

Výzkum vzájemné interakce membránových receptorů NKR-P1D a Clrb

Interakce myších receptorů NKR-P1D a Clrb byla poprvé popsána jako nový typ „MHC class-I independent missing-self recognition“ poskytující ochranu před NK buněčným zabíjením.^[1] Pozdější studie ale přinesla výsledky zpochybňující tato data a naznačující, že NKR-P1D váže Clrb pouze velmi slabě, jestli vůbec.^[2]

Abychom vnesli světlo na tyto diskrepantní výsledky, rekombinantně jsme připravili extracelulární domény obou receptorů v bakteriích *E. coli* a proteiny renaturovali *in vitro*. Kvalita renaturace byla ověřena určením zapojení disulfidických můstků a změřením ¹H/¹⁵N-HSQC spekter. Pomocí gelové filtrace a analytické ultracentrifugy nebylo možno poskytnout přesvědčivé důkazy pro existenci interakce. Slabá, ale specifická interakce byla pozorována za použití SPR techniky. Tato interakce překvapivě vykazovala pH závislost. Interakce mezi proteiny v roztoku byla následně imobilizována pomocí techniky chemického zesítnění proteinů. Byla použita činidla EDC, DSG a DSS. Reakční směsi byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a dimery byly štěpeny proteasami v gelu. Pomocí FTMS bylo možné identifikovat peptidy z obou proteinů, které byly spojeny některým ze síťovacích činidel.

Díky nedávno vyřešeným strukturám proteinů NKR-P1A a Clrg, které sdílí s NKR-P1D a Clrb 86% a 76% sekvenční identitu bylo možné vytvořit homologní modely obou proteinů i interagujícího páru dimerů. Část dat získaných síťovacím experimentem dle očekávání zapadala do modelu dvou homodimerů interagujících klasickým „face-to-face“ způsobem. Nezanedbatelná část pozorovaných spojení ale nemohla být vysvětlena tímto modelem, s ohledem na délku ramének použitých činidel. Tato pozorování nás vedla k návrhu modelu, podle kterého jsou tyto proteiny schopny interakce vždy jednoho homodimeru současně se dvěma homodimery proteinu druhého. Toto by navíc vedlo k výraznému zvýšení celkové avidity, i přesto že afinita jednotlivých monomerů může být velmi nízká, jak shodně naznačují gelová filtrace, analytická ultracentrifuga i povrchová plasmonová resonance.

1. Iizuka, K. et. al., Nat. Immunol., 2003, **4**, 801 – 807

2. Carlyle, J. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2004, **101**, 3527 – 3532