

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Katedra biochemie**



STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE INTERAKCE Nkr-p1f/Clrg

*Structural characterization of Nkr-p1f/Clrg interaction*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Daniel Kavan, Ph.D.

Konzultant práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Praha 2015

Bc. Lucie Tůmová

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Daniela Kavana, Ph.D. a konzultanta RNDr. Petra Nováka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 6. 5. 2015.

.....

podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému konzultantovi RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za odborné vedení práce a umožnění vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Danielu Kavanovi, Ph.D. za bezmeznou trpělivost a cenné rady, Mgr. Zdeňku Kukačkovi za pomoc při veškerém měření na hmotnostním spektrometru, a Mgr. Ladislavu Bumbovi, Ph.D. za SPR měření. Dík patří i ostatním členům Laboratoře strukturální biologie a buněčné signalizace MBÚ AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu vždy poradit a pomoci. V neposlední řadě patří mé poděkování rodině a blízkým, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

## **ABSTRAKT**

NK buňky jsou řazeny mezi lymfocyty, které se účastní primární odpovědi imunitního systému na viry infikované a nádorové buňky. Současně produkují cytokiny a zapojují se do tvorby sekundární imunitní odpovědi spolu s T a B lymfocyty. Tato diplomová práce se zabývá studiem struktury a interakce membránového receptoru Nkr-p1f spolu s ligandem Clr-g. Receptor Nkr-p1f má aktivační funkci a je schopen zahájit cytotoxickou funkci NK buněk. Trojrozměrná struktura byla vyřešena u homodimeru Clr-g, ale jeho interakce s receptorem dosud ne. Cílem práce bylo připravit produkční vektor celé extracelulární části receptoru Nkr-p1f a provést produkci Nkr-p1f a Clr-g v prokaryotickém expresním systému. Následně provést renaturaci a purifikaci proteinů *in vitro*. Tímto způsobem připravené proteiny byly analyzovány elektroforeticky a hmotnostní spektrometrií. Jejich interakce byla sledována biofyzikální metodou, povrchovou plasmonovou rezonancí (SPR). Avšak interakce mezi nimi nebyla technikou SPR odhalena.

## **ABSTRACT**

NK cells are ranked among lymphocytes, which are involved in primary immune responses to virus infected and tumour cells. They produce cytokines at the same time and are involved in the formation of secondary immune responses together with T and B lymphocytes. This diploma thesis is engaged in the study of the structure and interaction of the transmembrane receptor Nkr-p1f with its ligand Clr-g. This receptor Nkr-p1f has an activation function and is able to initiate the cytotoxic function of the NK cells. The three-dimensional structure has been solved as a Clr-g homodimer, but its interaction with the Nkr-p1f receptor remains mysterious. The aim was to prepare an expression vector coding the entire extracellular region of the receptor NKR-P1F and carry out the production of the receptor Nkr-p1f and Clr-g in prokaryotic expression system, subsequently renaturation and purification of the proteins *in vitro*. This way prepared proteins were analyzed by electrophoresis and mass spectrometry. Their interaction was studied with biophysical method, surface plasmon resonance (SPR). However, the interaction between them was not revealed by SPR technology. (In Czech)

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

NK buňky

receptor Nkr-p1f

ligand Clr-g

rekombinantní exprese

renaturace a purifikace proteinů

hmotnostní spektrometrie

disulfidické můstky

SPR

# OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	8
SYMBOLY .....	8
ZKRATKY .....	8
1 LITERÁRNÍ ÚVOD .....	12
1.1. Imunitní systém .....	12
1.2. Organizace imunitního systému .....	12
1.3. NK buňky a další buňky imunitního systému .....	13
1.3.1. Vývoj a lokalizace NK buněk .....	16
1.3.2. Aktivace NK buněk .....	17
1.3.3. Funkce NK buněk .....	18
1.4. Receptory NK buněk a signalizace .....	21
1.4.1. Imunoglobulinové receptory NK buněk .....	22
1.4.2. Receptory NK buněk s doménou podobnou lektinům C-typu .....	23
1.4.3. Signalizace pomocí receptorů .....	26
1.5. Interakce Nkr-p1f a Clr-g .....	26
1.5.1. Všeobecné strukturní znaky .....	30
2 CÍLE PRÁCE .....	33
3 MATERIÁL .....	34
3.1 Přístroje a pomůcky .....	34
3.2 Chemikálie .....	35
3.3 Enzymy .....	38
3.4 Vektory .....	39
3.5 Primery pro PCR .....	39
3.6 Bakteriální kmeny <i>E. coli</i> .....	39
3.7 Roztoky a pufrы .....	39
3.8 Média .....	41
4 METODY .....	42
4.1 Příprava produkčních vektorů pro celou extracelulární část Nkr-p1f .....	42
4.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	42
4.1.2 Elektroforéza v agarosovém gelu .....	42
4.1.3 Ligace namnoženého úseku DNA do vektoru pBSSK(+) .....	43
4.1.4 Bakteriální transformace klonovacích buněk .....	44

4.1.5 Izolace plazmidové DNA a její restrikce k ověření ligace .....	44
4.1.6 Opakování postupu s plazmidy pET-28b(+) a pET-30a(+) .....	45
4.1.7 Měření koncentrace plazmidové DNA izolované z většího objemu.....	47
4.2 Rekombinantní exprese proteinů Clr-g a Nkr-p1f.....	48
4.2.1 Příprava kompetentních produkčních buněk .....	48
4.2.2 Bakteriální transformace produkčních buněk .....	48
4.2.3 Testování exprese .....	49
4.2.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	50
4.2.4.1 SDS elektroforéza pro analýzu disulfidových vazeb .....	52
4.2.5 Hledání vhodných podmínek produkce Nkr-p1f.....	52
4.2.6 Velkoobjemová produkce proteinů .....	53
4.2.7 Izolace inkluzních tělísek .....	53
4.3 Renaturace proteinů Nkr-p1f a Clr-g .....	54
4.4 Zakoncentrování proteinového roztoku .....	56
4.4.1 Ultrafiltrace .....	56
4.4.2 Koncentrátory pro centrifugaci .....	56
4.5 Purifikace proteinů Nkr-p1f a Clr-g.....	56
4.5.1 Gelová permeační chromatografie.....	57
4.5.2 Afinitní chromatografie Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou .....	57
4.5.3 Chromatografie Clr-g na revezní fázi .....	58
4.5.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové.....	58
4.6 Charakterizace struktury Nkr-p1f a Clr-g hmotnostní spektrometrií .....	59
4.6.1 Odsolení proteinů a měření intaktní hmoty proteinů .....	60
4.6.2 Identifikace zapojení disulfidových vazeb v proteinech .....	60
4.7 Charakterizace struktury Nkr-p1f a Clr-g za pomoci sekvenčního alignmentu .....	62
4.8 Studium interakce celých extracelulárních částí Nkr-p1f s Clr-g.....	63
4.8.1 Povrchová plasmonová resonance (SPR).....	63
5. VÝSLEDKY .....	64
5.1 Příprava produkčních vektorů pro celou extracelulární část Nkr-p1f .....	64
5.1.1 Kontrola délky produktu PCR agarosovou elektroforézou .....	64
5.1.2 Kontrola ligace ve vektoru pBSSK(+) agarosovou elektroforézou.....	65
5.1.3 Kontrola ligace ve vektorech pNkr-p1fhis a pNkr-p1f agarosovou elektroforézou.....	65
5.1.4 Měření koncentrace a ověření sekvence plazmidů pNkr-p1fhis a pNkr-p1f.....	66

5.2 Rekombinantní exprese proteinů Clr-g a Nkr-p1f.....	67
5.2.1 Bakteriální transformace a testování exprese .....	67
5.2.2 Hledání vhodných podmínek produkce Nkr-p1f.....	69
5.2.3 Izolace inkluzních tělísek po velkoobjemové produkci .....	69
5.3 Renaturace proteinů Nkr-p1f a Clr-g .....	71
5.4 Purifikace proteinů .....	72
5.4.1 Afinitní chromatografie NKR-P1F s polyhistidinovou kotvou.....	72
5.4.2 Chromatografie Clr-g na reverzní fázi .....	74
5.4.3 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové.....	75
5.5 Ověření totožnosti proteinů Nkr-p1f a Clr-g.....	76
5.6 Charakterizace struktury Nkr-p1f a Clr-g .....	78
5.6.1 Identifikace zapojení disulfidových vazeb v proteinech .....	78
5.6.2 Sekvenční alignment .....	80
5.7 Studium interakce celých extracelulárních částí Nkr-p1f s Clr-g.....	83
5.7.1 Povrchová plasmonová rezonance (SPR).....	83
6. DISKUZE.....	84
7. ZÁVĚR.....	90
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	91

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

### SYMBOLY

<b>A</b>	absorbance
<b>c</b>	koncentrace ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , $\text{mg}/\text{ml}$ , $\text{mol}/\text{l}$ )
<b>t</b>	čas (min, hod)
<b>T</b>	teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )
<b>V</b>	objem (ml, $\mu\text{l}$ )

### ZKRATKY

<b>AcN</b>	acetonitril
<b>ADCC</b>	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)
<b>Ag</b>	antigen (Antigen)
<b>APC</b>	antigen prezentující buňky (Antigen Presenting Cells)
<b>APS</b>	peroxodisíran amonný (Ammonium PerSulfate)
<b>B7-H6</b>	ligand receptoru NKp30, nádorový antigen
<b>BAT3</b>	transkript 3 asociovaný s HLA-B (HLA-B Associated Transcript 3)
<b>BCR</b>	receptor B lymfocytů (B Cell Receptor)
<b>BDCA2</b>	lidský lektinový receptor C-typu (Blood Dendritic Cell Antigen 2)
<b>BLAST</b>	algoritmus pro srovnávání sekvenčních informací (Basic Local Alignment Search Tool)
<b>CD</b>	diferenční skupina (Cluster of Differentiation)
<b>Clr/CLEC2</b>	protein asociovaný s C-lektiny (C-type lectin related/ C-type Lectin-Like Receptor 2)
<b>CTLD</b>	lektinům podobné domény C-typu (C-Type Lectin-like Domains)
<b>CTLR</b>	receptory obsahující CTLD (C-Type Lectin-like Receptors)
<b>DAP12</b>	adaptorová molekula nesoucí aktivační motiv ITAM (DNAX Activating Protein of 12 kDa)
<b>DC</b>	dendritická buňka (Dendritic Cell)
<b>DC-SIGN</b>	lektinový receptor C-typu (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin)



<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>ESI</b>	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
<b>FTICR MS</b>	hmotnostní spektrometrie s iontově cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry)
<b>FA</b>	kyselina mravenčí (Acidum Formicicum)
<b>GM-CSF</b>	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
<b>HLA</b>	lidský leukocytární antigen (Human Leukocyte Antigen)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IL</b>	interleukin
<b>IL-15R</b>	receptor pro interleukin 15 (Interleukin-15 Receptor)
<b>iNKT</b>	invariantní NKT buňka (invariant Natural Killer Cell)
<b>IPTG</b>	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
<b>ITAM</b>	aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosine- based Activation Motif)
<b>ITIM</b>	inhibiční motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)
<b>KACL</b>	lektin C-typu asociovaný s keratinocyty (Keratinocyte-Associated C-type Lectin)
<b>KIR</b>	aktivační a inhibiční receptory imunoglobulinového typu NK buněk (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor)
<b>KLR</b>	C-lektinům podobné receptory NK buněk (Killer cell Lectin-like Receptors)
<b>Klrg1</b>	C-lektinům podobný receptor NK buněk, podrodina G, člen 1 (Killer Cell Lectin-like Receptor subfamily G, member 1)
<b>LB médium/agar</b>	médium/agar Luria-Bertani
<b>LC-MS</b>	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
<b>LGLs</b>	velké granulární lymfocyty (Large Granular Lymphocytes)
<b>LILR</b>	imunoglobulinové receptory leukocytů

	(Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors)
<b>LLT1</b>	lidský ligand NKR-P1A (Lectin-Like Transcript 1)
<b>LRC</b>	genový klastr kódující imunoglobulinové receptory (Leukocyte Receptor Complex)
<b>Ly49</b>	skupina myších lektinům podobných receptorů C-typu
<b>mAb</b>	monoklonální protilátka (Monoclonal Antibody)
<b>MALDI</b>	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
<b>mRNA</b>	messenger RNA (messenger Ribonucleic Acid)
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
<b>MWCO</b>	minimální velikost rozpuštěné látky zadržené membránou (Molecular Weight Cut-Off)
<b>NCR</b>	receptory přirozené cytotoxicity (Natural Cytotoxicity Receptors)
<b>NK buňka</b>	přirozený zabíječ (Natural Killer)
<b>NKC</b>	genový komplex kódující receptory s doménami podobnými lektinům C-typu (Natural Killer gene Complex)
<b>CD94/NKG2</b>	rodina receptorů NK buněk podobná C-lektinům
<b>OCILRP2</b>	produkt alternativně sestřižené mRNA pro Clr-g (Osteoclast Inhibitory Lectin Related Protein 2)
<b>OD</b>	optická denzita (Optical Density)
<b>PAGE</b>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PolyAcrylamide Gel Electroforesis)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
<b>PDB</b>	Proteinová databáze (Protein Data Bank)
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonyl fluorid (Phenylmethylsulfonyl fluorid)
<b>PTK</b>	protein tyrosin kinasa
<b>RPM</b>	otáčky za minutu (Revolutions Per Minute)
<b>SDS</b>	dodecylsírán sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)

<b>SPR</b>	povrchová plazmonová rezonance (Surface Plasmon Resonance)
<b>TCEP</b>	tris-(2-karboxyethyl)fosfin
<b>TCR</b>	receptor T lymfocytů (T Cell Receptor)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>TLR</b>	receptor podobný genu <i>Toll</i> ( <i>Toll</i> -like Receptor)
<b>TNF (-<math>\alpha</math>, -<math>\beta</math>)</b>	faktor nekrotizující nádory - $\alpha$ , - $\beta$ (Tumor Necrosis Factor)
<b>TOF</b>	doba letu částice (Time Of Flight)
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminometan
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galakto-pyranosid
<b>ZAP70</b>	protein tyrosin kinasa (Zeta chain-Associated Protein kinase 70)

# 1 LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1. Imunitní systém

Termín imunita byl odvozen z latinského slova *immunitas*. Toto slovo mělo jako původní význam ochranu senátorů před soudním stíháním během jejich volebního období. Později začalo docházet k používání tohoto slova i pro ochranu organismu před nemocí, konkrétně před infekčním onemocněním [1].

Imunitní systém má základní funkci při udržování homeostázy organismu. Evoluci trvalo přibližně 400 milionů let, než imunitní systém dosáhl takové komplexnosti a dokonce vysoké adaptivity jakou známe dnes [2], [3].

Jeho hlavní funkcí je udržování integrity organismu rozeznáváním substancí „škodlivých“ od „neškodných“, vnějšího i vnitřního původu [3]. Imunitní systém se snaží o udržení integrity organismu několika svými význačnými schopnostmi. Dokáže průběžně odstraňovat staré a pozměněné buňky díky odhalování různých látek v nich vznikajících. Současně rozeznává tkáň tělu vlastní, proti kterým udržuje toleranci. V neposlední řadě také rozeznává a eliminuje patogenní mikroorganismy a jejich toxické produkty [1], [2].

## 1.2. Organizace imunitního systému

Imunitní systém může být rozdělen podle mnoha kritérií, např. může být členěn na složku humorální a buněčnou, které se vzájemně doplňují ve svých funkcích. Do humorální části patří různé sérové proteiny a sekretované molekuly, např. složky komplementu, protilátky. V buněčné části zase můžeme najít různé druhy leukocytárních buněk, např. DC, NK, T a B lymfocyty [2], [3].

Na základě mechanismů může být dělen na nespecifickou (přirozenou) a antigenně specifickou (adaptivní) imunitu. Do obou imunitních odpovědí se zapojují leukocyty i rozpustné látky (proteiny, molekuly) [2].

Evolučně starší, přirozená imunita (nespecifická, vrozená), je považována za první obranu organismu. Rozpoznává společné znaky, strukturní i funkční, různých skupin mikroorganismů a patogenů. Je tvořena nejprve fyzikálními a chemickými bariérami (pokožka, sliznice), dále fagocytujícími buňkami, DC a NK buňkami. Humorální složka je zastoupena různými sekretovanými proteiny, chemokiny a cytokiny [1], [4].

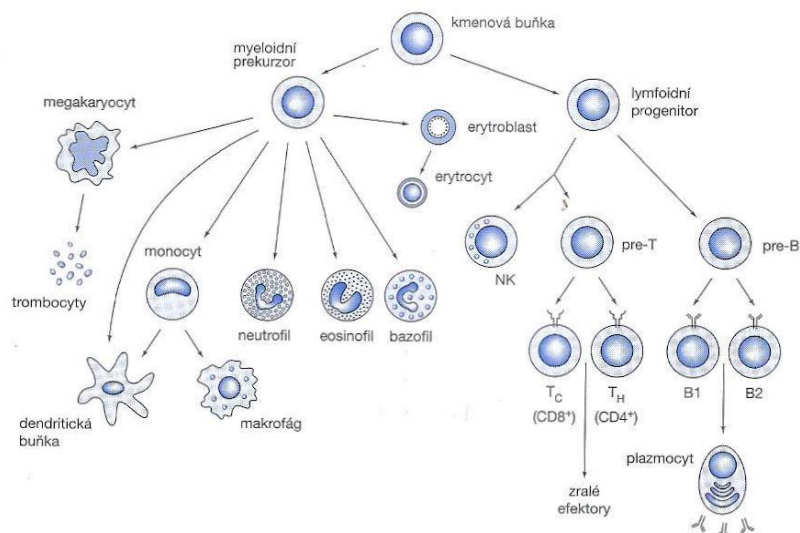
Adaptivní imunita (specifická), narušila od imunity přirozené, rozpoznává patogeny pomocí vysoce specifických receptorů pro dané epitopy (konkrétní místa na antigenech; antigenní determinanty). Za charakteristické vlastnosti této imunity jsou považovány vysoká specifita pro různé molekuly a schopnost si „pamatovat“. To znamená, že mohou efektivněji reagovat na opětovné setkání se stejným antigenem. Hlavní komponentou adaptivní imunity jsou lymfocyty T a B. T lymfocyty se dále dělí na  $T_c$ , které cíleně cytotoxicky zabíjejí buňky obsahující daný antigen, a  $T_h$ , které expresí různých proteinů podporují a ovlivňují ostatní složky imunitního systému. B lymfocyty sekretují do oběhu rozpustné protilátky [1], [2], [3]. Díky nutnosti aktivace lymfocytů se specifická imunita oproti nespecifické rozvíjí nejdříve po několika dnech od vstupu patogenu do organismu [1].

Buňky imunitního systému ve spojení s pojivovými a dalšími buňkami vytváří různé anatomické celky, jako jsou lymfatické orgány a tkáně. V primárních lymfatických orgánech (kostní dřeň, brzlík) dochází ke vzniku, diferenciaci a maturaci příslušných imunokompetentních buněk. Vlastní imunitní reakce probíhají v sekundárních lymfatických orgánech, např. slezina, lymfatické uzliny, do kterých se buňky imunitního systému dostávají krví a antigeny jsou volné nebo prezentovány na antigen prezentujících buňkách (APC) [2].

### **1.3. NK buňky a další buňky imunitního systému**

Všechny buňky nacházející se v krvi vznikají postupným vývojem z pluripotentních kmenových buněk kostní dřeně (obr. č. 1, str. 14) za pomoci signalizace cytokiny a kontakty se stromálními buňkami kostní dřeně [3].

Leukocyty (bílé krvinky) tvoří podstatnou část imunitního systému [2]. Během dne se v kostní dřeni vytvoří  $7 \times 10^{10}$  leukocytů, ale podle potřeby se může produkce několikanásobně zvýšit [3]. Kmenové buňky se mohou diferencovat na dvě rozdílné skupiny, lymfoidní a myeloidní.



**Obr. č. 1: Původ buněk imunitního systému z pluripotentních kmenových buněk [2].**

Do lymfoidní skupiny patří NK buňky, T a B lymfocyty. NK buňky, které se podobají T lymfocytům, mají cytotoxickou funkci. T lymfocyty se vyvíjí hlavně v brzlíku a dělí se na dvě populace, prekurzory pomocných T buněk a prekurzory cytotoxických T buněk, ze kterých vznikají díky různým signálům pomocné nebo cytotoxické T lymfocyty. V kostní dřeni a v sekundárních lymfoidních orgánech dochází k vývoji B lymfocytů, které po setkání s antigenem dokážou produkovat protilátky. Část lymfocytů vykazuje po setkání s antigenem imunologickou paměť [2], [4].

Myeloidní skupina obsahuje jako zástupce monocyty, které se ve tkáni přeměňují na dendritické buňky a makrofágy, a granulocyty (basofily, eosinofily, neutrofil). Dendritické buňky mohou vznikat také přímo z progenitoru. Všechny tyto buňky jsou součástí přirozené imunity, produkují tedy cytokiny a fagocytují. Všechny druhy buněk kromě granulocytů mají důležitou funkci jako APC [2].

## **NK buňky**

Přítomnost buněk, které mohly spontánně cytotoxicky zabít buňky jiné, nejprve komplikovala průběh měření řady testů. Například u výzkumu nádorů se nemohla slabá imunitní reakce změřit, protože ji zastínila aktivita takovýchto buněk [5].

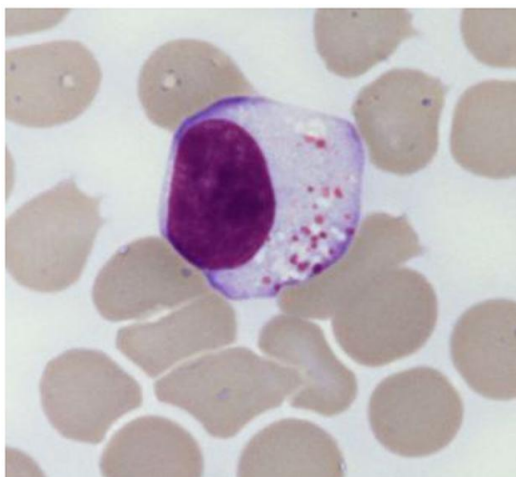
V roce 1975 Kiessling, Klein a Pross popsali tento nový typ buněk, které se nacházejí ve slezině normálních mladých myší. Dokázali, že tento typ buněk projevuje „spontánní“

cytotoxické chování *in vitro*, např. proti buněčné linii nakažené myším leukemickým virem Moloney. Navíc měly jinou funkční a povrchovou charakteristiku. Po odstranění monocytů, makrofágů a lymfocytů z organismu myši došlo ke zvýšení aktivity zabíječských buněk. Svou morfologií připomínaly malé lymfocyty, ale nedaly se zařadit ani mezi T, ani mezi B lymfocyty [5], [6]. Stejný rok vyšel článek od pana Prose a Jondala, ve kterém potvrdili výskyt těchto buněk i u lidí [7].

Původně se domnívali, že příčina cytotoxické funkce „spontánních“ zabíječských buněk je daná přítomností pouze myších leukemických virových antigenů. Přiznávali ovšem, že aktivita nemusí být leukemicky specifická, ale může být způsobena antigeny na povrchu leukemických buněk, které nejsou přímo kódovány genomem viru [5]. Dále popsali míru aktivity jako funkci genetických faktorů [8].

Přesná definice, která je jednoznačná jako u T a B lymfocytů, neexistuje. Ty jsou popsány pomocí jejich specifických receptorů TCR (T cell receptor) a BCR (B cell receptor). Přirozené zabíječské buňky (NKs) jsou charakterizovány jako vrozené velké granulární lymfocyty (LGLs; obr. č. 2, str. 16), které na svém povrchu produkují ne zcela specifické povrchové značky CD16 a NKH-1 u lidí, NK-1.1 u myši. Ovšem nejvíce specifická je pro tyto buňky exprese receptorů NCR (Natural Cytotoxicity Receptors), do kterých patří molekuly NKp30 a NKp46, exprimované na klidových i aktivovaných NK buňkách. Protože tyto buňky na svém povrchu nenesou TCR a BCR, jsou charakterizovány jako tzv. „nulové“ buňky [9], [10]. Původem jsou jim nejbližší  $\gamma\delta$  T lymfocyty a iNKT (invariant Natural Killer). Mají společnou produkci molekul, např. CD2, CD7, CD90, IFN- $\gamma$ , perforinu a granzymů [11].

Zprostředkovávají lyzi u buněk, kterým na povrchu chybí glykoproteinové receptory I. třídy hlavního histokompatibilního komplexu (MHC I) [12]. Navíc také produkují cytokiny a účastní se na tvorbě adaptivní imunitní odpovědi, i když NK buňky jsou řazeny do imunity přirozené [13]. Charakteristický rys NK buněk spočívá v jejich schopnosti rozlišovat buňky, které podstupují stresovou situaci (karcinogeneze, infekce viry, vystavení působení chemikálií, fyzické poškození), a zdravými buňkami díky zárodečně kódované sadě receptorů [14], [15], [16].



Obr. č. 2: Typický obrázek morfologie NK buňky [17].

### 1.3.1. Vývoj a lokalizace NK buněk

Tvorba NK buněk probíhá také z pluripotentních CD34+ hematopoietických kmenových buněk, které se dále transformují na lymfoidní progenitor a jsou vývojově bližší T lymfocytům [2]. Současně byly objeveny také populace buněk mimo kostní dřeň, např. v tonzilách, které by mohly být nejčasnějším prekurzorem ve vývoji T a NK buněk [17]. Maturace NK buněk je charakterizována různými imunofenotypy, které se liší expresí povrchových molekul [18]. Jedním z nejdůležitějších kroků v průběhu maturace pro selektivní diferenciaci, maturaci a přežití je přítomnost receptoru pro IL-15 (IL-15R). U myši, které mají snížený výskyt tohoto receptoru, dochází k maturaci malého počtu NK buněk [19], [20]. Celkově je šest nejdůležitějších cytokinů pro maturaci, aktivaci a život NK buněk, jako jsou IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 a IFN I. typu. Maturovaná NK buňka má schopnost produkce IFN- $\gamma$  a cytotoxickou funkci [21].

Během vývoje NK buněk musí dojít k získání povrchových receptorů v přesně daném pořadí. U člověka to není zatím zcela jasné, ale pořadí je přibližně následovné: nejprve dochází k expresi receptoru CD161, dále CD56, NKG2D, CD94/NKG2A, NKp46 a nakonec KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor) a CD16 [18], [22]. U myši je daná posloupnost lépe prozkoumána. Nejprve jsou u nich produkovány receptory NK1.1, CD94/NKG2A a NKp46, následují je DX5 a Ly49, a celý proces je ukončen pomocí expresí CD11b a CD43 [23].



Součástí vývoje NK buněk je i tzv. vzdělávání/licencování, které zajišťuje toleranci ke tkáním těla vlastních. K tomuto ději dochází pomocí rozpoznávání antigenů svého těla (MHC glykoproteinů I. třídy) pomocí inhibičních receptorů NK buněk [24].

V nedávné době bylo také zjištěno, že kromě klidových a aktivovaných NK buněk vznikají také dlouho žijící paměťové NK buňky [18], [25].

Vzhledem k jejich funkcím se NK buňky nachází v lymfoidních i nelymfoidních tkáních. Jejich funkce a lokalizace určuje repertoár povrchových receptorů [26]. Ve většině zastupují pouze minoritní skupinu lymfocytů, např. v lidské periferní krvi od 2 do 18 % [27]. Jejich hlavní výskyt je v krvi, slezině, plicích, játrech a v děložní sliznici u těhotných žen. Z krve putují do tkání podle aktuální potřeby [1]. Lidské NK buňky vydrží v krvi přibližně dva týdny [28]. U myši jsou hodnoty podobné [29], [30].

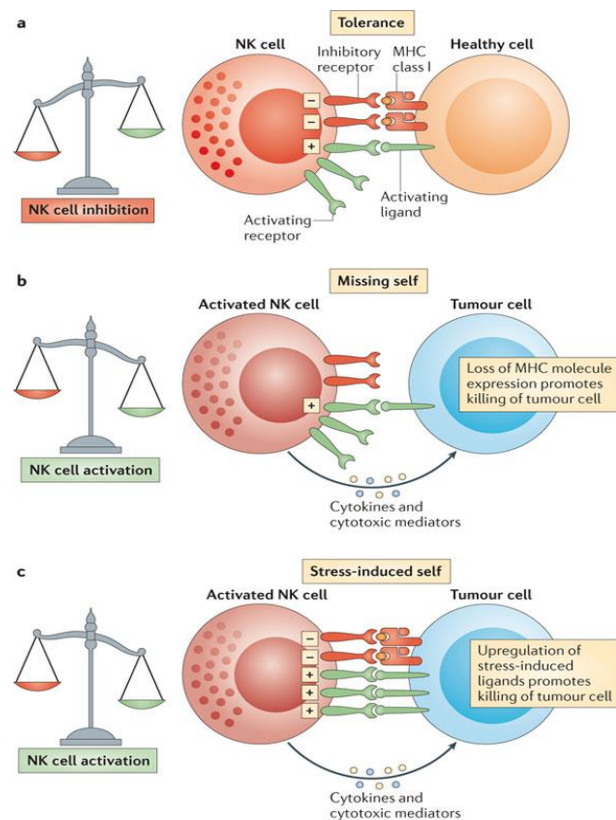
### **1.3.2. Aktivace NK buněk**

Nejprve bych se chtěla zaměřit na to, jakými hypotézami se vysvětluje schopnost NK buněk rozpoznávat cílové buňky, za které se považují virem infikované, nádorové a stresované buňky. Obecně lze říct, že dochází k aktivaci NK buňky, pokud signály z aktivačních receptorů převáží signály inhibiční.

Hypotéza „non-self recognition“ postuluje, že NK buňky jsou schopny rozpoznávat infekční molekuly pomocí svých inhibičních a aktivačních NK receptorů, případně Toll-like receptorů (TLR) [31], [32], [33].

Lze říci, že hlavní hypotéza rozpoznávání NK buněk se nazývá „missing self recognition“ (obr. č. 3, str. 18), která popisuje rozpoznání nedostatečného množství MHC glykoproteinů I. třídy na povrchu buněk a také non-MHC molekul („self“ molekuly). Ke snížení exprese těchto povrchových molekul dochází v případě nádorové transformace a infekce virem, když se buňka maskuje proti buněčné lyzi zprostředkované CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. Buňka se tak stává pro CD8<sup>+</sup> T lymfocyty neviditelná. V tomto okamžiku převáží množství aktivačních signálů inhibiční a dojde k lyzi cílové buňky. Zdravé buňky s dostatečným počtem těchto „self“ molekul se vážou na inhibiční receptory NK buněk a přežijí [14], [34], [35].

Další hypotéza, „induced-self recognition“ (obr. č. 3, str. 18), byla popsána na nádorově transformovaných a infikovaných buňkách. V těchto případech dochází ke zvýšení exprese některých „self“ molekul, ligandů aktivačních receptorů. Tímto dojde k převaze aktivačního signálu a spuštění cytotoxického mechanismu NK buněk[35], [31].



Obr. č. 3: Přehledné zobrazení hypotéz rozpoznávání cílových buněk (Missing-self recognition, Induced-self recognition, Tolerance) [37].

### 1.3.3. Funkce NK buněk

NK buňky jsou efektorové lymfocyty přirozené imunity kontrolující defektní buňky vlastního organismu (nádorové bujení, mikrobiální infekce, ...) a omezující jejich šíření a následné poškození tkáně. Jsou zapojeny tedy do cytotoxické funkce, regulace imunitní odpovědi a interakcí s ostatními buňkami. Účastní se také imunoterapie, transplantační imunity, autoimunity a zánětů.

## **Cytotoxická aktivita**

To je způsob, kterým NK buňka zabíjí buňky cílové. Zatím byly popsány tyto možnosti spuštění: pomocí cytotoxických granulí obsahujících granzymy a perforin, receptory smrti a reakcí závislou na protilátkách.

Jak již bylo uvedeno, NK buňky jsou granulární lymfocyty, které obsahují velké množství cytotoxických granulí obsahujících perforin a proteasy granzymy [2]. Protože tyto buňky nemají specifické receptory pro antigen, v imunitní odpovědi používají jiný mechanismus, např. nedostatek MHC glykoproteinů I. třídy na povrchu všech buněk lidského organismu [36]. MHC glykoproteiny slouží k rozlišování tělu vlastních a cizích či mutovaných proteinů. Lidské MHC glykoproteiny, nazývané HLA molekuly, slouží k prezentaci antigenů (krátkých peptidů). MHC molekuly I. třídy prezentují peptidy z proteinů produkovaných buňkou a MHC molekuly II. třídy peptidy z proteinů pohlcených buňkou z okolí. Těmito MHC molekulami buňka prezentuje svůj stav [4]. Pokud se např. nádorové buňky snaží zabránit rozpoznání T lymfocyty, dojde ke snížení počtu povrchových MHC molekul I. třídy, na které zareagují NK buňky. Dojde k převážení aktivačního signálu na úkor signálu inhibičního, NK buňka se aktivuje a vyloučí své cytoplazmatické granule. Dvě zřejmě nejdůležitější složky cytoplazmatických granul jsou perforin a granzymy. Perforin vytvoří, v závislosti na iontech vápenatých, v cytoplazmatické membráně cílové buňky multimerní komplexy, které dají vznik pórům. Granzymy (serinové proteasy) následně prochází prostou difúzí dovnitř buňky, kde indukují buněčnou smrt štěpením proteinů důležitých pro držení buněčné stability a integrity DNA [36], [37], [38]. Lidský granzym spouští buněčnou smrt mitochondriální cestou a myší granzym kaspasovou [39], [40]. Vlastní NK buňky jsou chráněny pomocí několika pojistek: chaperonu kalretikulinu při vlastní syntéze, inhibitoru proteas PI-9 (Proteinase inhibitor 9) uvnitř buňky a proteasy katepsinu B na povrchu buňky [41], [42], [43].

Druhá možnost cytotoxické aktivity je buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC, Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity). Většina infikovaných buněk je opsonizována pomocí protilátek typu IgG. Aktivační receptor CD16 (FcγRIIIa), který je exprimován na povrchu NK buněk, DC buněk, makrofágů a žírných buněk, se váže s nižší afinitou na Fc část protilátek ze třídy IgG [35], [44], [45]. Pokud je vazba protilátek

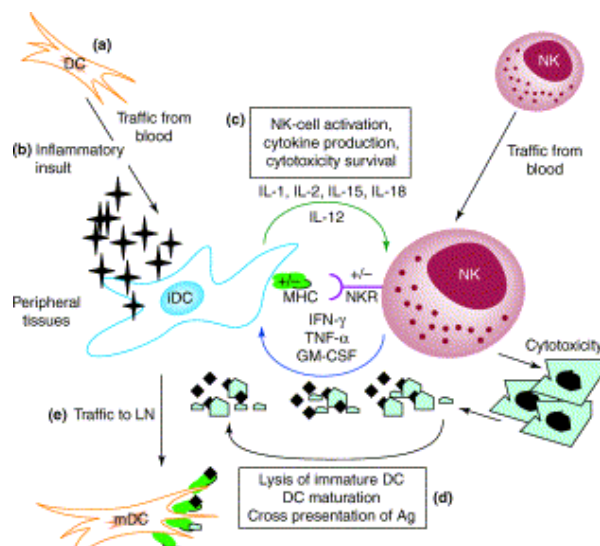
na antigen multivalentní, dochází ke spuštění signalizační kaskády, která následně vyvolá cytotoxickou aktivitu NK buněk za pomoci perforinu a granzymů. K zesílení ADCC dochází přítomností dalších aktivačních receptorů [46], [48].

Poslední možnost je pomocí receptorů smrti. Fas ligand (FasL), který se nachází na NK buňkách a T lymfocytech, se váže na Fas receptor (FasR) exprimovaný na cílových buňkách a aktivuje dráhu vedoucí k apoptóze cílové buňky [39], [47].

### **Regulace imunitní odpovědi**

NK buňky se zapojují do různých imunitních odpovědí dvěma způsoby, mezibuněčným kontaktem (vedoucím např. k apoptóze) a sekrecí cytokinů. V produkci cytokinů, jako jsou například IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ,  $\beta$ ), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), nezaostávají za ostatními buňkami. Ovlivňují makrofágy, DC, T a B lymfocyty. Ovlivňování je ale vzájemné. Díky tomuto NK buňky spojují, jak přirozenou, tak i adaptivní imunitu [35], [48], [49], [50]. NK buňky sekretují kromě cytokinů také chemokiny, které určují jejich lokalizaci do zanícených tkání [51].

IFN- $\gamma$  slouží k omezení šíření infekce v organismu tím, že zvyšuje produkci MHC glykoproteinů a zesiluje aktivaci makrofágů a T lymfocytů [2], [52]. NK buňky produkují také IL-10, který má právě opačnou funkci k IFN- $\gamma$  [2]. Maturace DC je podporována produkcí IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  [50]. Maturované DC produkují IL-12, který zpětně působí na NK buňky k produkci IFN- $\gamma$  [51], [50]. Kromě cytokinů na sebe NK a DC buňky působí také přímým buněčným kontaktem, kterým mohou indukovat maturaci a diferenciaci DC (obr. č. 4, str. 21) [53]. K tomuto ovlivnění dochází zřejmě interakcí mezi receptor-ligandovým párem Clr-g/NKR-P1F [54], [55], [56]. DC slouží jako antigen prezentující buňky, které stimulují T lymfocyty. Tímto je propojena přirozená imunita s adaptivní [50].



Obr. č. 4: Interakce NK buněk a DC v periferní tkáni prostřednictvím mezibuněčného kontaktu i produkce cytokinů [59].

### Ostatní funkce

Při těhotenství se deciduální NK buňky podílejí na potlačování mateřského imunitního systému vůči plodu, ale zároveň musí chránit dělohu a plod před infekcemi. Současně pomocí různých růstových faktorů se zapojují do podpory růstu placenty [57], [58].

NK buňky můžeme také odhalit v souvislosti s různými autoimunitními onemocněními. Například může dojít k vyvolání patologické cytotoxické reakce, narušení regulace imunitní odpovědi nebo dojde k vysoké expresi ligandů díky buněčnému stresu (Crohnova choroba) [2], [59].

Působení NK buněk při alergické reakci není příliš známé, ale jedna populace NK buněk za stimulace cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13 aktivuje B lymfocyty k produkci IgE, zatímco populace druhá má opačný účinek. IgE se váže na Fc receptory žírných buněk, které se tímto signálem degranulují a dojde k uvolnění mediátorů zánětu. Tyto mediátory spouští zánět a zahajují alergickou reakci [2], [60].

### 1.4. Receptory NK buněk a signalizace

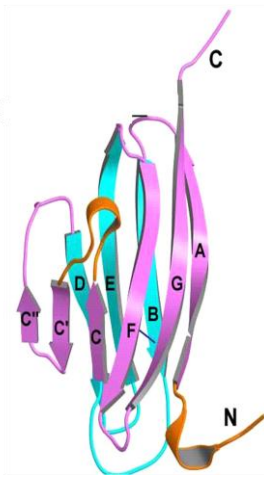
Receptory NK buněk mohou být děleny podle třech kritérií: funkční, strukturní a genetické.

Z funkčního hlediska můžeme rozdělit receptory na aktivační a inhibiční. *Aktivační receptor* obsahuje v transmembránové části nabitou aminokyselinu, přes kterou je asociován s adaptorovou molekulou, která obsahuje v intracelulární doméně motiv ITAM (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif). Mezi aktivační molekuly patří např. některé KIR, CD94-NKG2C, NKG2D, NCRs, NKp80 a NKp65. *Inhibiční receptor* v intracelulární části obsahuje ITIM (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif) a není spjat s adaptorovou molekulou. Do inhibičních receptorů patří např. KIR, CD94-NKG2A, NKR-P1A; u myši Nkr-p1b a Ly49 u myši [14], [61].

Z pohledu strukturního lze receptory NK buněk rozdělit na imunoglobulinové a C-lektinům podobného typu. *Imunoglobulinové receptory* jsou membránové proteiny I. typu a patří mezi ně např. některé KIR, LIR, NCR. *Receptory s doménou podobnou lektinům C-typu* jsou membránové proteiny II. typu a patří mezi ně např. Ly49, NKG2D, CD94-NKG2, NKR-P1 [62], [63], [64].

Genetické rozdělení souvisí se strukturou receptorů. Receptory imunoglobulinové jsou kódovány v sekvenci *LRC* (Leukocyte Receptor Complex). Receptory s doménou podobnou lektinům C typu jsou kódovány v sekvenci *NKC* (NK gene Complex) [65], [66], [67], [68].

#### 1.4.1. Imunoglobulinové receptory NK buněk



Obr. č. 5: Struktura imunoglobulinové domény [73].

Tyto receptory a nejenom ony obsahují imunoglobulinovou (Ig) doménu, která je tvořena dvěma antiparalelně orientovanými  $\beta$ -listy (Obr. č. 5, str. 22). Kromě receptorů se Ig doména nachází i v mnoha dalších proteinech s různými funkcemi [69], [70].

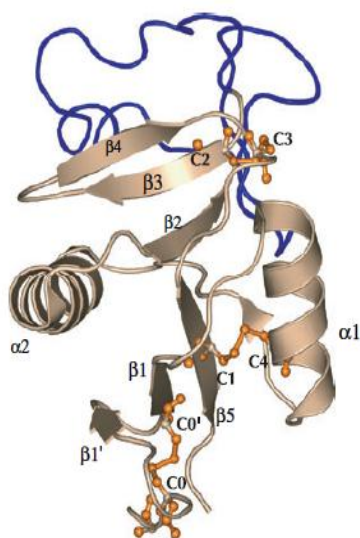
Jak jsem již uvedla výše v přehledu, imunoglobulinové receptory NK buněk jsou kódovány leukocytárním receptorovým komplexem LRC, který se u lidí nachází na chromozomu 19, u myši na chromozomu 7 [71]. Obecně jsou to

transmembránové proteiny I. typu, což znamená N-konec vně buňky, C-konec uvnitř. Mají různý počet Ig domén, dvě až čtyři, které jsou od cytoplazmatické domény odděleny krčkem procházejícím cytoplazmatickou membránou [69], [72].

Lidský *LRC* obsahuje tři skupiny imunoglobulinových receptorů: KIR, LILR a NCR. U myši byl popsán pouze receptor NKp46 z rodiny NCR [73], [74]. U rodiny KIR a LILR jsou nejčastější ligandy MHC glykoproteiny I. třídy, které se u lidí nazývají HLA (Human Leukocyte Antigen), a také na nich prezentované peptidy [73]. U receptorů NCR (NKp30, NKp44 a NKp46) jsou běžnými ligandy virové a nádorové proteiny, např. BAT3 a B7-H6 u hlavního aktivačního receptoru NK buněk, NKp30 [75], [76].

#### 1.4.2. Receptory NK buněk s doménou podobnou lektinům C-typu

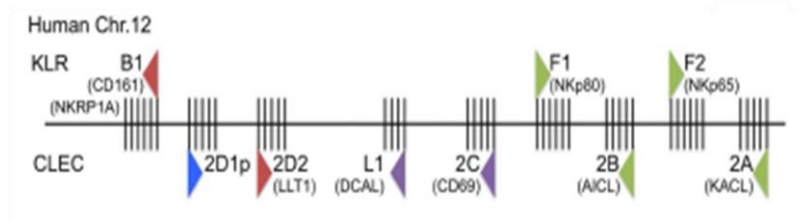
C-lektiny označují skupinu receptorů, které vážou sacharidy za přítomnosti vápenatých iontů. Zkratka CTLR (C-Type Lectin-like Receptors) označuje skupinu receptorů, která obsahuje CTLD (C-Type Lectin-like Domain). To znamená, že tyto receptory obsahují doménu podobnou C-lektinům, ale neobsahují vazebná místa pro vápenaté ionty. Díky tomu neváží sacharidy, ale jiný typ ligandu. V případě KLR (Killer cell Lectin-like Receptors) u NK buněk jsou ligandy proteinové molekuly [64], [77].



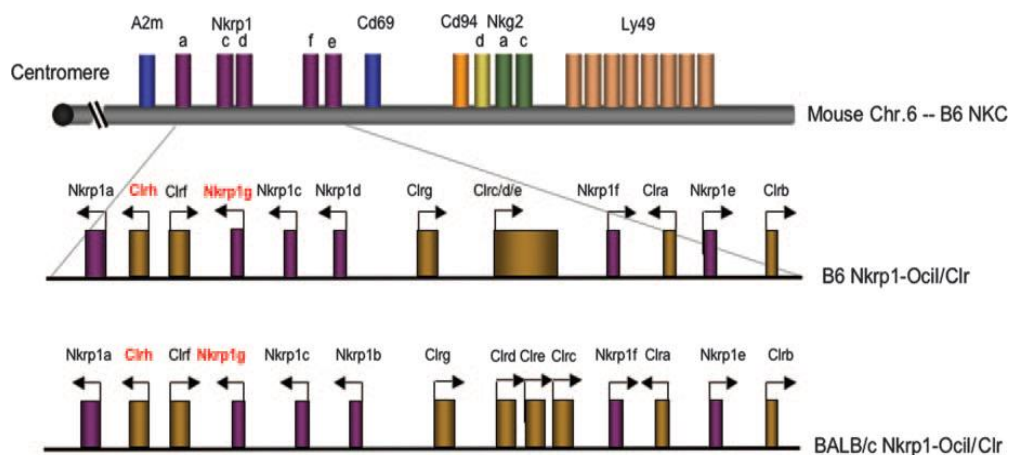
**Obr. č. 6: Struktura CTLD.** Dva  $\alpha$ -helixy, dva  $\beta$ -listy, modře smyčka, oranžově disulfidové vazby.

Struktura obecné CTLD (obr. č. 6, str. 23) se skládá ze dvou  $\alpha$ -helixů, dvou antiparalelních  $\beta$ -řetězců a smyčky. Dva antiparalelní  $\beta$ -řetězce vytvářejí velmi konzervované  $\beta$ -jádro. Toto jádro obsahuje WIGL motiv nalézající se na  $\beta_2$  řetězci a udává hydrofobicitu této části struktury. Dále obsahuje 4 konzervované cysteiny tvořící disulfidové vazby v tomto uspořádání: C1-C4 a C2-C3. CTLD s delší N-koncovou částí vytváří vlásenku, která je stabilizovaná další disulfidovou vazbou. Poté jsou zde disulfidové vazby v rozložení C1-C2, C3-C6 a C4-C5. Smyčka ve struktuře by mohla sloužit k vazbě ligandů [64], [78].

Jsou to transmembránové receptory II. typu, což znamená C-konec vně buňky, N-konec uvnitř. NK receptory obsahující domény podobné C-lektinům jsou kódovány genovým komplexem NKC, který je lokalizován u lidí na chromozómu 6 (obr. č. 7, str. 24), u myši na chromozómu 12 (obr. č. 8, str. 24) [79], [80], [81].



Obr. č. 7: Zobrazení NKC u lidí na chromozómu 12 [82].



Obr. č. 8: Zobrazení NKC u lidí na chromozómu 6 [83].

Mezi tyto receptory patří tři rodiny: Nkr-p1, CD94/NKG2 a Ly49. Receptorová rodina Nkr-p1 má u myši rodinu ligandů Clr [82]. U lidí je rodina NKR-P1 zastoupena pouze jedním členem, NKR-P1A, který váže LLT1. Známý ligand pro myšičí rodinu CD94/NKG2 je Qa-1, pro lidskou rodinu HLA-E. Oba ligandy patří mezi neklasické MHC glykoproteiny I. třídy. Poslední receptorová rodina Ly49 je pouze myšičí, která má známé ligandy m157 (protein myšičího cytomegaloviru), H-2 (klasická molekula MHC glykoproteinů I. třídy). U lidí se nachází skupina homologních imunoglobulinových receptorů KIR [72], [81].



## Rodina NKR-P1 a Clr

Rodina receptorů NKR-P1 obsahuje CTLD, která interaguje s rodinou ligandů Clr obsahující podobnou CTLD. Obě tyto rodiny molekul jsou kódovány v *NKC* genovém komplexu a vzájemně se prolínají, jak je vidět na obr. č. 8 (str. 24) [68], [83].

Skupina NKR-P1 zahrnuje u myši sedm zástupců: *Nkr-p1a*, *Nkr-p1b*, *Nkr-p1c* [84], *Nkr-p1d*, *Nkr-p1e*, *Nkr-p1f* [85] a *Nkr-p1g* [86], ze kterých je *Nkr-p1e* pseudogen [85]. U lidí jak již bylo řečeno, se vyskytuje pouze jeden zástupce, NKR-P1A [87]. V tabulce č. 1 (str. 25) jsou vypsané jejich známé ligandy a typ receptoru. Rodina myších ligandů Clr zahrnuje osm členů: Clr-a, Clr-b, Clr-c, Clr-d, Clr-e, Clr-f, Clr-g a Clr-h, z nichž Clr-e je považován za pseudogen [88], [67]. Obě skupiny genů jsou dost rozšířeny, i když *Nkr-p1* geny jsou konzervovány v průběhu evoluce mezi hlodavci, vačnatci, primáty, ostatními savci a ptáky [67]. Současně můžeme nalézt rodinu *Clr* v organismech, jako jsou myši, krysy a člověk [82], [89].

**Tab. č. 1: Myší a lidské receptory NKR-P1, jejich funkce a ligandy.** Myší ligandy u NKR-P1A a NKR-P1C nejsou zatím známy. NKR-P1E je pseudogen, proto nemá svůj ligand. Funkce označená jako + je aktivační, jako - inhibiční. Tabulka převzata a upravena [77], [85].

NKR-P1	A	B	C	D	E	F	G
<b>funkce</b>	+	-	+	-	pseudogen	+	-
<b>ligand u myši</b>	?	Clr-b	?	Clr-b		Clr-c, -d, -g	Clr-d, -g, -f
<b>ligand u člověka</b>	LLT1						

Rodina *Nkr-p1* receptorů se vyskytuje nejen na NK buňkách, ale i na povrchu NKT buněk, T lymfocytů a dendritických buněk [88], [90]. Všechny receptory jsou si ve své aminokyselinové sekvenci velmi podobné, i když jejich exprese je variabilní [91], [92]. U rodiny Clr se exprese také liší, ale navíc i lokalizace ve tkáních. Lze říci, že nejvíce je exprimován Clr-b, který se vyskytuje všude kromě mozku [89], [68]. Toto množství a všeobecné rozmístění naznačuje, že slouží k toleranci vlastního organismu podobně jako MHC glykoproteiny I. třídy. Ostatní ligandy Clr jsou produkovány méně v několika tkáních najednou nebo v konkrétní tkáni (Clr-d v oku) na různých buněčných typech [89], [91].

### 1.4.3. Signalizace pomocí receptorů

Na povrchu NK buněk se nacházejí aktivační komplexy, které se skládají z transmembránových aktivačních receptorů asociovaných skrz nabité aminokyseliny v transmembránových doménách s adaptorovými molekulami [93]. Adaptorové molekuly obsahují různý počet ITAM motivů, DAP12 a FcRγ jeden ITAM motiv, CD3ζ tři ITAM motivy na řetězec [94]. Motiv ITAM je složen ze sekvence aminokyselin (D/E)XXYXX(L/I)X<sub>6-8</sub>YXX(L/I), kde X<sub>6-8</sub> označuje 6-8 různých aminokyselin a lomítka dělí aminokyseliny, které se v daných pozicích mohou nacházet [95]. Všechny adaptorové molekuly obsahují v transmembránové doméně záporně nabitý zbytek kyseliny asparagové. Receptor, z důvodu stabilní asociace receptor-adaptorová molekula, má v transmembránové doméně zbytek opačně nabité aminokyseliny (lysin, arginin).

Při navázání ligandu na aktivační receptor dochází k aktivaci protein tyrosin kinasy (PTK) z rodiny Src, která fosforyluje motiv ITAM v intracelulární doméně adaptorových molekul. Toto vede k aktivaci PTK rodiny Syk (Syk či ZAP70). Následně jsou do signalizace zapojeny další transmembránové a cytosolické adaptorové molekuly a kinasy. Výsledek vede k aktivaci efektorových funkcí buňky [94], [95].

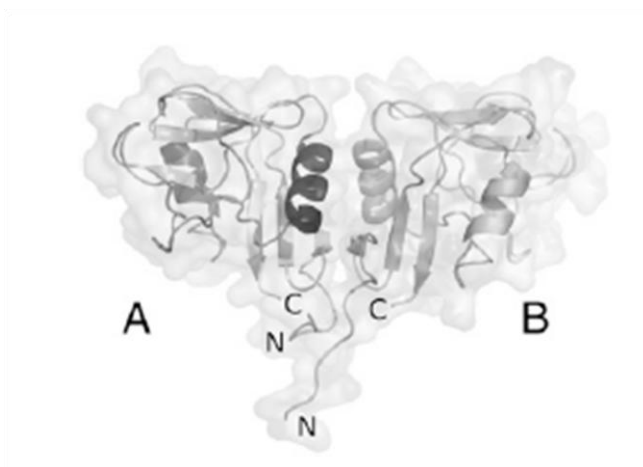
Inhibiční receptory neasociují s adaptorovými molekulami, ale ve své intracelulární doméně obsahují ITIM motiv. Tento motiv je definován sekvencí (I/L/V/S)XYXX(L/V), kde X značí libovolné aminokyseliny a lomítka dělí aminokyseliny, které se mohou v těchto pozicích nacházet. Při navázání ligandu na inhibiční receptor dochází k fosforylaci tyrosinu v motivu ITIM pomocí Src kinas. Následně díky tomu dochází k aktivaci fosfatasy SHP-1 a SHP-2, které defosforylují intracelulární substráty PTK účastnících se aktivační signalizace NK buněk [14], [94], [95].

### 1.5. Interakce Nkr-p1f a Clr-g

Interakce proteinů Nkr-p1f a Clr-g byla popsána v roce 2003 za pomoci buněčných testů, zahrnujících BWZ.36 reportérové buňky nesoucí fúzní receptory CD3ζ/Nkr-p1f, a tetramery Nkr-p1f [68]. Bylo odhaleno, že Nkr-p1f interaguje nejenom s Clr-g, ale i s Clr-c a Clr-d [86], [96]. A současně Clr-g interaguje nejen s Nkr-p1f, ale i s Nkr-p1g [86]. Pravděpodobný důvod, proč dochází k této rozšířené vazebné specifitě, je ten, že v myši Clr podrodině jsou konzervovány tři argininy (u Clrg jich je pět) udílející jim

pozitivní povrchový potenciál. Nkr-p1f a Nkr-p1g mají uprostřed svého receptoru negativní povrchový potenciál, čímž by mohlo docházet k vazbě na základě komplementarity povrchových potenciálů [68], [97].

V současné době máme k dispozici pouze krystalovou strukturu dimeru Clr-g (obr. č. 9, str. 27) [97]. Ale rentgenová struktura se často liší od skutečného rozložení proteinové molekuly. Obecně se ale předpokládá, že molekuly z rodiny Clr tvoří homodimery [68], [79]. Ale zda jsou Nkr-p1 také homodimery? Ve článku z roku 1989, zabývajícím se aktivačním receptorem na povrchu NK buněk, byl uveden SDS-PAGE gel, který zobrazoval imunoprecipitát receptoru za redukujících a neredukujících podmínek. Z toho usoudili, že je to struktura dimerní o 60 kDa složená ze dvou 30 kDa řetězců [98]. O dva roky později vyšel článek, ve kterém porovnávali myší a potkaní NK buňky. Své poznatky shrnuli tak, že jsou obě buňky podobné, ale nemají žádná data ohledně organizace molekul na buněčném povrchu, protože ještě neměli specifické myší mAb [84]. O rok později vyšel další potvrzující článek homodimerů pracující již s myším Nkr-p1c [99]. Existence homodimerů Nkr-p1 byla u všech těchto článků dokázána pomocí imunoprecipitace [98], [84], [99]. Tato metoda funguje tak, že mAb naváže svůj specifický Ag. Jedna molekula mAb má dvě ramena, mohla by podpořit nebo dokonce způsobit umělou dimerizaci Ag, či vůbec nedovolit vazbu Nkr-p1 v monomerním stavu. Toto potvrzuje článek z roku 2013 popisující krystalovou strukturu NKp65 s ligandem KACL, ve které je v roztoku NKp65

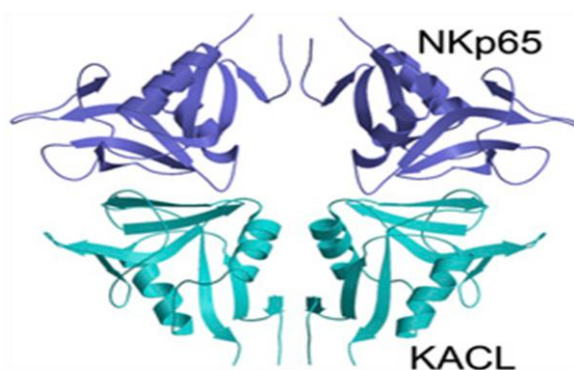


**Obr. č. 9: Rentgenokrystalová struktura myšího Clr-g.**

Podle výsledku lze říci, že tvoří dimer [100].

monomerní, ale na dimerní KACL se vážou dvě monomerní molekuly NKp65 [100].

Jedinými strukturně charakterizovanými molekulami u myši mezi proteiny Nkr-p1 a Clr jsou Nkr-p1a, Nkr-p1c a Clr-g. Také neexistuje žádný model popisující interakci některého proteinu z rodiny Nkr-p1 se svým ligandem. Momentálně existuje jediný model receptor-liganového páru. Homolog lidského Clr, protein KACL (Keratinocyte-Associated C-type Lectin), s aktivačním receptorem příbuzným k rodině Nkr-p1, NKp65 (obr. č. 10, str. 28) [101], [100]. Již v roce 2003 bylo oznámeno vytvoření ko-krytalové struktury Nkr-p1f s Clr-g a Nkr-p1d s Clr-b a přijetí článku redakcí. Do této doby článek nevyšel [68].



**Obr. č. 10: Struktura komplexu NKp65-KACL z rentgenostrukturní analýzy.** Interakce homodimerního proteinu KACL se dvěma monomerními molekulami NKp65 [103].

Nkr-p1f je transmembránový aktivační receptor, který je kódovaný genem v *NKC*. Aminokyselinová sekvence je vypsána na obr. č. 11 (str. 29). Extracelulární část tohoto receptoru obsahuje doménu CTLD, která interaguje s proteinovými molekulami [64]. V transmembránové doméně obsahuje nabitou aminokyselinu arginin, která dovoluje receptoru interagovat s adaptorovou molekulou [94]. Navíc intracelulární část neobsahuje motiv ITIM, ale zahrnuje Lck vazebný motiv, který slouží k vazbě kinasy. Všechny tyto okolnosti potvrzují aktivační funkci receptoru, i když zatím neznáme adaptorovou molekulu. Celý řetězec obsahuje sedm cysteinů, které zřejmě vytváří tři disulfidové vazby a jeden volný cystein se zapojuje do dimerizace molekul.

**MDTSKVHGNV**    **KPFRCPGYKQ**    **ASSPSFSPDA**    **CRCPHWHHLA**    **LKSGCAGLIL**  
**LLLSLIGLSV**    **LVRFLVQKPP**    **IEKCSVAAQE**    **NRTELTGRSA**    **IIECPRYWHP**  
**HWNKCLFVSQ**    **ISRPWAEGRD**    **ACSMEDAILL**    **LIENKEELRF**    **VQNLIKKEQ**  
**LFFIGLKYVQ**    **KEKIWKWIDG**    **SILNPILLRI**    **TGKDKENSCA**    **IISHTEVFSD**  
**SCSSDNHWIC**    **QKTLIHV**

**Obr. č. 11: Aminokyselinová sekvence Nkr-p1f.** Zelená barva označuje intracelulární část, černá barva transmembránovou část a červená extracelulární část. Červená extracelulární doména CTLD je podtržena. Podtržená zelená část představuje Lck vazebný motiv. Modře je označen arginin.

Clr-g je transmembránový ligand pro Nkr-p1f, který je kódovaný genem v *NKC*. V dopadu nových skutečností je nutné položit si otázku, zda je Clr-g ligand nebo receptor. Nedávno byly zjištěny nové funkce tohoto receptor-ligandového páru, k jejichž dostatečnému pochopení by mohla přispět znalost struktury tohoto páru. Ve článku z roku 2005 bylo napsáno [56], že OCILRP2, což je produkt alternativně sestřižené mRNA *Clr-g* kratší o čtyři aminokyseliny v intracelulární doméně, spolu s Nkr-p1f slouží jako kostimulační signál pro buněčnou proliferaci T lymfocytů a produkci IL-2. Minulý rok se zjistilo, že při interakci OCILRP2 s NKR-P1F dochází také k indukci zrání a diferenciaci DC [54]. Clr-g je běžně považován za ligand, ale v případě OCILRP2 má spíše receptorovou funkci, např. při přenosu signálu do T lymfocytu [54], [56]. Aminokyselinová sekvence (obr. č. 12, str. 29) spíše přispívá tomu názoru, že je to ligand, protože neobsahuje ani ITIM motiv, ani nabitou aminokyselinu v intracelulární části pro interakci s adaptorovou molekulou. Clr-g obsahuje šest cysteinů, proto může tvořit maximálně tři disulfidové vazby.

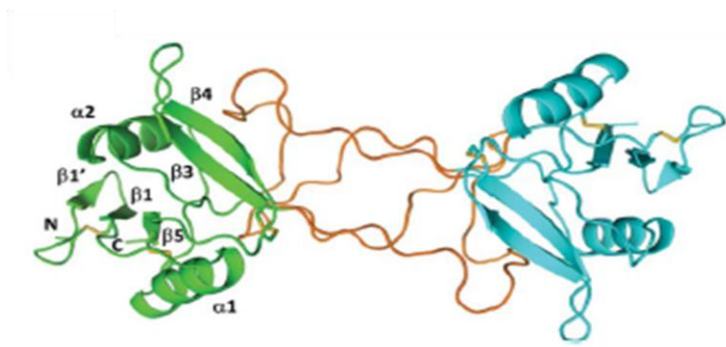
**MPDCLETGEK**    **LFVHNMNAQC**    **VQKPEEGNGP**    **LGTGGKIVQG**    **KCFRIISTVS**  
**PVKLYCCYGV**    **IMVLTVAVIA**    **LSVALSTKKT**    **EQIIINKTYA**    **ACSKNWTGVG**  
**NKCFYFSGYP**    **RNWTFAQ AFC**    **MAQEAQLARF**    **DNEEELIFLK**    **RFKGD FDCWI**  
**GLHRESSEHP**    **WKWTNNTEYN**    **NMNPILGVGR**    **YAYLSSDRIS**    **SSRSYINRMW**  
**ICSKLNNYNL**    **HCQTPPV**

**Obr. č. 12: Aminokyselinová sekvence Clr-g.** Zelená barva označuje intracelulární část, černá barva transmembránovou část a červená extracelulární část. Červená extracelulární doména CTLD podtržena.

### 1.5.1. Všeobecné strukturní znaky

Za pomoci sekvenčního alignmentu byl získán strom sekvenční příbuznosti, na jehož základě byla vytvořena tato kapitola.

Sekvenčně příbuzné molekuly Nkr-p1f (BDCA2 [102], Klrg1 [103], laminarin [104], Nkr-p1a při purifikaci v roztoku [105]) a Clr-g (laminarin [104], Ly49A při purifikaci v roztoku [106], [107]) existují jako monomerní. Zvláštní vlastnost má mezi nimi BDCA2, což je molekula obsahující C-lektinovou doménu vázající sacharidy za přítomnosti vápenatých iontů. Při dopravě tohoto proteinu z Golgiho aparátu na cytoplazmatickou membránu vytváří „domain-swapped“ dimery. V dimerním uspořádání ztrácí schopnost vazby vápenatých iontů a tím i glykan. „Domain-swapped“ dimer (obr. č. 13, str. 30) je vytvořen propojením monomerů skrz prodloužené smyčky [102]. Je zde teoretická možnost toho, že Clr-g nebo Nkr-p1f, nebo oba dva mohou fungovat ve formě monomeru.



Obr. č. 13: BDCA2 tvoří „domainswapped“ dimer pomocí prodloužených smyček [105].

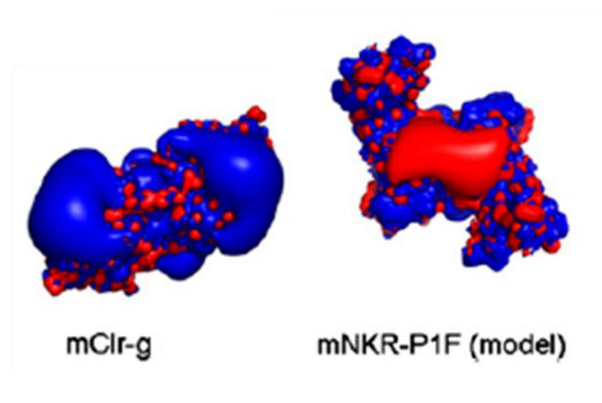
Sekvenčně podobné molekuly, které obsahují C-lektinové domény (DC-SIGN [108], asialoglykoproteinový receptor [109], langerin [110], [111]), tvoří oligomery pomocí opakujících se aminokyselinových sekvencí a díky  $\alpha$ -helikální struktuře krčku. Díky tomuto způsobu vytváří relativně velké oligomery: DC-SIGN homotetramer, asialoglykoproteinový receptor heterotetramer a langerin homotrimer [109], [111], [112]. U DC-SIGN (obr. č. 14, str. 31) je jednotka opakování tvořena přibližně z poloviny hydrofóbními aminokyselinami a jedním prolinem, který způsobuje helikální poruchy v řetězci [112], [113].

Toto uspořádání, ale není u Nkr-p1f a Clr-g příliš pravděpodobné, protože ani jeden z nich neobsahuje C-lektinovou doménu a nevážou vápenaté ionty.



**Obr. č. 14: DC-SIGN tvořící homotetramer pomocí krčku.** Poruchy v helikálních krčku jsou způsobeny prolinem v každé jednotce opakování [115].

Přímo u krystalu homodimeru Clr-g se objevuje zajímavá komplementarita povrchového elektrostatického potenciálu spolu s Nkr-p1f (obr. č. 15, str. 31). Model Nkr-p1f byl vytvořen homologním modelováním podle homodimeru Nkr-p1a. Clr-g má převážně pozitivní povrchový potenciál, kromě negativní centrální kapsy. Nkr-p1f má negativní povrchový potenciál, což usnadňuje vlastní interakci mezi nimi [97], [114].



**Obr. č. 15: Elektrostatický potenciál na povrchu Clr-g a na homologním modelu Nkr-p1f.** Modrá barva značí pozitivní elektrostatický potenciál. Červená barva značí negativní elektrostatický potenciál [97].

Při vazbě ligandu na homodimer lidského NKG2D není příliš velká strukturní, ani nábojová komplementarita. Ke zlepšení náboje může přispívat N-glykosylace NKG2D [115], [116]. N-glykosylace by mohla mít význam při interakci Clr-g a Nkr-P1f. Oba

proteiny mají jedno N-glykosylační místo (Clr-g na 112. aminokyselině, Nkr-p1f na 81. aminokyselině).

Ke vzniku, stabilitě a následně vazbě ligandů je důležitá buď kovalentní vazba v oblasti krčku (Nkr-p1a [78], Clec9a [117], Klrg1 v dimerní formě [103], Ly49A [106]), nebo nekovalentní spojení  $\beta$ -řetězci spolu s hydrofóbní oblastí mezi doménami (NKG2A/CD94 [118], CD69 [119], KACL [82]). Také k tomu přispívá podoba rozhraní mezi jednotlivými doménami (Clec9a). V tomto případě je těžké posoudit, který způsob spojení funguje u Nkr-p1f a Clr-g, pokud jsou dimerní.

Langerin, i když je to C-lektin, dokáže vázat glykoproteiny i bez vápenatých iontů. Je to vysvětleno flexibilitou prodloužených smyček [111]. Clec5, obsahující CTLD, dokáže i bez vápenatých iontů a vazebných míst rozpoznávat virové glykoproteiny. Tento proces není úplně jasný, zřejmě je způsoben konformační změnou homodimeru [120]. Pokud by to platilo i u Nkr-p1f, byl by takto schopen reagovat na virové glykoproteiny.

Pomalu je odhalována důležitost přítomnosti krčku (celé extracelulární části proteinu) při vazbě ligandu na receptor. Uskutečnění vazby ligandu pouze na konstrukt celé extracelulární části bylo pozorováno u Ly49C [106], NKp65 [100] a NKG2A/CD94 [121].

#### **Obecné shrnutí strukturních a vazebných vlastností na závěr:**

- monomerní molekuly
- nutnost přítomnosti struktury krčku pro tvorbu oligomerů
- přítomnost krčku pro správnou interakci s ligandem
- hydrofóbní oblasti zapojené do interakce s ligandem nebo do oligomerizace
- komplementarita povrchů zapojená do vazby ligandu a oligomerizace
- komplementarita povrchových elektrostatických potenciálů zapojená do interakce s ligandy
- N-glykosylace pro interakci s ligandy
- vazba glykoproteinů



## 2 CÍLE PRÁCE

- Příprava DNA konstruktů kódujícího celou extracelulární část proteinu Nkr-p1f
- Produkce celých extracelulárních částí proteinů Nkr-p1f a Clr-g v prokaryotickém expresním systému
  - nalezení vhodných podmínek produkce
  - provést *in vitro* renaturaci
  - purifikovat renaturované proteiny
  - potvrdit identitu proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie
- Charakterizace struktury obou proteinů pomocí technik hmotnostní spektrometrie (zapojení disulfidových můstků)
- Studium interakce celých extracelulárních částí Nkr-p1f spolu s ligandem Clr-g
  - biofyzikální technikou SPR

## 3 MATERIÁL

### 3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy AL 54	Mettler Toledo, USA
Automatické pipety	Gilson, USA
Biologický termostat BT 120M (37°C)	Lab. přístroje Praha
Celulosová membrána (MWCO 10 kDa)	Sigma-Aldrich, USA
Centrifuga Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Spectrafuge 16M	National Labnet Co., USA
Centrifuga VSMC-13	Shelton scientific, USA
Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra	Millipore, USA
Dialyzační trubice Spektra/Por	Spektrum Laboratories, USA
Eppendorfovy zkumavky (V = 1,5 ml a V = 0,5 ml)	Trefflab, Švýcarsko
Filtr na plastovou injekční stříkačku 22	TPP, Švýcarsko
Hmotnostní spektrometr FT-ICR Solarix XR™	Bruker, Německo
HPLC systém BioSys 510	Beckman Coulter, USA
HPLC systém NGC Quest™ 10 Chromatography System	Bio-Rad, USA
Chladnička	Zanussi, Itálie
Kahan	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Kolona ENrich™ SEC 70 10×300	Bio-Rad, USA
Kolona Peptid MicroTrap™	Michrom, USA
Kolona Protein MicroTrap™	Michrom, USA
Kolona PLRP-S BioHPLC 7,5×300	Agilent, USA
Kolona Superdex 75 HR 10/300	GE Healthcare, Německo
Kolona plnitelné: NiNTA a ionex	GE Healthcare, Německo
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Magnetická míchačka Stuart CB161	Keison, UK
Monochromátorová čtečka destiček Safire <sup>2</sup>	Tecan, Švýcarsko

Mrazicí box	Elektrolux, Švédsko
Mrazicí box (-80 °C) Bio Freezer	Forma scientific, USA
Napájecí zdroj EPS 500/400	Pharmacia, USA
Napájecí zdroj MP-250V	Cleaver Scientific, UK
pH metr Φ 200	Beckman, USA
Ploténkový vaříč	Sencor, Japonsko
ProteON XPR36	Bio-rad, USA
ProteON Sensor Chip	Bio-rad, USA
Předvážky HF-1200G	AND, USA
Souprava pro agarosovou elektroforézu	Sigma, USA
Souprava pro SDS-PAGE elektroforézu	Bio-Rad, Německo
Souprava pro ultrafiltraci	Sigma-Aldrich, USA
Spektrofotometr DeNovix DS-11	DeNovix, USA
Spektrofotometr DU-70	Beckman, USA
Termocyklér Mastercycler personal	Eppendorf, Německo
Třepačka VSR	Grant Boekel, UK
Třepačka na Erlenmeyerovy baňky	Sanyo Gallenkamp Ltd., UK
Třepačka na zkumavky BigGer Bill	Thermolyne, USA
Třepačka na zkumavky thermomixer comfort	Eppendorf, Německo
Ultrafiltrační membrána	Millipore, USA
Ultrazvuková lázeň	KRAINTEK, Slovensko
Ultrazvuková lázeň Sonorex	Bandelin, Německo
Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710	Cole-Parmer instrum. Co., USA
UV transiluminátor	Uvitec, UK
Vakuová odparka SpeedVac	Jouan, Francie
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA

### 3.2 Chemikálie

Acetonitril (AcN)	Merck, Německo
-------------------	----------------

Agar	Oxoid, USA
Agarosa	Serva, Německo
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Jersey Lab Supply, USA
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Bacto-trypton	Oxoid, USA
Bacto-yeast extrakt	Oxoid, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
BSA	Sigma-Aldrich, USA
Cystamin	Sigma-Aldrich, USA
Cysteamin	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Německo
Činidlo pro stanovení dle Bradfordové	Bio-Rad, USA
Dihydrogenfosforečnan sodný	Lachema, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, ČR
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, USA
DNA marker 100 bp, 1 kb	New England Biolabs, USA
dNTPs	Promega, USA
Dodecylsírán sodný	Jersey Lab Supply, USA
Dusičnan stříbrný	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Lachema, ČR
Ethidium bromid (EtBr)	Sigma-Aldrich, USA
Ethylendiamintetraacetát (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Ethylmorfolin	Sigma-Aldrich, USA
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, USA
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid, Taiwan
Glycerol	Lachema, ČR
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Guanidin-HCl	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, USA

High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, Taiwan
Hydrogenfosforečnan sodný	Lachema, ČR
Chlorid hořečnatý	Lachema, ČR
Chlorid manganatý	Lach-ner, ČR
Chlorid rubidný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid sodný	Lachema, ČR
Chlorid vápenatý	Lach-ner, ČR
Imidazol	Sigma-Aldrich, USA
IPTG	Sigma-Aldrich, USA
Isopropanol	Lachema, ČR
Jodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich, USA
Kanamycin (Kan)	Jersey Lab Supply, USA
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Kyselina mravenčí pro LC-MS	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina trifluoroctová (TFA)	Sigma-Aldrich, USA
L-arginin	Serva, Německo
Leupeptin	Sigma-Aldrich, USA
Markery pro SDS-PAGE	
Prestained Protein Marker 7-175 kDa	New England Biolabs, USA
Prestained Protein Marker 20-120 kDa	Thermo Fisher Scientific, USA
Unstained Protein Makrer 14,4-116 kDa	Thermo Fisher Scientific, USA
Maxiprep Plasmid Kit	Geneaid, Taiwan
Methanol	Merck, Německo
Močovina	Serva, Německo
MOPS	Sigma-Aldrich, USA
N,N'-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Octan draselný	Sigma-Aldrich, USA
Peroxodisíran amonný	Sigma-Aldrich, USA

fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, USA
Q-Sepharosa	Sigma-Aldrich, USA
Redukovaný glutathion	Sigma-Aldrich, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
Sodiumdodecylsulfát (SDS)	Jersey Lab Supply, USA
SP Sepharosa	Sigma-Aldrich, USA
TEMED	Serva, Německo
Tetracyklin	Jersey Lab Supply, USA
Tris-HCl	Jersey Lab Supply, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypton	Oxoid, USA
Uhličitan draselný/sodný	Sigma-Aldrich, USA
Voda (LC/MS grade)	Merck, Německo
X-gal	Life Technologies, USA
$\alpha$ -kyanoskořicová kyselina	Sigma-Aldrich, USA
$\beta$ -merkapt ethanol	Sigma-Aldrich, USA

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

### 3.3 Enzymy

Deep Vent™ DNA Polymerasa	New England Biolabs, USA
DNAsa I (deoxyribonukleasa I)	Sigma-Aldrich, USA
<i>HindIII</i> endonukleasa	New England Biolabs, USA
<i>KpnI</i> endonukleasa	Amersham Life Science, USA
<i>NdeI</i> endonukleasa	New England Biolabs, USA
RNAsa I (ribonukleasa I)	Sigma-Aldrich, USA
<i>SacI</i> endonukleasa	New England Biolabs, USA
<i>SmaI</i> endonukleasa	New England Biolabs, USA
T4 DNA ligasa	Fermentas, USA
Trypsin	Promega, USA
<i>XbaI</i> endonukleasa	New England Biolabs, USA

### 3.4 Vektory

pBluescript SK (+) [pBSSK(+)]	Novagen, USA
pET-28b(+)	Novagen, USA
pET-30a(+)	Novagen, USA
NKRP1F-pcDNA3.1(+)	Shanghai Generay Biotech, Čína

### 3.5 Primery pro PCR

Nkr-p1f FW (celá extracelulární část NKR-P1F)	Generi Biotech, ČR
5'-CGC CAT ATG CAA AAA CCA CCA ATA GAA AAA TG-3'	
Nkr-p1f REV (celá extracelulární část NKR-P1F)	Generi Biotech, ČR
5'-GCA AGC TTT CAG ACA TGT ATC AGG GTC-3'	

### 3.6 Bakteriální kmeny *E. coli*

**BL21-Gold (DE3)** *E. coli* B F- *ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)*dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal* λ(DE3) *endA* Hte  
Stratagene, USA

**NovaBlue** *endA1 hsdR17*(r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*  
F'[*proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup>*ZΔM15::Tn10*] (Tet<sup>R</sup>)  
Novagen, USA

### 3.7 Roztoky a pufrы

**Směs akrylamidu pro přípravu SDS-PAGE gelů:** 29 % akrylamid, 1 %  
N,N'-methylen-bis-akrylamid

**Barvicí roztok pro SDS-PAGE gely:** 0,25 % CBB R-250, 45 % methanol, 10% kyselina  
octová

**Činidlo dle Bradfordové:** komerčně dostupné od firmy Bio-Rad, USA

**Dialyzační pufr Clr-g, roztok 1:** 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>,  
pH 8,0

**Dialyzační pufr Clr-g, roztok 2:** 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>,  
pH 5,7

**Dialyzační pufr Nkr-p1f:** 10 mM Tris-HCl, 29 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0

**Elektrodotový pufr pro SDS-PAGE:** 10 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3

**Ethylmorfolinový pufr:** 100 mM ethylmorfolin, pH 8,4

**Fosfátový pufr pro SPR:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 150 mM NaCl, pH 7,5

**Guanidinový pufr pro solubilizaci inkluzních tělísek:** 50 mM Tris-HCl, 6 M guanidin-HCl, 100 mM DTT, pH 8,0

**Chromatografický pufr A pro afinitní chromatografii Nkr-p1f:** 10 mM Tris-HCl, 29 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0

**Chromatografický pufr B pro afinitní chromatografii Nkr-p1f:** 10 mM Tris-HCl, 0,5 M imidazol, 29 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0

**Chromatografický pufr A pro chromatografii proteinu Clr-g na reverzní fázi:** 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 5,7

**Chromatografický pufr B pro chromatografii proteinu Clr-g na reverzní fázi:** 98 % acetonitril, 0,07 % TFA

**Chromatografický pufr pro gelovou permeační chromatografii Clr-g:** 10 mM Tris-HCl, 29 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 8,0

**Chromatografický pufr pro gelovou permeační chromatografii Nkr-p1f:** 10 mM Tris-HCl, 29 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0

**Ligační pufr pro T4 DNA ligasu:** komerčně dostupný od firmy Fermentas, USA

**NEB1 pufr:** komerčně dostupný od firmy New England Biolabs, USA

**NEB2 pufr:** komerčně dostupný od firmy New England Biolabs, USA

**NEB4 pufr:** komerčně dostupný od firmy New England Biolabs, USA

**Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely:** 35 % ethanol, 10 % kyselina octová

**PCR pufr pro Deep Vent DNA polymerázu:** komerčně dostupný od New England Biolabs, USA

**Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM β-merkptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

**Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek:** 0,5 % Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM β-merkptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

**Renaturační pufr pro protein Clr-g:** 20 mM Tris-HCl, 0,4M Arginin, 3 mM cystamin, 9 mM cysteamin, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 8,0

**Renaturační pufr pro protein Nkr-p1f:** 20 mM Tris-HCl, 0,4M Arginin, 3 mM cystamin, 9 mM cysteamin, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9,0



**Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 25 % sacharosa, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

**Sacharosový lyzační pufr pro snadnou izolaci plazmidové DNA:** 8 % sacharosa, 50 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, 1 mg/ml lysozym, pH 8,0

**Sprejovací pufr:** 50 % MeOH

**TAE pufr:** 2 M Tris-HCl, 1 M kyselina octová, 50 mM EDTA, pH 8,0

**TFB I pufr:** 0,03 M CH<sub>3</sub>COOK, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % glycerol

**TFB II pufr:** 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % glycerol

**Vzorkový pufr pro DNA elektroforézu:** Gel Loading Dye Blue (6×), komerčně dostupné od firmy New England Biolabs, USA

**2x Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující:** 100 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0,2 % bromfenolová modř, 20 % glycerol, 200 mM dithiothreitol, pH 6,8

**2x Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující:** 100 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0,2 % bromfenolová modř, 20 % glycerol, pH 6,8

### 3.8 Média

**LB agar:** 1,5 % agar v LB médiu

**LB médium:** 1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH 7,4

## 4 METODY

### 4.1 Příprava produkčních vektorů pro celou extracelulární část Nkr-p1f

#### 4.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Z Číny od firmy Shanghai Generay Biotech byl zakoupen vektor NKRP1F-pcDNA3.1(+) obsahující celý gen NKR-P1F. Ke 4  $\mu\text{g}$  tohoto plazmidu bylo přidáno 8  $\mu\text{l}$  čisté destilované vody do celkové koncentrace 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . DNA konstrukt pro celou extracelulární část Nkr-p1f byl připraven pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se specifickými primery. Tyto primery obsahovaly místa pro restrikční endonukleasy *NdeI* a *HindIII*.

Všechny komponenty PCR (podle tab. č. 2, str. 42) byly přidány do mikrozkušavky umístěné na ledu. Pro dokonalé promíchání byla směs stočena 4 min při 10 000 $\times$ g a vložena do termocykléru nastaveném na metodu podle tab. č. 3, str. 42.

Tab. č. 2: Složení PCR reakční směsi.

Složka	V/ $\mu\text{l}$
Deep Vent DNA polymerasa	0,4
100 mM MgSO <sub>4</sub>	1,5
Pufr pro DNA polymerasu	5
10 mM dNTP	2
5 $\mu\text{M}$ RV primer	5
5 $\mu\text{M}$ FW extracelular primer	5
0,5 ng/ $\mu\text{l}$ templátová DNA	2
ddH <sub>2</sub> O	29

Tab. č. 3: Metoda PCR reakce.

Fáze	T/ $^{\circ}\text{C}$	Doba trvání t	Počet cyklů
1	95	2 min	1
2	95	30 s	35
	45	30 s	
	72	1 min	
3	72	10 min	1

Ověření délky DNA získané pomocí PCR reakce bylo provedeno elektroforézou v 1% agarosovém gelu (kap. 4.1.2).

#### 4.1.2 Elektroforéza v agarosovém gelu

DNA migruje agarosovým gelem k anodě na základě záporně nabitě kostry DNA. Koncentrace agarosového gelu je vybírána vzhledem k velikosti dělených fragmentů.

Fragmenty jsou vizualizovány pomocí ethidium bromidu, který se začleňuje do struktury DNA a ultrafialovým světlem je zviditelňován. Správná velikost je odhadována pomocí standardu DNA a pomocí programu GelAnalyzer.

Bylo připravováno 12  $\mu\text{l}$  vzorků, ze kterých se 9  $\mu\text{l}$  nanášelo na agarosový gel. K 10  $\mu\text{l}$  vzorku DNA se přidávaly 2  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru (Gel Loading Dye 6 $\times$  koncentrovaný). Pro odhad velikosti fragmentů se na agarosový gel přidávaly 2  $\mu\text{l}$  DNA standardu (100 bp DNA Ladder 500  $\mu\text{g/ml}$ ).

Pro identifikaci fragmentů byl připraven 1% agarosový gel, kdy bylo k 0,60 g agarosy přidáno 60 ml 1 $\times$ TAE pufru. Agarosa se v TAE pufru rozpouští zahříváním. Po úplném rozpuštění agarosy a jejím následném zchladnutí bylo přidáno 2,5  $\mu\text{l}$  roztoku ethidia bromidu o koncentraci 10 mg/ml, směs byla důkladně promíchána a nalita do připravené formy. Pro vytvoření jamek byl do ní umístěn hřeben. Po zatuhnutí, které se pozná změnou barvy, byl hřeben vyjmut a gel přenesen do elektroforetické vany naplněné 1 $\times$ TAE puforem. Elektroforéza probíhala při 10 V/cm.

#### 4.1.3 Ligace namnoženého úseku DNA do vektoru pBSSK(+)

Při amplifikaci úseku DNA byla použita Deep Vent DNA polymerasa, která vytváří tupé konce. Proto při linearizování vektoru pBSSK(+) pro ligaci byla použita restriční endonukleasa tvořící tupé konce, *SmaI*.

Podle tab. č. 4 (str. 43) byla vytvořena ligační směs, která byla ponechána přes noc při laboratorní teplotě.

Tab. č. 4: Složení ligační směsi při ligaci inzertu do vektoru pBSSK(+).

Složka	V/ $\mu\text{l}$
Vektor pBSSK(+) (c= 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1
Inzert= PCR produkt	25
<i>SmaI</i>	0,3
NEB4 pufr	2,5
20 mM ATP	1,5
T4 DNA ligasa (1 Weiss Unit/ $\mu\text{l}$ )	0,5

#### 4.1.4 Bakteriální transformace klonovacích buněk

V tomto případě byla využita technika „Blue-white screening“, která rozeznává mezi buňkami transformovanými vektory s rekombinantní DNA (bílé kolonie) a buňkami transformovanými samotnými vektory (modré kolonie). Tyto buňky musí růst na médiu s chemickou látkou X-gal. Klonovací buňky NovaBlue byly transformovány ligační směsí metodou tepelného šoku.

K 5  $\mu$ l plazmidové DNA o koncentraci přibližně 40 ng/ $\mu$ l bylo přidáno 100  $\mu$ l rozmražené suspenze buněk NovaBlue a inkubováno 20 min na ledu. Poté byl s buňkami proveden tepelný šok, který spočíval ve vystavení buněk teplotě 42°C na 50 s. Následovala inkubace buněk 1 min na ledu a přidání 1 ml sterilního LB média bez antibiotik. Nakonec směs byla inkubována jednu hodinu při 37°C.

Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při 1800 $\times$ g při laboratorní teplotě na stolní minicentrifuze. Osmset  $\mu$ l supernatantu bylo odebráno a v jeho zbytku byla peleta resuspendována a asepticky nanesena na Petriho misku s LB agarem s ampicilinem o finální koncentraci 150  $\mu$ g/ml. Před vlastním nanesením bylo do LB agaru vetřeno 100  $\mu$ l roztoku X-gal o koncentraci 20 mg/ml a 100  $\mu$ l 10 mM IPTG.

Petriho miska byla inkubována přes noc při 37°C.

#### 4.1.5 Izolace plazmidové DNA a její restrikce k ověření ligace

Osmi bakteriálními koloniemi bylo zaočkováno osm skleněných zkumavek obsahujících 1 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 150  $\mu$ g/ml, které byly následně ponechány přes noc třepat při 220 otáčkách/min a teplotě 37°C.

Bakterie narostly pouze v šesti zkumavkách, proto bylo pracováno pouze s těmito šesti. Jejich obsah byl přenesen do odpovídajících mikrozkušavek, které byly následně centrifugovány 10 min při 2 000 $\times$ g. Pro snadnou izolaci plazmidové DNA byly pelety po odebrání supernatantu resuspendovány ve 30  $\mu$ l ledového sacharosového pufru, inkubovány 10 min na ledu a následně 2-3 min povařeny. Poté byl obsah mikrozkušavek centrifugován 1 min při 4 500 $\times$ g a se supernatantem byla provedena restrikce restrikčními endonukleasami *HindIII*, *KpnI* a *SacI*. Složení dvou restrikčních směsí pro 6 vzorků je uvedeno v tab. č. 5 a 6 (str. 45).

Tyto restriční směsi byly inkubovány 1 hod při 37°C.

Tab. č. 5: Složení první restriční směsi pro 6 získaných vzorků plazmidové DNA. Štěpení endonukleasou *HindIII*.

Složka	V/ $\mu$ l
Plazmid pBSSK(+) s Nkr-p1f	9
NEB2 pufr	1
<i>HindIII</i>	0,3

Tab. č. 6: Složení druhé restriční směsi pro 6 získaných vzorků plazmidové DNA. Štěpení endonukleasou *KpnI* a *SacI*.

Složka	V/ $\mu$ l
Plazmid pBSSK(+) s Nkr-p1f	9
NEB1 pufr	1
<i>KpnI</i>	0,3
<i>SacI</i>	0,3
BSA (10 mg/ml, 100× koncentrovaný)	1

Po restrikci byla správnost ligace ověřena elektroforézou v agarosovém gelu (podle kap. 4.1.2), ale v koncentrovanějším gelu (1,5% gelu).

#### 4.1.6 Opakování postupu s plazmidy pET-28b(+) a pET-30a(+)

Nejprve byla provedena izolace plazmidové DNA z většího objemu. 50 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 150  $\mu$ g/ml bylo inokulováno 50  $\mu$ l buněčné kultury č. 3. Tato kultura byla inkubována přes noc při 37°C za třepání 220 ot./min. Následně byla provedena izolace plazmidové DNA pomocí kitu „High speed plasmid mini kit protocol“. Měřením absorbance byla přibližně určena koncentrace plazmidové DNA na 100  $\mu$ g/ml (30  $\mu$ g).

Dále byla provedena restrikce plazmidové DNA (plazmid pBSSK(+) s inzertem pro celou extracelulární část Nkr-p1f) a plazmidů pET-28b(+), pET-30a(+) restričními endonukleasami *NdeI*, *HindIII*. Složení dvou restričních směsí pro jeden vzorek je uvedeno v tab. č. 7 a 8 (str. 46). Tyto restriční směsi (celkem tři) byly inkubovány 1 hod při 37°C.

Po restrikci byly vzorky vizualizovány elektroforézou v agarosovém gelu (podle kap. 4.1.2), ale v koncentrovanějším 1,5% gelu. Gel nebyl ofocen, ale rovnou použit k izolaci fragmentů z agarosového gelu pomocí „Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit“. Tyto fragmenty odpovídaly genu kódujícímu celou extracelulární část Nkr-p1f, rozštěpeným plazmidům pET-28b(+) a pET-30a(+).

**Tab. č. 7: Složení první restrikční směsi pro  
původní vzorek plazmidové DNA.**

Štěpení endonukleasou *HindIII* a *NdeI*.

Složka	V/ $\mu$ l
Plazmid pBSSK(+) s Nkr-p1f	22,5
NEB2 pufr	2,5
<i>HindIII</i>	0,3
<i>NdeI</i>	0,3

**Tab. č. 8: Složení druhé a třetí restrikční směsi lišící se typem  
plazmidů. Štěpení endonukleasou *HindIII***

a *NdeI*.

Složka	V/ $\mu$ l
Plazmid pET-28b(+)/pET-30a(+)	1
NEB2 pufr	1
<i>HindIII</i>	0,3
<i>NdeI</i>	0,3
dH <sub>2</sub> O	8

Jak plazmidy pET-28b(+) a pET-30a(+), tak úsek DNA, byly štěpeny stejnými restrikčními endonukleasami kvůli následné ligaci. Podle tab. č. 9 (str. 46) byly vytvořeny dvě ligační směsi, která byly ponechány přes noc při laboratorní teplotě. Vektor pET-28b(+) s vloženou sekvencí pro celou extracelulární část receptoru Nkr-p1f byl nazýván pNkr-p1fhis a vektor pET-30a(+) s vloženou sekvencí pro celou extracelulární část receptoru Nkr-p1f pNkr-p1f.

**Tab. č. 9: Složení dvou ligačních směsí při ligaci inzertu  
do vektorů pET-28b(+) a pET-30a(+).**

Složka	V/ $\mu$ l
Plazmid pET-28b(+)/pET-30a(+)	30
Inzert	15
T4 ligační pufr	5
T4 DNA ligasa (1 Weiss Unit/ $\mu$ l)	1

Následně byla provedena bakteriální transformace klonovacích buněk Nova Blue ligačními směsmi podle kap. 4.1.4. V tomto případě nebyl použit „Blue-white screening“ a místo antibiotika ampicilinu se používal kanamycin (do výsledné koncentrace 50  $\mu$ g/ml) a tetracyklin (do výsledné koncentrace 12,5  $\mu$ g/ml). Další den bylo inokulováno 6 kolonií z LB agarové misky s koloniemi bakterií transformovaných plazmidy pNkr-p1fhis do 6 skleněných zkumavek s LB médiem s antibiotiky kanamycinem (do výsledné koncentrace 50  $\mu$ g/ml) a tetracyklinem (do výsledné koncentrace 12,5  $\mu$ g/ml). Stejný postup byl

proveden i pro LB agarové misky s koloniemi bakterií transformovanými plazmidy pNkr-p1f. Celkem 12 skleněných zkumavek s buněčnými suspenzemi bylo inkubováno do druhého dne při 37°C a třepání 220 ot./min.

Z těchto dvanácti bakteriálních suspenzí byla izolována plazmidová DNA a následně štěpena restričními endonukleasami *XbaI* a *HindIII* pro ověření správnosti ligace podle kap. 4.1.5. Lišily se pouze složením restričních směsí. Ty měly složení podle tab. č. 10 (str. 47).

Tab. č. 10: Složení dvou restričních směsí pro pNkr-p1fhis/pNkr-p1f.

Složka	V/ $\mu$ l
Plazmidová DNA pNkr-p1fhis/pNkr-p1f	9
NEB2 pufr	1
<i>XbaI</i>	0,3
<i>HindIII</i>	0,3
BSA (10 mg/ml, 100× koncentrovaný)	0,3

Po restrikci byla správnost ligace ověřena elektroforézou v agarosovém gelu (podle kap. 4.1.2), ale v koncentrovanějším 1,5% gelu.

#### 4.1.7 Měření koncentrace plazmidové DNA izolované z většího objemu

Pomocí výsledků restriční analýzy byly vybrány vzorky pro velkoobjemovou produkci.

Do skleněných zkumavek daných vzorků se zbytky buněčné suspenze byl přidán 1 ml LB média s antibiotiky kanamycinem (do výsledné koncentrace 50  $\mu$ g/ml) a tetracyklinem (do výsledné koncentrace 12,5  $\mu$ g/ml). Dvě 100ml LB média se stejnými antibiotiky byla inokulována 500  $\mu$ l z obou vzorků buněčných suspenzí. Nakonec byly ponechány přes noc třepat při 220 ot./min a teplotě 37°C.

Obě plazmidové DNA byly izolovány za pomoci soupravy „Maxiprep Plasmid Kit“ a jejich koncentrace byla změřena na přístroji DeNovix DS-11. Správnost připravených plazmidů byla ověřena sekvenací, na kterou bylo odebráno 5  $\mu$ l z každého vzorku.

## 4.2 Rekombinantní exprese proteinů Clr-g a Nkr-p1f

Bakteriální expresní systém je v praxi nejběžnější systém pro expresi rekombinantních proteinů. Tento způsob má několik výhod: jednoduchost, vyšší výtěžek, finanční a časová nenáročnost. Systém neumožňuje posttranslační modifikace a je možné exprimovat proteiny přibližně do 150 kDa.

Exprese cílového genu, kódovaného vektorem (např. pNkr-p1fhis, pNkr-p1f, pClr-g), je spuštěna vazbou T7 RNA polymerasy na T7 promotor. Tato T7 DNA polymerasa je kódována v genomu produkčních buněk (u BL21-Gold (DE3)) a její exprese je regulována *lac* operonem. V nepřítomnosti induktoru je transkripce zastavena vazbou *lac* represoru na *lac* operon. Jako induktor transkripce T7 RNA polymerasy slouží analog laktosy, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), vázající se na *lac* operon místo represoru. IPTG je používán z toho důvodu, že je narušitel od laktosy nemetabolizovatelný a jeho hladina nemusí být dále sledována a doplňována.

### 4.2.1 Příprava kompetentních produkčních buněk

Do 10 ml LB média s kanamycinem o výsledné koncentraci 50  $\mu$ g/ml a tetracyklinem o výsledné koncentraci 12,5  $\mu$ g/ml bylo přidáno 100  $\mu$ l suspenze bakteriálních buněk. Toto LB médium bylo inkubováno do druhého dne při 37°C a 220 otáčkách/min.

Následný den bylo z noční kultury odebráno 1,5 ml a tímto množstvím bylo inokulováno 100 ml LB média s antibiotiky kanamycinem a tetracyklinem. Při inokulaci bylo nutné zachovávat tento poměr. Kultura byla opět inkubována při 37°C a 220 otáčkách/min. Při OD=0,8 ( $\lambda=600$  nm) byla převedena do předem vychlazených sterilních centrifugačních kyvet a centrifugována 15 min při 3 000 $\times$ g a 4°C. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v 15 ml TFB I pufru a ponechána inkubovat 20 min na ledu. Poté byla suspenze odstředěna 15 min při 3 000 $\times$ g a 4°C. Resuspendace takto získané pelety proběhla pomocí 4 ml pufru TFB II. Připravená suspenze byla rozdělena po 100  $\mu$ l do označených sterilních vychlazených mikrozkuvek. Kompetentní buňky byly postupně zamrazovány, nejprve 2 hod při -20°C a poté až do použití při -80°C.

### 4.2.2 Bakteriální transformace produkčních buněk

Transformace produkčních kompetentních buněk kmene *E. coli* BL21-Gold (DE3) pomocí vektorů z tab. č. 11 (str. 49) byla provedena metodou tepelného šoku, která je popsána



v kapitole 4.1.4. Nebyla potřeba již provádět „Blue-white screening“. Jako antibiotika při transformaci a následné produkci byly použity kanamycin do koncentrace 50 µg/ml a tetracyklin do koncentrace 12,5 µg/ml.

Tři 100µl rozmražené bakteriální suspenze byly transformovány 0,5 µl 1,3 µg/µl pClr-g, 3 µl 0,2 µg/µl pNkr-p1fhis a 3 µl 0,13 µg/µl pNkr-p1f. Současně byla provedena negativní kontrola netransformovanými kompetentními buňkami.

Tab. č. 11: Plazmidové DNA použité pro transformaci buněk kmene *E. coli* BL21-Gold (DE3).

Zkratka	Vektor	Sekvence DNA	V/µl
pNkr-p1fhis	pET-28b(+)	Celá extracelulární část Nkr-p1f	3
pNkr-p1f	pET-30a(+)	Celá extracelulární část Nkr-p1f	3
pClr-g		Celá extracelulární část Clr-g	0,5

### 4.2.3 Testování exprese

Nejprve byla testována exprese požadovaných proteinů produkčními buňkami, což současně posloužilo k vybrání produkčního klonu pro velkoobjemovou expresi. K testování exprese byly vybrány čtyři nezávislé bakteriální kolonie pro každý protein získané bakteriální transformací. Těmito koloniemi byly vždy zvlášť inokulovány 2 ml LB média se stejnými antibiotiky o stejných koncentracích jako v kapitole 4.3.1. Celkem 12 zkumavek bylo uzavřeno a ponecháno růst přes noc při 37°C a 220 ot./min.

Druhý den byl připraven dvojnásobný počet sterilních zkumavek s 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky. Pokaždé dvě zkumavky s LB médiem byly zaočkovány 1 % objemu (10 µl) z jedné noční bakteriální kultury. Tyto kultury byly inkubovány při 220 ot./min a 37°C po dobu tří hodin, načež byla vždy jedna kultura ze dvou zkumavek indukována IPTG do koncentrace 1 mM a dále inkubována za stejných podmínek po dobu dalších tří hodin.

Poté byly kultury přeneseny do mikrozumavek a centrifugovány 5 minut při 3 000×g a laboratorní teplotě. Po odebrání supernatantu byly pelety resuspendovány v 50 µl 1× vzorkového redukujícího pufru, 5 minut povařeny a centrifugovány za stejných podmínek. Tyto vzorky byly následně analyzovány pomocí SDS elektroforézy.

#### 4.2.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

SDS-PAGE je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který protein obaluje a udílí mu záporný náboj. Proteiny jsou separovány na základě elektroforetické pohyblivosti závislé na délce řetězce, molekulové hmotnosti, denaturaci proteinu a posttranslačních modifikacích.

Tato SDS elektroforéza byla prováděna v 15% polyakrylamidovém dělicím gelu vzhledem k velikosti obou proteinů. Složení zaostřovacího a dělicího gelu je uvedeno v tab. č. 12 (str. 50). SDS elektroforéza byla v této práci prováděna pro kontrolu velikosti a čistoty proteinů během produkce, renaturace a purifikace.

Tab. č. 12: Složení 5% zaostřovacího a 15% dělicího polyakrylamidového gelu. Složení pro jeden gel.

Složka	5% zaostřovací gel V/ml	15% dělicí gel V/ml
H <sub>2</sub> O	0,68	1,1
30 % akrylamidová směs	0,17	2,5
1,5 M Tris-HCl o pH 8,8	-	1,3
1 M Tris-HCl o pH 6,8	0,13	-
10 % SDS	0,01	0,05
10 % APS	0,01	0,05
TEMED	0,001	0,002

Nejprve byla připravena aparatura pro nalití gelů. Mezi skla byl nalit 15% dělicí gel a převrstven destilovanou vodou, aby mohlo dojít k polymeraci bez přístupu vzduchu. Po zatuhnutí dělicího gelu byla voda odstraněna, skla jemně osušena filtračním papírem a na spodní vrstvu byl nalit zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřeben. Po zatuhnutí gelu, kdy bylo vidět rozhraní mezi dělicím a zaostřovacím gelem, byl hřeben vyjmut a vložen do sestavené elektroforetické aparatury s elektrodoým pufrem. Následně byly nanášeny vzorky a proteinový standard molekulových hmotností. Napětí pro elektroforézu bylo nastaveno na 200 V, proud 15 mA pro zaputování vzorků do gelu

a 25 mA pro vlastní průběh elektroforézy na jeden gel. Když čelo elektroforézy doputovalo ke konci gelu, byla elektroforéza ukončena.

Poté byly gely 15 minut barveny barvicím roztokem a následně odbarvovány odbarvovacím roztokem potřebnou dobu. Pokud i při dodržení tohoto postupu nebyl vidět žádný výsledek, bylo uskutečněno jiné barvení, barvení stříbrem (podle tab. č. 13, str. 51).

**Tab. č. 13: Postup barvení gelů stříbrem.**

Krok	Doba	Složení roztoku
1	3×30 min	Odbarvovací roztok 30 % ethanol; 10 % CH <sub>3</sub> COOH
2	10 min	20 % ethanol
3	10 min	H <sub>2</sub> O
4	1 min	0,2 g/l Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
5	2×20 s	H <sub>2</sub> O
6	30 min	2 g/l AgNO <sub>3</sub>
7	10 s	H <sub>2</sub> O
8	2-4 min	0,7 ml/l formaldehyd; 30 g/l K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 10 mg/l Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
9	1 min	50 g/l Tris-HCl; 25 % CH <sub>3</sub> COOH
10	-	Uchovávací roztok 1 % CH <sub>3</sub> COOH

Příprava vzorků byla rozdílná v závislosti na skupenství vzorku (pevný vzorek nebo kapalný) a na prostředí elektroforézy (redukující a neredukující prostředí). Obecně byly nejprve vzorky 5 minut povařeny a centrifugovány 5 minut při 5 000×g. Pevné vzorky byly resuspendovány v 1× koncentrovaném vzorkovém pufru (v případě redukujícího prostředí se 100 mM DTT) pro SDS elektroforézu. Ke kapalným vzorkům bylo přidáváno stejné množství 2× koncentrovaného vzorkového pufru (v případě redukujícího prostředí s 200 mM DTT). Do jamky bylo nanášeno maximálně 20-30 µl.

#### **4.2.4.1 SDS elektroforéza pro analýzu disulfidových vazeb**

Toto bylo připraveno pro identifikaci disulfidových vazeb, proto aby nedošlo k jejich narušení během separace v polyakrylamidovém gelu, probíhala SDS elektroforéza stejně jako v kap. 4.2.4, ale za neredukujících podmínek.

To znamenalo přidavek roztoku cystaminu (organický disulfid) do jednotlivých složek SDS elektroforézy. Do neredukujícího vzorkového pufru, zaostřovacího a separačního gelu byl přidán roztok cystaminu do 300  $\mu\text{M}$  koncentrace. Do elektrodového pufru byl přidán roztok cystaminu do 100  $\mu\text{M}$  koncentrace.

#### **4.2.5 Hledání vhodných podmínek produkce Nkr-p1f**

K nalezení nejvhodnějších podmínek pro produkci proteinu Nkr-p1f bylo provedeno testování koncentrace induktoru IPTG, teploty a doby exprese. U proteinu Clr-g byl již předpřipraven přibližný postup produkce, proto u tohoto proteinu optimální podmínky nebyly hledány.

Podle výsledků z testování exprese byl vybrán vzorek pro hledání produkčních podmínek. Z původního vzorku byla připravena noční stacionární kultura, ze které bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  do 1 ml LB média bez antibiotik. Po třech hodinách inkubace při 220 ot./min a 37°C byla tato bakteriální suspenze rozpipetována po 10  $\mu\text{l}$  do 16 skleněných zkumavek obsahujících 1 ml LB média se stejnými antibiotiky do výše udané koncentrace.

Po totožné kultivaci bylo osm vzorků indukováno následujícími koncentracemi IPTG: 2 mM; 1 mM; 0,5 mM; 0,3 mM; 0,1 mM; 0,05 mM; 0,01 mM a 0 mM. Poslední vzorek nebyl indukován a sloužil jako kontrola. Inkubace probíhala za stejných podmínek další tři hodiny.

Zbýlých osm vzorků bylo použito pro ověřování nejvhodnější teploty a času produkce. Všechny byly indukovány ve stejný čas do 1 mM koncentrace IPTG. U pěti vzorků probíhala kultivace při 37°C, ale lišila se její délka: 1, 2, 3, 5 a 24 hodin. Další dva vzorky se lišily teplotou při produkci: 30 a 25°C. Před indukcí byly tyto vzorky ponechány 30 minut vytemperovat na danou teplotu, indukovány IPTG a ponechány tři hodiny produkovat při dané teplotě. Poslední vzorek sloužil jako druhá kontrola.

Všechny kultury byly po produkci přeneseny do plastových mikrozkušavek, centrifugovány 5 min při 5 000 $\times$ g a laboratorní teplotě, a analyzovány pomocí

SDS elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu v redukcujícím prostředí (podle kap. 4.2.4).

#### **4.2.6 Velkoobjemová produkce proteinů**

Pro každý protein byla produkce provedena v 1 l LB média s příslušnými antibiotiky rozděleném po 500 ml do dvou dvoulitrových Erlenmayerových baněk. Každá Erlenmayerova baňka s LB médiem byla zaočkována 500  $\mu$ l noční stacionární kultury.

Získané vhodné podmínky produkce pro Nkr-p1f byly použity pro velkoobjemovou produkci. Všechny čtyři baňky zaočkované buněčnými suspenzemi Nkr-p1f, s i bez polyhistidinové kotvy, byly inkubovány při 37°C a 220 ot./min do dosažení OD=0,6 ( $\lambda$ =550 nm). V tuto chvíli byly buněčné kultury indukovány k expresi pomocí IPTG do finální koncentrace 0,1 mM a produkce probíhala 4 hodiny při 37°C a 220 ot./min.

Dvě baňky s LB médiem inokulované buněčnou kulturou Clr-g byly inkubovány při 37°C a 220 ot./min do OD=0,6 ( $\lambda$ =550 nm). Následně byly buněčné suspenze indukovány k produkci Clr-g pomocí IPTG do finální koncentrace 0,3 mM. Tato produkce trvala také 4 hodiny při 37°C a 220 ot./min.

Bakteriální suspenze byly poté centrifugovány 20 minut při 3 000 $\times$ g a 4°C. Po odlití supernatantu byly pelety zamrazeny na -20°C do té doby, než z nich byla izolována inkluzní tělíska.

#### **4.2.7 Izolace inkluzních tělísek**

Nkr-p1f i Clr-g jsou při bakteriální expresi produkovány do cytoplasmy jako inkluzní tělíska, tedy nerozpustné proteinové útvary.

Každá peleta získaná z 0,5 l LB média s příslušnými antibiotiky byla resuspendována v sacharosovém lyzačním pufru (25 ml sacharosového lyzačního pufru/peleta z 1 l LB média) spolu s inhibitory proteas (1  $\mu$ M leupeptin a 1 mM PMSF). Takto připravené směsi byly čtyřikrát zmrazeny na -80°C a znovu rozmrazeny při 40°C, mezitím sonikovány po dobu 30-ti s. Poté bylo k suspenzím buněk přidáno (na 25 ml sacharosového lyzačního pufru) 500  $\mu$ l 1 M roztoku chloridu hořečnatého, 4  $\mu$ l DNAsy I (100 U/ $\mu$ l) a 6  $\mu$ l RNAsy I (10 mg/ml). Tyto směsi byly inkubovány 30 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly suspenze pětkrát 30 s sonikovány s 30-ti sekundovými přestávkami na ledu a nakonec centrifugovány 15 min při 10 000 $\times$ g a 4°C.

V druhém kroku byly pelety resuspendovány v pufru s detergentem (25 ml pufru s detergentem/peleta z 1 l LB média) se stejným množstvím přidaných inhibitorů proteas jako v předchozím kroku. Resuspendace byla provedena pomocí třikrát opakované 30-ti sekundové sonikace s půlminutovými přestávkami na ledu. Takto upravené suspenze byly centrifugovány za stejných podmínek.

Nakonec byly sedimenty resuspendovány 30-ti sekundovou sonikací v promývacím pufru (15 ml promývacího pufru/peleta z 1 l LB média) s inhibitory proteas. Směsi byly centrifugovány jako v předchozích krocích a výsledný sediment tvořený inkluzními tělísky byl uchováván při -80°C.

V průběhu izolace inkluzních tělísek byly odebírány vzorky, ze supernatantů po centrifugaci a z výsledné pelety, se kterými byla následně provedena SDS elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu (podle kap. 4.2.4).

### **4.3 Renaturace proteinů Nkr-p1f a Clr-g**

Zmražená izolovaná inkluzní tělíška byla pomocí vortexu resuspendována v guanidinovém pufru (4 ml guanidinového pufru/peletu inkluzních tělísek Clr-g z 1 l LB média; 8 ml guanidinového pufru/peletu inkluzních tělísek Nkr-P1f z 1 l LB média). Poté byla inkubována 40 min při 40°C kvůli úplnému rozpuštění za občasné sonikace. Následně byly roztoky centrifugovány 15 min při 30 000×g a laboratorní teplotě. Získané supernatanty byly použity k renaturaci proteinů metodou rychlého naředění.

Při této metodě je roztok denaturovaného proteinu pomalu přikapáván do mnohonásobně většího objemu renaturačního pufru při 4°C. Tento roztok obsahuje vysokou koncentraci nízkomolekulárních aditiv (L-arginin), které napomáhají správnému sbalování proteinu a brání agregaci. Od vlastností proteinu se odvíjí i složení renaturačního pufru. Správnou renaturaci proteinu ovlivňuje také pH pufru a poměr složek redoxního systému (cystamin:cysteamin).

U renaturace proteinu Clr-g a obou forem proteinu Nkr-p1f byla nejprve testována změna tří parametrů: pH, poměr složek redoxního systému a koncentrace nízkomolekulárního aditiva L-argininu. Složení jednotlivých testovaných renaturačních pufrů je v tab. č. 14 a 15 (str. 55). Pro toto testování byly připraveny renaturační pufrы

o objemu 50 ml a spolu se vzorky byly umístěny do chladové místnosti o 4°C kvůli vytemperování na danou teplotu.

Za stálého míchání byl 0,5 ml vzorku přikapáván do 50 ml renaturačního pufru rychlostí přibližně 1 kapka/s. Za stejných podmínek byly roztoky ponechány míchat další 2 hod.

Tab. č. 14: Složení testovaných renaturačních pufrů pro obě formy Nkr-p1f. Pufry 1-4 se liší svým složením.

Pufr:	1	2	3	4
Tris-HCl	20 mM			
pH	8,5	8,5	9,0	9,0
L-Arginin	1 M	1 M	1 M	0,4 M
NaN <sub>3</sub>	1 mM			
Redoxní systém	3 mM cystamin	2 mM cystamin	3 mM cystamin	3 mM cystamin
	9 mM cysteamin	10 mM cysteamin	9 mM cysteamin	9 mM cysteamin

Tab. č. 15: Složení testovaných renaturačních pufrů pro Clr-g. Pufry 1-4 se liší svým složením.

Pufr:	1	2	3	4
Tris-HCl	20 mM			
pH	8,0	8,0	8,5	8,0
L-Arginin	1 M	0,4 M	1 M	1 M
NaN <sub>3</sub>	1 mM			
Redoxní systém	3 mM cystamin	3 mM cystamin	3 mM cystamin	2 mM cystamin
	9 mM cysteamin	9 mM cysteamin	9 mM cysteamin	10 mM cysteamin

Následně byly jednotlivé roztoky přeneseny do dialyzačních trubic a 6 hod dialyzovány při 4°C v chladové místnosti za stálého míchání proti 8 litrům dialyzačního pufru. Po uplynulé době byl dialyzační pufr vyměněn za nový a dále dialyzován 12 hod. za stejných podmínek.

Nejvýhodnější složení renaturačního pufru pro další renaturace bylo vybráno za pomoci gelové permeační chromatografie (podle kap. 4.5.1) na koloně Superdex 75 HR 10/300. Především bylo porovnáváno zastoupení monomerního proteinu a agregátu, ale také cena sloučenin renaturačního pufru.

Při opětovné expresi proteinu, byla inkluzní tělíska rozpuštěna v 500 ml vybraného renaturačního pufru. Pokud přesto došlo při renaturaci nebo dialýze k agregaci proteinů, byl roztok centrifugován 15 min při 14 000×g a 4°C kvůli zbavení sraženiny.

## **4.4 Zakoncentrování proteinového roztoku**

### **4.4.1 Ultrafiltrace**

Pro větší snížení objemu roztoků byla používána ultrafiltrace. Po proběhnutí dialýzy byl vzorek koncentrován pomocí ultrafiltrace na přibližně 20 ml. Po sestavení aparatury pro ultrafiltraci, byla tato aparatura naplněna roztokem proteinu a připojena ke zdroji inertního plynu (dusíku). Následně byl roztok zahušťován za pomalého míchání přes membránu s propustností do 10 kDa pod tlakem 0,3 MPa.

### **4.4.2 Koncentrátory pro centrifugaci**

Pro ještě větší zakoncentrování roztoku proteinu byly použity koncentrátory pro centrifugaci s limitem propustnosti 10 kDa. Roztok byl koncentrován na požadovaný objem opakovaně 20 min při 4 000×g a laboratorní teplotě.

## **4.5 Purifikace proteinů Nkr-p1f a Clr-g**

Rekombinantní protein Clr-g byl purifikován nejprve gelovou permeační chromatografií, poté ionexovou chromatografií a nakonec chromatografií na reverzní fázi. První dvě metody nebyly v purifikaci úspěšné, proto byla využívána chromatografie na reverzní fázi. Pro purifikaci rekombinantního proteinu Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy byly použity všechny výše uvedené metody, ale žádná neposkytovala dostatečné množství a čistotu proteinu. Proto bylo přistoupeno k purifikaci Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou pomocí afinitní chromatografie, která byla mnohem úspěšnější.

Tyto metody byly prováděny na přístrojích NGC Quest™ 10 Chromatography System od firmy Bio-Rad a BioSys 510 od firmy Beckman Coulter.



#### **4.5.1 Gelová permeační chromatografie**

Tato metoda je založena na „molekulovém sítu“ tvořeném póry uvnitř gelu umístěnému ve svislé koloně. Na něm jsou molekuly děleny podle své velikosti a tvaru. Mobilní fáze unáší konstantní rychlostí molekuly kolonou, ale menší částice pronikají do pórů gelu kolony a jejich průchod kolonou je oproti větším částicím díky tomu zpomalován.

Metoda gelové permeační chromatografie byla využita k nalezení nejvýhodnějšího složení renaturačního pufru (kap. 4.3). Přitom byly proteiny separovány na koloně Superdex 75 HR 10/300 při průtoku 0,4 ml/min.

Roztok proteinu po dialýze zbavený případné sraženiny byl zakonzentrován centrifugačními koncentrátory na přibližně 900  $\mu$ l. Před vlastním nanášením na kolonu byl vzorek odstředěn 4 500 $\times$ g 5 min za laboratorní teploty. Na kolonu byla nanášena 1/3 objemu roztoku proteinu.

#### **4.5.2 Afinity chromatografie Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou**

Afinity chromatografie umožňuje oddělit ze složité směsi určitou skupinu proteinů nebo dokonce i protein jeden. V tomto případě byla použita k proteinu připojená polyhistidinová kotva, která vykazuje silnou interakci s imobilizovanými ionty kovů ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Po navázání je provedeno odmytí nenavázaných proteinů a jiných nečistot. Polyhistidinová kotva je nakonec z vazby uvolněna gradientem roztoku imidazolu.

Metoda afinity chromatografie byla použita k purifikaci proteinu Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou. Proteiny byly separovány na plnitelné koloně od firmy GE Healthcare se stacionární fází NiNTA.

Konzentrováním roztoku Nkr-p1f dochází ke ztrátám proteinu, proto byl roztok po dialýze přímo nanášen na kolonu. Nános vzorku probíhal přibližně 10 hod při průtoku 0,7 ml/min a poté byla kolona promyta chromatografickým pufrem pro afinity chromatografii A. Nakonec byl protein eluován gradientem chromatografického pufru pro afinity chromatografii B s imidazolem při průtoku 1 ml/min. S jímanými frakcemi byla následně provedena SDS elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu (kap. 4.2.4) a měření koncentrace proteinů (kap. 4.5.4).

### **4.5.3 Chromatografie Clr-g na reverzní fázi**

U chromatografie s obrácenými fázemi je stacionární fází kapalina, která je vázána na hydrofobních částicích, a mobilní fází kapalina polární. K nepolární stacionární fázi mají větší afinitu látky méně polární (s hydrofobními oblastmi), které se k ní na počátku zachycují. Rostoucím gradientem koncentrace organického rozpouštědla postupně dochází k eluci proteinů z kolony.

Metoda chromatografie na reverzní fázi byla uplatněna při purifikaci proteinu Clr-g. Separace proteinů byla provedena na koloně PLRP-S BioHPLC 7,5×300 od firmy Agilent při 1 ml/min.

I při koncentrování roztoku Clr-g dochází k agregaci proteinů, především v centrifugačních koncentrátorech. Proto byl pomocí ultrafiltrace proteinový roztok zakonzentrován na 20 ml a přefiltrován přes filtr na injekční stříkačce. Vzorek byl nanesen na kolonu, která byla následně promyta chromatografickým pufrem A. Protein byl eluován gradientem chromatografického pufru B s acetonitrilem. Proteiny v jímáných frakcích byly vizualizovány pomocí SDS elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu (kap. 4.2.4) a nakonec byla změřena i jejich koncentrace (kap. 4.5.4).

### **4.5.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové**

Koncentrace proteinů byla stanovena díky kolorimetrické reakci, ke které dochází po smíchání činidla Bradfordové s roztokem obsahujícím proteiny. Roztok Bradfordové obsahuje barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250 vázající se na bazické a aromatické aminokyseliny (R, F, P, W) proteinů. Přičemž dochází ke změně barvy z hnědé na modrou, kterou lze sledovat spektrofotometricky při 595 nm.

Nejprve byly připraveny standardní kalibrační roztoky BSA o různých koncentracích (0 až 0,5 mg/ml) pro vytvoření kalibrační křivky. Z naměřených absorbancí standardních roztoků byla odečtena hodnota absorbance samostatného činidla, vytvořena kalibrační křivka a pomocí získané rovnice regrese vypočítány koncentrace z naměřených absorbancí vzorků.

Do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky byly napipetovány vzorky a standardní roztoky v tripletech po 5  $\mu$ l od každého, ke kterým bylo přidáno 200  $\mu$ l činidla Bradfordové. Velmi koncentrované vzorky byly nejprve naředěny. Po 5 minutách stání za laboratorní teploty

byla proměřena absorbance při 595 nm pomocí monochromátorové čtečky mikrotitračních destiček Safire<sup>2</sup>.

#### **4.6 Charakterizace struktury Nkr-p1f a Clr-g hmotnostní spektrometrií**

Hmotnostní spektrometrie (MS) je technika analytické chemie, která má celkově široké použití. Využívá se ke stanovení hmotnosti částic, základního složení vzorku a chemické struktury molekul (peptidů, proteinů). Navíc je možné touto metodou identifikovat bakterie a proteiny, u proteinů určit zapojení disulfidových můstků a dokonce i posttranslační modifikace. Toto je jen hrubý výčet možností hmotnostní spektrometrie.

Hmotnostní spektrometr sestává ze čtyř základních součástí: iontový zdroj, analyzátor, detektor a počítač ke zpracování výsledků.

Aby mohl být analyt analyzován, musí být převeden do ionizovaného stavu v plynné fázi. Ionty jsou ze zdroje transportovány do analyzátoru iontovou optikou. Měkké ionizační techniky jsou vhodně pro měření proteinů, protože při ionizaci nedochází k jejich fragmentaci. Mezi ně patří ionizace za přítomnosti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI). Hmotnostní analyzátor rozděluje ionty na základě jejich poměru  $m/z$  (poměr hmoty a náboje). V této práci byly využity analyzátory dva, analyzátor doby letu částice (TOF) a analyzátor používající iontově cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací (FT-ICR). Hmotnostní spektrometr zakončuje detektor, který sleduje průchod a dopad iontů.

Během této práce byla hmotnostní spektrometrie použita k ověření přítomnosti obou proteinů, k měření intaktní hmoty proteinů a k identifikaci disulfidových můstků.

Měření na hmotnostním spektrometru byla prováděna RNDr. Danielem Kavanem, Ph.D. a Mgr. Zdeňkem Kukačkou.

#### 4.6.1 Odsolení proteinů a měření intaktní hmoty proteinů

Před vlastním odsolením a měřením, byly vzorky okyseleny a zredukovány. Z frakce 6 z afinitní chromatografie NKR-P1F byly odebrány dva vzorky po 20  $\mu$ l a doplněny na 250  $\mu$ l 0,1 % roztokem FA. Z frakce 5 z chromatografie Clr-g na reverzní fázi byly odebrány také dva vzorky po 20  $\mu$ l a doplněny na 500  $\mu$ l 0,1 % roztokem FA. Dva vzorky, jeden Clr-g a druhý Nkr-p1f, byly zredukovány přidavkem roztoku 1 M TCEP do 100 mM koncentrace. Tato jsme získaly čtyři vzorky, z toho dva zredukované, které byly 5 min sonikovány a nakonec 5 min centrifugovány při 5 000 $\times$ g za laboratorní teploty.

Další postup práce se vzorky a s kolonou je uveden v tab. č. 16 (str. 60).

Tab. č. 16: Postup odsolení proteinového vzorku pomocí kolony MicroTrap. Zkratka AcN označuje acetonitril a zkratka FA kyselinu mravenčí.

Krok	Složení roztoku	V/ml
Promytí kolony	80 % AcN, 0,1 % FA	2 $\times$ 250 $\mu$ l
Ekvilibrace kolony	0,1 % FA	2 $\times$ 250 $\mu$ l
Nanesení vzorku	vzorek	po 250 $\mu$ l
Promytí vzorku	0,1 % FA	3 $\times$ 250 $\mu$ l
Eluce proteinu	80 % AcN, 0,1 % FA	50 $\mu$ l
Uchovávání kolony	50 % AcN	750 $\mu$ l

Po odsolení následovalo naředění vzorku na polovinu sprejovacím puforem a vlastní měření intaktní hmoty pomocí ESI-FTICR MS.

#### 4.6.2 Identifikace zapojení disulfidových vazeb v proteinech

Proteiny obsahující aminokyseliny s volnou sulfhydrylovou skupinou (C) vytvářejí vlivem oxidačního působení okolního prostředí disulfidové vazby. Ty jsou důležitým faktorem, který ovlivňuje terciární a kvartérní strukturu, a stabilitu bílkovin. Díky tomu vyřešení zapojení disulfidových vazeb u proteinů Nkr-p1f a Clr-g přispívá k získání jejich celkové struktury.

Nejprve byla provedena se vzorky SDS elektroforéza v neredukujícím prostředí podle kap. 4.2.4.1.

### **Řezání a odbarvení gelu**

Místa na polyakrylamidovém gelu obsahující protein byla skalpelem vyříznuta a na čisté skleněné podložce rozřezána na malé kostičky, které se skalpelem přenesly do odpovídajících mikrozkušavek.

Následovala sonikace až do odbarvení ve směsi 100  $\mu$ l ethylmorfolinového pufru se 100  $\mu$ l acetonitrilu. Tento roztok byl několikrát vyměňován, dokud nedošlo k úplnému odbarvení, po kterém byly zkumavky centrifugovány 15 s při 5 000 $\times$ g a zbylý roztok nad gelem odebrán.

Před vlastním štěpením proteasami bylo ke vzorkům přidáno nejprve 100  $\mu$ l 100 % acetonitrilu a směsi byly 5 min sonikovány. Po odebrání roztoku se ke vzorkům přidalo 100  $\mu$ l 50 % acetonitrilu a sonikace byla opakována. K úplnému vysušení gelů došlo pomocí vakuové odparky.

### **Štěpení proteinů proteasou**

Ke vzorkům s vysušeným gelem bylo přidáváno 30  $\mu$ l 50 mM ethylmorfolinového pufru o pH 8,5 s 10 % acetonitrilem a přidaným trypsinem do konečné koncentrace 10 ng/ $\mu$ l. Mikrozkušavky se vzorky byly inkubovány 30 min při 37°C a poté se přidal další roztok proteasy tak, aby byly kostičky gelu ponořené. Takto ošetřené vzorky byly dále inkubovány 10 hod při 37°C.

### **Extrakce peptidů z gelu**

Po inkubaci byly mikrozkušavky se vzorky centrifugovány 15 s při 5 000 $\times$ g a roztok přenesen do mikrozkušavek nových. Z tohoto roztoku byly připraveny vzorky na MALDI-TOF MS měření. Ke gelům ve starých mikrozkušavkách bylo přidáno 60  $\mu$ l 80 % acetonitrilu s 0,1 % TFA a následovala pětiminutová sonikace. Poté byly vzorky stejným způsobem centrifugovány a roztok byl přenesen do nových mikrozkušavek. Tímto byly extrahovány polární peptidy. Ke gelům bylo dále přidáno 60  $\mu$ l roztoku 0,1 % TFA. Byla zopakována sonikace, centrifugace a odebrání roztoku do nových mikrozkušavek. Tímto roztokem byly extrahovány nepolární peptidy. Nakonec bylo ke gelům přidáno 60  $\mu$ l 50 % acetonitrilu a byl zopakován postup se sonikací, centrifugací a odebráním roztoku. Tímto krokem se extrahovaly případné zbylé peptidy. Mikrozkušavky s extrahovanými směsmi byly koncentrovány na 10  $\mu$ l vakuovou odparkou.

Dále bylo do mikrozkuumavek přidáno 240  $\mu\text{l}$  0,1 % TFA a vzorky byly 5 min sonikovány a centrifugovány. Poté byly vzorky odsoleny podle kap. 4.8.1, ale s peptidovou MicroTrap kolonkou. A po odsolení byly vzorky sesušeny na 5  $\mu\text{l}$  pomocí vakuové odparky.

### **Měření na hmotnostním spektrometru (LC-MS, MALDI-TOF)**

Vzorky získané štěpením proteinů proteasou byly využity jednak pro potvrzení proteinů, ale také k identifikaci disulfidových vazeb hmotnostní spektrometrií. Nejprve byla připravena matrice, která vznikla smícháním 2  $\mu\text{l}$  roztoku 0,1 % TFA s 80 % acetonitrilem, s 2  $\mu\text{l}$  0,1 % TFA a s 2  $\mu\text{l}$  kyseliny  $\alpha$ -kyanoskořicové. Na destičku pro MALDI-TOF měření byl nejprve nanesen 1  $\mu\text{l}$  vzorku, který byl po odpaření převrstven 1  $\mu\text{l}$  čerstvě připravené matrice. Po zaschnutí byla destička předána k analýze.

Vzorky vyextrahované z gelu byly využity pro identifikaci disulfidových vazeb proteinů. K těmto odpařeným roztokům byly v den analýzy přidány 2  $\mu\text{l}$  80 % acetonitrilu s 0,1 % TFA a vzorky 10 min sonikovány a centrifugovány 15 s při 5 000 $\times$ g. Dále k těmto vzorkům bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  0,1 % TFA a opět stejným způsobem sonikovány a centrifugovány. V případě potřeby byl vzorek naředěn 0,1 % roztokem TFA. Těmito roztoky byly naplněny vialky a uzavřeny septem. Tyto vzorky byly analyzovány metodou LC-MS. Peptidy byly nejprve separovány kapalinovou chromatografií napojenou na nanoelektrosprej hmotnostního spektrometru.

V případě identifikace disulfidových vazeb byla získaná data vyhodnocena programem Data Analysis. Z tohoto programu byly vyexportovány informace o peptidových signálech do textového souboru, který byl vytvořen pro program Peak joiner, kde byla data upravena, a pro program Xlinx, ve kterém byly analyzovány peptidy spojené disulfidovými vazbami.

Pokud se jednalo o identifikaci proteinu, byl pro vyhodnocení získaných dat použit program FlexAnalysis, Mascot ve spolupráci s databází Swiss-Prot.

## **4.7 Charakterizace struktury Nkr-p1f a Clr-g za pomoci sekvenčního alignmentu**

Alignment slouží jako základní nástroj pro seřazování příbuzných sekvencí DNA, obsahujících podobné úseky, které poukazují na jejich sekvenční, strukturní nebo funkční příbuznost.

Pro zjištění určitých všeobecných strukturních znaků, které by mohly platit pro vazbu Nkr-p1f a Clr-g byl použit sekvenční alignment sekvenčně podobných molekul se známou strukturou. Nejprve byly vybrány příbuzné aminokyselinové sekvence pomocí programu BLAST z databáze PDB a Swiss-Prot o minimálním celkovém skóre, určujícím příbuznost, 50. Následně byl vytvořen strom sekvenční příbuznosti (v kapitole 5.6.2 ve výsledcích, str. 81 a 82). Pro strukturní vlastnosti do literárního úvodu byly vybrány sekvenčně příbuzné proteiny se známou strukturou.

## **4.8 Studium interakce celých extracelulárních částí Nkr-p1f s Clr-g**

Interakce monomerních forem celé extracelulární části proteinu Nkr-p1f (s polyhistidinovou kotvou) a Clr-g byla zkoušena biofyzikální technikou povrchovou plasmonovou rezonancí (SPR).

### **4.8.1 Povrchová plasmonová resonance (SPR)**

Povrchová plasmonová resonance (SPR nebo také rezonance povrchových plasmonů) je řazena mezi jednu z nejrozvinutějších optických detekčních technik. Povrchové plasmony jsou hromadně excitované elektrony, které leží na rozhraní mezi vodičem a izolantem. Vznikají při dopadu paprsku lineárně polarizovaného světla na rozhraní dvou prostředí o odlišných indexech lomu a při úplném odrazu světla. Přitom se vytváří povrchová vlna interagující s povrchovými plasmony kovové vrstvy za vzniku povrchové plazmonové vlny. Při vzniku této poslední vlny dochází ke snížení intenzity odraženého světla. Celá tato technika je tedy postavena na ději, při kterém dochází ke změně úhlu odrazu od tenké vrstvy kovu. Výhody této metody jsou citlivost, ale analyt musí být i tak v nadbytku oproti ligandu, a možnost sledovat kinetiku interakce v reálném čase.

Vlastní analýza probíhá tak, že na povrchu sensorového čipu (v tomto případě pokrytého tenkou vrstvou zlata) je imobilizován jeden z vazebných proteinů (tzn. ligand; Nkr-p1f pomocí polyhistidinové kotvy) a druhý partner (tzn. analyt) proudí kolem něj ve vhodném pufru. Pokud dojde k vazbě analytu na ligand, změní se tím index lomu a následně i rezonanční úhel odraženého světla. Výsledek je zobrazen jako závislost nárůstu signálu SPR na čase. Jako pufr vazebného prostředí byl v mém případě použit fosfátový pufr.

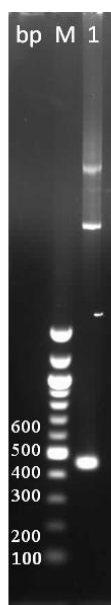
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Příprava produkčních vektorů pro celou extracelulární část Nkr-p1f

Produkční vektory pNkr-p1fhis a pNkr-p1f byly připraveny během této diplomové práce. Plazmid kódující Clr-g (pClr-g) byl vyroben RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D..

#### 5.1.1 Kontrola délky produktu PCR agarosovou elektroforézou

Fragment DNA kódující celou extracelulární část byl získán pomocí PCR se specifickými primery (podle kapitoly 4.1.1, str. 42). Pro ověření správnosti délky fragmentu DNA byla provedena agarosová elektroforéza v 1% gelu podle postupu v kapitole 4.1.2. Jak je vidět z obr. č. 16 (str. 64), namnožený úsek DNA má velikost mezi 400-500 bp. Pomocí programu GelAnalyzer byla vypočítána přibližná velikost 478 bp. Obě tyto hodnoty potvrzují skutečnou velikost úseku genu kódujícího celou extracelulární část Nkr-p1f, 468 bp, včetně přesahů s místy pro restriční endonukleasy.



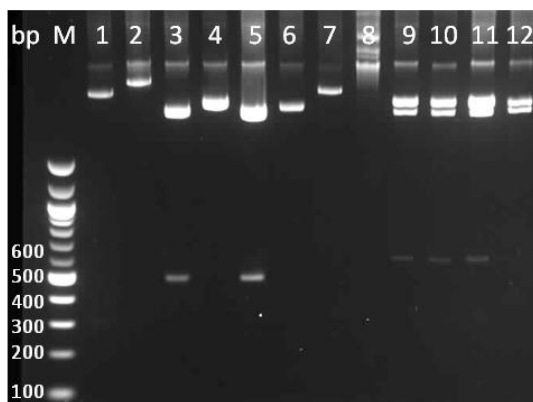
Obr. č. 16: Fotografie gelu z agarosové elektroforézy vzorku z vizualizace produktu PCR. M= DNA standard, 1= PCR produkt (468 bp).



### 5.1.2 Kontrola ligace ve vektoru pBSSK(+) agarosovou elektroforézou

Namnožený úsek DNA z PCR byl ligován do vektoru pBSSK(+) (kap. 4.1.3). Vektor byl dále použit k bakteriální transformaci klonovacích buněk NovaBlue (kap. 4.1.4). Na LB agaru vyrostla přibližně stovka kolonií, z nichž byly vybrány ty kolonie, které byly transformovány vektorem s inzertem. Pro přípravu nočních kultur bylo vybráno 8 kolonií, z nichž přes noc vyrostlo 6 kultur dále použitých pro izolaci vektorů (kap. 4.1.5).

Správnost ligace byla ověřena agarosovou elektroforézou vzorků z restrikční analýzy (kap. 4.1.5) třemi restrikčními endonukleasami (obr. č. 17, str. 65). Výsledkem restrikční analýzy by měl být fragment, vyštěpený z vektoru pBSSK(+), dlouhý v případě *HindIII* 535 bp (67+468 bp) a v případě *SacI* a *KpnI* 613 bp (145+468 bp). Vzorek 3 a 5 (nebo-li 9 a 11) mají inzert správně ligován. Velikost těchto fragmentů byla ověřena i za pomoci programu GelAnalyser.



Obr. č. 17: Fotografie gelu z agarosové elektroforézy vzorků pro ověření správnosti ligace. M= DNA standard, 1-6= plazmidová DNA štěpená *HindIII*, 7-12= plazmidová DNA štěpená *KpnI*.

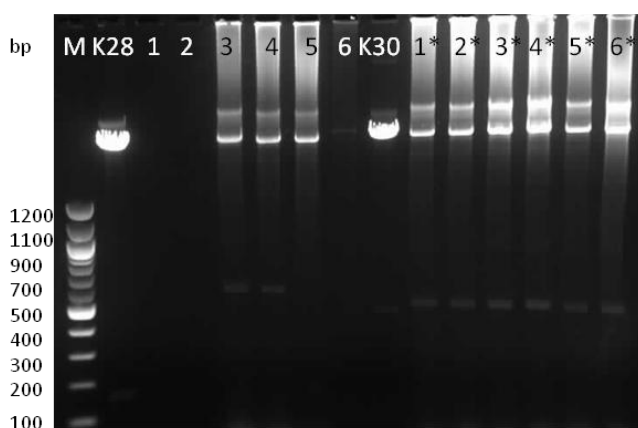
Podle výsledku restrikční analýzy byla vybrána noční kultura č. 3 (nebo-li 9) pro izolaci plazmidové DNA z většího objemu (50 ml).

### 5.1.3 Kontrola ligace ve vektorech pNkr-p1fhis a pNkr-p1f agarosovou elektroforézou

S plazmidovou DNA (vektor pBSSK(+)) s inzertem pro celou extracelulární část Nkr-p1f) a s plazmidy pET-28b(+), pET-30a(+) byla provedena restrikční analýza enzymy *NdeI*

a *HindIII*. Fragmenty odpovídající inzertu a rozštěpeným plazmidům byly vizualizovány agarosovou elektroforézou a následně extrahovány z gelu. Inzert byl následně ligován do plazmidů pET-30a(+) a pET-28b(+), se kterými proběhla transformace klonovacích buněk (kapitola 4.1.6).

Izolovaná plazmidová DNA byla štěpena restrikními endonukleasami *XbaI* a *HindIII* pro ověření správnosti ligace inzertu do těchto plazmidů. Agarosová elektroforéza těchto vzorků je zobrazena na obr. č. 18 (str. 66).



**Obr. č. 18: Fotografie gelu z agarosové elektroforézy vzorků pro ověření správnosti ligace.** M= DNA standard, K28= neštěpená plazmidová DNA v pNkr-p1fhis, 1-6= plazmidová DNA pNkr-p1fhis štěpená *HindIII* a *XbaI*, K30= neštěpená plazmidová DNA v pNkr-p1f, 1-6\* = plazmidová DNA pNkr-p1f štěpená *HindIII* a *XbaI*.

Kromě vzorku 1, 2 a 6 plazmidové DNA pNkr-p1fhis jsou všechny správně rozštěpené. Vznikají totiž stejně dlouhé fragmenty. U pNkr-p1fhis fragment dlouhý přibližně 770 bp a u pNKR-P1F 670 bp. Podle výsledku restrikní analýzy byly vybrány dvě noční kultury, vzorek tři u obou plazmidových DNA, pro izolaci plazmidové DNA z většího objemu (100 ml).

#### **5.1.4 Měření koncentrace a ověření sekvence plazmidů pNkr-p1fhis a pNkr-p1f**

Izolovaná plazmidová DNA byla získána v celkovém objemu 0,5 ml od každého vzorku. Výsledná koncentrace a celkové množství obou plazmidů je uvedeno v tab. č. 17 (str. 67). Správnost sekvence vektorů byla potvrzena DNA sekvenováním.

Tab. č. 17: Celková koncentrace a množství obou konstruktů.

	$c/ng \cdot \mu l^{-1}$	$m/\mu g$
<b>pNkr-p1fhis</b>	198	99
<b>pNkr-p1f</b>	132	66

## 5.2 Rekombinantní exprese proteinů Clr-g a Nkr-p1f

Aminokyselinové sekvence extracelulárních částí obou proteinů jsou uvedeny v kap. 1.5, ale v tab. č. 18 (str. 67) jsou uvedeny další důležité údaje. Celá extracelulární část Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou byla produkována pro uchycení na čip při povrchové plasmonové resonanci (SPR) a Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy na ostatní pokusy.

Tab. č. 18: Teoretická molekulová hmotnost ( $M_w$ ) a izoelektrický bod (pI) produkovaných extracelulárních částí proteinů Nkr-p1f a Clr-g. PolyHis= polyhistidinová kotva.

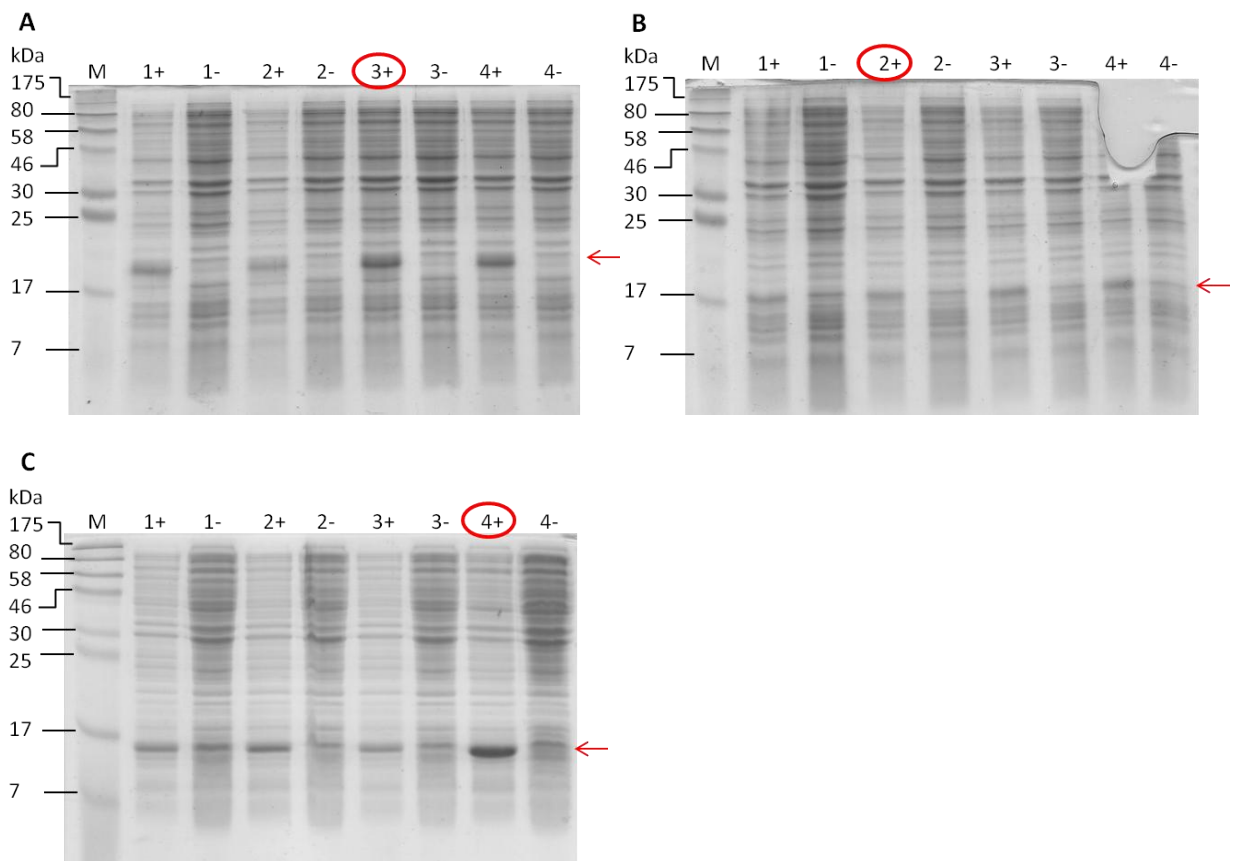
	<b>Nkr-p1f s polyHis</b>	<b>Nkr-p1f</b>	<b>Clr-g</b>
<b><math>M_w</math></b>	19,8 kDa	17,7 kDa	16,7 kDa
<b>pI</b>	8,18	7,60	8,92

Postup exprese a renaturace obou forem Nkr-p1f se od sebe navzájem nelišil. K rozdílům došlo až při purifikaci těchto forem, přičemž purifikace formy Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy byla velmi obtížná. Podmínky exprese Clr-g byly podobné. Při renaturaci Clrg byla použita stejná metoda, ale jiné složení roztoků, a při purifikaci byly využity jiné metody. Vše je uvedeno v dalším textu.

### 5.2.1 Bakteriální transformace a testování exprese

Při expresi proteinů Nkr-p1f a Clr-g byla nejprve provedena transformace produkčních kompetentních buněk kmene *E. coli* BL21-Gold(DE3) pomocí tepelného šoku podle kap. 4.1.4 a 4.2.2. Na všech třech Petriho miskách vyrostlo dostatečné množství bakteriálních kolonií, se kterými bylo dále pracováno. Na kontrolním LB agaru nebyly pozorovány žádné kolonie, z tohoto důvodu bylo vyloučeno znečištění a potvrzena správnost připravených kompetentních buněk.

Pro testování exprese byly vybrány z každé misky čtyři bakteriální kolonie, kterými byly inokulovány 2 ml LB média s příslušnými antibiotiky a inkubovány přes noc při 220 ot./min a 37°C. S těmito nočními stacionárními kulturami bylo dále provedeno testování exprese, jež je popsáno v kap. 4.2.3. Exprese proteinů byla analyzována SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu podle kap. 4.2.4. Na obr. č. 19 (str. 68) lze porovnávat indukované a neindukované bakteriální kultury. Dráhy označené jako plus (+) byly indukovány k expresi proteinů pomocí IPTG do koncentrace 1 mM.



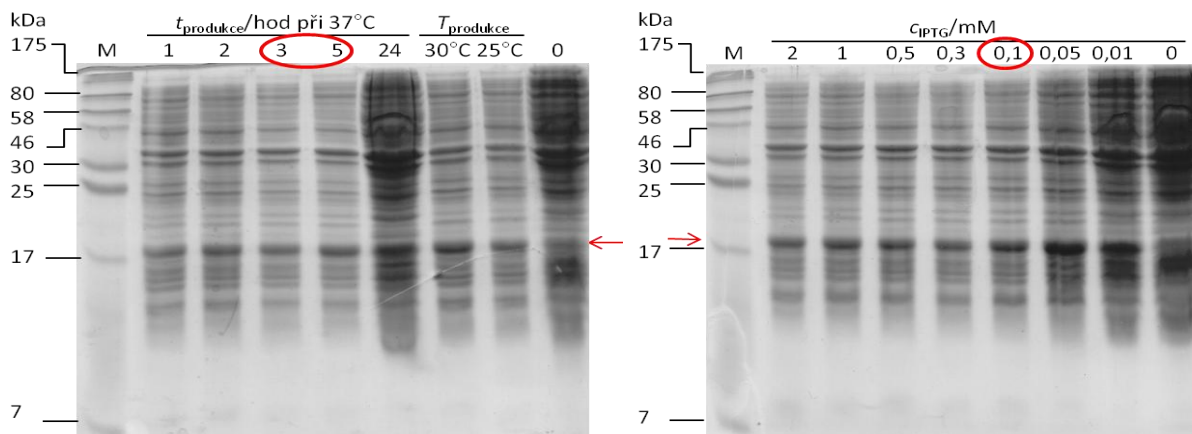
**Obr. č. 19: Fotografie gelů z SDS elektroforézy použité k výběru produkčního klonu.** Gel (A) zobrazuje bakteriální klony pro produkci celé extracelulární části proteinu Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou. Gel (B) popisuje bakteriální klony pro produkci celé extracelulární části proteinu Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy. Na gelu (C) jsou bakteriální klony pro produkci celé extracelulární části proteinu Clr-g. Dráhy označené znaménkem plus (+) obsahují indukované buňky. Dráhy označení znaménkem mínus (-) obsahují neindukované buňky. Rámečky zviditelňují produkované proteiny Nkr-p1f a Clr-g. Tyto vyznačené klony byly použity k velkoobjemové produkci. M= proteinový standard molekulových hmotností.

Pro nalezení vhodných podmínek k velkoobjemové produkci proteinu Nkr-p1f byl vybrán klon Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy č. 2. K velkoobjemové produkci byly použity klony č. 3 pro Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou, č. 4 pro Clr-g a již výše zmíněný klon Nkr-p1f, se kterým bylo provedeno testování podmínek produkce.

### 5.2.2 Hledání vhodných podmínek produkce Nkr-p1f

Vhodné podmínky pro expresi proteinu Nkr-p1f byly hledány z důvodu vyšších výtěžků v kratším čase. Byla zkoušena koncentrace induktoru IPTG, teplota a doba produkce podle kap. 4.2.5. Výsledky byly vizualizovány pomocí SDS elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu podle kap. 4.2.4 (obr. č. 20, str. 69).

Pro velkoobjemovou produkci byly vybrány takové podmínky, při nichž byl námi produkován protein jeden z nejvýraznějších, a ostatních proteinů bylo menší množství, při nejkratší době produkce a nejnižšímu množství induktoru IPTG. Byly vybrány tyto podmínky: 0,1 mM koncentrace induktoru IPTG a produkce 4 hodiny při 37°C.



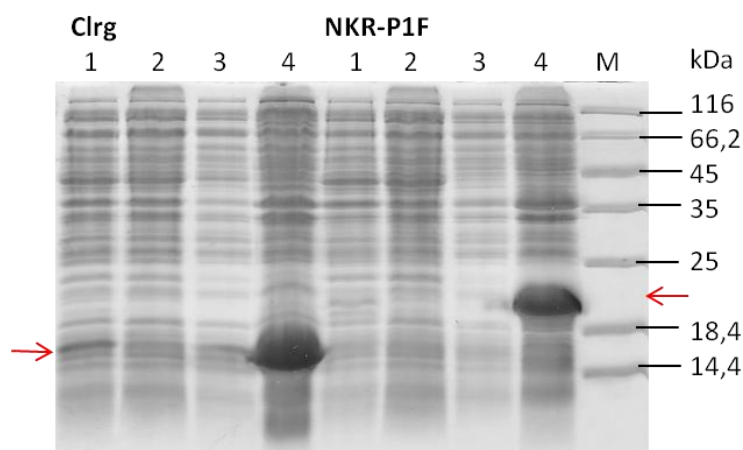
**Obr. č. 20: Fotografie gelů z SDS elektroforézy vzorků z hledání vhodných podmínek produkce Nkr-p1f.** Byly hledány podmínky produkce, jako jsou koncentrace induktoru IPTG, doba a čas produkce. M= proteinový standard molekulových hmotností.  $t_{\text{produkce}}$ = doba produkce v hodinách při 37°C (1,2,3,5,24 hod).  $T_{\text{produkce}}$ = teplota při 3 hodinách produkce (25°C, 30°C a 37°C).  $c_{\text{IPTG}}$ = koncentrace induktoru IPTG v mM. 0= neindukovaná kontrola při tří hodinové inkubaci a 37°C.

### 5.2.3 Izolace inkluzních tělísek po velkoobjemové produkci

Nalezené vhodné podmínky pro expresi obou forem Nkr-p1f (kap. 5.2.2) byly využity při velkoobjemové produkci (kap. 4.2.6). U druhého proteinu byly využity jiné podmínky

produkce z protokolu exprese Clr-g. Každý protein byl produkován v 1 l LB média s příslušnými antibiotiky. Nejprve byly buněčné kultury inkubovány při 37°C a 220 ot./min do dosažení OD=0,6 ( $\lambda=550$  nm), kdy byla provedena indukce. Následně byly proteiny produkovány 4 hodiny při 37°C a 220 ot./min. Centrifugací byly získány pelety, se kterými byla provedena izolace inkluzních tělísek postupem uvedeným v kap. 4.2.7. Sacharosový lyzační pufr spolu se sonikací a mražením způsobil rozbití buněčných stěn bakteriálních buněk. Membrány byly rozpuštěny použitím pufru s detergentem. K vymytí detergentu, který by dále vadil v jiných pokusech, byl použit vymývací pufr.

Během izolace byly odebírány vzorky z každého supernatantu po centrifugaci a také z konečné pelety. Pomocí SDS elektroforézy těchto vzorků byla sledována účinnost izolace u Clr-g a Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou (obr. 21, str. 70).



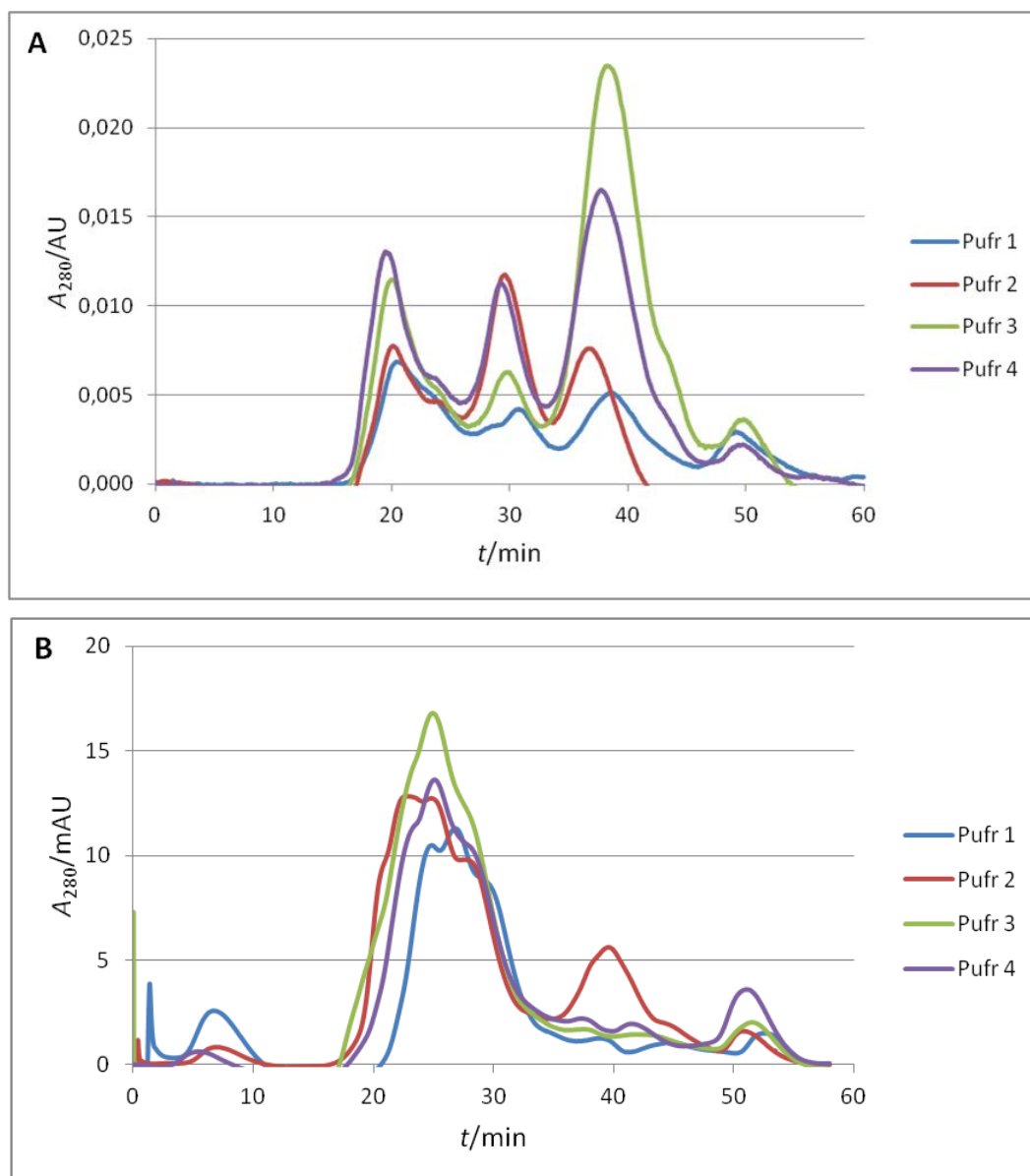
**Obr. č. 21: Fotografie gelu z SDS elektroforézy vzorků supernatantů a pelety z izolace inkluzních tělísek. M= proteinový standard molekulových hmotností. 1-3= supernatant z jednotlivých kroků izolace inkluzních tělísek. 4= sediment inkluzních tělísek. Vyznačeny proteiny o velikosti odpovídající proteinu Clr-g a Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou.**

Z kontrolní SDS elektroforézy bylo zjištěno, že izolace inkluzních tělísek u Nkr-p1f proběhla úspěšně, exprimovaný protein byl nalezen pouze v sedimentu inkluzních tělísek. Izolace inkluzních tělísek u Clr-g nebyla tolik účinná. Docházelo k vymývání proteinu do supernatantu již v průběhu izolace. Toto vymývání bylo zanedbáno, protože by izolace z těchto komplexních proteinových směsí byla příliš složitá.

### 5.3 Renaturace proteinů Nkr-p1f a Clr-g

Po izolaci inkluzních tělísek byly tyto proteiny renaturovány metodou rychlého naředění podle kap. 4.3. U renaturačních pufrů byla zkoušena změna pH, poměr redoxního systému a koncentrace nízkomolekulárních aditiv, L-argininu. Výsledek změny renaturačních pufrů byl vyhodnocen metodou gelové permeační chromatografie.

Po proběhnutí dialýzy byly roztoky proteinů zakoncentrovány pomocí ultrafiltrace



Obr. č. 22: Eluční profily proteinu Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy (A) a proteinu Clr-g (B) sledovaných při 280 nm metodou gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HR 10/300 lišící se renaturačními podmínkami. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min.

a centrifugačních koncentrátorů (podle kap. 4.4). Ze vzorku byla vždy 1/3 nanášena na kolonu Superdex 75 HR 10/300. Testování složení jednotlivých renaturačních pufrů pro Clr-g a Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy je na obr. č. 22 (str. 71).

Z elučních profilů získaných gelovou permeační chromatografií pro protein Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy (obr. č. 22 A, str. 71) si lze povšimnout, že je nejspíš produkován převážně jako monomer (~17,7 kDa; v čase cca 38 min), ale také jako dimer (~35,4 kDa). První chromatografický vrchol patrně představuje agregovaný protein a poslední vrchol již částečně rozpadlý produkt. Z druhého grafu č. 22 B (str. 71), který zobrazuje eluční profil proteinu Clr-g, je možné usoudit, že celá extracelulární část Clr-g se pravděpodobně vyskytuje spíše ve formě dimeru (~33,4 kDa; v čase cca 25 min). Eluční vrchol zastupující monomer (~16,7 kDa; v čase cca 40 min) a částečně rozpadlý produkt je zastoupen.

Pro renaturaci proteinu Nkr-p1f byl vybrán pufr č. 4, který sice nemá nejvyšší monomerní eluční vrchol, ale použije se pouze 0,4 M L-arginin. Pro renaturaci proteinu Clr-g byl vybrán pufr č. 2, který obsahuje monomerní i dimerní protein a také se sníží koncentrace L-Argininu na 0,4 M. Koncentrace L-argininu byla snižována z ekonomických důvodů.

## **5.4 Purifikace proteinů**

Po nalezení vhodného složení renaturačních pufrů (kap. 4.3 a 5.3) byla renaturace proteinů zopakována v 500 ml. A následně byla hledána pro oba proteiny odpovídající metoda purifikace. Bylo odhaleno, že gelová permeační chromatografie nevyhovovala. Z tohoto důvodu bylo vyzkoušeno více metod.

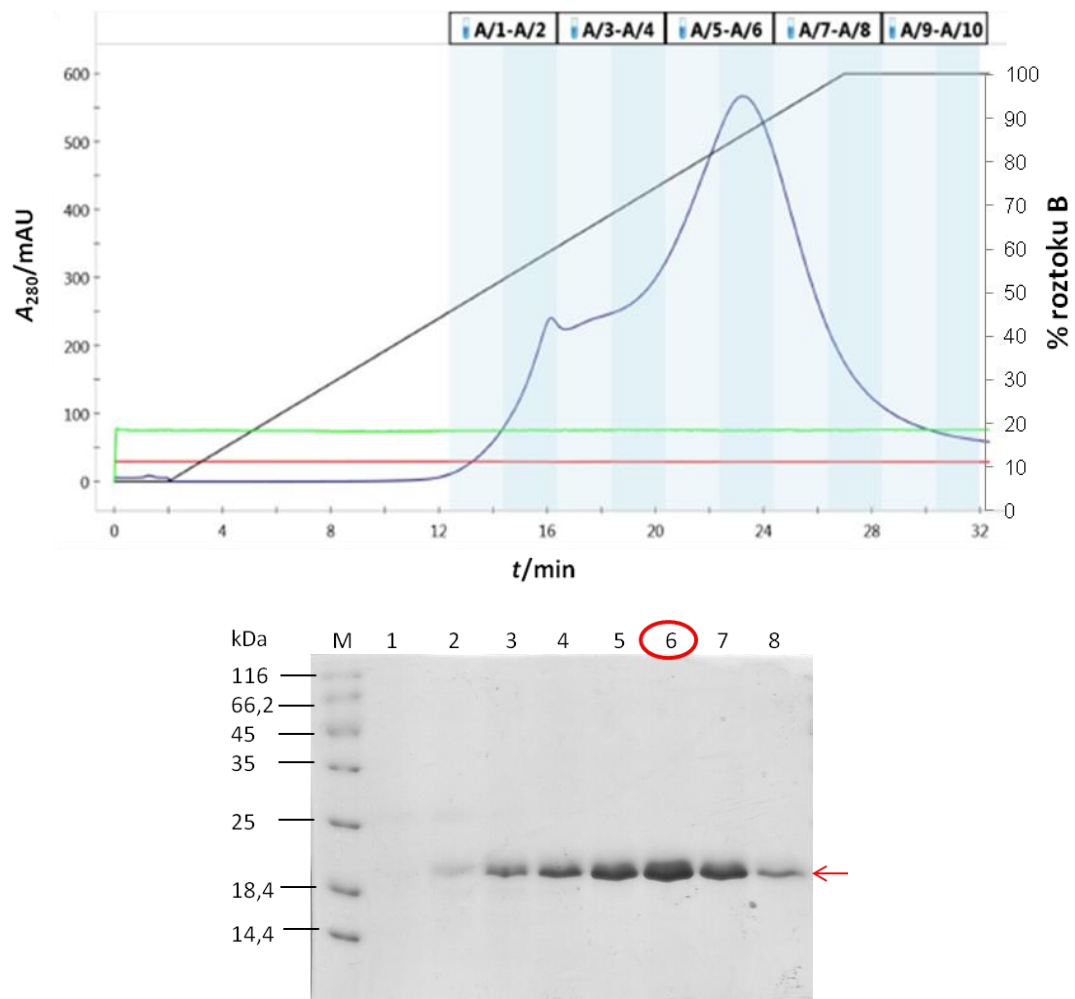
### **5.4.1 Afinity chromatografie NKR-P1F s polyhistidinovou kotvou**

Protože se mi nepodařilo purifikovat protein Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy v dostatečném množství a čistotě, bylo přistoupeno k purifikaci pouze druhé formy Nkr-p1f, proteinu s polyhistidinovou kotvou.

Při purifikaci proteinu Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou bylo přistoupeno k afinity chromatografii na přístroji NGC Quest™ 10 Chromatography System od firmy Bio-Rad (podle kap. 4.5.2). K separaci proteinů docházelo na plnitelné koloně od firmy GE Healthcare se stacionární fází NiNTA. Eluční profil z afinity chromatografie a fotografie



polyakrylamidového gelu z elektroforézy vzorků (podle kap. 4.2.4) je zobrazen na obr. č. 23 (str. 73).

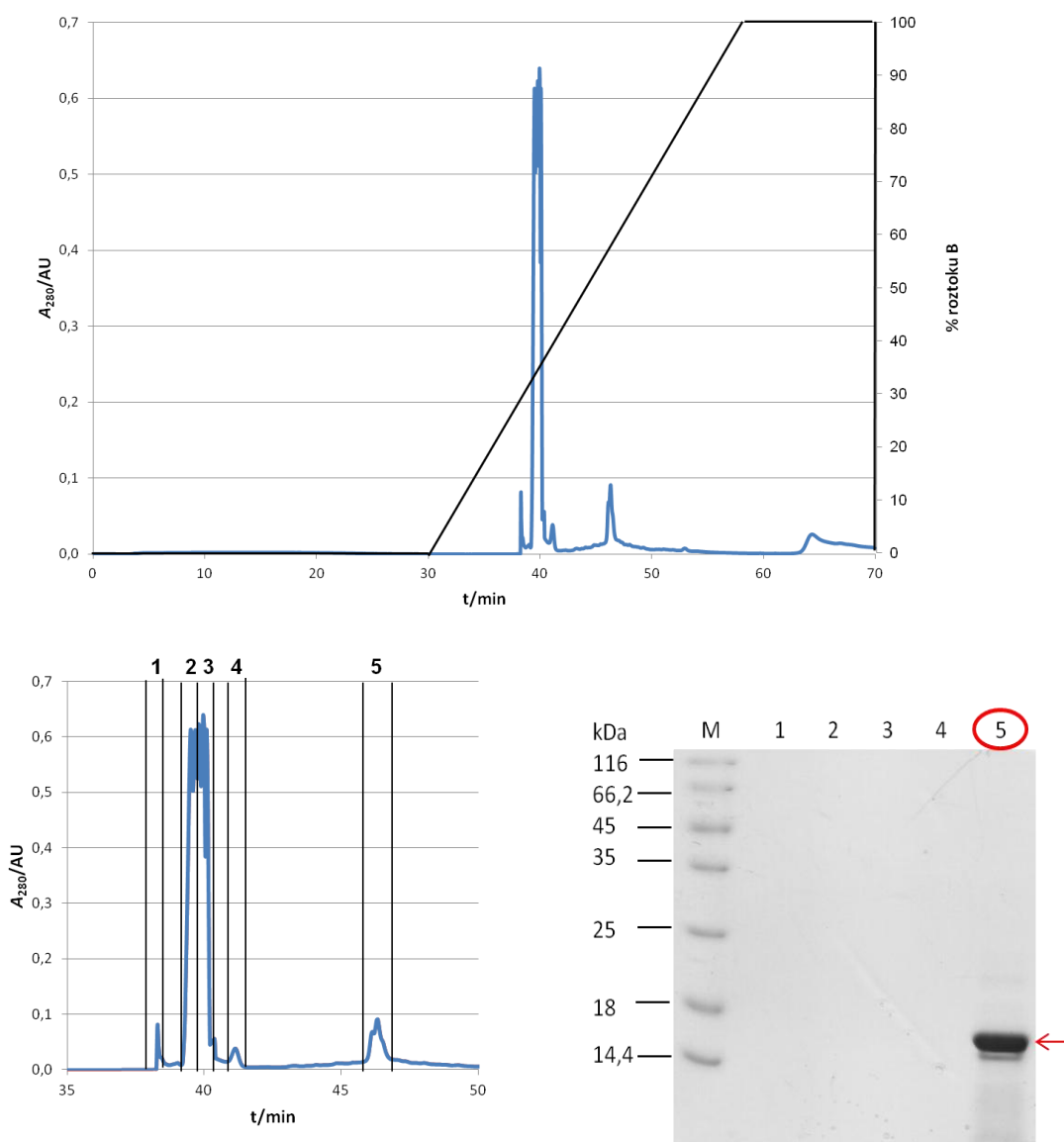


**Obr. č. 23:** Eluční profil proteinu Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou získaný afinitní chromatografií a fotografie polyakrylamidového gelu z SDS elektroforézy vzorků z afinitní chromatografie. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Separace proteinů probíhala na plnitelné koloně se stacionární fází NiNTA. Sbírané frakce v průběhu chromatografie jsou vypsány v horní části grafu. Frakce 4-8 obsahuje monomer proteinu. Na fotografii gelu je označena frakce s největším zastoupením proteinu. M= proteinový standard molekulových hmotností.

Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou je možné získat již pomocí afinitní chromatografie v dostatečné čistotě, jak je vidět z fotografie polyakrylamidového gelu na obr. č. 23 (str. 73).

## 5.4.2 Chromatografie Clr-g na reverzní fázi

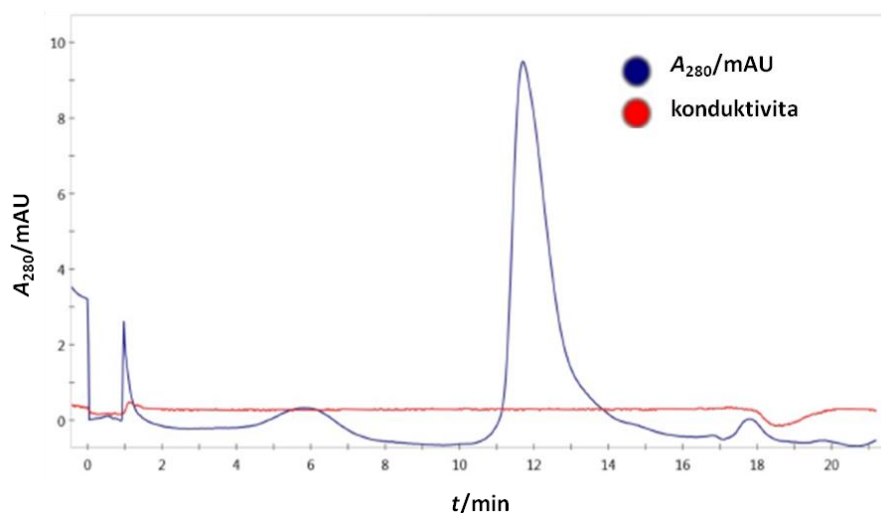
Po několika metodách purifikace celé extracelulární části proteinu Clr-g byla vybrána chromatografie na reverzní fázi (podle kap. 4.5.3). Separace proteinů probíhala na koloně PLRP-S BioHPLC 7,5×300 od firmy Agilent při 1 ml/min a přístroji BioSys 510 od firmy Beckman Coulter.



**Obr. č. 24:** Eluční profil proteinu Clr-g získaný chromatografií na reverzní fázi a fotografie polyakrylamidového gelu z SDS elektroforézy vzorků z chromatografie na reverzní fázi. Separace proteinů probíhala na koloně PLRP-S BioHPLC 7,5×300 od firmy Agilent při 1 ml/min. Na prvním grafu je zobrazen eluční profil spolu s gradientem chromatografického pufru B. Druhý graf je pouze výřez prvního grafu, na kterém jsou vyznačeny sbírané frakce. Frakce 5 obsahuje monomer proteinu, který je také vyznačen na fotografii gelu. Ostatní frakce neobsahovaly proteinové molekuly. M= proteinový standard molekulových hmotností.

Eluční profil chromatografie Clr-g na reverzní fázi s vyznačenými sbíranými frakcemi a fotografie polyakrylamidového gelu (podle kap. 4.2.4) těchto frakcí jsou uvedeny na obr. č. 24 (str. 74).

Clr-g bylo získáno v dostatečné čistotě již pomocí chromatografie na reverzní fázi, jak je vidět z fotografie polyakrylamidového gelu na obr. č. 24 (str. 74), ale přesto byla s částí frakce 5 (100  $\mu$ l) provedena ještě gelová permeační chromatografie (podle kap. 4.5.1), zda je nutné frakci přečišťovat. Z grafu č. 25 (str. 75) je patrné, že spolu s monomerním jsou ve frakci 5 částečně přítomny i oligomery a rozpadové produkty. Bylo rozhodnuto, že frakce č. 5 bude využita i bez dalšího přečišťování.



Obr. č. 25: Eluční profil Clr-g z gelové permeační chromatografie. Byla použita kolona ENrich™ SEC 70 10×300 a průtok 1 ml/min.

#### 5.4.3 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

Po purifikaci byly stanoveny koncentrace proteinů Clr-g a Nkr-p1f v jednotlivých získaných frakcích metodou podle Bradfordové (kap. 4.5.4). Následně z toho byla vypočítána množství proteinů získaná z 1 l LB média (tab. č. 19, str. 76).

V tabulce jsou uvedeny koncentrace frakce 5 pro protein Clr-g a frakce 6 pro protein Nkr-p1f, ve kterých bylo obsaženo největší množství daného proteinu.

**Tab. č. 19: Koncentrace proteinů v daných frakcích a jejich celkové množství z 1 l LB média.** Uvedená koncentrace Clr-g byla získána z frakce 5. Uvedená koncentrace Nkr-p1f byla měřena ve frakci 6, ale množství proteinu bylo určeno z frakce 3-8.

Protein	Koncentrace frakcí $c/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Množství proteinu $m/\text{mg}$
Clr-g	1,4	1,1
Nkr-p1f	1,0	6,5

## 5.5 Ověření totožnosti proteinů Nkr-p1f a Clr-g

Po purifikaci proteinu Clr-g chromatografií na obrácené fázi a proteinu Nkr-p1f afinitní chromatografií byly frakce 5 pro Clr-g a 6 pro Nkr-p1f odsoleny (podle kap. 4.6.1), aby mohla být hmotnostní spektrometrií, konkrétně měřením přesné intaktní hmoty ověřena identita proteinů. Peptidové mapování bylo provedeno na vyříznutém proužku z SDS elektroforézy. V obou případech došlo k potvrzení totožnosti proteinů, a proto bylo přistoupeno k dalším pokusům týkajících se charakterizace struktury a interakce proteinů.

Na obr. č. 26 a v tab. č. 20 (str. 76 a 77) je vypsáno pokrytí sekvence proteinu Clr-g pomocí techniky MALDI-TOF. Obr. č. 27 a tab. č. 21 (str. 76 a 77) představují to samé, ale pro protein Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou. Jsou zde zobrazeny peptidy s přesností do 100 ppm a ty nejintenzivnější byly ověřeny fragmentací.

1 MSTKKTEQII INKTYAACSK **NWTGVGNKCF YFSGYPRNWT FAQAFDMAQE**  
 51 **AQLARFDNEE ELIFLKRFGK DFDCWIGLHR ESSEHPWKWT NNTEYNNMNP**  
 101 **ILGVGRYAYL SSDR**ISSRS **YINR**MWICKS LNNYNLHCQT PPV

**Obr. č. 26: Pokrytí sekvence proteinu Clr-g pomocí techniky MALDI-TOF.** Červeně jsou označeny potvrzené peptidy.

1 MGSSHHHHHH SSGLVPR**GSH MQKPP**IEKCS VAAQENRTEL TGR**SAILECP**  
 51 **RYWHPHWKNC** LFVSQISR PW AEGRDACSME DAILLIENK EELRFVQNLI  
 101 **KGKEQLFFIG LKYVQKEKIW KWIDGSILNP NLLR**ITGKDK ENSCAIISHT  
 151 EVFSDSCSSD NHWICQKTLI HV

**Obr. č. 27: Pokrytí sekvence proteinu Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy technikou MALDI-TOF.** Červeně jsou označeny potvrzené peptidy.

Tab. č. 20: Potvrzené peptidy odpovídající hmotnostnímu spektru proteinu Clr-g z MALDI-TOF. Tučně označené peptidy byly ověřeny fragmentací.

Rozsah peptidu	m/z	Sekvence peptidu	Modifikace
21 – 37	1995,8712	NWTGVGNKCFYFSGYPR	
29 – 37	1139,4959	CFYFSGYPR	
38 – 55	2101,9531	NWTFAQAFDMAQAQLAR	Ox
56 – 66	1396,6549	FDNEEELIFLK	
<b>56 – 67</b>	<b>1552,8207</b>	<b>FDNEEELIFLKR</b>	
68 – 80	1593,7880	FKGDFDCWIGLHR	
81 – 106	3089,3262	ESSEHPWKWTNNTEYNNMNPILGVGR	Ox
<b>89 – 106</b>	<b>2109,0024</b>	<b>WTNNTEYNNMNPILGVGR</b>	Ox
89 – 106	2124,9880	WTNNTEYNNMNPILGVGR	2 Ox
<b>107 – 114</b>	<b>974,4303</b>	<b>YAYLSSDR</b>	
120 - 124	652,2999	SYINR	

Tab. č. 21: Potvrzené peptidy odpovídající hmotnostnímu spektru proteinu Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou z MALDI-TOF. Tučně označené peptidy byly ověřeny fragmentací.

Rozsah peptidu	m/z	Sekvence peptidu	Modifikace
18 – 28	1267,6090	GSHMQKPPIEK	Ox
44 – 51	888,3891	SAILECPR	
52 – 59	1183,4976	YWHPHWNK	Ox
52 – 59	1199,5032	YWHPHWNK	2 Ox
<b>102 – 112</b>	<b>1279,6987</b>	<b>GKEQLFFIGLK</b>	
119 – 134	1954,0107	IWKWIDGSILNPILLR	Ox
<b>122 – 134</b>	<b>1510,7898</b>	<b>WIDGSILNPILLR</b>	
122 - 134	1526,7804	WIDGSILNPILLR	Ox

## 5.6 Charakterizace struktury Nkr-p1f a Clr-g

### 5.6.1 Identifikace zapojení disulfidových vazeb v proteinech

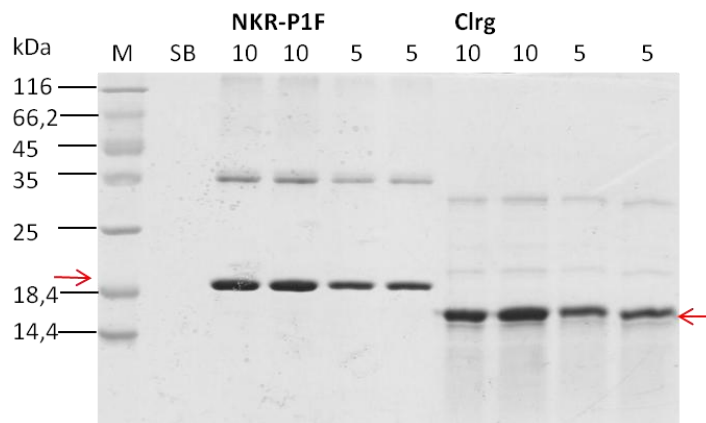
Protein Nkr-p1f obsahuje 7 cysteinů, měl by vytvářet tři disulfidové vazby a přes volnou sulfhydrylovou skupinu by mohl dimerizovat. Toto je ovšem pouze dohad. Protein Clr-g obsahuje 6 cysteinů, které by měly vytvářet tři disulfidové vazby. Přesně zapojení není známo, ale podle literatury [64] byl vytvořen předpoklad zapojení (tab. č. 22, str. 78).

**Tab. č. 22: Zapojení disulfidových vazeb v proteinech Nkr-p1f a Clr-g podle literatury.** Uvedena jsou pravděpodobná zapojení disulfidových vazeb v proteinech. U Nkr-p1f je navíc vypsán také cystein s volnou, do intramolekulární disulfidové vazby nezapojenou, sulfhydrylovou skupinou (-SH).

	<b>Nkr-p1f</b>	<b>Clr-g</b>
<b>Předpokládané disulfidové vazby</b>	48 - 59	17 - 28
	76 - 164	45 - 137
	143 - 156	73 - 127
<b>Cystein s volnou –SH skupinou</b>	28	-

Před vlastní analýzou zapojení disulfidových vazeb z peptidů byla nejprve změřena intaktní hmota proteinů Nkr-p1f a Clr-g, která napověděla počet zapojení disulfidových vazeb a jiných modifikací. Nejprve byly celkem čtyři vzorky z frakce 5 pro Clr-g a z frakce 6 pro Nkr-p1f odsoleny a následně polovina z nich pro kontrolu zredukována roztokem TCEP pro rozpojení disulfidových vazeb (podle kap. 4.6.1). Z naměřených hmot vyplývá, že molekula Clr-g obsahuje dvě disulfidové vazby, jednu volnou sulfhydrylovou skupinu a jednu s navázaným cysteaminem. Pro molekulu Nkr-p1f byly zjištěny tři disulfidové vazby, jedna sulfhydrylová skupina modifikovaná cysteaminem a N-konec zkrácen o methionin (M).

Následně bylo zapojení disulfidových vazeb analyzováno dvěma způsoby hmotnostní spektrometrie, LC-MS a MALDI-TOF, podle kap. 4.6.2. Součástí toho byla neredukující SDS elektroforéza v 15 % polyakrylamidovém gelu na základě kapitoly 4.2.4.1 (obr. č. 28, str. 79).



**Obr. č. 28:** Fotografie gelu z neredukující SDS elektroforézy vzorků proteinů k identifikaci zapojení disulfidových můstků. M= proteinový standard molekulových hmotností. Vzorek Nkr-p1f byl odebrán z frakce č. 6 afinitní chromatografie. Vzorek Clr-g z frakce č. 5 z chromatografie na reverzní fázi. Dráhy jsou označeny nanášeným objemem vzorku. Označená část gelu odpovídající monomerům proteinů byla následně vyříznuta.

Po SDS elektroforéze byla vyříznuta označená část, provedeno štěpení proteinů v gelu trypsinem, izolace peptidů z gelu, odsolení roztoků a následně vlastní analýza na hmotnostním spektrometru FT-ICR SolariX XR<sup>TM</sup>. Konečné výsledky obou způsobů hmotnostní spektrometrie jsou uvedeny v tab. č. 23 (str. 80).

V extracelulární části Clr-g byla nalezena tato nejčastější zapojení: první cystein s druhým, třetí s pátým a čtvrtý s šestým, i když měření intaktní hmoty byly odhaleny pouze zapojení dvě. Toto získané rozložení disulfidových vazeb je pravděpodobně špatné, liší se od očekávaného výsledku. U proteinu Nkr-p1f byla zjištěna pouze část zapojení disulfidových vazeb, a to druhý s třetím a šestý se sedmým. I když jich bylo prokázáno málo, potvrzují předchozí předpoklad zapojení disulfidových vazeb narozdíl od proteinu Clr-g. Vysvětlením tohoto stavu by mohl být „scrambling disulfidů“, kdy nedojde vlivem okolních podmínek ke správnému (nativnímu) zapojení disulfidových vazeb a sbalení proteinu.

**Tab. č. 23: Výsledky identifikace zapojení disulfidových vazeb proteinů Nkr-p1f a Clr-g.** Disulfidové můstky označené *kurzívou* byly nalezeny u velmi velkého počtu peptidů. Ty ostatní byly také rozšířené, i když méně. Přeškrtnutá disulfidová vazba byla také rozšířená, ale odporuje zjištěným datům i teoretickým interakcím.

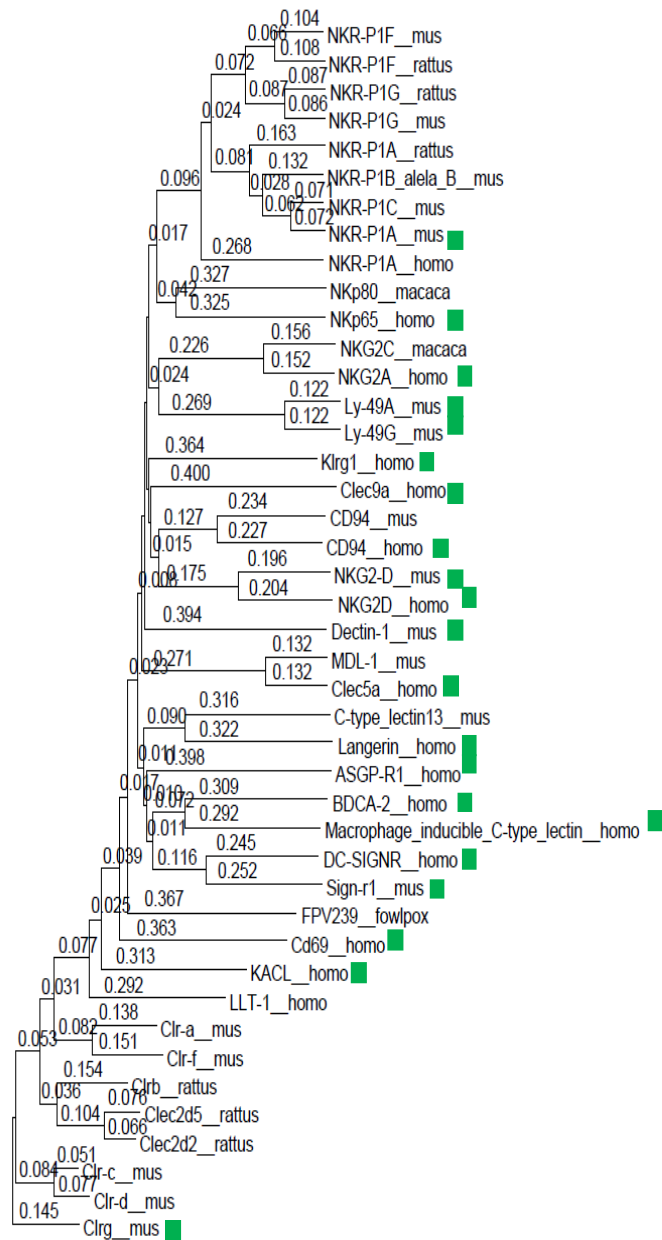
	<b>Nkr-p1f</b>	<b>Clr-g</b>
<b>MALDI-TOF</b>	48 – 59	17 - 28
	143 – 156	45 – 127
		73 - 137
<b>LC-MS</b>	<i>48 - 59</i>	17 – 28
		45 – 127
		<del>28 – 137</del>

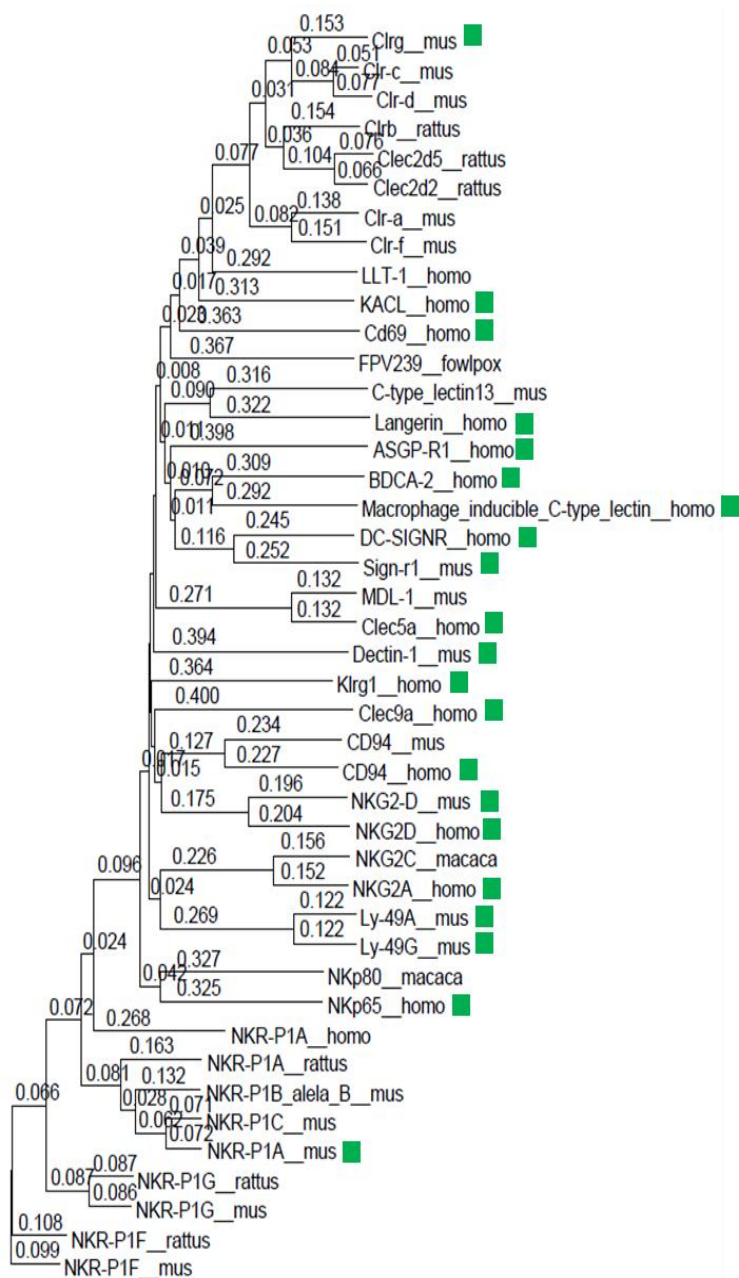
### 5.6.2 Sekvenční alignment

Postup sekvenčního alignmentu je popsán v kap. 4.7. Tato metoda byla vybrána pro zjištění určitých strukturních vlastností sekvenčně příbuzných proteinů, které by tedy mohly platit i u Nkr-p1f a Clr-g.



Tyto stromy sekvenční příbuznosti (obr. č. 29, str. 81 a 82) jsou zaměřeny na oba zástupce, Clr-g i Nkr-p1f. Jednotliví zástupci byly popsány jejich jménem a organismem, ze kterého pochází. Zeleně označené proteinové molekuly mají již určenou strukturu. Proto byly vybrány k porovnávání strukturních vlastností. Čím více jsou si dané proteiny sekvenčně podobné, tím je mezi nimi kratší vzdálenost (součet délek ramének mezi nimi).





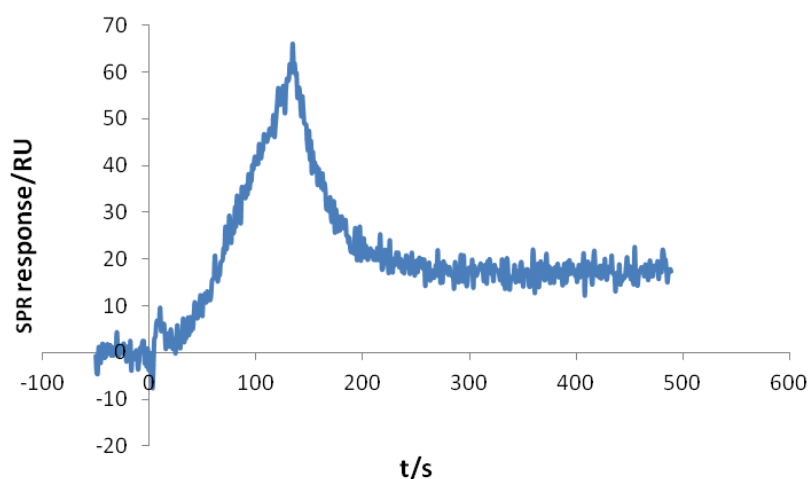
**Obr. č. 29: Stromy sekvenční příbuznosti vytvořené ze sekvenčního alignmentu pro proteiny C1r-g a Nkr-p1f.**

Zeleně označené proteinové molekuly mají již známou proteinovou strukturu. Proteiny označené: homo pochází z homo sapiens sapiens, mus pochází z mus musculus, rattus pochází z rattus norvegicus, macaca pochází z macaca mulata, fowlpox pochází z viru fowlpox. Sekvenčně podobné proteiny mají nejmenší vzdálenost ramének mezi sebou.

## 5.7 Studium interakce celých extracelulárních částí Nkr-p1f s Clr-g

### 5.7.1 Povrchová plasmonová rezonance (SPR)

Interakce proteinů Nkr-p1f a Clr-g byla zkoušena technikou povrchové plasmonové rezonance (SPR; kap. 4.8.1). Ligandem imobilizovaným na sensorovém čipu byl Nkr-p1f pomocí své polyhistidinové kotvy. Analyt, tedy Clr-g, byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru, kterým byl omýván sensorový čip při vlastní analýze. Výsledný senzogram je uveden na obr. č. 30 (str. 83).



Obr. č. 30: SPR senzogram při testování interakce proteinu Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou a proteinu Clr-g. Specifická interakce nebyla prokázána. Popis průběhu senzogramu: před časem 0 s byl ligand navázán na čipu a promýván samotným pufrém; v čase 0 s byl do pufru přidán analyt; v čase 120 s byl čip opět promýván samotným pufrém. Křivka do 120 s je nazývána asociační, po 120 s disociační.

Pomocí SPR nebyla specifická interakce proteinů Nkr-p1f a Clr-g prokázána. Docházelo pouze k interakci nespecifické a vazbě Clr-g na sensorový čip.

Měření a vyhodnocení bylo provedeno mnou a Mgr. Ladislavem Bumbou, Ph.D.

## 6. DISKUZE

Proteinová interakce receptoru Nkr-p1f s ligandem Clr-g na buněčné úrovni byla poprvé popsána v roce 2003 ve článku doktora Izuky, Naidenka a Plougastela [68]. Princip tohoto testu byla transfekce reportérové buněčné linie BWZ.36 chimerní cDNA, která kóduje cytoplazmatickou doménu kostimulační molekuly CD3 $\zeta$  fúzovanou s transmembránovou doménou Ly49a a s extracelulární doménou Nkr-p1f, a následné testování stimulace buněk. Nejprve bylo zjištěno, že buňky nesoucí tyto konstrukty vykazují stimulaci v důsledku interakce s nádorovou buněčnou linií MC47 a 2PK. Poté postupně pomocí těchto dvou buněčných linií a rozpustných tetramerů Nkr-p1f byl odhalen jejich ligand, proteinová molekula Clr-g [68].

Molekulární mechanismus vazby těchto proteinů nebyl dosud odhalen. Do této doby byla popsána jen struktura dimerní molekuly Clr-g z myšího kmene B6 [97], i když již bylo oznámeno v roce 2003, že byl redakcí přijat článek o krystalové struktuře komplexu Nkr-p1f s Clr-g a jejich mutační analýze [68]. Bohužel dodnes článek ještě nebyl vydán. Existuje jediný model lidského receptor-ligandového páru, který je k těmto proteinům homologní, a tím je dimerní molekula KACL, která váže dvě monomerní molekuly NKp65.

Struktura a interakce proteinů Nkr-p1f s Clr-g byla studována kvůli tomu, aby došlo k objasnění a lepšímu pochopení funkce NK buněk, které hrají důležitou roli v protinádorové a antivirové obraně těla. Není přesně známa funkce interakce těchto proteinů. Ví se pouze to, že interakce OCILRP2, kratší o čtyři aminokyseliny v intracelulární doméně než Clr-g, spolu s Nkr-p1f spouští mnoho dějů. Indukují zrání a diferenciaci DC, a slouží jako kostimulační signál proliferace T lymfocytů a produkce IL-2 [54]. Proto by tedy tyto proteiny mohly také hrát důležitou roli při mezibuněčných kontaktech.

Cílem této práce bylo připravit DNA konstrukt pro extracelulární část proteinu Nkr-p1f a spolu s již připraveným plazmidem pro extracelulární část proteinu Clr-g je využít k produkci proteinů v bakteriálním expresním systému. Následně proteiny renaturovat za vhodných podmínek, přečistit je vhodnou chromatografickou metodou a pomocí hmotnostní spektrometrie získat základní informace o struktuře proteinů. Nakonec také otestovat jejich interakci pomocí povrchové plasmonové rezonance. Získaná základní data o struktuře a interakci by mohla posloužit podrobnějšímu zkoumání.

Prvním krokem diplomové práce byla amplifikace celé extracelulární sekvence Nkr-p1f metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) za využití specifických primerů obsahujících sekvence pro restriční endonukleasy *HindIII* a *NdeI*. Jako templát sloužila komerčně připravená plazmidová DNA NKR-P1F-pcDNA3.1(+) od firmy Shanghai Biotech, která obsahovala sekvenci pro celý gen NKR-P1F. Připravené fragmenty byly nejprve ligovány do vektoru pBlueScript SK(+), se kterým mohla být uskutečněna bakteriální transformace klonovacích buněk NovaBlue kmene *E. coli* spolu s technikou „Blue-white screening“. Tato metoda nám dovolila rozlišit mezi bakteriemi transformovanými vektory s rekombinantní DNA a buňkami transformovanými samotnými vektory.

Fragmenty byly nejprve ligovány do vektoru pBlueScript SK(+) z toho důvodu, že nám nefungovalo štěpení restriční endonukleasou *NdeI* na kraji sekvence, i když někteří kolegové v laboratoři tímto způsobem údajně bez problému štěpí. Při PCR byla použita Deep Vent DNA polymerasa, která vytváří u fragmentů DNA tupé konce. Po rozštěpení vektoru pBlueScript SK(+) restriční endonukleasou *SmaI*, také tvořící tupé konce, mohly být fragmenty do tohoto plazmidu přímo ligovány. Navíc nám tento vektor umožnil provést techniku „Blue-white screening“. Další možností kromě použití tohoto vektoru by bylo prodloužení specifických primerů, které by byly dražší a současně by mohl nastat problém s velmi rozdílnou teplotou tání celé sekvence a sekvence nasedající v prvních cyklech PCR reakce.

I když nám bylo známo, že máme kolonie s vektory obsahující rekombinantní DNA, nevěděli jsme, zda obsahují správnou DNA. Proto byla z osmi náhodně vybraných kolonií izolována DNA a provedeno restriční štěpení endonukleasami *HindIII*, *KpnI* a *SacI*. Ve dvou z nich byla ověřena přítomnost správné DNA. Po středněobjemové izolaci DNA z jedné z těchto kultur bylo získáno 70 µg plazmidové DNA.

Při metodě PCR byla do vektoru oligonukleotidovými sondami vnesena místa pro restriční endonukleasy *NdeI* a *HindIII*, která byla nyní využita k restrikci fragmentů odpovídajících extracelulární části Nkr-p1f. U proteinu Nkr-p1f byla potřeba forma s i bez polyhistidinové kotvy kvůli budoucím pokusům, proto byly potřeba dva různé vektory, pET-30a(+) a pET-28b(+). Ty byly štěpeny stejnými restričními endonukleasami jako produkt PCR a posloužily k tvorbě plazmidů pNkr-p1fhis a pNkr-p1f. Stejným způsobem jako výše byla ověřena správnost ligace, která byla úspěšnější u pNkr-p1f.

Oba plazmidy byly izolovány velkoobjemově s výtěžkem 99 µg pNkr-p1fhis a 66 µg pNkr-p1f. Správnost sekvence byla potvrzena sekvenováním, proto bylo možné s těmito dvěma plazmidy a plazmidem pClr-g pokračovat expresí proteinů. Toto pracovní schéma přípravy plazmidů obsahujících sekvenci pro určité proteiny je v laboratoři běžně používané, a proto podle očekávání nenastaly žádné výrazné obtíže.

Všechny tyto plazmidy mají společné to, že obsahují celou extracelulární doménu, tedy i krček. Tento krček (stonek) rozděluje lektinům podobnou doménu C-typu a transmembránovou doménu. Poslední dobou začíná být dáván důraz na důležitost přítomnosti krčku při vazbě ligandu na receptor, např. u Ly49C [106], NKp65 [100] a NKG2A/CD94 [121].

Pro vlastní expresi proteinů Nkr-p1f a Clr-g byl vybrán bakteriální expresní systém díky své časové a ekonomické nenáročnosti. Na druhou stranu, ale nedochází k posttranslačním modifikacím, které mohou být rozhodující pro vytvoření správné struktury a interakce mezi nimi. Jeden typ modifikace, N-glykosylace, se ukazuje u některých členů této proteinové rodiny důležitý (NKG2D [115], [116]), protože přispívá ke zlepšení distribuce náboje a interakce s ligandem.

Po bakteriální transformaci produkčních buněk kmene *E. coli* BL21-Gold (DE3) vektory pNkr-p1fhis, pNkr-p1f a pClr-g metodou tepelného šoku byla testována rekombinantní exprese proteinů +/- testem. Pomocí SDS elektroforetické analýzy v polyakrylamidovém gelu byla potvrzena produkce všech proteinů v bakteriálních kulturách indukovaných roztokem IPTG. Při proběhlých testech exprese vykazovaly vždy všechny testované bakteriální kolonie expresi našich proteinů. Proto bylo v průběhu práce upuštěno od testování kolonií před každou další produkcí proteinů. Na všechny kroky produkce a purifikace proteinů byla použita k vizualizaci výsledků SDS elektroforéza v 15% agarosovém gelu. Dále s vybranou neindukovanou bakteriální kulturou Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy byly hledány vhodné podmínky pro velkoobjemovou produkci, jako jsou koncentrace induktoru IPTG, délka a teplota produkce. Tyto podmínky jsou obvykle testovány z důvodu zvýšení výtěžku a zkrácení produkčního času. Pro Clr-g nebyly podmínky hledány, neboť byl již postup produkce vypracován dříve členem naší laboratoře (Mgr. Ljubina Ivanova).

Dalším krokem k získání proteinů byla velkoobjemová produkce za podmínek, které byly určeny testováním. Výsledky několika různých podmínek produkce se jevily velmi podobné a uspokojivé, proto byl čas produkce vybrán podle Clr-g kvůli zjednodušení a maximálnímu sjednocení obou produkcí. Při produkci proteinu Nkr-p1f se vyplatilo snížit koncentraci induktoru IPTG z ekonomických důvodů. Po centrifugaci získaných bakteriálních kultur z nich byla izolována inkluzní tělíska, v jejichž formě jsou tyto proteiny produkovány podobně jako ostatní proteiny z této rodiny produkované v naší laboratoři.

Následovala solubilizace a renaturace, přičemž bylo třeba najít vhodné složení renaturačního pufru, který dovolí proteinům poskládat se do správné rozpustné formy. Při renaturaci byla použita metoda rychlého naředění, která se v naší laboratoři pro tuto skupinu proteinů používá s velmi dobrými výsledky. Z tohoto důvodu nebyla vyzkoušena jiná technika. Množství přítomnosti nežádoucích agregátů bylo zkoumáno pomocí gelové permeační chromatografie, která odhalila menší vliv složení pufru na renaturaci Clr-g a větší na renaturaci Nkr-p1f. Pro každý protein byl vybrán nejvhodnější renaturační pufr, což znamená pufr č. 4 pro Nkr-p1f (nejvíce dimerní formy a nízká koncentrace argininu) a pufr č. 2 pro Clr-g (nejvyšší zastoupení monomerní formy). Pro další experimenty je však potřeba převést protein do vhodnějšího pufru a vyšší koncentrace dialýzou a koncentrováním na membránových koncentrátorech. V tomto kroku docházelo k vysokým ztrátám obou proteinů, které precipitovaly již při relativně nízkých koncentracích (3 mg/ml).

Po několika metodách purifikace proteinu Clr-g byla vybrána chromatografie na reverzní fázi, kterou následovala gelová permeační chromatografie. Protože se mi nepodařilo najít vhodnou metodu purifikace proteinu Nkr-p1f bez polyhistidinové kotvy, která by poskytla větší množství proteinu o dostatečné čistotě, byla provedena purifikace Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou pomocí afinitní chromatografie. Z důvodu precipitace Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou při vyšších koncentracích byl při afinitní chromatografii použit zfiltrovaný vzorek ihned po dialýze. Výtěžek extracelulárních částí rekombinantních proteinů z 1 l LB média se pro Clr-g rovnal 1,1 mg a pro Nkr-p1f s polyhistidinovou kotvou 6,5 mg proteinu.

Totožnost rekombinantních proteinů byla potvrzena hmotnostní spektrometrií metodou mapování peptidů. Následovalo měření intaktní hmoty obou proteinů technikou

ESI-FT-ICR MS, při které byly získány hodnoty experimentálních molekulových hmotností. Z experimentálních výsledků byly u Clr-g prokázány dvě disulfidové vazby, jedna volná sulfhydrylová skupina a jedna s navázaným cysteaminem. Pro protein Nkr-p1f byly zjištěny tři disulfidové vazby a zbylá sulfhydrylová skupina modifikována cysteaminem. Již tyto výsledky naznačovaly špatné zapojení disulfidových vazeb u proteinu Clr-g a tedy i složení proteinu.

Přesto byly pozice disulfidových vazeb identifikovány. Nejdříve byly vzorky analyzovány elektroforeticky v neredukujícím polyakrylamidovém gelu, poté byly proteiny vyříznuty z gelu, rozštěpeny trypsinem a po extrakci z gelu analyzovány technikami MALDI-TOF a LC-MS. U proteinu Nkr-p1f byly sice správně identifikovány tři vazby, ale pouze jedna z nich odpovídala obecně podobě lektinům podobné domény C-typu [64].

Kvůli zjištění vzdáleností mezi jednotlivými aminoskupinami postraních řetězců lysinů a N-konce proteinů mělo být provedeno chemické síťování, které se nepodařilo provést z důvodů srážení proteinů během koncentrování a krátké době života proteinu Nkr-p1f (rychlá degradace proteinu v roztoku). Proto nebyla tato metoda ani negativní výsledky v této diplomové práci popisována.

Interakce proteinů Nkr-p1f a Clr-g byla testována citlivou metodou, povrchovou plasmonovou rezonancí (SPR), v prostředí fosfátového pufru. Jako ligand byl na čipu pokrytém tenkou vrstvou zlata imobilizován polyhistidinovou kotvou protein Nkr-p1f. Protein Clr-g fungoval jako analyt a byl umístěn ve fosfátovém pufru. Technikou SPR nebyla interakce mezi receptorem Nkr-p1f a jeho ligandem Clr-g potvrzena. Tento výsledek byl víceméně očekáván, vzhledem k výsledkům analýzy disulfidů a chování proteinů při síťování.

Výsledky charakterizace struktury a interakce těchto proteinů jsou zřejmě ovlivněny použitou renaturací. Ovšem neznáme případ, kdy by byla použita jiná funkční technika renaturace této skupiny proteinů. Navíc bylo testováno více složení renaturačních pufrů než je uvedeno v této práci, ale renaturace proteinů v nich dopadla stejně nebo hůře.

Příští postup nemá smysl soustředit na hledání pufrů pro metodu rychlého naředění, ale spíše vyzkoušet renaturaci imobilizovaného proteinu na chromatografické koloně. Případně by bylo vhodné provést produkci i v jiném expresním systému, který by dokázal produkovat přímo nativní protein. Bakteriální expresní systém byl však zvolen také



vzhledem ke konečnému cíli celého projektu, kterým by měla být kokrytalizace obou proteinů, kterou by případné posttranslační modifikace značně komplikovaly.

## 7. ZÁVĚR

- Byly připraveny dva DNA konstrukty (pNKR-P1Fhis, pNKR-P1F), které kódují celou extracelulární část proteinu NKR-P1F
- Byly vyprodukovány celé extracelulární části proteinů NKR-P1F a Clr-g v prokaryotickém expresním systému
  - byly nalezeny vhodné podmínky pro expresi proteinu NKR-P1F a také pro renaturaci proteinů NKR-P1F a Clr-g
  - renaturované proteiny byly purifikovány různými metodami: afinitní chromatografií pro NKR-P1F a chromatografií na reverzní fázi pro Clr-g
  - nakonec byly proteiny potvrzeny hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF
- Částečně zjištěné zapojení disulfidových můstků pomohlo k charakterizaci struktur obou proteinů
- Pomocí biofyzikální techniky povrchové plasmonové rezonance (SPR) nebyla zjištěna interakce celých extracelulárních částí proteinu NKR-P1F spolu se svým ligandem Clr-g

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., Pillai, S.: Cellular and Molecular Immunology. 7th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia (2012)
- [2] Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie. 4. ed., TRITON, Praha (2009)
- [3] Burmester, È., Pezzutto, A.: Color Atlas of Immunology. Thieme, New York (2003)
- [4] Roitt, I., Delves, P.: Roitt's essential immunology. 10th ed., Blackwell Science, Oxford (2001)
- [5] Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: Eur. J. Immunol. 5, 112–7 (1975)
- [6] Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., Wigzell, H.: Eur. J. Immunol. 5, 117–21 (1975)
- [7] Pross, H. F., Jondal, M.: Clin. Exp. Immunol. 21, 226–35 (1975)
- [8] Herberman, R. B., Nunn, M. E., Lavrin, D. H.: Int. J. Cancer 16, 216–29 (1975)
- [9] Horwitz, D. A., Bakke, A. C.: Immunol. Today 5, 148–53 (1984)
- [10] Ligthart, G., Schuit, H., Hijmans, W.: Immunology 55, 15–21 (1985)
- [11] Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., Vivier, E.: Nat. Rev. Immunol. 13, 145–9 (2013)
- [12] Trinchieri, G.: Adv. Immunol. 47, 187–376 (1989)
- [13] Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., Ugolini, S.: Science 331, 44–9 (2011)
- [14] Moretta, L., Moretta, A.: EMBO J. 23, 255–9 (2004)
- [15] Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L., Yokoyama, W. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 2731–6 (2000)
- [16] Biron, C. a, Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., Salazar-Mather, T. P.: Annu. Rev. Immunol. 17, 189–220 (1999)
- [17] McClory, S., Hughes, T., Freud, A. G., Briercheck, E. L., Martin, C., Trimboli, A. J., Yu, J., Zhang, X., Leone, G., Nuovo, G., Caligiuri, M. a: J. Clin. Invest. 122, 1403–15 (2012)
- [18] Yu, J., Freud, A. G., Caligiuri, M. a: Trends Immunol. 34, 573–82 (2013)

- [19] Zwirner, N. W., Domaica, C. I.: *Biofactors* 36, 274–88 (2010)
- [20] Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. a., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C. L., Joyce, S., Peschon, J. J.: *J. Exp. Med.* 191, 771–780 (2000)
- [21] Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G., Bryceson, Y. T.: *Blood* 115, 2167–76 (2010)
- [22] Grzywacz, B., Kataria, N., Sikora, M., Oostendorp, R. a, Dzierzak, E. a, Blazar, B. R., Miller, J. S., Verneris, M. R.: *Blood* 108, 3824–33 (2006)
- [23] Kim, S., Iizuka, K., Kang, H.-S. P., Dokun, A., French, A. R., Greco, S., Yokoyama, W. M.: *Nat. Immunol.* 3, 523–8 (2002)
- [24] Elliott, J. M., Yokoyama, W. M.: *Trends Immunol.* 32, 364–72 (2011)
- [25] Min-Oo, G., Kamimura, Y., Hendricks, D. W., Nabekura, T., Lanier, L. L.: *Trends Immunol.* 34, 251–8 (2013)
- [26] Mailliard, R. B., Alber, S. M., Shen, H., Watkins, S. C., Kirkwood, J. M., Herberman, R. B., Kalinski, P.: *J. Exp. Med.* 202, 941–53 (2005)
- [27] Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., Walzer, T.: *Immunol. Rev.* 220, 169–82 (2007)
- [28] Zhang, Y., Wallace, D. L., de Lara, C. M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., Griffin, G. E., Taylor, G. P., Tough, D. F., Beverley, P. C. L., Macallan, D. C.: *Immunology* 121, 258–65 (2007)
- [29] Jamieson, A. M., Isnard, P., Dorfman, J. R., Coles, M. C., Raulet, D. H.: *J. Immunol.* 172, 864–70 (2004)
- [30] Walzer, T., Bléry, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S. H., Jaeger, S., André, P., Gauthier, L., Daniel, L., Chemin, K., Morel, Y., Dalod, M., Imbert, J., Pierres, M., Moretta, A., Romagné, F., Vivier, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3384–9 (2007)
- [31] Zhang, C., Zhang, J., Tian, Z.: *Cell. Mol. Immunol.* 3, 241–54 (2006)
- [32] Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., Moretta, a: *Scand. J. Immunol.* 55, 229–32 (2002)
- [33] Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., Moretta, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10116–21 (2004)
- [34] Lodoen, M. B., Lanier, L. L.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 59–69 (2005)

- [35] Raulet, D. H., Vance, R. E.: *Nat. Rev. Immunol.* 6, 520–31 (2006)
- [36] Ljunggren, H. G., Kärre, K.: *J. Exp. Med.* 162, 1745–59 (1985)
- [37] Krzewski, K., Coligan, J. E.: *Front. Immunol.* 3, 335 (2012)
- [38] Kurschus, F. C., Fellows, E., Stegmann, E., Jenne, D. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13799–804 (2008)
- [39] Regner, M., Müllbacher, A.: *Immunol. Cell Biol.* 82, 161–9 (2004)
- [40] Susanto, O., Trapani, J. a, Brasacchio, D.: *Tissue Antigens* 80, 477–87 (2012)
- [41] Fraser, S. A., Karimi, R., Michalak, M., Hudig, D.: *J. Immunol.* 164, 4150–5 (2000)
- [42] Bird, C. H., Sutton, V. R., Sun, J., Hirst, C. E., Novak, A., Kumar, S., Trapani, J. A., Bird, P. I.: *Mol. Cell. Biol.* 18, 6387–98 (1998)
- [43] Catalfamo, M., Henkart, P. a: *Curr. Opin. Immunol.* 15, 522–527 (2003)
- [44] Weiner, L. M., Surana, R., Wang, S.: *Nat. Rev. Immunol.* 10, 317–27 (2010)
- [45] Seidel, U. J. E., Schlegel, P., Lang, P.: *Front. Immunol.* 4, 76 (2013)
- [46] Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., Long, E. O.: *Blood* 107, 159–66 (2006)
- [47] Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. a, Street, S. E. a, Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L. H., Degli-Esposti, M. a, Hayakawa, Y.: *Mol. Immunol.* 42, 501–10 (2005)
- [48] Cooper, M. a, Fehniger, T. a, Caligiuri, M. a: *Trends Immunol.* 22, 633–640 (2001)
- [49] Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S.: *Nat. Immunol.* 9, 503–10 (2008)
- [50] Moretta, a, Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., Moretta, L.: *Cell Death Differ.* 15, 226–33 (2008)
- [51] Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., Vivier, E.: *Blood* 106, 2252–8 (2005)
- [52] Morandi, B., Bougras, G., Muller, W. a, Ferlazzo, G., Münz, C.: *Eur. J. Immunol.* 36, 2394–400 (2006)
- [53] Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., Trinchieri, G.: *J. Exp. Med.* 195, 327–33 (2002)

- [54] Chai, L., Wu, S., Liu, G., Wang, Z., Tian, W., Ma, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 836–42 (2014)
- [55] Tian, W., Feng, B., Liou, H.-C.: *Cell. Immunol.* 235, 72–84 (2005)
- [56] Tian, W., Nunez, R., Cheng, S., Ding, Y., Tumang, J., Lyddane, C., Roman, C., Liou, H.-C.: *Cell. Immunol.* 234, 39–53 (2005)
- [57] Koopman, L. a, Kopcow, H. D., Rybalov, B., Boyson, J. E., Orange, J. S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C. J., Schachter, A. D., Park, P. J., Strominger, J. L.: *J. Exp. Med.* 198, 1201–12 (2003)
- [58] Winger, E. E., Reed, J. L.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 70, 1–9 (2013)
- [59] Tian, Z., Gershwin, M. E., Zhang, C.: *J. Autoimmun.* 39, 206–15 (2012)
- [60] Aktas, E., Akdis, M., Bilgic, S., Disch, R., Falk, C. S., Blaser, K., Akdis, C., Deniz, G.: *Clin. Exp. Immunol.* 140, 301–9 (2005)
- [61] Vivier, E., Ugolini, S.: *Nature* 66, 2010–2010 (2010)
- [62] Vivier, E., Ugolini, S.: *Front. Immunol.* 2, 18 (2011)
- [63] Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R. a., Margulies, D. H.: *Annu. Rev. Immunol.* 20, 853–85 (2002)
- [64] Zelensky, A. N., Gready, J. E.: *FEBS J.* 272, 6179–217 (2005)
- [65] Kelley, J., Walter, L., Trowsdale, J.: *PLoS Genet.* 1, 129–39 (2005)
- [66] Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F. M.: *Nat. Rev. Immunol.* 3, 304–16 (2003)
- [67] Hao, L., Klein, J., Nei, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3192–7 (2006)
- [68] Iizuka, K., Naidenko, O. V, Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M.: *Nat. Immunol.* 4, 801–807 (2003)
- [69] Bork, P., Holm, L., Sander, C.: *J. Mol. Biol.* 242, 309–20 (1994)
- [70] Dong, X., Xu, F., Gong, Y., Gao, J., Lin, P., Chen, T., Peng, Y., Qiang, B., Yuan, J., Peng, X., Rao, Z.: *J. Biol. Chem.* 281, 10610–7 (2006)
- [71] Martin, A. M., Kulski, J. K., Witt, C., Pontarotti, P., Christiansen, F. T.: *Trends Immunol.* 23, 81–88 (2002)
- [72] Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225–74 (2005)

- [73] Van Bergen, J., Trowsdale, J.: *Front. Immunol.* 3, 394 (2012)
- [74] Campbell, K. S., Hasegawa, J.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 536–44 (2013)
- [75] Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Böll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M., Engert, A.: *Immunity* 27, 965–74 (2007)
- [76] Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S. D.: *J. Exp. Med.* 206, 1495–503 (2009)
- [77] Zelensky, A. N., Gready, J. E.: 477, 466–477 (2003)
- [78] Sovová, Z., Kopecký, V., Pazderka, T., Hofbauerová, K., Rozbeský, D., Vaněk, O., Bezouška, K., Ettrich, R.: *J. Mol. Model.* 17, 1353–70 (2011)
- [79] Kirkham, C. L., Carlyle, J. R.: *Front. Immunol.* 5, 214 (2014)
- [80] Carlyle, J. R., Mesci, a., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L.-H., Rousselle, E., Troke, a. D., Proteau, M.-F., Makrigiannis, a. P.: *J. Immunol.* 176, 7511–7524 (2006)
- [81] Colonna, M., Moretta, A., Vély, F., Vivier, E.: *Immunol. Today* 21, 428–31 (2000)
- [82] Bartel, Y., Bauer, B., Steinle, A.: *Front. Immunol.* 4, 362 (2013)
- [83] Vogler, I., Steinle, A.: *J. Innate Immun.* 3, 227–35 (2011)
- [84] Giorda, R., Trucco, M.: *J. Immunol.* 147, 1701–1708 (1991)
- [85] Plougastel, B., Matsumoto, K., Dubbelde, C., Yokoyama, W. M.: *Immunogenetics* 53, 592–8 (2001)
- [86] Kveberg, L., Dai, K.-Z., Inngjerdigen, M., Brooks, C. G., Fossum, S., Vaage, J. T.: *Immunogenetics* 63, 429–36 (2011)
- [87] Lanier, L. L.: *Immunity* 6, 371–8 (1997)
- [88] Carlyle, J. R., Mesci, A., Fine, J. H., Chen, P., Bélanger, S., Tai, L.-H., Makrigiannis, A. P.: *Semin. Immunol.* 20, 321–30 (2008)
- [89] Zhang, Q., Rahim, M. M. a, Allan, D. S. J., Tu, M. M., Belanger, S., Abou-Samra, E., Ma, J., Sekhon, H. S., Fairhead, T., Zein, H. S., Carlyle, J. R., Anderson, S. K., Makrigiannis, A. P.: *PLoS One* 7, e50561 (2012)
- [90] Aust, J. G., Gays, F., Mickiewicz, K. M., Buchanan, E., Brooks, C. G.: *J. Immunol.* 183, 106–16 (2009)

- [91] Mesci, A., Ljusic, B., Makrigiannis, A. P., Carlyle, J. R.: *Immunol. Res.* 35, 13–26 (2006)
- [92] Kveberg, L., Dai, K.-Z., Westgaard, I. H., Daws, M. R., Fossum, S., Naper, C., Vaage, J. T.: *Eur. J. Immunol.* 39, 541–51 (2009)
- [93] Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* 16, 359–93 (1998)
- [94] Vivier, E., Nunès, J. a, Vély, F.: *Science* 306, 1517–9 (2004)
- [95] Lanier, L. L.: *Nat. Immunol.* 9, 495–502 (2008)
- [96] Zhou, H., Kartsogiannis, V., Quinn, J. M. W., Ly, C., Gange, C., Elliott, J., Ng, K. W., Gillespie, M. T.: *J. Biol. Chem.* 277, 48808–15 (2002)
- [97] Skálová, T., Kotýnková, K., Dušková, J., Hašek, J., Koval, T., Kolenko, P., Novák, P., Man, P., Hanč, P., Vaněk, O., Bezouška, K., Dohnálek, J.: *J. Immunol.* 189, 4881–9 (2012)
- [98] Chambers, W. H., Vujanovic, N. L., Deleo, A. B., Olszowy, M. W., Herberman, R. B., Hiserodt, J. C.: *J. Exp. Med.* 169, 1373–1389 (1989)
- [99] Ryan, J. C., Turck, J., Niemi, E. C., Yokoyama, W. M., Seaman, W. E.: *J. Immunol.* 149, 1631–5 (1992)
- [100] Li, Y., Wang, Q., Chen, S., Brown, P. H., Mariuzza, R. a: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11505–10 (2013)
- [101] Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K. M., Schitteck, B., Steinle, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5100–5 (2010)
- [102] Nagae, M., Ikeda, A., Kitago, Y., Matsumoto, N., Yamamoto, K., Yamaguchi, Y.: *Proteins* 82, 1512–8 (2014)
- [103] Li, Y., Hofmann, M., Wang, Q., Teng, L., Chlewicki, L. K., Pircher, H., Mariuzza, R. a: *Immunity* 31, 35–46 (2009)
- [104] Brown, J., O’Callaghan, C. A., Marshall, A. S. J., Gilbert, R. J. C., Siebold, C., Gordon, S., Brown, G. D., Jones, E. Y.: *Protein Sci.* 16, 1042–52 (2007)
- [105] Kolenko, P., Rozbeský, D., Vaněk, O., Bezouška, K., Hašek, J., Dohnálek, J.: *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 1519–23 (2011)
- [106] Deng, L., Cho, S., Malchiodi, E. L., Kerzic, M. C., Dam, J., Mariuzza, R. a: *J. Biol. Chem.* 283, 16840–9 (2008)



- [107] Tormo, J., Natarajan, K., Margulies, D. H., Mariuzza, R. A.: *Nature* 402, 623–31 (1999)
- [108] Feinberg, H., Mitchell, D. a, Drickamer, K., Weis, W. I.: *Science* 294, 2163–6 (2001)
- [109] Meier, M., Bider, M. D., Malashkevich, V. N., Spiess, M., Burkhard, P.: *J. Mol. Biol.* 300, 857–65 (2000)
- [110] Feinberg, H., Powlesland, A. S., Taylor, M. E., Weis, W. I.: *J. Biol. Chem.* 285, 13285–93 (2010)
- [111] Chatwell, L., Holla, A., Kaufer, B. B., Skerra, A.: *Mol. Immunol.* 45, 1981–94 (2008)
- [112] Snyder, G. a, Colonna, M., Sun, P. D.: *J. Mol. Biol.* 347, 979–89 (2005)
- [113] Mitchell, D. a, Fadden, a J., Drickamer, K.: *J. Biol. Chem.* 276, 28939–45 (2001)
- [114] Rosen, D. B., Cao, W., Avery, D. T., Tangye, S. G., Liu, Y.-J., Houchins, J. P., Lanier, L. L.: *J. Immunol.* 180, 6508–6517 (2008)
- [115] Li, P., McDermott, G., Strong, R. K.: *Immunity* 16, 77–86 (2002)
- [116] Bauer, S., Croh, V., Wu, J., Steinle, A.: 285, 727–730 (1999)
- [117] Zhang, J.-G., Czabotar, P. E., Policheni, A. N., Caminschi, I., Wan, S. S., Kitsoulis, S., Tullett, K. M., Robin, A. Y., Brammananth, R., van Delft, M. F., Lu, J., O’Reilly, L. a, Josefsson, E. C., Kile, B. T., Chin, W. J., Mintern, J. D., Olshina, M. a, Wong, W., Baum, J., Wright, M. D., Huang, D. C. S., Mohandas, N., Coppel, R. L., Colman, P. M., Nicola, N. a, Shortman, K., Lahoud, M. H.: *Immunity* 36, 646–57 (2012)
- [118] Sullivan, L. C., Clements, C. S., Beddoe, T., Johnson, D., Hoare, H. L., Lin, J., Huyton, T., Hopkins, E. J., Reid, H. H., Wilce, M. C. J., Kabat, J., Borrego, F., Coligan, J. E., Rossjohn, J., Brooks, A. G.: *Immunity* 27, 900–11 (2007)
- [119] Natarajan, K., Sawicki, M. W., Margulies, D. H., Mariuzza, R. A.: *Biochemistry* 39, 14779–86 (2000)
- [120] Watson, A. a, Lebedev, A. a, Hall, B. a, Fenton-May, A. E., Vagin, A. a, Dejnirattisai, W., Felce, J., Mongkolsapaya, J., Palma, A. S., Liu, Y., Feizi, T., Sreaton, G. R., Murshudov, G. N., O’Callaghan, C. a: *J. Biol. Chem.* 286, 24208–18 (2011)
- [121] Kaiser, B. K., Pizarro, J. C., Kerns, J., Strong, R. K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6696–701 (2008)

