

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Martin Čonka

PŘÍPRAVA REKOMBINATNÍCH EXTRACELULÁRNÍCH  
DOMÉN LEUKOCYTÁRNÍCH RECEPTORŮ  
AICL A NKR-P1C<sup>BALB</sup>

Expression of the recombinant extracellular parts of  
leukocyte receptors AICL a NKR-P1C<sup>BALB</sup>

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Daniel Rozbeský

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a MSM0021620808.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 5. května 2012.

## Poděkování

Zde bych rád poděkoval školiteli méj diplomové práce RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za možnost pracovat na této práci, za vedení této práce a za všechny jeho cenné rady. Poděkování patří též Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracování této diplomové práce v jeho laboratoři. Další velký dík patří mému konzultantovi Mgr. Danielu Rozbeskému, který mi poskytoval především praktické rady, jež jsem použil při řešení této práce a také za jeho neustálou podporu. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Danielu Kavanovi, Ph.D. a RNDr. Hynkovi Mrázkovi, Ph.D. za jejich užitečné rady, které jsem nejednou využil. Také bych rád poděkoval všem členům Laboratoře přirozené imunity za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr patří velké poděkování celé méj rodině a především rodičům, kteří mě po celou dobu mého studia plně podporovali.

## Obsah

Poděkování .....	3
Obsah.....	4
Seznam symbolů a zkratk .....	7
Abstrakt v českém jazyce .....	10
Abstrakt v anglickém jazyce.....	11
Klíčová slova v českém jazyce .....	12
Klíčová slova v anglickém jazyce.....	12
1. LITERÁRNÍ ÚVOD .....	13
1.1 Imunitní systém a jeho vlastnosti .....	13
1.2 Komponenty imunitního systému .....	15
1.3 NK buňky – základní popis a morfologie.....	16
1.4 Vývoj a výskyt NK buněk .....	17
1.5 Cytotoxické funkce NK buněk.....	18
1.6 Regulační funkce NK buněk.....	19
1.7 Identifikační mechanismy NK buněk.....	20
1.8 Receptory NK buněk .....	22
1.8.1 Aktivační a inhibiční receptory .....	22
1.8.2 Imunoglobulinové receptory .....	23
1.8.3 C-lektinové receptory.....	24
1.8.4 Myší NKR-P1C z kmene BALB/c (mNKR-P1C <sup>BALB</sup> ) reprezentující rodinu NKR-P1.....	25
1.8.5 Lidský AI1L (hAI1L) reprezentující rodinu receptorů příbuzných s molekulou CD69 .....	27
2. CÍL PRÁCE .....	29
3. MATERIÁL.....	30
3.1 Přístroje a pomůcky.....	30
3.2 Soupravy pro izolaci DNA .....	31
3.3 Chemikálie .....	31
3.4 Primery pro PCR.....	33
3.5 Enzymy .....	33
3.6 Vektory .....	34
3.7 Bakteriální kmeny .....	34

3.8	Roztoky.....	34
3.9	Média.....	36
4.	METODY.....	37
4.1	Příprava expresních plasmidů.....	37
4.1.1	Izolace celkové RNA z myši sleziny.....	37
4.1.2	Reversní transkripce.....	37
4.1.3	PCR amplifikace.....	38
4.1.4	Agarosová elektroforéza.....	38
4.1.5	Ligace do klonovacího vektoru pBluescript SK+.....	39
4.1.6	Transformace kompetentních buněk.....	39
4.1.7	Selekce klonů obsahujících požadovaný konstrukt.....	40
4.1.8	Příprava linearisovaného plasmidu pET-30a(+) a insertu.....	40
4.1.9	Stanovení koncentrace DNA.....	41
4.1.10	Ligace insertů do expresního vektoru pET-30a(+)......	41
4.1.11	DNA sekvenování připravených plasmidů.....	41
4.2.	Příprava rekombinantních proteinů.....	41
4.2.1	Transformace kompetentních buněk.....	41
4.2.2	Selekce produkčních klonů.....	42
4.2.3	SDS-PAGE.....	43
4.2.4	Identifikace produkovaných proteinů.....	44
4.2.5	Velkoobjemová produkce proteinů.....	45
4.2.6	Izolace inkluzních tělísek.....	45
4.2.7	Optimalizace <i>in vitro</i> renaturace mNKR-P1C <sup>BALB</sup> a hAICL.....	46
4.2.8	Ionexové chromatografie.....	48
4.2.9	Gelové filtrace na Superdexu 200.....	48
4.2.10	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové.....	49
4.3	Charakterizace připravených proteinových preparátů pomocí.....	50
	hmotnostní spektrometrie.....	50
4.3.1	Stanovení disulfidických můstků.....	50
4.3.2	Stanovení molekulových hmotností obou proteinů.....	51
5.	VÝSLEDKY.....	52
5.1	Úvod k výsledkům.....	52

5.2	Příprava expresních plasmidů .....	53
5.2.1	Izolace RNA a reversní transkripce .....	53
5.2.2	PCR amplifikace .....	53
5.2.3	Ligace do klonovacího vektoru pBluescript SK+ .....	54
5.2.4	Transformace kompetentních buněk a selekce klonů .....	54
	obsahujících požadované konstrukty .....	54
5.2.5	Klonování do expresního vektoru pET-30a(+) .....	56
5.3	Příprava rekombinantních proteinů .....	57
5.3.1	Transformace kompetentních buněk .....	57
5.3.2	Selekce produkčních klonů .....	57
5.3.3	Identifikace produkovaných proteinů .....	58
5.3.4	Velkoobjemová produkce proteinů a izolace inkuzních tělísek .....	59
5.3.5	Optimalizace <i>in vitro</i> renaturace mNKR-P1C <sup>BALB</sup> a hAICL .....	60
5.3.6	Ionexová chromatografie mNKR-P1C <sup>BALB</sup> na Q Sepharose FF .....	61
5.3.7	Ionexová chromatografie hAICL na SP Sepharose FF .....	62
5.3.8	Gelové filtrace mNKR-P1C <sup>BALB</sup> na Superdexu 200 .....	63
5.3.9	Gelové filtrace hAICL na Superdexu 200 .....	65
5.3.10	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové .....	66
5.4	Charakterizace připravených proteinových preparátů pomocí .....	67
	hmotnostní spektrometrie .....	67
5.4.1	Stanovení disulfidických můstků .....	67
5.4.2	Stanovení molekulových hmotností obou proteinů .....	68
6.	DISKUSE .....	70
7.	ZÁVĚR .....	74
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	75

## Seznam symbolů a zkratek

### Symboly

<b>A</b>	absorbance
<b>c</b>	koncentrace ( $\text{mol/dm}^3$ , $\text{mg/ml}$ )
<b>g</b>	gravitační zrychlení ( $9,80665 \text{ m sec}^{-2}$ )
<b>t</b>	čas (min)
<b>T</b>	teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )

### Zkratky

<b>AcN</b>	acetonitril
<b>ADCC</b>	cytotoxická reakce založená na protilátkách ( <b>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</b> )
<b>APC</b>	buňky prezentující antigen ( <b>Antigen Presenting Cells</b> )
<b>APS</b>	peroxodisíran amonný ( <b>Amonium PerSulfate</b> )
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin ( <b>Bovine Serum Albumin</b> )
<b>CD</b>	diferenciační antigen ( <b>Cluster of Differentiation</b> )
<b>Clr</b>	protein příbuzný C-lektinům ( <b>C-Lektin Related Protein</b> )
<b>CRD</b>	lektinová doména ( <b>Carbohydrate Recognition Domain</b> )
<b>DAPI10/12</b>	adaptorový protein o velikosti 10 kDa nebo 12 kDa aktivující DNAX ( <b>DNAX-Activating Protein of 10/12 kDa</b> )
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ELP</b>	časný lymfoidní prekurzor ( <b>Early Lymphoid Progenitor</b> )
<b>FasL</b>	ligand stimulující apoptosu ( <b>apoptosis stimulating Fragment Ligand</b> )
<b>Fc</b>	část molekuly protilátky ( <b>Fragment, crystallizable</b> )
<b>FcγRIII</b>	receptor III pro Fc část IgG
<b>GM-CSF</b>	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů ( <b>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</b> )
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina

<b>HLA</b>	lidské MHC ( <b>H</b> uman <b>L</b> eukocyte <b>A</b> ntigen)
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
<b>IFN</b>	interferon
<b>IgG</b>	imunoglobulin typu G
<b>IL</b>	interleukin
<b>IPTG</b>	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
<b>ITAM</b>	imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu ( <b>I</b> mmunoreceptor <b>T</b> yrosin-based <b>A</b> ctivation <b>M</b> otif)
<b>ITIM</b>	imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu ( <b>I</b> mmunoreceptor <b>T</b> yrosin-based <b>I</b> nhibition <b>M</b> otif)
<b>KIR</b>	zabíječský receptor imunoglobulinového typu ( <b>K</b> iller cell <b>I</b> munoglobulin-like <b>R</b> eceptors)
<b>LB medium</b>	Luria-Bertani medium
<b>LGL</b>	velké granulární lymfocyty ( <b>L</b> arge <b>G</b> ranular <b>L</b> ymphocytes)
<b>LLT1</b>	lektinům podobný transkript ( <b>L</b> ektin-like <b>T</b> ranscript <b>1</b> )
<b>Ly49</b>	rodina myších receptorů C-lektinového typu ( <b>L</b> ymphocyte antigen <b>49</b> )
<b>MALDI</b>	ionizace laserovou desorpčí za přítomnosti matrice ( <b>M</b> atrix <b>A</b> ssisted <b>L</b> aser <b>D</b> esorption <b>I</b> onization)
<b>MeOH</b>	methanol
<b>MICA/B</b>	proteiny strukturně podobné MHC glykoproteinům I. třídy ( <b>M</b> HC-class- <b>I</b> -like <b>C</b> hain <b>A/B</b> )
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex ( <b>M</b> ajor <b>H</b> istocompatibility <b>C</b> omplex)
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie ( <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry)
<b>NCR</b>	receptory vyskytující se na NK buňkách ( <b>N</b> atural <b>C</b> ytotoxicity <b>R</b> eceptor)
<b>NDSB 256</b>	dimethylbenzylamonium propan sulfát ( <b>N</b> on <b>D</b> etergent <b>S</b> ulfo <b>B</b> etaines)
<b>NK</b>	přirozený zabíječ ( <b>N</b> atural <b>K</b> iller)
<b>NK1.1</b>	receptor NK buněk, dnes nazývaný NKR-P1C ( <b>N</b> atural <b>K</b> iller antigen <b>1.1</b> )
<b>NKC</b>	genový komplex přirozených zabíječů ( <b>N</b> atural <b>K</b> iller <b>C</b> omplex)
<b>NKG2A-F</b>	rodina NK receptorů C-lektinového typu ( <b>N</b> atural <b>K</b> iller <b>G</b> roup <b>2</b> )
<b>NKp</b>	NK buněčný receptor ( <b>N</b> atural <b>K</b> iller <b>p</b> rotein)



<b>NKR-P1</b>	rodina receptorů NK buněk ( <b>Natural Killer Receptor-Protein 1</b> )
<b>OD</b>	optická densita ( <b>Optical Density</b> )
<b>PAGE</b>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ( <b>PolyAkrylamide Gel Electrophoresis</b> )
<b>PAMP</b>	molekulární struktury spojené s patogeny ( <b>Pathogen-Associated Molecular Pattern</b> )
<b>PIPES</b>	piperazine-N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina)
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonylfluorid
<b>PRR</b>	receptory rozpoznávající struktury spojené s patogeny ( <b>Pattern Recognition Receptor</b> )
<b>PVDF</b>	polyvinylidendifluorid
<b>SDS</b>	dodecylsírán sodný ( <b>Sodium Dodecyl Sulfate</b> )
<b>SHIP</b>	inositolová fosfatasa ( <b>SH2-domain-containing Inositol polyphosphate 5-Phosphatase</b> )
<b>SHP-1/2</b>	protein tyrosinové fosfatasy ( <b>SH2-domain-containing protein tyrosine Phosphatase 1/2</b> )
<b>Syk</b>	protein-tyrosin kinasa ( <b>Spleen tyrosine kinase</b> )
<b>T<sub>C</sub></b>	cytotoxický T lymfocyt ( <b>Cytotoxic T Cell</b> )
<b>TCEP</b>	<b>Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine</b>
<b>TCR</b>	receptor T lymfocytů ( <b>T-Cell Receptor</b> )
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
<b>TFA</b>	trifluoroctová kyselina ( <b>TriFluoroacetic Acid</b> )
<b>T<sub>H</sub></b>	pomocný T lymfocyt ( <b>Helper T Cell</b> )
<b>TNF</b>	faktor nekrotizující nádory ( <b>Tumor Necrosis Factor</b> )
<b>TLR</b>	receptor podobný receptoru Toll ( <b>Toll-Like Receptor</b> )
<b>TOF</b>	doba letu ( <b>Time Of Flight</b> )
<b>TRAIL</b>	ligand, který spouští apoptosu ( <b>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</b> )
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galaktopyranosid
<b>ZAP-70</b>	protein-tyrosin kinasa asociovaná se zeta řetězcem ( <b>Zeta-chain-Associated Protein kinase 70</b> )

## Abstrakt v českém jazyce

NK buňky jsou řazeny mezi populaci lymfocytů, která je schopna cytotoxicky usmrtit některé nádorové či viry infikované buňky. Předmětem této diplomové práce je myší NK buněčný receptor mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a lidský leukocytární receptor hAICL. mNKR-P1C<sup>BALB</sup> je řazen mezi aktivační receptory a je schopen aktivovat cytotoxické funkce NK buněk vůči cílovým buňkám. Receptor hAICL je ligandem lidského aktivačního NK buněčného receptoru NKp80. Interakce mezi těmito proteiny též vede k aktivaci efektorových funkcí NK buněk. Cílem této práce bylo připravit rekombinantní extracelulární části receptorů mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL, optimalizovat jejich *in vitro* renaturaci a charakterizovat tyto proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie. Takto získané proteinové preparáty poslouží k dalšímu studiu struktury extracelulárních částí těchto leukocytárních receptorů.

## **Abstrakt v anglickém jazyce**

NK cells represent a population of lymphocytes which are able to kill certain tumor cells or virally infected cells. The subject of the diploma thesis is a mouse NK cell receptor mNKR-P1C<sup>BALB</sup> and a human leukocyte receptor hAICL. The mNKR-P1C<sup>BALB</sup> belongs to the activating receptors and is able to activate the cytotoxic functions of NK cells. The hAICL receptor is a ligand to the NKp80 which is an activating receptor of NK cells. Interaction between these two proteins leads to the activation of effector functions of NK cells as well. The aim of this work was the preparation of the recombinant extracellular parts of receptors mNKR-P1C<sup>BALB</sup> and hAICL, the optimization of their *in vitro* refolding and the characterization of proteins using mass spectrometry. The proteins samples will be used for further structural study of the extracellular parts of these leukocytes receptors.

## **Klíčová slova v českém jazyce**

NK buňky

receptory NK buněk

NKR-P1C

AICL

## **Klíčová slova v anglickém jazyce**

NK cells

receptors of NK cells

NKR-P1C

AICL

# 1. LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1 Imunitní systém a jeho vlastnosti

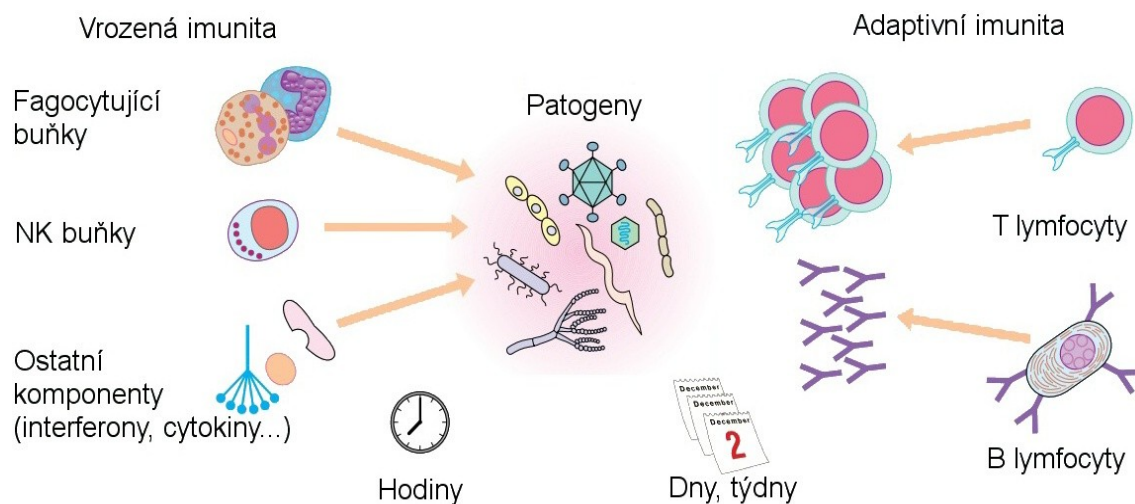
Imunitní systém udržuje přirozenou rovnováhu vnitřního prostředí organismu a zajišťuje jeho ochranu před škodlivinami. Tyto mohou být původem z vnějšího prostředí, ve kterém se organismus nachází (exogenní), ale také z vnitřního prostředí samotného organismu (endogenní). Mezi exogenní škodliviny řadíme např. bakterie, viry a různé toxické látky. Zástupce endogenních škodlivin představují nádorové buňky, které významně ohrožují organismus. Schopnost organismu čelit exogenním resp. endogenním škodlivinám je označována jako obranyschopnost resp. imunitní dohled. Souhrnně se všechny potenciální škodliviny nazývají patogeny. Reakce imunitního systému proti patogenům je označována jako imunitní odpověď. Tato odpověď však není důsledkem reakce na celý patogen např. bakterii nebo nádorovou buňku, ale pouze na jejich specifickou část – antigen. Významnou funkcí imunitního systému je též autotolerance, kdy imunitní systém rozeznává buňky vlastního organismu a udržuje vůči nim toleranci [1, 2, 3].

Společně s vzrůstajícím počtem patogenů se rozvíjí i imunitní systém a jeho mechanismy. Dnes rozeznáváme dva hlavní typy mechanismů působení imunitního systému: vrozenou a adaptivní imunitu. Oba tyto mechanismy společně spolupracují a navzájem se doplňují [3].

Vrozená imunita, také označovaná jako antigenně nespecifická, je evolučně starší a nerozlišuje typ škodliviny resp. antigenu. Její hlavní funkce je co nejrychleji zareagovat na patogen a určitým způsobem zastavit nebo alespoň zpomalit jeho vliv a šíření v těle hostitele. Poskytuje tedy první obrannou linii v boji proti škodlivině. Většina složek tohoto obranného mechanismu se nachází v organismu již před začátkem infekce. Vrozená imunita je složena z mnoha faktorů: fagocytujících buněk, které pohlcují patogen a brání tak jeho dalšímu kontaktu s tkání (makrofágy, neutrofily), tělních bariér (pokožka, hematoencefalická bariéra, kyselé prostředí žaludku), antimikrobiálních látek (enzymy rozkládající mikroorganismy), komplementového systému a nespecifických mediátorů další imunitní odpovědi (interferony a interleukiny). Mezi další buněčné složky řadíme i tzv. přirozené zabijáče (NK buňky), kteří jsou schopni cytotoxicky

zahubit nádorové či viry infikované buňky. Hlavní výhodou tohoto typu imunity je rychlost nástupu imunitní reakce, která se pohybuje řádově v hodinách [1, 3, 4].

Adaptivní imunita, nazývaná též antigeně specifická, je z evolučního hlediska mnohem mladší. Na rozdíl od vrozené imunity její funkce spočívá v cíleném zneškodnění konkrétních patogenů. Mezi zástupce tohoto imunitního mechanismu řadíme B a T lymfocyty. Jednotlivé antigeny jsou prezentovány tzv. antigen prezentujícími buňkami (APC, z angl. antigen presenting cells) T a B lymfocytům v lymfatických orgánech. B lymfocyty následně produkují specifické protilátky proti konkrétnímu antigenu. Tyto protilátky se navazují na daný patogen a opsonizují ho. Takto opsonizovaný patogen je rozeznáván např. NK buňkami, které napadené buňky cytotoxicky zahubí. T lymfocyty na rozdíl od B lymfocytů neprodukují protilátky a jsou schopny usmrcovat buňky obsahující patogen (např. APC buňky). Nástup účinku adaptivní imunity trvá podstatně déle než imunity vrozené, řádově několik dní. Pokud však dojde k infikování organismu v budoucnu stejným patogenem, se kterým se již dříve setkal, tak se mnohem rychleji a silněji aktivují T a B lymfocyty než při první infekci a nastane velmi brzké potlačení této infekce. Tento princip je označován jako imunologická paměť a je podstatou většiny očkování proti různým onemocněním [1, 3, 4].



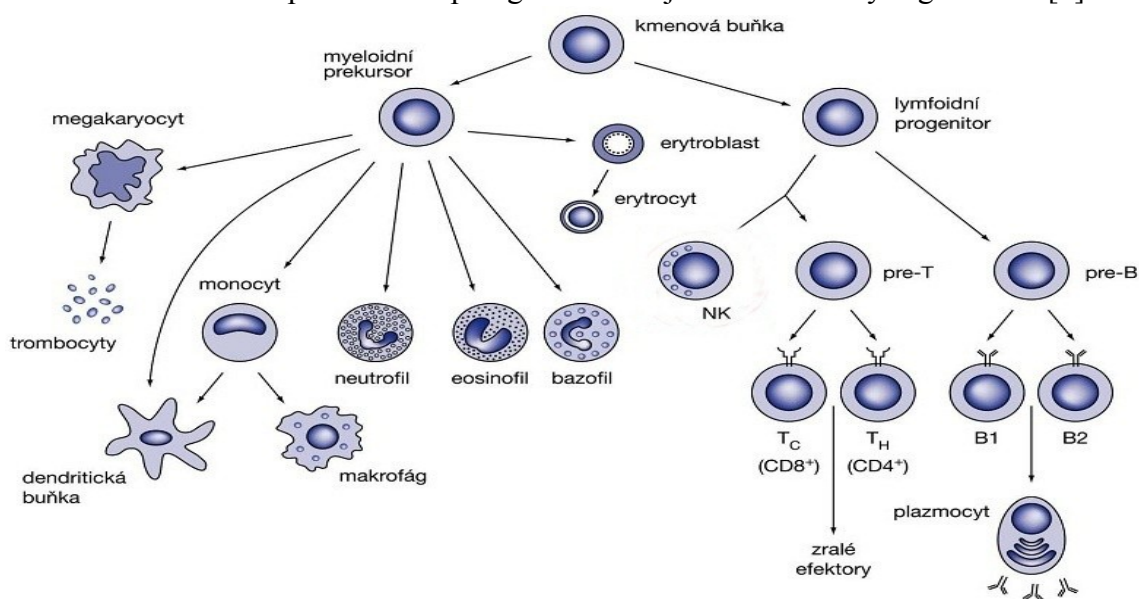
Obr. 1: Srovnání vrozené a adaptivní imunity. Upraveno podle [4].

## 1.2 Komponenty imunitního systému

Imunitní systém je složen z humorální a buněčné části. Protilátky, cytokiny, interferony, sérové proteiny, složky komplementu, adhezivní, kostimulační a další molekuly reprezentují skupinu humorální části. Naopak buněčná část je tvořena různými buňkami imunitního systému (imunocyty), které spolu s pojivovou tkání a dalšími látkami tvoří lymfatické orgány. Imunitní reakce organismu je zajištěna interakcí mezi buněčnými a humorálními složkami [2].

Mezi hlavní zástupce imunocytů patří různé druhy bílých krvinek (leukocytů). Všechny druhy leukocytů se diferencují z pluripotentních kmenových buněk (Obr. 2). Kmenové buňky se nacházejí v kostní dřeni a jsou charakterizovány povrchovými molekulami CD34 a CD117. Vlivem různých činitelů se z nich dále vyvíjí konkrétní diferencované buňky. Přímo z těchto kmenových buněk vznikají myeloidní a lymfoidní buněčné linie. Z myeloidního prekursoru se mohou tvořit červené krvinky, krevní destičky, různé typy granulocytů (neutrofil, eosinofil, bazofil) a monocytů (makrofágy a dendritické buňky) odpovědných za fagocytózu. Makrofágy a dendritické buňky představují antigen prezentující buňky, které se podílejí na aktivaci adaptivní imunity [2, 3].

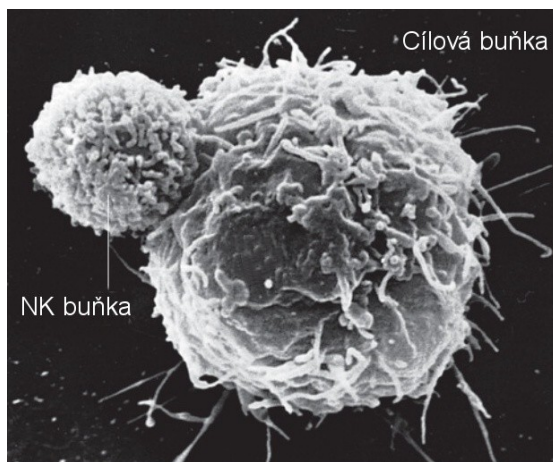
NK buňky, cytotoxické a pomocné T lymfocyty a B lymfocyty řadíme mezi populaci lymfocytů diferencovaných z lymfoidního progenitoru. Tito zástupci leukocytů hrají velmi důležitou úlohu při likvidaci patogenů ohrožujících hostitelský organismus [2].



Obr. 2: Vývoj jednotlivých druhů imunocytů. Přejato z [2].

### 1.3 NK buňky – základní popis a morfologie

V roce 1975 byla pracovní skupinou R. Kiesslinga identifikována buněčná populace lymfocytů, která byla schopná cytotoxicky usmrtit některé nádorové či virem infikované buňky, a to bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciace. Tyto „nové“ lymfocyty byly následně kvůli svým vlastnostem označeny jako přirození zabíječi (NK buňky, z angl. Natural Killers, Obr. 3). Ačkoliv byl jejich objev nejprve brán vědeckou veřejností s rezervou, počáteční pozorování byla velmi brzy potvrzena a termín NK buňky se stal nedílnou součástí imunologického slovníku. Mechanismus jejich působení však zůstal po dlouhou dobu neobjasněn [5, 6]. V organismu hrají klíčovou roli nejen při imunitní odpovědi proti nádorovým nebo virem infikovaným buňkám (především herpesvirem), ale také při transplantaci orgánů a v těhotenství [7, 8].



Obr. 3: Fotografie NK buňky v interakci s cílovou buňkou pořízená elektronovou mikroskopií. Přejato a upraveno podle [1].

V 90. letech 20. století byly NK buňky klasifikovány jako velké granulózní lymfocyty, označované zkratkou LGL (z angl. Large Granular Lymphocytes). Tento název vyplynul z jejich morfologie, jelikož obsahují velké množství cytotoxických granulí [6]. Od B a T lymfocytů se odlišují především absencí specifických povrchových receptorů pro antigen. Na rozdíl od cytotoxických T lymfocytů rozeznávají buňky se sníženou nebo vůbec žádnou expresí MHC glykoproteinů I. třídy. Díky tomuto faktu a jejich vlastnostem tvoří důležitou spojnicí mezi adaptivní a vrozenou imunitou [6, 9].

Jsou charakterizovány přítomností povrchových molekul CD16 (FcγRIII receptor rozeznávající Fc část IgG odpovědný za cytotoxickou reakci NK buněk realizovanou pomocí ADCC) a CD56 (adhezivní molekula). Mohou na svém povrchu také exprimovat receptor CD161 (označovaný též jako NKR-P1) a neexprimují molekulu CD3 (protein asociující s TCR). U myši se pak vyskytuje molekula NK1.1, která však není specifická pro všechny myší kmény [6, 10]. Jelikož se mnohé z těchto



povrchových molekul vyskytují i na dalších lymfocytech nelze hovořit o specifických znacích NK buněk. Naopak receptory NKp46, NKp30 a NKp44 byly identifikovány jako jejich specifické markery. Reprezentují skupinu receptorů označovanou jako NCR (z angl. Natural Cytotoxicity Receptor). NKp46 byl popsán jako zatím nejspecifičtější znak NK buněk u člověka, myši a potkana [11].

Kromě funkcí popsaných výše hrají NK buňky také významnou roli při autoimunitních onemocněních, astmatu, boji s virem HIV a také při obraně organismu proti různým parazitům (např. bakteriím rodu *Salmonella*, *Listeria* a dalším) [12, 13].

#### **1.4 Vývoj a výskyt NK buněk**

NK buňky se diferencují z lymfoidního progenitoru společně s B a T lymfocyty (kap. 1.2). Další nedávno objevenou možností jejich vzniku je vývoj z tzv. raného lymfoidního prekursoru (označ. ELP), ze kterého vznikají i některé typy buněk myeloidní linie [14]. Hlavním místem vývoje NK buněk je především kostní dřeň. Nezralé NK buňky byly u myši též pozorovány v játrech a thymu, což naznačuje, že zřejmě dochází k jejich vývoji i zde [15, 16]. U lidí byl pak pozorován vývoj NK buněk také v lymfatických uzlinách [17].

Charakteristickým rysem nezralých přirozených zabíječů diferencovaných v kostní dřeni myši je přítomnost povrchových receptorů CD122 a NKG2D. CD122 je zodpovědný za vazbu cytokinu IL-15 způsobujícího proliferaci a maturaci těchto lymfocytů. Proces maturace je rozdělen do celkem 5 stádií, kde jsou postupně exprimovány různé druhy dalších receptorů. Zralé buňky exprimují na svém povrchu receptory Ly49 a CD49b a jsou již schopné uplatnit své efektorové funkce [15, 16, 18].

U NK buněk vyvíjených v thymu dospělé myši byla pozorována snížená cytotoxicita a naopak zvýšená produkce protizánětlivých cytokinů. Spíše než cytotoxickou funkci mají tedy funkci regulační. Na rozdíl od buněk maturovaných v kostní dřeni postrádají povrchový receptor Ly49 a mají sníženou expresi molekul CD43 a CD11b. Dále exprimují CD127, což je receptor vázající IL-7, který hraje důležitou úlohu v jejich zrání. Zajímavostí je, že v thymu diferencované buňky jsou velmi málo zastoupeny v játrech a slezině [16, 19].

Lidské NK buňky se vyvíjí, na rozdíl od myších, také v lymfatických uzlinách (viz. výše) a jsou rozlišovány dvě subpopulace buněk podle exprese povrchových molekul CD16 a CD56. První populace, označovaná  $CD56^{\text{bright}}/CD16^{\text{dim}}$ , je charakterizovaná sníženou expresí molekuly CD56 a zvýšenou expresí CD16. Tento typ buněk vykazuje spíše regulační vlastnosti (produkují velké množství cytokinů a jsou méně cytotoxické). Zvýšení jejich cytotoxického působení je možné působením IL-2 a IL-12.  $CD56^{\text{dim}}/CD16^{\text{bright}}$  je označení druhé subpopulace lidských NK buněk. Tyto se vyznačují zvýšenou expresí povrchového receptoru CD56 a naopak sníženou expresí CD16. Na rozdíl od první subpopulace vykazují buňky s tímto fenotypem silnou cytotoxicitu a představují asi 90 % veškerých NK buněk v lidském organismu [20, 21, 22, 23].

Výskyt NK buněk byl pozorován jak v lymfatických, tak i v nelymfatických orgánech. Největší zastoupení bylo stanoveno v plicích a játrech. V periferní krvi člověka se hladina těchto lymfocytů pohybuje do 18 % z celkového počtu všech lymfocytů. Dále byl jejich výskyt zaznamenán také ve slezině, kostní dřeni a v téměř zanedbatelném množství i v thymu. Podle potřeby migrují do zanícených tkání [24, 25]. V průběhu těhotenství bylo zaznamenáno, u člověka i u myši, výrazné zvýšení jejich počtu v děloze [8].

## 1.5 Cytotoxické funkce NK buněk

Efektorové funkce NK buněk jsou závislé na převaze aktivačních resp. inhibičních signálů skrze jejich příslušné receptory [26]. Existují dva hlavní mechanismy, kterými jsou NK buňky schopny cytotoxicky usmrtit cílové buňky. V obou případech je nutný jejich kontakt s cílovou buňkou [27].

V prvním případě je likvidace cílové buňky zabezpečena exocytózou cytoplazmatických granulí NK buňky do mezibuněčného prostoru. Tyto obsahují protein perforin a rodinu strukturně příbuzných serinových proteas zvaných granzymy. Úlohou perforinu je narušení cytoplazmatické membrány cílové buňky pro průnik granzymů. Některé granzymy (např. granzym B) však mohou pronikat do buněk endocytózou zprostředkovanou receptory a nevyžadují tedy přítomnost perforinu. Bylo popsáno jedenáct různých druhů granzymů u myši, u člověka bylo nalezeno pouze pět

zástupců těchto enzymů. Tyto proteasy následně aktivují cysteinové proteasy nazývané kaspasy, které jsou zodpovědné za průběh apoptózy cílové buňky. Mohou ovšem také spustit apoptózu přímo, bez aktivace kaspas [27, 28, 29].

Druhá cesta spočívá v aktivaci „receptorů smrti“ (tzv. death receptorů), jež se vyskytují na povrchu cílové buňky, pomocí ligandů přítomných na NK buňce. NK buňky exprimují na svém povrchu dva typy ligandů aktivující death receptory. V obou případech se jedná o molekuly patřící do rodiny cytokinů TNF. První skupina ligandů je označovaná TRAIL (z angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand). Zástupcem je ligand Apo2 účastníci se aktivace receptorů TRAIL-R1 a TRAIL-R2. Bylo identifikováno pět členů lidských TRAIL receptorů. Pouze dva, jmenované výše, jsou schopny spustit apoptózu (opět pomocí aktivace kaspas) [27, 30]. Do druhé skupiny interakčních partnerů death receptorů, vyskytujících se na NK buňkách, je řazen Fas ligand (FasL) aktivující receptor CD95. Mnohé nádorové buňky neexprimují CD95 na svém povrchu a snaží se tak vyhnout zahubení.  $\text{INF-}\gamma$ , produkovaný přirozenými zabíječi, indukuje expresi tohoto receptoru pro FasL na cílové buňce a umožňuje následně opětovné využití této apoptické dráhy aktivované NK buňkami [27, 31, 32].

## 1.6 Regulační funkce NK buněk

Kromě cytotoxické funkce mají NK buňky důležitou funkci regulační. Produkuje velké množství cytokinů (např.  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  a  $\beta$ , GM-CSF), které se dále podílejí na další imunitní odpovědi organismu. Ovlivňují dendritické buňky, makrofágy, T a B buňky a endoteliální buňky. Setkání např. dendritických buněk s NK buňkami může probíhat v periferních tkáních nebo v lymfatických orgánech, přičemž výsledek této interakce může být dvojitý [33, 34, 35]. V prvním případě mohou být nezralé dendritické buňky usmrceny, což by mohlo mít negativní dopad na účinnost případné vakcinace [36, 37]. Dalším zkoumáním se však zjistilo, že tento vliv je naopak pozitivní, protože může nastat vzájemná výměna antigenů mezi apoptickými dendritickými buňkami a novou populací dendritických buněk. Tento fakt může mít pozitivní vliv na případnou aktivaci adaptivní imunity zprostředkovanou  $T_C$ ,  $T_H$  lymfocyty a protilátkami [38, 39]. V druhém případě mohou NK buňky naopak ovlivnit zrání dendritických buněk pomocí cytokinů  $\text{INF-}\gamma$  a  $\text{TNF-}\alpha$  [34, 35].

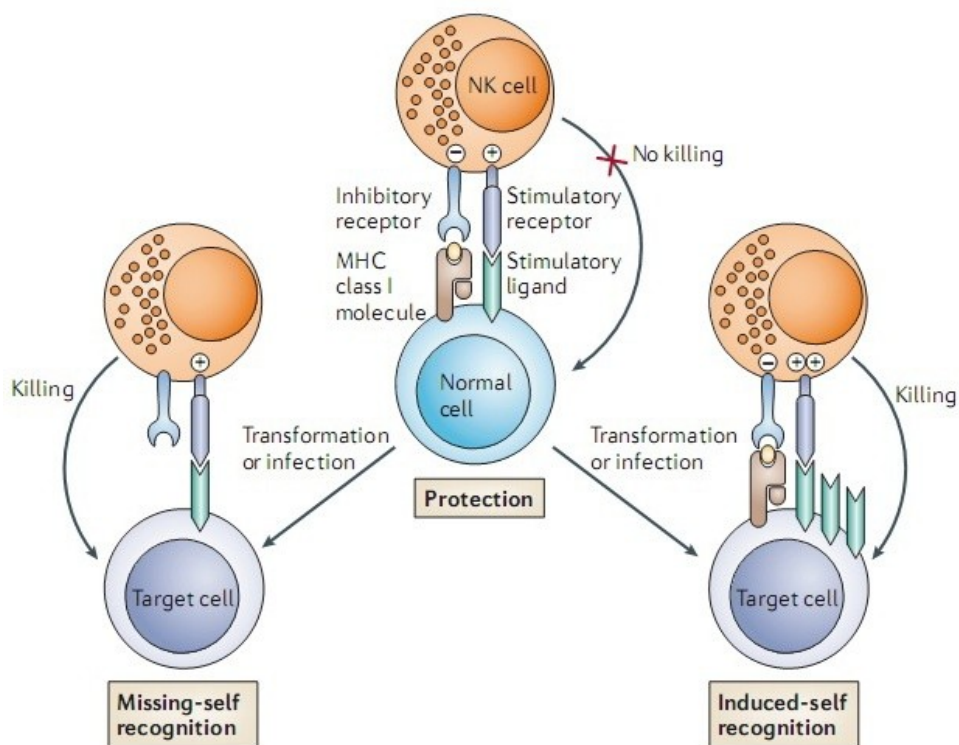
INF- $\gamma$  je NK buňkami produkován v hojné míře a podílí se kromě aktivace dendritických buněk i na aktivaci makrofágů a na vzniku Th1 buněčné linie složené z CD4<sup>+</sup> T lymfocytů [38, 40].

## 1.7 Identifikační mechanismy NK buněk

Po dlouhou dobu od objevu NK buněk nebylo jasné jakým mechanismem dochází k rozpoznávání buněk pozměněných viry či maligní transformací, jelikož přirození zabíječi patří do antigenně nespecifické části imunitního systému a nemají na svém povrchu receptory pro antigen. V současné době existuje několik hypotéz, které tuto důležitou funkci NK buněk objasňují [2, 41].

První z hypotéz, nazývaná „missing self recognition“, byla objevena v 90. letech 20. stol. Vychází z vlastnosti NK buněk, které jsou schopny rozpoznávat ostatní buňky se sníženou či vůbec žádnou expresí MHC glykoproteinů I. třídy. Tyto molekuly se za normálních okolností vyskytují na všech buňkách organismu (s výjimkou červených krvinek a spermií) a slouží k prezentaci antigenů cytotoxickým T lymfocytům, které případně pozměněné buňky zahubí. MHC glykoproteiny I. třídy jsou rozpoznávány inhibičními receptory NK buněk. Dochází k aktivaci fosfatas a dalším signalizačním kaskádám vedoucím k inhibici efektorových funkcí NK buněk (více popsáno v kap. 1.8.1). Pokud k této interakci nedojde, posune se rovnováha ve prospěch aktivační signálů zprostředkovaných aktivačními receptory. Výsledným efektem je následná cytotoxická likvidace cílové buňky. Důležitým faktem je tedy nezbytná přítomnost aktivačních signálů, což vysvětluje toleranci NK buněk vůči červeným krvinkám [42, 43, 44].

Druhou hypotézou NK buněčného rozpoznávání je tzv. „induced self recognition“. V tomto případě se na cílové buňce vyskytuje nadbytek vlastních proteinů, které jsou ligandy aktivačních receptorů. Mezi tyto molekuly patří např. MICA a MICB, což jsou interakční partneři receptoru NKG2D podobné MHC glykoproteinů I. třídy. Jejich zvýšená exprese může být důsledkem stresu, maligní transformace nebo virové infekce. Výsledkem této interakce je opět nerovnováha mezi aktivačními a inhibičními signály v NK buňce vedoucí k cytotoxickému zahubení cílové buňky. Porovnání obou hypotéz naznačuje Obr. 4 na str. 21 [41, 43, 45].



Obr. 4: Porovnání „missing self“ a „induced self“ mechanismů rozpoznávání cílových buněk NK buňkami. Převzato z [41].

Třetí dosud známou hypotézu NK buněčného rozpoznávání představuje tzv. „infectious non-self recognition“. Tato strategie je založená na detekci evolučně konzervovaných molekulárních vzorů, které jsou produkty patogenních i nepatogenních bakterií. Tyto invariantní struktury, označované jako PAMPy (z angl. Pathogen Associated Molecular Pattern), jsou specifické pouze pro bakterie (nevyskytují se v organismu hostitele). Mezi nejznámější příklady PAMPů patří lipopolysacharidy gram-negativních bakterií a peptidoglykan gram-pozitivních bakterií. Receptory rozpoznávající tyto struktury jsou označované zkr. PRR (z angl. Pattern Recognition Receptor). Toll-like receptory (TLR), exprimované na povrchu APC buněk, a aktivační NK buněčný receptor Ly49h představují jejich zástupce. Tato strategie je, v porovnání s předchozími, méně prozkoumána [46, 47, 48].

Poslední strategie detekce abnormálních buněk je založena na interakci Fc fragmentu protilátek typu IgG s Fc $\gamma$ RIII receptorem NK buněk. Patogen opsonizovaný imunoglobuliny tohoto typu je následně zneškodněn cytotoxickými mechanismy přirozených zabíječů. Tato strategie je známá jako cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC) [6, 49].

## 1.8 Receptory NK buněk

Receptory NK buněk lze rozdělit podle několika hledisek. První hledisko představuje rozdělení podle jejich funkce. V tomto případě jsou známy tři druhy receptorů: aktivační, inhibiční a kostimulační, jenž pouze zesilují efekt aktivačních receptorů. Výsledná reakce NK buňky na cílovou buňku závisí na nerovnováze mezi inhibičními a aktivačními signály. Druhou možností je jejich rozdělení ze strukturního hlediska. Zde existují dvě hlavní skupiny: imunoglobulinové a C-lektinové receptory. Obě tyto skupiny jsou blíže popsány dále. Geny pro C-lektinové NK buněčné receptory jsou zakódovány v NK genovém komplexu (NKC, z angl. Natural Killer gene complex). NKC se nachází na 12. chromozomu člověka a 6. chromozomu u myši [50, 51]. Imunoglobulinové receptory jsou kódovány na 19. chromozomu člověka [52].

### 1.8.1 Aktivační a inhibiční receptory

K zapojení aktivačních receptorů do následné signalizační kaskády je nutná přítomnost dalších povrchových molekul. Tyto jsou označovány jako adaptorové proteiny a asociují společně s aktivačními receptory na povrchu NK buněk. Dosud bylo objeveno několik druhů těchto struktur: DAP10, DAP12, FcεRI-γ a CD3-ζ. Všechny tyto proteiny obsahují ITAM motiv, který je charakteristický sekvencí (D/E)xxYxx(L/I)<sub>x6-8</sub>Yxx(L/I), kde x značí libovolnou aminokyselinu a lomítka alternativní aminokyseliny. DAP12 a FcεRI-γ obsahují jeden ITAM motiv, v molekule CD3-ζ se vyskytují tři tyto motivy a DAP10 nese zkrácenou verzi ITAM motivu, která je charakterizovaná sekvencí YxxM. Komplex receptor-adaptorový protein zprostředkovává elektrostatická interakce mezi záporně nabitou kyselinou asparagovou adaptorového proteinu a lysinem či argininem obsaženým v těsné blízkosti transmembránové části aktivačního receptoru. Po navázání ligandu na receptor dochází k fosforylaci tyrosinu, přítomného v ITAM motivu, prostřednictvím kinas rodiny Src. Následně se aktivují protein-tyrosin kinázy Syk a Zap-70, které se účastní další signalizační kaskády vedoucí k případnému spuštění efektorových funkcí NK buňky v závislosti na převažujících aktivačních resp. inhibičních signálech [53, 54, 55].

Inhibiční receptory, na rozdíl od aktivačních, nepotřebují kooperovat s jinými membránovými proteiny, aby se účastnili signalizační kaskády. Ve své cytoplasmatické části obsahují typický ITIM motiv (jeden nebo více), který je charakterizován sekvencí

(I/L/V/S)<sub>x</sub>Y<sub>xx</sub>(L/V). X zde značí opět libovolnou aminokyselinu a lomítka pak alternativní aminokyseliny, které se v tomto motivu mohou vyskytovat. Po navázání ligandu na inhibiční receptor dochází k fosforylaci tyrosinového zbytku v ITIM motivu kinásami rodiny Src. Dalším krokem signalizační dráhy je následná aktivace inositolové fosfatasy SHIP-1 nebo případně protein-tyrosin fosfatas SHP-1 a SHP-2. Fosfatasy dále defosforylují substráty protein-tyrosin kinas spojených s aktivačními receptory. Tímto způsobem omezují přenos signálu z aktivačních receptorů a případné spuštění efektorových funkcí NK buňky [54, 56, 57].

### 1.8.2 Imunoglobulinové receptory

Charakteristický znak receptorů, řazených do této superrodiny, představují imunoglobulinové domény přítomné v jejich extracelulárních částech. Zástupci této receptorové rodiny jsou zejména receptory zvané KIR (z angl. Killer cell Imunoglobulin-like Receptors) a NCR (z angl. Natural Cytotoxicity Receptors) [58, 59].

KIR (známé jako CD156) představují rodinu polymorfních aktivačních i inhibičních receptorů. Ze strukturního hlediska se jedná o transmembránové glykoproteiny I. typu a vyskytují se především na NK buňkách a některých T lymfocytech [60]. Ligandy těchto receptorů jsou zejména MHC glykoproteiny I. typu (lidské HLA-A, -B nebo -C). Dosud bylo objeveno 14 polymorfních genů kódujících tyto proteiny. Nomenklatura je odvozena od počtu imunoglobulinových domén obsažených v jejich extracelulární části. Tyto mohou být dvě (ozn. 2D) nebo tři (ozn. 3D) [58, 61]. Inhibiční receptory charakterizuje dlouhá cytoplasmatická doména (ozn. L) obsahující ITIM motiv. Krátká cytoplasmatická doména (ozn. S) se vyskytuje u aktivačních receptorů asociujících s adaptorovými molekulami. Výjimku představuje KIR2DL4, který disponuje dlouhou cytoplasmatickou doménou, i přestože se jedná o aktivační receptor [58, 62].

NCR jsou řazeny mezi specifické znaky NK buněk (viz kap. 1.4). Zástupce těchto receptorů představují proteiny NKp46, NKp44 a NKp30 [11]. Všechny patří mezi aktivační receptory a jsou schopny přímo indukovat efektorové funkce NK buňky při absenci MHC I resp. HLA na cílové buňce. Ve své extracelulární části obsahují, podobně jako KIR, dvě nebo tři imunoglobulinové domény a jsou charakterizovány jako transmembránové glykoproteiny I. typu. NKp46 a NKp30 byly pozorovány jak na čerstvých, tak i aktivovaných NK buňkách. Zatímco exprese NKp30 byla sledována pouze na maturovaných NK buněčných liniích. Zdá se, že tento receptor je zodpovědný

za cytotoxické usmrcení cílových buněk v případě, že nedojde ke spuštění apoptózy skrze předchozí dva jmenované zástupce NCR [59, 63].

### 1.8.3 C-lektinové receptory

Receptory patřící do této superrodiny obsahují ve své extracelulární části charakteristickou C-lektinovou doménu (CRD), která v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů je schopna vázat cukry. Nejvýznamnějšími zástupci jsou receptory rodin Ly49, CD94/NKG2, NKR-P1 a receptory příbuzné s molekulou CD69 [51]. Poslední dvě jmenované skupiny receptorů jsou blíže popsány v následujících kapitolách, jelikož jejich zástupci jsou předmětem této diplomové práce.

Výskyt receptorů rodiny Ly49 byl pozorován především u myši. Dosud bylo objeveno 23 členů, označovaných Ly49a-w. Strukturně se jedná o homodimerní transmembránové glykoproteiny II. typu. Většina zástupců této rodiny patří mezi inhibiční receptory (např. Ly49a, c, e) obsahující ITIM motiv v cytoplasmatické doméně. Byl však potvrzen i výskyt aktivační receptorů (např. Ly49d, h) asociujících s adaptorovou molekulou DAP12. Myši zástupci této rodiny jsou zatím nejlépe prozkoumání ze všech NK buněčných receptorů, což potvrzuje i rozřešení trojrozměrné struktury několika její členů [51, 64, 65]. U člověka byl nalezen pouze jeden gen, kódující protein Ly49I, který však zřejmě není funkční kvůli bodové mutaci [66].

Receptory rodiny CD94/NKG2 byly identifikovány u člověka a také u myši. Členové této skupiny mohou mít aktivační nebo inhibiční potenciál a jsou exprimováni především na NK buňkách a na populaci  $\text{CD8}^+$  T lymfocytů. Dosud bylo objeveno sedm členů. NKG2A, B, C, E a H tvoří disulfidicky vázané heterodimery s molekulou CD94. NKG2F proteinu chybí extracelulární doména, tudíž se zřejmě nejedná o funkční molekulu. Receptory NKG2A a B, obsahující klasický ITIM motiv a rozeznávající HLA-E, mají inhibiční funkci. NKG2C, E a H asociují s adaptorovým proteinem DAP12 a jedná se tedy o aktivační receptory, i přestože jsou schopny interakce s HLA-E [67, 68]. NKG2D se, na rozdíl od ostatních, vyskytuje na povrchu NK buněk jako homodimer s krátkou cytoplasmatickou doménou. Z funkčního hlediska se jedná také o aktivační receptor. Ligandy tohoto proteinu představují molekuly MICA a MICB, odvozené od MHC I [69].



#### **1.8.4 Myší NKR-P1C z kmene BALB/c (mNKR-P1C<sup>BALB</sup>) reprezentující rodinu NKR-P1**

Zástupci receptorové rodiny NKR-P1 (z angl. natural killer receptor – protein 1, ozn. CD161) byli objeveni již v 80. letech 20. stol., avšak jejich funkce zůstávala po dlouhou dobu neobjasněna, stejně jako vlastnosti těchto proteinů. Strukturně jsou charakterizovány jako disulfidicky spojené homodimerní transmembránové proteiny II. typu, které obsahují ve své extracelulární části C-lektinovou doménu (CRD). Tyto receptory se vyskytují především na povrchu myších, potkaních a lidských NK buněk. Byly však pozorovány i na některých T lymfocytech, NK-T a dendritických buňkách [51, 70].

Dosud se podařilo identifikovat šest myších členů této receptorové rodiny z kmene C57BL/6 (ozn. též B6), a to NKR-P1A, C, D, E, F a G. V kmeni BALB/c byl nalezen NKR-P1B namísto NKR-P1D. Vůbec prvním objeveným receptorem se stal NKR-P1C, který je předmětem této diplomové práce resp. jeho forma nalezená v myším kmeni BALB/c. Tento protein, označovaný též NK1.1, identifikovaný pomocí anti-NK1.1 protilátky, byl po dlouhý čas považován za specifický znak NK buněk [71]. Anti-NK1.1 (PK136) protilátkou se však podařilo identifikovat pouze receptory z kmene B6, nikoliv z kmene BALB/c. Z výsledků porovnání aminokyselinových sekvencí zástupců této receptorové rodiny (napříč různými myšími kmeny), byla vyslovena hypotéza, že vazba protilátky je závislá na přítomnosti serinu 191 a glutamátu 217. mNKR-P1C<sup>BALB</sup> obsahuje sice na pozici 217 glutamát, ale na pozici 191 je přítomen threonin (Obr. 5 na str. 26), což je způsobeno bodovou mutací a má zřejmě za následek nerozpoznání tohoto receptoru anti-NK1.1 protilátkou [72].

Přítomnost ITIM motivu v NKR-P1B/D a G svědčí o jejich inhibiční funkci. V transmembránové části receptorů NKR-P1A a F se vyskytuje pozitivně nabitý arginin a zároveň neobsahují ITIM motiv. Díky těmto faktům jsou řazeny mezi aktivační receptory. Přes receptor NKR-P1C jsou signály přenášeny pomocí klasického ITAM motivu nacházejícího se v adaptorové molekule FcεRI-γ, se kterou je tento receptor asociován prostřednictvím argininu přítomného v transmembránové doméně tohoto aktivačního receptoru [71, 73].

Fyziologické ligandy zástupců této receptorové rodiny byly identifikovány pouze u některých z nich. NKR-P1B/D specificky interaguje s molekulou Clr-b, NKR-P1F pak

s molekulou Clr-g. Geny kódující Clr-b a g, patřící do rodiny CLEC2, se nacházejí v NKC genovém komplexu a ze strukturního hlediska se jedná o molekuly odvozené od C-lektinů. Fyziologické ligandy receptorů NKR-P1A a C nebyly zatím nalezeny [74].

Dosud byly identifikovány čtyři typy potkaních receptorů této rodiny, NKR-P1A, B, F a G [75]. U člověka byl však nalezen pouze jeden gen kódující receptor NKR-P1A. Fyziologickým ligandem tohoto proteinu je molekula LLT1, patřící do skupiny receptorů příbuzných s molekulou CD69. Signalizační dráhy se po navázání ligandu účastní kyselá sfingomyelinasa. Tento enzym kooperuje na tvorbě ceramidů, kteří dále plní funkci druhých posílů. Signalizační dráhy u hlodavčích zástupců této rodiny se účastní protein-tyrosin-kináza p56<sup>lck</sup>, která patří do rodiny kináz Src. Tato interakce probíhá v cytoplazmatické části NKR-P1 receptorů, obsahující motiv CxCP (x značí libovolnou aminokyselinu), a účastní se jí také různé druhy G proteinů. Celkově jsou tyto signalizační dráhy daleko více prozkoumány než u lidského NKR-P1 [76, 77].

mNKR-P1C je složen z 223 aminokyselin. Molekulová hmotnost dimerního receptoru se pohybuje kolem 50 kDa. Porovnání sekvencí proteinů z kmene BALB/c (mNKR-P1C<sup>BALB</sup>) a B6 (mNKR-P1C<sup>B6</sup>) přibližuje obr. 5 [72]. Struktura tohoto proteinu ani fyziologický ligand není zatím znám. Právě k rozřešení těchto vlastností mNKR-P1C<sup>BALB</sup>, resp. extracelulární domény tohoto receptoru, by mohly přispět proteinové preparáty připravené v rámci této diplomové práce.

1	MDTARVYFGLKPPRTPGAWHESPLSLPPDACRCPRSHRLALKLSCAGLILLVLTLLIGMSV	
1	MDTASLYLGLKPPRTLGAWHESPSLPPDACRCPRSHRLALKLSCAGLILLVLTLLIGMSV	
61	LVRVLIQKPSREKCCVLIQENLNKTTDSPAQKQECPOHWSHRDKCFHISQVSNTWEEGQA	
61	LVRVLIQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSNTWEEGQA	
121	D <sup>SC</sup> GRKEATLLLIQDQEELRFLLD <sup>SI</sup> KEN <sup>YN</sup> NSFWIGLRYTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKI	
121	D <sup>SC</sup> GRKGATLLLIQDQEELRFLLD <sup>SI</sup> KE <sup>KY</sup> NSFWIGLRF <sup>T</sup> LPDMNWKWINGTTFNSDVLKI	
181	IGVTENGSCATISGDKVTSESCST <sup>D</sup> NRWICQKELNHETPSNDS	BALB/c
181	TGVTENGSCASILGDKVTPESCAS <sup>D</sup> NRWICQKELNHETPSNDS	B6

Obr. 5: Porovnání aminokyselinových sekvencí mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a mNKR-P1C<sup>B6</sup>. Modře je vyznačena cytoplazmatická doména, zeleně transmembránová doména, žlutě extracelulární doména, červeně jsou vyznačeny aminokyseliny, ve kterých se jednotlivé sekvence liší a rudě jsou označeny cysteiny. Šedou je označena mutace způsobující nerozpoznání mNKR-P1C<sup>BALB</sup> anti-NK1.1 protilátkou. Upraveno podle [72].

### 1.8.5 Lidský AIKL (hAIKL) reprezentující rodinu receptorů příbuzných s molekulou CD69

Do této rodiny jsou řazeny především lidské receptory LLT1 a AIKL a myší receptory Clr. Tyto molekuly jsou blízké CD69 a to především svým výskytem na povrchu aktivovaných lymfocytů [51].

Výskyt receptoru CD69, zvaného též raný aktivační antigen, byl pozorován zejména na aktivovaných NK buňkách, B a T lymfocytech a makrofázích. Konstitutivní exprese tohoto antigenu byla také objevena na lidských monocytech, krevních destičkách a epidermálních Langerhansových buňkách. Ačkoliv nejsou zatím přesně známé funkce tohoto proteinu ani jeho fyziologický ligand, některé výsledky naznačují, že by tato molekula mohla hrát významnou roli při patogenezi mnoha onemocnění jako je např. artritida, chronický zánět jater nebo astma. V imunitním systému plní nejspíše hlavně regulační funkci vedoucí k další imunitní odpovědi [78, 79].

Proteiny Clr (z angl. C-type lectin-related) byly nedávno identifikovány jako noví zástupci myších C-lektinových receptorů. Nejprve bylo popsáno sedm jejich členů, Clr-a - g. Později byl popsán i Clr-h. Geny kódující tyto povrchové molekuly se nacházejí v NKC genovém komplexu mezi NKR-P1C a CD69. Jednotliví zástupci této skupiny sdílí mezi sebou 80-90% homologii. Vysoký stupeň homologie byl nalezen také mezi Clr receptory a molekulou LLT1. Toto naznačuje, že LLT1 je lidským orthologem proteinů Clr. Některé z těchto molekul tvoří ligandy receptorů rodiny NKR-P1 [72, 74, 80].

Receptor LLT1 (z angl. lectin-like transcript 1) je ligandem lidského NKR-P1, jak již bylo řečeno v předcházející kapitole. LLT1 je exprimován hlavně na povrchu dendritických buněk, což naznačuje spojnici mezi NK a APC buňkami. Jeho výskyt byl také objeven na B lymfocytech při infekci virem Epstein-Barrové nebo HIV. Interakce s NKR-P1A inhibuje elektroové funkce NK buňky (cytotoxicitu a produkci cytokinů). Gen kódující tento protein leží přímo vedle receptoru NKR-P1A v NKC genovém komplexu. Nejbližším homologem LLT1 je receptor AIKL [81, 82].

Protein AIKL (z angl. activation-induced C-type lectin), označovaný také CLEC2B, je předmětem této diplomové práce. Tento lidský receptor byl objeven v roce 1997. Strukturně se jedná o homodimerní transmembránový protein II. typu, který je charakteristický velmi krátkou cytoplasmatickou doménou sestávající se pouze ze sedmi

aminokyselin. Celý receptor je složený ze 149 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost se pohybuje kolem 17 kDa. Podobnost extracelulární domény AICL a CD69 je asi 35 % v aminokyselinovém zastoupení [83].

Výskyt AICL byl pozorován především na buňkách myeloidní linie (monocytech, makrofázích a granulocytech), ale také na B a T lymfocytech a některých rakovinných buňkách (hlavně jaterních) [84]. Charakteristickým rysem tohoto proteinu je rychlý nárůst jeho transkripce při aktivaci lymfocytů a krátký poločas rozpadu mRNA, která jej kóduje. Díky výše uvedeným vlastnostem je receptor AICL řazen mezi rané aktivační antigeny exprimované na široké škále buněk [83].

AICL je interakčním partnerem lidského NK buněčného receptoru NKp80 (ozn. též KLRF1). Oba tyto proteiny byly nalezeny u člověka, ale nikoliv u hlodavců, na rozdíl od jiných receptorů NK buněk. Interakce mezi oběma receptory vede k uvolnění zánětlivých cytokinů, které vyvolávají další imunitní odpověď. Zde se tedy ukazuje spojnice mezi NK buňkami a buňkami myeloidní linie, jež může vést k počátečnímu vyvolání a udržení imunitní reakce u člověka [85].

Struktura AICL ani další významné vlastnosti tohoto proteinu nebyly zatím rozřešeny. K rozřešení vlastností a případně i struktury by mohla přispět tato práce, která je zaměřena především na rekombinantní přípravu extracelulární domény, nalezení optimálních podmínek renaturace a purifikaci tohoto proteinu.

## 2. CÍL PRÁCE

- příprava expresních plasmidů pro rekombinantní produkci extracelulárních domén receptorů mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL
- produkce těchto receptorů v expresním systému *E. coli* s použitím LB média
- optimalizace renaturace a purifikace takto připravených proteinů
- charakterizace připravených proteinů pomocí metod hmotnostní spektrometrie

### 3. MATERIÁL

#### 3.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy AL54 *Mettler Toledo, ČR*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga Avanti J-26 XP *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga Spectrafuge 16M *Edison, USA*
- Centrifuga VSMC-13 *Shelton Scientific, USA*
- Centrifuga Z 233 MK-2 *Hermle, Německo*
- Centrifugační koncentrátor Amicon Ultra (cut off 10 kDa) *Millipore, USA*
- Dialyzační trubice Spektra/Por *Spektrum Lab., USA*
- DNA sekvenátor ABI Prism 3100 *Applied Biosystems, USA*
- Dokumentační systém na focení gelů G:Box HR *Syngene, UK*
- Hmotnostní spektrometr APEX Qe Ultra *Bruker Daltonics, USA*
- HPLC systém Biosys 510 *Beckman, USA*
- Iluminátor BTS-20.LS *UVItec, UK*
- Inkubátor BT-120M *Lab. přístroje Praha, ČR*
- Kolona Q Sepharosa FF 16/140 *GE Healthcare, USA*
- Kolona SP Sepharosa FF 16/65 *GE Healthcare, USA*
- Kolona Superdex 200 10/300 GL *GE Healthcare, USA*
- Kolona Superdex 200 16/60 High Load *GE Healthcare, USA*
- MicroHPLC Agilent 1200 *Agilent, USA*
- Mikrokolonky microtrap 1×8 mm *Michrom Biores., USA*
- Monochromátorová čtečka destiček Safire *Tecan, Švýcarsko*
- Napájecí zdroj MP-250V *Major Science, USA*
- Napájecí zdroj ECPS 3000/150 *Pharmacia, Švédsko*
- Magnetická míchačka MM 2A *Lab. přístroje Praha, ČR*
- Mikrostříkačky, různé objemy *Hamilton, Švýcarsko*
- pH metr Φ200 *Beckman Coulter, USA*
- Předvážky HF-1200G *AND, USA*

- Souprava pro elektroforesu *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro elektroforesu *Bio-Rad, USA*
- Souprava pro elektroforesu X-Cell Sure Lock *Invitrogen, USA*
- Souprava pro ultrafiltraci *Millipore, USA*
- Spektrofotometr DU-70 *Beckman Coulter, USA*
- Termocyklér Mastercycler Personal *Eppendorf, Německo*
- Třepačka Comfort *Eppendorf, Německo*
- Třepačka na Erlenmeyerovy baňky *Sanyo Gallenkamp Ltd., UK*
- Třepačka na zkumavky BigGer Bill *Thermolyne, USA*
- Ultracentrifuga Optima LE80K *Beckman Coulter, USA*
- Ultrafiltrační membrány (cut off 10 kDa) *Millipore, USA*
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 *Cole-Parmer instrum. Co., USA*
- Ultrazvuková lázeň Sonorex *Bandelin, Německo*
- Vodní lázeň *Memmert, Německo*
- Vakuová odparka Savant SPD 121P Speedvac *Thermo Fisher, USA*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody MilliQ *Millipore, USA*

### **3.2 Soupravy pro izolaci DNA**

- JETQUICK Gel Extraction Spin Kit *Genomed, Německo*
- JETSTAR Plasmid MiniPrep Kit *Genomed, Německo*
- JETSTAR Plasmid MaxiPrep Kit *Genomed, Německo*

### **3.3 Chemikálie**

- Acetonitril (LC/MS jakost) *Merck, Německo*
- Agar *Oxoid, USA*
- Agarosa *Serva, Německo*
- Akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- Ampicilin *Jersey Lab Supply, USA*
- L-Arginin *Sigma-Aldrich, USA*
- Azid sodný *Sigma-Aldrich, USA*
- Coomassie Brilliant Blue G-250 *Serva, Německo*

▪ Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, Německo</i>
▪ Cystamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Cysteamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ DNA marker 100 bp; 1 kb	<i>New England Biolabs, USA</i>
▪ dNTPs	<i>Promega, USA</i>
▪ DTT	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Ethanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ Ethidium bromid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ EDTA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ 4-Ethylmorfolin	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ Glycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Guanidin hydrochlorid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ HEPES	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Hydroxid sodný	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ Chlorid sodný	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ Chlorid vápenatý	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ Chloroform	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ Isopropanol	<i>Merck, Německo</i>
▪ Jódacetamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Kanamycin	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
▪ Kvasničný extrakt	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
▪ Kyselina chlorovodíková	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ Kyselina octová (LC/MS jakost)	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ Kyselina trifluoroctová (LC/MS jakost)	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ Leupeptin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Methanol (LC/MS jakost)	<i>Merck, Německo</i>
▪ NDSB 256	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ N,N'-metylen-bis-akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Octan amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Peroxodisíran amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ PIPES	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ PMSF	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>



- Sodumdodecylsulfát *Jersey Lab Supply, USA*
- Standardy pro SDS-PAGE *Serva, Německo*
- Tetracyklin *Jersey Lab Supply, USA*
- TRI reagent *Sigma-Aldrich, USA*
- Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) *Sigma-Aldrich, USA*
- Tris hydrochlorid *Jersey Lab Supply, USA*
- Trypton *Oxoid, USA*
- Voda (LC/MS jakost) *J.T.Baker, USA*
- X-Gal *Serva, Německo*
- Ostatní běžné chemikálie *Lach-Ner, ČR*

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

### 3.4 Primery pro PCR

- mNKR-P1C<sup>BALB</sup> FW *GeneriBiotech, ČR*  
5' GCCATATGTCAAGAGAAAAATGC 3'
- mNKR-P1C<sup>BALB</sup> REV *GeneriBiotech, ČR*  
5' GCAAGCTTATCGAGGAGTCATTACTCGGGGT 3'
- hAICL FW *GeneriBiotech, ČR*  
5' GCCATATGTCTCAGAGTTTATGC 3'
- hAICL REV *GeneriBiotech, ČR*  
5' GCAAGCTTAGTGTATTCTTTTCC 3'
- Oligo(dT)<sub>20</sub> *Invitrogen, USA*

### 3.5 Enzymy

- AspN *Roche, Švýcarsko*
- Deep Vent DNA polymerasa *New England Biolabs, USA*
- DNAsa I (deoxyribonukleasa I) *Sigma-Aldrich, USA*
- GluC *Roche, Švýcarsko*
- HindIII endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- NdeI endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- RNAsa I (ribonukleasa I) *Sigma-Aldrich, USA*
- SmaI *New England Biolabs, USA*

- SuperScript III RT *Invitrogen, USA*
- T4 DNA ligasa *Stratagene, USA*
- Trypsin *Promega, USA*

### 3.6 Vektory

- pET-30a(+) *Novagen, USA*
- pBluescript SK+ *Stratagene, USA*

### 3.7 Bakteriální kmeny

- *E. coli*: BL21-Gold (DE3) *E. coli* B F<sup>-</sup> ompT hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tetr gal λ(DE3) endA Hte *Stratagene, USA*
- *E. coli*: NovaBlue endA1 hsdR17 (rK12<sup>-</sup> mK12<sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F<sup>'</sup>[proA+B<sup>+</sup> lacIqZDM15::Tn10] (TetR) *Novagen, USA*

### 3.8 Roztoky

- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) CBB R-250
- **Dialyzační pufr hAICL:** 10 mM PIPES, 9mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8
- **Dialyzační pufr mNKR-P1C<sup>BALB</sup>:** 15 mM Tris-HCl, 9 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE:** 10 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
- **First strand reakční pufr:** komerčně dostupný od firmy *Invitrogen, USA*
- **Fixační a odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová
- **Guanidinový pufr:** 6 M Guanidin-HCl, 10 mM DTT, pH 8,0
- **Ligační pufr pro T4 DNA ligasu:** komerčně dostupný od firmy *Stratagene, USA*
- **NEB II pufr:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs, USA*
- **NEB IV pufr:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs, USA*
- **Odbarvovací roztok pro PVDF membrány:** 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová

- **Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4
- **Pufr A pro ionexovou chromatografii hAICL:** 15 mM PIPES, 9 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8
- **Pufr B pro ionexovou chromatografii hAICL:** 15 mM PIPES, 1 M NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0
- **Pufr A pro ionexovou chromatografii mNKR-P1C<sup>BALB</sup>:** 15 mM Tris-HCl, 9 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0
- **Pufr B pro ionexovou chromatografii mNKR-P1C<sup>BALB</sup>:** 15 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0
- **Pufr pro DNA polymerasu Deep Vent:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs, USA*
- **Pufr pro elektropřenos:** 10 mM Tris-HCl, 150 mM glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,4
- **Pufr pro gelovou filtraci hAICL:** 15 mM PIPES, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8
- **Pufr pro gelovou filtraci mNKR-P1C<sup>BALB</sup>:** 15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0
- **Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek:** 0,5% (w/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4
- **Renaturační pufr hAICL:** 20 mM PIPES, 1 M arginin-HCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM cystamin, 10 mM cysteamin, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 10 mM NDSB 256, pH 6,8
- **Renaturační pufr mNKR-P1C<sup>BALB</sup>:** 50 mM Tris-HCl, 1 M arginin-HCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM cystamin, 9 mM cysteamin, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0
- **Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 25% (w/v) sacharosa, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4
- **Štěpící pufr pro AspN a trypsin:** 50 mM N-ethylmorfolinacetát, 10% AcN, pH 8,4
- **Štěpící pufr pro GluC:** 50 mM NH<sub>4</sub>Ac, 10% acetonitril, pH 4,0
- **TAE pufr:** 2 M Tris-HCl, 1 M HAc, 50 mM EDTA, pH 8,0
- **TE pufr:** 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
- **Thermo Pol reakční pufr:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs, USA*

- **TRI reagent** komerčně dostupný od firmy *Sigma-Aldrich, USA*
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující:** 50 mM Tris-HCl, 12% (v/v) glycerol, 4% SDS (w/v), 0,1% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující:** 50 mM Tris-HCl, 12% (v/v) glycerol, 4% SDS (w/v), 0,1% (w/v) bromfenolová modř, 2% (v/v) β-merkaptoethanol, pH 6,8

### 3.9 Média

- **LB agar:** 1,25% (w/v) agar v LB médiu
- **LB médium:** 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7,4

## **4. METODY**

V této diplomové práci byly používány metody ověřené dlouholetými zkušenostmi pracovníků Laboratoře přirozené imunity, založené zejména na laboratorním manuálu [86] nebo případně na doporučení výrobců některých chemikálií, souprav a přístrojů.

### **4.1 Příprava expresních plasmidů**

#### **4.1.1 Izolace celkové RNA z myší sleziny**

K izolaci celkové RNA byly použity dvě čerstvé myší sleziny (z kmene BALB/c). Ke každé slezině v homogenizátoru byl přidán 1 ml TRI reagentu. Následovala homogenizace a poté přenesení materiálu do speciálních mikrozkušavek neobsahujících RNAsy. TRI reagent obsahuje fenol a guanidin thiokyanát, který působí inhibičně na přítomné RNAsy. Dále bylo do obou mikrozkušavek přidáno 200  $\mu$ l chloroformu. Dalším krokem bylo promíchání obou fází, 5 minutová inkubace za laboratorní teploty a následná centrifugace při 12 000 $\times$ g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Vrchní vodná fáze, obsahující RNA, byla přenesena do čisté mikrozkušavky (RNase free). Dále bylo přidáno 500  $\mu$ l isopropanolu a směs ponechána inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Následovala opět centrifugace při 12 000 $\times$ g po dobu 8 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta RNA byla promyta 1 ml 75% ethanolu a rozsuspendována. Následovala další centrifugace při 7 500 $\times$ g po dobu 5 minut při 4 °C. Supernatant byl opět odstraněn a peleta RNA byla nejprve vysušena na vzduchu (ve flowboxu) a následně rozpuštěna ve 20  $\mu$ l RNAs zbavené vody. Při celé izolaci bylo pracováno ve flowboxu a sterilně. Takto izolovaná RNA byla ihned použita na syntézu cDNA.

#### **4.1.2 Reversní transkripce**

Izolovaná RNA byla inkubována 10 minut při 55 °C a dále použita jako templát při syntéze cDNA. Do reakční směsi bylo napipetováno: 1  $\mu$ l 50 mM oligo(dT)<sub>20</sub>, 1  $\mu$ l dNTP, 5  $\mu$ l RNA a 7  $\mu$ l RNAs zbavené vody. Následovala inkubace po dobu 5 minut při 65 °C a poté 1 minutu na ledu. Dále bylo do reakční směsi přidáno 4  $\mu$ l First Strand reakčního pufru (5krát koncentrovaného), 1  $\mu$ l 0,1 M DTT a 1  $\mu$ l reversní transkriptasy Superscript III (200 U/ $\mu$ l). Reakční směs byla promíchána a ponechána inkubovat 40 minut při 50 °C. Následovala inaktivace reversní transkriptasy 15 minutovou

inkubací při 70 °C. Takto připravená cDNA byla dále použita jako templát při PCR amplifikaci genu kódujícího extracelulární doménu mNKR-P1C<sup>BALB</sup>.

### 4.1.3 PCR amplifikace

Reakční směsi byly připraveny smícháním 31 µl dd H<sub>2</sub>O, 1,5 µl 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 µl Thermo Pol reakčního pufru (10krát koncentrovaného), 1,5 µl 10 mM dNTP, 5 µl 10 mM fw primeru, 5 µl 10 mM rv primeru, 1 µl templátu (cDNA o konc. 1 µg/µl) a 0,5 µl Deep Vent DNA polymerasy (2000 U/ml). Pro amplifikaci mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byla použita cDNA připravená podle kap. 4.1.2 a pro amplifikaci hAICL pak cDNA, která byla poskytnuta Mgr. Danielem Rozbeským. Samotná reakce byla provedena v termocycleru podle teplotního profilu obsaženém v Tab. 1.

Tab. 1: Teplotní profil PCR amplifikace

<i>Krok</i>	<i>Počet cyklů</i>	<i>T</i> °C	<i>t</i> min
1	1	94	2
2	30	94	0,5
		43	0,5
		72	1
3	1	72	10
4	1	4	-

Po dokončení reakce byly jednotlivé produkty vizualizovány pomocí agarosové elektroforézy. Zbylé produkty byly uchovávány při - 20 °C a dále použity na klonování.

### 4.1.4 Agarosová elektroforéza

Gel byl připraven rozpuštěním (za tepla) 0,5 g agarosy ve 40 ml TAE pufru. Po zchladnutí pod 50 °C byly přidány 2 µl ethidiumbromidu (o konc. 10 mg/ml). Následovalo nalití do vaničky a zanoření hřebene. Po ztuhnutí byl hřeben vyndán, gel byl přendán do elektroforetické aparatury a ponořen do TAE pufru. K 10 µl vzorků byly přidány 2 µl vzorkového pufru (6krát koncentrovaného). Takto připravené vzorky byly společně s markery naneseny do jednotlivých jamek. Separace probíhala při napětí 90 V po dobu asi 50 minut. K vizualizaci jednotlivých fragmentů DNA bylo využito fluorescence ethidiumbromidu (interkalovaného do DNA), která byla iniciována UV zářením.

#### 4.1.5 Ligace do klonovacího vektoru pBluescript SK+

Nejprve byla provedena agarosová elektroforéza, na kterou bylo nanášeno 20  $\mu$ l jednotlivých PCR produktů. Následně byly proužky, odpovídající požadovaným insertům, vyříznuty a extrahovány z gelu pomocí soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit. Bylo postupováno podle přiloženého protokolu. Výsledná přečištěná DNA byla použita do ligační směsi, která se sestávala z 1  $\mu$ l vektoru pBluescript SK+ (o konc. 1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 15,5  $\mu$ l přečištěného PCR produktu, 2  $\mu$ l NEB IV pufru, 0,5  $\mu$ l 20 mM ATP, 0,5  $\mu$ l restriční endonukleasy *Sma*I a 0,5  $\mu$ l T4 DNA ligasy (5 wU/ $\mu$ l). Směs byla promíchána a ponechána inkubovat přes noc při laboratorní teplotě.

Zaklonování insertů bylo zprostředkováno pomocí enzymu *Sma*I, který štěpí vektor pBluescript SK+. Tímto způsobem vzniknou tupé konce vektoru, do nichž je možno pomocí T4 DNA ligasy ligovat požadované inserty s tupými konci. Po zaligování DNA fragmentu do tohoto místa je toto narušeno a není tedy dále rozpoznáváno enzymem *Sma*I. Další výhodou je, že se právě v tomto místě nachází gen pro  $\beta$ -galaktosidasu, který je přerušen vloženým insertem a není poté funkční. Při transformaci bakterií takto vytvořeným konstruktem nedochází k přeměně substrátu  $\beta$ -galaktosidasy a vzniklé kolonie jsou bílé. Zde se jako substrát využívá X-Gal, což je derivát galaktosy spojený se substituovaným indolem, který po rozštěpení barví bakteriální kolonie modře. Tato selekce bakteriálních klonů je označována jako tzv. modro/bílá selekce (z angl. blue/white screening).

#### 4.1.6 Transformace kompetentních buněk

Kompetentní buňky *E. coli* kmen NovaBlue (uchovávané při - 80 °C) byly ponechány volně rozmrazit na ledu. Po roztátí buněk k nim bylo přidáno 10  $\mu$ l ligační směsi z kap. 4.1.5. Po 30 minutách inkubace na ledu, byl proveden tepelný šok teplotou 42 °C po dobu 45 s. Následně byly buňky přeneseny zpět na led a ihned k nim byl sterilně přidán 1 ml LB média bez antibiotik. Bakterie byly ponechány 1 hodinu při 37 °C a následně centrifugovány při 1 500 $\times$ g po dobu 5 minut za laboratorní teploty. Z mikrozkušavky byl odebrán 1 ml a zbylých 200  $\mu$ l bylo rozetřeno na misku obsahující LB agar s tetracyklinem (o výsledné konc. 12,5  $\mu$ g/ml) a ampicilinem (o výsledné konc. 150  $\mu$ g/ml). Před rozetřením bakterií byla ještě na ztuhlý agar rozetřena směs obsahující 20  $\mu$ l X-Gal (o konc. 50 mg/ml) a 100  $\mu$ l 100 mM IPTG. Miska s transformovanými

bakteriemi a miska bez plasmidu (kontrola) byly ponechány při 37 °C přes noc. Misky byly následně skladovány při 4 °C.

#### **4.1.7 Selekcce klonů obsahujících požadovaný konstrukt**

Nejprve byly připraveny noční kultury. Do čtyř označených sterilních zkumavek byly napipetovány 2 ml LB média obsahujícího tetracyklin a ampicilin ve stejných výsledných koncentracích jako v kap. 4.1.6. Dále byla do každé zkumavky přidána pomocí sterilního párátko jedna bílá kolonie (bakterie obsahující vektor s vloženým insetem), jež vyrostla na misce s LB agarem. Kultury byly ponechány třepat rychlostí 220 ot./min. při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. Z takto připravených nočních kultur byl odebrán 1 ml suspenze a byla izolována plasmidová DNA s použitím soupravy JETSTAR Plasmid MiniPrep. Bylo postupováno podle přiloženého protokolu. Následně byla plasmidová DNA štěpena restričními endonukleasami *NdeI* a *HindIII*. Reakční směs obsahovala 8 µl plasmidové DNA, 1 µl NEBII pufru (10krát koncentrovaného), 0,3 µl enzymu *NdeI* a 0,3 µl *HindIII*. Štěpení probíhalo 2 hodiny při teplotě 37 °C a výsledné fragmenty byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (kap. 4.1.4).

#### **4.1.8 Příprava linearisovaného plasmidu pET-30a(+) a insertu**

Prvním krokem byla příprava zásobního množství plasmidu pBluescript SK+ obsahujícího požadovaný insert. 100 ml LB média včetně příslušných antibiotik bylo zaočkováno 100 µl noční kultury připravené podle kap. 4.1.7, ve které byl pomocí restriční analýzy nalezen žádaný insert. Kultura byla ponechána třepat při 220 ot./min a teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. Následovala izolace plasmidové DNA pomocí soupravy JETSTAR Plasmid MaxiPrep, kdy bylo opět postupováno podle přiloženého manuálu. Dále byla stanovena koncentrace plasmidu, která byla následně upravena na hodnotu 1 mg/ml. Vektor pET-30a(+) o koncentraci 1 mg/ml byl poskytnut Mgr. Pavlem Hančem. Následovalo štěpení, 10 µg tohoto vektoru a 10 µg pBluescriptu se zaklonovaným insertem, restričními endonukleasami *NdeI* a *HindIII*. Reakční směsi obsahovaly 10 µl vektoru pET-30a(+) resp. 10 µl pBluescriptu, 1,5 µl *NdeI*, 1,5 µl *HindIII*, 3 µl NEBII pufru (10krát koncentrovaného) a ddH<sub>2</sub>O do výsledného objemu 30 µl u jednotlivých reakcí. Obě reakční směsi byly ponechány inkubovat při 37 °C po dobu 3 hodin. Poté byly jednotlivé fragmenty analyzovány pomocí agarosové



elektroforézy a příslušné proužky (insert a linearizovaný pET-30a(+)) byly vyříznuty pod UV lampou s dlouhovlnným UV zářením. Následně byla z gelu izolována DNA (použitím soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit). Takto připravená DNA byla použita k ligaci jednotlivých insertů do produkčního vektoru pET-30a(+).

#### **4.1.9 Stanovení koncentrace DNA**

K určení koncentrace DNA bylo využito spektrofotometrie při vlnových délkách 260 a 280 nm. Při 260 nm absorbují báze DNA a při 280 nm pak proteiny. Výsledný poměr  $A_{260}/A_{280}$  určuje čistotu DNA, u čisté DNA je tato hodnota 1,8. Koncentrace byla určována z empirického vztahu, kdy  $A_{260} = 1$  odpovídá 50  $\mu\text{g}$  DNA. Vzorky DNA byly před měřením většinou 100krát naředěny.

#### **4.1.10 Ligace insertů do expresního vektoru pET-30a(+)**

Ligační směs byla tvořena 4  $\mu\text{l}$  insertu (o konc. DNA 30  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), 12  $\mu\text{l}$  linearizovaného vektoru (o konc. DNA 30  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  pufru pro T4 DNA ligasu (10krát koncentrovaného), 1  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 0,3  $\mu\text{l}$  20 mM ATP a 0,5  $\mu\text{l}$  T4 DNA ligasy (5 wU/ $\mu\text{l}$ ). Směs byla promíchána a ponechána inkubovat přes noc za laboratorní teploty. Dále následovala transformace kompetentních buněk podle kap. 4.1.6 s tím rozdílem, že na misky s LB agarem nebyl nanesen X-Gal a IPTG. Dále byla provedena selekce klonů obsahujících požadované konstrukty (kap. 4.1.7). Bylo připraveno zásobní množství plasmidů mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL (kap. 4.1.8), které bylo skladováno při - 20 °C.

#### **4.1.11 DNA sekvenování připravených plasmidů**

Transformované bakterie, obsahující připravené konstrukty (mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL ve vektoru pET-30a(+)), byly předány Dr. Jürgenovi Felsbergovi, CSc. na MBÚ AV ČR, který provedl sekvenaci.

### **4.2. Příprava rekombinantních proteinů**

#### **4.2.1 Transformace kompetentních buněk**

K transformaci byly použity kompetentní buňky *E. coli* kmen BL21-Gold (DE3) uchovávané při - 80 °C. Po samovolném rozmrazení těchto buněk na ledu k nim bylo přidáno 0,5  $\mu\text{l}$  plasmidu o konc. 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  připraveného v kap. 4.1. Buňky byly

ponechány inkubovat na ledu po dobu 30 minut a následně byl proveden tepelný šok teplotou 42 °C po dobu 45 s. Dále byl přidán 1 ml LB média bez přítomnosti antibiotik a bakterie byly ponechány inkubovat 1 hodinu při teplotě 37 °C. Následně byly sцентрифugovány při 1 500×g po dobu 5 minut. Z mikrozkušavky bylo odebráno 1000 µl a zbylých 200 µl bylo rozetřeno na misku s LB agarem, která obsahovala tetracyklin (o výsledné konc. 12,5 µg/ml) a kanamycin (o výsledné konc. 50 µg/ml). Spolu s transformovanými bakteriemi byly na další misku s LB agarem a příslušnými antibiotiky rozetřeny i bakterie neobsahující plasmid, které sloužili jako kontrola. Následně byly obě misky ponechány 20 hodin v termostatu při 37 °C a poté byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

#### **4.2.2 Selekcce produkčních klonů**

Prvním krokem selekcce produkčního klonu byla příprava nočních kultur, kdy do čtyř sterilních zkumavek byly napipetovány vždy 3 ml LB média, obsahujícího tetracyklin a kanamycin o výsledných koncentracích jako v kap. 4.2.1. Následně byla do každé zkumavky pomocí sterilního párátko přenesena jedna kolonie bakterií, které vyrostly na misce s LB agarem. Všechny zkumavky byly ponechány třepat (220 ot./min.) přes noc při 37 °C. Druhý den bylo osm sterilních zkumavek, obsahujících 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky, zaočkováno 50 µl nočních kultur, kdy jednou noční kulturou byly zaočkovány média ve dvou zkumavkách. Všechny zkumavky byly ponechány třepat rychlostí 220 ot./min. po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby bylo do poloviny zkumavek označených plus přidáno 10,5 µl 100 mM IPTG (do výsl. konc. 1 mM). Zkumavky označené minus byly ponechány bez přídavku induktoru IPTG. Dále byly všechny vzorky ponechány opět třepat za stejných podmínek jako před přídavkem induktoru po dobu 3 hodin. Následně byly kultury přeneseny do mikrozkušavek a centrifugovány při 5 000×g za laboratorní teploty po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl odstraněn a sediment bakterií byl rozsuspendován ve 100 µl redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Vzniklé vzorky byly dále 5 minut povařeny, centrifugovány při 10 000×g po dobu 10 minut a analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz dále).

### 4.2.3 SDS-PAGE

Analýza vzorků byla prováděna vždy v 15% separačním polyakrylamidovém gelu, který byl společně s 5% zaostřovacím polyakrylamidovým gelem připraven smísením chemikálií podle Tab. 2 a 3. Takto připravené směsi byly nality mezi předem připravená elektroforetická skla. Nejprve byla nalita směs separačního gelu, která byla následně převrstvena destilovanou vodou. Po zatuhnutí tohoto gelu byla voda slita a nanášena směs zaostřovacího gelu, do které byl zanořen hřeben. Po ztuhnutí i tohoto gelu byl hřeben vyjmut a byla složena elektroforetická aparatura. Mezi skla a následně do celé aparatury byl nalit elektrodotový pufr. Následovalo nanášení vzorků, které byly připravovány smísením s redukujícím či neredukujícím vzorkovým puffrem pro SDS-PAGE (vždy v poměru 1:1), dále 5 minut povařeny a centrifugovány při 10 000×g po dobu 10 minut. Objem nanášených vzorků se pohyboval v rozmezí 10 - 20 μl. Společně se vzorky byl do první dráhy vždy nanesen standard molekulových hmotností o objemu 5 μl. Aparatura byla uzavřena a na elektrody bylo přivedeno napětí 200 V, při kterém separace trvala asi 50 minut. Po skončení analýzy byly gely opatrně vyjmuty a ponechány 15 minut barvit v barvicím roztoku pro SDS-PAGE. Po uplynutí této doby byl barvicí roztok slit, gely propláchnuty destilovanou vodou a ponořeny do fixačního a odbarvovacího roztoku pro SDS-PAGE. Po odbarvení byly gely skladovány v 1% kyselině octové.

Tab. 2: Složení 15% separačního polyakrylamidového gelu (množství k přípravě 2 gelů)

<i>Látka</i>	<i>V</i> ml
dd H <sub>2</sub> O	2,3
30% Akrylamidová směs	5,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10% SDS	0,1
10% APS	0,1
TEMED	0,004

Tab. 3: Složení 5% zaostřovacího polyakrylamidového gelu (množství k přípravě 2 gelů)

<i>Látka</i>	<i>V</i> ml
dd H <sub>2</sub> O	1,4
30% Akrylamidová směs	0,33
1,5 M Tris (pH 6,8)	0,25
10% SDS	0,02
10% APS	0,02
TEMED	0,004

#### 4.2.4 Identifikace produkovaných proteinů

Oba připravené proteiny byly identifikovány pomocí Edmanova odbourávání a analýzy tryptických štěpů technikou peptidového mapování (MALDI-TOF MS).

Edmanovým odbouráváním bylo stanovováno 20 aminokyselin vyskytujících se na N-konci proteinů. Proteiny byly nejprve separovány pomocí SDS-PAGE a následně přeneseny elektropřenosem na PVDF membránu. Gel po skončení SDS-PAGE byl ponořen do pufru pro elektropřenos. Do aparatury pro elektropřenos bylo vložena maska, jejíž velikost odpovídala velikosti gelu z SDS elektroforézy. Na masku bylo navrstveno 6 filtračních papírů namočených v pufru pro elektropřenos, na které byla umístěna PVDF membrána namočená v methanolu. Na membránu byl dále položen polyakrylamidový gel z SDS elektroforézy, na něj potom dalším 6 filtračních papíru (opět namočených v pufru pro elektropřenos) a víko aparatury. Přenos probíhal při proudové hustotě  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  po dobu asi 50 minut. Po skončení přenosu byla membrána vizualizována 1 minutu v barvicím roztoku pro SDS-PAGE a následně odbarvena v odbarvovacím roztoku pro PVDF membrány. Po odbarvení následovalo vysušení membrány a předání Prof. Karlu Bezouškovi, který zprostředkoval sekvenaci.

Druhý způsob identifikace proteinů byla analýza tryptických štěpů technikou peptidového mapování. Proužky představující jednotlivé proteiny byly vyříznuty skalpelem z polaakrylamidového gelu po stanovení produkčních klonů, následně rozkrájeny a odbarvovány přes noc ve  $100 \mu\text{l}$  AcN a  $100 \mu\text{l}$   $100 \text{ mM}$  N-ethylmorfolinoacetátového pufru o pH 8,4. Po odbarvení kousků gelu byl roztok odebrán, bylo přidáno  $100 \mu\text{l}$  AcN, promícháno pomocí pipety a roztok byl opět odebrán. Následovalo přidání  $50 \mu\text{l}$   $50 \text{ mM}$  roztoku TCEPu, se kterým byly vzorky 10 minut povařeny. Poté byl tento roztok opět odebrán a kousky gelu byly propláchnuty přidáním a odebráním  $100 \mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O a poté  $100 \mu\text{l}$  AcN. K takto připraveným vzorkům bylo napipetováno  $50 \mu\text{l}$   $50 \text{ mM}$  jódacetamidu, kterým byly alkylovány cysteiny přítomné v molekulách proteinů. Následovala 1,5 hodinová inkubace ve tmě, poté odebrání roztoku, přidání  $100 \mu\text{l}$  AcN, 5 minutová sonikace ve vodní lázni a odebrání roztoku AcN. Dále bylo přidáno  $100 \mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, opět sonikace a odebrání roztoku. Tyto proplachy s AcN a ddH<sub>2</sub>O byly provedeny celkem třikrát. Na závěr byly vzorky propláchnuty  $50 \mu\text{l}$   $50\%$  AcN a vysušeny na speedvacu. Dalším krokem bylo stěpení proteásou, kdy ke kouskům gelu bylo napipetováno  $30 \mu\text{l}$  N-ethylmorfolinoacetátového

pufri s 10% AcN o pH 8,4 a 0,3  $\mu\text{l}$  trypsinu (o konc. 500  $\mu\text{g/ml}$ ). Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C. Druhý den bylo ke vzorkům přidáno 6,5  $\mu\text{l}$  směsi 5% TFA a 95% AcN. Následovala 15 minutová sonikace ve vodní lázni a nanesení 0,5  $\mu\text{l}$  vzorku na terčik spolu s 0,5  $\mu\text{l}$  matrice, připravené smísením nasyceného roztoku  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny v MeOH, 80% AcN 0,1% TFA a ddH<sub>2</sub>O v poměru 1:1:1. Jednotlivá měření byla poté provedena Mgr. Danielem Rozbeským.

#### **4.2.5 Velkoobjemová produkce proteinů**

Oba proteiny (mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL) byly produkovány ve 2 litrech LB média v přítomnosti tetracyklinu a kanamycinu o výsledných konc. popsáných v kap. 4.2.1. Bakterie byly ponechány růst ve 4 Erlenmeyerových baňkách při 220 ot./min a 37 °C. Každá baňka obsahovala 500 ml LB média s příslušnými antibiotiky, které bylo zaočkováno 500  $\mu\text{l}$  nočních kultur připravených podle kap. 4.2.2. Průběžně byla měřena optická densita při 550 nm. Při hodnotě OD<sub>550</sub>  $\sim$  0,7 byl přidán induktor IPTG do výsledné konc. 1 mM. Po indukci byly bakterie ponechány produkovat příslušné proteiny po dobu 6 hodin za stejných podmínek jako před indukcí. Před přidáním IPTG a po skončení produkce byl odebrán 1 ml pro kontrolu.

#### **4.2.6 Izolace inkluzních tělísek**

Po ukončení produkce byly kultury centrifugovány při 8 000 $\times$ g po dobu 10 minut při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a suspenze bakterií z 1 litru LB média byla rozsuspendována ve 20 ml sacharosového lyzačního pufri s přidavkem inhibitorů proteas - leupeptinu (výsledná konc. 1  $\mu\text{M}$ ) a PMSF (výsledná konc. 1 mM). Buňky byly rozbity právě využitím vysokého osmotického tlaku sacharosového lyzačního pufri v kombinaci se sonikací po dobu 3 $\times$ 30 s. Po tomto kroku byla homogení směs 4 $\times$  zmražena a rozmražena. Po posledním rozmražení a vytemperování na laboratorní teplotu bylo přidáno (k suspenzi vzniklé z 1 litru LB média) 400  $\mu\text{l}$  1 M MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu\text{l}$  deoxyribonukleasy (100 U/  $\mu\text{l}$ ) a 5  $\mu\text{l}$  ribonukleasy (10 mg/ml) a vzorky byly ponechány inkubovat 20 minut za laboratorní teploty. Následovala sonikace a centrifugace při 8 000 $\times$ g po dobu 10 minut při 4 °C. Ze vzniklého supernatantu bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$  pro kontrolu průběhu izolace. Zbýlý supernatant byl slit a sediment byl rozsuspendován ve 20 ml pufri s detergentem společně s inhibitory proteas, které byly

přidány do stejné výsledné koncentrace jako v případě sacharosového pufru. Následovala opět sonikace 3×30 s a centrifugace při 8 000×g po dobu 10 minut při 4 °C. Ze vzniklého supernatantu bylo opět odebráno 100 µl pro kontrolu a zbylý roztok byl odstraněn. Posledním krokem bylo rozsuspendování sedimentu v 10 ml promývacího pufru bez detergentu společně se stejnou výslednou koncentrací inhibitorů jako v předešlých dvou krocích. Poté byly vzorky opět sonikovány a centrifugovány za stejných podmínek jako v předešlých krocích. Ze vzniklého supernatantu bylo odebráno 100 µl pro kontrolu. Ze sedimentu inkluzních tělísek byl taktéž odebrán vzorek. Všechny odebrané vzorky (před přidavkem IPTG, po skončení produkce, supernatanty z jednotlivých kroků izolace a sediment inkluzních tělísek) byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE podle kap. 4.2.3. Inkluzní tělíška pak byla skladována při - 20 °C.

#### 4.2.7 Optimalizace *in vitro* renaturace mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL

Sediment inkluzních tělísek (příslušného proteinu) z 1 litru LB média byl rozpuštěn ve 4 ml guanidinového pufru, s přidavkem leupeptinu a PMSF (o stejných výsledných konc. jako v kap. 4.2.6). Následovala inkubace při teplotě 40 °C. Po rozpuštění inkluzních tělísek byla provedena ultracentrifugace při 185 000×g po dobu 20 minut při 20 °C. Vzniklé supernatanty byly rovnoměrně rozděleny a následně pomalu přikapány při 4 °C vždy do 4 renaturačních pufrů o objemech 100 ml, jejichž složení popisují Tab. 4 a 5. Proteiny byly tedy renaturovány metodou rychlého naředění (protein byl vždy 100krát naředěn).

Tab. 4: Složení renaturačních pufrů pro optimalizaci renaturace mNKR-P1C<sup>BALB</sup>

<i>Látka</i>	<i>Podmínka</i>			
	A	B	C	D
L-Arginin	1 M	1 M	1 M	0,4 M
Cystamin	3 mM			
Cysteamin	9 mM	9 mM	4 mM	9 mM
Tris-HCl	50 mM			
CaCl <sub>2</sub>	100 mM			
NaN <sub>3</sub>	1 mM			
PMSF	1 mM			
pH	9,0	8,5	8,5	8,5

Tab. 5: Složení renaturačních pufrů pro optimalizaci renaturace hAICL

<i>Látka</i>	<i>Podmínka</i>			
	A	B	C	D
PIPES	20 mM		-	
HEPES	-		20 mM	
Cystamin	3 mM	1 mM	3 mM	1 mM
Cysteamin	9 mM	10 mM	9 mM	10 mM
L-Arginin	1 M			
CaCl <sub>2</sub>	100 mM			
NaN <sub>3</sub>	1 mM			
PMSF	1 mM			
pH	6,8		7,5	

Po přidání supernatantů jednotlivých proteinů do příslušných renaturačních pufrů následovala inkubace po dobu 1 hodiny při 4 °C. Poté byly všechny roztoky přeneseny do dialyzačních trubic a dialyzovány po dobu 6 a následně 12 hodin oproti dialyzačním pufrům (o objemech 8 litrů), jejichž složení popisují Tab. 6 a 7.

Tab. 6: Složení dialyzačního pufru pro mNKR-P1C<sup>BALB</sup>

<i>Látka</i>	<i>Podmínka</i>			
	A	B	C	D
Tris	15 mM			
NaCl	9 mM			
NaN <sub>3</sub>	1 mM			
pH	9,0	8,5	8,5	8,5

Tab. 7: Složení dialyzačního pufru pro hAICL

<i>Látka</i>	<i>Podmínka</i>			
	A	B	C	D
PIPES	10 mM	-		
HEPES	-	10 mM		
NaCl	9 mM			
NaN <sub>3</sub>	1 mM			
pH	6,8		7,5	

Po skončení dialýzy byly jednotlivé roztoky přelity z dialyzačních trubic do kádinek a následně zahuštěny ultrafiltrací na objem cca 30 ml. Byla použita ultrafiltrační membrána s limitem propustnosti (cut off) 10 kDa. Zahuštění probíhalo při stálém míchání, za laboratorní teploty a tlaku dusíku (inertního plynu) 0,5 MPa. Takto zahuštěné proteiny byly dále analyzovány pomocí ionexové chromatografie na Q Sepharose FF (mNKR-P1C<sup>BALB</sup>) resp. SP Sepharose FF (hAICL).

#### 4.2.8 Ionexové chromatografie

V případě mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byla použita kolona Q Sepharosy FF (anex) o rozměrech 1,6×14 cm, protože tento protein byl při pH 8,5 resp. 9,0 záporně nabitý. Separace probíhala 90 minut s lineárním gradientem od 9 mM až po 1 M NaCl na HPLC systému BioSys 510 s průtokovým fotometrickým detektorem při vlnové délce 280 nm. Průběh gradientu je naznačen v chromatogramu v kap. 5.3.6. Po zahuštění proteinů (odpovídajících jednotlivým podmínkám renaturace) pomocí ultrafiltrace, byla provedena centrifugace při 15 000×g po dobu 10 minut při 20 °C. Následně byly vzorky přefiltrovány přes bakteriologický filtr o velikosti pórů 22 μm a nanесeny na kolonu. Kolona byla ještě před nanесením jednotlivých vzorků promyta. Ekvilibrace byla provedena nejprve pufrém B pro ionexovou chromatografii mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a následně pufrém A pro ionexovou chromatografii mNKR-P1C<sup>BALB</sup>. Nanášení vzorků probíhalo při průtokové rychlosti 3 ml/min. Po nanесení vzorku byla spuštěna metoda s lineárním gradientem NaCl. Průtok mobilní fáze byl 3 ml/min. Jednotlivé frakce byly jímány manuálně a poté analyzovány pomocí SDS-PAGE. Po skončení separace byla kolona uchovávána ve 20% (v/v) ethanolu.

Pro analýzu hAICL byla použita kolona SP Sepharosy FF (katex o rozměrech 1,6×6,5 cm), jelikož při pH 6,8 (resp. 7,5) je náboj tohoto proteinu kladný. Separace a příprava vzorků probíhala stejným způsobem jako mNKR-P1C<sup>BALB</sup> s tím rozdílem, že byly použity pufrы A a B pro ionexovou chromatografii hAICL a průtok mobilní fáze byl 2 ml/min. Po skončení analýzy byla kolona uchovávána ve 20% (v/v) ethanolu.

#### 4.2.9 Gelové filtrace na Superdexu 200

Vzorky hAICL, odpovídající jímaným frakcím z SP Sepharosy FF a obsahující hledaný protein, byly nejprve zahuštěny pomocí centrifugačního koncentrátoru s limitem propustnosti 10 kDa na objem cca 250 μl. Koncentrování bylo provedeno při 2 000×g a teplotě 20 °C po dobu nutnou k dosažení požadovaného objemu. Jednotlivé retenáty byly poté promíchány pomocí pipety a přeneseny do mikrozkuhavky, ve které byly centrifugovány při 10 000×g po dobu 2 minut za laboratorní teploty. Takto připravené vzorky byly nanáшeny na kolonu Superdexu 200 10/300 GL (o rozměrech 1×30 cm) použitím opět HPLC systému BioSys 510 s průtokovým fotometrickým detektorem nastaveným na vlnovou délku 280 nm. Kolona byla před nanесením vzorků promyta



pufrem pro gelovou filtraci hAICL. Separace probíhala 60 minut při průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min. Jímané frakce byly zahuštěny a opět analyzovány pomocí SDS-PAGE. Kolona byla po skončení analýzy skladována ve 20% (v/v) ethanolu.

Analýza frakcí mNKR-P1C<sup>BALB</sup> po ionexové chromatografii na Q Sepharose FF byla nejprve provedena na Superdexu 200 16/60 High Load (o rozměrech 1,6×60 cm). Jednotlivé frakce byly opět zahuštěny na cca 1000 µl použitím centrifugačního koncentrátoru s limitem propustnosti 10 kDa. Tento krok a další příprava vzorku byly provedeny stejně jako u analýzy hAICL. Kolona byla nejprve promyta pufrem pro gelovou filtraci mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a následně byl nanesen vzorek. Separace probíhala 100 minut při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Jednotlivé frakce byly opět analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce, obsahující požadovaný protein, byly po této separaci ještě jednou přečištěny použitím gelové filtrace na koloně Superdexu 200 10/300 GL. Tento purifikační krok byl proveden za stejných podmínek jako separace hAICL na této koloně s tím rozdílem, že byl použit pufr pro gelovou filtraci mNKR-P1C<sup>BALB</sup>. Čistota takto přečištěných proteinových preparátů byla opět vyhodnocena pomocí SDS-PAGE.

#### **4.2.10 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové**

Frakce obou proteinů z finálních gelových filtrací na Superdexu 200 10/300 GL, byly zahuštěny použitím centrifugačních koncentrátorů na objem cca 500 µl (podle kap. 4.2.9). Koncentrace proteinů byly stanovovány pomocí kalibrační řady standardů BSA. Tato byla připravena v dubletu, a to napipetováním 5 µl roztoků BSA o koncentracích 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml na mikrotitrační destičku. Dále bylo na destičku napipetováno 5 µl jednotlivých frakcí proteinů (podle potřeby naředěných do rozsahu kalibrační řady), taktéž v dubletu. Ke všem vzorkům a standardům BSA bylo napipetováno 200 µl činidla pro stanovení dle Bradfordové, které obsahovalo Coomassie Brilliant Blue G-250. Po 5 minutách byla změřena absorbance při 595 nm (vlnová délka odpovídající vazbě činidla na protein) za použití monochromátorové čtečky destiček Safire. Z hodnot absorbancí kalibrační řady byla sestrojena kalibrační křivka, ze které byla poté odečtena koncentrace jednotlivých proteinových frakcí.

## 4.3 Charakterizace připravených proteinových preparátů pomocí hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie se stala nepostradatelnou součástí analýz všech typů vzorků. Pro stanovení vlastností proteinů se nejvíce využívají v současné době dva hlavní přístupy, a to bottom-up a top-down. Bottom-up přístup je založen na analýze peptidů, které vzniknou rozštěpením proteinu pomocí specifických proteas (trypsin, chymotrypsin, GluC, AspN, atd.). Tyto peptidy mohou být následně separovány pomocí kapalinové chromatografie a identifikovány s využitím hmotnostního spektrometru (spojení LC/MS) nebo mohou být analyzovány všechny najednou (MALDI-TOF MS). Tento přístup byl využit v této práci při identifikaci proteinů (MALDI-TOF MS) i při stanovení disulfidických můstků (LC/MS). Druhý přístup (tzv. top-down) vychází z analýzy celých molekul. Zde jsou molekuly fragmentovány až přímo ve hmotnostním spektrometru, kde jsou vzniklé fragmenty ihned analyzovány [87].

### 4.3.1 Stanovení disulfidických můstků

Oba proteiny (mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL) byly nejprve analyzovány pomocí SDS-PAGE v neredukujícím prostředí z důvodu ověření čistoty a oddělení případných nečistot. Proužky představující jednotlivé proteiny byly vyříznuty z gelu, rozkrájeny na malé kousky a následně odbarvovány přes noc ve 100  $\mu$ l AcN, 100  $\mu$ l 100 mM N-ethylmorfolinoacetátového pufru o pH 8,4 a cystaminu o výsledné konc. 200  $\mu$ M. Po odbarvení byl roztok odebrán a kousky gelu byly postupně promyty 100  $\mu$ l AcN a poté 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, celkem třikrát. Po odstranění posledního roztoku bylo přidáno 50  $\mu$ l 50% AcN, promícháno a roztok byl opět odebrán. K jednotlivým vzorkům byly přidány štěpící pufrы pro jednotlivé proteasy (tak aby byly kousky gelů převrstveny) a proteasy: trypsin, chymotrypsin, AspN a GluC. Štěpení prvními třemi proteasami probíhalo při 37 °C a štěpení pomocí GluC pak při laboratorní teplotě.

Dalším krokem byla izolace peptidů. Do čistých mikrozkušavek byl přenesen štěpící pufr (obsahující peptidy) z jednotlivých vzorků. Z kousků gelů těchto vzorků byly následně izolovány peptidy, nejprve propláchnutím v 50% AcN, poté v 0,1% TFA a nakonec v roztoku 80% AcN a 0,1% TFA. Všechny tyto roztoky byly postupně přidány ke kouskům gelů. Poté byla směs sonikována ve vodní lázni po dobu 5 minut a daný roztok byl odebrán a přidán do mikrozkušavky obsahující štěpící pufr. Kousky gelů

byly vyhozeny a roztok vzniklý smísením jednotlivých izolačních roztoků byl vysušen na Speedvacu na cca 50  $\mu$ l.

Následovalo odsolení na kolonce Microtrapu, která obsahuje stacionární reverzní fázi. Microtrap byl nejprve dvakrát propláchnut roztokem 80% AcN a 1% TFA, poté 0,1% TFA a následně byl na kolonku nanesen vzorek izolovaných peptidů, který byl naředěn na 500  $\mu$ l pomocí 0,1% TFA. Dále byla kolonka třikrát propláchnuta 0,1% TFA a byly tak odstraněny přítomné soli. Peptidy byly následně eluovány pomocí 50  $\mu$ l 80% AcN a 1% TFA. Z tohoto roztoku bylo odebráno 0,5  $\mu$ l pro potvrzení přítomnosti peptidů pomocí MALDI MS analýzy a poté byl tento roztok vysušen pomocí vakuové odparky do sucha.

Po kontrole přítomnosti peptidů v jednotlivých vzorcích pomocí MALDI MS analýzy, byly vzorky analyzovány pomocí LC/MS (kapilární HPLC/ESI FT-ICR MS). Obě tato měření byla provedena RNDr. Petrem Novákem, Ph.D. Příprava vzorku proteinu mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byla provedena Mgr. Danielem Rozbeským.

#### **4.3.2 Stanovení molekulových hmotností obou proteinů**

U obou připravených proteinů byla stanovena monoizotopická molekulová hmotnost. Proteinové preparáty byly nejprve odsoleny na Microtrapu (kap. 4.3.1). Namísto TFA v jednotlivých roztocích byla použita kyselina octová. Následně byly vzorky nastříknuty do hmotnostního spektrometru ESI FT-ICR MS. Zde došlo nejprve k ionizaci pomocí elektrospreje (ESI) a následně k analýze hmotnosti iontů v analyzátoru využívající iontové cyklotronové resonance v kombinaci s Fourierovou transformací (FT-ICR). Toto měření bylo provedeno RNDr. Petrem Novákem, Ph.D.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Úvod k výsledkům

Hlavními cíli této práce bylo připravit plasmidy pro rekombinantní expresi extracelulárních domén receptorů mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL, a jejich následné použití při produkci v expresním systému *E. coli*. Tento expresní systém využívá silného T7 promotoru obsaženého v expresním vektoru pET-30a(+). Na tento promotor se váže T7 RNA polymerasa, která se nachází v kompetentních buňkách *E. coli* a jejíž exprese (a tedy zároveň i exprese genu zaklonovaného v expresním vektoru) je regulována pomocí induktoru IPTG.

Aminokyselinové složení a hodnoty izoelektrických bodů produkovaných proteinů zobrazuje Obr. 6. Oba proteiny se za fyziologických podmínek vyskytují v podobě dimerů [51, 83]. Dimerní mNKR-P1C<sup>BALB</sup> se vyznačuje monoizotopickou molekulovou hmotností 35 307,82 Da, dimerní hAICL pak monoizotopickou molekulovou hmotností 27 728,80 Da.

mNKR-P1C<sup>BALB</sup> – 223 AMK

**MDTARVYFGLKPPRTPGAWHESPLSLPPDACRCPRSHRLAIKLSCAGLILL**  
**VLTLIGMSVLVRVLIQKPSREKCCVLIQENLNKTTDSPAKQECPOHWLSHR**  
**DKCFHISOVSNTWEEGOADSGRKEATLLLIQDOEELRFLDLSIKENYNSEF**  
**IGLRYTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKII GVTENGSCATISGDKVTSESCST**  
**DNRWICQKELNHETPSNDS**

Teoretická hodnota pI: 5,07

hAICL – 149 AMK

**MMTKHKKCFIIVGVLIITNIITLIVKLTRDSOSLCPYDWIGFONKCYFESK**  
**EEGDWNSKYNCSSTOHADLTIIDNIEEMNFLRRYKCSSDHWI GLKMAKNRT**  
**GQWVDGATFTKSEFGMRGSEGCAYLSDDGAATARCYTERKWI CRKRIH**

Teoretická hodnota pI: 8,47

Obr. 6: Aminokyselinové sekvence receptorů mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (výše) a hAICL (níže). **Červeně** jsou vyznačeny intracelulární části, **modře** transmembránové a **zeleně** extracelulární domény příslušných receptorů. Sekvence připravovaných proteinů jsou naznačeny **podtržením** a žlutě jsou vyznačeny **cysteiny**. Obrázek taktéž zobrazuje hodnoty izoelektrických bodů připravovaných proteinů.

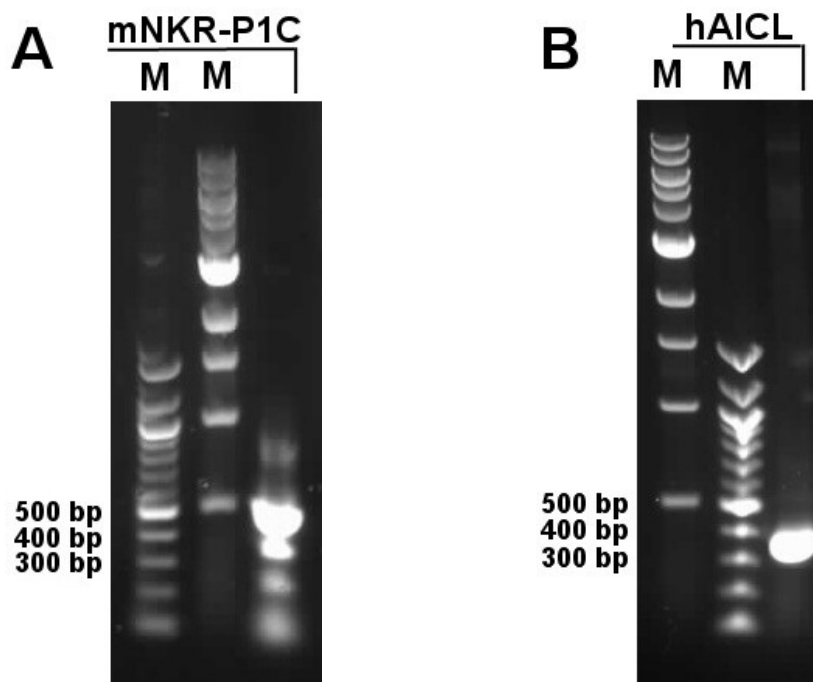
## 5.2 Příprava expresních plasmidů

### 5.2.1 Izolace RNA a reversní transkripce

Celková RNA byla izolována ze dvou čerstvých slezin, které pocházely z myší kmene BALB/c. Homogenizace byla provedena v přítomnosti TRI reagentu obsahujícího fenol a guanidin thiokyanát (inhibitor RNAs). K této směsi byl přidán chloroform a byla provedena extrakce. Přítomné proteiny se nacházely ve spodní organické fázi, DNA v mezifázi a v horní vodné fázi se vyskytovala RNA. Tato vrchní vodná fáze byla odebrána a RNA vysrážena pomocí isopropanolu a přečištěna pomocí 75% ethanolu. Celý průběh izolace probíhal sterilně ve flowboxu podle kap. 4.1.1. Takto připravená RNA byla ihned použita jako templát pro reversní transkripci. Bylo postupováno podle kap. 4.1.2. Zde byla použita reversní transkriptasa Superscript III (200 U/ $\mu$ l). Jako primer byl použit Oligo(dT)<sub>20</sub> (oligonukleotid složený pouze z thyminů), který nasedl na polyA konec RNA. Reversní transkriptasa byla po proběhnutí reakce inaktivována zvýšením teploty. Vzniklá cDNA byla dále použita k amplifikaci genu, kódujícího požadovaný úsek mNKR-P1C<sup>BALB</sup>, pomocí PCR.

### 5.2.2 PCR amplifikace

Amplifikace genů kódujících požadované proteiny byla provedena využitím polymerasové řetězové reakce s teplotním profilem zahrnutým v kap. 4.1.3. Pro amplifikaci hAICL byla, jako templát, využita cDNA poskytnutá Mgr. Danielem Rozbeským a pro mNKR-P1C<sup>BALB</sup> pak cDNA připravená podle kap. 4.1.2. Při obou reakcích byla použita Deep Vent DNA polymerasa, která vytváří tupé konce. Jako primery byly použity oligonukleotidy, v nichž byly zahrnuty na 5' koncích specifická místa pro štěpení restrikčními endonukleasami. Přímý primer obsahoval místo pro štěpení pomocí *NdeI*, reversní primer pak místo pro štěpení pomocí *HindIII*, které bylo zároveň i součástí stop kodonu. Jednotlivé PCR produkty byly následně analyzovány agarosovou elektroforézou (kap. 4.1.4). Průběh tohoto stanovení popisuje Obr. 7 na str. 54. Inset mNKR-P1C<sup>BALB</sup> o velikost 491 bp byl na elektroforéze pozorován v majoritním množství, avšak zde došlo k méně specifickému nasednutí primerů. Inset hAICL o velikosti 360 bp byl přítomen bez vedlejších produktů. Vzniklé produkty byly dále použity pro klonování do vektoru pBluescript SK+.



Obr. 7: Záznam agarosové elektroforézy PCR amplifikace mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (vlevo, část A) a hAICL (vpravo, část B). Dráhy označené M představují standardy (markery) určující délku nukleotidových řetězců.

### 5.2.3 Ligace do klonovacího vektoru pBluescript SK+

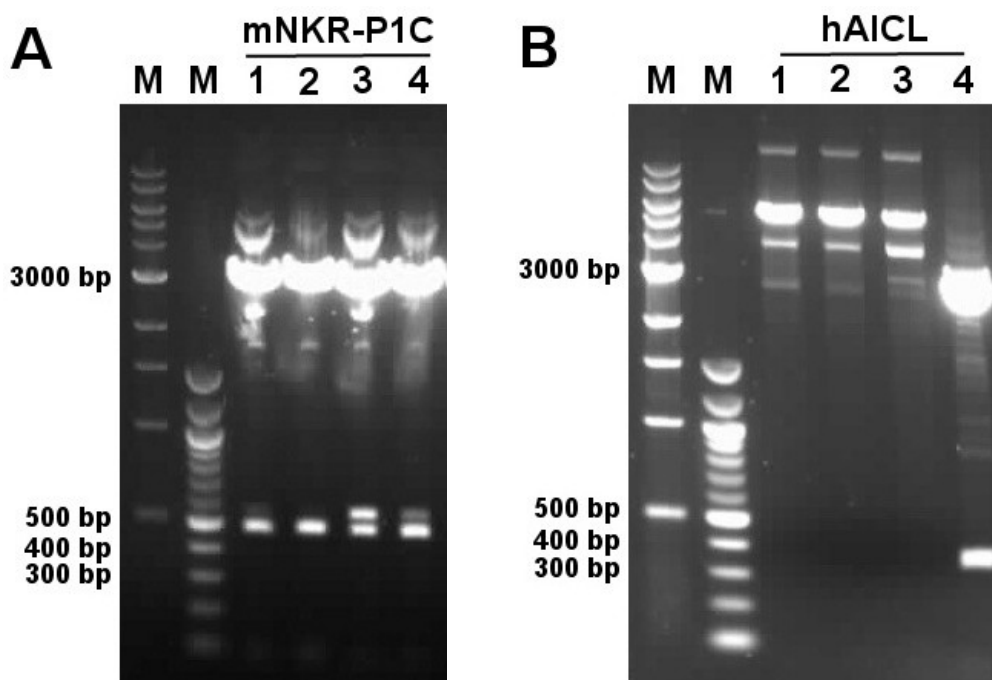
Tento krok popisuje kap. 4.1.5. Nejprve byla provedena preparativní agarosová elektroforéza jednotlivých PCR produktů. Proužky odpovídající velikosti jednotlivých insertů byly vyříznuty z gelu. Následně z nich byla izolována DNA, která byla poté použita do ligační směsi. Ligace byla uskutečněna pomocí T4 DNA ligasy (5 wU/μl) za laboratorní teploty.

### 5.2.4 Transformace kompetentních buněk a selekce klonů obsahujících požadované konstrukty

Pro transformaci byly použity buňky *E. coli* kmen NovaBlue, které jsou standardně uchovávány při - 80 °C. Samotná transformace byla provedena metodou tepelného šoku s využitím ligačních směsí připravených v kap. 4.1.5. Celý postup byl proveden podle kap. 4.1.6. Pro selekci buněk neobsahujících pBluescript SK+ bylo využito přítomnosti genu, zajišťujícího resistenci na ampicilin, v tomto vektoru. K selekci buněk, transformovaných vektory s obsaženými inserty, pak bylo využito přítomnosti přerušenoého genu pro β-galaktosidasu v těchto vektorech (modro/bílá selekce).

Na miskách s LB agarem vyrostlo cca 50 bakteriálních kolonií, z nichž zhruba polovina byla modrá.

Pro selekci klonů, obsahujících požadované konstrukty, byly nejprve připraveny noční kultury. Vždy 4 bílé kolonie byly přeneseny z LB agaru do tekutého LB média s příslušnými antibiotiky podle kap. 4.1.7. Tyto byly ponechány inkubovat při 37 °C přes noc. Z části objemu těchto kultur byly izolovány plasmidové DNA, které byly následně rozštěpeny pomocí restrikčních endonukleas *NdeI* a *HindIII*. Výsledky jednotlivých štěpení byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 8).



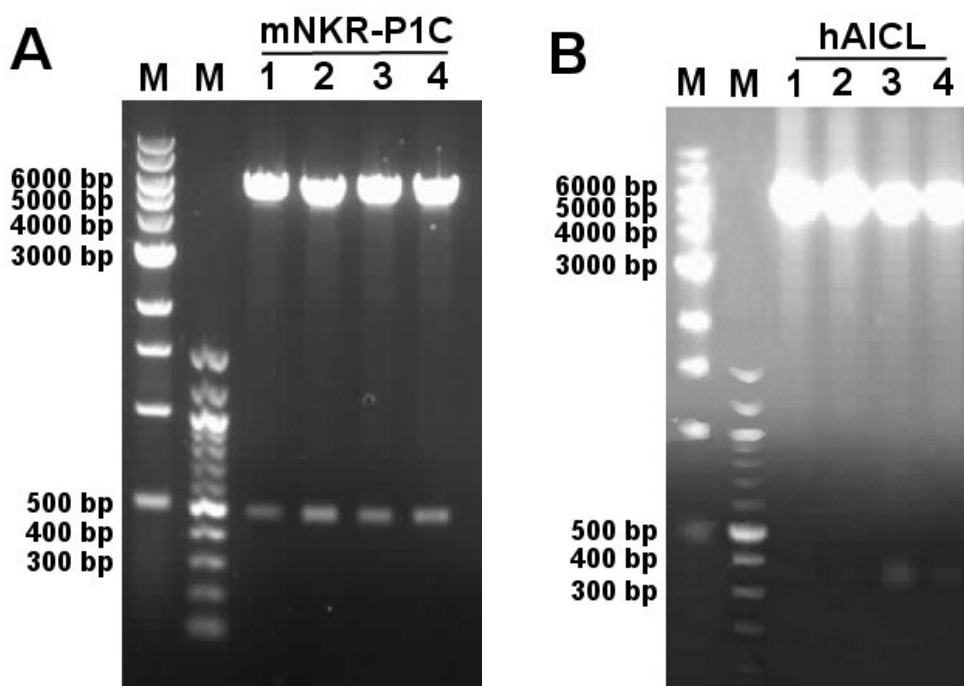
Obr. 8: Selekcce klonů, obsahujících inserty mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (část A) a hAICL (část B) ve vektoru pBluescript SK+, provedená pomocí agarosové elektroforézy. Dráhy označené M představují markery, dráhy 1 - 4 pak plasmidovou DNA izolovanou z různých bakteriálních klonů.

Z Obr. 8 je patrné, že insert mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (491 bp) a příslušná velikost vektoru (3000 bp) byly nalezeny ve všech drahách. V dráze číslo 2 byl však pozorován nejširší proužek insertu a také nejspecifičtější štěpení plasmidu. Byl tedy vybrán tento klon, se kterým bylo dále postupováno. V případě hAICL byl nalezen insert (360 bp) a požadovaná velikost vektoru v dráze číslo 4. Tento bakteriální klon byl vybrán pro další postup.

## 5.2.5 Klonování do expresního vektoru pET-30a(+)

Prvním krokem byla příprava insertů a linearizovaného vektoru pET-30a(+). Inserty byly připraveny štěpením plasmidových DNA pomocí restrikčních endonukleas *NdeI* a *HindIII*. Těmito enzymy byl též rozštěpen vektor pET-30a(+). Jednotlivé fragmenty byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Inserty spolu s linearizovaným vektorem byly vyříznuty z gelu a následně byla z těchto výřezů izolována DNA. Bylo postupováno podle kap. 4.1.8.

Takto připravené vzorky DNA byly použity do ligační směsi, která obsahovala 120 ng insertu a 360 ng linearizovaného vektoru. Poměr koncentrací insertu a vektoru byl tedy 1:3. Použitím T4 DNA ligasy bylo docíleno zaligování příslušných insertů do vektoru pET-30a(+) (kap. 4.1.10). Následovala transformace kompetentních buněk a selekce klonů obsahujících požadované konstrukty (kap. 4.1.7 a 4.1.10). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 9).



Obr. 9: Selekcce klonů, obsahujících inserty mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (část A) a hAICL (část B) ve vektoru pET-30a(+), provedená pomocí agarosové elektroforézy. Dráhy označené M představují markery, dráhy 1 - 4 pak plasmidovou DNA izolovanou z různých bakteriálních klonů.



Po vyhodnocení agarosové elektroforézy (Obr. 9, str. 56) bylo patrné, že insert mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (491 bp) a vektor pET-30a(+) (5422 bp) obsahují všechny čtyři bakteriální klony. Byl tedy vybrán klon číslo 2 (z důvodu nejširšího proužku insertu), ze kterého bylo připraveno zásobní množství plasmidu (kap. 4.1.8). Insert hAICL (360 bp) společně s vektorem o správné velikosti, byl pozorován zejména u vzorku číslo 3. Tento bakteriální klon byl tedy rovněž použit pro přípravu zásobního množství plasmidu. Výtěžek plasmidu mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byl 52 µg DNA a výtěžek plasmidu hAICL byl 65 µg DNA. Čistota plasmidů, stanovená poměrem A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, byla v rozmezí 1,7 - 1,9.

Transformované bakterie na miskách s LB agarem, obsahující připravené konstrukty (mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL ve vektoru pET-30a(+)), byly předány Dr. Jürgenovi Felsbergovi, CSc. na MBÚ AV ČR, který provedl sekvenaci. Porovnáním dat ze sekvenace s databází GenBank byla nalezena bodová mutace v konstruktu mNKR-P1C<sup>BALB</sup> na pozici 450, která se však nacházela ve třetí bázi kodonu a nezapříčinila změnu aminokyseliny. Výsledky sekvenace hAICL se přesně shodovaly se sekvencí kódující tento protein v databázi GenBank.

## **5.3 Příprava rekombinantních proteinů**

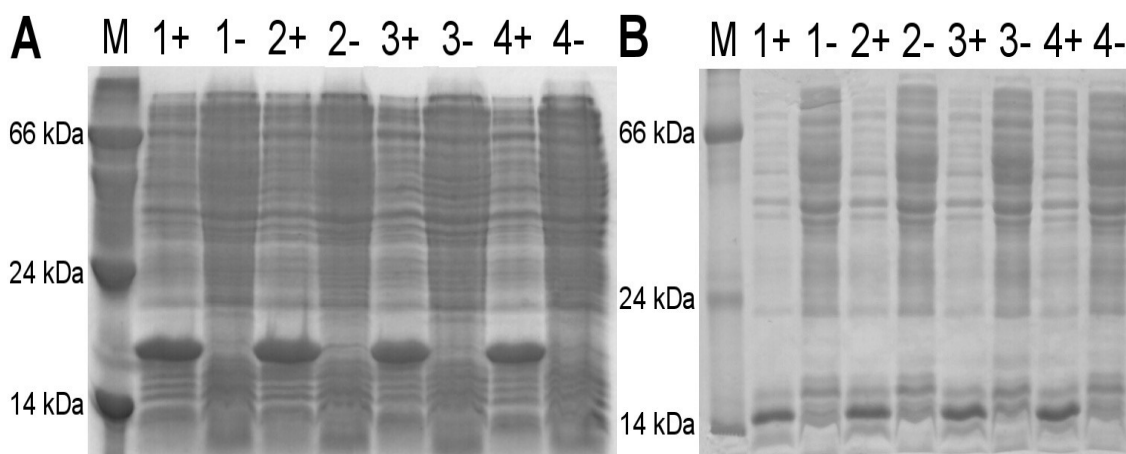
### **5.3.1 Transformace kompetentních buněk**

Připravenými plasmidy mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL (podle kap. 4.1) byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* kmen BL21-Gold (DE3). Transformace byly provedeny metodou tepelného šoku a takto upravené bakterie byly ponechány růst na LB agaru s antibiotiky (tetracyklinem a kanamycinem). Gen obsažený ve vektoru pET-30a(+) poskytoval takto upraveným bakteriím resistenci na kanamycin. Na LB agaru vyrostly tedy pouze bakteriální klony nesoucí tento plasmid. V obou případech vyrostlo na LB agaru asi 100 kolonií transformovaných bakterií. Na miskách s bakteriemi bez plasmidů (kontrola) nevyrostly žádné kolonie.

### **5.3.2 Selektce produkčních klonů**

Nejprve byly připraveny noční kultury jednotlivých bakteriálních klonů, kterými byla následně zaočkována čistá LB média. K 1 ml LB média bylo vždy přidáno 50 µl noční kultury. Zkumavky byly ponechány třepat při 37 °C po dobu 1 hodiny. Poté byl do zkumavek označených plus přidán induktor IPTG do výsledné konc. 1 mM.

Následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 3 hodin. Během této doby došlo ve zkumavkách označených plus k produkci rekombinantních proteinů, jelikož induktor IPTG spouští expresi T7 RNA polymerasy, která následně iniciuje expresi genu přítomného ve vektoru pET-30a(+). Ve vzorcích označených minus se tato exprese neprojevila z důvodu nepřítomnosti induktoru IPTG. Vyhodnocení tohoto pokusu bylo provedeno pomocí SDS-PAGE (Obr. 10). Celý postup byl proveden dle kap. 4.2.2.



Obr. 10: Selektce produkčních klonů mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (část A) a hAICL (část B). Dráhy označené + představují vzorky s přidavkem IPTG, dráhy označené - vzorky bez induktoru IPTG. Standardy molekulových hmotností (markery) jsou označeny M.

Z vyhodnocení SDS-PAGE bylo patrné, že proteiny byly produkovány všemi vybranými bakteriálními klony. Pro velkoobjemovou produkci proteinů byl zvolen klon číslo 2 v případě mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (z důvodu nejširšího proužku produkovaného proteinu) a klon číslo 1 v případě hAICL (z důvodu nejnižšího obsahu ostatních proteinů).

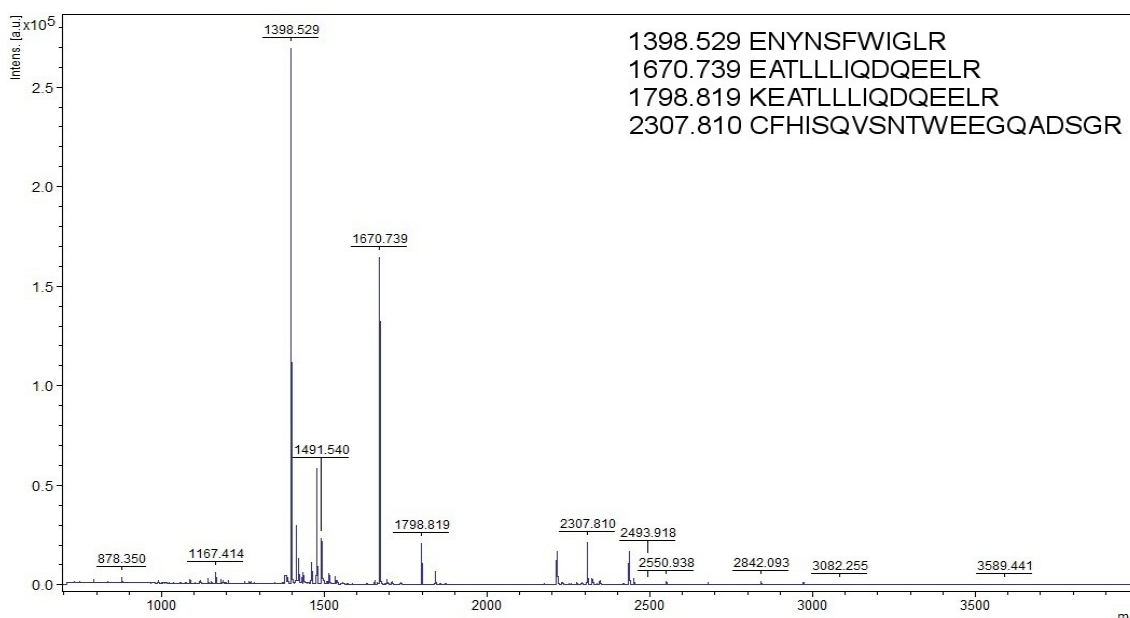
### 5.3.3 Identifikace produkovaných proteinů

Oba produkované proteiny byly identifikovány pomocí Edmanova odbourávání aminokyselin z N-konce proteinů a analýzy tryptických štěpů technikou peptidového mapování (MALDI-TOF MS). Oba tyto postupy byly blíže popsány v kap. 4.2.4.

Edmanovým odbouráváním se podařilo stanovit 17 aminokyselin od N-konce mNKR-P1C<sup>BALB</sup>. Oba proteiny byly přeneseny (z gelu po separaci SDS elektroforézou) na PVDF membránu pomocí elektropřenosu. PVDF membrány byly předány Prof. Karlu Bezouškovi, který zprostředkoval sekvenaci.

Sekvence SREKXXVLIQENLXKTTDSP (X značí nepřirazenou aminokyselinu) stanovená analýzou vzorku mNKR-P1C<sup>BALB</sup> potvrdila, že se nejspíše jedná o tento protein. V případě hAICL bylo stanovení nepřesné, jelikož se na PVDF membránu nepodařilo přenést dostatečné množství proteinu.

Analýza tryptických štěpů technikou peptidového mapování (MALDI-TOF MS) byla provedena z proužků proteinů, které byly vyříznuty z polyakrylamidových gelů (po stanovení produkčních klonů). Dále byly proteiny rozštěpeny trypsinem a izolované peptidy byly poté nanесeny na terčík. Měření provedl Mgr. Daniel Rozbeský. Získaná data byla porovnána s databází Mascot. Tímto porovnáním bylo potvrzeno, že se jedná o požadované proteiny. Ukázkou hmotnostního spektra mNKR-P1C<sup>BALB</sup> znázorňuje Obr. 11.

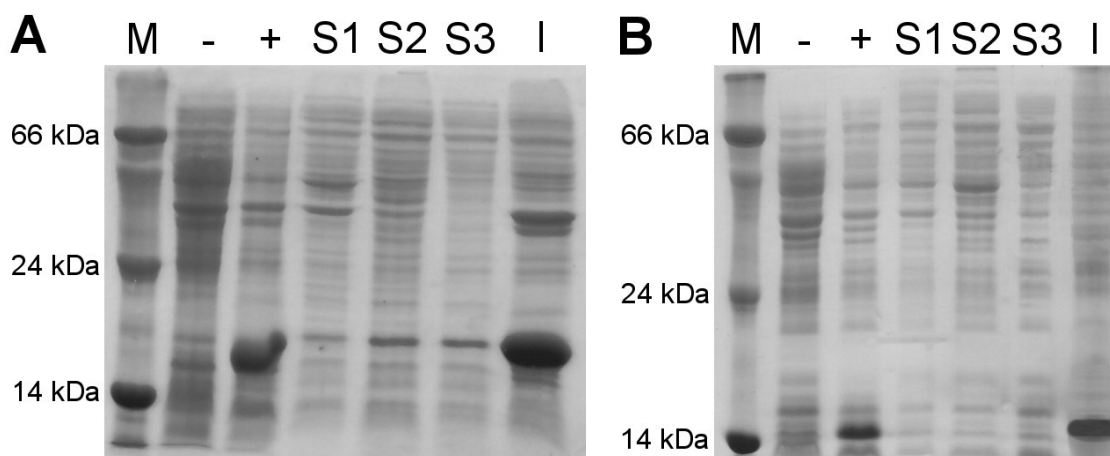


Obr. 11: Hmotnostní spektrum mNKR-P1C<sup>BALB</sup> získané analýzou tryptických štěpů tohoto proteinu pomocí techniky peptidového mapování (MALDI-TOF MS). Vyznačeny jsou některé významné peptidy.

### 5.3.4 Velkoobjemová produkce proteinů a izolace inkluzních tělísek

Proteiny byly produkovány vždy ve 2 litrech LB média s příslušnými antibiotiky (kap. 4.2.5). V obou případech byly produkce provedeny při 1 mM výsledné konc. indukturu IPTG, teplotě 37 °C a době produkce 6 hodin od indukce. Po uplynutí této doby následovala izolace inkluzních tělísek (kap. 4.2.6), což jsou agregáty produkovaného proteinu, které se hromadí uvnitř bakterie. K rozbití buněk bylo využito vysokého osmotického tlaku sacharosového lyzačního pufru v kombinaci se sonikací.

Následovalo promytí pufrům s detergentem, kde byl přítomen Triton X-100, a následně pufrům bez detergentu. Celý průběh izolace byl proveden v přítomnosti inhibitorů proteas a byl monitorován pomocí SDS-PAGE (Obr. 12).



Obr. 12: Průběh izolace inkluzních tělísek mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (část A) a hAICL (část B) analyzovaný pomocí SDS-PAGE. Dráhy označené M představují marker, - značí kultury před přidavkem IPTG, + kultury po skončení produkce, S1-S3 značí supernatanty z jednotlivých kroků izolace a dráha označená I představuje sediment inkluzních tělísek.

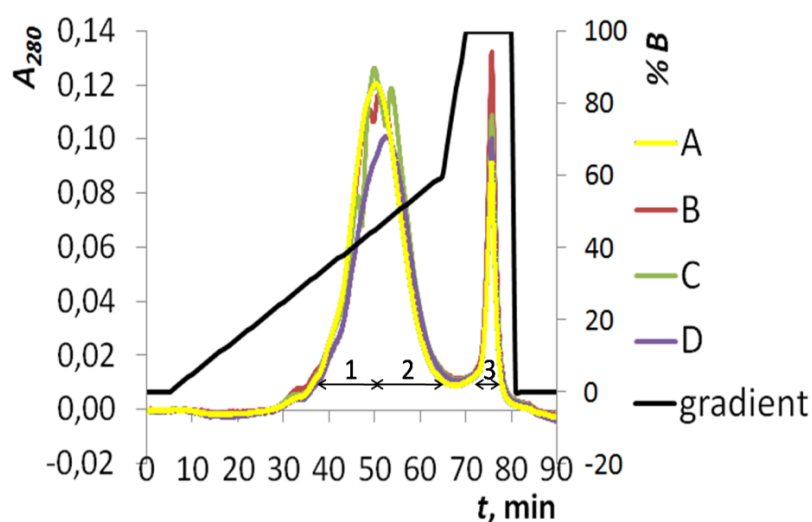
Z vyhodnocení gelů po SDS-PAGE bylo patrné, že inkluzní tělíška se podařilo správně izolovat bez významných ztrát obou proteinů, jelikož proužky odpovídající jednotlivým proteinům byly pozorovány pouze v kulturách po ukončení produkce a v sedimentu inkluzních tělísek.

### 5.3.5 Optimalizace *in vitro* renaturace mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL

Optimalizace renaturace obou proteinů byla prováděna metodou rychlého naředění podle kap. 4.2.7. Inkluzní tělíška byla nejprve rozpuštěna v guanidinovém pufru, který zde plnil funkci chaotropního činidla. Poté byly jednotlivé roztoky proteinů ultracentrifugovány a pomalu přikapávány (1 kapka/s) při 4 °C do renaturačních pufrů o různých složeních. Tato složení byla odlišná především v koncentraci L-argininu, poměru redoxních činidel a pH. L-arginin zde plnil funkci nízkomolekulárního chaperonu. Po hodinové inkubaci byly všechny roztoky dialyzovány oproti dialyzačním pufrům a následně zahuštěny použitím ultrafiltrace. Následovalo vyhodnocení jednotlivých podmínek pomocí ionexových chromatografií (porovnáním ploch pod jednotlivými křivkami).

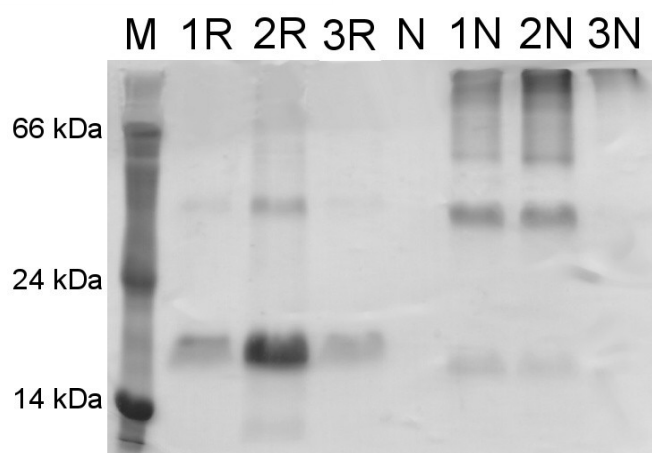
### 5.3.6 Ionexová chromatografie mNKR-P1C<sup>BALB</sup> na Q Sepharose FF

K analýze mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byla použita kolona Q Sepharosy FF (anex), jelikož byl protein při pH 8,5 (resp. 9,0) záporně nabitý (vyplývá z pI). Zakoncentrovaný vzorek pomocí ultrafiltrace byl přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 22  $\mu\text{m}$  a nanesen na kolonu rychlostí 3 ml/min. Analýza byla provedena podle kap. 4.2.8 s lineárním gradientem od počáteční koncentrace 9 mM až po 1 M NaCl. Separace probíhala při průtoku mobilní fáze 3 ml/min. Eluční profily proteinu renaturovaného v různých podmínkách a gradient NaCl přibližuje Obr. 13. Gradient je naznačen na vedlejší svislé ose v procentech pufru B, který obsahoval 1 M NaCl. V tomto obrázku jsou zároveň naznačeny i jednotlivé jímané frakce, které byly následně vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí. Obr. 14 zobrazuje SDS-PAGE frakcí jímaných při analýze renaturační podmínky A. Frakce z ostatních renaturačních podmínek vypadaly téměř totožně.



Obr. 13: Eluční profily mNKR-P1C<sup>BALB</sup> při analýze optimalizace renaturace na koloně Q Sepharosy FF. Průtok mobilní fáze byl 3 ml/min. Jímané frakce jsou vyznačeny šipkami.

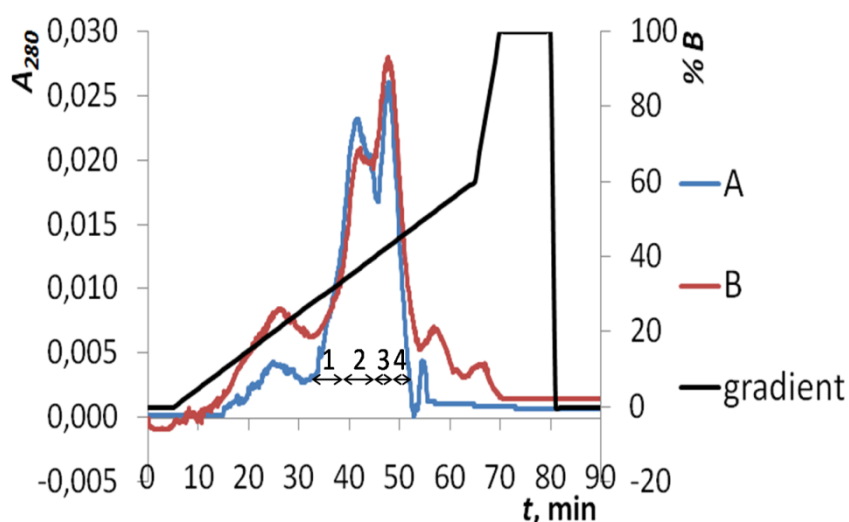
Obr. 14: SDS-PAGE frakcí jímaných při ionexové chromatografii mNKR-P1C<sup>BALB</sup> na Q Sepharose FF (renaturační podmínka A). Dráhy 1R-3R značí redukující prostředí, 1N-3N pak neredukující prostředí, N značí samotný neredukující pufr a M je označen marker.



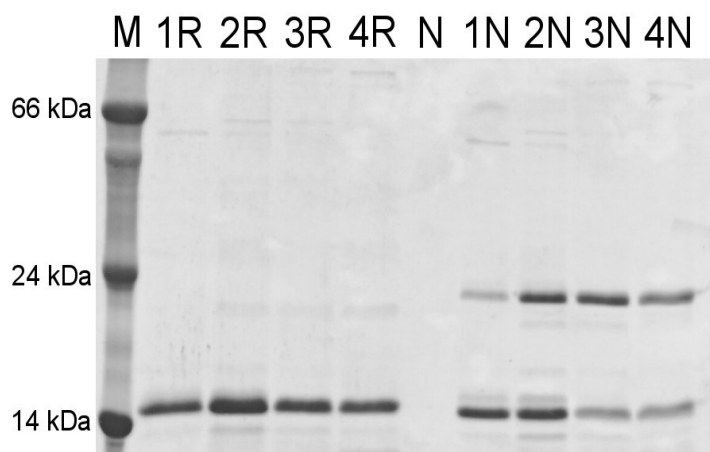
Frakce 1 a 2 byly dále purifikovány pomocí gelové filtrace. Frakce 3 obsahovala pouze agregáty (Obr. 14, str. 61, neredukující prostředí). Optimální renaturační podmínkou byla zvolena podmínka A, protože při renaturaci proteinu v tomto pufru bylo pozorováno nejméně agregátů.

### 5.3.7 Ionexová chromatografie hAICL na SP Sepharose FF

Renaturace hAICL v jednotlivých podmínkách byla vyhodnocována pomocí ionexové chromatografie na SP Sepharose FF (katex), protože protein byl při pH 6,8 (resp. 7,5) kladně nabitý (vyplývá z pI). Postup byl proveden podle kap.4.2.8 a byl analogický s analýzou mNKR-P1C<sup>BALB</sup> na koloně Q Sepharosy FF. Průtok mobilní fáze byl 2 ml/min. Chromatogramy z analýz renaturačních podmínek A a B jsou naznačeny spolu s gradientem NaCl vyjádřeným v procentech pufru B (1 M NaCl) a jímanými frakcemi, na Obr. 15. V podmínkách C a D pošlo k úplnému vysrážení proteinu a při analýze těchto podmínek nebyl pozorován žádný eluční profil. Vyhodnocení frakcí, jímaných při analýze podmínky B, pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí zobrazuje Obr. 16 (str. 63).



Obr. 15: Eluční profily při analýze optimalizace renaturace hAICL na koloně SP Sepharosy FF. Průtok mobilní fáze byl 2 ml/min. Jímané frakce jsou naznačeny šipkami.

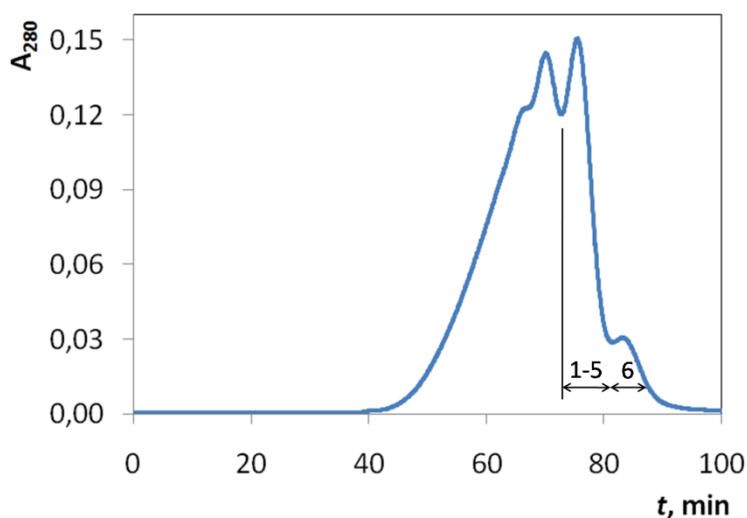


Obr. 16: SDS-PAGE frakcí jímaných při ionexové chromatografii hAICL na SP Sepharose FF (renaturační podmínka B). Dráhy 1R-3R značí redukující prostředí, 1N-3N pak neredukující prostředí, N značí samotný neredukující pufr a M je označen marker.

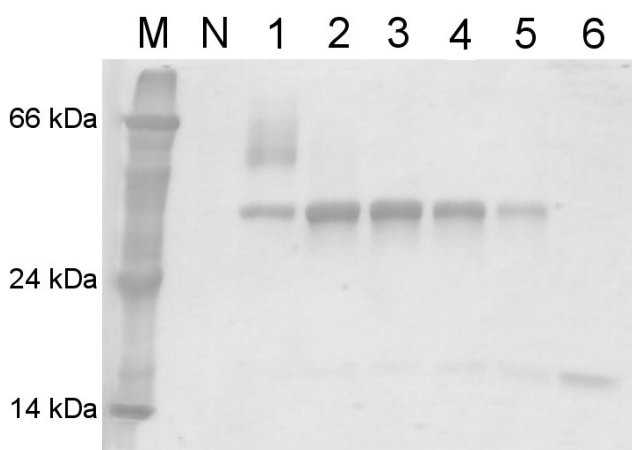
Frakce 3 a 4 byly dále purifikovány gelovou filtrací z důvodu přítomnosti vyššího množství dimerního proteinu oproti monomeru (Obr. 16, neredukující prostředí). Renaturační podmínka B byla zvolena jako optimální právě díky vyššímu zastoupení dimerního proteinu (Obr. 15, str. 62, 2. pík) oproti monomeru (1. pík).

### 5.3.8 Gelové filtrace mNKR-P1C<sup>BALB</sup> na Superdexu 200

Frakce 1 a 2 z ionexové chromatografie mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byly nejprve zahuštěny pomocí centrifugačních koncentrátorů na objem asi 1000  $\mu$ l. Následně byly postupně naneseny na kolonu Superdexu 200 16/60 High Load. Separace probíhala při průtoku mobilní fáze 1 ml/min po dobu 100 minut. Eluční profil analýzy frakce 2 z Q Sepharosy FF zobrazuje Obr. 17. Vyhodnocení frakcí pomocí SDS-PAGE v neredukujícím prostředí je znázorněno na Obr. 18 (str. 63).

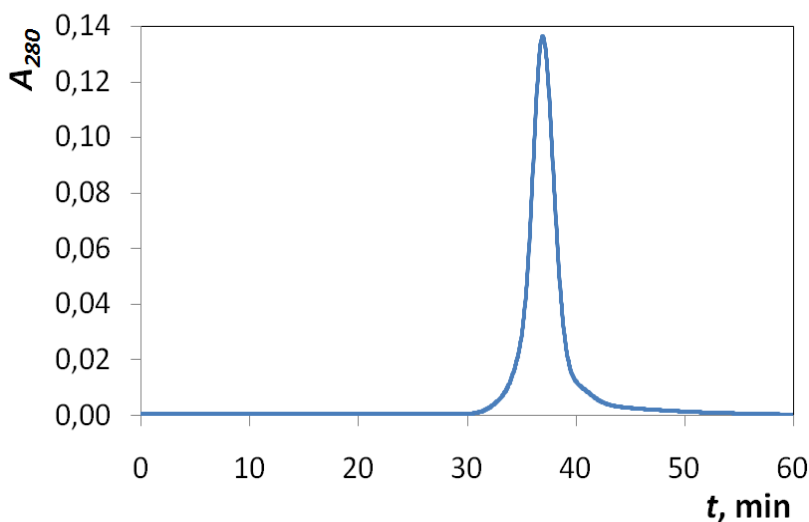


Obr. 17: Eluční profil frakce 2 na koloně Superdex 200 16/60 High Load. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Jímané frakce jsou naznačeny šipkami.



Obr. 18: Analýza frakcí z gelové filtrace na Superdexu 200 16/60 High Load pomocí SDS-PAGE v neredukujícím prostředí. Dráhy 1-6 značí jednotlivé frakce, N značí samotný neredukující pufr a M pak marker.

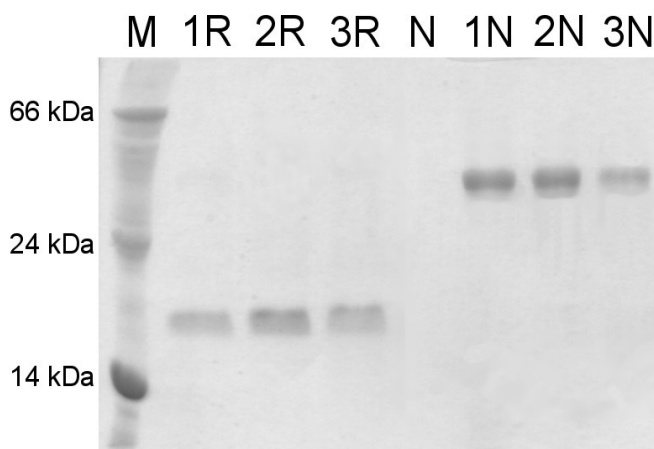
Z SDS-PAGE bylo patrné, že dimerní protein byl nalezen ve frakcích 2, 3, 4 a 5. Tyto frakce byly spojeny, zahuštěny a purifikovány na Superdexu 200 10/300 GL. Eluční profil mNKR-P1C<sup>BALB</sup> z této separace je zobrazen na Obr. 19.



Obr. 19: Eluční profil finální gelové filtrace mNKR-P1C<sup>BALB</sup> na koloně Superdexu 200 10/300 GL. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min.

Eluční profil proteinu (Obr. 19) byl jímán do třech frakcí, které byly poté analyzovány SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí. Toto stanovení přibližuje Obr. 20.

Obr. 20: SDS-PAGE frakcí z gelové filtrace mNKR-P1C<sup>BALB</sup> na Superdexu 200 10/300 GL. Dráhy 1R-3R značí redukující prostředí, 1N-3N pak neredukující prostředí, N značí samotný neredukující pufr a M marker.

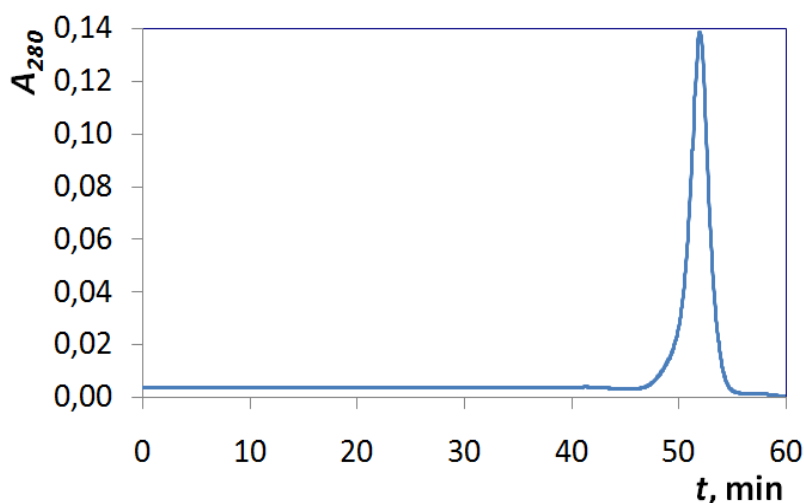




Z SDS-PAGE (Obr. 20, str. 64) bylo patrné, že se přečištěný dimerní mNKR-P1C<sup>BALB</sup> nacházel ve všech třech frakcích.

### 5.3.9 Gelová filtrace hAICL na Superdexu 200

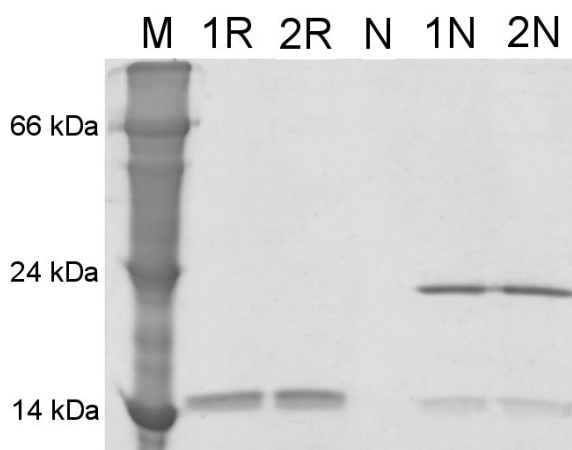
Frakce 3 a 4 z ionexové chromatografie na SP Sepharose FF byly nejprve zahuštěny na objem 250  $\mu$ l a poté jednotlivě nanoseny na kolonu Superdexu 200 10/300 GL. Analýza byla provedena podle kap. 4.2.9. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Eluční profil proteinové frakce 3 z SP Sepharosy FF zobrazuje Obr. 21. Eluční profil frakce 4 vypadal téměř totožně.



Obr. 21: Eluční profil hAICL na Superdexu 200 10/300 GL (frakce 3 získaná ze separace na SP Sepharose FF). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min.

Eluční profil proteinu (Obr. 21) byl jímán do dvou frakcí. Tyto byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí (Obr. 22).

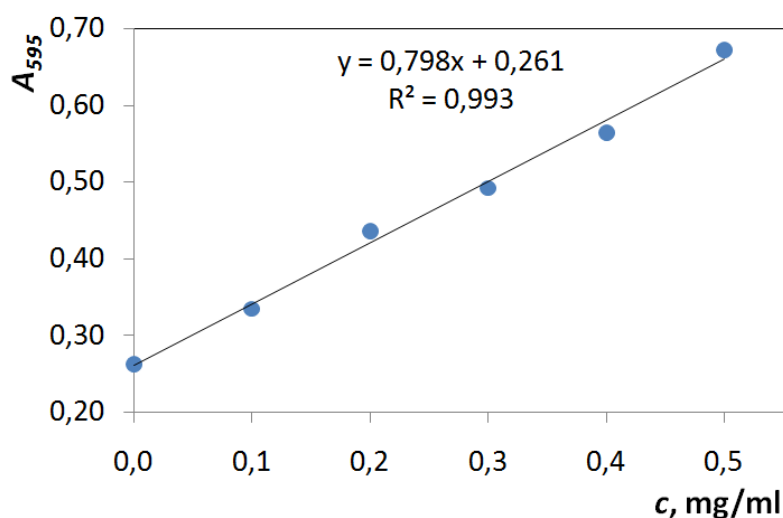
Obr. 22: SDS-PAGE frakcí z gelové filtrace hAICL na Superdexu 200 10/300 GL. Dráhy 1R a 2R označují redukující prostředí, 1N a 2N pak neredukující prostředí, N značí samotný neredukující pufr a M marker.



Z analýzy pomocí SDS-PAGE bylo patrné, že se protein podařilo přečistit do požadované čistoty a také že dimerní hAICL spolu s malým množstvím monomerního proteinu byl obsažen v obou frakcích.

### 5.3.10 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Frakce obou proteinů po finálních gelových filtracích byly spojeny, zahuštěny a jejich koncentrace byla stanovena porovnáním s kalibrační závislostí standardů BSA. Celý postup byl proveden podle kap. 4.2.10. K 5  $\mu\text{l}$  jednotlivých standardů BSA a k 5  $\mu\text{l}$  stanovovaných proteinů bylo vždy přidáno 200  $\mu\text{l}$  činidla pro stanovení dle Bradfordové. Byla změřena absorbance všech vzorků při vlnové délce 595 nm. Záření této vlnové délky je absorbováno zejména činidlem navázaným na protein. Z hodnot absorbancí standardů BSA byla sestrojena kalibrační křivka (Obr. 23), ze které byly následně odečteny koncentrace stanovovaných proteinů. Vypočtené koncentrace jednotlivých proteinů přibližuje Tab. 8.



Obr. 23: Kalibrační křivka standardů BSA.

Tab. 8: Vypočtené koncentrace a výtěžky připravených proteinů z 1 litru LB média

<i>Protein</i>	<i>c</i> mg/ml	<i>V</i> $\mu\text{l}$	<i>Množství proteinu</i> mg
mNKR-P1C <sup>BALB</sup>	0,71	1050	0,75
hAICL	0,68	750	0,51

Výtěžek mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byl 0,75 mg a výtěžek hAICL pak 0,51 mg při produkci z 1 litru LB média.

## 5.4 Charakterizace připravených proteinových preparátů pomocí hmotnostní spektrometrie

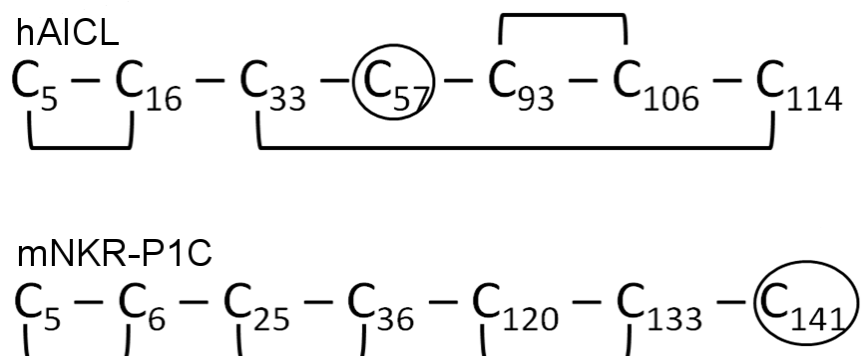
### 5.4.1 Stanovení disulfidických můstků

U obou proteinů bylo stanoveno zapojení disulfidických můstků v jejich molekulách. Bylo postupováno podle kap. 4.3.1. Při této charakterizaci bylo využito přístupu bottom-up, kdy byla provedena nejprve separace proteinů pomocí SDS-PAGE v neredukujícím prostředí (200  $\mu$ M cystamin), následovalo rozštěpení proteinů pomocí proteas (trypsin, chymotrypsin, AspN, GluC), izolace peptidů, jejich odsolení a analýza pomocí spojení LC/MS (kapilární HPLC/ESI FT-ICR MS). Ve spojení LC/MS byly peptidy (včetně disulfidicky spojených) jednotlivých proteinů nejprve odděleny pomocí HPLC a následně ihned analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie využívající iontové cyklotronové resonance [88].

Měření bylo provedeno RNDr. Petrem Novákem, Ph.D. Přípravu vzorku mNKR-P1C<sup>BALB</sup> realizoval Mgr. Daniel Rozbeský. Získaná data byla analyzována pomocí programu DataAnalysis (verze 4.0) od firmy Bruker Daltonics a GPMaw (verze 6.0) od firmy Lighthouse Data. Výsledky analýzy včetně příkladů některých peptidů zobrazuje Tab. 9. Schéma zapojení disulfidických můstků v obou proteinech zobrazuje Obr. 24 na str. 68.

Tab. 9: Výsledky analýzy disulfidických můstků mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL včetně příkladů některých peptidů

<i>Protein</i>	<i>Spojené cysteiny</i>	<i>Pozice spojených peptidů</i>	<i>Exp. Hmota</i> Da	<i>Teor. Hmota</i> Da	<i>Chyba</i> ppm
hAICL	1 + 2	1-7 + 8-24	2908,2568	2908,2598	1,0
	3 + 7	31-53 + 112-115	3314,5364	3314,5396	1,0
	5 + 6	89-105 + 106-110	2311,9541	2311,9558	0,7
	dimerizační (4 + 4)	56-62 + 56-69	2479,1355	2479,1318	1,4
mNKR-P1C <sup>BALB</sup>	1 + 2	3-15	1531,7592	1531,7612	1,4
	3 + 4	23-35 + 36-56	4039,8252	4039,8313	1,5
	5 + 6	128-138 + 111-127	2860,2896	2860,2939	1,5

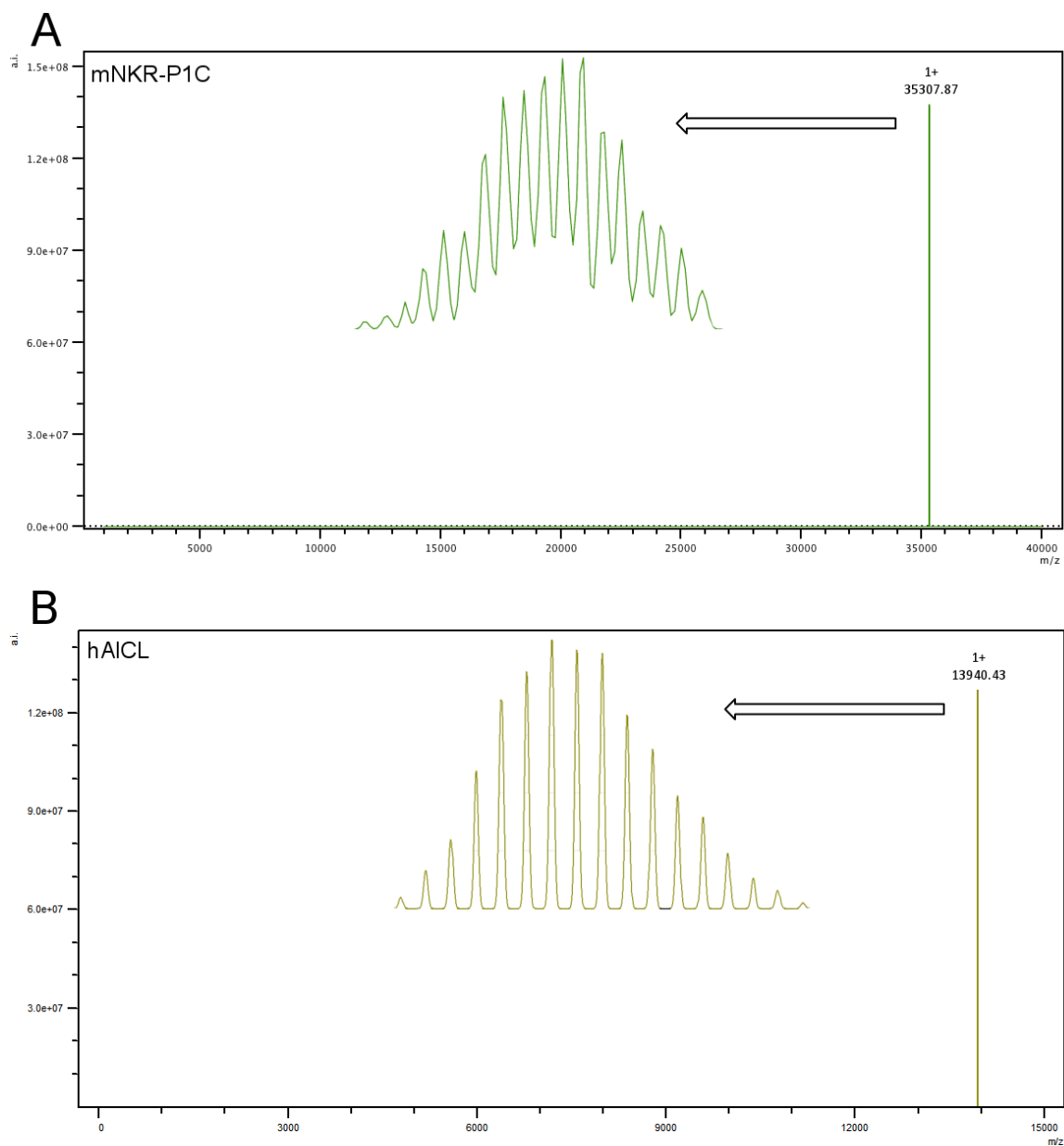


Obr. 24: Schéma zapojení cysteinů v molekulách hAICL a mNKR-P1C<sup>BALB</sup>. Zakroužkovány jsou cysteiny, přes které proteiny dimerizují.

#### 5.4.2 Stanovení molekulových hmotností obou proteinů

Oba proteinové preparáty byly nejprve odsoleny na Microtrapu (malá kolonka s reversní fází) a následně nastříknuty do hmotnostního spektrometru (ESI FT-ICR). Proteiny byly ionizovány pomocí elektrospreje (ESI) a poté analyzovány iontovou cyklotronovou resonancí (ICR) s použitím Fourierovy transformace (FT). Obě měření byla provedena RNDr. Petrem Novákem, Ph.D.

Podářilo se změřit molekulové hmotnosti dimerního mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a monomerního hAICL. Molekulová hmotnost dimerního hAICL se nepodařilo změřit z důvodu přítomnosti cysteaminu na dimerizačním cysteinu tohoto proteinu. Po dekonvoluci hmotnostních spekter (Obr. 25, str. 69) byla stanovena monoizotopická molekulová hmotnost dimerního mNKR-P1C<sup>BALB</sup>  $[M+H]^+$  na hodnotu 35 307,87 Da a monomerního hAICL  $[M+H]^+$  na hodnotu 13 864,42 Da (po odečtení molekulové hmotnosti cysteaminu). Chyba měření byla v obou případech 1,4 ppm. Z výsledků obou měření vyplynuly některé důležité vlastnosti proteinů. Konkrétně zapojení disulfidických můstků a nepřítomnost iniciačního methioninu v připravených proteinových preparátech. Dále byla pozorována také vysoká čistota a intaktnost obou proteinů.



Obr. 25: Dekonvulovaná ESI FT-ICR hmotnostní spektra mNKR-P1C<sup>BALB</sup> (část A) a hAICL (část B). V jednotlivých spektrech je vždy zobrazen izotopový profil nejintenzivnějšího iontu.

## 6. DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo připravit expresní vektory pro rekombinantní produkci extracelulárních domén receptorů mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL, dále tyto proteiny produkovat v expresním systému *E. coli* s použitím LB média, optimalizovat *in vitro* renaturaci a purifikaci obou proteinů, a na závěr charakterizovat připravené proteinové preparáty pomocí hmotnostní spektrometrie. Oba proteiny se za fyziologických podmínek vyskytují v podobě dimerů [51, 83], proto byla tato práce zaměřena především na jejich přípravu.

Prvním krokem byla příprava expresních plasmidů. V případě mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byla nejprve izolována celková RNA z myši sleziny využitím TRI reagentu, který obsahoval inhibitory RNAs. Následovala extrakce fenol-chloroformovou směsí a poté přečištění RNA pomocí vysrážení v přítomnosti isopropanolu a propláchnutí 75% ethanolem. Přečištěná RNA byla použita jako templát při reversní transkripci s využitím reversní transkriptasy Superscript III. Vzniklá cDNA byla dále použita jako templát pro PCR amplifikaci genu kódujícího extracelulární část receptoru mNKR-P1C<sup>BALB</sup>. V případě hAICL byla prvním krokem právě PCR amplifikace příslušného genu (kódujícího opět extracelulární část tohoto receptoru). Templátem pro tuto reakci byla cDNA poskytnutá Mgr. Danielem Rozbeským. U obou PCR reakcí byla použita DeepVent DNA polymerasa, která tvoří produkty s tupými konci. Vzniklé PCR amplifikáty obou genů, byly následně klonovány do klonovacího vektoru pBluescript SK+, s využitím restriční endonukleasy *SmaI*. Při tomto štěpení vznikal vektor s tupými konci. Ligace jednotlivých insertů do pBluescriptu SK+ byla uskutečněna pomocí T4 DNA ligasy. Následovala transformace kompetentních buněk *E. coli* kmen NovaBlue (tepelným šokem) a poté selekce klonů, obsahujících požadované inserty, s využitím restričních endonukleas *NdeI* a *HindIII*. Následně byly oba inserty překlonovány do expresního vektoru pET-30a(+), opět pomocí zmíněných enzymů a T4 DNA ligasy. Byla provedena opět transformace kompetentních buněk a selekce klonů stejným postupem. Sekvence insertů obsažené v obou konstruktech byly ověřeny DNA sekvenováním, které bylo provedeno Dr. Jürgenem Felsbergem, CSc na MBÚ AV ČR, v.v.i. Insert mNKR-P1C<sup>BALB</sup> obsahoval bodovou mutaci na pozici 450, která však neměnila aminokyselinové složení proteinu, a proto byla ponechána bez opravy. Sekvence insertu hAICL byla bez mutací. Plasmidy mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL byly namnoženy a dále

použity k heterologní expresi proteinů. Výtěžek plasmid mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byl 52 µg DNA a výtěžek plasmidu hAICL byl 65 µg DNA ze 100 ml kultury, což bylo dostačující množství pro další postup.

Prvním krokem přípravy obou proteinů byla transformace kompetentních buněk *E. coli* kmen BL21-Gold (DE3) metodou tepelného šoku. Poté byla stanovena selekce produkčních klonů a identifikace exprimovaných proteinů s využitím Edmanova odbourávání a analýzy tryptických štěpů peptidovým mapováním (MALDI-TOF MS). Edmanovým odbouráváním bylo stanoveno 17 aminokyselin od N-konce proteinu mNKR-P1C<sup>BALB</sup>. Tato analýza naznačovala, že se nejspíše jedná o tento protein. V případě hAICL se při tomto stanovení nepodařilo identifikovat většinu aminokyselin, z důvodu přenesení nedostatečného množství proteinu na PVDF membránu, která byla sekvenována. Oba proteiny byly též identifikovány pomocí analýzy tryptických štěpů metodou peptidového mapování (MALDI-TOF MS), kdy získaná data byla porovnána s databází Mascot a potvrdila přítomnost obou proteinů. Následovala velkoobjemová produkce, která byla uskutečněna vždy ve 2 litrech LB média (pro jeden protein). Indukce byla prováděna pomocí IPTG ve výsledné konc. 1 mM a doba produkce byla 6 hodin. Dále byla izolována inkluzní tělíska, s využitím sacharosového pufru, pufru s detergentem a promývacího pufru. Průběh izolace byl monitorován pomocí SDS-PAGE a nebyly zde pozorovány žádné významné ztráty proteinů. Dalším krokem byla optimalizace renaturace obou proteinů. Zde bylo využito L-argininu jako nízkomolekulárního chaperonu a redoxního systému cystamin/cysteamin. V případě mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byla zvolena jako optimální renaturační podmínka A, při které byl pozorován vznik nejmenšího množství agregátů. Vznikající agregáty byly problémem při následné purifikaci. Jako optimální podmínka renaturace hAICL byla zvolena podmínka B, kde bylo pozorováno větší zastoupení dimerního proteinu. Problémem při renaturaci hAICL bylo zejména srážení proteinu v průběhu dialýzy. Oba proteiny byly purifikovány nejprve ionexovou chromatografií na Q Sepharose FF (mNKR-P1C<sup>BALB</sup>) resp. SP Sepharose FF (hAICL), a následně gelovými filtracemi na Superdextru 200 10/300 GL. Protein mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byl před tímto krokem purifikován ještě s využitím kolony Superdextru 200 16/60 High Load, kde byl odstraněn majoritní podíl špatně sbalené bílkoviny. Z retenčního času mNKR-P1C<sup>BALB</sup> při gelové filtraci na Superdextru 200 10/300 GL a následné analýze jednotlivých frakcí pomocí SDS-PAGE, bylo patné,

že se tento protein vyskytoval v podobě kovalentního dimeru. Retenční čas hAICL při gelové filtraci na koloně Superdexu 200 10/300 GL svědčil o přítomnosti monomerního proteinu. Při analýze frakcí z této separace pomocí SDS-PAGE, byla však pozorována přítomnost majoritní části kovalentně spojeného dimerního proteinu s minoritním podílem monomeru. Tento fakt by mohlo vysvětlovat např. vysoce účinné sbalení proteinu hAICL během jeho renaturace. Výtěžek mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byl 0,75 mg a výtěžek hAICL byl 0,51 mg při produkci z 1 litru LB média. Tyto výtěžky jsou poměrně nízké v porovnání s např. mNKR-P1C z myšího kmene B6, který byl připraven v Laboratoři přirozené imunity Mgr. Danielem Rozbeských. Výtěžek tohoto proteinu se pohyboval v desítkách mg při produkci z 1 litru LB média [89]. Výtěžek mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byl ovlivněn především velkým množstvím vznikajících agregátů při renaturaci tohoto proteinu. V případě hAICL byly pozorovány významné ztráty proteinu při průběhu dialýzy.

Poslední částí této diplomové práce bylo charakterizovat připravené proteinové preparáty pomocí hmotnostní spektrometrie. K ověření zapojení disulfidických můstků v obou molekulách byl využit přístup bottom-up, kdy byly proteiny rozštěpeny proteasami (trypsin, chymotrypsin, AspN a GluC) a analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru (ESI FT-ICR) využívajícího iontové cyklotronové resonance v kombinaci s Fourierovou transformací. Měření bylo provedeno RNDr. Petrem Novákem, Ph.D. Ze získaných dat se podařilo identifikovat jednotlivé disulfidické můstky. V případě hAICL bylo potvrzeno spojení cysteinů, které odpovídá modifikovanému rysu C-lektinové domény. Rozdíl byl pozorován u dimerizačního cysteinu, jenž by se měl podle charakteristické C-lektinové domény nacházet před touto doménou, tedy nejbližší N-konci proteinu [90]. Podle získaných dat byl stanoven jako dimerizační cystein číslo 4, který se nachází uprostřed molekuly. Toto uspořádání však odpovídá databázi UniProt a jeví se tedy jako správné [91]. U proteinu mNKR-P1C<sup>BALB</sup> byl pozorován neklasický fold, kdy byly spojeny jednotlivé cysteiny nacházející se vedle sebe, i přestože se jedná o C-lektinový aktivační receptor. Tato data jsou v korelaci s kratší formou tohoto proteinu, která byla připravena a charakterizována Mgr. Danielem Rozbeským, a jsou námětem pro další zkoumání tohoto receptoru z hlediska jeho struktury.



U obou proteinů byly také stanoveny molekulové hmotnosti pomocí hmotnostního spektrometru ESI FT-ICR. V případě mNKR-P1C<sup>BALB</sup> se podařilo stanovit celkovou monoizotopickou hmotnost dimerního proteinu na hodnotu  $[M+H]^+$  35 307,87 Da s chybou měření 1,4 ppm. U proteinu hAICL se podařilo stanovit pouze monoizotopickou hmotnost monomerní jednotky, kvůli navázanému cysteaminu na dimerizačním cysteinu. Molekulová hmotnost hAICL  $[M+H]^+$  měla (po odečtení molekulové hmotnosti cysteaminu) hodnotu 13 864,42 Da, což odpovídá chybě měření 1,4 ppm. Z těchto výsledků vyplynula vysoká čistota a intaktnost obou proteinů, zapojení disulfidických můstků a nepřítomnost iniciačního methioninu v obou proteinech.

Připravené konstrukty mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL, stejně jako nalezení podmínek renaturace a purifikace, mohou být případně využity při rekombinantní přípravě extracelulárních částí těchto receptorů. Získané proteinové preparáty poslouží dále ke zkoumání struktury obou těchto proteinů pomocí chemického zesílení. Tyto experimenty probíhají v současné době na AV ČR, v.v.i.

## 7. ZÁVĚR

- byly připraveny expresní plasmidy pro rekombinantní produkci extracelulárních domén receptorů mNKR-P1C<sup>BALB</sup> a hAICL
- tyto proteiny byly produkovány v expresním systému *E. coli* s použitím LB média
- byly nalezeny podmínky renaturace a purifikace takto připravených proteinů
- získané proteinové preparáty byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie – byly stanoveny disulfidické můstky a monoizotopické molekulové hmotnosti obou proteinů

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Male, D.; Brostoff, J.; Roth, D. B.; Roitt, I.: *Immunology*. 7<sup>TH</sup> edit. Amsterdam, Elsevier 2006.
- [2] Hořejší, V.; Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha, Triton 2005.
- [3] Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S.: *Cellular and molecular immunology*. 6<sup>TH</sup> edit. Philadelphia, Saunders 2007.
- [4] Burmester, G. R.; Pezzutto, A.; Ulrichs, T.; Aicher, A.: *Color Atlas of Immunology*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag 2003.
- [5] Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H.: *Eur. J. Immunol.* **5**, 112 (1975).
- [6] Trinchieri, G.: *Adv. Immunol.* **47**, 187 (1989).
- [7] Yu, Y. Y.; Kumar, V.; Bennett, M.: *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 189 (1992).
- [8] Moffett-King, A.: *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 656 (2002).
- [9] Herberman, R. B.; Ortaldo, J. R.: *Science*. **214**, 24 (1981).
- [10] Moretta, A.; Bottino, C.; Mingari, M. C.; Biassoni, R.; Moretta, L.: *Nat. Immunol.* **3**, 6 (2002).
- [11] Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Cantoni, C.; Mingari, M. C.; Biassoni, R.; Moretta, L.: *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 197 (2001).
- [12] Lapaque, N.; Walzer, T.; Meresse, S.; Vivier, E.; Trowsdale, J.: *J. Immunol.* **182**, 4339 (2009).
- [13] Nishibori, T.; Xiong, H.; Kawamura, I.; Arakawa, M.; Mitsuyama, M.: *Infect. Immun.* **64**, 3188 (1996).
- [14] Igarashi, H.; Gregory, S. C.; Yokota, T.; Sakaguchi, N.; Kincade, P. W.: *Immunity*. **17**, 117 (2002).
- [15] Yokoyama, W. M.; Kim, S.; French, A. R.: *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 405 (2004).
- [16] Di Santo, J. P.: *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 257 (2006).
- [17] Freud, A. G.; Yokohama, A.; Becknell, B.; Lee, M. T.; Mao, H. C.; Ferketich, A. K.; Caligiuri, M. A.: *J. Exp. Med.* **203**, 1033 (2006).
- [18] Rosmaraki, E. E.; Douagi, I.; Roth, C.; Colucci, F.; Cumano, A.; Di Santo, J. P.: *Eur. J. Immunol.* **31**, 1900 (2001).
- [19] Vosshenrich, C. A.; Garcia-Ojeda, M. E.; Samson-Villeger, S. I.; Pasqualetto, V.; Enault, L.; Richard-Le Goff, O.; Corcuff, E.; Guy-Grand, D.; Rocha, B.; Cumano, A.; Rogge, L.; Ezine, S.; Di Santo, J. P.: *Nat. Immunol.* **7**, 1217 (2006).
- [20] Cooper, M. A.; Fehniger, T. A.; Caligiuri, M. A.: *Trends. Immunol.* **22**, 633 (2001).
- [21] Nagler, A.; Lanier, L. L.; Cwirla, S.; Phillips, J. H.: *J. Immunol.* **143**, 3183 (1989).
- [22] Nagler, A.; Lanier, L. L.; Phillips, J. H.: *J. Exp. Med.* **171**, 1527 (1990).
- [23] Robertson, M. J.; Soiffer, R. J.; Wolf, S. F.; Manley, T. J.; Donahue, C.; Young, D.; Herrmann, S. H.; Ritz, J.: *J. Exp. Med.* **175**, 779 (1992).
- [24] Rolstad, B.; Herberman, R. B.; Reynolds, C. W.: *J. Immunol.* **136**, 2800 (1986).
- [25] Gregoire, C.; Chasson, L.; Luci, C.; Tomasello, E.; Geissmann, F.; Vivier, E.; Walzer, T.: *Immunol. Rev.* **220**, 169 (2007).
- [26] Cerwenka, A.; Lanier, L. L.: *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 41 (2001).

- [27] Smyth, M. J.; Cretney, E.; Kelly, J. M.; Westwood, J. A.; Street, S. E.; Yagita, H.; Takeda, K.; Van Dommelen, S. L.; Degli-Esposti, M. A.; Hayakawa, Y.: *Mol. Immunol.* **42**, 501 (2005).
- [28] Shi, L.; Kraut, R. P.; Aebersold, R.; Greenberg, A. H.: *J. Exp. Med.* **175**, 553 (1992).
- [29] Trapani, J. A.; Davis, J.; Sutton, V. R.; Smyth, M. J.: *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 323 (2000).
- [30] Degli-Esposti, M.: *J. Leukoc. Biol.* **65**, 535 (1999).
- [31] Bradley, M.; Zeytun, A.; Rafi-Janajreh, A.; Nagarkatti, P. S.; Nagarkatti, M.: *Blood.* **92**, 4248 (1998).
- [32] Screpanti, V.; Wallin, R. P.; Ljunggren, H. G.; Grandien, A.: *J. Immunol.* **167**, 2068 (2001).
- [33] Degli-Esposti, M. A.; Smyth, M. J.: *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 112 (2005).
- [34] Moretta, L.; Ferlazzo, G.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Mingari, M. C.; Moretta, A.: *Immunol. Rev.* **214**, 219 (2006).
- [35] Walzer, T.; Dalod, M.; Robbins, S. H.; Zitvogel, L.; Vivier, E.: *Blood.* **106**, 2252 (2005).
- [36] Hayakawa, Y.; Screpanti, V.; Yagita, H.; Grandien, A.; Ljunggren, H. G.; Smyth, M. J.; Chambers, B. J.: *J. Immunol.* **172**, 123 (2004).
- [37] Piccioli, D.; Sbrana, S.; Melandri, E.; Valiante, N. M.: *J. Exp. Med.* **195**, 335 (2002).
- [38] Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S.: *Nat. Immunol.* **9**, 503 (2008).
- [39] Yu, G.; Xu, X.; Vu, M. D.; Kilpatrick, E. D.; Li, X. C.: *J. Exp. Med.* **203**, 1851 (2006).
- [40] Martin-Fontecha, A.; Thomsen, L. L.; Brett, S.; Gerard, C.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A.; Sallusto, F.: *Nat. Immunol.* **5**, 1260 (2004).
- [41] Raulet, D. H.; Vance, R. E.: *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 520 (2006).
- [42] Karre, K.; Ljunggren, H. G.; Piontek, G.; Kiessling, R.: *Nature.* **319**, 675 (1986).
- [43] Raulet, D. H.: *Semin. Immunol.* **18**, 145 (2006).
- [44] Oldenborg, P. A.; Zheleznyak, A.; Fang, Y. F.; Lagenaur, C. F.; Gresham, H. D.; Lindberg, F. P.: *Science.* **288**, 2051 (2000).
- [45] Diefenbach, A.; Raulet, D. H.: *Immunol. Rev.* **181**, 170 (2001).
- [46] Janeway, C. A., Jr.: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54 Pt 1**, 1 (1989).
- [47] Medzhitov, R.; Janeway, C. A., Jr.: *Cell.* **91**, 295 (1997).
- [48] Medzhitov, R.; Janeway, C. A., Jr.: *Science.* **296**, 298 (2002).
- [49] Perussia, B.; Trinchieri, G.; Jackson, A.; Warner, N. L.; Faust, J.; Rumpold, H.; Kraft, D.; Lanier, L. L.: *J. Immunol.* **133**, 180 (1984).
- [50] Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225 (2005).
- [51] Yokoyama, W. M.; Plougastel, B. F.: *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 304 (2003).
- [52] Suto, Y.; Maenaka, K.; Yabe, T.; Hirai, M.; Tokunaga, K.; Tadok, K.; Juji, T.: *Genomics.* **35**, 270 (1996).
- [53] Colucci, F.; Schweighoffer, E.; Tomasello, E.; Turner, M.; Ortaldo, J. R.; Vivier, E.; Tybulewicz, V. L.; Di Santo, J. P.: *Nat. Immunol.* **3**, 288 (2002).
- [54] Lanier, L. L.: *Nat. Immunol.* **9**, 495 (2008).
- [55] Lanier, L. L.; Yu, G.; Phillips, J. H.: *J. Immunol.* **146**, 1571 (1991).
- [56] Ravetch, J. V.; Lanier, L. L.: *Science.* **290**, 84 (2000).

- [57] Stebbins, C. C.; Watzl, C.; Billadeau, D. D.; Leibson, P. J.; Burshtyn, D. N.; Long, E. O.: *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6291 (2003).
- [58] Campbell, K. S.; Purdy, A. K.: *Immunology*. **132**, 315 (2011).
- [59] Moretta, A.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Mingari, M. C.; Moretta, L.: *Immunol. Today*. **21**, 228 (2000).
- [60] Vilches, C.; Parham, P.: *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 217 (2002).
- [61] Marsh, S. G.; Parham, P.; Dupont, B.; Geraghty, D. E.; Trowsdale, J.; Middleton, D.; Vilches, C.; Carrington, M.; Witt, C.; Guethlein, L. A.; Shilling, H.; Garcia, C. A.; Hsu, K. C.; Wain, H.: *Tissue Antigens*. **62**, 79 (2003).
- [62] Goodridge, J. P.; Witt, C. S.; Christiansen, F. T.; Warren, H. S.: *J. Immunol.* **171**, 1768 (2003).
- [63] Porgador, A.: *ScientificWorldJournal*. **5**, 151 (2005).
- [64] Dimasi, N.; Moretta, L.; Biassoni, R.: *Immunol. Res.* **30**, 95 (2004).
- [65] Wilhelm, B. T.; Gagnier, L.; Mager, D. L.: *Genomics*. **80**, 646 (2002).
- [66] Westgaard, I. H.; Berg, S. F.; Orstavik, S.; Fossum, S.; Dissen, E.: *Eur. J. Immunol.* **28**, 1839 (1998).
- [67] Braud, V. M.; Allan, D. S.; O'callaghan, C. A.; Soderstrom, K.; D'andrea, A.; Ogg, G. S.; Lazetic, S.; Young, N. T.; Bell, J. I.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.; Mcmichael, A. J.: *Nature*. **391**, 795 (1998).
- [68] Iwaszko, M.; Bogunia-Kubik, K.: *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **59**, 353 (2011).
- [69] Bauer, S.; Groh, V.; Wu, J.; Steinle, A.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.; Spies, T.: *Science*. **285**, 727 (1999).
- [70] Chambers, W. H.; Vujanovic, N. L.; Deleo, A. B.; Olszowy, M. W.; Herberman, R. B.; Hiserodt, J. C.: *J. Exp. Med.* **169**, 1373 (1989).
- [71] Vogler, I.; Steinle, A.: *J. Innate. Immun.* **3**, 227 (2011).
- [72] 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 (2006).
- [73] Arase, N.; Arase, H.; Park, S. Y.; Ohno, H.; Ra, C.; Saito, T.: *J. Exp. Med.* **186**, 1957 (1997).
- [74] Iizuka, K.; Naidenko, O. V.; Plougastel, B. F.; Fremont, D. H.; Yokoyama, W. M.: *Nat. Immunol.* **4**, 801 (2003).
- [75] Kveberg, L.; Dai, K. Z.; Westgaard, I. H.; Daws, M. R.; Fossum, S.; Naper, C.; Vaage, J. T.: *Eur. J. Immunol.* **39**, 541 (2009).
- [76] Campbell, K. S.; Giorda, R.: *Eur. J. Immunol.* **27**, 72 (1997).
- [77] Pozo, D.; Vales-Gomez, M.; Mavaddat, N.; Williamson, S. C.; Chisholm, S. E.; Reyburn, H.: *J. Immunol.* **176**, 2397 (2006).
- [78] Marzio, R.; Mauel, J.; Betz-Corradin, S.: *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**, 565 (1999).
- [79] Sancho, D.; Gomez, M.; Sanchez-Madrid, F.: *Trends. Immunol.* **26**, 136 (2005).
- [80] Plougastel, B.; Dubbelde, C.; Yokoyama, W. M.: *Immunogenetics*. **53**, 209 (2001).
- [81] Germain, C.; Meier, A.; Jensen, T.; Knapnougel, P.; Poupon, G.; Lazzari, A.; Neisig, A.; Hakansson, K.; Dong, T.; Wagtmann, N.; Galsgaard, E. D.; Spee, P.; Braud, V. M.: *J. Biol. Chem.* **286**, 37964 (2011).
- [82] Rosen, D. B.; Cao, W.; Avery, D. T.; Tangye, S. G.; Liu, Y. J.; Houchins, J. P.; Lanier, L. L.: *J. Immunol.* **180**, 6508 (2008).

- [83] Hamann, J.; Montgomery, K. T.; Lau, S.; Kucherlapati, R.; Van Lier, R. A.: *Immunogenetics*. **45**, 295 (1997).
- [84] Akatsuka, A.; Ito, M.; Yamauchi, C.; Ochiai, A.; Yamamoto, K.; Matsumoto, N.: *Int. Immunol.* **22**, 783 (2010).
- [85] Welte, S.; Kuttruff, S.; Waldhauer, I.; Steinle, A.: *Nat. Immunol.* **7**, 1334 (2006).
- [86] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- [87] Han, X.; Aslanian, A.; Yates, J. R., 3rd: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 483 (2008).
- [88] Pompach, P.; Man, P.; Kavan, D.; Hofbauerova, K.; Kumar, V.; Bezouska, K.; Havlicek, V.; Novak, P.: *J. Mass Spectrom.* **44**, 1571 (2009).
- [89] Rozbesky, D.; Kavan, D.; Chmelik, J.; Novak, P.; Vanek, O.; Bezouska, K.: *Protein Expr. Purif.* **77**, 178 (2011).
- [90] Zelensky, A. N.; Gready, J. E.: *Proteins*. **52**, 466 (2003).
- [91] UniProt: *Q92478 (CLC2B\_HUMAN)*. Dostupné z URL: <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q92478>> [cit. 26.4.2012]