

Studium receptor – ligandového páru NKR-P1F a Clrg

Myší receptor – ligandový pár NKR-P1F a Clrg je důležitou součástí receptorového „zipu“, který vzniká při kontaktu mezi NK buňkou a cílovou buňkou. Tento pár představuje jeden z příkladů nedávno objevených interakcí typu lektin-lektin, které jsou důležité při rozpoznání u mnoha imunocytů.

Za účelem studia struktury těchto proteinů a jejich vzájemné interakce byly připraveny vektory pET-30a(+) pro bakteriální expresi. Tyto vektory kódovaly části extracelulárních domén obou proteinů. Po indukci IPTG byly proteiny produkovány ve formě inkluzních tělísek, ze kterých byly renaturovány *in vitro*. Renaturované proteiny byly purifikovány kombinací ionexové a gelové chromatografie.

Konstrukt pro protein NKR-P1F poskytoval při použití standardních renaturačních protokolů pouze malé výtěžky solubilního proteinu, a navíc vyvstaly problémy s reprodukovatelností výsledků renaturace. V případě Clrg nebyly standardní postupy skládání úspěšné. Kvůli tomu bylo přistoupeno k mutaci lichého cysteinu, který nezapadal do obvyklého vzoru pro tyto receptory. Cystein byl mutován na serin a produkt výsledného C148S konstruktů již bylo možno renaturovat *in vitro*.

Dále bylo zjištěno, že přidavek (benzyl dimethylammonia)propansulfonátu do renaturačního pufru zvyšuje výtěžek solubilního Clrg proteinu. Identita a čistota obou proteinů, stejně jako kvalita renaturace byly zkontrolovány pomocí hmotnostní spektrometrie s iontově cyklotronovou rezonancí. Za použití modifikovaných protokolů elektroforézy a enzymatického štěpení s kombinací kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie bylo určeno zapojení disulfidových můstků u obou proteinů. Pozorované zapojení odpovídalo očekávanému vzoru pro molekuly odvozené od C-lektinů.

Protein Clrg byl analyzován pomocí analytické ultracentrifugace. Metodou sedimentační rychlosti byla získána hodnota sedimentačního koeficientu a bylo zjištěno, že protein se v roztoku vyskytuje převážně ve formě monomeru. Krystalizace proteinu Clrg byla úspěšná a bylo tedy možno naměřit difrakční data na synchrotronovém radiačním zdroji Bessy II, Helmholtz Zentrum Berlín. Fázový problém byl vyřešen molekulárním nahrazením s využitím struktury lidského proteinu CD 69. Struktura Clrg je vůbec první rozřešenou strukturou z celé Clr rodiny.

Financováno z grantů Ministerstva školství České Republiky (MSM_21620808 a 1M0505), a Grantové Agentury České Republiky (GAČR 305/09/H008 and 303/09/0477).