

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie



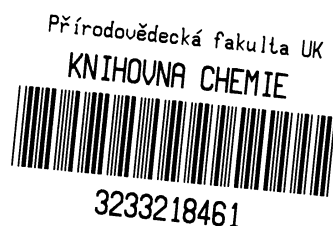
Klonování a amplifikace isoform b a g genu *Clr*, ligandu pro receptory *Nkrp1* myších NK buněk

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Ondřej Vaněk

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

Praha 2008



Petra Celadová

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

*ř.č. 98b/OS sled
(biokemie)*

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala především svému školiteli Mgr. Ondřeji Vaňkovi, za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, dále pak Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc., za možnost vypracování bakalářské práce a odborné vedení, a všem členům Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR. Děkuji také MUDr. Anně Fišerové, CSc., za poskytnutí celkové RNA izolované z myších slezin.

Poděkování patří i mým rodičům, za podporu v době mého studia.

Prohlášení

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

V Praze dne*6.6.2008*.....

Petra Celadová

PETRA CELADOVÁ

SEZNAM ZKRATEK

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátce (<i>antibody dependent cell cytotoxicity</i>)
bp	pár bází (jednotka délky řetězce DNA)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	označení povrchových molekul leukocytů (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementární DNA (<i>complementary DNA</i>)
Clr	rodina proteinů obsahujících podobný motiv jako lektiny typu C (<i>C-type lectin related</i>) = Ocil
DAP12	12kDa protein aktivující DNAX (<i>DNAX-activating protein of 12 kDa</i>)
ddH ₂ O	dvakrát destilovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	směs deoxynukleotidtrifosfátů
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Fc	část molekuly protilátky (<i>Fragment, crystallizable</i>)
FcεRIγ	vysokoafinitní receptor pro IgE (<i>Fc epsilon receptor type I gamma chain</i>)
FW	forward primer
H-2	hlavní myší histokompatibilní komplex
H-60	antigen menšího myšího histokompatibilního komplexu
HLA	hlavní lidský histokompatibilní antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
IFN-γ	interferon γ
IgG	imunoglobulin G
IL-3 (15)	interleukin 3 (15)
ILT2	imunoglobulinový transkript 2 (<i>Ig-like transcript 2</i>)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)

ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
KARAP	protein asociovaný s aktivačními receptory zabíječských buněk (<i>killer activating receptor associated protein</i>), = DAP12
kb	kilobaze (jednotka délky řetězce DNA)
KIR	imunoglobulinový receptor zabíječských buněk (<i>killer cell Ig-like receptor</i>)
KLRF1(G1)	C-lektinový receptor zabíječských buněk F1 (G1) (<i>killer cell lectin-like receptor F1 (G1)</i>)
LB	název média podle <u>L</u> uria- <u>B</u> ertaniho
LIR-1	imunoglobulinový receptor leukocytů (<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor</i>)
LRC	komplex genů pro receptory leukocytů (<i>leukocyte receptor complex</i>)
Ly-49	rodina receptorů C-lektinového typu (<i>lymphocyte antigen 49</i>)
M-CSF	faktor stimulující tvorbu osteoklastů (<i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MHC gp I	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (<i>major histocompatibility complex type I glycoproteins</i>)
MICA(B)	proteiny podobné MHC gp I (<i>MHC-class-I-like chain A(B)</i>)
mRNA	mitochondriální RNA (<i>mitochondrial RNA</i>)
NCR	skupina aktivačních receptorů z imunoglobulinové nadrodiny (<i>natural cytotoxicity receptor</i>), = NKp
NK	přirozený zabíječ (<i>natural killer</i>)
NKC	NK genový komplex (<i>NK-gene complex</i>)
NKG2	rodina C-lektinových receptorů NK buněk (<i>natural killer group 2</i>)
NKp30	receptor ze skupiny NCR (<i>natural killer cell p30-related protein</i>)
Nkrp1	rodina C-lektinových receptorů NK buněk (<i>natural killer cell receptor protein 1</i>)
NKT	NK-T-lymfocyty (<i>natural killer T cells</i>)
Ocil	lektin inhibující formaci osteoklastů (<i>Osteoclast inhibitory lectin</i>), = Clr
PCR	polymerasová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
RANKL	faktor stimulující tvorbu osteoklastů (<i>receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>)

REV	reverse primer
RPM	počet otáček za minutu (<i>rounds per minute</i>)
RT	reverzní traskriptasa
SHP1(2)	proteinová tyrosinová fosfatasa (<i>SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 (2)</i>)
SOC	bakteriální médium s vysokým obsahem živin
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA
T _C	cytotoxický T-lymfocyt (<i>T cytotoxic cell</i>)
TE	Tris pufr s EDTA
T _H	pomocný T-lymfocyt (<i>T helper cell</i>)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULBP	protein vázající UL16 (<i>UL16 binding protein</i>)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	4
1. LITERÁRNÍ ÚVOD	9
1.1. Imunitní systém	9
1.2. Imunitní mechanismy	9
1.3. Buňky imunitního systému	10
1.4. NK buňky	12
1.5. Receptory NK buněk	14
1.6. Nkrp1	16
1.7. Clr/Ocil	17
2. CÍL PRÁCE	20
3. MATERIÁL	21
3.1. Přístroje a pomůcky	21
3.2. Chemikálie	22
3.2.1. Primery pro PCR	22
3.2.2. Enzymy	22
3.2.3. Bakteriální kmeny	22
3.2.4. Vektory	22
3.2.5. Chemikálie	22
3.2.6. Roztoky a média	23
4. METODY	25
4.1. Izolace celkové RNA z myší sleziny	25
4.2. Syntéza cDNA z mRNA	25
4.3. PCR amplifikace	25
4.4. Detekce produktů PCR agarosovou elektroforézou	26

4.5.	Ligace získaných genů do expresního vektoru ze soupravy TOPO TA Cloning®	26
4.6.	Transformace kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> tepelným šokem ...	27
4.7.	Minipreparace plazmidové DNA	27
4.8.	Restrikční analýza	28
4.9.	Analýza DNA fragmentů agarosovou elektroforesou	28
4.10.	DNA sekvenování	28
5.	VÝSLEDKY	29
5.1.	Návrh a syntéza oligonukleotidových primerů	29
5.2.	Klonování a amplifikace DNA fragmentu	29
5.3.	Ligace DNA fragmentu do vektoru a kontrola restrikční analýzou.....	30
5.4.	DNA sekvenování	33
6.	DISKUZE	38
7.	ZÁVĚR	41
8.	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	42

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1. Imunitní systém

Imunitní systém je vysoce komplexní homeostatický mechanismus, který se u organismů vyvinul na obranu před škodlivinami z vnějšího i vnitřního prostředí^{1,2}. Funkce imunitního systému se projevuje jako obranyschopnost – schopnost rozpoznat a eliminovat vnější škodliviny (patogenní mikroorganismy a jejich toxické produkty), autotolerance – schopnost rozpoznat vlastní tkáň organismu a udržovat vůči nim toleranci – a imunitní dohled – schopnost rozpoznat a odstranit vnitřní škodliviny (staré, poškozené nebo zmutované buňky)¹.

1.2. Imunitní mechanismy

Součástí imunitního systému je velké množství buněk a molekul, jejichž vzájemnými interakcemi jsou zprostředkovány imunitní reakce². Ty jsou dvojího typu: nespecifické (neadaptivní, vrozené) a antigenně specifické (adaptivní)¹. Pro obranu organismu mají zásadní význam také neporušený povrch kůže a sliznic a přirozené neimunitní obranné mechanismy, jako jsou pohyb řasinek, nízké pH žaludku, teplota nebo různé chemické mediátory^{1,2}.

Evolučně starší nespecifické mechanismy jsou založeny na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem a rozpoznávají obvykle velké množství patogenů podle strukturních nebo funkčních rysů, jež jsou jim společné¹. Nespecifické imunitní mechanismy jsou zprostředkovány jednak buněčnými složkami (fagocytující buňky a přirozeně cytotoxické buňky, tzv. NK buňky, *natural killer*), jednak složkami humorálními (komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny). Složky vrozené imunity reagují na přítomnost patogenů rychle, řádově v minutách¹.

Antigenně specifické imunitní systémy jsou evolučně mladší, reakce na cizorodou strukturu je založena na její reakci s vysoce specifickými molekulami – v případě humorální složky adaptivní imunity se jedná o molekuly protilátek, u buněčně zprostředkovaných mechanismů o antigenně specifické receptory T-lymfocytů.

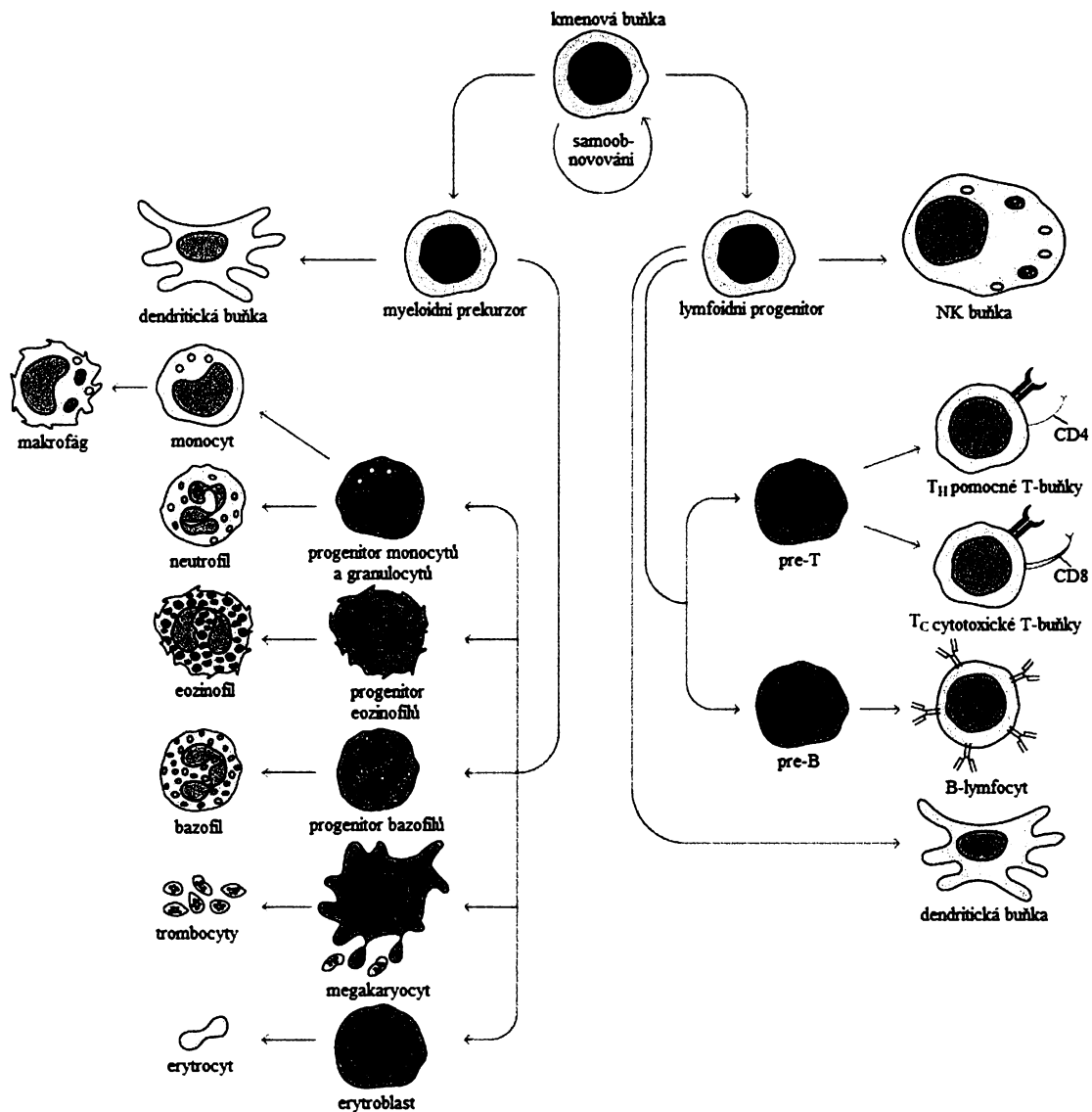
Mechanismy adaptivní imunity se aktivují až po setkání s daným antigenem. K úplnému rozvinutí specifické imunitní reakce je potřeba několik dní až týdnů. Charakteristickým rysem mechanismů adaptivní imunity je imunologická paměť, což je schopnost urychlené odpovědi při opětovném setkání s daným patogenem^{1,3}.

1.3. Buňky imunitního systému

Na imunitní odpovědi organismu se podílejí především různé druhy leukocytů (bíléch krvinek), které jsou přítomné v krvi, lymfě a lymfatických orgánech (např. mízní uzliny, slezina)^{2,3}. Všechny druhy leukocytů vznikají z pluripotentních kmenových buněk^{1,2}. Ty se nalézají po celý život v malém počtu v kostní dřeni a jejich úbytek v důsledku diferenciaci na různé typy leukocytů (způsobenou vlivem určitých růstových faktorů a cytokinů) je kompenzován dělením^{1,2}. Z kmenových buněk vznikají dvě linie buněk – lymfoidní a myeloidní^{1,2} (viz Obr. 1 na následující stránce).

Další diferenciaci buněk myeloidní linie dává vznik třem druhům granulocytů: neutrofilům, eozinofilům a bazofilům (tkáňovou formou posledně jmenovaných jsou žírné buňky – mastocyty); monocytům (cirkulují v krvi a diferencují se na makrofágy) a dendritickým buňkám. Buňky myeloidní linie tvoří základ nespecifické části imunitního systému – většina z nich má schopnost fagocytovat, produkuje cytokiny a další rozpustné signální látky¹. Kromě toho však některé (hlavně dendritické buňky, ale i monocyty a makrofágy) působí také jako antigen prezentující buňky pro T-lymfocyty, čímž se stávají spojkou mezi antigenně specifickou a vrozenou částí imunitního systému. Z myeloidní linie vznikají také červené krvinky (erytrocyty) a krevní destičky (trombocyty), jejichž hlavní funkce nespočívají v imunitních reakcích organismu (ač se na některých podílejí – zejm. při zánětu)¹.

Z lymfoidní linie vznikají diferenciací NK buňky a lymfocyty B a T^{1,2}. B-lymfocyty se nejprve vyvíjejí v kostní dřeni^{1,3}. Následně putují do sekundárních lymfoidních orgánů, kde po setkání s antigenem dojde k jejich diferenciaci do konečného stádia – plazmatických buněk (plazmocytů), které produkují protilátky¹. Vývoj většiny T-lymfocytů probíhá v brzlíku (thymus)^{1,3} až do chvíle, kdy z nich vzniknou buňky patřící do jedné ze dvou fenotypicky odlišných subpopulací: prekurzory pomocných T-buněk (T_H), nesoucí na svém buněčném povrchu receptor CD4, a prekurzory cytotoxických



Obr. 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky. Z pluripotentních kmenových buněk vznikají dvě základní linie – myeloidní a lymfoidní. Diferenciací buněk myeloidní linie vznikají tři druhy granulocytů (neutrofil, eozinofil, bazofil), monocyty, trombocyty, erytrocyty a některé dendritické buňky. Buňky lymfoidní linie se diferencují na NK buňky, všechny druhy T- a B-lymfocytů a některé dendritické buňky. Obrázek byl převzat z Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J.: Immunology² a upraven.

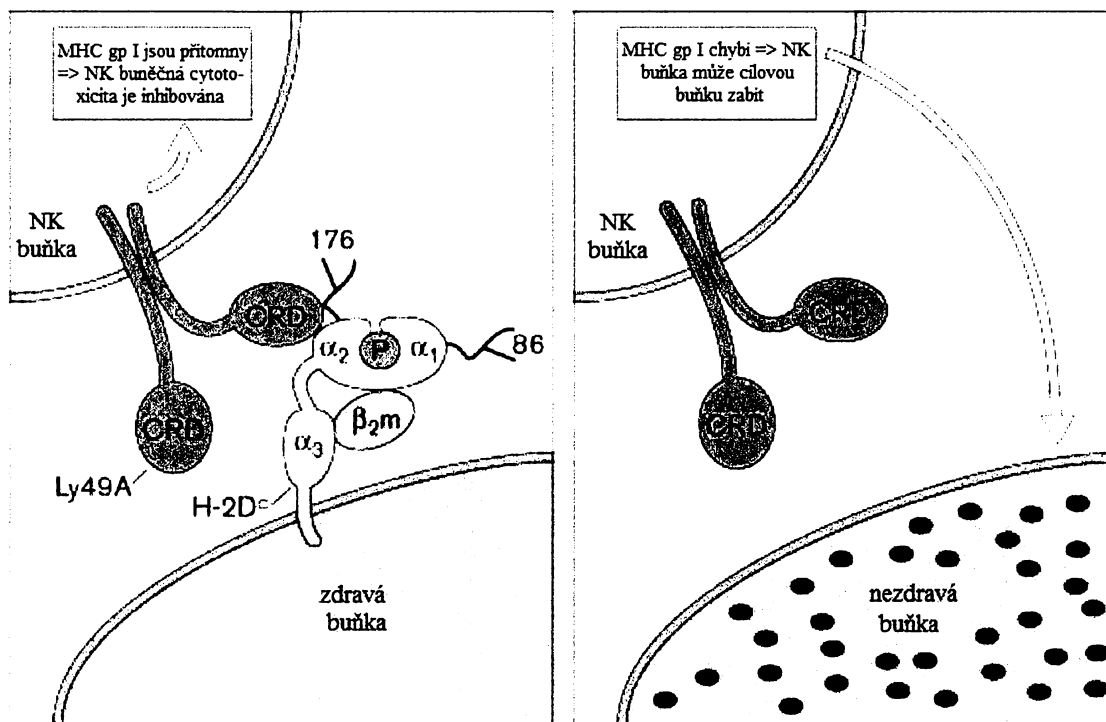
T-buněk (T_C) s receptorem $CD8$ ¹. Po setkání s vhodným antigenem T_H prekurzory diferencují na zralé efektorové T_H , jejichž hlavní funkcí je produkce cytokinů regulujících jiné buňky, T_C prekurzory pak dávají vznik efektorovým T_C buňkám, které jsou schopné cytotoxicky zabít jiné buňky¹.

1.4. NK buňky

NK buňky (*natural killers*, „přirození zabíječi“) jsou velké granulární lymfocyty schopné rozpoznat a zabít některé nádorové, virem infikované, protilátkami pokryté, transplantované nebo stresované buňky^{1,4,5}. Jejich cytolytická aktivita není podmíněna předchozím setkáním s patogenem (není nutná stimulace, proliferace a diferenciaci, jako je tomu u lymfocytů T_C¹) – NK buňky jsou tedy důležitou složkou vrozené imunity⁵.

NK buňky, narozdíl od T- a B-lymfocytů, neexprimují na svém povrchu antigenně specifické receptory, ale širokou škálu jiných receptorů, a to především imunoglobulinové a C-lektinové povahy¹, jejichž ligandy jsou v převážné většině MHC glykoproteiny I. třídy (MHC gp I)^{5,6}. MHC gp I jsou přítomny ve velkém množství na všech jaderných buňkách organismu (na somatických buňkách několik tisíc, na různých druzích leukocytů řádově více) a jejich základní funkcí je vázat peptidové fragmenty proteinů produkovaných (popř. pohlcených) buňkou a vystavovat je na buněčném povrchu, čímž umožní, aby mohly být potenciálně rozpoznány T-lymfocyty¹. Před tímto rozpoznáním (a následným napadením T_C lymfocyttem) se nádorové i některé virově infikované buňky brání potlačením exprese povrchových MHC gp I¹.

NK buňky (narozdíl od T-lymfocytů) rozpoznávají MHC gp I jako takové, nikoli peptidy, které jsou na nich vázané. Přítomnost normálního množství MHC gp I na povrchu cílové buňky inhibuje aktivaci NK buňky, zatímco jejich snížené množství nebo nepřítomnost vyvolává opačnou odpověď⁶ (viz Obr. 2 na následující stránce). Tento mechanismus rozpoznávání cílových buněk bývá často nazýván „missing-self“ („absence sebe sama“)^{7,8} a je vysvětlován tím, že NK buňky exprimují inhibiční receptory specifické pro MHC gp I⁸. Kromě inhibičních receptorů mají NK buňky na svém povrchu i stimulační receptory^{4,6,8} (viz dále). K likvidaci cílových buněk slouží NK buňkám cytotoxické granule, které obsahují perforin a granzymy¹.



Obr. 2: Rozpoznávání cílových buněk NK buňkami na základě chybějících MHC gp I ("missing-self" hypotéza). Obrázek vlevo ukazuje, že pakliže se NK buňka prostřednictvím některého inhibičního receptoru (zde Ly-49a) naváže na MHC gp I (zde konkrétně H-2D^d) na povrchu jiné buňky, NK cytotoxické mechanismy jsou inhibovány. Obrázek vpravo ukazuje nezdravou buňku, u níž virová infekce vedla k zastavení povrchové exprese MHC gp I. NK buňka není inhibována signály vznikajícími vazbou inhibičních receptorů na MHC gp I a je tedy možné, aby NK buňka cílovou buňku zabila. CRD – doména rozpoznávající MHC gp I (*carbohydrate recognition domain*); α_1 , α_2 , α_3 – extracelulární domény těžkého (α) řetězce MHC gp I; β_2m - β_2 mikroglobulin, běžně se vyskytující lehký řetězec MHC gp I molekul. Červeně jsou vyznačeny oligosacharidy H-2D^d. Obrázek byl převzat z Parham, P.: NK cell receptors: Of missing sugar and missing self⁷ a upraven.

NK buňky se vyvíjejí v kostní dřeni z definovaných NK progenitorů, diskontinuálně přes jednotlivá stádia. Důležitým faktorem pro jejich růst a vývoj je interleukin 15 (IL-15)⁶. Aktivita NK buněk je významně stimulována interferony α a β (ty jsou produkovány různými virově infikovanými buňkami)¹; míra přirozeného zabíjení může být ovlivněna nejrůznějšími membránovými proteiny, jako jsou CD2, 2B4, CD11a-CD18 a CD69, a také cytokiny⁸. NK buňky mají i důležité regulační funkce: produkují látky, které ovlivňují diferenciaci efektorových T_H-buněk a hematopoézu (cytokiny IFN- γ , IL-3, M-CSF a některé další)¹.

1.5. Receptory NK buněk

Na povrchu NK buněk se vyskytují receptory jednak stimulační (aktivační), jednak inhibiční^{1,4,6,8}. Vliv inhibičních receptorů obecně převažuje nad vlivem aktivačních receptorů^{8,9}.

Mechanismus inhibice NK buněčného zabíjení souvisí s přítomností inhibičního motivu ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, Val/Ile-Xaa-Tyr-Xaa-Xaa-Leu/Val) v cytoplazmatických doménách inhibičních receptorů^{8,9}. Po navázání ligandu je tyrosin z ITIM motivu fosforylován tyrosinovou kinasou z rodiny Src, což aktivuje proteinovou tyrosinovou fosfatasu 1 (SHP1), popř. některé další (SHP2). Tyto aktivované fosfatasy ruší fosforylační signalizační dráhy zahájené stimulačními receptory a vedoucí k aktivaci NK buněk^{1,8}.

Mnohé aktivační receptory mají podobné extracelulární domény jako inhibiční receptory, ale postrádají intracelulární motiv ITIM^{8,9,12}. Místo toho však velmi často obsahují v transmembránové doméně nabitě aminokyselinové zbytky. Ty usnadňují nekovalentní asociaci se signálními řetězci (adaptorovými molekulami) – transmembránovými proteiny, které jsou často vyžadovány pro optimální povrchovou expresi^{8,12}. V signálních řetězcích na NK buňkách se nalézají molekuly obsahující aktivační motiv ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, Asp/Glu-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Xaa-Leu/Ile-Xaa₍₆₋₈₎-Tyr-Xaa-Xaa-Leu/Ile) – jedná se např. o DAP12 (*DNAX-activating protein of 12 kDa*, známý také jako KARAP – *killer activating receptor associated protein*), FcεRIγ a CD3ξ. Po navázání ligandu na stimulační receptor dojde k fosforylaci tyrosinu v motivu ITAM, což spustí kaskádu intracelulárních dějů vedoucích k NK buněčné aktivaci^{8,12}.

Geny pro receptory NK buněk, ať již inhibiční či stimulační, jsou v genomu uloženy na dvou různých místech: v NK genovém komplexu (NKC, *natural killer receptor gene complex*; nalézá se na chromozómu 6 u myši, 4 u potkana a 12p13 u člověka)^{5,8,9} a v komplexu genů pro receptory leukocytů (LRC, *leukocyte receptor complex*; u člověka se nalézá na chromozómu 19q13.4, u myši na chromozómu 7)^{6,8,9}. Mezi společné vlastnosti těchto dvou genových komplexů patří např. vysoká míra polymorfismu, která zajišťuje vyšší rezistenci proti infekcím⁹; molekuly kódované v obou oblastech se však od sebe navzájem zřetelně liší⁸.

Receptory, jejichž geny jsou uloženy v LRC, patří do imunoglobulinové nadrodiny^{6,8,9} a nejsou exprimovány pouze na NK buňkách, ale i na různých jiných hematopoetických buňkách⁸. Jedná se např. o KIR (*killer cell Ig-like receptor*) a ILT2 (*Ig-like transcript 2*, neboli LIR-1, *leukocyte immunoglobulin-like receptor*)^{6,8,9}, receptory s inhibiční aktivitou¹ specificky rozpoznávající MHC gp I⁸. ILT jsou mimo jiné přítomny také na povrchu některých druhů leukocytů, kde pravděpodobně pomáhají tlumit jejich přílišnou aktivitu¹. Do imunoglobulinové nadrodiny dále patří i skupina aktivačních receptorů, tzv. NCR (*natural cytotoxicity receptors*) – konkrétně jde o NKp46, NKp44 a NKp30. Vyskytují se pouze na NK buňkách a jejich ligandy nejsou MHC gp I⁶. Dalším imunoglobulinovým receptorem je CD16, specificky rozpoznávající Fc části protilátek třídy IgG. S těmi se NK lymfocyt může setkat na povrchu infikované buňky¹. Asociace receptoru CD16 s jeho ligandem vede ve výsledku k cytotoxické aktivaci NK buňky – tento děj se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC, *antibody dependent cellular cytotoxicity*)^{1,8}.

Receptory kódované v NKC patří do nadrodiny lektinů typu C^{5,6} a jsou velmi důležité pro aktivitu NK buněk⁸. Patří sem rodiny receptorů Ly-49, Nkrp1, NKG2/CD94, dále pak stimulační receptor KLRF1, inhibiční KLRG1, CD69 a některé další^{6,7,8}.

Ly-49 je nejlépe prozkoumanou rodinou receptorů C-lektinového typu. Jedná se o homodimery⁷, jejichž ligandy jsou MHC gp I (konkrétně různé allotypy molekul H-2)⁶ a z nichž některé NK buněčné zabíjení inhibují (Ly-49a/c/g2/e a další), některé naopak cytotoxické funkce aktivují (Ly-49d/h)⁸.

Receptory z rodiny NKG2 tvoří disulfidicky spojené heterodimery s CD94, který je nezbytný pro jejich správnou funkci^{6,8}. Jedná se opět o receptory stimulační (NKG2C, E nebo H) i inhibiční (NKG2A); jejich ligandy jsou často neklasické MHC gp I, u člověka HLA-E a u myši Q_a-1^{6,8}. Ze skupiny se poněkud vymyká NKG2D, který je exprimován nejen na NK buňkách, kde funguje jako stimulační receptor, ale i na T-lymfocytech, kde pravděpodobně hraje roli kostimulační molekuly⁸; jeho ligandy jsou u člověka proteiny MICA, MICB a ULBP (protein vázající UL16, glykoprotein lidského cytomegaloviru)^{6,8}, u myši molekuly H-60 a Rae1⁸.

CD69 je disulfidicky spojený homodimer, k jehož povrchové expresi dochází krátce po aktivaci lymfocytů (včetně NK buněk)¹⁰. Jeho zesíťení s ligandem (např. monoklonálními protilátkami v přítomnosti forbolesterů) dále přispívá k cytotoxické aktivaci lymfocytů^{8,10}.

Receptory NK buněk jsou exprimovány po celou dobu vývoje buňky a jejich exprese je regulována mnoha různými faktory. Např. u Ly-49 hraje nejdůležitější roli aktivace či represe promotoru genů pro jednotlivé receptory, kinasa Fyn a také stromární MHC gp I⁶.

1.6. Nkrp1

Tato rodina zahrnuje receptory NK buněk C-lektinového typu se stimulační nebo inhibiční funkcí¹¹ – původně však byla popsána jako skupina stimulačních receptorů krysích NK buněk⁸. Patří sem mj. také NK1.1 (Nkrp1c), nejlepší známý serologický marker NK buněk myšího kmene C57BL/6⁸, který spolehlivě identifikuje i NK buňky mnoha jiných myších kmenů (CE, B6, NZB, C58, FVB atd.)⁴. Geny pro receptory Nkrp1 se nalézají na centromerickém konci NKC¹¹, blízko genu pro CD69⁸.

U myší jsou již po dlouhou dobu známy receptory Nkrp1a, b a c; v nedávné době byly dále identifikovány receptory Nkrp1d, e a f¹². Nkrp1a a c ve své cytoplazmatické doméně neobsahují motiv ITIM a mohou být exprimovány pouze s adaptorovou molekulou nesoucí motiv ITAM (v případě Nkrp1c je to FcεRIγ)^{8,12}. Obě tyto skutečnosti naznačují, že Nkrp1a a c jsou pravděpodobně stimulační receptory: u Nkrp1c byla stimulační funkce přímo dokázána¹². Naopak, ve struktuře myšího Nkrp1b je obsažen motiv ITIM, tento receptor je inhibiční^{8,11,12}. Funkce receptorů Nkrp1d a f sice nebyla přímo prokázána, ze sekvenční analýzy je však možné předpokládat, že Nkrp1d (jehož gen je pravděpodobně alelou Nkrp1b⁴) má funkci inhibiční (obsahuje ITIM) a Nkrp1f stimulační¹². Nkrp1e je patrně pseudogen (gen, který v buňce již není přepisován, je však příbuzný jiným, funkčním genům)¹².

U krys jsou známy receptory Nkrp1a, b, c a d (b*)^{11,12}. Prototypický Nkrp1a (první popsaný receptor z C-lektinové nadrodiny) je homodimer spojený disulfidickým můstkem, transmembránový protein II. typu se stimulační funkcí (provázání s protilátkou (3.2.3.) indukuje NK buněčné zabíjení)¹³. Naopak, krysí Nkrp1b ve své cytoplazmatické doméně obsahuje motiv ITIM a byl prokázána jeho inhibiční funkce¹¹. Inhibiční receptor Nkrp1c

byl identifikován teprve nedávno; je exprimován především Ly-49 negativními NK buňkami¹¹. Receptor Nkrp1d (b*) neobsahuje ITIM; nejvíce se podobá myšimu Nkrp1f¹² a odhaduje se, že má aktivační funkci¹¹.

V lidském NKC je kódována jen jediná molekula z rodiny Nkrp1: Nkrp1a. S myším Nkrp1 je identická z 45% a k její expresi dochází pouze na určité skupině zralých NK buněk a na T-lymfocytech (zatímco myši Nkrp1c je exprimován na všech NK buňkách a na specifické skupině T-lymfocytů, tzv. NKT buňkách)⁸.

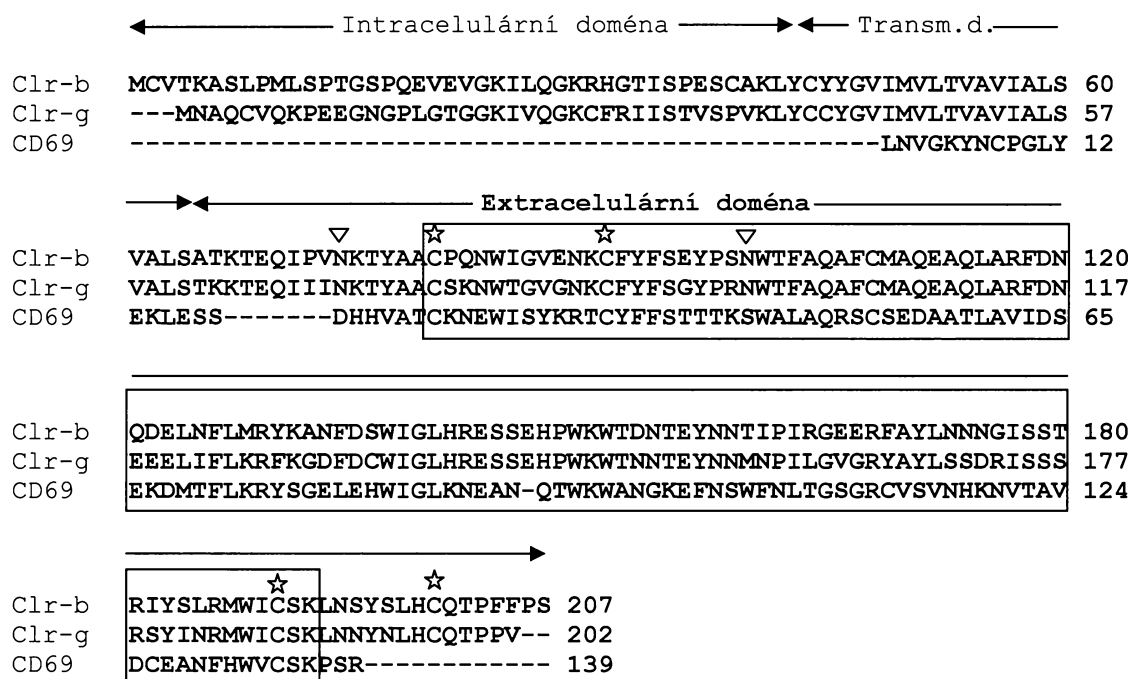
1.7. Clr/Ocil

Ligandy pro Nkrp1 zůstávaly po dlouhou dobu neznámé. Teprve nedávno bylo zjištěno, že některé z těchto receptorů specificky rozpoznávají a váží molekuly z rodiny Clr/Ocil (*C-type lectin-related molecule/Osteoclast inhibitory lectin*)^{14,15}.

První objevenou molekulou z této rodiny byl myši mOcil/Clr-b (Hong Zhou a kolegové, Melbournská univerzita, Austrálie; 2001)¹⁶. Tento transmembránový protein II. typu, jehož řetězec čítá 207 aminokyselinových zbytků a v extracelulární doméně obsahuje podobný C-lektinový motiv jako CD69, byl nejdříve popsán jako faktor inhibující formaci osteoklastů (mnohojaderných buněk, které se odvozují z linie makrofágů pocházejících z kostní dřene¹⁴ a jsou zodpovědné za resorpci kosti)¹⁶. Bylo dokázáno, že Clr-b *in vitro* inhibuje tvorbu osteoklastů (při aplikaci dostatečné dávky) v proliferativní fázi úplně, ve fázi diferenciací ze 70 %, a to i v případech, kdy jsou v kulturách přítomny také RANKL a M-CSF – faktory zásadní pro formaci osteoklastů¹⁶. Zjištěním této funkce se alespoň částečně osvětlil důvod přítomnosti Clr-b na osteoblastech; tento lektin je však exprimován na povrchu téměř všech hematopoetických buněk (kromě erythrocytů)¹⁵, což od začátku poukazovalo na fakt, že inhibice tvorby osteoklastů není pravděpodobně funkcí jedinou.

Velmi brzy po objevu Clr-b byly u myši identifikovány dvě další molekuly vykazující významnou podobnost s mOcil, jak ve struktuře, tak i v jejich tkáňové distribuci a ve schopnosti *in vitro* inhibovat tvorbu osteoklastů¹⁷. Tato redundance u Clr molekul pravděpodobně poukazuje na společného předchůdce. Molekuly, z nichž každá je kódována jiným, byť velmi podobným genem, nesou názvy mOcilrP1 (Clr-d) a mOcilrP2

(její isoformou, lišící se o 4 aminokyseliny, je mOcilrP2b neboli Clr-g; srovnání primární struktury Clr-b a Clr-g je na Obr. 3)¹⁷. Později byl nalezen také lidský homolog myšičího Clr, hOcil, který má srovnatelné efekty na vývoj osteoklastů jako mOcil a kromě toho je schopen inhibovat resorpci kosti již vyvinutými osteoklasty odvozenými od nádorových buněk¹⁸. Dále bylo ukázáno, že Ocil je schopný vázat různé fyziologicky důležité glykosaminoglykany a že tato vazba neovlivňuje jeho inhibiční funkci v osteoklastogenezi¹⁹.

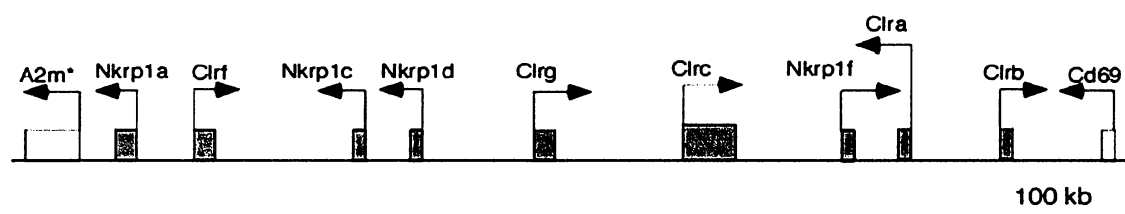


Obr. 3: Srovnání aminokyselinové sekvence Clr-b, Clr-g a myšičí CD69 (část sekvence). Aminokyseliny, ve kterých se sekvence shodují, jsou psány černě, ostatní červeně. Zatímco Clr-b a Clr-g jsou homologní z 67 %, jejich podobnost s CD69 je poměrně nižší (podobnost s Clr-b: 28 %, podobnost s Clr-g: 32 %). C-lektinová doména je ve všech případech v rámečku. Konzervovaná cysteinová rezidua jsou označena hvězdičkou, konzervovaná N-glykosylační místa jsou označena trojúhelníkem. Sekvence jsou rozděleny na jednotlivé domény, intracelulární, transmembránovou (Transm.d.) a extracelulární. Sekvence pocházejí z bioinformační databáze přístupné na www.ncbi.nlm.nih.gov a porovnány byly pomocí programu Clustal W (2.0.5) volně dostupného na www.ebi.ac.uk/clustalw/.

V nedlouhé historii rodiny molekul Clr se průlomovým stalo zjištění, že tyto proteiny C-lektinového typu jsou specifickými ligandy pro některé z Nkrp1 receptorů^{14,15}.

Konkrétně se jedná o molekulu Clr-g, která je specificky rozpoznávána a vázána stimulačním receptorem Nkrp1f¹⁴, a dále o Clr-b, jež je specifickým ligandem pro inhibiční receptory Nkrp1b a Nkrp1d^{14,15}. V později zmíněném případě se v určitém smyslu jedná o novou, jinou formu „missing self“ – místo MHC gp I zde vystupuje molekula Clr-b, která se vyskytuje na povrchu mnoha různých buněk, ale její povrchová exprese je často snížena u buněk nádorových (podobně jako MHC gp I)¹⁵.

Geny pro Clr se nalézají na stejném místě jako geny pro Nkrp1 – jsou s nimi promíchány na centromerickém konci NKC^{11,14} (viz Obr. 4). Pořadí genů je značně konzervované a daná oblast se vyznačuje velmi nízkým alelickým polymorfismem¹⁴. Mezi geny pro Clr a Nkrp1 je potlačena rekombinace, což spolu se skutečností, že spolu tyto geny velmi blízce sousedí, zaručuje, že specifické dvojice ligand-receptor jsou děděny společně^{11,14}.



Obr. 4: Organizace genů pro Nkrp1 (zeleně) a Clr (fialově) molekuly v centromerické části NKC. Diagram se vztahuje ke genomu myši kmene B6, v tomto úseku je genomická organizace stejná i u myši kmene 129. Obdélníky – geny, šipky – směr transkripce. Obrázek byl převzat z Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M.: Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors¹⁴.

2. CÍL PRÁCE

Na základě dostupných literárních údajů navrhnout oligonukleotidové primery vhodné pro klonování a amplifikaci genů Clr-b a Clr-g, isoform ligandu pro receptory z rodiny Nkrp1 myších NK buněk.

Amplifikovat geny pro výše uvedené receptory pomocí PCR z cDNA získané reverzní transkripcí celkové mRNA izolované ze slezin myšního kmene C57BL/6.

Klonovat PCR produkt do plazmidového vektoru, získaný inzert sekvenovat a sekvenci srovnat s bioinformatickými databázemi.

3. MATERIÁL

3.1. Přístroje

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
Mrazící box (-20 °C)	Zannusi, Itálie
Mrazící 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
Termocykler	Eppendorf, Německo
Termostat BT 120M	Lab. přístroje Praha, ČR
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

Clr-b_FW: 5'-ACATATGTGTGTCACAAAGGCTTCCCTA-3'

Clr-b_REV: 5'-TAAGCTTAGGAAGGAAAAAAGGAGTTTGGCA-3'

Clr-g_FW: 5'-ACATATGAATGCCAGTGTGTACAGAAG-3'

Clr-g_REV: 5'-TAAGCTTAGACAGGAGGAGTTTGGCAATG-3'

3.2.2. Enzymy

EcoR I	New England Biolabs, USA
Lysozym	Fluka, Švýcarsko
Platinum Taq polymerasa	Invitrogen, USA
SuperScript™ III RT	Invitrogen, USA
RNasa	Sigma, USA

3.2.3. Bakteriální kmeny

<i>Escherichia coli</i> , TOP10	Invitrogen, USA
---------------------------------	-----------------

3.2.4. Vektory

pCR [®] 2.1 – TOPO, 3.9 kb	Invitrogen, USA
-------------------------------------	-----------------

3.2.5. Chemikálie

Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Jersey Lab Supply, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA

BSA	New England Biolabs, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma, USA
DNA žebřík (100 bp)	New England Biolabs, USA
dNTP	Fermentas, Kanada
DTT	Sigma, USA
EDTA	Fluka, Švýcarsko
Ethanol	Lachema, ČR
Ethidiumbromid	Jersey Lab Supply, USA
Glycerol	Sigma, USA
Chlorid sodný	Lachema, ČR
IPTG	Sigma, USA
Kanamycin	Jersey Lab Supply, USA
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, ČR
Kyselina octová	Lachema, ČR
Síran hořečnatý	Lachema, ČR
Sacharosa	Lachema, ČR
Tris	Serva, USA
Tris-Cl	Serva, USA
Triton X-100	Sigma, USA
Trypton	Oxoid, Anglie
X-Gal	Serva, USA

3.2.6. Roztoky a média

Agarosový gel 1%	0,5 g agarosy; 50 ml TAE pufru; 2 μ l ethidiumbromidu
EcoRI pufr	50 mM TrisCl, pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 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 ₂ 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 ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM Tris-HCl; 2mM MgSO ₄ ; 0,1 % Triton-X100, pH 8,8
Salt solution (TOPO cloning kit)	1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl ₂
SOC médium	20 g bacto-tryptone; 5 g bacto-yeast extract; 0,5 g NaCl; 2,5 ml 1M KCl; ddH ₂ 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 ₃ COOH; 1 mM EDTA

4. METODY

4.1. Izolace celkové RNA z myší sleziny

Celková RNA byla izolována ze slezin čerstvě odebraných z myší kmene C57BL/6 v laboratoři MUDr. Anny Fišerové, CSc.

4.2. Syntéza cDNA z mRNA

V mikrozkušavce zbavené nukleas bylo smícháno 5 µg celkové RNA (1 µg/5 µl), 1 µl oligo(dT)₁₂₋₁₈ (50 µmol/L), 1 µl 10 mM dNTP Mix (10 mM dATP, dGTP, dCTP i dTTP, pH neutrální) a 6 µl destilované vody. Tato směs byla na dobu 5 minut zahřáta na 65°C a poté přenesena na led, kde byla po 1 minutu inkubována. Obsah mikrozkušavky byl poté sesbírán krátkou centrifugací a bylo přidáno 4 µl 5X First-Strand Bufferu, 1 µl DTT (0,1 M; Invitrogen), 1 µl inhibitoru RNas RNaseOUTTM (40 units/µl; Invitrogen) a 1 µl reverzní transkriptasy SuperScriptTM III RT (200 units/µl; Invitrogen). Roztok byl promíchán jemným nasáváním a vypouštěním pipetou a mikrozkušavky byly následně inkubovány 60 minut při 50°C. Reakce byla pozastavena zahřátím směsi na 70°C na dobu 15 minut.

4.3. PCR amplifikace

PCR amplifikace byla provedena za použití cDNA získané reverzní transkripcí z RNA (viz kapitola 4.2.), výše uvedených dvojic primerů (viz kapitola 3.2.1.) a Platinum Taq polymerasy (Invitrogen) – úplné složení reakční směsi viz Tab. 1.

Tab. 1: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci.

Složka	cDNA	FW	REV	Plat	dNTPs	DMSO	MgSO ₄	pufr	ddH ₂ O
V [µl]	1	2	2	0,5	1	3	4	2,5	31,5

FW = forward primer, REV = reverse primer, Plat = Platinum Taq polymerasa, pufr = Thermo Pol Buffer 10x

Bylo provedeno 30 cyklů PCR amplifikace s půlminutovým nasedáním primerů při 60°C a minutovou polymerací při 72°C. Termální profil PCR amplifikace viz Tab. 2.

Tab. 2: Termální profil PCR. Teplota krytu 105°C

Počet cyklů	1	30	30	30	1
Teplota	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
Čas [min]	2:05	0:30	0:30	1:00	10:00

4.4. Detekce produktů PCR agarosovou elektroforézou

5 µl směsi získané RT-PCR amplifikací bylo smícháno s 2 µl stop pufru a analyzováno agarosovou elektroforézou v 1 % agarosovém gelu obsahujícím pufr TAE (Tris-Acetat-EDTA²⁰) a ethidiumbromid. Elektroforéza byla provedena při 110, později při 130 V. Poté, co bromfenolová modř doputovala asi do dvou třetin délky gelu, byla elektroforéza ukončena a byla pořízena fotografie gelu pomocí videokamery a transluminátoru při vlnové délce 254 nm.

4.5. Ligace získaných genů do expresního vektoru ze soupravy TOPO TA Cloning®

Pro klonování DNA fragmentů získaných PCR amplifikací byl použit kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) a byl dodržen postup popsáný výrobcem²¹. Ligační směs (složení viz Tab. 3) byla v mikrozkuhavce jemně promíchána, inkubována za laboratorní teploty po dobu 5 minut a poté umístěna na led.

Tab. 3: Složení ligační směsi, dle manuálu firmy Invitrogen²¹

Složka	PCR produkt	Salt Solution	TOPO® vector	ddH ₂ O
V [µl]	1	1	1	3

4.6. Transformace kompetentních buněk *Escherichia coli* tepelným šokem

Ke kompetentním buňkám *Escherichia coli* kmene TOP10 byly po rozmrazení na ledu přidány 2 μ l roztoku vzniklého ligací PCR produktu do vektoru TOPO^{®21}. Směs byla jemně zamíchána a inkubována na ledu po dobu 20 minut. Poté byly buňky vystaveny na 30 sekund teplotnímu šoku (42°C) na vodní lázni bez třepání. Bezprostředně na to byly mikrozkušavky přeneseny zpět na led. K buňkám bylo přidáno 250 ml SOC média vytemperovaného na laboratorní teplotu. Pevně uzavřené mikrozkušavky byly po dobu 1 hodiny inkubovány při 37°C.

100 μ l roztoku buněk z každé transformace bylo potom rozetřeno na LB-agarové plotny s kanamycinem, IPTG (0,4 mM) a X-Gal (0,09 mg/ μ l, původně rozpuštěný v DMSO), které byly přehřáté na 37°C. Při této teplotě byly plotny inkubovány do druhého dne.

Z kolonií buněk *Escherichia coli* rezistentních na kanamycin, které na plotně vyrostly, byly bílé kolonie přeneseny vždy do 1 ml sterilně napipetovaného kapalného LB média s kanamycinem. Třepáním v bakteriální třepačce po dobu nejméně 20 hodin pak byla připravena stacionární kultura z vybraných buněk.

4.7. Minipreparace plazmidové DNA

Minipreparační příprava plazmidové DNA byla provedena metodou tzv. "Easy-prep" podle publikované metody²². Poté, co byla kultura transformovaných buněk *E. coli* oddělena ode dna a promíchána pomocí Vortexu, bylo odebráno 0,8 ml této kultury do mikrozkušavky a centrifugováno po dobu 30 s, rychlostí 6000 RPM. Supernatant byl odsát automatickou pipetou a peleta resuspendována ve 30 μ l EP pufru. Obsah mikrozkušavky byl protřepáván po dobu 5 minut, poté byl na 90 sekund vystaven ve vodní lázni teplotě 100°C a následně inkubován na ledu po dobu 10 minut. Dále byl obsah mikrozkušavek centrifugován při 4°C a maximálních otáčkách (22 000 RPM) po dobu 10 minut.

4.8. Restrikční analýza

V mikrozkumavkách bylo smícháno vždy 9 μ l roztoku plazmidové DNA, 0,5 μ l EcoR I a 1 μ l EcoR I pufru. Mikrozkumavky byly inkubovány po dobu 1 hodiny při 37°C, reakce byla zastavena přidáním 2 μ l stop roztoku.

4.9. Analýza DNA fragmentů agarosovou elektroforesou

DNA fragmenty vzniklé restrikčním štěpením byly analyzovány za pomoci elektroforézy v 1 % agarosovém gelu. Pro srovnání byl použit 100 bp DNA žebřík a dále původní produkty (DNA fragmenty získané PCR amplifikací, viz kapitola 4.3.). Po ukončení elektroforézy (asi po 30 minutách) byly vzorky detekovány pomocí transluminátoru při vlnové délce 254 nm.

4.10. DNA sekvenování

Buňky *E. coli* pozitivních klonů obsahující inzert správné délky byly rozetřeny na čerstvou LB-agarovou plotnu s kanamycinem. Miska byla inkubována přes noc při 37°C (zbytek použitých kultur byl promíchán s glycerolem, který byl přidán do 20 % objemu roztoku, kultury s glycerolem byly postupně ochlazeny a poté uschovány v mrazícím boxu při -20°C). Druhý den byla miska s narostlými koloniemi předána do DNA sekvenační laboratoře MBÚ AV ČR v. v. i. Dr. Jurgenu Felsbergovi, který zajistil přípravu plazmidové DNA s použitím purifikačního kitu firmy Genomed, a dále DNA sekvenování inzertů v obou směrech zahájené z míst specifických primerů obsažených v klonovacím vektoru (Obr. 7 na stránce 32), M13 forward primeru a M13 reverse primeru. Vlastní sekvenování bylo provedeno Sangerovou dideoxynukleotidovou metodou na automatickém DNA sekvenátoru firmy Applied Biosystems ABI Prism 3100.

5. VÝSLEDKY

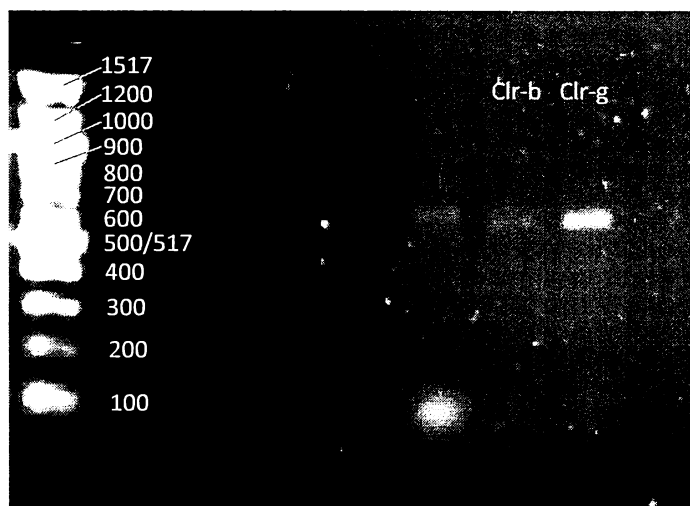
5.1. Návrh a syntéza oligonukleotidových primerů

Oligonukleotidové primery byly navrženy na základě imunologických článků, jež popisují klonování a sekvenování Clr-b a Clr-g, ligandů pro některé myší receptory Nkrp1^{16,17}. Na základě nukleotidových sekvencí těchto ligandů byly zvoleny primery, které byly poté použity při amplifikaci příslušných molekul.

Pro Clr-b byl navržen forward primer 5'-ACATATGTGTGTCACAAAGGCTTCCCTA-3' a reverse primer 5'-TAAGCTTAGGAAGGAAAAAAGGAGTTTGGCA-3', pro Clr-g byl zvolen forward primer 5'-ACATATGAATGCCAGTGTGTACAGAAG-3' a reverse primer 5'-TAAGCTTAGACAGGAGGAGTTTGGCAATG-3'. Navržené primery byly syntetizovány firmou Generi-Biotech v Hradci Králové. Pro každý z těchto primerů byla pomocí programu OligoCalc dostupného na webových stránkách <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> vypočítána teoretická teplota jejich nasedání na nukleotidové řetězce, která se pohybovala od 55 do 60°C.

5.2. Klonování a amplifikace DNA fragmentu

Celková RNA izolovaná z myších slezin získaných z laboratorních myší kmene C57BL/6 byla použita pro PCR amplifikaci genů pro receptory Clr-b a Clr-g. V počátečních experimentech, kdy byla použita v laboratoři běžně používaná Deep Vent DNA polymerasa a zvolena poměrně nízká teplota nasedání primerů (56 a 58°C), docházelo pouze k amplifikaci velmi malých množství DNA fragmentů odpovídajících spíše nespecifickým produktům (tzv. mispriming). Vznikla proto obava, zda tyto problémy nejsou způsobeny špatnou kvalitou nebo malým množstvím použité RNA. Při dalším pokusu však byla tato domněnka vyvrácena – po použití Platinum Taq polymerasy a techniky "Hot Start" byly na gelu pozorovatelné zóny amplifikovaných fragmentů. Pro nasedání primerů byla tentokrát použita teplota 60 a 65°C; zatímco teplota 65°C se ukázala jako příliš vysoká, při teplotě 60°C bylo dosaženo úspěšné a specifické amplifikace obou požadovaných fragmentů. Na gelu jim odpovídaly proužky v oblasti asi 600 bp (viz Obr. 5 na následující stránce).

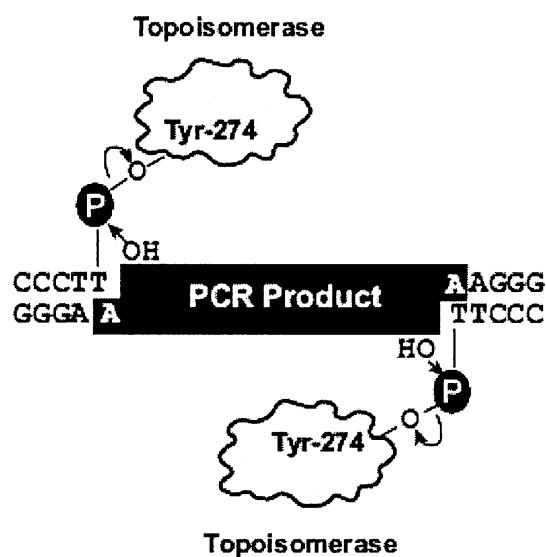


Obr. 5: Analýza DNA fragmentů amplifikovaných pomocí RT-PCR protokolu pomocí primerů specifických pro Clr-b a Clr-g. Pro analýzu byl použit 1 % agarosový gel v přítomnosti pufru TAE a ethidiumbromidu a DNA byla detekována na transluminátoru UV zářením vlnové délky 254 nm. Pro srovnání byl použit 100 bp DNA žebřík (tzv. marker s intervalem 100 bp, čísla vedle DNA žebříku odpovídají délce jednotlivých fragmentů). Obrázek je složen ze dvou fotografií stejného gelu, první z nich byla zaostřena na DNA žebřík, druhá potom na PCR produkty. Pro amplifikaci byla použita teplota nasedání primerů 60°C, nanášeno 5 µl reakční směsi.

5.3. Ligace DNA fragmentu do vektoru a kontrola restrikční analýzou

Získané DNA fragmenty byly vloženy do plazmidového vektoru pCR[®]2.1- TOPO[®] z komerčně dostupné soupravy TOPO TA Cloning[®] firmy Invitrogen. Vektor pCR[®]2.1- TOPO[®] je dodáván linearizovaný s jedním nespárovaným thymidylovým zbytkem na 3'-konci. Ten se páruje s adenylovým zbytkem na konci DNA fragmentu vzniklým nespécifickou adicí prováděnou většinou běžných termostabilních DNA polymeras. Celý proces je výrazně urychlen topoisomerasou I pocházející z viru Vaccinia, jež je umístěna na konci vektoru a pomáhá zachycení a účinné ligaci PCR produktu (viz Obr. 6 na následující stránce). Tak je dosaženo zvýšení účinnosti ligace, které umožňuje provádět ligaci pouze krátkou dobu a i za použití nízké koncentrace DNA fragmentů. Souprava TOPO TA Cloning[®] teoreticky vyžaduje přítomnost čistého DNA fragmentu, což bylo v případě Clr-b i Clr-g dosti dobře splněno. Ačkoli účinnost použitého kitu je vysoká, je po provedení ligační reakce nutné vyselektovat neproduktivní klony (vzniklé např. uzavřením samotného vektoru). K tomu byla použita dvojstupňová procedura:

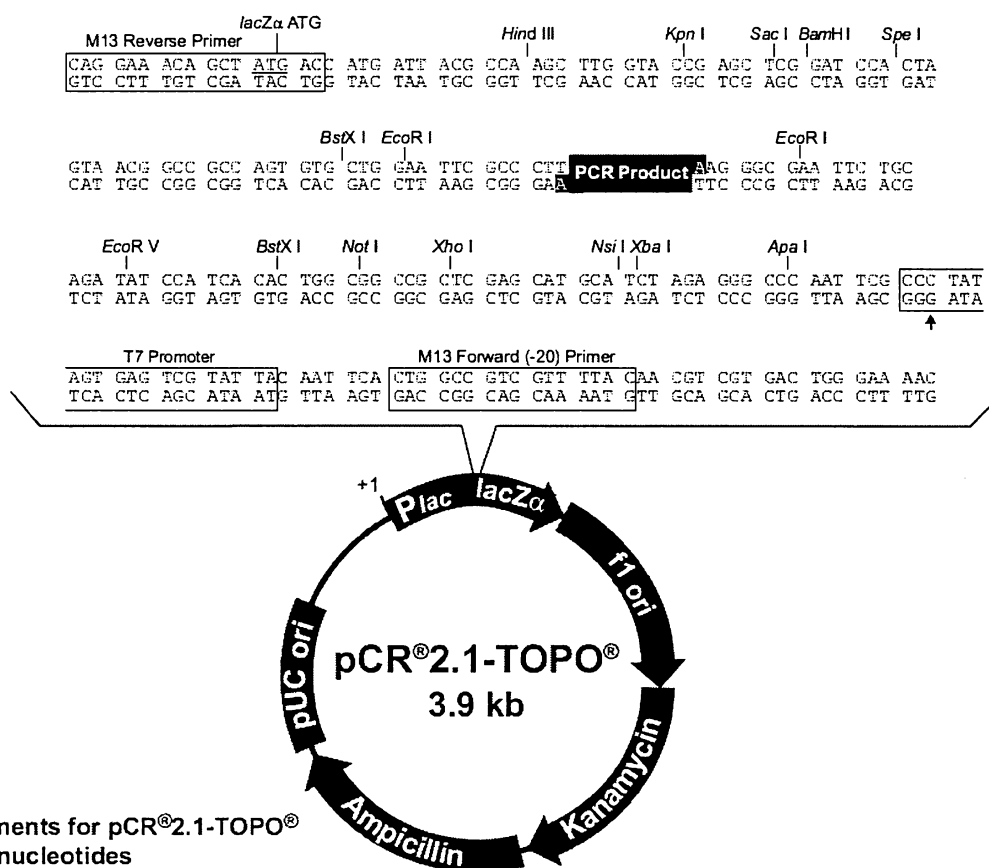
v prvním selekčním kroku byl použit tzv. blue/white screening a ve druhém restriční analýza pomocí restriční endonukleasy EcoR I.



Obr. 6: Princip ligace PCR fragmentu do TA vektoru pCR[®]2.1- TOPO[®] ze soupravy TOPO TA Cloning[®] firmy Invitrogen. Topoisomerasa I z viru Vaccinia se váže na dvojřetězcovou DNA na specifických místech a štěpí fosfodiesterovou vazbu po sekvenci 5'-CCCTT v jednom řetězci. Energie, která vzniká štěpením fosfodiesterové vazby, je zachována vytvořením kovalentní vazby mezi 3'-fosfátem rozštěpeného řetězce a tyrosylovým zbytkem (Tyr-274) topoisomerasy I. Fosfotyrosylová vazba mezi DNA řetězcem a enzymem může být napadena 5'-hydroxylem původního či jiného DNA řetězce, což vede k vytvoření nepřerušného nukleotidového řetězce a uvolnění topoisomerasy I. Obrázek byl převzat z firemního manuálu firmy Invitrogen, USA²¹

Podstatou metody blue/white screening je použití X-Gal, substituovaného galaktopyranosidu, který je štěpen enzymem β -galaktosidasou na galaktosu a modré barvivo na bázi indolu. Inzercí PCR produktu do plazmidového vektoru pCR[®]2.1- TOPO[®] dojde k přerušení genu pro β -galaktosidasu (viz Obr. 7 na následující stránce), což ve výsledku znamená, že bakteriální kolonie obsahující inzert již nejsou schopné produkovat tento enzym a tedy ani rozkládat X-Gal za vzniku modrého barviva. Tak se kolonie obsahující inzert jeví na Petriho misce jako bílé, a naopak kolonie obsahující vektor bez inzertu jsou modré.

EcoR I je restikční endonukleasa, která specificky štěpí polynukleotidový řetězec v místě označeném /: 5'...G/AATTC...3' (viz také Obr. 7).

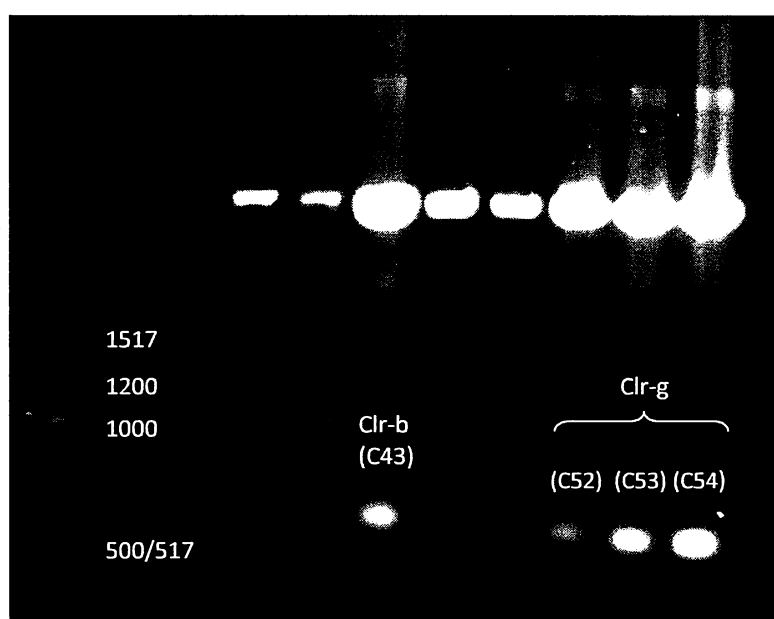


Comments for pCR^{2.1}-TOPO[®]
3931 nucleotides

LacZ α 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. 7: Schéma klonovacího vektoru pCR^{2.1}- TOPO[®] včetně popisu důležitých sekvencí a sekvence polylinkeru. Vyznačeno je místo nasedání M13 forward i reverse primeru, dále obě štěpná místa EcoR I a místo, kam se při ligaci vkládá PCR produkt. Plné šipky značí gen kódující enzym β -galaktosidasu (lacZ α), počátky replikace (f1 ori a pUC ori), gen kódující rezistenci na kanamycin (Kanamycin) a rezistenci na ampicilin (Ampicillin). Obrázek byl převzat z firemního manuálu firmy Invitrogen²¹.

Nejprve byly tedy za pomoci metody blue/white screening vybrány některé z kolonií, které se jevily bílé a byly dostatečně velké, čímž upozorňovaly na relativně vysokou pravděpodobnost, že obsahují vektor s vloženým inzertem. Vybrané kolonie byly potom ve druhém selekčním kroku podrobeny restriční analýze za použití restriční endonukleasy EcoR I s následnou detekcí DNA fragmentu agarosovou elektroforézou, jejíž výsledky lze vidět na Obr. 8. Toto kritérium je již mnohem přesnější a umožňuje vybrat klony vhodné pro DNA sekvenování inzertu. V mém případě byly získány 4 takové klony, jeden klon obsahující vektor s vloženým Clr-b, tři klony, které obsahovaly vektor s vloženým Clr-g.



Obr. 8: Výsledek restriční analýzy jednotlivých klonů získaných pěstováním bílých kolonií po transformaci a blue/white screeningu. Pro analýzu byl použit 1 % agarosový gel v přítomnosti pufru TAE a ethidiumbromidu a DNA byla detekována na transluminátoru UV zářením vlnové délky 254 nm. Pro srovnání byl použit 100 bp DNA žebřík (čísla vedle DNA žebříku odpovídají délce jednotlivých fragmentů). Pozitivní klony C43 (Clr-b), C52, C53 a C54 (Clr-g) restrikcí poskytly inzert o předpokládané délce (cca 600 bp). Naneseno 5 μ l reakční směsi.

5.4. DNA sekvenování

Konečným důkazem kvality získaného DNA fragmentu je teprve DNA sekvenování. To bylo provedeno jako placená služba v Laboratoři DNA sekvenování MBÚ AV ČR v. v. i. Dr. Jurgenem Felsbergem. Plazmid byl do Laboratoře dodán ve formě bakteriální

kultury; zde byl purifikován pomocí komerčně dostupného kitu a poté sekvenován na obou vlákních s použitím dideoxynukleotidové metody prováděné na automatickém DNA analyzátoru ABI Prism 3100 firmy Applied Biosystems. Tato technologie je vyhovující pro úseky DNA o délce až 1000 bp, což se pro geny kódující molekuly Clr-b a Clr-g (cca 600 bp) jevílo jako dostačující. Sekvenování bylo přesto prováděno na obou vlákních za použití M13 forward i M13 reverse primeru (viz Obr. 7 na stránce 32) – obě sekvence potom sloužily jako zdroj pro vytvoření konečné sekvence inzertu.

Nejprve byly v programu Chromas verze 1.45 (Griffith University, Southport, Queensland, Austrálie) prohlédnuty dodané soubory ve formě původních chromatogramů. Z nich bylo ve všech případech usouzeno, že byla získána velmi kvalitní sekvence v celém rozsahu sekvenovaného DNA inzertu. Sekvence začíná být velmi dobře čitelná asi 25 párů bazí za místem nasednutí primeru; její první část tedy odpovídá polylinkeru použitého vektoru pCR[®]2.1- TOPO[®] (viz Obr. 7 na stránce 32). V případě klonu C43 (Clr-b) se v místě 68. nukleotidu nachází jedno z obou restrikčních míst pro EcoR I (G/AATTC), ohraničující místo vkládání inzertu, a v místě 79. nukleotidu nepárové T použité pro ligaci DNA inzertu. Poté následuje 633 nukleotidů dlouhá sekvence celého inzertu, není-li započítáno koncové nespécifické A použité pro ligaci (v místě 713. nukleotidu). V místě 719. nukleotidu je pak druhé místo EcoR I použité pro restrikční analýzu (viz Obr. 7 na stránce 32 a Obr. 9). V případech klonů C53 a C54 je situace velmi podobná; délka inzertu je v obou případech 618 nukleotidů.

Na Obr. 9, 10 a 11 je konečné zhodnocení kvality klonovaných a amplifikovaných DNA sekvencí (sekvence byly pomocí programu BLAST dostupného na www.ncbi.nlm.nih.gov porovnány s nejbližší nukleotidovou sekvencí nalezenou v bioinformatických databázích) a jejich překlad do aminokyselinové sekvence (proveden pomocí programu Translate dostupného na webových stránkách www.expasy.org). V případě C43 došlo v průběhu amplifikace ke dvěma mutacím, z nichž jedna nemění kódovanou aminokyselinu (GCT (Ala) → GCC (Ala), v místě 431. nukleotidu), zatímco druhá provedla záměnu původního serinu za glycin (AGC (Ser) → GGC (Gly), v místě 129. nukleotidu). U klonu C53 došlo k záměně jednoho nukleotidu na místě 234, aminokyselinovou sekvenci to však neovlivnilo (GTT (Val) → GTC (Val)). Konečně u klonu C54 došlo k záměně u jednoho nukleotidu (424.), která změnila i aminokyselinovou sekvenci (záměna původního isoleucinu za valin, ATT (Ile) → GTT (Val)).

NNNNNNNNNGNCGANTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGA
 TATCTGCAGAATTCGCCCTTACATATGTGTGTACAAAGGCTTCCCTACCTATGCTTAGT
 M C V T K A S L P M L S
 CCCACAGGCGGCCCGCAGGAGGTAGAAGTGGGTAAAATTCTCCAAGGAAAAGGCACGGA
 P T G G P Q E V E V G K I L Q G K R H G
 ACCATCTCCCCTGAGTCTTGTGCTAAGCTTTACTGCTACTATGGAGTGATCATGGTCCTC
 T I S P E S C A K L Y C Y Y G V I M V L
 ACTGTAGCTGTAATTGCTCTTTCTGTTGCTTTGTCAGCAACAAAGACAGAACAGATCCCA
 T V A V I A L S V A L S A T K T E Q I P
 GTCAACAAGACCTATGCTGCTTGCCCGCAAACCTGGATTGGAGTTGAAAATAAATGTTTT
 V N K T Y A A C P Q N W I G V A Q E A Q
 TATTTTTCTGAATACCCAAGTAACTGGACATTCGCCCAGGCCTTCTGCATGGCACAAGAG
 L A R F D N Q D E L N F L M R Y K E N K
 GCCCAACTAGCCGGTTTGACAACCAGGATGAGCTGAATTCCTAATGAGATACAAGGCG
 C F Y F S E Y P S N W T F A Q A F C M A
 AATTTTGATTCCCTGGATTGGCCTGCACAGAGAGTCGTCAGAGCACCTTGGAAAGTGGACA
 N F D S W I G L H R E S S E H P W K W T
 GACAACACTGAGTATAACAACACGATTCCCATCCGGGGAGAGGAAAGATTTGCCTACCTG
 D N T E Y N N T I P I R G E E R F A Y L
 AACACAACGGGATCAGCAGTACCAGGATCTATTCACTTCGGATGTGGATCTGTAGCAAG
 N N N G I S S T R I Y S L R M W I C S K
 CTCAACAGCTATAGCCTCCACTGCCAAACTCCTTTTTTTTCTTCCTTAAGCTTAAAGGGCG
 L N S Y S L H C Q T P F F P S -

AATTCAG

A129G ... AGC (Ser) → GGC (Gly) – mutace v intracelulární části receptoru

T431C ... GCT (Ala) → GCC (Ala) – nezmění aminokyselinovou sekvenci

Obr. 9: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence inzertu z klonu C43, odpovídající sekvenci genu pro Clr-b, a popis vzniklých mutací. Zeleně jsou vyznačeny nukleotidy, které se shodují se sekvencí genu pro Clr-b uloženou v bioinformatické databázi přístupné na www.ncbi.nlm.nih.gov, červeně potom nukleotidy, které se s touto sekvencí neshodují (a aminokyselina, která se kvůli této mutaci při expresi proteinu změní). Modře jsou vyznačena štěpná místa pro EcoR I, T/A nukleotidy v místě ligace inzertu jsou jednou podtrženy. Dvakrát jsou podtržena restriční místa NdeI (CA/TATG) a HindIII (A/AGCTT).

NNNNNNNNNNNNNNCNNGGNNNNNAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTACAT
ATGAATGCCCAGTGTGTACAGAAGCCAGAAGAGGGCAATGGACCCCTTGGAACTGGAGGT
 M N A Q C V Q K P E E G N G P L G T G G
 AAAATTGTCCAAGGAAAATGTTTCAGAATCATCTCCACTGTGTCTCCTGTTAAACTTTAC
 K I V Q G K C F R I I S T V S P V K L Y
 TGCTGCTATGGAGTGATCATGGTCCTCACTGTAGCTGTAATTGCTCTTTCTGTCGCTTTG
 C C Y G V I M V L T V A V I A L S V A L
 TCAACAAAAAAGACAGAACAGATCATAATCAACAAGACCTATGCTGCTTGCTCAAAAAAC
 S T K K T E Q I I I N K T Y A A C S K N
 TGGACTGGAGTTGGAATAAATGTTTTTATTTTTCTGGATACCCACGTAACTGGACATTT
 W T G V G N K C F Y F S G Y P R N W T F
 GCCCAGGCCTTCTGCATGGCACAAGAGGCCCAACTAGCTCGGTTTGACAACGAGGAGGAG
 A Q A F C M A Q E A Q L A R F D N E E E
 CTGATTTTCTAAAGAGATTCAAGGGGGATTTTGATTGCTGGATTGGCCTGCACAGAGAG
 L I F L K R F K G D F D C W I G L H R E
 TCGTCAGAGCACCTTGGAAAGTGGACAAACAACACTGAGTATAACAACATGAATCCCATC
 S S E H P W K W T N N T E Y N N M N P I
 CTAGGAGTGGGAAGATATGCCTACCTGAGCAGCGATAGGATCAGCAGTTCGAGGAGCTAT
 L G V G R Y A Y L S S D R I S S S R S Y
 ATAAATCGGATGTGGATCTGTAGCAAGCTCAACAACCTATAACCTCCATTGCCAAACTCCT
 I N R M W I C S K L N N Y N L H C Q T P
 CCTGTCTAAGCTTAAAGGGCGAATTCTGC
 P V -

T234C ... GTT (Val) → GTC (Val) – nezmění aminokyselinovou sekvenci

Obr. 10: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence inzertu z klonu C53, odpovídající sekvenci genu pro Clr-g, a popis vzniklých mutací. Zeleně jsou vyznačeny nukleotidy, které se shodují se sekvencí genu pro Clr-g uloženou v bioinformatické databázi přístupné na www.ncbi.nlm.nih.gov, červeně potom nukleotidy, které se s touto sekvencí neshodují (a aminokyselina, která se kvůli této mutaci při expresi proteinu změní). Modře jsou vyznačena štěpná místa pro EcoR I, T/A nukleotidy v místě ligace inzertu jsou jednou podtrženy. Dvakrát jsou potom podtržena restriční místa NdeI (CA/TATG) a HindIII (A/AGCTT).

NNNNNNNNNNNNCNNGGNNNNNNNAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTCAT
ATGAATGCCCAGTGTGTACAGAAGCCAGAAGAGGGCAATGGACCCCTTGGAACTGGAGGT
 M N A Q C V Q K P E E G N G P L G T G G
 AAAATTGTCCAAGGAAAATGTTTCAGAATCATCTCCACTGTGTCTCCTGTTAAACTTTAC
 K I V Q G K C F R I I S T V S P V K L Y
 TGCTGCTATGGAGTGATCATGGTCCTCACTGTAGCTGTAATTGCTCTTTCTGTTGCTTTG
 C C Y G V I M V L T V A V I A L S V A L
 TCAACAAAAAAGACAGAACAGATCATAATCAACAAGACCTATGCTGCTTGCTCAAAAAAC
 S T K K T E Q I I I N K T Y A A C S K N
 TGGACTGGAGTTGGAATAAATGTTTTTATTTTTCTGGATACCCACGTAACCTGGACATTT
 W T G V G N K C F Y F S G Y P R N W T F
 GCCCAGGCCTTCTGCATGGCACAAGAGGCCCAACTAGCTCGGTTTGACAACGAGGAGGAG
 A Q A F C M A Q E A Q L A R F D N E E E
 CTGGTTTTCTAAAGAGATTCAAGGGGGATTTTGATTGCTGGATTGGCCTGCACAGAGAG
 L V F L K R F K G D F D C W I G L H R E
 TCGTCAGAGCACCCCTTGAAGTGGACAAACAACACTGAGTATAACAACATGAATCCCATC
 S S E H P W K W T N N T E Y N N M N P I
 CTAGGAGTGGGAAGATATGCCTACCTGAGCAGCGATAGGATCAGCAGTTCGAGGAGCTAT
 L G V G R Y A Y L S S D R I S S S R S Y
 ATAAATCGGATGTGGATCTGTAGCAAGCTCAACAACCTATAACCTCCATTGCCAAACTCCT
 I N R M W I C S K L N N Y N L H C Q T P
 CCTGTCTAAGCTTAAAGGGCGAATTCTGC
 P V -

A424G ... ATT (Ile) → GTT (Val) – mutace v lektinové doméně

Obr. 11: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence inzertu z klonu C54, odpovídající sekvenci genu pro Clr-g, a popis vzniklých mutací. Barevné značení je stejné jako u Obr. 10.

6. DISKUZE

Tato práce popisuje klonování a amplifikaci Clr-b a Clr-g, které patří do C-lektinové nadrodiny receptorů. Spolu s několika dalšími podobnými molekulami tvoří tyto dva receptory samostatnou rodinu – Ocil/Clr. U receptorů z této rodiny byly v dřívějších studiích zjištěny některé funkční analogie¹⁷ a dále byla sledována vysoká homologie sekvencí jednotlivých isoform Clr mezi sebou a významná podobnost se strukturou CD69, stimulačního receptoru hrajícího roli při rané fázi aktivace lymfocytů¹⁰. Srovnání aminokyselinových sekvencí Clr-b a Clr-g lze vidět na Obr. 3, kde je také ukázáno, jak rozsáhlé jsou v porovnání domény jednotlivých proteinů. Největší část receptoru zaujímá extracelulární doména, která je zodpovědná za vazbu Clr molekul na jejich receptory¹⁴ – v případě Clr-b má délku 143 aminokyselinových zbytků a u Clr-g 141; transmembránová část v obou případech čítá 21 aminokyselin; intracelulární část receptoru je znatelně kratší (Clr-b 43 aminokyselinových zbytků, Clr-g 40), přesto však je možné, že právě díky tomuto úseku by mohly probíhat nebo být aktivovány některé důležité biologické děje, například aktivace některé ze signalizačních drah.

Prvním krokem v postupu bylo navržení oligonukleotidových primerů, které by byly vhodné pro klonování a amplifikaci požadovaných receptorů. Vzhledem k tomu, že sekvence Clr-b a g se od sebe na obou koncích dostatečně liší, při navrhování primerů pro PCR-amplifikaci těchto genů se nevyskytly žádné problémy. Oba forward primery, které jsou 28 bazí dlouhé, začínají o 4 nukleotidy před iniciačním kodónem (ATG) a poskytují tak štěpné místo pro restriktivní endonukleasu NdeI (5'...CA/TATG...3'). Reverse primery, jejichž délka je 32, resp. 29 bazí, sledují nejprve strukturu konce extracelulární domény a poté za stop kodónem (TAA) pokračují dalšími pěti nukleotidy, poskytující tak štěpné místo pro restriktivní endonukleasu HindIII (5'...A/AGCTT...3'). Obě tato štěpná místa se mohou ukázat jako velmi užitečná v dalším experimentálním postupu. Pro každý z primerů byla pomocí programu OligoCalc vypočítána teoretická teplota jejich nasedání na templátové řetězce, která se pohybovala od 55 do 60°C. Proto byla také pro následnou PCR amplifikaci kompromisem zvolena teplota nasedání primerů 56 a 58°C. Ukázalo se však, že tyto teploty nejsou dostatečné, protože dochází k amplifikaci nescifických produktů a výtěžek produktů specifických je buď velmi malý, nebo nulový. Na neúspěchu

v tomto prvním pokusu se snad také mohla podílet použitá Deep Vent polymerasa, na úkor relativně vysoké přesnosti často neposkytující dostatečný výtěžek. V dalším experimentu byla proto zaměněna za Platinum Taq polymerasu, která poskytuje poměrně vysoký výtěžek, a teplota nasedání primerů byla zvýšena na 60 a 65°C. Kromě toho bylo také použito technologie "Hot Start", jejíž podstatou je zablokování aktivního centra použité DNA polymerasy proteinovým inhibitorem až do doby, kdy dojde k jeho disociaci v okamžiku první denaturace v termálním cyklátoru. Výhoda tohoto postupu spočívá ve snížení úrovně nespécifického nasedání primeru, v důsledku čehož vzrůstá výtěžek specifického PCR produktu. Teplota 65°C se ukázala jako příliš vysoká, naproti tomu však polymerace s teplotou nasedání primerů při 60°C byla účinná a bylo získáno dostatečné množství požadovaných produktů.

Ani klonování získaných fragmentů do plazmidového vektoru nebylo úplně bez problému. Při postupu byla nejprve použita souprava TOPO TA Cloning[®] firmy Invitrogen, jejíž expirační lhůta se však již chýlila ke konci. Bakterie s požadovaným inzertem nebyly získány, a pokus byl opakován se soupravou TOPO TA Cloning[®] novějšího data. V tomto případě pak bylo klonování úspěšné, a byly získány některé bakteriální kolonie s požadovaným inzertem.

K vyselektování bakterií, které obsahovaly vektor s inzertovaným PCR produktem, byl v prvním kroku použit tzv. blue/white screening, v druhém potom restrikční analýza. Blue/white screening byl navržen pouze jako orientační metoda, a v tomto rámci se ukázal býti poměrně účinný. Princip metody spočívá ve štěpení látky X-Gal na barevný produkt enzymem β -galaktosidasou. Enzym β -galaktosidasa je kódován v použitém plazmidovém vektoru genem, k jehož přerušení dochází v důsledku vložení DNA fragmentu do vektoru. Bakterie transformované takovým vektorem potom nemají schopnost rozkládat X-Gal na modré barvivo a na Petriho misce se jeví jako bílé. Někdy však na základě tohoto postupu mohou být vybrány kolonie, u kterých ještě nedošlo k úplné expresi enzymové výbavy (tomu lze v mnoha případech předejít vybráním větších bílých kolonií) nebo kolonie, do kterých byl vložen jiný než požadovaný inzert. Vkládání nespécifických inzertů do plazmidového vektoru je omezeno na úrovni PCR amplifikace/ligace použitím Platinum Taq polymerasy, jež nespécificky přidává na 3'-konec PCR produktu adenylový zbytek, a TOPO[®] vektoru, který má na svých otevřených 3'-koncích thymidylový zbytek. To pak zajišťuje zvýšenou pravděpodobnost ligace správného fragmentu do plazmidového

vektoru; na druhou stranu je však nutné, aby PCR směs byla poměrně čistá, tj. aby obsahovala pouze DNA fragmenty, jejichž vložení do vektoru je požadováno.

Restrikční analýza se pak ukázala jako spolehlivá metoda při eliminaci špatného výběru na základě dvou výše popsaných důvodů. U všech bakteriálních klonů, které byly na základě restrikční analýzy vybrány k DNA sekvenaci, se potvrdilo, že opravdu obsahují požadovaný DNA fragment.

DNA sekvenování odhalilo ve všech případech některé drobné mutace v nukleotidových sekvencích oproti sekvencím, které jsou uloženy v bioinformatických databázích. Tyto mutace vznikají v důsledku chyb v replikaci – každá polymerasa provádí replikaci pouze s určitou mírou přesnosti (a u Platinum Taq polymerasy není tato míra přesnosti ve srovnání s jinými polymerasami příliš vysoká), a chyby vedoucí k mutacím jsou tedy nevyhnutelné.

U Clr-b došlo k mutaci v intracelulární části receptoru (A129G), která zaměnila původní aminokyselinu serin za glycin. Druhá mutace v této sekvenci (T431C) by se při expresi proteinu neprojevila. U získaných sekvencí Clr-g lze v obou případech pozorovat záměnu v jednom nukleotidu. V prvním případě se jedná o mutaci, která nepozmění aminokyselinovou sekvenci (T234C), v druhém případě se potom vyskytla záměna, která by v aminokyselinovém řetězci způsobila mírnou mutaci v lektinové doméně (A424G) – záměnu původního isoleucinu za valin.

Pro další pokračování v experimentech je především vhodná molekula Clr-g z klonu C53 bez mutací v aminokyselinové sekvenci, použití molekuly Clr-g z druhého klonu (C54) je z důvodu mutace v lektinové doméně nepříliš vhodné, popř. je nutné mutaci opravit. Mutace v intracelulární části Clr-b nebude překážkou pro další studie molekuly, protože pro následnou rekombinantní expresi proteinu bude vybrán jen jeho extracelulární fragment odpovídající C-lektinové doméně.

Dalším postupem v experimentech bude tedy oprava mutací a dále pak exprese proteinů, které amplifikované molekuly kódují. Ty poslouží pro strukturální studie a dále bude možné přejít ke studiím funkčním, především k výzkumu vzájemné interakce Clr-b a g a jejich receptorů, myších Nkrp1.

7. ZÁVĚR

Byly amplifikovány geny pro molekuly Clr-b a Clr-g, ligandy myších receptorů z rodiny Nkrp1.

Výše uvedené geny byly klonovány do plazmidového vektoru, získaný inzert byl sekvenován a sekvence srovnána s bioinformatickými databázemi.

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- 1 Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. TRITON s r.o., Praha (2005)
- 2 Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J.: *Immunology*, 5th Edition. W. H. Freeman and Company, New York (2003)
- 3 Vodrážka, Z.: *Biochemie 1*. Academia, Praha (1992)
- 4 Carlyle, J. R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L. H., Rousselle, E., Troke, A. D., Proteau, M.-F., Makrigiannis, A. P.: Molecular and Genetic Basis for Strain Dependent NK1.1 Alloreactivity of Mouse NK Cells. *J. Immunol.* 176(12): 7511-7524 (2006)
- 5 Hao, L., Klein, J., Nei, M.: Heterogenous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(9): 3192-3197 (2006)
- 6 Colonna, M., Moretta, A., Vély, F., Vivier, E.: A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol. Today* 21(9): 428-431 (2000)
- 7 Parham, P.: NK cell receptors: Of missing sugar and missing self. *Curr. Biol.* 10(5): R195-R197 (2000)
- 8 Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F. M.: Immune Functions Encoded by the Natural Killer Gene Complex. *Nat. Rev. Immunol.* 3(4): 304 – 316 (2003)
- 9 Trowsdale, J.: Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes. *Immunity* 15(3): 363-374 (2001)
- 10 Natarajan, K., Sawicki, M. W., Margulies, D. H., Marriuzza, R. A.: Crystal Structure of Human CD69: A C-Type Lectin-Like Activation Marker of Hematopoietic Cells. *Biochemistry* 39(48): 14779-14786 (2000)
- 11 Kveberg, L., Bäck, C. J., Dai, K.-Z., Inngjerdigen, M., Rolstad B., Ryan, J. C., Vaage, J. T., Naper, C.: The Novel Inhibitory NKR-P1C Receptor and Ly49s3 Identify Two Complementary, Functionally Distinct NK Cell Subsets in Rats. *J. Immunol.* 176(7): 4133-4140 (2006)
- 12 Li, J., Rabinovich, B. A., Hurren, R., Shannon, J., Miller, R. G.: Expression cloning and function of the rat NK activating and inhibitory receptors NKR-P1A and -P1B. *Int. Immunol.* 15(3): 411-416

- 13 Kogelberg, H., Lawson, A. M., Muskett, F. W., Carruthers, R. A., Feizi, T.: Expression in *Escherichia coli*, Folding in Vitro, and Characterization of the Carbohydrate Recognition Domain of the Natural Killer Cell Receptor NKR-P1A. *Protein Expr. Purif.* 20(1): 10-20 (2000)
- 14 Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M.: Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR-P1 family of natural killer cell receptors. *Nat. Immunol.* 4(8): 801-807 (2003)
- 15 Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H., Raulet, D. H.: Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(10): 3527-3532 (2004)
- 16 Zhou, H., Kartsogiannis, V., Hu, Y. S., Elliott, J., Quinn, J. M. W., McKinstry, W. J., Gillespie, M. T., Ng, K. W.: A Novel Osteoblast-derived C-type Lectin That Inhibits Osteoclast Formation. *J. Biol. Chem.* 276(18): 14916-14923 (2001)
- 17 Zhou, H., Kartsogiannis, V., Quinn, J. M. W., Ly, C., Gange, C., Elliott, J., Ng, K. W., Gillespie, M. T.: Osteoclast Inhibitory Lectin, a Family of New Osteoclast Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 277(50): 48808-48815 (2002)
- 18 Hu, Y. S., Zhou, H., Myers, D., Quinn, J. M. W., Atkins, G. J., Ly, C., Gange, C., Kartsogiannis, V., Elliott, J., Kostakis, P., Zannettino, A. C. W., Cromer, B., McKinstry, W. J., Findlay, D. M., Gillespie, M. T., Ng, K. W.: Isolation of a Human Homolog of Osteoclast Inhibitory Lectin That Inhibits the Formation and Function of Osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 19(1): 89-99 (2004)
- 19 Gange, C. T., Quinn, J. M. W., Zhou, H., Kartsogiannis, V., Gillespie, M. T., Ng, K. W.: Characterization of Sugar Binding by Osteoclast Inhibitory Lectin. *J. Biol. Chem.* 279(28): 29043-29049 (2004)
- 20 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)
- 21 Invitrogen Corporation: TOPO TA Cloning[®]: Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products, User Manual, Version U (firemní literatura, ke stažení na http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf) (2006)
- 22 Berghammer, H., Auer, B.: „Easypreps“: fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* 14(4), 524-528 (1993)

