

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jiří Nový

**PŘÍPRAVA A STUDIUM LIDSKÉHO NK BUNĚČNÉHO
RECEPTORU AICL**

Preparation and study of human NK cell receptor AICL

Diplomová práce

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

Praha 2015

PROHLÁŠENÍ

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

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

V Praze dne

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval všem, kteří mi pomáhali a podporovali mě během přípravy a tvorby mé diplomové práce. Mé poděkování patří zejména mému školiteli **RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D.** za odborné vedení práce, mnohé konzultace, předání mnoha vědomostí a provedení měření na analytické ultracentrifuze. Dále bych rád poděkoval **Mgr. Janu Bláhovi** za ochotu pomoci v jakékoliv situaci a zajištění krystalografické části práce, **Mgr. Zdeňku Kukačkovi** za provedení analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie a **RNDr. Karolíně Hofbauerové, Ph.D.** a **RNDr. Vladimíru Kopeckému Jr., Ph.D.** za analýzu pomocí dynamického rozptylu světla a Ramanovy spektroskopie. Stejně tak bych rád poděkoval členům z laboratoře 204 a kolegům z katedry biochemie, rodině a přátelům.

ABSTRAKT

Přirozené zabíječské buňky neboli NK buňky jsou nedílnou součástí přirozené imunity a plní funkci rozpoznání a usmrcení nádorových a virem infikovaných buněk. Jejich funkce je regulována signály produkovanými díky interakci inhibičních a stimulačních receptorů na svém povrchu se svými specifickými ligandy na povrchu cílové buňky. Aktivačním receptorem je také NK receptor NKp80, který tvoří velmi specifický komplex s buněčným receptorem AICL, přičemž oba tyto receptory spadají do rodiny receptorů podobným lektinům C-typu. Zvýšená exprese receptoru AICL je přednostně specifická pro nádorové buňky myeloidního charakteru.

Tato diplomová práce popisuje produkci mutované formy AICL expresí v bakteriích *Escherichia coli* BL21 Gold (DE3) a následnou izolaci a *in vitro* renaturaci cílového proteinu. V předchozí studii bylo zjištěno, že lichý počet cysteinů v extracelulární lektinové doméně AICL způsobuje špatné sbalení proteinu. Záměnou lichého cysteinu za serin v poloze 87 bylo dosaženo zisku stabilní rozpustné formy AICL se sudým počtem cysteinů v konzervovaných pozicích, charakteristickým pro receptory C-lektinového typu. Správnost tvorby disulfidových můstků mezi cysteiny byla ověřena hmotnostní spektrometrií. Zisk značného množství proteinu umožnil nasazení krystalizačních pokusů v širokém spektru podmínek.

(Práce je psaná v českém jazyce)

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňky, NKp80, AICL, rekombinantní exprese, refolding

ABSTRACT

Natural killer cells, or NK cells are an integral component of innate immunity and fulfill the function of recognizing and killing tumor and virus-infected cells. Their function is regulated by signals produced by the interaction of inhibitory and stimulatory receptors on their surface with their specific ligands on the target cell surface. NKp80 is an activating receptor of NK cells and forms specific complex with cell receptor AICL, both of which belong to the family of C-type lectin-like receptors. Overexpression of AICL receptor is preferably specific for tumor cells of myeloid character.

This master's thesis describes the production of AICL mutated form by expression in *Escherichia coli* BL21 Gold (DE3) followed by isolation and *in vitro* renaturation of the target protein. In a previous study it was found that an odd number of cysteines in the extracellular lectin domain of AICL causes wrong folding of the protein. Substituting an odd cysteine for serine at position 87 lead to stable soluble form of AICL with an even number of cysteines in conserved positions, typical for CTLD receptors. Correctness of the formation of disulfide bonds between cysteines was verified by mass spectrometry. Significant amount of the protein gained allowed for setting up a wide variety of crystallization conditions.

(The thesis is written in Czech)

KEY WORDS

NK cells, NKp80, AICL, recombinant expression, refolding

SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
AcN	acetonitril
ADCC	cytotoxická reakce závislá na protilátkách (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AICL	receptor NK buněk (<i>activation-induced C-type lectin</i>)
AICL C87S	mutovaná forma receptoru AICL
APS	peroxosíran amonný (<i>ammonium persulfate</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C87	cystein 87
C87S	mutace cysteinu 87 záměnou za serin
CCR	chemokinový receptor C-C (<i>C-C chemokine receptor</i>)
CXCR3	chemokinový receptor C-X-C (<i>C-X-C chemokine receptor</i>)
CCL19	chemokinový ligand C-C (<i>C-C motif ligand</i>)
CLEC2	rodina C-lektinových receptorů NK buněk (<i>C-type lectin domain family 2</i>)
CTLD	doména podobná lektinům C-typu (<i>C-type lectin-like domain</i>)
CD	povrchové molekuly leukocytů (<i>cluster of differentiation</i>)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>electrosprey ionization</i>)
EtMorf	4-ethylmorfolin
FA	kyselina mravenčí (<i>formic acid</i>)
Fc	část molekuly protilátky (<i>fragment crystallizable</i>)
FT-ICR	iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (<i>Fourier transformation-ion cyclotron resonance</i>)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HLA	hlavní lidský histokompatibilní antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IgG	imunoglobulin G
IAA	jod acetamid (<i>iodacetamide</i>)
IFN	interferon
IL	interleukin
IPA	isopropylalkohol
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>)
KACL	receptor NK buněk (<i>keratinocyte-associated C-type lectin</i>)
KIR	imunoglobulinový receptor NK buněk (<i>killer cell immunoglobuline-like receptor</i>)
KLR	receptory zabíječských buněk podobné lektinům (<i>killer cell lectin like receptor</i>)
lacI	lac represor
LB	Luria Bertani médium
LIR	imunoglobulinový receptor NK buněk (<i>leukocyte immunoglobuline-like receptor</i>)
LLT1	receptor NK buněk (<i>lectin like transcript 1</i>)
Ly49	rodina myších receptorů C-lektinového typu (<i>lymphocyte antigen 49</i>)
MHC gp. I.	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (<i>major histocompatibility complex glycoproteins type I</i>)
MICA, MICB	neklasické MHC molekuly (<i>MHC class I-related</i>)
NK	přirozený zabíječ (<i>natural killer</i>)
NKC	NK genový komplex (<i>natural killer gene complex</i>)
NKG2	rodina receptorů NK buněk (<i>natural killer group 2</i>)
NKp30	receptor NK buněk (<i>natural killer cell protein, 30 kDa</i>)
NKp44	receptor NK buněk (<i>natural killer cell protein, 44 kDa</i>)
NKp46	receptor NK buněk (<i>natural killer cell protein, 46 kDa</i>)

NKp65	receptor NK buněk (<i>natural killer cell protein, 65 kDa</i>)
NKp80	receptor NK buněk (<i>natural killer cell protein, 80 kDa</i>)
NKR-P1A	receptor NK buněk (<i>natural killer cell receptor protein 1A</i>)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	fenylmethanysulfonylfluorid (<i>phenylmethanesulfonylfluoride</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
TAE	tris-acetátový pufr s EDTA
TE	tris-EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TES	tris pufrovaný EDTA obsahující fyziologický roztok (<i>tris buffered EDTA containing saline</i>)
TFA	kyselina trifluoroctová (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TNF	faktor nádorové nekrózy (<i>tumor necrosis factor</i>)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD.....	1
1.1	Princip imunitního systému	1
1.2	Lymfatické tkáně a buňky imunitního systému	2
1.3	NK buňky.....	4
1.4	Receptory NK buněk	6
1.4.1	Receptory podobné lektinům C-typu	8
1.5	Receptor AICL.....	9
1.5.1	Receptorový komplex NKp80-AICL	10
1.5.2	Mutovaná forma konstruktu AICL.....	11
2	ÚVOD K POUŽITÝM METODÁM.....	13
2.1	Expresce rekombinantních proteinů v <i>Escherichia coli</i>	13
2.1.1	Inkluzní tělíska	14
2.1.2	<i>In vitro</i> renaturace proteinů	14
2.1.3	Kompetentní buňky připravené pomocí kitu <i>Mix & Go</i>	15
3	CÍLE PRÁCE	16
4	MATERIÁL	17
4.1	Pomůcky a materiál	17
4.2	Chemikálie	18
4.3	Bakteriální kmeny	20
4.4	Oligonukleotidy pro PCR	20
4.5	Vektory	20
4.6	Enzymy	20
4.7	Plazmidové DNA.....	21
4.8	Pufry a jiné roztoky.....	21
4.8.1	PureLink HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit	22
5	METODY	23
5.1	Práce s DNA [43].....	23
5.1.1	Cílená mutace konstruktu AICL	23
5.1.2	Preparativní agarosová elektroforéza	25
5.1.3	Izolace DNA z gelu	25
5.1.4	Ligace inzertu AICL C87S do plazmidu.....	25
5.1.5	Transformace a kultivace <i>Escherichia coli</i> DH5α (1).....	26

5.1.6	PCR z kolonií	26
5.1.7	Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA pET30_AICL C87S.....	27
5.1.8	DNA sekvenace.....	28
5.2	Velkoobjemová příprava plazmidové DNA mut. AICL C87S.....	28
5.2.1	Transformace a kultivace <i>Escherichia coli</i> DH5α (2).....	28
5.2.2	Izolace plazmidové DNA	28
5.2.3	Stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA.....	29
5.3	Velkoobjemová exprese proteinu AICL	29
5.3.1	Transformace a kultivace <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3).....	29
5.3.2	Izolace inkluzních tělísek	30
5.3.3	SDS elektroforéza	31
5.3.4	<i>In vitro</i> renaturace proteinu AICL.....	31
5.3.5	Optimalizace <i>in vitro</i> renaturace	32
5.4	Purifikace proteinu AICL	33
5.4.1	Ionexová chromatografie s lineárním gradientem.....	33
5.4.2	Gelová permeační chromatografie	34
5.4.3	Měření koncentrace získaného proteinu.....	34
5.5	Mapování disulfidických můstků pomocí hmotnostní spektrometrie.....	35
5.5.1	Gradientová SDS elektroforéza v oxidativním prostředí	35
5.5.2	Digeste trypsinem a extrakce peptidů.....	35
5.5.3	Nabohacení a odsolení peptidů	36
5.5.4	Hmotnostní spektrometrie - analýza	36
5.6	Charakterizace proteinu	36
5.6.1	Sedimentační analýza pomocí analytické centrifugy	36
5.6.2	Dynamický rozptyl světla, DLS	37
5.6.3	Ramanova spektrometrie, DCDR.....	37
5.7	Krystalizace receptoru AICL C87S	38
6	VÝSLEDKY	39
6.1	Cílená mutagenese konstruktů receptoru AICL	39
6.2	Velkoobjemová příprava receptoru AICL C87S	42
6.2.1	Izolace inkluzních tělísek a <i>in vitro</i> renaturace.....	42
6.3	Purifikace rozpustné formy AICL C87S.....	44
6.4	Optimalizace <i>in vitro</i> renaturace.....	47
6.5	Mapování disulfidových můstků v rozpustné formě AICL C87S	51
6.6	Sedimentační analýza pomocí analytické centrifugy.....	52
6.7	Dynamický rozptyl světla, DLS.....	54

6.8	Ramanova spektroskopie, DCDR	55
6.9	Krystalizace receptoru AICL C87S	58
7	DISKUZE	59
8	ZÁVĚR	64
9	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	65

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Princip imunitního systému

Historický původ termínu imunita je odvozen z latinského slova *immunitas*, které odkazovalo na ochranu římských senátorů ve Starověkém Římě [1]. Až později byl tento termín použit pro označení ochrany organismu. První zmínění imunity, spojené s lidským tělem, je podle historiků připisováno Thukydiovovi, který žil v 5. století před naším letopočtem v Athénách a slovo imunita použil ve spojení s infekcí, kterou nazval mor (pravděpodobně se nejednalo o mor, který známe dnes). Za vývojem tohoto systému do dokonalé a složité formy, kterou dnes představuje, stojí více než 400 milionů let evoluce a postupného vývoje [2].

Primárním úkolem imunitního systému je ochrana jedince před cizími a škodlivými látkami, mikroorganismy, toxiny a rakovinnými buňkami [2,3]. Plní tedy obrannou funkci jak proti vnějším, tak proti vnitřním negativním vlivům. Tyto obranné funkce zajišťuje několik dílčích částí. Obranschopnost dokáže chránit organismus proti vnějším patogenním organismům a toxinům, autotolerance zajišťuje rozpoznávání vlastních tkání a udržuje toleranci vůči nim, imunitní dohled rozpoznává vnitřní škodliviny, jako jsou staré, poškozené a rakovinné buňky a zajišťuje jejich odstranění [3].

Imunitní systém se v zásadě dělí podle vlastností na nespecifickou imunitu a specifickou imunitu [1-4]. Specifickou imunitou disponují pouze obratlovci, na rozdíl od nespecifické, která je lokalizována u všech mnohobuněčných organismů [1,3]. Mezi nespecifickou a specifickou imunitou existuje mnoho spojení. Například při napadení systému mikroorganismy stimuluje reakce nespecifické imunity reakci specifické imunity a zároveň ovlivňuje její povahu.

Nespecifická neboli vrozená imunita je vývojově starší [1,3]. Skládá se z buněčných a biochemických ochranných mechanismů, které kladně působí proti mikroorganismům a toxickým produktům napadených buněk [1]. Ochranné mechanismy jsou zastoupeny fyzickými a chemickými bariérami. Zahrnuje antimikrobiální látky produkované povrchem epitelu, jako jsou mastné kyseliny na kůži, enzymy v tělních tekutinách (například lysozym) nebo antibakteriální defenziny [1,3,4]. Další bariérou je nepoškozený povrch kůže, a to díky nízké vlhkosti, kyselému pH nebo sekreci inhibičních látek [4]. Bohužel, mikroorganismy se i tak mohou dostat

do systému, a to prostupem přes mazové a potní žlázy, popřípadě skrz vlasové folikuly. Proto se nespecifické imunity účastní také proteiny krevního řečiště, zahrnující interferony, lektiny a cytokiny, což jsou proteiny regulující aktivitu buněk zapojených do nespecifické imunity [1,3]. Takovými buňkami jsou například fagocytující buňky (neutrofily, makrofágy), dendritické buňky nebo NK buňky (*natural killer*).

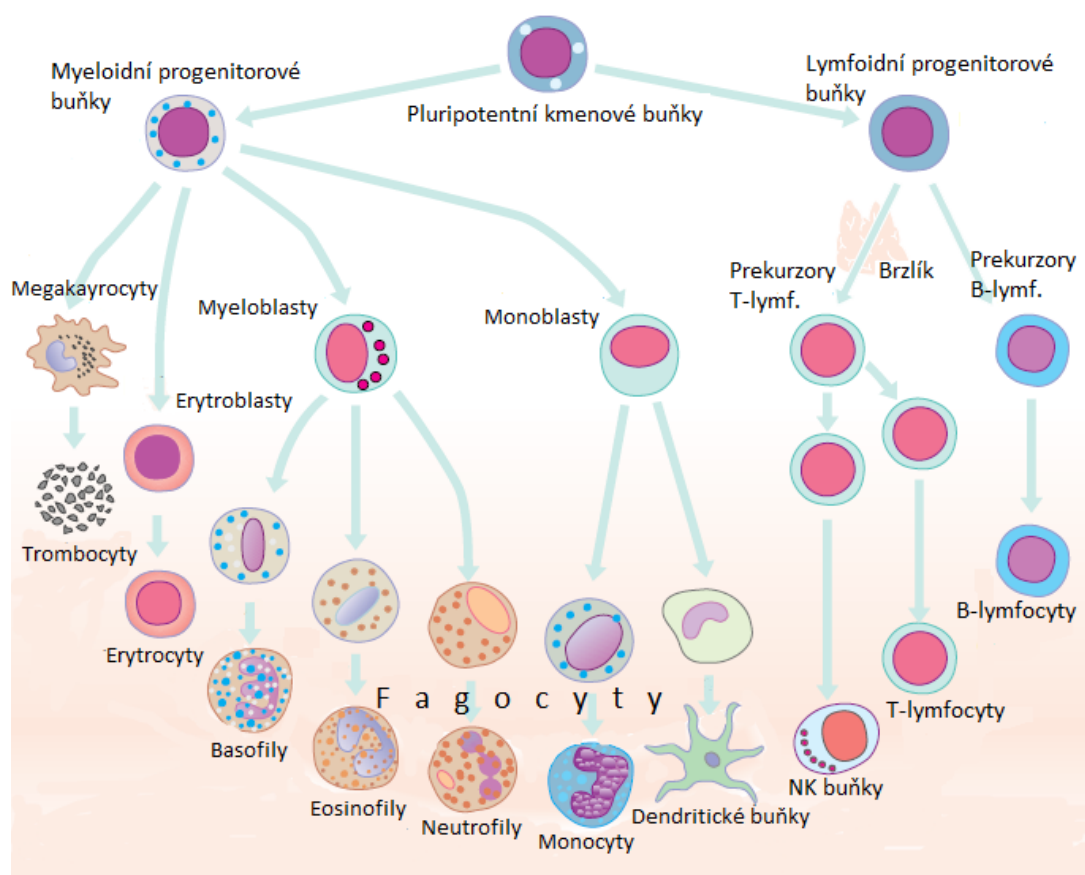
Vývojově mladší součástí imunitního systému je výše zmíněná specifická imunita, někdy nazývaná jako získaná či adaptivní [1,3]. Specifická imunita je charakteristická tím, že si dokáže zapamatovat odlišné mikrobiální a nemikrobiální látky a při opakované expozici je proti nim schopna s vysokou specifitou a efektivitou zakročit. Základními komponenty získané imunity jsou lymfocyty, které produkují neméně důležité protilátky [1]. Látky, které se specificky vážou s protilátkami lymfocytů, čímž je vyvolána imunitní odpověď, se nazývají antigeny.

Specifická imunita se dělí podle mechanismu působení na humorální imunitu a buněčnou imunitu [1,3]. Humorální je řízena B-lymfocyty, které produkují protilátky. Jejich funkcí je neutralizovat infekci a eliminovat extracelulární mikroorganismy. Naopak u buněčné imunity se o ochranu systému starají T-lymfocyty, které pomocí aktivace makrofágů a následné fagocytózy zabijí mikroorganismy, nebo přímo zabijí infikované buňky, čímž eliminují zdroj infekce.

1.2 Lymfatické tkáně a buňky imunitního systému

Společným znakem buněk imunitního systému je jejich původ [5]. Jejich základním stavebním kamenem jsou pluripotentní kmenové buňky kostní dřeně, které se diferencují na lymfoidní kmenové buňky a myeloidní kmenové buňky. Z myeloidních kmenových buněk vznikají megakaryocyty, erythroblasty, myeloblasty a monoblasty, které se diferencují na další buňky [2,5]. Mezi ty patří i takové, které se účastní nespecifické imunity. Z lymfoidních kmenových buněk, někdy též nazývaných progenitorové buňky, vznikají v kostní dřeni B-lymfocyty a z dalších progenitorových buněk opouštějících kostní dřeň vznikají prekurzorové T-lymfocyty. Část těchto prekurzorových T-lymfocytů se diferencuje na NK buňky a zbytek migruje do brzlíku (*thymus*), kde dochází k dozrávání v dospělé T-lymfocyty [4,5]. Na dozrávání těchto buněk se podílí hormon produkovaný brzlíkem, známý jako thymový hormon. Brzlík s přibývajícím věkem ztrácí svojí hmotnost a tím i funkci, protože se snižuje produkce thymového hormonu, což má za následek postupný nárůst nedozrálých T-lymfocytů v

krvním řečišti [5]. Postupná diferenciace buněk kostní dřeně je znázorněna na Obr.1.



Obr. 1: Diferenciace buněk kostní dřeně [2].

Pluripotentní kmenové buňky se dělí na myeloidní a lymfoidní buňky. Z myeloidních vznikají další diferenciací červené krvinky, krevní destičky a celá řada fagocytujících buněk. Z lymfoidních vznikají B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky.

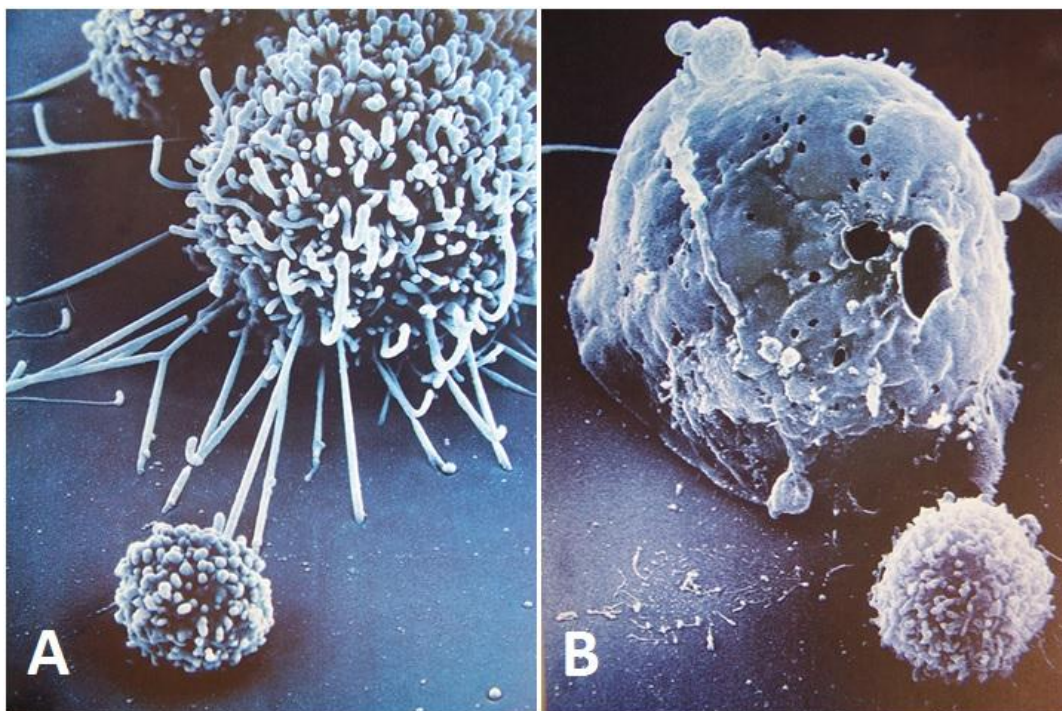
Kromě kostní dřeně a brzlíku, které jsou považovány za primární lymfatické tkáně, existují i sekundární lymfatické tkáně, které se podílejí na produkci a dozrávání lymfocytů v menší míře [4,5]. Mezi ně patří lymfatické uzliny, slezina, lymfatické tkáně spojené s gastrointestinálním traktem (Peyerovy plaky, játra), mandle nebo krev.

Tab.1: Podíl jednotlivých tkání na produkci T a B-lymfocytů [4].

Lymfatická tkáň	T-lymfocyty [%]	B-lymfocyty [%]
Brzlík	100	0
Krev	80	20
Uzliny	60	40
Slezina	45	55
Kostní dřeň	10	90

1.3 NK buňky

Zvláštním druhem lymfocytů, identifikovaným v roce 1975 [6], jsou přirozené zabíječské buňky, více známé pod názvem NK buňky (Obr. 2). Vznikají v kostní dřeni a jejich základním kamenem jsou pluripotentní kmenové buňky, které se diferencují na lymfoidní kmenové buňky a následně dozrávají v NK buňky [7]. Nicméně kostní dřeň není jedinou tkání, kde NK buňky mohou dozrávat. V mnoha studiích bylo zjištěno, že se tak děje i v mandlích, lymfatických uzlinách nebo brzlíku [7]. NK buňky zastupují 10-15 % všech lymfocytů cirkulujících v krevním řečišti. Kromě krve se ve velké míře vyskytují v játrech, plicích, slezině a dalších lymfatických tkáních, ovšem v různých poměrech [8,9].



Obr. 2: NK buňka rozeznávající a vázající se na nádorovou buňku [11]

A: NK buňka (menší vlevo dole) rozeznává nádorovou buňku pomocí svých specifických receptorů a váže se na ní.

B: Zničená nádorová buňka jako důsledek cytotoxických obranných mechanismů NK buňky.

NK buňky, stejně jako T-lymfocyty, se morfologicky řadí mezi velké granulární lymfocyty, což jsou zralé lymfocyty, charakteristické azurofilními granuly s cytochemickým průkazem kyselé fosfatasy [10]. Na rozdíl od T-lymfocytů, NK buňky nedisponují antigenně specifickými receptory [10], avšak po cytotoxické stránce jsou tyto skupiny různých lymfocytů velice komplementární [3]. A právě díky své vysoké

cytotoxicitě, schopnosti rozpoznat a následně pomocí apoptózy zničit nádorovou nebo virem infikovanou buňku, hrají významnou roli v rámci přirozené imunity [7,8].

NK buňky dokážou migrovat do zanícených tkání a sekundárních lymfatických orgánů, kde se při setkání s nádorovými buňkami nebo jinými buňkami, vykazujícími patogenitu, účastní v první linii obrany proti nim [7,8]. V takovém případě se NK buňky aktivují a mohou produkovat řadu látek, jako jsou chemokiny a cytokiny IL-2, IL-15, IL-18, které autokrinně a parakrinně aktivují další buňky podílející se na imunitní reakci [7-9]. Dále podporují zánětlivé reakce a regulací své vazby s imunitní odpovědí specifické imunity ovlivňují sílu a kvalitu reakce T-lymfocytů [7]. Díky těmto schopnostem jsou NK buňky schopny regulovat jak nespecifickou, tak specifickou imunitu [9]. Naproti tomu mohou být NK buňky ovlivněny pozitivní nebo negativní regulací od okolních buněk imunitního systému působením mezibuněčných spojení. Tato spojení jsou realizována vazbou s dendritickými buňkami, makrofágy a mesenchymálními stromálními buňkami, nebo jak už bylo zmíněno, vazbou s poškozenými, nádorovými nebo virem infikovanými buňkami [7-9].

Charakteristickými membránovými molekulami NK buněk jsou neurální buněčné adhezivní molekuly CD56 a Fcγ receptor III, označovaný jako CD16 [9]. Na základě isoform těchto molekul se NK buňky dělí na dvě subpopulace. Přibližně 90 % NK buněk mají nízkou expresi CD56 a vysokou expresi CD16, z čehož plyne označení subpopulace NK buněk $CD56^{dim} CD16^{bright}$ [8]. Zbýlých 10 % NK buněk exprimuje CD56 ve vysoké hustotě a CD16 v nízké - subpopulace $CD56^{bright} CD16^{dim}$. V novějších zdrojích je uváděno, že toto procentuální rozdělení se týká pouze NK buněk z periferní krve a sleziny, naopak v lymfatických tkáních se může nacházet až 75 % subpopulace $CD56^{bright} CD16^{dim}$ [9,12].

Přesná funkce molekuly CD56 u lidských NK buněk není známa, stejně tak důvod její rozdílné exprese. Cytotoxicita minoritních NK buněk $CD56^{bright} CD16^{dim}$ je nízká [8], protože tyto NK buňky exprimují nízké množství imunoglobulinových receptorů (KIR, *killer-cell immunoglobuline-like receptor*). Naopak ve velkém produkují receptor CD94/NKG2 [11]. Dále disponují receptory určenými pro lymfatické tkáně, jako jsou chemokiny CCR7 (*C-C chemokine receptor 7*), CXCR3 (*C-X-C chemokine receptor 3*) a receptory pro buněčné ligandy CCL19 (*C-C motif ligand 19*), CCL21 (*C-C motif ligand 21*) [9,12]. Poslední důležitou složkou je NK receptor specifický k CD62L neboli L-selektinu [12], což je adhezivní molekula na povrchu

endotelových buněk, zajišťující přenos NK buněk do sekundárních lymfatických tkání nebo oblastí zánětu [13].

Převažující subpopulace NK buněk CD56^{dim} CD16^{brigh} disponuje značnou cytotoxicitou díky vysoké produkci KIR [8,9]. Jejich cytotoxicita je zprostředkována pomocí cytoplazmatických granulí, které obsahují perforiny a granzymy [2,9,12]. Perforiny dokážou svými cytolytickými účinky vytvořit póry v patogenní buňce, granzymy zastávají funkci proteinas [2,12]. Receptor CCR7 je zcela postrádán, ovšem s vyšší intenzitou jsou přítomny CXCR1 (*C-X-C chemokine receptor 1*) a CX3CR1 (*C-X-3C chemokine receptor 1*).

Aktivita NK buněk se v těle jedince výrazně liší v závislosti na mnoha faktorech, mezi které se řadí pohlaví, věk, zdravotní stav nebo množství krevních buněk [14]. Například u myši bylo zjištěno, že se sníženou aktivitou NK buněk je spojena vyšší úmrtnost [14]. Z pozorování starších pacientů se zhoršeným zdravotním stavem bylo prokázáno, že se sníženou aktivitou NK buněk je spojen rapidnější rozvoj infekce a snížená schopnost přežití v důsledku infekce [14]. Nicméně, existuje mnoho dalších otázek, které by bylo třeba v této problematice zodpovědět.

1.4 Receptory NK buněk

Navzdory funkčnímu významu NK buněk v obraně proti virovým a nádorovým onemocněním zůstaly NK buňky mnoho let po svém objevení skryty pod rouškou tajemných a rozporuplných úvah a otázky ohledně jejich molekulárních mechanismů zůstaly léta bez odpovědi [7]. NK buňky přitom vlastní detekční systém zahrnující velké množství receptorů, které svým spojením s cílovou buňkou určují kvalitu a intenzitu jejich imunitní odpovědi - spuštění cytotoxických mechanismů [6].

Na konci 80. let vznikla hypotéza *missing-self*, která popisuje jev, kdy NK buňka dokáže efektivně zabít myší nádorové buňky, které nejsou schopny produkovat povrchové buněčné molekuly MHC gp. I (*major histocompatibility complex glycoproteins type I*), u lidí známé jako HLA I (*human leukocyte antigen I*). Tehdy tak vznikla teorie, že NK buňky mají s pomocí této molekuly schopnost rozpoznat a tolerovat buňky, které touto molekulou disponují a naopak zabít takové, které ji postrádají [7]. Na základě hypotézy *missing-self* došlo k závěru, že NK buňka disponuje inhibičními receptory, které rozpoznávají expresi MHC gp. I na povrchu cílové buňky, čímž jsou inhibovány její cytotoxické mechanismy [6,7,15,16].

Inhibiční receptory NK buněk lze rozdělit do tří proteinových rodin. Do té první spadají imunoglobulinové receptory KIR, charakteristické vazbou s klasickými molekulami MHC gp. I [7,15,16]. Tato rodina, jejíž genový komplex je lokalizován na 19. chromozomu, byla nalezena pouze u člověka [15]. U hlodavců tuto funkci převzala druhá známá rodina receptorů, disponující doménou podobnou lektinům C-typu (CTLD, *C-type lectin-like domain*). Tyto receptory jsou specifické pro neklasické molekuly MHC gp. I, popřípadě pro jiné ligandy. Příkladem může být myší Ly49 interagující s ligandy podobnými MHC gp. I, kódovanými cytomegalovirem [17], nebo lidského CD94/NKG2 rozeznávající neklasickou molekulu HLA-E [7,15,16]. Poslední rodinou jsou leukocytární receptory (LIR, *leukocyte immunoglobuline-like receptor*), jež jsou podobné KIR [16]. Ty jsou také specifické ke klasickým molekulám MHC gp. I, avšak s nižší afinitou a spíše jsou charakteristické pro B-lymfocyty [1].

Všechny tyto inhibiční receptory disponují aminokyselinovým motivem ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), pro který je charakteristická aminokyselinová sekvence (I/L/V/S)XYXX(L/V) (X představuje jakoukoliv AK) [16]. Tento motiv je zodpovědný za spuštění inhibičních mechanismů v případě, že je cílová buňka označena za zdravou [1,16]. Principem je fosforylace tyrosinu a následná aktivace protein-tyrosin kinas. Pokud inhibiční receptor NK buňky rozpozná svůj specifický ligand na povrchu cílové buňky (např. MHC gp. I.), dochází k defosforylaci tyrosinu a tak i k blokaci signalizačních drah důležitých pro aktivaci cytotoxických mechanismů NK buňky.

Vedle inhibičních receptorů stojí aktivační receptory. Ty spouštějí cytotoxické mechanismy NK buňky přímou interakcí s cílovou buňkou [7]. K aktivaci dochází tehdy, pokud je identifikována stresovaná buňka specifická produkcí nebo nadprodukcí ligandů, které jsou důsledkem transformace normální buňky v nádorovou, popřípadě důsledkem virové infekce. Taková nadprodukce se ovšem může vyskytnout i u zdravých buněk, které jsou v tu chvíli pod zátěží nepatogenního charakteru. Aby tak nedocházelo k zabíjení zdravých buněk, uplatňuje se kooperace s inhibičními receptory, která je v takovýchto situacích velmi důležitá [16]. Jak už bylo zmíněno, zdravá buňka disponuje molekulou MHC gp. I [7]. Pokud je takováto molekula identifikována inhibičními receptory zatímco je ve stresu a aktivační receptory ji pokládají za patogenní, dochází ke vzniku rovnováhy mezi inhibiční a aktivační odpovědí a buňka je tolerována.

Pro aktivační receptory je charakteristický aminokyselinový motiv ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) [16]. ITAM je definován sekvencí (D/E)XXYXX(L/I)X₆₋₈YXX(L/I). Tento motiv není součástí aktivačních receptorů, ale okolních membránových proteinů, s kterými receptory vzájemně asociují [1,16]. Po interakci receptoru s ligandem tyto membránové proteiny zprostředkovávají přenos signálu pro aktivaci NK buňky. V tu chvíli dochází k fosforylaci tyrosinů v sekvenci ITAM a následné aktivaci protein-tyrosin kinas, čímž se aktivují i cytotoxické mechanismy NK buňky.

Stejně jako inhibiční se i aktivační receptory dělí do rodin receptorů CTLD a receptorů podobných KIR, ovšem minimum se jich váže s molekulami MHC gp. I a jim podobným [1,15,17]. Nejznámějšími aktivačními receptory jsou NKp46, NKp44 a NKp30 [8,15-18]. Mezi stimulační receptor imunoglobulinového charakteru patří i Fc-receptor CD16, vázající se na Fc části protilátek třídy IgG [1,3]. Po jejich interakci dochází k agregaci receptorů, přenosu signálu a aktivaci cytotoxicity NK buňky. Tento děj je znám jako cytotoxická reakce závislá na protilátkách neboli ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*).

1.4.1 Receptory podobné lektinům C-typu

Jak už bylo zmíněno, do rodiny receptorů s CTLD spadá mnoho NK receptorů, ať už inhibičních, nebo aktivačních. Strukturně se jedná o transmembránové glykoproteiny II. typu s aminoterminální cytoplasmatickou doménou [19]. Tato doména obsahuje dva α -helixy a dva antiparalelní β -listy, stabilizované dvěma nebo ve více případech třemi disulfidovými můstky. Funkčně se často jedná o homo- nebo heterodimery spojené disulfidovou vazbou. Pro většinu těchto receptorů je charakteristická oblast dlouhé smyčky (z angl. *long loop region*), která je u klasických lektinů C-typu zapojena do Ca^{2+} dependentní vazby se sacharidy [20,21,22]. Pomocí sekvenční homologie byly charakterizovány i takové proteiny, které sice dlouhou smyčku mají, ale chybí v ní klíčové aminokyselinové zbytky a tudíž se sacharidy neinteragují. Jedná se tak o atypickou skupinu CTLD, která je podobná lektinům C-typu po stránce strukturní, nikoliv však vazebné [19].

Receptory obsahující CTLD jsou kódovány NK genovým komplexem, (NKC, *natural killer gene-complex*) [15,19]. Ten je lokalizován u myši na 6. chromozomu a u lidí na 12. chromozomu. CTLD receptory jsou děleny na skupinu KLR (*killer cell*

lectin-like receptor) a CLEC (*C-type lectin-like receptor*) [17,19]. První skupina je exprimována NK buňkami, druhá jinými typy buněk jako jsou myeloidní buňky, dendritické buňky, keratinocyty a další.

Některé CTLD receptory jsou známé svou interakcí s molekulami podobnými MHC gp. I [19]. Mezi ně patří již zmíněné inhibiční receptory CD94/NKG2A a CD94/NKG2C, specifické k lidskému HLA-E, nebo aktivační NKG2D [19]. Ten tvoří komplex se specifickými molekulami MICA a MICB, které jsou exprimovány zásadně virem infikovanými a tumorovými buňkami, buňkou po teplotním šoku, popřípadě po poškození tkáně [1,15,19]. Mezi lidskými receptory obsahujícími CTLD je i celá řada takových, které interagují s jinými molekulami [19]. Nejznámějším KLR receptorem je CD69, který je přítomen u hlodavců i lidí [19,22]. Dalšími KLR jsou NKR-P1A (*natural killer cell receptor protein 1 A*), NKp65 (*natural killer cell protein, 65 kDa*) nebo NKp80 (*natural killer cell protein, 80 kDa*) [17,19,23-25]. Tyto NK receptory tvoří specifický komplex s ligandy, které mohou rovněž patřit do rodiny CTLD, takzvané CLEC2 receptory. Těmi jsou například LLT1 (*lectin-like transcript 1*), specifický k NKR-P1A, KACL (*keratinocyte-associated C-type lectin*) k NKp65 a AICL (*activation-induced C-type lectin*) k NKp80 [17,19,23-25].

1.5 Receptor AICL

Pro tuto práci je stěžejním výše zmíněný receptor AICL (*activation-induced C-type lectin*), také známý jako CLEC2B (*C-type lectin domain family 2 B*), z jehož názvu vyplývá, že spadá do rodiny CTLD receptorů [17,18]. Tento receptor je přednostně exprimován buňkami hematopoetického původu [18,26]. Jedná se o myeloidní buňky, jako jsou granulocyty, monocyty a makrofágy [18,19,27]. Ačkoliv se jedná o ligand receptoru NK buněk, ze studií vyplynulo, že je tento receptor produkován i některými NK buňkami a několika druhy B a T-lymfocytů [18,27]. Na úkor zvýšené exprese AICL je ale u takovýchto typů NK buněk potlačena exprese jeho přirozeně specifického receptoru, aktivačního NKp80, čímž NK buňka ztrácí svojí NKp80-řízenou toxicitu [19]. Vedle hematopoetických buněk je AICL exprimován i nehematopoetickými buňkami, což bylo potvrzeno u stabilních linií HeLaS3, ME180 (buněčné linie s karcinomem) a C32TG (buněčné linie s melanomem) [27]. Tyto linie exprimovaly AICL stejně dobře, jako stabilní linie hematopoetických nádorových buněk K562, HUT78 a U937 (linie s leukémií). Vedle těchto experimentů bylo také zjištěno, že je

tento receptor exprimován nejen stabilními liniemi, ale i primárními rakovinnými buňkami jater.

AICL je stejně jako jeho příbuzné receptory s CTLD exprimován z NKC [17], jeho aminokyselinová sekvence je ze 35% podobná sekvenci CD69 [26]. Na rozdíl od CD69 je tento gen lokalizován pouze v lidském NKC [28]. Strukturně se jedná o transmembránový glykoprotein II. typu, jehož sekvence (Obr. 3) je složena ze 149 aminokyselin (447 párů bází) [26]. Extracelulární část, skládající se ze 124 aminokyselin vykazuje značnou podobnost se sekvencemi dalších proteinů z rodiny CTLD. Sekvence disponuje třemi N-glykosylačními místy [26,27] a sedmi cysteiny, mezi kterými jsou tvořeny disulfidové můstky [26,29]. Lichý cystein je pravděpodobně zodpovědný za dimerizaci [29]. Molekulová hmotnost činí 28 kDa ve formě deglykosylovaného homodimeru a za redukčních podmínek 17 kDa ve formě monomeru [27].

AICL:

**MMTKHKKCFIIVGVLITTNITLIVKLTRDSQSLCPYDWIGFQNKCYIFSKEEGD
WNSSKYNCSTQHADLTIIDNIEEMNFLRRYKCSSDHWIGLKMAKNRTGQWV
DGATFTKSFGRGSEGCAYLSDDGAATARCYTERKWICRKRH**

Obr. 3: Sekvence CTLD receptoru AICL.

AICL konstrukt II je značen modře, transmembránový úsek červeně. Potencionální glykosylační místa jsou vyznačena v růžových rámečcích, cysteiny tvořící disulfidové můstky ve žlutých rámečcích a cystein 87 (dále C87) teoreticky zodpovědný za dimerizaci v zeleném rámečku.

1.5.1 Receptorový komplex NKp80-AICL

Buněčný receptor AICL byl identifikován jako ligand aktivačního receptoru NK buněk - NKp80 [18,19,27,28,30]. Ten je charakterizován jako aktivační receptor NK buněk, spouštějící cytotoxicitu a podporující vypuštění prozánětlivých cytokinů IFN γ (interferon γ) a TNF (faktor nádorové nekrózy, *tumor necrosis factor*) [18,19]. Kromě čerstvých a aktivovaných NK buněk je NKp80 exprimován i cytotoxickými T-lymfocyty [19,30,31]. Stejně jako AICL je NKp80 kódován pouze v NKC lidí a primátů [27,28], neexistují k němu žádné hlodavčí orthology [30]. Geny těchto receptorů jsou lokalizovány pouze 7 kb od sebe v orientaci *tail-to-tail* (konec ke konci), což by mohlo potvrdit hypotézu, že receptor a ligand jsou kódovány v genetické vazbě [19].

NKp80, někdy označován jako KLRF1 (*killer cell lectin-like receptor F1*), patří stejně jako AICL do rodiny receptorů CTLD, tudíž se jedná o transmembránový protein II. typu jehož sekvence je složena ze 231 aminokyselin (693 párů bází) [19,27,31,32] a přirozeně se vyskytuje ve formě homodimeru [19,30].

Z experimentu s myeloidními buňkami nakaženými Kaposiho sarkomem asociovaným s herpesvirem bylo zjištěno, že tyto patogenní buňky mají schopnost chránit sebe samé před NKp80-řízenou cytotoxicitou NK buňky [33]. Principem je aktivita virové ubiquitin ligasy, která je zodpovědná za snížení produkce AICL na svém povrchu. Se sníženým množstvím tohoto ligandu na povrchu nakažené buňky dochází k neschopnosti interakce s NK buňkou právě přes NKp80. Stejný jev byl sledován i u snížení exprese molekul MICA a MICB, které jsou specifické k aktivačnímu receptoru NKG2D.

1.5.2 Mutovaná forma konstruktů AICL

Předchozí studie AICL udávají, že v oblasti extracelulární domény aminokyselinová sekvence disponuje sedmi cysteiny [26]. Nicméně, během studie AICL v naší laboratoři, předcházející této práci, bylo docíleno teorie, že lichý počet cysteinů může způsobit nespecifické sbalování proteinu během *in vitro* renaturačních postupů, čímž by mohlo dojít ke vzniku špatně sbaleného proteinu.

Teoretickým řešením tohoto problému mohlo být vytvoření mutované formy AICL s absencí jednoho cysteinu, a to záměnou za jinou aminokyselinu. Po porovnání extracelulární části sekvence AICL s extracelulárními sekvencemi příbuzných receptorů z CTLD rodiny, které převážně disponují šesti cysteiny v totožných polohách, byl pro cílenou mutaci vybrán cystein v poloze 87 (C87) (Obr. 4, str. 12). Význam tohoto typu zásahu do aminokyselinové sekvence proteinu byl zdárně potvrzen v diplomové práci Mgr. Jana Bláhy [23], kdy došlo k cílené mutaci aminokyselinové sekvence CTLD receptoru LLT1, a to přidáním šestého cysteinu namísto histidinu 176. Po provedení cílené mutace v sekvenci AICL lze usuzovat, že zůstane zachováno přirozené chování proteinu a bude podpořeno správné párování cysteinů. Po rekombinantní expresi v bakteriálních expresních systémech a následné *in vitro* renaturaci by mutovaná forma tohoto proteinu měla být podle předpokladu dobře rozpustná a sbalená do přirozené konformace.

		10	20	30	40	50	60		
<i>LLT1</i>	74	ACPE	SWIGFQRKCFYF	SDDTKNWTSSQRF	CD	SQDADLAQVESF	QELN	FLLR-YKGPSD-HWIGLSR137	
<i>KACL</i>	57	ACSGDWLGVRDKCFYF	SDDTRNWTASKIF	CSLQKAE	LAQIDTQEDMEFLKR	-YAGTDM-HWIGLSR120			
<i>AICL</i>	34	LCPYDWIGFQNKCYF	SKEEGDWNS	SKYNCSTQHADL	TIIDNIEEMN	FLLR-YKCSSD-HWIGLKM97			
<i>CD69</i>	84	SCSEDWVG	YQRKCFYF	ISTVKRSWTS	SAQNACSEHGAT	LAVIDSEKDMN	FLLR-YAGREE-HWVGLKK147		
<i>NKp65</i>	77	LCPNDWLLNEGKCYWF	STFKTWKESQRD	CTQLQAHL	LVIQNLDELEF	IQNSLKP	GHF-GWIGLYV141		
<i>NKp80</i>	113	LQSEWLK	YQKCYWFSNEMK	SWSDSYVYCLERK	SHLLIHDQLEMAF	IQKNLRQLNY-VWIGLNF177			
<i>NKR-P1A</i>	93	NCPIYWQQLREK	CLLF	SHTVNPWNHSLAD	CS	TKESSLLLIRDKDEL	IHTQNLIRDKAILFWIGLNF158		
		70	80	90	100	110	120	130	
<i>LLT1</i>	138	E-QGQ	PWKWINGTEWT-RQFPILGAG	---	E	CAYLNDK	GASSARHYTERK	WICS	SKSDIHV-----191
<i>KACL</i>	121	K-QGD	SWKWTNGTTFN-GWFEIIGNG	---	S	F AFLSAD	GVHSSRGFIDIK	WICS	SKPKYFL-----174
<i>AICL</i>	98	A-KNRTGQWVDGATFT	-KSGMRGSE---	G	CAYLSD	GAATARC	YTERK	WICRKR-IH-----149	
<i>CD69</i>	148	E-PGHP	WKSNGKEFN-HWFNVTGSD	---	K	VFLKNTEVS	SMECEKNLYWIC	KNPKYK-----199	
<i>NKp65</i>	142	TFQGNL	WMWIDEHFLVPELFSVIGPTDDRS	CAVITGNWVYSEDCS	STFKGIC	QRDAILTHNGT	SGV207		
<i>NKp80</i>	178	TSLKMTWTWVDGSPIDSKIFF	IKGPAKENS	CAAIKESKIFSET	CSSVFKWICQY	-----231			
<i>NKR-P1A</i>	159	SLSEKNW	KWINGSFLNSNDLEIRGDAKENS	CISISQTSVYSEY	C	STEIRWICQKEL	TPVRNKVYPD224		

Obr. 4: Porovnání sekvencí CTLD receptorů NK buněk.

Na tomto obrázku je znázorněna sekvenční podobnost CTLD receptorů NK buněk, z čehož je patrné, že většina z nich disponuje šesti cysteiny, výjimkou je KACL se čtyřmi, LLT1 s pěti a AICL se sedmi cysteiny. Sekvence AICL je značena červeným rámečkem, cysteiny v totožných polohách jsou podbarveny žlutě a lichý C87 v sekvenci AICL zeleně [34].

2 ÚVOD K POUŽITÝM METODÁM

2.1 Exprese rekombinantních proteinů v *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* jsou vhodným systémem pro klonování DNA a také jako expresní systém rekombinantních proteinů [35]. Ve srovnání s řadou eukaryotních rekombinantních systémů, jako jsou kvasinkové systémy, hmyzí buňky nebo savčí expresní systémy, disponuje exprese v bakteriích řadou výhod, ale i nevýhod [36,37]. Mezi výhody lze zařadit jednoduchost transformace a kultivace, krátký čas zdvojení buněk a tím i podstatně rychlejší produkce proteinů, možnost kultivace do vysoké hustoty a v neposlední řadě nízké finanční nároky [35-38]. Jejich kultivace může probíhat v tekutém médiu, na tuhých plotnách i v normální atmosféře, standardně při 37 °C [35]. Produkci rekombinantních proteinů v *E. coli* je možno získat vysoké výtěžky za poměrně krátký čas. Nevýhodou však mohou být absence posttranslačních modifikací, jako jsou N- a O-glykosylace, tvorba disulfidových můstků nebo problém se sbalením proteinu do nativní konformace [35,36]. Další nevýhodou může být vznik neaktivního proteinu nebo shluk exprimovaných proteinů do inkluzních tělísek, která jsou lokalizovatelná v cytoplazmě nebo periplazmatickém prostoru [35,36,38].

Známým prokaryotním expresním systémem je kmen *E. coli* BL21-Gold. Výhodou tohoto kmenu je genetická úprava umožňující cílené ovlivnění a načasování exprese užitím indukčních činidel. V této práci byl použit kmen BL21-Gold (DE3). Klíčovou roli u tohoto kmene hrají geny *lacI* (kódující *lac* represor) a DE3 (nesoucí informaci pro syntézu T7 RNA polymerasy zodpovědné za transkripci) [36,38,39]. Vzniklý *lac* represor blokuje syntézu polymerasy a tím i transkripci proteinu až do té chvíle, než se bakterie rozrostou na požadovanou hustotu. Následně je do kultury přidáno indukční činidlo IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid), které na sebe váže *lac* represor, čímž umožní syntézu polymerasy a následnou transkripci.

Užívány jsou také více upravené kmeny Rosseta a Origami, které jsou odvozené od BL21-Gold (DE3) [35,36]. Kmen Rosseta je upraven tak, aby v něm snáze probíhala exprese eukaryotních genů. Kmen Origami je naopak schopen tvořit správně zapojené disulfidové můstky v cílovém proteinu.

2.2 Inkluzní tělíska

V bakteriálních expresních systémech dochází v mnoha případech k expresi špatně sbaleného proteinu a tvorbě nerozpustných agregátů - inkluzních tělísek [35,36,40,41]. Za jejich vznikem stojí různé typy interakcí, jako jsou kovalentní a vodíkové vazby, iontové interakce a hydrofobní interakce [35]. O důvodu jejich vzniku existují pouze teorie. Nejpravděpodobnějším předpokladem je, že exprese proteinu probíhá v takové míře, až je převyšována optimální kapacita bakteriální buňky, která je třeba pro správné sbalení proteinu [35,41]. Protein se tak stává nestabilní a tvoří již zmíněné agregáty [38,41]. Minimalizace tvorby těchto agregátů je v některých případech možná snížením teploty kultivace *E. coli* při expresi ze 37 °C na pokojovou teplotu a prodloužením doby exprese. Další možností je užití geneticky upravených kmenů *E. coli* Origami nebo Rosseta, které by měly mít schopnost sbalit protein do nativní struktury.

Naštěstí existují metody, kdy mohou být inkluzní tělíska obsahující špatně sbalený protein z lyzátu bakterií izolována, solubilizována a *in vitro* renaturací lze získat protein ve své nativní formě [40,41].

2.2.1 *In vitro* renaturace proteinů

In vitro renaturace (také známá jako refolding) představuje i v dnešní době složitou a ne vždy stoprocentně fungující metodu [35, 41]. Důvodem může být absence univerzálního renaturačního pufru, riziko průběhu vedlejších reakcí za vzniku špatně sbalených proteinů, jejich inaktivace nebo zpětná agregace [35,40]. Tato metoda navíc vyžaduje mnoho optimalizací pro vytvoření vhodného kompatibilního postupu s určitým proteinem [41]. Nezbytnou součástí je následné užití ověřujících metod, zda se opravdu jedná o protein ve správné konformaci [35]. Takovými metodami mohou být hmotnostní spektrometrie nebo ověření vazby na specifický receptor/ligand.

Při renaturaci proteinu se principiálně jedná o přeměnu proteinu ze špatně sbalené konformace v nativní [40]. Nejprve je třeba protein solubilizovat v denaturačním činidle. Většinou se jedná o vysoké koncentrace guanidinu nebo močoviny (koncentrace se pohybuje v rozmezí 6-8 M), popřípadě iontových detergentů. Následuje renaturace proteinu, která je iniciována snížením koncentrace denaturačního činidla v přítomnosti proteinu [40,41]. V důsledku snížení koncentrace tohoto činidla začne protein tvořit disulfidové můstky a sbalovat se do přirozené konformace [40].

Disulfidové můstky může protein tvořit už v denaturačním činidle, ovšem není zaručeno, že se tak děje přirozeně. Z tohoto důvodu je v guanidinovém pufru nebo močovinně důležitá přítomnost redukčního činidla, nejčastěji 100mM DTT, čímž je protein zcela zredukován a k tvorbě disulfidových můstku nedochází.

Existuje celá řada renaturačních postupů, z kterých lze zmínit například dialýza proti renaturačnímu pufru, rychlé naředění denaturovaného proteinu v renaturačním pufru nebo gelová filtrace s užitím renaturačního pufru jako mobilní fáze [40,41].

Důležitou roli u renaturačního pufru hraje jeho složení, které určuje optimální pH pufru, iontovou sílu pufru nebo optimální teplota, při které pufr reaguje s denaturovaným proteinem [41]. Další důležitou složkou pufru jsou nízkomolekulární látky, přidávané za účelem zvýšení efektivity renaturace proteinu [40]. Jejich volba je závislá na charakteru denaturovaného proteinu. Používány jsou například L-arginin hydrochlorid, polyethylenglykol nebo cyklodextrin [40,41].

2.3 Kompetentní buňky připravené pomocí kitu *Mix & Go* [42]

Transformační kit *Mix & Go* od ZYMO RESEARCH určený pro *E. coli* představuje zjednodušení práce při transformaci bakterií *E. coli*. Výhod těchto bakterií, které jsou předem namnoženy pomocí daného postupu za použití dodaného média je několik. První výhodou je vyřazení metody *heat-shock* (transformace teplotním šokem), či dalších podobných postupů, čímž je při transformaci ušetřen čas. Další výhodou je zvýšená efektivita transformace oproti transformacím klasických kompetentních buněk. Dle protokolu je možno provést transformaci *E. coli* a následné natření kultury na Petriho misku během pár minut, pokud je jako antibiotikum užit ampicilin. S použitím jiného antibiotika (kanamycin, tetracyklin, atd.) je bohužel postup delší z důvodu nezbytnosti hodinové inkubace ve 37 °C, nicméně tento krok přináší lepší výsledky transformace.

3 CÍLE PRÁCE

- cílená mutageneze lichého cysteinu v konstruktu AICL
- rekombinantní exprese proteinu v bakteriích *Escherichia coli* BL21 Gold (DE3)
- renaturace a purifikace receptoru AICL s mutací C87S
- strukturní charakterizace a krystalizace

4 MATERIÁL

4.1 Pomůcky a materiál

4-12% NuPAGE Bis-Tris gradient gel	<i>Invitrogen, USA</i>
Analytické váhy	<i>AND, USA</i>
Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	<i>H+P Labortechnik, Německo</i>
Automatické pipety	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga 5415 R	<i>Eppendorf, Německo</i>
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	<i>Sigma, USA</i>
Dialyzační trubice	<i>Sigma, USA</i>
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Filtry Millipore Express 0,22 µm	<i>Millipore, USA</i>
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570	<i>SONY, Japonsko</i>
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	<i>Geneaid, Německo</i>
High Speed Plasmid Mini Kit	<i>Geneaid, Německo</i>
HPLC systém ÄKTAbasic	<i>Amersham Biosciences, Švédsko</i>
Injekční mikrostříkačka	<i>Hamilton, USA</i>
Inkubátor IR 1500	<i>LABsystem Praha, ČR</i>
Kahan Fuego SCS	<i>VERKON, ČR</i>
Kolona Superdex 200 10/300 GL	<i>Amersham Biosciences, Švédsko</i>
Kolona SP Sepharosa FF	<i>GE Healthcare Life Science, UK</i>
Koncentrátory Amicon Ultra, 10 000 MWCO	<i>Millipore, USA</i>
Křemenné kyvety 3×3 mm	<i>Hellma Analytics, Německo</i>
Kyvety pro ultracentrifugaci	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Laminární box BIO 126	<i>LABOX, ČR</i>
Laminární box Clean Air Techniek B.V.	<i>PMV, Nizozemsko</i>
Lednice 225 R (4 °C)	<i>CALEX, ČR</i>
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	<i>VWR, USA</i>
Mikrokolonka Micro Trap	<i>Michrom Bioresources, USA</i>
Mikrotitrační destička	<i>Sigma, USA</i>

Mrazicí box (-20 °C)	<i>Zanussi, Itálie</i>
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	<i>Sanyo, Japonsko</i>
PCR tepelný cyklátor	<i>Eppendorf, Německo</i>
Petriho misky	<i>P-Lab, ČR</i>
pH metr 3310	<i>Jenway, UK</i>
Pipetovací nástavec Midi plus	<i>Biohit, USA</i>
Plastik pro tkáňové kultury	<i>TPP, Švýcarsko</i>
Předvážky KB1200-2	<i>Kern, Švýcarsko</i>
PureLink™ Plasmid DNA Maxiprep Kit	<i>Invitrogen, USA</i>
Robot Crystal Gryphon	<i>Art Robbins Instruments, USA</i>
Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	<i>Savant, USA</i>
Skener LiDE 210	<i>Canon, Japonsko</i>
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Biokeystone, USA</i>
Souprava pro filtraci za sníženého tlaku	<i>Sigma, USA</i>
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Spektrofotometr NanoVue Plus	<i>GE Healthcare, USA</i>
Spektrofotometr Sunrise	<i>TECAN, Německo</i>
Spektrofotometr UV/VIS	<i>Unicam, UK</i>
Termostat VLM SL1	<i>VLM, Německo</i>
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	<i>Schöeller, Německo</i>
Ultrazvuková sonda Sonoplus	<i>Bandelin, Německo</i>
Ultrazvuková vodní lázeň	<i>P-Lab, ČR</i>
UV prosvěcovací lampa	<i>UltraLum, USA</i>
Vaň	<i>ETA, ČR</i>
Vodní lázeň TW2	<i>Julabo, Německo</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>
Zdroj napětí PS 251-2	<i>Sigma, USA</i>

4.2 Chemikálie

AcN (LC-MS čistota)	<i>Merck, Německo</i>
Agar	<i>Oxoid, Anglie</i>
Agarosa	<i>Sigma, USA</i>

Akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
APS	<i>Serva, USA</i>
Azid sodný	<i>Serva, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Lach-Ner, ČR</i>
BSA	<i>New England Biolabs, USA</i>
Combi PPP master mix	<i>Top-Bio, ČR</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Sigma, USA</i>
Cystamin	<i>Sigma, USA</i>
Cysteamin	<i>Sigma, USA</i>
Činidlo dle Bradfordové	<i>Bio-Rad, Německo</i>
dNTP	<i>Top-Bio, ČR</i>
DTT	<i>Serva, USA</i>
EDTA	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Ethanol 96 %	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Glycerol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Glycin	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
GoodView	<i>Ecoli, Slovensko</i>
Guanidin	<i>Serva, USA</i>
HEPES	<i>Sigma, USA</i>
IAA	<i>Sigma, USA</i>
IPTG	<i>Serva, USA</i>
Isopropanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Kanamycin	<i>Serva, USA</i>
Kvasničný autolyzát	<i>Imuna, Slovensko</i>
Kyselina octová	<i>Lach-Nech, ČR</i>
Leupeptin	<i>Serva, USA</i>
L-arginin	<i>Serva, USA</i>
MgCl ₂	<i>Lach-Ner, ČR</i>
MgSO ₄	<i>Lach-Ner, ČR</i>
PMSF	<i>Serva, USA</i>
Pufr NEB2	<i>New England Biolabs, USA</i>
Pufr pro T4 ligasu	<i>New England Biolabs, USA</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>

Standard pro agarosovou elektroforézu	<i>New England Biolabs, USA</i>
Standard pro SDS-PAGE	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
TFA	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
Tris	<i>Sigma, USA</i>
Triton X-100	<i>Sigma, ČR</i>
Trypton	<i>Oxoid, Anglie</i>

(Čistota použitých chemikálií byla alespoň p.a. a vyšší)

4.3 Bakteriální kmeny

<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>Invitrogen, USA</i>
<i>Escherichia coli</i> BL21 Gold (DE3)	<i>Stratagene, USA</i>

4.4 Oligonukleotidy pro PCR

- AICL_S31_FW
5' AAAAAACATATGTCTCAGAGTTTATGCCCTATGAT 3'
- AICL_H149_REV
5' AAAAAAAAGCTTGTGTATTCTTTTCCTGCAAATCCA 3'
- AICL_C87S_FW
5' GCGGTATAAAAAGCAGTTCTGATC 3'
- AICL_C87S_REV
5' GATCAGAACTGCTTTTATACCGC 3'

4.5 Vektory

pET30	<i>New England Biolabs, USA</i>
-------	---------------------------------

4.6 Enzymy

DNAsa (deoxyribonuklasa)	<i>New England Biolabs, USA</i>
Deep Vent DNA polymerasa	<i>New England Biolabs, USA</i>
HindIII	<i>New England Biolabs, USA</i>
NdeI	<i>New England Biolabs, USA</i>

RNAsa (ribonukleasa)

Serva, USA

T4 DNA ligasa

New England Biolabs, USA

4.7 Plazmidové DNA

pTT28_I1 (AICL konstrukt)

RNdr. Ondřej Vaněk, Ph.D., PřF

UK, Praha, ČR

4.8 Pufry a jiné roztoky

AA: 30% akrylamid, 1% N,N'-methylen-bis-akrylamid

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

Dialyzační pufr: 10mM HEPES, 9mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 6,8

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE: 10× koncentrovaný: 3% Tris, 14,4% glycin, 1% SDS, pH 8,3

Guanidinový pufr: 6M Guanidin-HCl, 10mM DTT, pH 8,0

LB agar: 1,5% agar v LB médiu

LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4; použitá koncentrace antibiotik: kanamycin 50 µg/ml

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

Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek: 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM merkaptoethanol, 1mM NaN₃, 1mM PMSF, 1µM leupeptin, pH 7,4

Pufr A pro ionexovou chromatografii: 10mM HEPES, 9mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 6,8

Pufr B pro ionexovou chromatografii: 10mM HEPES, 1M NaCl, 1mM NaN₃, pH 6,8

Pufr pro gelovou chromatografii: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 7,5

Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek: 0,5% (w/v) Triton X-100, 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM merkaptoethanol, 1mM NaN₃, 1mM PMSF, 1µM leupeptin, pH 7,4

Renaturační pufr: 20mM HEPES, 1M L-arginin-HCl, 100mM CaCl₂, 1mM cystamin, 10mM cysteamin, 1mM NaN₃, 1mM PMSF, pH 6,8

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

TAE pufr (1x koncentrovaný): 40mM Tris, 20mM CH₃COOH, 1mM EDTA, pH 8,3

TES pufr: 10mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 8,0

Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu: 30% glycerol, 1% bromfenolová modř,
70% TE pufr

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

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující: 2× koncentrovaný: 100mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, 100mM DTT, pH 6,8

4.8.1 PureLink HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit

Pufr R3: 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa A, pH 8,0

Pufr L7: 0,2M NaOH, 1% SDS

Pufr N3: 3,1M octan draselný, pH 5,5

Pufr EQ1: 0,1M octan sodný, 0,6M NaCl, 0,15% Triton X-100, pH 5,0

Pufr W8: 0,1M octan sodný, 825mM NaCl, pH 5,0

Pufr E4: 100mM Tris-HCl, 1,25M NaCl, pH 8,5

5 METODY

5.1 Práce s DNA [43]

5.1.1 Cílená mutace konstruktů AICL [44]

K mutaci sedmého cysteinu za serin v sekvenci konstruktů AICL byla použita metoda *overlap extension PCR* neboli PCR s prodlužováním pomocí přesahujících úseků. Tento postup zahrnuje dvě po sobě jdoucí PCR reakce (Obr. 5, str. 24). Během první reakce dochází k amplifikaci od počátku konstruktů do místa mutace v jedné směsi a od místa mutace na konec konstruktů v druhé směsi. Během druhé reakce jsou obě části spojeny.

Nutností bylo nejprve navrhnout přímé oligonukleotidy konstruktů a mutační oligonukleotidy (dále primery), kdy přímé primery konstruktů obsahovaly oblast důležitou pro štěpení danými restrikčními endonukleasami a mutační primery oblast pro požadovanou změnu v sekvenci DNA oproti nativnímu stavu. Další podmínkou při návrhu primerů byla jejich délka. Ta byla navrhována tak, aby se teplota disociace primerů pohybovala mezi 50 a 60 °C.

Při první reakci PCR bylo do dvou 0,5 ml PCR zkumavek pipetováno 1 µl templátu (plazmidová DNA pTT28_ I1, c = 10 µg/µl), 1,5 µl 10mM dNTPs, 1,5 µl 10mM MgSO₄, 5 µl PCR pufru (10× koncentrovaný) a 30 µl dH₂O. Do jedné zkumavky bylo následně pipetováno 5 µl 5µM přímého primeru konstruktů a 5 µl 5µM reverzního mutačního primeru, do druhé stejné množství přímého mutačního primeru a reverzního primeru konstruktů. V závěru bylo do každé zkumavky pipetováno 0,5 µl Deep Vent DNA polymerasy, směs byla promíchána a krátce centrifugována. Zkumavky byly vloženy do tepelného cyklátoru pro PCR s následujícím teplotním programem:

- 1) 94 °C - 5 min
- 2) 94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min (30 cyklů)
- 3) 72 °C - 10 min

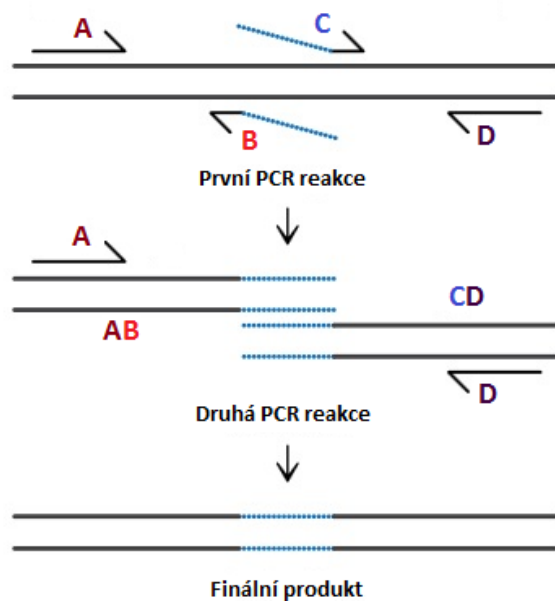
Vzorky byly po skončení reakce vyjmuty a byla s nimi provedena preparativní agarosová elektroforéza (viz. 5.1.2) a následně byly oba produkty první PCR reakce extrahovány z gelu (viz. 5.1.3) do 30 µl dH₂O.

Druhá PCR reakce spočívala ve smíchání 15 µl obou produktů z předchozí

reakce, přidání 5 μ l 5 μ M přímého primeru konstruktu a stejné množství reverzního primeru konstruktu, 1,5 μ l 10mM dNTPs, 1,5 μ l 10mM MgSO₄, 5 μ l PCR pufru (10 \times koncentrovaný) a nakonec 0,5 μ l Deep Vent DNA polymerasy. Směs byla opět promíchána a krátce centrifugována. Následovalo provedení další PCR s následujícím programem:

- 1) 94 °C - 5 min
- 2) 94 °C - 30 s; 56 °C - 30 s; 72 °C - 1 min (30 cyklů)
- 3) 72 °C - 10 min

Po skončení reakce byla opět provedena agarosová elektroforéza (viz. 5.1.2) a extrakce finálního produktu - DNA sekvence konstruktu AICL C87S z gelu (viz. 5.1.3) do 50 μ l dH₂O.



Obr. 5: Schéma *overlap extension PCR*.

V první reakci dochází k dvěma dílčím amplifikacím, a to od počátku sekvence k bodu mutace s užitím přímého primeru konstruktu (A) a reverzního mutačního primeru (B) a od bodu mutace ke konci sekvence s užitím přímého mutačního primeru (C) a reverzního primeru konstruktu (D). Ve druhé reakci dochází ke spojení dvou částí z prvního kroku s využitím přímého a reverzního primeru konstruktu (A a D). Oblast nasedání mutačního primeru je vyznačena modrou přerušovanou čarou. Šipky značí průběh amplifikace ve směru od 5' konce ke 3' konci. Převzato a upraveno z [45]

5.1.2 Preparativní agarosová elektroforéza

Gel byl připraven smícháním směsi z 0,65 g agarosy a 65 ml TAE pufru a následným povařením v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí roztoku na cca 50 °C byly přidány 3 µl fluorescenční barvy GoodView. Gel byl nalit do vaničky aparatury, tak aby se v něm nevytvořily bublinky a byl ponechán zatuhnout společně s hřebenem vytvářejícím jamky. Po zatuhnutí byl převrstven 200 ml dH₂O a k elektrodám bylo nalito 65 a 180 ml TAE pufru. Do jedné jamky byl napipetován DNA standard a do dalších vzorek DNA. Elektroforéza probíhala po dobu 20 minut při 180 V. K vizualizaci byla využita fluorescence, která byla sledována pod UV prosvěcovací lampou při 312 nm pouze po nezbytně nutnou dobu. Část gelu obsahující vyseparovaný vzorek DNA byla vyříznuta a přenesena do 1,5ml mikrozkušavky. Tento vzorek DNA byl izolován z gelu, popř. uchován v mrazáku při -20 °C.

5.1.3 Izolace DNA z gelu

Pro extrakci z gelu byla využita komerční sada Gel/PCR Fragments DNA Fragments Extraction Kit [46]. Na každých 100 mg vyříznuté části gelu bylo přidáno 300 µl pufru L1. Následovala inkubace při 50 °C, dokud se gel v roztoku nerozpustil, přičemž obsah zkumavky byl během rozpouštění občas promíchán. Roztok s DNA vzorkem byl pipetován na kolonku vloženou do mikrozkušavky a centrifugován 1 minutu při 15000 × g, 20 °C. Kolonka byla promyta 500 µl pufru L2 a opět centrifugována za stejných podmínek, jako u předchozí centrifugace. Po centrifugaci byla kolonka umístěna do čisté 1,5ml mikrozkušavky. K eluci plazmidové DNA bylo použito 50 µl sterilní dH₂O, která byla předem přehřátá na 65 °C a eluce probíhala centrifugací 2 minuty při 15000 × g, 20 °C.

5.1.4 Ligace inzertu AICL C87S do plazmidu

K přípravě linearizovaného plazmidu pET30 bylo použito zásobní množství daného plazmidu. Směs pro přípravu se skládala ze 4 µg plazmidu rozpuštěného ve sterilní dH₂O, 2 µl 10× koncentrovaného NEB2 pufru a 2 µl BSA (1 µg/ µl) - vše smícháno v 1,5ml mikrozkušavce. Výsledný roztok byl doplněn sterilní dH₂O na 19 µl. Jako poslední byly přidány restriční endonukleasy - 0,5 µl enzymu NdeI a 0,5 µl enzymu HindIII. Směs byla promíchána a inkubována 1 hodinu při 37 °C. Po inkubaci následovala elektroforetická separace na agarosovém gelu (5.1.2) a extrakce

linearizovaného vektoru DNA z gelu (5.1.3). Stejnou přípravou prošel i inzert konstruktu AICL C87S za použití stejných endonukleas.

Po extrakci z gelu byla změřena koncentrace linearizovaného vektoru a inzertu na spektrofotometru NanoVue Plus. Ligační směs byla namíchána tak, aby se v ní nacházel 3 - 6 molární přebytek inzertu vůči linearizovanému vektoru. V 1,5ml mikrozkušavce bylo tedy smícháno 8 μ l inzertu, 2 μ l linearizovaného plazmidu, 2 μ l 10 \times koncentrovaného pufru pro T4 DNA ligasu, doplněno na 19 μ l sterilní dH₂O a nakonec přidán 1 μ l enzymu T4 DNA ligasy. Následně byla směs inkubována 30 minut za laboratorní teploty.

5.1.5 Transformace a kultivace *Escherichia coli* DH5 α (1) [42]

Mikrozkušavka s alikvotem kompetentních bakteriálních buněk *E. coli* DH5 α , připravených za použití transformačního kitu pro *Escherichia coli* Mix & Go, byla ponechána volně rozmrazat na ledu. Po rozmrznutí bylo k suspenzi buněk o objemu 50 μ l přidáno veškeré množství ligační směsi z předchozí kapitoly. Směs byla inkubována v mikrozkušavce na ledu po dobu 20 minut. Poté byl přidán 1 ml LB média předehřátého na 37 °C, zkušavka byla několikerým otočením promíchána a umístěna do inkubátoru na 1 hodinu při 37 °C. Po inkubaci byl obsah mikrozkušavky centrifugován 3 minuty při 2000 \times g, 20 °C, přebytek LB média byl odstraněn a buňky byly ve zbytku média resuspendovány. Suspenze byla rozetřena na předehřáté Petriho misce s LB agarem a kanamycinem. Bakterie byly inkubovány přes noc (okolo 16 hodin) při 37 °C. Misky s koloniemi *E. coli* DH5 α byly další den zpracovány, nebo uchovány v lednici při teplotě 4 °C.

5.1.6 PCR z kolonií

Na Petriho misce bylo vybráno šest kolonií pro selekci pozitivních klonů pomocí PCR z kolonií. Každá náhodně vybraná kolonie na misce byla jemným dotykem nasáta do 200 μ l pipetovací špičky a opláchnuta v 6 μ l dH₂O v 0,2 ml mikrozkušavce pro PCR. Stejná špička byla následně opláchnuta v 5 ml LB média s přidáním kanamycinem v 50 ml zkušavce. Následně byly zkušavky inkubovány 16 hodin při 220 ot./min, 37 °C.

Do 0,2ml mikrozkušavek obsahujících suspenzi byly přidány 2 μ l 5 μ M přímého primeru konstruktu AICL C87S, 2 μ l 5 μ M reverzního primeru konstruktu

AICL C87S a 10 μ l 2 \times koncentrované Combi PPP PCR reakční směsi. Směs byla lehce promíchána a centrifugována. Následovala PCR metoda v tepelném cyklátoru s následujícím teplotním programem:

- 1) 94 °C - 5 min
- 2) 94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min (20 cyklů)
- 3) 72 °C - 10 min

Po skončení programu byla teplota v cyklátoru snížena na 4 °C. S výslednými produkty byla provedena analýza pomocí agarosové elektroforézy (viz.5.1.2).

5.1.7 Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA pET30_AICL C87S

K přípravě nízkoobjemové plazmidové DNA bylo použito 5ml noční kultury *Escherichia Coli* DH5 α transformované plazmidem pET30_AICL C87S. K izolaci DNA byla použita komerčně dodávaná souprava High Speed Plasmid Mini Kit [47]. Suspenze ve zkumavce byla postupně po 1 ml zcentrifugována v mikrozkuhavce, vždy 1 minutu při 15000 \times g, 20 °C. Po centrifugaci a odstranění posledního supernatantu bylo k peletu bakterií přidáno 200 μ l resuspendačního pufru s RNasou PD1 a peleta byla resuspendována. Následovalo přidání dalších 200 μ l lyzačního pufru PD2 a zkumavka byla několikanásobným otočením promíchána. Po 2 minutách inkubace bylo ke směsi přidáno 300 μ l neutralizačního pufru PD3 a obsah zkumavky byl opět několika pohyby promíchán a následně centrifugován 3 minuty při 15000 \times g, 20 °C. Supernatant byl přenesen do kolonky a centrifugován 30 sekund za předešlých podmínek. Po odstranění filtrátu bylo na kolonku pipetováno 400 μ l W1 pufru a kolonka centrifugována, 600 μ l promývacího Wash pufru a opět centrifugována. Filtrát byl odstraněn a kolonka byla 3 min centrifugací vysušena. Následovala eluce čisté DNA přehřátou sterilní dH₂O (65 °C). Na kolonku bylo pipetováno 50 μ l dH₂O a po 2 minutách byla kolonka přemístěna do čisté 1,5ml mikrozkuhavky a centrifugována 2 minuty za předešlých podmínek. Kvalita a koncentrace získané plazmidové DNA byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoVue Plus a sekvenací DNA.

5.1.8 DNA sekvenace

Vzorky určené pro sekvenaci DNA byly připraveny do 0,2 ml PCR mikrozkušavek smícháním 10 ng plazmidové DNA na každých 100 párů bází a 1 μ l 5 μ M roztoku přímého sekvenačního primeru v jedné zkumavce a 1 μ l 5 μ M reverzního sekvenačního primeru v druhé. Obsah zkumavky byl následně zředěn sterilní dH₂O na 14 μ l. Sekvenaci plazmidové DNA provedla *Laboratoř sekvenace DNA, PřF UK* pomocí automatického sekvenátoru 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, USA).

5.2 Velkoobjemová příprava plazmidové DNA mut. AICL C87S

5.2.1 Transformace a kultivace *Escherichia coli* DH5 α (2)

Nejprve byl rozmražen alikvot kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5 α stejným způsobem jako v kapitole 5.1.5. Po rozmrznutí bylo k suspenzi buněk o objemu 50 μ l přidáno 5 μ l plazmidové DNA pET30_AICL C87S ($c = 25$ ng/ μ l, $A_{260}/A_{280} = 1,6$). Následoval totožný postup jako v již zmíněné kapitole. Bakterie byly inkubovány přes noc (okolo 16 hodin) při 37 °C. Misky s koloniemi *E. coli* DH5 α byly uchovány v ledničce při teplotě 4 °C.

Na Petriho misky s koloniemi byly pipetovány 4 ml LB média, v němž byly kolonie resuspendovány a převedeny do 0,5 l LB média s přídavkem kanamycinu ve 2l sterilních Erlenmeyerových baňkách. Kultury byly třepány v třepačce s termostatem 15 hodin při 37 °C, 220 ot./min. Po inkubaci byl obsah baňek převeden do 250ml plastových centrifugačních kyvet a centrifugován 30 minut při 4500 \times g, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelety zpracovány při izolaci plazmidové DNA, nebo uchovány v mrazáku při -20 °C.

5.2.2 Izolace plazmidové DNA

Pelety byly resuspendovány ve 40 ml TES pufru a suspenze rozdělena po 20 ml do dvou 30ml polypropylenových centrifugačních zkumavek. Obsah zkumavek byl centrifugován při 14000 \times g po dobu 10 minut, 4 °C. Supernatant byl odstraněn. Pro izolaci plazmidové DNA byla použita komerční sada PureLink Plasmid DNA Maxiprep Kit [48]. Pelety ve zkumavce byly resuspendovány v 9 ml resuspendačního pufru R3 s RNasou. Následně bylo přidáno stejné množství lyzačního pufru L7 a obsah kyvet byl promíchán několikerým otočením zkumavky. Po 5 minutách inkubace za laboratorní teploty bylo ke směsi přidáno 9 ml precipitačního pufru N3 a směs byla opět

promíchána několikanásobným obrácením zkumavky, čímž vznikla hustá bílá sraženina. Obsah zkumavek byl centrifugován po dobu 10 minut při $14000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant ze zkumavky byl převeden na kolonu, která byla předem ekvilibrována 30 ml ekvilibračního pufru EQ1. Po prokapání supernatantu přes kolonu byla kolona promyta 25 ml promývacího pufru W8 a nakonec došlo k eluci DNA 15 ml elučního pufru E4 do čisté zkumavky. K eluátu bylo přidáno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu a obsah zkumavky byl centrifugován 30 minut při $20000 \times g$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odstraněn, k peletě bylo přidáno 5 ml předchlazeného 70% (v/v) ethanolu a peleta jím opláchnuta. Obsah zkumavky byl opět centrifugován po dobu 5 minut při $15000 \times g$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odstraněn a peleta byla krátce vysušena ve vakuové odparce. Po vysušení byla peleta rozpuštěna v 1 ml sterilní dH_2O .

5.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA

Ke zjištění koncentrace a čistoty byla plazmidová DNA $300\times$ zředěna v dH_2O a změřena absorbance při 260 a 280 nm. K vypočítání koncentrace bylo užito empirického vztahu, kdy při absorbanci $A_{260} = 1,0$ je koncentrace DNA v roztoku rovna $50\text{ }\mu\text{g/ml}$. Čistota DNA byla určena z poměru A_{260}/A_{280} . Pro čistou DNA je tento poměr roven přibližně 1,8.

5.3 Velkoobjemová exprese proteinu AICL

5.3.1 Transformace a kultivace *E. coli* BL21 Gold (DE3) [42]

Stejně jako u předchozích transformací (viz. kapitoly 5.2.1 a 5.1.5) byl stejným způsobem rozmrazen alikvot kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli* BL21 Gold (DE3). K suspenzi buněk o objemu $100\text{ }\mu\text{l}$ bylo přidáno $0,6\text{ }\mu\text{l}$ velkoobjemově připravené plazmidové DNA pET30_AICL C87S ($c = 1,70\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $A_{260}/A_{280} = 1,64$). Následoval stejný postup jako v již zmíněných kapitolách o transformaci. V závěru byla suspenze buněk rozetřena na Petriho misky s LB agarem s přidavkem kanamycinu a Petriho misky byly inkubovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího dne.

Druhý den byly kolonie na misce resuspendovány 4 ml LB média a převedeny do $0,5\text{ l}$ LB média s přidavkem kanamycinu ve 2l sterilních Erlenmeyerových baňkách. Kultury byly třepány ve třepačce vytemperované na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ při 220 ot./min .

Během třepání byla sledována absorbance kultury oproti čistému LB médiu při vlnové délce 550 nm . Sledování absorbance bylo započato přibližně 2 hodiny po

umístění kultur do třepačky a poté byla absorbance sledována každých 20 - 30 minut, dokud se nepohybovala v rozmezí hodnot 0,6 - 0,7. Následně byla kultura zaindukována přidáním IPTG do výsledné koncentrace 0,5 mM a teplota inkubace byla snížena na 18 °C. Při stejných otáčkách se kultura třepala do druhého dne, kdy byla kultivace ukončena. Obsah baněk byl převeden do 250ml plastových centrifugačních kyvet a centrifugován 30 minut při $4500 \times g$, 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelety zpracovány izolací inkluzních tělísek, nebo uchovány v mrazáku při -20 °C.

5.3.2 Izolace inkluzních tělísek

Pelety z dílčích 0,5l LB produkcí byly resuspendovány každá v 10 ml sacharosového lyzačního pufru s přidavkem inhibitorů proteas PMSF (výsledná koncentrace 1 mM) a leupeptinu (výsledná koncentrace 1 μ M). Suspenze byly převedeny do 30ml polypropylenových zkumavek. Buňky v suspenzi sacharosového lyzačního pufru byly následně rozbíjeny ultrazvukem pomocí sonikační sondy po dobu 3×30 s za stálého chlazení na ledu. Po sonikaci byla homogenizovaná směs $4 \times$ zmrazena v -80 °C a následně vždy rozmrazena ve vodní lázni vytemperované na 37 °C. Po posledním rozmražení bylo k suspenzi v každé zkumavce přidáno vždy 200 μ l $MgCl_2$ (1 M), 10 μ l DNAsy (10 U/ μ l) a 2,5 μ l RNAsy (10 mg/ml). Směs byla inkubována po dobu 20 minut za laboratorní teploty a za nepřístupu světla. Po inkubaci byl obsah zkumavek opět sonikován 3×30 s jako při předešlé sonikaci a centrifugován 10 minut při $8000 \times g$, 4 °C. Vzniklý supernatant byl ze zkumavek odstraněn a uchován pro kontrolu průběhu izolace pomocí SDS elektroforézy. Ke vzniklým peletám bylo přidáno vždy 10 ml pufru s detergentem (Triton X-100) společně s inhibitory proteas o stejné koncentraci jako v sacharosovém lyzačním pufru. Pelety byly resuspendovány, suspenze opět sonikovány 3×30 s a obsah zkumavek centrifugován 10 minut při $8000 \times g$, 4 °C. Opět byl odebrán supernatant pro kontrolu. V posledním kroku byly pelety resuspendovány, každá v 10 ml promývacího pufru bez detergentu s inhibitory proteas o stejné koncentraci jako v předchozích pufrech a jejich obsah opět sonikován 3×30 s. Následovala poslední centrifugace 10 minut při $8000 \times g$, 4 °C, odstranění a uchování supernatantu pro následnou kontrolu. Z pelet byl taktéž odebrán vzorek ke kontrole pomocí SDS elektroforézy a pelety byly uchovány v mrazáku při -20 °C.

5.3.3 SDS elektroforéza [49]

Ke kontrole vzorků odebraných v průběhu izolace inkluzních tělísek byl použit 15% dělicí polyakrylamidový gel. Po sestavení soupravy pro přípravu gelu byl připraven dělicí a zarovnávací gel podle složení uvedeného v Tab. 2. Nejprve byl nalit mezi elektroforetická skla dělicí gel, který byl převrstven dH₂O z důvodu lepšího zarovnání gelu. Po jeho zatuhnutí byla voda slita a byl nanesen zaostřovací gel, do něhož byl vložen hřeben tvořící jamky (10 nebo 15 jamek). Po zatuhnutí zarovnávacího gelu byl hřeben vyjmut a skla s gelem vložena do elektroforetické aparatury. Ta byla zalita elektrodoým pufrem, včetně skel s gely. Odebrané vzorky pro SDS elektroforézu bylo nejprve třeba smíchat se vzorkovým pufrem, a to neredukujícím nebo redukujícím (neredukující s přídavkem 100mM DTT). Kapalné vzorky pro elektroforézu byly vždy smíchány z 10 μ l vzorku a 10 μ l 2 \times koncentrovaného vzorkového pufru. Vzorky z pelet bylo třeba rozpustit v nadbytku stejného pufru. Následně byly mikrozkušavky s takto nachystanými vzorky umístěny na 5 minut do vroucí lázně a po dostatečném povaření krátce centrifugovány. Na gel bylo pipetováno 5 μ l proteinového standardu a 10 μ l od každého vzorku. Elektroforéza probíhala 60 minut při 200 V. Poté byly gely vyjmuty ze skel a minimálně 30 minut barveny v barvicí lázni. Po dostatečném obarvení byly gely přelity odbarvovacím roztokem a postupně odbarveny.

Tab. 2: Složení 15% dělicího a zarovnávacího polyakrylamidového gelu (množství pro přípravu 2 gelů)

Látka	Dělicí polyakrylamidový gel [ml]	Zarovnávací polyakrylamidový gel [ml]
dH ₂ O	1,800	1,400
30% AA	4,000	0,500
1,5M Tris, pH 8,8	2,000	-
1M Tris, pH 6,8	-	0,250
10% SDS	0,080	0,020
10% APS	0,080	0,020
TEMED	0,004	0,003

5.3.4 *In vitro* renaturace proteinu AICL

Peleta inkluzních tělísek z 0,5l produkce byla rozpuštěna ve 2 ml 6M guanidinového pufru s přídavkem inhibitorů proteas PMSF (výsledná konc. 1 mM) a leupeptinu (výsledná konc. 1 μ M). Zkušavka se směsí byla inkubována ve vodní lázni

vytemperované na 40 °C. V průběhu rozpouštění byl obsah zkumavky protřepáván a rozbíjen v sonikační lázni. Po rozpuštění inkluzních tělísek byla provedena ultracentrifugace při 50000 × g, 30 min, 4 °C. K centrifugaci byly užity 26,5ml ultracentrifugační kyvety, které byly po okraj doplněny 6M guanidinovým pufr. Po skončení ultracentrifugace byl supernatant odebrán a centrifugací při 4500 × g 4 °C zakonzentrován na co nejmenší objem v koncentrátoru Amicon Ultra 10 000, aby bylo odstraněno co nejvíce guanidinového pufru. V průběhu ultracentrifugace a zakonzentrování byl připraven renaturační pufr (Tab. 3). Renaturace byla provedena metodou mnohonásobného zředění, kdy byl roztok s rozpuštěným proteinem přikapáván do 200 ml renaturačního pufru za stálého míchání při teplotě 4 °C. Následovala hodinová renaturace za stálého míchání při stejné teplotě. Po hodině byl pufr s renaturovaným proteinem přenesen do dialyzačních trubic a ty byly umístěny do nádoby s 6 l dialyzačního pufru. Obsah nádoby byl míchán při 4 °C do druhého dne. Po skončení dialýzy byl obsah dialyzačních trubic přelit do kádinky a byla provedena purifikace proteinu.

Tab. 3: Složení renaturačního pufru pro *in vitro* renaturaci AICL C87S

Látka	Konzentrace [M]
HEPES	0,020
Cysteamin	0,010
Cystamin	0,001
Arginin	1,000
CaCl ₂	0,100
NaN ₃	0,001
PMSF	0,001
pH	6,8

5.3.5 Optimalizace *in vitro* renaturace

Z důvodu vysoké spotřeby argininu byla provedena optimalizace *in vitro* renaturace v renaturačních pufrech o různé koncentraci argininu. Experiment byl proveden dle stejného postupu jako v kapitole 5.3.4 s rozdílem, že při každé renaturaci byl použit pufr s jinou koncentrací argininu (1M, 0,5M a 0,25M). Postup renaturace, doba míchání i teplota prostředí byla totožná s předchozím postupem.

Druhou změnou bylo nahrazení centrifugace v ultracentrifuze při 50000 × g, 30 min, 4 °C za centrifugaci při 20000 × g, 60 min, 4 °C. Byla tak eliminováno potřebné

přesné vyvažování ultracentrifugačních kyvet, mnohonásobné ředění proteinu v dalším guanidinovém pufru z důvodu potřebného naplnění ultracentrifugačních kyvet po okraj a následné zakoncentrování proteinu v pufru za účelem odstranění co nejvíce pufru.

5.4 Purifikace proteinu AICL

5.4.1 Ionexová chromatografie s lineárním gradientem

Pro ionexovou chromatografii byla použita kolonka SP Sepharosa FF o rozměrech 7×25 mm a objemu 1 ml. Chromatografie probíhala s lineárním gradientem po dobu 20 minut při průtoku 0,5 ml. Gradient byl nastaven od 9mM (0 %) až po 1M (100 %) koncentraci NaCl. K purifikaci byl použit HPLC systém ÄKTAbasic se spekrofotometrickým detektorem o vlnové délce 280 nm. Před dávkováním na kolonu byl získaný roztok z dialyzačních trubic 10 minut centrifugován při 4500 × g, 4 °C a hned poté filtrován přes filtrační papír za sníženého tlaku, aby byl získán čistý supernatant bez precipitovaného proteinu, který během dialýzy v trubicích vznikl. Kolona byla před dávkováním promyta, ekvilibrována pufrem A, pufrem B a opět pufrem A. Dávkování čistého roztoku na kolonu bylo provedeno s průtokem 4 ml/min. Z důvodu malé kapacity kolony bylo třeba roztok dávkovat po částech, aby nedošlo ke zbytečným ztrátám nezachyceného proteinu v odpadu. Po nadávkování veškerého roztoku byla kolona opět krátce promyta pufrem A. Během metody byly jednotlivé frakce manuálně jímány do 1,5ml mikrozkuvek. Poté byla s jednotlivými frakcemi provedena analýza pomocí SDS elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu a gelová permeační chromatografie.

Tab. 5: Složení pufrů pro gradientovou ionexovou chromatografii

Látka	Pufř A [M]	Pufř B [M]
HEPES		0,010
NaCl	0,009	1,000
NaN ₃		0,001
pH		6,8

Ionexová chromatografie s roztoky proteinu získanými z optimalizace *in vitro* renaturace v pufrech o různé koncentraci argininu probíhala stejným způsobem. Následovala SDS elektroforéza (viz. 5.3.3) a gelová permeační chromatografie.

5.4.2 Gelová permeační chromatografie

Frakce získané z ionexové chromatografie byly spojeny a pomocí koncentrátorů Amicon Ultra 10000 zakoncentrovány centrifugací při $4500 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na objem $< 400\ \mu\text{l}$. V průběhu zakoncentrování byla frakce prošla přes membránu koncentrátoru kontrolována metodou dle Bradfordové, zda membrána protein nepropouští. Po zakoncentrování byl vzorek připraven pro dávkování do HPLC systému ÄKTAbasic. Na systém byla napojena kolona Superdex 200 10/300 GL o tlakovém limitu 1,5 MPa. Před analýzou byla kolona promyta 20% ethanolem, dH_2O , 1 M NaOH a HEPES pufrům pro gelovou chromatografii. Celá metoda probíhala 50 minut při průtoku 0,5 ml/min. Před dávkováním vzorku do systému byla dávkovací smyčka promyta HEPES pufrům pro gelovou chromatografii pomocí injekční stříkačky opatřené tupou jehlou. Následoval nástřik koncentrovaného vzorku pomocí mikrostříkačky. Během metody byly manuálně jímány jednotlivé frakce o cca 0,5 ml do mikrozkušavek. Z frakcí byly odebrány vzorky pro analýzu pomocí SDS elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu (viz. 5.3.3) a frakce byly uchovány v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4.3 Měření koncentrace získaného proteinu [49]

Po provedení SDS elektroforézy a zjištění, zda je molekulová velikost i čistota proteinu vyhovující, byly jednotlivé frakce spojeny a byla u nich zjištěna koncentrace proteinu. Ta byla stanovena metodou dle Bradfordové na 96-ti jamkové mikrotitrační destičce. Jako první byla připravena kalibrační řada z roztoků BSA v koncentračním rozmezí 0,1 - 0,9 mg/ml. Do jamky bylo pipetováno vždy 200 μl činidla dle Bradfordové a 5 μl standardu BSA a směs byla dostatečně promíchána. Dále bylo smícháno 200 μl činidla dle Bradfordové a 5 μl vzorku. Po 5 minutách inkubace byly obsahy jamek opět řádně promíchány a byla změřena absorbance při 595 nm pomocí čtečky destiček Sunrise. Ze získaných hodnot kalibrační řady byla sestrojena kalibrační křivka a získána rovnice regrese, s jejíž pomocí zbyla zjištěna koncentrace proteinu ve frakci.

5.5 Mapování disulfidických můstků pomocí hmotnostní spektrometrie

Mapování zapojení disulfidových můstků tvořených mezi jednotlivými cysteiny ze sekvence proteinu bylo provedeno měřením hmotnosti (m/z) peptidových štěpů z proteinu konstruktu AICL C87S v oxidativním prostředí. Vlastní práce byla provedena Mgr. Zdeňkem Kukačkou (*Laboratoř charakterizace molekulární struktury, MBÚ AV ČR*) dle standardního protokolu.

5.5.1 Gradientová SDS elektroforéza v oxidativním prostředí

Ve zkumavce bylo smícháno 10 μ l proteinu v HEPES pufru a 2 μ l 120mM alkylačního roztoku IAA. Obsah zkumavky byl ponechán 20 minut inkubovat za nepřístupu světla a za laboratorní teploty. Po inkubaci byly ke směsi přidány 2 μ l 1mM roztoku cystaminu a 4 μ l 5 \times koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru. Po minutové inkubaci při 90 °C a následné centrifugaci byl vzorek nanesen na komerční gradientový polyakrylamidový gel (4-12% NuPAGE Bis-Tris gradient gel). Elektroforéza probíhala 40 minut při napětí 200 V. Poté byl gel barven 30 minut v barvicí lázni a následně odbarven odbarvovacím roztokem. Proužek charakteristický pro protein byl vyříznut a rozdělen na malé kostičky. Ty byly v mikrozkušavce doplněny o 0,1M EtMorf pufr, pH 8,2 a obsah zkumavek byl sonikován. Supernatant byl odstraněn a postup byl opakován do odbarvení kostiček gelu. Následoval oplach roztokem cystaminu v dH₂O a sonikace, oplach roztokem cystaminu v AcN a sonikace. Poslední oplach byl proveden v EtMorf pufru, následovala sonikace a odstranění supernatantu.

5.5.2 Digesce trypsinem a extrakce peptidů

S gelem, který obsahoval protein, byla zahájena digesce trypsinem. Kousky gelu byly zcela ponořeny v pufru pro digesci trypsinem a byla provedena inkubace ve vodní lázni při 37 °C po dobu 8 - 12 hodin. Po inkubaci byl supernatant odebrán do čisté mikrozkušavky a gel byl sonikován 5 minut v 50 μ l 80% AcN s 0,1% přídavkem kyseliny TFA a získaný supernatant byl přidán do předchozí zkumavky. Supernatant byl vysušen ve vakuové rotační odparce a k sušině bylo přidáno 100 μ l 0,1% TFA a sonikován 15 minut.

5.5.3 Nabohacení a odsolení peptidů

Komerční kolonka Micro Trap byla promyta 500 μ l 80% AcN, 0,1% TFA, poté 300 μ l 0,1% TFA a následovalo nanesení 100 μ l 0,1% TFA peptidového extraktu. Kolonka byla opět promyta, a to dvakrát 500 μ l 0,1% TFA. Nabohacená a odsolená peptidová frakce byla eluována 50 μ l 80% AcN, 0,1% TFA do čisté mikrozkušavky. Eluát byl vysušen v rotační vakuové odparce a uchován v mrazáku při -80 °C do samotného měření.

5.5.4 Hmotnostní spektrometrie - analýza [50]

Nachystané vzorky ve vialkách, připravené smícháním vzorku s 20 μ l dH₂O a 30 μ l 5% AcN, 1% kys. octové, byly umístěny do vzorkovače napojeného k LC-MS. Kapalinová chromatografie (μ HPLC Agilent 1200) s připojenou kolonou Magic C18 byla provedena s dvěma roztoky mobilní fáze o následujícím složení: roztok A (0,2% FA, 2% IPA, 2% AcN v dH₂O) a roztok B (0,16% FA, 10% IPA, 5% AcN v dH₂O). Objem nástřiku na kolonu činil 5 μ l. K analýze byl použit hmotnostní spektrometr Apex-Ultra. Ionizace peptidů byla provedena měkkou ionizační technikou ESI a detekce pomocí FT-ICR. Analýza získaných hodnot m/z byla provedena speciálními programy DataAnalysis 4.0 a MSLinks, které jsou vhodné pro sledování disulfidových můstků, popřípadě N-glykosylace. Vlastní měření bylo provedeno Mgr. Zdeňkem Kukačkou.

5.6 Charakterizace proteinu

5.6.1 Sedimentační analýza pomocí analytické centrifugy [51]

Měření metodou sedimentační rychlosti bylo provedeno na analytické centrifuze Proteomelab XL-1 s rotorem An50Ti. Z výsledku této analýzy, což je sedimentační koeficient molekuly, lze získat informace o tvaru a velikosti molekuly proteinu. Toto měření a jeho vyhodnocení provedl RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

K měření byla použita dvoukomorová cela, kdy v jedné části byl přítomen roztok proteinu o objemu 430 μ l a v druhé příslušný pufr jako reference, též o objemu 430 μ l. Měření probíhalo při 50000 ot./min, 20 °C a sedimentace vzorku byla sledována spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. První měření bylo provedeno se vzorkem proteinu AICL C87S v HEPES pufru o výsledné koncentraci 0,1 mg/ml a bylo sbíráno 100 snímků po dobu 5 minut. Druhé měření bylo provedeno se stejným vzorkem v téže pufru s koncentrací 1,1 mg/ml. Sbíráno bylo 100 snímků po dobu 8 minut.

Parciální specifický objem proteinu společně s hustotou a viskozitou pufru byly predikovány pomocí programu SEDNTERP [52] a naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu SEDFIT [53].

5.6.2 Dynamický rozptyl světla, DLS

Se vzorkem proteinu AICL C87S o koncentraci 1,1 mg/ml v HEPES pufru bylo provedeno měření dynamického rozptylu světla (DLS, *dynamic light scattering*). K měření byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments Ltd., UK*) opatřený heliovo-neonovým laserem o vlnové délce 633 nm. Metodu provedla a vyhodnotila RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D. (*Fyzikální ústav, MFF UK*).

Vzorek byl nejprve zfiltrován přes 0,1 μ m centrifugační filtry Ultrafree-MC (*Millipore, USA*) z důvodu odstranění prachových částic, které by mohly rušit stanovení. Měření bylo provedeno v křemenných kyvetách o rozměru 3 \times 3 mm a objemu 40 μ l, a to pod úhlem 173° a teplotě 20 °C. Měření teplotní denaturace bylo provedeno v teplotním rozsahu 20 - 60 °C s krokem po 1 °C s následným čekáním 3 minuty pro teplotní stabilizaci mezi jednotlivými měřeními; vzorek byl převrstven 100 μ l minerálního oleje z důvodu zamezení jeho odparu. Pro vyhodnocení výsledků byl použit software Zetasizer 6.2 (*Malvern Instruments Ltd., UK*).

5.6.3 Ramanova spektroskopie, DCDR

Ramanova spektroskopie metodou kapkově nanášených povlaků (DCDR, *drop coating deposition Raman*) a následné vyhodnocení byly provedeny RNDr. Vladimírem Kopeckým Jr., Ph.D. (*Fyzikální ústav, MFF UK*). Technika DCDR je založena na efektu kávového kroužku a umožňuje nedestruktivní spektroskopická měření roztoků biomolekul s koncentrací až 1 μ M [54]. Metodicky se jedná o umístění kapky roztoku vzorku na hydrofobní povrch, kdy po vysušení kapky dojde na jejím okraji ke vzniku kroužku [55].

Protein AICL C87S koncentrací 0,7 mg/ml byl nejprve převeden do 10mM Tris pufru, pH 7. Ten byl dále dialyzován na speciálním 0,0025 μ m/white VSWP/13 mm filtru (*Millipore, USA*) proti dH₂O po dobu 20 minut. Následovala nanáška 2 μ l vzorku na hydrofobní povrch CaF₂ destičky, kde byl vzorek ponechán vyschnout za pokojové teploty. Vzniklý povlak byl zkoumán pomocí Ramanova mikroskopu. Použit byl spektrometr HR 800 Raman mikrospektrometr (*Horiba Jobin Yvon, Fracie*) s laserem o

vlnové délce 632,82 nm. Spektra byla integrována po dobu 10 minut za použití CCD detektoru (*charge-coupled device*) chlazeného kapalným dusíkem.

5.7 Krystalizace receptoru AICL C87S

Krystalizace připraveného proteinu AICL C87S probíhala v *Henry Wellcome Bulding for Genomic Medicine, University od Oxford, UK* pod dohledem Mgr. Jana Bláhy. Tyto experimenty probíhají za podpory projektu *Instruct - Integrating structural biology*.

Ke krystalizaci připraveného konstruktů receptoru AICL C87S bylo třeba užití značného množství krystalizačních podmínek, z kterých by byly vybrány ty nevhodnější. Takovéto experimenty byly provedeny v mikroskopických objemech nasazených kapek, kdy bylo využito řady krystalizačních podmínek z komerčních sad pro krystalizaci proteinů.

Protein AICL C87S byl přepraven do *Henry Wellcome Bulding for Genomic Medicine*, kde bylo využito speciálních robotů schopných pipetovat kapky o objemech až 100 nl. Širokospektré nasazení optimalizačních podmínek probíhalo metodou sedící kapky na 96 jamkových krystalizačních destičkách (*Greiner, Německo*). Nejprve robot *Hydra 96 (Art Robbins Instruments, USA)* naplnil 96 rezervoárů sadou srážedel. Následovalo přemístění krystalizační destičky na robota typu *Cartesian (Genomic Solutions, USA)*, který si ze zkumavky se odebral 9,6 μ l proteinového preparátu a do každé krystalizační pozice nad rezervoárem pipetoval 100 nl kapičku. Poté robot odebral z každého rezervoáru stejné množství srážedla a pipetoval ho ke kapce preparátu. Tím bylo připraveno 96 podmínek pro krystalizaci o objemu 200 nl. Pro zamezení odparu srážedel byla destička překryta speciální fólií. Krystalizační pokusy byly uskladněny při 20 °C v automatizovaném skladišti, které zajišťuje pravidelnou digitální vizualizaci všech krystalizačních podmínek přístupných ke kontrole po internetu.

6 VÝSLEDKY

6.1 Cílená mutagenese konstruktů receptorů AICL

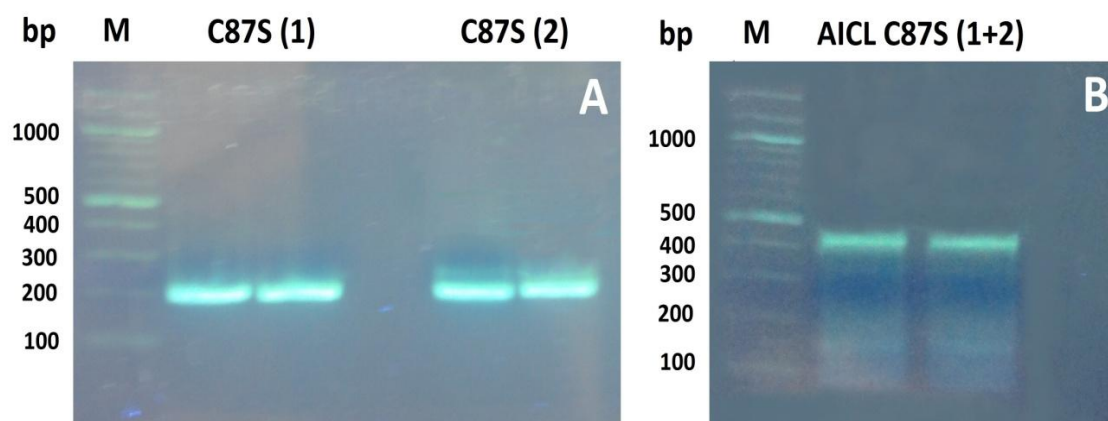
Prvním krokem v této práci byl úkol vyřešit problémové sbalování konstruktů receptorů AICL během *in vitro* renaturace po expresi v bakteriálním expresním systému. Z předchozí studie vyplynulo, že během zapojování disulfidových můstků může docházet k interakci nepárového cysteinu s ostatními, a tím i tvorbě nescificky sbalených agregátů. Při srovnání sekvencí příbuzných CTLD receptorů NK buněk lze vyzorovat, že až na výjimky jejich C-lektinová doména disponuje šesti cysteiny v konzervovaných pozicích. Jednou takovou výjimkou je i extracelulární doména receptoru AICL, která disponuje navíc sedmým cysteinem v pozici 87. Ten by teoreticky mohl být za přirozených podmínek zodpovědný za dimerizaci proteinu.

Po srovnání těchto sekvencí bylo rozhodnuto, že bude vytvořena mutovaná forma tohoto konstruktů, a to záměnou cysteinu v pozici 87 za serin, čímž by mělo být zamezeno interakcím tohoto nepárového cysteinu s ostatními a dojde k sbalení proteinu do přirozené konformace.

K mutaci byla použita metoda PCR s prodlužováním přesahujících úseků (viz. 5.1.1). Jako templát byla použita plasmidová DNA pTT28_I1 obsahující konstrukt extracelulární části receptoru AICL (viz. Obr. 3, str. 10). Během první PCR reakce byly použity přímý primer konstruktů AICL_S31_FW a navržený reverzní mutační primer AICL_C87S_REV v první reakční směsi a přímý mutační primer AICL_C87S_FW s reverzním primerem konstruktů AICL_H149_REV v druhé reakční směsi. Sekvence primerů jsou uvedeny v použitých materiálech (viz 4.4). Po provedení PCR reakce byly amplifikované úseky přečištěny pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 6, str. 40) a spojeny v druhé PCR reakci (Obr. 6, str. 40). Ve druhé PCR reakci byly použity přímý a reverzní primer konstruktů - AICL_S31_FW a AICL_H149_REV. Předpokládaná velikost DNA sekvence kódující konstrukt AICL s bodovou mutací C87S činí 381 bp.

Mutovaný konstrukt AICL C87S byl použitím navržených primerů opatřen sekvencemi pro štěpení restrikčními endonukleasami NdeI (sekvence CATATG) a HindIII (sekvence AAGCTT). Díky tomu byl tento inzert na svých koncích upraven tak, aby mohl být vložen do expresního vektoru pET30, vhodného pro expresi v bakteriálních systémech. Ten obsahuje totožná restrikční místa pro tyto endonukleasy. Po štěpení byly směsi fragmentů separovány pomocí agarosové elektroforézy a

odpovídající fragmenty byly vyříznuty a extrahovány. Z inzertu AICL C87S a linearizovaného vektoru pET30 byla připravena ligační směs společně s T4 DNA ligasou. Tato směs byla použita k transformaci bakterií *E. coli* DH5α a po inkubaci byla směs natřena na misku s LB agarem s přidavkem kanamycinu.

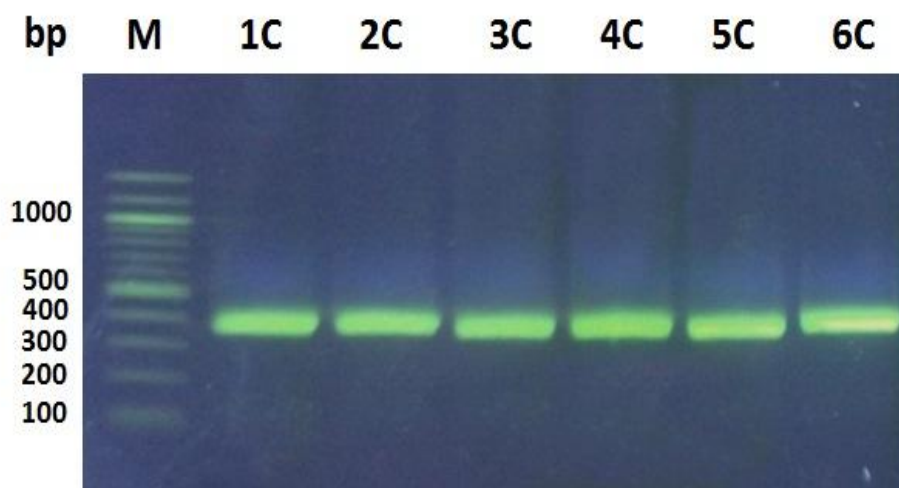


Obr. 6: Fotografie agarosové elektroforézy se vzorky z PCR s prodlužováním přesahujících úseků.

A: Fotografie zobrazuje dubletní dráhy produktů C87S (1) a C87S (2) po prvních reakcích PCR obsahující fragmenty s mutací C87S a překrývajícími se úseky. Předpokládaná velikost C87S (1) je 193 bp, C87S (2) je 211 bp. **M** obsahuje DNA standard v bp.

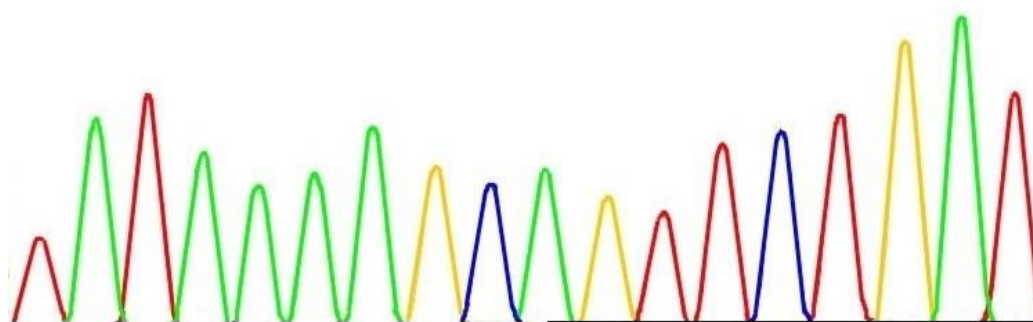
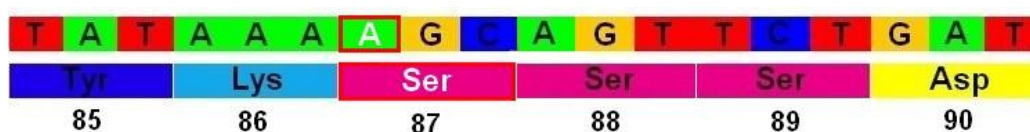
B: Fotografie zobrazuje dublet produktu z druhé reakce PCR, který obsahuje spojené fragmenty z prvních PCR reakcí. Předpokládaná velikost činí 381 bp. **M** obsahuje DNA standard v bp.

Druhý den bylo z četného počtu kolonií vybráno šest, s kterými byla provedena PCR z kolonií (viz. 5.1.6). Jako přímý primer byl použit přímý primer konstruktu AICL_S31_FW a jako reverzní primer konstruktu AICL_H149_REV. Následovala analýza pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 7, str. 41). Klon 1C byl vybrán pro nízkoobjemovou přípravu DNA (viz. 5.1.7). Z připravené DNA byl posléze odebrán vzorek pro sekvenaci v *Laboratoři sekvenace DNA, PřF UK*. Sekvence potvrdila vznik cílené mutace C87S (Obr. 8, str. 41).



Obr. 7: Fotografie agarosové elektroforézy se vzorky z PCR z kolonií.

Fotografie zobrazuje agarosovou elektroforézu se vzorky z PCR z kolonií. Při použití přímého a reverzního primeru konstruktu AICL C87S je předpokládána velikost sekvence 381 bp. Té odpovídají vzorky ze všech šesti odebraných kolonií (1C - 6C), tudíž všechny jsou vhodné pro nízkoobjemovou přípravu DNA a vyhodnocení pomocí sekvenace. M značí DNA standard.



Obr. 8: Potvrzení mutace C87S pomocí sekvenace.

Obrázek zobrazuje úspěšnou mutaci C87S, kdy došlo k záměně cysteinu v poloze 87 za serin, tzn. kodon TGC (Cys) byl změněn na AGC (Ser). Spodní část zobrazuje průběh chromatografie přímého řetězce ve směru 5' → 3'. Horní část zobrazuje stejný průběh chromatogramu záznamem nukleotidové sekvence a její překlad do primární aminokyselinové sekvence (aminokyseliny jsou očíslované). Místo mutace je označeno červeným rámečkem. Obrázek byl vytvořen v programu Codon Code Aligner a dále upraven v grafickém editoru.

Velkoobjemovou přípravou plazmidové DNA bylo získáno dostatečné množství plazmidové DNA pET30_AICL C87S (viz. 5.2.1), kdy byla následně určena koncentrace a čistota této plazmidové DNA měřením absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6: Koncentrace a čistota plazmidové DNA pET30_AICL C87S po velkoobjemové přípravě DNA

Vzorek	A ₂₆₀	A ₂₈₀	c [µg/µl]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
pET30_AICL C87S	0,113	0,069	1,70	1,64

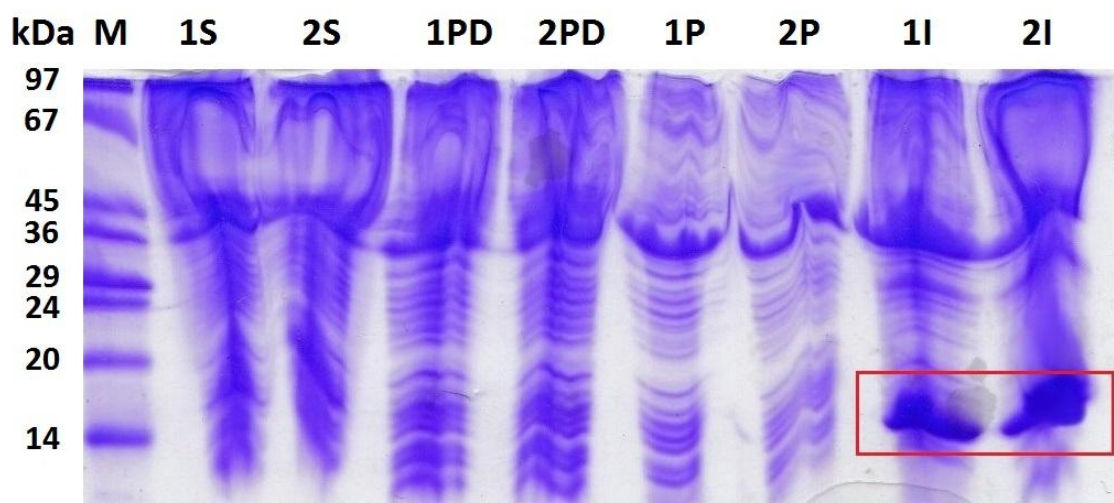
6.2 Velkoobjemová příprava receptoru AICL C87S

Pro velkoobjemovou přípravu proteinu AICL s bodovou mutací C87S byl použit rekombinantní expresní systém *E. coli* BL21 Gold (DE3). Bakterie byly transformovány plazmidovou DNA pET_AICL C87S. Po inkubaci byla směs rozetřena na misky s LB agarem s přidavkem kanamycinu. Následující den byly kolonie na miskách inokulovány do LB média s kanamycinem ponechány třepat, kdy byla v průběhu třepání sledována hustota množících se bakterií. Po dosažení vhodné hustoty byla teplota snížena a kultury v lahvích byly zaindukovány. Takto byly lahve s kulturami ponechány třepat do dalšího dne, kdy byly natřepané bakterie sklizeny a uchovány v mrazáku při -20 °C. Za účelem zisku většího množství proteinu byla velkoobjemová příprava proteinu provedena několikrát.

6.2.1 Izolace inkluzních tělísek a *in vitro* renaturace

Exprimovaný protein tvořící agregáty - inkluzní tělíska, bylo třeba izolovat z bakterií. K tomu byla použita kombinace několika metod pro izolaci inkluzních tělísek, zahrnující použití prudkého zmrazení v -80 °C a sonikaci pomocí ultrazvuku v lyzačním pufru, pufru s detergentem a promývacím pufru. Po každé sonikaci ultrazvukem byla provedena centrifugace a supernatant byl od pelety odstraněn. Ze supernatantu byl vždy odebrán vzorek pro SDS elektroforézu v 15% polyakrylamidovém gelu pro kontrolu, zda se cílový protein stále nachází v nerozpustné části ve formě inkluzních tělísek a nepřechází do rozpustné formy. Stejná analýza byla provedena i s promytou peletou inkluzních tělísek, zda je protein opravdu přítomen. Fotografie SDS elektroforézy s jednotlivými frakcemi z izolace a vzorkem inkluzních tělísek je zobrazena na Obr. 9,

str. 43. Z obrázku je patrné, že během izolace inkluzních tělísek nedošlo ke ztrátě požadovaného proteinu (konstrukt AICL C87S) o teoretické velikosti 13858,5 kDa během promývání v pufrech, ale všechn byl zachován v inkluzních tělískách.



Obr. 9: 15% SDS elektroforéza po izolaci inkluzních tělísek.

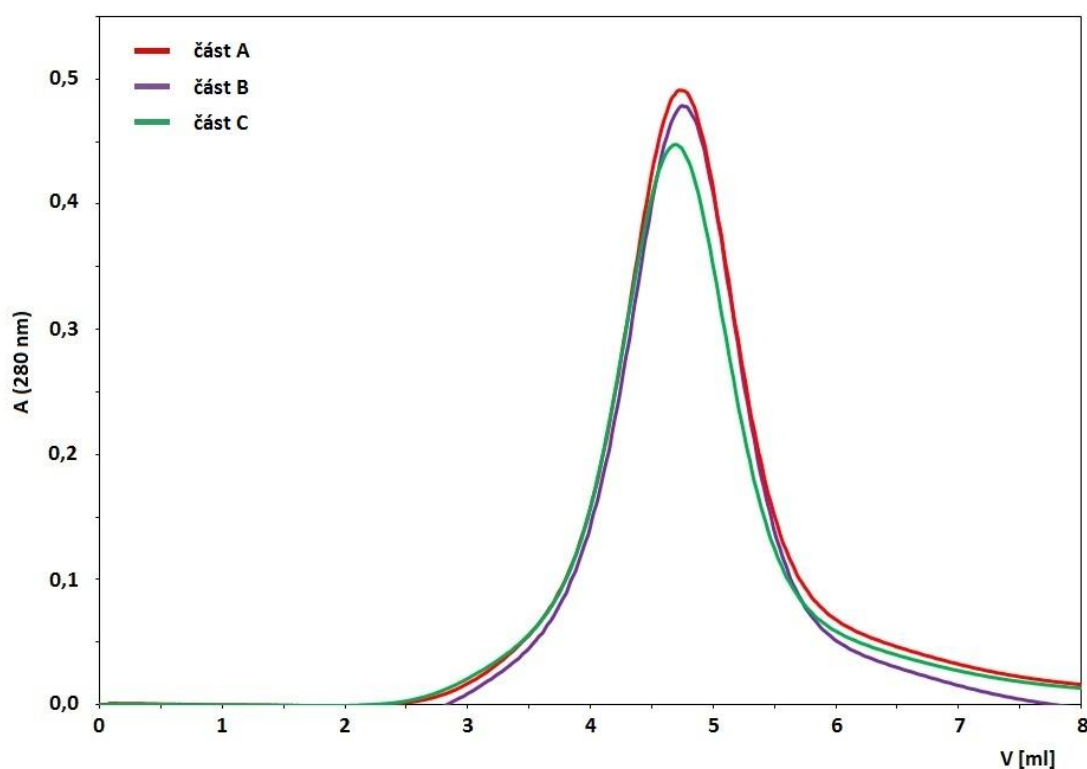
Fotografie SDS elektroforetického gelu obsahující vzorky odebrané v průběhu izolace inkluzních tělísek ze dvou 0,5l produkcí. Vzorky byly rozpuštěny v redukcujícím vzorkovém pufru. Číslo vždy určuje produkci. **M** značí proteinový standard v kDa, **S** - vzorky odebrané ze supernatantu po centrifugaci v sacharosovém lyzačním pufru, **PD** - vz. odebrané ze supernatantu po centrifugaci v promývacím pufru s detergentem, **P** - vz. ze supernatantu po centrifugaci v promývacím pufru bez detergentu, **I** - vz. odebrané z promytých pelet inkluzních tělísek. Červený rámeček značí cílový protein o předpokládané velikosti 13,86 kDa.

(Kvalita elektroforézy je zhoršená z důvodu složení použitých pufků během izolace a obsahu značného množství nespecifických proteinů vzniklých během bakteriální exprese.)

Izolovaná inkluzní tělíčka byla solubilizována v 6M guanidinovém pufru ve 40°C vodní lázni. Během rozpouštění byl obsah zkumavky občas promíchán pipetou, vortexovou míchačkou a krátce sonikován v ultrazvukové lázni. Po dostatečném rozpouštění a centrifugování obsahu zkumavky byl protein rozpuštěný v guanidinovém pufru přikapáván do renaturačního pufru s 1M koncentrací argininu, čímž došlo k přechodu proteinu do nativní konformace. Po hodinovém míchání byly tímto puftrem s renaturovaným proteinem naplněny dialyzační trubice, které byly přes noc umístěny do nádoby s dialyzačním puftrem. Následující den byl obsah trubic převeden do kádinek, zcentrifugován a zfiltrován tak, aby byly odstraněny nerozpustné agregáty, vzniklé v průběhu renaturace a dialýzy.

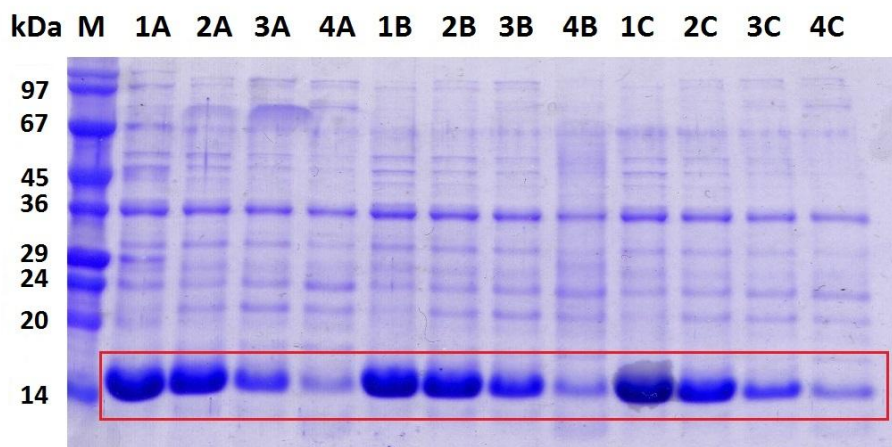
6.3 Purifikace rozpustné formy AICL C87S

Zfiltrované dialyzáty, které obsahovaly renaturovaný protein, byly aplikovány na ionexovou kolonu SP Sepharosa FF, zapojenou na HPLC systém. Metoda probíhala s lineárním gradientem za využití dvou pufrů o rozdílných koncentracích NaCl. Z důvodu velikosti a kapacity kolony byla chromatografie provedena po částech na několikrát. Chromatografie byla monitorována spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 280 nm. Během metody byly odebírány frakce po 0,5 - 1,0 ml. V průběhu opakujících se analýz bylo zjištěno, že eluce potencionálního proteinu AICL C87S při konstantním průtoku 0,5 ml/min a 20 minutovém gradientu se pohybovala přibližně mezi 3,5 ml a 6,0 ml (Obr. 10). Teoretická velikost proteinu a čistota frakce byla ověřena pomocí SDS elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu. (Obr. 11, str. 45).



Obr. 10: Chromatogramy ionexové chromatografie proteinu AICL C87S po *in vitro* renaturaci.

Záznam z ionexové chromatografie proteinu AICL C87S po *in vitro* renaturaci, kdy byla produkce rozdělena na tři části, s kterými byla postupně chromatografie provedena. V průběhu každé chromatografie byly odebrány 4 frakce. Požitou kolonou byla SP Sepharosa FF. Průběh chromatografie byl měřen spektrofotometricky při 280 nm. Chromatogramy jednotlivých částí **A**, **B** a **C** jsou rozlišeny barevně.

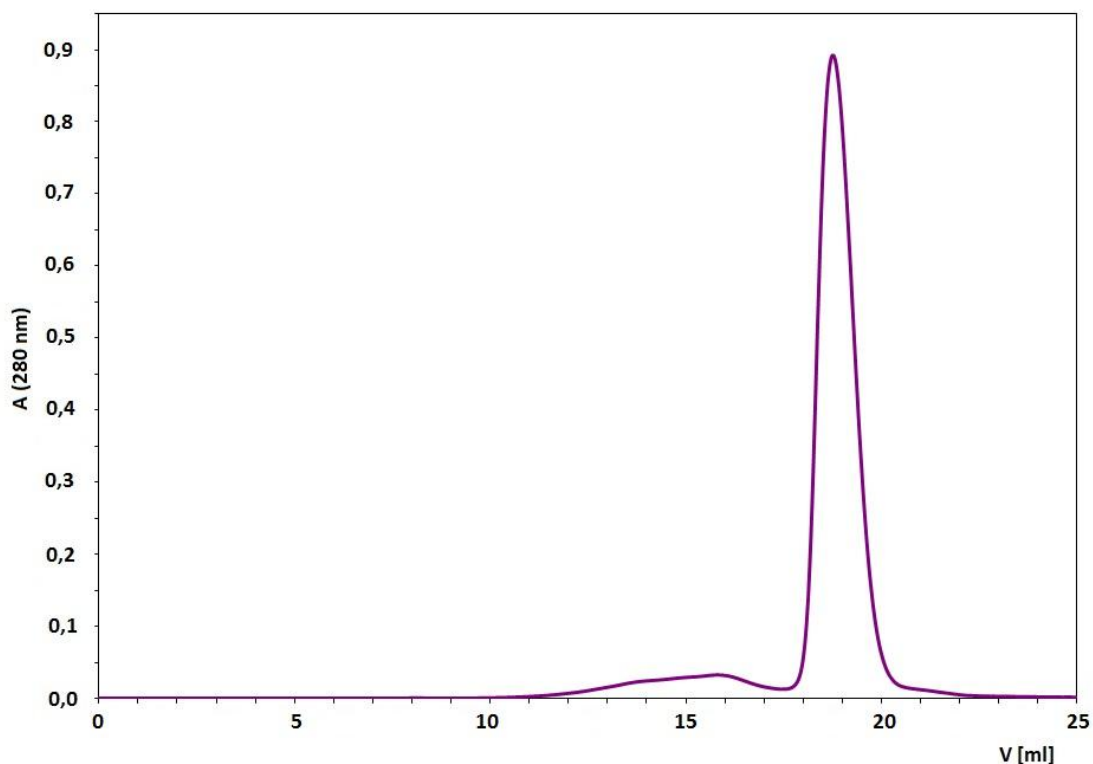


Obr. 11: 15% SDS elektroforéza se vzorky po ionexové chromatografii.

Fotografie SDS elektroforetického gelu obsahující vzorky odebrané v průběhu ionexové chromatografie každé části produkce. Vzorky **1A-4A** pocházejí z první části, **1B-4B** ze druhé a **1C-4C** ze třetí. Vzorky byly rozpuštěny v redukcujícím vzorkovém pufru. **M** značí proteinový standard v kDa. Červený rámeček značí cílový protein o předpokládané velikosti 13,86 kDa.

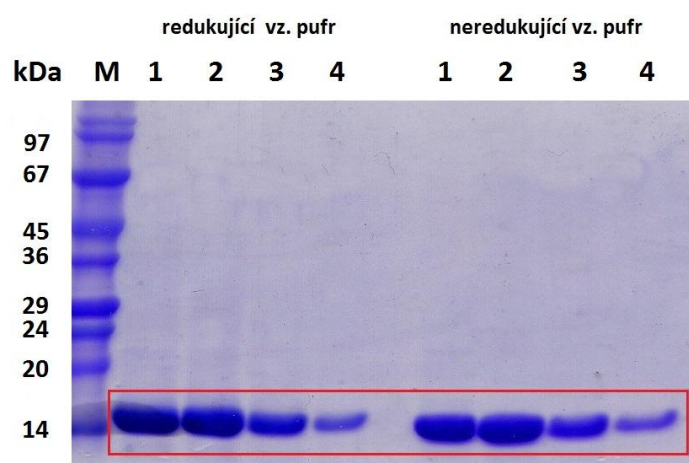
Po vyhodnocení SDS elektroforézy byly frakce získané ionexovou chromatografií spojeny a zakoncentrovány na objem < 400 μ l. Takto zakoncentrovaný vzorek byl pomocí mikrostříkačky aplikován na kolonu Superdex 200 10/300 GL, připojenou na HPLC systém. Tento systém byl ekvilibrován v HEPES pufru pro gelovou chromatografii. Chromatografie byla opět monitorována spektrofotometricky při 280 nm. Při průtoku 0,5 ml/min byl protein eluován mezi 18 ml a 20 ml (Obr. 12, str. 46). Frakce byly odebírány po zhruba 0,5 ml. Následovalo ověření frakcí SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu (Obr. 13, str. 46).

Po vyhodnocení čistoty frakcí a správné velikosti proteinu byly frakce spojeny. Ve směsi frakcí byla stanovena výsledná koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové. Pro zjištění koncentrace byla zhotovena kalibrační řada ze standardů BSA, z které byla získána rovnice regrese (Obr. 14, str. 47). Dosazením hodnoty absorbance vzorku do této rovnice byla zjištěna reálná koncentrace v jednotkách mg/ml a ve vztahu k celkovému objemu frakce i reálné množství proteinu v miligramech (Tab. 7, str. 47). Koncentrace byla měřena po zpracování každé produkce, což pokaždé vyžadovalo sestavení nové kalibrační řady tak, aby došlo ke měření koncentrace vzorku za stejných podmínek. Výsledek měření koncentrace v Tab. 7 se vztahuje k předešlému chromatogramu (Obr. 12) a SDS elektroforéze (Obr. 13) a byl vypočítán s využitím rovnice regrese z Obr. 14.



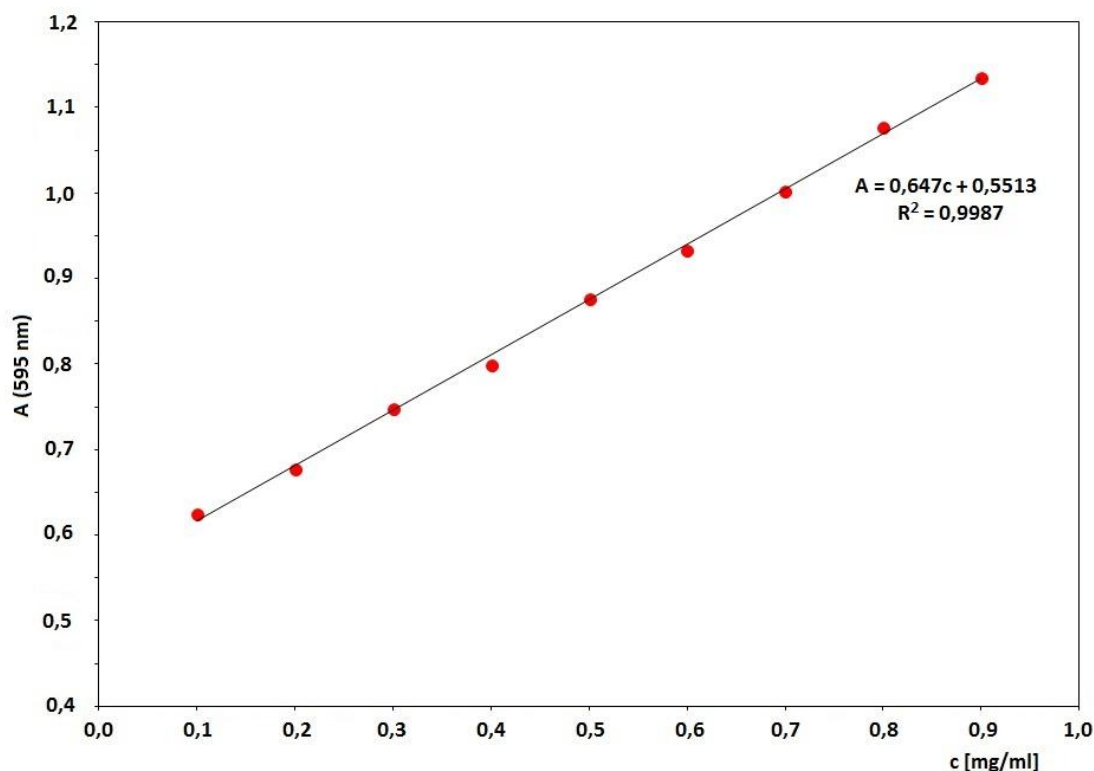
Obr. 12: Chromatogram gelové permeační chromatografie proteinu AICL C87S.

Záznam z gelové permeační chromatografie proteinu AICL C87S po spojení frakcí z ionexové chromatografie. V průběhu chromatografie byly odebrány 4 frakce mezi 18. a 20. ml. Použitou kolonou byl Superdex 200 10/300 GL. Průběh chromatografie byl měřen spektrofotometricky při 280 nm.



Obr. 13: 15% SDS elektroforéza se vzorky po gelové permeační chromatografii.

Fotografie SDS elektroforetického gelu obsahující vzorky odebrané v průběhu gelové permeační chromatografie. Vzorky byly rozpuštěny v redukujícím i neredukujícím vzorkovém pufru. **M** značí proteinový standard v kDa. Červený rámeček značí cílový protein o předpokládané velikosti 13,86 kDa.



Obr. 14: Kalibrační křivka užitá při stanovení koncentrace proteinu.

Kalibrační křivka sestavená ze standardů BSA o koncentraci 0,1 - 0,9 mg/ml. Měření proběhlo po smíchání s pufrům dle Bradfordové při 595 nm. Ze získaných lineárně stoupajících hodnot byla sestavena kalibrační přímka a byla získána rovnice regrese a hodnota spolehlivosti.

Tab. 7: Zjištěná koncentrace v mg/ml a celkové množství proteinu ve frakci.

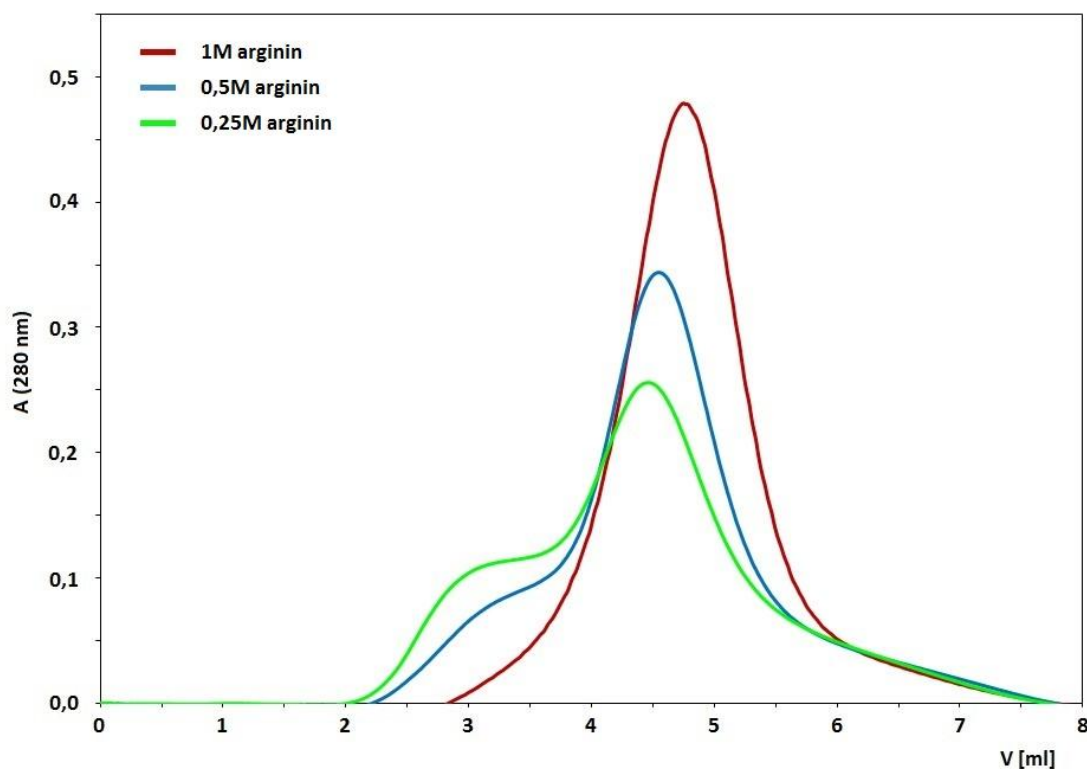
Absorbance vz.	Ředící faktor	Koncentrace [mg/ml]	Objem vz. [ml]	Celkový výtěžek [mg]
1,0250	2	1,5	2,29	3,39

(Pokud koncentrace vzorku byla vyšší než hodnoty kalibrační křivky a tudíž měla i vyšší absorbanci, bylo třeba vzorek odebraný pro měření koncentrace náležitě zředit.)

6.4 Optimalizace *in vitro* renaturace

V rámci optimalizace *in vitro* renaturace byly zpracovány 3 proteinové produkce z 0,5l LB média, které byly renaturovány v pufrách o rozdílné koncentraci argininu - 1M, 0,5M a 0,25M. Po hodinovém míchání rozpuštěného proteinu v pufru byly vypořovány první odlišnosti, a to množství sraženého proteinu v pufru, které se zvyšovalo se snižující koncentrací argininu. Další odlišnost byla vypořována druhý den po dialýze, když byly obsahy dialyzačních trubic převedeny do nádoby - rozdílný

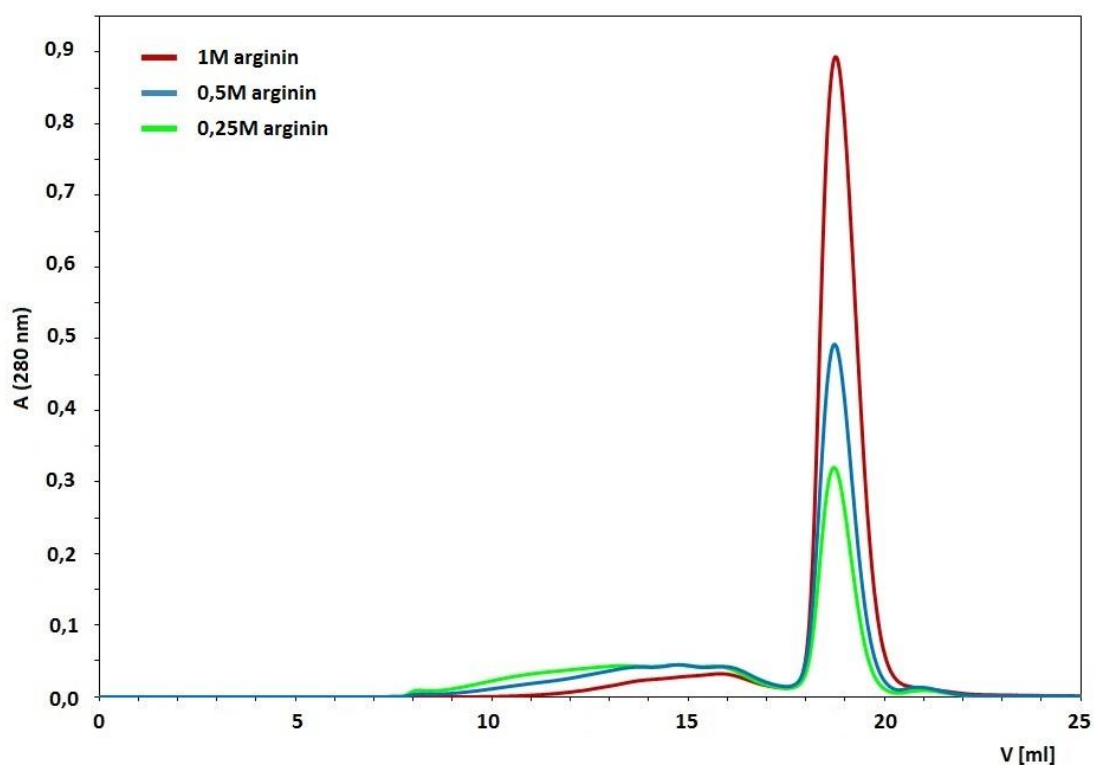
objem roztoku v nich, který se snižoval se snižující koncentrací argininu pufru (Tab. 8, str. 50). Během ionexové chromatografie s kolonou SP Sepharosa FF při průtoku 0,5 ml/min a 20 minutovém gradientu byla pozorována eluce proteinu ve srovnatelném objemu, ovšem jeho množství se lišilo v závislosti na použité koncentraci argininu při renaturaci (Obr. 15). Dále bylo vyzorováno, že se snižující koncentrací argininu zřejmě docházelo ke vzniku nespecificky sbalených proteinů, jejichž eluce předcházela eluci proteinu konstruktu AICL C87S. Během metody byly frakce odebrány opět mezi cca 3,5 ml a 6,0 ml.



Obr. 15: Srovnání chromatogramů ionexové chromatografie proteinu AICL C87S po *in vitro* renaturaci za různých koncentrací argininu.

Záznam z ionexové chromatografie proteinu AICL C87S během optimalizace *in vitro* renaturace. Z obrázku je patrné, že se zvyšuje výtěžek renaturovaného proteinu se zvyšující koncentrací argininu v renaturačním pufru. Naopak se snižující koncentrací argininu se výtěžnost snižuje a dochází ke vzniku nespecificky sbaleného proteinu. Na obrázku jsou srovnány chromatogramy z třetinového objemu každé renaturace a v průběhu každé chromatografie byly odebrány 4 frakce. Požitou kolonou byla SP Sepharosa FF. Průběh chromatografie byl měřen spektrofotometricky při 280 nm. Chromatogramy po renaturaci v různé koncentraci argininu jsou rozlišeny barevně.

Po provedení ionexové chromatografie byla provedena SDS elektroforéza pro kontrolu, zda se jedná o daný protein, frakce z jednotlivých chromatografií byly zakonzentrovány. Následovala gelová permeační chromatografie s připojenou kolonou Superdex 200 10/300 GL, kdy došlo k jednotlivým nástřikům reprezentujícím renaturaci v renaturačním pufru obsahujícím 1M, 0,5M a 0,25M arginin. Každá metoda probíhala při průtoku 0,5 ml/min po dobu 50 minut. Ze získaných chromatogramů lze usoudit, že množství argininu v renaturačním pufru opravdu ovlivňuje celkovou výtěžnost renaturovaného proteinu (Obr. 16).



Obr. 16: Srovnání chromatogramů gelové permeační chromatografie proteinu AICL C87S po *in vitro* renaturaci za různých koncentrací argininu.

Záznam z gelové permeační chromatografie proteinu AICL C87S během optimalizace *in vitro* renaturace. Z chromatogramů je opět patrné, že zvyšující se koncentrace argininu zajišťuje vyšší výtěžek renaturovaného proteinu. V průběhu chromatografie byly odebrány 4 frakce mezi 18. a 20. ml. Použitou kolonou byl Superdex 200 300/10 GL. Průběh chromatografie byl měřen spektrofotometricky při 280 nm. Chromatogramy po renaturaci v různé koncentraci argininu jsou rozlišeny barevně.

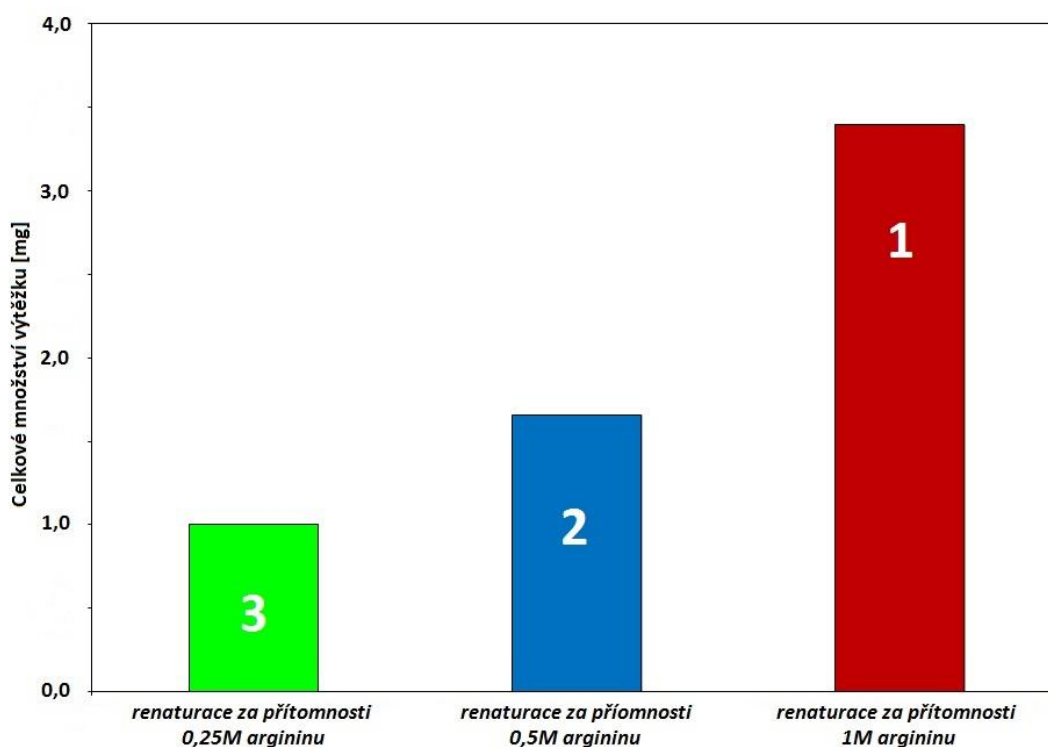
Získané frakce z gelové permeační chromatografie byly opět podrobeny SDS elektroforéze, kdy bylo zjištěno, že ve všech renaturačních podmínkách dochází k zisku

proteinu o předpokládané velikosti 13,86 kDa. Po změření koncentrace proteinu ve frakcích z jednotlivých podmínek byly získány hodnoty konečného množství produkovaného proteinu (Tab. 8).

Konečné výtěžky jsou vyobrazeny pomocí sloupcových grafů (Obr. 17), kde je na první pohled potvrzeno, že během *in vitro* renaturace je koncentrace argininu v renaturačním pufru zásadní pro získání většího množství renaturovaného proteinu.

Tab. 8: Tabulka srovnání výtěžků proteinu AICL C87S po *in vitro* renaturaci za přítomnosti různé koncentrace argininu.

Produkce	Koncentrace argininu v renaturačním pufru [M]	Objem roztoku z dialyzačních střeň [ml]	Celkový výtěžek proteinu [mg]
1.	1,00	310	3,39
2.	0,50	250	1,66
3.	0,25	220	1,03



Obr. 17: Graf srovnání výtěžků proteinu AICL C87S po *in vitro* renaturacích za přítomnosti různé koncentrace argininu.

6.5 Mapování disulfidových můstků v rozpustné formě AICL C87S

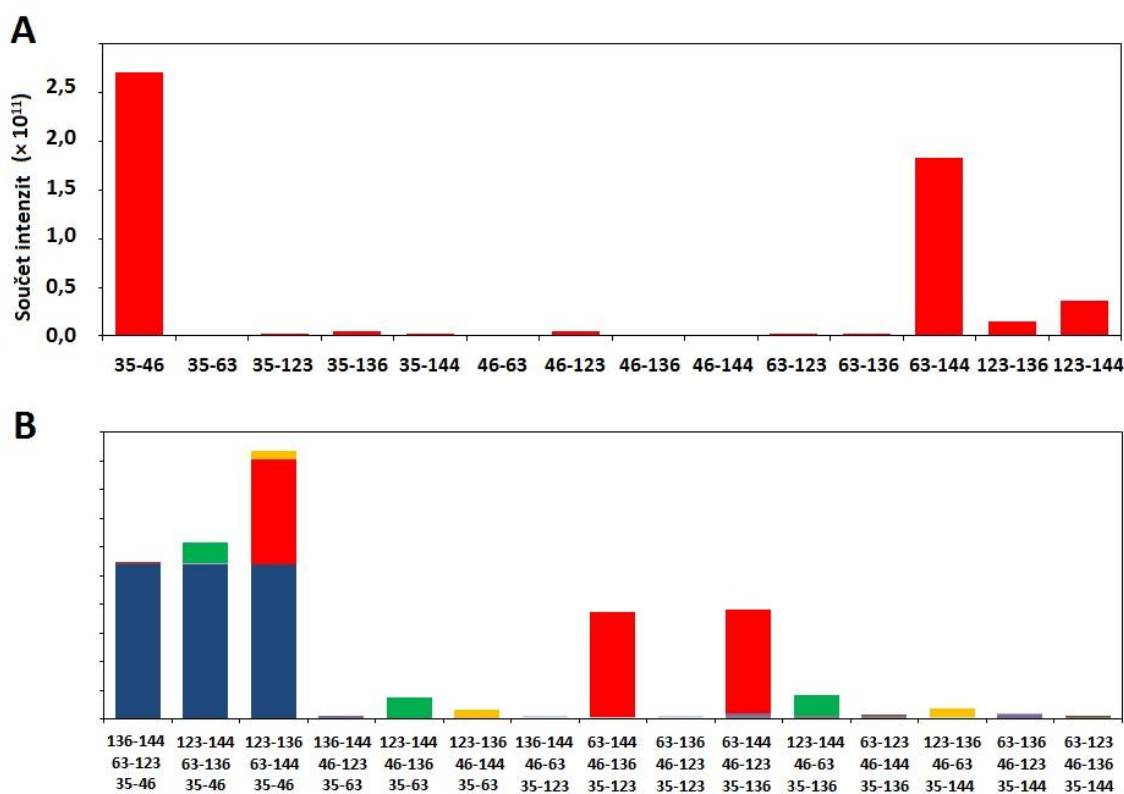
Zapojení disulfidových můstků v proteinu konstruktu AICL C87S bylo objasněno pomocí hmotnostní spektrometrie. Protein byl separován gradientovou elektroforézou v oxidačním prostředí. Následovalo vyjmutí proužků gelu s proteinem a jeho štěpení trypsinem. Po získání peptidických štěpů byla provedena LC-MS analýza (viz. 5.5.4). Tato práce byla provedena Mgr. Zdeňkem Kukačkou. Ze získaných výsledků (Obr. 19, str. 52) lze usuzovat, že u proteinu dochází ke tvorbě disulfidových můstků v uspořádání C35-C46, C63-C144 a C123-C136 (Obr. 18). Toto zapojení je v souladu s příbuznými receptory z CTLD rodiny receptorů, kdy se cysteiny v sekvencích nacházejí v konzervovaných pozicích (viz. Obr. 4, str. 12). Abnormálně vyšší součet intenzit pro zapojení mezi C123-C144, převyšující součet intenzit pro předpokládané zapojení C123-C136 je zřejmě daný vznikem arteficiálních cystických peptidů, v praxi často nazýváno jako *scrambling*. Díky těmto výsledkům lze potvrdit, že mutace lichého cysteinu v poloze 87 nemá nežádoucí vliv na sbalení proteinu do nativní struktury, ale naopak je po expresi v bakteriálním systému a následné *in vitro* renaturaci přirozené sbalení usnadněno.

AICL C87S:



Obr. 18: Sekvence mutované formy AICL C87S s vyznačenými disulfidovými můstky po jejich analýze pomocí LC-MS.

Exprimovaný konstrukt AICL C87S je značen modře. Cysteiny tvořící disulfidové můstky jsou ve žlutých rámečcích a černá čára znázorňuje jejich zapojení v aminokyselinové sekvenci proteinu.



Obr. 19: Výsledek analýzy disulfidových můstků mezi cysteiny v mutované formě konstruktu AICL C87S.

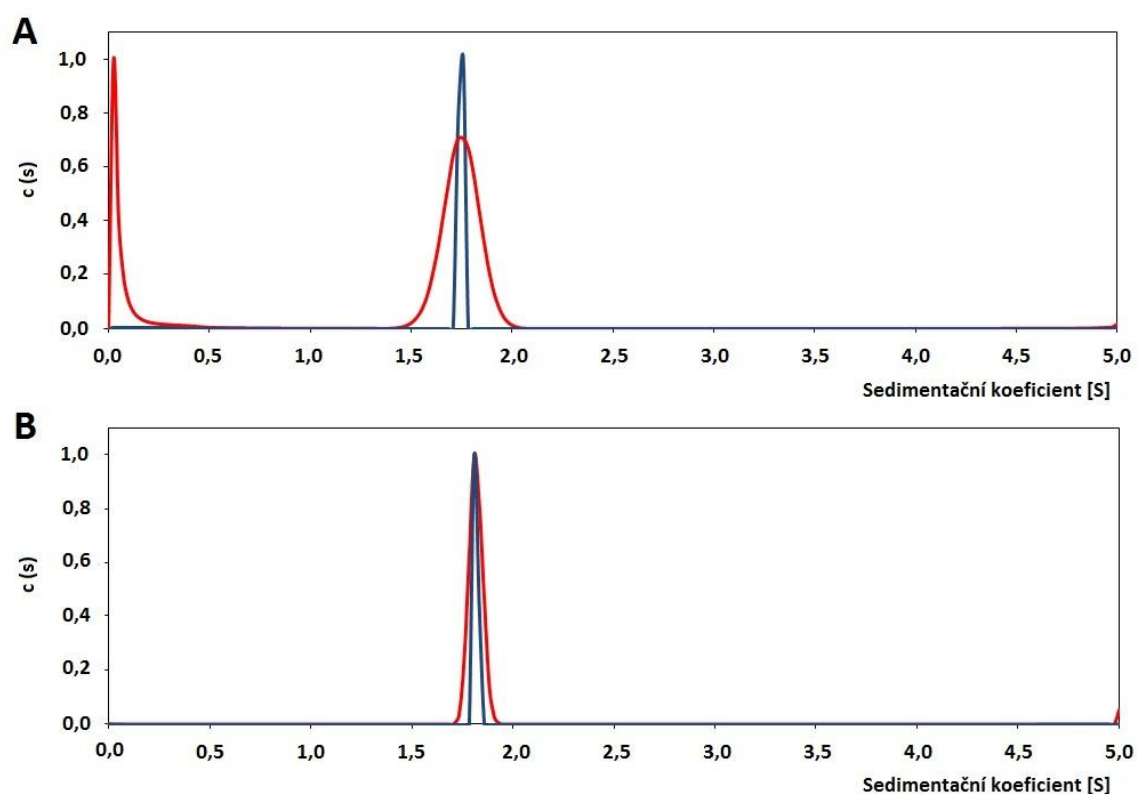
A: Zobrazení relativního srovnání součtu intenzit signálů jednotlivých disulfidicky spojených peptidů. Z grafu se zobrazenými intenzitami jednotlivých zapojení mezi cysteiny jde jednoznačně potvrdit zapojení *C35-C46* a *C63-C144*. Třetí disulfidové zapojení by mělo odpovídat zapojení mezi *C123-C136*, i přes to, že součet signálů pro *C123-C144* vyšší. Nicméně takovéto zapojení je velmi málo pravděpodobné z důvodu zanedbatelných naměřených intenzit pro teoretické spojení ostatních cysteinů mezi sebou.

B: Zobrazení pravděpodobnosti zapojení jednotlivých možností disulfidů mezi cysteiny v sekvenci proteinu AICL C87S. Druhý graf zobrazující jednotlivé kombinace zapojení tří disulfidů jednoznačně potvrzuje, že nejpravděpodobnější zapojení je mezi *C35-C46*, *C63-C144* a *C123-C136*. Ostatní kombinace zapojení disulfidových můstků mezi přítomnými cysteiny je z porovnání intenzit nemožné.

6.6 Sedimentační analýza pomocí analytické centrifugy

Pomocí analýzy metodou sedimentační rychlosti vzorků proteinu AICL C87S o koncentracích 0,1 mg/ml a 1,1 mg/ml bylo pozorováno, že se protein v roztoku ve své rozpustné formě vyskytuje pouze ve formě jediné částice se sedimentačním

koeficientem $s_{20,w} = 1,83$ S, při vyšší koncentraci při $s_{20,w} = 1,91$ S, což vzhledem k jeho molekulové hmotnosti (13858,5 Da) odpovídá monomeru (Obr. 20). Velikost molekuly byla stanovena přibližně na $2,5-3 \times 4,5-5,5$ nm při měření vzorku o $c = 0,1$ mg/ml a na $3,0-4,5$ nm při měření vzorku o $c = 1,1$ mg/ml, což při porovnání s velikostí molekul příbuzných receptorů o známé krystalové struktuře, např. CD69 [22], také koreluje s rozměry monomeru. Z dat byla dále získána přibližná molekulová hmotnost, která činila 13,7 kDa, což odpovídá té teoretické. Sedimentační data byla vyhodnocena metodou kontinuální distribuce sedimentujících částic $c(s)$ v závislosti na jejich sedimentačním koeficientu, a to jak pro spojité spektrum sedimentujících částic, tak pro sedimentaci diskretních částic. Metoda sedimentační rychlosti a vyhodnocení výsledků byly provedeny RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D.

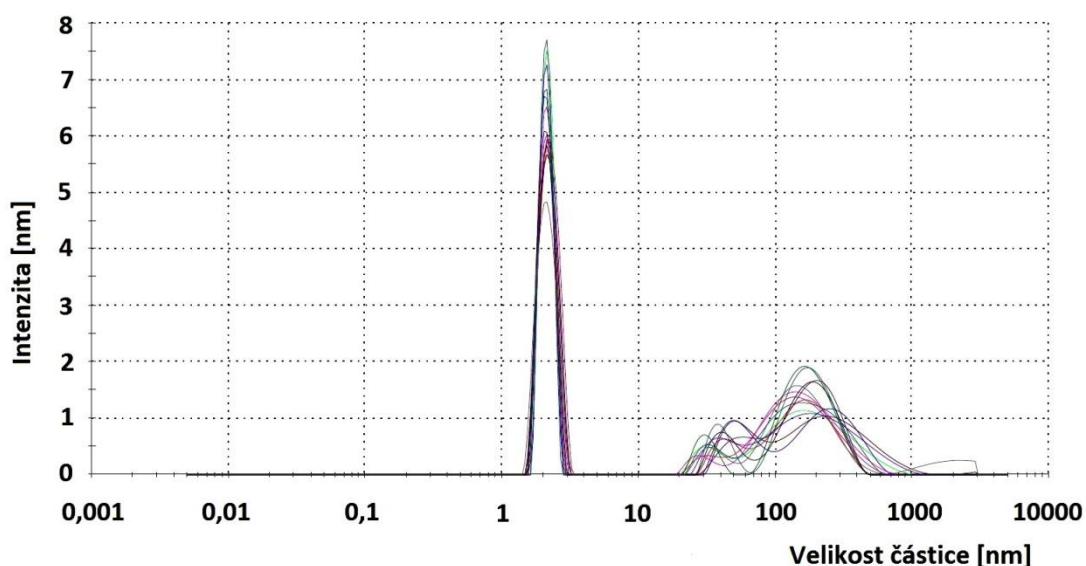


Obr. 20: Sedimentační analýza AICL C87S

Připravený protein AICL C87S byl analyzován pomocí analytické ultracentrifugy metodou sedimentační rychlosti ve dvou koncentracích, **A** - 0,1 mg/ml a **B** - 1,1 mg/ml. Na vertikální ose jsou vyneseny normalizované hodnoty distribuce sedimentujících částic, červené křivky znázorňují vyhodnocení pro spojité spektrum sedimentujících částic, modré křivky znázorňují vyhodnocení pro sedimentaci diskretních částic.

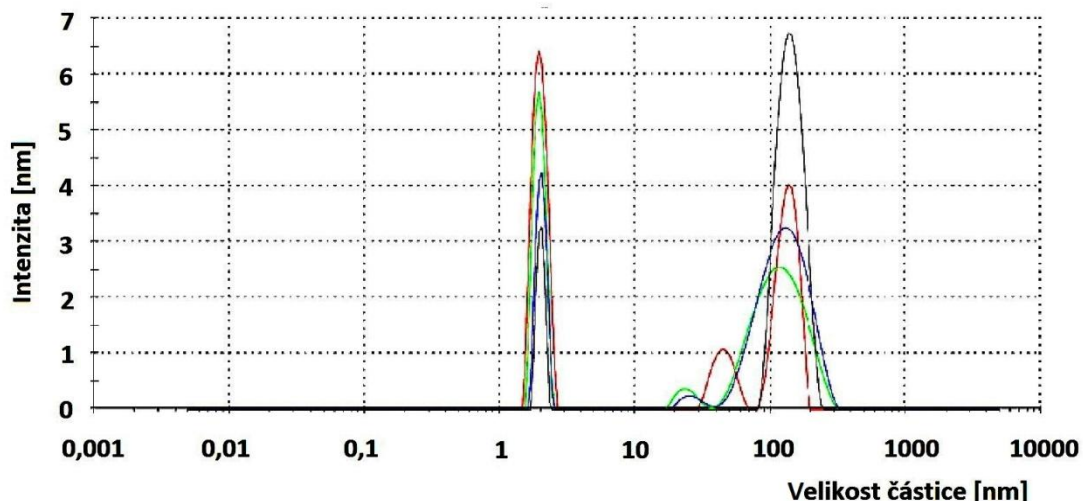
6.7 Dynamický rozptyl světla, DLS

Měření vzorku obsahujícího protein AICL C87S ($c = 1,1$ mg/ml) za konstantní teploty bylo provedeno v osmnácti měření, z kterých bylo pět vyloučeno z důvodu pravděpodobné přítomnosti prachových částic či extrémně velkých agregátů, což by narušilo získání konečných výsledků. Výpočty a vyhodnocení výsledků bylo provedeno dle příručky k přístroji Zetasizer Nano [56]. Z výsledků měření při konstantní teplotě 20 °C je patrné, že pás 1 obsahuje monomerní protein o přibližné velikosti $19,7 \pm 3,7$ kDa (Obr. 21), (Tab. 9, str. 55). Pásky 2 a 3 zřejmě zastupují nespecifické agregáty. V průběhu druhého měření byla získána data charakterizující stabilitu proteinu závislou na zvyšující se teplotě, kdy bylo zjištěno, že protein není zcela stabilní už při nižších teplotách, což je zřejmě způsobeno vazbou přítomných nespecifických agregátů na jeho molekulu (Obr. 22, str. 55). Metodu provedla a výsledky vyhodnotila RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D. (*Fyzikální ústav, MFF UK*).



Obr. 21: Distribuce velikosti částic dle intenzit pro vzorek měřený při 20 °C

Na obrázku jsou znatelně oddělené jednotlivé pásky, kdy pás 1 představuje právě protein AICL C87S. Pás 2 a pás 3 představují polydisperzní částice, kterými jsou zřejmě nespecifické agregáty. Obrázek obsahuje 13 měření.



Obr. 22: Distribuce velikosti částic dle intenzity pro vzorek měřený při různých teplotách.

Z obrázku je patrné, že se zvyšující se teplotou během analýzy se stálost proteinu snižuje a protein začíná agregovat. Červená křivka představuje měření při 30 °C, zelená při 33 °C, modrá při 34 °C a černá při 35 °C.

Tab. 9: Výsledky měření DLS při 20 °C.

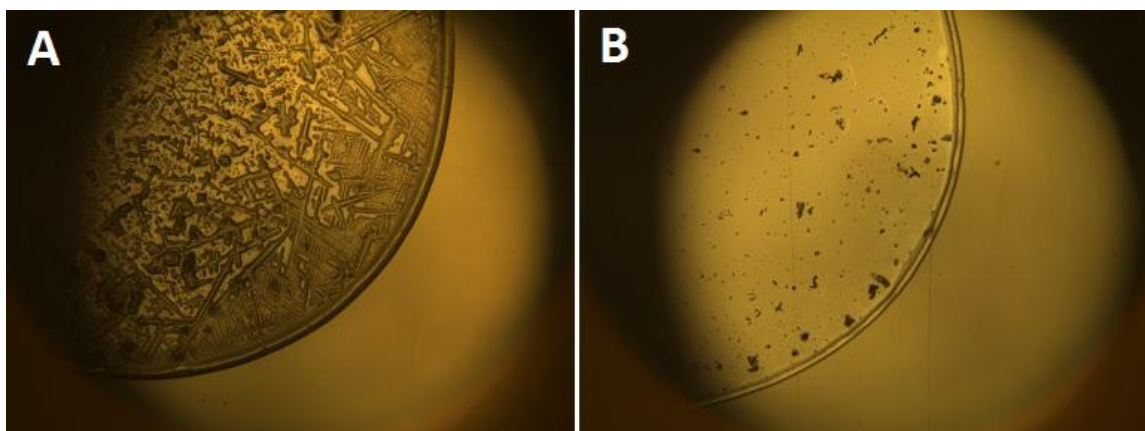
	Poloměr±SD [nm]	Pd [%]	MW±SD [kDa]	Int. [%]	
Pás 1	2,127±0,3317	15,6	19,7±3,1	45,9	monodisperzní
Pás 2	32,48±7,927	22,0	(11,6±7,4).10 ³	6,4	polydisperzní
Pás 3	142,5±85,83	50,3	(3,69±1,24).10 ⁵	42,1	polydisperzní

(Pd - relativní polydisperzita, MW - molekulová velikost, Int. - intezita, SD - směrodatná odchylka)

6.8 Ramanova spektrometrie, DCDR

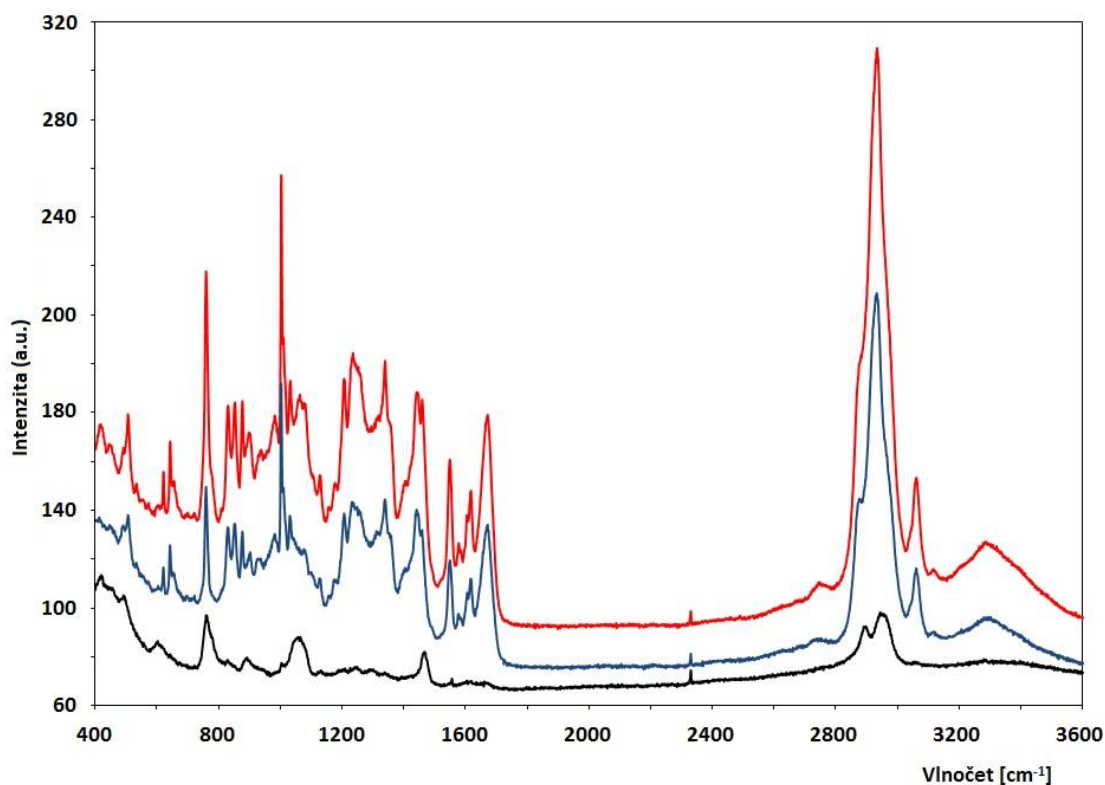
Protein AICL C87S v Tris pufru byl nejprve dialyzován přes mikrofiltr za účelem odsolení roztoku. Po dialýze bylo patrné, že dialýza byla efektivní (Obr. 23, str. 56). Pro kontrolu byla metoda DCDR provedena s proteinem v Tris pufru, po dialýze a se samotným pufrům, kdy z porovnání vyplývá, že dialýza byla žádoucí, neboť samotný pufr ovlivňoval sílu měřených signálů (Obr. 24, str. 56). Z detailního spektra proteinu po dialýze (Obr. 25, str. 57) je patrná přítomnost disulfidových můstků v oblasti vlnočtu 490, 510 a 533 cm⁻¹ a zároveň z Obr. 24 je patrné, že v oblasti 2500-2600 cm⁻¹

charakteristické pro volné thiolové skupiny cysteinů není žádný signál, z čehož plyne, že k zapojení disulfidů skutečně došlo. Dalšími důležitými signály jsou signály pro dublety tyrosinu, dublet tryptofanu a pásy amidu I a amidu III.



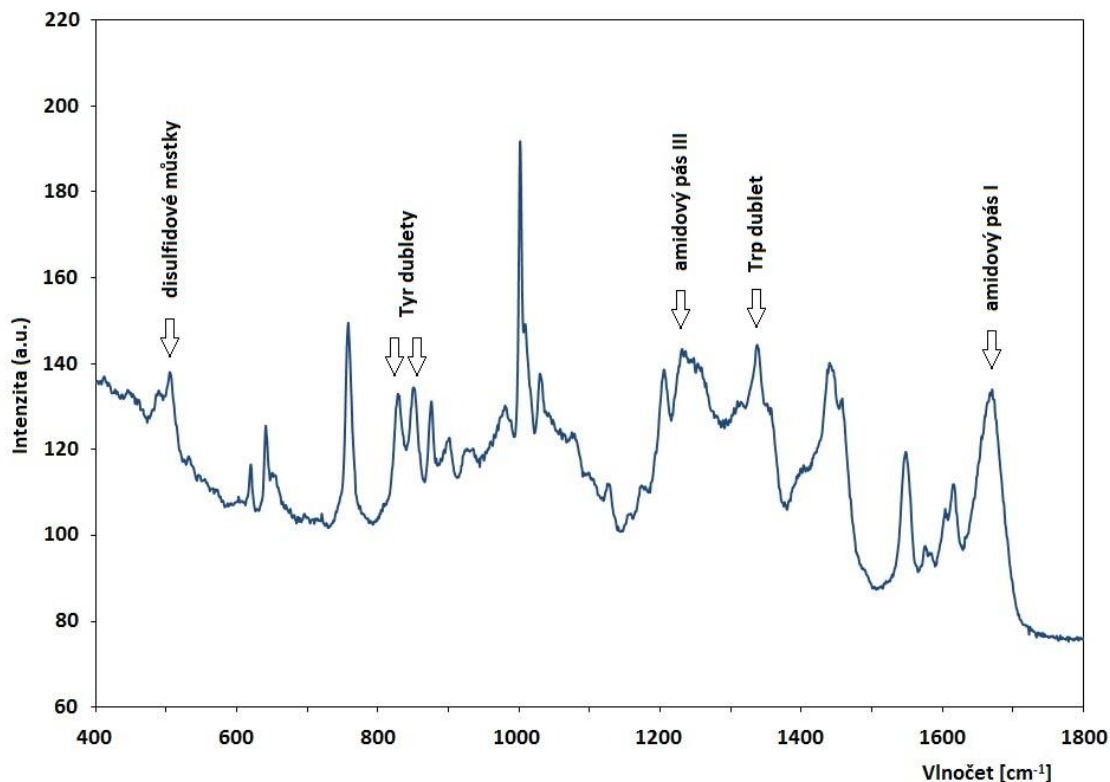
Obr. 23: Fotografie vysušených kapek s proteinem AICL C87S.

Fotografie byly pořízeny při pětinasobném zvětšení. Obrázek A zobrazuje vysušenou kapku s proteinem v Tris pufru, obrázek B vysušenou kapku s proteinem po dialýze. Z porovnání je patrné, že při dialýze došlo k efektivnímu odsolení roztoku se vzorkem.



Obr. 24: Ramanova spektra AICL C87S.

Srovnání změřených spekter pro roztok proteinu v Tris pufru (červená), po dialýze (modrá) a samotného Tris pufru (černá).



Obr. 25: Ramanovo spektrum pro AICL C87S po dialýze.

V obrázku jsou vyznačeny stěžejní signály, a to pro přítomnost disulfidových můstků s vlnočtem 490, 505 a 533 cm^{-1} , dva tyrosinové dublety - 829 a 851 cm^{-1} , tryptofanový dublet - 1338 cm^{-1} , a dále pro pás amidu III - 1232 cm^{-1} a pás amidu I - 1671 cm^{-1} .

Z dat byla vyhodnocena četnost zastoupení prvků sekundární struktury proteinu, a to pomocí čtyř různých metodických postupů, jednak ve vztahu k pásu amidu I a III, kdy je jako reference využito standardů proteinů o známé struktuře, a dále metod RIP (*reference intensity profiles*) využívajících referenčních intenzitních profilů prvků sekundární struktury (Tab. 10, str. 58). Výsledky jednotlivých nezávislých metod popisují procentuelní zastoupení jednotlivých typů sekundárních struktur a po vzájemném srovnání korelují, což podporuje věrohodnost analýzy.

Tab. 10: Procentuální zastoupení sekundárních struktur v proteinu nalezených pomocí DCDR.

Struktura	AmI [%]	AmIII [%]	3-RIP [%]	4-RIP [%]
α - helix	20±5	28±5	23±3	23±3
α - uspořádaný	12±4	-	-	11±3
α - neuspořádaný	8±4	-	-	12±3
β - list	47±4	42±6	49±3	48±3
β - ohyb	19±2	20±5	-	-
Jiná	10±2	9±4	28±3	29±3
Součet	96	99	100	100

(AmI - amidový pás I, AmIII - amidový pás III, RIP - reference intensity profiles)

6.9 Krystalizace receptoru AICL C87S

S proteinem AICL C87S bylo nasazeno široké spektrum krystalizačních podmínek v laboratořích *Henry Wellcome Bulding for Genomic Medicine*. Práce probíhala pod dohledem Mgr. Jana Bláhy. S proteinovým preparátem o koncentraci 8,8 mg/ml bylo nasazeno 576 krystalizačních kapek o objemu 200 nl na šesti 96 jamkových krystalizačních destičkách. Sedmá destička s 96ti 200nl kapkami byla připravena s preparátem o koncentraci 5 mg/ml. Vývoj krystalizačních experimentů byl díky digitální kontrole sledován prostřednictvím internetu. Dosud nebyl pozorován vznik jakýchkoliv krystalů v žádné z krystalizačních podmínek.

7 DISKUZE

Předchozí studie lidského buněčného receptoru AICL ukázala, že během jeho produkce metodou rekombinantní exprese v bakteriálním expresním systému a následné renaturace dochází k agregaci proteinu a nízkému výtěžku rozpustné formy, která ovšem nemá homogenní konfiguraci disulfidových můstků. Důvodem vzniku takovéto nepřírozené formy může být fakt, že byla produkována pouze část receptoru, a to extracelulární C-lektinová doména, která navíc obsahuje sedm cysteinů, z nich šest cysteinů tvoří přirozeně disulfidové můstky a lichý cystein je teoreticky zodpovědný za tvorbu kovalentního dimeru [29]. Dalším vlivem na produkci proteinu může být jak exprese v bakteriích, tak následná metoda *in vitro* renaturace, která je považována za náročnou a ne vždy zcela efektivní metodu a vyžaduje mnoho optimalizací kompatibilních s daným proteinem.

Srovnáním sekvencí příbuzných C-lektinových receptorů NK buněk a jejich ligandů stejného typu bylo ukázáno, že tyto receptory disponují cysteiny v evolučně konzervovaných pozicích. Jinak tomu není ani u receptoru AICL a jeho cysteinů tvořících disulfidové můstky, výjimkou je právě lichý cystein v poloze 87, který do konzervovaných pozic nezapadá. Díky těmto poznatkům byla navržena bodová mutace v DNA sekvenci kódující konstrukt AICL tak, aby při přepisu do aminokyselinové sekvence došlo k záměně cysteinu za serin v poloze 87, čímž by byla získána sekvence disponující pouze šesti cysteiny v konzervovaných pozicích.

Hlavním cílem této práce tedy byla příprava mutované formy receptoru AICL s bodovou mutací C87S. Mutace v sekvenci DNA probíhala s užitím PCR s prodlužováním přesahujících úseků a následně byla tato sekvence neboli inzert vložen do plazmidové DNA vhodné pro expresi v bakteriálních systémech. Správnost mutace byla potvrzena pomocí DNA sekvenace. Během produkce zásobního množství plazmidové DNA pET30_AICL C87S bylo získáno optimální množství této plazmidové DNA o vhodné čistotě.

Rekombinantní exprese proteinu byla provedena v bakteriích *E. coli* BL21 Gold (DE3), kdy byla spektrofotometricky sledována hustota množících se bakterií v médiu a při dosažení optimální hustoty došlo k indukci bakterií pomocí IPTG, čímž došlo k odstranění lac represoru a následné syntéze T7 RNA polymerasy potřebné pro transkripci DNA. Během přípravy rozpustné formy tohoto receptoru bylo třeba méně standardizovaných metod, a to izolace inkluzních tělísek a následné *in vitro* renaturace

proteinu. Během izolace inkluzních tělísek neboli nerozpustných agregátů cílového proteinu po produkci v bakteriích bylo třeba dbát na efektivitu izolace a následně sledovat, zda se cílový protein nachází v roztoku stále v nerozpustné formě, k čemuž posloužila kontrola pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Kontrola vždy potvrdila, že se protein o teoretické velikosti 13,86 kDa nachází v blízkosti standardu o velikosti 14 kDa, z čehož lze usuzovat, že cílový protein byl exprimován a během izolace se stále vyskytoval ve své nerozpustné formě. Navazující *in vitro* renaturace probíhala metodou rychlého zředění denaturovaného proteinu v renaturačním pufru s vysokou koncentrací argininu s následným odsolením pomocí dialýzy.

Z důvodu vysoké spotřeby argininu byla provedena optimalizace renaturace v různých koncentracích argininu. Z výsledků bylo patrné, že se snižující se koncentrací argininu v pufru se snižoval i výtěžek rozpustné formy proteinu, naopak bylo pozorováno zvyšující se množství nerozpustných agregátů v renaturačním pufru, které bylo třeba před chromatografickými metodami odstranit. Ze získaných výsledků lze tedy usuzovat, že vysoká koncentrace argininu v renaturačním pufru je zásadní pro vyšší výtěžnost. Nicméně renaturace proteinu může být ovlivněna i dalšími faktory, jako je rychlost přikapávání solubilizovaného proteinu do pufru nebo intenzita míchání pufru, tak aby aktuálně přidaný protein přešel po svém naředění do své přirozené konformace, tudíž tato metoda vyžadovala i trpělivost a čas.

Během purifikace proteinu pomocí ionexové chromatografie bylo nezbytné nanášet celkové množství proteinu rozpuštěného v pufru po částech tak, aby nebyla překročena efektivní kapacita kolony a nedošlo tak ke ztrátám kýženého proteinu.

S odebranými frakcemi byla opět provedena SDS elektroforéza, která potvrdila přítomnost proteinu o přibližné velikosti 14 kDa, nyní už v rozpustné formě. Nicméně čistota frakcí nebyla stále optimální, což bylo napraveno provedením gelové permeační chromatografie. Během této chromatografie byly jímány frakce vždy v rozmezí 18 - 20 ml v jednom píku, což ukazovalo, že je získaný protein ve formě monomeru. Čistota jímaných frakcí a kvalita proteinu byla opět zkontrolována pomocí SDS elektroforézy za redukujících a neredukujících podmínek. Ta potvrdila, že ve frakci je přítomen pouze protein ve formě monomeru a o velikosti cca 14 kDa v téměř dokonalé čistotě, vhodné pro další experimentální analýzy. Z výsledku elektroforézy lze i předběžně usuzovat, že došlo ke správnému zapojení disulfidových můstků v konstrukt proteinu a ne ke tvorbě dalších nespecifických produktů, což bylo dále

potvrzeno pomocí mapování disulfidových můstků metodou LC-MS.

Z výsledků hmotnostní spektrometrie je patrné, že došlo jednoznačně k zapojení prvního disulfidového můstku mezi cysteiny C35-C46 a druhého mezi C63-C144. Zapojení třetího disulfidového můstku je na první pohled diskutabilní z toho důvodu, že intenzita pro předpokládané spojení mezi C123-C136 je nižší než u spojení C123-C144. Nicméně, při srovnání mnohonásobně vyšších intenzit pro předchozí dvě spojení je logické, že jediná možná kombinace při vznik třetího disulfidového můstku je právě předpokládané spojení C123-C136. Vyšší součet intenzit pro zapojení C123-C144 je z velké pravděpodobnosti způsobeno takzvaným *scramblingem* neboli vznikem arteficiálních cystických peptidů. Obvyklé zastoupení takovýchto peptidů je nízké, nicméně existuje řada faktorů, které mohou zvýšit pravděpodobnost jejich vzniku. Hlavním faktorem, který zřejmě zapříčinil vznik tohoto abnormální disulfidové spojení mezi C123-C144 je, že cysteiny 123, 136 a 144 jsou v sekvenci proteinu umístěny velmi blízko u sebe, což právě zvyšuje pravděpodobnost *scramblingu*. Vliv na vznik arteficiálních cystických peptidů může mít mimo jiné i nakládání se vzorkem během přípravy peptidových štěpů před vlastní analýzou LC-MS. Výsledné zapojení disulfidových můstků C35-C46, C123-C136 a C63-C144 je v souladu se zapojením disulfidových můstků u vyřešených struktur příbuzných NK receptorů z rodiny disponující doménou podobnou lektinům C-typu. Těmi jsou například lidský receptor CD69 [22] nebo myší receptor Clrg [57].

Nemutovaná forma receptoru AICL se přirozeně vyskytuje pravděpodobně ve formě kovalentního homodimeru tvořeného pomocí lichého cysteinu v poloze 87 [29]. Nicméně, mutovaná forma tohoto receptoru tento cystein v poloze 87 postrádá. Protein by se tedy mohl vyskytovat ve své rozpustné formě jako monomer, ale také tvořit nekovalentní dimer, stejně jako jeho příbuzné receptory (CD69, LLT1). Provedením sedimentační analýzy na analytické ultracentrifuze byla potvrzena první úvaha, a to, že se protein AICL C87S v rozpustné formě vyskytuje jako monomer. Touto metodou byla mimo jiné získána i informace o přibližné prostorové a molekulové velikosti proteinu, kdy experimentální hodnota molekulové velikosti koreluje s hodnotou teoretickou.

Pomocí metody dynamického rozptylu světla byly získány výsledky, na jejichž základě a vztahu k teoretické molekulové hmotnosti lze opět usuzovat, že získaný protein je monomer i přes to, že získaná hodnota pro molekulovou velikost je zatížena chybou. Nicméně se jedná o méně přesnou analýzu ve srovnání se sedimentační

analýzou. Vedle homogenní složky představující právě monomer proteinu AICL C87S se však ve vzorku nacházela i vysokomolekulární složka, jejíž vznik je pravděpodobně způsoben mražením a následným rozmražením nebo ne zcela vyhovujícími podmínkami při uchovávání, jako je pH a iontová síla roztoku, přítomnost různých solí, popřípadě je vznik agregátů způsoben během zakoncentrování pomocí centrifugačních koncentrátorů. Otázkou tedy je, zda by nebyla pro protein příhodnější absence mrazení a protein byl uchováván pouze v lednici při 4 °C. Při měření teplotní závislosti byly první změny sledovány při 30 °C, kdy se pás 2 a 3 stal monodisperzním. Během zvyšování teploty byla pozorována oligomerizace proteinu a při teplotě 37 °C už byly přítomny pouze malé zbytky monomeru (5,7 % z distribuce intenzity). Naopak se zvyšoval podíl struktur o velikosti $4,58 \cdot 10^5$ kDa. Tyto výsledky naznačují, že protein je v takovémto stavu velmi málo teplotně stabilní. Důvodem můžou být opět podmínky skladování, během kterých pravděpodobně vznikají nespecifické agregáty, které narušují i stabilitu molekuly proteinu během zvyšování teploty, a to zřejmě vazbou agregátů na molekulu proteinu, čímž může být způsobena právě denaturace za teplot nižších, než je přirozená fyziologická teplota. Výsledky těchto analýz lze považovat pouze za hrubé odhady, nikoliv stěžejní data.

Pomocí Ramanovy spektroskopie byly získány informace o sekundární struktuře proteinu. Spektrum poukazuje na přítomnost uzavřených disulfidových můstků a postranních řetězců tyrosinu a tryptofanu přítomných na povrchu molekuly proteinu (ve vodném prostředí). Sekundární struktura disponuje především β -listy, v menší míře α -helixy. Procentuální zastoupení jednotlivých struktur je velmi podobné zastoupení struktur u receptoru CD69 (Obr. 26, str. 63), který je příbuzným receptorem z rodiny receptorů CTLD. Pro CD69 jsou zastoupení jednotlivých struktur zjištěných pomocí DCDR následující: α -helix - 20 ± 5 %, β -list - 50 ± 6 %, β -ohyb - 21 ± 5 , jiná - 9 ± 4 % (po srovnání s amidovým pásem III); α -helix - 12 ± 5 %, β -list - 49 ± 4 %, β -ohyb - 19 ± 2 , jiná - 10 ± 2 % (po srovnání s amidovým pásem I) [58].

S rozpustnou formou mutovaného receptoru AICL C87S byla zahájena proteinová krystalizace v *Henry Wellcome Building for Genomic Medicine*, kde bylo nasazeno sedm 96 jamkových krystalizačních destiček se širokým spektrem krystalizačních podmínek metodou sedící kapky. Bohužel, ve velké části nasazených podmínek byla po krátké době sledována precipitace proteinu nebo separace fází. Nicméně ve zbývajících podmínkách byly sledovány stále čisté kapky, beze známek

srážení, ve kterých by mohl protein v budoucnu tvořit krystaly. Z těchto průběžných výsledků vyplývá, že tento protein vyžaduje další optimalizace, a to jak po stránce skladování, jak už je zmíněno v předchozím odstavci diskutujícím DLS, tak i po stránce následných krystalizačních podmínek.



Obr. 26: Krystalová struktura extracelulární CTLD domény receptoru CD69.

Sekundární struktura CD69 zobrazující zastoupení α -helixů (červená), β -listů (světle modrá), β -ohybu (zelená) a jiných struktur (šedá); zdroj PDB 3HUP [22].

8 ZÁVĚR

- Byla připravena plasmidová DNA s inzertem kódujícím konstrukt receptoru AICL s bodovou mutací původního cysteinu 87 za serin.
- Rekombinantní exprese v bakteriích byla získána nerozpustná forma AICL C87S, která byla následně izolována a převedena do správně sbalené a rozpustné formy pomocí *in vitro* renaturace.
- Protein byl purifikován a jeho čistota a velikost byla ověřena pomocí SDS elektroforézy.
- Charakterizace konstruktu AICL C87S pomocí hmotnostní spektrometrie potvrdila správné zapojení disulfidových můstků mezi C35-C46, C63-C144 a C123-C136.
- Metodou sedimentační analýzy byl potvrzen předpoklad, že mutovaná forma AICL C87S se bude ve své rozpustné formě vyskytovat pouze jako monomer.
- Ramanova spektroskopie potvrdila, že připravený protein má sekundární strukturu, která odpovídá proteinu sbalenému v předpokládané nativní konformaci.

9 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S.: Cellular and molecular immunology, 7th Edition. Elsevier Saunders, USA (2012)
2. Burmersted, G., Pezzutto, A.: Color Atlas of Immunology, Thieme, USA (2003)
3. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie, 3. vydání, TRITON, Praha (2005)
4. Debebe, S.: Immunology and Serology, EPHTI, Ethiopia (2004)
5. Jílek, P.: Základy imunologie, 2. vydání, ANYWAY, Praha (2008)
6. http://www.nature.com/nri/posters/nkcells/nri1012_nkcells_poster.pdf (8.2.2015)
7. Moretta, L., Pietra, G., Montaldo, E., Pende, D., Falco, M., Del Zotto, G., Locatelli, F., Moretta, A., Mingari, C. M.: *Frontiers in Immunology*, 5, 87 (2014)
8. Middleton, D., Curran, M., Maxwell, L.: *Transplant immunology*, 10, 147-164 (2002)
9. Kopecký, J., Kopecký, O.: *Klinická onkologie*, 23, 5-9 (2010)
10. Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J. a kol.: Hematologie - přehled maligních hematologických nemocí, Grada Publishing a.s., Praha (2008)
11. <http://www.conkwest.com/natural-killer-cells> (8.2.2015)
12. Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., Moretta, A., Münz, C.: *The Journal of Immunology*, 172, 1455-1462 (2004)
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6402> (8.2.2015)
14. Ogata, K., An, E., Shioi, K., Nakamura, S., Luo, S., Yokose, N., Minami, S., Dan, K.: *Clinical & Experimental Immunology*, 124, 392-397 (2001)
15. Garcia, C. A., Robinson, J., Alejandro Madrigal, J., Marsh, S. G. E.: *Immunología*, 22, 190-202 (2003)
16. Lanier, L.L.: *Nature Immunology*, 9, 495-502 (2008)
17. Li, Y., Mariuzza, R. A.: *Frontiers in Immunology*, 5, 123 (2014)
18. Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., Steinle, A.: *Nature Immunology*, 7, 1334-1342 (2006)
19. Bartel, Y., Bauer, B., Steinle, A.: *Frontiers in Immunology*, 4, 362 (2013)
20. Zelensky, A. N., Gready, J. E.: *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 272, 6179-6217 (2005)

21. Osorio, F., de Sousa, C. R.: *Immunity*, 34, 651-664 (2011)
22. Kolenko, P., Skálová, T., Vaněk, O., Štěpánková, A., Dušková, J., Hašek, J., Bezouška, K., Dohnálek, J.: *Acta Crystallographica Section F*, 65, 1258-1260 (2009)
23. Bláha, J.: Diplomová práce - Příprava a studium lidského lymfocytárního receptoru LLT1, PŘF UK, Praha (2012)
24. Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K. M., Schitteck, B., Steinle, A.: *Proceedings of the National Academy of Science Journal*, 107, 5100-5105 (2010)
25. Nový, J.: Bakalářská práce - Příprava lidského NK buněčného receptoru KACL, PŘF UK, Praha (2013)
26. Hamann, J., Montgomery, K. T., Lau, S., Kucherlapati, R., van Lier, R. A. W.: *Immunogenetics*, 45, 295-300 (1997)
27. Akatsuka, A., Ito, M., Yamauchi, C., Ochiai, A., Yamamoto, K., Matsumoto, N.: *International Immunology*, 22, 783-790 (2010)
28. Spreu, J., Kienle, E. C., Schrage, B., Steinle, A.: *Immunogenetics*, 59, 903-912 (2007)
29. Čonka, M.: Diplomová práce - Příprava rekombinantních extracelulárních domén leukocytárních receptorů AICL a NKR-P1C^{BALB}, PŘF UK, Praha (2012)
30. Huang, H., Zheng, Y., Tian, Z., Sun, R.: *Immunological Investigations*, 39, 587-597 (2010)
31. Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Paroliny, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A.: *Europe Journal Immunology*, 31, 233-252 (2001)
32. Roda-Navarro, P., Hernanz-Falcón, P., Arce, I., Fernández-Ruiz, E.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1520, 141-146 (2001)
33. Thomas, M., Boname, J. M., Field, S., Nejentsev, S., Sallo, M., Cerundolo, V., Wills, M., Lehner, P. J.: *Proceedings of the National Academy of Science Journal*, 105, 1656-1661 (2008)
34. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (6.2.2015)
35. Weigl, E., Raška, M., Šíma, P., Turánek, J., Frömmel, J., Rašková Kafková, L.: Škola molekulárních biotechnologií Profession - Studijní texty k teoretickým modulům, Tribun EU s.r.o., Olomouc (2010)

36. <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Expres-rekombinantnich-proteinu-teoreticky-zaklad.pdf> (6.2.2015)
37. Ariescu, A. R., Lu, W., Jones, E. Y.: *Acta Crystallographica Section D*, 62, 1243-1250 (2006)
38. Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A.: *Frontiers in Microbiology*, 5, 172 (2014)
39. <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/230130.pdf> (6.2.2015)
40. Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T.: *Protein Expression and Purification*, 28, 1-8 (2003)
41. Rudolph, R., Lilie, H.: *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental biology*, 10, 49-56 (1996)
42. <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/166/t3001i.pdf>, (6.2.2015)
43. Sambrook, J., Russel, D. W.: *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (2001)
44. Ho, N. S., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R.: *Gene*, 77, 51-59 (1989)
45. <http://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2012/01/10/methods-for-site-directed-mutagenesis> (26.2.2015)
46. http://www.geneaid.com/sites/default/files/DF13_0.pdf (9.3.2015)
47. <http://www.geneaid.com/sites/default/files/PD12.pdf> (9.3.2015)
48. https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_hipure_plasmid_dna_purification_man.pdf (9.3.2015)
49. <http://www.biotech.kth.se/courses/gru/courselist/BB2060/HT08/Analytlab2009.pdf> (7.3.2015)
50. Pompach, P., Man, P., Kavan, D., Hofbauerová, K., Kumar, V., Bezouška, K., Havlíček, V., Novák, P.: *Journal of Mass Spectrometry*, 11, 1571-1578 (2009)
51. Vaněk, O., Bezouška, K.: *Chemické. Listy*, 104, 1155-1162 (2010)
52. SEDNTERP, dostupné z: <http://www.jphilo.mailway.com> (20.4.2015)
53. Schuck, P.: *Biophysical Journal*, 78, 1606-1619 (2000), SEDFIT, dostupné z: <http://www.analyticalultracentrifugation.com> (20.4.2015)
54. Deegan, R. D., Bakajin, O., Dupot, T. F., Huber, G., Gel, S. R., Witten, T. A.: *Nature*, 389, 827-829 (1997)

55. Zhang, D., Xie, Y., Mrozek, M. F., Ortiz, C., Davisson, V. J., Ben-Amotz, D.: *Analytical Biochemistry*, 75, 5703-5709 (2003)
56. Zetasizer Nano - Příručka pro uživatele Malvern Instrumets, Malvern (2007)
57. Skálová, T., Kotýnková, K., Dušková, J., Hašek, J., Koval', T., Kolenko, P., Novák, P., Hanc, P., Vaněk, O., Bezouška, K., Dohnálek, J.: *The Journal of Immunology*, 189, 4881-4889 (2012)
58. Vaněk, O.: Diplomová práce - Příprava a strukturní studie proteinu CD69, receptoru NK buněk, PřF UK, Praha (2005)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka