

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY**  
**Katedra biochemie**

---



**VÝZKUM VAZEBNÝCH SPECIFIT IZOFOREM  
RECEPTORU NKR-P1 POTKANA**

Diplomová práce  
studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Vedoucí diplomové práce:  
Praha 2007

Prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc.  
Hynek Mrázek

## **Prohlášení**

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

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 a MBÚ AV ČR

V Praze dne.....*4.5. 2007*.....

*Karel Bezouška*  
.....

podpis

**Předmětová slova:** Imunologie, vazebné experimenty

**Klíčová slova:** NK buňky, receptory NK buněk, NKR-P1, CD69, oligosacharidy, adhezivní interakce, leukocyty, lektiny

## Poděkování

V první řadě rád bych poděkoval svému školiteli Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, Csc. za vedení při vypracování diplomové práce, za jeho ochotu, rady i pomoc při experimentální práci. Dále bych rád poděkoval Mgr. Danielu Kavanovi za pomoc při vykonávání experimentů a celému kolektivu Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR za jejich pomoc a cenné rady nejen při přípravě experimentů.

<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>8</b>
<b>PŘEDMLUVA .....</b>	<b>10</b>
<b>I. ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>I.1 IMUNITNÍ SYSTÉM .....</b>	<b>11</b>
I.1.1 Funkce imunitního systému.....	11
I.1.2 Druhy imunitních mechanismů .....	11
I.1.3 Hlavní složky imunitního systému .....	12
I.1.4 Povrchové molekuly leukocytů .....	13
<b>I.2 NK BUŇKY .....</b>	<b>16</b>
I.2.1 Funkce NK buněk.....	16
I.2.2 Princip buněčného rozpoznávání.....	17
I.2.3 Receptory NK buněk .....	17
I.2.4 Cytotoxická aktivita NK buněk .....	20
<b>I.3 Molekula CD69.....</b>	<b>21</b>
I.3.1 Struktura molekuly CD69.....	22
I.3.2 Funkce molekuly CD69.....	23
I.3.3 Specifické ligandy molekuly CD69.....	23
<b>I.4 Molekula NKR-P1 .....</b>	<b>24</b>
I.4.1 Struktura a funkce molekuly NKR-P1.....	25
I.4.2 Specifické ligandy molekuly NKR-P1 .....	26
<b>II. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>27</b>
<b>III. PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE .....</b>	<b>28</b>
<b>III.1 Přístroje .....</b>	<b>28</b>

<b>III.2 CHEMIKÁLIE</b> .....	<b>29</b>
<b>III.3 PUFRY A ROZTOKY</b> .....	<b>31</b>
III.3.1 Média .....	32
III.3.2 Enzymy .....	32
III.3.3 Inhibitory.....	32
III.3.4 Vektory .....	33
III.3.5 Bakteriální kmeny .....	33
III.3.6 Marker pro SDS PAGE.....	33
<b>IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
<b>IV.1 METODY PŘI PRÁCI S BAKTERIÁLNÍMI KULTURAMI</b> .....	<b>34</b>
IV.1.1 Transformace kompetentních buněk.....	34
IV.1.2 Optimalizace produkce a selekce produkčního klonu .....	34
IV.1.3 Velkoobjemová produkce .....	35
<b>IV.2 METODY PŘI PRÁCI S PROTEINY</b> .....	<b>35</b>
IV.2.1 Izolace inkluzních tělísek .....	35
IV.2.2 Solubizace inkluzních tělísek .....	36
IV.2.3 Renaturace proteinu.....	36
IV.2.4 Dialýza.....	37
IV.2.5 Metody sloužící k zakoncentrování proteinu.....	37
IV.2.6 Stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové.....	37
IV.2.7 Proteinová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS .....	38
IV.2.8 Barvení polyakrylamidových gelů.....	38
<b>IV.3 CHROMATOGRAFICKÉ METODY</b> .....	<b>39</b>
IV.3.1 Ionexová chromatografie .....	39
IV.3.2 Chromatografie na obrácené fázi.....	39
IV.3.3 Gelová chromatografie .....	40

<b>IV.4 VAZEBNÉ EXPERIMENTY</b> .....	<b>40</b>
IV.4.1 Naznačení proteinu CD69 fluorescenční sondou .....	40
IV.4.2 Inhibiční vazebné experimenty .....	41
IV.4.3 Precipitační experimenty .....	42
IV.4.4 Metody přímé vazby .....	42
IV.4.5 Rovnovážná dialýza.....	43
<b>V. VÝSLEDKY</b> .....	<b>46</b>
<b>V.1 PŘÍPRAVA MOLEKULY hCD69</b> .....	<b>46</b>
V.1.1 Produkce proteinu hCD69.....	46
V.1.2 Purifikace proteinu hCD69 .....	47
<b>V.2 PŘÍPRAVA ZKRÁCENÉ FORMY MOLEKULY hCD69</b> ...	<b>50</b>
<b>V.3 PŘÍPRAVA MOLEKUL rNKR-P1A a rNKR-P1B</b> .....	<b>53</b>
V.3.1 Produkce proteinu rNKR-P1A a rNKR-P1B .....	53
V.3.2 Purifikace proteinů rNKR-P1A a rNKR-P1B.....	54
<b>V.4 VAZEBNÉ STUDIE</b> .....	<b>55</b>
V.4.1 Inhibiční vazebné experimenty .....	55
V.4.2 Precipitační experimenty.....	59
V.4.3 Přímá vazba.....	60
V.4.4 Rovnovážná dialýza .....	64
<b>VI. DISKUSE</b> .....	<b>67</b>
<b>VII. SOUHRN</b> .....	<b>70</b>
<b>SEZNAM LITERATURY</b> .....	<b>71</b>

## SEZNAM ZKRATEK

<b>ADCC</b>	- buněčná cytotoxicita závislá na protilátce ( <b>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</b> )
<b>AMK</b>	- aminokyselina
<b>Amp</b>	- ampicilin
<b>APS</b>	- peroxodisíran amonný
<b>BCR</b>	- antigenní receptor B-lymfocytů ( <b>B-Cell Receptor</b> )
<b>BSA</b>	- hovězí sérový albumin
<b>CBB R</b>	- barva Coomassie Brilliant Blue R250
<b>CD</b>	- označení povrchových leukocytárních molekul ( <b>Cluster of Differentiation</b> )
<b>CRD</b>	- lektinová doména vázající sacharid
<b>CTLD</b>	- „doména podobná lektinům C-typu“ ( <b>C-Type Lectin-like Domain</b> )
<b>DMSO</b>	- dimetylsulfoxid
<b>DTT</b>	- dithiothreitol
<b>EDTA</b>	- kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>EtOH</b>	- ethanol
<b>Fc</b>	- fragment imunoglobulinu po štěpení papainem
<b>FcγIII</b>	- receptor III pro Fc část IgG
<b>Fuc</b>	- fukosa
<b>GalNAc</b>	- N-acetylgalaktosamin
<b>GC</b>	- gelová chromatografie
<b>GlcNAc</b>	- N-acetylglukosamin
<b>GM-CSF</b>	- faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
<b>GPI</b>	- glykosylfosfatidylinositol
<b>HEPES</b>	- 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
<b>HLA</b>	- hlavní histokompatibilní lidský komplex ( <b>Human Leucocytes Antigens</b> )
<b>HPLC</b>	- vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IFN</b>	- interferon
<b>IL</b>	- interleukin
<b>Ig</b>	- imunoglobulin
<b>IP<sub>3</sub></b>	- inositoltrisfosfát
<b>IPTG</b>	- isopropylthio-β-D-galaktosid



<b>ITAM</b>	- imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu ( <b>Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif</b> )
<b>ITIM</b>	- imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu ( <b>Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif</b> )
<b>KIR</b>	- zabíječský receptor imunoglobulinového typu ( <b>Killer Immunoglobulin Receptor</b> )
<b>LB</b>	- médium ( <b>Luria-Bertani</b> )
<b>Man</b>	- manosa
<b>MHC</b>	- hlavní histokompatibilní komplex ( <b>Major Histocompatibility Complex</b> )
<b>MS</b>	- hmotnostní spektrometrie ( <b>Mass Spectrometry</b> )
<b>NK</b>	- „přirozeně zabíječské buňky“ ( <b>Natural Killers</b> )
<b>NKC</b>	- komplex genů NK buněk ( <b>Natural Killer Complex</b> )
<b>NKT</b>	- „přirozeně zabíječské“ T buňky
<b>PEG</b>	- polyetylen glykol
<b>PKC</b>	- proteinkinasa C
<b>PIPES</b>	- 1, 4 – piperazindiethansulfonová kyselina
<b>PMSF</b>	- fenylmethylsulfonylfluorid
<b>PTK</b>	- protein-tyrosinové kinasy
<b>RP-HPLC</b>	- vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi ( <b>Reversed Phase</b> )
<b>SDS</b>	- dodecylsulfát sodný
<b>SDS-PAGE</b>	- SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
<b>T<sub>C</sub></b>	- cytotoxické T lymfocyty ( <b>cytotoxicity</b> )
<b>T<sub>H</sub></b>	- pomocné T lymfocyty ( <b>helper</b> )
<b>TCR</b>	- antigenní receptor T-lymfocytů ( <b>T-Cell Receptor</b> )
<b>TEMED</b>	- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
<b>TFA</b>	- trifluoroctová kyselina
<b>Tet</b>	- tetracyklin
<b>Tricin</b>	- N-tris(hydroxymethyl)-methyl glycin
<b>Tris</b>	- tris(hydroxymethyl)aminomethan

# PŘEDMLUVA

V laboratoři architektury proteinů se již dlouho dobu zkoumají pod vedením Prof, RNDr, Karla Bezoušky, CSc leukocytární antigeny. Lidský homolog hCD69 a potkaní izoformy receptoru NKR-P1 patří mezi receptory, na kterých byla již provedena řada vazebných i strukturních experimentů.

Podrobné poznání těchto molekul, jejich funkcí a různých vzájemných interakcí je velice složité, nicméně jejich dokonalé pochopení by mohlo být velmi užitečné při boji proti mnoha onemocněním ať virovým, autoimunitním či nádorovým.

# I. ÚVOD

## I.1 IMUNITNÍ SYSTÉM

Všechny organismy jsou neustále vystavovány útokům jiných organismů. Živočichové si proti svým predátorům vybudovali ohromné množství obranných mechanismů. Avšak mnohem nebezpečnější je napadení infekčními mikroorganismy nebo viry. Aby se jim živočichové dokázali ubránit vyvinuli si důmyslné obranné reakce známé jako imunitní systém.<sup>1</sup>

### I.1.1 Funkce imunitního systému

Funkcí imunitního systému je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává „škodlivé“ od „neškodného“, a chrání tak organismus proti škodlivinám vnějšího původu (rozpoznání škodliviny a ochrana před jejím patogenním působením), tato funkce se nazývá **obranyschopnost** i vnitřního původu tzv. **imunitní dohled** (průběžné odstraňování vnitřních škodlivin např. staré, poškozené či některé pozměněné buňky). Imunitní systém také rozpozná vlastní tkáň organismu a udržuje vůči nim **toleranci** (schopnost rozpoznat a tolerovat tkáň a látky organismu vlastní).<sup>1</sup>

### I.1.2 Druhy imunitních mechanismů

Imunitní mechanismy lze rozdělit do dvou základních kategorií: **nespecifické** a **antigenně specifické**.

Nespecifické mechanismy jsou evolučně starší. Jsou obvykle účinné proti mnoha patogenům tím, že reagují na strukturní nebo funkční rysy jim společné. Můžeme je rozdělit na buněčné a humorální.<sup>1</sup> Buněčné nespecifické systémy jsou reprezentovány fagocytyujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami (NK buňky, Natural Killer cells „přirození zabijáci“). Humorální složky nespecifické imunity tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny. Nespecifické složky imunitního systému reagují rychle (řádově minuty) na přítomnost škodliviny na rozdíl od specifických složek imunitního systému, které potřebují k úplnému rozvoji imunitní reakce několik dnů až týdnů.<sup>2</sup>

Specifické mechanismy jsou evolučně mladší (známé až u obratlovců). Antigenně specifické znamená, že reagují na každou cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce

specifických molekul, (protilátky, antigeně specifické receptory), a aktivují se až po setkání s antigenem.

Patří mezi ně mechanismy humorální (založené na protilátkách) a buněčně zprostředkované (založené hlavně na T lymfocytech). Charakteristickým rysem specifické imunity je tzv. *imunologická paměť*.

U obratlovců jsou nespecifické i specifické mechanismy imunitního systému velmi důležité a vzájemně spolu kooperují.

### I.1.3 Hlavní složky imunitního systému

Mezi hlavní složky imunitního systému patří lymfatické tkáně a orgány, buňky imunitního systému (imunocyty) a molekuly imunitního systému.

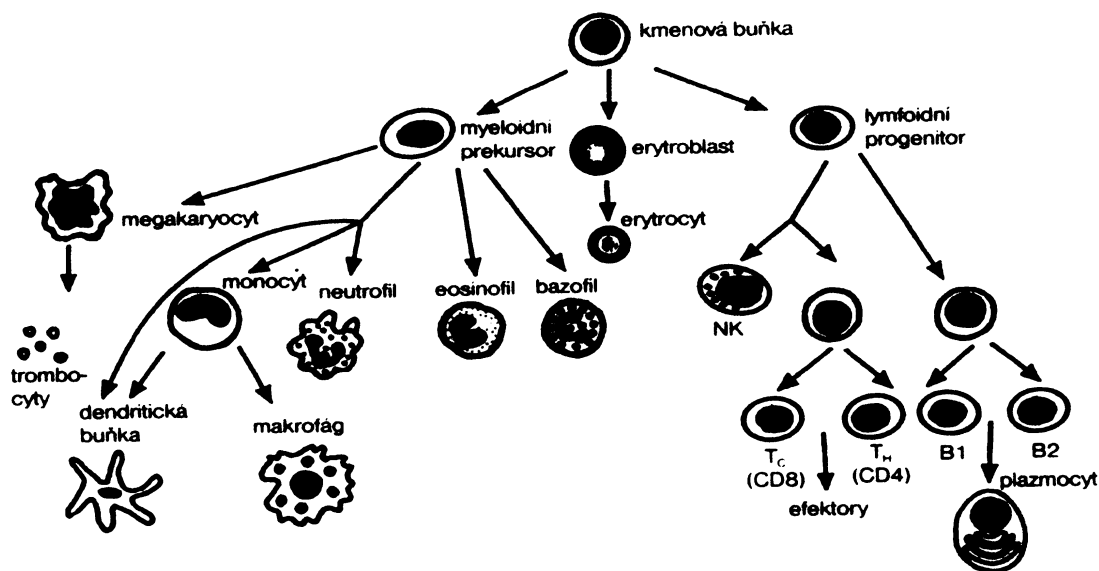
Lymfatické tkáně a orgány rozdělujeme na primární, mezi které řadíme kostní dřeň a brzlík, a sekundární, mezi které patří slezina, lymfatické uzliny a rozptýlené lymfatické tkáně. V primárních orgánech probíhá vznik, zrání a diferenciací buněk imunitního systému, zatímco sekundární lymfatické tkáně a orgány jsou místem, kde probíhají hlavní fáze antigeně specifických imunitních reakcí.

Buňky imunitního systému tvoří z velké části různé druhy bílých krvinek (leukocyty). Všechny druhy leukocytů vznikají z pluripotentních kmenových buněk, které jsou charakteristické přítomností adhezivní molekuly CD34. Z kmenových buněk vznikají dvě základní linie myeloidní a lymfoidní (obr. 1).

Z myeloidní linie vznikají monocyty, granulocyty a dendritické buňky.<sup>1</sup> Některé z těchto buněk jsou schopny fagocytózy a mohou také působit jako antigen prezentující buňky. Buňky myeloidní linie jsou základem jak pro nespecifické tak pro specifické imunitní mechanismy.

Mezi buňky lymfoidní linie patří T lymfocyty, B lymfocyty a NK buňky. Hlavní centrum vývoje T lymfocytů je brzlík, avšak některé subpopulace se vyvíjí mimo brzlík. Z brzlíku odcházejí dvě odlišné populace T lymfocytů, T<sub>c</sub> lymfocyty (cytotoxické) které mají na svém povrchu receptor CD8 a T<sub>h</sub> lymfocyty s povrchovým receptorem CD4. Oba druhy T lymfocytů se po setkání s antigenem na povrchu antigen prezentující buňky (APC) mění na tzv. efektorové T lymfocyty. T<sub>h</sub> lymfocyty se vyznačují produkcí cytokinů, které se podílejí na regulaci jiných buněk. T<sub>c</sub> lymfocyty se vyznačují schopností cytotoxicky zabít jiné buňky. Vývoj B lymfocytů probíhá v kostní dřeni a dokončuje se setkáním s antigenem

v lymfatických orgánech. Konečným stádiem diferenciacie B lymfocytů jsou plazmatické buňky, které produkují protilátky. Část B a T lymfocytů se mění na paměťové buňky. Tyto buňky jsou zodpovědné za tzv. imunologickou paměť.



Obr. 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky<sup>1</sup>.

### I.1.4 Povrchové molekuly leukocytů

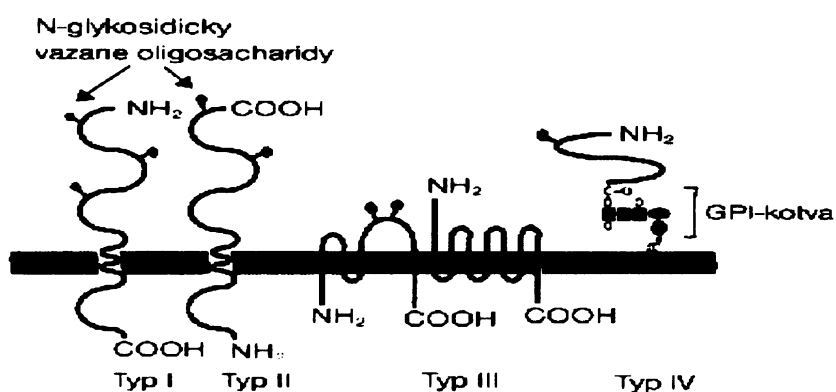
Většina děju probíhající v imunitním systému je závislá na mezibuněčných kontaktech. Tyto kontakty jsou zajišťovány molekulami přítomnými jak na povrchu leukocytů, tak na povrchu ostatních buněčných i nebuněčných struktur, které jsou přítomny v organismu. Ve většině případech nepůsobí tyto adhezivní molekuly jen jako pasivní spojnice, ale po interakci s vazebným partnerem přenáší do buňky signál, který informuje buňku o uskutečněné adhezi.<sup>3</sup> Na tento signál poté buňka aktivně reaguje.

Některé adhezivní molekuly jsou exprimovány neustále, jiné až po signalizaci jiným receptorovým systémem či vazbou cytokinu na jeho specifický receptor. Některé se vyskytují jen na leukocytech jiné i na jiných buňkách v organismu. Podle výskytu těchto molekul lze usuzovat na stupeň diferenciacie, fyziologický stav či situaci ve které se buňka nachází. Neboť některé molekulové struktury se vyskytují na buněčném povrchu jen v určitých konkrétních situacích či v určitém stadiu vývoje buňky. Expresie těchto povrchových molekul není samozřejmě omezena jen na buňky imunitního systému, ale je základem celé řady

jiných mechanismů probíhajících v organismu (buněčná adheze, embryogeneze, mutageneze, karcinogeneze, tkáňová diferenciace atd.).

Vzhledem k velkému počtu těchto molekul se zavedlo tzv. CD názvosloví (z angl. cluster of differentiation). Tento názvoslovný systém odstraňuje určitý chaos, který vznikal libovolným pojmenováním nově objevených molekul například podle jejich funkce či struktury. Název je tvořen písmeny CD za kterými následuje pořadové číslo molekuly popřípadě další znaky potřebné k odlišení různých izoform. CD názvosloví neříká nic o funkci či struktuře daných molekul, je to pouze inventurní systém.<sup>4</sup>

Povrchové leukocyty můžeme dělit podle několika hledisek. Za prvé podle zakotvení proteinů v cytoplazmatické membráně (obr.2). U proteinů *I.typu* je N-terminální část lokalizovaná extracelulárně, cytoplazmatickou membránou prochází úsek asi 20 hydrofobních aminokyselin a C-terminální část je lokalizována intracelulárně. Tento typ membránových proteinů je nejběžnější. Méně běžný *II.typ* má C-terminální část lokalizovanou extracelulárně a N-terminální část intracelulárně. U membránových proteinů *III.typu* prochází polypeptidový řetězec membránou opakovaně (typicky např. 4x nebo 7x). membránové proteiny *IV.typu* jsou k cytoplazmatické membráně zakotveny pomocí glykolipidové „kotvy“, celý peptidový řetězec je lokalizován extracelulárně a k C-koncové aminokyselině je připojen glykosylfosfatidylinositol (GPI).<sup>5</sup>



**Obr. 2: Druhy povrchových proteinů.<sup>1</sup>**

Povrchové molekuly leukocytů se dělí podle jejich funkce do několika skupin.

---

### Dělení povrchových molekul leukocytů podle jejich funkce

---

**Antigeně specifické receptory:** TCR, BCR nacházejí se u B a T-lymfocytů.

**Adhezivní molekuly:** integriny, muciny, selektiny a jiné lektiny. Tyto molekuly se uplatňují při buněčné adhezi.

**MHC-glykoproteiny:** (z angl. major histocompatibility complex) u lidí označovaných jako HLA (z angl. human leukocyte antigens). MHC-glykoproteiny lze rozdělit na MHC I.třídy, které jsou přítomny na všech buňkách organismu a MHC II.třídy, které jsou za fyziologických podmínek přítomny jen na buňkách prezentující antigen.

**Fc-receptory:** váží Fc část imunoglobulinových molekul. Jednotlivé Fc-receptory jsou specifické pro různé izotypy imunoglobulinů

**Komplementové receptory (CR):** váží fragmenty složek komplementu.

**Povrchové enzymy:** mnoho proteinů jejichž extracelulární nebo intracelulární část vykazuje enzymovou aktivitu.

**Transportní proteiny:** membránové pumpy, kanály atd.

---

Dále lze povrchové molekuly leukocytů dělit do tzv. rodin nebo superrodin podle jejich strukturní podobnosti. Toto dělení se provádí podle aminokyselinové sekvence molekul a tudíž podle jejich podobného prostorového uspořádání polypeptidového řetězce.

---

### Nejvýznamnější superrodiny povrchových leukocytů

---

**Imunoglobulinová rodina:** BCR, TCR, většina Fc-receptorů atd.

**Integrinová rodina:**  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 7$  integriny

**Lektinová (C-typu):** selektiny a některé receptory NK buněk (NKR-P1, CD69 atd).

**Komplement receptorová rodina:** CD21 (CR2), CD35 (CR1) atd.

**Cytokinin receptorová:** receptory pro IL-2, IL-3, IL-4 atd.

**Fibronektinová:** receptory pro IFN- $\gamma$ , IL-10 atd

**Skupina TNF:** Fas L, membránový TNF atd.

**Scavenger-receptorová:** CD5, CD6 atd.

**MHC rodina:** MHC gp.I, MHC gp. II, CD1.

**Mucinová rodina:** CD34, CD43 atd.

**Glykosaminyglykanová rodina:** CD44, CD138 atd.

**Tyrosin-fosfatazová:** CD45, CD148

**Glykolipidová rodina:** CD17, CD60 atd. <sup>6</sup>

---

Některé molekuly mohou vykazovat několik strukturních podobností a zároveň mohou vykonávat několik funkcí. V takových případech se bere v úvahu jen nejdůležitější funkce a struktura která je zodpovědná za tuto funkci.

## I.2 NK BUŇKY

### I.2.1 Funkce NK buněk

NK buňky (natural killers cells) byly popsány teprve v roce 1975 jako lymfocyty <sup>7</sup>, které jsou schopny bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci zabít některé nádorové nebo virově infikované buňky.

Jsou to velké granulární lymfocyty, které se vyvíjí v kostní dřeni společně s ostatními lymfocyty z pluripotentních kmenových buněk. Vývojově jsou bližší T-lymfocytům, tuto příbuznost dokazuje nedávný objev T-lymfocytů, které nesou na svém povrchu markery charakteristické pro NK buňky (NKR-P1). Tato skupina byla nazvána NKT.<sup>8</sup>

NK buňky jsou stejně jako T<sub>c</sub>-lymfocyty zapojeny do cytotoxických reakcí, které jsou namířené proti nádorově změněným nebo virově infikovaným buňkám. Produkci velkého množství cytokinů mají také regulační význam při specifické imunitní odpovědi, diferenciaci buněk, buněčné adhezi atd. Mezi nejdůležitější cytokin produkovaný NK buňkami je INF- $\gamma$ ,<sup>1</sup> který stimuluje makrofágy k přeměně na aktivovanou formu, ke zvýšení exprese MHC gp.II a k sekreci IL-12, který je výrazným diferenciačním faktorem pro T<sub>h</sub>1-lymfocyty a inhibujícím faktorem pro vývoj T<sub>h</sub>2-lymfocytů.<sup>9</sup> Další cytokiny produkované NK buňkami jsou TNF $\alpha$ ,  $\beta$ , které jsou nezbytné při stimulaci (TNF $\alpha$ ) či inhibici (TNF $\beta$ ) mitózy, uplatňují se také při zánětlivých procesech. Dále jsou NK buňky producenti tzv. faktorů stimulující kolonie (CSF). Tyto faktory stimulují diferenciaci monocytů (M-CSF), granulocytů (G-CSF) a myeloidních buněk (GM-CSF). V neposlední řadě se NK buňky uplatňují při regulaci autoimunitních reakcí.



## I.2.2 Princip buněčného rozpoznávání

NK buňky exprimují na svém povrchu receptory rozeznávající MHC gp.I. Pokud se NK buňka setká s buňkou která má na svém povrchu „normální“ množství MHC gp.I neaktivuje své cytotoxické mechanismy. V opačném případě, kdy NK buňka nalezne na povrchu zkoumané buňky abnormálně málo MHC gp.I (některé nádorové nebo virově infikované buňky potlačují exprese MHC gp.I) aktivuje své cytotoxické mechanismy a danou buňku zabije. Tato hypotéza se nazývá self missing<sup>10</sup> a vysvětluje jak imunitní systém dokáže eliminovat buňky, které unikají jeho pozornosti sníženou expresí MHC gp.I.

## I.2.3 Receptory NK buněk

Interakce NK buněk s okolím je zprostředkována receptory umístěnými na jejich povrchu. NK buňky mají na svém povrchu dva základní typy receptorů aktivační a inhibiční.

**Aktivační receptory:** Po interakci membránového receptoru s jeho ligandem dochází k přenosu signálu do buňky. Přenos signálu probíhá pomocí nabitých aminokyselin, které se nacházejí v intracelulární části receptoru. Tyto intracelulární části jsou spojeny s adaptorovými molekulami jako jsou např. DAP10, DAP12, které obsahují imunoreceptorový tyrosin-vázající aktivační motiv ITAM<sup>11</sup> (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif). Fosforylaci ITAM zajišťují protein-tyrosin kinázy skupiny Src. Signalizace dále probíhá využitím fosfatidylinositol-3-kinázy a PTK ZAP10 a SYK.

Další možnost přenosu signálu je pomocí G-proteinů asociovaným s receptory. Po navázání ligandu se od receptoru odpojí G-protein tvořený třemi podjednotkami  $\alpha\beta\gamma$ . Na  $\alpha$  podjednotku se naváže GTP místo dosud navázaného GDP a dojde k disociaci na  $\beta\gamma$  a  $\alpha$ -GTP. Komplexy  $\alpha$ -GTP a  $\beta\gamma$  se mohou vázat na jiné enzymy a ovlivňovat jejich aktivitu.

Mezi aktivační receptory NK buněk patří lidský NKR-P1, CD69, NKG-2D, myší NKR-PA, CD69, skupina receptorů zodpovědná za spontánní cytotoxicitu NK buněk NKp44, NKp46, protilátkový receptor CD16.<sup>12</sup>

**Inhibiční receptory:** Specifické ligandy pro tyto receptory jsou MHC gp.I. Lidské molekuly MHC se nazývají HLA (Human Leukocyte Antigen), který se dělí na HLA-A, B, C nazývané klasické a HLA-E, F, G nazývané neklasické.<sup>1</sup> Řada receptorů obsahuje ve své intracelulární části imunoreceptorový tyrosin vázající inhibiční motiv ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Na tento motiv se váží protein-tyrosin-fosfatázy skupiny SHP1 a SHP2, které defosforylují PTK a tím inhibují přenos signálu.

Mezi klasické inhibiční receptory NK buněk patří myší molekuly Ly-49 a NKR-P1Ba lidské KIR2DL, KIR3DL a NKG-2A.<sup>12</sup>

Podle struktury dělíme receptory NK buněk na dvě tzv. rodiny *imunoglobulinovou a C-lektinovou*.

Receptory patřící do imunoglobulinové rodiny se nazývají KIR (Killer Inhibition Receptors),<sup>13</sup> dosud byly nalezeny pouze na lidských NK buňkách. Dělí se do dvou podrodin v závislosti na počtu imunoglobulinových domén v extracelulární části molekuly. První podrodina obsahuje dvě (KIR2D) a druhá podrodina tři (KIR3D) domény imunoglobulinového typu. Ligandy pro tyto receptory jsou klasické molekuly HLA.

Proteiny C-lektinového typu byly poprvé identifikovány v 80. letech 20. století.<sup>14</sup> Společným znakem této rodiny je tzv. CRD (Carohydrate Recognition Doman). Tato sacharid vázající doména potřebuje ke své vazebné aktivitě přítomnost vápenatých iontů. Přestože je CRD pro všechny proteiny této skupiny společná, její přesná charakterizace se u jednotlivých proteinů liší. Na základě homologie aminokyselinové sekvence lze C-lektiny rozdělit do 7 odlišných skupin.<sup>15</sup>

---

#### Dělení lektinů C-typu do skupin dle homologie aminokyselinové sekvence

---

##### *Proteoglykany*

##### *Transmembránové receptory II.typu*

##### *Kolektiny*

##### *Selektiny*

##### *Lymfocytární membránové antigeny II.typu* (sem patří také lektinové receptory NK Buněk)

##### *Manosové receptory makrofágů*

##### *Volné lektinové domény*

---

Lektinové receptory C-typu jsou transmembránové proteiny II.typu, na povrchu buněk se zpravidla vyskytují jako kovalentní dimery (homodimery).<sup>16</sup> V extracelulární části, která bývá velmi často glykosylovaná se nachází CRD doména.<sup>17</sup> Dále se protein skládá z krčku obsahujícího cysteiny zodpovědné za dimerizaci, krátké transmembránové části (přibližně 20AK), a intracelulární části sloužící k přenosu signálu pomocí ITAM/ITIM sekvence a asociovaných PTKas rodiny Src (Lyn, Fyk), adaptorových molekul nebo

G-proteinů.<sup>18</sup>

Geny kódující lektinové receptory C-lektinového typu jsou umístěny v tzv. NKC genovém komplexu. U lidí se NKC vyskytuje na 12. chromosomu, u myši na 6. a u potkanů na 4. chromosomu. Porovnání lidského a myšního NKC<sup>19</sup> (obr.3).

Jak je vidět tak geny pro polymorfní receptory rodiny Ly-49 a NKR-P1 jsou umístěny stranou od monomorfních genů pro CD69 a CD94. Do skupiny Ly-49 patří 9 příbuzných členů Ly-49A – Ly-49I. Rodina receptorů Ly-49 působí inhibičně na buněčnou cytotoxicitu. Tyto receptory se vyskytují na povrchu myších a potkaních NK buněk. Na povrchu lidských NK buněk nebyly zatím objeveny.<sup>20</sup>



**Obr. 3: Porovnání NKC, kódujícího geny pro lektinové receptory C-typu.**

Jak se zdá jejich funkci u lidských NK buněk převzaly KIRs viz. výše. Jako další byla objevena rodina pěti genů C-lektinového typu označených jako NKG 2A-E.

Receptory NKG 2 se odlišují v extracelulární a cytoplazmatické části. Tato rozdílnost umožňuje velkou variabilitu receptorů pro jejich ligandy. NKG 2 receptory jsou obvykle spojeny s glykoproteiny označovanými jako CD94.<sup>21</sup> Zdá se, že NKG 2 nemohou být exprimovány na buněčném povrchu bez přítomnosti CD94. Funkce CD94 není dosud zcela jasná. Jelikož intracelulární část CD94 je příliš krátká a neobsahuje žádnou signální sekvenci, zdá se, že napomáhá transportu NKG 2 na povrch buněk.

## I.2.4 Cytotoxická aktivita NK buněk

U NK buněk jsou známy dva mechanismy cytotoxického účinku a to přirozená cytotoxicita, která se uskutečňuje buď přes apoptotický Fas ligand nebo lytickou cestou za přítomnosti vápníku, a dále buněčná cytotoxicita závislá na protilátce proti cílové struktuře (ADCC). Po setkání NK buňky s cílovou buňkou dochází k interakci mezi povrchovými receptory obou buněk, zesílení vzájemné vazby a spuštění lytických mechanismů. Cílová buňka po obdržení tzv. „polibku smrti“ umírá, NK buňka se od ní odpoutá a pokračuje k dalším cílům.

### *Na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (ADCC)*

ADCC jako jediný z mechanismů využívaných NK buňkami je součástí specifické adaptivní imunity. Setká-li se NK buňka s buňkou, která je opsonizovaná protilátkami třídy IgG dochází ke spuštění této reakce. Na povrchu NK buněk se nachází stimulační nízkoafinní receptor pro IgG CD16 (FcγRIII). Tento receptor se váže na Fc část protilátek. CD16 byl nalezen na většině lidských i myších NK buněk, na aktivovaných monocitech a povrchu T buněk. Po navázání ligandu na CD16 dochází k aktivaci PTKázy rodiny Src vazbou na tyrosinové zbytky v oblasti ITAM cytoplazmatické domény.<sup>22</sup> Dále dochází k aktivaci fosfolipáz, stimulaci fosfatidilinositol-3-kináz a indukci MAP kinasy, což vede ke zvýšení hladiny intracelulárního vápníku.<sup>23</sup> Zvýšená hladina  $Ca^{2+}$  má za následek spuštění cytotoxických mechanismů, vedoucích ke spuštění procesu apoptózy.

ADCC je dominantní aktivita protilátek v boji proti nádorově transformovaným buňkám.<sup>24</sup>

### *Lytická cesta závislá na vápenatých iontech*

V cytoplazmě NK buněk se nachází velké množství cytotoxických granulí (specializovaných lyzozomů), které obsahují protein zvaný perforin a proteázy nazývané granzymy. Poté, co NK buňka rozezná pomocí specializovaných povrchových receptorů poškozenou nebo jinak změněnou buňku, putují tyto cytotoxické granule k plazmatické membráně, fúzí s ní a jejich obsah se vylije do úzké štěrbině mezi oběma buňkami (tzv. degranulace). Póry vytvořené perforinem v cytoplazmatické membráně (perforin je strukturně podobný C9 komplementovému proteinu)<sup>1</sup> vstupují do nitra buňky granzymy. Ty následně v cytoplazmě štěpí prekurzory proteas ze skupiny kaspas, které se tím aktivují. Kaspasy působí na další proteiny v cytoplazmě, což vede ke spuštění celé řady reakcí vedoucí k apoptotické smrti zasažené buňky.<sup>25</sup>

Proč granzymy působí jen na cílovou buňku a nepoškodí buňky které ho sekretují, není dosud zcela jasné. Jedno z možných vysvětlení je, že granzymy se vylučují jako celek a poté fúzí s membránou cílové buňky aniž by poškodily buňku efektorovou.

### ***Fas-Fas ligandová cesta (Fas-FasL)***

Na povrchu NK buněk se nachází protein zvaný Fas ligand (FasL). Tento protein patří do skupiny TNF (Tumor Necrosis Factor) povrchových molekul. FasL se váže na apoptotický receptor Fas (CD95),<sup>26</sup> který je přítomný na povrchu mnoha různých buněk. Vazbou na tento receptor se aktivují kaskády reakcí vedoucí k apoptotické smrti buňky. Na povrchu NK buněk se exprimují celkem tři zástupci apoptotických receptorů-TRAIL ligand, TNF a již zmíněný FasL. Na povrchu NK buněk se také nachází apoptotický receptor Fas, což umožňuje důležitou zpětnou regulaci NK buněk.<sup>27</sup> Některé nádorově změněné buňky však toho faktu využívají ve snaze vyhnout se útoku ze strany imunitního systému, tím že na svém povrchu exprimují FasL a tím indukují apoptózu u cytotoxických buněk.

## **I.3 Molekula CD69**

Tato molekula byla poprvé identifikována v roce 1986,<sup>28</sup> roku 1993 klonována a definována jako receptor strukturně patřící do lektinové rodiny C-typu (obsahuje CRD



**Obr. 4: Pohled na obě podjednotky receptoru CD69, který tvoří nekovalentní dimer.**

doménu s vazebnou schopností závislou na vápníku). Molekula CD69 je povrchový leukocytární receptor. Patří mezi glykoproteiny II. třídy. V současné době je znám myší (mCD69), potkaní (rCD69) a lidský (hCD69) homolog. Jeho přítomnost byla zjištěna nejen na NK buňkách, ale i na povrchu T-lymfocytů a jiných buněk

hematopoetické řady (thymocyty, monocyty, neutrofilní granulocyty).<sup>29,30,31</sup> Někdy bývá označován jako ranně aktivační antigen neboť jeho exprese je indukována velmi brzo po aktivaci buněk (24-48 hodin).<sup>32</sup>

Na buněčném povrchu je molekula CD69 exprimována v podobě disulfidicky spojeného homodimeru o velikosti 28kDa až 32kDa (obr.4). Rozdílnost v molekulové hmotnosti je dán rozdílným stupněm glykosylace na N-konci extracelulární části molekuly.

Gen pro molekuly CD69 je lokalizován v NK genovém komplexu u člověka na 12. u myši na 6. a u potkanů na 4. chromosomu.<sup>33</sup> Intracelulární část obsahuje fosforylované serinové zbytky spojené s G-proteiny.

### I.3.1 Struktura molekuly CD69

Polypeptidový řetězec lidské molekuly CD69 (kterým se zabývá tato práce) který má délku 199 aminokyselin (AMK) se skládá z intracelulární části o délce 40 AMK zbytky, transmembránové části s 21 AMK zbytky a extracelulární části složené z krčku o velikosti 21 AMK a globulární C-lektinové části o velikosti 117 AMK zbytků.<sup>34</sup> V této doméně jsou obsaženy dvě  $\alpha$ -helikální struktury ( $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ ) a dvě antiparalelní struktury  $\beta$ -skládaného listu ( $\beta 0, \beta 1, \beta 2, \beta 2', \beta 3, \beta 4, \beta 5$ ). Tato strukturální charakteristika je podobná i u ostatních lektinů C-typu.<sup>35</sup>

Řetězce jsou v extracelulární části propojeny třemi disulfidickými můstky. Můstky mezi Cys113-Cys194 a Cys173-Cys186 jsou typické pro klasické lektiny C-typu. Třetí disulfidický můstek je mezi Cys82-Cys96 (obr.5). Molekula CD69 obsahuje ještě jednu molekulu cysteinu na pozici 68. Tento cystein slouží k intermolekulárnímu propojení s další molekulou CD69. Jednotlivé strukturální části jsou mezi sebou propojeny čtyřmi smyčkami lokalizovanými mezi aminokyselinami 148-152, 158-162, 169-171, 177-180. Tyto smyčky obsahují potenciální ligandová vazebná místa.<sup>3</sup>



**Obr. 5: Struktura CRD domény proteinu CD69**

Řetězec v extracelulární části je propojen třemi disulfidickými můstky (vyznačené šipkou).

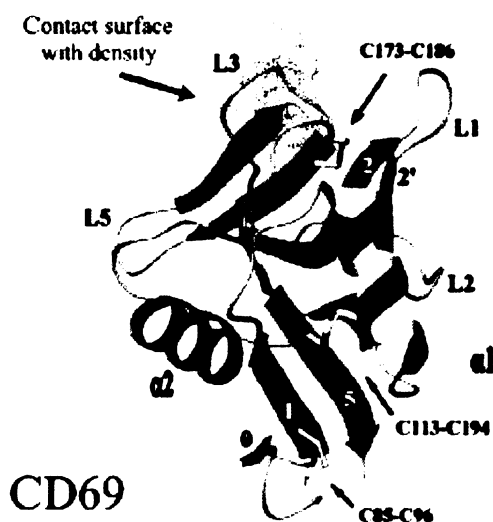
### I.3.2 Funkce molekuly CD69

Dojde-li k agregaci extracelulárních částí receptoru pomocí specifických ligandů, jsou buňky exprimující na svém povrchu molekulu CD69 aktivovány. Tyto buňky začnou proliferovat a plnit svou efektorovou funkci. Agregace receptoru CD69 na aktivovaných lymfocytech vede ke stimulaci proteinkinázy A indukující expresi genů pro IL-2, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ .<sup>37</sup> Tato agregace zároveň vyvolává mobilizaci extracelulárního vápníku, který je nezbytný při závěrečné fázi cytotoxické reakce lymfocytů. U cirkulujících monocytů a neutrofilů exprimující molekulu CD69 na svém povrchu vede agregace tohoto proteinu k uvolnění NO a degranululaci.<sup>38</sup>

Signalizační cesta vedená molekulou CD69 není dodnes dostatečně známá. Bylo však zjištěno, že vazba přes CD69 u IL-2 aktivovaných NK buněk vede k rychlé, selektivní aktivaci PTK skupiny Syk. Při aktivaci PTK skupiny Syk jsou dále potřeba PTK ze skupiny Src (kináza Lck). Obě tyto skupiny PTK jsou nezbytné k vyvolání cytotoxické aktivity NK buněk.

### I.3.3 Specifické ligandy molekuly CD69

Po objasnění aminokyselinové sekvence receptoru CD69, bylo zjištěno, že tento protein není klasickou molekulou patřící do rodiny C-lektinového typu, neboť téměř postrádá



**Obr. 6: Přepokládaná oblast vazby sacharidových ligandů na monomer CD69**

konzervované aminokyseliny potřebné pro vazbu vápníku a sacharidů (obr.6). Tato vazebná doména bývá označována jako doména podobná lektinům C-typu, CTLD (C-type lectine-like domain).<sup>5, 39</sup> U molekuly CD69 se buď jedná o nový typ vazebné domény nebo molekula rozpoznává jiné než sacharidové ligandy.

Do dnešní doby byla navržena celá řada potenciálních ligandů pro molekulu CD69, které lze rozdělit do třech skupin.

**Vápník.** Po rozřešení aminokyselinové sekvence molekuly CD69, vazba  $\text{Ca}^{2+}$  nebyla očekávána. Avšak na základě experimentů provedených v laboratoři doc. Bezoušky byla zjištěna u rekombinantně připravené CTLD lidské molekuly CD69 vazba vápníku i různých sacharidových ligandů.<sup>47</sup> Jako nejlepší

monosacharidový ligand se ukázal N-acetylglukosamin a N-acetylgalaktosamin. Vazba těchto monosacharidů byla významně ovlivněna přítomností  $\text{Ca}^{2+}$ . Vápník bylo možné z molekuly odstranit pouze vysokými koncentracemi chelatačního činidla nebo nízkou hodnotou pH. Při odstranění molekuly  $\text{Ca}^{2+}$  významně poklesla schopnost vazby sacharidových ligandů. Po opětovném přidání vápníku se vysokoafinitní vazba opět obnovila.<sup>40</sup>

Výsledky poslední studie potvrdily jedno vazebné místo pro  $\text{Ca}^{2+}$  na monomer s  $K_d \sim 54 \mu\text{M}$  tvořené Asp171, Glu185 a Glu187.

**Sacharidy.** Do dnešní doby byla identifikována celá řada nízko i vysokoafinitních ligandů pro molekulu CD69. Mezi nejvýznamnější patří především N-acetylované hexosaminy a struktury nesoucí záporný náboj. Z monosacharidových hexosaminů byla zjištěna vazba GlcNAc a GalNAc s  $K_d \sim 64 \mu\text{M}$ .<sup>41</sup> U GalNAc byly nalezeny dvě vazebná místa a pro GlcNAc tři vazebná místa. Obě tyto místa jsou umístěna pravděpodobně umístěna v blízkosti vazebného místa pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Pracovní skupina doc. Bezoušky zjistila velmi silnou vazbu větvených ligandů ovomukoidu s koncovými GlcNAc na CD69.<sup>47</sup> Na základě těchto výsledků byly navrženy a následně připraveny ligandy ve formě glykodendrimerů na bázi polylysinů či polyamidoaminů s různým počtem koncových monosacharidových struktur.

**Látky proteinové povahy.** V posledních letech byl zahájen výzkum možných proteinových ligandů molekuly CD69. Bylo zjištěno, že molekula CD69 specificky váže některé proteiny tepelného šoku, například hsp60. Dále byla zjištěna specifická vazba některých proteinů ze skupiny S-galektinů.<sup>42</sup>

V poslední řadě je nutné poznamenat, že fyziologický ligand receptoru CD69 není dosud znám.

## I.4 Molekula NKR-P1

Protein NKR-P1 byl poprvé charakterizován v roce 1989 jako receptor potkaních NK buněk.<sup>43</sup> Nalézáme je též na monocytech a dendritických buňkách.<sup>44</sup> Později byl také objeven na specifické subpopulaci  $T_c$ -lymfocytů, nyní nazvaných NKT buňky.<sup>45</sup> Tyto NKT buňky se vyskytují zejména v játrech a epiteliích. Protein NKR-P1 byl dále nalezen na myších a lidských NK buňkách. Na povrchu lidských NK buněk byla zatím nalezena pouze jedna izoforma NKR-P1A (mající asi 46 % homologie s potkaní NKR-P1A), na



potkaních NK buňkách byly nalezeny izoformy NKR-P1A, B, C a na myších NK buňkách NKR-P1A, B, C, D, E, F.

### **I.4.1 Struktura a funkce molekuly NKR-P1**

Molekula rNKR-P1A patří mezi glykoproteiny II. třídy, je disulfidicky spojený homodimer o relativní hmotnosti přibližně 60 000.<sup>46</sup> Je 223 aminokyselin dlouhá, skládá se z intracelulární části dlouhé přibližně 50 aminokyselinových zbytků, transmembránové části o délce 40 AMK, krčku 30 AMK a extracelulární části o velikosti přibližně sto AMK.<sup>47</sup>

Dále byla molekulárním modelováním a přímými vazebnými experimenty s radioaktivně značenými oligosacharidovými ligandy receptoru NKR-P1 byla odhalena existence vazebné drážky, která se rozprostírá přes celou vazebnou doménu.<sup>47</sup> Vazebná drážka je pokryta několika aminokyselinami které se přímo účastní vazby sacharidů. Bylo zjištěno, že i malá změna aminokyselin umístěných přímo ve vazebné rýze může mít za následek opačnou funkci receptoru. Tak je tomu například u dvou různých izoform receptoru NKR-P1A, B. Tyto dvě izoformy receptoru NKR-P1 mají 97 procent identických aminokyselin, ale opačnou funkci.<sup>47</sup>

Intracelulární část obsahuje Cys-X-Cys-Pro aminokyselinový motiv. Tento motiv zajišťuje asociaci s protein tyrosin-kinasy skupin Src.<sup>48</sup> Při navázání ligandu na molekulu NKR-PA dojde k aktivaci těchto kinas, následné zvýšení hladiny intracelulárního vápníku, produkci TNF- $\alpha$  a k degranulaci lytických granulí NK buňky.

Bylo pozorováno, že mutantní linie NK buněk, která neexprimuje na svém povrchu NKR-P1A nemá schopnost zabíjet některé nádorově transformované buňky. Poté co byla u těchto buněk exprese tohoto proteinu opět obnovena, buňky opět získaly schopnost zabíjet nádorové buňky.<sup>49, 50</sup> To ukazuje na velkou důležitost tohoto receptoru při obraně proti nádorovým buňkám.

Potkaní NKR-P1B je daleko méně prozkoumaný než NKR-P1A. Ve své cytoplazmatické části obsahuje ITIM motiv, který je asociován s SHP-1 protein tyrosin kinasou, tato kinasa inhibuje přenos aktivačního signálu.<sup>51</sup> NKR-P1B je tudíž inhibiční receptor NK buněk.<sup>52</sup>

Trojrozměrná struktura obou izoform NKR-P1 nebyla dosud rozřešena.

## I.4.2 Specifické ligandy molekuly NKR-P1

Molekula NKR-P1 patří rodiny receptorů C-lektinového typu tzn. jeho vazebná aktivita je výrazně závislá na vápníku. Bylo objeveno, že potkaní NKR-P1A skutečně váže  $\text{Ca}^{2+}$  a v jeho přítomnosti i některé sacharidy.

Vazba  $\text{Ca}^{2+}$  se však na rozdíl od ostatních lektinů vyznačovala neobyčejnou pevností. V počátečních monosacharidových vazebných testech s NKR-P1A a NKR-P1B nebyla zjištěna rozdílnost ve vazbě monosaharidových ligandů. Bylo zjištěno pořadí inhibiční síly od ManNAc přes GalNAc, GlcNAc, Fuc, Man, Gal v tomto případě má ManNAc nejvyšší inhibiční aktivitu, Gal nejnižší.<sup>47</sup> Zatím co hexosaminy získané de-N-acetylací těchto monosacharidů byly velmi chudými ligandy, hydrofobní aglykon významně zvýšil vazbu zvláště v případě beta-O-glykosidického spojení. Afinity některých hexosaminových oligosacharidů se významně zvýšili v porovnání s monosacharidy. Maximální afinity bylo dosaženo na úrovni chitotetraosy.<sup>53</sup>

Dále byly jako vysoko-afinitní ligandy pro receptor NKR-P1 identifikovány monosacharidy a lineární oligosacharidové struktury. Tyto ligandy obsahují oligosacharidové sekvence rodiny krevních skupin, gangliové rodiny a glykosaminoglykanů.<sup>54</sup> Kromě toho byla také prokázána interakce s povrchovými oligosacharidy na nádorově transformovaných buňkách. Tyto interakce jsou rozhodující pro rozpoznání nádorových buněk a aktivaci přirozené zabíječské buňky.

Z důvodů limitované dostupnosti, nízké stability a vysoké ceny oligosacharidových derivátů, se začalo s experimenty s novou generací vysoko afinitních oligosacharidových ligandů pro NKR-P1. Tyto syntetické ligandy jsou založeny na polyamidoaminové nebo polylysinové kostře.<sup>55, 56</sup> V počátečním testování těchto sacharidy pokrytými dendrimery se ukázalo, že jsou velmi účinnými ligandy pro receptor NKR-P1 in vitro. A dále byla prokázána jejich protinádorová aktivita.

## **II. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

- Připravit proteiny hCD69 pro experimenty v laboratoři a pro experimenty pomocí NMR spektroskopie
- Připravit zkrácené formy proteinu hCD69
- Připravit protein rNKR-P1A, B pro vazebné experimenty a experimenty v laboratoři
- Provést vazebné studie proteinů hCD69, NKR-P1A, B, D, C a hNKR-P1 s využitím několika různých experimentálních technik

# III. PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

## III.1 Přístroje

- Analytické váhy A&D, USA
- Automatické pipety Gilson, USA
- Centrifuga J-6M Beckman, USA
- Centrifuga J2-2I Beckman, USA
- Centrifuga MPW-365 Mechanika Precyzyjna, Polsko
- Centrifuga Z 382 K Hermle, Německo
- Centrifuga stolní, Spectrofuge 16M Edison, USA
- Čtečka destiček – SAFIRE TECAN, Rakousko
- Dialyzační trubice ( $M_r$  “cut off” 10000) Sigma, USA
- Filtry PVDF 0,22 $\mu$ m Millipore, USA
- HPLC systém BioSys 510 Beckman, USA
- Chladnička Zanussi, Itálie
- Chladnička Skandiluxe, Dánsko
- Koncentrátory Centriprep, Centricon, Microcon Amicon, USA
- Kolona Superdex 75 HR 10/30 Pharmacia, USA
- Kolona Superdex 200 HR 10/30 Pharmacia, USA
- Kolona Vydac-C4 Dionex, USA
- Magnetická míchačka MM 2A Laboratorní přístroje Praha, ČR
- Mrazicí box (-80 °C) Ultra Low Revco, USA
- Mrazicí box (-20 °C) Zanussi, Itálie
- pH metr  $\Phi$ 200 Beckman, USA
- Předvážky HF1200G A&D, USA
- Souprava pro elektroforézu Sigma, USA
- Souprava pro ultrafiltraci Sigma, USA
- Spektrofotometr SPEKTROMOM195D MOM, Maďarsko
- Třepačka Bigger Bill Thermolyne, USA
- Třepačka na Erlenmayerovy baňky Gallenkamp Ltd., UK
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 Cole-Parmer Instrumen, USA

- Vakuová odparka Speedvac
- Ultrazvuková lázeň
- Vortexový mixér
- Zdroj deionizované vody MilliQ
- Zdroj napětí EPS 500/400

*Jouan, Francie*  
*KRAINTEK, Slovensko*  
*VELP Scientifica, Itálie*  
*Millipore, USA*  
*Pharmacia, USA*

## III.2 CHEMIKÁLIE

- Acetonitril
- Agar
- Akrylamid
- APS
- L-Arginin hydrochlorid
- Azid sodný
- Bacto-tryptone
- Bacto-yeast extract
- Bis-Tris
- Bromfenolová modř
- BSA
- Coomassie Brilliant Blue R-250
- Cystamin
- Cysteamin
- Činidlo pro stanovení dle Bradfordové
- Dihydrogenfosforečnan draselný
- DTT
- EDTA
- GalNAc
- Ethanol
- Glukosa
- GlcNAc
- Glycerol
- Glycin
- Guanidin hydrochlorid
- HEPES

*Merck, Německo*  
*Oxoid, USA*  
*Sigma, USA*  
*Sigma, USA*  
*Sigma, USA*  
*Sigma, USA*  
*Oxoid, USA*  
*Oxoid, USA*  
*Sigma, USA*  
*Sigma, USA*  
*Sigma, USA*  
*Serva, USA*  
*Sigma, USA*  
*Sigma, USA*  
*Bio-Rad, Německo*  
*Lachema, ČR*  
*Fluka, Švýcarsko*  
*Fluka, Švýcarsko*  
*Lachema, ČR*  
*Lachema, ČR*  
*Lachema, ČR*  
*Lachema, ČR*  
*Sigma, USA*  
*Fluka, Švýcarsko*  
*Jersey Lab Supply, USA*  
*Serva, Německo*

• Hydrogenfosforečnan sodný	<i>Lachema, ČR</i>
• Hydroxid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
• Chloramfenikol	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Chlorid amonný	<i>Lachema, ČR</i>
• Chlorid draselný	<i>Lachema, ČR</i>
• Chlorid hořečnatý	<i>Lachema, ČR</i>
• Chlorid sodný	<i>Lachema, ČR</i>
• Chlorid vápenatý	<i>Sigma, USA</i>
• IPTG	<i>Sigma, USA</i>
• Kyselina chlorovodíková	<i>Lachema, ČR</i>
• Kyselina octová	<i>Lachema, ČR</i>
• Kyselina trifluoroctová	<i>Lachema, ČR</i>
• β-merkptoethanol	<i>Sigma, USA</i>
• Methanol	<i>Lachema, ČR</i>
• NHS-rhodamin	<i>Pierce, USA</i>
• N,N'-methylen-bis-akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
• PEG	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
• PIPES	<i>Sigma, USA</i>
• PMSF	<i>Sigma, USA</i>
• SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• S Sepharosa FF	<i>Amersham, UK</i>
• Síran hořečnatý	<i>Lachema, ČR</i>
• Standard pro IEF	<i>Serva, USA</i>
• Standard pro SDS-PAGE	<i>Serva, USA</i>
• Scintilacní roztok	<i>Amersham Bioscience, USA</i>
• TEMED	<i>Serva, USA</i>
• TFA	<i>Serva, USA</i>
• Thiamin hydrochlorid	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
• Tricin	<i>Serva, USA</i>
• Tris	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>

### III.3 PUFRY A ROZTOKY

- **Sacharosový lyzační pufr:** 25 % sacharosa, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, pH = 8,0
- **TES:** 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH = 8,0
- **TBS pufr:** 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,4
- **PBS pufr:** 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4
- **Pufr s detergentem:** 0,5 % N-octyl-β-D-glukopyranosid, 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM β-merkapt ethanol, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, pH = 8,0
- **Promývací pufr:** 0,5 M guanidine.HCl, 50 mM Tris, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, pH = 8,0
- **Guanidinový pufr:** 7 M guanidin-HCl, 100 mM Tris, pH = 8,0
- **Renaturační pufr pro protein CD69:** 0,4 M arginin.HCl, 100 mM Tris, 9 mM cysteamin, 2 mM cystamin, 2 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, pH = 8,5
- **Renaturační pufr pro protein NKR-P1:** 50 mM Tris.HCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M arginin.HCl, 3 mM cystamin, 9 mM cysteamin, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM PMSF, 1 µM leupeptin, 1 µM pepstatin, pH = 8,5
- **TE pufr:** 10 mM tris, 0,5 mM EDTA
- **TeA pufr:** 50 mM Tetraethylamin, 150 Mm NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>
- **Pufr pro 1. dialýzu:** 0,5 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,5
- **Pufr pro 2. dialýzu:** 50 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,5
- **Pufr pro gelovou chromatografii proteinu CD69:** 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 7,5
- **Pufr pro gelovou chromatografii proteinu NKR-P1:** 10 mM PIPES, 50 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 6,8
- **Pufr A pro ionexovou chromatografii proteinu CD69:** 20 mM Tris.HCl, 15 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 9,2
- **Pufr B pro ionexovou chromatografii proteinu CD69:** 20 mM Tris.HCl, 1 M NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 9,2
- **Pufr A pro ionexovou chromatografii proteinu NKR-P1:** 15 mM Tris. HCl, 15 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 8,5

- **Puftr B pro ionexovou chromatografii proteinu NKR-P1:** 15 mM Tris. HCl, 1 M NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 8,5
- **Mobilní fáze A pro RP-HPLC:** 0,1 % kys. trifluoroctová
- **Mobilní fáze B pro RP-HPLC:** 95 % acetonitril, 5 % mobilní fáze A
- **Puftr A pro ionexovou chromatografii v močovíně:** 15 mM citrát(Na), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 8 M močovina, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 4,5
- **Puftr B pro ionexovou chromatografii v močovíně:** 15 mM citrát(Na), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH = 4,5
- **Vzorkový puftr pro SDS-PAGE redukující:** 50 mM Tris, 12 % glycerol, 4 % SDS, 0,1 % bromfenolová modř, 2 % β-merkptoethanol, pH = 6,8
- **Vzorkový puftr pro SDS-PAGE neredukující:** 50 mM Tris, 12 % glycerol, 4 % SDS, 0,1 % bromfenolová modř, pH = 6,8
- **AA:** 30 % akrylamid, 1 % N,N'-metylen-bis-akrylamid
- **Elektrodový puftr:** 10 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1 % SDS, pH = 8,0
- **Barvicí roztok pro SDS elektroforézu:** 45 % MeOH, 10 % kys. octová, 0,25 % CBB R-250
- **Fixační a odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu:** 35 % EtOH, 10 % kys. Octová
- **Vyvíjecí roztok pro barvení stříbrem:** 37 % formaldehyd, 3 % K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,001 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

### III.3.1 Média

- **LB agar:** 1,25 % agar v LB médiu
- **LB médium:** 1 % bacto-trytone, 0,5 % bacto-yeast extract, 1 % NaCl, pH = 7,4

### III.3.2 Enzymy

- DNAsa I (deoxyribonukleasa I) *Sigma, USA*
- RNAsa I (ribonukleasa I) *Sigma, USA*
- Trypsin *Promega, USA*

### III.3.3 Inhibitory

- Pepstatin *Sigma, USA*
- PMSF *Sigma, USA*



- Leupeptin

*Sigma*, USA

### III.3.4 Vektory

- pRSET B

*Invitrogen*, USA

### III.3.5 Bakteriální kmeny

- Epicurian Coli<sup>®</sup> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL: *E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>)  
*dcm*<sup>+</sup> *Tet*<sup>r</sup> *gal* l (DE3) *endA* Hte

*Stratagene*, USA

### III.3.6 Marker pro SDS PAGE

- BSA 66 kDa, ovalalbumin 44 kDa, tripsinogen 24 kDa, lysosym 14 kDa

## **IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **IV.1 METODY PŘI PRÁCI S BAKTERIÁLNÍMI KULTURAMI**

#### **IV.1.1 Transformace kompetentních buněk**

Expresní vektor byl transformován do kompetentních buněk bakteriálního kmene *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3).

Kompetentní buňky uchovávané při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  byly pomalu nechány roztát na ledu. Následně byl přidán plazmid ( $0,3\text{ }\mu\text{g} / 100\text{ }\mu\text{l}$  buněk) a směs byla nechána inkubovat 20 minut na ledu. Poté byly bakterie vystaveny působení teploty  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve vodní lázni po dobu 45 sekund. A ihned uloženy na led. Po jedné minutě inkubace na ledu bylo přidáno 1 ml LB média bez antibiotik a směs byla nechána inkubovat 1 hodinu při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Buňky byly odstředěny 2 min  $2500\text{ g}$ ,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pelet byl resuspendován v  $50\text{ }\mu\text{l}$  LB média bez antibiotik a rozetřen vyžíhanou skleněnou tyčinkou na Petriho misku s tuhým agarovým LB médiem s příslušnými antibiotiky (Amp  $50\text{ }\mu\text{l/ml}$ , Tet  $12,5\text{ }\mu\text{l/ml}$ ). Na misce byly bakterie ponechány přibližně 24 hod při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , do vytvoření viditelných kolonií. Pro další použití byly misky skladovány při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **IV.1.2 Optimalizace produkce a selekce produkčního klonu**

Pro získání proteinů v maximálním možném množství je nutné optimalizovat podmínky produkce. Parametry které byly sledovány při optimalizaci jsou doba kultivace a koncentrace IPTG (induktor).

Po transformaci bakteriálního kmene bylo vybranými koloniemi zaočkováno 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky. Suspenze byly nechány inkubovat za intenzivního třepání ( $240\text{ ot/min}$ ), při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  přes noc. Z každé kultury bylo setinovým objemem zaočkováno po 4x 1 ml LB média s antibiotiky. Suspenze byly nechány inkubovat ( $240\text{ ot/min}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), inkubace probíhala do doby než optická denzita suspenze dosáhla hodnoty přibližně 0,6 (měřeno jako absorbance buněčné suspenze při  $550\text{ nm}$ ). Poté byl do první zkumavky přidán IPTG do výsledné koncentrace  $0,1\text{ mM}$ , do druhé zkumavky do koncentrace  $0,5\text{ mM}$  a třetí do  $1\text{ mM}$ . Poslední zkumavka byla ponechána bez IPTG jako negativní kontrola. Dále

byly všechny zkumavky inkubovány (240 ot/min, 37 °C). Po 2; 3,5; 5; 6 hodinách bylo z každé zkumavky odebráno 100 µl suspenze.

Suspenze byly centrifugovány (16000 g, 2 min, 20 °C), supernatant odstraněn a pelet resuspendován v 150 µl redukujícího vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. K analýze na 15 % polyakrylamidového gelu bylo použito 10 µl vzorku.

Touto analýzou byly zjištěny optimální podmínky produkce a zároveň vybrán nejlepší produkční klon. Tento postup byl proveden jen při produkci proteinu rNKR-P1. Optimální podmínky produkce proteinu CD69 byly zjištěny Mgr. Ondřejem Vaňkem.<sup>2</sup>

### **IV.1.3 Velkoobjemová produkce**

Tisícinou objemu bakteriální suspenze vybraného produkčního klonu bylo zaočkováno 4 x 500 ml LB média s příslušnými antibiotiky. Bakteriální kultury byly inkubovány za podmínek zjištěných při optimalizaci produkce.

Získaná bakteriální kultura byla odstředěna 40 min při 2500 g, 4 °C. Pelety byly resuspendovány ve 20 ml TES pufru a centrifugovány (900 g, 20 min, 4 °C). Supernatanty byly opět odstraněny a pelety byly pro další použití uchovány při -20 °C.

## **IV.2 METODY PŘI PRÁCI S PROTEINY**

### **IV.2.1 Izolace inkluzních tělísek**

K rozmraženému peletu bylo přidáno 20 ml sacharosového lyzačního roztoku ( na pelet z 500 ml bakteriální suspenze) s přidavkem inhibitorů proteáz (10 µM leupetin, 10 µM pepstatin, 1 mM PMSF). Směs byla deset minut sonikována sonikační sondou na ledu, poté byla zmrazena při -80 °C. Po třiceti minutách byla směs rozmrazena ve vodní lázni a opět deset minut sonikována. Tento proces byl proveden celkem čtyřikrát. Do každé kyvety bylo přidáno 400 µl 1M MgCl<sub>2</sub>, 2 µl DNAázy (10 mg/ml) a 5 µl RNAázy (10 mg/ml). Směs byla nechána inkubovat 30 min při laboratorní teplotě. Dále byla směs sonikována 15 minut na ledu. Po sonikaci byla směs centrifugována (12 000 g, 15 min, 4 °C). Ze supernatantu i peletu byly odebrány vzorky na analýzu pomocí SDS PAGE.

Pelet byl resuspendován v 15 ml pufru s detergentem. Byly přidány inhibitory proteáz o příslušné koncentraci viz. výše. Směs byla patnáct minut sonikována na ledu. Poté byla

centrifugována (12 000 g, 15 min, 4 °C). Pelet byl resuspendován ve 20 ml pufru bez detergentu s příslušnými inhibitory proteáz. Směs byla opět patnáct minut sonikována na ledu a poté centrifugována (12 000 g, 20 min, 4 °C). Pro důkladné odstranění detergentu ze směsi byl poslední krok opakován dvakrát. Pro další použití byl pelet, obsahující převážně agregovanou formu rekombinantního proteinu, zmražen při -20 °C.

## **IV.2.2 Solubizace inkluzních tělísek**

Prvním krokem renaturace vyprodukovaného proteinu ve formě inkluzních tělísek je jeho solubilizace. Solubilizace se provádí nejčastěji pomocí denaturačních činidel (močovina, guanidin-HCl) nebo detergenty.

Inkluzní tělíška byly rozpuštěny v 6 M guanidin-HCl pufru s 100 mM DTT (6 ml na pelet z 500 ml bakteriální kultury) resuspendovaná pomocí vortexu, pipety a sonikační sondy. Směs byla nechána inkubovat 1 hodinu při teplotě 37 °C. Poté byla suspenze centrifugována (12 000 g, 20 min, 4 °C), supernatant obsahující rozpuštěný protein byl renaturován metodou rychlého naředění. Pelet byl uschován při 4 °C pro další solubilizaci

## **IV.2.3 Renaturace proteinu**

Po solubilizaci proteinu následuje vlastní renaturace rekombinantního proteinu metodou rychlého naředění. Tento proces převede protein do nedenaturovaného stavu.

Optimalizaci složení renaturačního pufru pro rekombinantní protein CD69 provedl již Mgr. Ondřej Vaněk.<sup>2</sup>

Pro rekombinantní protein NKR-P1 byla optimalizace provedena Prof. RNDr. Karlem Bezouškou, CSc.

Protein rozpuštěný při solubilizaci byl přikapáván do patřičného renaturačního pufru za stálého míchání rychlostí 1 kapka za 2 sekundy. Následně byl renaturační pufr nechán inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě za stálého míchání. Při renaturaci rekombinantního proteinu CD69 se objevil bílý zákal, který byl po inkubaci odstředěn (12000 g, 20 min, 4 °C). Při renaturaci proteinu rNKR-P1 zákal nebyl pozorován, tudíž nebyla nutná centrifugace renaturačního pufru s nakapaným proteinem

## IV.2.4 Dialýza

Dialyzační trubice byly připraveny následujícím postupem: dialyzační trubice o délce 50cm, byly povařeny 10 minut v 500 ml roztoku (2 % NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA). Následně promyty destilovanou vodou a povařeny v TE pufru. Tyto připravené dialyzační trubice byly uchovány v TE pufru při 4 °C.

U proteinu CD69 byl supernatant po centrifugaci převeden do dialyzačních trubic a nechán dialyzovat při 4 °C, 6 hodin za stálého míchání proti dialyzačnímu pufru 1. Poté byly dialyzační trubice s roztokem převedeny do dialyzačního pufru 2, kde byly nechány dialyzovat přes noc za stálého míchání při 4 °C. Dialyzační roztoky byly shodné pro oba proteiny používané v rámci této práce.

## IV.2.5 Metody sloužící k zakoncentrování proteinu

K zakoncentrování zředěných roztoků proteinů byly použity koncentrátoři Centriprep a Centricon s membránou propustnou pro molekuly  $M_r < 10000$ . Před prvním použitím byly koncentrátoři promyty destilovanou vodou a poté stejným pufrům ve kterém se nachází protein. Koncentrátoři byly uchovávány v destilované vodě obsahující 1mM NaN<sub>3</sub>. Koncentrátoři Centricon mohou být vystavovány maximální odstředivé síle 5000 g, Centriprep 3000 g.

Pro větší objemy zředěných roztoků proteinu byly použity soupravy pro ultrafiltraci s vloženou membránou propustnou opět pro molekuly  $M_r < 10000$ . Zde bylo místo odstředivé síly použito tlaku plynu.

## IV.2.6 Stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové

Pro stanovení koncentrace proteinu byla použita technika dle Bradfordové.<sup>57</sup> Stanovení bylo prováděno na mikrotitračních destičkách, do jamky byl o napipetováno 5  $\mu$ l vzorku a k němu bylo přidáno 200  $\mu$ l činidla. Směs byla nechána inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Pro vyloučení nepřesnosti pipetování byla stanovení prováděna triplicitně. Stejným způsobem byl připraven slepý vzorek, kde místo vzorku bylo napipetováno 5  $\mu$ l vody.

Kalibrační přímka byla připravena pomocí roztoků BSA o známe koncentraci v rozsahu 0,05 – 0,5 mg/ml. Koncentrace proteinu byla stanovena spektrofotometricky, měřením při vlnové délce 595 nm. Následně byly hodnoty odečteny z kalibrační přímky.

## **IV.2.7 Proteinová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS**

Tato metoda je velmi často používána při analýze proteinů různé velikosti. Při SDS elektroforéze je využito dvou druhů gelů. Horní gel tzv. „zaostřovací“ má nižší pH (pH = 6,8) a slouží k zaostření vzorku. Dolní gel tzv. „rozlišovací“ s vyšším pH (pH = 8,8), slouží k samotné separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Koncentrace dolního rozlišovacího gelu se volí podle očekávané velikosti analyzovaných proteinů.

V této práci bylo použito 5 % zaostřovacího gelu a 15 % rozlišovacího gelu. Gely byly připraveny jak je popsáno v literatuře.<sup>58</sup>

Pevné vzorky na SDS elektroforézu byly připraveny resuspendováním v redukujícím pufru pro elektroforézu, kapalné vzorky byly naředěny v poměru 1:1 stejným puftrem. Následně byly vzorky pět minut povařeny a centrifugovány (14000 g, 5 min, 20 °C). Poté byly vzorky nanесeny do jamek zaostřovacího gelu.

Elektroforéza probíhala při konstantním proudu 20-25 mA najeden gel a 16-26 V na 1cm gelu.

## **IV.2.8 Barvení polyakrylamidových gelů**

### ***Barvení Coomasie Brilliant Blue R-250***

Polyakrylamidové gely byly po ukončení SDS elektroforézy ponechány ve fixačním roztoku na 10-15 minut. Následně byly gely ponořeny na 20 minut do barvicího roztoku, který obsahuje Coomasie Brilliant Blue R-250. Poté byly gely ponořeny do odbarvovacího roztoku až do vymizení modrého pozadí. Gely byly uchovány v 1 % kyselině octové.

### ***Barvení stříbrem***

Po ukončení elektroforézy byly gely fixovány 3x30 min ve fixačním roztoku, následně oplachovány 20 min v 20 % EtOH a omyty 3x20 ml destilované vody. Následovala jedno minutová senzitivace v 0,02% roztoku Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Gel byl opět propláchnut 3x20 ml destilované vody a inkubován 30 min v roztoku 0,2 % AgNO<sub>3</sub>. Poté byl gel inkubován ve

vyvíjecím roztoku pro barvení stříbrem do zviditelnění separovaných proteinů. Gely byly opět uchovány v 1 % AcOH.

## **IV.3 CHROMATOGRAFICKÉ METODY**

### **IV.3.1 Ionexová chromatografie**

HPLC systém byl postupně promyt 1 M NaOH, 1 M AcOH a H<sub>2</sub>O následně byla připojena kolona Q-sepharosy, nastaven průtok mobilní fáze na 1 ml/min. Kolona byla promyta 1 M NaOH a AcOH a H<sub>2</sub>O. Poté byla kolona promyta pufrům B pro ionexovou chromatografii, do ustálení konduktivity a následně pufrům A pro ionexovou chromatografii do ustálení konduktivity. Oba pufrů byly před použitím přefiltrovány přes PDVF membránu 0,22 μm.

Vzorek byl nanesen rychlostí 1 ml/min. Po nanesení vzorku byly kolona promyta pufrům A pro ionexovou chromatografii a následně spuštěn lineární gradient do 50 % pufru B pro ionexovou chromatografii za 30 min. Složení pufrů pro ionexovou chromatografii proteinů CD69 a NKR-P1 bylo odlišné viz. seznam chemikálií. Po vyelování vzorku byla kolona promyta 1 M NaOH, 1 M AcOH a H<sub>2</sub>O a uchována v 20 % EtOH. Nachytané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Detekce proteinů byla prováděna spektrofotometricky, měřením absorbance při 280 nm. Průtok mobilní fáze byl sledován vodivostním detektorem.

### **IV.3.2 Chromatografie na obrácené fázi**

HPLC systém byl promyt postupně vodou, 1 M NaOH, 1 M kys. octovou, vodou, mobilní fází B pro RP-HPLC, mobilní fází A pro RP-HPLC a byla připojena kolona Vydac-C4 a průtok nastaven na 2 ml/min. Poté byla kolona promyta 1 min při 100 % A, za 1 min do 30 % B, za 10 min do 50 % B, za 1 min do 100 % B, 1 min při 100 % B, za 1 min do 100 % A, 5 min při 100 % A a tento cyklus byl opakován celkem 3x. Vzorek pro reverzní chromatografii byl před použitím okyselen pomocí TFA na pH = 2.

Po nastříknutí vzorku byla kolona promyta pufrům A pro RP-HPLC a následně byl spuštěn lineární gradient do 50 % pufru B pro RP-HPLC za 30 min. Po ustálení byl spuštěn

gradient do 100 % B za deset min. Kolona byla zakonzervována v mobilní fázi B. Detekce proteinů byla prováděna spektrofotometricky, měřením absorbance při 280 nm.

Z nachytaných frakcí byl odpařen acetonitril, vzorek byl zakonzentrován a uchován při -20 °C pro další použití.

### **IV.3.3 Gelová chromatografie**

Při gelové chromatografii byla použita kolona Superdex 200. Systém byl vždy promyt vodou, 1 M NaOH, 1 M kys. octovou, vodou a příslušným pufrům pro GC. Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min a vzorek nepřekračující objem 150 µl byl nastříknut na kolonu. Jímané frakce byly podrobeny analýze pomocí SDS-PAGE. Kolona byla uchována v 20 %EtOH.

Detekce proteinů byla prováděna spektrofotometricky, měřením absorbance při 280 nm.

## **IV.4 VAZEBNÉ EXPERIMENTY**

### **IV.4.1 Naznačení proteinu CD69 fluorescenční sondou**

Pro naznačení proteinu CD69 bylo použito molekuly NHS-rhodaminu. NHS-rhodamin je velmi často používaná molekula pro fluorescenční značení proteinů, má exitační maximum při vlnové délce 544 nm a emisní maximum při 576 nm. NHS-rhodamin obsahuje N-Hydroxysuccinimidovou skupinu, která velmi účinně reaguje s amino skupinou lysinu přítomného v proteinu. Touto reakcí vzniká velmi stabilní amidová vazba. pH optimum pro tuto reakci je v rozmezí 7 – 9.

NHS-rhodamin byl rozpuštěn ve směsi DMSO : MeOH (1 : 1). Množství rozpuštěného NHS-rhodaminu bylo vypočítáno, tak aby poměr rhodamin:lysiny (přítomný v proteinu) byl 10:1, 5:1, 2:1, 1:1. Do všech zkumavek obsahujících různé množství NHS-rhodaminu bylo napipetováno příslušné množství proteinu v TeA pufru. Reakční směsi byly nechána inkubovat při laboratorní teplotě. Po jedné, dvou a třech hodinách inkubace bylo z reakčních směsí odebráno 2 x 20 µl vzorku. Prvních 20 µl vzorku bylo zbaveno nezreagovaného NHS-rhodaminu pomocí gelové chromatografie na koloně superdex 200.



Druhá část vzorku byla zbavena nezreagovaného NHS-rhodaminu pomocí dialýzy proti TeA pufru.

Následně bylo vypočítáno procento naznačení daného proteinu.<sup>59</sup> Podle vztahu (1.1).

$$\frac{A_{494}}{\epsilon' \times \text{konc.proteinu(M)}} \times \text{ředicífaktor} \times 100 \quad (1.1)$$

$\epsilon'$  = molární extinkční koeficient rhodaminu = 60 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

$A_{494}$  = absorbance značeného proteinu při 494 nm.

## IV.4.2 Inhibiční vazebné experimenty

Principem inhibičních vazebných experimentů je měření stupně inhibice vazby proteinu na GlcNAc, který je navázaný pomocí hydrofobních interakcí na mikrotitrační destičku. Různé sacharidové ligandy přidané na mikrotitrační destičku, kompetují s GlcNAc navázaným na polystyrenovou mikrotitrační destičku o vazebné místo na CRD doméne proteinu. Čím se přidané sacharidové ligandy silněji váží na CRD doménu proteinu, tím slabší je vazba GlcNAc navázaného na destičce k této doméne a tudíž tím méně proteinu zůstane přítomno k detekci na destičce. K těmto experimentům byl použit protein značený pomocí I<sup>125</sup>. Toto značení prováděl doc, K. Bezouška, CSc.

Mikrotitrační destičky byly pokryty 100  $\mu$ l GlcNAc-BSA na jamku. A nechány inkubovat přes noc při teplotě 4°C. Po inkubaci byl GlcNAc vyjmut, destičky promyty PBS a do jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 150  $\mu$ l 2 % BSA jako blokavacího činidla a ponechány inkubovat 3 hod. při 4 °C. Po inkubaci byl roztok BSA vyjmut destičky opět promyty PBS a do jamek byly nanесeny inhibitory o různé koncentraci. K inhibitorům byl přidán stejný objem radioaktivně značeného proteinu. A destičky byly nechány 2 hod. inkubovat při 4 °C. Po inkubaci byly destičky několikrát důkladně promyty PBS, nechány vysušit při 37 °C do druhého dne. Do jamek vysušených destičkám bylo přidáno 100  $\mu$ l scintilačního roztoku. A destičky byly změřeny na  $\beta$ -counteru. Procento inhibice bylo vypočítáno podle vztahu (1.2)

$$\left(1 - \frac{\text{dpm}_{\text{exp}} - \text{dpm}_{\text{poz}}}{\text{dpm}_{\text{max}} - \text{dpm}_{\text{poz}}}\right) \times 100$$

(1.2)

$\text{dpm}_{\text{exp}}$  - diverzita za sekundy naměřená u experimentálních vzorků

$\text{dpm}_{\text{poz}}$  - diverzita za sekundu pozadí

$\text{dpm}_{\text{max}}$  - maximální naměřená diverzita za sekundu

### IV.4.3 Precipitační experimenty

Do jamek mikrotitrační destičky byly přidány ligandy o různé koncentraci. K těmto ligandům byl přidán stejný objem radioaktivně značeného proteinu. Směs byla nechána inkubovat 1 hod. při teplotě 4 °C. Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 100 µl 20 % polyetylen glykolu a necháno opět inkubovat 1 hod. při 4 °C. Následně byly mikrotitrační destičky centrifugovány (2000 g, 20 min, 4 °C). Po centrifugaci byl supernatant odstraněn. Destičky byly důkladně vysušeny 37 °C přes noc. Do jamek bylo přidáno 100 µl scintilačního roztoku a destičky byly změřeny na β-counteru.

### IV.4.4 Metody přímé vazby

Redukující sacharidy použité v této studii byly přeměněny na příslušný β-D-glycosylamin použitím metody dle Linkhoshertov.<sup>62</sup> Tyto glycosaminy byly okamžitě konjugovány s BSA.<sup>63</sup> BSA-konjugáty byly analyzovány pomocí MALDI hmotnostní spektrometrie, SDS elektroforézy a kvantitativní sacharidové analýzy (Dionex systém).<sup>64</sup>

Oligosacharidové-BSA konjugáty byly nanášeny do jamek mikrotitračních destiček a inkubovány přes noc v přítomnosti 50 µl BSA neoglykoproteinu v TBS pufru při 4 °C. Následně byly destičky pětkrát promyty TBS puforem a pětkrát destilovanou vodou, vysušeny a uchovány při -20 °C pro další použití.

Vysušené destičky byly rehydratovány ve 100 µl TBS pufru na jamku přes noc při 4 °C. K rehydratovaným destičkám byla přidána směs fluorescenčně značeného proteinu NKR-P1A a rhodaminem značeném proteinu hCD69 (1 µg každého ve 100 µl TBS pufru na jamku). Destičky byly inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě, následně promyty TBS

pufrům a proměřeny na čtečce destiček podle specifických parametrů pro obě fluorescenční sondy.<sup>59</sup>

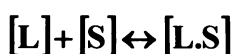
#### IV.4.5 Rovnovážná dialýza

Rovnovážná dialýza je účinný nástroj pro zkoumání interakcí mezi jednotlivými molekulami.

Při standardním provedení rovnovážné dialýzy se používají dva kompartmenty oddělené membránou propustnou pro nízkomolekulární látky, jako jsou například sacharidové ligandy receptorů NK buněk. Do prvního kompartmentu se umístí protein o známé koncentraci (v našem případě receptor NK buněk NKRP1A). Do druhého kompartmentu se umístí látka (ligand) o známé koncentraci, pro kterou je membrána umístěná mezi kompartmenty propustná. Ligand musí být označen způsobem umožňující jeho rychlé a spolehlivé stanovení.

Látka (ligand) umístěná v druhém kompartmentu difunduje skrz membránu, kde se část váže na receptor a část zůstává volná v roztoku. Difúze ligandu přes membránu a vazba na receptor probíhá až do ustanovení rovnováhy ligandu na obou stranách membrány. Po ustavení rovnováhy se změní koncentrace ligandu ve stejném objemu pufru odebraného z obou kompartmentů. A na základě rozdílu koncentrací se určí koncentrace tzv. volného a vázaného ligandu.<sup>60</sup>

Pro ideální případ interakce jediného ligandu s homogením vazebným místem, můžeme pro matematické vyjádření vyjít z rovnováhy<sup>61</sup>:



L je koncentrace vazebných míst receptoru

S je koncentrace sacharidového ligandu

(1.3)

Asociační konstantu takové rovnováhy lze vyjádřit jako:

$$K_a = \frac{[L.S]}{[S]_{\text{volný}} \times [L]_{\text{volný}}}$$

(1.4)

Jestliže označíme koncentraci volného ligandu jako  $C$  a počet molů vázaného ligandu na jeden mol proteinu jako  $r$  potom platí že:

$$r = \frac{[S]_{\text{vázaný}}}{[L]} \quad (1.5)$$

Jestliže se v molekule proteinu nachází  $n$  vazebných míst pak celková koncentrace všech vazebných center je:

$$[L] = n \times [L]_{\text{celkový}} \quad (1.6)$$

Kombinací těchto vzorců získáme vztah pro výpočet volných vazebných center

$$K = \frac{r}{\left\{ n - \frac{[S]_{\text{váz}}}{[L]} \right\} \times C}$$

$$C \text{ je koncentrace volného ligandu} \quad (1.7)$$

Tento vztah se pro usnadnění výpočtu zpravidla uvažuje ve formě navržené Scatchardem jako lineární závislost mezi  $r / C$  a  $r$

$$r / C = nK - rK \quad (1.8)$$

Scatchardův výnos má tvar přímky pouze za předpokladu jednoho typu vazebných center. Jestliže jsou vazebná centra heterogenní graf se zakřivuje.

Do dialyzačních mikrozkuvek bylo napipetováno 100  $\mu$ l zkoumaného proteinu. Každá mikrozkuvka s proteinem byla ponořena do skleněných, dvacetimililitrových lahviček s 10 ml TBS pufru. Membrána na dialyzační mikrozkuvce musí být v celém svém povrchu ve styku s TBS pufrem, který je v lahvičkách.

Následně byl do každé lahvičky obsahující TBS pufr přidán různý objem radioaktivně značeného oligosacharidu, tak aby v každé lahvičce byla jiná koncentrace značeného oligosacharidu. Směs byla důkladně promíchána a inkubována 48 hodin při 37 °C.

Po inkubaci bylo z každé dialyzační mikrozkuřavky odebráno 3 x 10 µl vzorku. Vzorky byly napipetovány do plastických měřících lahviček do které bylo předem odměřeno 2 ml scintilačního roztoku. Dále bylo odebráno 3 x 10 µl vzorku ze skleněné lahvičky ve které probíhala dialýza. Tento vzorek byl opět napipetován do plastických měřících lahviček obsahujících 2 ml scintilačního roztoku. Radioaktivita v plastických lahvičkách byla měřena na oddělení radiologie.

## V. VÝSLEDKY

### V.1 PŘÍPRAVA MOLEKULY hCD69

#### V.1.1 Produkce proteinu hCD69

Pro bakteriální rekombinantní exprese proteinu byl jako expresní vektor použit plazmid **pRSET B**. Tento plazmid obsahuje selekční marker, který uděluje transformovaným bakteriálním klonům rezistenci vůči antibiotiku ampicilinu. Tento expresní vektor navíc nevnáší do exprimované molekuly další aminokyselinové sekvence, které by bylo nutné dále odštěpit proteasou. Do tohoto vektoru byla vložena sekvence kódující protein hLMCD69, odpovídající koncovým 130 AMK z celkové sekvence lidského receptoru CD69 (obr.7). Takto připravený plazmid o koncentraci 1 µg/µl jsem obdržel od Mgr. Daniela Kavana.

**GQYTFSMPSDSHVSSCEDWVG YQRKCYFISTVKRSW TSAQNACSEHGATLAVI  
DSEKDMNFLKRYAGREEHWVGLKKEPGHPWKWSNGKEFNNWFNVTGSDKCV  
FLKNTEVSSMECEKNLYWICNKPYK**

#### **Obr. 7: Aminokyselinová sekvence proteinu hCD69**

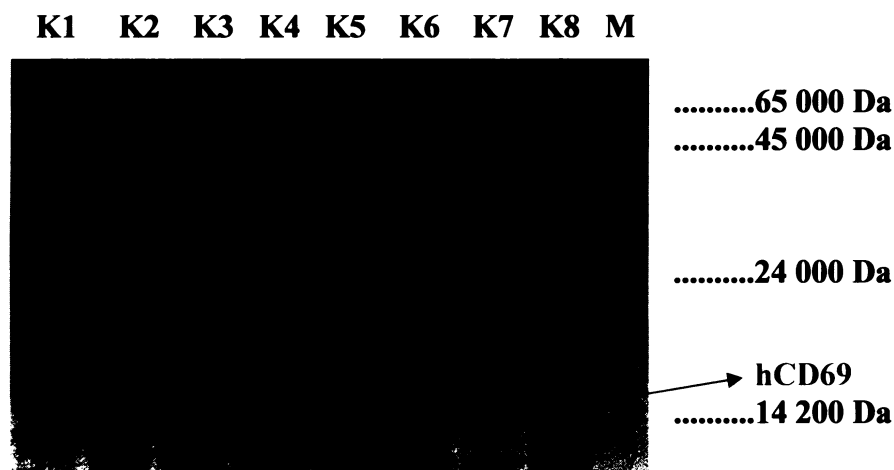
Sekvence konstruktů hCD69 obsahuje 130 AMK, žlutě jsou vyznačeny cysteiny tvořící 3 disulfidické můstky

Takto připraveným plazmidem byl transformován kompetentní bakteriální kmen *E.coli* **BL-21 (DE3) RIL**, tento bakteriální kmen nese rezistenci vůči antibiotikům tetracyklinu a chloramfenikolu. Transformace bakteriálního kmenu byla provedena metodou tepelného šoku. Bakterie byly poté vysety na misky s agarovým LB médiem obsahujícím antibiotika tetracyklin a ampicilin. Jako negativní kontrola byly na druhou misku obsahující také agarové LB médium vysety netransformované bakterie.

Na misce s transformovanými bakteriemi vyrostlo asi 200 kolonií což potvrzuje úspěšnou transformaci a dobré kompetentní schopnosti buněk. Negativní kontrola zůstala podle očekávání prázdná.

Pomocí SDS PAGE byl nalezen nejvhodnější producent za podmínek, které byly zjištěny již dříve Mgr. O. Vaňkem<sup>2</sup>. protein byl produkován bez indukce IPTG, doba kultivace byla 15 hodin.

Po vyhodnocení gelu z SDS PAGE byl pro velkoobjemovou produkci vybrán produkční klon K2 (Obr.8).



**Obr. 8: Hledání produkčního klonu analýzou SDS-PAGE**

Označení K1-K8 jsou jednotlivé kolonie, které byly vybrány pro analýzu produkce proteinu. M je marker použitý při elektroforéze (viz. seznam chemikálií). Molekula hCD69 je pruh nad proteinem o velikosti 14 200 Da.

Pro dokonalé provzdušnění byla velkoobjemová produkce provedena ve čtyřech dvou-litrových baňkách, v každé z nich bylo maximálně 500 ml LB média s příslušnými antibiotiky (Amp 50  $\mu$ l / ml, Tet 12,5  $\mu$ l / ml).

Izolace inkluzních tělísek byla provedena podle postupu popsaného v metodické části. Dále bylo nutné protein izolovaný z inkluzních tělísek renaturovat.

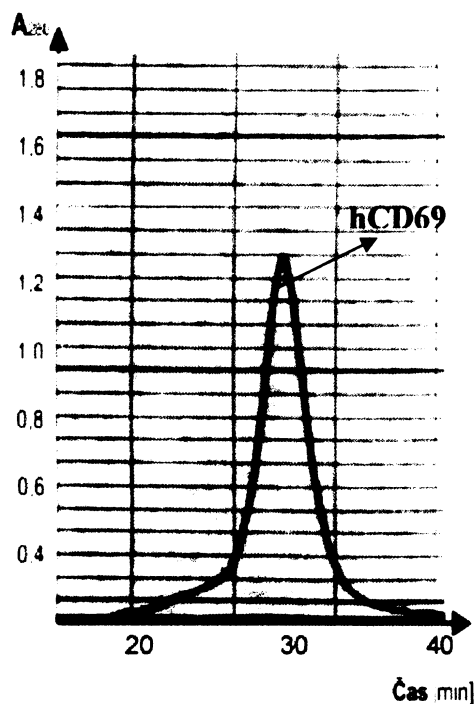
Renaturace probíhala metodou rychlého naředění do renaturačního pufru. Renaturační pufru obsahoval velké množství L-arginin hydrochloridu jako molekulárního chaperonu, Tris HCl pro udržení stálého pH a cysteamin/cystamin, které jsou nezbytné pro nastavení správného redoxního potenciálu, který je důležitý pro správné pozvolné utváření disulfidických můstků v molekule. Všechny parametry vytvářené látkami obsaženými v renaturačním pufru a koncentrace proteinu jsou velmi důležité pro úspěšné složení proteinu a velký výtěžek renaturace.

### V.1.2 Purifikace proteinu hCD69

K purifikaci proteinu bylo použito postupně několik chromatografických metod. Jako první krok purifikace proteinu byla zařazena:

## ***Ionexová chromatografie***

Pro ionexovou chromatografii byla použita kolona **Q-sepharosy** ekvilibrovaná v pufru A pro ionexovou chromatografii proteinu hCD69 o pH = 9,2. Protein hCD69 jehož **pI = 8,2** se při pH = 9,2 na kolonu Q-sepharosy nechytá, tudíž je eluován s čelem



**Obr. 9: Záznam z ionexové chromatografie proteinu hCD69**

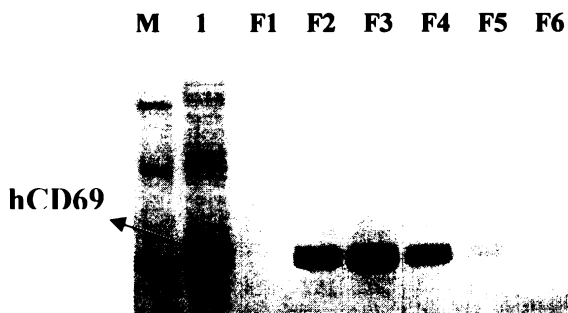
Eluční profil. Kolona sepharosa. Průtok mobilní fáze 1 ml/min. Absorbance měřena při 280 nm. Parametry kolony: 1,6 x 18 cm

Eluce ostatních proteinů přítomných ve vzorku byla provedena lineárním gradientem do pufru B pro ionexovou chromatografii proteinu hCD69. Délka gradientu byla 90 minut do 100 % pufru B. Množství eluovaného proteinu bylo sledováno spektrofotometricky měřením absorbance při 280 nm (obr. 9). Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Při analýze byl použit 15 % polyakrylamidový gel

Vzorky označené F2-F5 byly zakoncentrovány a byly podrobeny dalšímu kroku purifikace.

## ***Chromatografie na obrácené fázi***

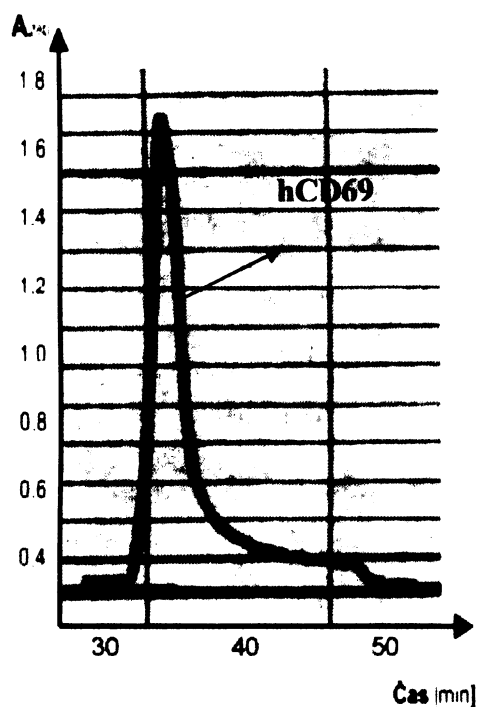
Vybrané frakce po ionexové chromatografii byly spojeny a zakoncentrovány. Následně byly okyseleny pomocí TFA na pH = 2 a nastříknuty na promytou kolonu **C4-Vydac** ekvilibrovanou mobilní fází A. Po nanesení vzorku byla kolona promývána puftrem A pro RP-HPLC. Eluce byla provedena acetonitrilem, spuštěním lineárního gradientu do 50 % pufru B pro RP-HPLC za 30 min.



**Obr. 10: Analýza frakcí po ionexové chromatografii**

V dráze označené M je marker, číslo 1 je vzorek nanesený na kolonu. Označení F1-F6 jsou jednotlivé frakce po ionexové chromatografii.





**Obr. 11: Záznam chromatografie na obrácené fázi.**

Eluční profil. Kolona C-4 Vydac, průtok mobilní fáze 2 ml/min, Absorbance měřena při 280 nm. Parametry kolony 1 x 25 cm.

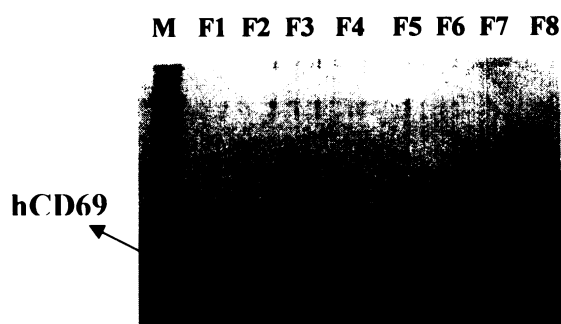
Po ustálení byl spuštěn gradient do 100 % B za deset min. Množství eluovaného proteinu bylo sledováno spektrofotometricky měřením absorbance při 280 nm. Z jímáných frakcí byl odpařen acetonitril a vzorky byly podrobeny analýze SDS-elektroforézou na 15 % polyakrylamidovém gelu.

Frakce F1-F6 byly zakoncentrovány na objem cca 400  $\mu$ l a dále použity při posledním purifikačním kroku.

### **Gelová chromatografie**

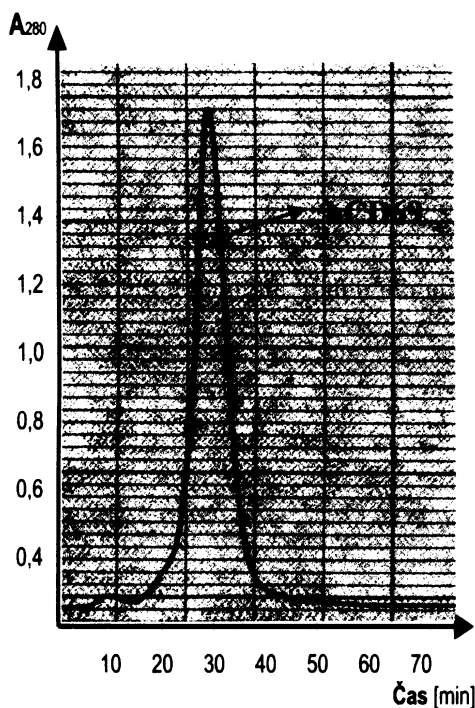
Gelová chromatografie byla provedena na koloně **Superdex 200**, podle postupu popsaného v metodické části. Množství eluovaného proteinu bylo sledováno spektrofotometricky měřením absorbance při 280 nm (obr. 13).

Přítomnost proteinu ve frakcích byla ověřena SDS-elektroforézou na 15 % polyakrylamidovém gelu (obr. 14).



**Obr. 12: Analýza frakcí po chromatografii na obrácené fázi**

M je marker, F1-F8 jsou frakce nasbírané po chromatografii na obrácené fázi



**Obr. 13: Záznam gelové chromatografie**

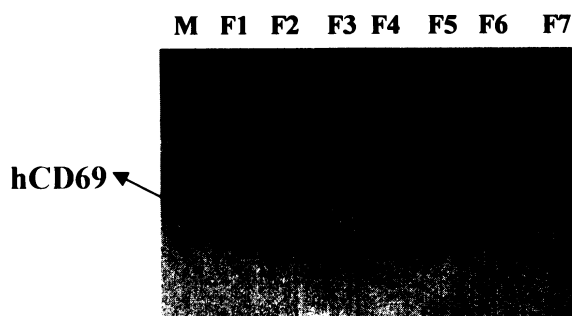
Eluční profil. Kolona Superdex 200, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min. Absorbance měřena při 280 nm. Parametry kolony 1 x 30 cm.

Frakce F1-F5 byly zakoncentrovány na koncentraci 10 mg/ml. Koncentrace byla stanovena metodou dle Bradfordové viz. metodická část.

## V.2 PŘÍPRAVA ZKRÁCENÉ FORMY MOLEKULY hCD69

Mgr. Ondřejem Vaňkem byl připraveny dva konstrukty pracovně nazvané L1 a M1 pro expresi zkrácené formy molekuly hCD69. Tyto molekuly obsahují jen aminokyseliny, které se vyskytují v CRD doméně proteinu. Transformaci bakterií a velkoobjemovou produkci provedl Mgr. Ondřej Vaněk. Já jsem se zabýval renaturací a purifikací proteinů. Oba tyto kroky probíhaly podle stejného postupu jako při přípravě klasické formy rekombinantního proteinu hCD69.

Konstrukty pro zkrácené formy proteinů hCD69 se liší v počátečních aminokyselinách. Protein L1 narozdíl od proteinu M1 má na N-konci navíc aminokyseliny valin a serin. Porovnání aminokyselinových sekvencí obou zkrácených forem proteinu hCD69 (obr.15).



**Obr. 14: Analýza frakcí po gelové chromatografii**

M je marker, F1-F7 jsou jednotlivé frakce po gelové chromatografii

VSSCEDWV GYQRKCYFIS TVKRSWTSAQ CSEHGATL AVIDSEKDMN  
FLKRYAGREE HWVGLKKEPG HPWKWSNGKE FNNWFNVTGS DKCVFLKNT  
VSSMECEKNL YWICNKPYK

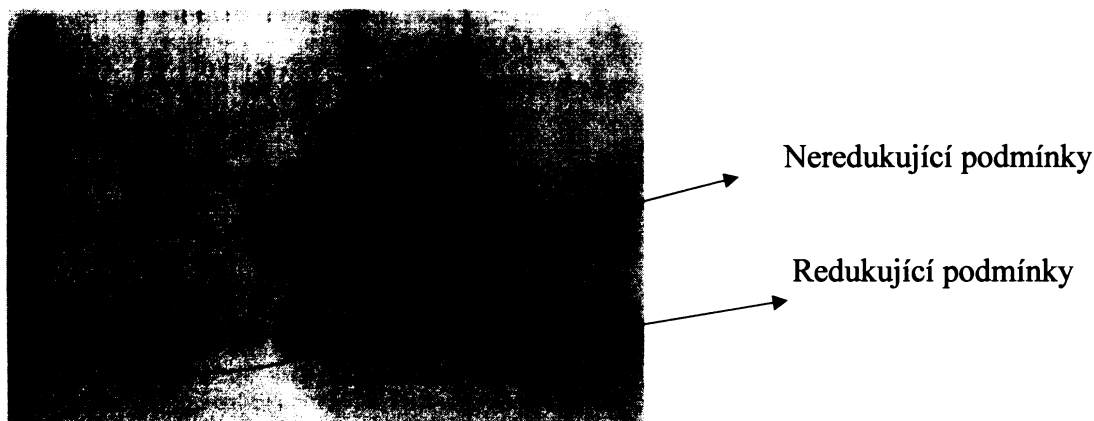
SCSEDWV CYFIS TVKRSWTSAQ NACSEHGATL AVIDSEKDMN FLKRYAGREE  
HWVGLKKEPG HPWKWSNGKE FNNWFNVTGS DKCVFLKNT VSSMECEKNL  
YWICNKPYK

**Obr. 15: Aminokyselinová sekvence zkrácených forem proteinu hCD69.**

První sekvence náleží proteinu pracovně nazvaným L1, druhá sekvence patří proteinu pracovně nazvaným M1. Žlutě jsou opět vyznačeny cysteiny tvořící disulfidické můstky.

Při renaturaci a purifikaci zkrácené formy proteinu nebyly zjištěny žádné odchylky v chování proteinů. Oba tyto kroky probíhaly shodně jako v případě klasické molekuly hCD69.

M L1 L2 L3 M1 M2 M3 L4 L5 L6 M4 M5 M6



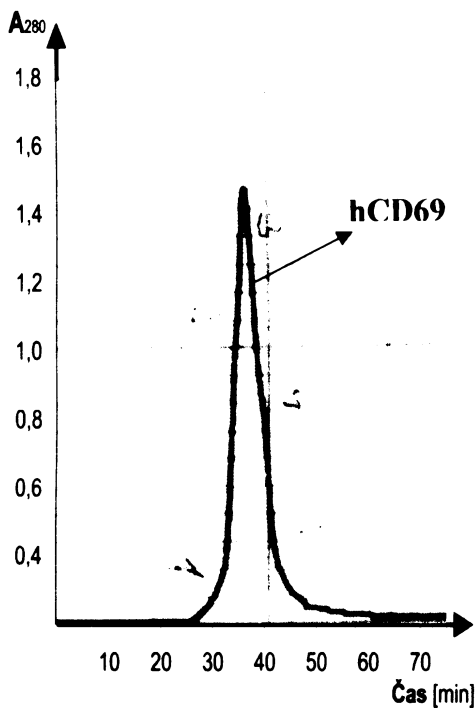
**Obr. 16: SDS-PAGE zkrácených forem proteinů hCD69.**

M je marker, označení L1-L3 jsou frakce po gelové chromatografii proteinu hCD69 pracovně označeného L1 v neredukujících podmínkách, L4-L6 je tentýž protein v redukujících podmínkách. M1-M3 jsou frakce proteinu hCD69 pracovně označeného M1 v nereduk. podmínkách a M4-M6 je tentýž protein v redukujících podmínkách

Správná renaturace proteinů byla orientačně zjištěna SDS-PAGE v redukujících a neredukujících podmínkách. Z výsledného gelu je jasně zřetelný posun v redukujících podmínkách obr.16.

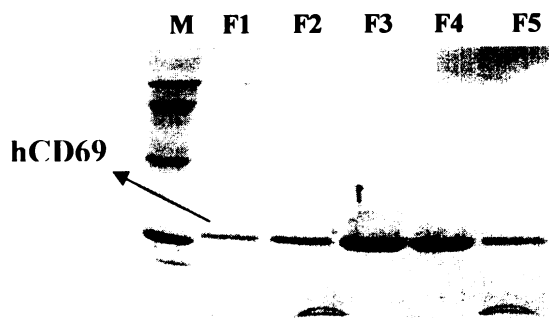
Jako výsledek úspěšné purifikace uvádím výsledek posledního purifikačního kroku ( záznam z gelové chromatografie a SDS elektroforézy) obr.17-18 u proteinu pracovně nazvaným L1 a obr. 19-20 u proteinu M1.

Frakce získané z gelové chromatografie byly zakoncentrovány a uschovány pro další použití.



**Obr. 17: Záznam gelové chromatografie zkrácené formy proteinu hCD69 pracovně nazvaným L1**

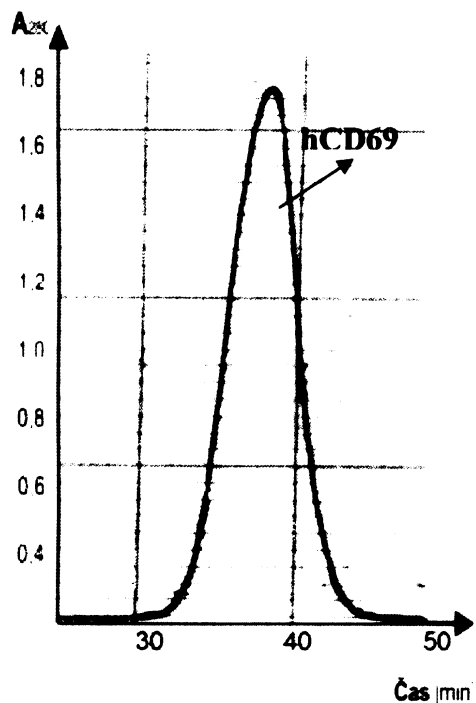
Eluční profil. Kolona Superdex 200, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min. Absorbance měřena při 280 nm. Parametry kolony 1 x 30 cm



**Obr. 18: Analýza frakcí po gelové chromatografii zkrácené formy**

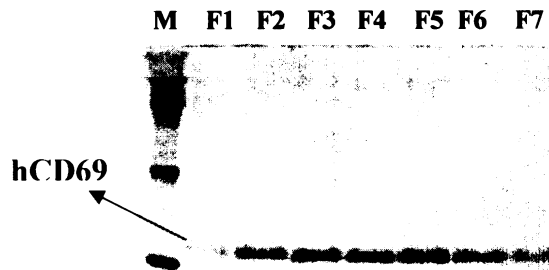
**proteinu hCD69 pracovně nazvaným L1**

M je marker, F1-F5 jsou frakce po gelové chromatografii



**Obr. 19: Záznam gelové chromatografie zkrácené formy proteinu hCD69 pracovně nazvaným M1**

Eluční profil. Kolona Superdex 200, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min. Absorbance měřena při 280 nm. Parametry kolony 1 x 30 cm



**Obr. 20: Analýza frakcí po gelové chromatografii zkrácené formy**

**proteinu hCD69 pracovně nazvaným M1**

M je marker, F1-F5 jsou jednotlivé frakce po gelové chromatografii

## V.3 PŘÍPRAVA MOLEKUL rNKR-P1A a rNKR-P1B

### V.3.1 Produkce proteinu rNKR-P1A a rNKR-P1B

Pro bakteriální exprese protein byl jako expresní vektor opět použit plazmid **pRSET B**. Takto připravený plazmid o koncentraci 1 µg/µl jsem obdržel od Mgr. Ľuboslava Mihóka. Pro transformaci byl použit stejný bakteriální kmen jako v případě produkce proteinu hCD69 (*E.coli* BL-21 (DE3) RIL).

K1 K2 K3 K4 K5 K6 K7 K8 K9 K10 K11 M



**Obr. 21: Hledání produkčního klonu analýzou SDS-PAGE proteinu NKR-P1A**

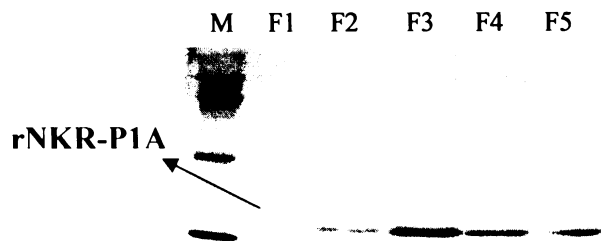
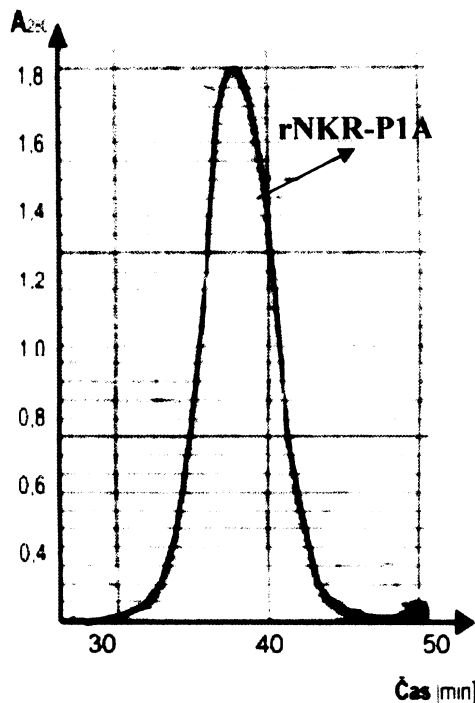
Označení K1-K11 jsou jednotlivé kolonie, které byly vybrány pro analýzu produkce proteinu. M je marker použitý při elektroforéze (viz. seznam chemikálií). Molekula rNKR-P1A je pruh nad proteinem o velikosti 14 200 Da.

Produkce probíhala za podmínek zjištěných Doc, RNDr Karlem Bezouškou, CSc. Protein byl produkován 16 hodin, bez předchozí indukce IPTG, ve čtyřech dvou-litrových baňkách, v každé z nich bylo maximálně 500 ml LB média s příslušnými antibiotiky (Amp 50 µl / ml, Tet 12,5 µl / ml).

Po produkci následovala analýza SDS-PAGE kterou byl nalezen nejvhodnější producent proteinů. Pro ilustraci zde uvádím gel z SDS-elektroforézy při hledání producenta proteinu NKR-P1A. U hledání producenta proteinu NKR-P1B byla situace obdobná. Izolace inkluzních tělísek byla provedena podle návodu v metodické části. Renaturace proteinu byla provedena metodou rychlého naředění do renaturačního pufru pro proteiny rNKR-P1A, B. Optimalizace složení renaturačního pufru byla provedena Prof, RNDr Karlem Bezouškou, CSc.

## V.3.2 Purifikace proteinů rNKR-P1A a rNKR-P1B

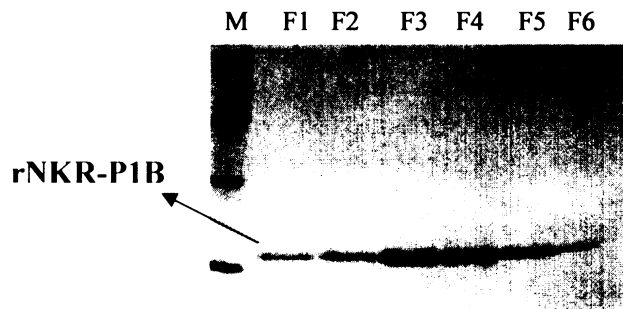
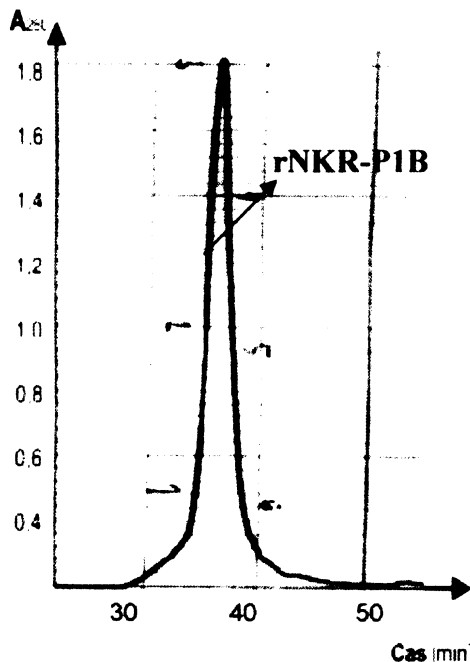
Při purifikaci proteinů rNKR-P1A a rNKR-P1B bylo použito stejných metod ve stejném pořadí jako při purifikaci proteinu hCD69.



**Obr. 23: Analýza frakcí po gelové chromatografii proteinu rNKR-P1A**  
M je marker, F1-F5 jsou jednotlivé frakce po gelové chromatografii

**Obr. 22: Záznam gelové chromatografie proteinu rNKR-P1A**

Eluční profil. Kolona Superdex 200, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min. Absorbance měřena při 280 nm. Parametry kolony 1 x 30 cm



**Obr. 25: Analýza frakcí po gelové chromatografii proteinu rNKR-P1B**  
M je marker, F1-F5 jsou jednotlivé frakce po gelové chromatografii

**Obr. 24: Záznam gelové chromatografie proteinu rNKR-P1B**

Eluční profil. Kolona Superdex 200, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min. Absorbance měřena při 280 nm. Parametry kolony 1 x 30 cm

Roztoky a pufrы pro tuto purifikaci jsou uvedeny v seznamu chemikálií. Jako výsledek úspěšné purifikace uvádím výsledek posledního purifikačního kroku ( záznam z gelové chromatografie a SDS elektroforézy) obr. 22, 23.

Frakce obsahující protein získané z gelové chromatografie byly zakoncentrovány a uschovány pro další použití.

## V.4 VAZEBNÉ STUDIE

### V.4.1 Inhibiční vazebné experimenty

Inhibiční vazebné experimenty byly prováděny s proteiny rNKR-P1B, rNKR-P1D, rNKR-P1C a lidským homologem NKR-P1.

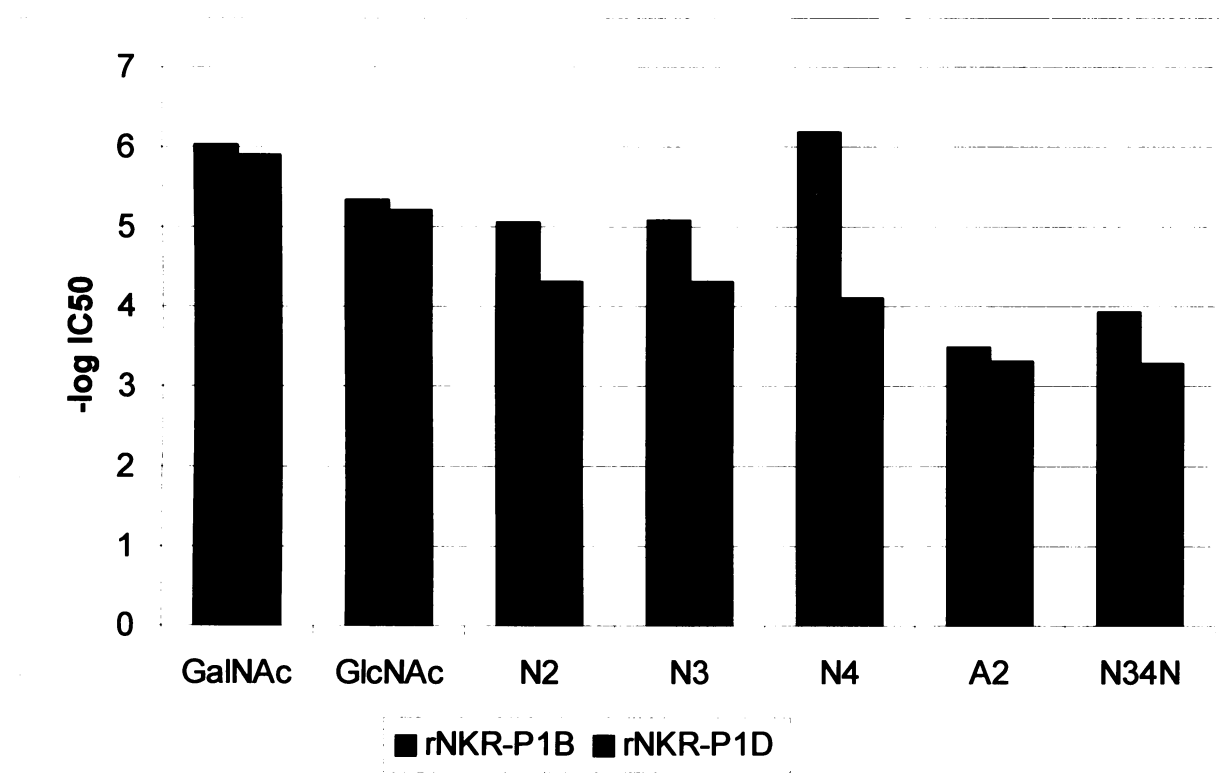
**Sacharidové struktury použité při inhibičních studiích**

Zkratka	Struktura
DB	GalNAc $\beta$ 1→4(GalNAc) $_2\beta$ 1→4ManNAc $\beta$ 1→4benzyl
GGM(COO <sup>-</sup> )	GalNAc(COO <sup>-</sup> ) $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→4ManNAc
D	GalNAc $\beta$ 1→4(GalNAc) $_2\beta$ 1→4ManNAc
GGM	GalNAc $\beta$ 1→4GlcNAc $\beta$ 1→4ManNAc
A34A	GalNAc $\beta$ 1→3(GlcNAc $\beta$ 1→4)GalNAc
N34N	GlcNAc $\beta$ 1→3(GalNAc $\beta$ 1→4)GlcNAc
GM(COO <sup>-</sup> )	GalNAc(COO <sup>-</sup> ) $\beta$ 1→4ManNAc
GM(SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	GalNAc (SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) $\beta$ 1→4Man
GM	GalNAc $\beta$ 1→4ManNAc
..	
A2	GalNAc $\beta$ 1→4GalNAc
N3N	GlcNAc $\beta$ 1→3GlcNAc
A3A	GalNAc $\beta$ 1→3GalNAc
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GlcNAc	N-acetylglukosamin
N2	chitobiosa
N3	chitotriosa
N4	chitotetraosa

Schopnosti těchto proteinů vázat sacharidové strukturní motivy bylo využito ke sledování inhibice této vazby jinými sacharidovými strukturami. Tímto způsobem měli být určeny různé sacharidové struktury, které se specificky váží na tyto proteiny.

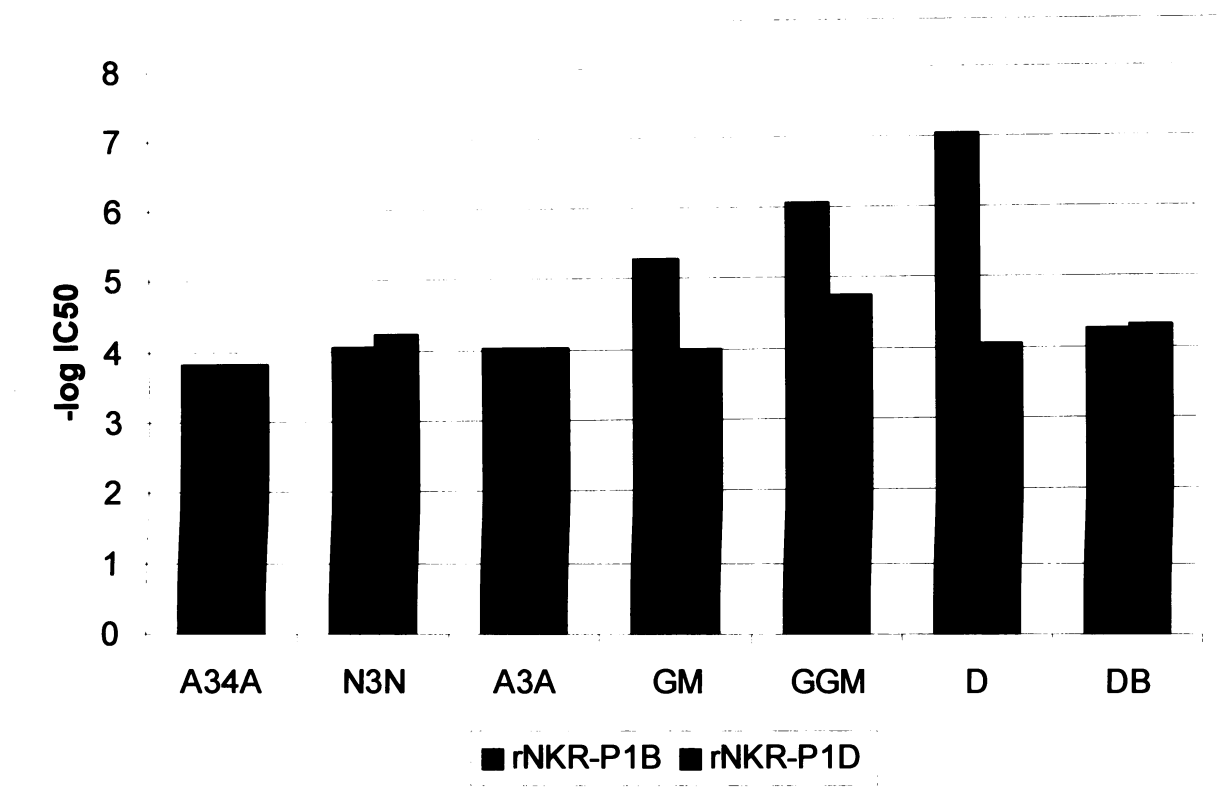
Pro inhibiční experimenty byla zvolena molekula N-acetyl-D-glukosaminu z předpokládané vysoké afinity k proteinům. Bylo sledováno procento inhibice vazby

N-acetyl-D-glukosaminu k CRD doméně proteinu různými sacharidovými strukturami včetně glykodendrimerů v závislosti na jejich koncentraci. Následně byla vypočtena tzv. IC<sub>50</sub> což je právě 50 % inhibice vazby proteinu na N-acetyl-D-glukosamin.

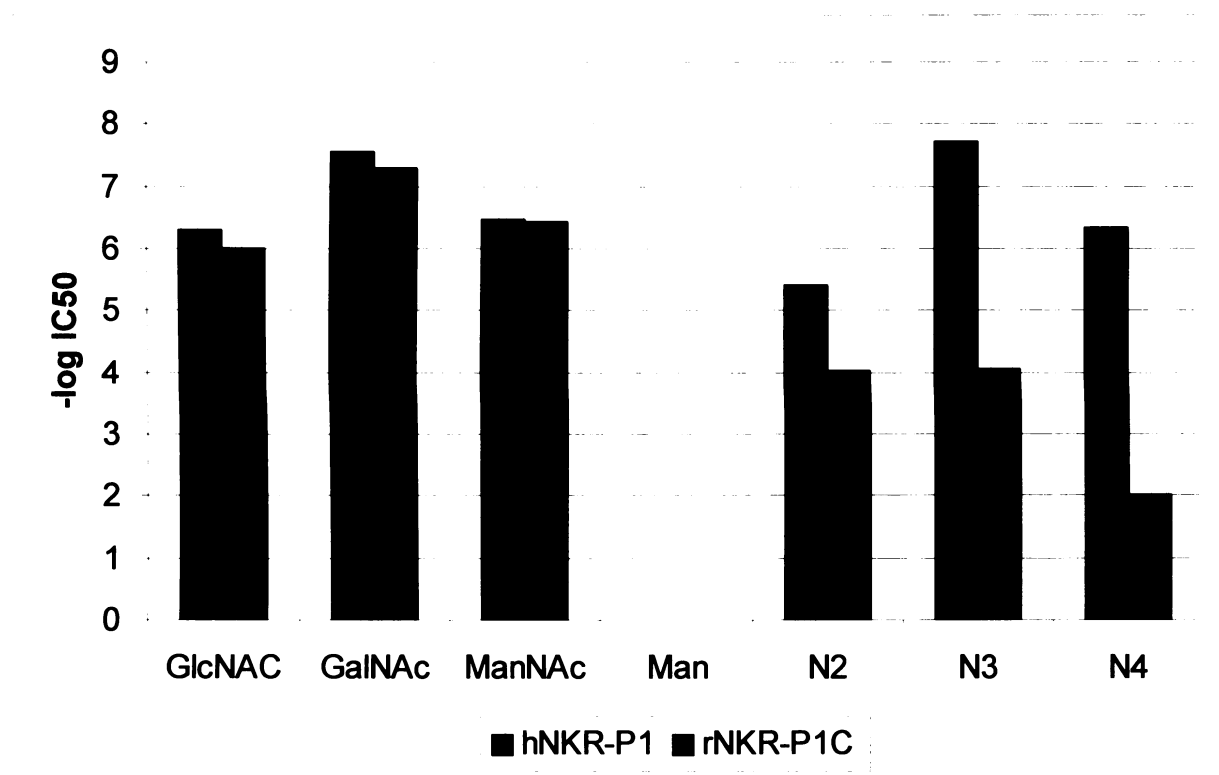


**Obr.26: Srovnání 50 % inhibice různými sacharidovými strukturami pro molekuly rNKR-P1B a rNKR-P1D**

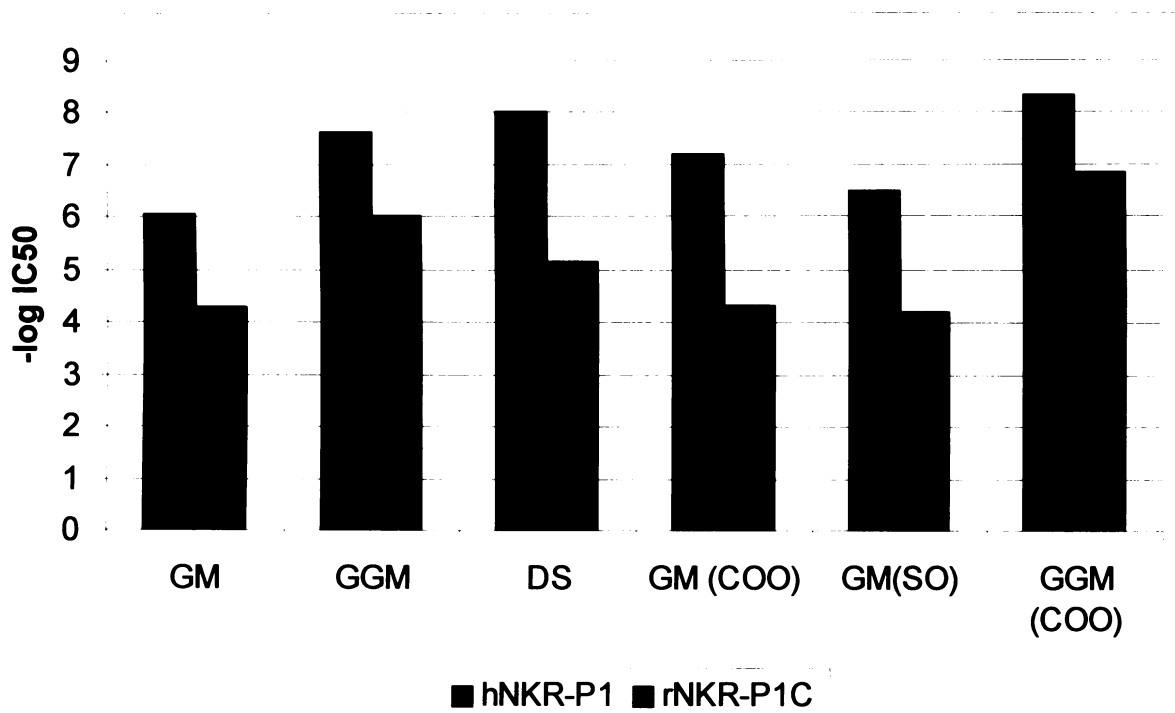




**Obr.27: Srovnání 50 % inhibice různými sacharidovými strukturami pro molekuly rNKR-P1B a rNKR-P1D**



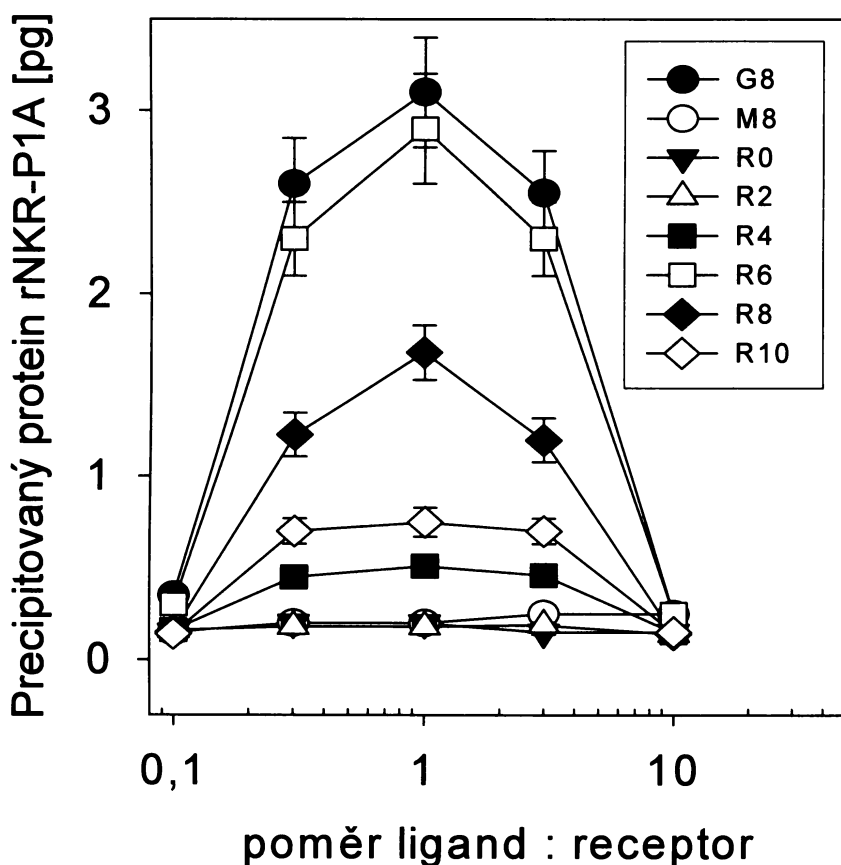
**Obr.28: Srovnání 50 % inhibice různými sacharidovými strukturami pro molekuly rNKR-P1C a hNKR-P1**



**Obr.29: Srovnání 50 % inhibice různými sacharidovými strukturami pro molekuly rNKR-P1C a hNKR-P1**

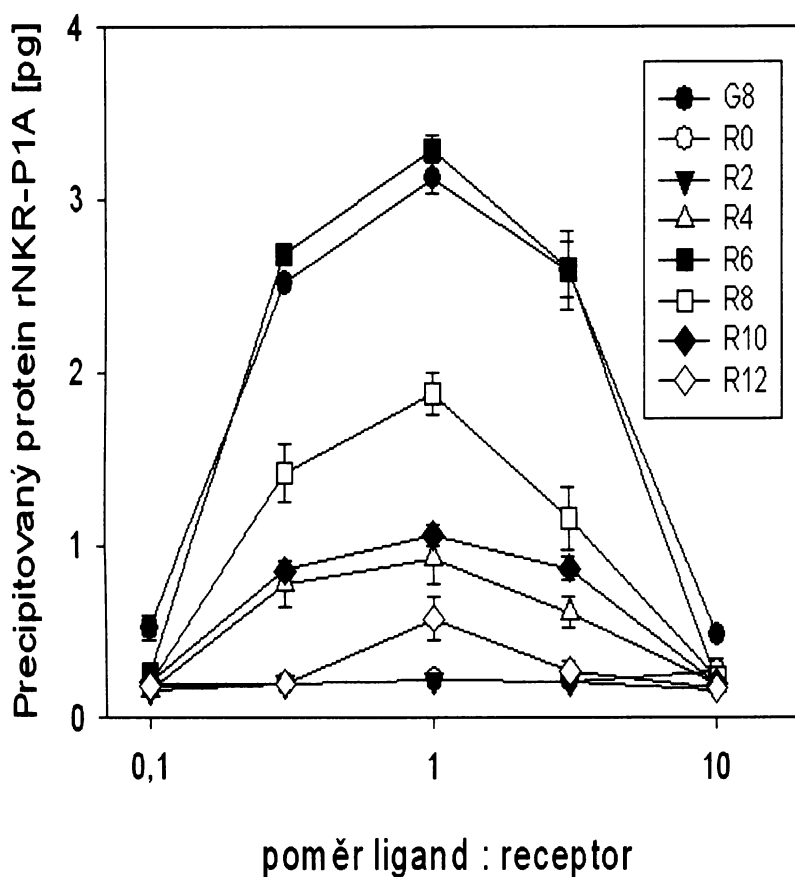
## V.4.2 Precipitační experimenty

Pro precipitační experimenty bylo využito tzv. molekulárních pravítek. Molekulární pravítka jsou lineární molekuly obsahující různý počet atomů uhlíku. Na obou koncích molekuly je umístěn sacharid. Tento sacharid je vázán CRD doménou proteinu. Při určité koncentraci proteinu a sacharidu dojde k zesítnění proteinů přes molekuly obsahující sacharid a ke vzniku precipitátu. Množství precipitátu je následně zjištěno stanovením radioaktivity. Protein pro tyto experimenty je radioaktivně značený izotopem  $^{125}\text{I}$ .



**Obr.30: Závislost precipitovaného proteinu na poměru ligand : receptor**

G8- (GlcNAc)oktadendrimer polyamidového typu, M8- (GlcNAc)oktadendrimer polylysinového typu, R0- molekulární pravítko s jedním spojovacím uhlíkem, R2- molekulární pravítko se dvěma spojovacími uhlíky, R4- čtyři spojovací uhlíky, R6- šest uhlíků, R8- osm uhlíků, R10- deset uhlíků

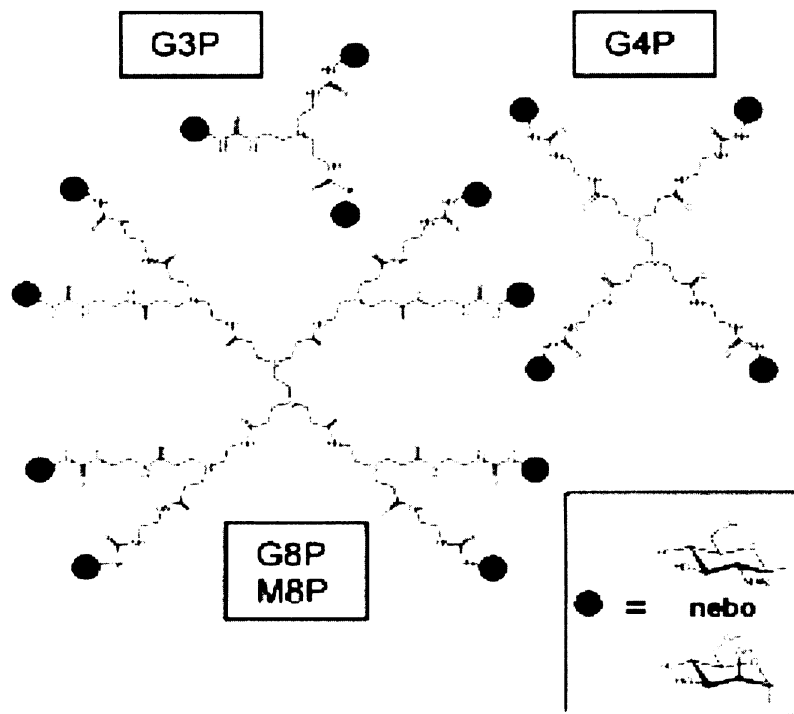


**Obr.31: Závislost precipitovaného proteinu na poměru ligand : receptor**

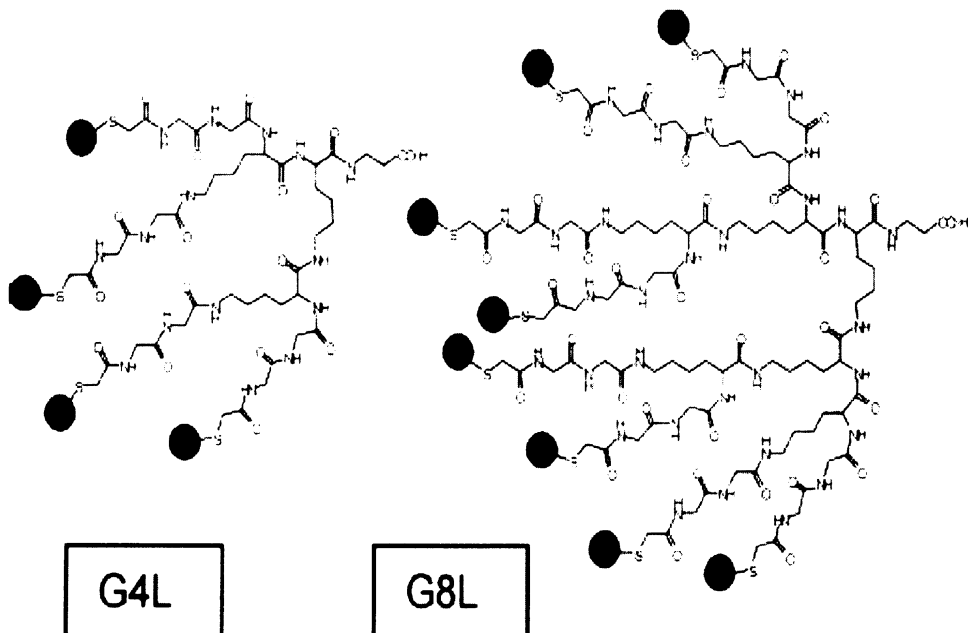
G8- (GlcNAc)oktadendrimer polyamidového typu, R0- molekulární pravítko s jedním spojovacím uhlíkem, R2- molekulární pravítko se dvěma spojovacími uhlíky, R4- čtyři spojovací uhlíky, R6- šest uhlíků, R8- osm uhlíků, R10- deset uhlíků, R12- dvanáct spojovacích uhlíků

### V.4.3 Přímá vazba

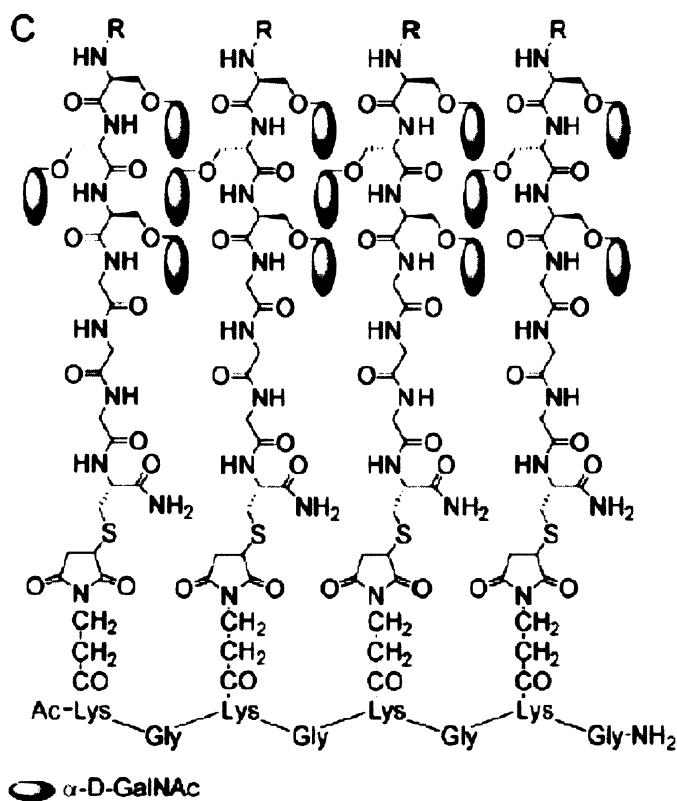
Přímé vazebné experimenty byly prováděny na polystyrenových mikrotitračních destičkách. Na kterých byly navázány struktury obsahující sacharidové ligandy. Proteiny rNKR-P1A a hCD69 byly označeny fluorescenční sondou viz. experimentální část.



Obr.32: Glykodendrimery na bázi polyamidoaminů



Obr.32: Glykodendrimery na bázi polylysinů



Obr.33: Struktura tzv. Comblike dendrimerů

---

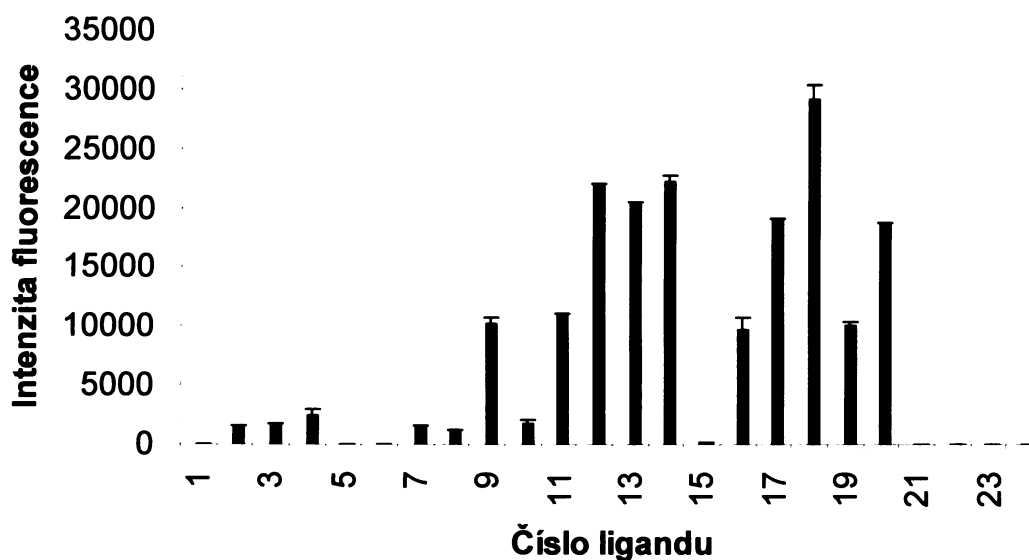
Sacharidové struktury použité při přímých vazebných experimentech

---

Zkratka	Struktura
BSA	Hovězí sérový albumin
GlcNac	N-acetylglukosamin
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
ManNac	N - acetylmanosamin
Fuc	Fukosa
N2	Chitobiosa
N3	Chitotriosa
N4	Chitotetraosa
A2	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GalNAc
A3	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GalNAc
A4	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GalNAc
D	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(GalNAc) $_2\beta$ 1 $\rightarrow$ 4ManNAc
DB	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(GalNAc) $_2\beta$ 1 $\rightarrow$ 4ManNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4benzyl
M8P	Oktadendrimer na bázi polyamidoaminů

N2L	Didendrimer na bázi polylysinů
N4L	Tetradendrimer na bázi polylysinů
N8L	Oktadendrimer na bázi polylysinů
Comp9	Comblike dendrimer s devíti koncovými sacharidy ( GalNAc)
Comp10	Comblike dendrimer s deseti koncovými sacharidy ( GalNAc)
Comp11	Comblike dendrimer s jedenácti koncovými sacharidy GalNAc)
TriOVO	Triovomukoid
TetraOVO	Tetraovomukoid
PentaOVO	Pentaovomukoid

### NKR-P1, NHS-fluorescein

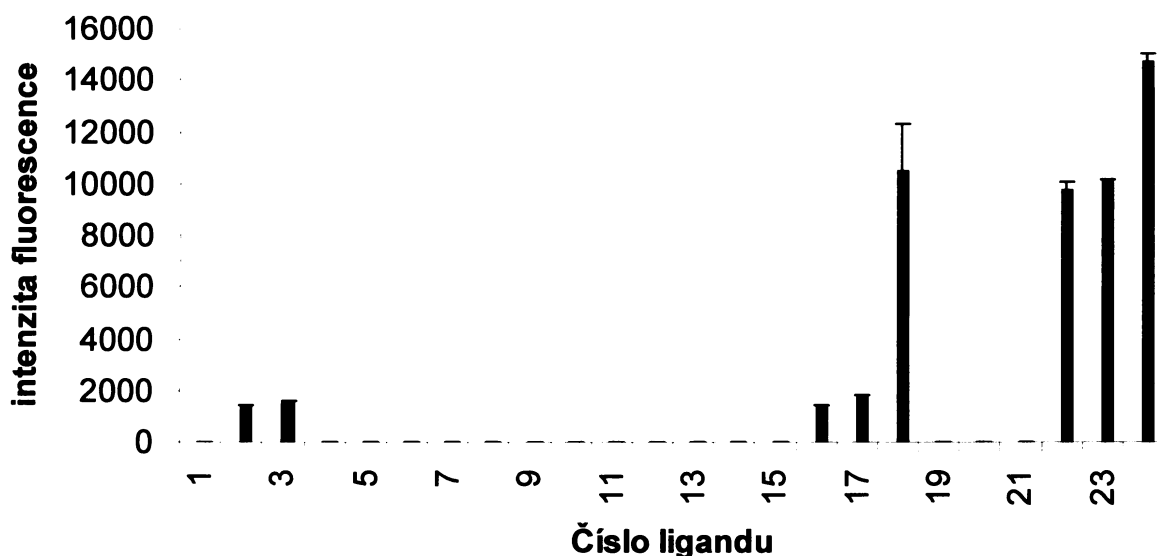


**Obr.34: Výsledek přímé vazebné studie s fluorescenčně značeným proteinem rNKR-P1A**

Jednotlivé sacharidové struktury použité při experimentu

1. BSA	7. N2	13.D	19. Comb9
2. GlcNAc	8. N3	14.DB	20. Comb10
3. GalNAc	9. N4	15. M8	21. Comb11
4. ManNAc	10. A2	16. N2	22. TriOVO
5. Fuc	11. A	17. N4	23. TetrOVO
6. Man	12. A4	18. N8	24.PentOVO

## CD69, NHS-Rhodamine



**Obr.35: Výsledek přímé vazebné studie s fluorescenčně značeným proteinem hCD69**

Jednotlivé sacharidové struktury použité v experimentu

1. BSA	7. N2	13.D	19. Comb9
2. GlcNAc	8. N3	14.DB	20. Comb10
3. GalNAc	9. N4	15. M8	21. Comb11
4. ManNAc	10. A2	16. N2	22. TriOVO
5. Fuc	11. A3	17. N4	23. TetrOVO
6. Man	12. A4	18. N8	24. PentOVO

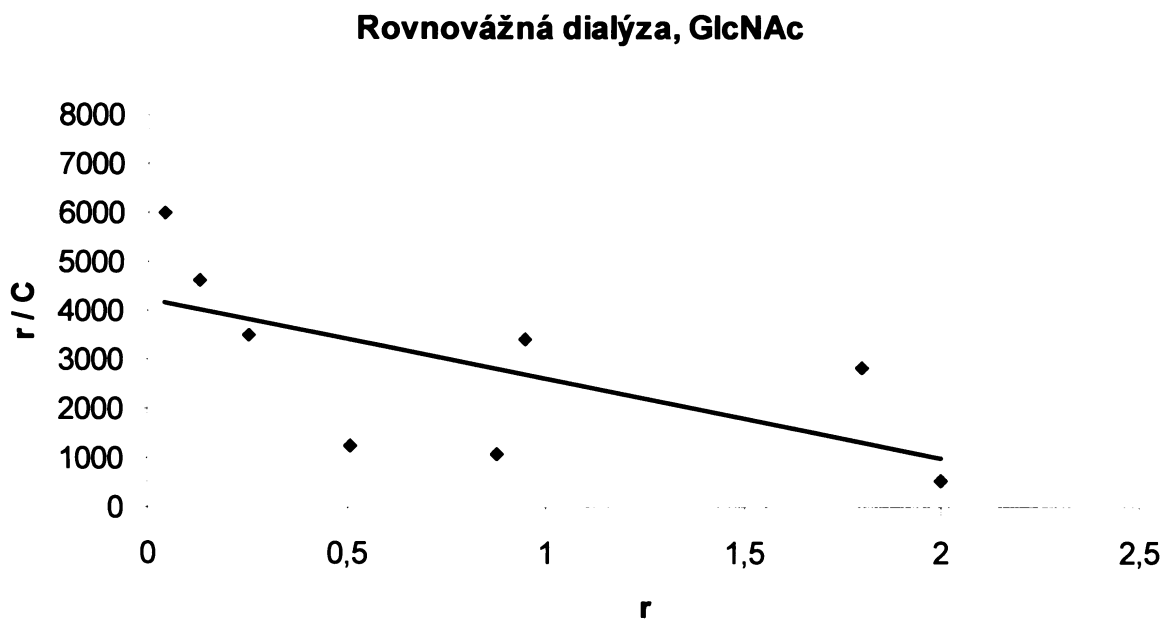
### V.4.4 Rovnovážná dialýza

Metoda rovnovážné dialýzy byla prováděna podle postupu popsaného v metodické části. Radioaktivně značené oligosacharidy byly přidány do dialyzačního roztoku až po umístění kompartmentu obsahujícího protein do dialyzační nádoby. Celý proces dialýzy trval 48 hodin při 37 °C.



Byly použity tři radioaktivně značené sacharidové ligandy

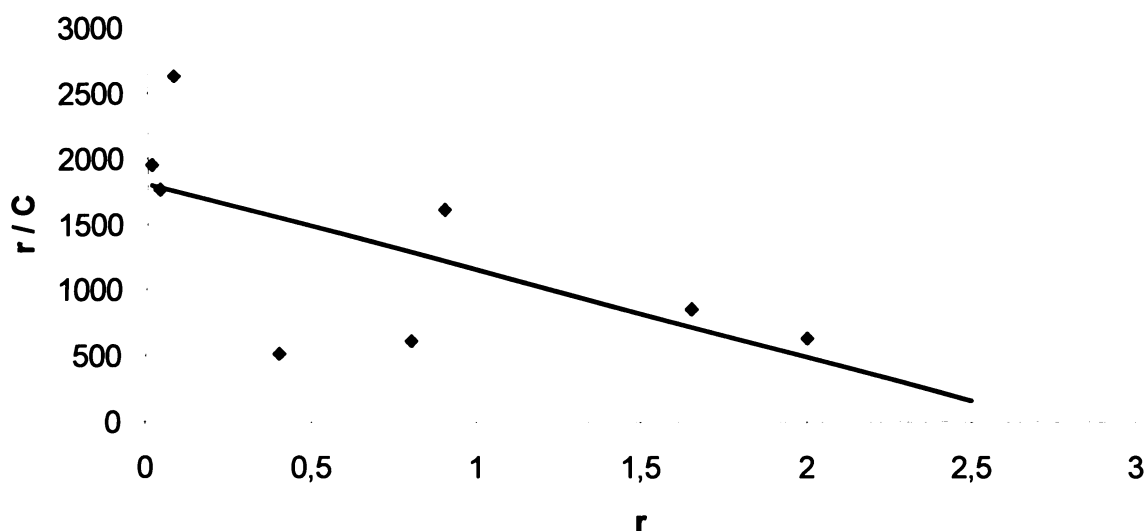
Radioaktivně značené oligosacharidy používané při rovnovážné dialýze	
Zkratka	Struktura
GlcNAc	N-acetylglukosamin
TRIOVO	Triovomukoid
D (COO <sup>-</sup> )	GalNAc (COO <sup>-</sup> )β1→4(GalNAc) <sub>2</sub> β1→4ManNAc



**Obr.35: Výsledek rovnovážné dialýzy s proteinem rNKR-P1A, ligandem GlcNAc**  
 r je poměr koncentrací vázaného ligandu ku koncentraci proteinu C je koncentrace volného ligandu

$$K_d = 2,1 \times 10^{-4} \text{ M}$$

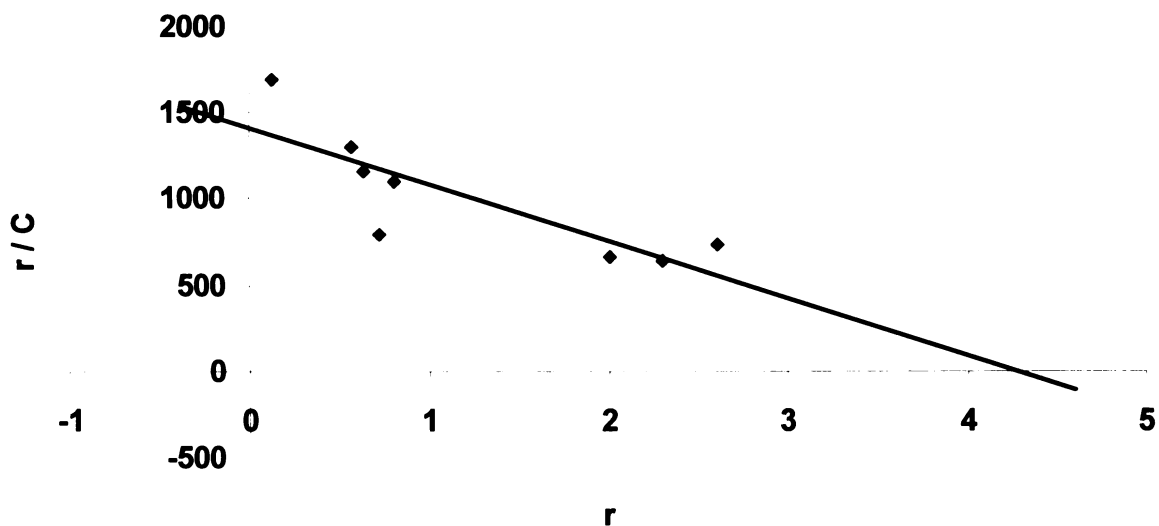
### Rovnovážná dialýza, TRI OVO



**Obr.36: Výsledek rovnovážné dialýzy s proteinem rNKR-P1A, ligandem D COO<sup>-</sup>**  
 r je poměr koncentrací vázaného ligandu ku koncentraci proteinu  
 C je koncentrace volného ligandu

$$K_d = 7,1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

### Rovnovážná dialýza, D COO<sup>-</sup>



**Obr.37: Výsledek rovnovážné dialýzy s proteinem rNKR-P1A, ligandem TRI OVO**  
 r je poměr koncentrací vázaného ligandu ku koncentraci proteinu  
 C je koncentrace volného ligandu

$$K_d = 5,5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

## VI. DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo připravit protein hCD69 pro experimenty v laboratoři a k analýze v laboratoři NMR spektroskopie na MU V Brně. Dále bylo potřeba připravit zkrácené formy tohoto proteinu. Obě tyto formy byly navrhnuty z důvodů nízké stability klasického proteinu hCD69. Navrhnuté zkrácené formy proteinu hCD69 by měli vykazovat vyšší stabilitu.

Další cíl této práce bylo připravit izoformy A a B potkaního proteinu NKR-P1. Tyto proteinu byly následně využity k vazebným experimentům a strukturním studiím, v rámci naší laboratoře.

Pro bakteriální expresi všech výše zmiňovaných proteinů byl využit expresní systém kompetentních buněk *E.COLI BL-21 (DE3) RIL*. Tento expresní systém byl ověřen již dříve. Dále byl použit expresní vektor **pRSET B**. Při výběru nejlepšího produkčního klonu se ukázalo, že buňky produkují protein i bez předchozí indukce IPTG a to dokonce v mnoha případech ještě lépe. Jedno z možných vysvětlení může být mutace laktosového operonu v použitém plazmidu. Nebo přítomnost laktosy v kultivačním médiu. Samotný induktor je ve vyšších koncentracích pro bakteriální buňky toxický což může být příčinou nižší produkce proteinu.

Podmínky pro kultivaci a renaturaci proteinu hCD69 byly převzaty z optimalizace provedené Mgr. O. Vaňkem.

Podmínky pro kultivaci a renaturaci proteinů NKR-P1 byly převzaty z optimalizace provedené Prof, RNDr Karlem Bezouškou, CSc. Renaturace obou produkovaných proteinů byla provedena metodou rychlého naředění optimalizace renaturačních pufrů byla provedena již dříve.

K purifikaci všech výše zmíněných proteinů bylo použito tří po sobě následujících chromatografií. Jako první byla zařazena **ionexová chromatografie** na Q-Sepharose. Protein hCD69 se na koloně vůbec nezachytil a byl eluován s čelem. Protein NKR-P1 byl na koloně zachycen a eluován gradientem pufru o vyšší iontové síle.

Z důvodů vysoké stability proteinů nebyla do purifikace zařazena denaturace v močovíně. Tento krok byl dříve zařazen do postupu, aby byly odstraněny kontaminanty, které způsobovaly nestabilitu purifikovaného proteinu. Tato nestabilita byla pozorována při interpretaci spekter z hmotnostní spektrometrie.

Jako druhý krok purifikace obou proteinů byla zařazena **chromatografie na obrácené fázi** a nakonec byla zařazena **gelová chromatografie**.

Celkové množství získaného proteinu z každé produkce ( 2 litry LB média) je **10 mg** u proteinu hCD69. U zkrácených forem proteinu hCD69 je získané množství čistého proteinu stejné jako v případě klasické formy.

U proteinu NKR-P1 je celkové množství získaného purifikovaného proteinu z jedné produkce ( 2 litry LB média) **8 mg**.

Dále bylo s potkaními receptory NKR-P1B, C <sup>65</sup>, D a s lidským homologem receptoru NKR-P1 provedeno několik vazebných inhibičních studií. Proteiny byly radioaktivně označeny izotopem <sup>125</sup>I. Protein NKR-P1C byl získán od Prof. B. Rolstad z Univerity v Oslu. Monosacharidové struktury vybrané pro experimenty se na všechny izoformy receptoru NKR-P1 vázaly téměř stejně a to v pořadí **GalNAc > GlcNAc > ManNAc > Fuc > Man**. Tyto výsledky potvrzují přítomnost vazebného místa pro **N-acetylgalaktosamin**, **N-acetylglukosamin** a **N-acetylmanosamin** na všech zkoumaných izoformách potkaního receptoru NKR-P1 a lidském homologu NKR-P1.

Dále byla zkoumána inhibice chitobiosou, chitotriosou a chitotetraosou neboli lineárními oligosacharidy obsahující dva, tři a čtyři N-acetylglukosaminy vázané  $\beta$ 1-4 vazbou. Bylo zjištěno, že vazba těchto ligandů k receptoru rNKR-P1D je přibližně stejná, k receptoru rNKR-P1B stoupá afinita těchto ligandů se stoupajícím počtem N-acetylglukosaminů v molekule. U molekuly rNKR-P1C je vazba **chitobiosy** a **chitotriosy** naprosto stejná, ale naopak vazba **chitotetraosy** je minimální. Vazba těchto ligandů k lidskému receptoru je vyšší ve všech případech než u potkaních izoformem receptoru NKR-P1. U ostatních ligandů používaných v těchto experimentech je vazba k lidskému homologu receptoru ve všech případech vyšší než u potkaních forem.

Precipitační experimenty, které jsou analogií precipitace receptorů na membránách buněk, která je nezbytná pro jejich biologickou aktivitu (předání signálu do nitra buňky a odpověď na něj) s proteinem rNKR-P1A, byl stanoven jako nejlepší ligand **G8 - (GlcNAc)oktadendrimer** polyamidového typu. Druhá nejlepší molekula precipitující protein je tzv. molekulární pravítko obsahující šest spojovacích uhlíků. Naopak **M8 - (GlcNAc)oktadendrimer** polylysinového typu nezpůsobuje precipitaci v žádném případě.

Při přímých vazebných experimentech s rNKR-P1A, byla zjištěna stoupající afinita ligandů  $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GalNAc}(\mathbf{A2}) < \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GalNAc}\beta 1(\mathbf{A3}) < \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GalNAc}(\mathbf{A4})$ . Dále byla zjištěna vysoká afinita ligandů (**D**)  $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4(\text{GalNAc})_2\beta 1 \rightarrow 4\text{ManNAc}$  a

**(DB)** GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(GalNAc) $_2\beta$ 1 $\rightarrow$ 4ManNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4benzyl. Také byla potvrzena vazba **chitobiosy, chitotriosy a chitotetraosy**.

Dále byla zjištěna vazba tzv. **comblike dendrimerů** s koncovými devíti a deseti GalNAc.

Při přímých vazebných experimentech s proteinem hCD69 byla zjištěna vazba chitobiosy, chitotriosy a chitotetraosy v tomto pořadí. Také byla zjištěna vazba **TriOVO < TetraOVO < PentaOvomukoidových** ligandů. Vazba tzv. **Comblike dendrimerů** na protein hCD69 byla nulová.

Metoda rovnovážné dialýzy byla prováděna s proteinem rNKR-P1A a radiokativně značenými sacharidy. U sacharidu **GlcNAc** byla zjištěna disociační konstanta **K<sub>d</sub> = 2,1 x 10<sup>-4</sup> M**. U ligandu **D COO<sup>-</sup>** **K<sub>d</sub> = 7,1 x 10<sup>-3</sup> M** a u ligandu **TRIOVO** **K<sub>d</sub> = 5,5 x 10<sup>-4</sup> M**.

V návaznosti na tyto studie se otvírá široké pole možností dalších vazebných experimentů s proteiny zkoumanými v této práci. K rozřešení různých strukturních motivů receptorů by mohla pomoci například tvorba různých mutantních forem těchto proteinů s následnými vazebnými experimenty.

Konečným cílem by pak bylo nalezení ideálního ligandu aktivujícího nebo inhibujícího NK buňky, přes vazbu na tyto povrchové proteiny.

## VII. SOUHRN

Bylo připraveno celkové množství 10 mg rekombinantního proteinu hCD69 ze 2 litrů LB média. Tento protein byl využit k experimentům NMR v Brně.

Bylo renaturováno a purifikováno stejné množství zkrácených forem proteinu hCD69. Tento protein byl využit pro experimenty v laboratoři.

Bylo připraveno 8 mg proteinu rNKR-P1A a stejné množství proteinu rNKR-P1B ze 2 litrů LB média. Tyto proteiny byly použity při vazebných experimentech v laboratoři i v rámci této diplomové práce.

Byly provedeny různé vazebné experimenty s potkaními receptory NK buněk NKR-P1A, B, C, D s lidským homologem receptoru NKR-P1 a s receptorem CD69.

## SEZNAM LITERATURY

1. Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (2001)
2. Vaněk, O.: Příprava a strukturní studie proteinu CD69, receptoru NK buněk. Diplomová práce. PŘF UK Praha, katedra biochemie, (2005)
3. Mould, A.P., Humphiers, M.J.: *Nature* 432, 27-28 (2004)
4. Hořejší, V.: *Molekulární imunologie*, skriptum PŘF UK, Praha (1993)
5. Kavan, D.: Produkce a studium neglykosylované molekuly CD45, Diplomová práce. PŘF UK Praha, katedra biochemie str. 12-14 (2002)
6. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., *Eur. J. Immunol.* 16, 216-223 (1995)
7. Robertson, M.J., Ritz, J.: *Blood* 76, 2421-2438 (1990)
8. Hammond, K.J.L., Godfrey, D.I.: *Tissue Antigens* 59, 353-363 (2002)
9. Loza, M.J., Zamai, L., Azzoni, L., Rosati, E., Perrusia, B.: *Blood* 99, 1273-1281 (2002)
10. Ljunggren, h:G., Karre, K.: *Immunol. Today* 11, 237-244 (1990)
11. Blery, M., Olcese, L., Vivier, E.: *Human Immunol.* 61, 51-64 (2000)
12. Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H.: *Nature Review* 2, 850-861 (2002)
13. Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Pende, D., Millo, R., Moretta, R., Bottino, C., Moretta, A.: *Mol. Immunol.* 37, 1015-1024 (2000)
14. Weis, W.I., Kahn, R., Fourme, R., Drickamer, K., Hendrickson, W.A.: *Science* 254, 1608-1615 (1991)
15. Bilej, M., Bubenik, J., Dlabac, V., Holan, V., Horejsi, V., Pospisil, M., Prokesova, L., Rihova, B., Sima, P., Sirova, M., Sterzl, J., Tlaskalova, H., Treibichavsky, I., Tuckova, L., *Pokroky v imunologii*, UK Praha (1994)
16. Bezouska, K., Crychlow, G.V., Rose, J.M., Taylor, M.E., Dricamer, K.: *Biol. Chem.* 266, 11604-11609 (1991)
17. Drickamer, K.: *Curr.Opin.Struct. Biol.* 3, 393-400 (1993)
18. Moretta, A., Biasoni, R., Bottino, C., Moretta, L.: *Semin. Immunol.* 12, 129-138 (2000)
19. Barten, R., Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J., Wilson, J.M.: *Trends. Immunol.* 22, 52-57 (2001)
20. Ryan, J.C., Seaman, W.E.: *Immunol. Rew.* 155, 79-89 (1997)
21. Yokoyama, W.M.: *Curr. Opin. Immunol.* 10, 298-305 (1998)
22. Leibson, P.J.: *Immunity* 6, 655-661 (1997)
23. Perrusia, B.: *nature Immunol.* 1, 372-374 (2002)
24. O'Shea, J.J., Weismann, A.M., Kennedy, I.C.S., Ortaldo, J.R.: *J. Immunol.* 148, 2947-2502 (1991)

25. Trapani, J.A., Davis, J., Sutton, V.R., Smyth, M.J.: *Curr. Opin. Immunol.* 12, 323-329 (2000)
26. Ashekenazi, A.: *Nature Rev. Cancer* 2, 420-430 (2002)
27. Montel, A.H., Bochan, R. M., Hobbs, J., Lynch, D., Brahmi, Z.: *Cell Immunol.* 166, 236-246 (1995)
28. Hara, T., Jung, L.K., Bjorndahl, J.M., Fu, S. M.: *J. Exp. Med.* 164, 1988-2005 (1986)
29. Testi, R., Philips, J.H., Lanier, L.L.: *J. Immunol.* 141, 2557-2563 (1988)
30. De Maria, R., Cifone, M.G., Trotta, R., Rippo, M.R., Festuccia, C., Santoni, A., Testi, R.: *J. Exp. Med.* 180, 1999-2004 (1994)
31. Gavioli, R., Risso, A., Smilovich, D., Baldissarro, I., Capra, M.C., Bargellesi, A., Cosulich, M.E.: *Cell. Immunol.* 142, 186-196 (1992)
32. Cebrián, M., Yague, E., Rincón, M., López-Botet, M., De Landázuri, M.O., Sánchez-Madrid, F.: *J. Exp. Med.* 168, 1621-1637 (1988)
33. Yokoyama, W.M., Seaman, W.E.: *Annu. Rev. Immunol.* 11, 613-635 (1993)
34. Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F., Tormo, J.: *J. Biol. Chem.* 276, 7312-7319 (2000)
35. Drickamer, K.: *Biol. Chem.* 263, 9557-9560 (1998)
36. Lera, A.S., Viedma, F., Sánchez-Madrid, F., Carruthers, R.A., Feizi, T.: *Protein Expr. Purif.* 20, 10-20 (2000)
37. Testi, R., Phillips, J.H., Lanier, L.L.: *J. Immunol.* 143, 1123-1128 (1989)
38. Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., Santoni, A.: *Immunol. Today* 15, 479-483 (1994)
39. Drickamer, K.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 585-590 (1999)
40. Bezouška, K., Nepovím, A., Horváth, O., Pospíšil, M., Hamann, J., Feizi T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 68-74 (1995)
41. Pavlíček, J., Sopko, B., Ettrich, R., Kopecký, V.Jr., Baumruk, V., Man, P., Havlíček, V., Vrbacký, M., Martínková, L., Křen, V., Pospíšil, M., Bezouška, K.: *Biochemistry* 42, 9295-9306 (2003)
42. Švábová, L.: *Diplomová práce, Katedra biochemie PřF UK, Praha* (2003)
43. Chambers, W., Vujanovic, N. L., DeLeo, A., Oslozovy, M.W., Herbermann, R., Hiserodt, J.: *J. Exp. Med.* 169, 1373-1385 (1997)
44. Poggi, A., Tomasello, E., Costa, P.: *Res. Immunol.* 148, 179-189 (1997)
45. Exley, M., Garcia, J., Balk, S.O., Porcelli, S.: *J. Exp. Med.* 186, 109-121 (1997)
46. Giorda, R., Rudert, W.A., Vawassori, C., Chambers, W.H., Hiserodt, J., Trucco, M.: *Science* 249, 1298-1306 (1990)
47. Plihal, O., Byrtusova, P., Pavlicek, J., Mihok, L., Ettrich, R., Man, P., Pompach, P., Havlicek, V., Husakova, L., Bezouska, K.: *Czech. Chem. Commun.* 69, 631-644 (2004)



48. Campbell, K.S., Giorda, R.: *Eur.J. Immunol.* 47, 27-39 (1997)
49. Ryan, J., Niemi, E.C., Nakamura, M.C., Seaman, W.E.: *J.Exp. Med.* 181, 1911-1925 (1995)
50. Pavlicek, J.: Vazebne vlastnosti lektinových receptoru C-typu, doktorska práce, PŘF UK, katedra biochemie (2003)
51. Byrtusova, P.: Produkce a studium molekuly NKR-P1B, diplomova práce, PŘF UK, katedra biochemie (2003)
52. Li, P., Rabinovich, B.A., Hurren, R., Shannon, J., Miller, R.G.: *Int. Immunol.* 15, 411-430 (2003)
53. Bezouska, K., Sklenar, J., Dvorakova, J., Havlicek, V., Pospisil, M., Thiem, J., Kren, V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 149-161 (1997)
54. Bezouska, K., Yuen, C.T., O'Brien, J., Childs, R.A., Chai, W., Lawson, A.M., Drbal, K., Fisarova, A., Pospisil, M., Feizi, T.: *Nature* 372, 150-162 (1994)
55. Krist, P., Vannucci, L., Kuzma, M., Man, P., Sadalapure, K., Patel, A., Bezouška, K., Pospíšil, M., Petruš, L., Lindhorst, T., Křen, V.: *ChemBiochem.* 5, 445-452 (2004)
56. Bezouška, K.: *Mol. Biotech.* 90, 269-290 (2003)
57. Bratford, M.: *Anal. Biochem.* 72, 248-256 (1976)
58. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.: *Molecular Cloning, Laboratory Manual (Second Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
59. NHS-Rhodamine, Instruction Number 46102, Pierce (2006)
60. Harvard apparatus, Guide to equilibrium dialysis, Southborough (2002)
61. Bezouška, K.: *Přednášky: Lektiny a jejich využití*, PŘF UK, Praha (2006)
62. Linkhoshertov, L. M., Novikova, O. S., Derevitskaya, V. A., and Kochetkov, N. K.: *Carbohydr. Res.* 146, C1-C5 (1986)
63. Semeňuk, T., Krist, P., Pavlíček, J., Bezouška, K., Kuzma, M., Novák, P., Křen, V.: *Glycoconjugate J.* 18, 817-826 (2001)
64. Dionex Corporation, Technical Note 53, (2004)
65. Kveberg, L., Back, J., Dai, K. Z., Inngjerdningen, M., Rolstad, B., Ryan, J. C., Vaage, V. J., Naper, Ch.: *J. Immunol.* 176, 4133-4140 (2006)