comments for pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>  
 3931 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

Obr. 4 Schéma klonovacího vektoru pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> včetně popisu důležitých sekvencí a sekvence polylinkeru. Na obrázku jsou vyznačena obě štěpná místa EcoRI, místa nasedání M13 forward a M13 reverse primeru a místo, kam se při ligaci vkládá PCR produkt. Plnými šipkami je vyznačen gen pro β-galaktosidasu (lacZα), počátky replikace (f1 ori a pUC ori) a geny kódující rezistenci na ampicilin a kanamycin. Obrázek je převzat z firemního manuálu firmy Invitrogen, USA – zdroj [17].



28. Teploty tání uvedené u sekvencí byly pro jednotlivé oligonukleotidové primery vypočítány pomocí programu OligoCalc dostupného na webové stránce <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html> a odpovídají specifické části primeru a celému primeru. Do sekvence primerů byla vložena štěpná místa pro restriční endonukleasy NdeI a HindIII.

Vzhledem ke shodující se části aminokyselinové sekvence receptorů NKR-P1B a NKR-P1D byl pro PCR amplifikaci genů kódujících oba tyto receptory použit tentýž přímý primer.

**NKR-P1BD\_FW:** 5' ACATATGGATTCAACAACACTGGTCTATGCA 3'

31 bazí, T = 57°C a 59°C

**NKR-P1B\_REV:** 5' TAAGCTTAGGAGTCATTACTCGGGGTTTCAT 3'

31 bazí, T = 56°C a 60°C

**NKR-P1D\_REV:** 5' TAAGCTTAGGAGTCATTACACGGGGTTTCAT 3'

31 bazí, T = 56°C a 60°C

**NKR-P1F\_FW:** 5' ACATATGGACACATCAAAGGTCCATGGC 3'

28 bazí, T = 57°C a 60°C

**NKR-P1F\_REV:** 5' TAAGCTTAGACATGTATCAGGGTCTTTTGGC 3'

31b, T = 56°C a 60°C

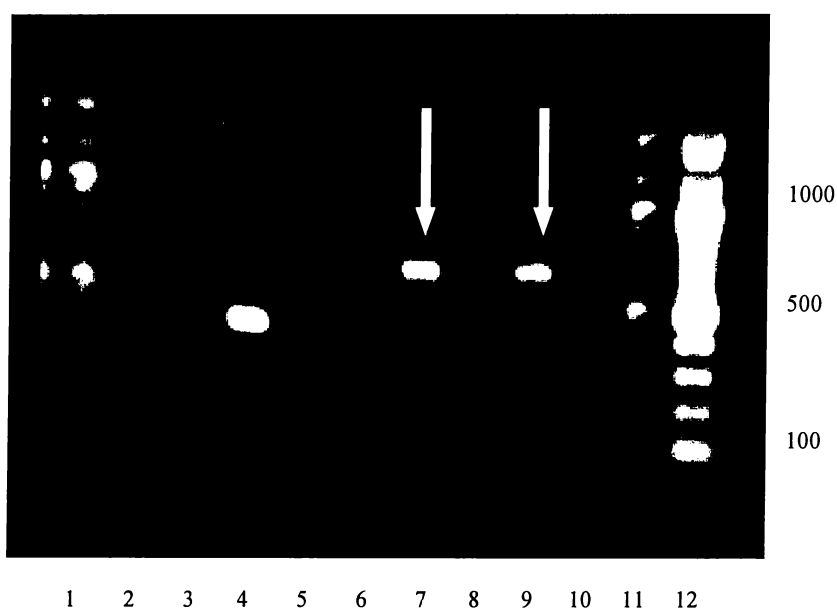
**Obr. 6: Primery pro PCR amplifikaci genů kódujících receptory NKR-P1B/D/F.**

Tučně jsou vyznačeny iniciační kodony (u přímých primerů) a stop kodony (u zpětných primerů), štěpná místa pro restriční endonukleasy jsou podtržena (u přímých primerů NdeI, u zpětných HindIII).

Ačkoliv se jednalo o provedení rutinního a dobře popsánoho protokolu, nebyly PCR amplifikace zcela bez problémů. V počátečním experimentu, kdy byla použita v laboratoři běžně používaná Deep Vent DNA polymerasa, docházelo pouze k amplifikaci velmi malých množství DNA fragmentů odpovídajících spíše nespecifickým produktům. Obavy, zda problémy nejsou způsobeny špatnou kvalitou nebo malým množstvím použité RNA, se naštěstí nepotvrdily, a po použití Platinum Taq DNA polymerasy a techniky „Hot startu“ začaly být na gelu pozorovány silnější zóny amplifikovaných DNA fragmentů.

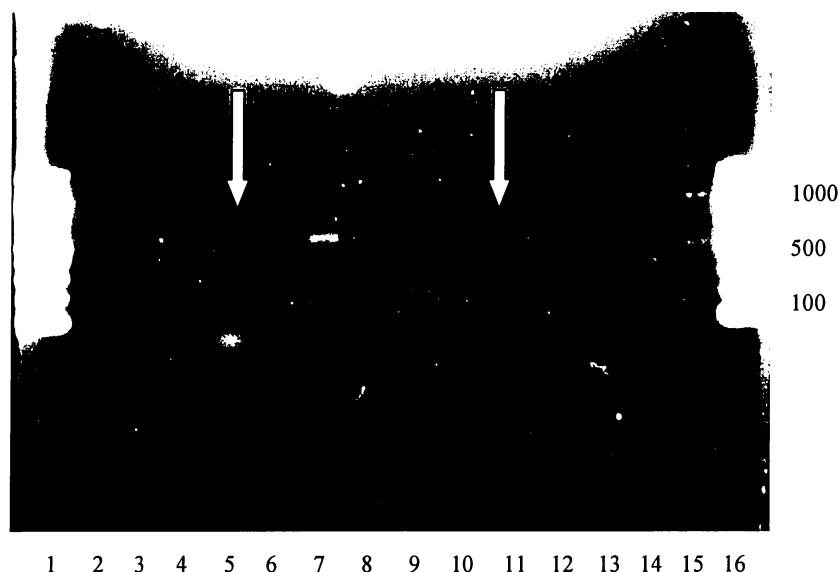
PCR byla provedena nejprve při teplotách nasedání primerů 60 °C a 65 °C. Při těchto teplotách však byla úspěšná pouze amplifikace genu kódujícího NKR-P1F. Proto bylo nutno optimalizovat podmínky PCR pro amplifikaci genů kódujících zbývající dva receptory a teplota nasedání primerů byla snížena na 56 °C.

Výsledný produkt PCR byl detekován pomocí agarosové elektroforesy (viz obr. 7 na str. 29, obr. 8 na str. 30). Velikost vzniklých PCR produktů byla určena na základě srovnání se standardem (100 bp DNA žebřík). Produkty se nacházely mezi fragmenty standardu o velikosti 600 a 700 bp, což odpovídalo očekávané velikosti produktů (681 bp v případě NKR-P1B/D, 663 bp v případě NKR-P1F).



**Obr. 7: Výsledek PCR reakce - fotografie agarosového gelu.**

Teplota nasedání primerů 56 °C. Dráhy 1, 11, 12 - standard (100 bp DNA žebřík, čísla vedle žebříku značí počet párů bazí DNA fragmentů), dráhy 7, 9 - očekávané PCR produkty (dráha 7 NKR-P1D, dráha 9 NKR-P1B), z fotografie je dobře patrná nespecifita. Dráhy 8, 10 – neúspěšná PCR amplifikace se starší cDNA. Ve zbývajících drahách nesouvisející vzorky. Elektroforesa byla provedena v 1% agarosovém gelu.



**Obr. 8: Výsledek PCR reakce - fotografie agarosového gelu.**

Dráhy 1, 15, 16 - standard (100 bp DNA žebřík, čísla vedle žebříku značí počet párů bází DNA fragmentů), dráha 5 - NKR-P1F při teplotě nasedání primerů 60 °C, dráha 11 - NKR-P1F při teplotě nasedání primerů 65 °C. Ve zbývajících drahách nesouvisející vzorky. Elektroforesa byla provedena v 1% agarosovém gelu.

## 5.2 PURIFIKACE PCR PRODUKTŮ

Vzhledem k tomu, že první pokus o ligaci genů kódujících NKR-P1D a NKR-P1F byl neúspěšný, bylo nutno odpovídající PCR produkty před dalším pokusem purifikovat postupem popsáním v odstavci 4.6.

## 5.3 LIGACE GENŮ DO KLONOVACÍHO VEKTORU, TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK, IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA

Geny získané PCR amplifikací byly zaligovány do klonovacího vektoru (TOPO vektor) pomocí komerčně dostupné sady TOPO TA Cloning® Kit firmy Invitrogen<sup>17</sup>, která využívá série tzv. TA vektorů obsahujících koncový nespárovaný thymidylový zbytek, který se páruje s adenylovým zbytkem na konci PCR fragmentu vzniklým nespécifickou adicí prováděnou většinou běžných termostabilních DNA polymeras. Pro výrazné urychlení ligačního procesu je navíc u TOPO kitů na konci vektoru umístěna

topoisomerasa I pocházející z viru *Vaccinia*, která jako DNA vazebný protein napomáhá zachycení a účinné ligaci PCR produktu, což umožňuje provádět ligaci pouze krátkou dobu a s použitím nízké koncentrace amplifikovaných PCR fragmentů. Klonovací kit teoreticky vyžaduje přítomnost čistého DNA fragmentu; tato podmínka byla splněna v případě mNKR-P1F, nikoli však v případě mNKR-P1B/D, kdy směs po RT-PCR amplifikaci obsahovala několik fragmentů (obr. 7 na str. 29). Nakonec však bylo rozhodnuto ligovat celou tuto směs do cílového vektoru vzhledem k tomu, že požadovaný fragment se ve směsi vyskytoval jako majoritní. Takto připraveným vektorem byly metodou tepelného šoku transformovány kompetentní buňky *E.coli*. K selekci buněk, do nichž byl úspěšně vnesen plasmid (a tedy k oddělení neproduktivních transformantů vzniklých např. uzavřením vektoru „do sebe“), byl využit tzv. blue-white screening - selekce modrých a bílých kolonií na médiu s chromogenním substrátem, která je založená na přerušení genu pro enzym  $\beta$ -galaktosidasu vložením insertu. Bakteriální kolonie obsahující insert tedy již nejsou schopné produkovat enzymaticky aktivní galaktosidasu a jeví se na Petriho misce s agarem jako bílé, kolonie obsahující plasmid bez insertu jsou naopak modré.

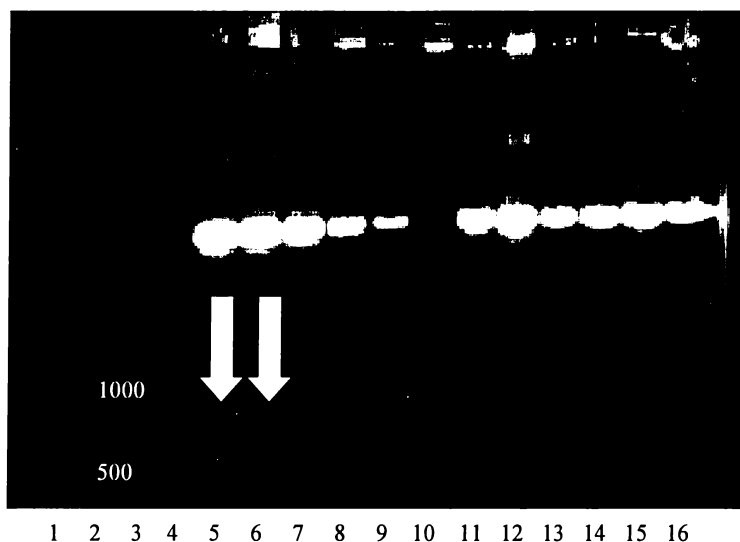
V dalším kroku pak byla u několika bílých (potenciálně pozitivních) kolonií ověřována přítomnost a velikost insertu restrikční analýzou. Kolonie byly asepticky zaočkovány do LB média s kanamycinem (značení vzorků NKR-P1B 1.1 - 1.4, NKR-P1D 2.1 - 2.11, NKR-P1F 3.1 - 3.10) a po nárůstu bakteriálních kultur do optimální density byly tyto kultury použity k mikropreparaci plasmidové DNA využitím EP pufru. Izolovaná plasmidová DNA byla dále podrobena restrikčnímu štěpení za účelem identifikace vektorů nesoucích insert.

#### **5.4 RESTRIKČNÍ ANALÝZA, ANALÝZA VZNIKLÝCH DNA FRAGMENTŮ AGAROSOVOU ELEKTROFORESOU**

Vzorky plasmidové DNA izolované z jednotlivých klonů transformovaných buněk byly štěpeny pomocí restrikčního enzymu EcoRI. Vzniklé DNA fragmenty byly poté analyzovány agarosovou elektroforesou. Vektory nesoucí správně vložený insert byly identifikovány srovnáním velikosti DNA fragmentu se standardem, jímž byl vzorek odpovídajícího PCR produktu – jednalo se o plasmidy pocházející z kolonií označených

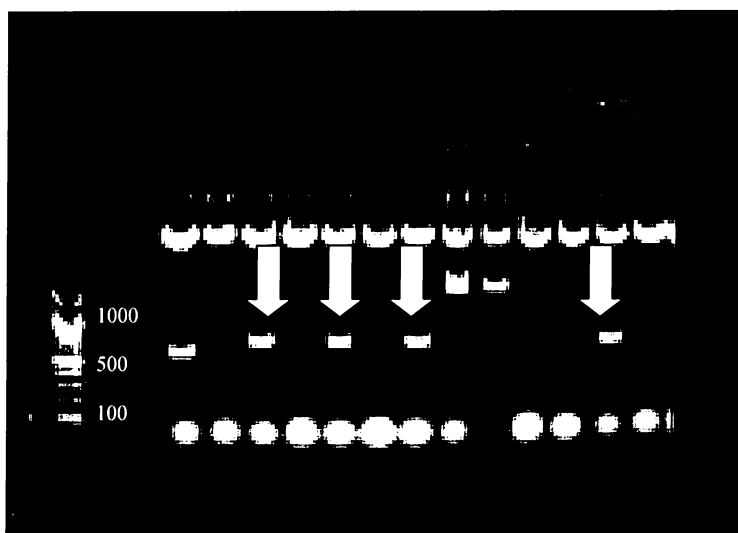


1.1, 1.2, 2.7, 2.9, 2.11 a 3.9 (viz obr. 9 na str. 32 a obr. 10 na str. 33). V případě plasmidu izolovaného z kolonie 2.5 došlo k vložení fragmentu DNA kratšího než byla předpokládaná velikost insertu (nespecifický produkt PCR reakce, viz obr. 10 na str. 33), proto byla tato plasmidová DNA z další práce vyloučena.



**Obr. 9: Výsledek restrikční analýzy - fotografie agarosového gelu.**

Dráha 1 - 100 bp DNA žebřík (vyznačeny počty bp fragmentů); dráhy 2, 3, 4 - standard (PCR produkty NKR-P1B, D, F); dráhy 5-8 NKR-P1B (klony 1.1 - 1.4); dráhy 9-12 NKR-P1D (2.1 - 2.4); dráhy 13-16 NKR-P1F (3.1 - 3.4). Správně vložený insert - dráha 5 (1.1) a 6 (1.2) - NKR-P1B.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

**Obr. 10: Výsledek restrikční analýzy - fotografie agarosového gelu.**

Dráha 1 - 100 bp DNA žebřík (vyznačeny počty bp některých fragmentů); dráhy 2, 3 - standard (PCR produkty v pořadí NKR-P1D, F); dráhy 4-10 NKR-P1D (klony 2.5-2.11); dráhy 11-16 NKR-P1F (klony 3.5-3.10). Správně vložený insert - 2.7, 2.9, 2.11 (dráhy 6, 8, 10 - NKR-P1F), 3.9 (dráha 15 - NKR-P1F). V dráze 4 je patrný fragment kratší než byla předpokládaná velikost insertu.

## 5.5 DNA SEKVENOVÁNÍ

Pro sekvenaci byly vybrány kolonie označené 1.1, 1.2, 2.7, 2.9 a 3.9.

Konečným důkazem kvality získaného DNA fragmentu je teprve DNA sekvenování, které bylo provedeno jako placená služba v Laboratoři DNA sekvenování MBÚ AV ČR v.v.i. dr. Jürgenem Felsbergem. Plasmid ve formě bakteriální kultury byl v této laboratoři purifikován pomocí komerčně dostupného kitu a poté sekvenován s použitím dideoxynukleotidové metody prováděné na automatickém DNA analyzátoru ABI Prism 3100 firmy Applied Biosystems. S použitím této technologie lze sekvenovat úseky DNA o délce až 1000 bp, což se jevílo pro mnou použité inserty o délce 700 bp jako dostačující. Sekvenování bylo prováděno na obou vláčkách s použitím M13 forward a M13 reverse primeru; obě sekvence sloužily jako duplicitní zdroj pro vytvoření finální sekvence insertu.

Pro posouzení kvality získané DNA sekvence byly nejprve dodané soubory vytištěny ve formě původních chromatogramů. V případě klonů 2.9 a 3.9 byla získána velmi kvalitní sekvence v celém rozsahu sekvenovaného DNA insertu. Sekvence začíná být velmi dobře čitelná asi 30 párů bází za místem nasednutí primeru. Její prvá část odpovídá tedy polylinkeru použitého vektoru pCR2.1-TOPO.

V místě 44. (2.9), resp. 67. (3.9) nukleotidu se nachází jedno z obou restričních míst EcoRI (GAATTC) ohraničující místo vkládání insertu, v místě 55., resp. 78. nukleotidu pak nepárové T použité pro ligaci DNA insertu. Následuje sekvence celého insertu, který je přesně 681, resp. 663 nukleotidů, nepočítáme-li koncové nespecifické A použité pro ligaci. V místě 737, resp. 730. nukleotidu je nepárové A vektoru použité pro ligaci, v místě 743., resp. 736. nukleotidu se pak nachází druhé místo EcoRI použité pro restriční analýzu. (viz obr. 11 a 12 na str. 35).

Byly získány geny kódující receptory NKR-P1D a NKR-P1F. Gen pro NKR-P1B se získat nepodařilo, což potvrzuje, že se tento gen u myšího kmene C57BL/6 (na rozdíl např. od kmene BALB/c) nevyskytuje a že geny kódující NKR-P1B a NKR-P1D představují dvě různé alely téhož genu.<sup>14</sup> Použitím primerů pro NKR-P1B byly získány pouze geny kódující NKR-P1D, ovšem s řadou zásadních mutací způsobených zřejmě nasednutím zpětného primeru pro NKR-P1B. Pro další práci jsou vhodné následující klony:

- NKR-PD: klon označený 2.9, dosahující 100% identity aminokyselinové sekvence
- NKR-P1F: klon označený 3.9, s mutací v lektinové doméně (T476C ... GTA (Val) → GCA (Ala)), kterou bude před další prací případně potřeba opravit, a další mutací C156T ... CTC (Leu) → CTT (Leu), která nemění kódovanou aminokyselinu

Pozn.: Číslování nukleotidů se zde týká sekvence vlastního insertu (amplifikovaného genu), na rozdíl od předchozí strany, kdy byly číslovány nukleotidy celé sekvence DNA fragmentu vzniklého štěpením plasmidu.

Na obr. 11 a obr. 12 na str. 35 se nachází finální zhodnocení kvality klonovaných a amplifikovaných DNA sekvencí. Z obrázků jsou patrné výše uvedené informace - v plasmidu H2.9 se podařilo získat dokonale identickou kopii publikované sekvence myšího receptoru NKR-P1D, zatímco v případě plasmidu H3.9 došlo v průběhu amplifikace ke dvěma mutacím.

NNNNNNNNNNNCTNGGNNNNNAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTACATATGGATT  
 CAACAACACTGGTCTATGCAGATTTAAACCTAGCCAGGATCCAAGAACCTAAGCATGATTCACCTC  
 CATCTCTTTCCCAGACACCTGTCGGTGCCCTCGCTGGCATCGGTTGGCTCTGAAATTTGGCTGTG  
 CTGGCCTCATCCTTCTTGTGCTGGTCGTGATTGGACTCTGTGTCTTGGTGTATCAGTACAAAAT  
 CATCAGTACAAAATCTGCGCGGATGTTCAAGAGAACAGAACACATACAACAGGTTGTTTCAGCTA  
 AGCTAGAGTGGCCACAAGACTGGCTTTACACCCGAGATAAGTGCTTTCACGTTTCTCAAGTTTCCA  
 ACACTTGGAAGGAATGTCGAATTGATTGTGATAAAAAAGGAGCCACTTTGCTGCTCATTCAAGACC  
 AAGAAGAACTGAGATTCCTACTGGACTCAATAAAGGAAAAATACAATTCATTTTGGATTGGACTAA  
 GTTACACATTAACAGACATGAACTGGAAGTGGATAAATGGCACAGCTTTCATTTCTGATGTACTAA  
 AAATCACTGGTGTCACTGAAAATGGCAGCTGTGCCGCCATCTCAGGAGAAAAAGTGAATCTGAGG  
 GCTGTTCTTCAGACAACCGTTGGATCTGCCAAAAGGAACTAAACCATGAAACCCCGTGAATGACT  
 CCTAAGCTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAG  
 AGGGCCCAATTTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA  
 CTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCG  
 TAATAGCGAANANGCCNCANCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCNGAATGGNGAANGGNN  
 NCGCCCNAGCGNCNCNTNNANCNNNNNGGNGTNGNGGNNACNCGNNNNNNNNNNNCNACNNTNN  
 NNNCNCNNNNNNCCNNNTTNNNTNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

**Obr. 11: Vyhodnocení kvality sekvence získaného DNA fragmentu - NKR-P1D.**  
 (Sekvence plasmidu H2.9). Restrikční místa EcoRI v plasmidu jsou vyznačena žlutě, T/A  
 nukleotidy v místě ligace insertu modře. Zeleně označené nukleotidy značí sekvenci insertu  
 shodující se s publikovanou sekvencí genu pro NKR-P1D, která byla použita jako výchozí  
 při návrhu primerů (viz příloha 2). Restrikční místa pro NdeI a Hind III jsou podtržena.

NNNNNNNNNNCGNNTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCA  
 GAATTCGCCCTACATATGGACACATCAAAGGTCCATGGCAATGTAAGCCATTTAGGTGTCCAGG  
 GTATAAGCAAGCATCTTCTCCATCTTTCTCCCAGATGCTTGTGCGTGCCACACTGGCATCATTT  
 GGCTCTGAAATCTGGCTGTGCTGGGCTGATCCTTCTTCTTTGAGCCTGATTGGACTCAGTGTCTT  
 AGTGAGATTCCTAGTGCAAAAACCACCAATAGAAAAATGCAGTGTGGCTGCTCAAGAGAACAGGAC  
 TGAACAAACAGGAAGATCAGCCATACTAGAGTGCCGAGATATTGGCATCCACACTGGAACAAATG  
 TTTATTTGTTTCTCAAATTTCCAGACCTTGGGCAGAAGGTCGAGATGCCTGCTCTATGGAAGACGC  
 CATTTTGTGCTCATTGAAAATAAAGAAGAAGTGAATTTGTGCAGAACTTGATAAAGGGAAAAGA  
 ACAGTTATTTTTTATTGGACTAAAATATGACAGAAGGAGAAGATCTGGAAGTGGATAGATGGCTC  
 TATTTTAAATCCTAACCTATTACGAATCACTGGCAAGGACAAAGAAAACAGCTGTGCCATCATCTC  
 ACACACGGAAGTGTTCAGATTCTTGTCTTCAGACAACCACTGGATCTGCCAAAAGACCCTGAT  
 ACATGTCTAAGCTTAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGG  
 TACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAATTC  
 CACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCA  
 CATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCNGGAAANNTGTCGTGNCAGCTGCATTAAT  
 GAATCGGCCNACGCGCGGGGNNANGNNTNGCGTANNGGGCNCTCTTNCNNTTNCNNNNNNNNNG  
 ANNCNCCNCCNNNGGNNNNNNNGNNNNNNNGNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

**Obr. 12: Vyhodnocení kvality sekvence získaného DNA fragmentu - NKR-P1F.**  
 (Sekvence plasmidu H3.9). Restrikční místa EcoRI v plasmidu jsou vyznačena žlutě, T/A  
 nukleotidy v místě ligace insertu modře. Zeleně označené nukleotidy značí sekvenci insertu  
 shodující se s publikovanou sekvencí genu pro NKR-P1F, která byla použita jako výchozí  
 při návrhu primerů (viz příloha 3), mutace jsou označeny červeně. Restrikční místa pro  
 NdeI a Hind III jsou podtržena.

## 6. DISKUSE

Tato práce se zabývá popisem klonování a amplifikace genů kódujících myší lektinové receptory NKR-P1B, NKR-P1D a NKR-P1F. Cíle práce bylo dosaženo pouze částečně – podařilo se amplifikovat geny pro isoformy D a F, nikoliv však pro isoformu B, což se zdá být potvrzením poznatku, že gen kódující tuto isoformu se u myšího kmene C57BL/6, z něž se v této práci vycházelo, nevyskytuje.<sup>14</sup>

Prvním krokem práce bylo navržení vhodných oligonukleotidových primerů pro PCR amplifikaci. Návrh primerů pro amplifikaci genu kódujícího NKR-P1F proběhl bez problémů, při návrhu primerů pro amplifikaci genů kódujících NKR-P1B a D bylo nutno počítat se skutečností, že sekvence obou receptorů jsou si navzájem velmi podobné (což odpovídá domněnce, že se jedná o dvě alely téhož genu) a v části rozhodující pro návrh přímého primeru dokonce shodné; proto byl pro amplifikaci obou genů použit tentýž přímý primer. Do obou přímých primerů bylo vloženo štěpné místo pro restriční endonukleasu NdeI a do všech tří zpětných primerů štěpné místo pro HindIII. Na základě teoretických teplot tání (viz obr. 6 na str. 28) byla pro PCR amplifikaci zvolena teplota nasedání primerů 53,5 °C a 56 °C. Při prvním pokusu o amplifikaci byla použita v laboratoři běžně používaná Deep Vent polymerasa. V této fázi se bohužel nepodařilo získat žádné produkty - došlo ke vzniku velkého množství nespecifických produktů a výtěžek požadovaných specifických produktů byl prakticky nulový. Neúspěch byl zřejmě zapříčiněn buďto příliš nízkou teplotou zvolenou pro PCR amplifikaci, nebo použitím Deep Vent polymerasy. Tato polymerasa je oproti jiným sice relativně přesná, ale často neposkytuje dostatečný výtěžek požadovaného produktu. Při dalším opakování pokusu byla proto zvolena Platinum Taq Polymerasa, teplota nasedání primerů byla zvýšena na 60 °C a 65 °C a byla použita technologie „Hot Start“ umožňující snížení úrovně nespecifického nasedání primerů. V případě genu pro NKR-P1F bylo při obou použitých teplotách získáno dostatečné množství produktu; v případě genů pro NKR-P1B a D však bylo nutno ještě jednou optimalizovat podmínky PCR a teplotu snížit na 56 °C při použití Platinum Taq polymerasy; poté byly i v těchto případech získány požadované produkty.

Při klonování získaných PCR produktů do plasmidového vektoru pomocí komerční sady TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit firmy Invitrogen se nejprve vyskytly problémy s procházejícím datem expirace této sady. Při použití nové sady byly již získány bakterie s insertem obsahujícím gen pro NKR-P1B; zbývající dva PCR produkty bylo nutno před dalším opakovaním klonování a transformace purifikovat. Poté byly i zde získány bakterie s požadovaným insertem.

K identifikaci bakteriálních kolonií obsahujících vektor se správně vloženým PCR produktem byla použita dvojstupňová procedura - v prvním kroku byl jako orientační metoda použit tzv. blue-white screening (selekce modrých a bílých kolonií na médiu s chromogenním substrátem založená na přerušení genu pro enzym  $\beta$ -galaktosidasu vložením insertu), ve druhém kroku byla pak u několika vybraných kolonií provedena kontrola přítomnosti a velikosti insertu restriční analýzou. Tento krok byl nutný proto, že při selekci v předchozím kroku mohly být vybrány kolonie, u nichž dosud nedošlo k úplné expresi enzymové výbavy, nebo kolonie, do nichž byl vložen nespecifický insert.

Na základě DNA sekvenování bylo zjištěno, že sekvence genu amplifikovaného s použitím primerů pro NKR-P1B odpovídá sekvenci genu kódujícího NKR-P1D. Došlo zde ovšem ke vzniku řady zásadních mutací způsobených zřejmě nasednutím zpětného primeru pro NKR-P1B, který nebyl dostatečně specifický.

Dále se podařilo získat dokonale identickou kopii sekvence myšího receptoru NKR-P1D publikované v bioinformatických databázích, a také pro další práci vhodnou molekulu NKR-P1F, v níž však v průběhu amplifikace došlo ke dvěma mutacím, z nichž první nemění kódovanou aminokyselinu a druhá by v aminokyselinovém řetězci způsobila mutaci v lektinové doméně – záměnu původního valinu za alanin. Příčinou těchto mutací byla nepříliš velká míra přesnosti replikace, již se vyznačuje Platinum Taq polymerasa.

Dalším krokem experimentů bude tedy především oprava vzniklých mutací, po níž bude možno přistoupit k expresi proteinů kódovaných amplifikovanými geny. Získané proteiny pak bude možno využít ke strukturním a následně i funkčním studiím, zejména ke studiu interakce receptorů NKR-P1D a NKR-P1F s jejich ligandy, molekulami Clrb a Clrg.

## 7. ZÁVĚR

- Byly získány geny kódující myší lektinové receptory NKR-P1D a NKR-P1F; gen pro NKR-P1D vykazuje 100% shodu s údaji v bioinformatických databázích, gen pro NKR-P1F obsahuje dvě mutace, z nichž první nemění kódovanou aminokyselinu a druhá způsobuje mutaci v lektinové doméně - tuto mutaci bude před dalším pokračováním experimentální práce nutno opravit.
- Gen kódující NKR-P1B se získat nepodařilo; toto zjištění potvrzuje domněnku, že se tento gen u kmene C57BL/6 nevyskytuje a odpovídá mu zde gen pro NKR-P1D.
- Po opravení mutací bude další postup spočívat v expresi proteinů a jejich následných strukturních a funkčních studiích, zejména výzkumu interakcí s molekulami Clr.

## 8. PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY

- [1] Hořejší, V., Bartůňková, J.; *Základy imunologie* (2. vydání), Triton, Praha (2001)
- [2] Goldman, A.S., Prabhakar, B.S.: *Immunology Overview - Medical Microbiology* (4. vydání), The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (1996)
- [3] Giorda, R., Rudert, W.A., Vavassori, C., Chambers, W.H., Hiserodt, J.C., Trucco, M.; *Science*, 249, 1298-1300 (1990). NKR-P1, a Signal Transduction Molecule on Natural Killer Cells.
- [4] Yokoyama, W.M., Plougastel, B.F.M; *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 304-316 (2003). Immune Functions Encoded by the Natural Killer Gene Complex.
- [5] Bléry, M., Olcese, L., Vivier, E.; *Hum. Immunol.*, 61, 51-64 (2000). Early Signaling Via Inhibitory and Activating NK Receptors.
- [6] Su, R.Ch., Kung, S.K.P., Gariépy, J., Barber, B.H., Miller, R.G.; *J. Immunol.*, 161, 755-766 (1998). NK Cells Can Recognize Different Forms of Class I MHC.
- [7] Iizuka, K., Naidenko, O.V., Plougastel, B.F.M., Fremont, D.H., Yokoyama, W.M.; *Nat. Immunol.*, 4, 801-807 (2003). Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR-P1 family of natural killer cell receptors.
- [8] Barten, R., Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J., Wilson, M.J.; *Trends Immunol.*, 22, 52-57 (2001). Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors.
- [9] Plougastel, B., Matsumoto, K., Dubbelde, Ch., Yokoyama, W.M.; *Immunogenetics*, 53, 592-598 (2001). Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse Nkrp1 cluster of genes: cloning of three new Nkrp1 members, Nkrp1d, Nkrp1e and Nkrp1f.



- [10] Ljutic, B., Carlyle, J.R., Filipp, D., Nakagawa, R., Julius, M., Zúniga-Pflücker, J.C.; *J. Immunol.*, 174, 4789-4796 (2005). Functional Requirements for Signaling through the Stimulatory and Inhibitory Mouse NKR-P1 (CD161) NK Cell Receptors.
- [11] Li, J., Rabinovich, B.A., Hurren, R., Shannon, J., Miller, R.G.; *Int. Immunol.*, 15, 411-416 (2002). Expression cloning and function of the rat NK activating and inhibitory receptors NKR-P1A and NKR-P1B.
- [12] Carlyle, J.R., Jamieson, A.M., Gasser, S., Clingan, C.S., Arase, H., Raulet, D.H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3527-3532 (2004). Missing self-recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors.
- [13] Gange, Ch.T., Quinn, J.M.W., Zhou, H., Kartsogiannis, V., Gillespie, M.T., Wah Ng, K.; *J. Biol. Chem.*, 279, 29043-29049 (2004). Characterization of sugar binding by osteoclast inhibitory lectin.
- [14] Carlyle, J.R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L.H., Rousselle, E., Troke, A.D., Proteau, M.F., Makrigiannis, A.P.; *J. Immunol.*, 176, 7511-7524, 2006. Molecular and Genetic Basis for Strain-Dependent NK1.1 Alloreactivity of Mouse NK cells.
- [15] Chomczynski, P., Sacchi, N.; *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
- [16] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
- [17] TOPO TA Cloning ®: Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products; firemní manuál, verze U, Invitrogen, USA (2006)  
[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)
- [18] Berghammer, H., Auer, B.: *Biotechniques*, 14, 524-528 (1993). „Easypreps“: fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *Escherichia coli*.

## Příloha 1 – Nukleotidová sekvence mNKR-P1B

>P27812|KRBBA\_MOUSE Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1B allele

A - Mus musculus (Mouse); M77677

K nukleotidové sekvenci je přiřazena odpovídající aminokyselinová sekvence.

```
atggattcaacaacactgggtctatgcagatttaaactagccaggatccaagaacctaag
M D S T T L V Y A D L N L A R I Q E P K
catgattcacctccatctctttccccagacacctgtcggtgccctcgctggcatcggttg
H D S P P S L S P D T C R C P R W H R L
gctctgaaatthggctgtgctggcctcatccttcttgctggctcgtgattggactctgt
A L K F G C A G L I L L V L V V I G L C
gtcttgggtgctatcagtacaaaaatcatcagtacaaaaatctgcgcggatggtcaagag
V L V L S V Q K S S V Q K I C A D V Q E
aacagaacacatacaacagattggttcagttaatttagagtgccacaagactggctttca
N R T H T T D C S V N L E C P Q D W L S
caccgagataagtgctttcgtgttttcaagttccaacacttgggaggaaggtaagct
H R D K C F R V F Q V S N T W E E G Q A
gactgtggtagaaaaggagccactttgctgctcattcaagaccaagaagaactgagattc
D C G R K G A T L L L I Q D Q E E L R F
ctactggactcaataaaggaaaaatataattcattttggattggactaaggttcacattg
L L D S I K E K Y N S F W I G L R F T L
ccagacatgaactggaagtggataaatggcacaactttcaattctgatgtactaaaaatc
P D M N W K W I N G T T F N S D V L K I
actggtgacactgaaaatggcagctgtgctccatctcaggagacaaagtgacttctgag
T G D T E N G S C A S I S G D K V T S E
agctgttctacagacaaccgttggatctgccaaaaggaactaaaccatgaaaccccgagt
S C S T D N R W I C Q K E L N H E T P S
aatgactcctga
N D S -
```

Konce nukleotidových sekvencí použité k návrhu primerů pro PCR amplifikaci:

TCCATCTACAATGGATTCAACAACACTGGTCTATGCA.....  
.....ATGAAACCCCGAGTAATGACTCCTGACTGTGAATCC

## Příloha 2 – Nukleotidová sekvence mNKR-P1D

>Q99JB4|KRBBB\_MOUSE Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1B allele  
B - Mus musculus (Mouse); AF342896

K nukleotidové sekvenci je přiřazena odpovídající aminokyselinová sekvence.

```
atggattcaacaacactgggtctatgcagatttaaactagccaggatccaagaacctaag
M D S T T L V Y A D L N L A R I Q E P K
catgattcacctccatctctttccccagacacctgtcgggtgccctcgctggcatcggttg
H D S P P S L S P D T C R C P R W H R L
gctctgaaatttggctgtgctggcctcatccttcttgctggctcgtgattggactctgt
A L K F G C A G L I L L V L V V I G L C
gtcttgggtgctatcagtacaaaaatcatcagtacaaaaatctgcgcggatggttcaagag
V L V L S V Q K S S V Q K I C A D V Q E
aacagaacacatacaacaggttggttcagctaagctagagtgccacaagactggctttca
N R T H T T G C S A K L E C P Q D W L S
caccgagataagtgttttcagtttctcaagtttccaacacttgggaaggaatgtcgaatt
H R D K C F H V S Q V S N T W K E C R I
gattgtgataaaaaaggagccactttgctgctcattcaagaccaagaagaactgagattc
D C D K K G A T L L L I Q D Q E E L R F
ctactggactcaataaaggaaaaatacaattcattttggattggactaagttacacatta
L L D S I K E K Y N S F W I G L S Y T L
acagacatgaactggaagtggataaatggcacagctttcaattctgatgtactaaaaatc
T D M N W K W I N G T A F N S D V L K I
actgggtgtcactgaaaatggcagctgtgcccgcctctcaggagaaaaagtgacttctgag
T G V T E N G S C A A I S G E K V T S E
ggctgttcttcagacaaccgttggatctgccaaaaggaactaaccatgaaaccccggtg
G C S S D N R W I C Q K E L N H E T P C
aatgactcctga
N D S -
```

Konce nukleotidových sekvencí použité k návrhu primerů pro PRC amplifikaci:

```
TCCATCAACAATGGATTCAACAACACTGGTCTATGCA.....  
.....ATGAAACCCCGTGTAATGACTCCTGACTGCGAATCC
```

### Příloha 3 – Nukleotidová sekvence mNKR-P1F

>Q8VD98|KLRBF\_MOUSE Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1F  
DQ237931

K nukleotidové sekvenci je přiřazena odpovídající aminokyselinová sekvence.

```
atggacacatcaaaggtccatggcaatgtaaagccatttaggtgtccaggggtataagcaa
M D T S K V H G N V K P F R C P G Y K Q
gcatcttctccatctttctccccagatgcttgtcggtgccacactggcatcatttggct
A S S P S F S P D A C R C P H W H H L A
ctgaaatctggctgtgctgggctgatccttcttctcttgagcctgattggactcagtgtc
L K S G C A G L I L L L L S L I G L S V
ttagtgagattcctagtgcacaaaaccaccaatagaaaaatgcagtgtggctgctcaagag
L V R F L V Q K P P I E K C S V A A Q E
aacaggactgaactaacaggaagatcagccatactagagtgcccgagatattggcatcca
N R T E L T G R S A I L E C P R Y W H P
cactggaacaaatgtttatattgtttctcaaatttccagaccttgggcagaaggtcgagat
H W N K C L F V S Q I S R P W A E G R D
gcctgctctatggaagacgccattttgttctcattgaaaataaagaagaactgagattt
A C S M E D A I L L L I E N K E E L R F
gtgcagaacttgataaagggaaaagaacagttatTTTTATTGGACTAAAATATGTACAG
V Q N L I K G K E Q L F F I G L K Y V Q
aaggagaagatctggaagtggatagatggctctatttttaaatcctaacctattacgaatc
K E K I W K W I D G S I L N P N L L R I
actggcaaggacaaagaaaacagctgtgccatcatctcacacacggaagtgttttcagat
T G K D K E N S C A I I S H T E V F S D
tcttgttcttcagacaaccactggatctgcaaaaagaccctgatacatgtctga
S C S S D N H W I C Q K T L I H V -
```

Konce nukleotidových sekvencí použité k návrhu primerů pro PRC amplifikaci:

**ATGGACACATCAAAGGTCCATGGC ..... GCCAAAAGACCCTGATACATGTCTGA**

