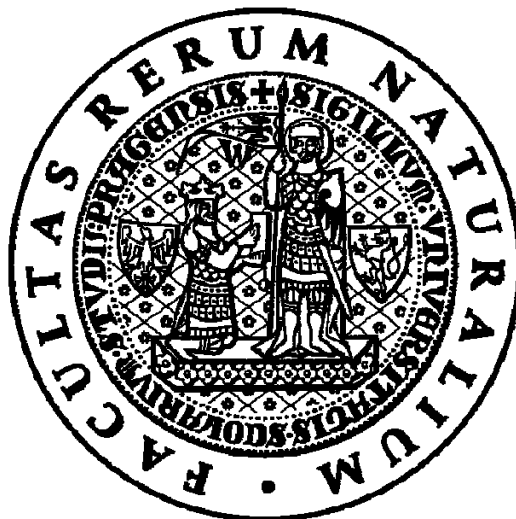


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Jan Bláha

**PŘÍPRAVA A STUDIUM LIDSKÉHO LYMFOCYTÁRNÍHO
RECEPTORU LLT1**

**PREPARATION AND STUDY OF HUMAN LYMPHOCYTE
RECEPTOR LLT1**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha 2012

PODĚKOVÁNÍ:

*Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli **RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD.** za odborné vedení práce, trpělivost a snahu mě naučit novým dovednostem a **prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc.** za možnost vypracování diplomové práce a odborné vedení. Dále děkuji **RNDr. Petru Novákovi, PhD.** za vedení hmotnostně spektrometrické části, **Ing. Janu Dohnálkovi, PhD.** za vedení části krystalografické a **RNDr. Tereze Skálové, PhD.** za vyřešení struktury LLT1. Děkuji evropské infrastruktuře P-CUBE za možnost využití platformy pro rekombinantní expresi a krystalizaci proteinů v Oxfordu. Členům skupiny STRUBI za ochotu poradit a **Dr. Yuguangu Zhao** a **Dr. Karlu Harlosovi** za velkou pomoc s krystalografickou částí práce. Všem členům Laboratoře přirozené imunity MBÚ AV ČR a Katedry biochemie PřF UK bych rád poděkoval za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu kdykoliv poradit a pomoci. V neposlední řadě děkuji také své rodině a přátelům za jejich nesmírnou trpělivost a neustálou podporu v době mého studia.*

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, PhD. a Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 14. 5. 2012

Podpis: _____

Bc. Jan Bláha

ABSTRAKT:

Přirozené zabíječské buňky (NK buňky) jsou pro svojí schopnost rozpoznat a přivodit buněčnou smrt nádorovým a virem infikovaným buňkám bez předchozí antigenní senzitivace intenzivně studovanou součástí imunitního systému. Jejich imunitní funkce je regulována signály vyvolanými interakcí povrchových stimulačních a inhibičních receptorů s ligandy přítomnými na cílové buňce. Současný výzkum receptorů NK buněk C-lektinového typu ukázal, že jejich ligandy se nacházejí v rámci stejné proteinové rodiny, popisující tak receptor-ligandovou interakci dvou lektinů. Je tomu tak i v případě inhibičního receptoru lidských NK buněk NKRP1 (gen KLRB1) a jeho ligandu LLT1 (gen CLEC2D). Imunologické studie popisují ochranu nádorových buněk před imunitním systémem zvýšenou expresí receptoru LLT1 nádorovými buňkami nebo sníženou expresí receptoru NKRP1 na NK buňkách.

Tato diplomová práce popisuje úspěšnou produkci rozpustné formy LLT1 metodou rekombinantní exprese v lidských embryonálních ledvinných buňkách (HEK 293). Ukazuje, že lichý počet cysteinů obsažených v rámci extracelulární lektinové domény LLT1 způsobuje agregaci a špatné sbalení proteinu. Rozpustná forma LLT1 byla stabilizována obnovením šestého cysteinu v evolučně konzervované pozici přístupem cílené mutagenese. Tvorba třetího disulfidického můstku byla ověřena hmotnostně spektrometrickým přístupem. Záměna histidinu za cystein v pozici 176 vedla také ke značnému zvýšení výtěžku a homogenity produktu, umožňující úspěšnou krystalizaci ve dvou různých krystalických formách a řešení struktury rozpustné formy LLT1 v rozlišení až 2.0 Å.

(Práce je psaná v českém jazyce)

KLÍČOVÁ SLOVA:

rekombinantní exprese, transientní transfekce, HEK293, přirozené zabíječské buňky, LLT1, CLEC2D, rentgenová strukturní analýza

ABSTRACT:

Natural killer (NK) cells are an intensively studied part of immune system, possessing unique ability to recognize and induce death of tumor and virus-infected cells without prior antigen sensitization. Their function is regulated by a fine balance of signals induced by multiple activating and inhibitory cell surface receptors and their interaction with the ligands present on the target cell. Recent research in their C-type lectin-like receptors repertoire has shown that ligands of some of these previously orphan receptors lie within their own family, describing a lectin-lectin interaction. This is the case of human inhibitory receptor NKRP1 (gene KLRB1) and its ligand LLT1 (gene CLEC2D). Previous studies have shown that overproduction of LLT1 in cancer cells or lower production of NKRP1 in NK cells is connected to cancerous manifestations.

This master's thesis shows a successful production of the extracellular part of LLT1 utilizing a mammalian expression system based on transient transfection of modified human embryonic kidney (HEK) cell lines. It was found that the five cystein residues contained within the lectin domain of LLT1 tend to cause misfolding and formation of aggregates. Stabilization of the domain was achieved by restoration of the sixth cystein residue at the evolutionary conserved position utilizing a site directed mutagenesis approach. The reconstruction of disulfide bond was verified by mass spectrometry. The mutation of His 176 to Cys 176 led to significant improvement in yield and homogeneity of product that enabled successful crystallization in two different crystalline forms and solution of the structure at 2.0 Å.

(The thesis is written in Czech.)

KEY WORDS:

recombinant expression, transient transfection, HEK293, natural killer cells, LLT1, CLEC2D, X-ray crystallography

SEZNAM ZKRATEK

- AcN Acetonitril
- ADCC buněčná cytotoxicita závislá na protilátce (antibody dependent cell cytotoxicity)
- AICL označení povrchového leukocytárního receptoru (activation-induced C-type lectin)
- APS peroxisíran amonný (ammonium persulfate)
- AspN endopeptidasa Asp-N
- BCR receptor B lymfocytů pro antigen (B-cell receptor)
- bp pár bazí (jednotka délky řetězce DNA, base pair)
- BSA hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
- CAM karboxyamidomethyl (carboxyamidomethyl)
- CBB R-250 barva Coomassie Brilliant Blue R-250
- CD označení povrchových molekul leukocytů (cluster of differentiation)
- CLEC2 rodina C-lektinových receptorů NK buněk (C-type lectin domain family 2)
- Clr rodina proteinů obsahujících podobný motiv jako lektiny typu C (C-type lectin related); viz též Ocil
- CTLD doména podobná lektinům C-typu (C-type lectin-like domain)
- DAP10 10 kDa protein aktivující DNAX (DNAX activating protein of 10 kDa)
- DAP12 12 kDa protein aktivující DNAX (DNAX activating protein of 12 kDa)
- ddH₂O dvakrát deionizovaná voda
- DLS dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
- DMSO Dimethylsulfoxid
- dNTP směs deoxynukleotidtrifosfátů
- DSG disukcinimidyl glutarát
- DSS Disukcinimidyl suberát
- EBNA1t zkrácená forma jaderného antigenu 1 z viru Epstein-Barrové (Epstein-Barr nuclear antigen 1 truncated)
- EDC 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
- EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová
- Endo H endoglykosidasa H
- Endo H_f endoglykosidasa H s fúzním proteinem
- ESI metoda ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
- EtMorf 4-ethylmorfolin
- FA kyselina mravenčí (formic acid)
- Fc část molekuly protilátky (Fragment, crystallizable)
- FcεR1y vysokoafinitní receptor pro IgE (Fc epsilon receptor type I gamma chain)

- GnTI N-acetylglukosaminyltransferasa I
- H/D výměna vodíkovo/deuteriová výměna
- HEK293 označení buněčné linie lidských embryonálních ledvinných buněk číslo 293 (human embryonic kidney 293)
- HeLa označení buněčné linie nádoru děložního hrdla (Henrietta Lacks)
- HLA hlavní lidský histokompatibilní antigen (human leukocyte antigen)
- HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
- CHO označení buněčné linie z vaječníku křečička čínského (Chinese hamster ovary)
- IAA jod acetamid
- IFN Interferon
- Ig Imunoglobulin
- IL Interleukin
- IPA propan-2-ol (Isopropyl alcohol)
- ITAM imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
- ITIM imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)
- KACL receptor NK buněk (keratinocyte-associated C-type lectin)
- KIR imunoglobulinový receptor zabíječských buněk (killer cell Ig-like receptor)
- LB název média podle Luria-Bertaniho
- LC-MS hmotnostní spektrometrie spřažená s kapalinovou chromatografií (Liquid chromatography – Mass spectrometry)
- LIR imunoglobulinový receptor leukocytů (leukocyte immunoglobulin-like receptor)
- LLT1 receptor NK buněk (lectin like transcript 1)
- Ly-49 rodina receptorů C-lektinového typu (lymphocyte antigen 49)
- MALDI ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
- MHC gp. I glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (major histocompatibility complex type I glycoproteins)
- MS hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
- NK přirozený zabíječ (natural killer)
- NKC NK genový komplex (natural killer receptor gene complex)
- NKG2 rodina C-lektinových receptorů NK buněk (natural killer group 2)
- NKp65 receptor NK buněk (natural killer cell p65-related protein)
- NKp80 receptor NK buněk (natural killer cell p80-related protein)
- NKRP1 rodina C-lektinových receptorů NK buněk (natural killer cell receptor protein 1)
- NKT NK-T-lymfocyty (natural killer T cells)
- NMR nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)

- Ocil lektin inhibující formaci osteoklastů (Osteoclast inhibitory lectin); viz též Clr
- PCR polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
- PEG Polyethylenglykol
- PNGasa F protein-N-glykanasa F
- PTK protein tyrosin kinasa (protein tyrosine kinase)
- PTP protein tyrosin fosfatasa (protein tyrosine phosphatase)
- SDS dodecylsulfát sodný
- SDS-PAGE SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
- SV40 TAg velký T-antigen viru SV40
- TAE Tris-acetátový pufr s EDTA
- T_c cytotoxický T-lymfocyt (cytotoxic T-cell)
- TCR receptor T lymfocytů pro antigen (T-cell receptor)
- TEMED N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
- TES zkratka pro pufr obsahující Tris, EDTA a chlorid sodný
- TFA kyselina trifluoroctová
- Tris tris(hydroxymethyl)aminomethan

OBSAH

<u>1.</u>	<u>LITERÁRNÍ ÚVOD</u>	<u>1</u>
1.1.	PŘIROZENÉ ZABÍJEČSKÉ BUŇKY	1
1.2.	RECEPTORY NK BUNĚK	3
1.3.	RECEPTORY LEKTINOVÉHO C-TYPU	4
1.3.1.	RECEPTOR LLT1	5
1.3.1.1.	MUTOVANÁ FORMA RECEPTORU LLT1	7
<u>2.</u>	<u>ÚVOD K POUŽITÝM METODÁM</u>	<u>8</u>
2.1.	PŘÍPRAVA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ	8
2.1.1.	SAVČÍ BUNĚČNÉ LINIE	9
2.1.2.	LIDSKÉ EMBRYONÁLNÍ LEDVINNÉ BUŇKY 293	10
2.1.3.	MODIFIKOVANÁ N-GLYKOSYLACE	11
2.2.	METODY STUDIA STRUKTURY PROTEINŮ	13
2.2.1.	RENTGENOVÁ STRUKTURNÍ ANALÝZA	14
2.2.2.	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	16
<u>3.</u>	<u>CÍLE PRÁCE</u>	<u>20</u>
<u>4.</u>	<u>MATERIÁL</u>	<u>21</u>
4.1.	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	21
4.2.	CHEMIKÁLIE	23
4.3.	ENZYMY	25
4.4.	BAKTERIÁLNÍ KMENY A BUNĚČNÉ LINIE	25
4.5.	VEKTORY	25
4.6.	OLIGONUKLEOTIDY PRO PCR	26
4.7.	ROZTOKY A MÉDIA	26
4.7.1.	PUFRY A JINÉ ROZTOKY	26
4.7.2.	PURELINK™ HiPURE PLASMID DNA MAXIPREP KIT	27
4.7.3.	KULTIVAČNÍ MÉDIA	27
<u>5.</u>	<u>METODY</u>	<u>28</u>
5.1.	PRÁCE S DNA	28
5.1.1.	PŘÍPRAVA INZERTU A LINEARIZOVANÉHO VEKTORU	28
5.1.2.	AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA	28

5.1.3.	EXTRAKCE DNA Z AGAROSOVÉHO GELU	28
5.1.4.	LIGACE ŠTĚPENÉHO INZERTU DO LINEARIZOVANÉHO VEKTORU	29
5.1.5.	PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK <i>ESCHERICHIA COLI</i>	29
5.1.6.	TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK <i>E. COLI</i> TEPELNÝM ŠOKEM	30
5.1.7.	PCR Z KOLONIÍ	30
5.1.8.	NÍZKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLASMIDOVÉ DNA	30
5.1.9.	SEKVENOVÁNÍ DNA	31
5.1.10.	VELKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLASMIDOVÉ DNA	31
5.1.11.	STANOVENÍ KONCENTRACE DNA	32
5.1.12.	CÍLENÁ MUTAGENEZE	32
5.2.	PRÁCE S BUNĚČNÝMI LINIEMI HEK293	35
5.2.1.	POČÍTÁNÍ BUNĚČNÉ HUSTOTY POMOCÍ HEMOCYTOTMETRU	35
5.2.2.	KULTIVACE BUNĚČNÝCH LINIÍ HEK293T, HEK293-6E A HEK293S	35
5.2.3.	ZMRAZOVÁNÍ BUNĚČNÝCH LINIÍ HEK293T, HEK293-6E A HEK293S	36
5.2.4.	ROZMRAZOVÁNÍ BUNĚČNÝCH LINIÍ HEK293T, HEK293-6E A HEK293S	36
5.2.5.	TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293T A HEK293-6E	37
5.2.6.	PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V PROSTŘEDÍ KIFUNENSINU	37
5.2.7.	TRANSFEKCE BUNĚČNÉ LINIE HEK293S	37
5.3.	PURIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ HISTIDINOVÉ KOTVY	38
5.3.1.	CHELATAČNÍ CHROMATOGRFIE	38
5.3.2.	ZKONCENTROVÁNÍ PROTEINŮ	39
5.3.3.	GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE	39
5.4.	CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÉHO PROTEINU	39
5.4.1.	STANOVENÍ KONCENTRACE	39
5.4.2.	SDS-ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU	39
5.4.3.	ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE	40
5.4.3.1.	METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY	40
5.4.3.2.	METODA SEDIMENTAČNÍ RYCHLOSTI	40
5.4.4.	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE - MAPOVÁNÍ DISULFIDICKÝCH VAZEB	40
5.4.4.1.	GRADIENTOVÁ SDS-PAGE V OXIDATIVNÍM PROSTŘEDÍ	41
5.4.4.2.	DEGLYKOSYLACE DENATUROVANÉHO PROTEINU	41
5.4.4.3.	DIGESCE PEPTIDASAMI	41
5.4.4.4.	EXTRAKCE PEPTIDŮ	42
5.4.4.5.	NABOHACENÍ A ODSOLENÍ PEPTIDŮ	42
5.4.4.6.	HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÁ ANALÝZA	42
5.5.	KRYSTALIZACE PROTEINŮ	43
5.5.1.	AUTOMATIZOVANÉ HLEDÁNÍ KRYSTALIZAČNÍCH PODMÍNEK	43
5.5.2.	OPTIMALIZACE KRYSTALIZAČNÍCH PODMÍNEK	44
5.5.3.	MRAZENÍ KRYSTALŮ	44
5.5.4.	TESTOVÁNÍ KRYSTALŮ NA PROTEINOVOU DIFRAKCI	45
5.5.5.	MĚŘENÍ KRYSTALOVÉ DIFRAKCE	45
5.5.6.	ZPRACOVÁNÍ DAT A ŘEŠENÍ STRUKTURY LLT1	45
6.	<u>VÝSLEDKY</u>	46
6.1.	NÁVRH KONSTRUKTU RECEPTORU LLT1	46
6.2.	POPIS VEKTORU PTT28	47

6.3.	PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU pTT28_L2	48
6.4.	PŘÍPRAVA ROZPUSTNÉ FORMY LLT1.....	49
6.5.	MAPOVÁNÍ DISULFIDICKÝCH VAZEB ROZPUSTNÉ FORMY LLT1.....	52
6.6.	CÍLENÁ MUTAGENEZE KONSTRUKTU L2	54
6.7.	PŘÍPRAVA MUTOVANÝCH FOREM RECEPTORU LLT1.....	58
6.8.	MAPOVÁNÍ DISULFIDICKÝCH VAZEB MUTOVANÉ FORMY L2_H176C	61
6.9.	ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE.....	63
6.10.	KRYSTALIZACE MUTOVANÉ FORMY L2_H176C.....	65
6.11.	ŘEŠENÍ STRUKTURY RECEPTORU LLT1	71
<u>7.</u>	<u>DISKUSE</u>	<u>73</u>
<u>8.</u>	<u>SHRNUTÍ.....</u>	<u>79</u>
<u>9.</u>	<u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u>	<u>80</u>
<u>10.</u>	<u>PŘÍLOHY</u>	<u>85</u>
10.1.	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE – SEZNAM IDENTIFIKOVANÝCH PEPTIDŮ	85

1. Literární úvod

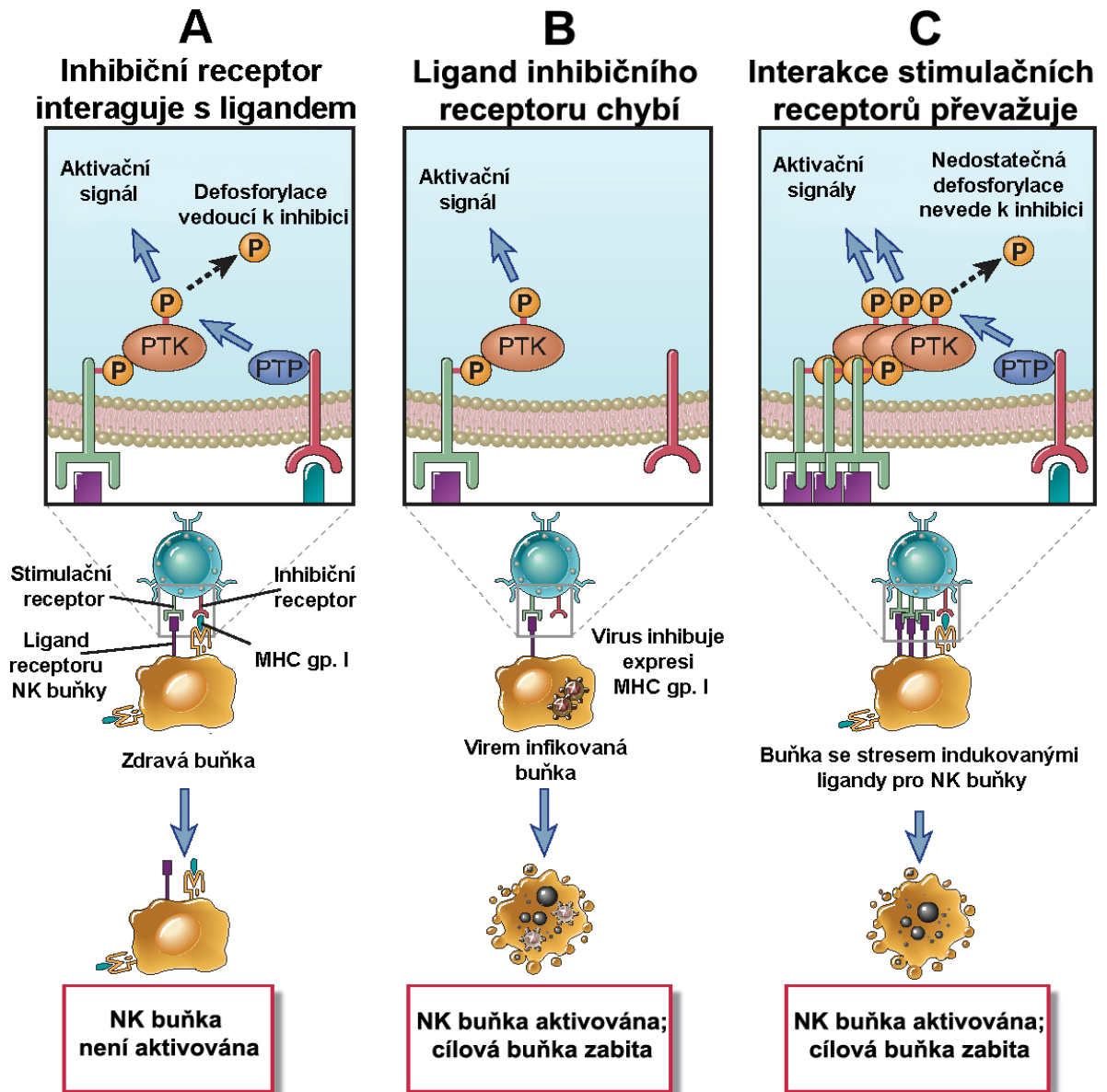
1.1. Přirozené zabíječské buňky

Biologická imunita a imunitní systém jsou myšlenky, které mají své kořeny patrně již ve starověké Číně, kde docházelo k imunizaci dětí práškem ze strupů neštovic. Na našem kontinentě se pak první zmínka o imunitě připisuje řeckému Thukydidovi, který si všiml, že někteří lidé jsou vůči masovým chorobám neteční. Za otce moderního přemýšlení o imunitě můžeme označit Angličana E. Jennera, který v roce 1798 publikoval metodu zvanou vakcinace, pomocí které imunizoval děti proti neštovicím. Příchod dvacátého století pak přinesl pro imunologii významná jména jako Louis Pasteur, Robert Koch, Paul Ehrlich nebo Elie Metchnikoff, z nichž mnozí byli za objasnění příčin onemocnění oceněni Nobelovou cenou. Studium imunitního systému na úrovni buněčných mechanismů přichází ve druhé polovině dvacátého století s rozvojem imunochemických technik, tkáňových kultur, rekombinantní přípravy proteinů nebo transgeních zvířat [1].

Dnes víme, že imunitní systém je základní homeostatický mechanismus, jenž udržuje integritu organismu tím, že ho chrání před škodlivinami z vnějšího i vnitřního prostředí. Přitom rozpoznává vlastní tkáň a je k nim tolerantní. Mechanismy imunitního systému rozlišujeme podle rychlosti reakce na evolučně starší nespecifické a na antigenně specifické. Jak se ukazuje jsou tyto mechanismy na sobě závislé a jejich signalizační dráhy jsou doslova propletené v molekulární koncert, jehož hlavní myšlenkou je likvidace potenciální škodliviny [2,3].

Relativně nedávno objevenou složkou imunitního systému jsou přirozené zabíječské buňky (natural killer cells, dále jen NK buňky) [4], které byly pojmenovány podle jejich schopnosti rychle zabít nádorové buňky *in vitro* bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci. Morfologicky se jedná o velké granulární lymfocyty, které vznikají diferenciací z lymfoidních progenitorů v kostní dřeni. NK buňky identifikujeme pomocí přítomnosti receptorů CD16 (receptor pro Fc fragment IgG) a CD56 (adhezní molekula) za současné nepřítomnosti CD3 komplexu. Na rozdíl od T a B lymfocytů NK buňky na svém povrchu nemají antigenně specifické receptory (tzn. TCR a CD3 komplex nebo BCR). Přesto jsou vývojově bližší spíše T-lymfocytům, o čemž svědčí podobné cytotoxické mechanismy NK buněk a cytotoxických T lymfocytů (T_c) nebo existence NK-T buněčné populace, která exprimuje některé NK-buněčné i T-lymfocytární receptory. U člověka tvoří NK buňky zhruba 5 - 15% všech lymfocytů. Kromě sleziny

se NK buňky vyskytují v lymfoidních tkáních jen vzácně. Hojně jsou ale zastoupeny v plicích, játrech nebo gravidní děloze [1,2].



Obr. 1: Funkce aktivačních a inhibičních receptorů NK buněk. Panel A ukazuje interakci stimulačního receptoru NK buňky s ligandem vedoucí k aktivaci protein-tyrosin kinasy (PTK). Přitom interaguje inhibiční receptor NK buňky s MHC gp. I a aktivuje protein-tyrosin fosfatasu (PTP), která inhibuje aktivovanou PTK. NK buňka není aktivována. Situace na **panelu B** ukazuje podobný případ bez vlivu inhibičního receptoru, cytotoxické mechanismy NK buňky jsou aktivovány. **Panel C** ukazuje převažující stimulační signál, který vede k aktivaci cytotoxických mechanismů NK buňky [1].

NK buňky jsou schopné rozeznat buňky nádorové, napadené virem, opsonizované protilátkami nebo poškozené stresem. Pomocí svých cytotoxických mechanismů NK buňka

pak „přinutí“ potenciálně nebezpečné buňky ke spáchání programované smrti (apoptosy), která je bezpečná pro okolní tkáň. Na rozdíl od T_c lymfocytů neuvítají NK buňky k rozeznání svého cíle antigenně specifické receptory, ale řadu stimulačních a inhibičních receptorů. Tyto receptory rozeznávají řadu povrchových molekul cílových buněk a stimulují nebo inhibují cytotoxickou odpověď NK buněk (viz. Obr. 1, str. 2) [1,2].

Přestože NK buňky řadíme k nespecifické imunitní odpovědi, ovlivňují tyto lymfocyty i odpověď antigenně specifickou. Vedle vlastní cytotoxické odpovědi se NK buňky totiž podílejí také na imunomodulaci prostřednictvím cytokinů, které buď přímo sekretují – např. $IFN-\gamma$ [5] nebo k sekreci stimulují jiné lymfocyty [6,7,8,9].

1.2. Receptory NK buněk

Inhibiční receptory rozeznávají převážně MHC glykoproteiny I. třídy (MHC gp. I), které jsou normálními buňkami hojně exprimovány. Buněčný stres nebo napadení virem totiž často vede k omezení exprese tohoto glykoproteinového komplexu. To má za následek únik těchto potenciálně nebezpečných buněk před T-lymfocytární imunitní odpovědí. Proto NK buňky interpretují dostatečný výskyt MHC gp. I na povrchu buněk jako známku zdraví a jsou rozpoznáním této povrchové struktury inhibovány. Naopak nepřítomnost tohoto znaku zdraví vede k aktivaci cytotoxické odpovědi. Schopnost aktivace NK buněk na základě nepřítomnosti standardního znaku je popisována jako „missing-self“ teorie [10,11].

Inhibiční receptory NK buněk můžeme rozdělit do tří proteinových rodin podle rozlišené terciární struktury. Jsou to receptory z imunoglobulinové rodiny (KIR, Killer-cell immunoglobulin-like receptors), dále receptory obsahující doménu podobnou lektinům C-typu (CTLD, C-type lectin domain), mezi jejichž zástupce patří např. heterodimerní CD94/NKG2A rozeznávající konkrétní MHC gp. I, u člověka označovaný jako HLA-E. A poslední skupinou jsou leukocytární receptory obsahující doménu podobnou imunoglobulinu (LIR, leukocyte Ig-like receptors), které váží MHC gp. I s nižší afinitou než KIR a jsou typické spíše pro B-lymfocyty [1,2,12,13].

Společným jmenovatelem inhibičních receptorů NK buněk je intracelulární aminokyselinový motiv označovaný jako ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, S/I/V/L X Y X X I/V/L, kde X značí libovolnou aminokyselinu) [14]. Jak už název napovídá, je součástí tohoto aminokyselinového motivu minimálně jeden tyrosin, který je při interakci receptoru s ligandem fosforylován. To vede k aktivaci fosfatasy, které

přeruší signální kaskádu aktivačních receptorů a tak blokuje jejich stimulační potenciál, tedy inhibují NK buňku [15].

Stimulační receptory rozeznávají širokou skupinu povrchových struktur přítomných na buňkách infikovaných virem, poškozených stresem ale i na buňkách zdravých. Ligandy mnohých stimulačních receptorů nejsou stále identifikovány. Podobně jako inhibiční receptory patří stimulační receptory především do KIR a CTDL rodin [1,2,12,13].

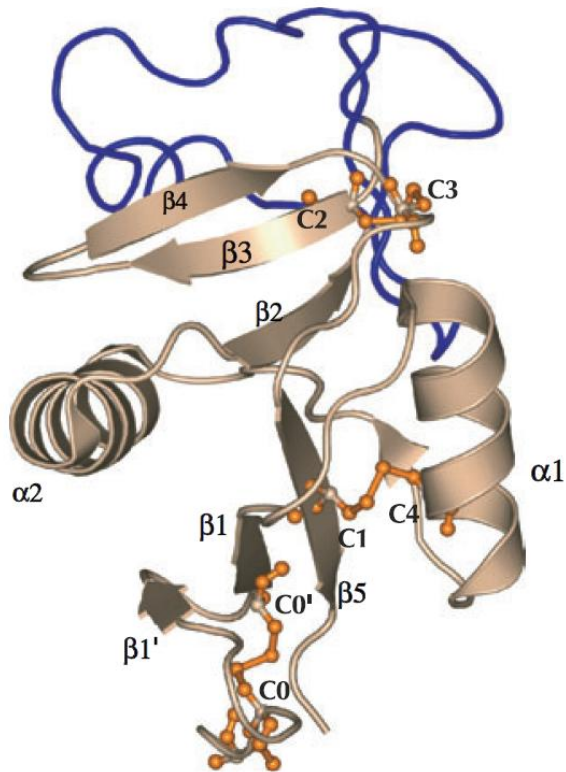
Signalizace těchto receptorů je zprostředkována pomocí intracelulárního aminokyselinového motivu ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, Y X X I/L X₍₆₋₁₂₎ Y X X I/L, kde X značí libovolnou aminokyselinu) [14]. Narozdíl od inhibičních receptorů nebývá tento motiv přímo součástí aktivačního receptoru. Aktivační receptory totiž asociují nekovalentně s dalšími membránovými proteiny, které ITAM obsahují a zprostředkovávají tak přenos signálu po interakci aktivačního receptoru s ligandem. Příkladem receptoru a asociující jednotky jsou NKG2D a DAP10, KIR2DS a DAP12 nebo CD16 a FcεRIγ. Interakce receptoru s ligandem umožňuje fosforylaci tyrosinů, následuje asociace a aktivace dalších kinas, které signál propagují [2].

Mezi stimulační receptory patří i Fc receptor CD16, který s nízkou afinitou rozeznává Fc část protilátek třídy IgG. Setká-li se NK lymfocyt s buňkou, která je opsonizována protilátkami třídy IgG, naváže se prostřednictvím receptoru CD16 na jejich Fc část. To pak způsobí agregaci receptorů a přenesení signálů, které aktivují cytotoxické mechanismy. Tento děj se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC; antibody-dependent cellular cytotoxicity) [16].

1.3. Receptory lektinového C-typu

Rodina proteinů obsahující doménu podobnou lektinům C-typu patří do skupiny velice různorodých živočišných lektinů. Receptory lektinového C-typu jsou pojmenovány podle toho, že interakce se sacharidovými ligandy je u nich závislá na přítomnosti Ca²⁺ iontu. Mezi receptory NK buněk nacházíme celou řadu proteinů obsahujících CTLD. Jsou to často transmembránové proteiny II. typu tvořící homo nebo heterodimery. Pro CTLD je charakteristická struktura dvojité smyčky (viz. Obr. 2, str. 5), ve které se nachází dva antiparalelní β-listy a dva α-helixy. Celá doména bývá stabilizována dvěma až čtyřmi vysoce konzervovanými disulfidickými můstky. Smyčka označovaná jako „long loop region“ je strukturně a evolučně proměnlivá a v některých případech dokonce i zcela

schází. Tato smyčka se může podílet na dimerizaci CTLD a často se právě zde nachází vazebné místo sacharidu [17].



Obr. 2: Typická struktura CTLD. Typická doména lektinového C-typu obsahuje dva α -helixy ($\alpha 1$, $\alpha 2$), dva antiparalelní β -listy ($\beta 1' + \beta 1 + \beta 5$; $\beta 2 + \beta 3 + \beta 4$). Doména je stabilizována dvěma ($C1-C4$; $C2-C3$) nebo třemi ($C0-C0'$) disulfidickými můstky (oranžový kuličkový model). Proměnlivá smyčka - tzv. „long loop region“ je vyznačena tmavě modrou [17, PDB: 1K91].

Receptory NK buněk se částečně strukturně odlišují od typické CTLD, což může souviset s faktem, že nejčastěji specificky rozpoznávají a váží proteinové ligandy – např. MHC gp. I nebo jiné povrchové receptory. Tato vazba se také často uskutečňuje bez přítomnosti Ca^{2+} iontů. Celkově se v rámci C-lektinů jedná o evolučně mladou skupinu, u myši je zastoupena např. receptorovými rodinami Ly-49 [18], NKG2 [19] nebo NKRP1 a Clr [20]; u lidí pak např. receptory CD69 [21], NKG2, AICL a NKp80 [22], KACL a NKp65 [23] nebo NKRP1 a LLT1 [24].

1.3.1. Receptor LLT1

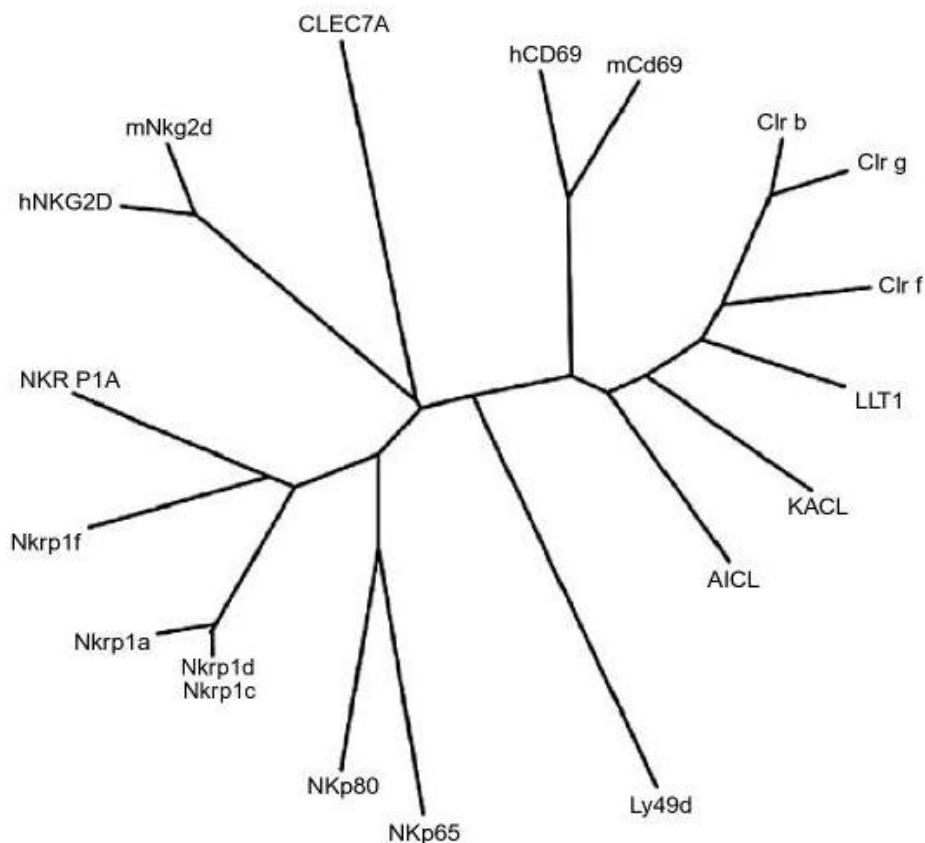
Hlavním předmětem studia této práce je receptor lidských NK buněk LLT1 (lectin-like transcript 1), který je kódovaný genem CLEC2D. Pro tento gen bylo identifikováno šest různých transkripčních variant. Přitom pouze isoforma 1 genu

CLEC2D – označovaná jako LLT1, poskytuje proteinový produkt rozpoznávající fyziologický ligand. Ostatní isoformy nejsou vystaveny na buněčný povrch a zůstávají v endoplasmatickém retikulu, kde vytváří homodimery nebo heterodimery s LLT1. Přitom exprese LLT1 je v porovnání s CLEC2D isoformou 2 mnohem nižší, což může naznačovat jistou regulaci exprese povrchově funkčního receptoru [25].

LLT1 je transmembránový glykoprotein II. typu tvořící kovalentní homodimery obsahující C-terminální CTLD. Tento receptor byl identifikován na NK buňkách, T a B lymfocytech a dendritických buňkách. Můžeme jej nalézt také na osteoblastech, kde inhibuje tvorbu osteoklastů, respektive odbourávání kostní tkáně (odtud pochází i alternativní název pro LLT1 – OCIL, osteoclast inhibitory lectin) [26].

Fyziologickým ligandem LLT1 je inhibiční receptor lidských NK buněk NKRP1 (dále jen NKRP1) [6,24]. Vytvořením tohoto fyziologického komplexu může dojít jednak k inhibici cytotoxické odpovědi NK buněk, nebo iniciaci sekrece imunomodulačních látek. Protože NKRP1 se vyskytuje na NK buňkách nebo T lymfocytech, existuje řada možných kombinací konkrétního buněčného výskytu interagujícího páru. Bylo například ukázáno, že interakce receptoru LLT1 na NK buňce s receptorem NKRP1 na T lymfocytu zvyšuje sekreci IFN- γ obou typů buněk a omezuje sekreci IFN- α T lymfocytům [6,7]. Naopak NKRP1 na NK lymfocytu interagující s LLT1 na dendritické buňce způsobuje zvýšenou sekreci IL-12, který stimuluje expresi receptoru NKRP1 [9]. Bylo také ukázáno, že glioblastomové mozkové nádory se chrání před cytotoxickou odpovědí NK buněk zvýšenou expresí LLT1 [27].

Receptor LLT1 v souladu s očekáváním vykazuje podobnost s ostatními C-lektinovými receptory NK buněk. Porovnání C-terminálních lektinových domén (viz. Obr. 3, str. 7) například ukazuje zhruba 50% identitu a 75% podobnost primární sekvence LLT1 a receptorů rodiny Clr, nebo zhruba 40% sekvenční identitu a 70% podobnost s receptory CD69. Srovnání CTLD receptoru LLT1 a NKRP1 pak vykazuje zhruba 30% identitu a 55% podobnost [28].



Obr. 3: Fylogenetická analýza CTLD lidských a myších receptorů NCRP1 a CLEC2. Receptory NKG2D, CLEC7A a Ly49D jsou uvedeny pro srovnání. Fylogenetický strom byl vytvořen pomocí programu PHYLIP [23].

1.3.1.1. Mutovaná forma receptoru LLT1

Jednou z klíčových částí této práce je nahrazení histidinu na pozici 176 v primární sekvenci receptoru LLT1 cysteinem. Význam této mutace byl nezávisle objeven japonskou skupinou doktora J. Kamishikiryo, která v průběhu mojí práce tento výsledek publikovala v časopise *Journal of Biological Chemistry* [29]. Článek popisuje přípravu přirozené a mutovaných forem receptoru LLT1 rekombinantní expresí v *Escherichia coli* s následným renaturačním krokem. Přitom ukazuje, že rozpustné formy receptoru LLT1 neobsahující mutaci H176C jsou nestálé a mají tendenci agregovat. Dále s využitím srovnávací CD spektroskopie ukazuje, že zmíněná mutace neovlivňuje četnost zastoupení prvků sekundárních struktur a metodou povrchové plazmonové rezonance ukazuje, že zmíněná mutace neovlivňuje K_d komplexu LLT1-NCRP1. Také z těchto důvodů nebylo zkoumání vlivu mutace na prostorovou strukturu nebo interakci s fyziologickým ligandem zahrnuto do náplně této práce.

2. Úvod k použitým metodám

2.1. Příprava rekombinantních proteinů

V odvětvích jako biomedicína, imunologie nebo proteomika je dnes velký důraz kladen na výzkum proteinů. Tyto proteiny můžeme získat např. izolací z přirozeného zdroje, poměrně omezeně připravit *in vitro* nebo využít tzv. rekombinantní exprese. Rekombinantní exprese je postup při kterém je gen proteinu našeho zájmu vnesen pomocí vektoru virového či bakteriálního (plasmid) původu do produkčního organismu, kterým jsou obvykle opět bakterie nebo eukaryotní mikroorganismy či buněčné linie. Produkční organismus pak exprimuje vložený gen za vzniku rekombinantního proteinu, který většinou několika málo purifikačními kroky získáme v dostatečné čistotě pro naše potřeby.

Protože jednou z vlastností života i na molekulární úrovni je jeho rozmanitost, mají rekombinantní proteiny produkované v různých organismech různé vlastnosti. Prokaryotické organismy například postrádají komplexní proteosyntetický aparát obvyklý u eukaryotních buněk, může tak docházet ke špatnému sbalení daného proteinu a jeho vyloučení ve formě nerozpustných agregátů, tzv. inkluzních tělísek. V některých případech však lze proteiny z inkluzních tělísek *in vitro* renaturovat a získat je v jejich nativní konformaci. Je-li výtěžek renaturace dostatečný pro dané účely, může být produkce rekombinantních proteinů ve formě inkluzních tělísek relativně výhodná kvůli jejich snadné izolaci v poměrně vysoké čistotě. Podstatné rozdíly nacházíme také mezi jednotlivými eukaryotními organismy a to především na úrovni posttranslačních modifikací. Dobrým příkladem je N-glykosylace proteinů: zatímco většina savčích buněk vytváří tzv. komplexní glykosylaci, často užívané hmyzí buňky poskytují jednoduchou manosovou glykosylaci a kvasinky pak své proteiny přímo hyperglykosylují koncovými manosovými strukturami. Přitom pro terapeutické využití takových proteinů může mít přítomnost „cizího“ typu glykosylace za následek imunitní respektive alergickou odpověď.

Nejpoužívanější produkční organismy pochází i dnes stále z říše prokaryot a to pro jejich rychlý růst a snadnou a levnou kultivaci. Jsou to především různé kmeny bakterií *Escherichia coli* [30] nebo *Lactococcus lactis* [31]. Problémy při správném sbalování rekombinantních proteinů v prokaryotech však nutí stále častěji vědce i průmysl k užívání eukaryotických expresních systémů. Bývají to zástupci kvasinek (např. *Saccharomyces cerevisiae* [32] a *Pichia pastoris* [33]), které nejsou náročné na kultivaci, mají krátkou generační dobu a poskytují poměrně vysoké výtěžky. Nevýhodou je již zmíněná manosová

hyperglykosylace proteinů. Hmyzí buňky (např. *Spodoptera frugiperda* - buněčná linie Sf9 a Sf21, *Trichoplusia ni* – buněčná linie Hi5 či *Drosophila melanogaster* - buněčná linie S2 [34]) jsou méně náročné na kultivaci než buňky savčí a poskytují jednoduchou manosovou glykosylaci vhodnou pro strukturní studie. Rekombinantní exprese v hmyzích buňkách je v současnosti stále metodou první volby pro strukturní biologii. Pro jejich transfekci se používají nejčastěji virové vektory anebo chemické transfekční postupy. Na vzestupu je také používání zástupců ze skupiny prvoků (*Protozoa*), a to především pro člověka nepatogenní *Leishmania tarentolae* [35]. Výhodami tohoto organismu je např. rychlý růst až do značně vysokých buněčných hustot, uniformní glykosylace podobná glykosylaci savčího typu nebo nižší nároky na kultivaci a teplotu (pouze 26°C, bez CO₂).

Stále více jsou však pro strukturní a funkční studie, ale i pro výrobu farmaceutických terapeutik, upřednostňovány savčí expresní systémy, zajišťující správné nativní uspořádání rekombinantního proteinu včetně odpovídajících posttranslačních modifikací. V roce 2010 se uvádělo, že z 58 biofarmaceutických rekombinantních proteinů je 32 produkováno v savčích buňkách [36]. Hlavní nevýhodou je vysoká cena kultivačních médií, přístrojová náročnost a velká náchylnost ke kontaminaci [34].

Obecně nelze říci, který expresní systém je nejlepší. Vždy totiž záleží na konkrétním proteinu, o jehož rekombinantní přípravu se pokoušíme. Velké množství proteinů se dá úspěšně a levně produkovat v prokaryotických buňkách - byť s případným mnohdy náročným renaturačním krokem. Přesto pokud chceme daný protein používat v biologických a funkčních testech, snažíme se naším vyprodukovaným modelem co nejvíce přiblížit reálnému proteinu *in vivo*. Pro lidské proteiny tuto podmínku skutečně nejlépe splňují savčí expresní systémy – a to nejlépe expresní systémy založené na lidských buněčných liniích.

2.1.1. Savčí buněčné linie

Savčí buňky jsou obvykle kultivovány v prostředí atmosféry 5% CO₂ při 37°C. Zdrojem potřebných živin, růstových faktorů, biogenních a stopových prvků jsou kultivační média, která mohou obsahovat i speciální aditiva – např. heparin k zamezení vzniku buněčných agregátů (vhodné pro míchané suspenzní kultury), acidobazické indikátory pro kontrolu pH anebo antibiotika pro vyšší odolnost vůči kontaminaci.

Savčí buněčné linie vznikají z odebraných primárních buněk příslušného savce. Protože se tyto buňky nemohou množit neomezeně dlouho, vytvářejí se z nich nesmrtelné

buněčné linie. Imortalizace se provádí buď náhodnou mutací, transformací virovou DNA nebo splynutím s již nesmrtelnou nádorovou buňkou za vzniku tzv. hybridomů. Např. hybridomy vzniklé splynutím lymfocytu imunizované myši s myelomovou buňkou jsou využívány pro výrobu monoklonálních protilátek [37].

Savčích buněčných linií používaných ve vědě a průmyslu je dnes velká řada. Nejčastěji se můžeme setkat např. s buněčnou linií CHO (Chinese Hamster Ovary) odvozenou z primárních buněk vaječníku křečička čínského [38]. Její výhodou je rychlý růst, přizpůsobivost a vysoká úspěšnost při tvorbě stabilně transfekovaných linií [39]. Další hojně používaná buněčná linie je pojmenována podle nevědomé dárkyně primárních buněk nádoru děložního hrdla, která rakovině nakonec podlehla - HeLa (Henrietta Lacks) [40]. Tato linie je poměrně dobře prostudovaná a je užívána jako model lidských buněk nebo pro rekombinantní expresi [41]. Jejich kultivace není obtížná, naopak HeLa buňky mají při neopatrném zacházení tendenci kontaminovat svoje okolí [42]. V poslední době ve vztahu k produkci rekombinantních proteinů nabývá na významu také buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk číslo 293.

2.1.2. Lidské embryonální ledvinné buňky 293

Lidské embryonální ledvinné buňky číslo 293, známé spíše pod zkratkou HEK293 (Human Embryonic Kidney 293), je plný název pro dnes velmi atraktivní expresní systém, a to jak z hlediska průmyslové, tak i akademické výroby rekombinantních proteinů. Tato buněčná linie byla v roce 1970 vytvořena Frankem Grahamem (v laboratoři Alexandra Van der Eba v Leidenu; Holandsko) odvozením z primárních lidských ledvinových buněk získaných z potracených embryí [43]. Primární kultura byla imortalizována transformací virovou DNA z adenoviru 5, transformace byla provedena s pomocí precipitace DNA chloridem vápenatým [44]. Číslo 293 označuje transformační pokus, ze kterého tato linie vzešla.

Buňky HEK293 lze snadno kultivovat adherentně i v suspenzi. Suspenzní kultivace probíhá v bezsérovém prostředí a je vhodná pro produkci v třepaných lahvích, kde bylo již dosaženo až 100 l objemu produkce [45], nebo velkoobjemových bioreaktorech. Lidský expresní systém by měl poskytovat savčí rekombinantní proteiny se správnými a přirozenými posttranslačními modifikacemi – ať už se jedná o správné vytvoření disulfidových můstků, proteolytické úpravy nebo glykosylaci. Cenou za nativitu proteinu

jsou (v porovnání s prokaryotickými expresními systémy) drahá kultivační média, dlouhá generační doba a náchylnost k infekcím [34].

Dnes se můžeme setkat s mnoha variantami původní linie HEK293, které byly v průběhu času na akademické a komerční půdě vyvinuty pro snazší kultivaci nebo vyšší úroveň produkce proteinů. V této práci bylo užíváno těchto buněčných linií:

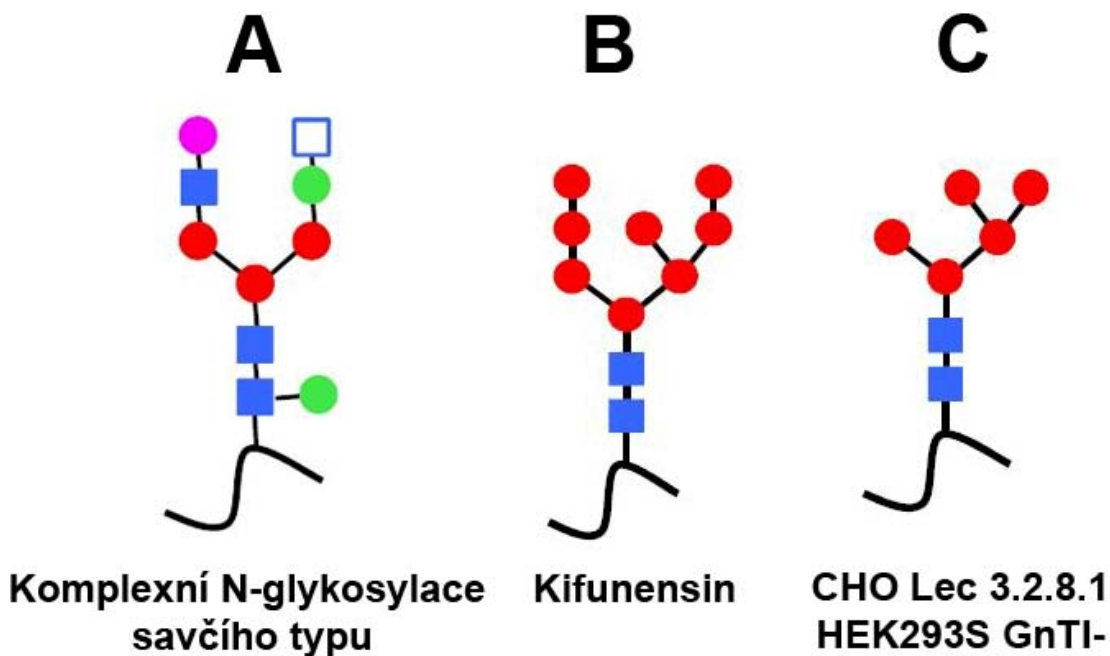
- HEK293T – Kultura stabilně transformována genem pro velký T-antigen polyomaviru SV40 (SV40 TAg), který umožňuje episomální replikaci plasmidů obsahujících replikační počátek SV40 [46].
- HEK293-6E – Kultura stabilně transformovaná optimalizovanou verzí genu pro nukleární antigen 1 viru Epstein-Barrové (EBNA1) tzv. EBNA1t (EBNA1 truncated), který vykazuje nižší cytotoxicitu a umožňuje episomální replikaci plasmidů obsahujících replikační počátek oriP. Tato kultura je uzpůsobená pro bezsérovou kultivaci, její plný název je HEK293F-EBNA1t [47].
- HEK293S GnTI - Buněčná kultura uzpůsobená pro bezsérovou kultivaci v suspenzi; postrádá aktivitu N-acetylglukosaminyltransferasy I (GnTI). Veškeré proteiny produkované touto linií mají homogenní manosovou N-glykosylaci [48].

2.1.3. Modifikovaná N-glykosylace

Rekombinantní příprava glykoproteinů v savčích buňkách přináší potenciální problémy pro jejich krystalizaci. Komplexní N-glykosylace savčího typu nebývá uniformní. Navázané oligosacharidy se mohou lišit např. přítomností a počtem navázaných zbytků fukosy či kyseliny sialové, popřípadě mohou některé oligosacharidy na dané molekule proteinu zcela scházet. Z těchto důvodů nebývá připravený glykoprotein doslova chemicky čistou látkou. Dlouhé sacharidové řetězce jsou navíc poměrně flexibilní, což také není dobrý předpoklad pro utvoření uspořádané struktury krystalu [49].

Tento problém můžeme řešit deglykosylací připraveného glykoproteinu – např. pomocí endoglykosidasy H (Endo H; ponechává první GlcNAc vázaný na Asn) nebo protein-N-glykanasy F (PNGasa F; kompletní deglykosylace, přeměna Asn na Asp) [50]. U přirozené glykosylace savčího typu (viz. Obr. 4, str. 12) se často setkáváme s neúplnou deglykosylací, což je způsobeno fukosylací prvního GlcNAc, která poskytuje směs

produktů. Naproti tomu jednoduchá manosová glykosylace, popsaná níže, je odštěpitelná mnohem snáze a většinou poskytuje uniformní deglykosylovaný produkt.



Obr. 4: Modifikace N-glykosylace. Panel A ukazuje finální podobu komplexní N-glykosylace savčího typu. Panel B ukazuje vysoce manosovou N-glykosylaci při produkci proteinu v prostředí kifunensinu. Panel C ukazuje jednoduchou manosovou glykosylaci proteinu produkovaného v buněčné linii CHO Lec 3.2.8.1 nebo HEK293S GnTI-. Sacharidy jsou znázorněny geometrickými tvary: GlcNAc (modrý čtverec), Man (červený kruh), Fuc (zelený kruh), Sia (fialový kruh), GalNAc (prázdný modrý čtverec) [51].

Další možností je ovlivnění proteosyntetického aparátu během produkce rekombinantního glykoproteinu např. chemickým inhibitorem klíčového glykosylačního procesu. Kifunensin je inhibitor α -manosidasy I [52], který brání odštěpení uniformní manosové struktury respektive syntéze komplexních oligosacharidů. Rekombinantní protein produkovaný v savčích buňkách v prostředí kifunensinu obsahuje uniformní vysoce manosovou N-glykosylaci (viz Obr. 4). Kifunensin také pozitivně ovlivňuje výtěžek vyrobeného rekombinantního proteinu. Nevýhodou tohoto inhibitoru je poměrně vysoká cena.

Existují také konkrétní svačí buněčné linie, které mají přímo vyraženu aktivitu některého procesu z glykosylační kaskády, díky čemuž vzniká jednodušší typ N-glykosylace. Takovými buněčnými liniemi jsou např. CHO Lec 3.2.8.1 [53] nebo

HEK293S GnTI [48] , které neexprimují gen pro N-acetylglukosaminyltransferasu I. Poskytují tak jednoduchou manosovou glykosylaci (viz. Obr. 4, str. 12), která je jednodušší než u proteinů produkovaných v prostředí kifunensinu. Výhodou těchto buněčných linií oproti chemickým inhibitorům je fakt, že poskytují jednoduchou N-glykosylaci inherentně a tedy zadarmo. Na druhé straně nepřírozená glykosylace všech buněčných proteinů může mít za následek méně efektivní výrobu rekombinantních proteinů, tedy jejich nižší výtěžky.

2.2. Metody studia struktury proteinů

Protože funkce proteinů je determinována prostorovým uspořádáním jejich polypeptidového řetězce, je pro detailní objasnění funkčního mechanismu proteinu nutné poznání jeho prostorové struktury. Strukturní biologie je disciplína zabývající se studiem prostorových struktur biomakromolekul. Využívá přitom celé řady biofyzikálních metod, jejichž informační syntézou se snaží popsat strukturu nebo mechanismus funkce dané biomakromolekuly.

I zdánlivě běžné metody nám mohou poskytnout řadu informací ohledně strukturního uspořádání proteinů. Např. gelová permeační chromatografie nebo elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu může pomoci objasnit oligomerii studovaného proteinu nebo kovalentní povahu takového oligomeru. Pomocí analytické ultracentrifugace můžeme charakterizovat danou biomakromolekulu z hlediska její molekulové hmotnosti a sedimentačního koeficientu. Můžeme také získat odhad velikosti a tvaru částice, případně distribuci jednotlivých typů sedimentujících částic ve směsi. V neposlední řadě lze také studovat rovnovážné systémy, včetně určení příslušných rovnovážných konstant [54]. Dynamický rozptyl světla (DLS) bývá považován za doplňkovou metodu k analytické ultracentrifugaci, neboť poskytuje informaci o distribuci velikosti částic. DLS je často užíván pro ověření homogenity proteinových vzorků určených pro krystalizaci. Ve vlastním řešení struktury biomakromolekul nebo jejich komplexů se v současnosti nejvíce uplatňuje kryoelektronová mikroskopie a tomografie, vícerozměrná nukleární magnetická rezonance a rentgenová strukturní analýza [55,56].

V elektronovém mikroskopu dopadá koherentní svazek elektronů na zmražený hydratovaný vzorek, který je fixován ve vrstvě ledu. Vzorek se skládá z molekul s náhodnou orientací a my tak získáváme dvourozměrné projekce v různých orientacích,

ze kterých můžeme počítačovou rekonstrukcí získat prostorový model studované částice. Rozlišení získaného modelu však nebývá vyšší než 5 Å a poskytuje spíše tvar nebo objemovou obálku dané částice. Do prostorového modelu částice s nízkým rozlišením, můžeme umisťovat vyřešené struktury s vysokým rozlišením. Tato metoda je tedy vhodná pro studium struktur velkých částic a komplexů (např. ribosomů [57] nebo virových částic [58]) a často je kombinována s rentgenovou strukturní analýzou.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) využívá interakce atomových jader s nenulovým jaderným spinem v magnetickém poli s radiofrekvenčním zářením. Vzniklé relaxační záření nám pak v multidimenzionálním uspořádání experimentu může poskytnout informaci o vzdálenostech atomů H^1 , C^{13} nebo N^{15} . Protože se celý pokus odehrává ve vodném prostředí nehrozí přítomnost strukturních artefaktů způsobených krystalografickými kontakty (viz. Obr. 5, str. 17). Získáváme soubor struktur (konformerů) daného proteinu, který poskytuje informaci o jeho globální a vnitřní dynamice. Tato metoda také umožňuje snadnou titraci proteinu a sledování vlivu např. pH nebo koncentrace ligandu na jeho strukturu. Hlavní nevýhodou NMR ve strukturní biologii je fakt, že složitost naměřených spekter roste s velikostí zkoumané částice. Překryv signálů jednotlivých atomů a jejich nedostačující rozlišení omezuje tuto techniku pro zkoumání biomakromolekul menších než 50 kDa. Přesto moderní rozvoj této techniky naznačuje, že se brzy budou objevovat struktury řešené pomocí NMR o hmotnosti větší než 500 kDa [59,60].

2.2.1. Rentgenová strukturní analýza [55,56]

Hlavní technikou pro řešení prostorové struktury biomakromolekul v atomárním rozlišení je rentgenová strukturní analýza. Tato metoda je schopna poskytnout informaci o prostorové struktuře (elektronové hustotě) v atomárním rozlišení a není přitom omezená velikostí studované částice. Princip rentgenové strukturní analýzy je založen na interakci koherentního monochromatického rentgenového paprsku o vlnové délce blízké hodnotě 1 Å s krystalem studované biomakromolekuly. Rentgenové záření je rozptylováno elektrony pravidelně uspořádaných molekul v krystalové mříži. Rozptýlená vlna poskytuje informaci o elektronové hustotě v krystalu, tedy o struktuře dané molekuly. Přitom s rozptylovým úhlem roste jemnost vzorkování základní buňky krystalu respektive rozlišení, ale zároveň klesá intenzita rozptylu elektromagnetického záření. Právě díky pravidelnému uspořádání velkého množství stejných molekul v krystalu jsou konstruktivně

se skládající rozptylované vlny zesilovány rozptylem na pravidelně se opakujících elektronových hustotách stejného charakteru. Krystal biomakromolekuly tedy funguje jako zesilovač konstruktivně se skládajícího rozptylu rentgenového záření, které je zachyceno snímačem jako tzv. difrakční reflexe. Z toho také vyplývá, že flexibilní nebo neuspořádané části biomakromolekuly nejsou pomocí rentgenové strukturní analýzy „viditelné“.

Hlavním úskalím této metody je ale potřeba difraktujícího monokrystalu studované částice. Pěstování a růst proteinových monokrystalů je totiž většinou náročná záležitost. Klasický postup zahrnuje vytvoření 100 nl – 2 μ l krystalizační kapky smícháním velice čistého proteinového preparátu se srážedlem nebo chemickým aditivem. Krystalizační kapka pak v prostředí kontrolované difuze vysychá – a tím se zvýší koncentrace biomakromolekuly i srážedla. Pakliže jsou chemicko-fyzikální vlastnosti prostředí (pH, teplota, gravitační pole, chemické látky, atd.) právě správné dojde k vytvoření nukleačního zárodku a pomalému růstu proteinového monokrystalu. Protože pro úspěšnou krystalizaci některých proteinů je zapotřebí vyzkoušet až několik tisíc krystalizačních podmínek, rozvíjí se v poslední době automatizace tohoto procesu pomocí robotů, kteří jsou schopni nasazovat krystalizační kapky přesně i ve velmi malých objemech. Přesto je třeba podotknout, že některé proteiny mají tendenci krystalizovat takřka samy a jiné jsou prakticky nekrystalizovatelné.

Jako zdroj intenzivního monochromatického rentgenového záření se využívají synchrotronové urychlovače částic. Na postupně se otáčející krystal dopadá svazek záření, dochází k jeho rozptylu a poloha rozptýlených paprsků záření je následně v pravidelných časových intervalech snímána plošným detektorem. Výsledkem je soubor difrakčních dat, který ale obsahuje pouze informaci o intenzitě dopadajících rozptýlených vln záření, informace o jejich fázi chybí. Přitom fázová informace rozptýlené vlny má větší informační hodnotu. Tomuto druhému úskalí rentgenové strukturní analýzy říkáme fázový problém. Existuje několik přístupů, jak tento problém řešit. Technika molekulárního nahrazení vychází z již vyřešené prostorové struktury homologního proteinu, který je použit jako model pro hledání uspořádání molekul uvnitř základní buňky krystalu tak, aby to nejlépe vyhovovalo naměřenému souboru difrakčních dat. Takto získané fáze jsou pak užity k vygenerování mapy elektronových hustot respektive prostorové struktury biomakromolekuly.

Pokud není k dispozici prostorová struktura homologního proteinu můžeme zvolit techniku vícečetného isomorfního nahrazení, která spočívá v kokrystalizaci

biomakromolekuly s elektronově bohatým těžkým kovem, nejčastěji Hg^{2+} . Pakliže získáme krystal stejné symetrie základní buňky můžeme porovnáním difrakčního souboru dat původního a o těžký kov obohaceného krystalu určit pozici tohoto atomu v základní buňce. To pak poskytuje základ k výpočtu fází v celé základní buňce. Tento přístup k řešení fázového problému bývá vytlačován technikou anomálního rozptylu.

Anomální rozptyl nejčastěji spočívá v krystalizaci proteinu, ve kterém je methionin nahrazen selenomethioninem. Takový krystal je ozařován rentgenovým paprskem o vlnové délce blízké energii absorpční hrany selenu. Absorbované fotony jsou následně hned emitovány se stejnou energií, což způsobí fázové opoždění vzhledem k fotonům, které jsou rozptylovány normálně. Anomální rozptyl tak způsobí malé ale měřitelné rozdíly mezi centrosymetrickými reflexemi, z kterých lze fáze dopočítat.

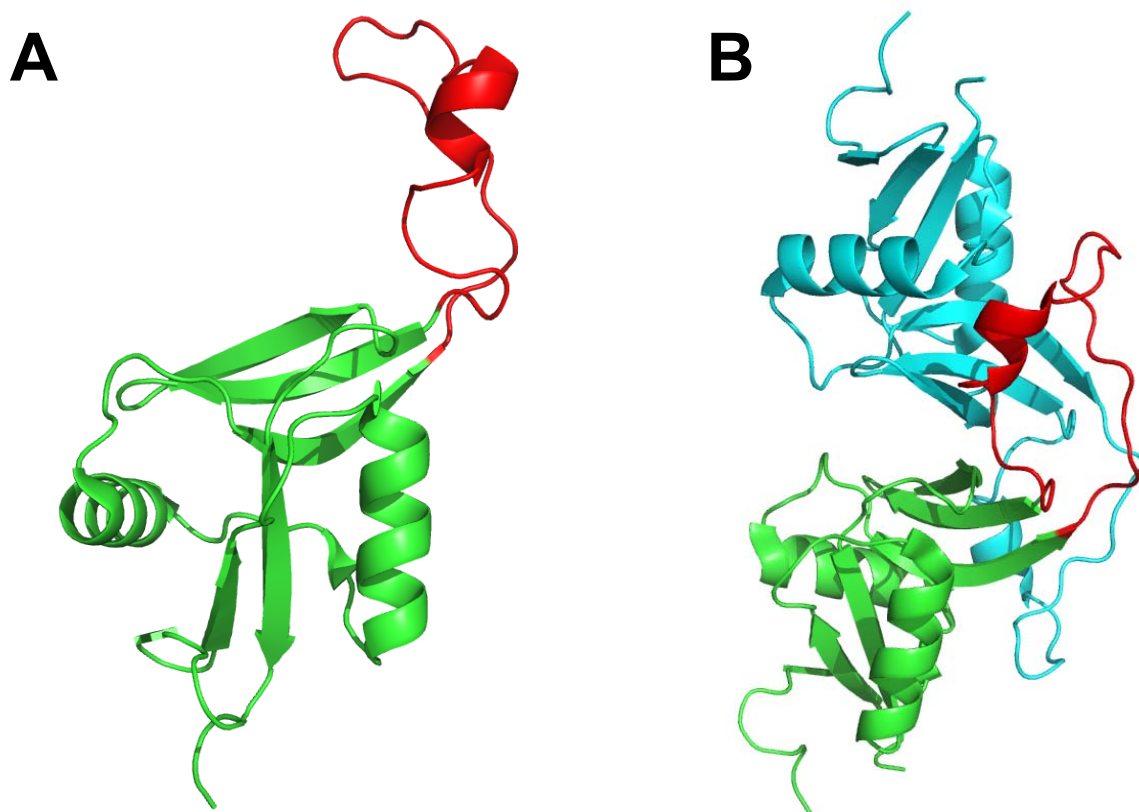
Naměřený soubor difrakčních dat s vyřešeným fázovým problémem je pomocí Fourierovy transformace převeden do mapy elektronové hustoty. Následuje iterativní modelování polypeptidového řetězce a vylepšování vypočítaných fází dokud není shoda mezi difrakčními daty a modelem maximalizována.

Vyřešená krystalová struktura sice neposkytuje pohled na zkoumanou částici v roztoku, je však třeba si uvědomit, že proteinové krystaly bývají vyplněny typicky ze 40-80% vodou. Na mnoha příkladech bylo také ukázáno, že mezi prostorovými strukturami získanými přístupem NMR a rentgenové strukturní analýzy není rozdíl. Přesto se může stát, že stabilizující krystalografické kontakty mezi molekulami v krystalové mřížce způsobí vznik strukturních artefaktů (viz. Obr. 5, str. 17). Samozřejmě není vhodné spoléhat se na jeden informační zdroj, technika rentgenové strukturní analýzy bývá proto doplňována kryoelektronovou mikroskopií nebo stále častěji hmotnostní spektrometrií [61].

2.2.2. Hmotnostní spektrometrie

S rozvojem měkkých ionizačních technik – ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) a velice citlivých a přesných detektorů získala hmotnostní spektrometrie své nezastupitelné místo v charakterizaci proteinů. Hmotnostní spektrometrie dnes již prakticky vytlačila proteinové sekvenátory na bázi Edmanova odbourávání aminokyselin. Může nám poskytnout informaci o intaktní glykosylované hmotnosti proteinu. Pomocí měření přesných hmotností (m/z) cystických peptidů můžeme mapovat disulfidové spojení mezi konkrétními cysteiny proteinu nebo lokalizaci posttranslačních modifikací (glykosylace, fosforylace, atd.)

Moderní přístupy hmotnostní spektrometrie mohou sloužit jako doplňkové metody k rentgenové strukturní analýze v případech sporných otázek strukturních artefaktů způsobených krystalografickými kontakty [62]. Jedná se především o metodu chemického síťování a vodíkovo/deuteriovou výměnu (dále jen H/D výměna). Příkladem může být nedávno vyřešená struktura NKRP1A receptoru myších NK buněk [63]. Krystalografická struktura poskytla sice očekávanou CTLD doménu, ale jedna ze smyček na povrchu domény (tzv. „long loop region“) byla extendována do prostoru a stabilizována krystalografickým kontaktem se stejnou smyčkou sousední molekuly. Protože ale neexistuje jiná vyřešená struktura homologního receptoru rodiny NKRP1, nebylo úplně jasné zda se v této formě myší receptor NKRP1A nachází i v roztoku. Tuto otázku pomohla zodpovědět hmotnostní spektrometrie pomocí dvou výše zmíněných přístupů (viz. Obr. 6, str. 19) [61].

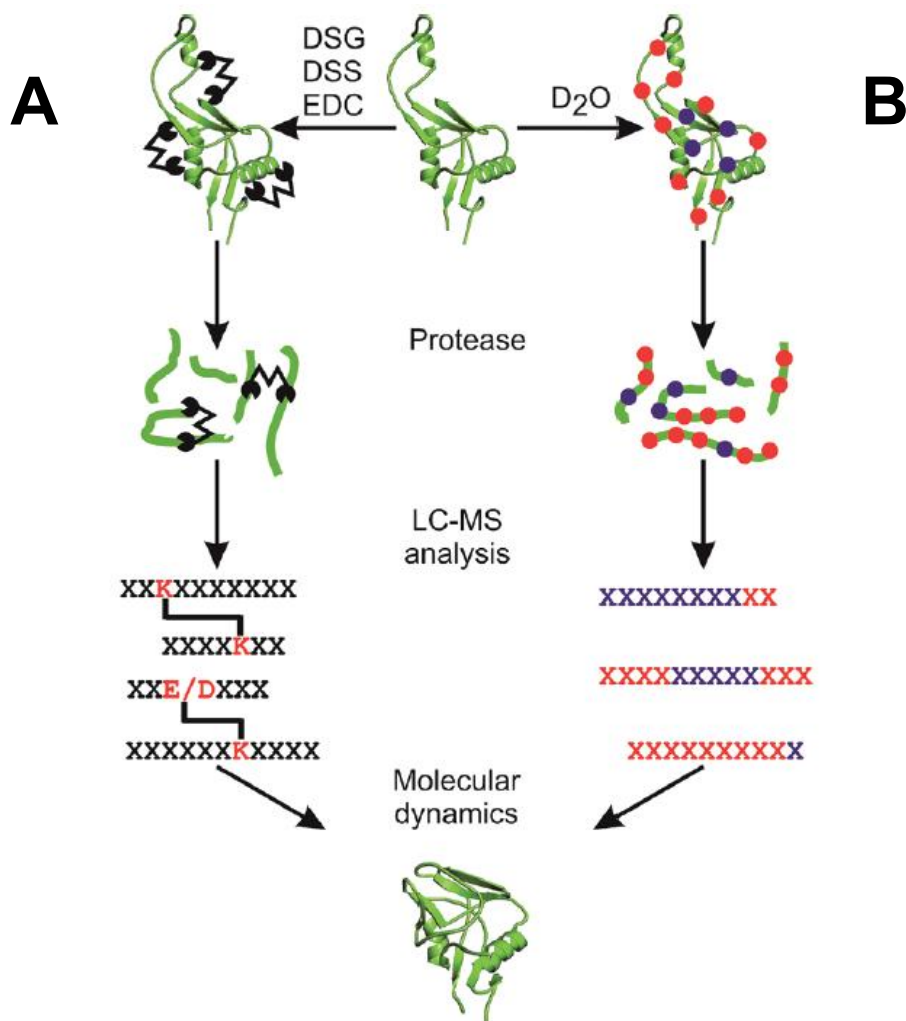


Obr. 5: Krystalografický model myšího NKRP1A. Panel A ukazuje prostorový model vytvořený na základě rentgenové strukturní analýzy krystalů myšího NKRP1A. Model je obarven **zelenou**, **červeně** je vyznačena dlouhá smyčka, která je extendována do prostoru. **Panel B** ukazuje uspořádání dvou blízkých molekul mNRP1A v základní buňce krystalu, je patrný krystalografický kontakt tvořený překryvem dvou sousedních smyček. Barvení je stejné jako u panelu A, druhá molekula myšího NKRP1A je vybarvena **světle modrou** [63, PDB: 3M9Z].

Princip přístupu chemického síťování („cross-linking“) spočívá ve vytvoření kovalentní vazby mezi dvěma prostorově blízkými aminokyselinami a to buď intra- nebo intermolekulárně. Síťovací činidlo je schopné spojit jen ty aminokyselinové zbytky, které jsou od sebe vzdáleny na délku raménka bifunkčního síťovacího činidla, které může být homo- i heterofunkční. Dělíme je hlavně podle selektivní reaktivity funkčních skupin s aminokyselinami. Pro strukturní studie je vhodné užívat pouze produkty s jedním nebo dvěma navázanými síťovacími činidly. Produkty jsou elektroforeticky separovány a pomocí peptidasy hydrolyzovány na peptidy. Porovnáním hmotností změřených hmotnostním spektrometrem s hmotnostmi teoretickými (vypočtenými ze známé aminokyselinové sekvence proteinu) můžeme nalézt peptidy spojené síťovacím činidlem a stanovit tak minimální vzdálenost dvou konkrétních aminokyselin [64,65,66].

Hmotnostní spektrometrie s využitím H/D výměny poskytuje informaci o lokální přístupnosti rozpouštědla k aminokyselinám polypeptidového řetězce. Lze tak studovat proteinovou dynamiku, resp. vztah struktury a funkce. Princip spočívá v rychlé výměně amidických vodíků za deuterium v rozpouštědle bohatém na deuterovanou vodu. Výměna se dá výrazně ovlivnit teplotou a pH, k nejpomalejší výměně dochází za nízkých teplot a pH zhruba 2,5. Tato výměna se pak projeví jako změna hmotnosti (m/z) měřených peptidů a na základě porovnání řady vzorků s různou inkubační dobou v deuterovaném rozpouštědle můžeme identifikovat rozpouštědlu přístupnější či více flexibilní části polypeptidového řetězce [67].

V našem příkladu myšního receptoru NK buněk NKRP1A bylo nakonec pomocí porovnání vzdálenostních restrikcí chemického síťování s krystalografickým modelem a porovnáním H/D výměny přirozeného myšního NKRP1A receptoru s jeho mutovanou formou neobsahující diskutovanou smyčku zjištěno, že „dlouhá smyčka“ není v roztoku narozdíl od krystalu extendována do prostoru, ale „připažena“ ke globulární doméně (viz. Obr. 6, str. 19) [61].



Obr. 6: Moderní přístupy hmotnostní spektrometrie. Panel A ukazuje pracovní schéma chemického zesílení. Se vzorkem nejprve reaguje zvolené síťovací činidlo, následuje hydrolyza vzorku peptidasou, LC-MS analýza a porovnání naměřených a teoretických hmotností *in silico*. **Panel B** ukazuje přístup H/D výměny. Vzorek je nejprve deuterován v rozpouštědle bohatém na D₂O, výměna je zpomalena zchlazením nebo úpravou pH, následuje hydrolyza vzorku peptidasou, LC-MS analýza a vyhodnocení *in silico*. Poslední část zahrnuje interpretaci naměřeného ve vztahu k známé prostorové struktuře vzorku [61].

3. Cíle práce

- příprava extracelulární části receptoru LLT1 rekombinantní expresí v HEK293 buňkách
- purifikace a charakterizace připraveného proteinu
- krystalizace připraveného proteinu

4. Materiál

4.1. Přístroje a pomůcky

- Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad *New Brunswick Scientific, USA*
- 4-12% NuPAGE Bis-Tris gradient gel *Invitrogen, USA*
- Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I *Beckman Coulter, USA*
- Analytické váhy *AND, USA*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga 5415 R *Eppendorf, Německo*
- Centrifuga Allegra X-22R *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga Spectrofuge 16M *Edison, USA*
- Centrifuga Universal 320 R *Hettich, Německo*
- Centrifugační zkumavky Oak Ridge *Sigma-Aldrich, USA*
- Filtry pro sterilizaci 0,22 µm *TPP, Švýcarsko*
- Filtry PVDF 0,22 µm, 45 mm průměr *Sigma-Aldrich, USA*
- Fotoaparát Olympus SP-500 UZ *Olympus, Japonsko*
- Hemocytometr *Sigma-Aldrich, USA*
- High speed plasmid mini kit *Geneaid, Německo*
- Hmotnostní spektrometr Apex-Ultra *Bruker Daltonics, USA*
- HPLC systém ÄKTAbasic *Amersham Biosciences, Švédsko*
- Inkubátor CO₂ MC0-18AIC *Sanyo, UK*
- Inkubátor IR 1500 *LABsystem Praha, ČR*
- JETQUICK Gel Extraction Spin Kit *Genomed, Německo*
- Kahan Fuego SCS *WLD-TEC, Německo*
- Kolona Magic C18AQ (0,02 x 15 cm) *Michrom Bioresources, USA*
- Kolona s fritou Econo-column *Bio-Rad, Německo*
- Kolona Superdex 200 10/300 GL (1 x 30 cm) *Amersham Biosciences, Švédsko*
- Koncentrátory Amicon Ultra *Millipore, USA*
- Krystalizační deska EasyXtal *QIAGEN, Německo*
- Krystalizační destička CrystalQuick™ *Greiner, Německo*

- Krystalizační destička Intelli-Plate 96 *Art Robbins Instruments, USA*
- Krystalizační robot Crystal Gryphon *Art Robbins Instruments, USA*
- Krystalizační robot Hydra 96 *Art Robbins Instruments, USA*
- Krystalografické smyčky typu SPINE *MiTeGen, USA*
- Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky *P-LAB, ČR*
- Laminární box BIO 126 *LABOX, ČR*
- Laminární box Clean Air *PMV, Nizozemí*
- Magnetická míchačka MM 2A *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- Mikrokolonka MicroTrap (0,1 x 0,8 cm) *Michrom Bioresources, USA*
- Mikroskop inverzní *Intraco Micro, ČR*
- Mikroskop SZX2 *Olympus, Japonsko*
- Mrazicí box (-20°C) *Zanussi, Itálie*
- Mrazicí box (-80°C) MDF-U53V *Sanyo, Japonsko*
- Mrazicí kontejner Mr. Frosty *Sigma, USA*
- Nosič pro IMAC chromatografii Talon *Clontech, USA*
- PCR tepelný cyklátor *Eppendorf, Německo*
- pH metr Φ 240 *Beckman, USA*
- Pipetovací nástavec Biohit midi plus *Biohit, USA*
- Pipetovací robot Cartesian *Genomic Solutions, USA*
- Plastik pro tkáňové kultury *TPP, Švýcarsko*
- Předvážky KERN 1200-2 *AND, USA*
- PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit *Invitrogen, USA*
- Rotační vakuová odparka *Trigon, Francie*
- Sonikační lázeň *Bandelin, Německo*
- Souprava pro agarosovou elektroforézu *Sigma, USA*
- Souprava pro filtraci za sníženého tlaku *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro SDS-PAGE *Bio-Rad, Německo*
- Souprava pro SDS-PAGE *Invitrogen, USA*
- Spektrofotometr NanoVue Plus *GE Healthcare, USA*

▪ Spektrofotometr UNICAM UV4-100	<i>Beckman, USA</i>
▪ Termostat VLM LS 1	<i>VLM, Německo</i>
▪ Třepačka Orbit 1000	<i>Labnet, USA</i>
▪ Třepačka Orbi-safe TS NetWise	<i>Schöeller, Německo</i>
▪ UV prosvěcovací lampa	<i>UltraLum, USA</i>
▪ Vialky se septem	<i>Agilent, USA</i>
▪ Vodní lázeň	<i>Memmert, Německo</i>
▪ Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
▪ Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>
▪ Zdroj napětí PowerPac	<i>BioRad, Německo</i>
▪ Zdroj napětí PS 251-2	<i>Tesla, ČR</i>
▪ μ HPLC systém Agilent 1200	<i>Agilent, USA</i>

4.2. Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly minimálně čistoty p.a.

▪ 4-Ethylmorfolin	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ Acetonitril (LC-MS čistoty)	<i>Merck, Německo</i>
▪ Agar	<i>Oxoid, Anglie</i>
▪ Agarosa	<i>Sigma, USA</i>
▪ Akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
▪ Ampicilin	<i>Biotika, SR</i>
▪ APS	<i>Serva, USA</i>
▪ Azid sodný	<i>Serva, USA</i>
▪ Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
▪ BSA	<i>New England Biolabs, USA</i>
▪ Citronan sodný neutrální	<i>Lachema, ČR</i>
▪ Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, USA</i>
▪ Crystal Screen HT	<i>Hampton Research, USA</i>
▪ Cystamin	<i>Sigma, USA</i>
▪ Činidlo dle Bradfordové	<i>Bio-Rad, Německo</i>
▪ DMSO	<i>Sigma, USA</i>

▪ dNTP	<i>Top-Bio, ČR</i>
▪ DTT	<i>Serva, USA</i>
▪ EDTA	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
▪ Emerald Wizard Classic 1 a 2	<i>Emerald Biosystems, USA</i>
▪ Ethidium bromid	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
▪ ExCELL293 médium	<i>Sigma, USA</i>
▪ Glycerol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ Glycin	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ Grid Screen PEG 6000	<i>Hampton Research, USA</i>
▪ IAA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ Index HT	<i>Hampton Research, USA</i>
▪ IPA (LC-MS čistoty)	<i>Merck, Německo</i>
▪ JCSG+ Suite	<i>QIAGEN, Německo</i>
▪ Kvasničný extrakt	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
▪ Kyselina fosforečná	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ Kyselina mravenčí (LC-MS čistoty)	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ Kyselina octová (LC-MS čistoty)	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
▪ L-glutamin	<i>Sigma, USA</i>
▪ MgSO ₄	<i>Lach-Ner, ČR</i>
▪ N,N'-metylen-bis-akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
▪ PACTpremier	<i>Molecular Dimensions, UK</i>
▪ PCR pufr ThermoPol	<i>New England Biolabs, USA</i>
▪ PEG 300	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
▪ PEG/Ion HT	<i>Hampton Research, USA</i>
▪ PEGRx HT	<i>Hampton Research, USA</i>
▪ PEI 25 kDa lineární (IPEI)	<i>Polysciences, USA</i>
▪ Pluronic F-68	<i>Sigma, USA</i>
▪ PPP master mix	<i>Top-Bio, ČR</i>
▪ Pufr NEB1	<i>New England Biolabs, USA</i>
▪ Pufr pro T4 DNA ligasu	<i>Fermentas, Kanada</i>
▪ SaltRx HT	<i>Hampton Research, USA</i>
▪ SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
▪ Standard pro agarosovou elektroforézu	<i>Ascoprot Biotech, ČR</i>

- Standard pro SDS PAGE *Fermentas, Kanada*
- Standard pro SDS PAGE *Invitrogen, USA*
- TEMED *Serva, USA*
- TFA *Fluka, Švýcarsko*
- Tris *Sigma, USA*
- Trypanová modř *Sigma, USA*
- Trypton *Oxoid, Anglie*
- Tween 20 *Sigma, USA*
- Ostatní běžné chemikálie: *Lach-Ner, ČR*

4.3. Enzymy

- AgeI *New England Biolabs, USA*
- AspN *Roche, Německo*
- Deep Vent DNA polymerasa *New England Biolabs, USA*
- ENDO Hf *New England Biolabs, USA*
- KpnI *New England Biolabs, USA*
- RNasa A *Serva, USA*
- T4 DNA ligasa *New England Biolabs, USA*
- Trypsin *Promega, USA*

4.4. Bakteriální kmeny a buněčné linie

- E. Coli DH5α *Marek Ingr, Praha, ČR*
- HEK293T *A. Radu Aricescu, Oxford, Velká Británie*
- HEK293-6E *Y. Durocher, Montreal, Kanada*
- HEK293S GnTI- *CRL-3022, ATCC, USA*

4.5. Vektory

- pHLsec *A. Radu Aricescu, Oxford, Velká Británie*
- pTT28 *Y. Durocher, Montreal, Kanada*

4.6. Oligonukleotidy pro PCR

- **L2_Q72_FW**
5' AAAAAAACCGGTCAAGCTGCATGCCAGAAAGC 3'
- **L2_V191_REV**
5' AAAAAAGGTACCGACATGTATATCTGATTTGGAACAAATC 3'
- **pTT_FW**
5' TGATATTCACCTGGCCCGATCTG 3'
- **pTT_REV**
5' TATGTCCTTCCGAGTGAGAG 3'
- **L2_C163S_FW**
5' GAGCAGGAGAGTCTGCCTATTTGAA 3'
- **L2_C163_REV**
5' TTCAAATAGGCAGACTCTCCTGCTC 3'
- **L2_H176C_FW**
5' GTAGTGCCAGGTGCTACACAGAGAG 3'
- **L2_H176C_REV**
5' CTCTCTGTGTAGCACCTGGCACTAC 3'

4.7. Roztoky a média

4.7.1. Pufry a jiné roztoky

- **AA:** 30% akrylamid, 1% N,N'-metylen-bis-akrylamid
- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% CBB R-250
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE – 10× koncentrovaný:** 3% Tris, 14,4% glycin, 1% SDS, pH 8,3
- **LB agar:** 1,5% agar v LB médiu
- **LB médium:** 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4; použité koncentrace antibiotik: ampicilin 100 µg/ml (zásobní koncentrace 100 mg/ml)
- **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35% ethanol, 10% kyselina octová
- **PBS pufr:** 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,0
- **PBS pufr s imidazolem:** 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 250 mM imidazol, pH 7,0

- **PBS-TK pufr:** 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,0
- **Pufr pro agarosovou elektroforézu** – TAE pufr, 1× koncentrovaný: 40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA, pH 8,3
- **Pufr pro gelovou chromatografii:** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5
- **Roztok IPEI:** 1 mg/ml IPEI, pH 7,0
- **Stop roztok:** 30% glycerol, bromfenolová modř, TE pufr
- **TE pufr:** 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH 8,0
- **TES pufr:** 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 8,0
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující** – 2× koncentrovaný: 100 mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, pH 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující** – 2× koncentrovaný: 100 mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, 100 mM DTT, pH 6,8

4.7.2. PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit

- **Roztok R3:** 50 mM Tris-HCl, 100 µg/ml RNAsa A, pH 8,0
- **Roztok L7:** 0,2 M NaOH, 1% SDS
- **Roztok N3:** 3,1 M octan draselný, pH 5,5
- **Roztok EQ1:** 0,1 M octan sodný, 0,6 M NaCl, 0,15% Triton X-100, pH 5,0
- **Roztok W8:** 0,1 M octan sodný, 825 mM NaCl, pH 5,0
- **Roztok E4:** 100 mM Tris-HCl, 1,25 M NaCl, pH 8,5

4.7.3. Kultivační média

- **ExCELL293 médium:** zakoupeno hotové médium (*Sigma*, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsledná koncentrace 4 mM)
- **F17 médium:** zakoupeno hotové médium (*Gibco Invitrogen*, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsledná koncentrace 4 mM) a o Pluronic F-68 (výsledná koncentrace 0,1%)

5. Metody

5.1. Práce s DNA [68]

5.1.1. Příprava inzertu a linearizovaného vektoru

Pro přípravu inzertu nebo linearizovaného vektoru bylo použito zásobní množství daného plasmidu s požadovaným inzertem. Standardně bylo do 1,5 ml mikrozkušavky pipetováno cca 4 μg plasmidu rozpuštěného v ddH₂O. K odebranému roztoku plasmidu byly přidány 2 μl 10 \times koncentrovaného NEB1 pufru a 2 μl BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Výsledný roztok byl doplněn ddH₂O na 19 μl a následně bylo přidáno 0,5 μl enzymu AgeI a 0,5 μl enzymu KpnI. Směs byla promíchána a ponechána inkubovat 1 h při 37°C. Poté byly ke směsi přidány 2 μl stop roztoku a po promíchání byla provedena elektroforetická separace na agarosovém gelu.

5.1.2. Agarosová elektroforéza

Gel pro agarosovou elektroforézu byl připraven z 0,6 g agarosy a 60 ml TAE pufru. Agarosa byla rozpuštěna krátkým povařením v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí roztoku na zhruba 50°C bylo přidáno 60 μl ethidium bromidu (0,5 mg/ml). Gel byl ponechán ztuhnout ve vaničce aparatury s hřebenem a následně byl vložen do elektroforetické aparatury s TAE puftrem. Do jamek byly pipetovány vzorky obsahující vždy jednu desetinu objemu stop roztoku a do jedné dráhy standard. Elektroforéza byla ponechána probíhat 30 až 45 min při 110 V. K vizualizaci DNA byla využita fluorescence komplexu DNA s interkalovaným ethidium bromidem po ozáření UV lampou při vlnové délce 312 nm. V případě preparativní agarosové elektroforézy byl gel ozařován UV lampou jen po nezbytně nutnou minimální dobu. Část gelu obsahující dobře separovaný vzorek DNA o předpokládané velikosti byla vyříznuta a přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky. Vzorek DNA byl standardně ihned z gelu extrahován (viz. 5.1.3.), nebo v něm uchován při -20°C.

5.1.3. Extrakce DNA z agarosového gelu

Extrakce DNA z agarosového gelu byla provedena pomocí soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit podle návodu výrobce [69]. K vyříznutému kousku gelu bylo přidáno 300 μl roztoku L1 na každých 100 mg gelu. Následovala inkubace při 50°C po dobu 15 min, přičemž byl vzorek každé 3 min promíchán. Vzorek byl pipetován na kolonku vloženou do mikrozkušavky a centrifugován při 13000 \times g, 1 min. Pakliže

hmotnost gelu přesáhla 300 mg byla kolonka promyta 300 μ l roztoku L1. Kolonka byla následně promyta 500 μ l roztoku L2, poté opět následovala centrifugace při 13000 \times g, 1 min, která byla opakována ještě jednou pro odstranění všech zbytků roztoku L2. Plasmidová DNA byla eluována 50 μ l ddH₂O zahřáté na 65°C odstředěním při 13000 \times g, 2 min.

5.1.4. Ligace štěpeného inzertu do linearizovaného vektoru

Ligační směs byla standardně připravována tak, aby objemový poměr štěpeného inzertu a linearizovaného vektoru odpovídal zhruba 3 až 6-ti násobnému molárnímu přebytku inzertu vůči vektoru. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky na spektrofotometru NanoVue Plus. Ligační směs byla připravována např. smícháním 8 μ l ddH₂O, 2 μ l pufru pro T4 DNA ligasu (10 \times koncentrovaný), 1 μ l T4 DNA ligasy, 2 μ l linearizovaného plasmidu a 8 μ l inzertu v 1,5 ml mikrozkušavce. Směs byla ponechána 30 minut při laboratorní teplotě nebo ve vodní lázni při 25°C.

5.1.5. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

Kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5 α byly připravovány z původních alikvotů zakoupených od NEB nebo rozpěstováním již dříve připravených alikvotů kompetentních buněk standardně následujícím postupem. Jeden alikvot kompetentních buněk byl pipetován do 2 \times 50 ml sterilního LB média v 2 \times 500 ml Erlenmeyerově baňce. Bakteriální suspenze byly třepány v termostátované třepačce při 37°C a 220 ot./min, dokud optická denzita při 600 nm nedosáhla hodnoty mezi 0,3 až 0,5. Suspenze byly poté přeneseny do dvou 50 ml polypropylenových zkumavek na ledu a nechány 10 min inkubovat, poté byly centrifugovány při 1500 \times g, 10 min, 4°C. Supernatant byl slit a zkumavky se nechaly 1 min v obrácené poloze pro odstranění zbytků LB média. Ke každé peletě bylo přidáno 10 ml předchlazeného (0°C) roztoku 100 mM CaCl₂, peleta byla resuspendována a nechána stát 10 min na ledu. Suspenze byly opět centrifugovány při 1500 \times g, 10 min, 4°C. Poté byl supernatant slit a zkumavky se opět nechaly 1 min v obrácené poloze. Ke každé peletě byly následně přidány 2 ml předchlazeného roztoku 100 mM CaCl₂ a peleta byla resuspendována vychlazenou pipetovací špičkou. Suspenze se nechala stát 20 min na ledu. Poté bylo do každé zkumavky přidáno po 2 ml sterilního 50% glycerolu. Výsledné roztoky byly rozděleny po 200 μ l alikvotech do 1,5 ml mikrozkušavek a skladovány při -80°C.

5.1.6. Transformace kompetentních buněk *E. coli* tepelným šokem

Alikvot(y) kompetentních buněk *E. coli* DH5 α byl ponechán roztát na ledu. K ligační směsi nebo roztoku izolovaného plasmidu (maximálně 1 μ g DNA) v 1,5 ml mikrozkuhavce bylo přidáno 50 μ l suspenze kompetentních buněk. Směs byla ponechána 30 min na ledu, poté byla na 1 min umístěna do vodní lázně předehřáté na teplotu 42°C a ihned přenesena zpět na led. Do zkuhavky byl poté přidán 1 ml na 37°C předehřátého LB média, zkuhavka několikerým obrácením promíchána a ponechána inkubovat 1 hod při 37°C. Směs byla následně centrifugována při 1500 \times g, 5 min, většina supernatantu byla slita. Bakteriální peleta byla resuspendována ve zbytku supernatantnu (cca 100 μ l) a rozetřena na LB agar s patřičným antibiotikem (100 μ g/ml ampicilin) na Petriho misce. Bakterie byly inkubovány přes noc (cca 16 hod) při 37°C. Misky s vyrostlými koloniemi byly uchovávány v ledničce při 4°C.

5.1.7. PCR z kolonií

Pro selekci pozitivních klonů byl užíván postup tzv. PCR z kolonií. Vybraná bakteriální kolonie byla dotykem nasáta do 20 μ l pipetovací špičky a resuspendována v 6 μ l ddH₂O v 0,2 ml PCR mikrozkuhavce. Stejnou špičkou bylo zaočkováno 5 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) v 50 ml polypropylenové zkuhavce, která byla nechána třepat v termostatované třepačce při 37°C, 220 ot./min, 15 h, teplota se poté za stálého třepání snížila na 4°C. K suspenzi v PCR zkuhavce byly následně přidány 2 μ l 5 μ M přímého primeru daného inzertu a 2 μ l 5 μ M reverzního sekvenačního primeru pro daný vektor (takto je ověřena nejenom přítomnost inzertu, ale i jeho správná orientace). Dále bylo přidáno 10 μ l 2 \times koncentrované PPP PCR reakční směsi. Směs byla lehce promíchána a krátce centrifugována. Zkuhavky byly umístěny do tepelného cyklátoru s programem:

- A. 5 min - 94°C
- B. 20 cyklů: 30 s - 94°C; 30 s - 52°C; 1 min - 72°C
- C. 10 min - 72°C

Teplota v cyklátoru se poté snížila na 4°C. Výsledný PCR produkt byl analyzován pomocí agarosové elektroforézy.

5.1.8. Nízkoobjemová příprava plasmidové DNA

Pro nízkoobjemovou přípravu plasmidové DNA bylo použito vždy 5 ml bakteriální kultury *E. coli* DH5 α transformované daným plasmidem nebo ligační směsí. Kultura byla

inkubována za stálého třepání v termostatované třepačce při 37°C, 220 ot./min, 15 h, teplota se poté snížila na 4°C. Plasmidová DNA byla z takové kultury izolována pomocí komerčně dostupné soupravy High-Speed Plasmid Mini Kit podle návodu výrobce [70]. Pro eluci plasmidové DNA bylo přímo na matici kolonky pipetováno 50 µl ddH₂O předeřtáté na 65°C, po 2 min byla kolonka umístěna do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, následovala centrifugace při 15000× g, 2 min. Koncentrace a kvalita izolované plasmidové DNA byla ověřena na spektrofotometru NanoVue Plus a případně sekvenací DNA.

5.1.9. Sekvenování DNA

Sekvenaci plasmidové DNA prováděla Laboratoř sekvenace DNA (*Centrum servisních laboratoří biologické sekce*, PřF UK) pomocí automatického sekvenátoru 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, USA) nebo 3130xl Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, USA). Vzorky byly připravovány do 0,2 ml PCR mikrozkušavek smícháním 10 ng plasmidové DNA na každých 100 bp sekvenované oblasti (plasmidová DNA byla rozpuštěna v ddH₂O, koncentrace byla stanovena na spektrofotometru NanoVue Plus) a 1 µl 5 µM roztoku buď přímého, anebo reverzního sekvenačního primeru. Roztok byl zředěn ddH₂O na 14 µl.

5.1.10. Velkoobjemová příprava plasmidové DNA

Kompetentní buňky *E. coli* DH5α transformované daným plasmidem (viz. 5.1.6.) byly inkubovány 16 hod při 37°C. Poté bylo na každou Petriho misku s bakteriálními koloniemi pipetováno 5 ml LB média, v němž byly bakterie resuspendovány a následně převedeny do 0,5 l LB média s patřičným antibiotikem ve 2 l sterilní Erlenmeyerově baňce. Kultury byly třepány v termostatované třepačce při 37°C, 220 ot./min, po dobu 12 hod a poté byly až do dalšího zpracování uchovány při 4°C. Následovalo odstředění kultur při 4000× g, 20 min, 4°C. Pelety byly resuspendovány v 20 ml TES pufru a rozděleny do dvou 30 ml polypropylenových zkumavek a centrifugovány při 16000× g, 20 min, 4°C. Supernatant byl slit a pelety byly dále ihned zpracovány anebo skladovány při -20°C.

Pro izolaci plasmidové DNA bylo využito komerčně dostupné soupravy PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit s pomocí upraveného postupu výrobce. Peleta v 30 ml polypropylenové zkumavce byla resuspendována v 9 ml kompletního roztoku R3, bylo přidáno 9 ml roztoku L7 a směs byla opatrně promíchána otočením zkumavky 10×. Po 5 min inkubaci bylo přidáno 9 ml roztoku N3 a směs byla opatrně

promíchána otočením zkumavky 10×. Směs byla centrifugována při 19000× g, 10 min při 20°C. Při nedostatečném oddělení supernatantu od sraženiny byla centrifugace opakována. Supernatant byl nanesen na kolonu ekvilibrovanou 30 ml roztoku EQ1. Následovalo promytí 2× 30 ml roztoku W8 a poté eluce 15 ml roztoku E4 do čisté 30 ml polypropylenové zkumavky. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml IPA a směs byla důkladně protřepána a centrifugována při 19000× g, 30 min, 0°C. Supernatant byl opatrně slit a peleta byla opláchnuta 5 ml 70% (v/v) ethanolu. Následovala centrifugace při 19000× g, 5 min, 0°C. Supernatant byl opatrně odstraněn, peleta byla dosušena ve vakuové odparce a následně rozpuštěna v 1 ml ddH₂O.

Kolony dodávané s tímto komerčním kitem byly běžně recyklovány pro opakované použití. Ihned po eluci DNA byly promyty 1 M HCl a skladovány v 1 M HCl při 4°C. Před použitím byly kolony důkladně promyty ddH₂O dokud nebylo pH eluátu neutrální, poté byly ekvilibrovány 30 ml roztoku EQ1. Všechny potřebné roztoky byly standardně připravovány podle složení deklarovaného výrobcem (viz. 4.7.2.) a před použitím filtrovány přes 0,22 µm PVDF filtr [71].

5.1.11. Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace a čistota DNA byly stanoveny spektrofotometricky. V případě velkoobjemové přípravy plasmidové DNA byla změřena absorbance roztoku 300× zředěného ddH₂O při vlnové délce 260 a 280 nm. V případě nízkých koncentrací DNA z nízkoobjemové přípravy plasmidové DNA, naštěpených inzertů nebo linearizovaných vektorů byl neředěný roztok měřen na spektrofotometru NanoVue Plus. Koncentrace DNA byla vypočítána z empirického vztahu, podle kterého má roztok dvouvláknové DNA o koncentraci 50 µg/ml absorbanci rovnou 1. Poměr A_{260}/A_{280} je u čisté DNA roven přibližně 1,8 a čistota připravené DNA se obvykle pohybovala kolem této hodnoty. Pro transfekci však byla s úspěchem použita i DNA s poměrem A_{260}/A_{280} pouze 1,5.

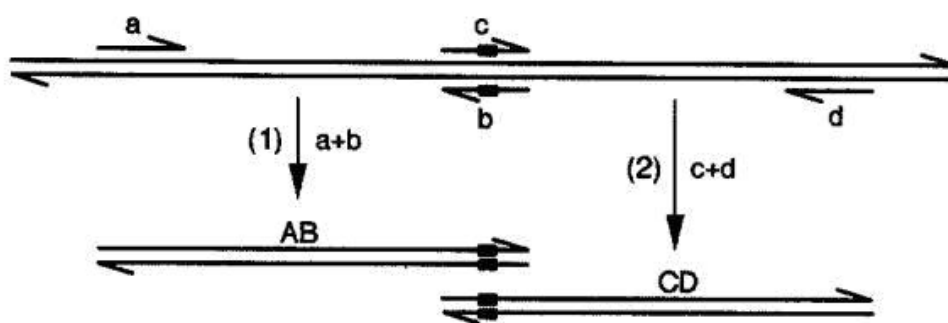
5.1.12. Cílená mutagenese

Pro cílenou mutaci aminokyseliny v sekvenci daného konstruktu bylo použito metody PCR s prodlužováním přesahujících úseků (overlap extension PCR; OE PCR), která zahrnuje použití dvou po sobě následujících PCR reakcí [72]. Nejprve byly navrženy sekvenčně komplementární oligonukleotidy (dále jen mutační primery) tak, aby byly

minimálně 25 bp dlouhé a aby jejich teplota disociace byla v intervalu mezi 50°C a 60°C. Tyto mutační primery obsahovaly oblast požadované změny v sekvenci DNA proti nativnímu stavu a to uprostřed oligonukleotidového řetězce. Pro první PCR bylo do dvou 0,5 ml PCR zkumavek pipetováno 30 μ l ddH₂O, 5 μ l PCR pufru (10 \times koncentrovaný), 1,5 μ l 10 mM dNTP, 1,5 μ l 0,1 M MgSO₄ a 1 μ l templátu (10 ng plasmidové DNA). Jako templát byla použita plasmidová DNA obsahující sekvenci daného konstrukt, ve kterém chceme vytvořit bodovou mutaci (v této práci vždy pHLsec_L2; konstrukt L2 je LLT1 Q72-V191). Do každé zkumavky pak bylo pipetováno po 5 μ l 5 μ M přímého a reverzního primeru. Přičemž do první zkumavky byl pipetován přímý primer konstruktu a reverzní mutační primer a do druhé zkumavky pak reverzní primer konstruktu a přímý mutační primer (viz. Obr. 7). Nakonec bylo do každé zkumavky přidáno 0,5 μ l Deep Vent DNA polymerasy, směs byla lehce promíchána a centrifugována. Zkumavky byly umístěny do tepelného cyklátoru s následujícím programem:

- A. 5 min - 94°C
- B. 30 cyklů: 30 s - 94°C; 30 s - 53°C; 1 min - 72°C
- C. 10 min - 72°C

Se vzorky byla poté provedena preparativní agarosová elektroforéza (viz. 5.1.2.) a oba produkty o předpokládané velikosti byly extrahovány z gelu (viz. 5.1.3.), každý do 30 μ l ddH₂O.

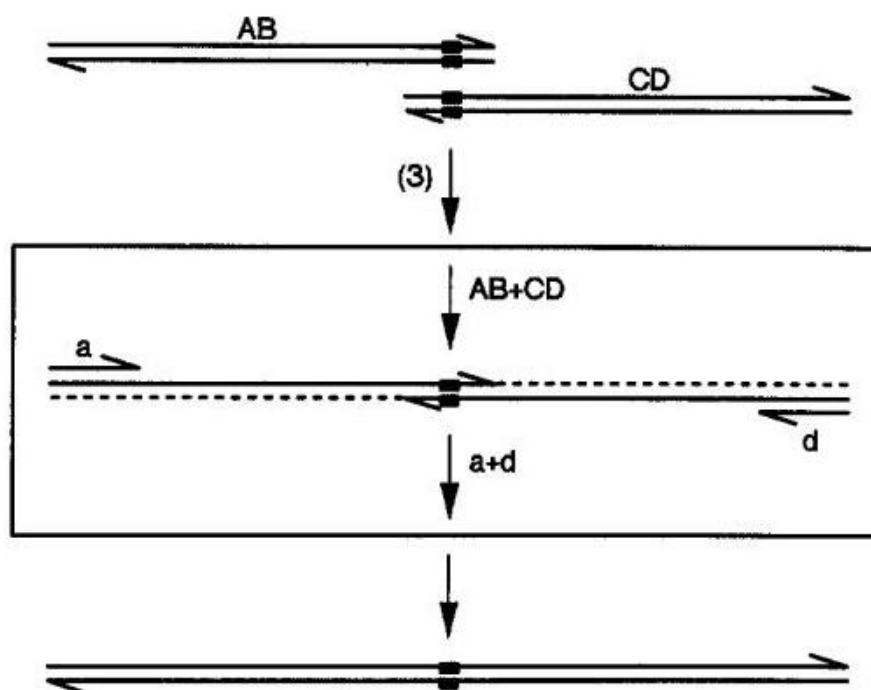


Obr. 7: Schematické znázornění první reakce v postupu PCR s prodlužováním přesahujících úseků. V první zkumavce probíhá amplifikace (1) sekvence ohraničené přímým primerem konstruktu (a) a reverzním mutačním primerem (b). Ve druhé zkumavce probíhá amplifikace (2) sekvence ohraničené reverzním primerem konstruktu (c) a přímým mutačním primerem (d). Změna sekvence oproti nativnímu stavu je zobrazena tučným obdélníkem. DNA řetězce jsou orientovány půlenou šipkou od 5' konce k 3' konci [72].

Pro druhou PCR (viz. Obr. 8) bylo do 0,5 ml PCR zkumavky pipetováno po 15 μ l každého ze dvou produktů prvních PCR, 5 μ l 5 μ M přímého primeru konstruktů, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru konstruktů, 5 μ l PCR pufru (10 \times koncentrovaný), 1,5 μ l 10 mM dNTP, 1,5 μ l 0,1 M MgSO₄. Nakonec bylo do zkumavky přidáno 0,5 μ l Deep Vent DNA polymerasy, směs byla lehce promíchána a centrifugována. Zkumavka byla umístěna do tepelného cyklátoru s následujícím programem:

- A. 5 min - 94°C
- B. 30 cyklů: 30 s - 94°C ;30 s - 58°C ;1 min - 72°C
- C. 10 min - 72°C

Poté byla provedena preparativní agarosová elektroforéza (viz. 5.1.2.) a finální produkt o předpokládané velikosti byl extrahován z gelu (viz. 5.1.3.) do 50 μ l ddH₂O.



Obr. 8: Schematické znázornění druhé reakce v postupu PCR s prodlužováním přesahujících úseků. Oba produkty první reakce jsou smíchány, pomocí komplementárních přesahů hybridizují a slouží tak jako pre-templát pro amplifikaci pomocí přímého a zpětného primeru konstruktů. Změna sekvence oproti nativnímu stavu je zobrazena tučným obdélníkem. DNA řetězce jsou orientovány půlenou šipkou od 5' konce k 3' konci [72].

Pro ligaci do linearizovaného vektoru bylo zapotřebí takto připravený mutovaný inzert štěpit restričními endonukleasami obdobným postupem jako v odstavci 5.1.1.:

do 1,5 ml mikrozkušavky bylo pipetováno 25 μl připraveného neštěpeného inzertu, 3,5 μl 10 \times koncentrovaného NEB1 pufru, 3,5 μl BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 2 μl ddH₂O. Následně bylo přidáno 0,5 μl enzymu AgeI a 0,5 μl enzymu KpnI. Směs byla promíchána a ponechána inkubovat 1 h při 37°C. Poté následovala tepelná inaktivace enzymu AgeI při 65°C, 20 min. Pro odstranění restrikčních enzymů a nízkomolekulárních oligonukleotidů bylo použito soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit. Bylo postupováno podobně jako při extrakci z agarosového gelu (5.1.3.) s tím, že nejprve bylo ke směsi ve zkumavce přidáno 300 μl roztoku L1, vzniklý roztok byl dobře promíchán, aplikován na kolonku ze stejné soupravy a dále se postupovalo stejně jako v odstavci 5.1.3. Takto připravené štěpené mutované inzerty byly dále využity pro ligaci do linearizovaného vektoru podle 5.1.4.

5.2. Práce s buněčnými liniemi HEK293

Práce s buněčnými kulturami probíhala v čistém prostředí místnosti pro tkáňové kultury (Katedra biochemie, PřF UK), která byla pravidelně uklížena a ozařována germicidní UV lampou. Veškeré zacházení s buněčnými kulturami probíhalo výhradně v určeném boxu s laminárním prouděním podle zásad sterilní práce.

5.2.1. Počítání buněčné hustoty pomocí hemocytometru

Buňky byly počítány manuálně pomocí hemocytometru. Automatickou pipetou bylo odebráno 20 μl rozmíchané buněčné suspenze a v mikrozkušavce zředěno smícháním s 20 - 80 μl 0,4% roztoku trypanové modři v PBS-TK. Po 5 min inkubaci bylo 20 μl směsi pipetováno do hemocytometru. Živé (průhledné) i mrtvé (modré) buňky byly spočítány zvlášť ve všech devíti čtvercích, průměrná hodnota pro jeden čtverec vynásobená faktorem ředění a faktorem $1 \cdot 10^4$ pak odpovídá buněčné hustotě v jednotkách 10^6 ml^{-1} ; procento živých buněk (viabilita) odpovídá podílu počtu živých buněk a součtu všech buněk vynásobeného stem.

5.2.2. Kultivace buněčných linií HEK293T, HEK293-6E a HEK293S

Buněčné kultury byly kultivovány v inkubátoru při 37°C, 5% CO₂ na Petriho miskách nebo v čtverhranných lahvích na třepačce v kultivačním médiu a subkultivovány ředěním čerstvým médiem tak, aby se jejich hustota pohybovala přibližně mezi

0,2 až $4 \cdot 10^6$ ml⁻¹. Buněčné linie HEK293T [73], HEK293-6E [47] a HEK293S GnTI⁺ (dále jen HEK293S) byly kultivovány ve směsi ExCELL293 média a F17 média v poměru 1:1 (dále jen Ex/F17). Po dosažení 24 h generační doby u buněčné linie HEK293-6E bylo ke kultivačnímu médiu přidáváno antibiotikum G418 ve výsledné koncentraci 25 µg.ml⁻¹.

Běžný postup údržby zásobní kultury byl následovný: 2-3 dny po rozmrazení alikvotního množství dosáhly buňky na 10 cm Petriho misce hustoty $2 \cdot 10^6$ ml⁻¹, byly rozmíchány 10 ml pipetou pomocí pipetovacího nástavce a přeneseny do celkem 75 ml Ex/F17 média v 250 ml čtverhranné láhvi s víčkem s prodyšným 0,22 µm filtrem a třepány na orbitální třepačce (Orbit 1000, Labnet, USA) vybavené adhezivní podložkou (Sticky Pad, New Brunswick Scientific, USA) rychlostí 135 ot./min (rotační průměr 19 mm) uvnitř CO₂ inkubátoru. Optimální objem média je za těchto podmínek 30-40% objemu láhve. Tato kultura pak byla udržována subkultivací a používána k transfekci/produkci rekombinantních proteinů.

5.2.3. Zmrazování buněčných linií HEK293T, HEK293-6E a HEK293S

Pro zmrazení buněk byla nejprve spočítána hustota dané buněčné suspenze, centrifugována v 50 ml sterilních zkumavkách při 200× g, 3 min a resuspendována v takovém objemu mrazicího média, aby výsledná hustota byla $5 \cdot 10^6$ ml⁻¹. Mrazicí médium sestávalo z 45% objemu použitého kultivačního média, z 45% čerstvého Ex/F17 média a z 10% sterilního DMSO pro tkáňové kultury. Výsledná suspenze byla rozdělena po 1 ml do kryozkumavek a v mrazicím kontejneru Mr. Frosty (kontrolovaný pokles teploty rychlostí 1°C za minutu) umístěna do mrazicího boxu (-80°C), kde byly zmrazené buňky i nadále skladovány.

5.2.4. Rozmrazování buněčných linií HEK293T, HEK293-6E a HEK293S

Do 15 ml sterilní zkumavky bylo pipetováno 10 ml na 37°C předeřátého ExCELL293 média. Alikvot zmrazených buněk v kryozkumavce byl co nejrychleji rozmražen ve vodní lázni vyhřáté na teplotu 37°C a přenesen do připraveného média. Výsledná suspenze byla jemně promíchána a centrifugována při 200× g, 5 min. Supernatant byl odstraněn, buňky resuspendovány v 10 ml Ex/F17 média a přeneseny na 10 cm Petriho misku.

5.2.5. Transfekce buněčné linie HEK293T a HEK293-6E

Den před plánovanou transfekcí buněčné linie HEK293T nebo HEK293-6E byla určena hustota předkultivované buněčné suspenze (viz. 5.2.1.). Potřebné množství buněčné suspenze bylo centrifugací při 200× g, 5 min zbaveno média a buněčná peleta byla resuspendována v čerstvém F17 médiu. Takto bylo připraveno typicky 200 ml buněčné suspenze o hustotě 1.10^6 ml^{-1} v 1 l čtverhranné láhvi. Takto připravená kultura byla kultivována na třepačce za popsanych standardních podmínek (viz. 5.2.2.). V následující den plánované transfekce měla pak připravená buněčná suspenze hustotu přibližně 2.10^6 ml^{-1} . Pro transfekci buněčné linie HEK293T i HEK293-6E bylo užíváno 1 µg plasmidové DNA na 1.10^6 transfekovaných buněk. Jako transfekční činidlo byl užíván roztok IPEI. Pro buněčnou linii HEK293T byl zvolen hmotnostní poměr DNA:IPEI (w:w) 1:5, pro linii HEK293-6E pak 1:4. Pro přípravu transfekčního roztoku bylo ve sterilní zkumavce zředěno příslušné množství roztoku plasmidové DNA do PBS-TK. Tento roztok byl sterilizován filtrací přes 0,22 µm filtr a byl přidán patřičný objem roztoku IPEI. Objem PBS-TK byl volen tak, aby výsledný objem transfekčního roztoku nebyl větší než 10% objemu produkční kultury, standardně se pohyboval mezi 5-10 ml. Výsledný roztok byl důkladně protřepán a inkubován 5-10 min (během inkubace se roztok mírně zakalil vlivem tvorby komplexu DNA:PEI) a poté byl přidán k předpřipravené buněčné suspenzi. Čtyři hodiny po přidání transfekčního roztoku byla buněčná suspenze zředěna čerstvým ExCELL293 médiem na polovinu (typicky 400 ml o buněčné hustotě 1.10^6 ml^{-1}). Produkce probíhala následujících 5-7 dní, jako vodítko pro ukončení produkce byla sledována viabilita buněk, pokud klesla pod 70% živých buněk v suspenzi, produkce byla ukončena. Médium bylo centrifugováno při 4000× g, 30 min, 4°C a následně zmrazeno a uchováváno při -20°C nebo ihned dále zpracováno (viz. 5.3.1.).

5.2.6. Produkce rekombinantních proteinů v prostředí kifunensinu

Pro produkci proteinů v buněčných liniích HEK293T nebo HEK293-6E s vysoce manosovou glykosylací byl do výsledného produkčního média 4 hodiny po transfekci přidáván roztok kifunensinu tak, aby jeho koncentrace v produkčním médiu byla 1 µg/ml.

5.2.7. Transfekce buněčné linie HEK293S

Buněčná linie HEK293S byla transfekována ve vysoké buněčné hustotě [74]. V den plánované transfekce byla určená hustota předkultivované buněčné suspenze (viz. 5.2.1.).

Potřebné množství buněčné suspenze bylo centrifugací při 200× g, 5 min zbaveno média a buněčná peleta byla resuspendována v čerstvém ExCELL293 médiu. Takto bylo připraveno typicky 16 ml suspenze o buněčné hustotě $25 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ v 1 l čtverhranné láhvi. Pro transfekci buněčné linie HEK293S bylo užíváno 1 μg plasmidové DNA na $1 \cdot 10^6$ transfekovaných buněk. Jako transfekční činidlo byl užíván roztok IPEI při hmotnostním poměru DNA:IPEI (w:w) 1:5. Pro přípravu transfekčního roztoku bylo ve sterilní zkumavce zředěno příslušné množství roztoku plasmidové DNA do PBS-TK. Tento roztok byl sterilizován filtrací přes 0,22 μm filtr a byl přidán patřičný objem roztoku IPEI. Objem PBS-TK byl volen tak, aby výsledný objem transfekčního roztoku po přidání k předpřipravené buněčné suspenzi upravil buněčnou hustotu na $20 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Standardně se výsledný objem transfekčního roztoku pohyboval mezi 3-5 ml. Výsledný roztok byl důkladně protřepán a inkubován 5-10 min (během inkubace se roztok mírně zakalil vlivem tvorby komplexu DNA:PEI) a poté byl přidán k předpřipravené buněčné suspenzi. Čtyři hodiny po přidání transfekčního roztoku byla buněčná suspenze zředěna čerstvým ExCELL293 médiem na polovinu (typicky 400 ml o buněčné hustotě $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Produkce probíhala následujících 5-7 dní, jako vodítko pro ukončení produkce byla sledována viabilita buněk, pokud klesla pod 70% živých buněk v suspenzi, produkce byla ukončena. Médium bylo centrifugováno při 4000× g, 30 min, 4°C a následně zmrazeno a uchováváno při -20°C nebo ihned dále zpracováno (viz. 5.3.1.).

5.3. Purifikace proteinů pomocí histidinové kotvy

5.3.1. Chelatační chromatografie

Pro chelatační chromatografii byl použit kobaltnatými ionty nabitý nosič (TALON[®] Metal Affinity Resin, Clontech, USA), který byl předem promyt destilovanou vodou a poté PBS. Médium z produkce bylo zfiltrováno přes 0,22 μm filtr, byl přidán PBS pufr v objemovém poměru 1:1 a byla zkontrolována (a popř. upravena) hodnota pH na 7,0. Do této směsi byl přidán nosič (typicky 2 ml na 400 ml produkčního média) a suspenze byla třepána v 2 l Erlenmeyerových baňkách při 140 ot./min, 1 hod, 16°C. Suspenze byla aplikována na kolonu s fritou (kolona Econo, Bio-Rad, Německo), po zachycení veškerého nosiče byla následně promyta PBS. Eluce byla provedena 4× 5 ml PBS s 250 mM imidazolem.

5.3.2. Zkoncentrování proteinů

Eluční frakce byly spojeny a zkoncentrovány pomocí koncentrátorů Amicon Ultra, s membránou propustnou pro molekuly o $M_r < 10000$, v centrifuze při $3000 \times g$, 20°C na objem 100-200 μl . Nové koncentrátoři byly před prvním použitím promyty ddH₂O, mezi použitím byly naplněny ddH₂O, aby membrána nevysychala.

5.3.3. Gelová permeační chromatografie

HPLC systém byl promyt ddH₂O a při průtoku 0,5 ml/min byla připojena kolona Superdex 200 10/300 GL, která byla promyta ddH₂O, 1 M NaOH, opět ddH₂O a pufrem pro gelovou chromatografii. Vzorek připravený zkoncentrováním frakcí z chelatační chromatografie byl aplikován na ekvilibrovanou kolonu. Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz. 5.4.2.) a frakce o dostatečné čistotě s obsahem stejného produktu byly spojeny. Kolona i systém byly po promytí uchovávány ve 20% čistém ethanolu.

5.4. Charakterizace připraveného proteinu

5.4.1. Stanovení koncentrace

Koncentrace přečištěného proteinu byla orientačně stanovena metodou dle Bradfordové. Stanovení bylo provedeno na 96ti jamkové destičce, k 5 μl roztoku proteinu bylo vždy přidáno 200 μl činidla dle Bradfordové a směs byla ponechána inkubovat 5 min za laboratorní teploty. Pomocí roztoků BSA v rozmezí koncentrací 0-1 mg/ml byla sestrojena kalibrační řada, stanovení přibližné koncentrace proteinu bylo provedeno vizuálně porovnáním s kalibrační řadou či spektrofotometricky.

5.4.2. SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu [75]

Pro elektroforetickou separaci byl užíván 15% polyakrylamidový gel, který byl připraven z 1,8 ml ddH₂O, 4 ml 30% AA, 2 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 80 μl 10% SDS, 80 μl 10% APS a 4 μl TEMED. Zaostrovací gel byl připraven z 1,4 ml ddH₂O, 0,5 ml 30% AA, 0,25 ml 1 M Tris pH 6,8, 20 μl 10% SDS, 20 μl 10% APS a 3 μl TEMED. Množství jsou uvedena vždy pro 2 gely. Neredukovaný vzorek byl připraven smícháním 10 μl preparátu s 10 μl 2 \times koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru. Pro přípravu redukováného vzorku byl užit redukující vzorkový pufr. Následně byly vzorky 5 min povařeny a krátce centrifugovány. 15 μl takto připravených vzorků se nanášelo na gel společně s 5 μg

standardu. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 50 min. Gely byly barveny 15 min v barvicí lázni a následně odbarveny v odbarvovací lázni.

5.4.3. Analytická ultracentrifugace [54]

5.4.3.1. Metoda sedimentační rovnováhy

Měření bylo provedeno na analytické ultracentrifuze Proteomelab XL-I. Pro měření byl použit roztok proteinu L2_H176C v pufru pro gelovou chromatografii o koncentraci 0,07 mg/ml a téhož proteinu po deglykosylaci Endo H_f o koncentraci 0,09 mg/ml. Do šestikomorové cely bylo pipetováno 110 µl proteinu a 130 µl pufru jako reference (rotor An-50Ti, *Beckman Coulter*, USA). Měření probíhalo postupně při 12-15-18-21-24-27-30000 ot./min, 4°C, 1. snímek poprvé po 30 hod, další po 18 hod, sedimentace vzorku byla sledována pomocí absorbanční optiky při 280 nm. Data byla vyhodnocena pomocí programů Sedfit [76] a Sedphat [77], přičemž hustota pufru a parciální specifické objemy proteinů byly predikovány ze znalosti složení pufru, resp. aminokyselinových sekvencí proteinů v programu SEDNTERP [78]. Měření a jeho vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, PhD.

5.4.3.2. Metoda sedimentační rychlosti

Při této metodě byla využita dvoukomorová cely. Do jednoho sektoru bylo pipetováno 400 µl roztoku proteinu o koncentraci 0,2 mg/ml, do druhého sektoru 400 µl pufru jako reference. Měření probíhalo při 48000 ot./min, 280 nm, 20°C a bylo sbíráno 80 snímků po 5 min. Pro měření roztoku proteinu o koncentraci 0,02 mg/ml bylo postupováno stejně. Měření a jeho vyhodnocení (viz 5.4.3.1.) provedl RNDr. Ondřej Vaněk, PhD.

5.4.4. Hmotnostní spektrometrie - mapování disulfidických vazeb

Analýza zapojení cysteinů do disulfidických můstků v připraveném proteinu byla prováděna pomocí velice přesného měření hmotnosti (m/z) peptidových štěpů tohoto proteinu v oxidativním prostředí. Vlastní práce probíhala pod dohledem RNDr. Petra Nováka, PhD. (*Laboratoř charakterizace molekulární struktury*, MBÚ AV ČR, v.v.i.) podle následujícího protokolu.

5.4.4.1. Gradientová SDS-PAGE v oxidativním prostředí

Do 0,5 ml mikrozkušavky bylo pipetováno 10 μ l (zhruba 10 μ g) čistého preparátu proteinu v pufru pro gelovou chromatografii. Volné sulfhydrylové skupiny byly alkylovány přidávkem 2 μ l 120 mM roztoku IAA (rozpuštěném v 0,1 M EtMorf pufru, pH 8,4), vzorky byly následně 20 min inkubovány ve tmě za laboratorní teploty. K alkylovanému vzorku byly poté přidány 4 μ l 5 \times koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru a 2 μ l 1 mM roztoku cystaminu. Takto připravený vzorek byl poté inkubován 1 min při 90°C, krátce centrifugován a nanesen na komerční gradientový polyakrylamidový gel (4-12% NuPAGE Bis-Tris gradient gel, *Invitrogen*). Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po 40 min. Gel byl poté barven 30 min v barvicí lázni a následně odbarven v odbarvovací lázni do úplného odbarvení pozadí gelu. Příslušný proužek proteinu byl z gelu vyříznut a nakrájen na malé kostičky. V mikrozkušavce bylo ke kouskům gelu přidáno 250 μ l 0,1 M EtMorf pufru, pH 8,4, 50 μ l 1 mM roztoku cystaminu ve stejném pufru a 200 μ l AcN. Směs byla 10 min sonikována v ultrazvukové lázni. Supernatant byl následně odstraněn, tento postup byl opakován do odbarvení gelu. Poté byly kousky gelu opláchnuty 200 μ l 100 μ M roztoku cystaminu v ddH₂O, směs byla 5 min sonikována a supernatant odstraněn. Následoval oplach 200 μ l 100 μ M roztoku cystaminu v AcN, směs byla 5 min sonikována a supernatant odstraněn. Tento oplach byl opakován. Poslední oplach byl proveden v 250 μ l 0,1 M EtMorf pufru, pH 8,4, 50 μ l 1 mM roztoku cystaminu ve stejném pufru a 200 μ l AcN, směs byla sonikována 5 min a supernatant odstraněn.

5.4.4.2. Deglykosylace denaturovaného proteinu

Následovala deglykosylace denaturovaného vzorku v gelu pomocí enzymu Endo H_f. Ke kouskům gelu bylo pipetováno 8 μ l ddH₂O, 1 μ l 10 \times koncentrovaného reakčního pufru Endo H_f a 1 μ l enzymu Endo H_f. Směs byla inkubována 1 hod při 37°C. Supernatant byl poté odstraněn a následovala stejná procedura oplachů jako v předcházejícím odstavci. Kousky gelu byly poté vysušeny na rotační vakuové odparce a byly skladovány při -80°C nebo ihned zpracovány.

5.4.4.3. Digesce peptidasami

Dalším krokem byla digesce proteinu v gelu vybranými peptidasami – trypsinem, který štěpí polypeptidový řetězec na C-konci Lys a Arg a endopeptidasu AspN, která štěpí

výlučně na N-konci Asp. Pro digesci trypsinem byl jeho zásobní roztok (500 ng/μl) 50× zředěn pufrům o složení: 50 mM NH₄Ac, 1 μM cystamin, 10% v/v AcN, pH 7,0. Pro digesci endopeptidasou AspN byl její zásobní roztok (100 ng/μl) 20× zředěn výše uvedeným pufrům. Ke kouskům gelu byl pipetován zředěný roztok peptidas tak, aby byly kousky celé ponořené - standardně 10 μl. Následovala inkubace ve vodní lázni při 37°C po dobu 8 až 12 hod. Vzorky byly poté zmrazeny při -20°C nebo ihned zpracovány.

5.4.4.4. Extrakce peptidů

Supernatant po digesci peptidasami byl odebrán do čisté sběrné mikrozkušavky, ke kouskům gelu bylo pipetováno 50 μl 80% AcN, 0,1% TFA a sonikováno 5 min, supernatant byl poté odebrán a přidán do sběrné mikrozkušavky. Tento postup byl dále opakován nejprve s 50 μl 0,1% TFA a poté s 50 μl 40% AcN. Kousky gelu byly uschovány a skladovány při -80°C. Odebrané peptidové extrakty byly vysušeny na vakuové rotační odparce téměř do sucha. Poté bylo do mikrozkušavky pipetováno 100 μl 0,1% TFA a sonikováno 15 min.

5.4.4.5. Nabohacení a odsolení peptidů

Nabohacení a odsolení peptidů bylo provedeno pomocí komerční mikrokolonky s reverzní fází MicroTrap (*Michrom Bioresources, USA*). Kolonka byla nejprve promyta 500 μl 80% AcN, 0,1% TFA. Těsně před nanesením vzorku byla kolonka promyta 300 μl 0,1% TFA, následně byl nanesen vzorek (tedy 100 μl 0,1% TFA peptidového extraktu z předchozího kroku), poté byla kolona dvakrát promyta 500 μl 0,1% TFA. Nabohacená a odsolená peptidová frakce byla eluována 50 μl 80% AcN, 0,1% TFA a jímána do čisté mikrozkušavky. Eluát byl v mikrozkušavce vysušen na rotační vakuové odparce a uchován při -80°C až do samotného MS měření.

5.4.4.6. Hmotnostně spektrometrická analýza

Vlastní LC-MS analýzu prováděl RNDr. Petr Novák, PhD. Ke vzorkům bylo pipetováno 20 μl ddH₂O a 30 μl 5% AcN, 1% kys. octové, sonikováno 10 min a roztok byl přenesen do speciálních vialek se septem. Vzorky byly umístěny do automatického vzorkovače připojeného k systému LC-MS. Kapalinová chromatografie (μHPLC systém Agilent 1200) na obrácené fázi (kolona Magic C18) probíhala s roztoky mobilní fáze o následujícím složení: roztok A (0,2% FA; 2% IPA; 2% AcN v H₂O) a roztok B

(0,16% FA; 10% IPA; 5% H₂O v AcN). Nástřik vzorku činil 5 μ l. Zachycené peptidy byly vymyty lineární gradientem pufru B od 1 do 45% za 30 minut 4 μ l.min⁻¹. HPLC systém byl spojen s hmotnostním spektrometrem (Apex-Ultra mass spectrometr, *Bruker Daltonics*). Separované peptidy byly nabity pomocí ESI ionizace a detekovány pomocí FT-ICR analyzátoru. Naměřené hodnoty m/z získaných peptidů byly dále analyzovány pomocí speciálních programů DataAnalysis 4.0 (*Bruker Daltonics*) a MSLinks (<http://www.ms3d.org/>). Prakticky se jednalo o porovnání naměřených hodnot m/z s teoretickými hodnotami m/z tryptických nebo jiných štěpů se zohledněním různých modifikací (např. přítomnost disulfidického můstku nebo N-glykosylace) [79].

5.5. Krystalizace proteinů

Krystalizace připravených proteinů probíhala v *Laboratoři strukturní biologie*, ÚOCHB AV ČR, v.v.i. pod dohledem RNDr. Ondřeje Vaňka, PhD., v *Laboratoři strukturní analýzy biomakromolekul*, ÚMCH AV ČR, v.v.i. pod dohledem Ing. Jana Dohnálka, PhD., a také v *Henry Wellcome Building for Genomic Medicine*, University of Oxford, UK v rámci kurzu *Workshop on mammalian expression technologies 2011* a udělenému mezinárodnímu přístupu (*Trans-national access*) k tomuto pracovišti evropskou infrastrukturou P-CUBE (<http://www.p-cube.eu/>).

5.5.1. Automatizované hledání krystalizačních podmínek

Pro krystalizaci připraveného proteinového preparátu bylo nejprve potřeba z velkého spektra krystalizačních podmínek vytipovat ty nejslibnější. K tomu bylo využito automatizovaných pipetovacích robotů, pomocí kterých bylo možno uskutečnit velké množství krystalizačních experimentů v malých objemech nasazovaných kapek – tedy s malou spotřebou proteinu. V těchto širokospektrých krystalizačních pokusech byly užívány podmínky z komerčně dodávaných optimalizačních sad pro krystalizaci (*Hampton Research*). Práce se lišila podle daného pracoviště.

V *Henry Wellcome Building for Genomic Medicine* bylo využíváno na míru upravených robotů (typu Cartesian, *Genomic Solutions*, USA) schopných přesně pipetovat až 100 nl kapky. Širokospektrá optimalizace probíhala metodou sedící kapky na 96ti jamkových krystalizačních destičkách (*Greiner*, Německo). Nejprve bylo pomocí robota Hydra 96 (*Art Robbins Instruments*, USA) naplněno všech 96 komůrek pro rezervoár sadou srážedel. Poté byla krystalizační deska přenesena na robota typu Cartesian, robot si

z připravené mikrozkušavky odebral zhruba 9,6 μl proteinového preparátu a na každou z 96 krystalizačních pozic nad rezervoárem pipetoval 100 nl kapku. Poté robot odebral z komůrky rezervoáru 100 nl a pipetoval tento roztok ke kapce preparátu nad daným rezervoárem. Takto bylo na každé destičce připraveno 96 různých 200 nl krystalizačních pokusů typu „sedící kapka“. Aby nedocházelo k nežádoucímu odpařování roztoků, byla destička nakonec přelepena speciální těsnicí průhlednou fólií. Krystalizační pokusy byly skladovány při 21°C v automatizovaném skladišti s pravidelnou digitální vizualizací všech nasazených krystalizačních pokusů, přístupnou po internetu.

V *Laboratoři strukturní biologie* probíhala práce obdobně s těmito rozdíly. Pomocí zde užívaného robota typu Crystal Gryphon (*Art Robbins Instruments, USA*) bylo do 96ti jamkové krystalizační destičky Intelli-plate 96 pipetováno 200 μl roztoku rezervoáru, sedící krystalizační kapka byla vytvořena smícháním 200 nl proteinového preparátu a 200 nl daného rezervoáru. Krystalizační pokusy byly uchovávány při 20°C. Krystalizační experimenty byly sledovány pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem minimálně jednou za 14 dní.

5.5.2. Optimalizace krystalizačních podmínek

Další optimalizace krystalizačních podmínek byla prováděna manuálně v *Laboratoři strukturní biologie* a to metodou sedící nebo visící kapky. Krystalizační pokusy byly uchovávány při 20°C a sledovány pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem minimálně jednou za 14 dní. Pro metodu sedící kapky bylo používáno 96ti jamkových krystalizačních destiček (Intelli-plate 96), užívaný objem rezervoáru byl 100 μl . Sedící krystalizační kapka byla standardně připravena smísením 0,5 μl roztoku proteinu a 0,5 μl odebraného rezervoáru. Komůrky s kapkami nad rezervoárem byly nakonec přelepeny speciální těsnicí fólií. Pro metodu visící kapky bylo užíváno 24 jamkových desek (EasyXtal), užívaný objem rezervoáru byl standardně 300 μl . Kapka byla standardně připravena smísením 1 μl roztoku proteinu a 1 μl odebraného rezervoáru na stlačeným vzduchem očištěným sklíčku šroubovacího uzávěru jamky. Uzávěr s kapkou byl poté těsně zašroubován nad jamku s daným rezervoárem.

5.5.3. Mrazení krystalů

Pro přenášení a uchovávání byly krystaly mrazeny v tekutém dusíku. Nejprve byla prázdná vialka naplněna, ponořena a vytemperována v tekutém dusíku. Poté byl za pomoci

nylonové smyčky přiměřených rozměrů vyloven krystal z dané kapky. Smyčka byla ihned umístěna do vialky naplněné tekutým dusíkem. Mrazení krystalů probíhalo pod dohledem Ing. Jana Dohnálka, PhD.

5.5.4. Testování krystalů na proteinovou difrakci

Testování krystalů na proteinovou difrakci bylo uskutečněno na difraktometru *Laboratoře rentgenové difrakce na monokrystalech*, FZÚ AV ČR, v.v.i., a také na difraktometru *Laboratoře strukturní biologie*, BTÚ AV ČR, v.v.i., vždy pod odborným dohledem Ing. Jana Dohnálka, PhD.

5.5.5. Měření krystalové difrakce

Měření krystalové difrakce probíhalo 24.-25. 11. 2011 na zdroji synchrotronového záření BESSY II (Beamline 1 a 2, *Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH*, Německo) pod dohledem Ing. Jana Dohnálka, PhD. Měření probíhalo při 100 K, energie rentgenového svazku byla 13 500 eV, resp. 0,918 Å. Pro kompletní soubor difrakčních dat bylo pořízeno 360 difrakčních snímků s expozicí 2 s a $\Delta\varphi = 0,5^\circ$ ve vzdálenosti detektoru 288,06 mm, což odpovídá detekčnímu maximu 2,5 Å.

Krystaly které vyrostly v *Henry Wellcome Building for Genomic Medicine*, University of Oxford, UK byly loveny, mrazeny a měřeny Dr. Karlem Harlosem (*STRUBI*, University of Oxford, UK). Měření krystalové difrakce probíhalo 11. 3. 2012 na zdroji synchrotronového záření Diamond light source (Beamline I02; *Harwell Science and Innovation Campus*, UK). Rentgenový svazek měl vlnovou délku 0,97960 Å. Soubor difrakčních dat obsahoval 360 snímků s expozicí 1 s a $\Delta\varphi = 0,5^\circ$ s detekčním maximem nastaveném na 2,05 Å.

5.5.6. Zpracování dat a řešení struktury LLT1

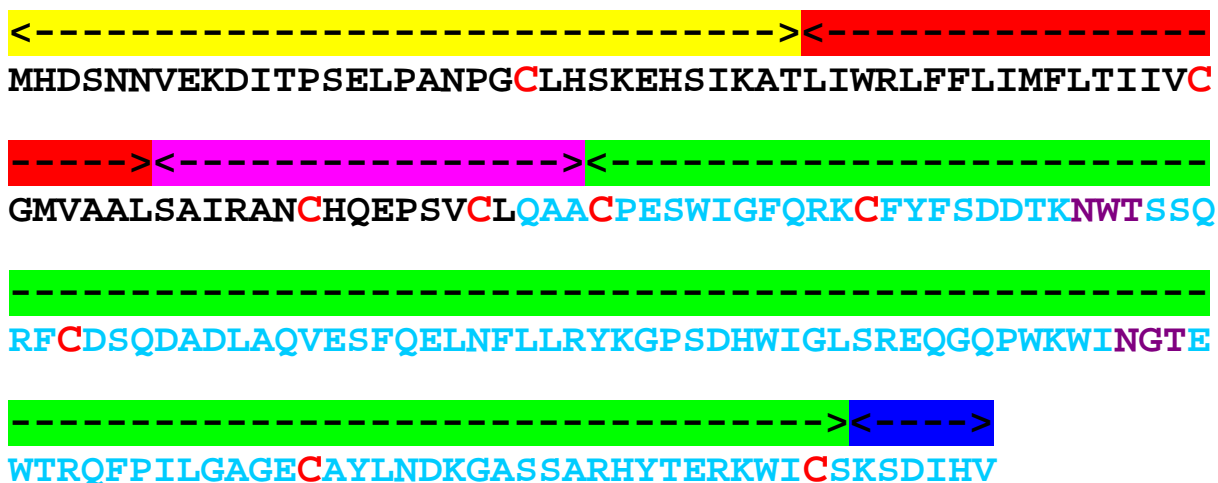
Získaná data zpracovávala a model struktury LLT1 rafinovala RNDr. Tereza Skálová, PhD. (*Laboratoř strukturní analýzy biomakromolekul*, ÚMCH AV ČR, v.v.i.). Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení s pomocí již vyřešené struktury homologního myššího receptoru Clrg (PDB: 3RS1; [80]).

6. Výsledky

6.1. Návrh konstruktů receptoru LLT1

Až donedávna, nebyla příprava rozpustné formy receptoru LLT1 v bakteriálním expresním systému popsána [29] a i v rámci pracovní skupiny *Laboratoře architektury proteinů* jsou zkušenosti s tímto postupem přípravy zcela čerstvé [81]. Naproti tomu z dostupné literatury zabývající se imunologií a funkcí LLT1 na buněčné úrovni je již delší doba zřetelné, že připravit tento receptor pomocí eukaryotické exprese, resp. savčích buněčných linií lze, a to i v jeho rozpustné formě, například pomocí buněčné linie HEK293 [6,23]. Proto jsme se na začátku pokusu o strukturní charakterizaci extracelulární domény tohoto receptoru rozhodli postupovat právě skrze rekombinantní expresi v linii HEK293.

Aminokyselinový konstrukt receptoru LLT1, na který se tato práce soustředila především, nese pracovní označení L2, protože je druhým v řadě již testovaných konstruktů LLT1. Jak je patrné z popisu primární sekvence na Obr. 9, konstrukt L2_{Q72-V191} zahrnuje celou predikovanou C-terminální lektinovou doménu receptoru LLT1 s krátkým přesahem do dimerizačního krčku a celý C-terminální úsek. Dimerizační krček nebyl v tomto konstruktu zahrnut v souladu s předchozími zkušenostmi laboratoře školitele s přípravou homologních NK receptorů. Zahrnutí krátké části dimerizačního krčku a celé C-terminální sekvence vychází ze znalosti krystalové struktury homologního receptoru

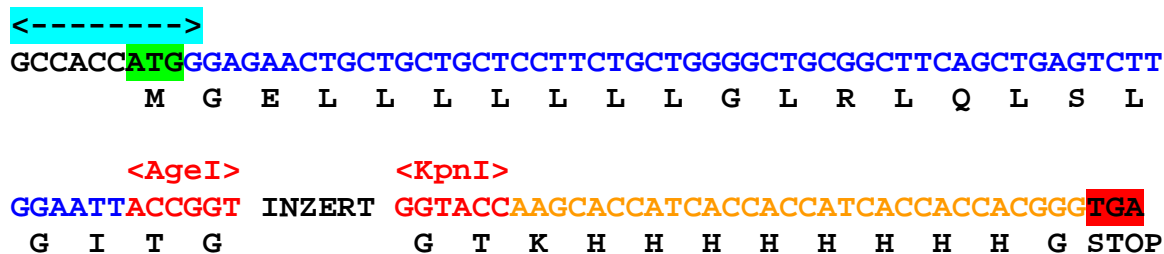


Obr. 9: Primární sekvence LLT1. Receptor LLT1 můžeme rozdělit na N-terminální intercelulární část (**žlutě**), transmembránovou část (**červeně**), dimerizační krček (**růžově**), C-lektinovou doménu (**zeleně**) a C-terminální část (**modře**). V primární sekvenci je **světle modrou** zvýrazněn navržený konstrukt s pracovním označením L2 (Gln 72 – Val 191), dále **červenou** všechny cysteiny a **fialovou** predikovaná místa možné N-glykosylace. Transmembránový úsek a C-lektinová doména byly predikovány algoritmem Globplot 2.3 [82].

CD69, ve které aminokyselinové zbytky těchto částí spolu interagují a mají tak strukturně stabilizační roli. DNA kódující konstrukt L2 byla v době započetí mé diplomové práce v *Laboratoři architektury proteinů* již dostupná ve formě expresního vektoru pHLsec_L2 (připraveného mým školitelem), vhodného pro transientní transfekci buněk HEK293. Protože ale dosavadní zkušenosti s expresním vektorem pTT28 ukazovaly v porovnání s vektorem pHLsec na možnost vyšších výtěžků rekombinantního proteinu, bylo v první části této práce rozhodnuto vložit konstrukt L2 do expresního vektoru pTT28.

6.2. Popis vektoru pTT28

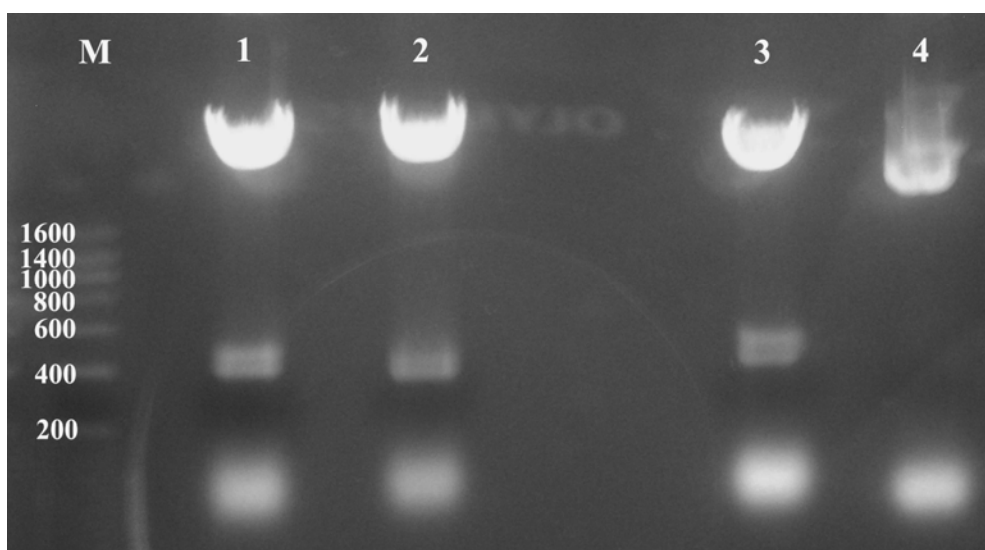
Expresní vektor pTT28, laskavý dar od Dr. Y. Durochera (Montreal, Kanada), je odvozený od vektoru pTT5, který vznikl úpravou komerčního vektoru pCEP4 [47]. Prokaryotická oblast tohoto vektoru obsahuje bakteriální počátek replikace a gen zodpovědný za rezistenci vůči ampicilinu. Eukaryotická oblast tohoto vektoru obsahuje virový replikační počátek oriP, který umožňuje episomální replikaci vektoru v buňkách obsahujících nukleární antigen 1 z viru Epstein-Barrové (EBNA1). Zkrácenou verzi tohoto nukleárního antigenu obsahuje například buněčná linie HEK293-6E. Eukaryotická expresní kazeta je vybavena silným cytomegalovirovým promotorem a adenovirovým posilovačem („enhancerem“), které zajišťují zvýšenou transkripci do mRNA. Optimalizovaná sekvence Kozakové v blízkosti translačního počátku usnadňuje iniciaci translace na ribosomu. Syntetický N-terminální peptid zajišťuje buněčnou sekreci a C-terminální histidinová kotva snadnou afinitní purifikaci vyrobeného proteinu. Originální vektor pTT28 byl již dříve v laboratoři školitele upraven tak, aby obsahoval restriční místa AgeI a KpnI, která umožňují snadné vložení inzertu mezi signální peptid a afinitní kotvu (viz. Obr. 10).



Obr. 10: Okolí klonovacího místa vektoru pTT28. Sekvence Kozakové (ohraničena světle modrou šipkou), iniciační kodon (zeleně), sekreční signál (modře), restriční místa pro AgeI a KpnI (ohraničené červenou šipkou), histidinová kotva (žlutě) a terminační kodon (červeně).

6.3. Příprava expresního vektoru pTT28_L2

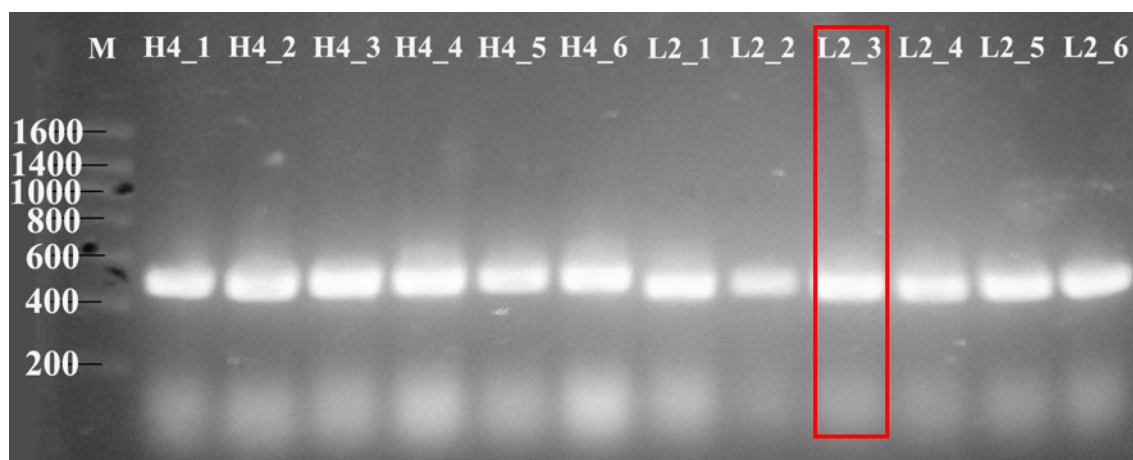
Jelikož je sekvence inzertu v klonovacím místě vektorů pHLsec i pTT28 ohraničena sekvencemi pro restriční endonukleasy AgeI a KpnI (viz. Obr. 10, str. 47), je přenos inzertů mezi těmito dvěma vektory značně usnadněn. Inzert L2 a linearizovaný vektor pTT28 s kompatibilními sekvenčními přesahy byly získány působením restričních endonukleas AgeI a KpnI na vektor pHLsec_L2 a pTT28_C1 (obsahující konstrukt C1 pro kryší receptor Clrb). Směsi DNA fragmentů byly separovány pomocí preparativní agarosové elektroforézy (viz. Obr. 11) a požadované fragmenty byly z gelu extrahovány. S takto získaným přečištěným inzertem L2 a linearizovaným vektorem pTT28 byla připravena ligační směs s T4 DNA ligasou. Touto směsí byly poté metodou tepelného šoku transformovány bakterie *E. coli* DH5 α , které byly posléze vysety na misku s LB agarem obsahujícím ampicilin.



Obr. 11: Agarosová elektroforéza štěpení pHLsec_L2 a pTT28_C1. Na fotografii agarosové elektroforézy je patrné úspěšné vyštěpení inzertu L2 (předpokládaná velikost 369 bp) z plasmidu pHLsec_L2 pomocí AgeI a KpnI a dále úspěšná linearizace vektoru pTT28_C1 vyštěpením inzertu C1 (předpokládaná velikost 438 bp) pomocí AgeI a KpnI. Vzorky v drahách jsou označeny následovně. Standard v bp (**M**), nesouvisející vzorek (**1**), štěpené pHLsec_L2 (**2**), štěpené pTT28_C1 (**3**), neštěpené pTT28_C1 (**4**).

Na misce vyrostlo velké množství kolonií, selekce byla provedena se šesti vybranými koloniemi pomocí PCR z kolonií podle postupu v odstavci 5.1.7., přičemž jako přímý primer byl použit oligonukleotid specifický pro konstrukt (L2_Q72_FW) a jako reverzní primer oligonukleotid specifický pro vektor (pTT_REV). Předpokládaná velikost

amplifikovaného úseku DNA byla 411 bp. Výsledek agarosové elektroforézy PCR z kolonií ukázal, že všechny vybrané kolonie byly pozitivní (viz. Obr. 12).



Obr. 12: PCR z kolonií. Fotografie agarosové elektroforézy PCR z kolonií. V dráze označené **M** je standard v bp. Dráhy označené **H4_1** až **H4_6** obsahují nesouvisející vzorky. Dráhy označené **L2_1** až **L2_6** obsahují vzorky šesti vybraných klonů *E. coli* DH5a transformovaných ligační směsí expresního vektoru pTT28_L2, předpokládaná velikost amplifikovaného úseku DNA byla 411 bp. Pro další práci byl zvolen klon z dráhy **L2_3** (červený obdélník)

Klon označený L2_3 byl použit pro nízkoobjemovou přípravu plasmidové DNA podle postupu v odstavci 5.1.8. Připravená plasmidová DNA byla předána *Laboratoři sekvenace DNA* pro ověření správnosti vložené sekvence. Získaná nukleotidová sekvence inzertu byla porovnávána se známou nukleotidovou sekvencí receptoru LLT1 v databázi GenBank. Správnost vloženého inzertu byla potvrzena.

Následovala velkoobjemová příprava expresního vektoru pTT28_L2 podle postupu uvedeném v odstavci 5.1.10. Čistota a množství připravené plasmidové DNA byla určena měřením absorpance při vlnové délce 260 nm a 280 nm, výsledky jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1: Výsledek velkoobjemové přípravy expresního vektoru pTT28_L2.

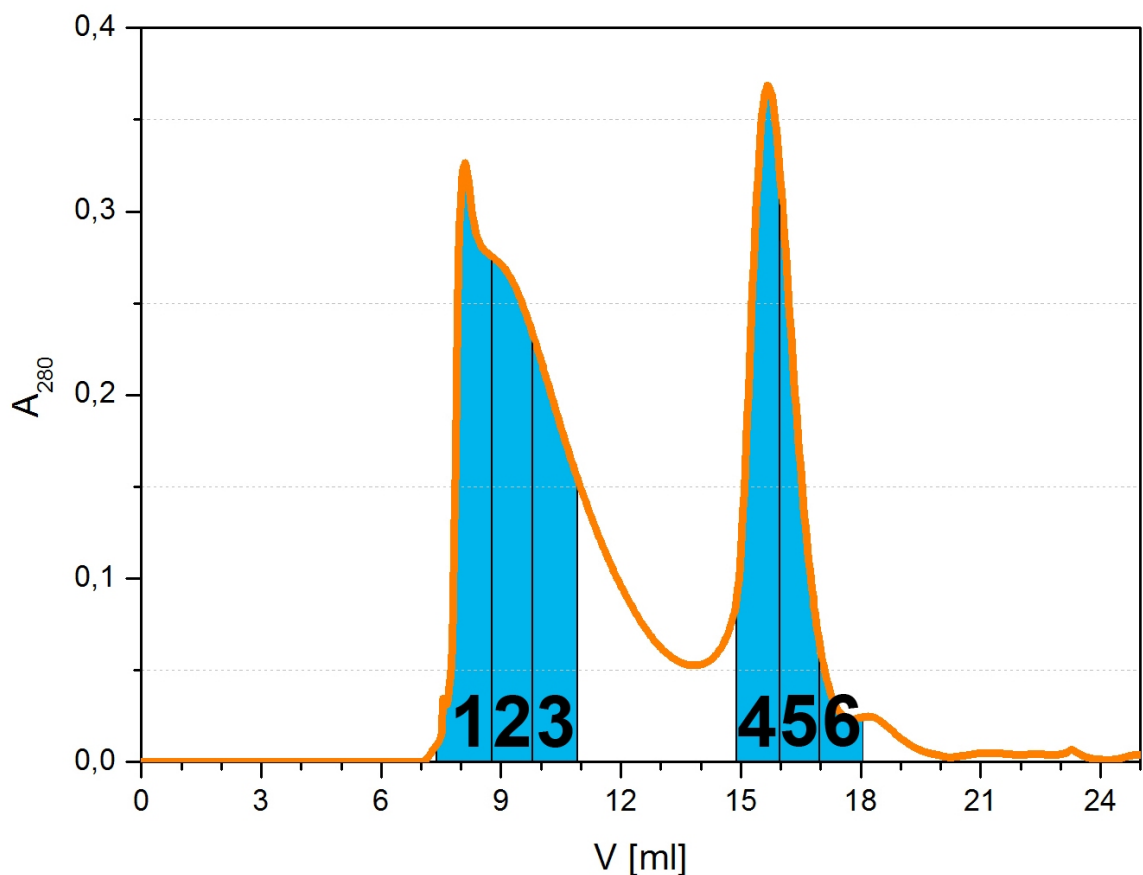
Vzorek	A ₂₆₀	A ₂₈₀	c [μg/μl]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
pTT28_L2	0,290	0,160	4,35	1,81

6.4. Příprava rozpustné formy LLT1

Konstrukt L2 byl produkován metodou transientní transfekce buněčné linie HEK293-6E. Standardně bylo transfekováno 400 ml suspenzní kultury v 1 l čtverhranné

láhvi na třepače o počáteční buněčné hustotě $1.10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ podle postupu popsaného v odstavci 5.2.5. Šest dní po transfekci bylo produkční médium sklizeno a naprodukovaný protein byl purifikován pomocí chelatační chromatografie založené na principu reverzibilní interakce histidinového postranního řetězce s Co^{2+} ionty imobilizovanými na agarosových kuličkách. Výhoda této metody spočívá v její vysoké specifitě, díky které je možno v jednom kroku odstranit většinu nečistot ze vzorku (proteiny se na nosič váží prostřednictvím osmi histidinů své C-koncové kotvy). Ekvilibračním a promývacím pufrům byl PBS, pufr pro eluci PBS s 250 mM imidazolem, jak je popsáno v odstavci 5.3.1.

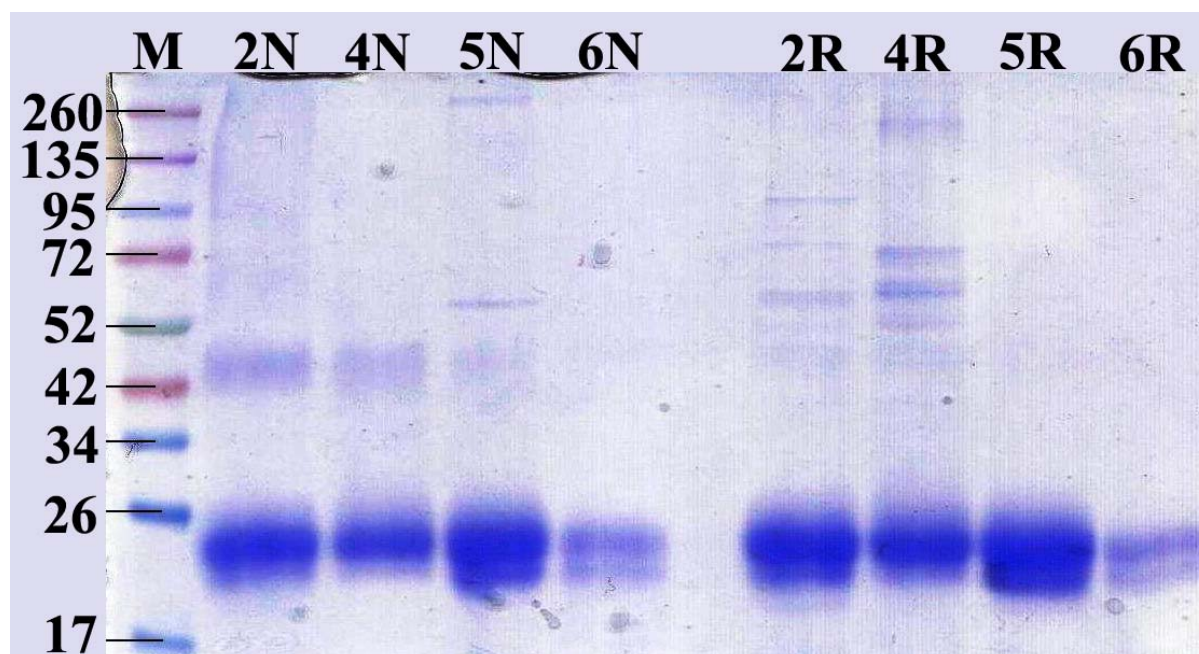
Frakce získané v tomto purifikačním kroku byly spojeny a preparát byl zakoncentrován do menšího objemu – standardně 100 - 150 μl , aby mohl být aplikován do systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie s připojenou kolonou Superdex 200 10/300 GL. Pro gelovou permeační chromatografii byl tento systém ekvilibrován v pufru



Obr. 13: Chromatogram purifikace konstruktů L2. Záznam gelové permeační chromatografie konstruktů L2 produkovaných v HEK293-6E linii na koloně Superdex 200 10/300 GL, ukazuje na přítomnost velkého množství agregovaného konstruktů L2 ve frakcích 1 až 3. **Oranžově** je znázorněn průběh absorpčního záznamu při 280 nm. **Modré oblasti** pak značí šest zachycených frakcí (rozlišeny čísly 1 až 6).

o složení 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5. Průběh chromatografie byl monitorován měřením absorpance při 280 nm.

Chromatogram na Obr. 13, str. 50 ukazuje výsledek posledního purifikačního kroku připraveného konstrukt L2, během kterého bylo posbíráno celkem 6 frakcí (vyznačeno v chromatogramu čísla 1 až 6). Jelikož mrtvý objem užitého HPLC systému je přibližně 8 ml, je z absorbančního záznamu patrné že frakce 1 až 3 obsahují částice s velkým hydrodynamickým objemem. V rámci pracovní skupiny mého školitele, kde jsou stejnou expresní a purifikační metodou připravovány i další lektinové receptory NK-buněk podobné receptoru LLT1, byl takový výsledek ojedinělý pro konstrukt L2. Proto můžeme usoudit, že se nejednalo o během chelatační chromatografie nespecificky zachycené součásti kultivačního média či jiné proteiny sekretované buněčnou linií, naopak s velkou pravděpodobností šlo o agregáty špatně sbaleného konstrukt L2. Frakce 4 až 6 pak odpovídají předpokládanému retenčnímu objemu pro sbalený globulární konstrukt L2.



Obr. 14: 15% SDS-PAGE frakcí gelové permeační chromatografie L2. Fotografie elektroforetické analýzy frakcí 2, 4, 5 a 6 z gelové permeační chromatografie konstrukt L2. Je patrné že všechny frakce obsahují konstrukt L2 (teoretická hmotnost proteinu je 16 kDa, ta je však dále zvýšena glykosylací - 2 predikovaná N-glykosylační místa). V neredukujícím prostředí je pak patrná příměs vyššího oligomerního stavu - dimeru, který se v redukujícím prostředí rozpadá na monomerní konstrukt L2. Vzorky v dráhách jsou označeny číslem dané frakce a rozlišeny na neredukující (N) a redukující (R) část; dráha M obsahuje proteinový standard v kDa.

Následná SDS-PAGE provedená s frakcemi 2, 4, 5 a 6 (viz. Obr. 14, str. 51) ukázala v neredukujících podmínkách na přítomnost pravděpodobně vyšších oligomerních stavů konstruktů L2, které se v redukujícím prostředí rozpadají na částice o hmotnosti předpokládaného monomerního konstruktů L2. Protože konstrukt L2 obsahuje ve své primární sekvenci jeden lichý cystein, je možné, že došlo k nesprávnému vzniku disulfidických můstků a ke vzniku špatně sbalených kovalentně spojených částic. Frakce 4 až 6 byly spojeny a zakoncentrovány pro další analýzu.

Výtěžek konstruktů L2 byl přibližně 0,5 mg z litru produkčního média, do tohoto množství jsou započítány pouze frakce gelové chromatografie neobsahující agregáty konstruktů L2.

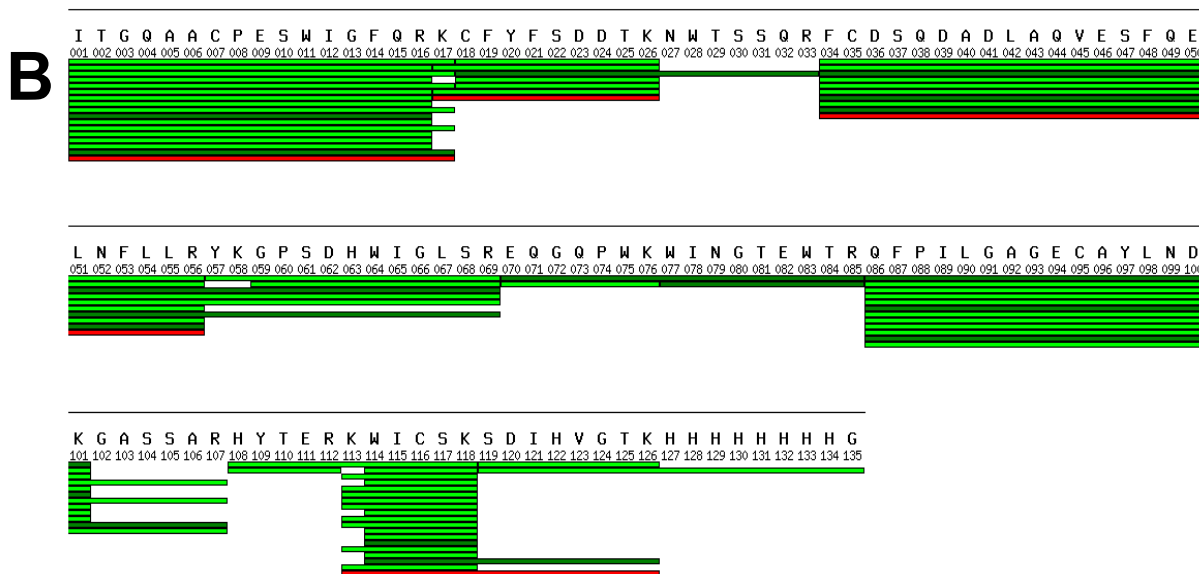
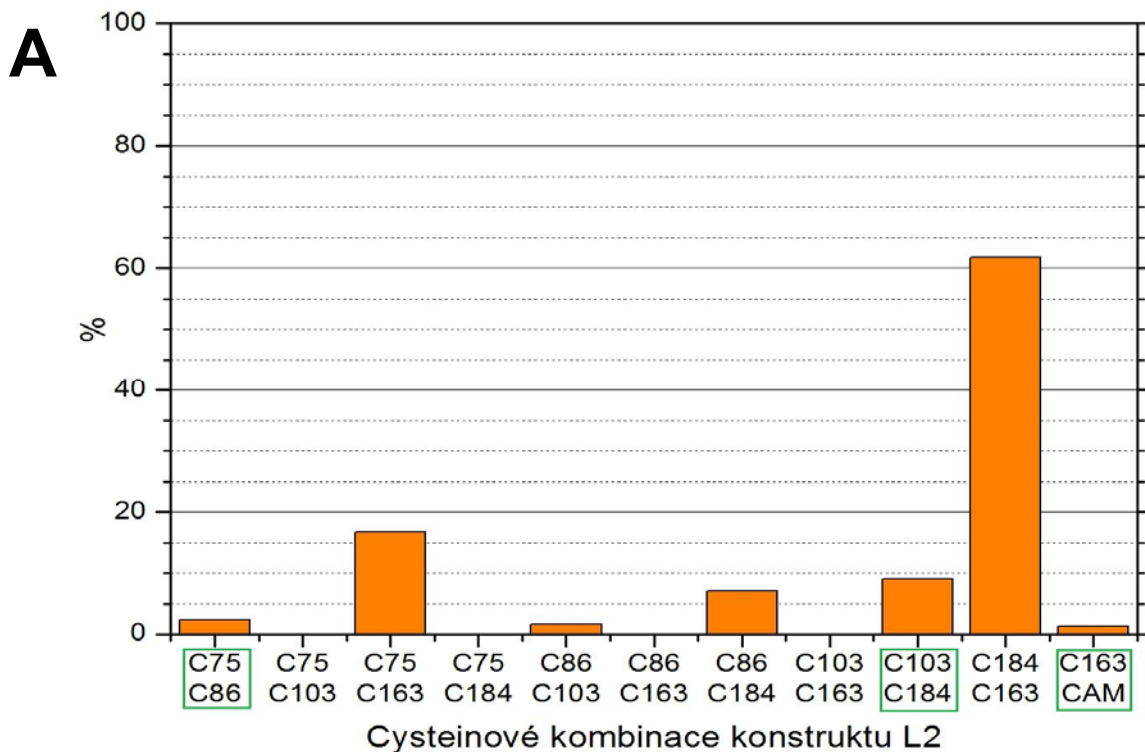
6.5. Mapování disulfidických vazeb rozpustné formy LLT1

Seznam všech identifikovaných a přiřazených hodnot m/z je uveden v příloze 10.1.

Pochyby o správném sbalení konstruktů L2, které mohlo být způsobeno přítomností lichého cysteinu v lektinové doméně respektive nesprávným utvořením disulfidických můstků, jsem se snažil objasnit užitím hmotnostní spektrometrie jako techniky pro mapování disulfidických spojení v proteinu. Postup práce je uveden v odstavci 5.4.4. Princip spočívá v přesném měření hmotnosti (m/z) peptidických štěpů daného proteinu v oxidativním prostředí. Přičemž přesnost měření musí být taková, aby byly rozlišitelné peptidy s oxidovanými a redukovanými cystickými zbytky. Dva peptidy kovalentně spojené disulfidem jsou hmotnostním spektrometrem zaznamenány jako jedna částice o hmotnosti součtu obou peptidů. Dekonvoluované monoisotopické hodnoty m/z jsou pak identifikovány na základě porovnání s *in silico* vytvořenými peptidovými štěpy.

Na základě porovnání s vyřešenými strukturami homologních C-lektinových receptorů NK-buněk (hCD69, mClrg) bylo predikováno disulfidové uspořádání C-lektinové domény receptoru LLT1 jako:

- Cys 75 – Cys 86
- Cys 103 – Cys 184
- Cys 163 – lichý nepárový cystein.



Obr. 15: Výsledky mapování disulfidických vazeb v konstrukt L2. Panel A – Graf zobrazující relativní porovnání součtu intenzit signálů identifikovaných disulfidicky spojených tryptických štěpů. 100% odpovídá součtu všech identifikovaných cystických peptidů. Do součtu byly zahrnuty disulfidicky spojené peptidy identifikované s chybou menší 3 ppm. Disulfidická konfigurace, která je ve shodě s predikcí je zvýrazněna **zeleným obdélníkem**. CAM – karboxyamidomethyl (značí volné sulfhydrylové skupiny původně v proteinu). **Panel B** – Diagram znázorňující pokrytí primární sekvence identifikovanými peptidy. Zde zobrazený diagram ukazuje 100% pokrytí při štěpení konstrukt L2 trypsinem. **Zeleně** jsou zobrazeny peptidy identifikované s chybou menší 3 ppm, **červeně** s chybou mezi 3 a 5 ppm.

Pro mapování disulfidických vazeb byl preparát konstruktů L2 elektroforeticky separován a vyříznuté části gelu byly štěpeny enzymy trypsinem nebo AspN. Deglykosylovaná, odsolená a nabohacená frakce peptidů pak byla změřena v systému LC-MS s FT-ICR detektorem. Při štěpení trypsinem i AspN dosaženo 100% pokrytí primární sekvence identifikovanými peptidy. Získané výsledky (viz. Obr. 15, str. 53) ukázaly na nehomogenní disulfidickou konfiguraci konstruktů L2. Tento výsledek je v naprosté neshodě s předpokladem a ukazuje na problémy při sbalování proteinu, způsobené nejspíše nepárovým cysteinem 163. Ve shodě s předpokladem je pouze zhruba 2 až 10% vzorku. Vedlejším výsledkem hmotnostně spektrometrické analýzy bylo zjištění, že obě predikovaná N-glykosylační místa – Asn 95 a Asn 147 jsou skutečně glykosylována.

6.6. Cílená mutagenese konstruktů L2

	10	20	30	40	50
<i>rClrb-WAG</i>	77 YAACPRNWIGVGNKCFYFSEYASNWTF	SQTFCKAQEAELARFDTEEELNFLSRYKGS	--	FD135	
<i>mClrg</i>	89 YAACSKNWTG VGNKCFYFSGYPRNWT	FAQAFMAQEAQLARFDNEEELIFLKRFGD	--	FD147	
<i>hLLT1</i>	72 QAACPESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTF	SQRFCDSQDADLAQVE SFQELNFLLRKGP	--	SD130	
<i>AICL</i>	33 -SLCPYDWIGFQNKCYFYSKEEGDWNSS	KYNCSTQHADLTIIDNIEEMNFLRRYKCS	--	SD90	
<i>hCD69</i>	82 VSSCEDWVG YQRKCFYFISTVKRSWT	SAQNACSEHGATLAVIDSEKDMNFKRYAGR	--	EE140	
<i>mNKR-P1A</i>	91 KLECPQDWLSHRDKCFHVSQVSN	TWEEGLVDCDGKCATLMLIQDQEELRFL	LDSIKEKYN	151	
<i>mNKR-P1C</i>	91 NLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSN	TWEEGQADCGRKGATLLLIQDQEELRFL	LDSIKEKYN	151	
<i>rNKR-P1B-WAG</i>	91 KLKCPKDWHSQDKCFHVSQAPNTW	NKSLADCGGKCATLMLIQDQEELRFL	RNLTKGKDR	151	
<i>rNKR-P1B-SD</i>	91 KLKCPKDWHSQDKCFHVSQTSIT	WKGLADCGGKCATLLLVQDQEELRFL	RNLTKRIS	151	
<i>KLRF1</i>	111 TVLCQSEWLKYQKCYWFSNEMK	SWSDSYVYCLERKSHLLIHDQLEMA	FIQKNLRQ	-LNY170	

	70	80	90	100	110	120
<i>rClrb-WAG</i>	136 YWIGLHRESSEHPWKWT	DNTQYN-YLSIRGVER---	YAYLNDIGISSARVYADKRW	CSR192		
<i>mClrg</i>	148 CWIGLHRESSEHPWKWT	NNTEYN-NMNPILGVGR---	YAYLSSDRISSSRSYINRM	WICSK204		
<i>hLLT1</i>	131 HWIGLSREQ-QPWK	WINGTEWT-RQFPILGAGE---	CAYLNDKGASSARHYTERK	WICSK186		
<i>AICL</i>	91 HWIGLKMAKN-RTGQ	VVDGATFT-KSFGMRGSEG---	CAYLSDDGAAATARCYTERK	WICRK146		
<i>hCD69</i>	141 HWVGLKKEPG-HP	WKWSNGKEFN-NWFNVTG	SDK---CVFLKNT	EVSSMECEKNLYWIC	NK196	
<i>mNKR-P1A</i>	152 FWIGLRYTLPDMN	NWKWINGSTLNSDVLKITG	DTENDSCAAISGDKVTF	ESCNSDNRWICQK	212	
<i>mNKR-P1C</i>	152 FWIGLRFYLPDMN	NWKWINGSTLNSDVLKITG	VTENGSCASILGDKVTF	ESCASDNRWICQK	212	
<i>rNKR-P1B-WAG</i>	152 FWIGLNYTLPDK	NWKWINSSTLNSDVL	SIFGDTKQNSCASISQDK	VLSESCSDNLWICQK	212	
<i>rNKR-P1B-SD</i>	152 FWIGLSYTL	SDEKWKWINGSTLNSDAL	NITGDEKDS	CASVSQDKVLSESCSD	NIWICQK212	
<i>KLRF1</i>	171 VWIGLNFTSLKMT	WTWVDGSPIDSKIFFIKG	PAKENS	CAAIKESKIFSETCSS	VFKWICQY231	

Obr. 16: Porovnáním primárních sekvencí homologních C-letinových receptorů NK-buněk. Na obrázku je zobrazeno sekvencí porovnání lektinových domén receptorů NK-buněk. Je patrné, že lze vyjma receptorů *rClrb-WAG*, *mClrg* a *LLT1* v lektinové doméně nalézt 6 cysteinů na konzervovaných pozicích v primární sekvenci těchto receptorů. Sekvence receptoru *LLT1* je podbarvena **růžově**. Cysteiny jsou podbarveny **zeleně**. Histidin 176 v primární sekvenci receptoru *LLT1* je podbarven **fialově**. Písmena: h (human), m (mouse) a r (rat) označují původ daných receptorů; WAG a SD - označení kmenů potkana [28].

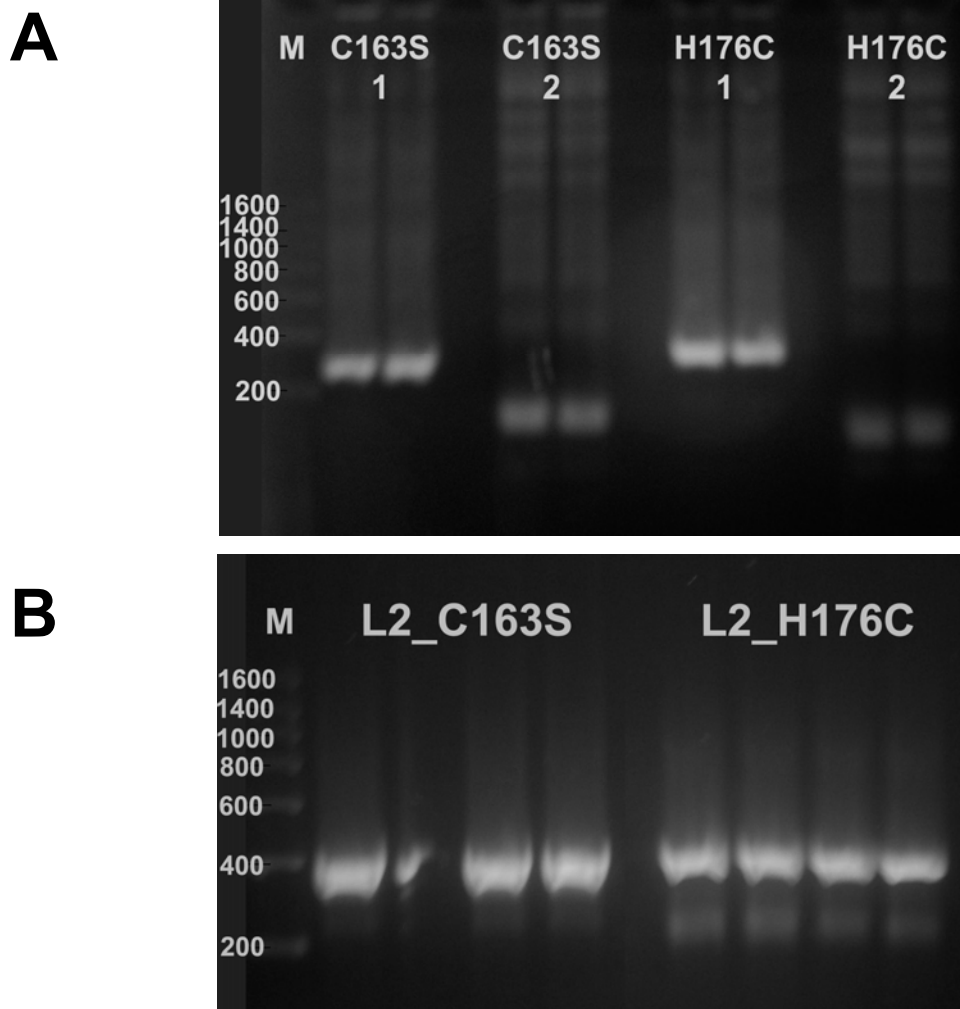
V další fázi této práce jsem se snažil vyřešit problém sbalování konstruktu L2 při expresi v savčích HEK293 buňkách. Z výsledků mapování disulfidických vazeb vyplynulo, že nepárový cystein 163 nejspíše interferuje při tvorbě predikované nebo aspoň jednotné disulfidové konfigurace. Porovnáním primárních sekvencí homologních C-letinových receptorů NK-buněk lze ukázat, že lektinová doména těchto receptorů obsahuje na šesti konzervovaných pozicích cysteiny (viz. Obr. 16, str. 54). Výjimkou jsou např. receptory rClrb-WAG a mClrg, které ve své primární sekvenci postrádají dva z konzervovaných cysteinů. Zvláštní výjimkou je pak receptor LLT1, který ve své primární sekvenci postrádá pouze jeden z konzervovaných cysteinů – a to na pozici 176, kde je namísto cysteinu histidin.

Na základě této sekvenční analýzy jsem se rozhodl pokusit se zamezit interferenci nepárového cysteinu 163 při sbalování proteinového konstruktu jednak jeho nahrazením za serin anebo obnovením zapojení cysteinu 163 do disulfidické vazby nahrazením histidinu v pozici 176 za cystein. Cílená mutageneze zmíněných aminokyselin byla provedena metodou PCR s prodlužováním přesahujících úseků podle postupu uvedeném v odstavci 5.1.12.

Pro záměnu cysteinu 163 za serin byl v první PCR amplifikován jednak úsek mezi přímým primerem konstruktu L2_Q72_FW a navrženým reverzním mutačním primerem L2_C163S_REV a také úsek mezi navrženým přímým mutačním primerem L2_C163S_FW a reverzním primerem konstruktu L2_V191_REV. Jako templát byla užitá plasmidová DNA pTT28_L2. Sekvence všech užitých primerů jsou uvedeny v odstavci 4.6. Tyto amplifikované úseky byly po přečištění pomocí agarosové elektroforézy spojeny ve druhé PCR a amplifikovány pomocí přímého a reverzního primeru konstruktu L2 (viz Obr. 17, str. 56). Získaný mutovaný inzert L2_C163S byl upraven pomocí enzymů AgeI a KpnI a pomocí T4 DNA ligasy vnesen do linearizovaného vektoru pTT28. Touto směsí byly poté metodou tepelného šoku transformovány bakterie *E. coli* DH5 α , které byly posléze vysety na misku s LB agarem obsahujícím ampicilin. V případě záměny histidinu 176 za cystein bylo postupováno analogicky, jako mutační primery byly užity L2_H176C_FW a L2_H176C_REV.

Na miskách vyrostly desítky kolonií, selekce byla provedena se třemi vybranými koloniemi z každé misky pomocí PCR z kolonií podle postupu v odstavci 5.1.7. s dvoutřetinovou úspěšností. Po jednom pozitivním klonu pTT28_L2_C163S a pTT28_L2_H176C bylo užito pro nízkoobjemovou přípravu plasmidové DNA podle

postupu v odstavci 5.1.8. Připravená plasmidová DNA byla předána *Laboratoři sekvenace DNA* na sekvenaci. Získaná nukleotidová sekvence inzertu byla porovnávána se známou nukleotidovou sekvencí receptoru LLT1 v databázi GenBank a potvrdila správnost sekvence inzertu s přítomnou cílenou mutací (viz. Obr. 18, str. 57).



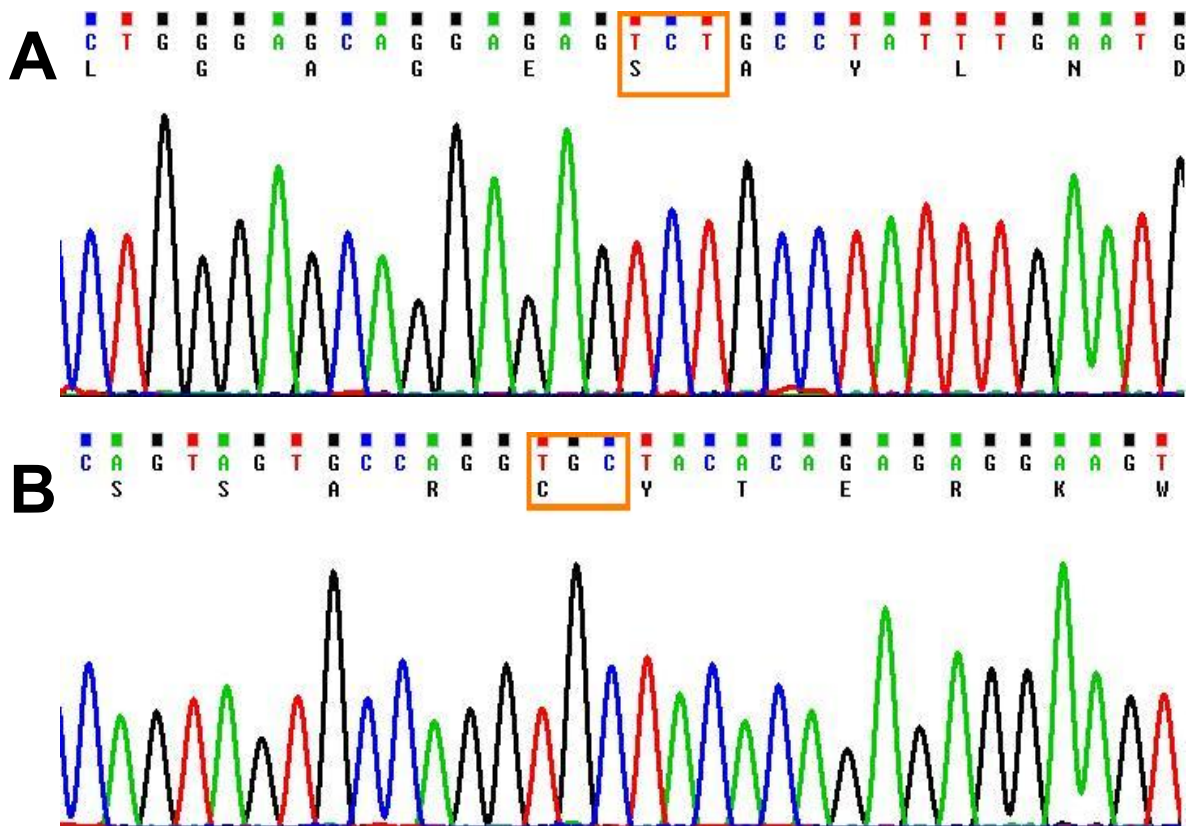
Obr. 17: PCR s prodlužováním přesahujících úseků. Panel A ukazuje fotografii agarosové elektroforézy produktů první PCR. Dráha **M** obsahuje standard v bp. Dubletní dráhy **C163S 1** a **2** obsahují amplifikované fragmenty se zavedenou mutací (C163S) a překrývajícími se úseky – předpokládaná velikost fragmentu **C163S 1** je 299 bp, **C163S 2** pak 110 bp. Analogicky je tomu pro dráhy **H176C 1** a **2**, ve kterých je předpokládaná velikost amplifikovaného fragmentu DNA 338 bp resp. 71 bp. **Panel B** ukazuje fotografii agarosové elektroforézy produktů druhé PCR. Dráha **M** obsahuje standard v bp. Kvartet drah **L2_C163S** a **L2_H176C** obsahuje amplifikované spojené fragmenty první PCR očekávané velikosti 384 bp.

Následovala velkoobjemová příprava expresních vektorů pTT28_L2_C163S a pTT28_L2_H176C podle postupu uvedeném v odstavci 5.1.10. Čistota a množství připravené plasmidové DNA byla určena měřením absorbance při vlnové délce 260 nm a 280 nm, výsledky jsou shrnuty v Tab. 2, str. 57.

Tab. 2: Výsledek velkoobjemové přípravy expresních vektorů s mutovaným konstruktem L2.

Vzorek	A ₂₆₀	A ₂₈₀	c [μg/μl]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
pTT28_L2_C163S	0,269	0,150	4,04	1,79
pTT28_L2_H176C	0,292	0,160	4,38	1,83

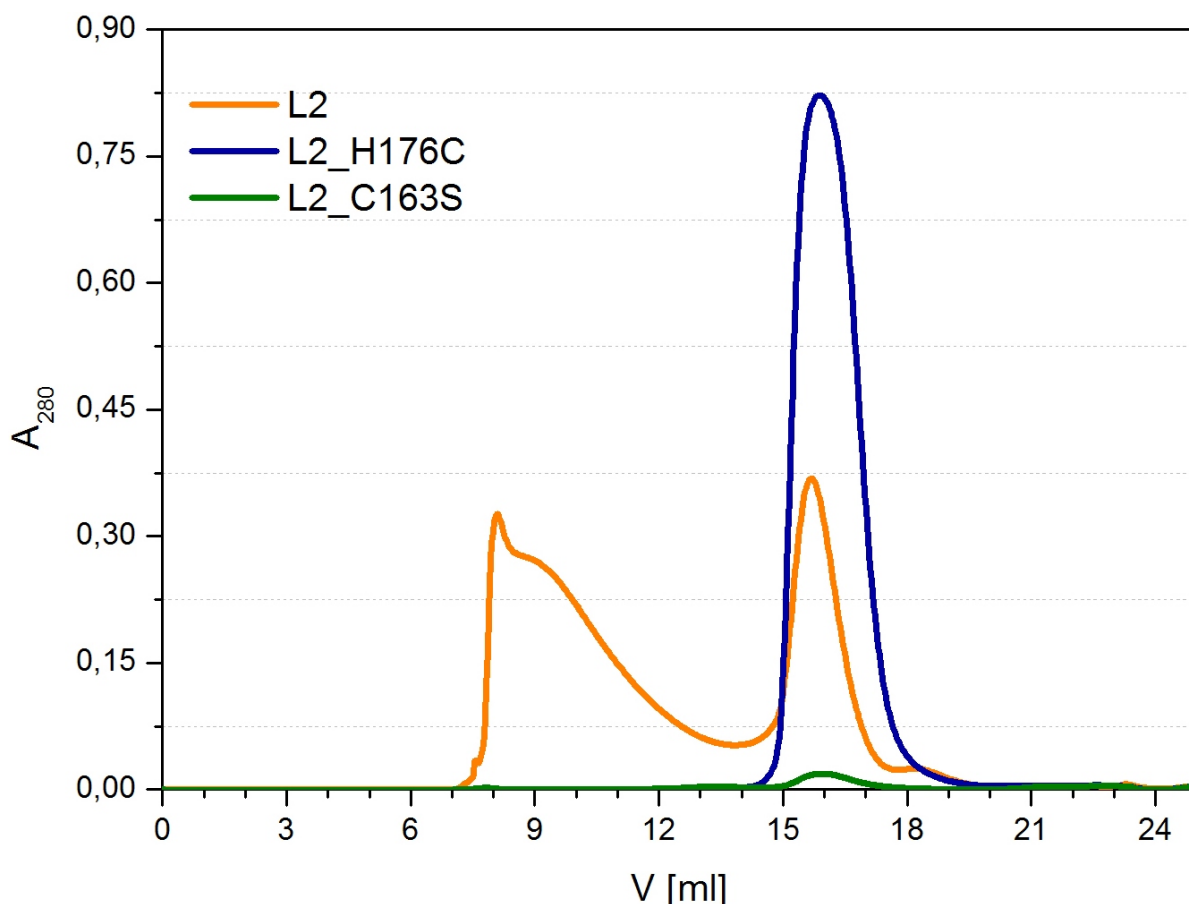
V průběhu této práce bylo kvůli spotřebě plasmidové DNA nutno velkoobjemou přípravu expresního vektoru pTT28_L2_H176C opakovat. Výsledky dalších takových příprav byly velmi podobné výsledku uvedenému v Tab. 2.



Obr. 18: Sekvenační ověření mutovaných inzertů. Panel A ukazuje úspěšné ověření zavedení cílené mutace C163S záměnou guaninu za cytosin v kodonu TGT (Cys) => TCT (Ser). Panel B ukazuje úspěšné ověření zavedení cílené mutace H176C záměnou nukleotidů v kodonu CAC (His) => TGC (Cys). Spodní část obrázků ukazuje průběh sekvenačního chromatogramu přímého řetězce od 5' konce ke 3' konci. Horní část obrázku ukazuje průběh stejného sekvenačního chromatogramu záznamem nukleotidové sekvence a jeho překlad do primární aminokyselinové sekvence ve správném čtecím rámci. Kodony obsahující mutaci jsou zvýrazněny **oranžovým obdélníkem**. Obrázky byly vytvořeny pomocí programu Chromas V 1.45.

6.7. Příprava mutovaných forem receptoru LLT1

Produkce mutovaných konstruktů L2_C163S a L2_H176C byla provedena stejně jako v případě konstruktů L2 (viz. 6.4.). Produkce proběhla v buňkách HEK293-6E (400 ml, počáteční hustota $1 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$), médium bylo sklizeno 6 dní po transfekci a připravený rekombinantní protein byl purifikován nejprve chelatační a následně gelovou permeační chromatografií podle výše popsaných standardních postupů.

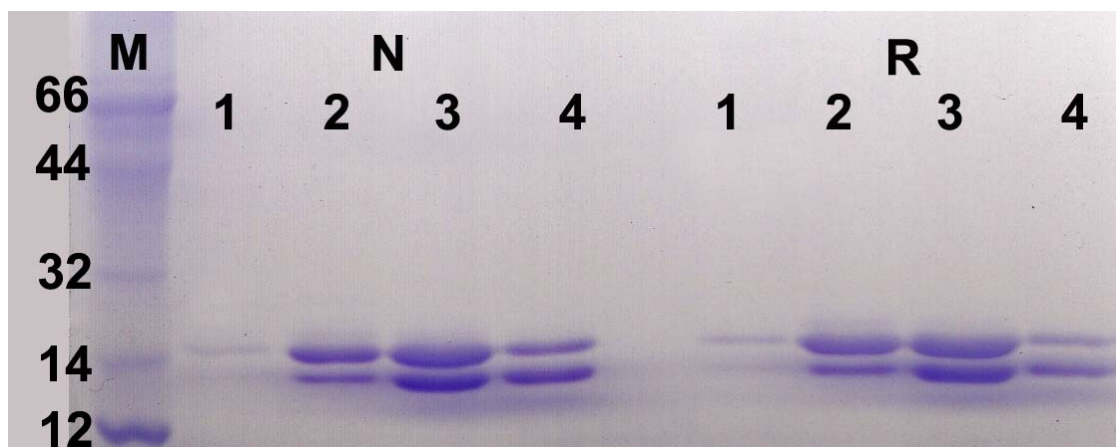


Obr. 19: Porovnání gelové permeační chromatografie nemutovaného a mutovaných konstruktů L2. Srovnání chromatogramů přirozeného konstruktů L2 (oranžově), mutovaného konstruktů L2_C163S (zeleně) a mutovaného konstruktů L2_H176C (modře). Je patrné, že konstrukt L2_C163S se nepodařilo připravit. Konstrukt L2_H176C naopak svým výtěžkem a homogenitou přesáhl přirozený konstrukt L2, na jehož chromatografickém záznamu je patrná přítomnost agregátů. Chromatografie probíhala na koloně Superdex 200 10/300 GL a její průběh byl monitorován měřením absorbance při 280 nm.

Chromatogram na Obr. 19 ukazuje porovnání výsledků posledního purifikačního kroku připravených mutovaných konstruktů L2_C163S a L2_H176C a přirozeného konstruktů L2. Tento výsledek ukazuje, že pokus o zamezení interference nepárového cysteinu 163 při sbalování proteinového konstruktů jeho nahrazením za serin dopadl

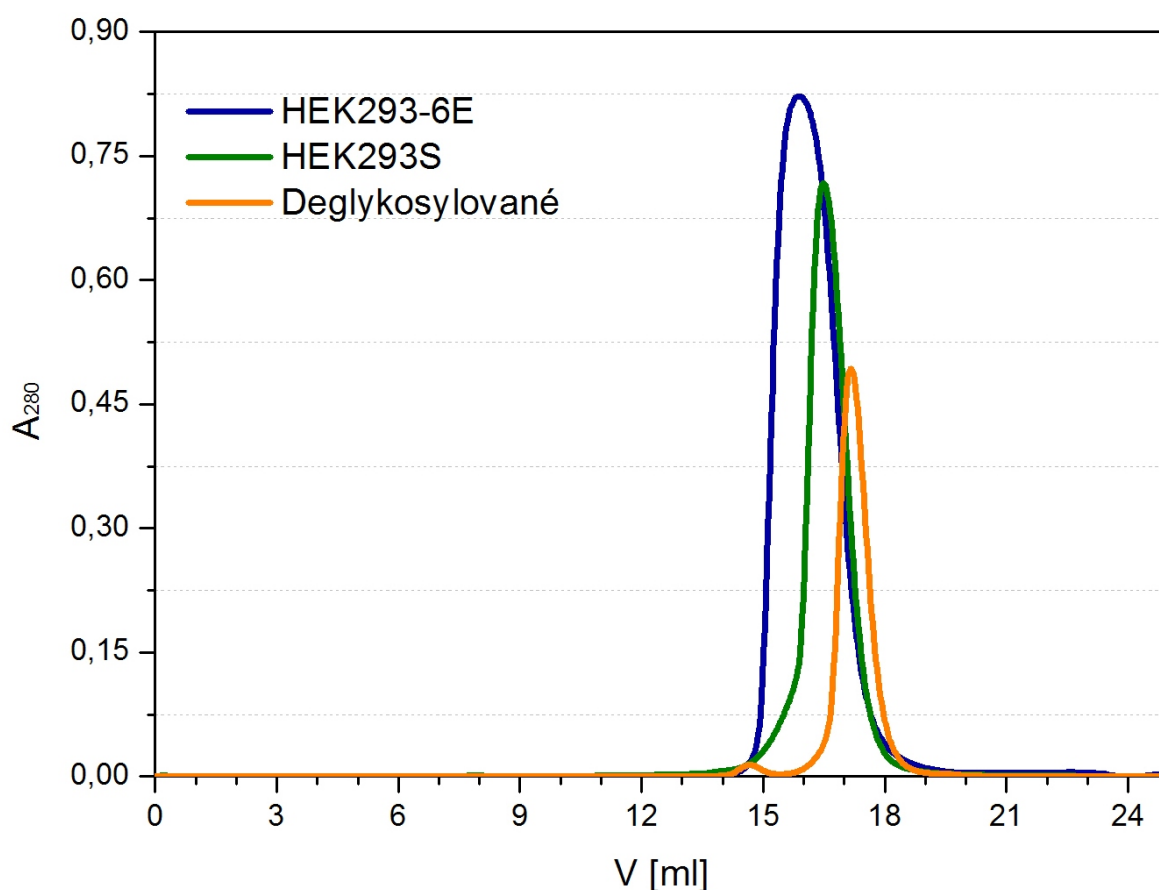
nepříznivě. Výsledný výtěžek konstruktů L2_C163S je prakticky zanedbatelný. Z toho můžeme usuzovat, že cystein na pozici 163 má v celém konstruktě strukturně stabilizační roli, a jeho záměnou za serin je mutovaný konstrukt L2_C163S destabilizován a degradován uvnitř buněk ještě před vlastní sekrecí do média.

Výsledek produkce mutovaného konstruktů L2_H176C naopak naznačuje, že „navrácení“ šestého cysteinu do C-lektinové domény má za následek její celkovou stabilizaci. Finální produkt vypadá na chromatogramu homogenně, nebyly zaznamenány agregované částice jako v případě přirozeného konstruktů L2. Výtěžek produkce konstruktů L2_H176C se standardně pohyboval kolem 3 mg/l produkce, což je zhruba šestinásobný nárůst oproti výtěžku přirozeného konstruktů L2 (cca 0,5 mg/l). Následná elektroforetická separace čtyř nasbíraných frakcí pokrývajících hlavní vrchol gelové chromatografie konstruktů L2_H176C ukázala, že preparát o předpokládané velikosti se nachází ve všech zmíněných frakcích ve dvou formách (viz. Obr. 20). Pravděpodobně se jedná o dvě různé glykoformy konstruktů L2_H176C, což potvrdila SDS-PAGE deglykosylovaného proteinu. Frakce byly proto spojeny a zakoncentrovány pro další analýzu.



Obr. 20: 15% SDS-PAGE frakcí gelové permeační chromatografie L2_H176C. Fotografie elektroforetické analýzy čtyř frakcí z gelové permeační chromatografie konstruktů L2_H176C. Je patrné, že ve všech frakcích se nachází pouze konstrukt L2_H176C (teoretická hmotnost proteinu je 16 kDa, ta je však dále zvýšena glykosylací - 2 predikovaná N-glykosylační místa), přičemž se vyskytuje ve dvou různých elektroforeticky separovaných formách. Pravděpodobně se jedná o dvě různé glykoformy téhož proteinu. Vzorky v dráhách jsou označeny číslem dané frakce a rozlišeny na neredukující (N) a redukující (R) část; dráha M obsahuje proteinový standard v kDa.

Kvůli spotřebě materiálu bylo nutno během této práce produkci konstruktu L2_H176C opakovat. Všechny produkce a purifikace probíhaly podle postupů popsaných v odstavcích 5.2. a 5.3. v buněčných liniích HEK293-6E, HEK293T nebo HEK293S. Pro krystalizační účely bylo také nutno deglykosylovat část preparátu pomocí enzymu Endo H_f. Následující chromatogram (viz. Obr. 21) ukazuje porovnání mezi produkcí konstruktů v buněčné linii HEK293-6E s přirozenou komplexní glykosylací, HEK293S s homogenní glykosylací jednoduchého manosového typu a deglykosylovaným konstruktům L2_H176C. Je patrné, že s vyšším stupněm omezení glykosylace klesá hydrodynamický poloměr částice konstruktu L2_H176C a retenční objem na koloně Superdex 200 10/300 GL roste.



Obr. 21: Porovnání různých glykosylačních stavů konstruktu L2_H176C. Graf ukazuje porovnání chromatogramů gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL konstruktu L2_H176C produkovaném s přirozenou komplexní glykosylací v buněčné linii HEK293-6E (**modře**), s homogenní glykosylací v buněčné linii HEK293S (**zeleně**) a tentýž protein deglykosylovaný pomocí enzymu Endo H_f (**oranžově**). Je patrné, že s ubývající komplexností glykosylace se retenční objem zvyšuje.

6.8. Mapování disulfidických vazeb mutované formy L2_H176C

Seznam všech identifikovaných a přiřazených hodnot m/z je uveden v příloze 10.1.

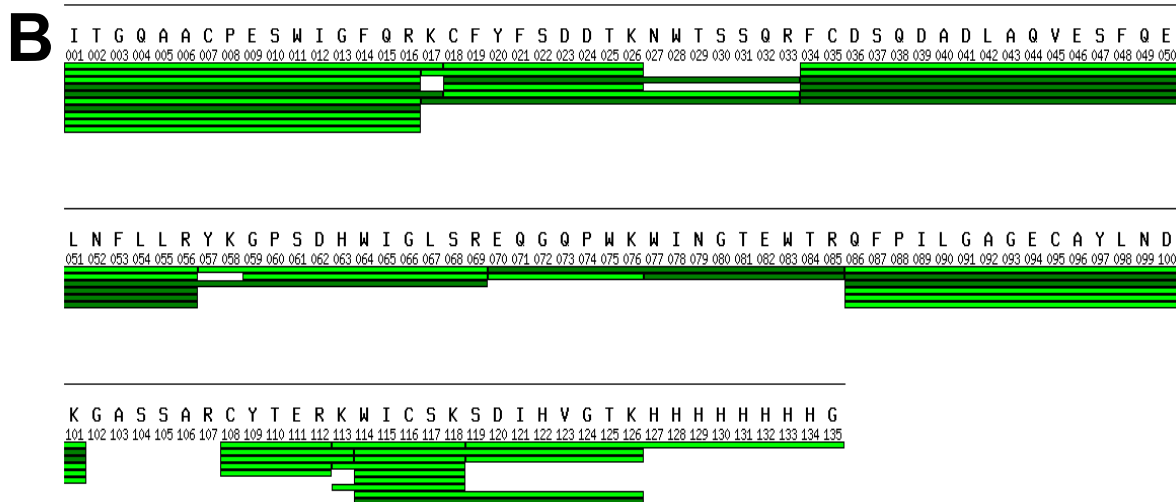
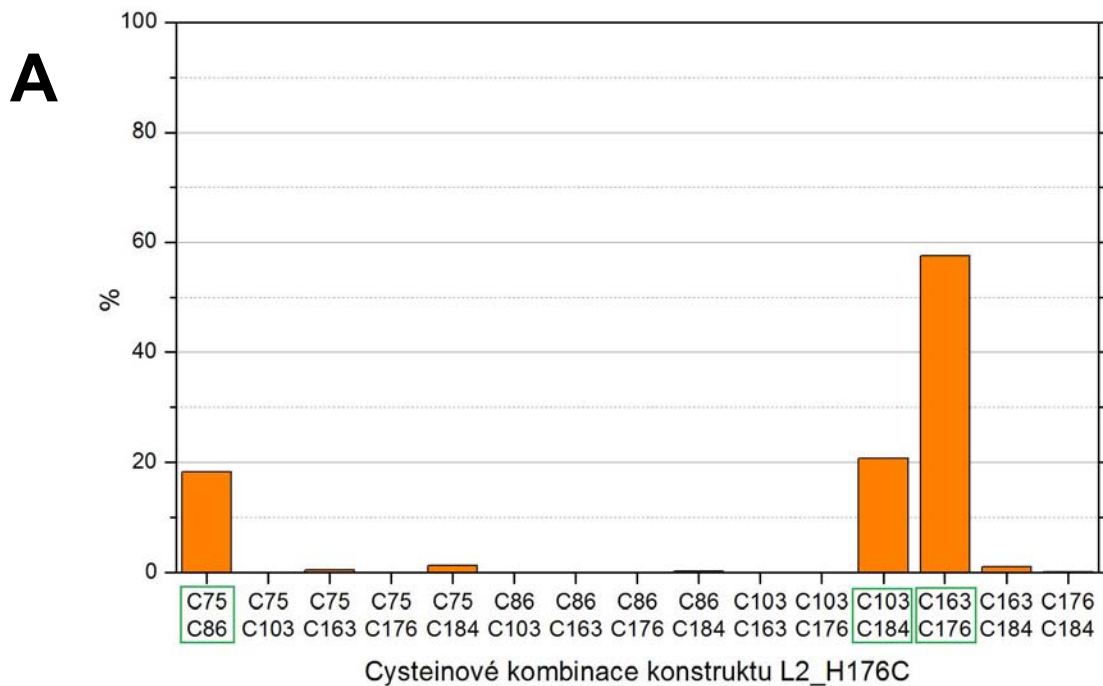
Pro objasnění disulfidové konfigurace úspěšně produkovaného konstruktu L2_H176C s přidaným cysteinem bylo analogicky jako v případě přirozeného konstruktu L2 užito hmotnostní spektrometrie. Postup práce je popsán v odstavci 5.4.4.

Preparát konstruktu L2_H176C byl elektroforeticky separován a vyříznuté části gelu byly štěpeny enzymy trypsinem nebo AspN. Deglykosylovaná, odsolená a nabohacená frakce peptidů pak byla změřena v systému LC-MS s FT-ICR detektorem. Při štěpení trypsinem bylo dosaženo 96% pokrytí primární sekvence identifikovanými peptidy, při štěpení AspN pak 100% pokrytí. Shrnující výsledkový graf (viz. Obr. 22, str. 62) ukazuje na homogenní disulfidickou konfiguraci konstruktu L2_H176C, která je ve shodě s předpokladem na základě porovnání s již vyřešenými strukturami homologních receptorů hCD69 a mClrg:

- Cys 75 – Cys 86
- Cys 103 – Cys 184
- Cys 163 – Cys 176.

Tento výsledek potvrzuje, že záměna histidinu na pozici 176 za cystein obnovila disulfidické spojení s cysteinem 163, čímž byla stabilizována lektinová doména a celkově byly odstraněny problémy způsobující výraznou nehomogenitu produkovaného konstrukt receptoru LLT1.

Výsledky hmotnostně spektrometrické analýzy konstrukt L2_H176C také potvrdily výsledek předešlé analýzy přirozeného konstrukt L2 v tom smyslu, že obě predikovaná N-glykosylační místa – Asn 95 a Asn 147 jsou skutečně glykosylována.

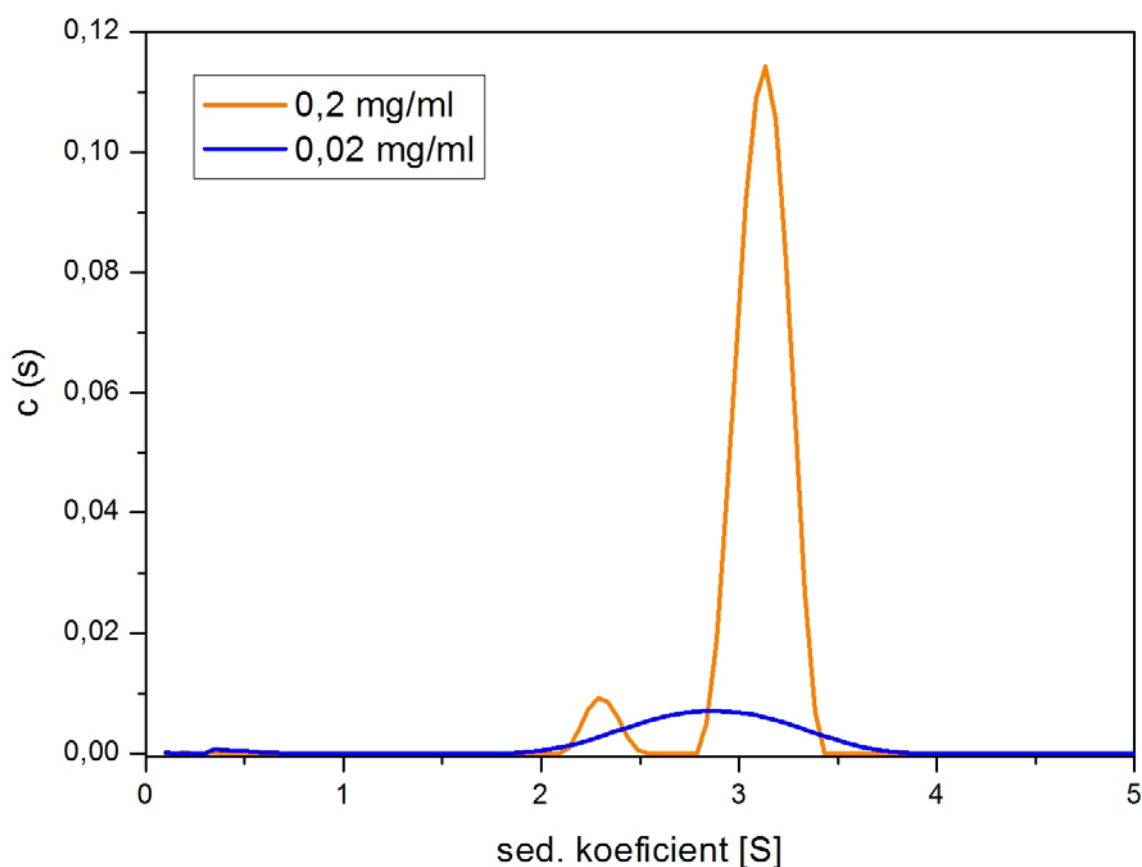


Obr. 22: Výsledky mapování disulfidických vazeb v konstruktě L2_H176C. Panel A – Graf zobrazující relativní porovnání součtu intenzit signálů identifikovaných disulfidicky spojených tryptických štěpů. 100% odpovídá součtu všech identifikovaných cystických peptidů. Do součtu byly zahrnuty disulfidicky spojené peptidy identifikované s chybou menší 3 ppm. Disulfidická konfigurace, která je ve shodě s predikcí je zvýrazněna **zeleným obdélníkem. Panel B – Diagram znázorňující pokrytí primární sekvence identifikovanými peptidy. Zde zobrazený diagram ukazuje 96% pokrytí při štěpení konstruktů L2_H176C trypsinem. **Zeleně** jsou zobrazeny peptidy identifikované s chybou menší 3 ppm.**

6.9. Analytická ultracentrifugace

Analýzu vzorků pomocí analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-I metodami sedimentační rychlosti a sedimentační rovnováhy a vyhodnocení výsledků provedl RNDr. Ondřej Vaněk, PhD.

Analýza přirozeně glykosylovaného vzorku L2_H176C metodou sedimentační rychlosti při koncentraci 0,2 mg/ml provedená podle postupu popsáném v odstavci 5.4.3.2. ukázala, že se protein při této koncentraci v roztoku vyskytuje převážně ve formě se sedimentačním koeficientem 3,14 S odpovídající nekovalentnímu dimeru a v minoritní formě se sedimentačním koeficientem 2,43 S odpovídající monomeru.

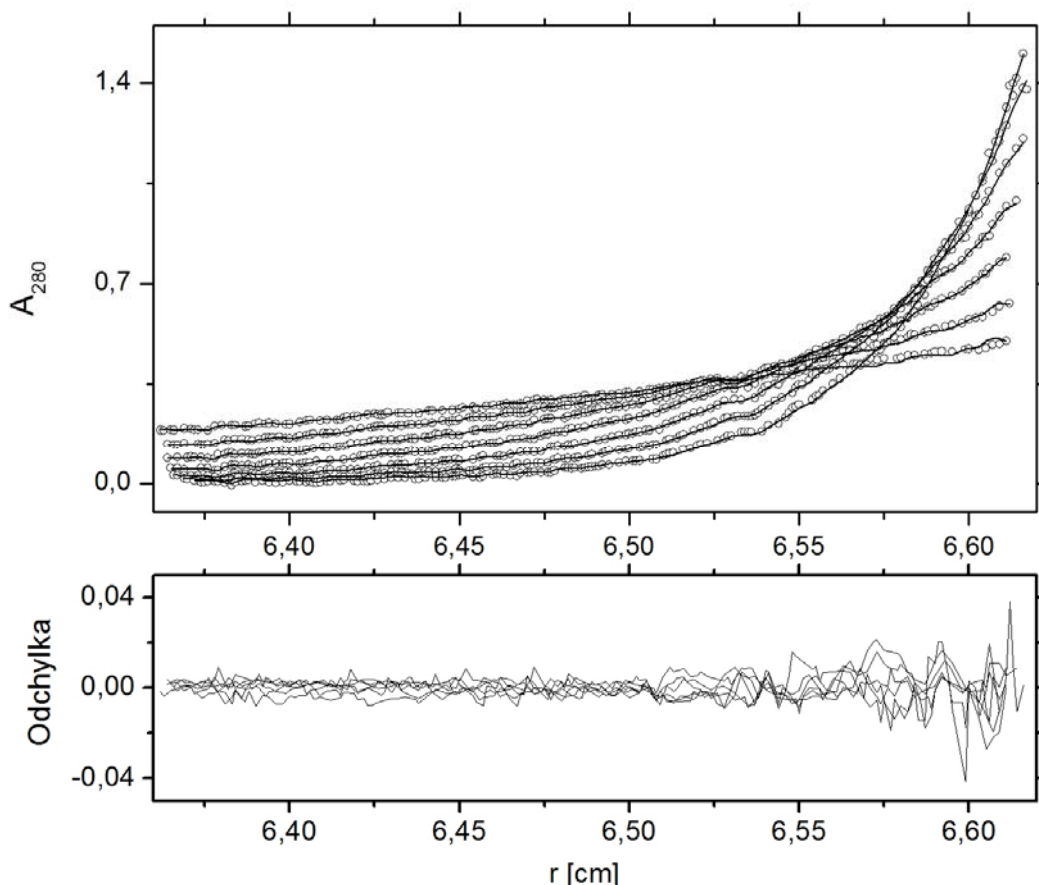


Obr. 23: Metoda sedimentační rychlosti - srovnání distribuce sedimentačního koeficientu. Graf ukazuje distribuci sedimentačního koeficientu při analýze přirozeně glykosylovaného vzorku L2_H176C metodou sedimentační rychlosti při dvou různých koncentracích proteinu – 0,2 mg/ml (oranžově) a 0,02 mg/ml (modře)

Pokus provedený s 10× zředěným vzorkem ukázal, že v této nižší koncentraci nelze rozlišit sedimentační koeficient jednotlivých forem monomeru a nekovalentního dimeru, tento systém se patrně již dostává do oblasti rovnováhy obou forem s „rovnovážným“

sedimentačním koeficientem 2,87. Obr. 23 na str. 63 ukazuje porovnání distribuce sedimentačního koeficientu v obou zmíněných pokusech.

Pro studium vlivu glykosylace na tvorbu nekovalentního dimeru konstruktu L2_H176C byl podle odstavce 5.4.3.1. proveden sedimentačně rovnovážný experiment s proteinem produkovaným v buněčné linii HEK293S (homogenní glykosylace) a s proteinem deglykosylovaným pomocí Endo H_f. U proteinu s homogenní glykosylací byla určena hmotnost 35494 Da ± cca 500 Da, což dobře odpovídá očekávané hmotnosti dimeru: 2 × 15661 Da (= 31334 Da) + 2 × 2 obsazená místa N-glykosylace HEK293S typu (-GlcNAc₂-Man₅ po 1217 Da) => 36191 Da, bez náznaku přítomnosti monomerní formy proteinu. Pro deglykosylovanou formu proteinu byla určena hmotnost 32366 Da ± cca 500 Da, což opět dobře odpovídá očekávané hmotnosti dimeru deglykosylovaného Endo H_f (32135 Da), bez náznaku přítomnosti monomeru. Sedimentační profil deglykosylované formy je na Obr. 24.



Obr. 24: Sedimentační profil deglykosylované formy L2_H176C. Roztok proteinu o koncentraci 0,09 mg/ml byl centrifugován při 12-15-18-21-24-27-30000 ot./min a jeho sedimentace sledována při 280 nm jako závislost absorpance na poloměru otáčení v rovnováze pro dané otáčky. Spodní část grafu ukazuje na kvalitu modelu rovnovážné sedimentace vyjádřenou odchylkou modelu od naměřených dat.

6.10. Krystalizace mutované formy L2_H176C

Pokusy o krystalizaci konstruktu L2_H176C započaly v dubnu 2011 mojí účastí na kurzu „Mammalian Expression Technologies“ pořádaném evropskou infrastrukturou P-CUBE v *Henry Wellcome Building for Genomic Medicine*, University of Oxford, UK.

Nejprve zde byla úspěšně provedena produkce a purifikace konstruktu L2_H176C ve výtěžku přibližně 3 mg. Produkce proběhla v buněčné linii HEK293T [83] v přítomnosti kifunensinu (inhibitor α -manosidasy I), díky kterému mají produkované proteiny zjednodušenou vysoce manosovou glykosylaci. Purifikace proběhla standardním způsobem popsáným v této práci. Pro gelovou permeační chromatografii byl použit pufr o složení 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5. Frakce po gelové permeační chromatografii ověřené SDS-PAGE byly spojeny a zakonzentrovány na 9,8 mg/ml. Polovina tohoto koncentrátu byla deglykosylována přidávkem enzymu Endo H_f [49] v hmotnostním poměru 1:200. S těmito preparáty bylo podle postupu v odstavci 5.5.1. připraveno 672 sedících 200 nl krystalizačních kapek na sedmi 96ti jamkových krystalizačních destičkách (viz. Tab. 3). Jelikož se jednalo o první krystalizační pokusy s tímto proteinem, byly jako krystalizační podmínky užity komerční optimalizační sady pro krystalizaci. Vývoj krystalizačních experimentů mohl být díky pravidelnému automatizovanému fotografování sledován prostřednictvím internetu.

Tab. 3: Krystalizace konstruktu L2_H176C v Oxfordu I. Preparát byl modifikován produkcí v prostředí kifunensinu nebo deglykosylován pomocí enzymu Endo H_f, výsledná koncentrace preparátu byla 9,8 mg/ml v pufru o složení 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5.

Stav glykosylace	Sada pro krystalizaci
Manosová - kifunensin	Crystal Screen HT
	PEG/ION HT
	Grid Screen PEG 6000
	Index HT
Deglykosylováno – Endo H _f 1:200	Crystal Screen HT
	Emerald Wizard Classic 1 a 2
	Index HT
	SaltRx HT

Zhruba po jednom měsíci naznačoval vývoj krystalizačních experimentů větší naději ke krystalizovatelnosti preparátu s jednoduchou glykosylací ošetřenou produkcí v prostředí kifunensinu. Podmínky ve kterých se objevoval mikrokrytalický precipitát

(viz. Tab. 4) jsem se pokoušel v *Laboratoři strukturní biologie*, ÚOCHB, AV ČR, v.v.i. optimalizovat z hlediska koncentrace srážedla, pH a přidané soli podle postupu popsáném v odstavci 5.5.2. Pro tuto optimalizaci jsem používal zbytek produktu z výše uvedeného kurzu (L2_H176C s vysoce manosovou glykosylací, 9,8 mg/ml, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5) a také protein L2_H176C s homogenní jednoduchou glykosylací produkovaný v buněčné linii 293S (dále jen L2_H176C_S), zakcentrovaný na 13,8 mg/ml v pufru o složení 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5. Vývoj krystalizačních experimentů této optimalizace končil nejlépe jako mikrokrystalický precipitát a nevedl k použitelným proteinovým monokrystalům.

Tab. 4: Krystalizační podmínky, v nichž se měsíc od nasazení objevoval mikrokrystalický precipitát.

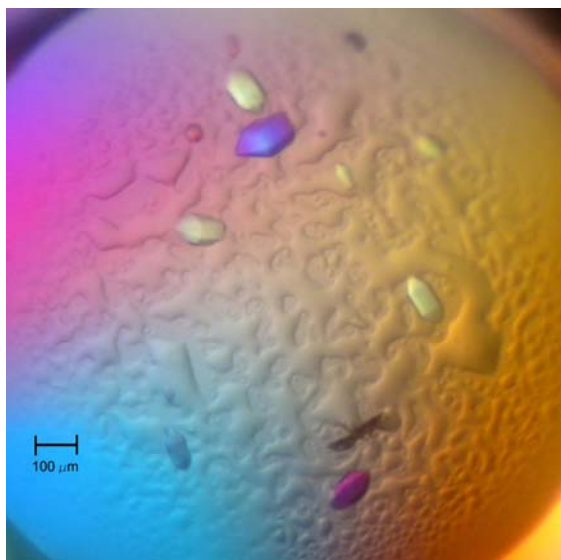
Užitý protein – L2_H176C s vysoce manosovou glykosylací (kifunensin); výsledná koncentrace preparátu byla 9,8 mg/ml v pufru o složení 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5.

Srážedlo	Sůl	Pufr
25% PEG 3350	0,2 M NH ₄ Ac	0,1 M HEPES, pH 7,5
25% PEG 3350	0,2 M MgCl ₂	0,1 M HEPES, pH 7,5
20% PEG 3350	0,2 M MgCl ₂	
20% PEG 3350	0,2 M KCl	
25% PEG 3350	0,2 M Na ₂ HPO ₄	

Během této doby byl v *Laboratoři strukturní biologie* s proteinem L2_H176C_S proveden také krystalizační experiment s komerční sadou pro krystalizaci JCSG+ Suite (*QIAGEN*, Německo) podle postupu uveden v odstavci 5.5.1. V jedné z krystalizačních podmínek tohoto pokusu byl po 14 dnech pozorován růst monokrystalů, jež se v polarizovaném světle jevíly barevné, což obvykle odpovídá krystalům proteinů, narozdíl od krystalů solí, které se většinou v polarizovaném světle jeví jen jako bezbarvé (viz. Obr. 25, str. 67). Podmínka měla toto složení:

- **40% PEG 300, 0,1 M citronan-fosfátový pufr, pH 4,2.**

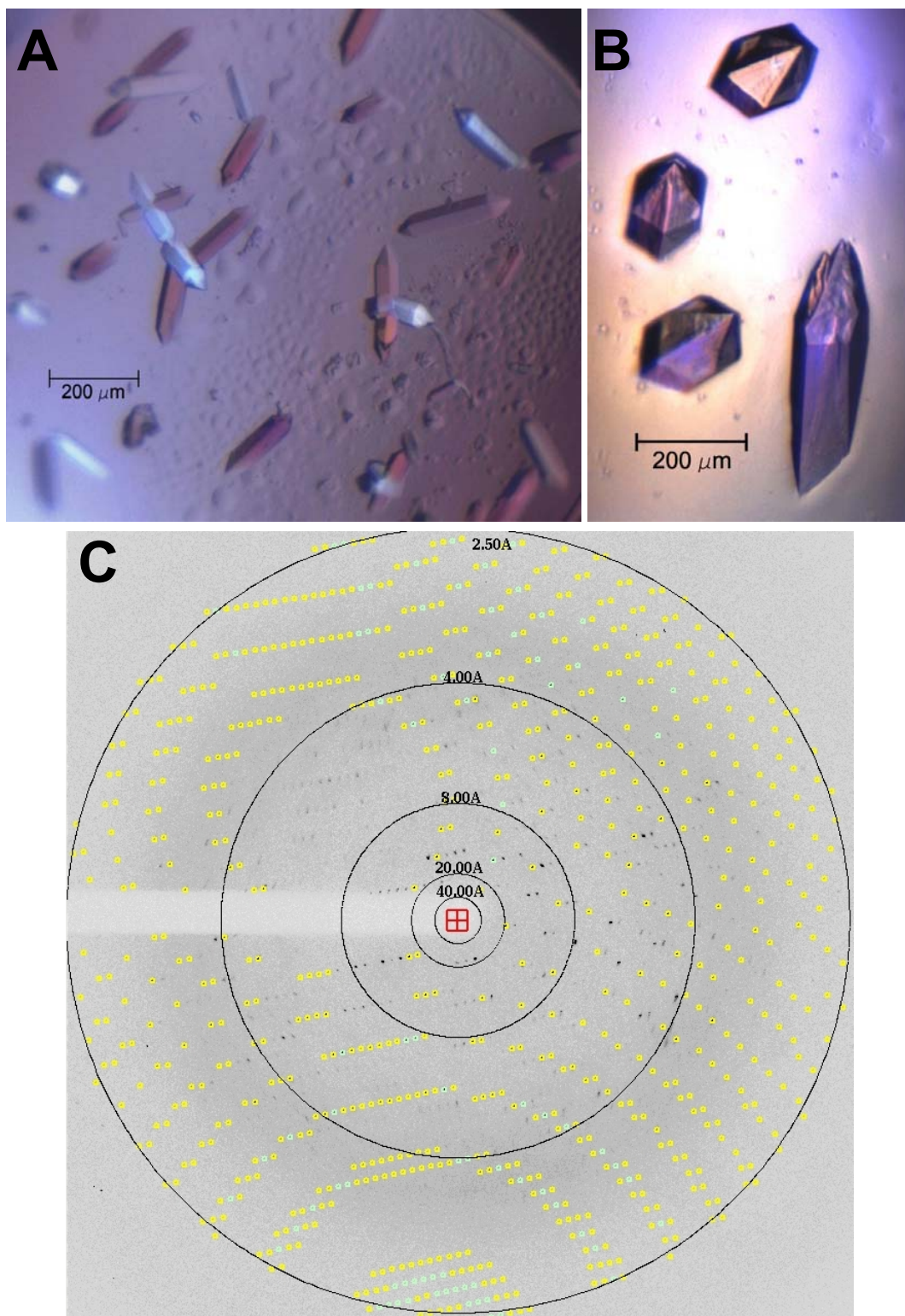
Podle postupu uvedeném v odstavci 5.5.3. bylo pod dohledem Ing. Jana Dohnálka, PhD. vyloveno a bez kryoprotekce zmrazeno v tekutém dusíku několik krystalů o velikosti zhruba 150 μm. Krystaly byly přirostlé k podkladu, od kterého musely být odříznuty. Následně byly pod dohledem Ing. Jan Dohnálka, PhD. otestovány na proteinovou difrakci v *Laboratoři rentgenové difrakce na monokrystalech* na místním difraktometru. Tento pokus potvrdil, že se jedná o krystaly proteinu, difrakce však byla detekována jen do 4 Å.



Obr. 25: První pozorované monokrystaly konstruktu L2_H176C receptoru LLT1. Tyto krystaly vyrostly po zhruba 14 dnech ze směsi proteinu L2_H176C o koncentraci 13,8 mg/ml v pufru o složení 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN_3 , pH 7,5 a podmínky z komerční sady pro krystalizaci JCSG+ Suite (*Hampton Research*, USA) o složení 40% PEG 300, 0,1 M citronan-fosfátový pufr, pH 4,2. Snímek je pořízen v polarizovaném světle. Měřítka znázorňuje vzdálenost 100 μm .

Růst těchto krystalů byl ve stejné podmínce reprodukován s rezervoárem připraveným z chemikálií dostupných v laboratoři (viz. 4.2). Protože krystaly měly v pokusech typu sedící kapka stále tendenci přirůstat k podkladu, pokoušel jsem se reprodukovat tento pokus také v kapkách visících. V obou typech krystalizačních pokusů se zárodky krystalů začaly objevovat nejdříve po jednom týdnu a svou velikost zvětšovaly přibližně jeden měsíc od nasazení kapky (viz. Obr. 26, str. 68). Největší (až 450 μm) a nejkvalitnější krystaly byly stejně jako v předešlém případě vyloveny z kapek a mrazeny bez kryoprotektantu v kapalném dusíku. Následné testování krystalů na difraktometru BTÚ, AV ČR, v.v.i. pod dohledem Ing. Jana Dohnálka, PhD. poskytlo proteinovou difrakci detekovanou do 3,5 Å.

Difrakci krystalů jsem měřil během 24.-25. 11. 2011 na zdroji synchrotronového záření BESSY II v Berlíně, experimentální podmínky jsou popsány v odstavci 5.5.5. Práce probíhala pod dohledem Ing. Jana Dohnálka, PhD. Výsledkem byly tři kompletní soubory difrakčních dat změřené na dvou krystalech s nejsilnější difrakcí detekovatelnou až do rozlišení 2,8 Å (viz. Obr. 26, str. 68).



Obr. 26: Krystaly konstruktu L2_H176C s homogenní glykosylací a jejich difrakce. Fotografie sedící (**Panel A**) a visící (**Panel B**) kapky s krystaly proteinu L2_H176C. Fotografie byly pořízeny v polarizovaném světle. Měřítka znázorňují vzdálenost 200 μm . **Panel C** ukazuje jednu z pořízených difrakčních fotografií těchto krystalů zpracovanou v programu HKL [84]. Soustředné kružnice ohraničují oblast difrakčního rozlišení v \AA . Žlutá a zelená kolečka označují úplné nebo částečné skvrny v rámci celého souboru difrakčních dat v souladu se zvolenou prostorovou grupou symetrie.

Přestože jsme v této fázi práce získali kvalitní difrakční data konstruktu L2_H176C, spekulovali jsme, že hlavním faktorem tlumícím rentgenovou difrakci je přítomnost glykosylace. Tento fakt je častým jevem v rentgenové krystalografii, i když samozřejmě vždy záleží na uspořádání oligosacharidu v krystalové mříži. Proto jsem ještě v listopadu 2011 využil mezinárodního přístupu („Trans-national access“) uděleného evropskou infrastrukturou P-CUBE, díky kterému jsem se mohl vrátit do *Henry Wellcome Building for Genomic Medicine*, University of Oxford, UK, pro nasazení komerčních optimalizačních sad pro krystalizaci s deglykosylovaným konstruktem L2_H176C.

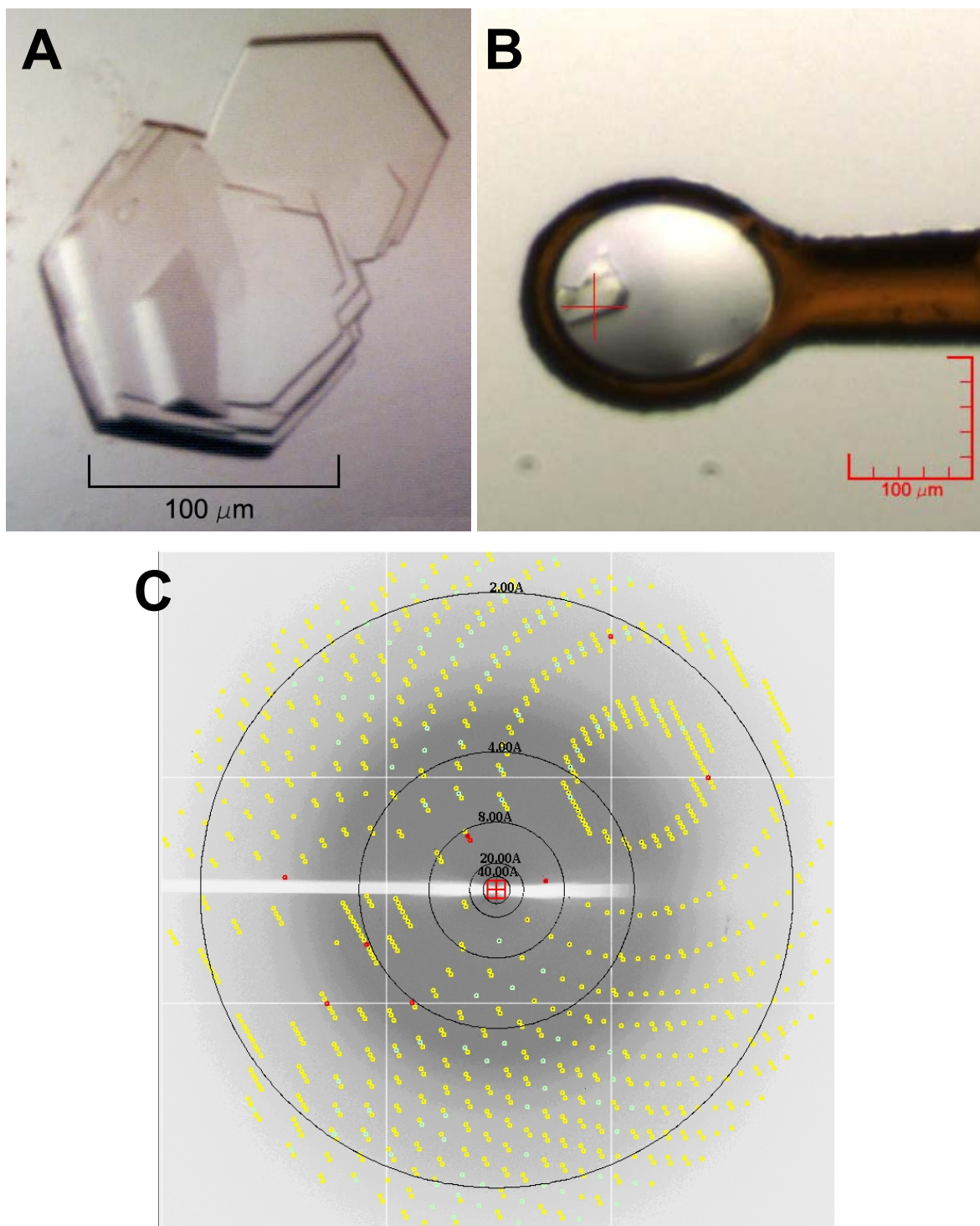
K preparátu L2_H176C_S produkovaném v domácí laboratoři (1,8 mg proteinu v 50 µl pufru 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5) byly přidány 2 µg enzymu Endo H_f. Směs byla ponechána inkubovat na ledu přes noc (zhruba 20 hod). Protože se ve směsi objevil jemný precipitát, bylo přidáno 50 µl 1 M roztoku L-argininu, díky čemuž se precipitát rozpustil. Roztok byl dále vyředěn 25 µl ddH₂O na konečnou koncentraci 13,5 mg/ml. S takto připraveným roztokem konstruktu L2_H176C_S bylo dle postupu v odstavci 5.5.1. připraveno 576 sedících 200 nl krystalizačních kapek na sedmi 96ti jamkových krystalizačních destičkách, použité sady pro krystalizaci jsou uvedeny v Tab. 5. Zhruba po dvaceti dnech se začaly v podmínce sady Index:

- **2 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M citrát sodný, pH 3,5**

objevovat krystaly tvaru pravidelných šestiúhelníků (viz. Obr. 27, str. 70). Dr. Karl Harlos krystaly zmrazil v tekutém dusíku s kryoprotekcí 25% glycerolem. Dále provedl 11. 03. 2012 s těmito krystaly měření rentgenové difrakce na zdroji synchrotronového záření Diamond light source, UK. Celkem pořídil dva kompletní soubory difrakčních fotografií s maximální rozlišením 2,05 Å (viz. Obr. 27, str. 70).

Tab. 5: Krystalizace deglykosylovaného konstruktu L2_H176C_S v Oxfordu II. Protein byl modifikován produkcí v buněčné linii HEK293S a deglykosylován pomocí enzymu Endo H_f, výsledná koncentrace preparátu byla 13,5 mg/ml v pufru o složení 400 mM L-arginin, 4 mM HEPES, 120 mM NaCl, 4 mM NaN₃.

Stav glykosylace	Sada pro krystalizaci
Deglykosylováno – Endo H _f 1:900	Index HT Crystal Screen HT PEG/ION HT Grid Screen PEG 6000 PACTpremier PEGRx HT

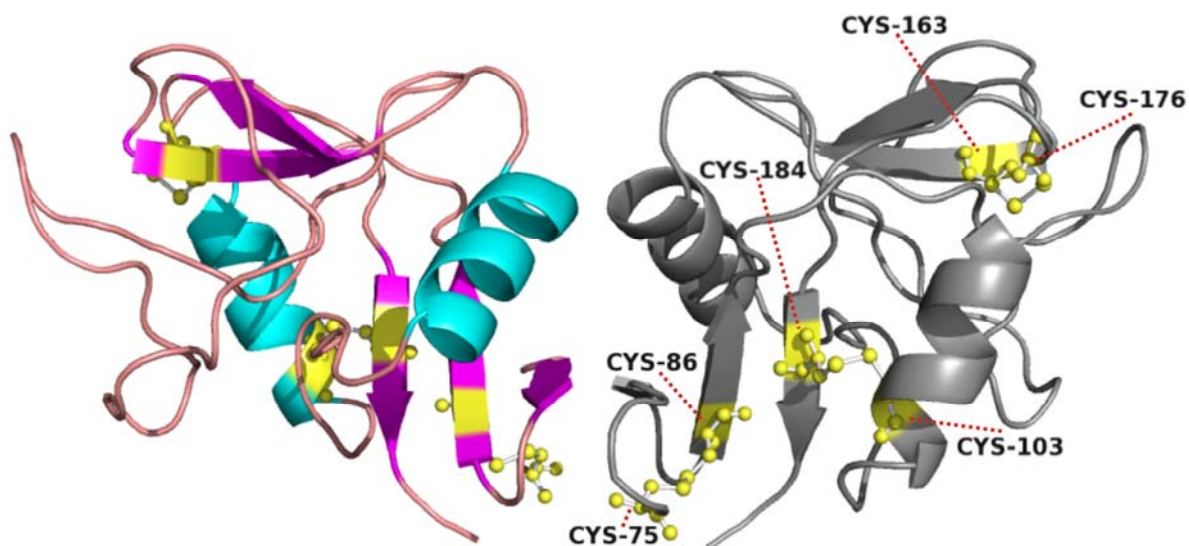


Obr. 27: Krystaly deglykosylovaného konstruktu L2_H176C_S a jejich difrakce. Fotografie krystalu v sedící kapce (**Panel A**) a vyloveného úlomku (**Panel B**), na kterém byla měřena difrakční data – červený kříž ukazuje místo do kterého byl zaměřen rentgenový paprsek. **Panel C** ukazuje jednu z pořízených difrakčních fotografií těchto krystalů zpracovanou v programu HKL [84]. Soustředné kružnice ohraničují oblast difrakčního rozlišení v Å. Žlutá a zelená kolečka označují úplné nebo částečné skvrny v rámci celého souboru difrakčních dat v souladu se zvolenou prostorovou grupou symetrie. Červená kolečka označují překrývající se nebo příliš intenzivní difrakční skvrny v tomto modelu.

6.11. Řešení struktury receptoru LLT1

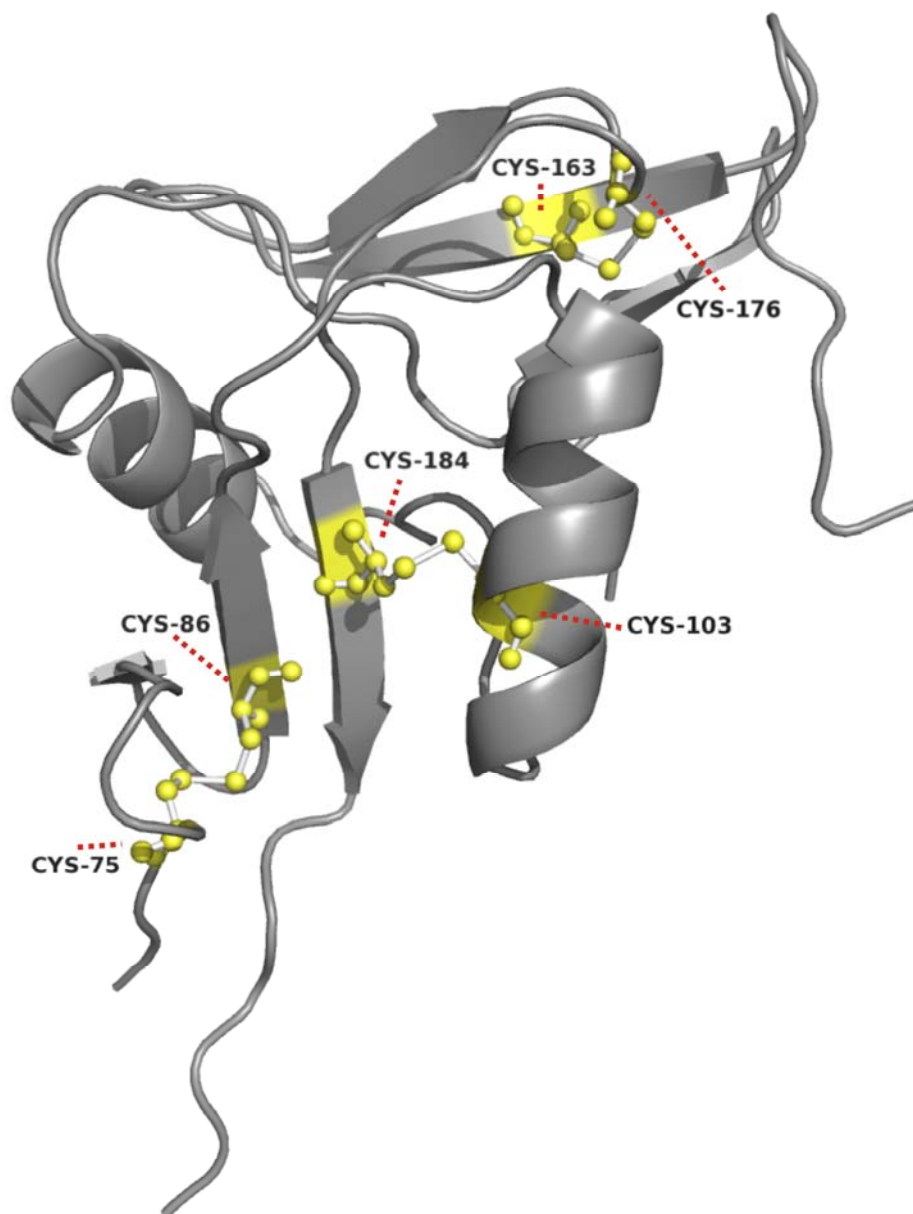
Všechna získaná difrakční data zpracovávala a prostorové modely vytvářela a rafinovala RNDr. Tereza Skálová, PhD., *Laboratoř strukturní analýzy biomakromolekul, ÚMCH AV ČR, v.v.i.* Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení s pomocí již vyřešené struktury příbuzného myšního receptoru Clrg [80].

V případě difrakčních dat získaných z krystalů konstruktu L2_H176C_S s homogenní glykosylací se ukázalo, že se jedná o směšnou difrakci dvou krystalových mřížek. Data se přesto podařilo separovat. Tyto krystaly patří do hexagonálního systému s prostorovou grupou symetrie $P6_3$. V asymetrické jednotce těchto krystalů se nachází nekovalentní dimer konstruktu L2_H176C. Prostorový model vytvořený na základě upřesněných map elektronových hustot je na Obr. 28.



Obr. 28: Krystalografický model struktury LLT1 I. Model byl vytvořen na základě difrakčních dat krystalů konstruktu L2_H176C_S s homogenní glykosylací RNDr. Terezou Skálovou, PhD. Obrázek ukazuje asymetrickou jednotku krystalu – nekovalentní dimer. V obou podjednotkách jsou disulfidická spojení vybarvena **žlutě** a znázorněna kuličkovým modelem. U podjednotky vpravo jsou pak označeny konkrétní cystická spojení (Cys75 – Cys86; Cys103 – Cys134; Cys163 – Cys176). Podjednotka vlevo je pak vybarvena podle prvků sekundárních struktur – **světle modře** α -helixy a **fialově** β -skládané listy. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.3 [85].

Difrakční data získaná z krystalů deglykosylovaného konstruktu L2_H176C_S ukázala, že tyto krystaly patří do trigonálního systému s prostorovou grupou symetrie $P3_221$. V asymetrické jednotce těchto krystalů se přitom nachází monomer konstruktu L2_H176C. Prostorový model vytvořený na základě upřesněných map elektronových hustot je na Obr. 29.



Obr. 29: Krystalografický model struktury LLT1 II. Model byl vytvořen na základě difrakčních dat krystalů deglykosylovaného konstruktu L2_H176C_S RNDr. Terezou Skálovou, PhD. Obrázek ukazuje asymetrickou jednotku krystalu – monomer. Disulfidická spojení jsou znázorněna **žlutě** kuličkovým modelem a participující cysteiny jsou označeny (Cys75 – Cys86; Cys103 – Cys184; Cys163 – Cys176). Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.3 [85].

7. Diskuse

Stěžejním cílem této práce bylo rekombinantní expresí připravit rozpustnou formu lidského receptoru LLT1. Metodou transientní transfekce lidských embryonálních ledvinných buněk 293 byla připravena extracelulární část tohoto receptoru. Protein ale z velké části agregoval a bližší analýza ukázala, že produkt nemá homogenní konfiguraci disulfidických můstků. I když je tento protein lidskými buňkami běžně vyráběn, je třeba si uvědomit, že připravena byla zkrácená forma tohoto receptoru, která ještě navíc zahrnuje 5 cysteinů. Navíc v transientně transfekovaných buňkách dochází ke zvýšené nefyziologické úrovni produkce tohoto proteinu. Tyto skutečnosti mohou souviset s problémy při sbalování proteinu vedoucí k neočekávané a nehomogenní disulfidické konfiguraci. Špatně sbalené proteiny jsou pak nestabilní a agregují. Podobného výsledku dosáhli i kolegové ze skupiny doktora J. Kamishikirya [29], když pozorovali nestabilitu a agregaci rozpustné formy receptoru LLT1 získaného renaturací z bakteriálních inkluzních tělísek.

Srovnání primárních sekvencí C-lektinových receptorů NK buněk ukázalo, že receptor LLT1 obsahuje ve své C-terminální doméně nepárový cystein v evolučně konzervované pozici – cystein 163. Evolučně konzervovaná pozice cystického partnera je ale v primární sekvenci LLT1 nahrazena histidinem 176. Tento poznatek vedl jednak k neúspěšné přípravě mutované formy receptoru LLT1 nahrazením cysteinu na pozici 163 za serin a dále k úspěšné přípravě mutované formy nahrazující histidin na pozici 176 za cystein.

Neúspěšná příprava mutovaného proteinu C163S naznačuje strukturně stabilizační roli tohoto cysteinu. V našem případě přípravy zkrácené formy receptoru LLT1 tento nepárový cystein tvoří preferenčně disulfidický můstek s cysteinem 184 dále pak s cysteinem 75. Tím pravděpodobně dochází k vytváření metastabilní formy tohoto receptoru, která se „úspěšně“ produkuje. V případě fyziologické produkce tohoto receptoru se domnívám, že jistou roli při skládání hraje přítomnost trasmembránového úseku, který může například znemožnit odklon N-koncové části C-terminální domény a zamezit tak tvorbě disulfidického můstku mezi cysteinem 163 a 184.

Zajímavou je sama přítomnost nepárového cysteinu v okolí histidinu. Tato skutečnost by mohla u jiných proteinů vzbuzovat dojem enzymaticky aktivního centra, ale u receptoru LLT1 nebyla žádná enzymatická aktivita dokázána. Mutovanou formu C163S

receptoru LLT1 se v savčích buňkách připravit nepodařilo, a i tato mutovaná forma připravená renaturací inkluzních tělísek má stejně jako přirozené LLT1 tendenci agregovat [29]. Na základě těchto faktů můžeme pouze spekulovat, že cystein 163 v blízkosti histidinu 176 má i bez vytvoření disulfidického můstku jistou strukturně stabilizační úlohu, nelze vyloučit ani možnost koordinace vícemocného iontu.

Příprava mutovaného proteinu H176C byla naopak úspěšná. Mapování disulfidických můstků potvrdilo obnovení disulfidického spojení mezi cysteiny 163 a 176 a celkovou homogenní konfiguraci disulfidických můstků, která je v souladu s již vyřešenými strukturami evolučně příbuzných C-lektinových receptorů NK buněk (např. lidský receptor CD69 nebo myší Clrg). Celkové zvýšení výtěžku dále napovídá, že obnovení třetího disulfidu stabilizovalo lektinovou doménu a byly tak odstraněny problémy při skládání proteinu v buňkách. Disulfidická spojení zmapovaná hmotnostní spektrometrií jsou pak potvrzena krystalografickými strukturami glykosylované i deglykosylované formy mutovaného LLT1 (viz. Obr. 28 a 29, str. 71 a 72).

Podobných výsledků opět dosáhli kolegové ze skupiny doktora J. Kamishikirya, když pozorovali nestabilitu a agregaci mutované formy C163S a naopak zvýšenou stabilitu mutované formy H176C. Při studiu těchto mutantů pomocí CD spektroskopie také ukázali, že záměna histidinu na pozici 176 za cystein nemá v porovnání s přirozenou formou LLT1 zásadní vliv na zastoupení prvků sekundárních struktur. A dále metodou povrchové plazmonové rezonance ukázali, že mutovaná forma receptoru LLT1 H176C rozpoznává svůj fyziologický ligand NKRP1 bez zásadního ovlivnění K_d komplexu [29]. Z těchto důvodů nebyly strukturní dopady cílené mutagenese v této práci dále ověřovány.

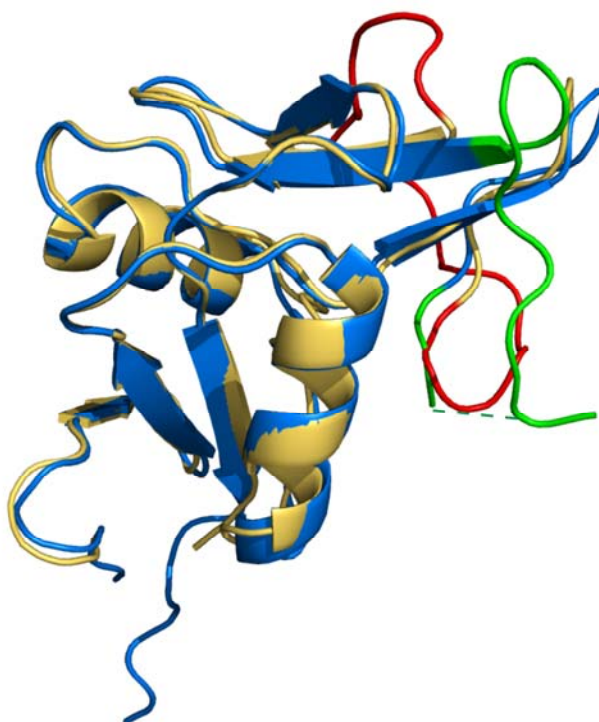
Lidský receptor LLT1 by měl vytvářet kovalentní dimer pomocí jednoho nebo dvou cysteinů v tzv. dimerizačním krčku. Jelikož připravená zkrácená forma tohoto receptoru neobsahuje další volný cystein, nemůže kovalentní dimer utvářet. Výsledky sedimentační analýzy pomocí analytické ultracentrifugace ale ukazují, že v roztoku se tato zkrácená forma receptoru vyskytuje v rovnováze nekovalentního dimeru a monomeru. Výsledky ze sedimentační rovnováhy dále ukazují, že na tvorbu nekovalentního dimeru nemá vliv stupeň glykosylace proteinu.

Připravená mutovaná forma receptoru LLT1 H176C byla úspěšně vykrytalizována a to ve dvou krystalových formách s různým stupněm glykosylace. Krystaly glykosylovaného proteinu poskytovaly slabší difrakci než krystaly deglykosylovaného

proteinu. Tato skutečnost může souviset s přítomností respektive nepřítomností oligosacharidů, ale také může jít o rozdíl na úrovni krystalové symetrie.

Analýza difrakčních dat poskytla modely struktury rozpustné mutované formy LLT1. V případě glykosylovaného proteinu se v asymetrické jednotce nacházel nekovalentní dimer (viz. Obr. 28, str. 74), v případě deglykosylovaného pak monomer (viz. Obr. 29, str. 75). Výsledky analytické ultracentrifugace ukazují, že stupeň glykosylace nemá na tvorbu nekovalentního dimeru v roztoku vliv, proto můžeme usuzovat, že oligomerii proteinu ovlivnilo chemické prostředí krystalizační podmínky. Výrazným rozdílem obou podmínek je přítom složka srážedla – v případě deglykosylovaného proteinu jím byl 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, v případě glykosylovaného 40% PEG 300.

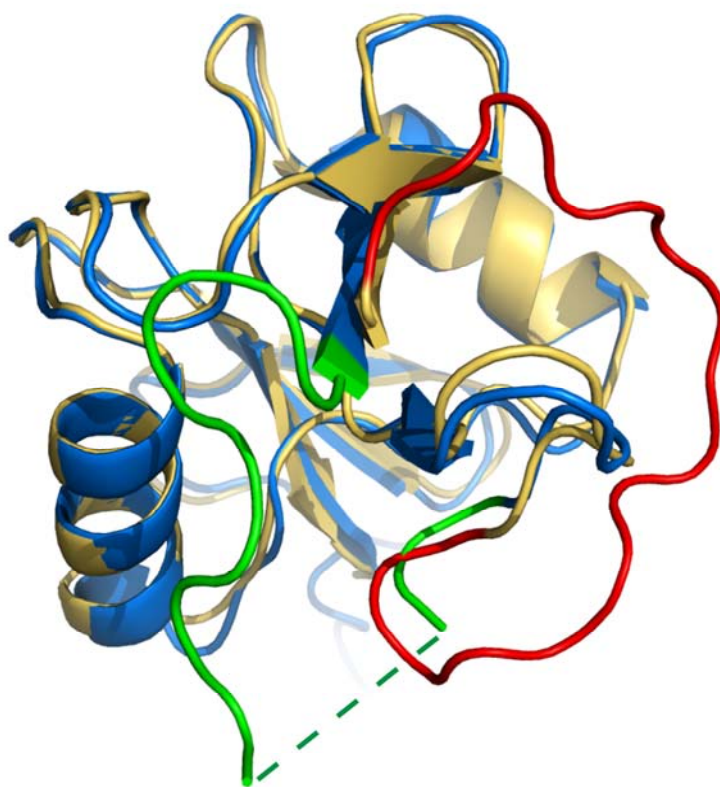
Další analýza získaných modelů struktur ukazuje (viz. Obr. 30, str. 78 a Obr. 31), že celkový průběh peptidové páteře a zastoupení prvků sekundárních struktur jsou podle očekávání velice podobné s jedinou výjimkou. Tu tvoří odlišné vedení osmnácti-



Obr. 30: Porovnání monomerů LLT1 z jeho dvou krystalových struktur. Porovnání je provedeno na základě minimálních vzdáleností C_α atomů homologních aminokyselin. Model deglykosylované mutované formy LLT1 je vybarven **modře**, glykosylované pak **žlutě**. Rozdílně vedená smyčka (K144 – G161) je u deglykosylované formy znázorněna **zeleně**, u glykosylované **červeně**. Scházející aminokyseliny (T149 – W151) jsou znázorněny přerušovanou čarou. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.3 [85].

aminokyselinové smyčky K144 – G161 odpovídající tzv. „long loop region“ oblasti CTLD (na Obr. 30, str. 75 a Obr. 31 odlišena červeně u glykosylovaného a zeleně u deglykosylovaného proteinu). Navíc mapa elektronové hustoty deglykosylovaného proteinu neposkytuje kompletní informaci o celé této smyčce, 3 aminokyseliny T149 - W151 v ní nejsou patrné (na Obr. 30, str. 75 a Obr. 31 naznačeno zelenou přerušovanou čarou). To poukazuje na neuspořádanost tohoto úseku v krystalu a naznačuje to flexibilitu celé smyčky obdobně jako v případě myšního receptoru NKRP1A (viz. Obr. 5 a 6, str. 17 a 19).

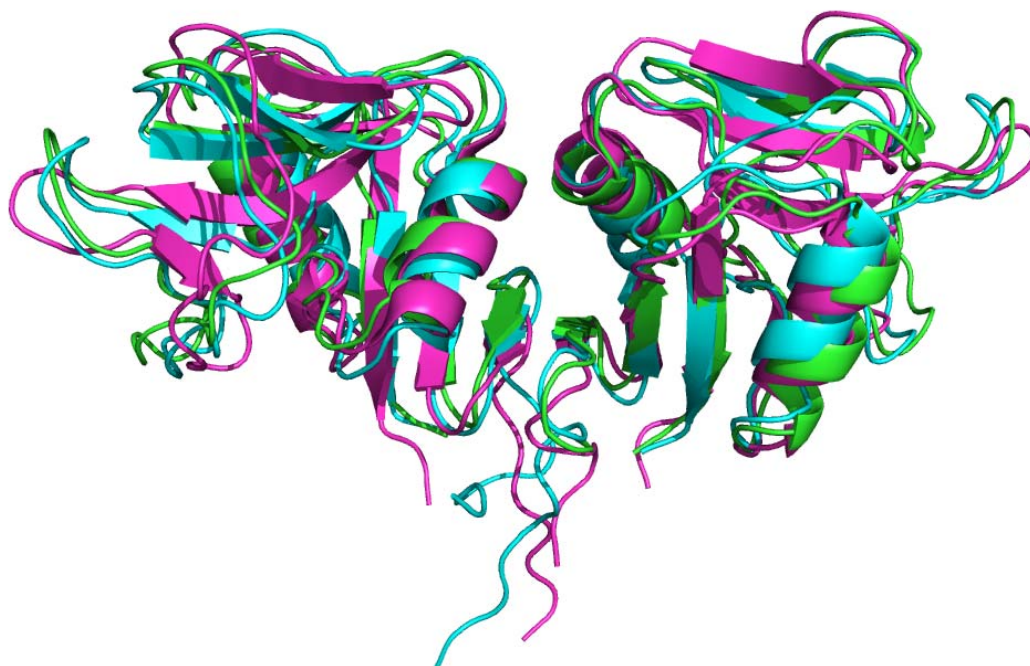
Srovnáme-li získané krystalové struktury s prostorovým uspořádáním příbuzných proteinů (viz. Obr. 32, str. 77), zjistíme, že průběh „sporné“ smyčky ve struktuře proteinů hCD69 a mClrg odpovídá průběhu smyčky v modelu dimerního glykosylovaného receptoru LLT1. To může naznačovat, že tato smyčka má jistou konformační volnost, ale



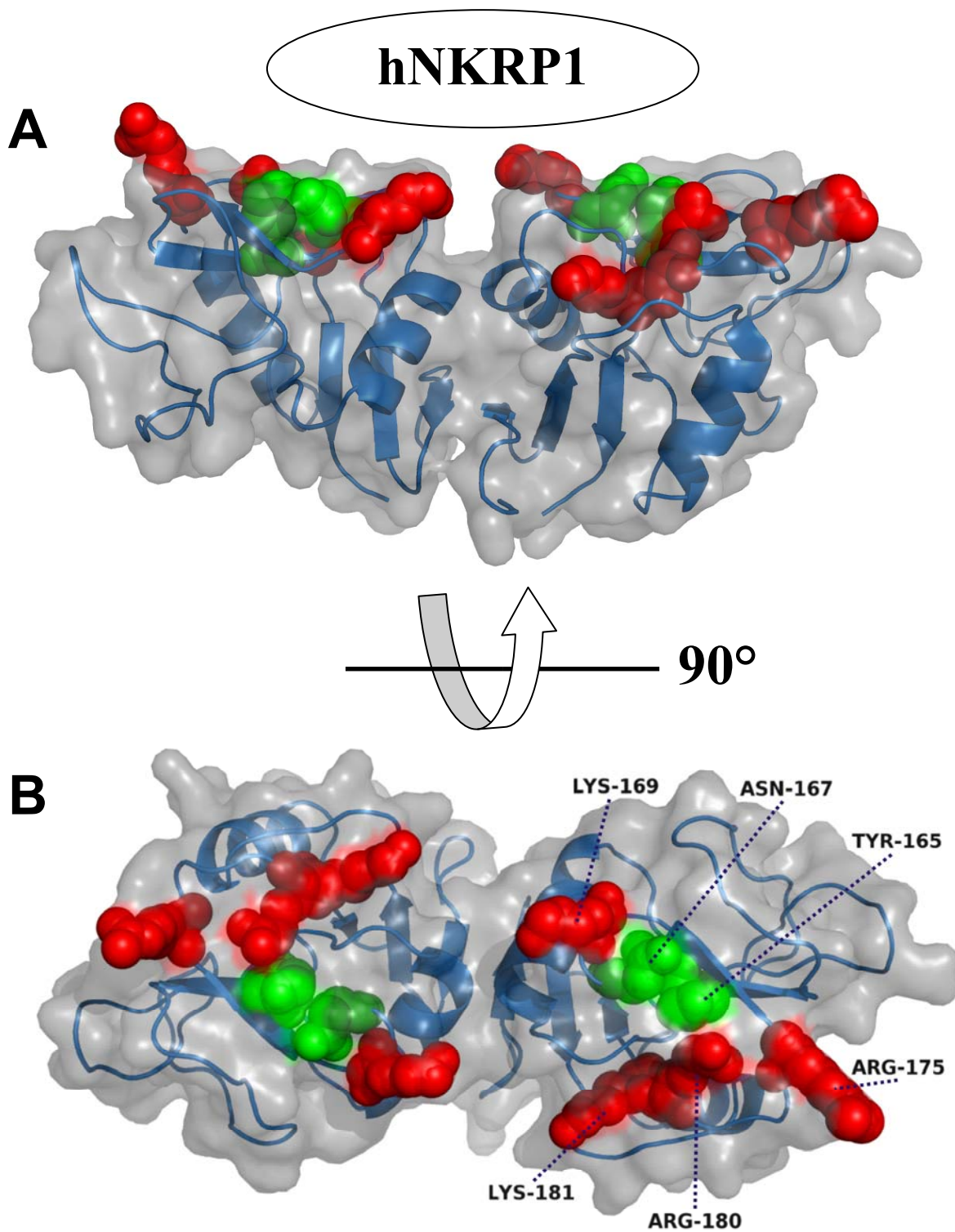
Obr. 31: Detail smyčky K144 – G161 v krystalových strukturách LLT1. Porovnání modelů glykosylované a deglykosylované formy LLT1 je provedeno na základě minimálních vzdáleností C_{α} atomů homologních aminokyselin. Model deglykosylované mutované formy LLT1 je vybarven **modře**, glykosylované pak **žlutě**. Rozdílně vedená smyčka (K144 – G161) je u deglykosylované formy znázorněna **zeleně**, u glykosylované **červeně**. Scházející aminokyseliny (T149 – W151) jsou znázorněny přerušovanou čarou. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.3 [85].

při fyziologické interakci s vazebným partnerem se uspořádává do podoby zachycené ve struktuře glykosylovaného LLT1. Z porovnání je dále patrné, že lektinová doména receptoru LLT1 je velice podobná oběma výše uvedeným receptorům. V monomerní jednotce nacházíme dva α -helixy a dva β -skládané listy. Srovnatelný je také celkový průběh peptidové páteře a dimerizační rozhraní. Není to však až tak překvapivé, neboť všechny tři receptory náleží do stejné CLEC2 rodiny genů v NKC genovém komplexu (oblast chromozomu sdružující geny pro lektinové receptory NK buněk [12]).

Skupina doktora J. Kamishikirya také pomocí cílené mutagenze identifikovala aminokyseliny receptoru LLT1 klíčové pro interakci s jeho fyziologickým ligandem NKRP1. Tyto můžeme rozdělit na aminokyseliny pro interakci nezbytné (K169, R175, R180 a K181) – jejich záměna zcela zrušila tvorbu komplexu, a na aminokyseliny interakci podporující (Y165 a N167) – jejich záměna tvorbu komplexu zeslabovala [29]. Obr. 33 na str. 78 ukazuje, že se tyto aminokyseliny skutečně nacházejí na předpokládaném interakčním rozhraní receptoru LLT1 – tedy na opačné straně než by byl transmembránový úsek, potažmo cytoplazmatická membrána buňky. Ani jedna z těchto aminokyselin se nenachází v oblasti konformačně flexibilní smyčky (K144 – G161).



Obr. 32: Srovnání krystalových struktur receptorů LLT1, hCD69 a mClrg. Na obrázku jsou porovnány modely dimerní glykosylované formy LLT1 (zelená), dimerní formy hCD69 (fialová, PDB: 3HUP) a dimerní formy mClrg (světle modrá, [80] PDB: 3RS1). Porovnání je provedeno na základě minimalizace vzdáleností C_{α} atomů homologních aminokyselin. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.3 [85].



Obr. 33: Detail vazebného miesta receptoru LLT1. Panel A a B ukazujú o 90° pootočený model glykosylované mutované formy receptoru LLT1 (**modře**) se znázorněným „Connollyho“ povrchem (**průsvitná šedá**). **Červenými** sférami jsou znázorněny aminokyseliny nezbytné pro interakci s fyziologickým ligandem NKRP1 (K169, R175, R180 a K181), **světle zelenými** pak aminokyseliny podporující interakci s NKRP1 (Y165 a N167) [29]. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.3 [85].

8. Shrnutí

- Byla připravena a purifikována extracelulární část lidského receptoru NK-buněk LLT1, v podobě konstruktů označeného jako L2 (Gln 72 – Val 191).
- Charakterizace konstruktů L2 ukázala nehomogenní zapojení disulfidických můstků a přítomnost oligosacharidů u obou N-glykosylačních míst.
- Byl připraven a purifikován mutovaný konstrukt L2_H176C (His 176 => Cys 176).
- Charakterizace konstruktů L2_H176C potvrdila úspěšnou strukturní stabilizaci obnovením disulfidického můstku mezi Cys 163 a Cys 176 a přítomnost oligosacharidů u obou N-glykosylačních míst.
- Konstrukt L2_H176C s homogenní glykosylací byl úspěšně vykrytalizován v hexagonálním krystalovém systému.
- Struktura konstruktů L2_H176C s homogenní glykosylací byla vyřešena do maximálního rozlišení 2,8 Å.
- Deglykosylovaný konstrukt L2_H176C byl úspěšně vykrytalizován v trigonálním krystalovém systému.
- Struktura deglykosylovaného konstruktů L2_H176C byla vyřešena do maximálního rozlišení 2,0 Å.

9. Seznam použité literatury

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S.: Cellular and molecular immunology, 7th Edition. Elsevier Saunders, USA (2011)
2. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie, 4. vydání. Triton, Praha (2009)
3. Degli-Esposti, M. A., Smyth, M. J.: Nat. Rev. Immunol. 5, 112-124 (2005)
4. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: Eur. J. Immunol. 5, 112-117 (1975)
5. Bambard, N. D., Mathew, S. O., Mathew, P. A.: Scand. J. Immunol. 71, 210-219 (2010)
6. Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M. J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., Braud, V. M.: J. Immunol. 175, 7791-7795 (2005)
7. Rosen, D. B., Cao, W., Avery, D. T., Tangye, S. G., Liu, Y. J., Houchins, J. P., Lanier, L. L.: J. Immunol. 180, 6508-6517 (2008)
8. Poggi, A., Rubartelli, A., Moretta, L., Zocchi, M. R.: Eur. J. Immunol. 27, 2965-2970 (1997)
9. Huarte, E., Cubillos-Ruiz, J. R., Nesbeth, Y. C., Scarlett, U. K., Martinez, D. G., Engle, X. A., Rigby, W. F., Pioli, P. A., Guyre, P. M., Conejo-Garcia, J. R.: Blood. 112, 1259-1268 (2008)
10. Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., Kiessling, R.: J. Immunol. 174, 6566-6569 (2005)
11. Di Santo, J. P.: Nat. Immunol. 9, 473-475 (2008)
12. Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F. M.: Nat. Rev. Immunol. 3, 304-316 (2003)
13. Lanier, L. L.: Annu. Rev. Immunol. 23, 225-274 (2005)
14. Barrow, A. D., Trowsdale, J.: Eur. J. Immunol. 36, 1646-1653 (2006)
15. Peterson, M. E., Long, E. O.: Immunity. 29, 578-588 (2008)
16. Koren, H. S., Amos, D. B., Kim, Y. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 5127-5131 (1978)
17. Zelensky, A. N., Gready, J. E.: FEBS J. 272, 6179-6217 (2005)
18. Karlhofer, F. M., Ribaldo, R. K., Yokoyama, W. M.: Nature 358, 66-70 (1992)
19. Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F. H.: J. Exp. Med. 173, 1017-1020 (1991)
20. Aust, J. G., Gays, F., Mickiewicz, K. M., Buchanan, E., Brooks, C. G.: J. Immunol. 183, 106-116 (2009)
21. Kolenko, P., Skálová, T., Vaněk, O., Štěpánková, A., Dušková, J., Hašek, J., Bezouška, K., Dohnálek, J.: Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 65, 1258-1260 (2009)
22. Dennehy, K. M., Klimosch, S. N., Steinle, A.: J. Immunol. 186, 657-661 (2011)

23. Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K. M., Schitteck, B., Steinle, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 5100-5105 (2010)
24. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. A., Warren, H. S., Lanier, L. L.: *J. Immunol.* 175, 7769-7799 (2005)
25. Germain, C., Bihl, F., Zahn, S., Poupon, G., Dumaurier, M. J., Rampanarivo, H. H., Padkjær, S. B., Spee, P., Braud, V. M.: *J. Biol. Chem.* 285, 36207-36215 (2010)
26. Hu, Y. S., Zhou, H., Myers, D., Quinn, J. M., Atkins, G. J., Ly, C., Gange, C., Kartsogiannis, V., Elliott, J., Kostakis, P., Zannettino, A. C., Cromer, B., McKinstry, W. J., Findlay, D. M., Gillespie, M. T., Ng, K. W.: *J. Bone. Miner. Res.* 19, 89-99 (2004)
27. Roth, P., Mittelbronn, M., Wick, W., Meyermann, R., Tatagiba, M., Weller, M.: *Cancer Res.* 67, 3540-3544 (2007)
28. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=lalign&context=protein>;
citováno 5. 4. 2012
29. Kamishikiryo, J., Fukuhara, H., Okabe, Y., Kuroki, K., Maenaka, K.: *J. Biol. Chem.* 286, 23823-23830 (2011)
30. Schmidt, F. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 363-372 (2004)
31. de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P., de Vos, W. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3662-3667 (1996)
32. Mrázek, H., Benada, O., Man, P., Vaněk, O., Křen, V., Bezouška, K., Weignerová, L.: *Protein Expr. Purif.* 81, 106-114 (2012)
33. Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., Madden, K. R.: *Mol. Cell. Biol.* 5, 3376-3385 (1985)
34. Loomis, K. H., Rockwell, C. R., Sternard, H. D., Yaeger, K. W., Novy, R. E. jr.: *Expression systems.* Scion Publishing Ltd., USA (2007)
35. Niimi, T.: *Methods. Mol. Biol.* 824, 307-315 (2012)
36. Walsh, G.: *Nat. Biotechnol.* 9, 917-924 (2010)
37. Lanzavecchia, A., Corti, D., Sallusto, F.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 523-528 (2007)
38. Kim, J. Y., Kim, Y. G., Lee, G. M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 917-930 (2012)
39. Chen, W., Cao, W., Zhao, H., Hu, Q., Qu, L., Hu, S., Ge, J., Wen, Z., Wang, X., Li, H., Huang, K., Bu, Z.: *Cytokine.* 54, 324-329 (2011)
40. Skloot, R.: *The immortal life of Henrietta Lacks.* Crown publishing group, USA (2010)
41. Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T.: *Cancer. Res.* 59, 141-150 (1999)

42. Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H. G., Kohara, A., MacLeod, R. A., Masters, J. R., Nakamura, Y., Reid, Y. A., Reddel, R. R., Freshney, R. I.: *Int. J. Cancer.* 127, 1-8 (2010)
43. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R.: *J. Gen. Virol.* 36, 59-74 (1977)
44. Graham, F. L., van der Eb, A. J.: *Virology.* 52, 456-467 (1973)
45. Girard, P., Derouazi, M., Baumgartner, G., Bourgeois, M., Jordan, M., Jacko, B., Wurm, F. M.: *Cytotechnology.* 38, 15-21 (2002)
46. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., Baltimore, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 8392-8396 (1993)
47. Durocher, Y., Perret, S., Kamen, A.: *Nucleic Acids Res.* 30, E9 (2002)
48. Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R., Khorana, H. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 13419-13424 (2002)
49. Chang, V. T., Crispin, M., Aricescu, A. R., Harvey, D. J., Nettleship, J. E., Fennelly, J. A., Yu, C., Boles, K. S., Evans, E. J., Stuart, D. I., Dwek, R. A., Jones, E. Y., Owens, R. J., Davis, S. J.: *Structure.* 15, 267-273 (2007)
50. Grueninger-Leitch, F., D'Arcy, A., D'Arcy, B., Chène, C.: *Protein Sci.* 5, 2617-2622 (1996)
51. Chang, V. T.: *Workshop on mammalian expression technologies*, Oxford, UK (2011)
52. Elbein, A. D., Tropea, J. E., Mitchell, M., Kaushal, G. P.: *J. Biol. Chem.* 15, 15599-15605 (1990)
53. Davis, S. J., Puklavec, M. J., Ashford, D. A., Harlos, K., Jones, E. Y., Stuart, D. I., Williams, A. F.: *Protein Eng.* 6, 229-232 (1993)
54. Vaněk, O., Bezouška, K.: *Chem. Listy.* 104, 1155-1162 (2010)
55. Obšil, T.: *Biofyzikální chemie, přednáška na PřF UK, Katedra biochemie, Praha* (2010)
56. Rupp, B.: *Biomolecular crystallography*. Garland Science, USA (2010)
57. Mitra, K., Frank, J.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 299-317 (2006)
58. Lander, G. C., Tang, L., Casjens, S. R., Gilcrease, E. B., Prevelige, P., Poliakov, A., Potter, C. S., Carragher, B., Johnson, J. E.: *Science.* 312, 1791-1795 (2006)
59. Riek, R., Pervushin, K., Wüthrich, K.: *Trends Biochem. Sci.* 25, 462-468 (2000)
60. Wider, G., Wüthrich, K.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 594-601 (1999)
61. Rozbeský, D., Man, P., Kavan, D., Chmelík, J., Černý, J., Bezouška, K., Novák, P.: *Anal. Chem.* 84, 867-870 (2012)
62. Heck, A. J.: *Nat. Methods.* 5, 927-933 (2008)

63. Kolenko, P., Rozbeský, D., Vaněk, O., Kopecký, V. Jr., Hofbauerová, K., Novák, P., Pompach, P., Hašek, J., Skálová, T., Bezouška, K., Dohnálek J.: *J. Struct. Biol.* 175, 434-441 (2011)
64. Young, M. M., Tang, N., Hempel, J. C., Oshiro, C. M., Taylor, E. W., Kuntz, I. D., Gibson, B. W., Dollinger, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 5802-5806 (2000)
65. Rappsilber, J., Siniosoglou, S., Hurt, E. C., Mann, M.: *Anal. Chem.* 72, 267-275 (2000)
66. Novak, P., Kruppa, G. H.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 14, 355-365 (2008)
67. Engen, J. R.: *Anal. Chem.* 81, 7870-7875 (2009)
68. Sambrook, J., Russell, D. W.: *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (2001)
69. <http://www.genomed-dna.com/pdf/Quick-PDFs/JETQUICK-Protocol.PDF>, citováno 8. 4. 2012
70. http://www.bionovuslifesciences.com.au/images/stories/file/Geneaid/pdf/High-Speed_Plasmid_Mini_Kit.pdf, citováno 8. 4. 2012
71. Siddappa, N. B., Avinash, A., Venkatramanan, M., Ranga, U.: *Biotechniques.* 42, 188-192 (2007)
72. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R.: *Gene.* 77, 51-59 (1989)
73. Aricescu, A. R., Lu, W., Jones, E. Y.: *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62, 1243-1250 (2006)
74. Backliwal, G., Hildinger, M., Hasija, V., Wurm, F. M.: *Biotechnol. Bioeng.* 99, 721-727 (2008)
75. Laemmli, U. K.: *Nature* 227, 680-685 (1970)
76. Schuck, P.: *Biophys. J.* 78, 1606-1619 (2000)
77. Schuck, P.: *Anal. Biochem.* 320, 104-124 (2003)
78. www.jphilo.mailway.com, citováno 9. 4. 2012
79. Pompach, P., Man, P., Kavan, D., Hofbauerová, K., Kumar, V., Bezouska, K., Havlíček, V., Novák, P.: *J. Mass. Spectrom.* 11, 1571-1578 (2009)
80. Skálová, T., Kotýnková, K., Dušková, J., Hašek, J., Koval', T., Man, P., Hanč, P., Vaněk, O., Bezouška, K., Dohnálek, J.: *J. Immunol.*, Přijato do tisku (2012)
81. Vostárek, F.: Příprava rekombinantních extracelulárních domén lidských leukocytárních receptorů LLT1 a NKR-P1A: Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2012)
82. <http://globplot.embl.de/>; citováno 17. 3. 2012
83. Zhao, Y., Bishop, B., Clay, J. E., Lu, W., Jones, M., Daenke, S., Siebold, C., Stuart, D. I., Jones, E. Y., Aricescu, A. R.: *J. Struct. Biol.* 175, 209-215 (2011)
84. Otwinowski, Z., Minor, W.: *Methods in Enzymology, Volume 276: Macromolecular Crystallography* Academic Press (1997)

85. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.3 Schrödinger, LLC.

10. Přílohy

10.1. Hmotnostní spektrometrie – seznam identifikovaných peptidů

Následující čtyři tabulky uvádí seznam všech identifikovaných peptidů při mapování disulfidických můstků pomocí hmotnostní spektrometrie. Na každém řádku je uvedena dekonvoluovaná experimentální hodnota m/z v Da (**Exp Mass**), teoretická hmotnost identifikovaného peptidu v Da (**Thr Mass**), chyba přiřazení v ppm (**Err**), číselné označení úseku daného peptidu v perspektivě konkrétního konstruktů a případné modifikace daného peptidu (**Seq Num**), primární aminokyselinová sekvence identifikovaného peptidu (**Seq(s)**), intenzita píku přímo úměrná množství detekované látky (**Int. Sum**) a retenční objem píku kapalinové chromatografie, ve kterém byl identifikovaný peptid eluován (**Ret.**).

Přirozený konstrukt L2 štěpený peptidasou trypsinem – část 1/2

Exp Mass	Thr Mass	Err	Seq Num	Seq(s)	Int. Sum	Ret.
1515.7698	1515.7708	0.6	57-69	YKGPSDHWIGLSR	1.35E+09	rt= 11.29
1365.6423	1365.6438	1.1	77-85+1HexNAc	WINGTEWTR	6.88E+08	rt= 13.27
872.4254	872.4266	1.4	70-76	EQGQPWK	4.93E+08	rt= 2.30
2500.2349	2500.2366	0.7	113-118,86-101	KWICKSK-QFPILGAGECAYLNDK	3.23E+08	rt= 17.43
856.4517	856.4528	1.2	119-126	SDIHVGTK	2.93E+08	rt= 0.79
2372.1387	2372.1416	1.3	114-118,86-101	WICKSK-QFPILGAGECAYLNDK	2.65E+08	rt= 19.02
2219.05	2219.052	0.9	70-85+1HexNAc	EQGQPWKWINGTEWTR	2.14E+08	rt= 18.62
2009.9427	2009.9456	1.4	119-135	SDIHVGTKHHHHHHHHHG	1.24E+08	rt= 0.28
1224.6115	1224.6124	0.8	59-69	GPSDHWIGLSR	1.17E+08	rt= 11.77
1838.8658	1838.868	1.2	1-16+1Cysteamin	ITGQAACPESWIGFQR	1.03E+08	rt= 15.80
3499.6729	3499.6775	1.4	86-101,1-16	QFPILGAGECAYLNDK-ITGQAACPESWIGFQR	9.30E+07	rt= 22.42
2397.1467	2397.1482	0.6	114-118,1-16	WICKSK-ITGQAACPESWIGFQR	7.40E+07	rt= 17.66
3321.5513	3321.5559	1.4	114-118,34-56	WICKSK-FCDSQDADLAQVESFQELNLLR	6.70E+07	rt= 27.37
3029.4937	3029.4976	1.3	113-118,86-107	KWICKSK-QFPILGAGECAYLNDKGASSAR	6.70E+07	rt= 16.36
1813.8608	1813.8616	0.4	86-101+1Cysteamin	QFPILGAGECAYLNDK	6.52E+07	rt= 17.43
2525.2402	2525.2432	1.2	113-118,1-16	KWICKSK-ITGQAACPESWIGFQR	4.56E+07	rt= 16.20
2525.2402	2525.2432	1.2	114-118,1-17	WICKSK-ITGQAACPESWIGFQRK	4.56E+07	rt= 16.20
3449.6465	3449.6509	1.3	113-118,34-56	KWICKSK-FCDSQDADLAQVESFQELNLLR	3.23E+07	rt= 25.67
2901.4006	2901.4026	0.7	114-118,86-107	WICKSK-QFPILGAGECAYLNDKGASSAR	2.37E+07	rt= 17.66
2763.2715	2763.2756	1.5	34-56+1Cysteamin	FCDSQDADLAQVESFQELNLLR	2.11E+07	rt= 27.37
5435.5693	5435.5415	5.1	17-26,34-69	KCFYFSDDTK-FCDSQDADLAQVESFQELNLLRYKGPSDHWIGLSR	1.81E+07	rt= 24.64
2886.2832	2886.2864	1.1	18-26,1-16	CFYFSDDTK-ITGQAACPESWIGFQR	1.41E+07	rt= 19.54
1795.8671	1795.8688	1	86-101+1CAM	QFPILGAGECAYLNDK	1.38E+07	rt= 19.54

Přirozený konstrukt L2 štěpený peptidasou trypsinem – část 2/2

Exp Mass	Thr Mass	Err	Seq Num	Seq(s)	Int. Sum	Ret.
3014.3823	3014.3813	0.3	18-26,1-17	CFYFSDDTK-ITGQAACPEWIGFQRK	1.24E+07	rt= 17.91
3014.3823	3014.3813	0.3	17-26,1-16	KCFYFSDDTK-ITGQAACPEWIGFQR	1.24E+07	rt= 17.91
1763.8516	1763.8538	1.2	1-16	ITGQAACPEWIGFQR	1.04E+07	rt= 20.68
3627.7678	3627.7725	1.3	86-101,1-17	QFPILGAGECAYLNDK-ITGQAACPEWIGFQRK	6.31E+06	rt= 20.49
1738.8457	1738.8473	0.9	86-101	QFPILGAGECAYLNDK	4.50E+06	rt= 21.71
2343.1189	2343.1223	1.5	86-107+1Cysteamin	QFPILGAGECAYLNDKGASSAR	4.06E+06	rt= 16.04
4028.9316	4028.9385	1.7	1-16,86-107	ITGQAACPEWIGFQR-QFPILGAGECAYLNDKGASSAR	3.92E+06	rt= 21.24
705.3314	705.3319	0.8	108-112	HYTER	3.86E+06	rt= 0.28
4260.022	4260.0278	1.4	34-69+1Cysteamin	FCDSQDADLAQVESFQELNFLRYKG PSDHWIGLSR	3.53E+06	rt= 25.99
1886.8511	1886.8456	2.9	113-118,18-26	KWICKSK-CFYFSDDTK	3.07E+06	rt= 15.80
1886.8511	1886.8456	2.9	114-118,17-26	WICKSK-KCFYFSDDTK	3.07E+06	rt= 15.80
4449.0854	4449.0918	1.4	1-16,34-56	ITGQAACPEWIGFQR-FCDSQDADLAQVESFQELNFLLR	2.57E+06	rt= 28.93
764.4116	764.4128	1.6	113-118	KWICKSK	2.15E+06	rt= 3.21
3515.6665	3515.688	6.1	114-118,77-101	WICKSK- WINGTEWTRQFPILGAGECAYLNDK	1.86E+06	rt= 21.71
2653.3354	2653.3381	1	113-118,1-17	KWICKSK-ITGQAACPEWIGFQRK	1.58E+06	rt= 15.09
2996.3677	2996.3711	1.1	1-26+1S_S	ITGQAACPEWIGFQRKCFYFSDDTK	1.55E+06	rt= 20.05
711.3311	711.3322	1.5	114-118+1Cysteamin	WICKSK	1.49E+06	rt= 1.31
1948.9646	1948.9702	2.9	1-17+1CAM	ITGQAACPEWIGFQRK	1.02E+06	rt= 17.07
1548.7621	1548.7666	2.9	114-126+1Cysteamin	WICKSKDIHVGTK	8.12E+05	rt= 9.79
3186.5488	3186.5503	0.5	108-118,86-101	HYTERKWICKSK- QFPILGAGECAYLNDK	8.09E+05	rt= 16.04
3868.8884	3868.9126	6.2	1-17,102-118	ITGQAACPEWIGFQRK- GASSARHYTERKWICKSK	7.56E+05	rt= 21.44
4946.3975	4946.4028	1.1	113-118,34-69	KWICKSK- FCDSQDADLAQVESFQELNFLRYKG PSDHWIGLSR	7.18E+05	rt= 24.84
3948.7554	3948.7595	1	1-16,18-33+1HexNAc	ITGQAACPEWIGFQR- CFYFSDDTKNWTSSQR	5.72E+05	rt= 19.22
3490.7888	3490.7725	4.7	113-126,1-17	KWICKSKDIHVGTK- ITGQAACPEWIGFQRK	3.86E+05	rt= 26.54
3938.7722	3938.7891	4.3	17-26,34-56	KCFYFSDDTK- FCDSQDADLAQVESFQELNFLLR	3.45E+05	rt= 26.54
4242.0313	4242.0352	0.9	34-69+1CAM	FCDSQDADLAQVESFQELNFLRYKG PSDHWIGLSR	3.39E+05	rt= 27.37
4577.1841	4577.1865	0.6	1-17,34-56	ITGQAACPEWIGFQRK- FCDSQDADLAQVESFQELNFLLR	2.98E+05	rt= 26.94

Přirozený konstrukt L2 štěpený peptidasou AspN – část 1/2

Exp Mass	Thr Mass	Err	Seq Num	Seq(s)	Int. Sum	Ret.
2537.18	2537.175	2.3	1-22+1S_S	ITGQAACPEWIGFQRKCFYFS	1.43E+09	rt= 22.54
2652.201	2652.201	0.3	1-23+1S_S	ITGQAACPEWIGFQRKCFYFSD	3.44E+08	rt= 22.42
1922.912	1922.914	0.6	120-135	DIHVGTKHHHHHHHHHG	2.75E+08	rt= 0.40
1036.494	1036.495	1.3	41-49	DLAQVESFQ	2.31E+08	rt= 13.74
2454.261	2454.267	2.3	41-61	DLAQVESFQELNFLRYKGPS	1.67E+08	rt= 27.33
1436.789	1436.79	1.1	50-61	ELNFLRYKGPS	1.48E+08	rt= 18.18
2539.179	2539.19	4.6	1-22	ITGQAACPEWIGFQRKCFYFS	7.74E+07	rt= 22.54
510.2191	510.2199	1.6	46-49	ESFQ	1.53E+07	rt= 13.74
2385.153	2385.155	1.1	100-119+1Cysteamin	DKGASSARHYTERKWICKSKS	1.01E+07	rt= 1.90

Přirozený konstrukt L2 štěpený peptidasou AspN – část 2/2

Exp Mass	Thr Mass	Err	Seq Num	Seq(s)	Int. Sum	Ret.
2689.215	2689.219	1.5	1-22+2Cysteamin	ITGQAACPESWIGFQRKCFYFS	6.56E+06	rt= 18.30
3418.751	3418.755	1.2	41-69	DLAQVESFQELNLLRYKGPSDH WIGLSR	5.31E+06	rt= 26.86
2654.204	2654.217	4.9	1-23	ITGQAACPESWIGFQRKCFYFSD	5.16E+06	rt= 22.42
3440.513	3440.512	0.1	111-119,23- 40+1HexNAc	ERKWICKS- DDTKNWTSSQRFCDSDA	3.22E+06	rt= 17.55
1912.88	1912.869	5.6	9-23	ESWIGFQRKCFYFSD	1.96E+06	rt= 0.40
8824.005	8823.994	1.2	9-40,70- 110+1Cysteamin+ 1HexNAc	ESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSS QRFCDSDA- EQGQPWKWINGTEWTRQFPILGA GECAYLNDKGASSARHYT	1.53E+06	rt= 22.90
2640.329	2640.331	0.8	39-61	DADLAQVESFQELNLLRYKGPS	1.32E+06	rt= 27.33
3139.429	3139.421	2.5	111-119,24- 38+1HexNAc	ERKWICKS- DTKNWTSSQRFCDSDQ	1.15E+06	rt= 2.26
2804.241	2804.245	1.7	1-23+2Cysteamin	ITGQAACPESWIGFQRKCFYFSD	8.85E+05	rt= 18.30
6967.353	6967.365	1.7	111-119,62- 110+1HexNAc	ERKWICKS- DHWIGLSREQGQPWKWINGTEW TRQFPILGAGECAYLNDKGASSA RHYT	8.66E+05	rt= 22.90
6967.353	6967.365	1.7	100-119,62- 99+1HexNAc	DKGASSARHYTERKWICKS- DHWIGLSREQGQPWKWINGTEW TRQFPILGAGECAYLN	8.66E+05	rt= 22.90
2596.197	2596.212	5.7	1-22+1CAM	ITGQAACPESWIGFQRKCFYFS	5.03E+05	rt= 22.42
2401.274	2401.278	1.5	50-69	ELNLLRYKGPSDHWIGLSR	5.00E+05	rt= 20.64
3019.411	3019.415	1.3	94-99,100-119	ECAYLN- DKGASSARHYTERKWICKS	4.60E+05	rt= 8.27
3019.411	3019.415	1.3	111-119,94-110	ERKWICKS- ECAYLNDKGASSARHYT	4.60E+05	rt= 8.27
5229.37	5229.38	2	24-40,111- 135+1HexNAc	DTKNWTSSQRFCDSDA- ERKWICKSDIHVGTKHHHHHHH HG	4.37E+05	rt= 23.69
2515.129	2515.116	5.3	24-45	DTKNWTSSQRFCDSDADLAQV	4.04E+05	rt= 30.35

Mutovaný konstrukt L2_H176C štěpený peptidasou trypsinem – část 1/2

Exp Mass	Thr Mass	Err	Seq Num	Seq(s)	Int. Sum	Ret.
1515.77	1515.771	0.6	57-69	YKGPSDHWIGLSR	7.08E+08	rt= 11.53
2407.102	2407.106	1.8	108-112,86-101	CYTER-QFPILGAGECAYLNDK	1.74E+08	rt= 16.08
872.4255	872.4266	1.3	70-76	EQGQPWK	1.48E+08	rt= 2.37
856.4518	856.4528	1.1	119-126	SDIHVGTK	1.45E+08	rt= 0.67
1224.612	1224.612	0.8	59-69	GPSDHWIGLSR	1.44E+08	rt= 11.73
1365.642	1365.644	1.6	77-85+1HexNAc	WINGTEWTR	1.43E+08	rt= 13.23
1838.866	1838.868	0.9	1-16+1Cysteamin	ITGQAACPESWIGFQR	3.46E+07	rt= 15.84
2886.283	2886.286	1.1	18-26,1-16	CFYFSDDTK- ITGQAACPESWIGFQR	3.26E+07	rt= 19.44
3321.552	3321.556	1.2	114-118,34-56	WICKS- FCDSQDADLAQVESFQELNLLR	3.18E+07	rt= 27.21
3449.647	3449.651	1.1	113-118,34-56	KWICKS- FCDSQDADLAQVESFQELNLLR	3.17E+07	rt= 25.59
1820.873	1820.875	1.1	1-16+1CAM	ITGQAACPESWIGFQR	2.71E+07	rt= 18.22
2009.944	2009.946	0.9	119-135	SDIHVGTKHHHHHHHHHG	2.41E+07	rt= 0.32
3014.381	3014.381	0.3	18-26,1-17	CFYFSDDTK- ITGQAACPESWIGFQRK	2.05E+07	rt= 18.02
3014.381	3014.381	0.3	17-26,1-16	KCFYFSDDTK- ITGQAACPESWIGFQR	2.05E+07	rt= 18.02
1795.867	1795.869	0.8	86-101+1CAM	QFPILGAGECAYLNDK	1.67E+07	rt= 19.21
2745.279	2745.283	1.3	34-56+1CAM	FCDSQDADLAQVESFQELNLLR	1.39E+07	rt= 29.11

Mutovaný konstrukt L2_H176C štěpený peptidasou trypsinem – část 2/2

Exp Mass	Thr Mass	Err	Seq Num	Seq(s)	Int. Sum	Ret.
2219.05	2219.052	1	70-85+1HexNAc	EQGQPWKWINGTEWTR	1.14E+07	rt= 18.53
1813.861	1813.862	0.2	86-101+1Cysteamin	QFPILGAGECAYLNDK	7.79E+06	rt= 17.51
1948.968	1948.97	0.9	1-17+1CAM	ITGQAACPEWIGFQRK	5.49E+06	rt= 16.91
2373.05	2373.046	1.7	17- 33+1CAM+1HexNAc	KCFYFSDDTKNWTSSQR	4.56E+06	rt= 21.16
2397.146	2397.148	0.9	114-118,1-16	WICKS-ITGQAACPEWIGFQR	4.21E+06	rt= 17.90
1548.762	1548.767	2.8	114-126+1Cysteamin	WICKS-DIHVGTK	2.64E+06	rt= 8.91
2763.272	2763.276	1.3	34-56+1Cysteamin	FCDSQDADLAQVESFQELNLLR	2.56E+06	rt= 27.21
2918.339	2918.356	6.1	86-112+1S_S	QFPILGAGECAYLNDKGASSARCYTER	2.10E+06	rt= 17.31
2142.013	2142.011	0.9	108-112,114-126	CYTER-WICKS-DIHVGTK	2.06E+06	rt= 21.51
1763.853	1763.854	0.3	1.16	ITGQAACPEWIGFQR	1.96E+06	rt= 20.48
3499.672	3499.678	1.5	86-101,1-16	QFPILGAGECAYLNDK-ITGQAACPEWIGFQR	1.62E+06	rt= 22.42
4242.031	4242.035	0.9	34-69+1CAM	FCDSQDADLAQVESFQELNLLRYKGPS	1.53E+06	rt= 27.21
2996.367	2996.371	1.4	1-26+1S_S	ITGQAACPEWIGFQRKCFYFSDDTK	1.44E+06	rt= 20.00
3948.755	3948.76	1.1	1-16,18-33+1HexNAc	ITGQAACPEWIGFQR-CFYFSDDTKNWTSSQR	1.36E+06	rt= 19.21
2500.236	2500.237	0.2	113-118,86-101	KWICKS-QFPILGAGECAYLNDK	1.34E+06	rt= 17.51
3455.585	3455.579	1.7	114-126,18-33	WICKS-DIHVGTK-CFYFSDDTKNWTSSQR	7.58E+05	rt= 26.98
1432.67	1432.672	1.3	108-112,113-118	CYTER-KWICKS	4.31E+05	rt= 1.90
1432.67	1432.672	1.2	114-118,108-113	WICKS-CYTERK	4.31E+05	rt= 1.90
2535.198	2535.201	1.1	108-113,86-101	CYTERK-QFPILGAGECAYLNDK	3.90E+05	rt= 13.43

Mutovaný konstrukt L2_H176C štěpený peptidasou AspN

Exp Mass	Thr Mass	Err	Seq Num	Seq(s)	Int. Sum	Ret.
8599.043	8599.011	3.8	23-38,62-118+1CAM	DDTKNWTSSQRFCDSDQ-DHWIGLSREQQPWKWINGTEWTRQFPILGAGECAYLNDKGASSARCYTERKWICKS	3.21E+06	rt= 8.79
3322.553	3322.529	7	114-126,94-110	WICKS-DIHVGTK-ECAYLNDKGASSARCYT	5.32E+05	rt= 27.05
2454.264	2454.267	1.3	41-61	DLAQVESFQELNLLRYKGPS	3.34E+06	rt= 27.05
2537.171	2537.175	1.3	1-22+1S_S	ITGQAACPEWIGFQRKCFYFS	2.83E+07	rt= 22.42
2689.215	2689.219	1.3	1-22+2Cysteamin	ITGQAACPEWIGFQRKCFYFS	7.32E+05	rt= 18.22
1436.789	1436.79	0.9	50-61	ELNLLRYKGPS	7.42E+06	rt= 17.98
3440.514	3440.512	0.5	111-119,23-40+1HexNAc	ERKWICKS-DDTKNWTSSQRFCDSDQA	5.39E+05	rt= 17.46
3441.515	3441.524	2.6	9-35+1Cysteamin	ESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSSQRFC	6.10E+05	rt= 17.46
1948.967	1948.97	1.8	1-17+1CAM	ITGQAACPEWIGFQRK	2.55E+05	rt= 16.87
8089.652	8089.68	3.5	23-49,77-119+1Cysteamin	DDTKNWTSSQRFCDSDADLAQVESFQ-WINGTEWTRQFPILGAGECAYLNDKGASSARCYTERKWICKS	2.84E+05	rt= 13.70
1036.494	1036.495	1.1	41-49	DLAQVESFQ	1.39E+07	rt= 13.70
510.2193	510.2199	1.1	46-49	ESFQ	8.54E+05	rt= 13.70
2009.944	2009.946	1	119-135	SDIHVGTKHHHHHHHHG	1.74E+06	rt= 0.32
1922.912	1922.914	0.8	120-135	DIHVGTKHHHHHHHHG	1.34E+07	rt= 0.32

