

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Barbora Růžičková

Studium struktury receptoru DCL-1 pomocí hmotnostní
spektrometrie

Structural study of the DCL-1 receptor using mass spectrometry

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Daniel Kavan, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Zdeněk Kukačka

Praha 2013

Prohlášení

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

V Praze dne:

.....

Barbora Růžičková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Danielu Kavanovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi ochotně poskytoval v průběhu celé práce. Dále bych ráda poděkovala svému konzultantovi Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi, který mě seznámil s metodou chemického síťování proteinů a vedoucímu laboratoře RNDr. Petrovi Novákovi, Ph.D. nejen za umožnění vypracování diplomové práce, ale také za změření hmotnostních spekter. Velké díky patří také všem ostatním členům Laboratoře přirozené imunity za jejich ochotu vždy pomoci při práci v laboratoři a za vytvoření přátelského prostředí. V neposlední řadě patří dík mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

Abstrakt (Čj)

DCL-1 (CD302) je transmembránový C-lektinový receptor typu I, který je exprimován na monocytech, makrofázích, granulocytech a dendritických buňkách. Jeho extracelulární doména však postrádá aminokyselinové motivy, esenciální pro vazbu sacharidových struktur v přítomnosti vápenatých kationtů, což naznačuje, že nemá klasickou vazebnou aktivitu typickou pro C-lektinové receptory jako například manosový receptor. Žádné jeho exogenní nebo endogenní ligandy ovšem nebyly dosud nalezeny. V důsledku vnitřní kolokalizace s F-aktinem lze předpokládat, že tento nekonvenční lektinový receptor hraje důležitou roli nejen v endocytóze a fagocytóze, ale také v buněčné adhezi a migraci. Receptor DCL-1 byl poprvé identifikován jako genetický fúzní partner lidského multilektinového receptoru DEC-205 v buněčné linii Hodgkinova lymfomu.

Experimentální část této práce se zabývá identifikací zapojení disulfidických vazeb a získání dat k validaci krystalové struktury DCL-1. Nejprve byla provedena optimalizace podmínek produkce a renaturace za účelem získat co největší množství proteinu DCL-1, resp. jeho extracelulární domény.

Optimální podmínky byly využity k přípravě proteinu, se kterým bylo provedeno štěpení v gelu specifickými endopeptidasami za přítomnosti cystaminu následované LC-MS analýzou. Porovnáním naměřených dat z LC-MS s databází hmot peptidových fragmentů generovaných softwarem bylo zjištěno, jakým způsobem jsou spárovány cysteiny v receptoru DCL-1.

Pro náhled na terciární strukturu receptoru DCL-1 byly provedeny experimenty chemického síťování v kombinaci s LC-MS analýzou. Za tímto účelem byla do reakcí s proteinem použita dvě homobifunkční činidla (DSS a DSG) a jedno heterobifunkční (EDC). Získaná spojení uvnitř proteinu byla ověřena na modelu krystalové struktury DCL-1.

Klíčová slova: DCL-1, C-lektinový receptor, chemické síťování, disulfidické vazby, LC-MS, Hodgkinův lymfom

Abstract (En)

DCL-1 (CD302) is a type I transmembrane C-type lectin receptor, which is expressed on monocytes, macrophages, granulocytes and dendritic cells. However, its extracellular domain lacks the amino acids motives essential for carbohydrate binding in the presence of calcium ions, suggesting that it does not have the classic binding capacity found in other C-type lectin receptors such as the mannose receptor. No exogenous or endogenous ligands have been identified yet, though. Due to internal colocalization with F-actin we can assume, that this unconventional lectin receptor plays a role not only in endocytosis and phagocytosis but also in the cell adhesion and migration. The receptor DCL-1 was first identified as a genetic fusion partner of human DEC-205 multilectin receptor in Hodgkin's lymphoma cell lines.

The experimental part of this thesis deals with the characterization of disulfide bonds and data acquisition for validation of DCL-1 crystal structure. First the production and refolding conditions were optimized to obtain the highest amount of DCL-1 protein, precisely its extracellular domain.

These optimal conditions were used to prepare the protein for in-gel digestion using specific endopeptidases in the presence of cystamine followed by LC-MS analysis. DCL-1 disulfide bonds were determined by comparing of LC-MS analysis data with software generated theoretical peptide masses.

Chemical cross-linking experiments in combination with LC-MS analysis were carried out to map the tertiary structure of the DCL-1 receptor. For this purpose, two homobifunctional (DSG and DSS) and one heterobifunctional (EDC) reagents were used. The model of DCL-1 crystal structure was validated by the obtained protein cross-links.

Keywords: DCL-1, C-type lectin receptor, chemical cross-linking, disulfide bonds, LC-MS, Hodgkin's lymphoma

Obsah

1	Teoretická část	11
1.1	Imunitní systém.....	11
1.1.1	Buňky imunitního systému	13
1.1.2	Dendritické buňky	15
1.2	Receptory důležité pro tuto práci	20
1.2.1	Receptor DCL-1	20
1.2.2	Receptor DEC-205	23
1.2.3	Fúzní protein DEC-205/DCL-1	24
1.2.4	Patologie spojená s DEC-205/DCL-1	24
2	Cíle práce	27
3	Materiál	28
3.1	Přístroje.....	28
3.2	Chemikálie	29
3.3	Roztoky, pufrý a jiný materiál.....	30
3.4	Vektor	33
3.5	Bakteriální kmen.....	33
4	Metody	34
4.1	Rekombinantní exprese proteinů	34
4.1.1	Transformace kompetentních buněk.....	34
4.1.2	Selekce produkčního klonu	34
4.1.3	Optimalizace podmínek produkce proteinu.....	35
4.1.4	Velkoobjemová produkce proteinu	36
4.1.5	Izolace inkluzních tělísek.....	36
4.2	Renaturace proteinu z inkluzních tělísek.....	37
4.2.1	Renaturace proteinu metodou rychlého naředění.....	37
4.2.2	Dialýza	37
4.3	Metody sloužící k zakoncentrování proteinu	37
4.3.1	Ultrafiltrace	37
4.3.2	Centrifugační koncentrátory	38
4.4	Chromatografické metody.....	38
4.4.1	Gelová filtrace.....	38
4.5	Elektromigrační metody	39
4.5.1	Diskontinuální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	40
4.6	Stanovení koncentrace proteinu.....	41

4.6.1	Stanovení koncentrace proteinu podle Bradfordové.....	41
4.6.2	Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA.....	41
4.6.3	Aminokyselinová analýza proteinu	42
4.7	Metody použité pro strukturní studie	43
4.7.1	Odsolení vzorku proteinu	43
4.7.2	Odsolení vzorků peptidů.....	43
4.7.3	Štěpení proteinů po SDS-PAGE pomocí endopeptidas	44
4.7.4	Extrakce peptidů z gelu	44
4.7.5	Stanovení zapojení disulfidických můstků.....	45
4.7.6	Chemické síťování proteinu.....	46
4.7.6.1	Reakce proteinu se síťovacími činidly	47
5	Výsledky	49
5.1	Produkce extracelulární domény DCL-1.....	49
5.1.1	Selekce produkčních klonů	49
5.1.2	Optimalizace podmínek produkce proteinu.....	50
5.1.3	Velkoobjemová produkce proteinu	52
5.2	Renaturace proteinu z inkluzních tělísek.....	53
5.2.1	Optimalizace renaturace proteinu DCL-1.....	53
5.2.2	Purifikace proteinu gelovou filtrací.....	54
5.2.2.1	Analýza frakcí získaných z gelové filtrace	55
5.3	Stanovení koncentrace proteinu.....	56
5.3.1	Stanovení koncentrace DCL-1 metodou dle Bradfordové.....	56
5.3.2	Stanovení koncentrace DCL-1 metodou BCA.....	58
5.3.3	Aminokyselinová analýza DCL-1.....	60
5.4	Hmotnostní spektrometrie	61
5.4.1	Stanovení monoizotopické hmotnosti proteinu	61
5.4.2	Stanovení zapojení disulfidových vazeb	62
5.4.3	Chemické síťování DCL-1.....	62
6	Diskuze	67
7	Závěr	70
8	Citovaná literatura	71

Seznam použitých zkratek

- **ACQ** 6-aminoquinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát
- **AcN** acetonitril
- **AMQ** 6-aminoquinolin
- **APC** antigen prezentující buňka (**Antigen Presenting Cell**)
- **APS** persíran amonný
- **BCA** bicinchoninová kyselina (**Bicinchoninic Acid**)
- **BCR** B buněčný receptor (**B Cell Receptor**)
- **BSA** hovězí sérový albumin (**Bovine Serum Albumin**)
- **CBB R-250** Coomasie Brilian Blue R-250
- **CCL** chemokinový ligand (**Chemokine (C-C) motif Ligand**)
- **CCR** chemokinový receptor (**Chemokine (C-C) motif Receptor**)
- **CD** diferenciační antigen (**Cluster of Differentiation**)
- **cDNA** komplementární deoxyribonukleová kyselina (**complementary Deoxyribonucleic Acid**)
- **CLEC13A** C-type **Lectin** domain family **13** member **A**
- **CpG** Cytosine-phosphorothioate-Guanine
- **CR** komplementový receptor (**Complement Receptor**)
- **CRD** sacharidy rozpoznávající doména (**Carbohydrate Recognition Domain**)
- **CTLD** C-lektinová doména (**C-Type Lectin Domain**)
- **DCL-1** lektin typu C asociovaný s DEC-205 (**DEC-205-associated C-type Lectin-1**)
- **DC-SIGN** **DC-Specific Intracellular adhesion molecule-3 Grabbing Nonintegrin**
- **DEC-205** **Dendritic and Epithelial Cells 205**
- **DSG** disukcinimidyl glutarát
- **dsRNA** dvouvláknová ribonukleová kyselina (**double-stranded Ribonucleic Acid**)
- **DSS** disukcinimidyl suberát
- **DTT** dithiothreitol ((2S,3S)-1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol)

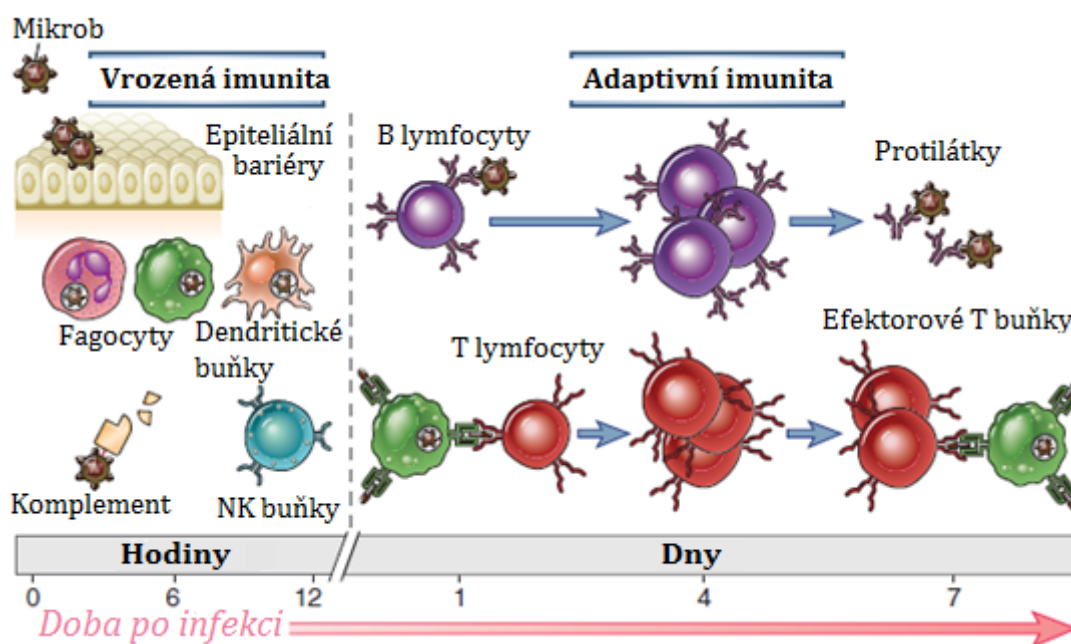
- **EDC** 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
- **EDTA** kyselina ethylendiamintetraoctová
- **ESI** ionizace elektrosprejem (**E**lectrospray **I**onization)
- **FcR** Fc receptor
- **FDC** folikulární dendritická buňka (**F**ollicular **D**endritic **C**ell)
- **Flt3L** **F**MS like **t**yrosine kinase **3** **L**igand
- **FT** Fourierova transformace (**F**ourier **T**ransformation)
- **GM-CSF** faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (**G**ranulocyte-**M**onocyte **C**olony-**S**timulating **F**actor)
- **HAc** kyselina octová
- **HEPES** kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
- **HL** Hodgkinův lymfom (**H**odgkin's **L**ymphoma)
- **HRS** **H**odgkin and **R**eed-**S**ternberg
- **HSC** Hematopoetická kmenová buňka (**H**ematopoetic **S**tem **C**ell)
- **ICR** Iontová cyklotronová rezonance (**I**on **C**yclotron **R**esonance)
- **IFN** interferon
- **IL** interleukin
- **IPTG** isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
- **LPS** lipopolysacharid
- **mDC** myeloidní dendritická buňka (**m**yeloid **D**endritic **C**ells)
- **MHC** hlavní histokompatibilní komplex (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex)
- **MMR** manosový receptor makrofágů (**M**acrophage **M**annose **R**eceptor)
- **mRNA** informační ribonukleová kyselina (**m**essenger **R**ibonucleic **A**cid)
- **MS** hmotnostní spektrometrie (**M**ass **S**pectrometry)
- **MIP** **M**acrophage **I**nflammatory **P**rotein
- **NHS** N-hydroxysukcinimid
- **NK** přirozený zabíječ (**N**atural **K**iller)

- **PBMC** mononukleární buňky periferní krve
(**P**eripheral **B**lood **M**ononuclear **C**ells)
- **PAMP** struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
(**P**athogen **A**ssociated **M**olecular **P**atterns)
- **pDC** plazmacytoidní dendritická buňka
(**p**lasmacytoid **D**endritic **C**ells)
- **PLA₂R** receptor fosfolipasy A₂ (**P**hospholipase **A**₂ **R**eceptor)
- **PRR** receptor rozpoznávající patogen
(**P**athogen **R**ecognition **R**eceptors)
- **SDS-PAGE** polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
(**S**odium **D**odecyl **S**ulfate **P**olyacrylamide **G**el **E**lectrophoresis)
- **SLC** **S**ecundary **L**ymfoid **T**issues **C**hemokine
- **ssRNA** jednovláknová ribonukleová kyselina
(**s**ingle-**s**tranded **R**ibonucleic **A**cid)
- **Tc** cytotoxický T lymfocyt (**c**ytotoxic **T** cell)
- **TCEP** Tris-(2-carboxyethyl)phosphine
- **TCR** T buněčný receptor (**T** **C**ell **R**eceptor)
- **TEMED** *N,N,N',N'*-tetramethylethan-1,2-diamin
- **TFA** kyselina trifluoroctová
- **TGF** transformující růstový faktor (**T**ransforming **G**rowth **F**actor)
- **Th** pomocný T lymfocyt (**h**elper **T** cell)
- **TLR** **T**oll-like **R**eceptor
- **TNF** faktor nekrotizující nádory (**T**umor **N**ecrosis **F**actor)

1 Teoretická část

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je komplexní síť vzájemně kooperujících speciálních buněk a molekul, které se podílí na udržení integrity a homeostázy organismu. Fyziologickou funkcí imunitního systému je rozpoznávat cizorodé komponenty a chránit organismus před patogenními mikroorganismy a jejich toxickými produkty za současné eliminace patologicky změněných (mutovaných), poškozených a odumřelých buněk vlastního těla. Další hlavní vlastností je autotolerance, tj. schopnost rozpoznávání vlastních tkání organismu, navození a udržení tolerance vůči nim. Na funkci imunitního systému participují dva hlavní mechanismy – evolučně starší *vrozená (antigenně nespecifická)* a evolučně mladší *adaptivní (antigenně specifická) imunita*. Obrana proti škodlivým agens je tedy obstaraná okamžitou reakcí vrozené imunity a pomalu se rozvíjející (4-7 dní po infekci) odpovědí adaptivní imunity (viz Obr. 1). [1]



Obr. 1: Vrozená a adaptivní imunita. Mechanismus vrozené imunity zajišťuje velmi rychlou reakci proti infekci, zatímco adaptivní imunitní odpověď se rozvíjí později. Předpokládané kinetiky obou imunitních odpovědí se však mohou lišit v závislosti na typu infekce. Převzato a upraveno. [1]

Vrozená imunita představuje první obrannou linii organismu během infekce a hraje tedy rozhodující roli v časném rozpoznání a následném spuštění

protizánětlivé odpovědi proti invazivním patogenům. Ve srovnání s adaptivní imunitou není ovlivněna předešlým setkáním s patogenem. [2]

Systém vrozené imunity je založen na buněčných a biochemických obranných mechanismech, které jsou v organismu připraveny předem a rozpoznávají evolučně konzervované struktury molekul, společné pro různé skupiny patogenů a označované termínem PAMP. Nespecifický systém je zároveň stimulován i endogenními molekulami, jež jsou produkovány poškozenými a mrtvými buňkami organismu, slouží k eliminaci těchto buněk a iniciuje proces reparace tkání. [1] Molekulové vzory PAMP exprimované na všech mikroorganismech jsou obvykle esenciální pro jejich přežití a zahrnují například endotoxiny (LPS), lipoproteiny, peptidoglykany, glykany, manany, ssRNA, dsRNA a nemetylovanou CpG DNA. [3] Mechanismus rozpoznávání mikrobiálních PAMP a endogenních molekul je zprostředkován receptory přirozené imunity známých jako PRR. [3, 4]

Vrozený imunitní systém blokuje vstup mikroorganismů z vnějšího prostředí do hostitelských tkání a eliminuje nebo omezuje jejich růst. Hlavní fyzickou bariéru organismu proti infekci tvoří neporušený povrch epitelu a sliznic respiračního, gastrointestinálního a genitourinárního traktu, jejichž buňky produkují antimikrobiální chemické (mastné kyseliny na kůži, kyselé pH žaludečních šťáv a moči, enzymy – lysozym a pepsin) a mechanické (pohyb řasinek, longitudinální tok vzduchu v dýchacích cestách nebo tekutiny v močových cestách) obranné mechanismy neimunitní povahy. [5]

Buněčná nespecifická imunitní odpověď proti mikrobům, které překonají epitelovou bariéru, je zajištěna fagocyty a přirozeně cytotoxickými buňkami (NK buňkami). Mezi fagocyty patří zejména neutrofil, eosinofil a tkáňové makrofágy. NK buňky hrají klíčovou roli v nespecifické imunitní odpovědi, zvláště pak v obraně proti virům a nádorově změněným buňkám. Mikroby, které překonají tyto obranné reakce v tkáních, přechází do krve, kde jsou rozeznávány cirkulujícími proteiny komplementového systému. [1]

Adaptivní imunita je specifická k různým mikrobiálním a nemikrobiálním antigenům a vzrůstá opakovanými expozicemi antigenem, tento fenomén bývá označován jako imunologická paměť. Tu zajišťují složky specifické imunity,

T- a B-lymfocyty, které mají na svém povrchu obrovského množství různých receptorů (TCR a BCR) s přesně definovanou specifitou pro nejrůznější antigeny. [1]

Adaptivní mechanismus je stejně jako vrozený tvořen ze dvou typů imunitních odpovědí – humorální a buněčně zprostředkované. Humorální specifický systém je zprostředkován B lymfocyty, jež sekretují různé třídy protilátek se specializovanými funkcemi. Protilátky po rozeznání mikrobiálních antigenů neutralizují nakažlivost mikrobů, opsonizují je a nasměrují k pohlcení fagocyty. B lymfocyty tedy fungují jako mediátory humorální adaptivní imunity, která je principiálně obranným mechanismem proti extracelulárním mikrobům a jejich toxickým produktům. [1]

Buněčně zprostředkovanou odpověď reprezentují hlavně T lymfocyty rozeznávající antigeny intracelulárních mikrobů. Populace T lymfocytů je rozdělena na funkčně odlišné subpopulace, které se liší expresí povrchových molekul a sekretovanými cytokiny. Dle povrchových molekul se dají rozdělit na molekuly nesoucí CD4 (koreceptor MHC gp II) a CD8 (koreceptor MHC gp I). [1] Subpopulace CD4⁺ má úlohu regulační (Th), zatímco subpopulace CD8⁺ cytotoxickou (Tc). Cytotoxické T buňky rozeznávají a ničí vlastní buňky infikované viry a dalšími intracelulárními patogeny. [6] Další druh T buněk představují regulační T lymfocyty (T_{reg}), jejichž hlavní funkcí je potlačit imunitní odpovědi jiných efektorových T lymfocytů. [1]

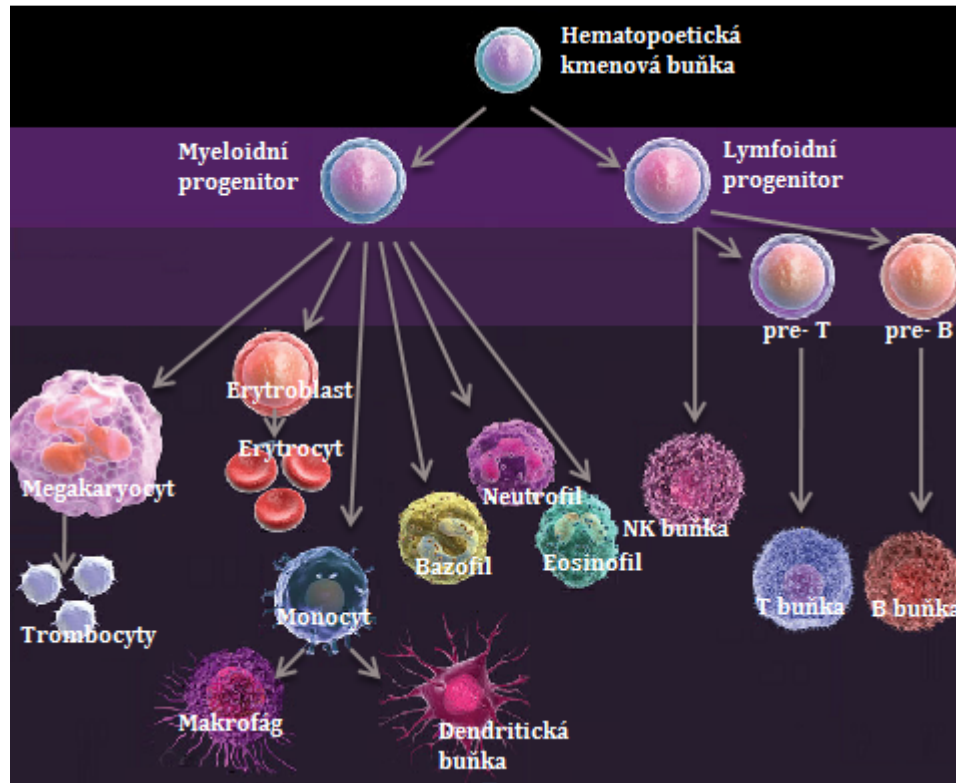
1.1.1 Buňky imunitního systému

Buňky vrozeného a adaptivního imunitního systému jsou obvykle prezentovány jako buňky cirkulující v krvi a lymfě, anatomicky definované shluky v lymfoidních orgánech a buňky rozptýlené prakticky ve všech tkáních. Anatomická organizace těchto buněk a jejich schopnost cirkulovat a přecházet mezi lymfou, krví a tkáněmi mají rozhodující význam pro vytváření účinné imunitní odpovědi. [1]

Všechny populace buněk imunitního systému vznikají v kostní dřeni z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk (HSC) a jsou charakterizovány specifickými povrchovými znaky (viz Obr. 2, str. 14).

HSC mají schopnost sebeobnovy a udržují se ve dřeni v malém množství po celý život. HSC mohou být identifikovány přítomností charakteristických povrchových znaků zahrnujících CD34 nebo absencí specifických znaků jednotlivých linií.

HSC dávají vznik multipotentním progenitorům lymfoidní a myeloidní linie, z nichž se diferencují efektorové buňky. [7, 8] Společný lymfoidní progenitor je zdrojem prekurzorů NK buněk, T a B lymfocytů. [10]



Obr. 2: Hematopoéza. Zjednodušený vývojový model subpopulací leukocytů z HSC za absence cytokinů, růstových faktorů a dalších vývojových faktorů. Upraveno a převzato. [9]

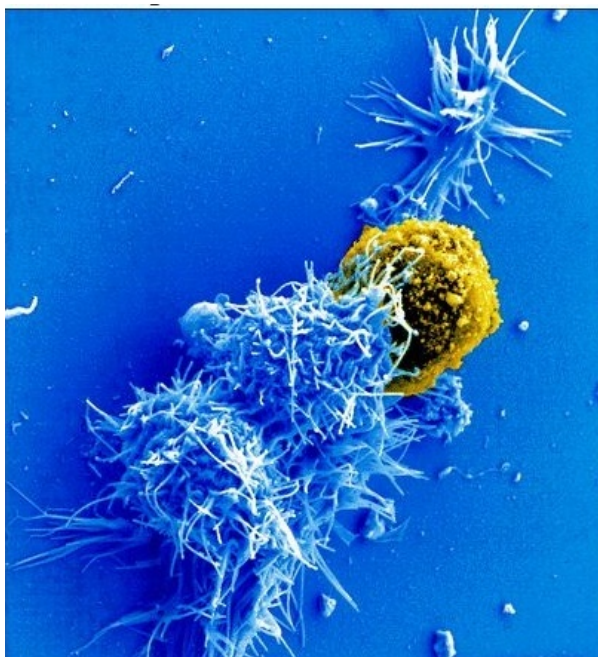
Maturace B buněk probíhá u lidí v kostní dřeni, ale k finální diferenciaci dochází až po aktivaci antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech. Konečným výsledkem diferenciaci B buněk jsou plazmocyty produkující protilátky. Rané T buněčné progenitory opouští kostní dřeň a migrují do brzlíku (thymu), kde dokončují svůj vývoj. Z thymu odchází prekurzory Th buněk s povrchovým receptorem CD4 a Tc buněk s CD8. Aktivace naivních CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů vyžaduje rozpoznání antigenních peptidů v komplexu s MHC gp II nebo I na povrchu profesionálních antigen prezentujících buněk (APC). Po aktivaci se prekurzory Tc a Th buněk diferencují na efektorové cytokiny sekretující CD4⁺ a CD8⁺ T buňky. [10]

Ze společného myeloidního progenitoru pocházejí erytrocyty, megakaryocyty, granulocyty (neutrofil, eosinofil a bazofil) a monocyty. Monocyty jsou cirkulující prekurzory tkáňových makrofágů. Cirkulující bazofily jsou podobné

tkáňovým mastocytům (žírné buňky). Ze stejného progenitoru se vyvíjí i dendritické buňky, které společně s ostatními druhy myeloidních buněk zajišťují nespecifickou část imunitního systému. [10]

1.1.2 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) jsou specializované akcesorní buňky, které byly původně objeveny v preparátech adherentních mononukleárních buněk ze sleziny myši. [11] Steinmanem a Cohnem byly popsány jako nový buněčný typ leukocytů odlišný od monocytů a makrofágů svou unikátní morfologií s množstvím výběžků (dendritů), podle níž byly pojmenovány. [12] Dendritické buňky jsou profesionální antigen prezentující buňky (APC), mnohem účinnější než ostatní (makrofágy, B buňky, aj.), jelikož jsou jediné APC, které mohou aktivovat naivní T lymfocyty (viz Obr. 3).



Obr. 3: Interakce mezi lidskou dendritickou buňkou (modrá) a lidským T lymfocytom (žlutý). Ukázka přesné interakce mezi buňkami pochází z elektronového mikroskopu. Převzato. [53]

Tato populace leukocytů může být považována za rodinu obsahující několik typů buněk různě lokalizovaných s jednou společnou rolí, tj. zahájení primární specifické odpovědi. V menším množství se nachází ve všech orgánech a tkáních kromě mozku, varlat a rohovky. [13] DC schopné stimulovat naivní T a B buňky plní

funkci „prostředníka“ mezi systémem vrozené a adaptivní imunity. Dendritické buňky mohou vznikat z myeloidního i lymfoidního progenitoru HSC. [14] Významný pokrok ve studiu DC se uskutečnil v polovině 90. let, kdy byly vyvinuty protokoly popisující kultivaci myeloidních DC z monocytů periferní krve v přítomnosti GM-CSF a IL-4 [15] a lymfoidních DC z plazmocytoidních buněk krve s IL-3. [16] Vyvíjející se prekurzory DC jsou z kostní dřeně vyplavovány do krve a odtud vstupují do tkání, kde se vyskytují především v tzv. nezralém stavu. [17]

Nezralé DC exprimují na svém povrchu malé množství MHC molekul, [18] ale žádné kostimulační molekuly jako např. CD40, B7 molekuly (CD80/CD86) a znaky typické pro zralé DC, potřebné k aktivaci naivních T lymfocytů. [19] V nepřítomnosti invazivních patogenů nebo zánětu nezralé DC neustále monitorují složení okolního prostředí fagocytózou odumřelých buněk zdravých tkání a nebo pinocytózou molekul rozpuštěných v extracelulární tekutině. Určitá část nezralých DC migruje z tkání do lymfatických uzlin a prezentuje fragmenty pohlcených autoantigenů v komplexu s MHC gp I specifickým T lymfocytům, které takto zpracované autoantigeny rozpoznávají a nejsou tedy tímto kontaktem aktivovány. Dochází buď k anergizaci těchto T buněk nebo se přeměňují na regulační T lymfocyty, specificky potlačující autoimunitní reakce. Nezralé DC se tak značně podílejí na procesu periferní tolerance vůči vlastním tkáním. [16, 20, 21] DC lymfoidní linie mohou též indukovat centrální toleranci v thymu negativní (eliminace autoreaktivních T buněk) a pozitivní (delece T buněk s nefukčním TCR) selekcí T lymfocytů. [22]

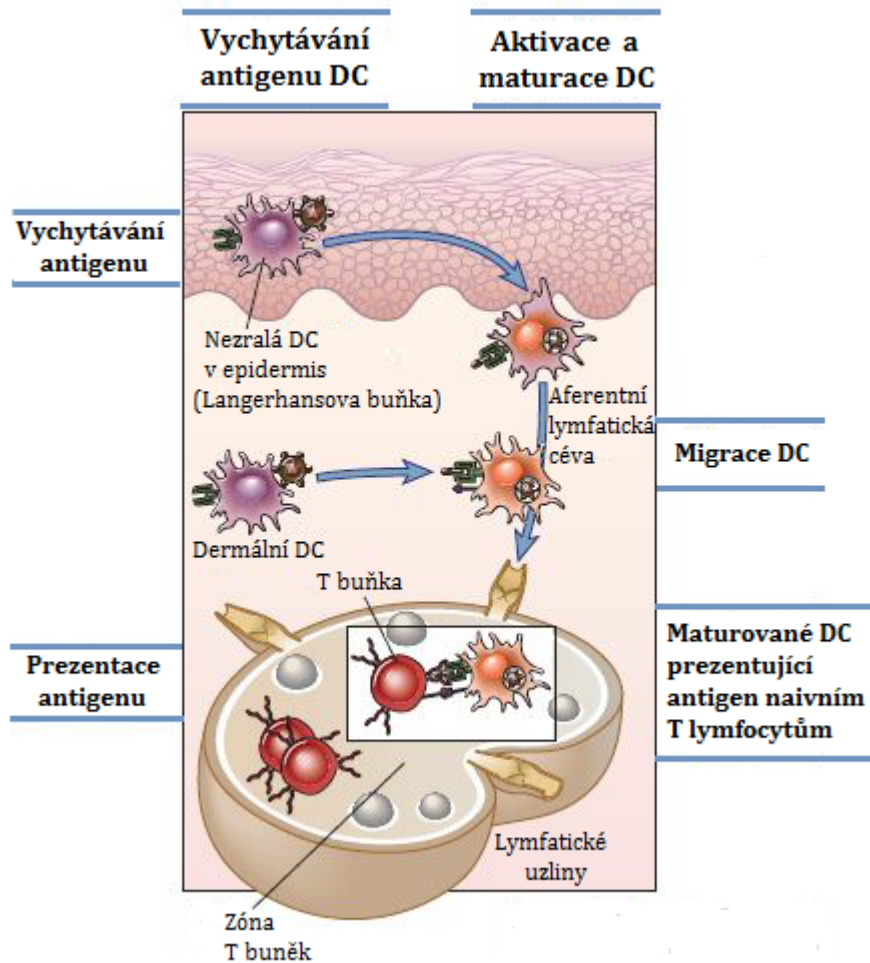
Nezralé DC jsou lokalizovány v periferních tkáních a sliznicích, v místech vstupu infekce. Nejvíce jich lze nalézt v kůži a ve sliznicích dýchacího a zažívacího traktu, kde slouží jako senzory signálů nebezpečí. Rozpoznáním těchto signálů pomocí specifických receptorů je zahájen proces, během kterého DC podléhá celé řadě fenotypických a funkčních změn. Tento charakteristický proces konečné diferenciaci nezralé DC na zralou DC, schopnou aktivovat naivní T lymfocyty, se nazývá maturace. [23, 24]

Během maturačního procesu dochází ke kompletnímu genetickému přeprogramování DC. [25] Migrace nezralých DC do periferních tkání je usměrňována expresí receptorů CCR1, CCR5 a CCR6 specifických pro chemokiny (např. MIP-3 α , MIP-1 α , MIP-1 β aj.). [26, 27]

Signály stimulující aktivaci stejně jako maturaci DC představují složky patogenů – bakteriální LPS, [28] CpG oligonukleotidy, [29] virovou dsRNA; [30] proteiny virů a bakterií; [31] cytokiny produkované během zánětu - TNF- α a γ , IL-1, IL-4; ligand T buněk – CD40L (exprimovaný hlavně na aktivovaných CD4⁺ T buňkách) [28, 32] a apoptotická tělíska. [33] Po aktivaci DC dojde ke změně v produkci chemokinových receptorů a na povrchu zralých DC se objevuje především CCR7. Zralé aktivované DC s CCR7 opouští tkáň a migrují skrz aferentní lymfatické cévy do T buněčných zón lymfatických uzlin, kam jsou atrahovány chemokiny MIP-3 β (CCL19) a SLC (CCL21). [34, 35] Naivní T lymfocyty také exprimují CCR7 a tím je zajištěno směřování obou těchto buněčných populací do stejného místa, čímž je zaručena jejich interakce (viz Obr. 4, str. 18). [1]

V průběhu maturace přestávají DC velmi rychle fagocytovat okolní antigeny, zvyšují syntézu molekul MHC I. a II. třídy a jejich transport na membránu s peptidy antigenů pocházejících z fagocytózy nebo pinocytózy. [36] Dochází k výraznému nárůstu exprese kostimulačních a adhezivních molekul podílejících se na aktivaci a diferenciaci naivních T lymfocytů na různé typy efektorových buněk. Fenotyp DC se mění v různých stádiích aktivace a maturace. Zralé DC exprimují celou řadu adhezivních molekul – CD50, CD58, CD54 a CD102; kostimulačních molekul - CD80 (B7.1), CD86 (B7.2); molekul regulujících kostimulaci (CD40) a povrchových znaků (CD83). [37, 38] Maturací DC je spouštěna sekrece mnoha cytokinů, jednak signalizujících zánět (TNF α , IL-1, IL-6) a dále imunoregulačních (IL-12, IL-15, IL-18, IL-10). [54, 55]

Nejúčinnějšími signály k aktivaci DC jsou struktury charakteristické pro patogeny (PAMP), pro něž mají nezralé DC na svém povrchu velké množství receptorů - PRR. První identifikované receptory ze skupiny PRR byly Toll-like receptory (TLR). Postupně byly identifikovány i další receptory jako např. C-lektinové receptory především – DEC-205 (CD205), manosový receptor (CD206), DC-SIGN (CD209) a langerin (CD207) [39, 40, 41]; FcR (CD16, CD32); komplementové receptory (CD21 a CD35) aj. [42]



Obr. 4: Role dendritických buněk ve vychytávání a prezentování antigenu. Antigeny (resp. mikroby), které přejdou přes ochrannou bariéru (pokožku), jsou vychytávány nezralými dendritickými buňkami v kůži (Langerhansovy buňky) nebo škáře (dermální DC), jež je transportují skrz aferentní lymfatické cévy do místních lymfatických uzlin. V průběhu této migrace DC maturují a stávají se účinnými APC. Upraveno a převzato. [1]

TLR selektivně rozpoznávají široké spektrum různých PAMP. Do současnosti bylo u lidí popsáno 10 rozdílných TLR, každý z nich reaguje s jiným patogenním vzorem. TLR4 je aktivován i endogenními signály – kyselinou hyaluronovou nebo fibrinogenem. [44] Exprese jednotlivých TLR tedy objasňuje specializaci podtypů DC v obraně proti různým skupinám patogenů. [43] Mezi DC lze rozlišit mnoho subpopulací s odlišnou lokalizací, expresí povrchových znaků a funkcí. [45]

U myších a lidských DC lze rozlišit funkčně a morfoloicky dva základní subtypy. Plazmacytoidní DC (pDC) připomínají svou morfoloii plazmatické buňky a jsou hlavním zdrojem antivirových cytokinů IFN- α produkovaných během imunitní odpovědi proti virové infekci. [45]

Tento významný rys pDC je očekávaný vzhledem ke skutečnosti, že tyto buňky více než jiné typy hojně exprimují endozomální TLR-7 a -9, které detekují virové nukleové kyseliny (ssRNA a nemetylovaná CpG DNA) internalizované v buňkách. [46] pDC je odvozena od lymfoidní linie a nachází se v krvi, thymu a sekundárních lymfatických orgánech a lze ji identifikovat dle exprese receptoru pro IL-3 (CD123). IL-3 a CD40L jsou růstové faktory pDC. Dalším subtypem jsou myeloidní DC (označované také jako konvenční). Mezi ně patří Langerhansovy buňky v epidermis s povrchovým znakem CD11c, které jsou charakteristické expresí langerinu (CD207) a DEC-205. Nejčtenější populaci myeloidních DC (mDC) tvoří intersticiální DC, jež vznikají za přítomnosti GM-CSF a buď IL-4 nebo TNF- α . Intersticiální DC se vyskytují v dermis a téměř ve všech orgánech (plicích, srdci, atd.) a mezi jejich charakteristické znaky patří CD11b, CD15b a CD68. mDC exprimují zbylé typy TLR a zahajují imunitní odpověď proti virům, bakteriím, plísním a parazitům. [47]

Na povrchu myeloidních DC se také vyskytuje nedávno objevený receptor DCL-1. [58] Vývoj pDC a mDC z lidských hematopoetických progenitorů závisí na cytokinech označovaných jako Flt3 ligandy, které se váží na Flt3 kinásové receptory na prekursorových buňkách. [49] DC jsou schopné zpracovávat exogenní antigen skrz endosomální systém a předkládají ho naivním CD4⁺ T buňkám v komplexu s MHC gp II. Antigen endogenního původu (protein produkovaný vlastními buňkami nebo z intracelulárního parazitu) je zpracován činností proteazomu a prezentován na molekule MHC gp I naivním CD8⁺ T buňkám. [48] CD141⁺ DC (subtyp mDC) disponují alternativním mechanismem předkládání antigenu naivním CD8⁺ T buňkám, kdy vystavují exogenní antigeny na molekulách MHC gp I. Tento proces se nejčastěji označuje jako křížová prezentace. [50] Výsledkem uvedených interakcí je klonální expanze aktivovaných T buněk a diferenciací na efektorové buňky s odlišnými funkcemi. [48]

Folikulární dendritické buňky (FDC) mají původ v prekurzorech stromálních buněk kostní dřeně a nachází se ve folikulech sekundárních lymfatických orgánů, kde vytvářejí interaktivní sítě, v nichž se zachycují aktivované B buňky. FDC vychytávají antigeny v komplexu s přirozenými protilátkami nebo komplementovými produkty, neexprimují na svém povrchu antigeny v komplexu s MHC II molekulami, ale mají receptory pro komplement – CR1/2 (CD35/21) a protilátkové komponenty – FcR

(CD32). Tyto receptory nejsou schopné internalizace antigenů, ale drží je na svém povrchu dlouhou dobu a prezentují ke zpracování B buňkám v germinálních (zárodečných) centrech. Po zpracování je B buňky prezentují CD4⁺ T buňkám (tzv. T_{FH} lymfocty) k získání pomocných signálů pro sekundární proliferaci a diferenciaci na paměťové a dlouho žijící plazmatické buňky. FDC se podílejí na dozrávání B buněk především během sekundární imunitní odpovědi. Výsledkem celého procesu je afinitní maturace vznikajících protilátek. [51]

Produkce IFN- α pDC je důležitá i pro aktivaci NK, Tc buněk a makrofágů. [52] Dermální DC jsou schopné přímo aktivovat naivní a paměťové B buňky. Aktivované B buňky se diferencují v plazmatické buňky produkující protilátky. Další možností je nepřímá aktivace B buněk prostřednictvím CD4⁺ Th buněk. [48]

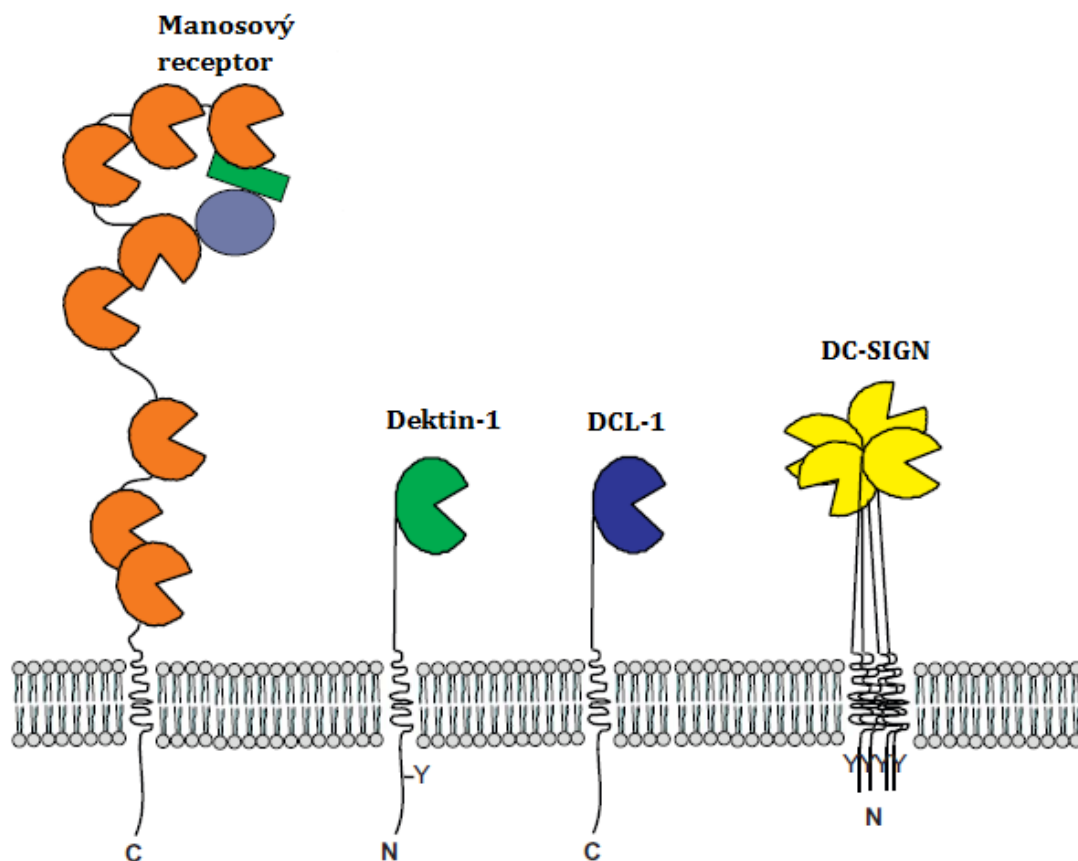
1.2 Receptory důležité pro tuto práci

1.2.1 Receptor DCL-1

Receptor DCL-1, také značený jako CD302/CLEC13A, je transmembránový C-lektinový receptor typu I. Částečná cDNA sekvence hDCL-1 byla nalezena náhodným sekvenováním KG-1 cDNA knihovny v souvislosti s procesem klonování DEC-205. [56] DCL-1 byl identifikován jako genetický fúzní partner lidského multilektinového receptoru DEC-205 v buněčné linii Hodgkinova lymfomu (L428) a byl klasifikován do rodiny C-lektinových receptorů. Název DCL-1 (resp. hDCL-1) je odvozen z jeho pojmenování jako C-lektinu typu I asociovaném s DEC-205. [56, 57] Lidský DCL-1 (hDCL-1) gen, kódovaný 6 exony v rozpětí 29 kb, je umístěn v klastru obsahujícím geny transmembránových C-lektinů typu I (např. DEC-205 a PLA₂R) na chromosomu 2 v oblasti q24. [58]

Tento nejjednodušší typ transmembránových C-lektinů typu I (viz Obr. 5, str. 21) se skládá z N-terminálního signálního peptidu (SP – exon 1), extracelulární C-lektinové domény (CTLD – exony 2 až 4), krátké spojky (exon 5), transmembránové části následované cytoplazmatickou doménou (TM a CP – exon 6).

Receptor DCL-1 je vysoce konzervovaný v rámci lidských, myších, potkaních a dalších savčích ortologů. Celková aminokyselinová identita a podobnost mezi hDCL-1 a myším ortologem byla nižší než mezi lidským a potkaním. hDCL-1 mRNA je přítomna v několika odlišných tkáních, i když hladina exprese je variabilní. [58]



Obr. 5: Struktury vybraných C-lectinových proteinů. Převzato a upraveno. [60]

Játra, plíce, slezina, dospělé PBMC a fetální ledviny exprimují hDCL-1 mRNA v relativně velkém množství, kdežto dospělé nervové tkáně, kosterní svalstvo a vaječníky vykazují nízkou hladinu exprese. V rámci těchto tkání byla mRNA nalezena výhradně ve fagocytech a APC, jedná se především o monocyty, myeloidní a plazmocytoïdní DC, makrofágy a granulocyty, narozdíl od NK, B a T buněk, kde nebyla mRNA detekována vůbec. [58] V souladu s těmito výsledky byla přítomnost průměrného množství hDCL-1 receptoru detekována na povrchu monocytů, myeloidních DC a granulocytů, rovněž v menší míře na pDC a makrofázích. Kromě toho se na monocytech a makrofázích (resp. DC) vyskytovaly dvě formy hDCL-1 odlišných molekulových hmotností. [58]

DCL-1 CTLD obsahuje šest velmi konzervovaných cysteinů, typický motiv jednotný pro C-lectiny, které tvoří intramolekulární disulfidové vazby a napomáhají tak k formování její prostorové struktury. Sekvence CTLD je také bohatá na kyselé aminokyseliny (E a D), podle nichž byla predikována hodnota izoelektrického bodu

na 4,14. Extracelulární doména navíc zachovává potenciální místo N-glykosylace blízko středu CTLD. Cytoplazmatická sekvence DCL-1 zahrnuje hned několik motivů (internalizační motiv založený na tyrosinu, kyselý a hydrofobní aminokyselinový klastr a serinový, threoninový a tyrosinový fosforylační motiv), které by měly přispívat k endocytóze, směřování do pozdního endozomu a také k signalizaci. [58]

DCL-1 má jako jediný z transmembránových C-lektinů typu I pouze jednu tzv. doménu rozpoznávající sacharidy (CRD) v extracelulární části. Receptor hDCL-1 postrádá aminokyselinové motivy esenciální pro vazbu sacharidových struktur v přítomnosti Ca^{2+} , což naznačuje, že nemá klasickou vazebnou aktivitu typickou pro C-lektinové receptory (např. DC-SIGN a MMR). Nicméně v případě dectinu-1 se také jedná o neobvyklý C-lektinový receptor, který váže β -glukany způsobem nezávislým na Ca^{2+} [61], je tedy možné, že DCL-1 by také mohl vázat sacharidy nějakou alternativní cestou. Navíc žádné jeho exogenní ani endogenní ligandy nebyly dosud nalezeny [60], mohl by tedy klidně rozpoznávat i některé proteinové ligandy podobně jako DC-SIGN a PLA₂R. [62, 63]

Z analýzy bylo zjištěno, že hDCL-1 na buněčném povrchu je schopen zprostředkovat endocytózu po navázání značených monoklonálních protilátek. Navíc buněčné linie transfekované hDCL-1 jsou schopné fagocytovat mikročástice označené monoklonálními protilátkami, které následně transportují do fagolysozomu k proteolytické degradaci. hDCL-1 byl však nejméně účinný fagocytující receptor v porovnání s MMR a hDEC-205. V průběhu tohoto experimentu byla u hDCL-1 pozorována kolokalizace s F-aktinem konkrétně při kontaktech mezi částicemi a buňkami. [58]

Receptor DCL-1 je kolokalizován s F-aktinem ve filopodiích a buněčném kortexu, zatímco u MMR (CD206) a DEC-205 (CD205) nebyla tato kolokalizace přítomna. Kolokalizace s F-aktinem by mohla být způsobena vlivem vnitřních signálů obsažených v CP hDCL-1 jako v případě jiných buněčných nebo matrixových adhezivních receptorů (kadhedriny, selektiny, integriny, aj.). Interakce hDCL-1 s F-aktinem probíhá pravděpodobně nepřímo bez přítomnosti běžných adaptorových proteinů. [58]

Studie naznačují, že v důsledku vnitřní kolokalizace hDCL-1 s F-aktinem hraje tento nekonvenční lektinový receptor důležitou roli nejen v endocytóze a fagocytóze, ale také v APC adhezi a migraci, mohl by se tedy stát cílem terapeutického zásahu. [58]

1.2.2 Receptor DEC-205

DEC-205 (také známý pod názvem CD205) patří do rodiny transmembránových multilektinových receptorů typu I, zahrnujících manosový receptor makrokrofágů (MMR), receptor pro fosfolipasu A₂ (PLA₂R) a nedávno popsany Endo180. [64, 65, 66] DEC-205, poprvé klonovaný v myši, je považovaný za receptor schopný vychytávat a zpracovávat antigeny. [67] Myší i lidská forma tohoto receptoru sdílí stejnou extracelulární část obsahující N-terminální doménu bohatou na cysteiny (CR), fibronektinovou doménu typu II (FN) a mnohonásobnou C-lektinovou doménu (série 10 CTLD). [68] Relativně krátká cytoplazmatická část (CP) zahrnuje motivy založené na tyrosinu nebo hydrofobních aminokyselinách, které umožňují endocytózu. [69] Lidské DEC-205 receptory vykazují ~80% proteinovou identitu s myším ortologem, což naznačuje, že jeho funkce je mezidruhově konzervována. [70, 71]

Vazebná specifita DEC-205 zatím nebyla identifikována, ale jeho doménová struktura nasvědčuje, že by tento receptor mohl rozpoznávat mnoho ligandů. [72] DEC-205 je převážně exprimován na kortikálním epitelu thymu, medulárních DC v thymu a na různých subtypech periferních DC (Langerhansových, dermálních a DC ve slezině a lymfatických uzlinách), dále na makrofázích, B lymfocytech a v malém množství také na T lymfocytech. [70, 73, 74] DEC-205 hraje roli při odstraňování apoptotických thymocytů buněčným epitelem v thymu. [75] U DEC-205 receptoru se neobjevují žádné aminokyselinové motivy spojené s vazbou sacharidů. [76, 77]

Studie funkce DEC-205 byly založeny na využití monoklonálních protilátek jako náhradních ligandů a demonstrovaly vychytání antigenu DC prostřednictvím konjugace s protilátkami, jeho endocytózu, zpracování a prezentaci na MHC molekulách I. (křížová prezentace) a II. třídy s vysokou účinností. Za tento efekt, který je střídavě usměrňován motivy v intracelulární části receptoru, jsou zodpovědné recyklační vlastnosti DEC-205.

Motiv založený na tyrosinu zajišťuje počáteční endocytózu pomocí klathrinových váčků, zatímco klastr kyselých aminokyselin (kyselá triáda EDE) směřuje receptor do pozdního endozomu, umožní tak zpracování endocytovaného antigenu a jeho následné vystavení na povrchu antigen prezentujících buněk v komplexu s MHC gp I. a II. třídy. [78, 79]

1.2.3 Fúzní protein DEC-205/DCL-1

Katoem a kol. byly objeveny dvě nové varianty alternativně sestřižené mRNA multilektinového receptoru DEC-205 během jeho klonování z nádorové linie L428 (HRS buněčná linie). Jedna varianta mRNA kóduje extracelulární doménu DEC-205 (resp. její osmou až desátou CRD), která je sloučena s CRD, transmembránovou (TM) a cytoplazmatickou doménou (CP) pocházejících z DCL-1. Další varianta mRNA je kratší přibližně o třetinu (186 bp) C-terminální části CRD 10 z DEC-205. Popsané varianty mRNA jsou charakteristické pro fúzní protein hDEC-205/hDCL-1 exprimovaný v HRS buněčné linii. Geny pro DEC-205 a DCL-1 leží v lokusu q24 na chromosomu 2 ve vzájemné vzdálenosti 5,4 kb. Iniciační místo transkripce DCL-1 bylo nalezeno 44 bp před DCL-1 translačním startovním kodonem, umístěném v 5,4 kb sekvenci intronů mezi geny DEC-205 a DCL-1, což potvrdilo, že DCL-1 tvoří samostatný gen. Obě varianty fúzní mRNA patrně vznikají působením neobvyklého kontrolního mechanismu transkripce v HRS buňkách, který zajišťuje jejich kotranskripci a následný intergenový sestřih.

mRNA fúzního proteinu hDEC-205/hDCL-1 je v malém množství exprimována v monocytech a nezralých DC. Fúzní protein byl však nalezen pouze u zralých DC. [59] Vysokou úroveň exprese mRNA (9,5 kb) fúzního proteinu hDEC-205/hDCL-1 vykazují především buňky Hodgkinova lymfomu. Jeho zřejmě selektivní exprese v HRS buňkách by se mohla stát cílem T buněčně zprostředkované a na protilátkách založené imunoterapie HL. [56]

1.2.4 Patologie spojená s DEC-205/DCL-1

Transkript fúzního proteinu hDEC-205/hDCL-1 byl identifikován ve spojitosti s Hodgkinovým lymfomem, který představuje asi 30% všech lymfomů. Klasický Hodgkinův lymfom (HL) je maligní lymfom charakteristický přítomností malé populace morfologicky odlišných maligních buněk, známých jako buňky

mononukleární Hodgkinovy a multinukleární Reedové-Sternberga (HRS). První záznam o tomto onemocnění uvedl v roce 1832 Thomas Hodgkin, který ve své práci popsal nádorové zvětšení lymfatických uzlin a sleziny. [80] Nedávné pokusy identifikovaly přeskupení imunoglobulinových genů ve většině individuálních HRS buňkách, což ukazuje na jejich původ v B buňkách. Pravděpodobně HRS buňky pochází z B buněk zárodečného centra, které unikly apoptóze. [81, 82]

HRS buňky jsou obklopeny velkou populací zřejmě nemaligních B a T lymfocytů, plazmocytů, granulocytů, mastocytů a histiocytů, jejichž proliferaci pravděpodobně samy zprostředkovávají a to produkcí široké škály cytokinů a chemokinů. [83] HRS buněčné linie (L428) jsou v mnoha ohledech podobné antigen prezentujícím buňkám (aktivované B buňky a DC), jelikož exprimují povrchové molekuly, které se účastní aktivace, diferenciaci a proliferaci T a B buněk. Jedná se zejména o molekuly zásadní pro aktivaci (MHC II), kostimulační (CD40, CD80 a CD86), adhezivní (CD11c) a povrchové znaky DC (CD83). Dále sekretují některé chemokiny (CCL5, CCL17, CCL22 a CCL28), cytokiny (GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-10, IL-13, IL-15 a IL-21). [84, 85] HRS produkují některé rozpustné faktory (např. TGFβ a IL-10) pomocí nichž inhibují aktivaci Tc buněk a APC. [86]

HRS atrahují několik typů buněk imunitního systému do lymfatických tkání a vytváří tak typické zánětlivé mikroprostředí, které jim zprostředkovává různé signály od ostatních buněk zejména růstové a další potřebné pro jejich přežití. Některé studie prokázaly inhibici T buněčné proliferace a snížení produkce cytokinů Th buňkami. Mezbuněčné interakce mohou vést k imunitní inhibici – např. HRS buňky exprimují CD95L, který vyvolává apoptózu aktivovaných CD4⁺ a CD8⁺ T buněk. Pacienti mají tedy defektní buněčnou imunitu a jsou náchylní k bakteriálním a virovým infekcím. [87]

Dále HRS buňky produkují mnoho receptorů a ligandů, které využívají k udržení nádorového prostředí. Významná je exprese CD15 molekuly, která slouží jako diagnostický marker Hodgkinova lymfomu. CD15 molekuly jsou skupina fukosylovaných sacharidových struktur, jež fungují jako ligandy pro E-selektiny na endoteliálních buňkách a podporují buněčnou adhezi. CD15-selektinové interakce hrají důležitou roli ve vývoji a udržování nádorového mikroprostředí. HRS buňky produkují receptory TNF rodiny (CD30, CD40, CD95 aj.), jejichž funkcí je stimulace

apoptózy, a naopak indukují buněčnou proliferaci a chrání buňky před podněty vyvolávající apoptózu. Záchrana HRS buněk před apoptózou je klíčový jev v patogenitě Hodgkinova lymfomu. [87]

Zajímavé je, že HRS buněčné linie exprimují nadměrné množství DEC-205/DCL-1 fúzní mRNA, kdežto 4,2 kb DCL-1 mRNA zde nebyla zjištěna. Zatímco ostatní lidské myeloidní buněčné linie (HL60) jsou schopné exprese DEC-205 i DCL-1 mRNA. Zdá se, že exprese fúzní mRNA je vysoce regulována, což vede ke spekulaci, že v HRS buňkách existují jisté transkripční faktory, které mohou kontrolovat kotranskripci DEC-205 a DCL-1 genů. [56] Funkční význam fúzního proteinu DEC-205/DCL-1 je prozatím neznámý. [58]

2 Cíle práce

- Optimalizace podmínek produkce a renaturace DCL-1 *in vitro*
- Ověření zapojení disulfidických můstků v DCL-1
- Získat data pro ověření struktury DCL-1 pomocí metody chemického síťování v kombinaci s hmotnostní spektrometrií

3 Materiál

3.1 Přístroje

Analytické váhy AL54-IC	<i>Mettler Toledo, ČR</i>
Aparatura pro ultrafiltraci	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Automatické pipety	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga J-6M	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Spectrafuge 16M	<i>Labnet, USA</i>
Centrifuga Avanti J-26 XP	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga VSMC-13	<i>Shelton Scientific, USA</i>
Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra	<i>Millipore, USA</i>
Dialyzační trubice	<i>Spektrum Laboratories, USA</i>
HPLC systém BioSys 510	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Chladnička	<i>Elektrolux, Švédsko</i>
Kolonky MicroTrap s reverzní fází	<i>Michrom Bioresources, USA</i>
Kolona Superdex 75 HR 10/300 GE	<i>Healthcare, Německo</i>
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Mrazicí box (-80°C)	<i>Revco, USA</i>
Mrazicí box (-20 °C)	<i>Zannusi, Itálie</i>
Mikrostříkačky	<i>Hamilton, Švýcarsko</i>
pH metr Φ200	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Předvážky HF-1200G	<i>AND, USA</i>
Spektrofotometr SAFIRE II	<i>Tecan, Švýcarsko</i>
Souprava pro SDS-PAGE elektroforézu	<i>Bio-Rad, USA</i>
Spektrofotometr DU-70	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Sterilní filtr 0,2 µm, PS	<i>Whatman, USA</i>
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf, Německo</i>
Thermoblok	<i>Grant, UK</i>
Třepačka na Erlenmayerovy baňky	<i>Gallenkamp Ltd., UK</i>
Třepačka na zkumavky BigGer Bill	<i>Thermolyne, USA</i>
Ultracentrifuga Optima LE-80K	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Ultrafiltrační membrána	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

Ultrazvuková lázeň Sonorex	<i>Bandelin, Německo</i>
Ultrazvuková sonda Ultrasonic homogenizer 4710	<i>Cole-Parmer Instrum. Co., USA</i>
Vakuová odparka Speedvac	<i>Jouan, Francie</i>
Vakuová odparka Savant SPD 121P Speedvac	<i>Thermo Fisher, USA</i>
Vortexový mixér Zx ³	<i>Scientifica, Itálie</i>
Varič	<i>Eta, ČR</i>
Zdroj deionizované vody Milli-Q Academic	<i>Millipore, USA</i>

3.2 Chemikálie

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid	<i>Thermo Scientific, USA</i>
2-merkaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
4-ethylmorfolin	<i>Merck, Německo</i>
Acetonitril	<i>Merck, Německo</i>
Akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Azid sodný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Serva, Německo</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, Německo</i>
Cystamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Cysteamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Dimethyl sulfoxid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Disukcinimidyl glutarát	<i>Thermo Scientific, USA</i>
Disukcinimidyl suberát	<i>Thermo Scientific, USA</i>
Dodecylsulfát sodný	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
DTT	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
EDTA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Ethanol	<i>Lachema, ČR</i>
Glycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Guanidin-HCl	<i>Serva, Německo</i>
HEPES	<i>Serva, Německo</i>
Hovězí sérový albumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Hydroxid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid hořečnatý	<i>Lachema, ČR</i>

Chlorid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
Chlorid vápenatý	<i>Lachema, ČR</i>
IPTG	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Jodacetamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Kyselina chlorovodíková	<i>Lachema, ČR</i>
Kyselina octová	<i>Lachema, ČR</i>
Kyselina trifluoroctová pro LC-MS	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
Kvasničný extrakt	<i>Oxoid, USA</i>
L-arginin-HCl	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Methanol	<i>Lachema, ČR</i>
<i>N,N'</i> -methylen-bis-akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Persíran amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Sacharosa	<i>Lachema, ČR</i>
TCEP	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
TEMED (1,2-bis(dimethylamino)ethan)	<i>Serva, Německo</i>
Tris	<i>Serva, Německo</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Trypton	<i>Oxoid, USA</i>
Ultračistá voda (LC-MS grade)	<i>J.T. Baker, USA</i>
Ostatní chemikálie	<i>Lachema, ČR</i>

Všechny použité chemikálie byly v nejvyšší komerčně dostupné kvalitě.

3.3 Roztoky, pufrů a jiný materiál

1 × vzorkový pufr pro SDS elektroforézu (neredukující): 50 mM Tris-HCl; 1 M glycerol; 7 mM SDS; 1,5 mM bromfenolová modř; pH = 6,8

1 × vzorkový pufr pro SDS elektroforézu (redukující): 50 mM Tris-HCl; 1 M glycerol; 7 mM SDS; 1,5 mM bromfenolová modř; 100 mM DTT; pH = 6,8

Akrylamidová směs pro přípravu SDS-PAGE gelů: 29% (w/v) akrylamid; 1% (w/v) *N,N'*-methylen-bis-akrylamid

Asp-N (zásobní roztok 100 µg/µl)
Roche, Švýcarsko

Barvicí roztok pro SDS elektroforézu: 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové:

Bio-Rad, Německo

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinů reakcí s BCA

Sigma-Aldrich, USA

Dialyzační pufr: 15 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM NaN₃; pH = 8,0

DNAsa I

Sigma-Aldrich, USA

Elektrodotový pufr pro SDS elektroforézu: 10mM Tris, 20mM glycin, 3,5mM SDS, pH = 8,3

Elektrodotový 20× MES pufr pro gradientovou NuPAGE elektroforézu

Invitrogen, USA

Guanidinový pufr na rozpuštění inkluzních tělísek: 6 M guanidin-HCl; 100 mM Tris-HCl; 100 mM DTT; pH = 8,0

Chromatografický pufr pro gelovou filtraci: 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; 1 mM NaN₃; pH = 8,0

Kanamycin – 50 mg/ml zásobní roztok antibiotika (v dH₂O)

Sigma-Aldrich, USA

Kit pro AccQ-Tag aminokyselinovou analýzu

Waters, USA

LB agar: 1,5% (w/v) agar v LB médiu

LB médium: 1% (w/v) bacto-tryptone; 0,5% (w/v) bacto-yeast extract; 1% (w/v) NaCl; pH = 7,4

Leupeptin

Sigma-Aldrich, USA

Marker pro SDS elektroforézu

Sigma-Aldrich, USA

NuPAGE 4-12% gradientový Bis-Tris gel

Invitrogen, USA

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely: 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

Pepstatin

Sigma-Aldrich, USA

PMSF

Sigma-Aldrich, USA

Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek: 50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM 2-merkapt ethanol; 1 mM NaN₃; pH = 7,4

Pufr pro štěpení s endopeptidasami: 50 mM ethylmorfolin-acetát; 10% acetonitril; pH = 8,23

Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek: 0,5% (w/v) Triton X-100; 50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM 2-merkapt ethanol; 1 mM NaN₃; pH = 7,4

RNasa I

Sigma-Aldrich, USA

Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek: 25% (w/v) sacharosa; 50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 mM NaN₃; pH = 7,4

See Blue marker pro gradientovou NuPAGE elektroforézu

Invitrogen, USA

Solvent A pro LC-MS: 5% (v/v) kyselina octová

Solvent B pro LC-M: 5% (v/v) kyselina octová, 80% (v/v) acetonitril

Solvent A pro LC-MS: 0,1% (v/v) kyselina trifluoroctová

Solvent B pro LC-MS: 1% (v/v) kyselina trifluoroctová, 80% (v/v) acetonitril

Solvent C pro LC-MS: 0,1% (v/v) kyselina trifluoroctová, 80% (v/v) acetonitril

Tetracyklin hydrochlorid - 5 mg/ml zásobní roztok antibiotika (v EtOH)

Jersey Lab Supply, USA

Trypsin (zásobní roztok 100 µg/µl)

Roche, Švýcarsko

3.4 Vektor

Rekombinantní expresní vektor pHCL1E - připravil RNDr. Daniel Kavan, Ph.D. zaklonováním extracelulární domény DCL-1 do komerčně dostupného vektoru pET 30a(+) od firmy *Merck*, Německo

3.5 Bakteriální kmen

kmen BL21-Gold(DE3), genotype: *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS* (r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tetr^R
gal λ(DE3) *endA* Hte
Stratagene, USA

4 Metody

4.1 Rekombinantní exprese proteinů

4.1.1 Transformace kompetentních buněk

Transformace vyžaduje speciálně upravené bakteriální buňky – tzv. kompetentní buňky, tj. buňky, které jsou schopné přijmout cizí DNA (plazmid). Buňky jsou uvedeny do stavu kompetence inkubací v přítomnosti vápenatých iontů (roztok chloridu vápenatého), které způsobí větší permeabilitu membrány. Transformace se nejčastěji provádí metodou tzv. tepelného šoku, kdy dochází k destabilizaci cytoplazmatické membrány a následné integraci vektoru do bakteriálních buněk.

Kompetentní buňky *E. coli* kmene BL21(DE3) byly ponechány 15 min rozmrazit na ledu. K alikvotě byla sterilně přidána plazmidová DNA a vzniklá směs byla ponechána inkubovat 30 min na ledu. Po inkubaci byla provedena transformace metodou tzv. tepelného šoku, tj. zahřátím buněk ve vodní lázni na 42 °C po dobu 45 s a bezprostředně poté zchlazením na ledu. Poté byl k alikvotě asepticky přidán 1 ml čistého LB-média a směs byla inkubována při 37 °C po dobu 1 hod. Po inkubaci následovala centrifugace (2500× g, 5 min). Po centrifugaci bylo odstraněno 800 µl supernatantu a peleta byla resuspendována ve zbylém množství supernatantu. Suspenze transformovaných buněk byla rozetřena pomocí sterilní hokejky po celém povrchu LB agarové plotny obsahující příslušná antibiotika. Naočkovaná miska byla kultivována v inkubátoru při 37 °C přes noc.

4.1.2 Selektce produkčního klonu

Kompetentní buňky *E. coli* kmene BL21(DE3) mají speciálně upravený genom, aby bylo možné cíleně ovlivnit expresi rekombinantního proteinu, která je regulována velice silným T7 promotorem z bakteriofága λ. Na T7 promotor umístěný v expresním vektoru specificky nasedá T7 RNA polymerasa, která zajišťuje transkripci rekombinantního proteinu. Exprese T7 RNA polymerasy je kontrolována *lac* promotorem, který je uložen v genomu *E. coli*. *Lac* represor, jehož gen je také vložený v genomu *E. coli*, nasedá na *lac* operátorovou sekvenci v blízkosti *lac* promotoru, čímž blokuje syntézu T7 RNA polymerasy a transkripce rekombinantního proteinu na vektoru neprobíhá.

Nejčastěji se k indukci exprese T7 RNA polymerasy a následné iniciaci transkripce požadovaného proteinu používá IPTG (nemetabolizovatelný analog laktosy), který na sebe váže *lac* represor a brání tak jeho vazbě na *lac* operátor.

Z Petriho misky s narostlými koloniemi byly náhodně vybrány čtyři, které byly přeočkovány do zkumavek s 1 ml čistého LB-média obsahujícího příslušná antibiotika. Zaočkováná média byla ponechána inkubovat za stálého třepání (220 ot./min) při 37 °C přes noc.

Po inkubaci bylo 10 µl každé stacionární kultury zaočkováno do 1 ml čistého LB média s příslušnými antibiotiky. Vždy dvě média byla zaočkována stejnou kulturou a ponechána kultivovat na třepačce při 37 °C po dobu 3 hod. Následně byla výhradně u jedné ze dvou totožných kultur provedena indukce 1 mM IPTG (označena+), zatímco druhá kultura bez indukce sloužila jako negativní kontrola (označena -). Kultury byly inkubovány za stálého třepání (220 ot./min) při 37 °C další 3 hod., kdy docházelo k produkci proteinu. Po inkubaci byly kultury centrifugovány (5000× g, 5 min). Pelety bakteriálních buněk získané centrifugací byly analyzovány na SDS-PAGE v redukujících podmínkách (viz kapitola 4.5.1).

4.1.3 Optimalizace podmínek produkce proteinu

S vybranými vhodnými produkčními klony byla provedena optimalizace produkce. Při optimalizaci byly sledovány různé varianty těchto parametrů: koncentrace expresního induktoru IPTG, teploty a doby produkce. Vždy 10 µl stacionární kultury bylo přeočkováno do 1 ml čerstvého LB média s příslušnými antibiotiky. Buňky použité k optimalizaci koncentrace IPTG byly kultivovány za stálého třepání (220 ot./min) při 37 °C po dobu 3 hod. (empirická doba za kterou bakterie dorostou do optické denzity 0,6). Následně byly indukovány různými koncentracemi IPTG a sklizeny po 6 hod. produkce. Buňky užití k optimalizaci teploty byly nejprve zchlazeny na 30 °C a 22 °C, poté indukovány 1 mM IPTG a sklizeny opět po 6 hod. produkce. Buňky určené k optimalizaci doby produkce byly kultivovány analogicky jako v případě optimalizace koncentrace IPTG s tím rozdílem, že následovala indukce 1 mM IPTG a sklizení buněk probíhalo v odlišných časových intervalech produkce. Množství vyprodukovaného proteinu jednotlivými buňkami bylo vizualizováno na SDS elektroforéze v redukujících podmínkách.

4.1.4 Velkoobjemová produkce proteinu

Z optimalizace produkce byly zjištěny nejvhodnější podmínky potřebné k získání co největšího množství produkovaného proteinu, které byly použity při produkci ve velkém objemu. Velkoobjemová produkce byla provedena celkem ve 2 l sterilního LB-média s antibiotiky, kdy jedna 2 l Erlenmeyerova baňka obsahující 500 ml média byla zaočkována 5 ml stacionární produkční kultury. Baňky se zaočkovanými médii byly ponechány třepat rychlostí 220 ot./min při 37 °C po dobu přibližně 4 hod. V průběhu kultivace byla spektrofotometricky měřena optická denzita všech buněčných kultur při vlnové délce 550 nm. Induktor exprese IPTG byl přidán do rostoucích bakteriálních kultur, když hodnota optické denzity přesáhla 0,6. Po indukci IPTG byly buněčné kultury inkubovány za stálého třepání (220 ot./min, 37 °C) po dobu 3 hod. Po ukončení inkubace byly centrifugovány (6000× g, 15 min, 4 °C). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a pelety buněk s nerozpustným proteinem byly uchovány při -80 °C až do zahájení izolace inkluzních tělísek.

4.1.5 Izolace inkluzních tělísek

Pelety produkční kultury byly postupně resuspendovány krátkými pulsy ultrazvukové sondy 5× 30 s ve 20 ml sacharosového lyzačního pufru včetně přidávaných inhibitorů proteas 10 μM leupeptin, 10 μM pepstatin a 1 mM PMSF. Převedené pelety byly zmrazeny při -80 °C po 30 min a opět rozmrazeny ve vodní lázni. Celý proces sonikace, zmražení a rozmražení byl opakován čtyřikrát po sobě. Po posledním rozmražení bylo k suspenzi přidáno 400 μl 1 M roztoku MgCl₂, 2 μl 100 U/μl roztoku DNasy a 5 μl 10 mg/ml roztoku RNasy a byla ponechána inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 20 min. V průběhu inkubace byla směs sonikována na ledu 2× 30 s a poté následovala centrifugace (8000× g, 15 min, 4 °C). Supernatant vzniklý centrifugací byl odstraněn, peleta byla resuspendována ve 20 ml pufru s detergentem pomocí ultrazvukové sondy a opět byly přidány inhibitory proteas. Směs byla sonikována 2× 30 s a centrifugována (15000× g, 10 min, 4 °C). Po odebrání supernatantu byla peleta resuspendována ve 20 ml promývacího pufru bez detergentu s inhibitory proteas. Dále byla provedena sonikace 2× 30 s, centrifugace (15000× g, 10 min, 4 °C) a odstranění supernatantu. Vzniklá peleta obsahující inkluzní tělíška byla uchována při -20 °C.

4.2 Renaturace proteinu z inkluzních tělísek

Mnoho rekombinantních proteinů především eukaryotického původu je exprimována v *E. coli* ve formě nerozpustných útvarů tzv. inkluzních tělísek v cytoplasmě. Pro dosažení rozpustného proteinu v aktivní formě je třeba provést solubilizaci inkluzních tělísek pomocí silných denaturačních činidel v kombinaci s redukčními činidly a následnou renaturaci. Renaturace je proces, kdy dochází k rekonstrukci nativní konformace proteinu po předchozí denaturaci. Běžně používanou metodou renaturace je metoda rychlého naředění, kde se denaturovaný protein přidává po malých dávkách do nadbytku renaturačního pufru za stálého míchání a po zředění se během několika sekund složí do správné konformace. Do renaturačních pufrů se zpravidla přidávají látky, které napomáhají ke snížení agregace proteinu a usnadňují tvorbu disulfidických můstků.

4.2.1 Renaturace proteinu metodou rychlého naředění

Renaturace proteinu byla provedena metodou rychlého naředění. Peleta inkluzních tělísek získaná z 2 l produkční kultury byla nejprve rozpuštěna v 5 ml solubilizačního pufru obsahujícího 6 M guanidin-HCl a 10 mM DTT. Následně byl vzorek centrifugován (25 000× g, 30 min, 20 °C) a vzniklý supernatant obsahující denaturovaný protein byl za stálého míchání postupně přikapáván do 500 ml renaturačního pufru rychlostí přibližně jedna kapka za sekundu.

4.2.2 Dialýza

Renaturační směsi byly převedeny do dialyzačních trubic asi do 2/3 jejich objemu a poté dialyzovány za stálého míchání proti 8 l dialyzačního pufru při 4 °C po dobu 5 hod. Po uplynutí této doby byla dialýza znovu opakována s čerstvým pufrům přes noc.

4.3 Metody sloužící k zakoncentrování proteinu

4.3.1 Ultrafiltrace

Po dialýze byl zředěný roztok proteinu přenesen do sestavené aparatury pro ultrafiltraci, ve které byla vložena ultrafiltrační membrána o průměru 76 mm s limitem propustnosti pórů její aktivní vrstvy 10 kDa. Filtrace roztoku proteinu přes

membránu probíhala pod vstupním tlakem dusíku 0,5 MPa za stálého míchání při laboratorní teplotě. Ultrafiltrací byl vzorek zakoncentrován na objem cca 30 ml. Po ukončení ultrafiltrace byla membrána uchována v 1 mM roztoku NaN_3 při 4 °C, aby nedošlo k jejímu vyschnutí a popraskání.

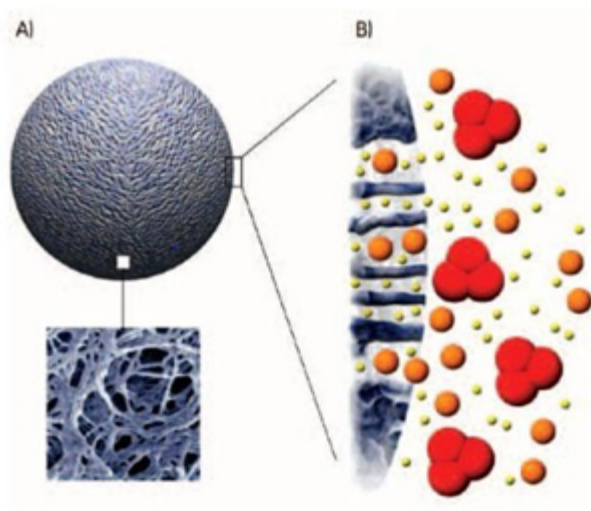
4.3.2 Centrifugační koncentrátoři

Centrifugační koncentrátor řady Amicon® Ultra-15 byl použit k zakoncentrování vzorků proteinu určených k purifikaci gelovou filtrací i kolonových eluátů. Membrány v těchto filtračních zařízeních jsou podobně jako ultrafiltrační membrány schopné zadržovat molekuly přesahující limitní nominální molekulovou hmotnost, ovšem hnací silou transportu vzorku skrz membránu byla v tomto případě centrifugační síla. Retentát byl opakovanou centrifugací (2500× g, 20 min, 25 °C) zakoncentrován na objem 500-1000 μl . Membrána koncentrátoru byla opět uchována v 1 mM roztoku NaN_3 při 4 °C.

4.4 Chromatografické metody

4.4.1 Gelová filtrace

Gelová permeační chromatografie slouží k separaci složek směsi na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti, velikosti a tvaru. Separovaná směs molekul je unášena proudem mobilní fáze skrz kolonu naplněnou porézními gelovými částicemi. Velmi malé molekuly mohou úplně difundovat do stacionární fáze přítomné v pórech gelu, větší zůstávají při povrchu a ty, jejichž průměr je větší než póry gelu, do něj nepronikají vůbec (Obr. 6, str. 39). Nejmenší molekuly jsou z kolony eluovány s nejvyšším retenčním časem (nejpomaleji). Gelová chromatografie používá řadu materiálů včetně zesíťovaného dextranu (Sephadex), polyakrylamidu (Bio-gel), agarosy (Sepharosa) a kombinovaných materiálů (Superdex – zesíťované porézní agarosové částice s kovalentně navázaným dextranem).^[88]



Obr. 6: (A) částice gelu s podrobným detailem z elektronového mikroskopu, (B) směs molekul difundujících do pórů gelu ^[88]

Separace renaturační směsi probíhala na koloně Superdexu 75 HR v HPLC systému BioSys 510 s nastavenou průtokovou rychlostí mobilní fáze 0,4 ml/min. Kolona byla před nanesením vzorku promyta elučním pufrem. Vzorek proteinu byl zahuštěn pomocí centrifugačního koncentrátoru a následně přes injektor nastříknut na kolonu. Spektrofotometrický detektor zaznamenával hodnoty absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm v závislosti na retenčním čase a příslušné frakce byly jímány manuálně. Po ukončení separace byla kolona uchována ve 20% roztoku ethanolu. Přítomnost a čistota proteinu ve frakcích byla ověřena SDS-PAGE v redukujících i neredukujících podmínkách.

4.5 Elektromigrační metody

Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS se využívá k separaci proteinů na základě jejich rozdílné elektroforetické pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli vytvořeném vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Proteiny jsou tepelně denaturovány ve vzorkovém pufru obsahujícím detergent SDS, který se na proteiny váže a uděluje jim záporný náboj přímo úměrný jejich velikosti. Proteiny o stejné hustotě náboje jsou tedy separovány pouze na základě své molekulové hmotnosti v polyakrylamidovém gelu během migrace ke kladné elektrodě. V závislosti na velikosti proteinů se užívají

gely o různé hustotě s rozdílnými separačními schopnostmi, kterých lze dosáhnout upravením poměru vody a akrylamidového mixu.

4.5.1 Diskontinuální SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

SDS elektroforéza byla provedena v 15 % polyakrylamidovém gelu. Mezi dvě utěsněná skla byl nejprve nalit separační gel (viz Tab. 1), který byl následně převrstven destilovanou vodou. Po proběhnutí polymerace separačního gelu byla vrstva vody odstraněna a na jeho povrch byla nanесena vrstva zaostřovacího gelu (viz Tab. 2, str. 41), do které byl zasunut hřeben pro vytvoření jamek. Po vyjmutí hřebenu ze ztuhlého gelu byla skla upevněna do elektroforetické aparatury, která byla zalita SDS elektrodoým puřrem. Vzorky byly připraveny smísením se vzorkovým puřrem (v redukujících či neredukujících podmínkách), poté povařeny po dobu 5 min a centrifugovány (12000× g, 5 min). Připravené vzorky včetně proteinového standardu byly nanесeny do vytvořených jamek v zaostřovacím gelu. Separace proteinu probíhala za konstantního proudu, který byl nastaven nejprve na 30 mA/gel pro zaputování vzorků a následně zvýšen na 50 mA. Elektroforéza byla ukončena, když zóna bromfenolové modři doputovala ke spodnímu okraji gelu. Po ukončení elektroforézy byly gely ponořeny na 10 min do barvicího roztoku pro vizualizaci a následně ponečány odbarvovat v odbarvovacím roztoku, než byly zřetelně vidět jednotlivé zóny proteinu.

Tab. 1: Složení 15% separačního gelu na SDS-PAGE

Složení 15% separačního gelu	V [ml]
dH ₂ O	1,1
30% akrylamidový mix	2,5
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3
10% SDS	0,05
TEMED	0,002
10% APS	0,05

Tab.2: Složení 5% zaostřovacího gelu na SDS-PAGE

Složení 5% zaostřovacího gelu	V[ml]
dH ₂ O	0,68
30% akrylamidový mix	0,17
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,13
10% SDS	0,01
TEMED	0,001
10% APS	0,01

4.6 Stanovení koncentrace proteinu

4.6.1 Stanovení koncentrace proteinu podle Bradfordové

Metoda je založena na kolorimetrické reakci, která probíhá smísením činidla Bradfordové s roztokem proteinu. Specifické činidlo obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250, které se v kyselém prostředí váže na bazické (především arginin) a nepolární (fenylalanin, tryptofan a prolin) aminokyselinové zbytky proteinů. Po adsorpci barviva na aminokyselinové zbytky dochází k posunutí absorpčního maxima vázaného barviva ze 465 na 595 nm, což se projevuje změnou barvy roztoku (modrý), která je úměrná množství proteinu. [89]

Pro stanovení koncentrace proteinu byly použity kalibrační roztoky BSA o koncentracích 0,1 – 0,5 mg/ml. Na mikrotitrační destičku bylo přeneseno ve dvojicích po 5 µl kalibračních roztoků, vhodně zředěných vzorků proteinu a referenčního vzorku (dH₂O). Ke každému vzorku bylo přidáno 200 µl činidla Bradfordové a takto vzniklé směsi byly ponechány inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 15 min. Po inkubaci byly naměřeny jejich absorbance na spektrofotometru Safire^{2™} Microplate Reader při vlnové délce 595 nm. Z naměřených hodnot absorbancí standardních roztoků byla sestrojena kalibrační přímka a ze získané rovnice lineární regrese byla vypočtena koncentrace proteinu.

4.6.2 Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA

Metoda využívá sodné soli kyseliny bichinoninové, která chelatuje měďné ionty za vzniku purpurového komplexu detekovatelného spektrofotometricky při 562 nm. Měďné ionty vznikají redukcí měďnatých iontů peptidovými vazbami proteinu v alkalickém prostředí. [90]

Koncentrace proteinu byla stanovena spektrofotometricky při 562 nm pomocí stejných standardních roztoků jako v případě metody dle Bradfordové. Ovšem v tomto případě bylo ke 25 μl každého vzorku standardu, zředěného vzorku proteinu a slepého vzorku (dH_2O) přidáno 200 μl činidla připraveného dle návodu výrobce (roztoky BCA a síranu měďnatého v poměru 50:1) a následná inkubace za laboratorní teploty trvala 45 min. Všechny vzorky byly opět stanoveny ve dvojicích pro snížení chyby měření. Z rovnice kalibrační přímky standardních roztoků byla vypočtena koncentrace proteinu.

4.6.3 Aminokyselinová analýza proteinu

Aminokyselinová analýza je nejpřesnější metoda absolutní kvantifikace proteinů. Pro stanovení aminokyselinového složení v hydrolyzátu proteinu byla použita předkolonová derivatizační AccQ•Tag metoda, která je založena na derivatizaci aminokyselin pomocí ACQ činidla. ACQ činidlo konvertuje primární a sekundární aminokyseliny na vysoce stabilní deriváty močoviny, které jsou kvantifikovány fluorescenční detekcí při 395 nm (excitace 250 nm). Nezareagované činidlo podléhá hydrolýze za vzniku hlavního vedlejšího produktu AMQ, NHS a oxidu uhličitého. AMQ slabě fluoreskuje při 395 nm a tvoří malý vrchol, který lze v chromatogramu snadno rozlišit. [91]

Vzorky na aminokyselinovou analýzu byly připraveny smísením 10 μl 40 \times ředěného roztoku proteinu, resp. 0,2 mg/ml roztoku BSA a ovalbuminu s 90 μl 6 M HCl. Mikrozkušavky obsahující připravené vzorky byly zataveny nad plamenem. Kyselá hydrolýza byla provedena při 110 $^{\circ}\text{C}$ přes noc. Po hydrolýze byly odlomeny zatavené hroty mikrozkušavek a vzorky byly lyofilizovány po dobu 2 hod. Následně byly rozpuštěny ve 20 μl 20 mM HCl, smíseny s 60 μl borátového pufru a derivatizovány pomocí 20 μl ACQ činidla. Kalibrační standard byl připraven smísením 10 μl roztoku aminokyselinového standardu s 20 μl derivatizačního činidla ACQ a 70 μl borátového pufru. Derivatizované vzorky byly inkubovány 1 min za laboratorní teploty, poté lehce zamíchány na vortexu a přemístěny do vodní lázně, kde byly inkubovány při 55 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min.

Gradientová separace směsi derivátů aminokyselin stejně tak kalibračního standardu probíhala v RP-HPLC systému. Před nástřikem vzorků byl systém nejprve ekvilibrován eluenty A (AccQ•Tag pufr) a B (60% acetonitril) dle návodu výrobce.

Průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na 1 ml/min. Chromatografická metoda byla provedena dle návodu výrobce. Derivatizované vzorky byly kvantifikovány fluorescenční detekcí při 395 nm (excitace 250 nm).

Data získaná z chromatogramu byla využita ke stanovení přesné koncentrace proteinu. Aminokyselinový standard obsahoval po 50 pmol každé aminokyseliny. Podle poměru plochy našich chromatografických vrcholů získaných integrací byla určena látková množství aminokyselin. Ze sekvence proteinu obsahujícího různé množství daných aminokyselin bylo získáno látkové množství proteinu, z něhož bylo vypočtena hmotnost proteinu v nástřiku.

Hodnota naměřené absorbance ředěného roztoku proteinu při 280 nm byla využita k výpočtu molárního absorpčního koeficientu.

4.7 Metody použité pro strukturní studie

4.7.1 Odsolení vzorku proteinu

Zahuštěný roztok proteinu získaný gelovou filtrací bylo potřeba pro hmotnostně spektrometrickou analýzu přecistit, aby nedošlo k tvorbě aduktů s ionty solí. K odsolování vzorku byla použita proteinová kolonka MicroTrap na reverzní fázi, kterou je polymerní hydrofóbní sorbent. Kolonka byla nejprve 2× promyta solventem A (5% HAc), 1× solventem B (5% HAc, 80% AcN) a poté ekvilibrována solventem A. Na připravenou kolonku byl nanesen vzorek proteinu a následně byla 3× promyta solventem A, čímž byl protein zbaven nežádoucích solí. Navázaný protein byl z kolonky eluován 50 µl solventu B.

4.7.2 Odsolení vzorků peptidů

Pro odstranění solí, které by mohly rušit MS stanovení byla použita peptidová kolonka MicroTrap s reverzní fází. Kolonka byla nejprve 3× promyta 50% AcN, 3× solventem B, 3× solventem C, 3× solventem A. Na připravenou kolonku byl nanesen vzorek extrahovaných peptidů a následně byla 3× promyta solventem A (odsolení). Navázané peptidy byly z kolonky eluovány 50 µl solventu B, které byly jímány do čisté mikrozkuřavky. Mezi nanášením jednotlivých vzorků extraktů byla kolonka reekvilibrována 3× promytím solventem A. Stejným způsobem byly zpracovány i ostatní vzorky. Odsolené vzorky byly lyofilizovány na objem cca 5 µl.

K vysušeným vzorkům byly přidány 2 μ l solventu B a byly zamíchány na vortexu. Dále bylo ke vzorkům přidáno 25 μ l solventu A a opět byly zamíchány na vortexu. Následovala sonikace (5 min) a centrifugace (12 000 \times g, 15 s).

4.7.3 Štěpení proteinů po SDS-PAGE pomocí endopeptidas

Vyřezané proužky gelu s proteinem byly skalpelem rozkrájeny na malé kostičky a převedeny do mikrozkrumavek. Kostičky gelu byly převrstveny 200 μ l 50 mM ethylmorfolinového pufru (pH 8,2) s AcN v poměru 1:1, zamíchány na vortexu a ponechány sonikovat do odbarvení (cca 1,5 hod.). Po sonikaci byly vzorky centrifugovány (12000 \times g, 15 s), vzniklé supernatanty byly odstraněny a kostičky gelu byly převeštvény 150 μ l AcN. Vzorky byly zamíchány na vortexu a sonikovány 5 min. Po odebrání supernatantů byly ponechány vysušit v lyofilizátoru po dobu 20 min.

V případě zesíťovaných proteinů byl ke všem lyofilizovaným kostičkám gelu přidán 100 mM roztok redukčního činidla TCEPu. Vzorky byly zamíchány na vortexu a ponechány 5 min v termostatu při 90 °C. Ze zahřátých vzorků byly odebrány supernatanty a bylo k nim přidáno 100 μ l AcN. Poté byly vzorky zamíchány na vortexu a opět byly odebrány supernatanty. Kostičky byly převrstveny 50 mM roztokem alkylačního činidla iodacetamidu a ponechány 20 min ve tmě. Po uplynutí této doby byl roztok ze všech vzorků odstraněn.

Následně byly kostičky gelu převrstveny 150 μ l vody. Vzorky byly zamíchány na vortexu, sonikovány po dobu 5 min, centrifugovány (12 000 \times g, 15 s) a vzniklé supernatanty byly odebrány. Dále bylo ke vzorkům přidáno 150 μ l AcN. Po přidání AcN byly vzorky znovu zamíchány, sonikovány (5 min), centrifugovány (12 000 \times g, 15 s) a byly zbaveny supernatantů. Proces hydratace (H₂O) a dehydratace (AcN) byl ještě dvakrát opakován než byly vzorky lyofilizovány.

Po lyofilizaci vzorků byly kostičky gelu s proteinem převrstveny roztokem endopeptidasy obsahujícího 50 mM ethylmorfolinový pufr (pH 8,2) s 10% AcN. Připravené vzorky byly ponechány štěpit v termostatu při 37 °C přes noc.

4.7.4 Extrakce peptidů z gelu

Po ukončení štěpení byly vzorky centrifugovány (12 000 \times g, 15 s), sonikovány 2 min, opět centrifugovány a supernatanty obsahující peptidy byly

převedeny do čistých mikrozkušavek. Kostičky gelu byly pro extrakci zbylých peptidů převrstveny 30 μ l 50% AcN, centrifugovány (12 000 \times g, 15 s), sonikovány 5 min, znovu centrifugovány a vzniklé supernatanty byly odebrány do příslušných mikrozkušavek. Stejný proces byl opakován s roztokem 0,1% TFA a roztokem 0,1% TFA v 60% AcN. Vzorky s extrahovanými peptidy byly zakonzentrovány v lyofilizátoru na cca 5 μ l. Po lyofilizaci bylo ke vzorkům přidáno 5 μ l roztoku 80% AcN s 1% TFA, poté byly vzorky sonikovány 5 min a centrifugovány (12 000 \times g, 15 s). Po centrifugaci bylo přidáno 240 μ l 0,1 % TFA a následovala znovu sonikace a centrifugace.

4.7.5 Stanovení zapojení disulfidických můstků

Disulfidické vazby jsou důležitým faktorem, který ovlivňuje proces skládání proteinů a přispívá ke stabilitě jejich prostorové struktury. Informace o jejich uspořádání může usnadnit homologní modelování proteinů a naznačit vlastní sbalování produkovaných rekombinantních proteinů. K identifikaci disulfidicky spojených peptidů byl použit protokol, který využívá stanovení hmotnosti s vysokou přesností a rozlišovací síly FT-MS. Dalšího zjednodušení analýzy dat bylo dosaženo užitím specifických endopeptidas (trypsinu a Asp-N) a softwarových nástrojů umožňujících rychlou samostatnou interpretaci dat. Jelikož specifické proteasy štěpí v bazickém prostředí, kde by mohlo docházet k rozpojení a zpětnému spojení disulfidických vazeb (tzv. scrambling), byl přímo do reakce s endopeptidasou, elektrodového a SDS vzorkového pufru přidán cystamin v příslušné koncentraci, aby se zabránilo tomuto efektu. [92]

Neredukující SDS elektroforéza probíhala na 4-12% komerčním gradientovém Bis-Tris gelu v prostředí 20 \times koncentrovaného MES SDS elektrodového pufru obsahujícího 100 μ M cystamin. Vzorky připravené smísením roztoku proteinu s neredukujícím 4 \times koncentrovaným NuPAGE LDS vzorkovým pufrem se 100 μ M cystaminem byly nanášeny spolu s proteinovým standardem do jamek gelu. Separace proteinu probíhala za konstantního napětí 200 V. Po ukončení elektroforézy byly jednotlivé zóny proteinu vizualizovány barvicím roztokem a následně vyříznuty pomocí skalpelu.

Následně byly vzorky štěpeny endopeptidasami za přítomnosti 0,3 mM cystaminu podle kap. 4.7.3. Vzniklé peptidy byly z gelu extrahovány dle kap. 4.7.4 a odsoleny dle kap. 4.7.2. Po odsolení byly vzorky převedeny do vialek opatřených septem a předány RNDr. Petrovi Novákovi, Ph.D., který provedl jejich analýzu metodou LC/ESI-FTICR MS. Naměřená data, která byla zpracována v programech Links a Data Analysis 3.0., byla použita k nalezení peptidů spojených disulfidickými můstky.

4.7.6 Chemické síťování proteinu

Chemické síťování proteinů v kombinaci s hmotnostní spektrometrií se ukázalo jako vhodný nástroj k mapování modelu trojrozměrné struktury proteinů s nízkým rozlišením a charakterizaci protein-proteinových interakcí. [93] Analýza zesíťovaných peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie přináší několik výhod spojených s MS analýzou: Hmotnost zkoumaných proteinů nebo proteinových komplexů je teoreticky neomezena, jelikož jsou zde analyzovány peptidy získané proteolytickým štěpením zesíťovaných proteinů. Analýza je zpravidla rychlá, relativně tolerantní vůči čistotě proteinu a za ideálních podmínek vyžaduje pouze malé množství proteinu (femtomoly). Metoda umožňuje získat náhled na 3D strukturu proteinu v jeho nativním stavu (v roztoku) a snadnou identifikaci flexibilních oblastí. Přístupné této analýze jsou i membránové proteiny a proteiny, které se vyskytují v různých sestřihových variantách nebo s odlišnými posttranslačními modifikacemi. Široká specifita dostupných síťovacích čidel vůči určitým reakčním skupinám (např. primární aminy, sulfhydryly, karbonyly a karboxyly) a odlišné velikosti jejich spojovacích ramének umožňuje provést rozsáhlou škálu experimentů. [94]

Podstatou síťovacích reakcí je vytvoření kovalentní vazby mezi reakčními skupinami síťovacích činidel a prostorově blízkými aminokyselinovými zbytky jednoho nebo dvou polypeptidových řetězců. Výsledkem síťovacích reakcí je více možných produktů, které jsou klasifikovány jako intra-, inter-peptidové spojení a mono-spoje, které mohou vznikat navázáním pouze jedné reaktivní skupiny síťovacího činidla nebo deaktivací reakční skupiny. Základní síťovací činidla obsahují dvě a více reakčních skupin, sloučených prostřednictvím spojovacího raménka. Délka tohoto raménka je často užívána jako tzv. molekulární pravítka k odhadování

vzdálenosti dvou spojených aminokyselinových zbytků, poskytujících přibližnou topologickou informaci o proteinech nebo proteinových komplexech. Existuje enormní množství komerčně dostupných síťovacích činidel, které jsou strukturními variantami základních činidel, ale jsou založené na malém množství chemických reakcí organických sloučenin. Činidla se dělí do několika kategorií dle své reaktivity (amino-, sulfhydryl-, karbonyl-, hydroxyl- a foto-reaktivní) nebo podle inkorporované vedlejší funkční skupiny. Výběr reakční skupiny síťovacího činidla závisí na proteinu určenému k síťování. [95]

Metoda chemického síťování také slouží k validaci 3D struktur proteinů, získaných pomocí technik NMR a rentgenostrukturní analýzy, čehož bylo využito v této práci. Za tímto účelem byla vybrána dvě homobifunkční činidla DSS a DSG (vysoce aminoreaktivní NHS-estery) a jedno heterobifunkční činidlo EDC, která byla použita k zesíťování proteinu DCL-1. Homobifunkční činidla obsahují identické reaktivní skupiny na obou koncích spojovacího raménka, zatímco heterobifunkční nesou odlišné reaktivní skupiny. DSS (spojovací raménko o délce 11,4Å) a DSG (7,7Å) jsou zástupci NHS-esterů, které reagují výhradně s volnou N-terminální (α -NH₂) aminoskupinou nebo ϵ -aminoskupinou lysinu v proteinu za vzniku stabilní amidové vazby a současně dochází k odstoupení NHS skupiny. Nicméně některé studie prokázaly modifikace na tyrosinových a serinových postranních řetězcích zkoumaných peptidů, ovšem tyto reakce přednostně probíhaly v kyselém prostředí, zatímco v alkalickém byly preferovány reakce s aminoskupinami lysinu. Tyto nežádoucí vazby tedy nejsou stabilní v alkalickém prostředí. [96] EDC je heterobifunkční činidlo s nulovou délkou spojovacího raménka a zprostředkovává dvoukrokovou reakci mezi karboxylovými skupinami a primárními aminy peptidů. V prvním kroku reakce EDC reaguje s karboxylovou skupinou peptidu za vzniku vysoce reaktivního esteru, který následně podléhá nukleofilnímu ataku primární aminoskupiny dalšího peptidu za vzniku amidové vazby a rozpustného derivátu močoviny. [94]

4.7.6.1 Reakce proteinu se síťovacími činidly

Pro reakce se síťovacími činidly bylo nejprve nutné převést protein do vhodnějšího pufru pomocí mikrodialýzy. Poté bylo provedeno s vybranými homobifunkčními činidly DSS a DSG zvlášť celkem pět síťovacích reakcí proteinu.

Pro reakce byly použity směsi činidel, které byly připraveny rozpuštěním nedeuterované (DSS; DSG)/deuterované (DSSD4; DSGD4) formy (1:1) síťovacích činidel v DMSO. Směsi činidel usnadňují identifikaci spojení uvnitř proteinu zprostředkovaných síťovacími činidly v hmotnostních spektrech. V dalších sedmi síťovacích reakcích proteinu byly použity připravené roztoky heterobifunkčního činidla EDC. Do všech síťovacích reakcí byla činidla přidána v příslušných molárních nadbytcích oproti proteinu. Reakce sloužící jako negativní kontroly nepodléhaly působení žádného činidla. Směsi byly zamíchány na vortexu a ponechány inkubovat po dobu 4 hod při laboratorní teplotě.

Po inkubaci byl ke směsím přidán 4× koncentrovaný NuPAGE vzorkový pufr se 100 mM DTT. Reakční směsi připravené v redukujícím pufru byly nanесeny spolu s proteinovým standardem do jamek 4-12% gradientového Bis-Tris gelu a separovány v prostředí 20× koncentrovaného MES SDS elektrodového pufru se zdrojem napětí nastaveným na 200 V. Pro vizualizaci zón zesíťovaného proteinu byly gely ponořeny do barvicího roztoku a následně odbarveny. Z odbarvených gelů byly pomocí skalpelu vyřezány vybrané zóny zesíťovaného proteinu z reakcí s nevhodnějšími podmínkami včetně negativní kontroly.

Následovalo štěpení vzorků proteinu, jehož disulfidické můstky byly nejprve redukovány 100 mM roztokem TCEPu a poté alkylovány 50 mM roztokem iodacetamidu, dle kap. 4.7.3, extrakce peptidů z gelu dle kap. 4.7.4 a odsolení vzorků peptidů dle kap. 4.7.2. Po odsolení byly získané frakce peptidů převedeny do vialek opatřených septem určených k LC/ESI-FTICR analýze, kterou provedl RNDr. Petr Novák, Ph.D.

5 Výsledky

5.1 Produkce extracelulární domény DCL-1

Konstrukt umožňující expresi produkovaného proteinu v bakteriích *E. coli* kmene BL21(DE3) Gold je tvořen extracelulární doménou DCL-1 (viz Obr. 7).

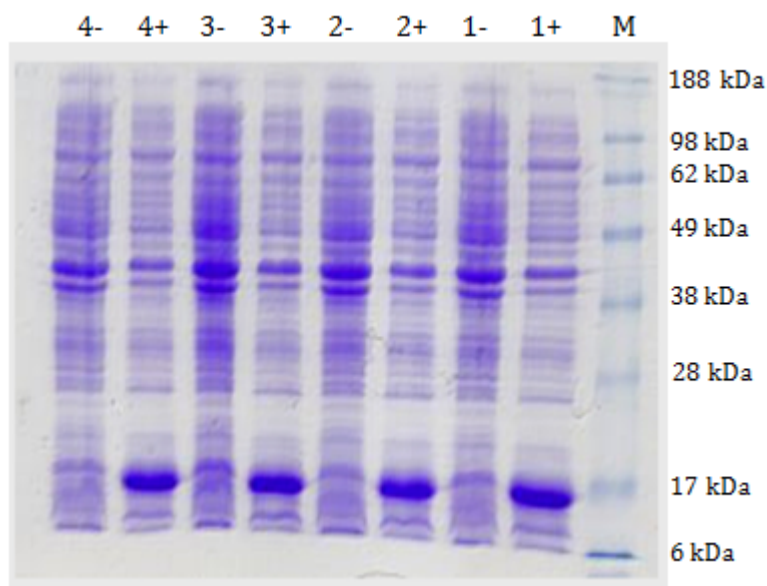
```
      10           20           30           40           50           60
MLRAALPALL LPLLGLAAAA VADCPSSTWI QFQDSCYIFL QEAIKVESIE DVRNQCTDHG
      70           80           90           100          110          120
ADMISIHNEE ENAFILDTLK KQWKGPDDIL LGMFYDTDDA SFKWFDNSNM TFDKWTDQDD
      130          140          150          160          170          180
DEDLVDTCAF LHIKTGEWKK GNCEVSSVEG TLCKTAIPYK RKYLSDNHIL ISALVIAS TV
      190          200          210          220          230
ILTVLGAIIW FLYKKHSDSR FTTVFSTAPQ SPYNEDCVLV VGEENEYPVQ FD
```

Obr. 7: Sekvence DCL-1 obsahuje 232 AMK a skládá se ze: zeleně vyznačeného - (SP) signálního peptidu, modře - CRD, oranžově - krátké spojky, růžově - transmembránové části a šedivě - intracelulární domény. Zaklonovaná sekvence v plazmidu pHCL1E je zvýrazněna podtržením.^[97]

Molekulová hmotnost připraveného proteinu je 16 212 Da, monoizotopická 16195,374 Da a teoretická hodnota pI leží kolem 4,3.

5.1.1 Selektce produkčních klonů

S narostlými bakteriálními kulturami *E. coli* kmene BL21(DE3) Gold, transformovanými 0,5 µg expresního vektoru pHCL1E, byla provedena zkušební produkce proteinu, která měla prokázat, zda opravdu obsahují vnesený vektor a jsou tedy schopné produkovat cílový protein. Jedna část bakteriálních kultur byla indukována 1 mM IPTG, zatímco druhá bez indukce sloužila jako negativní kontrola. Připravené lyzáty sklizených bakteriálních kultur byly vyhodnoceny na SDS-PAGE v redukujících podmínkách (viz Obr. 8, str. 50), přičemž nanáška všech vzorků byla 10 µl a proteinového standardu jen 5 µl. Z elektroforetického gelu je patrné, že u indukovaných kultur značně převládá produkce exprimovaného proteinu, jehož zóny se nachází přibližně u 16 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti DCL-1. Všechny čtyři bakteriální kultury se ukázaly jako vhodné producenti DCL-1 a byly použity pro další experimenty.



Obr. 8: SDS-PAGE analýza produkčních klonů. Dráha na gelu označená M představuje marker (tj. standard molekulových hmotností). Následující dráhy označené: 1+, 2+, 3+ a 4+ označují vzorky lyzátů bakteriálních kultur indukovaných IPTG, zatímco dráhy označené: 1-, 2-, 3- a 4- jsou vzorky lyzátů bakteriálních kultur sloužících jako negativní kontroly, tedy bez indukce IPTG.

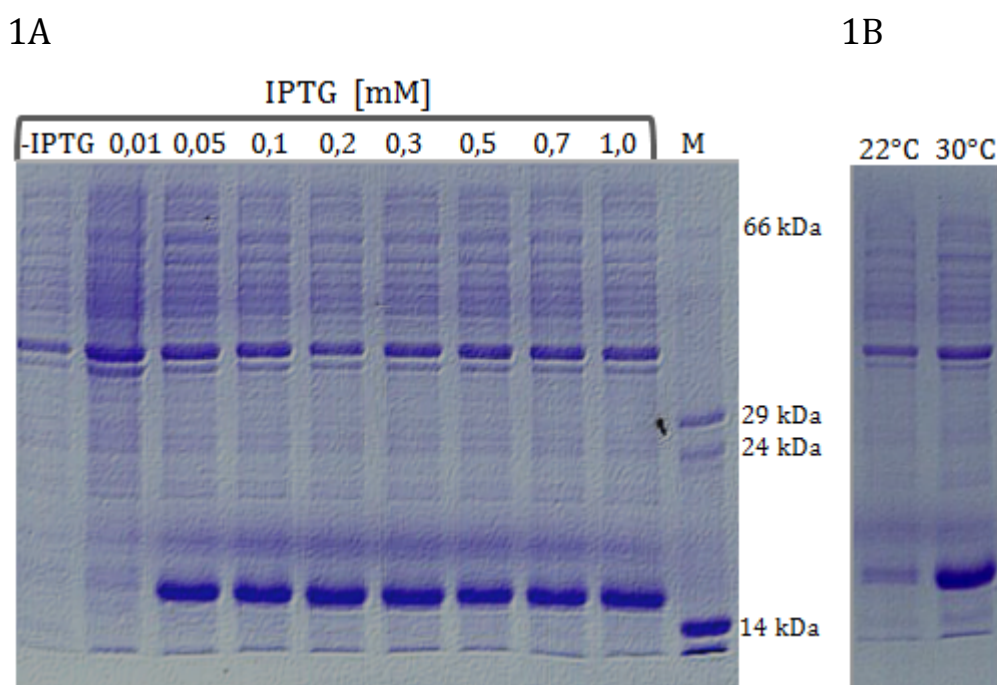
5.1.2 Optimalizace podmínek produkce proteinu

Za účelem získat co největší množství produkovaného proteinu během krátké doby produkce byla provedena optimalizace kultivačních podmínek. Vzhledem k tomu, že všechny testované kultury během zkušební produkce prokázaly schopnost produkovat daný protein, byla k optimalizaci náhodně vybrána bakteriální kultura 1. Stacionární kultury byly kultivovány vždy v 1 ml LB-média s příslušnými antibiotiky a v exponenciální fázi růstu byla část těchto kultur indukována různými koncentracemi IPTG. Další byla po indukci 1 mM IPTG inkubována při odlišných teplotách a poslední byla po této indukci sklizena v různých časových intervalech (viz Tab. 3).

Tab. 3: Rozpis podmínek navržených k optimalizaci produkce proteinu

Optimalizace koncentrace IPTG										
doba produkce	Teplota	koncentrace IPTG [mM]								
6 h	37 °C	0,00	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0
koncentrace IPTG	Teplota	doba produkce								
1 mM	37 °C	0 h	0,5 h	1 h	2 h	3 h	6 h	24 h		

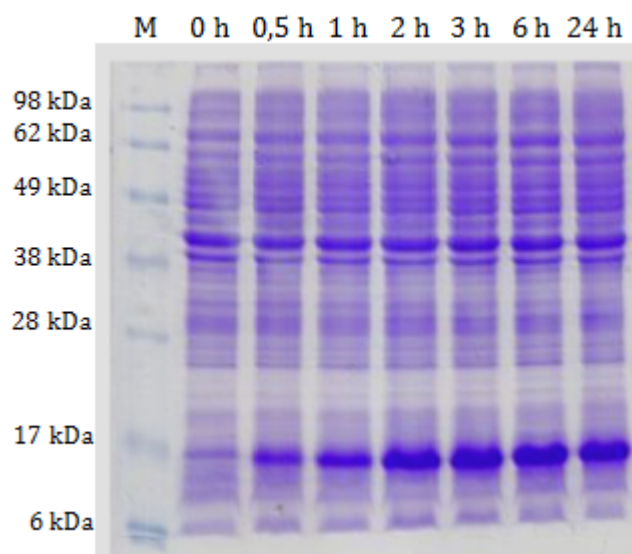
K analýze bakteriálních buněk kultivovaných za různých stanovených podmínek byla použita redukující SDS elektroforéza, kdy vzorky byly naneseny do jamek zaostřovacího gelu po 10 μ l včetně proteinového standardu (5 μ l). Z gelu 1A je zřejmé, že produkovaný protein je ve větším množství bakteriálními buňkami produkován již po indukci 0,05 mM IPTG. S vyšší koncentrací IPTG jeho množství dále stoupá a při 0,3 mM koncentraci IPTG je jeho produkce nejsilnější. Další zvyšování koncentrace IPTG neindukuje větší produkci proteinu, ale naopak se jeho množství lehce snižuje (viz Obr. 9-1A). Gel 1B ukazuje významný vliv teploty na produkci proteinu, jelikož při laboratorní teplotě (22 °C) není protein produkován téměř vůbec, zatímco při 30 °C je jeho produkce značně vysoká (viz Obr. 9-1B).



Obr. 9-1A a B: Stanovení hladin produkovaných proteinů bakteriálními buňkami při různých kultivačních podmínkách: rozdílná koncentrace IPTG [mM] – gel 1A a odlišná teplota produkce – gel 1B.

Rozdílná doba produkce proteinu vyobrazena na gelu 1C prokazuje, že k nejúčinnější produkci cílového proteinu docházelo až 3 hod. po indukci. Při delším časovém intervalu (6 a 24 hod.) se produkce proteinu nijak nezvyšovala (viz Obr. 9-1C, str. 52).

1C



Obr. 9-1C: Stanovení hladin produkovaných proteinů bakteriálními buňkami při různých kultivačních podmínkách: sklízení buněk po indukci v různých časových intervalech.

Na základě vyhodnocení sledovaných parametrů byly pro velkoobjemovou produkci DCL-1 vybrány následující podmínky: 0,3 mM IPTG, 3 hod. doba produkce a pro zjednodušení experimentu teplota produkce 37 °C.

5.1.3 Velkoobjemová produkce proteinu

Z optimalizace byly zjištěny nejvhodnější podmínky, které byly použity pro velkoobjemovou produkci proteinu v celkem 2 l LB-média s antibiotiky. Pro zajištění dostatečného provzdušnění byly vhodné produkční bakteriální kultury zaočkovány vždy do 0,5 l tekutého média indukovaného 0,3 mM IPTG, jakmile hodnota optické denzity narostlých kultur přesáhla 0,6 (viz Tab. 4). Kultury byly sklizeny po 3 hod. produkce.

Tab. 4: Naměřené hodnoty optických denzit rostoucích kultur při 550 nm

doba inkubace kultury před indukcí IPTG	OD ₅₅₀ 1.kultura	OD ₅₅₀ 2.kultura	OD ₅₅₀ 3. kultura	OD ₅₅₀ 4. kultura
4 hod	0,6559	0,3521	0,4039	0,6699
6 hod	–	0,6273	0,6721	–

- Po překročení hodnoty optických denzit 0,6 byl do kultury přidán induktor IPTG.

Proteiny byly produkovány ve formě nerozpustných inkluzních tělísek, proto bylo nejprve nutné rozrušit bakteriální buněčnou stěnu a po centrifugaci odstranit supernatant obsahující rozpustné buněčné složky. Izolovaná peleta obsahující inkluzní tělíška byla přečištěna promytím pufrem s detergentem a promývacím pufrem bez detergentu.

5.2 Renaturace proteinu z inkluzních tělísek

Peleta inkluzních tělísek byla solubilizována a renaturace proteinu byla provedena metodou rychlého naředění. Pro odstranění vysoké koncentrace solí, chaotropních a redukčních činidel z roztoku renaturovaného proteinu byla provedena dialýza. Po převedení do vhodnějších podmínek byl zředěný roztok proteinu zakonzentrován pomocí ultrafiltrace a poté centrifugačním koncentrátorem. Zakonzentrovaný renaturovaný protein byl purifikován gelovou filtrací.

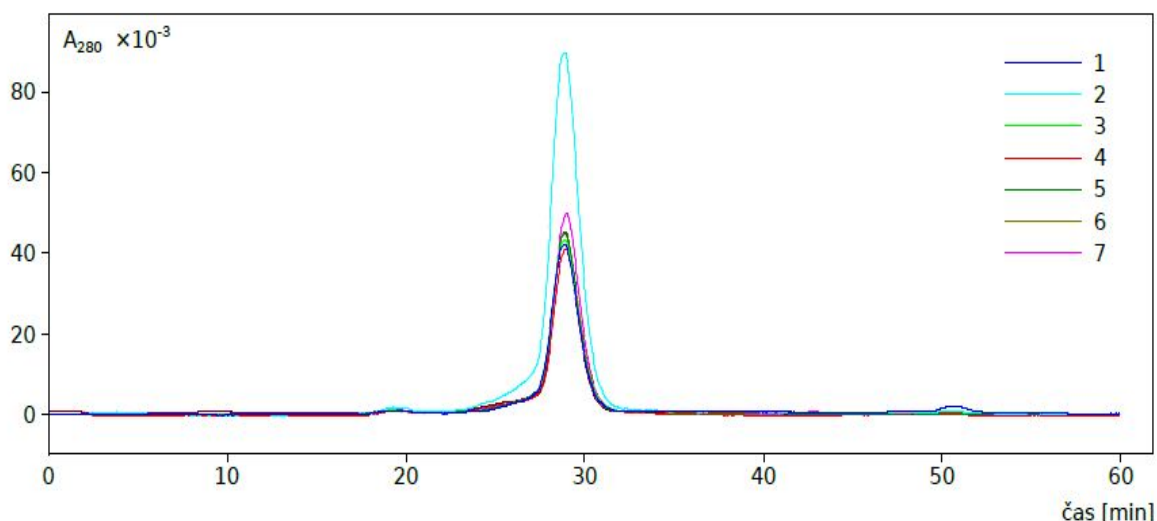
5.2.1 Optimalizace renaturace proteinu DCL-1

Při hledání optimálních renaturačních podmínek byl supernatant obsahující rozpuštěná inkluzní tělíška vzniklá z 500 ml produkční kultury renaturován metodou rychlého naředění. Renaturační směsi byly připraveny postupným převedením 50 μ l supernatantu do 50 ml příslušného renaturačního pufru. Koncentrace proteinu by neměla být vyšší než 0,1 mg/ml. K optimalizaci renaturace proteinu bylo použito sedm renaturačních pufrů o odlišné molární koncentraci L-argininu, poměru koncentrací cystaminu a cysteaminu, pH a koncentraci chloridu vápenatého. Složení jednotlivých renaturačních pufrů je podrobně popsáno v Tab. 5.

Tab. 5: Složení renaturačních pufrů užitých k optimalizaci renaturace

Složka	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Tris-HCl	100 mM	100 mM	100 mM	100 Mm	100 mM	100 mM	100 mM
NaN₃	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
L-arginin	0,4 M	1,0 M	0,4 M	0,4 M	0,4 M	0,4 M	0,4 M
pH	8,5	8,5	8,0	9,0	8,5	8,5	8,5
Cysteamin	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	1 mM	20 mM
Cystamin	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	5 mM	1 mM
CaCl₂	0 mM	0 mM	0 mM	0 mM	10 mM	0 mM	0 mM

Purifikace vzorků proteinu, získaných zakoncentrováním 10% objemu renaturačních směsí, byla provedena gelovou filtrací. Eluční křivky, tj. závislosti hodnot absorbance eluátů při 280 nm na retenčních časech, jsou zobrazeny na Obr. 10.

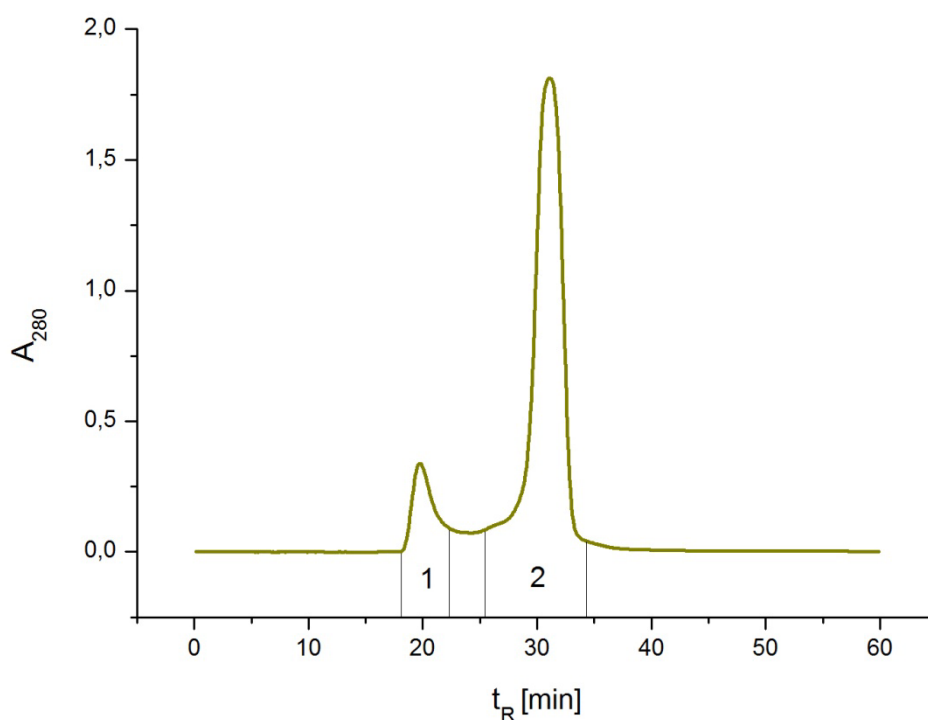


Obr. 10: Analýza renaturačních pufrů - porovnání chromatogramů separovaných proteinů na koloně Superdex 75 HR. Jednotlivé křivky ilustrují eluční profily proteinů s nástřikovým objemem 400 μ l, které byly renaturovány v pufrch o různém složení.

Z porovnání integrací získaných ploch chromatografických vrcholů příslušných elučních profilů vyplývá, že nejvhodnější renaturační pufr obsahuje vysokou koncentraci L-argininu (1 M). Ostatní renaturační pufrы poskytují srovnatelné eluční profily. S ohledem na finanční náklady byla zvolena nižší koncentrace L-argininu a pro renaturaci proteinu produkovaného ve 2 l LB-média byly vybrány podmínky odpovídající složení pufru číslo 1.

5.2.2 Purifikace proteinu gelovou filtrací

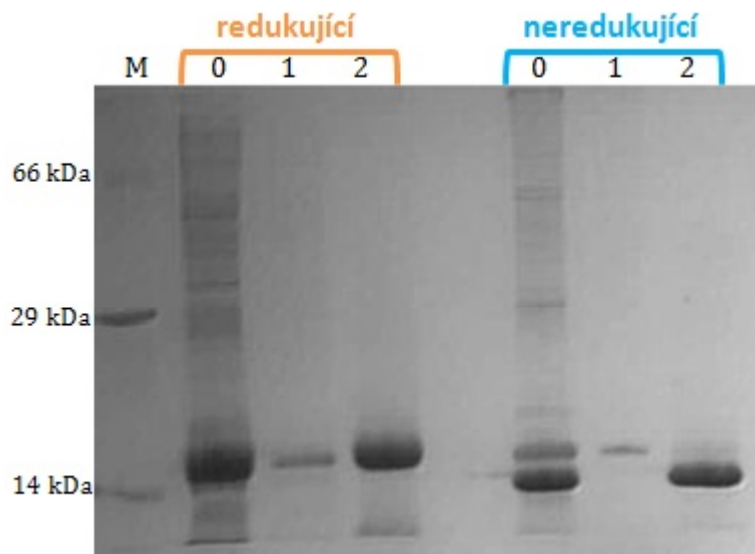
Izokratická separace renaturovaného proteinu od agregátů byla provedena metodou gelové filtrace. Eluční křivka je znázorněna na Obr. 11 na str. 55.



Obr. 11: Chromatogram separovaného proteinu na koloně Superdexu 75 HR. Zelená křivka znázorňuje nástřik vzorku o objemu 500 μ l a číslo 2 pod vrcholem vyznačuje frakci eluovaného proteinu, která odpovídá retenčnímu časovému intervalu: 25,5 – 34 min. Obě vyznačené frakce č. 1 a 2 byly analyzovány na SDS elektroforéze v redukujících a neredukujících podmínkách.

5.2.2.1 Analýza frakcí získaných z gelové filtrace

Zakonzentrované frakce z gelové filtrace společně se vzorkem proteinu před purifikací byly naneseny v 5 μ l na gel k redukující a neredukující SDS-PAGE analýze. Na gelu lze pozorovat zóny vysoce čistého proteinu po purifikaci u 16 kDa odpovídající monomerní formě DCL-1 (dráhy č. 2) v redukujících i neredukujících podmínkách. Posun zóny proteinu v neredukujících podmínkách vypovídá o přítomnosti disulfidických můstků, které vedou k tvorbě kompaktnější molekuly s větší pohyblivostí (viz Obr. 12, str. 56).



Obr. 12: SDS-PAGE analýza frakcí proteinu v redukujících a neredukujících podmínkách. Dráha na gelu označená M představuje marker. Následující dráhy označují redukující a neredukující podmínky: 0 - renaturovaný vzorek proteinu, 1 - frakce 1 z gelové filtrace, 2 - frakce 2 z gelové filtrace.

Ve frakci proteinu získané z gelové filtrace, která byla zakoncentrována na 1 ml, byla následně stanovena koncentrace metodou dle Bradfordové, BCA a aminokyselinovou analýzou.

5.3 Stanovení koncentrace proteinu

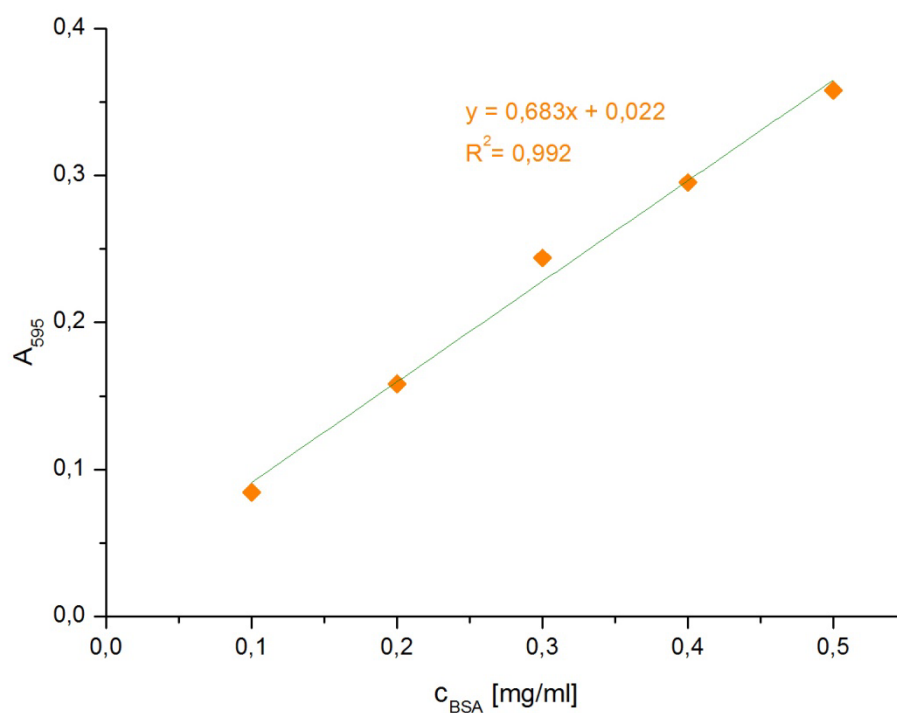
5.3.1 Stanovení koncentrace DCL-1 metodou dle Bradfordové

Z naměřených hodnot absorbancí standardních roztoků při 595 nm byla sestrojena kalibrační přímka (viz Obr. 13, str. 57) a ze získané rovnice lineární regrese byla vypočtena koncentrace 40× naředěného roztoku proteinu (viz Tab. 7, str. 58). Pro kalibraci byly jako standardy použity roztoky BSA v rozmezí koncentrací 0,1– 0,5 mg/ml a jako slepý vzorek dH_2O (viz Tab. 6, str. 57)

Tab. 6: Naměřené a vypočítané hodnoty absorpance potřebné k sestrojení kalibrační přímky.

konzentrace standardu BSA [mg/ml]	A_{595} standardu BSA	$\emptyset A_{595}$ standardu BSA po odečtení slepého vzorku
0,0	0,3294	0,3251
0,1	0,4204	0,4032
0,2	0,4809	0,4899
0,3	0,5706	0,5717
0,4	0,6154	0,6294
0,5	0,6705	0,6999

- $\emptyset A_{595}$ standardu BSA po odečtení slepého vzorku – průměrné hodnoty absorpance kalibračních roztoků naměřených při vlnové délce 595 nm po odečtení průměrné hodnoty absorpance slepého vzorku (dH₂O).



Obr. 13: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové. Závislost absorpance kalibračních roztoků na příslušných koncentracích s rovnicí kalibrační přímky: $y = 0,683x + 0,022$ a $R^2 = 0,992$.

Tab. 7: Vypočtená hodnota koncentrace proteinu z naměřené hodnoty absorbance ředěného vzorku proteinu DCL-1.

ředění vzorku proteinu	A_{595} vzorku proteinu	$\emptyset A_{595}$ vzorku proteinu po odečtení slepého vzorku	koncentrace vzorku proteinu [mg/ml]
40×	0,6151	0,6533	16,68

- Výpočet koncentrace 40× ředěného vzorku DCL-1 po gelové filtraci:

$$y = 0,683x + 0,022 \rightarrow x = \frac{y - 0,022}{0,683} \rightarrow x = \frac{0,307 - 0,022}{0,683} \rightarrow x = 0,417$$

$$C_{DCL-1} = 0,417 \cdot 40 \Rightarrow \underline{16,68 \text{ mg/ml}}$$

Všechny vzorky byly stanoveny ve dvojicích pro snížení chyby měření. Koncentrace DCL-1 byla stanovena metodou dle Bradfordové na 16,68 mg/ml.

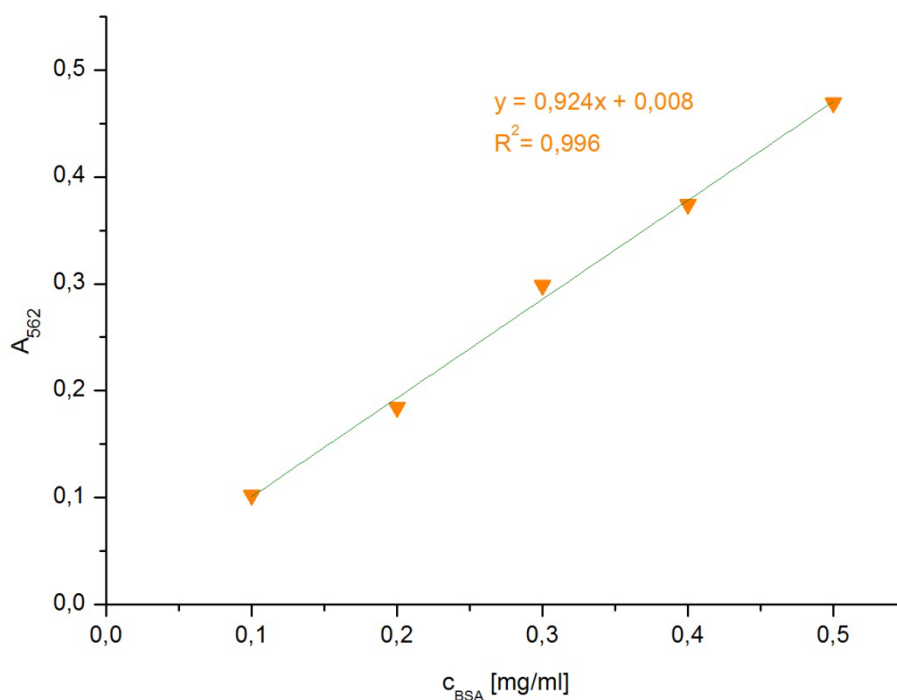
5.3.2 Stanovení koncentrace DCL-1 metodou BCA

Množství proteinu bylo dále stanoveno reakcí s bicinchoninovou kyselinou. Opět byla pomocí naměřených absorbancí standardních roztoků BSA (viz Tab. 8) zkonstruována kalibrační přímka (Obr. 14, str. 59), jejíž rovnice regrese byla následně využita k výpočtu koncentrace 40× naředěného proteinu (Tab. 9, str. 59).

Tab. 8: Naměřené a vypočítané hodnoty absorbance kalibračních roztoků.

koncentrace standardu BSA [mg/ml]	A_{562} standardu BSA	$\emptyset A_{562}$ standardu BSA po odečtení slepého vzorku
0,0	0,1399	0,1393
0,1	–	0,2415
0,2	0,3307	0,3172
0,3	0,4345	0,4411
0,4	0,5127	0,5281
0,5	0,6097	0,6074

- $\emptyset A_{595}$ standardu BSA po odečtení slepého vzorku – průměrné hodnoty absorbance kalibračních roztoků naměřených při vlnové délce 562 nm po odečtení průměrné hodnoty absorbance slepého vzorku (dH₂O).
- odlehlá hodnota byla z tabulky vyjmuta – 0,2732



Obr. 14: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA. Závislost absorbance měřené při 562 nm na koncentraci standardu BSA s rovnicí kalibrační křivky: $y = 0,924x + 0,008$ a $R^2 = 0,996$.

Tab. 9: Vypočtená hodnota koncentrace proteinu z naměřené hodnoty absorbance ředěného vzorku proteinu DCL-1.

ředění vzorku proteinu	A_{562} vzorku proteinu	$\emptyset A_{562}$ vzorku proteinu po odečtení slepého vzorku	koncentrace vzorku proteinu [mg/ml]
40×	0,5920	0,5894	19,2

- Výpočet koncentrace 40× ředěného vzorku DCL-1 po gelové filtraci:

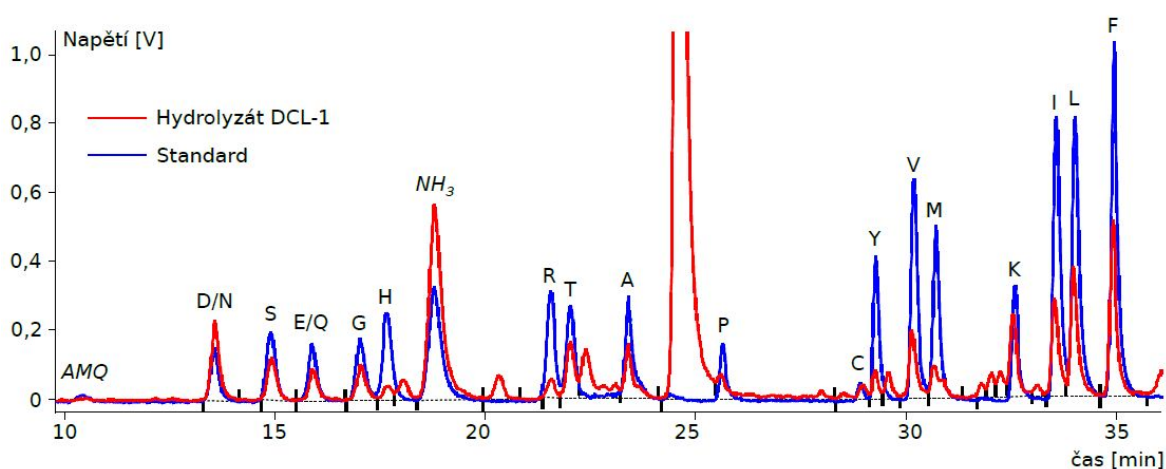
$$y = 0,924x + 0,008 \rightarrow x = \frac{y - 0,008}{0,924} \rightarrow x = \frac{0,4511 - 0,008}{0,924} \rightarrow x = 0,480$$

$$C_{DCL-1} = 0,480 \cdot 40 \Rightarrow \underline{19,2 \text{ mg/ml}}$$

Všechny vzorky byly opět naměřeny ve dvojicích. Koncentrace DCL-1 byla stanovena BCA metodou na 19,2 mg/ml.

5.3.3 Aminokyselinová analýza DCL-1

Separace směsi derivátů aminokyselin stejně tak derivatizovaných standardů probíhala na koloně v RP-HPLC systému. Metoda byla provedena dvakrát s přímým nástřikem vzorků na kolonu v objemu 5 μ l. Derivatizované vzorky byly po gradientové eluci fluorescenčně detekovány při 395 nm (excitace 250 nm). Data získaná z chromatogramu (viz Obr. 15), jež byla vyhodnocena v programu CSW32, byla použita k výpočtu přesné koncentrace DCL-1 (viz Tab. 10). Z naměřené hodnoty absorbance 40 \times ředěného roztoku proteinu při 280 nm byl vypočítán molární absorpční koeficient (viz Tab. 11, str. 61).



Obr. 15: Chromatogram hydrolyzátu DCL-1 a aminokyselinového standardu po předchozí derivatizaci ACQ činidlem

Tab. 10: Vypočtená a získaná data z chromatogramu potřebná pro výpočet koncentrace DCL-1

celkové ředění vzorku proteinu	n_{proteinu} [pmol] v nástřiku (5 μ l)	m_{proteinu} [μ g] v nástřiku (5 μ l)	C_{proteinu} [mg/ml]
400 \times	15,4	0,25	20

Vzorek proteinu DCL-1 má tedy skutečnou koncentraci 20 mg/ml.

Tab. 11: Výpočet molárního absorpčního koeficientu DCL-1

ředění vzorku proteinu	A_{280} vzorku proteinu	$c_{\text{proteinu}}[\text{M}]$	$\epsilon_{280} [\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}]$ vzorku protein
40×	0,708	3×10^{-5}	23 600

- A_{280} - absorbance vzorku proteinu naměřená při 280 nm
- ϵ_{280} - molární absorpční koeficient vypočítaný z absorbance měřené při 280 nm

Hodnota stanoveného molárního absorpčního koeficientu DCL-1 při 280 nm je $23\,600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ a liší se od teoretické, která byla odhadnuta nástrojem ExPASy ProtParam Tool, přibližně o 27%.

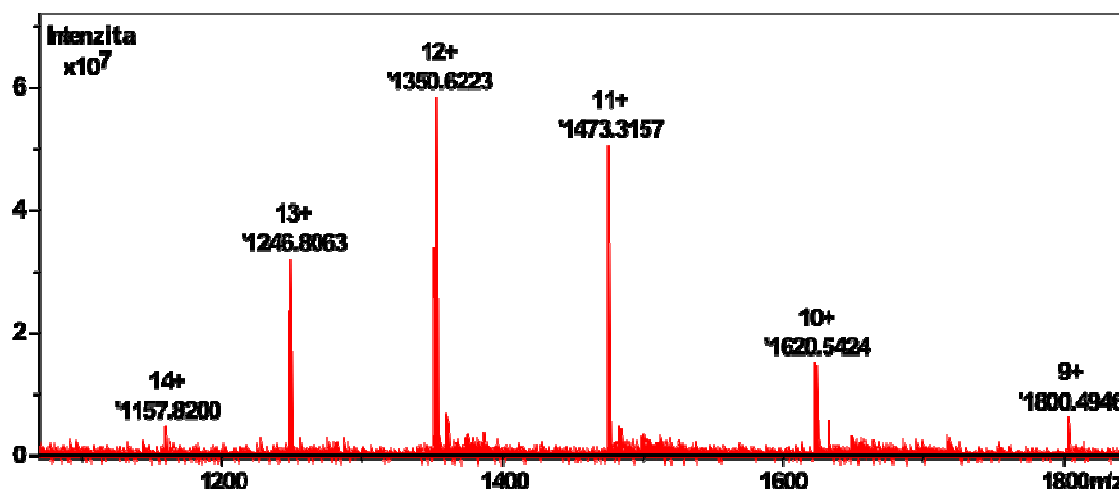
5.4 Hmotnostní spektrometrie

5.4.1 Stanovení monoizotopické hmotnosti proteinu

Pro ověření identity purifikovaného proteinu byla provedena analýza pomocí hmotnostní spektrometrie. Nejprve byl vzorek proteinu odsolen na proteinové koloně MicroTrap s reverzní fází. Po odstranění látek, které by mohly rušit MS analýzu, bylo odebráno 10 μl přečištěné frakce proteinu a předáno RNDr. Petrovi Novákovi, Ph.D., který provedl jejich stanovení pomocí ESI-FT-ICR MS. Z naměřeného spektra byla odečtena monoizotopická hmotnost, která činí 16195,374 Da (viz Obr. 16).

- Výpočet monoizotopické hmotnosti DCL-1:

$$[M+zH]^{z+} \Rightarrow M_r = (12 \cdot 1350,6223) - (12 \cdot 1,0078) = \underline{16195,374 \text{ Da}}$$



Obr. 16: Hmotnostní spektrum intaktu DCL-1.

5.4.2 Stanovení zapojení disulfidových vazeb

Ověřený vzorek proteinu byl nanesen v množství 4 µg společně s proteinovým standardem (5 µl) na 4-12% gradientový Bis-Tris gel. Po proběhnutí neredukující NuPAGE byly z gelu vyřezány zóny proteinu, které byly po odbarvení štěpeny endopeptidasami (Asp-N, trypsin a jejich kombinace). Peptidové fragmenty extrahované z gelu byly odsoleny na koloně MicroTrap a 27 µl frakce peptidů ve vialkách byly předány RNDr. Petrovi Novákovi, Ph.D. na analýzu LC/ESI-FT-ICR MS.

Získaná naměřená data z LC-MS byla porovnána s databází hmot peptidových fragmentů generované softwarem Links a poté byla jejich přítomnost zkontrolována aplikací Data Analysis 3.0.

Z nalezených hmot o příslušné intenzitě (viz Tab. 12) bylo stanoveno schéma zapojení disulfidických můstků, které je znázorněno na Obr. 17.

Tab.12 : Identifikace zapojení disulfidických vazeb v proteinu DCL-1

DCL-1	Peptidy	m/z	Intezita	Proteasa
Cys3/Cys15	2– 24	2851,2776	2×10^6	Trypsin
Cys35/Cys107	33– 36/105–113	1509,6855	1×10^8	Asp-N + trypsin
Cys35/Cys107	30– 36/105-140	4843,3493	4×10^6	Asp-N
Cys122/Cys132	120– 133	1423,6222	4×10^8	Asp-N + trypsin



Obr. 17: Schéma zapojení disulfidových vazeb uvnitř proteinu DCL-1. Modrá část vyznačuje celou aminokyselinovou sekvenci proteinu bez signálního peptidu.

5.4.3 Chemické síťování DCL-1

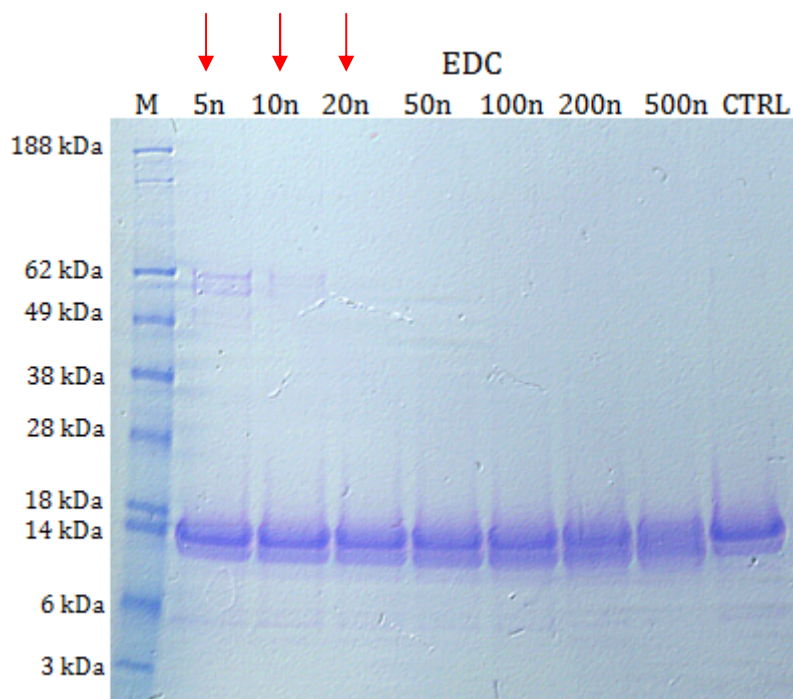
Roztok proteinu, v němž byla stanovena koncentrace na 20 mg/ml, byl pro reakci se síťovacími činidly převeden do vhodnějšího 20 mM HEPES pufru. Na jednu reakci bylo použito vždy 12 µg proteinu, k nimž byly přidány směsi nedeuterované/deuterované formy činidel DSS, DSG pro snažší interpretaci hmotnostních spekter a činidlo EDC v příslušných molárních nadbytcích (viz Tab. 13, str. 63).

Reakce byly naneseny po 25 μ l spolu s proteinovým standardem (18 μ l) do jamek 4-12% gradientového Bis-Tris gelu. Na základě NuPAGE analýzy byly vybrány reakce obsahující malé molární nadbytky příslušných činidel včetně negativní kontroly, jež jsou na gelech vyznačeny červenými šipkami (viz Obr. 18; Obr. 19, str. 64).

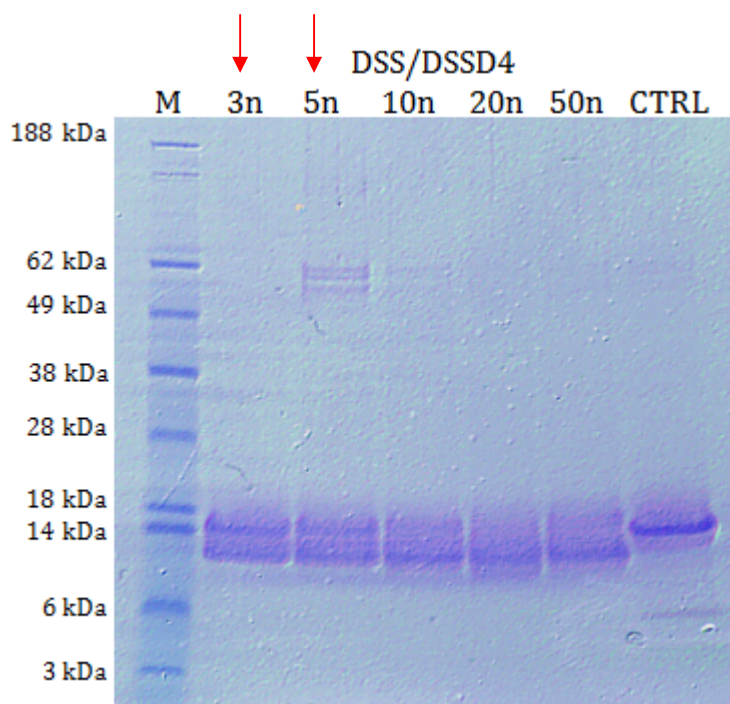
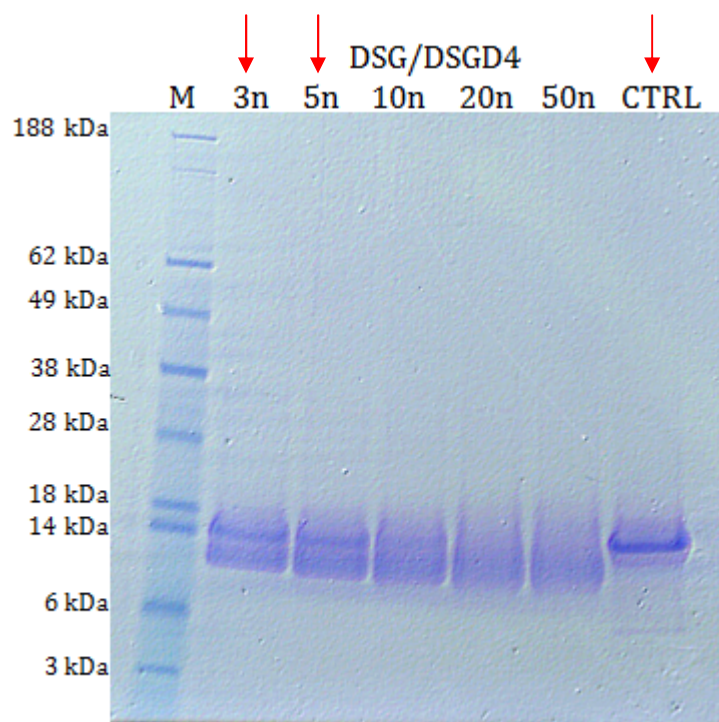
Tab. 13: Podmínky použité při síťovacích reakcích

Síťovací Činidlo	molární nadbytek síťovacího činidla (n)							zásobní koncentrace činidel [mg/ml]
EDC	5n	10n	20n	50n	100n	200n	500n	1,5
DSS/DSSD4	3n	5n	10n	20n	50n	–	–	1,5
DSG/DSGD4	3n	5n	10n	20n	50n	–	–	1,5

- DSS/DSSD4 a DSG/DSGD4 – směsi obsahující nedeuterované/deuterované formy činidel



Obr. 18: Optimalizace reakčních podmínek síťovacích reakcí s činidlem EDC. Pro analýzu byly vybrány proběhlé síťovací reakce obsahující malé nadbytky síťovacích činidel, jež jsou vyznačeny červenými šipkami: 5n, 10n a 20n (n - molární nadbytek činidla oproti proteinu).



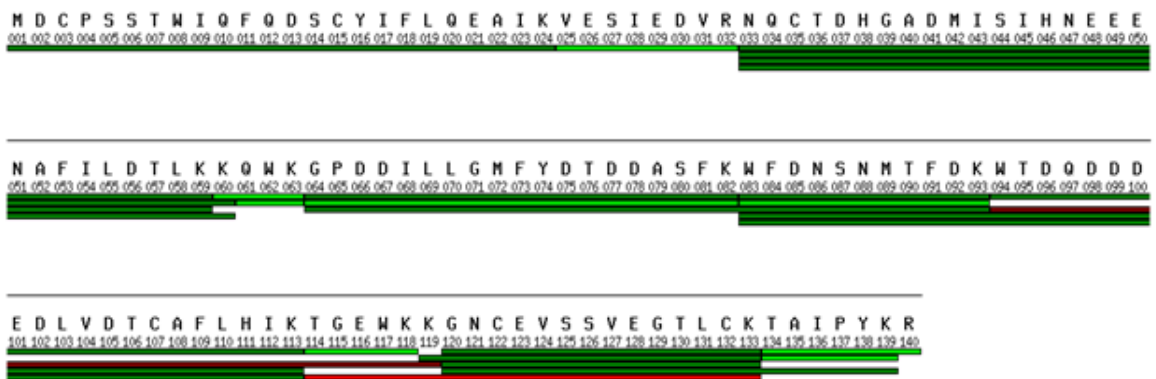
Obr.19: Optimalizace reakčních podmínek síťovacích reakcí s DSS/DSSD4 a DSG/DSGD4. Pro analýzu byly vybrány proběhlé síťovací reakce obsahující malé nadbytky síťovacích činidel spolu s CTRL –negativní kontrolou (reakce bez síťovacích činidel), jež jsou vyznačeny červenými šipkami: 3n a 5n (n - molární nadbytek činidla oproti proteinu)

Vyřezané proužky těchto reakcí proteinu společně s negativní kontrolou byly odbarveny. Po odbarvení byly disulfidické můstky zesíťovaného proteinu redukovány a alkylovány. Následovalo štěpení proteinu trypsinem v alkalickém prostředí. Peptidy izolované z gelu byly odsoleny a získané 27 µl frakce peptidů ve vialkách byly předány RNDr. Petrovi Novákovi, Ph.D., který provedl jejich stanovení pomocí LC/ESI-FT-ICR MS. Hmoty vzniklých proteinových spojení byly vyhledány programem Links a zkontrolovány v aplikaci Data Analysis 3.0. Výsledná intrapeptidová spojení v rámci proteinu DCL-1 jsou shrnuta v tabulce 14.

Tab. 14: Získaná intrapeptidová spojení uvnitř proteinu DCL-1 reakcemi se síťovacími činidly (DSS, DSG a EDC).

Síťovací Činidlo	exp. Hmota	teor. Hmota	chyba [ppm]	peptidová spojení	možná spojení
DSG	1432,7551	1432,7588	2,5	60-63,114-119	K60-K118
DSG	2365,0825	2365,0806	0,8	114-133+2CAM+1DSG	K118-K119
DSG	2786,3018	2786,3022	0,2	60-82+1DSG	K60-K63
DSG	3261,4751	3261,4688	1,9	94-119+1CAM+1DSG	K113-K118
DSG	3781,7676	3781,7590	2,3	33-63+1CAM+1DSG	K59-K60
DSS	2407,1301	2407,1274	1,1	114-133+2CAM+1DSS	K118-K119
DSS	2507,2310	2507,2273	1,5	120-140+2CAM+1DSS	K133-K139
DSS	2828,3547	2828,3491	2,0	60-82+1DSS	K60-K63
DSS	3303,5193	3303,5156	1,1	94-119+1CAM+1DSS	K113-K118
DSS	3823,8113	3823,8059	1,4	33-63+1CAM+1DSS	K59-K60
EDC	3196,5276	3196,5254	0,7	25-32,114-133+2CAM	E26/E29/D30 -K118/K119

Negativní kontrola potvrdila 100% pokrytí štěpené sekvence proteinu peptidovými fragmenty (viz Obr. 20, str. 66).



Obr. 20: Pokrytí AMK sekvence proteinu *peptidovými fragmenty naštěpené trypsinem.*
 Červené peptidové fragmenty jsou modifikované (oxidace methioninu), zatímco zelené neobsahují žádné modifikace.

Celkem bylo získáno šest spojení uvnitř proteinu DCL-1. Tato spojení nalezených aminokyselin byla ověřena na modelu krystalové struktury DCL-1.

6 Diskuze

Receptorem DCL-1 resp. jeho extracelulární doménou se naše laboratoř zabývá již delší dobu, o čemž vypovídá hotový model krystalové struktury tohoto receptoru, který však nebyl zatím publikován a z tohoto důvodu není na přání autorů v této práci uveden. V současné době probíhají v naší laboratoři pokusy o rozřešení struktury DCL-1 pomocí technik NMR. Údaje o „omezení vzdáleností“ postranních řetězců aminokyselin a identifikace zapojení disulfidických vazeb v rámci proteinu DCL-1 získané metodou hmotnostní spektrometrie by tedy mohly pomoci k ověření rozřešené krystalové struktury.

Výhledově se plánují experimenty s fúzním proteinem DCL-1/DEC-205, který je ve vysoké míře exprimován na buňkách Hodgkinova lymfomu a mohl by tedy hrát důležitou roli v této patologii.

Vedle stanovení disulfidických vazeb a získání dat k validaci krystalové struktury se tato práce zabývá také ověřením optimalizace podmínek produkce a renaturace proteinu, jelikož nebyla prozatím důkladně testována. Dle SDS-PAGE analýzy lyzátů bakteriálních buněk, kultivovaných při různých variantách tří sledovaných parametrů (koncentrace IPTG, doby a teploty produkce), byly jako optimální podmínky produkce stanoveny následující faktory: 0,3 mM IPTG, 3 hod. doba produkce a teplota produkce 37 °C. Získané nejvhodnější podmínky produkce DCL-1 se shodují s již dříve užívanými podmínkami v laboratoři.

Optimální podmínky renaturace inkluzních tělísek, vyhodnocené porovnáním elučních profilů proteinů renaturovaných v pufrch o různém složení, odpovídaly pufru s nejvyšší koncentrací L-argininu (1 M). Ostatní eluční profily se výrazně nelišily, tudíž změny poměrů zbylých složek obsažených v pufrch nemají na renaturaci proteinu výrazný vliv. Vzhledem k finančním nákladům byl zvolen pro renaturaci proteinu z 2 l produkční kultury renaturační pufr 1 s nižším množstvím L-argininu (0,4 mM), který byl už užitý v předchozích experimentech a poskytuje uspokojivé výtěžky.

Z naměřené přesné hmotnosti proteinu vyplývá, že se cysteiny nachází v oxidovaném stavu a tudíž lze předpokládat, že tvoří disulfidické vazby. Ke stejnému závěru dochází i kolegové v laboratoři z NMR experimentů. Posun zóny proteinu v neredukujících podmínkách, který je patrný z SDS-PAGE vyhodnocení

purifikovaného proteinu v redukujících a neredukujících podmínkách, rovněž vypovídá o pravděpodobné přítomnosti disulfidických můstků.

Na základě těchto zjištění bylo provedeno štěpení proteinu v gelu specifickými endopeptidasami (Asp-N, trypsin a jejich kombinace) za přítomnosti cystaminu nasledované LC-MS experimenty, které nám poskytly informace o tom, jakým způsobem jsou spárovány cysteiny v molekule DCL-1. Zjištěné schéma zapojení disulfidických můstků v proteinu DCL-1 neodpovídá běžnému zapojení v C-lektinové rodině. Obdobné schéma zapojení bylo v naší laboratoři zjištěno ještě u dalšího receptoru C-lektinové rodiny NKR-P1C myšího kmene BALB a zároveň se nalezené přesné hmotnosti disulfidicky spojených peptidů v naměřených hmotnostních spektrech vyznačují vysokými intenzitami, což potvrzuje věrohodnost získaného zapojení.

Zjištěné informace o zapojení disulfidických můstků v proteinu neodpovídají zapojení v krystalové struktuře o rozlišení do 2,15 Å, která nám byla poskytnuta RNDr. Terezou Skálovou, Ph.D. Nicméně cysteiny jsou v krystalové struktuře lokalizovány blízko sebe, tudíž lze předpokládat, že by elektronová hustota šla vysvětlit i v souladu s hodnotami experimentálních dat z LC-MS analýzy. V budoucnu bude navíc možné porovnat vyhodnocená data s modelem 3D struktury rozřešené pomocí technik NMR.

Důležitým parametrem metody chemického síťování je koncentrace proteinu, proto byla v této práci pro srovnání stanovena třemi různými způsoby (metodou BCA, dle Bradfordové a aminokyselinovou analýzou). Za nejpřesnější metodu stanovení považujeme aminokyselinovou analýzu, pomocí které byla rovněž stanovena experimentální hodnota molárního absorpčního koeficientu, která se výrazně neliší od teoretické získané pomocí nástroje ExPASy ProtParam Tool.

K mapování struktury receptoru DCL-1 byly provedeny experimenty chemického síťování v kombinaci s LC-MS analýzou vytvořených kovalentních aduktů. Vybraná homobifunkční činidla DSS a DSG byla do síťovacích reakcí použita ve formě nedeuterované/deuterované směsi, která usnadňuje interpretaci peptidových fragmentů spojených těmito činidly v hmotnostních spektrech. DSS (délka spojovacího raménka 11,4 Å) a DSG (7,7 Å) činidla tvoří amidové vazby mezi prostorově blízkými lysinovými zbytky. Posledním užitým činidlem bylo

heterobifunkční EDC, které vytváří kovalentní spojení blízkých lysinových zbytků s postranními řetězci kyseliny asparagové a glutamové (popřípadě N-konce a C-koncem peptidu). Spojení zesíťovaného proteinu byly získány štěpením s trypsinem v alkalickém prostředí.

Z tabulky 14 je zřejmé, že bylo získáno šest spojení uvnitř proteinu DCL-1, všechna odpovídala od 2,47 do 21,84 Å v krystalové struktuře, zatímco žádná z variant spojení poskytnutého síťovacími reakcemi s EDC struktuře neodpovídala. Tento výsledek lze přičíst jednak nesnadné práci s EDC, jelikož podléhá ve vodném prostředí hydrolyze a jednak obtížné interpretaci spekter, jelikož sekvence produkovaného proteinu obsahuje obrovské množství asparagových a glutamových kyselin. Samotná aplikace spojení uvnitř proteinu na krystalovou strukturu byla stejně jako v případě disulfidických vazeb provedena Mgr. Zdeňkem Kukačkou. Výsledná spojení v rámci proteinu budou dále využita při pokusech o rozřešení 3D struktury receptoru DCL-1 pomocí spekter NMR, které jsou v současné době prováděny v naší laboratoři.

7 Závěr

- Kultivační a renaturační podmínky pro přípravu extracelulární domény DCL-1 byly optimalizovány *in vitro*.
- Naprodukovaný protein ve formě inkluzních tělísek byl renaturován a purifikován - následně byl stanoven výtěžek proteinu DCL-1 na 20 mg z 2 l produkce zakoncentrované do 1 ml a molární absorpční koeficient na $23\,600\text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$, jehož hodnota je v porovnání s teoretickou nižší.
- Z LC-MS analýzy peptidových fragmentů štěpených pomocí endopeptidas bylo identifikováno zapojení disulfidických vazeb uvnitř proteinu DCL-1.
- Provedením experimentu chemického síťování v kombinaci s LC-MS analýzou vytvořených kovalentních aduktů bylo získáno šest proteinových spojení, která odpovídají krystalové struktuře DCL-1.

8 Citovaná literatura

- [1] Abbas, A. K., Lichtman, A. H. a Pillai, S.: Cellular and Molecular Immunology, Elsevier, Philadelphia (2011)
- [2] Medzhitov, R., and C. Janeway, Jr: N. Engl. J. Med. 343, 338-344 (2000)
- [3] Medzhitov, R.: Nat. Rev. Immunol. 1, 135-145 (2001)
- [4] Elgert, K. D., Introduction to the Immune System, v knize Immunology: Understanding the Immune System, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, str. 1-26 (2009)
- [5] Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie, Triton, Praha (2009)
- [6] Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W. E.: Annu. Rev. Immunol. 28, 445-489 (2010)
- [7] Dzierzak, E., and Speck, N. A.: Nat. Immunol. 9, 129 - 136 (2008)
- [8] Hard, D. N.: Blood 90, 3245-3287
- [9] Dostupné z URL: http://www.biologend.com/pop_pathway.php?id=5
(cit. 15.3. 2013)
- [10] Male, D., Brostoff, J., and Roth, D. B.: Cells, Tissues, and Organs of the Immune System, v knize Immunology, Elsevier, Saunders, str. 17-50 (2012)
- [11] Steinman, R. M., and Cohn, Z. A.: J. Exp. Med. 137, 1142-1162 (1973)
- [12] Steinman, R. M., and Cohn, Z. A.: J. Exp. Med. 139, 380-397 (1974)
- [13] Chung, N. P., Chen, Y., Chan, V. S. F., Tam, P. K. H., and Lin, C. L. S.: Histol. Histopathol. 19, 317-324 (2004)
- [14] Banchereau, J., Briere, F., Caux C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., Palucka, K.: Annu. Rev. Immunol. 18, 767-811 (2000)
- [15] Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P., Steinman, R., and Schuler, G.: J. Exp. Med. 180, 83-93 (1994)
- [16] Grouard, G., Rissoan, M., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.: J. Exp. Med. 185, 1101-1111 (1997)
- [17] Quah, B. J. C., and O'Neill, H. C.: J. Cell. Mol. Med. 9, 643-654 (2005)
- [18] Mommaas, A. M., Mulder, A. A., Out, C. J., Girolomoni, G., Koerten, H. K., Vermeer, B. J., and Koning, F.: Eur. J. Immunol. 25, 520-525 (1995)
- [19] Lee, M. G., Borkowski, T.A., and Udey, M.C.: J. Invest. Dermatol. 101, 883-886 (1993)

- [20] Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krakovsky, J., Munza, C., and Bhardwaj, N.: *J. Exp. Med.* 193, 233-238 (2001)
- [21] Ferguson, T. A., and Kazama, H.: *Immunol. Res.* 32, 99-108 (2005)
- [22] Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K.: *J. Exp. Med.* 185, 541-550 (1997)
- [23] Lozach, P. Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Saropoli, I., Foung, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos F., and Altmeyer, R.: *J. Biol. Chem.* 278, 20358-20366 (2003)
- [24] Steinman, R. M., Turleyb, S., Mellmanb, I., and Inaba, K.: *J. Exp. Med.* 191, 411-416 (2000)
- [25] Grannuci, F., Vizzardelli, C., Virzi, E., Rescigno, M., and Ricciardi-Castagnoli, P.: *Eur. J. Immunol.* 31, 2539-2546
- [26] Robert, C., Fuhlbrigge, R. C., Kieffer, J. D., Ayehunie, S., Hynes, R. O., Cheng, G., Grabbe, S., von Andrian, U. H., and Kupper, T. S.: *J. Exp. Med.* 189, 627-636 (1999)
- [27] Greaves, D. R., Wang, W., Dairaghi, D. J., Dieu, M. C., Saint-Vis, B., Franz-Bacon, K., Rossi, D., Caux, C., McClanahan, T., Gordon, S., Zlotnik, A., and Schall, T. J.: *J. Exp. Med.* 186, 837-844 (1997)
- [28] Salusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A.: *J. Exp. Med.* 182, 389-400 (1995)
- [29] Verdijk, R., Mutis, T., Esendam, B., Kamp, J., Melief, C., Brand, A., and Goulmy, E.: *J. Immunol.* 163, 57-61 (1999)
- [30] Celle, M., Sallo, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., and Lanzavecchia, A.: *J. Exp. Med.* 189, 821-829 (1999)
- [31] Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V., Davoust, J., and Ricciardi-Castagnoli, P.: *J. Exp. Med.* 185, 317-328 (1997)
- [32] Flores-Romo, L.: *Immunology* 102, 255-262 (2001)
- [33] Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N.: *Nature* 392, 86-89 (1998)
- [34] Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C.: *J. Exp. Med.* 188, 373-386 (1998)

- [35] Chan, V. W., Kothakota, S., Rohan, M. C., Panganiban-Lustan, L., Gardner, J. P., Wachowicz, M. S., Winter, J. A., and Williams, L. T.: *Blood* 93, 3610-3016 (1999)
- [36] Zhou, L., and Tedder, T.: *J. Immunol.* 154, 3821-3835 (1995)
- [37] Fong, L., and Engleman, G. E.: *Annu. Rev. Immunol.* 18, 245-273 (2000)
- [38] Bakdash, G., Sitting, S. P., van Dijk, T., Figdor, C. G., and de Vries, J. M.: *Front. Immunol.* 4, 53 (2013)
- [39] Gijzen, K., Cambi, A., Torensma, R., and Figdor, C. G.: *Curr. Protein. Pept. Sci.* 7, 283-294 (2006)
- [40] Pasare, C., and Medzhitov, R.: *Microbes Infect* 6, 1382-1387 (2004)
- [41] Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., and van Kooyk, Y., Figdor, C.G.: *Cell* 100, 575-585 (2000)
- [42] Reis e Sousa, C., Stahl, P. D., and Austyn, J. M.: *J. Exp. Med.* 178, 509-519 (1993)
- [43] Iwasaki, A., and Medzhitov, R.: *Nat. Immunol.* 5, 987-995 (2004)
- [44] Arancibia, S. A., Beltrán, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F., and Hermoso, M. A.: *Biol. Res.* 40, 97-112 (2007)
- [45] Liu Y. J.: *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275-306 (2005)
- [46] Liu, K. J.: *J. Cancer Mol.* 2, 213-215 (2006)
- [47] Lipscomb, M., and Masten, B.: *Physiologic. Rev.* 82, 97-130 (2002)
- [48] Palucka, K., and Banchereau, J.: *Nat. Rev. Cancer* 12, 265-77 (2012)
- [49] Merad, M., and Manz, G.: *Blood* 113, 3418-3247 (2009)
- [50] Basta, S., and Alatery, A.: *Scand. J. Immunol.* 65, 311-319 (2007)
- [51] Park, C. S., and Choi, Y. S.: *Immunology* 114, 2-10 (2005)
- [52] Fitzgerald-Bocarslyand, P., and Jacobs, E. S.: *J. Leukoc. Biol.* 87, 609-620 (2010)
- [53] Ceccaldi, P. E., Delebecque, F., Prevost, M. C., Abastado, J. P., Gessain, A., Schwartz, O., and Ozden, S.: *J. Virol.* 80, 4771-4780 (2006)
- [54] Radstake, T. R. D. J., van Lent, P. L. E. M., Pesman, G. J., Blom, A. B., Sweep, F. G. J., Rönnelid, J., Adema, G. J., Barrera, P., van den Berg, W. B. : *Ann. Rheum. Dis.* 63, 696-702 (2004)
- [55] Wallet, M. A., Sen, P., and Tisch, R.: *Clin. Med. Res.* 3, 166-175 (2005)
- [56] Kato, M., Khan, S., Gonzalez, N., O'Neill, B.P., McDonald, K.J., Cooper, B.J., Angel, N.Z., and Hart, D. N.: *J. Biol. Chem.* 278, 34035-34041 (2003)
- [57] Zelensky, A.N., and Gready, J. E.: *FEBS J.* 272, 6179-6217(2005)

- [58] Kato, M., Khan, S., d'Aniello, E., McDonald, K. J., and Hart, D. N. J.: *J. Immunol.* 79, 6052-6063 (2007)
- [59] Butler, M., Morel, A. S., Jordan, W. J., Eren, E., Hue, S., Shrimpton, R. E., and Ritter, M. A.: *Immunology* 120, 362-371(2006)
- [60] Kerrigan, A. M., and Brown, G. D.: *Immunobiology* 214, 562-575 (2009)
- [61] Brown, G. D., Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, D. J., Williams, J. A., Martinez-Pomares, L., Wong S. Y., and Gordon, S.: *J. Exp. Med.* 196, 407-412 (2002)
- [62] Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G.: *Cell* 100, 575-585 (2000)
- [63] Ancian, P., Lambeau, G., and Lazdunski, M.: *Biochemistry* 34, 13146-13151 (1995)
- [64] Stahl, P.D., Ezekowitz, R.A.: *Curr. Opin. Immunol.* 10, 50-55 (1998)
- [65] Ancian, P., Lambeau, G., Mattei, M. G., and Lazdunski, M.: *J. Biol. Chem.* 270, 8963-8970 (1995)
- [66] Sheikh, H., Yarwood, H., Ashworth, A., and Isacke, C.: *J. Cell. Sci.* 113, 1021-1032 (2000)
- [67] Jiang, W., Swiggard, J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C.: *Nature* 375, 151-155 (1995)
- [68] Kato, M., Neil, T. K. Clark, G. J., Morris, C. M., Sorg, R. V., and Hart, D. N.: *Immunogenetics* 47, 442-450 (1998)
- [69] Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M.: *J. Exp. Med.* 196, 1627-1638 (2002)
- [70] Kato, M., McDonald, K. J., Khan, S., Ross, I. L., Vuckovic, S., Chen, K., Munster, D., MacDonald, K. P. A., and Hart, N. J.: *Int. Immunol.* 18, 857-869 (2006)
- [71] McKay, P. F., Imami, N., Johns, M., Taylor-Fishwick, D.A., Sedibane, L.M., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Palmer, D.B., George, A.J., Foxwell, B.M., Ritter, M.A.: *Eur. J. Immunol.* 28, 4071-4083 (1998)
- [72] Shrimpton, R. E., Butler, M., Morel, A. S., Eren, E., Hue, S. S., and Ritter, M. A.: *Mol. Immunol.* 46, 1229-1239 (2009)
- [73] Maagd, R.A., MacKenzie, W.A., Schurman, H.J., Ritter, M.A., Price, K.M., Broekhuizen, R., and Kater, L.: *Immunology* 54, 745-754 (1985)

- [74] Witmer-Pack, M.D., Swiggard, W.J., Mirza, A., Inaba, K., and Steinman RM.: Cell Immunol. 163, 157-62 (1995)
- [75] Small, M., and Kraal, G.: Int. Immunol. 15, 197-203 (2003)
- [76] Stahl, P.D., Ezekowitz, and R.A.: Curr. Opin. Immunol. 10, 50-55 (1998)
- [77] Feinberg, H., Park-Snyder, S., Kolatkar, A.R., Heise, C.T., Taylor, M.E., and Weis, W.I.: J. Biol. Chem. 275, 21539-21548 (2000)
- [78] Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S. L., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M.: J. Cell Biol. 151, 673-684 (2000)
- [79] Mahnke, K., Qian, Y., Knop, J., and Enk, A. H.: Blood 101, 4862-4869 (2003)
- [80] Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H. D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., and Stein, H.: Blood 95, 1443-1450 (2000)
- [81] Brune, V., Tiacci, E., Pfeil, I., Döring, C., Susan Eckerle, van Noesel, C. J.M., Klapper, W., Falini, B., von Heydebreck, A., Metzler, D., Bräuninger, A., Hansmann, M. L., and Küppers, R.: J. Exp. Med. 205, 2251-2268 (2008)
- [82] Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., and Stein, H.: Blood 95, 1443-14450 (2005)
- [83] Lamprecht, B., Kreher, S., Anagnostopoulos, I., Jöhrens, K., Monteleone, G., Jundt, F., Stein, H., Janz, M., Dörken, B., and Mathas, S.: Blood 112, 3339-3347 (2008)
- [84] Aldinucci, D., Gloghini, A., Pinto, A., De Filippi, R., and Carbone, A.: J. Pathol. 221, 248-263 (2010)
- [85] Skinnider, B. F., and Mak, T. W.: Blood 99, 4283-4297 (2002)
- [86] Gandhi, M.K., Moll, G., Smith, C., Dua, U., Lambley, E., Ramuz, O., Gill, D., Marlton, P., Seymour, J.F., and Khanna, R.: Blood 110, 1326-1329 (2007)
- [87] Yurchenko, M., and Sidorenko, S. P.: Exp. Oncol. 32, 214-223 (2010)
- [88] GE Healthcare: Gel Filtration Principles and Methods 18-1022-18 AK
- [89] Bradford, M. M.: Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)
- [90] Smith, P.K., et al.: Anal Biochem. 150, 76-85 (1985)
- [91] Instruction Manual Waters AccQ•Tag Chemistry Package, Waters Corporation, USA (1993)

- [92] Pompach, P., Man, P., Kavan, D., Hofbauerová, K., Kumar, V., Bezouška, K., Havlíček, V., and Novák, P.: *J. Mass Spectrom.* 44, 1571-1578 (2009)
- [93] Young, M. M., Tang, N., Hempel, J. C., Oshiro, C. M., Taylor, E. W., Kuntz, I. D., Gibson, B. W., and Dollinger, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 5802-5806 (2000)
- [94] Sinz, A.: *Mass Spectrom. Rev.* 25, 663-682 (2006)
- [95] Tang, X., and Bruce, J. E.: *Mol. Biosyst.* 6, 939-947 (2010)
- [96] Mädler, S., Bich, C., Touboul, D., and Zenobi, R.: *J. Mass. Spectrom.* 44, 694-706 (2009)
- [97] Dostupné z URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8IX05> (cit. 13.4. 2013)

