

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Rekombinantní exprese a studium  
receptorů mNKR-P1A a C**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.**

**PRAHA 2009**

**DANIEL ROZBESKÝ**

## **PROHLÁŠENÍ**

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

V Praze dne 1. 5. 2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Daniel Prošek', written over a horizontal dotted line.

podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád vyjádřil poděkování školiteli diplomové práce Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za vytvoření vynikajícího pracovního prostředí, cenné rady a připomínky. Dále moje poděkování patří všem členům Laboratoře architektury proteinů, především Mgr. Danielu Kavanovi a Mgr. Hynku Mrázkovi za ochotu kdykoliv pomoci a poradit a za příjemné zpestření práce v časech neúspěšných a nekonečných experimentů.

Velké díky patří Mgr. Ondřeji Vaňkovi za pomoc při práci s analytickou ultracentrifugou, dále Mgr. Petru Pompachovi, Ph.D. za určení lokalizace disulfidových vazeb a Mgr. Petru Novákovi, Ph.D. za změření hmotnostních spekter a cenné rady při práci se síťovacími činidly.

Doc. Ing. Richardu Hrabalovi, CSc. děkuji za promptní změření  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spekter, dále RNDr. Kateřině Hofbauerové, Ph.D. a RNDr. Vladimíru Kopeckému, Ph.D. za charakterizaci rekombinantních proteinů metodou diferenční skenovací kalorimetrie.

Ing. Petru Kolenkovi děkuji za zasvěcení do tajů krystalizace proteinů, za možnost změření dynamického rozptylu světla a hlavně za velké úsilí vynaložené při řešení struktury myšího NKR-P1A metodou rentgenové strukturní analýzy. Velké díky patří i Pavlu Hančovi za pomoc s překladem diplomové práce do češtiny. Na závěr bych chtěl poděkovat svým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

---

## OBSAH

<b>Obsah</b>	<b>4</b>
<b>Seznam zkratek</b>	<b>7</b>
<b>Předmluva</b>	<b>9</b>
<b>1. Přehled literatury</b>	<b>10</b>
1.1 NK buňky a jejich pozice v imunitním systému	10
1.2 Anatomická lokalizace, klasifikace a migrace NK buněk	11
1.3 Regulace efektorových funkcí NK buněk	12
1.4 Funkce NK buněk	13
1.4.1 Protinádorová funkce	13
1.4.2 Protivirová funkce	14
1.4.3 Regulační funkce	14
1.4.4 Další funkce NK buněk	15
1.5 Principy NK buněčného rozpoznávání	16
1.6 NK receptorová signalizace	18
1.7 Cytotoxické mechanismy NK buněk	20
1.7.1 Exocytosa cytotoxických granulí	20
1.7.2 Indukce apoptosy death receptory	21
1.8 Receptory NK buněk	21
1.8.1 Rodina receptorů KIR	21
1.8.2 Rodina receptorů Ly49	23
1.8.3 Rodina receptorů CD94/NKG2	24
1.8.4 Receptor NKG2D	25
1.8.5 Myší receptory NKR-P1A a NKR-P1C a jejich postavení v rodině receptorů NKR-P1	26
1.9 Imunoterapeutický potenciál NK buněk	28
<b>2. Cíl práce</b>	<b>31</b>
<b>3. Materiál</b>	<b>32</b>
3.1 Přístroje	32
3.2 Chemikálie	33
3.3 Enzymy	35
3.4 Inhibitory proteas	35

---

3.5 Vektory	35
3.6 Bakteriální kmeny	35
3.7 Roztoky a puřry	35
3.8 Média	36
<b>4. Metody</b>	<b>37</b>
4.1 Rekombinantní exprese proteinů	37
4.1.1 Transformace kompetentních buněk	37
4.1.2 Selektce produkčního klonu	38
4.1.3 Optimalizace produkce rekombinantního proteinu	38
4.1.4 Velkoobjemová produkce proteinů	39
4.1.5 Zjištění lokalizace exprimovaného proteinu	39
4.1.6 Izolace a purifikace inkluzních tělísek	40
4.1.7 Solubilizace inkluzních tělísek	40
4.2 Renaturace proteinů	41
4.2.1 Optimalizace renaturace proteinů	41
4.2.2 Velkoobjemová renaturace proteinů	42
4.3 Elektromigrační metody	42
4.3.1 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	42
4.3.2 Elektropřenos proteinu na PVDF membránu	44
4.4 Chromatografické metody	44
4.5 Metody sloužící k zahušťování proteinů	44
4.5.1 Ultrafiltrace	44
4.5.2 Zahušťování roztoku proteinů pomocí centrifugačních koncentrátorů	45
4.6 TCA precipitace	45
4.7 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové	45
4.8 Fluorescenční značení proteinů	46
4.9 Síťovací reakce	46
4.10 Vazebné experimenty	47
4.10.1 Vazebný test radioaktivně značených proteinů s neoglykoproteiny a přirozenými glykoproteiny	47
4.10.2 Inhibiční vazebné experimenty na mikrotitračních destičkách	48
4.10.3 Vazebné experimenty s fluorescenčně značenými proteiny	49

---

4.11 Hmotnostní spektrometrie	49
4.12 Proteinová NMR spektroskopie	50
4.13 Dynamický rozptyl světla	51
4.14 Analytická ultracentrifuga	52
4.15 Diferenční skenovací kalorimetrie	53
4.16 Proteinová krystalizace	54
<b>5. Výsledky</b>	<b>55</b>
5.1 Úvod k výsledkům	55
5.2 Rekombinantní exprese mNKR-P1A a mNKR-P1C	57
5.2.1 Transformace kompetentních buněk a selekce produkčních klonů	57
5.2.2 Optimalizace produkce rekombinantních proteinů	59
5.2.3 Velkoobjemová produkce proteinů a zjištění jejich lokalizace	60
5.2.4 Izolace, purifikace a solubilizace inkluzních tělísek	61
5.3 Optimalizace renaturace a purifikace rekombinantních proteinů	62
5.3.1 Optimalizace renaturace	62
5.3.2 Ověření homogenity proteinových preparátů SDS elektroforézou	64
5.3.3 Finální chromatografie na Superdexu 75 HR 10/30	64
5.3.4 Analýza optimalizace renaturace a stanovení koncentrace proteinů	66
5.4 Ověření homogenity proteinových preparátů hmotnostní spektrometrií	67
5.5 Izotopové značení rekombinantních proteinů	68
5.6 Ověření poskládání proteinových preparátů NMR spektroskopii	70
5.7 Vyšetření biochemické a fyzikálně-chemické stability mNKR-P1A a mNKR-P1C <i>in vitro</i>	71
5.8 Fluorescenční značení mNKR-P1A a mNKR-P1C	73
5.9 Vazebné experimenty	75
5.10 Síťovací reakce	83
5.11 Studium mNKR-P1A a mNKR-P1C metodami DLS a AUC	84
5.12 Určení lokalizace disulfidových vazeb v mNKR-P1A a mNKR-P1C	87
5.13 Krystalizace proteinů a rentgenová strukturní analýza	88
<b>6. Diskuze</b>	<b>92</b>
<b>7. Souhrn</b>	<b>98</b>
<b>8. Seznam použité literatury</b>	<b>99</b>

**SEZNAM ZKRATEK**

<b>ADCC</b>	cytotoxická reakce založená na protilátkách ( <b>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</b> )
<b>AUC</b>	analytická ultracentrifuga
<b>Bis-Tris</b>	bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin ( <b>Bovine Serum Albumin</b> )
<b>CD</b>	diferenční antigen ( <b>Cluster of Differentiation</b> )
<b>CTL</b>	cytotoxický T lymfocyt ( <b>Cytotoxic T Lymphocyte</b> )
<b>CTLD</b>	doména podobná lektinům C-typu ( <b>C-Type Lectin-like Domain</b> )
<b>DC</b>	dendritická buňka ( <b>Dendritic Cell</b> )
<b>DLS</b>	dynamický rozptyl světla ( <b>Dynamic Light Scattering</b> )
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDC</b>	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ESI</b>	ionizace elektroprayem ( <b>ElectroSpray Ionization</b> )
<b>FT-ICR</b>	iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
<b>GVHD</b>	reakce štěpu proti hostiteli ( <b>Graft-Versus-Host-Disease</b> )
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxymethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
<b>HLA</b>	hlavní lidský (histokompatibilní) antigen ( <b>Human Leukocyte Antigen</b> )
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kapalinová chromatografie ( <b>High Performance Liquid Chromatography</b> )
<b>HSQC</b>	<b>Heteronuclear Single Quantum Coherence</b>
<b>IFN</b>	interferon
<b>IL</b>	interleukin
<b>IPTG</b>	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
<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 (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors)
<b>LAK</b>	buňky-zabíječi aktivované lymfokinem (Lymphokine Activated Killers)
<b>LB medium</b>	Luria-Bertani medium
<b>LRC</b>	genový komplex leukocytárních receptorů (Leukocyte Receptor Complex)
<b>MALDI</b>	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
<b>MCMV</b>	myší cytomegalovirus (Mouse CytoMegalovirus)
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
<b>NK</b>	přírozený zabíječ (Natural Killer)
<b>NKC</b>	genový komplex přírozených zabíječů (Natural Killer Complex)
<b>OD</b>	optická densita (Optical Density)
<b>PAMP</b>	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (Pathogen-Associated Molecular Pattern)
<b>PEG</b>	polyethylenglykol
<b>PIPES</b>	piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina)
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonylfluorid
<b>PVDF</b>	polyvinylidendifluorid
<b>RCMV</b>	potkaní cytomegalovirus (Rat CytoMegalovirus)
<b>SDS</b>	dodecylsírán sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
<b>TCA</b>	trichloroctová kyselina (TriChloroacetic Acid)
<b>TCR</b>	receptor T lymfocytů pro antigen (T-Cell Receptor)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
<b>TFA</b>	trifluoroctová kyselina (TriFluoroacetic Acid)
<b>TGF</b>	transformující růstový faktor (Transforming Growth Factor)
<b>T<sub>H</sub></b>	pomocný T lymfocyt (Helper T Cell)
<b>TLR</b>	receptory rodiny Toll (Toll-Like Receptors)
<b>TNF</b>	faktor nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Factor)
<b>TOF</b>	doba letu částice (Time Of Flight)
<b>TRAIL</b>	ligand rodiny TNF indukující apoptosu (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan

## **PŘEDMLUVA**

Významnou součástí imunitního systému jsou NK buňky, které jsou schopné rozpoznávat a zabíjet některé nádorové a virem infikované buňky. Rozpoznání abnormálních buněk je zprostředkováno receptory, které se nacházejí na povrchu NK buněk. Mezi nejstarší a nejznámější NK receptory patří také mNKR-P1A a mNKR-P1C, které byly předmětem studia mé diplomové práce. Ačkoliv od objevu těchto receptorů uplynulo už téměř 20 let, představují i přes intenzivní výzkum velkou neznámou. Jejich struktura, vazebná specifita, fyziologický ligand a funkce jsou zahalené rouškou tajemství.

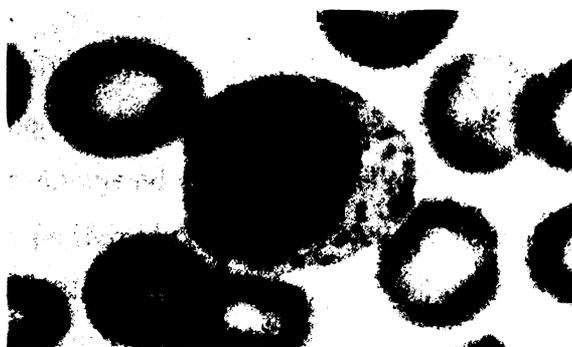
Cílem diplomové práce bylo připravit část extracelulární domény obou receptorů a charakterizovat je z hlediska stability, struktury a vazebné specifiity.

Výsledky prezentované v diplomové práci nejsou jen novým poznatkem ve světě NK buněk, ale kombinace uvedených znalostí o struktuře a vazebné specifitě může najít uplatnění v klinické sféře, například při návrhu glykomimetik a jejich použití v protinádorové terapii.

# 1. PŘEHLED LITERATURY

## 1.1 NK buňky a jejich pozice v imunitním systému

V roce 1975 Kiessling *et al.* charakterizoval populaci lymfocytů, která byla schopná bez předchozí stimulace zabíjet buňky některých nádorových linií. Tyto lymfocyty byly na základě své funkce označeny jako přirození zabíječi, resp. NK buňky (z angl. Natural Killers) [1]. Několik let byly NK buňky situované na okraji zájmu výzkumu a pro většinu imunologů představovaly záhadu. Základní principy a mechanismy světa NK buněk se začaly postupně odkrývat až v 90. letech 20. století a toto úsilí přetrvává dodnes. Zároveň se začínají objevovat snahy využít jejich unikátních vlastností v terapii některých onemocnění.



Obr. 1 Mikroskopický obrázek NK buňky [5].

V současné době se NK buňky definují jako samostatná lymfoidní populace schopná zabíjet alogenní a některé autologní buňky, které podlely maligní transformaci, intenzivnímu stresu, případně bakteriální nebo virové infekci. Významná je i jejich regulační funkce, a proto se často označují za jakousi spojku mezi přirozenou a adaptivní imunitou [2]. NK buňky

nemají unikátní diferenciační znak (nebo alespoň není žádný doposud znám), protože jejich povrchové molekuly jsou sdíleny hlavně s T, ale i B lymfocyty a některými buňkami myeloidní linie. I přesto se často charakterizují fenotypem  $CD3^-CD16^{+/-}CD56^+CD161^{+/-}$  [2, 3]. Podle Lorenze Moretty by vhodnějšími diferenciačními znaky byly receptory NKp46 a NKp30, které jsou na rozdíl od CD16, CD56 a CD161 pro NK buňky vysoce specifické [4]. Z morfologického hlediska jsou NK buňky velké granulózní lymfocyty (*obr. 1*) a jejich morfologie je závislá na stupni aktivace a maturace [2, 5].

NK buňky se diferencují, podobně jako T a B lymfocyty, z lymfoidního progenitoru. Na rozdíl od T a B lymfocytů je pro ně charakteristická absence antigeně specifických receptorů. Principy rozpoznávání abnormálních buněk jsou v porovnání s T a B lymfocyty mnohem komplexnější [6]. V mnohých aspektech se podobají T lymfocytům, například s CTL (cytotoxický T lymfocyt) sdílejí stejné mechanismy cytotoxického zabíjení, a podobně jako CTL a  $T_H1$  jsou i NK buňky významnými producenty  $IFN-\gamma$ . Významným rozlišovacím znakem v produkci cytokinů je neschopnost produkovat IL-2. Působení NK buněk a CTL v imunitním systému je navzájem komplementární. Zatímco CTL rozpoznávají na povrchu

buněk komplex peptid-MHC I, cílem NK buněk jsou naopak buňky s potlačenou expresí MHC I. Redukce exprese MHC I je charakteristická pro některé nádorové a viry infikované buňky, které se tímto mechanismem snaží vyhnout působení CTL. Na rozdíl od CTL jsou NK buňky schopny reagovat na přítomnost abnormální buňky velmi rychle (v řádu minut), a to bez předcházející stimulace, proliferace a diferenciaci jako je tomu u T lymfocytů. Pohotová reakce na škodliviny a konstitutivní exprese invariantních NK receptorů je v imunitním systému staví do role obránců první linie [2, 7, 8].

## 1.2 Anatomická lokalizace, klasifikace a migrace NK buněk

NK buňky jsou distribuované po celém organismu, nacházejí se v lymfatických i nelymfatických tkáních. Ze všech lymfocytů představují minoritní frakci, přičemž jejich největší výskyt byl pozorován v plicích, játrech a slezině. Výskyt v periferní krvi člověka fluktuuje od 2 do 18 % z celkového počtu lymfocytů. Poločas života maturovaných NK buněk v periferní krvi myši i člověka se pohybuje od 7 do 10 dnů [9, 10, 11, 12].

Na základě fenotypových, funkčních a anatomických atributů se NK buňky klasifikují do několika subpopulací. Myší NK buňky se dělí podle povrchové exprese CD11b a CD27 do třech subpopulací, které se liší distribucí v tkáních a intenzitou efektorových funkcí.  $CD11b^{dull}CD27^+$  se nacházejí převážně v kostní dřeni a lymfatických uzlinách,  $CD11b^+CD27^{dull}$  jsou hojné v krvi, slezině, plicích a játrech, zatímco  $CD11b^+CD27^+$  jsou poměrně homogenně distribuované po celém organismu.  $CD11b^+CD27^+$  a  $CD11b^+CD27^{dull}$  vykazují v porovnání s  $CD11b^{dull}CD27^+$  vyšší cytotoxicitu [13, 14].

Lidské NK buňky jsou rozdělené na dvě subpopulace, které se liší hlavně v efektorových a migračních vlastnostech. Subpopulace  $CD56^{dim}$  exprimuje CD16 a perforin, vyskytuje se převážně v periferní krvi a slezině, a je výrazně cytotoxická s charakteristickou produkcí  $IFN-\gamma$  po interakci s nádorovými buňkami *in vitro*. V lymfatických uzlinách dominují  $CD56^{bright}$  s charakteristickou absencí CD16 a intracytoplazmatického perforinu. Po stimulaci produkují  $IFN-\gamma$  spolu s cytokiny IL-12, IL-15 a IL-18 [15, 16, 17].

Na migraci NK buněk do ložiska zánětu participují různé chemokinové receptory, u myši hlavně CCR2, CCR5, CXCR3 a CX3CR1, u člověka pravděpodobně CXCR1 a ChemR. Vstup NK buněk do lymfatických uzlin z krve je závislý na CD62L. Za homing NK buněk do plic, sleziny a krve je zodpovědný receptor  $S1P_5$  [9, 18, 19, 20, 21].

### 1.3 Regulace efektorových funkcí NK buněk

Intenzita a kvalita cytotoxické a cytokinové odpovědi NK buněk závisí na cytokinovém mikroprostředí a interakci s buňkami imunitního systému, především s DC (dendritické buňky), T buňkami a makrofágy. Účinnými aktivátory efektorových funkcí NK buněk jsou interferony I. typu, IL-12, IL-18 a IL-15 [22].

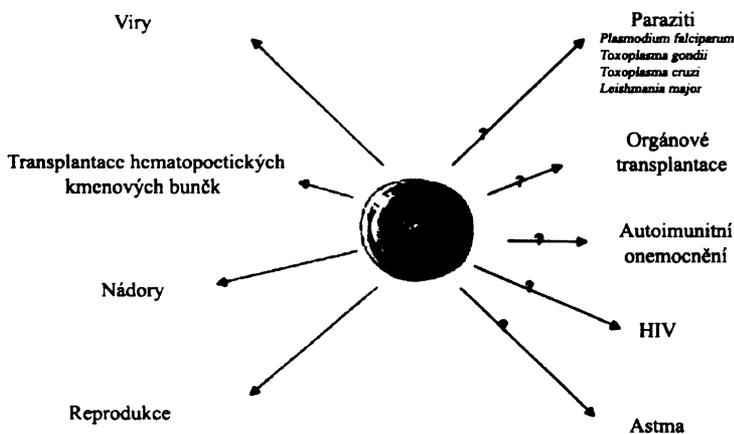
Na aktivaci NK buněk *in vivo* participují do značné míry DC, jak bylo demonstrováno na pokusech s myšmi a později i lidskými NK buňkami. Pro aktivaci je potřebná přítomnost některých cytokinů a zřejmě i přímý kontakt s DC [23, 24, 25]. Po interakci maturovaných DC s NK buňkami dochází k formování DC-NK buněčného kontaktu označovaného také jako stimulační synapse. Výsledkem této interakce je polarizace DC a masivní sekrece IL-12 na povrch NK buňky. IL-12 se ukazuje jako klíčový cytokin v indukci aktivace NK buňky, která je spojená se sekrecí IFN- $\gamma$  a zvýšením cytotoxicity [26, 27]. NK buňky mohou být aktivovány i IFN I. typu, které jsou hojně produkovány hlavně plasmocytoidními DC a mastocyty [28, 29]. Jiný mechanismus aktivace NK buněk je založený na Toll-like receptorech TLR3 a TLR9, které rozpoznávají evolučně konzervované bakteriální a virové struktury označované jako PAMPy [30].

V lymfatických uzlinách může docházet ke stimulaci NK buněk účinkem IL-2 produkovaného CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, který se váže na vysokoafinní receptor pro IL-2 a následně spouští signalizační kaskádu, která vede k NK buněčné proliferaci, aktivaci cytotoxických mechanismů a produkci cytokinů [31]. Na myších modelech bylo prokázáno, že po infiltraci nádoru CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a NK buňkami, CD8<sup>+</sup> T lymfocyty poskytují NK buňkám pomoc neznámé povahy, která vede k aktivaci cytotoxických mechanismů a následné rejekci nádoru. Molekulární mechanismus této unikátní interakce zůstává doposud nejasný [32]. Aktivita NK buněk může být regulovaná i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulačními T lymfocyty, především jejich membránově vázaným TGF- $\beta$ , který participuje na supresi efektorových funkcí NK buněk a potlačení exprese aktivačního receptoru NKG2D [33, 34, 35].

Po aktivaci NK buněk dochází často k reciproční regulaci různých buněčných typů jako DC, T lymfocytů, B lymfocytů a endoteliálních buněk. Základní principy reciproční regulace NK buněk jsou popsány v následující kapitole.

## 1.4 Funkce NK buněk

NK buňky mají kromě schopnosti eliminovat některé nádorové a viry infikované buňky i důležitou úlohu v regulaci imunitních reakcí, kde vytváří jakousi spojku mezi přirozenou a adaptivní imunitou. V současnosti se velký význam připisuje aloreaktivním NK buňkám, ať už v boji proti nádorům nebo v prevenci jak rejekce tak GVHD (graft-versus-host disease) po transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Zdá se, že NK buňky mají významné postavení i v reprodukci, dále v patogenezi autoimunit, astma a infekce HIV (obr. 2). Stručný přehled některých funkcí NK buněk je uveden v následujících odstavcích.



Obr. 2 Známé a předpokládané funkce NK buněk. Upraveno podle [77].

### 1.4.1 Protinádorová funkce

Schopnost NK buněk cytotoxicky zabít některé nádorové buňky byla potvrzena početnými studiemi na myších a potkaních modelech *in vivo*, ale i na mnohých lidských buněčných liniích *in vitro* [2]. Principy rozpoznávání nádorových buněk jsou založeny na přítomnosti nebo absenci některých ligandů NK receptorů

(například potlačená exprese MHC I nebo zvýšená exprese ligandů receptoru NKG2D případně ligandu receptoru CD27) [36, 37, 38, 39].

Úloha NK buněk v pozici imunitního dozoru byla dokumentovaná na mnohých myších modelech se spontánními i indukovanými nádory. Například NK deficientní myši jsou v porovnání s neimunokompromitovanými myši náchylnější na sarkomy indukované methylcholanthrénem [40]. Klíčová funkce imunitního dozoru myších NK buněk byla pozorována v případě růstu spontánních B lymfomů [41].

Protinádorová funkce NK buněk u lidí je demonstrována na jedincích s imunodeficiencemi nebo dysfunkcemi NK buněk [42]. Epidemiologické studie jasně dokazují, že snížená aktivita NK buněk u lidí koreluje se zvýšenou incidencí nádorových onemocnění [43].

### 1.4.2 Protivirová funkce

NK buňky jsou spolu s interferony první linií v obraně proti virům. Z myších experimentálních modelů je zřejmé jejich klíčové postavení v obraně proti viru *Herpes simplex 1*, dále viru chřipky a poxviru *Ectromelia* [44]. Protivirovou aktivitu myších NK buněk dokumentuje fakt, že jedinci s defekty nebo dysfunkcemi NK buněk, vykazují vyšší náchylnost k infekci MCMV (myší cytomegalovirus) [44, 45]. Důkazem je i exprese velkého množství decoy („maskovacích“) ligandů herpesviru v snaze vyhnout se působení NK buněk. Známým decoy ligandem je například potkaní ligand RCTL potkaního RCMV, který vykazuje homologii s ligandem Clr-b, což je ligand inhibičních receptorů NKR-P1D a NKR-P1B [46].

Mechanismy rozpoznávání infikovaných buněk se liší v závislosti na použitém myším modelu. V případě infekce C57/BL6 myší herpesvirem MCMV, NK buňky selektivně rozpoznávají povrchovou molekulu m157 kódovanou virem MCMV prostřednictvím receptoru Ly49H [47, 48]. V myších kmenech s defektními Ly49H dochází k interakci jiných párů receptor-ligand, například u Ma/My myší je to interakce mezi Ly49P a H-2D<sup>k</sup> [49].

Epidemiologické studie s lidskými jedinci s absencí nebo defekty NK buněk poukazují na význam NK buněk především v obraně před infekcemi lidskými herpesviry. Otázka, zda je funkce NK buněk v obraně proti virům redundantní nebo unikátní je v současnosti předmětem diskusí mnohých imunologů [42].

### 1.4.3 Regulační funkce

NK buňky mají kromě schopnosti zabít některé abnormální buňky i významnou schopnost regulovat mnohé imunitní reakce a tím ovlivňovat spektrum procesů v přirozené i adaptivní imunitě.

Významné postavení má nedávno popsána interakce mezi DC a NK buňkami. Aktivované NK buňky mohou regulovat dva protichůdné procesy u DC, a to maturaci DC nebo cytotoxickou eradikaci imaturovaných myeloidních DC [50, 51, 52, 53]. Imaturované myeloidní DC mají potlačenou expresi MHC I, a proto jsou senzitivní na působení NK buněk. Rezistenci k působení NK buněk získávají až po internalizaci antigenu, kdy dochází ke zvýšení exprese MHC I [54]. Mezi NK receptory zahrnuté do procesu rozpoznávání a eliminace DC patří NKp30 a DNAM-1 [55, 56]. Předpokládá se, že likvidace imaturovaných DC má význam v regulaci homeostázy DC [50, 57]. Na druhou stranu NK buňky participují i na procesu maturace DC, a to sekrecí TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  [58].

NK buňky mají kromě DC velký vliv i na adaptivní imunitu. Cytotoxická likvidace některých abnormálních buněk potencuje prezentaci, případně i crossprezentaci antigenu DC a následně může vyvolat  $T_H1$ ,  $T_H2$  imunitní reakci nebo aktivaci CTL.  $IFN-\gamma$  produkovaný NK buňkami může participovat na polarizaci  $CD4^+$  T lymfocytů do  $T_H1$  linie. Předpokládá se, že NK buňky mají význam v ochraně před některými autoimunitními chorobami a to takový, že se podílejí na supresi některých autoreaktivních T a B lymfocytů [59, 60, 61].

Po objevení cytokinu CX3C, nazývaného též fraktalkin, se zjistilo, že NK buňky jsou zřejmě zahrnuté v patogenezi vaskulopatií a dysfunkcí některých orgánů. Fraktalkin, který je exprimovaný na povrchu endoteliálních buněk může aktivovat NK buňky, tím že se váže na receptor CX3CR1. Tato nechtěná aktivace NK buněk je pro endoteliální buňky letální a může vyústit až v poškození cév [62].

Nedávno byla charakterizovaná nová subpopulace tzv. děložních NK buněk označovaných uNK (z angl. uterine natural killer), která zastává významnou úlohu v reprodukci. uNK osídlují endometrium dělohy, kde iniciují strukturální změny a angiogenezi produkcí různých proangiogenních faktorů, například VEGF, PLGF a NKG5. Diferenciace, aktivace a funkce uNK buněk jsou doposud zahalené rouškou tajemství. S jejich objevem se zároveň vynořuje otázka participace na neplodnosti a spontánních abortech [63, 64, 65].

#### 1.4.4 Další funkce NK buněk

NK buňky jsou zodpovědné za mnohé imunopatologické reakce. U pacientů s hepatitidou typu B indukují apoptosu hepatocytů, čímž přispívají k destrukci a amplifikaci zánětu v játrech [66]. NK buňky se dávají do souvislosti i s poškozením  $\beta$  buněk Langerhansových ostrůvků na myších modelech diabetu indukovaného virem coxsackie B4 [67]. Dále se spojují s mnohými zánětlivými onemocněními jako artritida či sarkoidóza [68, 69]. Dalším negativním aspektem je markantní účast na dysregulaci imunitní odpovědi během septického šoku [70, 71].

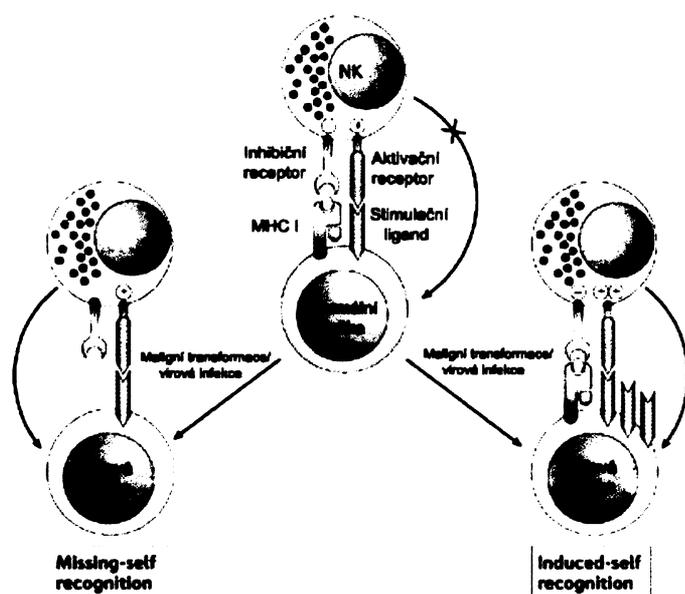
Mnohé studie poukazují na význam NK buněk v obraně proti protozoálním parazitům jako *Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma gondi* a *Trypanosoma* hlavně včasnou produkcí  $IFN-\gamma$  a následnou aktivací makrofágů [72, 73].

Dva protichůdné efekty NK buněk byli popsány u pacientů s infekcí HIV. Interakce aktivačního receptoru KIR3DS1 s molekulou HLA-Bw4, která je exprimována na povrchu buněk infikovaných virem HIV, vede k eradikaci infikované buňky a následnému zpomalení

progrese infekce HIV [74, 75]. Na druhou stranu rozpustný peptid o sekvenci NH<sub>2</sub>-SWSNKS-COOH, který se odštěpuje z glykoproteinu gp41 viru HIV-1, indukuje na povrchu neinfikovaných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů expresi ligandu receptoru NKp44, čímž se stávají CD4<sup>+</sup> T lymfocyty velmi senzitivní k působení NK buněk. Výsledkem interakce s NK buňkou je cytotoxická eradikace neinfikovaných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, což přispívá k dalším masivním ztrátám T lymfocytů [76].

## 1.5 Principy NK buněčného rozpoznávání

Narozdíl od T a B lymfocytů, specifita NK buněk k cílovým buňkám není daná jedním antigenně specifickým receptorem, ale je určena komplexním repertoárem aktivačních a inhibičních receptorů, které jsou exprimované na povrchu každé NK buňky [78]. Zatímco aktivační receptory indukují efektorové funkce NK buněk, inhibiční je naopak suprimují. Aktivace NK buňky závisí jak na expresi aktivačních a inhibičních ligandů na cílových buňkách, tak i na přítomnosti receptorů specifických pro exprimovaný ligand a na dynamické



Obr. 3 Aktivita NK buňky je určena dynamickou rovnováhou mezi aktivačními a inhibičními receptory. K indukci efektorových funkcí NK buňky dochází, když má cílová buňka sníženou expresi MHC I nebo naopak zvýšenou expresi některých vlastních proteinů, ke které dochází účinkem stresu, maligní transformace nebo virové infekce. Upraveno podle [82].

rovnováze mezi aktivačními a inhibičními signály, které jsou transmitované stimulovanými NK receptory [79, 80].

V současnosti jsou známe tři, případně až čtyři, strategie NK buněčného rozpoznávání cílových buněk. Nejstarší strategií je tzv. *missing-self recognition* (obr. 3), podle které NK buňky detekují a následně eliminují buňky se sníženou expresí MHC I [81]. Snížená exprese MHC I je charakteristická pro některé nádorové a virem infikované buňky, které se tímto mechanismem snaží vyhnout působení CTL. Molekuly MHC I jsou ligandy některých

inhibičních receptorů, a proto jejich nepřítomnost na cílové buňce vyvolává absenci inhibičních signálů v signalizaci NK buňky. Výsledkem je pokles signalizačních prahů, které musí být překonány aktivačními signály, aby došlo k plné aktivaci NK buňky [83, 84]. Samotná absence nebo snížená exprese MHC I však k aktivaci NK buňky resp. indukci efektorových funkcí nepostačuje. Kromě potlačené exprese MHC I je potřebné, aby cílová buňka exprimovala na povrchu ligandy aktivačních receptorů. A proto buňky, které na svém povrchu neexprimují ani MHC I ani ligandy aktivačních receptorů, nejsou NK buňkami eliminovány. Tento fakt je jedním z vysvětlení, proč NK buňky neatakují erythrocyty, pro které je charakteristická absence MHC I [82, 85].

Další známou strategií rozpoznávání cílových buněk je *induced-self recognition* (obr. 3). Podle této strategie NK buňky rozeznávají pomocí aktivačních receptorů buňky se zvýšenou expresí některých vlastních povrchových proteinů. Předpokládá se, že tyto proteiny jsou s velmi nízkou intenzitou exprimované na povrchu zdravých buněk a ke zvýšení jejich exprese dochází účinkem stresu, maligní transformace nebo virové infekce. Typickým příkladem jsou stresem indukované proteiny MICA a MICB, které rozpoznává aktivační receptor NKG2D [86, 87, 88, 89].

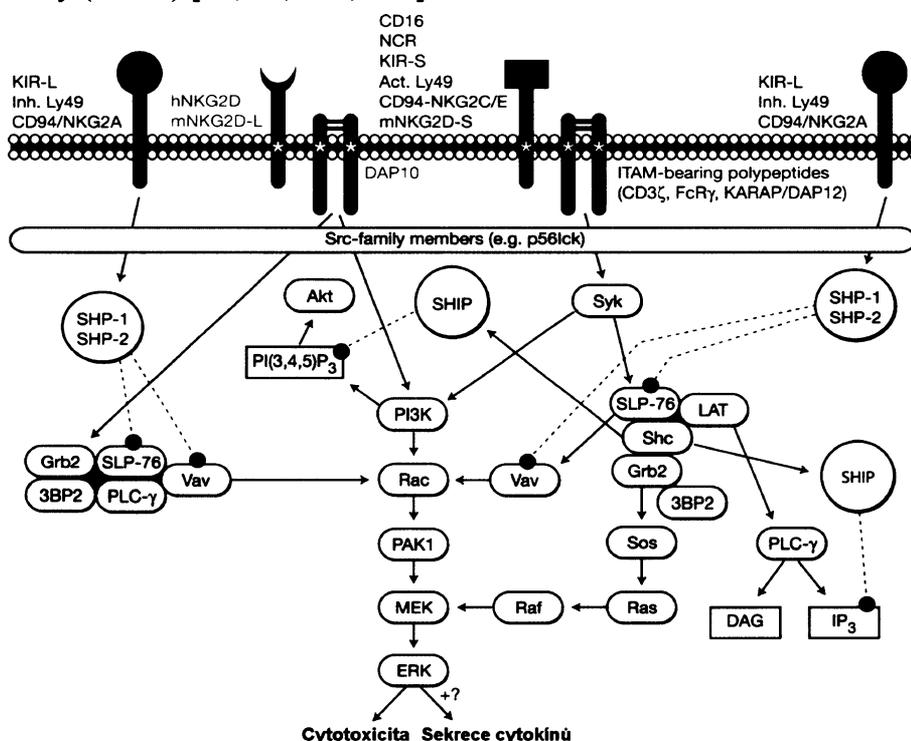
Další a nejméně prozkoumanou strategií rozpoznávání je *infectious non-self*. Princip *infectious non-self* strategie je založený na rozpoznávání některých evolučně konzervovaných struktur, které jsou sdílené mnohými patogeny. Na rozpoznávání těchto struktur, často označovaných jako PAMPy, participují některé patogen-specifické receptory NK buněk. Známým příkladem je aktivační receptor Ly49H, který váže protein m157 exprimovaný myším cytomegalovirem (MCMV) [90, 91, 92, 93].

Další způsob detekce cílových buněk může být zprostředkovaný protilátkami. NK buňky mohou pomocí povrchové molekuly CD16, což je Fc $\gamma$ RIII receptor, rozpoznávat buňky opsonizované protilátkami IgG. Interakce CD16 s Fc částí IgG vede ke spuštění signalizační kaskády, která rezultuje v indukci efektorových funkcí. Tento děj se nazývá cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC) [2, 95].

## 1.6 NK receptorová signalizace

Významným atributem NK receptorové signalizace jsou konzervované sekvence aminokyselin, které se nachází buď v cytoplazmatické části receptoru nebo jsou součástí adaptorové molekuly, která nekovalentně interaguje s receptorem.

Téměř všechny známé inhibiční receptory NK buněk disponují jedním nebo více intracytoplazmatickými motivy ITIM s konzervovanou sekvencí I/S/V/LxYxxL/V, kde x je libovolná aminokyselina [96, 97]. Po navázání ligandu na inhibiční receptor dochází k fosforylaci tyrosinu ITIM motivu protein-tyrosin-kinasami rodiny Src a k následné asociaci s fosfatasami SHP-1 nebo SHP-2, které se preferenčně váží na fosfotyrosin ITIMu prostřednictvím svých SH-2 domén. Výsledkem uvedených interakcí je zvýšení aktivity fosfatas a jejich následná účast na přímé nebo nepřímé defosforylaci intracelulárních signalizačních proteinů jako FcεRIγ, ZAP70, Syk, PLCγ1, PLCγ2, Shc, LAT, SLP76 a Vav-1. Další známou fosfatasou je inositol-fosfatas SHIP, která participuje na defosforylaci 5'-fosfátu z fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu. Finálním efektem defosforylace uvedených proteinů a substrátů je inhibice signalizačních kaskád, které vedou k indukci efektorových funkcí NK buňky (obr. 4) [98, 99, 100, 101].



Obr. 4 NK receptorová signalizace. Znáznorněny jsou inhibiční receptory (červeně) se specifitou pro MHC I, dále aktivační receptory asociované s adaptory nesoucími ITAM motiv (modře) a aktivační receptor NKG2D asociovaný s adaptorem DAP10 (zeleně). Hvězdička znázorňuje přítomnost nabitě aminokyselin v transmembránovém segmentu. Upraveno podle [102].

Signalizace některých aktivačních receptorů je založena na asociaci s adaptorovými proteiny, které disponují jedním nebo třemi ITAM motivy s konzervovanou sekvencí D/Ex<sub>(7-8)</sub>D/ExxYxx(L/I/V)<sub>x(7)</sub>YxxL/I/V [103]. NK buňky exprimují tři adaptorové proteiny obsahující ITAM motivy, a to FcεRIγ, CD3ζ a DAP12 [104, 105, 106]. Dalším známým adaptorovým proteinem je DAP10, který však disponuje neklasickým ITAM motivem s konzervovanou sekvencí YxxM [107]. Všechny uvedené adaptorové proteiny mají v transmembránovém segmentu záporně nabitou kyselinu asparagovou, která je zodpovědná za elektrostatickou interakci a asociaci s aktivačními receptory, které mají v transmembránové části kladně nabitý lysin nebo arginin. Po navázání ligandů na aktivační receptory dochází k formování oligomerních aktivačních komplexů, což vede k aktivaci protein-tyrosin-kinas rodiny Src (p56<sup>lck</sup> a p59<sup>fyn</sup>), které fosforylují tyrosiny na ITAM motivech. Na fosfotyrosiny ITAM motivů se následně váží protein-tyrosin-kinasy rodiny Syk (Syk a ZAP70), které se po následné aktivaci zapojují do signalizační kaskády. Významnou úlohu v integraci a propagaci signálu mají různé transmembránové a cytosolové adaptory jako LAT, SLP-76, 3BP2. Například po fosforylaci adaptoru LAT dochází ke kontaktu s PLCγ a její následné aktivaci, což vede ke spuštění dobře prozkoumané signalizační kaskády. Další spuštěná signalizační kaskáda zahrnuje aktivaci malého G-proteinu Ras, následně serin/threonin-kinasu Raf, dále protein-kinasu MEK, která fosforylačně aktivuje další proteinkinasu ERK. Tato aktivovaná kinasa stimuluje další kinasy, což nakonec rezultuje v aktivaci transkripčních programů, které vedou k indukci cytotoxicity a produkci cytokinů [108, 109].

Signalizační kaskáda spouštěná aktivačním receptorem NKG2D, který nekovalentně asociuje s adaptorem DAP10 (myší NKG2D může asociovat i s DAP12), se liší od ITAM-dependentních signalizačních drah. Jedním z rozdílů je nezávislost na proteinkinásách rodiny Syk, dále použití odlišných isoformů signalizačních proteinů Vav a nakonec neschopnost aktivovat sekreci cytokinů [110, 111].

Každopádně indukce efektorových funkcí NK buňky závisí jak na expresi aktivačních a inhibičních ligandů na cílových buňkách, tak na přítomnosti receptorů specifických pro exprimovaný ligand, stejně jako i na dynamické rovnováze mezi aktivačními a inhibičními signály, které jsou transmitované stimulovanými NK receptory.

## 1.7 Cytotoxické mechanismy NK buněk

NK buňky zabíjejí cílové buňky prostřednictvím dvou mechanismů. Nejpoužívanějším mechanismem je exocytosa cytotoxických granulí, tím druhým je mechanismus využívající death receptory.

### 1.7.1 Exocytosa cytotoxických granulí

Ke smrti cílové buňky indukované mechanismem cytotoxických granulí, dochází velmi rychle (do 5 minut), čímž se zamezuje replikaci a dalšímu šíření potenciálního patogenu. Mechanismus využívá cytotoxické granule nacházející se v cytoplazmě NK buňky [112, 113]. Součástí cytotoxických granulí je perforin a granzymy. Perforin je protein homologický komplementovému proteinu C9 a podobně jako on je schopný vytvářet v membráně homopolymerní cirkulární póry s průměrem 15-16 nm [114]. Granzymy jsou serinové proteasy, které spouštějí signalizační kaskádu vedoucí k apoptose buňky [115].

Po rozpoznání cílové buňky dochází k polarizaci mikrotubulárního systému NK buňky a následné migraci cytotoxických granulí k plus konci mikrotubulů směrem ke kontaktu s cílovou buňkou, který se označuje jako imunologická synapse. Původně se předpokládalo, že po fúzi cytotoxických granulí s cytoplazmatickou membránou NK buňky dochází k uvolnění jejich obsahu v místě imunologické synapse, a že perforin vytváří v cytoplazmatické membráně cílové buňky póry, přes které se do cytoplazmy dostávají granzymy, které následně indukují apoptosu. Tato hypotéza se však ukázala jako nesprávná [116]. V současnosti se předpokládá, že granzymy jsou spolu s perforinem internalizované endocytózou, na které participuje manosa-6-fosfátový receptor [117] a až po internalizaci dochází v membráně endosomu k formování pórů, přes které se do cytoplazmy cílové buňky dostávají granzymy. Granzym B následně aktivuje kaspasy, které spouštějí signalizační kaskádu vedoucí k fragmentaci DNA, což vede ke smrti buňky. Granzym A zase indukuje apoptosu nezávisle na kaspasach tím, že generuje jednořetězcové zlomy v DNA a štěpí laminy [118, 119]. Rezistence NK buňky k perforinu a granzymům je daná jednak membránově vázaným katepsinem B, který štěpí perforin a blokuje formování pórů na membráně NK buňky, a jednak inhibitory granzymů, které se označují jako serpiny [120, 121].

### 1.7.2 Indukce apoptozy death receptory

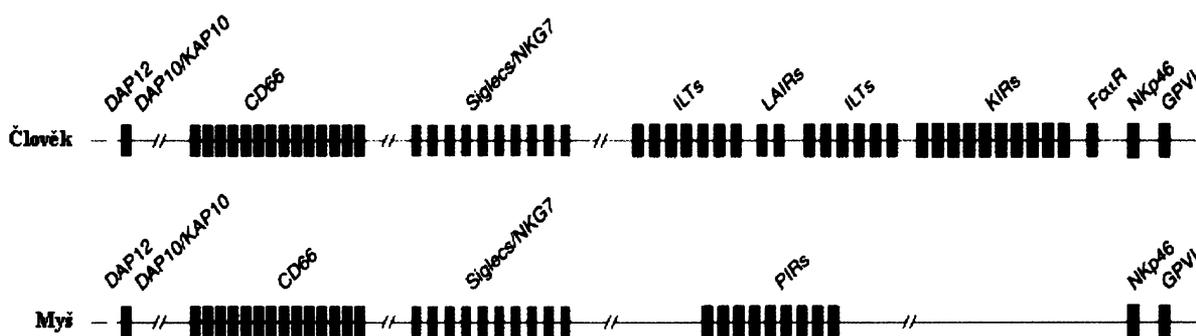
Na povrchu NK buňky se mohou nacházet proteiny rodiny TNF, které po interakci s death receptory indukují apoptosu cílové buňky. Jedním z těchto proteinů je TRAIL známý také jako Apo2 ligand, což je transmembránový protein II. typu s markantní expresí po stimulaci IFN- $\gamma$  nebo IL-15. Doposud bylo charakterizováno pět receptorů pro TRAIL a z toho dva, TRAIL-R1 a TRAIL-R2, po navázání molekuly TRAIL spouštějí signální kaskádu vedoucí k apoptose cílové buňky [122, 123]. Dalším významným apoptickým proteinem, který je po stimulaci IFN- $\gamma$  exprimován na povrchu NK buněk, je Fas-ligand (FasL). Po navázání FasL na death receptor Fas (CD95), který je přítomný na povrchu různých typů buněk, dochází opět ke spuštění signální kaskády, která vyústí v apoptosu [124, 125].

## 1.8 Receptory NK buněk

V této kapitole podávám stručný přehled nejznámějších receptorových rodin NK buněk se zaměřením na strukturu, signalizaci, ligandy a biologickou funkci jednotlivých receptorů.

### 1.8.1 Rodina receptorů KIR

Lidské receptory KIR jsou transmembránové glykoproteiny I. typu disponující dvěma nebo třemi imunoglobulinovými doménami v extracelulárním segmentu. Jejich exprese byla pozorována na povrchu NK buněk a na některých subpopulacích T lymfocytů.



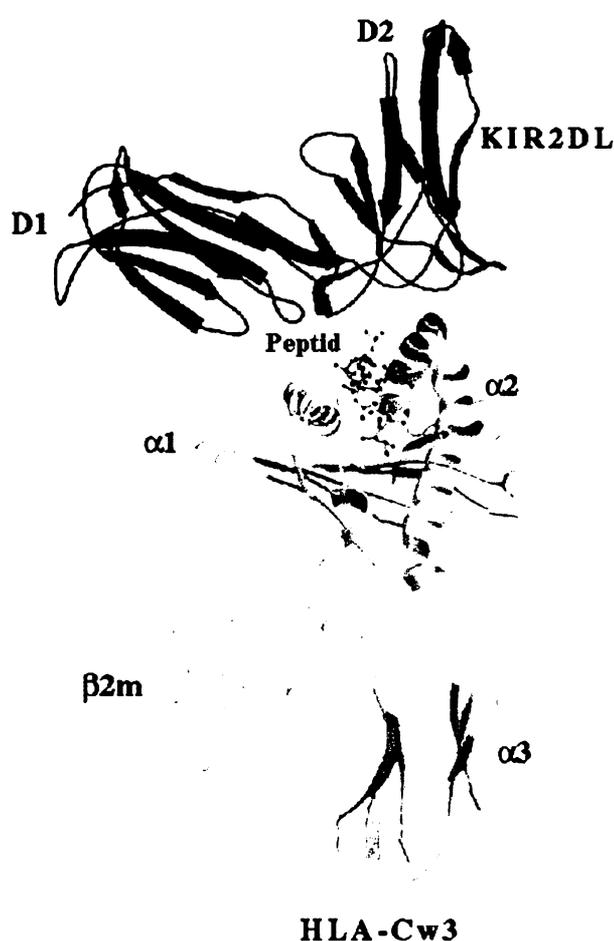
Obr. 5 Schematická mapa lidského a myšního LRC komplexu. Upraveno podle [131].

Všechny KIR receptory patří do imunoglobulinové rodiny a podle počtu imunoglobulinových domén se dělí na KIR2D a KIR3D. Imunoglobulinové domény jsou od transmembránového segmentu oddělené krčkem a jejich cytoplazmatická doména je buď krátká nebo dlouhá, což koresponduje s funkcí receptoru. Inhibiční receptory, označované KIR2DL nebo KIR3DL

mají dlouhou cytoplazmatickou doménu, na které se nachází jeden nebo dva ITIM motivy. Aktivační receptory, označované KIR2DS nebo KIR3DS, mají krátkou cytoplazmatickou doménu a jejich signalizace závisí na asociaci s ITAM nesoucí adaptorovou molekulou DAP12 [126, 127, 128].

Geny lidských KIR receptorů jsou součástí LRC komplexu (Leukocyte receptor cluster) na chromozomu 19q13.4 (*obr. 5*). Doposud bylo identifikováno 15 lidských KIR genů a 2 pseudogeny. U myši byly na chromozomu X objeveny dva geny homologické lidskému KIR3DL [129, 130].

Lidské KIR receptory rozpoznávají molekuly HLA-A, -B a -C. Obecně platí, že receptory



KIR3DL rozpoznávají alelické formy HLA-A a HLA-B, zatímco KIR2DL rozpoznává alelické formy HLA-C, které se liší aminokyselinami v  $\alpha 1$  doméně na pozicích 77 a 80. Ačkoliv je interakce mezi receptorem KIR a HLA závislá na přítomnosti peptidu ve vazebném žlábků HLA, receptory nejsou schopné rozlišit, zda je prezentovaný peptid endogenní nebo exogenní resp. vazba KIR na HLA nezávisí na pozici a sekvenci prezentovaného peptidu [132, 133, 134]. Receptory KIR se váží na HLA v místě, kde je peptid nejvíc zanořený do vazebného žlábků, tj. v oblasti ukořisťujících aminokyselin (*obr. 6*) [135].

Aktivační KIR receptory se na HLA neváží vůbec nebo jen s velmi nízkou afinitou. Předpokládá se, že tyto receptory budou podobně jako aktivační receptory Ly49 zřejmě vázat nefyziologické ligandy.

*Obr. 6* Struktura komplexu lidského receptoru KIR2DL s ligandem HLA-Cw3. Upraveno podle [136].

## 1.8.2 Rodina receptorů Ly49



Obr. 7 Struktura dimeru receptoru Ly49A.  
Upraveno podle [136].

Multigenní rodinu Ly49 tvoří transmembránové glykoproteiny II. typu, které jsou exprimované na povrchu myších NK buněk a některých T lymfocytů [137]. Receptory rodiny Ly49 jsou disulfidicky vázané homodimery disponující extracelulární CTLD doménou (obr. 7) a jejich hlavní funkcí je rozpoznávání MHC I, u myši H-2K a H-2D.

Předpokládá se, že úlohu myších Ly49 převzali u člověka receptory rodiny KIR. Doposud bylo identifikováno 14 genů myších Ly49, které jsou součástí genového komplexu NKC nacházejícího se na chromozómu č. 6 (obr. 8). Na lidském NKC s lokusem 12p12.3-p13.2 byl objeven jeden pseudogen označený *Ly49L*. Výsledkem poměrně rychlé evoluce receptorů Ly49 je jejich silný polymorfismus a markantní variabilita v rámci myších kmenů. K diverzifikaci receptorů Ly49 přispívá i jejich monoalelická exprese a přeskupování exonů, kde každá doména, ať už cytoplazmatická, transmembránová nebo ligand vázící, je kódovaná nezávislým exonem [138, 139, 140, 141].



Obr. 8 Schematická mapa lidského a myšího NKC. Černá tečka na konci mapy znázorňuje centromeru. Upraveno podle [131].

Repertoár Ly49 je tvořen převážně inhibičními receptory, které mají v cytoplazmatických doménách ITIM motivy, ale i aktivačními receptory, např. Ly49D a Ly49H, které nekovalentně asociují s ITAM nesoucí adaptorovou molekulou DAP12 [142].

Velmi dobře prozkoumaná je interakce mezi inhibičním receptorem Ly49A a jeho ligandem H-2D<sup>d</sup>. Zjistilo se, že vazba Ly49A na H-2D<sup>d</sup> není ovlivněna peptidem v jeho vazebném žlábků. Strukturní analýza tohoto komplexu potvrdila, že Ly49A se váže na dvě místa H-2D<sup>d</sup> kompletně mimo vazebný žlábek resp., že Ly49A rozpoznává H-2D<sup>d</sup> jako takový, nezávisle na sekvenci peptidu [143, 144]. Přestože receptory rodiny Ly49 patří do rodiny C-lektinů, vazebné pokusy s rekombinantními receptory a jejich ligandy ukazují, že vazba ligandu není závislá ani na přítomnosti Ca<sup>2+</sup> ani na přítomnosti sacharidu [145].

Zatímco hlavní funkcí inhibičních receptorů Ly49 je rozpoznávání molekul H-2, funkce aktivačních receptorů je neznámá. Je pravděpodobné, že fyziologickými ligandy aktivačních receptorů Ly49 jsou patogenní proteiny, což potvrzuje aktivační receptor Ly49H rozpoznávající glykoprotein m157, který je kódovaný myším MCMV a exprimovaný na povrchu buněk infikovaných MCMV [146, 147, 148, 149].

Ačkoliv jsou lidské receptory KIR a myší Ly49 strukturně odlišné, sdílejí mnohé společné atributy. Obě receptorové rodiny jsou kódované skupinou 10-15 genů, které vznikly genovou duplikací a byli diverzifikované genovou konverzí. K diversifikaci obou rodin přispívá silný polymorfismus a jejich monoalelická exprese. Další významnou společnou vlastností je téměř identická funkce obou receptorových rodin.

### 1.8.3 Rodina receptorů CD94/NKG2

Receptory CD94/NKG2 jsou disulfidicky vázané heterodimery exprimované na povrchu NK buněk člověka a hlodavců,  $\gamma\delta$  T lymfocytech a CD8<sup>+</sup> T lymfocytech. Receptory této rodiny jsou transmembránové proteiny II. typu disponující CTLD doménou. Zatímco CD94 je invariantní ve všech heterodimerech (*obr. 9*), NKG2 může být zastoupen některým z 5 členů označovaných NKG2A-F, s výjimkou NKG2D [150, 151, 152]. Geny *CD94* a *NKG2* jsou součástí NKC komplexu, přičemž v lidském NKC jsou lokusy *NKG2A*, *-C*, *-E* a *-F* a v myším *NKG2A*, *-C* a *-E*. Pro lidský NKG2F je charakteristická absence extracelulární domény. Receptor NKG2B je zase splicingovou variantou NKG2A [152, 153, 154, 155]. V porovnání s receptory Ly49 a KIR je repertoár CD94/NKG méně polymorfní, což je zřejmě dané omezeným polymorfismem jejich ligandů [156]. NKG2A/B mají dlouhou cytoplazmatickou



Obr. 9 Struktura CD94. Upraveno podle [136].

signální (N-terminální) peptidy pocházející z biosyntetických prekurzorů klasických MHC I, a proto je možno je považovat za jakési indikátory normální exprese MHC I. Na vazbě ligandu participuje jen NKG2, protože CD94 by nebyl schopný transmitovat signál z důvodu absence cytoplazmatické domény. Zajímavým atributem této receptorové rodiny je, že aktivační i inhibiční receptory rozpoznávají stejné ligandy [158, 159, 160].

#### 1.8.4 Receptor NKG2D

NKG2D je homodimerní aktivační receptor exprimovaný na povrchu NK buněk,  $\gamma\delta$  T lymfocytů a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Podobně jako předcházející receptory i NKG2D je transmembránový glykoprotein II. typu disponující CTLD doménou (*obr. 10*) [161]. U myši



Obr. 10 Struktura dimeru NKG2D. Upraveno podle [136].

doménu obsahující ITIM motivy, což koresponduje s jejich inhibiční funkcí. NKG2C a -E jsou naopak aktivační receptory, které asociují s ITAM nesoucí adaptorovou molekulou DAP12 [157].

Ačkoliv je gen *NKG2D* součástí NKC komplexu, receptor NKG2D se nepáruje s CD94 a vykazuje nízký stupeň homologie s ostatními NKG2. Proto je charakterizovaný v samostatné kapitole.

CD94/NKG2A a CD94/NKG2C rozpoznávají neklasické MHC I molekuly, u člověka HLA-E a u myši Qa-1. HLA-E i Qa-1 váží

byly pozorované dvě isoformy receptoru NKG2D, které se liší přítomností nebo absencí 13 aminokyselin na N-terminálním konci. Isoformy vznikají alternativním splicingem a liší se v asociaci s adaptorovými molekulami. Delší isoforma označovaná NKG2D-L asociuje s DAP10, zatímco kratší isoforma označovaná NKG2D-S je promiskuitnější a může

asociovat jak s DAP10 tak i s DAP12. U lidí byla pozorovaná jen delší isoforma NKG2D-L. Asociace s různými adaptorovými molekulami má za následek spuštění různých signalizačních kaskád (DAP10 aktivuje resp. zvyšuje aktivitu protein-tyrosin-kinasy Syk nebo ZAP-70, zatímco DAP12 aktivuje hlavně fosfatidylinositol-3-kinasu) [162, 163, 164].

NKG2D váže rodinu ligandů, která vykazuje strukturní homologii s MHC I. Ligandy lidského NKG2D jsou MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 a ULBP4, ligandy myšního receptoru jsou RAE-1 $\alpha$ , RAE-1 $\beta$ , RAE-1 $\gamma$ , RAE-1 $\zeta$ , RAE-1 $\epsilon$ , H60 a MULT1. ULBP1, -2, -3 a -4 jsou lidskými ortology myších RAE1/H60/MULT1 molekul. Všechny ligandy mají  $\alpha$ 1 a  $\alpha$ 2 doménu homologní s MHC I a ligandy MICA a MICB disponují i  $\alpha$ 3 doménou. V jejich struktuře absentuje jak  $\beta$ 2-mikroglobulin, tak i peptid, který je u MHC I navázaný ve vazebném žlábků [165, 166, 167].

Mnohé z uvedených receptorů jsou hojně exprimované na nádorových a viry infikovaných buňkách, a proto receptor NKG2D hraje významnou úlohu v protinádorové a protivirové imunitě. To dokumentuje i přítomnost velkého množství sekretovaných ligandů v séru onkologických pacientů, které slouží jako decoy („maskovací“) ligandy ve snaze neutralizovat NK buněčnou odpověď [168].

### 1.8.5 Myší receptory NKR-P1A a NKR-P1C a jejich postavení v rodině receptorů NKR-P1

Receptory rodiny NKR-P1 jsou homodimerní transmembránové proteiny II. typu patřící do rodiny C-lektinů. Jejich exprese byla pozorovaná na NK buňkách, NK-T lymfocytech a některých subpopulacích T lymfocytů. U myši bylo doposud objeveno pět receptorů této rodiny, a to NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1C, NKR-P1D a NKR-P1F [169, 170, 171]. Receptor NKR-P1C byl původně označený jako NK1.1 antigen a byl dlouho považovaný za diferenciační znak NK buněk v C57/BL6 myších. Pro detekci NK buněk se používala monoklonální protilátka anti-NK1.1 známá také jako PK136 [172]. Později se zjistilo, že se váže i na jiné polymorfní receptory rodiny NKR-P1 v různých myších kmenech. Geny rodiny *NKR-P1* jsou součástí NKC komplexu nacházejícího se u myši na chromosomu č. 6. Ortology myších NKR-P1 genů byly objeveny u potkana i u člověka. Narozdíl od hlodavců, kteří disponují několika geny *NKR-P1*, u člověka byl určen jen jeden nepolymorfní gen [173, 174].

Inhibiční funkce myších NKR-P1B a NKR-P1D byla vyvozená z přítomnosti ITIM motivu v jejich cytoplazmatické doméně. Na druhou stranu absence ITIM motivu a přítomnost nabitě aminokyseliny argininu v transmembránovém segmentu poukazuje na aktivační funkci myších NKR-P1A, NKR-P1C a NKR-P1F. Myší NKR-P1C asociuje s adaptorovou molekulou FcεRIγ a zesíťování těchto receptorů monoklonální protilátkou anti-NK1.1 vede k masivní produkci IFN-γ. Asociace s FcεRIγ a produkce IFN-γ po zesíťování se předpokládá i u NKR-P1A a NKR-P1F [175, 176]. Dále byla pozorována interakce myších NKR-P1C a NKR-P1B s protein-tyrosin-kinasou rodiny Src, a to p56<sup>lck</sup>. Interakce byla zprostředkována prostřednictvím motivu CxCP v cytoplazmatické doméně obou receptorů. Tento motiv byl pozorován i v cytoplazmatické doméně koreceptorů CD4 a CD8 [177].

Funkce a signalizace lidského receptoru NKR-P1A není doposud dostatečně prozkoumaná. Předpokládá se, že cytoplazmatická část receptoru může interagovat s kyselou sfingomyelinasou (aSMasa), která spouští signalizační kaskádu prostřednictvím ceramidů, které slouží jako druzí poslové [174].

Fyziologické ligandy myších NKR-P1A a NKR-P1C nebyly doposud identifikovány. Byla však pozorovaná jejich vysoká afinita k některým oligosacharidům a spuštění signalizačních kaskád vedoucích k indukci efektorových funkcí po interakci těchto oligosacharidových ligandů s receptory NKR-P1 [178]. Ligandy ostatních isoform myších receptorů NKR-P1 jsou již známy. Receptory NKR-P1B a NKR-P1D váží molekulu Clr-b, známou též jako Ocil, a receptor NKR-P1F váže Clr-g, známou i jako OcilrP2. Uvedené ligandy jsou transmembránové glykoproteiny II. typu a jejich lokusy jsou součástí NKC komplexu. Zatímco Clr-b je hojně exprimovaný na všech hematopoetických buňkách s jádrem i na některých nehematopoetických buňkách, Clr-g je preferenčně exprimovaný na povrchu aktivovaných NK buněk. Lidským ortologem myších *Clr* genů je *LLT1*, který je exprimovaný na periferních hematopoetických buňkách [178, 180, 181, 182, 183].

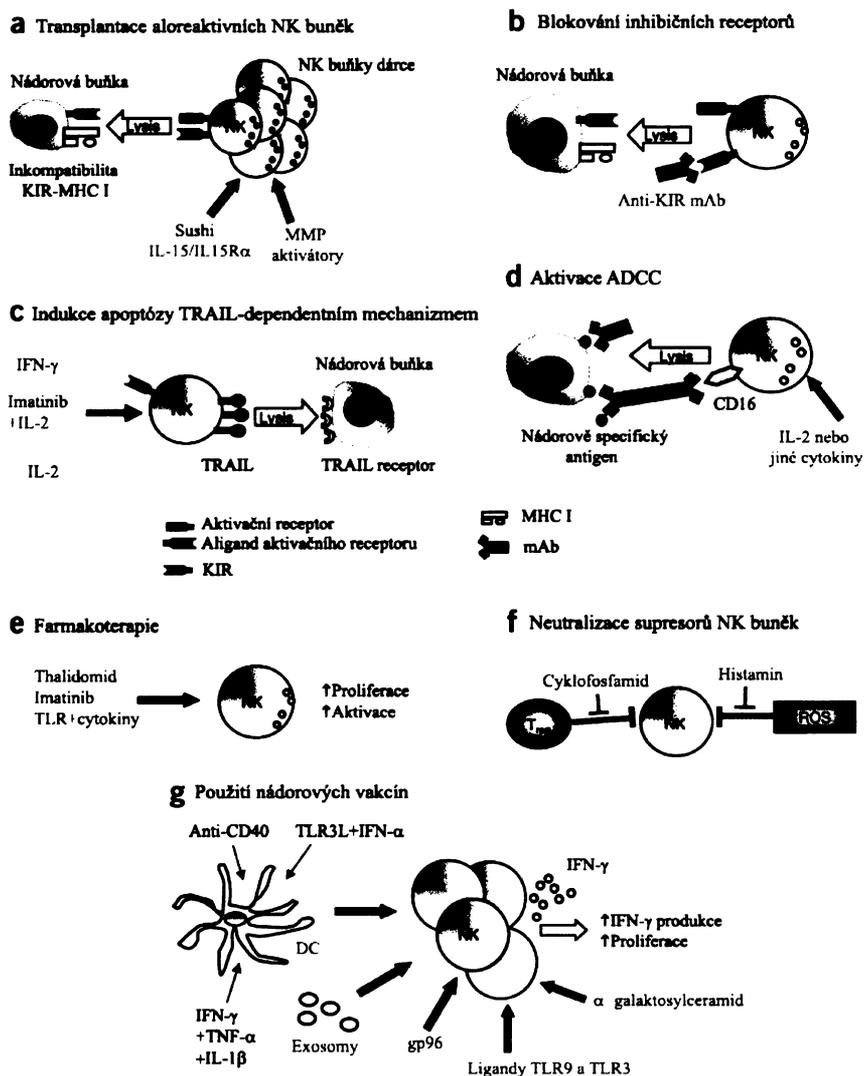
Ačkoliv myší receptor NKR-P1C je znám už více než 30 let, zůstává spolu s NKR-P1A neustále zahalený rouškou tajemství. Nejsou známy ani jejich ligandy, ani fyziologická funkce a ani struktura, která nebyla doposud vyřešena pro žádný receptor rodiny NKR-P1.

## 1.9 Imunoterapeutický potenciál NK buněk

S postupným odhalováním základních mechanismů světa NK buněk se začaly vynořovat snahy využít jejich unikátní vlastnosti v terapii některých onemocnění. Už v roce 1982 Grimm *et al.* demonstroval, že periferní lymfocyty aktivované IL-2, často označované zkratkou LAK (lymphokine-activated killers), jsou schopné zabít některé lidské nádorové linie [184]. Tento fenomén byl zprostředkován především NK buňkami a CTL. První klinické pokusy s využitím autologních LAK v kombinaci s IL-2 zrealizoval Rosenberg na 25 pacientech v pokročilém stádiu rakoviny [185]. Kombinace LAK s IL-2 se však ukázala jako nepříliš úspěšná a efekt nepřinášely ani vyšší dávky vysoce purifikovaných LAK. Pozdější práce ukázaly, že příčinou neúspěchu byla IL-2 stimulovaná expanze regulačních T lymfocytů, které přímo inhibovaly efektorové funkce NK buněk a zprostředkovaly jejich apoptosu mechanismem AICD (activation-induced cell death) [186].

Současné imunoterapeutické přístupy založené na NK buňkách je možno rozdělit do několika skupin (*obr. 11*). Jednou z terapeutických strategií je manipulace s inhibičními a aktivačními receptory. Blokování NK inhibičních receptorů monoklonálními protilátkami se ukazuje úspěšně v preklinických modelech terapie některých leukémií a melanomů. Využívají se hlavně protilátky, které blokují interakci inhibičních receptorů KIR2DL1, 2, 3 s jejich ligandem HLA-C [187, 188]. Klíčové postavení v eradikaci akutní myeloblastické leukémie má aloreaktivita NK buněk u pacientů, kteří se podrobili transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Aloreaktivní NK buňky se kromě eliminace leukemických buněk podílejí na prevenci jak rejekce, tak GVHD (graft-versus-host disease). Novější techniky využívají alogenní transplantaci *ex vivo* aktivovaných NK buněk. Důležitou úlohu má výběr dárců, který se realizuje genotypizací a fenotypizací inhibičních KIR receptorů ve snaze zabezpečit maximální inkompatibilitu KIR receptorů dárce s hostitelskými HLA I [189, 190, 191, 192, 193].

Další terapeutická strategie využívá NK buněčné Fc receptory pro stimulaci ADCC [194]. Typickým příkladem, který se používá v terapii nonHodgkinových lymfomů, je rituximab, což je chimérická monoklonální protilátka se specifitou k antigenu CD20, který je exprimovaný na B lymfocytech a na více než 90 % B lymfocytů nonHodgkinských lymfomů. Mechanismus účinku je zřejmě zprostředkovaný vazbou na FcγRIII receptory NK buněk a následnou reakcí ADCC případně i aktivací komplementu [195, 196]. V terapii solidních nádorů mohou najít uplatnění bispecifické, případně i trispecifické protilátky se specifitou



Obr. 11 Imunoterapeutické přístupy založené na NK buňkách. Strategie manipulace mezi inhibičními a aktivačními NK receptory (a, b), indukce apoptózy TRAIL-dependentním mechanismem (c), využití NK buněčných Fc receptorů pro stimulaci ADCC (d), stimulace efektorových funkcí NK buněk vakcínami nebo farmaky (e, g) a přístupy založené na neutralizaci supresorů NK buněk (f). Upraveno podle [207].

IKDC, která po premedikaci imatinibem a IL-2 exprimuje na povrchu molekulu TRAIL a následně indukuje v nádorových buňkách apoptosu TRAIL-dependentním mechanismem [200, 201].

k nádorovým antigenům a k povrchové molekule CD16 exprimované na NK buňkách, makrofágích a neutrofilech [197]. Potenciál v imunoterapii nádorů má i strategie založená na indukci apoptózy TRAIL-dependentním mechanismem a to v případě nádorů, které získávají (po chemoterapii) rezistenci k indukci přirozené apoptózy [198]. Proto se mnohá chemoterapeutika podávají v synergii s různými agonisty proapoptických receptorů (rhApo2L/TRAIL nebo DR-4 případně DR-5 specifické protilátky) [199].

V budoucnosti může sehrát v terapii nádorů významnou úlohu zatím poměrně neznámá subpopulace NK buněk tzv.

Další přístup je založený na stimulaci efektorových funkcí NK buněk vakcínami nebo farmaky. Z vakcín mohou najít uplatnění heat shock proteiny odvozené z melanomu a z nádoru tlustého střeva [202], z farmak například thalidomid v terapii mnohočetného myelomu, imatimib v terapii nádorů trávicího traktu a histamin dihydrochlorid v terapii akutní myeloblastické leukémie [203, 204, 205].

Jiné imunoterapeutické přístupy by mohly být založeny na neutralizaci supresorů efektorových funkcí NK buněk. Cílem terapeutického zásahu by se tak mohly stát rozpustné ligandy receptoru NKG2D, TGF- $\beta$ , regulační T lymfocyty, indolamin-2,3-dioxygenasa nebo reaktivní intermediáty kyslíku [206].

Mnoho z uvedených terapeutických přístupů se v současnosti nachází ve fázích klinického testování, některé se už více či méně úspěšně používají v kombinaci s konvenční léčbou (chirurgické odstranění, chemoterapie nebo radioterapie). Každopádně existuje reálná naděje, že postupné detailní poznání mechanismů protinádorové imunity povede k formování racionálních a efektivních terapeutických postupů.

## **2. CÍL PRÁCE**

- Rekombinantní příprava receptorů mNKR-P1A a mNKR-P1C, optimalizace proteinové produkce a renaturace.
- Izotopové značení rekombinantních proteinů izotopem  $^{15}\text{N}$  a ověření poskládání rekombinantních proteinů metodou proteinové NMR spektroskopie.
- Vyšetření biochemické a fyzikálně-chemické stability proteinů *in vitro*.
- Charakterizace velikosti a tvaru mNKR-P1A a mNKR-P1C metodami DLS a AUC.
- Výzkum vazebné specifity obou proteinů.
- Pokus o krystalizaci mNKR-P1A a mNKR-P1C.

### 3. MATERIÁL

#### 3.1 Přístroje

- Analytická ultracentrifuga Proteome Lab XL-I *Beckman Coulter, USA*
- Analytické váhy AL54 *Mettler Toledo, ČR*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga Avanti J-26 XP *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga Z 233 MK-2 *Hermle, Německo*
- Centrifuga Spectrafuge 16M *Edison, USA*
- Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra *Millipore, USA*
- Detektor DLS Zetasizer Nano *Malvern Instruments, UK*
- Dialyzační trubice Spektra/Por *Spektrum Laboratories, USA*
- Kolona Superdex 75 PC 3,2/30 *GE Healthcare, Německo*
- Kolona Superdex 75 HR 10/30 *GE Healthcare, Německo*
- Napájecí zdroj MP-250V *Major Science, USA*
- Hmotnostní spektrometr ULTRAFLEX III *Bruker, Německo*
- Hmotnostní spektrometr APEX-Qe FTMS *Bruker, Německo*
- HPLC systém BioSys 510 *Beckman Coulter, USA*
- HPLC systém SMART *Pharmacia Biotech AB, Švédsko*
- Magnetická míchačka MM 2A *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- MicroTrap *Michrom, USA*
- Monochromátorová čtečka destiček Safire<sup>2</sup> *Tecan, Švýcarsko*
- pH metr Φ200 *Beckman Coulter, USA*
- předvážky HF-1200G *AND, USA*
- PVDF membrány *Pall Corp., USA*
- Rentgenový film Medix XBU *Foma Bohemia, ČR*
- Scintilační detektor MicroBeta 1450 TriLux *PerkinElmer, USA*
- Souprava pro elektroforézu *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro elektropřenos *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro ultrafiltraci *Sigma-Aldrich, USA*
- Spektrofotometr DU-70 *Beckman Coulter, USA*

- NMR spektrometr Bruker Avance 600 MHz *Bruker, Německo*
- Třepačka na Erlenmeyerovy baňky *Gallenkamp Ltd., UK*
- Třepačka na zkumavky BigGer Bill *Thermolyne, USA*
- Ultracentrifuga Optima LE-80K *Beckman Coulter, USA*
- Ultrafiltrační membrány *Sigma-Aldrich, USA*
- Ultrazvuková lázeň *KRAINTEK, Slovensko*
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 *Cole-Parmer Instrum. Co., USA*
- Vakuová odparka Speedvac *Jouan, Francie*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody MilliQ *Millipore, USA*

### 3.2 Chemikálie

- Acetonitril *Merck, Německo*
- Agar *Oxoid, USA*
- Akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- L-Arginin hydrochlorid *Sigma-Aldrich, USA*
- Azid sodný *Sigma-Aldrich, USA*
- Bacto-tryptone *Oxoid, USA*
- Bacto-yeast extrakt *Oxoid, USA*
- Bromfenolová modř *Sigma-Aldrich, USA*
- BSA *Sigma-Aldrich, USA*
- Coomassie Brilliant Blue R-250 *Serva, Německo*
- Crystal screen, Crystal Screen 2, Index Screen *Hampton Research, USA*
- Cystamin *Sigma-Aldrich, USA*
- Cysteamin *Sigma-Aldrich, USA*
- Činidlo pro stanovení dle Bradfordové *Bio-Rad, Německo*
- DMSO *Jersey Lab Supply, USA*
- DTT *Sigma-Aldrich, USA*
- EDC *Sigma-Aldrich, USA*
- EDTA *Sigma-Aldrich, USA*
- Formaldehyd *Sigma-Aldrich, USA*

---

• Glukosa	<i>Lachema, ČR</i>
• Glycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Guanidin hydrochlorid	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• HEPES	<i>Serva, Německo</i>
• IPTG	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Kanamycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• $\beta$ -merkapt ethanol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Minerální olej	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• $^{15}\text{N}$ chlorid amonný	<i>Cambridge Isotope Lab., USA</i>
• NHS-fluorescein	<i>Pierce, USA</i>
• NHS-rhodamin	<i>Pierce, USA</i>
• N,N'-metylen-bis-akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Peroxodisíran amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• PIPES	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Pyridin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Q-Sepharosa FF	<i>GE Healthcare, Německo</i>
• Scintilační roztok	<i>GE Healthcare, Německo</i>
• SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Sephadex G-15	<i>GE Healthcare, Německo</i>
• Standardy pro SDS-PAGE	<i>Serva, Německo</i>
• TEMED	<i>Serva, Německo</i>
• Tetracyklin	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Thiamin hydrochlorid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Thiosíran sodný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Tris	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
• Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
• Ustalovač	<i>Kodak, USA</i>
• Vývojka	<i>Kodak, USA</i>
• Ostatní chemikálie	<i>Lachema, ČR</i>

➤ Všechny použité chemikálie byly v nejvyšší komerčně dostupné čistotě.

### 3.3 Enzymy

- DNAsa I (deoxyribonukleasa I) *Sigma-Aldrich, USA*
- Lysozym (Hen Egg White) *Jersey Lab Supply, USA*
- RNAsa I (ribonukleasa I) *Sigma-Aldrich, USA*
- Trypsin *Promega, USA*

### 3.4 Inhibitory proteas

- Leupeptin *Sigma-Aldrich, USA*
- Pepstatin *Sigma-Aldrich, USA*
- PMSF *Sigma-Aldrich, USA*

### 3.5 Vektory

- pET-30a-(+) *Novagen, USA*

### 3.6 Bakteriální kmeny

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

### 3.7 Roztoky a pufrы

- **Barvicí roztok pro SDS elektroforézu:** 45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,25 % (w/v) CBB R-250
- **Dialyzační pufr:** 15 mM Tris-HCl, 9 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=8,5
- **Elektrodový pufr:** 10 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH=8,3
- **Fixační a odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu:** 35 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) kyselina octová
- **Guanidinový pufr:** 6 M Guanidin-HCl, 10 mM DTT, pH=8,0
- **HEPES pufr:** 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=7,0
- **Odbarvovací roztok pro PVDF membrány:** 45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová
- **PIPES pufr:** 15 mM PIPES, 50 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=6,8

- **Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkaptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=7,4
- **Pufr pro elektropřenos:** 10 mM Tris-HCl, 150 mM glycin, 20 % (v/v) methanol, pH = 8,4
- **Pufr pro fluorescenční značení:** 15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1,9 M acetonitril, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=8,0
- **Pufr pro gelovou chromatografii:** 15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=8,0
- **Pufr pro ionexovou chromatografii:** 15 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=8,5
- **Pufr pro separaci dimerů:** 15 mM PIPES, 50 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=6,0
- **Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek:** 0,5% (w/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkaptoethanol, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=7,4
- **Pyridinový pufr:** 50 mM pyridin-HCl, 50 mM NaCl, pH=6,0
- **Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 25 % (w/v) sacharosa, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=7,4
- **Směs akrylamidu:** 29 % (w/v) akrylamid, 1 % (w/v) N,N'-metylen-bis-akrylamid
- **TBS pufr:** 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=7,4
- **TBS+C pufr:** 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH=7,4
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující:** 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 2 % (v/v) β-merkaptoethanol, pH = 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující:** 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, pH = 6,8

### 3.8 Média

- **LB agar:** 1,25 % (w/v) agar v LB médiu
- **LB médium:** 1 % (w/v) bacto-tryptone, 0,5 % (w/v) bacto-yeast extract, 1 % (w/v) NaCl, pH = 7,4
- **M9 minimální médium:** 42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,6 mM NaCl, 18,7 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 22 mM glukosa, 1 mM thiamin-HCl

## 4. METODY

Většina postupů uvedených v metodické části byla založena na dlouholetých zkušenostech pracovníků Laboratoře architektury proteinů, dále na laboratorním manuálu [208] a doporučeních výrobců některých chemikálií a přístrojů.

### 4.1 Rekombinantní exprese proteinů

Rekombinantní proteiny mNKR-P1A a mNKR-P1C byli exprimovány v bakteriálních expresních systémech s použitím expresního vektoru pET-30a(+), který využívá T7 promotor. Princip kontrolované a vysoce účinné exprese je založen na specifickém rozpoznávání T7 promotoru bakteriofágovou T7 RNA polymerasou, která má o mnoho vyšší aktivitu než bakteriální RNA polymerasa. Použité bakteriální expresní systémy měly gen pro T7 RNA polymerasu integrovaný v bakteriální DNA za *lac* operátorem, který je negativně kontrolovaný *lac* represorem, což je produkt *lacI* genu. K indukci *lac* promotoru se používal analog laktosy isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), který se váže na *lac* represor a zabraňuje jeho vazbě na operátorovou oblast. Výhodou IPTG je jeho snadný transport do buněk a skutečnost, že není buňkami metabolizovaný.

#### 4.1.1 Transformace kompetentních buněk

Plasmidová DNA byla vnesena do bakteriálních buněk metodou transformace tepelným šokem. Použité recipientní buňky byly uvedeny do stavu kompetence účinkem chloridu vápenatého a byly uskladněny několik měsíců při teplotě -70 °C.

K 200  $\mu$ l kompetentních buněk, které se nechaly postupně rozmrazit na ledové lázni, bylo přidáno 10 ng – 1  $\mu$ g plasmidové DNA a směs byla inkubována 15 – 30 minut na ledu. Dále následoval tepelný šok při 42 °C po dobu 50 sekund. Po tepelném šoku byly buňky inkubovány 1 minutu na ledu, následně k nim byl přidán 1 ml sterilního LB média a bakteriální suspenze se nechala inkubovat 1 hodinu při 37 °C. Potom byly buňky odstředěny při 1 800 g po dobu 2 minut při laboratorní teplotě, sediment resuspendován ve 100  $\mu$ l LB média a vzniklá suspenze byla pomocí vyžíhané a vychlazené skleněné tyčinky rozetřena po povrchu LB agaru s příslušnými antibiotiky v Petriho misce. Na negativní kontrolu transformace se použily netransformované kompetentní buňky. Petriho misky s inokulovaným LB agarem byly inkubovány při 37 °C po dobu 10-15 hodin, případně až do vytvoření viditelných bakteriálních kolonií.

#### 4.1.2 Selekcce produkčního klonu

Po transformaci kompetentních buněk bylo osm bakteriálních kolonií asepticky přeneseno sterilním párátkem do 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky a bakterie byly kultivovány při 37 °C a 220 ot./min do stacionární fáze. Potom byly dvě zkumavky, označené jako plus a minus, obsahující 1 ml sterilního LB média s antibiotiky inokulovány 10 µl kultury ve stacionární fázi z jednoho transformanta a buněčná kultura byla následně kultivována při 37 °C a 220 ot./min. Při  $OD_{550}=0,7$ , která byla měřena spektrofotometricky, byla u bakteriálních kultur označených jako plus provedena indukce proteinové exprese 1 mM IPTG, po níž následovala kultivace při 37 °C a 220 ot./min po dobu 2 hodin. Potom byly buňky odstředovány 10 minut při 5 000 g při laboratorní teplotě. Sediment byl resuspendován ve 130 µl redukujícího vzorkového pufru pro SDS PAGE, suspenze byla povařena 5 minut na vodní lázni a znovu odstředěna při 10 000 g po dobu 10 minut a laboratorní teplotě. Dalším krokem byla SDS elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu, přičemž se do jedné jamky aplikovalo 10 µl z připraveného supernatantu. Přítomnost exprimovaného proteinu byla potvrzena komparací elektroforeticky rozdělených proteinů mezi indukovanými a neindukovaným kulturami jednotlivých transformantů.

#### 4.1.3 Optimalizace produkce rekombinantního proteinu

Optimalizovanými parametry byl jednak čas proteinové produkce, dále teplota produkce a koncentrace induktoru IPTG.

Za účelem prozkoumání kinetiky proteinové produkce bylo 50 ml LB média s příslušnými antibiotiky inokulováno 0,5 ml stacionární bakteriální kultury daného produkčního klonu. Bakteriální kultura byla kultivována při 220 ot./min a teplotě 37 °C do  $OD_{550}=0,7$ , kdy se uskutečnila indukce proteinové exprese 1 mM IPTG. Dále následovala kultivace při 220 ot./min a 37 °C, přičemž byly z bakteriální kultury odebírány vzorky o objemu 1 ml v čase 30 minut, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 a 24 hodin po indukci. Ihned po odběru byl 1 ml bakteriální kultury odstředěn 10 minut při 5 000 g při laboratorní teplotě a sediment následně uskladněn při -20 °C. Nakonec byly všechny vzorky analyzovány SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu.

Při zjišťování vlivu koncentrace IPTG na proteinovou produkci, bylo 6 zkumavek s 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky inokulováno 10 µl bakteriální stacionární kultury šesti produkčních klonů. Následovala kultivace při 220 ot./min a 37 °C do  $OD_{550}=0,7$ , kdy se uskutečnila indukce proteinové exprese 0,01 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 1,0 mM

a 5,0 mM IPTG. Dalším krokem byla 2 hodinová kultivace při 220 ot./min a 37 °C. Potom byly z každé bakteriální kultury připraveny vzorky pro elektroforézu analogickým postupem jako v předcházející kapitole a nakonec byly analyzovány SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu.

Při zjišťování vlivu teploty na produkci proteinu byly dvě zkumavky obsahující 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky inokulované 10 µl bakteriální stacionární kultury jednoho produkčního klonu. Následovala kultivace při 220 ot./min a teplotě 37 °C do  $OD_{550}=0,7$ , kdy se uskutečnila indukce proteinové exprese 1 mM IPTG. Dalším krokem byla kultivace při 220 ot./min, přičemž jedna bakteriální kultura byla inkubovaná při 37 °C a druhá při 30 °C. Po dvou hodinách byly z bakteriálních kultur připraveny vzorky pro elektroforézu, které byly následně analyzované SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu.

#### 4.1.4 Velkoobjemová produkce proteinů

Velkoobjemová produkce proteinů byla realizovaná nejčastěji v 1 litru kultivačního média s příslušnými antibiotiky. Pro zajištění dostatečné aerace byl objem použité Erlenmeyerovy baňky minimálně čtyřikrát větší než objem média. Prvním krokem byla inokulace kultivačního média setinou až tisícinou objemu stacionární kultury produkčního klonu. Dále následovala kultivace za intenzivního třepání při 220 ot./min a při teplotě 37 °C. Při  $OD_{550}=0,7$  byla indukována proteinová exprese pomocí IPTG o optimální koncentraci a následovala kultivace při optimální teplotě, za intenzivního třepání 220 ot./min po dobu, která byla taktéž optimální. Nakonec byla buněčná kultura odstředěna 10 minut při 5 000 g a 4 °C.

#### 4.1.5 Zjištění lokalizace exprimovaného proteinu

Rekombinantní protein může být obecně exprimovaný do nerozpustných agregátů označovaných jako inkluzní tělíska, dále do cytoplazmy případně periplazmy, nebo do kultivačního média. Před volbou purifikační metody je proto nutné zjistit lokalizaci exprimovaného proteinu. Tu je možné určit elektroforetickou analýzou frakcí po diferenční centrifugaci buněčného lyzátu.

Výchozím materiálem pro analýzu byla buněčná kultura po velkoobjemové produkci proteinu, ze které bylo odebráno 200 µl. Odebraná buněčná kultura byla odstředěna 10 minut při 5 000 g a laboratorní teplotě. K 10 µl supernatantu bylo přidáno 10 µl 2 × koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Sediment byl resuspendován v 200 µl sacharosového lyzačního pufru, dále zmražen na -80 °C, následně rozmražen, posonikován

sonikační sondou třikrát po 30 sekundách s 30 sekundovými přestávkami na ledu a nakonec opět zmražen a rozmražen. Buněčný lyzát byl odstředěn 10 minut při 15 000 g a laboratorní teplotě. K 10  $\mu$ l supernatantu bylo přidáno 10  $\mu$ l 2  $\times$  koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE a sediment byl resuspendován ve 130  $\mu$ l redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Takto připravené vzorky byly povařeny 5 minut na vodní lázni, dále odstředěny 10 minut při 15 000 g a laboratorní teplotě, aplikovány na jamky gelu o objemu 10  $\mu$ l a nakonec analyzovány SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu.

#### 4.1.6 Izolace a purifikace inkluzních tělísek

Sediment z 1 litru kultivačního média z velkoobjemové produkce proteinů byl resuspendovaný v 20 ml sacharosového lyzačního pufru, do kterého byly přidány inhibitory proteas, a to leupeptin a pepstatin (finální koncentrace 1  $\mu$ M) a PMSF (finální koncentrace 1 mM). Buněčná suspenze byla čtyřikrát zmražena na -80 °C a rozmražena ve vodní lázni při 40 °C. Potom k ní bylo přidáno 400  $\mu$ l 1 M roztoku chloridu horečnatého, 3  $\mu$ l DNAsy I (100 U/ $\mu$ l) a 5  $\mu$ l RNAsy I (10 mg/ml). Připravená směs se nechala inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě. Buněčná suspenze byla následně sonikována pomocí sonikační sondy pětkrát po 30 sekund s 30 sekundovými přestávkami na ledu a potom byla odstředěna 15 minut při 15 000 g a 4 °C. Sediment byl resuspendován sonikací v 20 ml pufru s detergentem spolu s inhibitory proteas a znovu odstředěn jako v předchozím případě. Nakonec byl sediment resuspendován sonikací v 10 ml promývacího pufru s inhibitory a opět odstředěn jako v předchozím případě. Finální sediment tvořený převážně agregovanou formou rekombinantního proteinu byl pro další experimenty uchován při -20 °C.

#### 4.1.7 Solubilizace inkluzních tělísek

Inkluzní tělíška byla pomocí vortexu a opakovaného pipetování resuspendována v guanidinovém pufru (8 ml pufru/1 g inkluzních tělísek) a ihned byl přidán leupeptin a pepstatin do finální koncentrace 1  $\mu$ M. Zakalený roztok byl inkubován 1 hodinu při 40 °C na vodní lázni a po inkubaci byl vyčeřen ultracentrifugací po dobu 30 minut při 185 000 g a 20 °C. Supernatant byl potom přenesen do čisté plastové zkušavky a okamžitě použit na renaturaci proteinu.

## 4.2 Renaturace proteinů

Renaturace proteinu (angl. refolding) je proces, při kterém se neuspořádaný polypeptidový řetězec svine do nativní konformace. Při přípravě rekombinantních proteinů z inkluzních tělísek je potřeba proteiny renaturovat *in vitro*. Nejpoužívanější metodou *in vitro* renaturace je metoda rychlého naředění (z angl. rapid dilution), kdy se denaturovaný protein pomalu přikapává do nadbytku pufru s vysokým obsahem tzv. nízkomolekulárních chaperonů (např. L-arginin). K parametrům, které ovlivňují renaturaci daného proteinu patří koncentrace nízkomolekulárního chaperonu, poměr složek redoxního systému pufru, pH pufru, výsledná koncentrace proteinu či přítomnost aditiv.

### 4.2.1 Optimalizace renaturace proteinů

*In vitro* renaturace rekombinantních proteinů se realizovala metodou rychlého naředění s využitím L-argininu jako nízkomolekulárního chaperonu. Na základě bohatých zkušeností v Laboratoři architektury proteinů s renaturací CD69, lidských a potkaních ortologů NKR-P1, byla připravena sada čtyř renaturačních pufrů obsahujících Tris-HCl, L-arginin, cystamin, cysteamin, chlorid vápenatý a azid sodný o složení, které je uvedeno v *Tabulce 1*, kde *c* je molární koncentrace. Optimalizovanými parametry byla koncentrace argininu, poměr redoxního systému cysteamin k cystaminu a pH. Třeba poznamenat, že například poměr cysteamin/cystamin rovný 10:2 znamená, že renaturační pufr před renaturací obsahoval cysteamin o koncentraci 9 mM a cystamin o koncentraci 3 mM. Ke konverzi na poměr 10:2 došlo až při samotné renaturaci redukcí cystaminu účinkem DTT, který byl součástí guanidinového pufru, v kterém byl protein solubilizovaný.

*Tabulka 1*

50	50	50	50
100	100	100	100
1	1	1	1
1,0	1,0	1,0	0,4
10:2	10:2	5:2	10:2
8,5	9,0	8,5	8,5

Před optimalizací renaturace byly renaturační pufrů o objemu 100 ml ochlazený v chladové místnosti a těsně před renaturací byl k roztokům přidán PMSF do finální koncentrace 1 mM. Potom byly za neustálého míchání do renaturačních pufrů pomalu přikapávány denaturované roztoky proteinů o rychlosti asi 1 ml/min. Celkově byl do 100 ml renaturačního pufru nakapán 1 ml roztoku denaturovaného proteinu. Po renaturaci byly roztoky v chladové místnosti míchány ještě hodinu a potom byly přeneseny do dialyzačních střeň a dialyzovány proti dialyzačnímu pufru tak, že roztoky 1, 3 a 4 byly dialyzovány spolu proti 6 l dialyzačního pufru a roztok 2 byl dialyzován proti 2 l dialyzačního pufru s pH upraveným na 9,0. Dialýza byla po 6 hodinách vyměněna a ukončena po 10 hodinách. Účinnost jednotlivých renaturačních podmínek byla vyhodnocena komparací ploch elučních vrcholů po gelové chromatografii na koloně Superdex 75 HR 10/30 a SDS elektroforézou za redukujících a neredukujících podmínek.

#### 4.2.2 Velkoobjemová renaturace proteinů

Celkový postup byl analogický jako v předcházející kapitole s tím rozdílem, že velkoobjemová renaturace proteinů byla uskutečňována ve 400 ml renaturačního pufru s optimalizovanými podmínkami a po renaturaci byl renaturační roztok dialyzován proti 8 l dialyzačního pufru.

### 4.3 Elektromigrační metody

#### 4.3.1 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS byla používána k analytické separaci proteinů s cílem získat poměrně spolehlivou informaci o čistotě proteinu a jeho molekulové hmotnosti.

Nejdříve byl mezi skla elektroforetické jednotky nanesen separační gel o složení, které vyjadřuje *Tabulka 2* a následně byl opatrně převrstven vodou. Po zpolymerování gelu byla voda vylita, na její místo byl nanesen zaostřovací gel o složení znázorněném v *Tabulce 2* a okamžitě byl do gelu zasunut hřeben.

Tabulka 2

4,0	2,3	1,4
3,3	5,0	0,33
2,5 (pH=8,8)	2,5 (pH=8,8)	0,25 (pH=6,8)
0,1	0,1	0,02
0,1	0,1	0,02
0,004	0,004	0,004

Po zpolymerování zaostřovacího gelu byl hřeben vytáhnout, jamky byly promyty elektrodovým pufrem, dále byla sestavena elektroforetická jednotka a do jamek gelu byly aplikovány vzorky určené na analýzu, případně i standardy molekulových hmotností. Elektroforéza proteinů na dvou gelech probíhala při 80 V a 25 mA pro zaostřovací gel a 140 V a 50 mA pro separační gel dokud čelo elektroforézy neopustilo gel. Po ukončení elektroforézy byly gely ihned obarveny.

Při barvení gelu roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250 byl gel barven 15 minut v barvicím roztoku pro SDS elektroforézu a potom odbarvovaný v odbarvovacím roztoku do odbarvení pozadí.

Při barvení stříbrem byl gel fixovaný třikrát 30 minut v roztoku 30% (v/v) ethanolu a 10% (v/v) kyseliny octové. Dále následovala 10 minutová inkubace v roztoku 10% (v/v) ethanolu a potom v destilované vodě po dobu 10 minut. Gel byl na 1 minutu vystaven působení roztoku 0,02% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , následně byl dvakrát propláchnut v destilované vodě po dobu 20 sekund a inkubován 30 minut v čerstvě připraveném roztoku 0,2% (w/v)  $\text{AgNO}_3$ . Po důkladném opláchnutí vodou byl gel vyvíjen ve směsi 0,037% (v/v) formaldehydu, 3% (w/v)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  a 0,001% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  do optimálního zbarvení. Potom byl gel okamžitě vložen na 1 minutu do roztoku 4,5% (w/v) Tris a 25% (v/v) kyseliny octové a nakonec byl uskladněn v 1% (v/v) kyselině octové.

### 4.3.2 Elektropřenos proteinu na PVDF membránu

Po elektroforetické separaci byl gel ekvilibrován 10 minut v transferovém pufru. Na spodní stranu kazety pro elektropřenos bylo vloženo 6 kusů filtračních papírků nasycených transferovým pufrem, dále PVDF membrána o rozměrech gelu, která byla předtím ponořená na minutu v methanolu, potom gel a nakonec 6 kusů filtračních papírků nasycených transferovým pufrem. Elektropřenos proteinů z gelu na membránu probíhal při proudové hustotě  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  gelu po dobu 1 hodiny. Po elektropřenosu proteinu byla membrána třikrát propláchnuta vodou, barvená 1 minutu barvicím roztokem pro SDS elektroforézu a nakonec odbarvena odbarvovacím roztokem pro elektropřenos.

## 4.4 Chromatografické metody

Při purifikaci rekombinantně připravených proteinů se hojně využívaly chromatografické metody, především ionexová a gelová chromatografie.

Ionexová chromatografie se realizovala na koloně Q Sepharosy FF o rozměrech  $1,0 \times 6,0 \text{ cm}$ , což je silný anex obsahující kvartérní amoniové soli navázané na zesíťované agarose. Na gelovou chromatografii byly použity kolony Superdex 75 HR 10/30 nebo Superdex 75 PC 3,2/30, které obsahují zesíťovaný dextranový gel. Všechny chromatografické separace byly prováděny na HPLC systému BioSys 510 nebo na mikropurifikačním systému SMART. Purifikované proteiny byly při gelové chromatografii eluované izokraticky, při ionexové byla zvolena eluce lineárním gradientem NaCl. Eluce proteinů byla monitorovaná průtokovým fotometrickým detektorem při 280 nm a jednotlivé frakce byly sbírány manuálně nebo s použitím sběrače frakcí. Po ukončení chromatografické separace byl HPLC systém včetně kolony postupně promyt 0,5 M roztokem NaOH a 20% (v/v) roztokem ethanolu. Kolony byly taktéž skladovány v 20% (v/v) roztoku ethanolu.

## 4.5 Metody sloužící k zahušťování proteinů

### 4.5.1 Ultrafiltrace

Roztok proteinu po dialýze byl zahušťován na objem 30 ml pomocí ultrafiltrace. Ultrafiltrační membrána z PLGC celulosy o průměru 76 mm a s limitem 10 kDa byla vložena správnou orientací aktivní strany do soupravy pro ultrafiltraci. Zahušťování roztoku proteinu probíhalo při laboratorní teplotě, tlaku inertního plynu (dusíku) 0,5 MPa a pomalého míchání

magnetickým míchadlem. Ultrafiltrační membrány byly uskladňované v roztoku 1 mM azidu sodného.

#### 4.5.2 Zahušťování roztoku proteinů pomocí centrifugačních koncentrátorů

Roztoky proteinů byly zahušťovány na objem 50 až 500  $\mu$ l pomocí centrifugačních koncentrátorů Amicon Ultra s maximálním objemem 15 nebo 4 ml a s limitem 10 kDa. Roztok proteinu byl zahušťován v centrifuze s výkyvným rotorem při 2 000 g, teplotě 20 °C po dobu 10 až 15 minut. Po zahuštění byl retenát promíchán opakovaným pipetováním a přenesen do čisté mikrozkušavky. Centrifugační koncentrátoři byly uskladněné v roztoku 1 mM azidu sodného.

#### 4.6 TCA precipitace

K roztoku proteinu byla přidána 100 % (w/v) TCA do finální koncentrace 10 % a směs se nechala inkubovat 30 minut při teplotě 4 °C. Po inkubaci byla směs odstředěna 10 minut při 20 000 g a 4 °C a sediment byl následně promyt vychlazeným acetonem. Potom byla směs znovu odstředěna 10 minut při 20 000 g, 4 °C a sediment byl vysušen při laboratorní teplotě. Promývání acetonem se zopakovalo ještě dvakrát. Nakonec byl sediment resuspendován ve vzorkovém pufru pro SDS-PAGE o požadovaném objemu.

#### 4.7 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové je velmi rychlá a poměrně citlivá metoda kvantifikace proteinů. Princip metody je založený na vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na bazické a aromatické aminokyseliny proteinu, přičemž po navázání barviva na protein dochází k posunu absorpčního maxima barviva z 365 nm na 595 nm. Nevýhodou metody je závislost na aminokyselinovém složení stanovovaného proteinu a rušivý vliv detergentů, které se často používají při izolaci a purifikaci proteinů.

Koncentrace proteinů byla stanovovaná spektrofotometricky na mikrotitračních destičkách. K 5  $\mu$ l roztoku proteinu bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250. Směs byla následně promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Všechna stanovení byla prováděna triplicitně, aby byly eliminovány chyby z pipetování malých objemů. Množství proteinu bylo stanoveno měřením absorbance při 595 nm a odčítáním

z kalibrační křivky, která byla sestavená pomocí sady standardů BSA v rozsahu koncentrací 0,1 až 0,5 mg/ml.

#### 4.8 Fluorescenční značení proteinů

Připravené rekombinantní proteiny byly označeny fluorescenčními značkami. Protein mNKR-P1A byl označen fluoresceinem, mNKR-P1C rhodaminem. Na značení byly použity N-hydroxysukcinimidové (NHS) estery fluorescenčních značek, které v pH 7-9 účinně reagují s primárními aminoskupinami (N-terminální nebo aminoskupinou lysinu) za vzniku amidové vazby a odštěpení N-hydroxysukcinimidu.

Před samotnou reakcí bylo nutné převést proteiny do pufru, který neobsahoval žádný primární amin. Proto byly oba proteiny dialýzou převedeny do 1,5 M karbonátového pufru o pH=9,0 a následně byly zahuštěny na objem 200  $\mu$ l. K 200  $\mu$ g proteinu byl přidán 100 molární nadbytek fluorescenční značky rozpuštěné v 50  $\mu$ l DMSO a reakční směs byla inkubovaná 2 hodiny při teplotě 45 °C na vodní lázni a následně 1 hodinu při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 50  $\mu$ l 1 M roztoku Tris-HCl o pH=8,0 a nezreagované fluorescenční značky byly odseparovány chromatograficky. Reakční směs byla nanesena na kolonu Sephadex G-15 o rozměrech 1 x 30 cm ekvilibrovanou pufrům pro fluorescenční značení a proteiny byly izokraticky eluované tímto pufrům při průtoku 1 ml/min. Eluce byla sledována průtokovým fotometrickým detektorem při 280 nm a frakce byly sbírány manuálně. Monodisperzita fluorescenčně značených preparátů byla ověřena gelovou chromatografií na Superdexu 75 HR 10/30 a porovnáním elučních profilů fluorescenčně značených a neznačených proteinů.

#### 4.9 Síťovací reakce

Oba rekombinantně připravené proteiny byly síťované heterobifunkčním činidlem EDC, což je asi nejznámější karbodiimid používaný v síťovacích reakcích. EDC je síťovací činidlo o nulové délce, které reaguje s primární aminoskupinou lysinu nebo N-terminální aminoskupinou N-koncové aminokyseliny a karboxylovou skupinou kyseliny asparagové nebo glutamové. Optimální pH reakce je 4,6-6,0.

Před samotnou reakcí byly oba proteiny převedeny dialýzou do pyridinového pufru, který neobsahoval žádný primární amin. Protože pH pyridinového pufru bylo blízké k výpočtem určenému izoelektrickému bodu obou proteinů, byla za účelem kontroly monodisperzity a

vyloučení změny oligomerizace proteinů provedena gelová chromatografie na Superdexu 75 HR 10/30.

Síťovací reakce byly realizované v roztocích s koncentracemi proteinů 0,1 a 1,0 mg/ml, přičemž se na každou reakci aplikovalo 100 µg proteinu. Na negativní kontrolu byl použit roztok s koncentrací 0,1 mg/ml. Síťovací reakce byla pro každou koncentraci proteinu prováděna v 200 a 1000 molárním nadbytku EDC, který se rozpustil v pyridinovém pufru, a jeho roztok o koncentraci 120 mg/ml byl okamžitě přidán k roztokům proteinů. Po 6 hodinové inkubaci při laboratorní teplotě bylo z každé reakční směsi odebráno 10 µl vzorku a následně byla uskutečněna analýza SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu.

Na separaci síťovaných dimerů byl použit mikropurifikační systém SMART. Reakční směs s roztokem proteinu o koncentraci 1,0 mg/ml byla zahuštěna na vakuové odparce na objem 40 µl a nanesená na kolonu Superdex 75 PC 3,2/30 ekvilibrovanou puftrem pro separaci dimeru. Proteiny byly izokraticky eluované tím samým puftrem při průtokové rychlosti 40 µl/min. Frakce byly sbírány automaticky sběračem frakcí po 80 µl a odseparované kovalentní dimery byly analyzovány SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu.

## 4.10 Vazebné experimenty

### 4.10.1 Vazebný test radioaktivně značených proteinů s neoglykoproteiny a přirozenými glykoproteiny

Cílem tohoto vazebného testu bylo najít vhodný ligand, kterým by mohly být pokryté mikrotitrační destičky v inhibičních experimentech popsanych v následující kapitole.

Prvním krokem byla elektroforetická separace vybraných 13 neoglykoproteinů a přirozených glykoproteinů v 10% polyakrylamidovém gelu. Testované látky byly následně přeneseny na PVDF membránu a obarveny barvicím roztokem pro SDS elektroforézu. Vazebná místa na PVDF membráně byla zablokována 4 hodinovou inkubací s 2% BSA v TBS+C pufru, po které následovala 12 hodinová inkubace s radioaktivně značeným proteinem v TBS+C pufru s měrnou aktivitou 83 kBq/ml při teplotě 4 °C. Radioaktivní značení rekombinantních proteinů  $Na^{125}I$  podle protokolu Iodogen provedl Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc. Po inkubaci byla PVDF membrána třikrát promyta vychlazeným TBS+C puftrem a vysušena mezi dvěma filtračními papíry. Potom následovala 24 hodinová expozice rentgenového filmu Medix XBU v radiografické kazetě s intenzifikační destičkou. Film byl nakonec vizualizován autoradiograficky ve fotokomoře.

#### 4.10.2 Inhibiční vazebné experimenty na mikrotitračních destičkách

Principem inhibičních vazebných experimentů je měření stupně inhibice vazby radioaktivně značeného proteinu na  $\beta$ -D-GlcNAc, který je imobilizovaný na mikrotitrační destičce. Testované sacharidové ligandy přidávané do jamek mikrotitrační destičky kompetují s imobilizovaným  $\beta$ -D-GlcNAc o vazebné místo radioaktivně značeného proteinu. Čím je afinita testovaných sacharidových ligandů k rekombinantnímu proteinu vyšší, tím menší množství proteinu zůstane navázané na destičce. Množství radioaktivního proteinu navázaného na destičce je možné detekovat scintilačním detektorem.

Prvním krokem bylo určení saturační křivky. Šest jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo pokryto v dupletech 100  $\mu$ l roztoku  $\beta$ -D-GlcNAc-BSA o koncentraci 10  $\mu$ g/ml. Po 12 hodinové inkubaci při 4 °C byly jamky třikrát promyté TBS+C puforem a vazebná místa na jamkách blokována 130  $\mu$ l 2% BSA v TBS+C pufru. Po 3 hodinové inkubaci při 4 °C byly jamky opět třikrát promyté TBS+C puforem a do jedné jamky bylo nanášeno 100  $\mu$ l 30  $\times$  zředěného roztoku radioaktivně značeného proteinu. Do ostatních jamek bylo potom nanášeno 100  $\mu$ l roztoku značeného proteinu v trojkovém ředění. Po 2 hodinové inkubaci při 4 °C byla destička třikrát promyta TBS+C puforem a ponechána vysušit při 37 °C. Potom bylo do každé jamky nanášeno 100  $\mu$ l scintilačního roztoku, destička byla přelepena lepící páskou a aktivita navázaného proteinu byla změřena scintilačním detektorem MicroBeta 1450 TriLux. Následně byla sestrojena saturační křivka, tj. závislost aktivity navázaného proteinu na relativní koncentraci proteinu nanášeného do konkrétní jamky. Pro inhibiční experimenty byla za optimální relativní koncentraci radioaktivně značených proteinů zvolena taková koncentrace, při které došlo k polovičnímu nasycení imobilizovaného ligandu  $\beta$ -D-GlcNAc.

Při samotných inhibičních testech se postupovalo analogicky jako při určování saturační křivky s tím rozdílem, že do blokových a promytých jamek bylo nanášeno nejprve 50  $\mu$ l inhibitoru v desítkovém ředění s počáteční koncentrací 2 mM a následně 50  $\mu$ l radioaktivně značeného proteinu s dvakrát větší koncentrací než byla optimální koncentrace určená ze saturační křivky. Nakonec tedy bylo v každé jamce 100  $\mu$ l roztoku s optimální relativní koncentrací radioaktivně značeného proteinu a s desítkovým ředěním inhibitoru s počáteční koncentrací 1 mM. Po proměření aktivity scintilačním detektorem MicroBeta 1450 TriLux bylo pro každou jamku vypočítáno procento inhibice definované vztahem

$$P_i = 100 \left( 1 - \frac{A_i - A_p}{A_{\max} - A_p} \right), \quad (1)$$

kde  $P_i$  je procento inhibice vazby radioaktivně značeného proteinu v  $i$ -té jamce,  $A_i$  je naměřená aktivita v  $i$ -té jamce,  $A_p$  je aktivita pozadí a  $A_{max}$  je maximální naměřená aktivita. Dále byla do grafu vynesena závislost procenta inhibice na záporném dekadickém logaritmu koncentrace inhibitoru, jednotlivými body byla proložena sigmoida a v programu OriginPro 8 byl spočítán inflexní bod, který odpovídal hodnotě  $-\log IC_{50}$ .

#### 4.10.3 Vazebné experimenty s fluorescenčně značenými proteiny

Transparentní 384 jamková destička byla pokryta v kvadrupletech spektrem sacharidových ligandů. Na negativní kontrolu byl použit BSA. Vazebná místa každé jamky byla blokována 50  $\mu$ l 2% BSA v TBS+C pufru po dobu 3 hodin při 4 °C. Destička byla následně třikrát promyta TBS+C puftrem a do každé jamky bylo nanášeno 20  $\mu$ l ekvimolární směsi fluorescenčně značených proteinů tj. mNKR-P1A značený fluoresceinem a mNKR-P1C značený rhodaminem. Po 2 hodinové inkubaci při 4 °C byla destička znovu třikrát promyta TBS+C puftrem a ponechána vysušit při 37 °C. Potom byl komplex ligand-fluorescenčně značený protein rozdisociován pomocí 0,1 M acetátového pufru s pH=4,2 obsahujícího 150 mM NaCl, 0,1% oktyl- $\beta$ -D-glucosid, 0,1% Triton X-100 a 0,1% 3-(benzyl dimethylamonio)-propansulfonát. Po 12 hodinové inkubaci byla na monochromátorové čtečce destiček Safire<sup>2</sup> naměřena intenzita fluorescence ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 496/519$  nm pro fluorescein-mNKR-P1A a  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 546/577$  nm pro rhodamin-mNKR-P1C).

#### 4.11 Hmotnostní spektrometrie

Po vyvinutí měkkých technik ionizace v 80. letech minulého století našla hmotnostní spektrometrie významné uplatnění v proteomice. Tato fyzikálně-chemická metoda poskytuje informace o hmotnosti molekul, molekulových fragmentů a o některých strukturálních aspektech proteinů. Výhodou hmotnostní spektrometrie je její citlivost, rychlost a také vysoká rozlišovací schopnost. V diplomové práci byla hmotnostní spektrometrie použita pro identifikaci exprimovaných proteinů, dále pro určení jejich celkové molekulové hmotnosti, ověření homogenity a čistoty proteinových preparátů a pro zjištění lokalizace disulfidových vazeb.

Před stanovením molekulové hmotnosti byly proteinové preparáty přečištěny a odsoleny na Microtrapu, tj. malé koloně s obrácenou fází. Po nanášení vzorku na kolonu pomocí Hamiltonovy stříkačky byla kolona dvakrát promyta roztokem 5 % acetonitrilu a 0,1 % TFA.

Proteiny byly eluovány 50  $\mu$ l roztoku 80 % acetonitrilu a 0,1 % TFA. Odsolené proteiny byly potom ionizovány elektrosprayem (ESI) a hmotnost vzniklých iontů byla analyzována na FT MS analyzátoru s iontově cyklotronovou rezonancí (ICR). Měření prováděl Mgr. Petr Novák, Ph.D.

Při identifikaci rekombinantních proteinů byla prvním krokem SDS elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu. Po obarvení gelu roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250 byla zóna odpovídající potenciálnímu rekombinantnímu proteinu vyříznuta skalpelem a rozkrájena na kostky o hraně 1 mm, které byly následně 3 hodiny inkubovány při laboratorní teplotě se 100  $\mu$ l N-ethylmorpholinoacetátového pufru pH=8,4 a 100  $\mu$ l acetonitrilu. Směs acetonitrilu a N-ethylmorpholinoacetátového pufru byla opatrně odebrána pipetou a vysušené kousky gelu byly rehydratované 100  $\mu$ l vody po dobu 5 minut. Potom byla voda opatrně odebrána pipetou a kousky gelu byly inkubovány 5 minut ve 100  $\mu$ l acetonitrilu. Inkubace 100  $\mu$ l acetonitrilu a rehydratace vodou se zopakovala celkově třikrát. Potom byly kousky gelu dosušeny na vzduchu při laboratorní teplotě, následně převrstveny 35  $\mu$ l N-ethylmorpholinoacetátového pufru a nakonec byl k suspenzi přidán 1  $\mu$ l trypsinu (0,1 mg/ml) a potom TFA do finální koncentrace 1 %. Po 12 hodinové inkubaci při 37 °C byla směs 15 minut sonikována a odevzdána Mgr. Danielu Kavanovi na MALDI-TOF analýzu tryptických štěpů. Přítomnost rekombinantních proteinů byla potvrzena komparací naměřených hodnot s databází v programu Mascot.

#### 4.12 Proteinová NMR spektroskopie

Proteinová NMR spektroskopie poskytuje cenné informace o struktuře a dynamice proteinů. Nejpoužívanější technikou v proteinové NMR spektroskopii je měření  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spekter (z angl. Heteronuclear Single Quantum Coherence) proteinů značených izotopem dusíku  $^{15}\text{N}$ . Rekombinantní proteiny označené izotopem dusíku  $^{15}\text{N}$  je možné vyprodukovat na minimálním médiu, kde jediným zdrojem dusíku je  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Každý signál v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru reprezentuje N-H skupinu peptidových vazeb nebo postranních řetězců některých aminokyselin. Každá aminokyselina v polypeptidovém řetězci s výjimkou prolinu tedy poskytuje jeden signál. Ve spektru jsou dále viditelné postranní  $\text{N}\epsilon$ - $\text{H}\epsilon$  skupiny tryptofanu,  $\text{N}\delta$ - $\text{H}\delta 2$  a  $\text{N}\epsilon\text{H}\epsilon 2$  skupiny asparaginu a glutaminu. Principiálně jsou viditelné i  $\text{N}\epsilon$ - $\text{H}\epsilon$  skupiny argininu.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra jsou často označována jako fingerprinty proteinů, protože každý protein má unikátní rozložení signálů. Této techniky se často používá

na ověření poskládání rekombinantního proteinu, dále na vyšetření stability proteinu *in vitro* případně na pozorování dynamiky proteinu při titračních experimentech neznačených ligandů.

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra v diplomové práci byla měřena za účelem ověření poskládání rekombinantních proteinů mNKR-P1A a mNKR-P1C a kvůli vyšetření stability obou proteinů *in vitro*. Spektra byla naměřena na spektrometru Bruker Avance 600 MHz, který byl vybavený kryosondou, na VŠCHT ve spolupráci s Doc. Ing. Richardem Hrabalem, CSc. Na měření byly použity značené proteiny  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1A resp.  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1C o koncentraci 0,34 mM resp. 0,21 mM. Proteiny byly převedeny do PIPES pufru a těsně před měřením byla k roztokům proteinů přidána  $\text{D}_2\text{O}$  do finální koncentrace 10%.

#### 4.13 Dynamický rozptyl světla

Principem metody dynamického rozptylu světla (DLS), která je též známa jako kvazielastický rozptyl nebo fotokorelační spektroskopie, je měření světla rozptýleného molekulami studované látky v průběhu času. Pokud by byla molekula stacionární, množství rozptýleného světla by bylo konstantní, ale protože molekuly studované látky v roztoku difundují Brownovým pohybem, existují interference, které způsobují změny intenzity rozptýleného světla. Čím se částice pohybují rychleji, tím rychleji se mění intenzita. Rychlost těchto změn je přímo závislá na difúzi molekul, kterou ovlivňuje teplota, viskozita rozpouštědla a velikost molekul studované látky. Pokud jsou teplota a rozpouštědlo konstantní, proměnlivost intenzity rozptýleného světla je přímo úměrná hydrodynamickému poloměru ( $R_h$ ) molekuly. Měření  $R_h$  se realizuje porovnáváním změn náhodného vzoru intenzity rozptýleného světla v čase a následným určením autokorelační funkce, která se převede na měření velikosti studované molekuly po zahrnutí všech ostatních parametrů ovlivňujících signál, jako je teplota, viskozita rozpouštědla a vlnová délka laserového světla.

Dynamický rozptyl světla byl použit k ověření monodisperzity proteinových preparátů a na měření distribuce velikosti molekul. Měření se realizovalo v 45  $\mu\text{l}$  křemenných kyvetách při 18 °C na detektoru DLS Zetasizer Nano na Ústavu makromolekulární chemie, AV ČR ve spolupráci s Ing. Petrem Kolenkem. DLS byl měřen při koncentraci proteinů 0,1 mg/ml v HEPES pufru.

#### 4.14 Analytická ultracentrifuga

Analytická ultracentrifuga (AUC) sestavená Svedbergem v roce 1923 sehrála významnou úlohu v počátcích studia makromolekul. Po příchodu mnohem jednodušších technik, kterými bylo možno určovat molekulovou hmotnost makromolekul, se AUC téměř vytratila. V posledních letech však dochází vlivem digitalizace a počítačového zpracování dat k jejímu znovuobjevení, přičemž velké uplatnění nachází v charakterizaci proteinových komplexů, proteinových interakcí, vazby ligandu na protein, ale i v určování proteinové oligomerie a základních hydrodynamických a termodynamických parametrů.

V diplomové práci byly použity dvě metody AUC, a to metoda sedimentační rychlosti a metoda sedimentační rovnováhy. Metoda sedimentační rychlosti byla použita na určení sedimentačního koeficientu a jiných hydrodynamických parametrů a na odhad tvaru proteinů. Sedimentační koeficient  $s$  je definovaný Svedbergovou rovnicí,

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - v\rho)}{N_A f} = \frac{MD(1 - v\rho)}{RT}, \quad (2)$$

kde  $u$  je radiální rychlost koncentračního rozhraní,  $\omega$  je uhlová rychlost rotoru,  $r$  je radiální vzdálenost rozhraní od osy otáčení,  $M$  je molekulová hmotnost makromolekuly,  $v$  je parciální specifický objem makromolekuly,  $\rho$  je hustota rozpouštědla,  $N_A$  je Avogadrovo číslo,  $f$  je frikční koeficient,  $D$  je difúzní koeficient a  $R$  je molární plynová konstanta. Princip metody sedimentační rychlosti je následující: Na roztok proteinu, který je umístěný v sektorově tvarované cele v rotoru AUC se aplikuje poměrně vysoké odstředivé zrychlení. Po určitém čase dochází k vytvoření koncentračního rozhraní, které se pohybuje radiálním směrem ke dnu cely. Výstupem moderní AUC při měření sedimentační rychlosti jsou koncentrační profily studované látky v radiálním směru celého roztoku jako funkce času. Dalším krokem je analytické nebo numerické řešení Lammovy rovnice, což je parciální diferenciální rovnice, která popisuje sedimentaci a difúzi makromolekuly v sektorově tvarované cele. Řešení Lammovy rovnice a finální určení sedimentačního a difúzního koeficientu provádějí některé veřejně dostupné programy jako Sedfit, Svedberg nebo Lamm.

Metoda sedimentační rovnováhy byla použita pro odhad molekulové hmotnosti rekombinantních proteinů s cílem prozkoumat jejich oligomerii. Při této technice se roztok proteinu vystaví menšímu odstředivému zrychlení než v případě sedimentační rychlosti a

výsledkem je opět sedimentace proteinů ke dnu cely. Proti zvyšující se koncentraci proteinu na dně cely začíná působit difúze a po určitém čase dochází k ustálení rovnováhy mezi sedimentací a difúzí. Ve stavu rovnováhy je distribuce koncentrace proteinu v radiálním směru exponenciální a invariantní v čase. Naměřenými daty se fituje exponenciální funkce distribuce koncentrace proteinu v radiálním směru a z ní se při znalosti ostatních parametrů následně určuje molekulová hmotnost proteinu.

Měření sedimentační rychlosti a sedimentační rovnováhy bylo realizované ve spolupráci s Mgr. Ondřejem Vaňkem v analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I použitím absorbanční a laserové interferenční optiky a rotoru An50Ti. Vzorky proteinů o objemu 120 a 420  $\mu\text{l}$  byly před experimentem dialyzovány proti 2 litrům HEPES pufru po dobu 12 hodin. Metoda sedimentační rychlosti byla prováděna při 40 000 ot./min a 20 °C pomocí dvoukanálového centerpiecu, do kterého bylo naneseno 400  $\mu\text{l}$  retenátu s koncentrací proteinu 0,4 mg/ml a 400  $\mu\text{l}$  dialyzátu jako slepého vzorku. Absorbance byla měřena při 300 nm v 10 minutových intervalech s radial step size 30  $\mu\text{m}$ . Celkově bylo nasnímáno 50 záznamů. Při metodě sedimentační rovnováhy byl použit šestikanálový centerpiece, do kterého bylo naneseno 100  $\mu\text{l}$  retenátu s koncentrací proteinu 0,1 mg/ml a 100  $\mu\text{l}$  dialyzátu jako slepého vzorku. Měření rovnováhy bylo prováděno při 20 °C a při rychlostech 27 000, 30 000 a 33 000 ot./min. Absorbance byla měřena po 16 hodinách ustalování rovnováhy při 295 nm a radial step size 10  $\mu\text{m}$ . Hustota rozpouštědla a parciální specifický objem rekombinantních proteinů byly určeny v programu Sednterp. Naměřená data byla nakonec analyzována v programu Sedfit.

#### 4.15 Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) umožňuje určit termodynamické parametry stability makromolekul z množství tepla, které je uvolněno nebo spotřebováno při tepelně indukovaných konformačních přechodech. Při měření je kontinuálně zahřívána jak cela se vzorkem, tak i referenční cela, která je naplněná pouze puftrem. Teplota se obvykle mění v rozsahu 0-100 °C s gradientem 1 °C/min. Pokud dojde v cele se vzorkem k denaturaci proteinu, kdy se část dodaného tepla spotřebuje na narušení nekovalentních vazeb, bude teplota cely se vzorkem nižší než teplota referenční cely. Z rozdílu teplot mezi oběma celami, který je zaznamenáván termočlánkem, je určena dodatečná energie, která je potřebná pro vyrovnání teplot obou cel. Tato dodatečná energie je zaznamenávána. Výsledkem měření je

termogram, který udává závislost tepelné kapacity  $C_p$  roztoku proteinu na teplotě. Teplota odpovídající maximu termogramu je teplota tání  $T_m$ , která charakterizuje teplotní stabilitu proteinu. Při teplotě tání  $T_m$  je právě polovina molekul v denaturovaném stavu.

Cílem DSC bylo určit základní termodynamické parametry připravených proteinových preparátů a získat informace o jejich stabilitě případně reverzibilitě termální denaturace. Kalorimetrické měření bylo provedeno RNDr. Kateřinou Hofbauerovou, Ph.D. a RNDr. Vladimírem Kopeckým, Ph.D. na Matematicko-fyzikální fakultě UK, pomocí kalorimetru Model 6100 Nano II Differential Scanning Calorimetr.

#### 4.16 Proteinová krystalizace

Krystalizace proteinů je empirický proces založený na hledání fyzikálně-chemických podmínek a parametrů a jejich následné optimalizaci vedoucí k produkci monokrystalů vhodných pro rentgenovou strukturní analýzu. Strategie krystalizace spočívá v pomalém převedení roztoku proteinu do bodu těsně nad jeho limit nasycení, kdy dochází ke vzniku malého množství krystalizačních jader, která potom pokračují v růstu. Klasické metody krystalizace jsou založené na zvyšování úrovně nasycení roztoku použitím vhodného precipitačního činidla (např.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , PEG) a dále na modifikaci pH, teploty, koncentrace proteinu nebo typu rozpouštědla.

Krystalizace rekombinantních proteinů mNKR-P1A a mNKR-P1C byla prováděna na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, ve spolupráci s Ing. Petrem Kolenkem. Pro počáteční screening krystalizačních podmínek byla zvolena metoda sedící kapky (sitting drop vapor diffusion) na 96 jamkových destičkách a pro optimalizaci podmínek byla zvolena metoda visící kapky (hanging drop vapor diffusion) na 24 jamkových destičkách. Pro počáteční screening podmínek byly zvoleny komerčně dostupné sady Index Screen, Crystal I Screen a Crystal II Screen. Na silikonizovaný povrch krystalizačních destiček byla nejprve nanesena 0,4  $\mu\text{l}$  kapka proteinu o koncentraci 10,0 mg/ml a potom bylo ke kapce proteinu přidáno 0,4  $\mu\text{l}$  matečného roztoku z 80  $\mu\text{l}$  rezervoáru. Celý objem kapky byl nasán špičkou pipety, promíchán a nová kapka byla umístěná do středu destičky. Jamky krystalizační destičky byly uzavřené a kompletní krystalizační destička byla umístěná do bezotřesového inkubátoru s teplotou 18 °C. Na pozorování krystalů byl použit optický mikroskop s polarizačním filtrem.

## 5. Výsledky

### 5.1 Úvod k výsledkům

Aminokyselinové sekvence mNKR-P1A (GI:200059) a mNKR-P1C (GI:122065363) jsou uvedeny na *obr. 12*. Vypočítaná molekulová hmotnost konstruktů mNKR-P1A má hodnotu 15 991,80 Da a odhadnutý izoelektrický bod 4,77. Analogicky, molekulová hmotnost mNKR-P1C má hodnotu 15 409,22 a izoelektrický bod 4,86. Konstrukty mNKR-P1A a mNKR-P1C jsou sekvenčně homologické z 85,7%. Porovnání sekvencí je znázorněno na *obr. 13*.

#### mNKR-P1A

**MDTARVYFGLKPPRTPGAWHESPPSLPPDA ██████████ RSHRSALKLSCAGLILLVVTLLIGMSVLV  
RVLIQKPSIEKCYVLIQENLNKTTDCSAKLECPQDWLSHRDKCFHVSQVSNTWEEGLVDCDG  
KGATLMLIQDOEELRFLLDSEKEKYNFS ██████████ RYTLPPDMNWKWINGSTLNSDVLKITGDTE  
DSCAAISGDKVTFESCNSDNRWICQELYHETLSNYVGYGH**

#### mNKR-P1C

**MDTASIYLGLKPPRTLGAWHESPPSLPPDA ██████████ RSHRLALKLSCAGLILLVLTLLIGMSVLV  
RVLVQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSNTWEEGQADCGR  
KGATLLLIQDOEELRFLLDSEKEKYNFS ██████████ RFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKITGVTE  
GSCASILGDKVTPESCASDNRWICQELNHETPSNDS**

*Obr. 12 Aminokyselinové sekvence receptorů mNKR-P1A a mNKR-P1C. Intracelulární oblast receptoru je znázorněná červeně, transmembránový segment černě, extracelulární část modře a sekvence připravovaných konstruktů je zvýrazněná podtržením. Zelenou barvou je dále vyznačen motiv CxCP, který participuje na asociaci s protein-tyrosin-kinasou p56<sup>lck</sup>, fialovou barvou je znázorněn motiv WIGL, který je charakteristický pro C-lektinové NK receptory a žlutou barvou jsou znázorněny cysteiny, které by měly vytvářet disulfidové vazby.*

```

          10      20      30      40      50
mNKR-P1A  SAKLECPQDWLSHRDKCFHVSQVSNTWEEGLVDCDGGKATLMLIQDQEEL 50
mNKR-P1C  SVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSNTWEEGQADCGRKGATLLLIQDQEEL 50

          60      70      80      90      100
mNKR-P1A  RFLLSIKEKYNSFWIGLRYTLPDMNWKWINGSTLNSDVLKITGDTENDS 100
mNKR-P1C  RFLLSIKEKYNSFWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKITGVTENG 100

          110     120     130
mNKR-P1A  CAAISGDKVTFESCNSDNRWICQKELYHETLSNYVGYGH 139
mNKR-P1C  CASILGDKVTFESCASDNRWICQKELNHETPSNDS 135

```

Obr. 13 Porovnání aminokyselinových sekvencí konstruktů *mNKR-P1A* a *mNKR-P1C*.

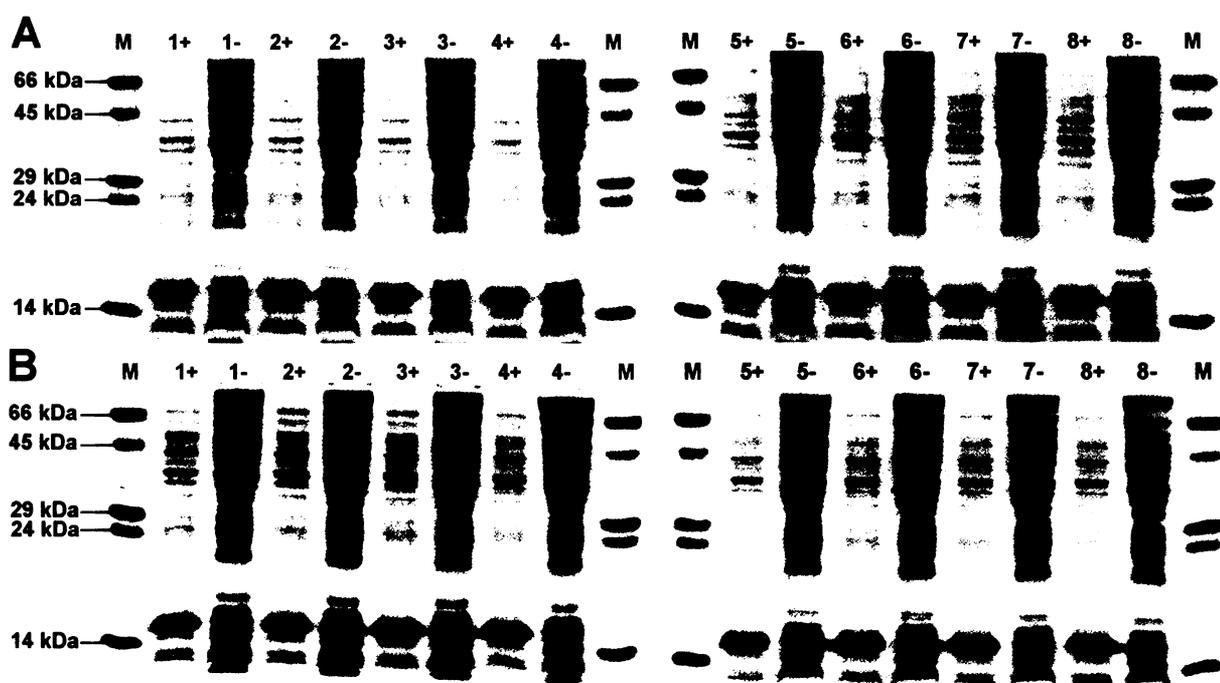
cDNA obou receptorů byla připravena technikou RT-PCR z RNA izolované ze slezin B6/BL myší. Izolaci RNA a RT-PCR provedl Vojtěch Žůrek. DNA fragmenty kódující konstrukty *mNKR-P1A* a *mNKR-P1C* byly následně zaklonované do expresního vektoru pET-30a(+) mezi restrikční místa pro *NdeI* a *HindIII*. Sekvence expresních vektorů označených jako pMNKR-P1A a pMNKR-P1C byla ověřená DNA sekvenováním. Uvedené expresní vektory byly připraveny Prof. RNDr. Karlem Bezouškou, DSc.

## 5.2 Rekombinantní exprese mNKR-P1A a mNKR-P1C

### 5.2.1 Transformace kompetentních buněk a selekce produkčních klonů

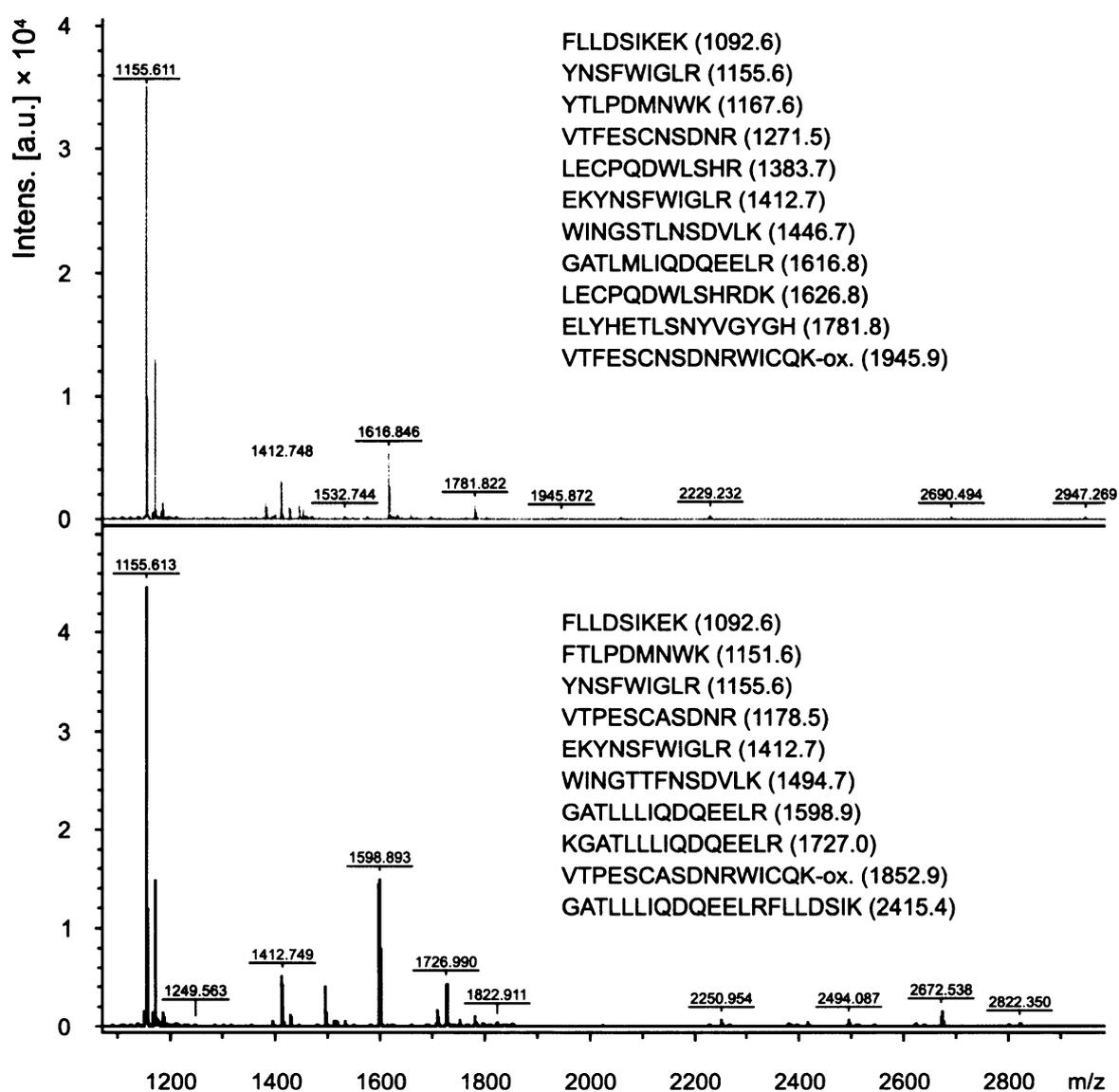
Prvním krokem v expresi mNKR-P1A a mNKR-P1C byla transformace kompetentních buněk BL21(DE3) Gold rekombinantními plazmidy pMNKR-P1A a pMNKR-P1C. Kompetentní buňky byly transformovány metodou tepelného šoku podle postupu 4.1.1. Po 12 hodinové inkubaci vyrostlo na obou LB agaroch s obsahem tetracyklinu a kanamycinu v Petriho miskách asi 200 bakteriálních kolonií. Na LB agaru, který sloužil jako negativní kontrola, nevyrostly žádné kolonie, čímž byla vyloučena kontaminace.

Osm bakteriálních kolonií z jednoho LB agaru bylo asepticky přeneseno do osmi 1 ml LB médií s obsahem tetracyklinu a kanamycinu a bakteriální kultury byly kultivovány při 220 ot./min a 37 °C do stacionární fáze. Dále následovala selekce produkčních klonů podle postupu 4.1.2. Exprese rekombinantních proteinů byla analyzována SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu a následnou komparací elektroforeticky rozdělených proteinů mezi indukovanými a neindukovaným kulturami jednotlivých transformantů (*obr. 14*). Ve všech drahách elektroforeogramu označených jako plus je viditelná markantní zóna v oblasti 15-16 kDa, která by měla odpovídat exprimovanému mNKR-P1A resp. mNKR-P1C.



Obr. 14 Selekcce produkčních klonů mNKR-P1A (A) a mNKR-P1C (B). Dráha M obsahuje standardy molekulových hmotností.

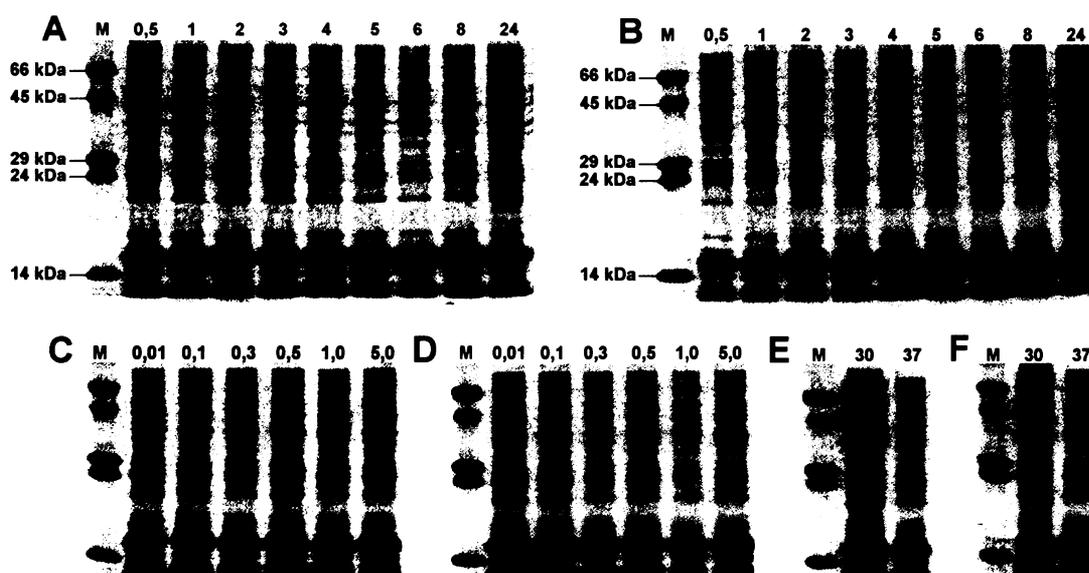
Identifikace rekombinantních proteinů byla realizována metodou peptidového mapování. Za tímto účelem byla zóna odpovídající mNKR-P1A resp. mNKR-P1C v dráze 1+ vyříznuta skalpelem, protein byl rozštěpený trypsinem podle postupu uvedeného v kapitole 4.11 a odevzdaný Mgr. Danielu Kavanovi na MALDI-TOF analýzu tryptických štěpů. Přítomnost rekombinantních proteinů byla potvrzena komparací naměřených hodnot s databází v programu Mascot. Hmotnostní spektra MALDI-TOF tryptických fragmentů jsou znázorněna na obr. 15. K producentům 1, 2, 3 a 4 byl přidán sterilní glycerol do finální koncentrace 15% a bakteriální kultury byly uchovány při -80 °C.



Obr. 15 MALDI-TOF hmotnostní spektrum tryptických štěpů mNKR-P1A (modře) a mNKR-P1C (červeně). V pravém horním rohu jsou znázorněny sekvence odpovídající některým tryptickým štěpům.

### 5.2.2 Optimalizace produkce rekombinantních proteinů

Cílem optimalizace proteinové produkce bylo zjistit, jak připravit maximální množství proteinu za minimální čas s využitím minimálního množství finančních prostředků. Optimalizovanými parametry byl jednak čas proteinové produkce, dále teplota produkce a koncentrace induktoru IPTG. Při optimalizaci se postupovalo podle kapitoly 4.1.3. Vliv jednotlivých parametrů na proteinovou produkci byl analyzován SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu (*obr. 16*).



*Obr. 16 Optimalizace proteinové produkce. Optimalizace času produkce mNKR-P1A (A) a mNKR-P1C (B), optimalizace vlivu koncentrace induktoru IPTG na produkci mNKR-P1A (C) a mNKR-P1C (D), optimalizace teploty produkce mNKR-P1A (E) a mNKR-P1C (F).*

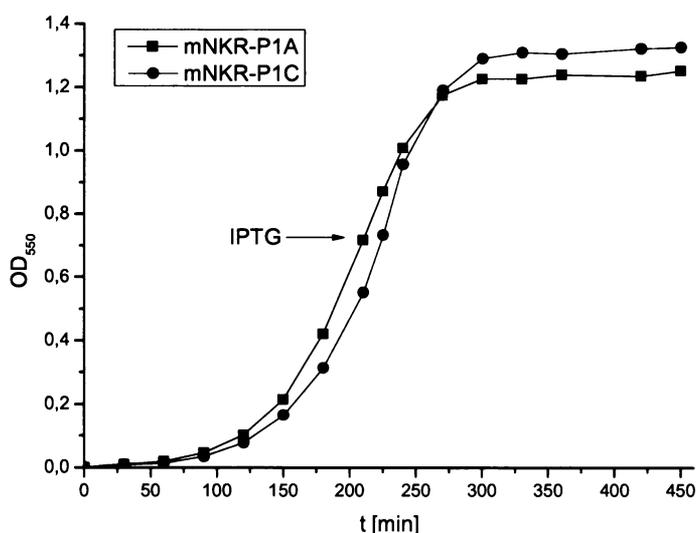
Z elektroforeogramů, které znázorňují kinetiku produkce rekombinantních proteinů (mNKR-P1A na *obr. 16A* a mNKR-P1C na *obr. 16B*), vyplývá, že oba proteiny se produkují už po 30 minutách od indukce proteinové exprese. V časovém intervalu od 2 do 8 hodin po indukci je množství proteinu v analyzovaných frakcích přibližně konstantní. Po 24 hodinách od indukce dochází k parciální degradaci jak mNKR-P1A tak i mNKR-P1C.

Vliv koncentrace induktoru IPTG na proteinovou produkci je uvedený na *obr. 16C* pro mNKR-P1A a na *obr. 16D* pro mNKR-P1C. Pozoruhodné je, že k nejmarkantnější expresi rekombinantních proteinů došlo u producentů, u kterých byla proteinová exprese indukována jen 0,01 a 0,1 mM IPTG.

Vliv teploty na produkci proteinů dokumentují elektroforeogramy na *obr. 16E* pro mNKR-P1A a *16F* pro mNKR-P1C. Protein mNKR-P1A se produkuje přibližně se stejnou intenzitou u pozorovaných producentů při obou teplotách. Při teplotě 30 °C jsou však v buněčném lyzátu ve velké míře zastoupeny bakteriální proteiny, které by mohly komplikovat purifikaci rekombinantního proteinu. Protein mNKR-P1C se intenzivněji produkuje při teplotě 37 °C a v porovnání s produkcí při 30 °C buněčný lyzáat obsahuje menší množství bakteriálních proteinů.

Za optimální čas produkce obou rekombinantních proteinů byly nakonec zvoleny 2 hodiny, za optimální koncentraci induktoru IPTG byla zvolena koncentrace 0,01 mM a za optimální teplotu produkce teplota 37 °C.

### 5.2.3 Velkoobjemová produkce proteinů a zjištění jejich lokalizace

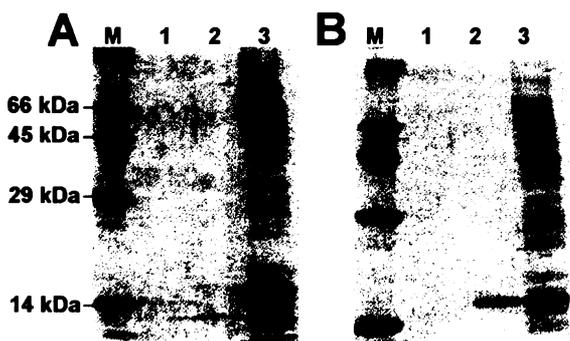


*Obr. 17* Růstová křivka producentů mNKR-P1A a mNKR-P1C stanovená spektrofotometricky při submerzní kultivaci na LB médiu.

Velkoobjemová produkce proteinů byla realizována nejčastěji v 1 litru LB média obsahujícím tetracyklin a kanamycin. Při  $OD_{550}=0,7$  se uskutečnila indukce proteinové exprese 0,01 mM IPTG. Bakteriální kultura byla následně kultivovaná při 220 ot./min a 37 °C po dobu 2 hodin. Po dobu submerzní kultivace producentů byla spektrofotometricky při  $OD_{550}$  stanovena růstová křivka (*obr. 17*) (pozn. z důvodu získání dostatečného počtu hodnot pro růstovou křivku, byla v tomto případě

bakteriální kultura ponechána kultivovat až 4 hodiny po indukci proteinové exprese).

Dalším krokem bylo zjištění lokalizace exprimovaného proteinu, která byla určena elektroforetickou analýzou frakcí po diferenční centrifugaci buněčného lyzátu. Při analýze se postupovalo podle kapitoly 4.1.5. Elektroforeogramy znázorňující lokalizaci exprimovaných proteinů jsou znázorněny na *obr. 18*, kde dráha M obsahuje standardy molekulových hmotností, dráha 1 představuje médium resp. supernatant po odstředění buněčné kultury



Obr. 18 Zjištění lokalizace exprimovaného mNKR-P1A (A) a mNKR-P1C (B) elektroforetickou analýzou frakcí po diferenční centrifugaci buněčného lyzátu.

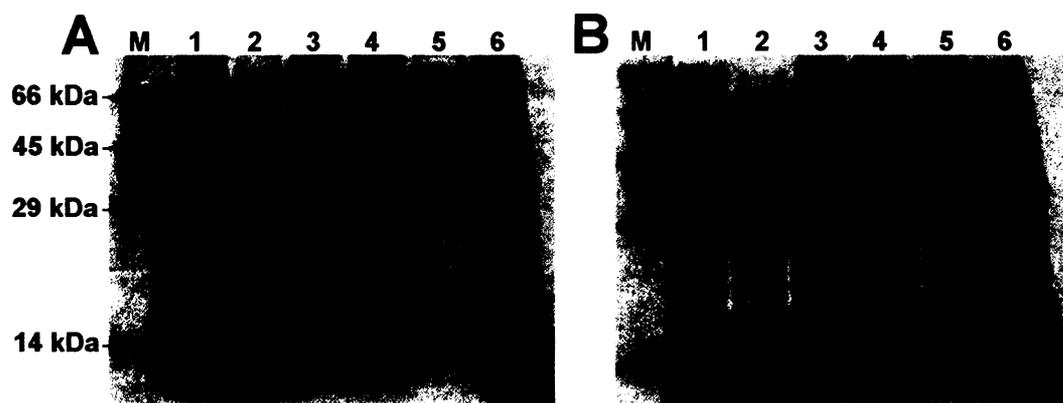
rozpuštěných agregátů označovaných jako inkluzní tělíska a mNKR-P1C se exprimuje jak ve formě inkluzních tělísek, tak i ve formě rozpustného proteinu lokalizovaného v cytoplasmě. Protože pokusy o purifikaci (kombinace chromatografických technik) rozpustné formy mNKR-P1C selhaly, byly oba rekombinantní proteiny izolovány výhradně z inkluzních tělísek.

#### 5.2.4 Izolace, purifikace a solubilizace inkluzních tělísek

Izolace inkluzních tělísek byla prováděna podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.6. Proces izolace byl monitorován SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu. Elektroforeogramy jsou uvedeny na obr. 19, kde dráha M obsahuje standardy molekulových hmotností, dráha 1 sloužící jako negativní kontrola znázorňuje proteinový obsah lyzátu producenta, u kterého nebyla indukována proteinová exprese, dráha 2 sloužící jako pozitivní kontrola znázorňuje proteinový obsah lyzátu producenta po indukci exprese pomocí IPTG, do dráhy 3 byl aplikován supernatant po promývání inkluzních tělísek sacharosovým lyzačním pufrem, do dráhy 4 byl aplikován supernatant po promývání inkluzních tělísek pufrem s detergentem Triton X-100, dráha 5 obsahovala supernatant po finálním promytí inkluzních tělísek promývacím pufrem a dráha 6 představuje vyizolovaná inkluzní tělíska, resp. sediment po promytí inkluzních tělísek promývacím pufrem.

Z uvedených elektroforeogramů vyplývá, že při izolaci inkluzních tělísek proteinu mNKR-P1C docházelo k výrazným ztrátám jeho rozpustné formy do promývacích pufřů. Pokusy o purifikaci rozpustné formy mNKR-P1C z promývacích pufřů sérií chromatografických technik se však ukázaly jako neúspěšné. Inkluzní tělíska byla po izolaci solubilizována v guanidinovém pufru podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.7.

při 5 000 g, do dráhy 2 byl aplikován supernatant po odstředění desintegrovanych buněk při 15 000 g a dráha 3 představuje sediment po odstředění desintegrovanych buněk při 15 000 g. Z elektroforeogramů vyplývá, že mNKR-P1A se exprimuje ve formě nerozpustných agregátů označovaných jako inkluzní tělíska a mNKR-P1C se exprimuje jak ve formě inkluzních tělísek, tak i ve formě rozpustného proteinu lokalizovaného v cytoplasmě. Protože pokusy o purifikaci (kombinace chromatografických technik) rozpustné formy mNKR-P1C selhaly, byly oba rekombinantní proteiny izolovány výhradně z inkluzních tělísek.

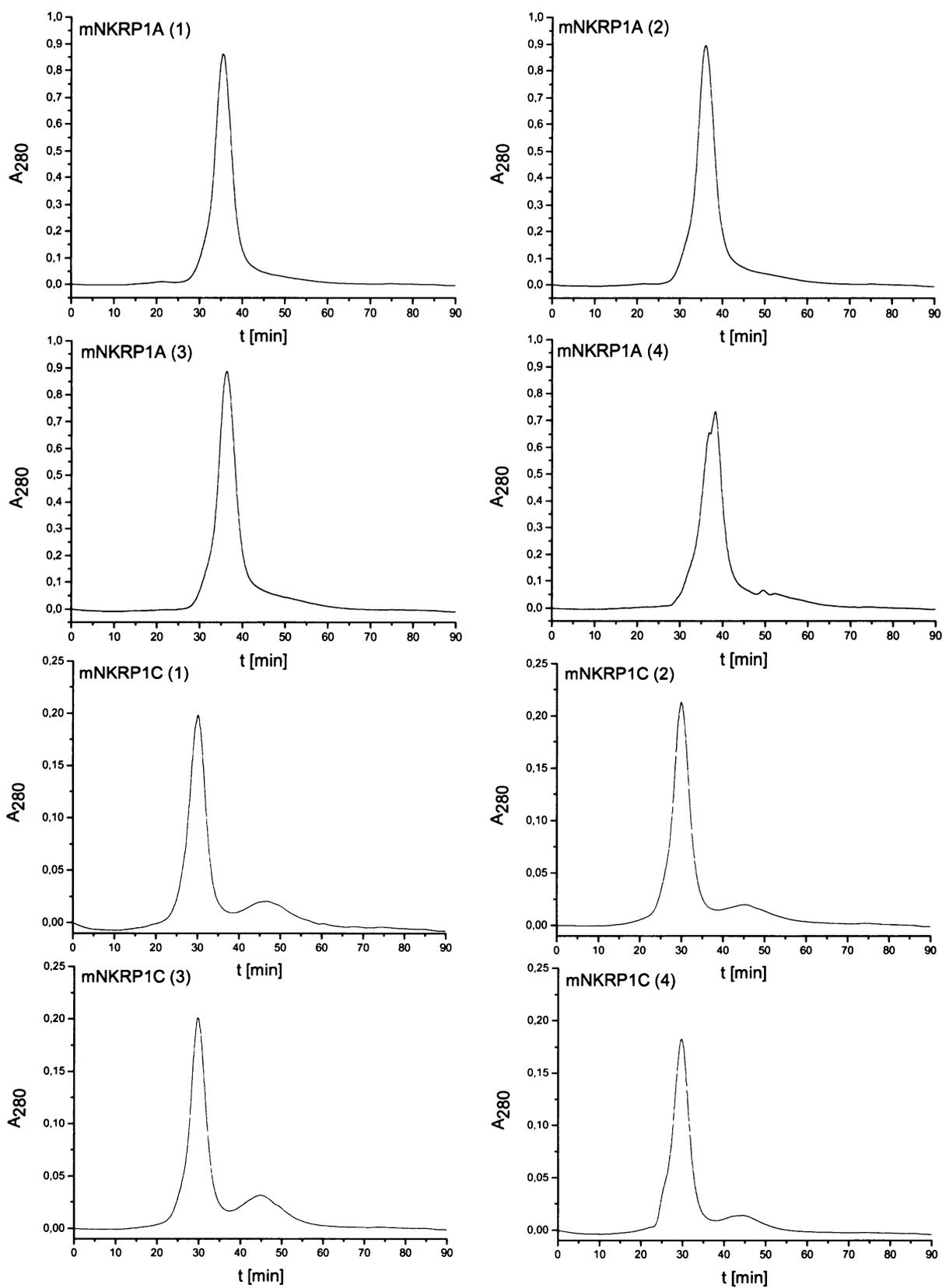


Obr. 19 Průběh izolace inkluzních tělísek monitorovaný SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu. Izolace inkluzních tělísek mNKR-P1A znázorněna na panelu A, mNKR-P1C na panelu B. Popis jednotlivých drah je uveden v textu.

## 5.3 Optimalizace renaturace a purifikace rekombinantních proteinů

### 5.3.1 Optimalizace renaturace

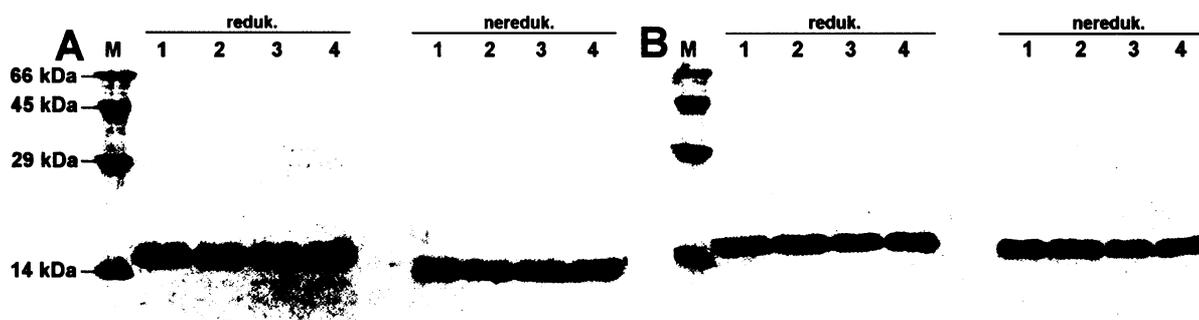
*In vitro* renaturace rekombinantních proteinů byla realizována metodou rychlého naředění s využitím L-argininu jako nízkomolekulárního chaperonu. Při optimalizaci renaturace bylo postupováno podle kapitoly 4.2.1. Optimalizovanými parametry byla koncentrace argininu, poměr redoxního systému cysteamin k cystaminu a pH. Složení čtyř renaturačních pufrů obsahujících Tris-HCl, arginin, cystamin, cysteamin, chlorid vápenatý a azid sodný je uveden v kapitole 4.2.1, v *Tabulce 1*, kde *c* je molární koncentrace. Po dialýze byl roztok proteinu zahuštěn ultrafiltrací na objem 30 ml s využitím ultrafiltrační membrány z PLGC celulosy o průměru 76 mm a s limitem 10 kDa. Potom byl roztok proteinu přefiltrován přes filtr Whatman o průměru 25 mm a následně byl nanesen při průtokové rychlosti 1,0 ml/min na kolonu Q-Sepharosy FF o rozměrech 1,0 × 6,0 cm ekvilibrovanou dialyzačním pufrem. Po nanesení proteinu byla kolona promyta dialyzačním pufrem a navázané proteiny byly eluovány lineárním gradientem NaCl od 9 mM do 1 M, který trval 60 minut. Eluce proteinů byla monitorována průtokovým fotometrickým detektorem při 280 nm a proteinové frakce byly na základě  $A_{280}$  jímány manuálně. Eluční profily rekombinantních proteinů renaturovaných při čtyřech různých podmínkách jsou znázorněny na *obr. 20*, kde *t* je retenční čas a  $A_{280}$  je absorbance při 280 nm. V levém horním rohu je uvedeno číslo pufru, v kterém byl protein renaturován. Proteinové frakce byly dále analyzované SDS elektroforézou.



Obr. 20 Purifikace mNKR-P1A a mNKR-P1C na Q-Sepharose FF. V levém horním rohu elučních profilů je uvedeno číslo pufru, v kterém byl protein renaturovaný.

### 5.3.2 Ověření homogenity proteinových preparátů SDS elektroforézou za redukujících a neredukujících podmínek

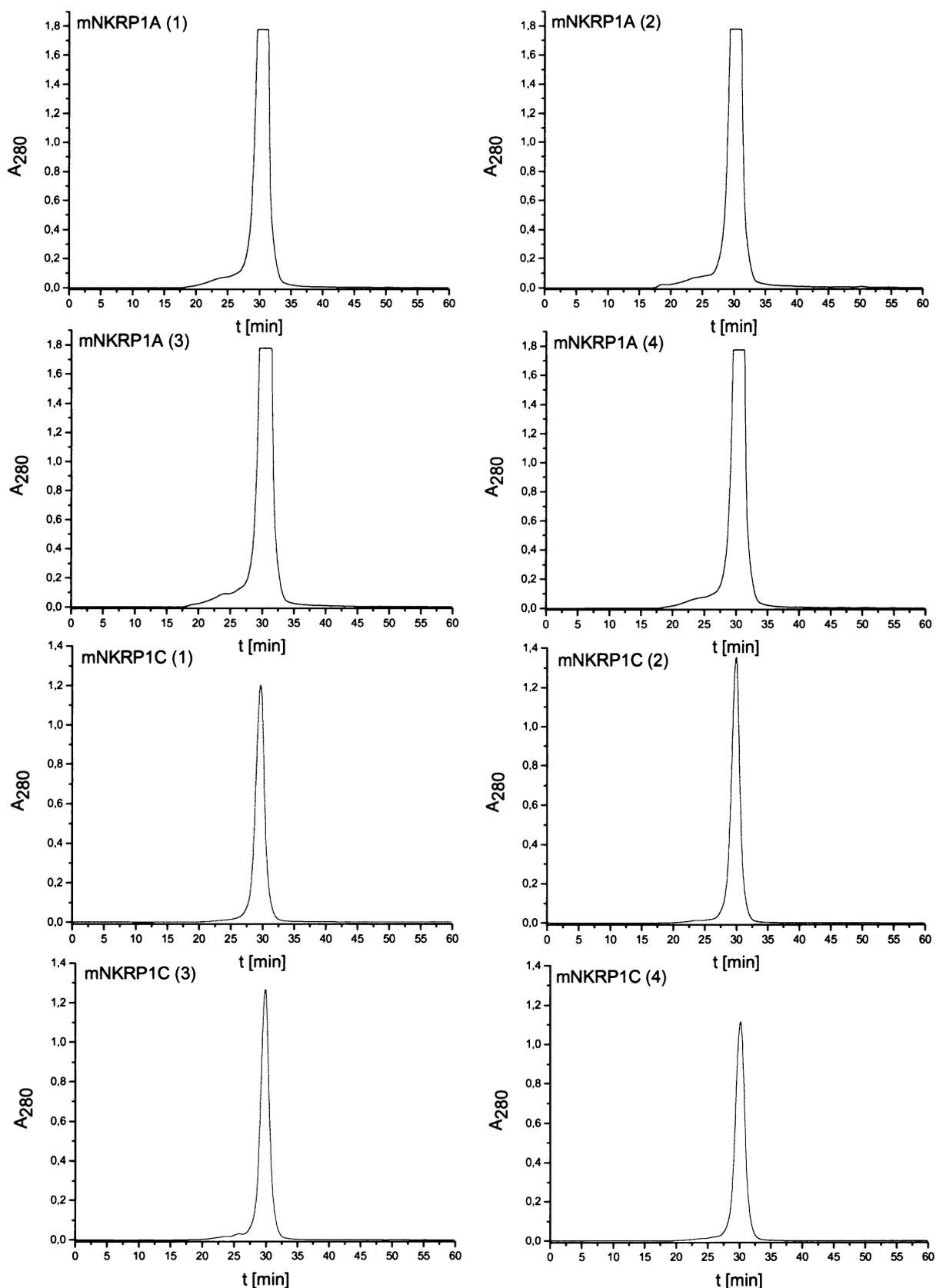
Proteinové preparáty po purifikaci na Q-Sepharose FF byly analyzovány SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu za redukujících a neredukujících podmínek. Elektroforeogramy jsou znázorněny na *obr. 21*, přičemž číslo dráhy je zároveň číslem renaturačního pufru, ve kterém byl protein renaturovaný. Na elektroforeogramech je jasně viditelný posun elektroforetické mobility za neredukujících podmínek způsobený větší kompaktností molekuly, která byla daná zesíťováním disulfidových vazeb. Výsledky SDS elektroforézy zároveň vyvrátily existenci kovalentního dimeru mNKR-P1A a mNKR-P1C. Z důvodu vysoké čistoty všech preparátů byla za finální purifikační proces zvolena gelová chromatografie.



*Obr. 21* Analýza preparátů mNKR-P1A (A) a mNKR-P1C (B) SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu za redukujících a neredukujících podmínek. Číslo dráhy je totožné s číslem pufru, v kterém byl protein renaturovaný.

### 5.3.3 Finální chromatografie na Superdexu 75 HR 10/30

Proteinové frakce z kolony Q-Sepharosy FF byly zahuštěny centrifugačním koncentrátorem Amicon Ultra s limitem 10 kDa na objem 400  $\mu$ l a byly naneseny na kolonu Superdex 75 HR 10/30 ekvilibrovanou pufrům pro gelovou chromatografii. Proteiny byly eluovány izokraticky při průtokové rychlosti 0,4 ml/min. Eluce proteinů byla monitorována průtokovým fotometrickým detektorem při 280 nm a proteinové frakce byly na základě  $A_{280}$  jímány manuálně. Eluční profily rekombinantních proteinů renaturovaných při čtyřech různých podmínkách jsou znázorněny na *obr. 22*, kde  $t$  je retenční čas a  $A_{280}$  je absorbance při 280 nm.



Obr. 22 Finální chromatografie mNKR-P1A a mNKR-P1C na Superdexu 75 HR 10/30. V levém horním rohu elučních profilů je uvedeno číslo pufry, ve kterém byl protein renaturovaný. Polohy elučních maxim odpovídají proteinu o molekulové hmotnosti 31 kDa.

Eluční maximum preparátů mNKR-P1A není dobře viditelné, protože množství proteinu naneseného na kolonu přesáhlo limit detektoru. Profily elučních maxim dokumentují monodisperzitu proteinových preparátů a jejich poloha odpovídá proteinu o molekulové hmotnosti 31 kDa, což koresponduje dimeru mNKR-P1A a mNKR-P1C.

#### **5.3.4 Analýza optimalizace renaturace a stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové**

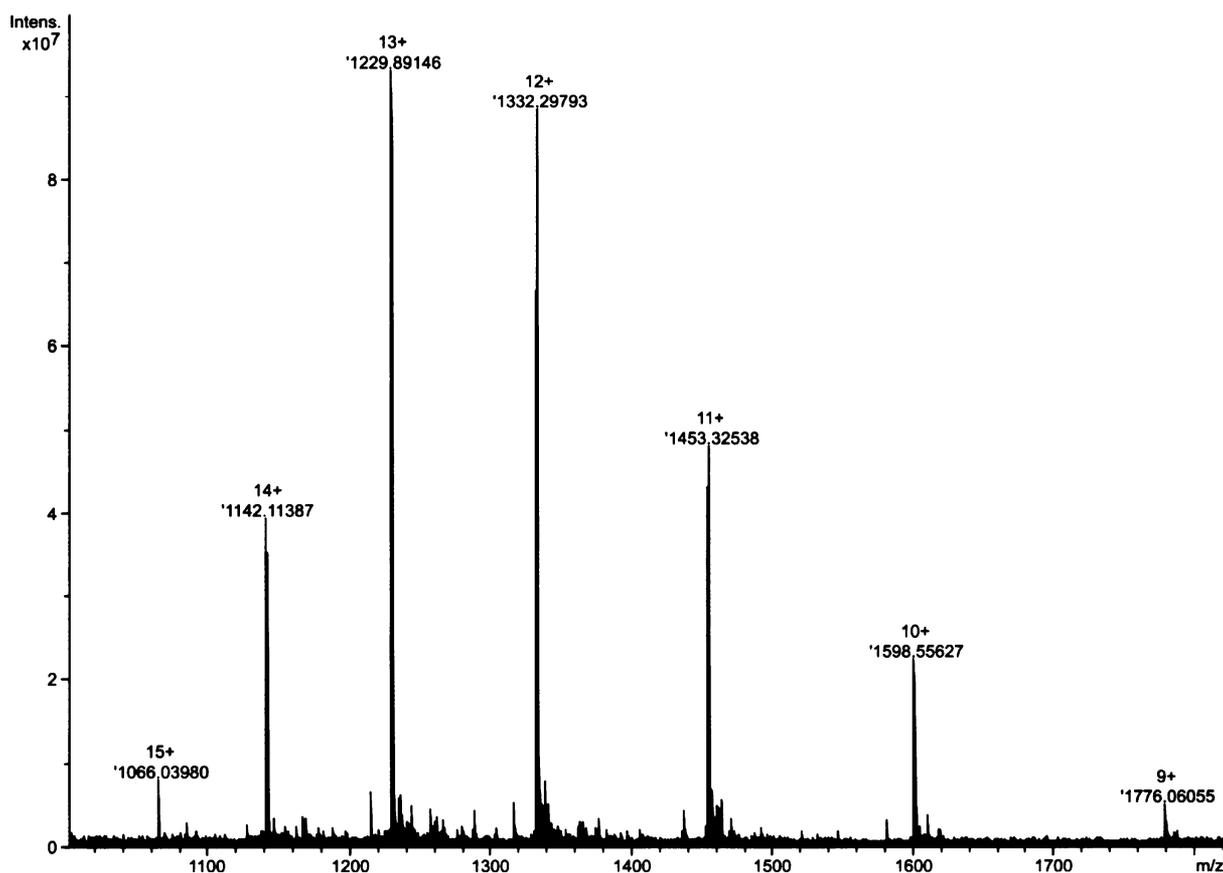
Z gelové chromatografie, stejně jako z SDS elektroforézy za redukujících a neredukujících podmínek, vyplývá, že oba proteiny byly pravděpodobně renaturovány ve všech čtyřech podmínkách. Účinnost renaturace v jednotlivých podmínkách byla vyhodnocena porovnáním elučních ploch vrcholů. Numerická integrace elučních vrcholů byla zrealizovaná v programu OriginPro8. Relativní velikost plochy elučního maxima proteinu mNKR-P1A renaturovaného v renaturačním pufru 1 je 5,9, velikost plochy v pufru 2 je 6,1, v pufru 3 je 6,2 a v pufru 4 je 5,9. Analogicky, relativní velikost plochy elučního maxima proteinu mNKR-P1C v pufru 1 je 2,3, v pufru 2 je 2,4, v pufru 3 je 2,3 a v pufru 4 je 2,2. Ve všech 4 renaturačních pufrech byl protein mNKR-P1A resp. mNKR-P1C renaturován přibližně se stejnou účinností. Menší odchylky mohou být způsobeny i manipulací při zahušřování roztoku proteinů a chromatografií. Za optimální podmínky renaturace obou proteinů byly zvoleny ekonomicky nejvýhodnější podmínky, které odpovídaly složení renaturačního pufru č. 4 tj. 50 mM Tris-HCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4 M L-Arg, 9 mM cysteamin, 3 mM cystamin, 1 mM NaN<sub>3</sub> a pH = 8,5.

Nakonec byla ve všech frakcích stanovena koncentrace proteinu podle Bradfordové a byl určen celkový výtěžek proteinu. Z 1 litru buněčné kultury na LB médiu obsahujícím tetracyklin a kanamycin bylo získáno 10 mg proteinu mNKR-P1A a 6 mg proteinu mNKR-P1C. Při velkoobjemových produkcích za optimálních podmínek a při velkoobjemových renaturacích za optimálních podmínek se výtěžky z 1 litru buněčné kultury na LB médiu pohybovaly okolo 21 mg pro mNKR-P1A a 17 mg pro mNKR-P1C.

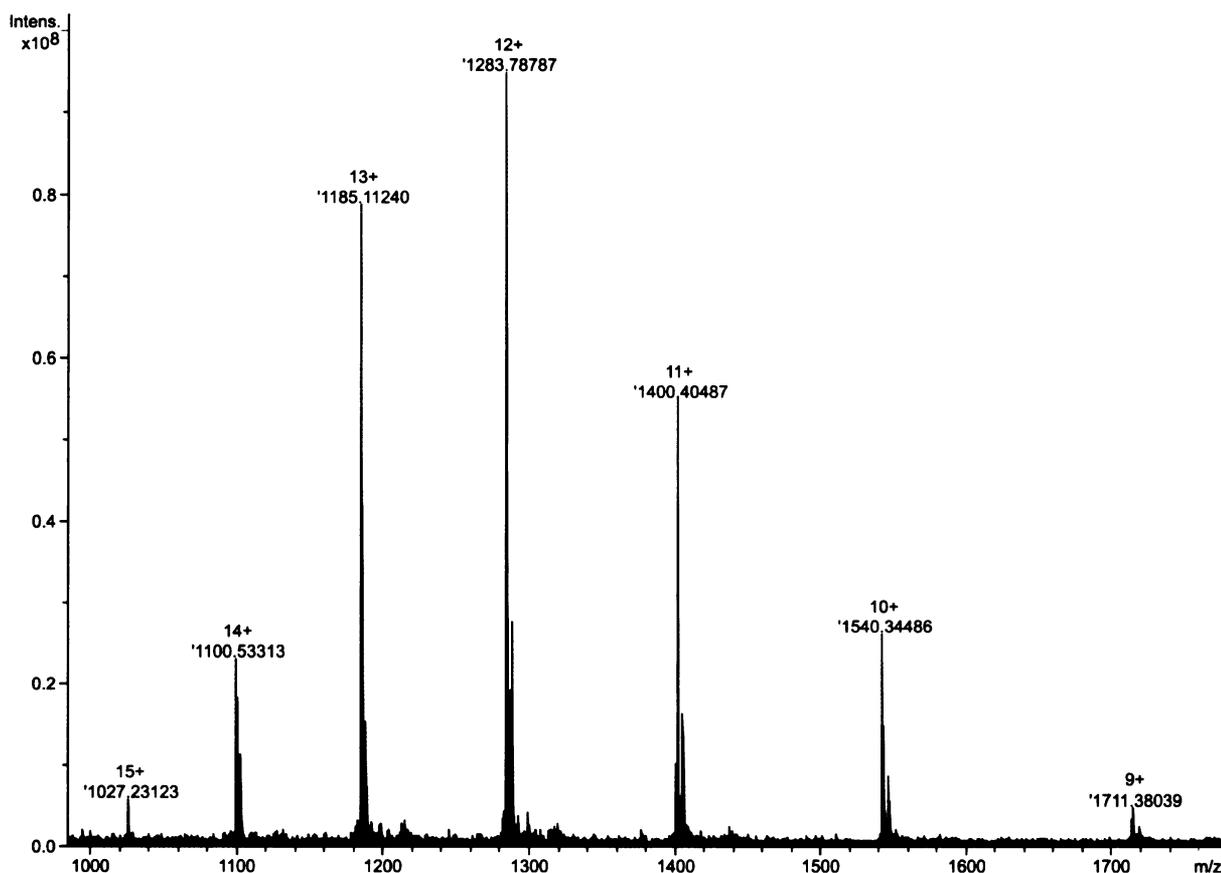
## 5.4 Ověření homogenity proteinových preparátů hmotnostní spektrometrií s iontově cyklotronovou rezonancí

Proteinové preparáty byly nejprve odsoleny na Microtrapu, tj. malé koloně s obrácenou fází podle postupu uvedeného v kapitole 4.11. Odsolené proteiny byly potom ionizovány elektrosprayem (ESI) a hmotnost vzniklých iontů byla analyzována na FT MS analyzátoru s iontově cyklotronovou rezonancí (ICR). Měření prováděl Mgr. Petr Novák, Ph.D.

Hmotnostní spektra jsou znázorněna na *obr. 23 a 24*. Po dekonvoluci spekter byla stanovena celková hmotnost mNKR-P1A  $[M+H]^+$  na 15 976,50 Da resp. mNKRP-1C  $[M+H]^+$  na 15 394,38 Da, což odpovídá monoizotopické molekulové hmotnosti proteinu mNKR-P1A resp. mNKR-P1C s absencí iniciačního methioninu a po spárování všech 6 cysteinů. Hmotnostní spektra dále dokumentují intaktnost a vysokou čistotu obou proteinů.

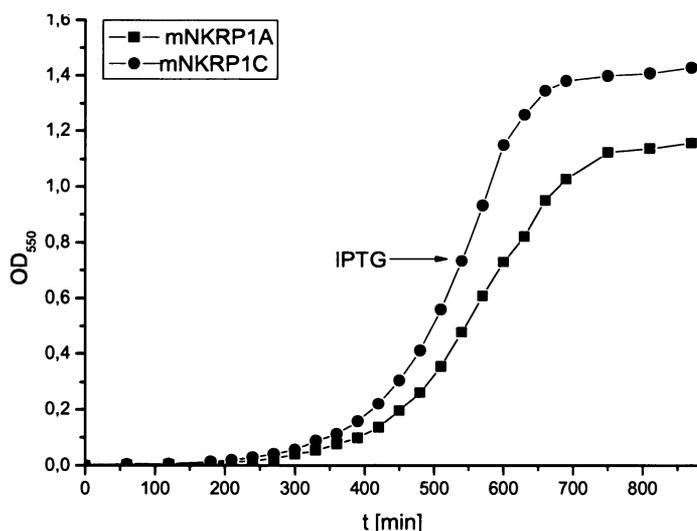


*Obr. 23* Spektrum mNKR-P1A měřené ESI FT-ICR hmotnostní spektrometrií. Po dekonvoluci spekter byla stanovena celková hmotnost mNKR-P1A  $[M+H]^+$  na 15 976,50 Da.



Obr. 24 Spektrum *mNKR-P1C* měřené ESI FT-ICR hmotnostní spektrometrií. Po dekonvoluci spekter byla stanovena celková hmotnost *mNKR-P1C*  $[M+H]^+$  na 15 394,38 Da.

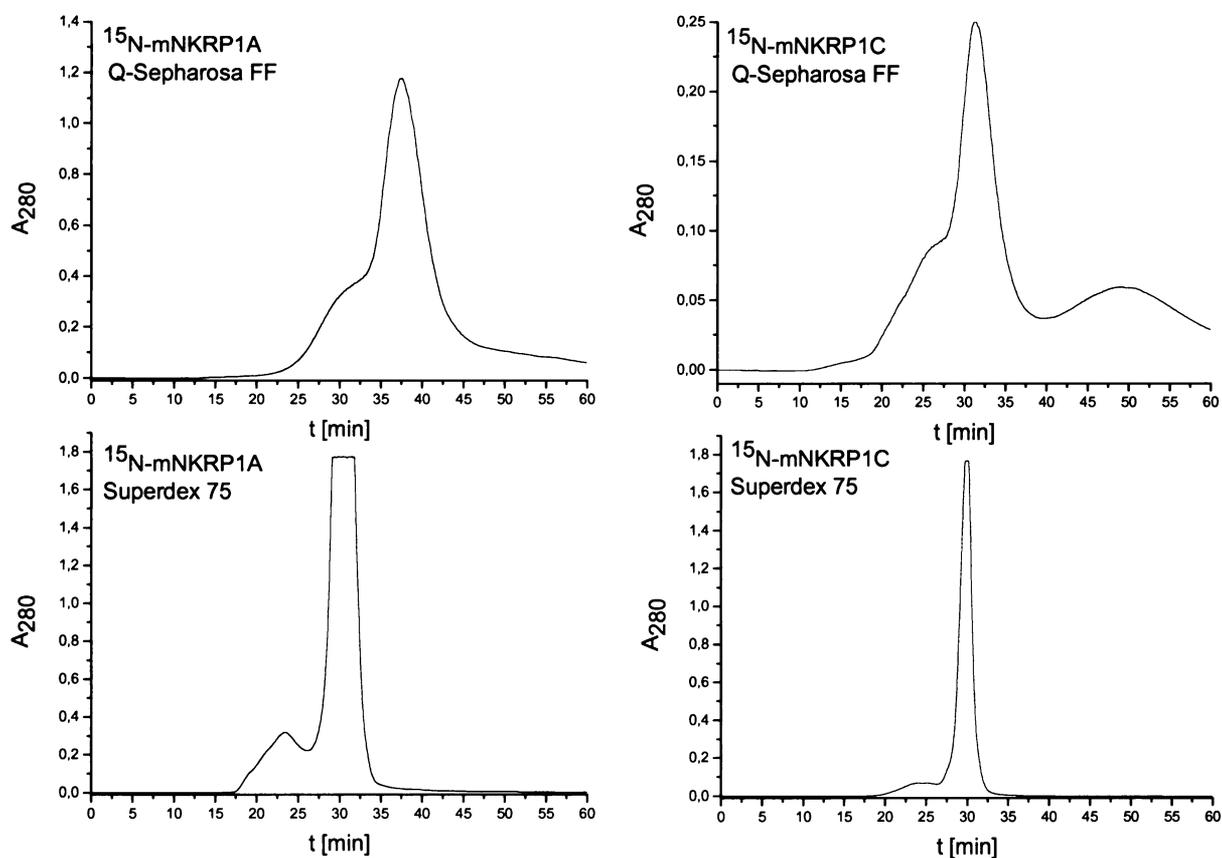
## 5.5 Izotopové značení rekombinantních proteinů



Obr. 25 Růstová křivka producentů *mNKR-P1A* a *mNKR-P1C* stanovená spektrofotometricky při submerzní kultivaci na M9 minimálním médiu.

Cílem izotopového značení bylo připavit rekombinantní proteiny značené dusíkem  $^{15}\text{N}$ , které by mohly být následně využity v NMR analýzách. Značené proteiny byly produkovány v 1 litru M9 minimálního média, kde jediným zdrojem dusíku byl  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Růstová křivka producentů stanovena spektrofotometricky při submerzní kultivaci na M9 minimálním médiu obsahujícím tetracyklin a kanamycin

je znázorněna na *obr. 25*. Protože růstová rychlost producentů na M9 minimálním médiu byla výrazně menší než růstová rychlost producentů na LB médiu, byla bakteriální kultura kultivovaná po indukci proteinové exprese po dobu 4 hodin. Všechny ostatní postupy, jako izolace inkluzních tělísek, velkoobjemová renaturace a purifikace byly prováděny za optimálních podmínek a standardních postupů uvedených v metodické části. Eluční profily purifikace značených proteinů na Q-Sepharose FF a eluční profily finální chromatografie na Superdexu 75 HR 10/30 jsou znázorněny na *obr. 26*.



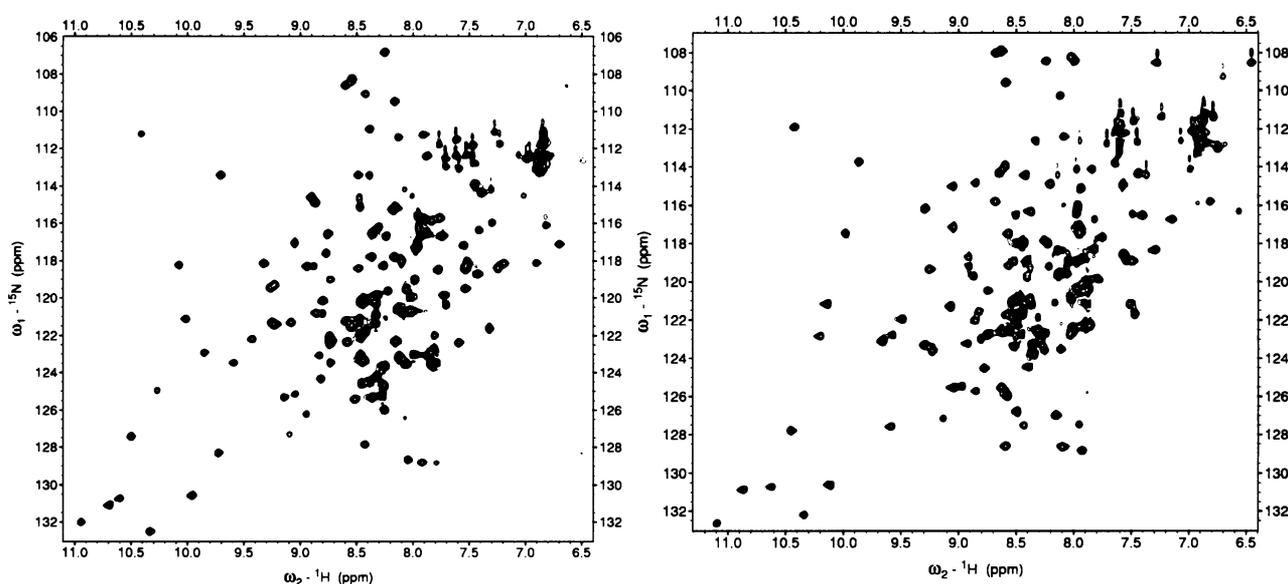
*Obr. 26* Eluční profily  $^{15}\text{N-mNKRPA}$  a  $^{15}\text{N-mNKRPA1C}$  po chromatografii na Q-Sepharose FF a Superdexu 75.

Homogenita značených proteinových preparátů byla ověřena SDS elektroforézou v 15% polyakrylamidovém gelu za redukujících a neredukujících podmínek. Nakonec byly značené proteiny převedeny do PIPES pufru pomocí dialýzy, proteinové preparáty byly zahuštěny centrifugačním zahušťovačem Amicon Ultra s limitem 10 kDa na finální objem 350  $\mu\text{l}$  a byla

stanovena koncentrace proteinů podle Bradfordové. Z 1 litru buněčné kultury na M9 minimálním médiu obsahujícím tetracyklin a kanamycin bylo získáno 1,9 mg  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1A a 1,2 mg  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1C. Stupeň naznačení určený pomocí ESI FT-ICR hmotnostní spektrometrie byl větší než 98% (hmotnostní spektra nejsou znázorněna).

## 5.6 Ověření poskládání proteinových preparátů NMR spektroskopii

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra (obr. 27) byla naměřena na spektrometru Bruker Avance 600 MHz, který byl vybaven kryosondou, na VŠCHT ve spolupráci s Doc. Ing. Richardem Hrabalem, CSc. Na měření byly použity uniformně značené proteiny  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1A resp.  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1C o koncentraci 0,34 mM resp. 0,21 mM.

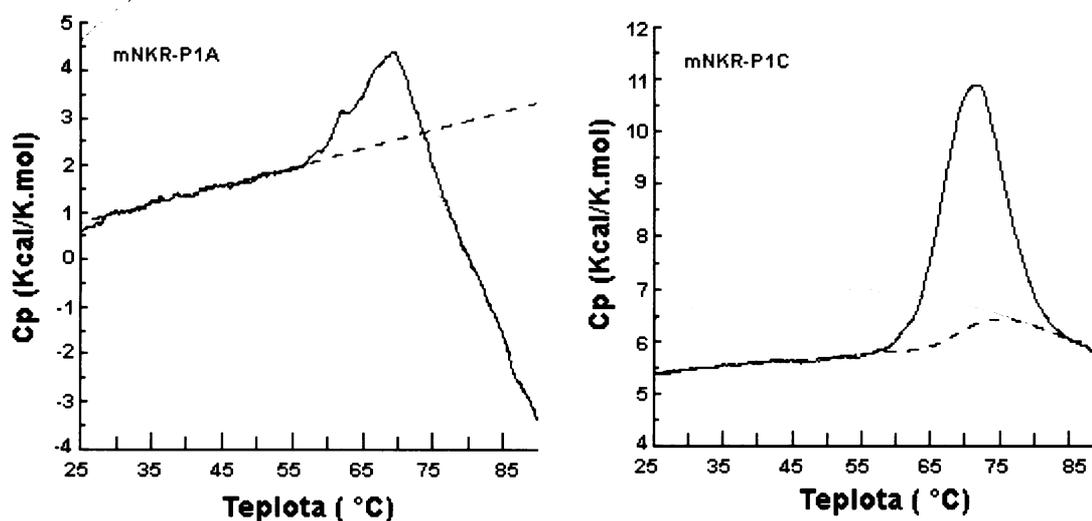


Obr. 27  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra uniformně značených  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1A (červeně) a  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1C (modře) dokumentují, že oba proteiny jsou monodisperzní a kompaktně sfoldované.

Z disperze signálů v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrech vyplývá, že oba rekombinantní proteiny jsou poskládané. V levé spodní části spektra jsou dobře viditelné signály postranní  $\text{N}\epsilon$ - $\text{H}\epsilon$  skupiny tryptofanů, v pravé horní části spektra jsou dobře viditelné signály  $\text{N}\delta$ - $\text{H}\delta 2$  resp.  $\text{N}\epsilon\text{H}\epsilon 2$  skupiny asparaginů resp. glutaminů. Pokud by rekombinantní proteiny nebyly poskládané, všechny signály by byly lokalizované v centrální části spektra. Spektra dále dokumentují vysokou čistotu obou preparátů a podle Doc. Hrabala ze šířky spektrální čáry vyplývá, že oba studované proteiny jsou za daných podmínek v monomerním stavu.

## 5.7 Vyšetření biochemické a fyzikálně-chemické stability mNKR-P1A a mNKR-P1C *in vitro*

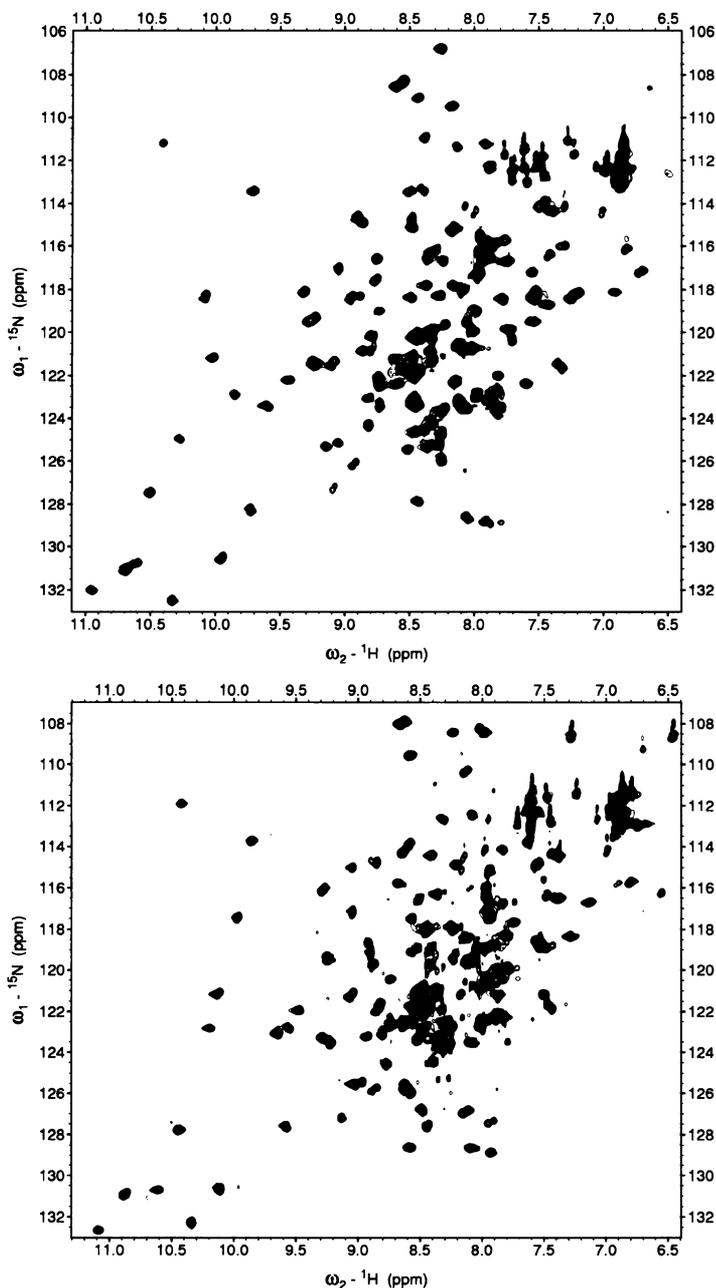
Znalost stability je esenciální podmínka při dalším studiu rekombinantních proteinů. V diplomové práci byla stabilita mNKR-P1A a mNKR-P1C vyšetřována různými technikami. Jednou z nich byla diferenční skenovací kalorimetrie, která byla použita za účelem získání informace o stabilitě, případně reverzibilitě termální denaturace připravených rekombinantních proteinů. Kalorimetrické měření bylo provedené RNDr. Kateřinou Hofbauerovou, Ph.D. a RNDr. Vladimírem Kopeckým, Ph.D. na Matematicko-fyzikální fakultě UK pomocí kalorimetru Model 6100 Nano II Differential Scanning Calorimetr. Při kalorimetrickém měření byla teplota měněna v rozsahu 5-90 °C s gradientem 1 °C/min. Naměřené hodnoty byly analyzovány v programu DSCRun a CpCalc 2.2. Z termogramu, který je znázorněn na *obr. 28*, vyplývá, že oba rekombinantní proteiny podléhají ireverzibilní termální denaturaci s jedním endotermickým maximem. Teplota denaturace mNKR-P1A byla  $T_m = 69,1$  °C a teplota denaturace mNKR-P1C byla  $T_m = 71,6$  °C. Uvedené hodnoty teplot denaturace naznačují, že mNKR-P1C je, i když nepatrně, stabilnější než mNKR-P1A.



*Obr. 28 Termogramy mNKR-P1A a mNKR-P1C dokumentují, že oba rekombinantní proteiny podléhají ireverzibilní termální denaturaci s jedním endotermickým maximem.*

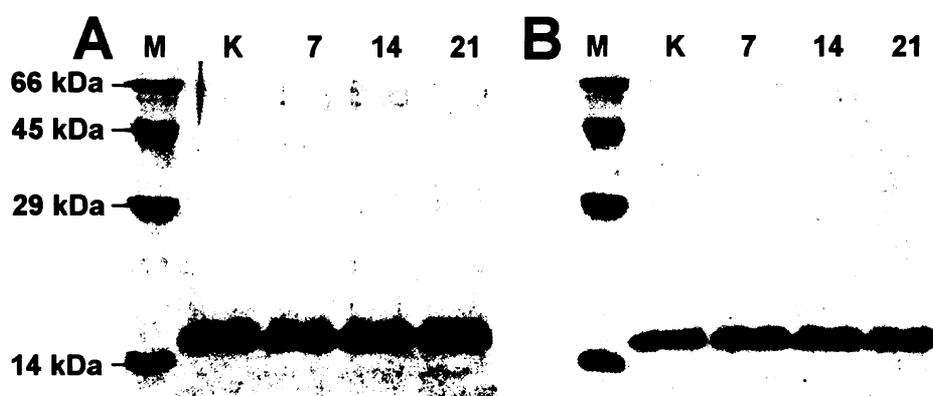
Stabilita proteinových preparátů byla dále vyšetřována NMR spektroskopií. Po naměření  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spekter prezentovaných v kapitole 5.6 byly proteinové preparáty uskladněny při teplotě 6 °C. Po 92 dnech skladování byly proteiny znovu analyzovány NMR

spektroskopií a naměřená  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra byla porovnána s původními spektry. Z překryvu spekter (obr. 29) vyplývá, že původní spektra a spektra naměřená po 92 dnech skladování jsou téměř identická. Menší odchylky jsou zřejmě způsobeny rozdílnou teplotou měření.



Obr. 29  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum mNKR-P1A (nahore) a mNKR-P1C (dole). Měření bylo zopakované po 92 dnech skladování při 6 °C a bylo naměřeno téměř identické spektrum (červené), což potvrzuje dobrou stabilitu obou proteinů.

Biochemická stabilita, která do velké míry koreluje s čistotou získaných proteinových preparátů resp. s přítomností proteasových kontaminací, byla vyšetřována SDS elektroforézou. Proteinové preparáty v pufru pro gelovou chromatografii o koncentraci 10,0 mg/ml byly převrstveny minerálním olejem, uskladněny v mikrozkušavkách a ponechány inkubovat při 37 °C. Po 7, 14 a 21 dnech byla provedená SDS elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu a byl pozorován vznik degradačních produktů nebo posun elektroforetické mobility vůči kontrole uchovávané při 6 °C. Elektroforeogramy jsou znázorněny na obr. 30. Vznik degradačních produktů ani posun elektroforetické mobility však nebyl pozorován u žádného preparátu, což svědčí pro dobrou stabilitu obou preparátů.



Obr. 30 Vyšetření biochemické stability mNKR-P1A (A) a mNKR-P1C (B). Vzorky proteinů byly inkubovány při 37 °C a po skončení inkubace byly vyšetřeny vůči kontrole uchovávané při 6 °C. Doba inkubace ve dnech je uvedena nad jednotlivými dráhami.

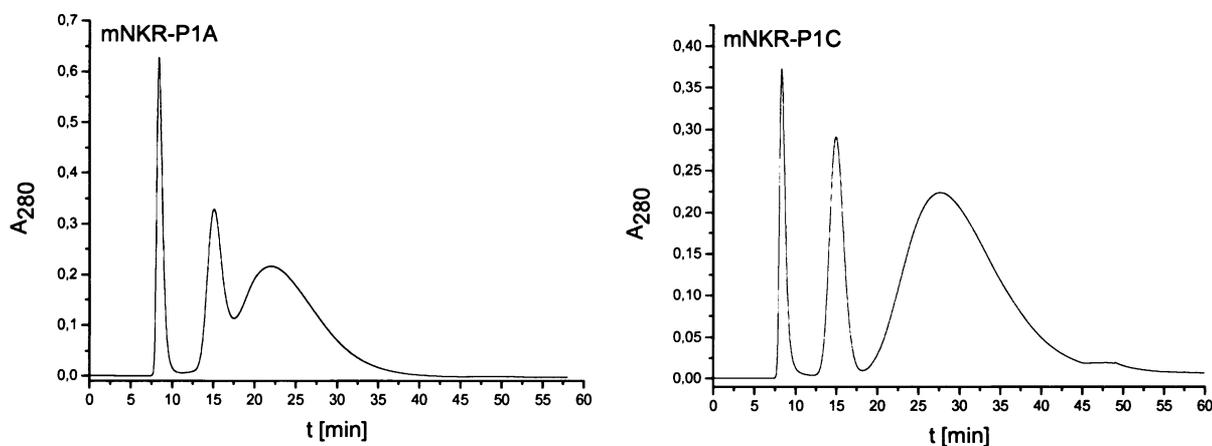
Připravené rekombinantní proteiny vykazují velmi dobrou rozpustnost. Oba proteiny byly centrifugačními koncentrátoři Amicon Ultra zahuštěny v pufru pro gelovou chromatografii až na koncentraci 40 mg/ml bez pozorované precipitace či agregace. V tomto pufru byly proteinové preparáty rutinně skladovány při koncentraci 10,0 mg/ml.

Připravené proteiny nebylo možné purifikovat chromatografií na obrácené fázi na koloně Vydac-C4, protože při podmínkách používaných při této technice, tj. 40% acetonitril a pH=2 byla pozorována markantní precipitace obou rekombinantních proteinů. Otázkou zůstává, zda byla precipitace způsobena nízkým pH nebo přechodem přes izoelektrický bod.

Za účelem prozkoumání vlivu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů na připravené rekombinantní proteiny, byly mNKR-P1A a mNKR-P1C renaturovány v renaturačním pufru s optimalizovanými podmínkami s absencí  $\text{CaCl}_2$ . Během renaturace, purifikace a SDS elektroforézy finálních preparátů za redukujících a neredukujících podmínek nebyly pozorovány žádné anomálie oproti proteinům skládaným v přítomnosti  $\text{CaCl}_2$ .

## 5.8 Fluorescenční značení mNKR-P1A a mNKR-P1C

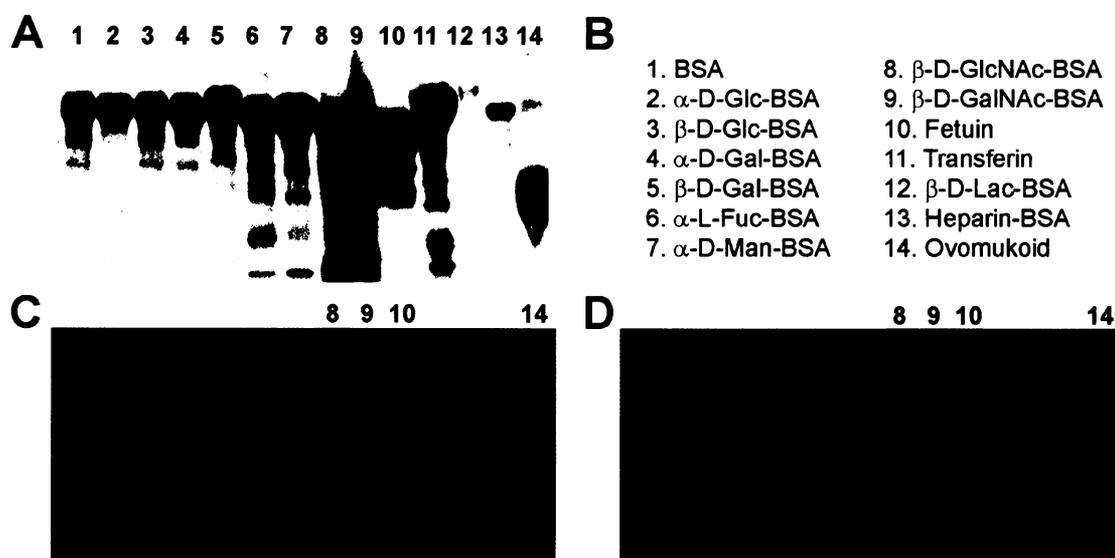
Cílem fluorescenčního značení rekombinantních proteinů realizovaného podle kapitoly 4.8 bylo připravit fluorescenčně značené proteiny, které byly následně použity při vazebných experimentech. mNKR-P1A byl označen fluoresceinem a mNKR-P1C rhodaminem. Nezreagované fluorescenční značky byly od značených proteinů odseparované chromatograficky. Reakční směs byla nanášena na kolónu Sephadex G-15 o rozměrech 1 × 30 cm ekvilibrovanou pufrům pro fluorescenční značení a proteiny byly izokraticky eluované tím samým pufrům při průtoku 1 ml/min. Frakce prvního elučního maxima znázorněného na chromatogramech na *obr. 31*, byly jímány manuálně a dále analyzovány chromatografií na Superdexu 75 HR 10/30. Poloha elučního maxima značených proteinů po chromatografii na Superdexu 75 HR 10/30 byla téměř identická s polohou elučního maxima neznačených proteinů, čímž se vyloučila degradace proteinu, případně vznik agregovaných forem při fluorescenčním značení. Připravené fluorescenčně značené proteiny byly zahuštěné na objem 400  $\mu$ l a použité ve vazebných experimentech.



*Obr. 31* Separace fluorescenčně značených proteinů z reakční směsi na koloně Sephadex G-15.

## 5.9 Vazebné experimenty

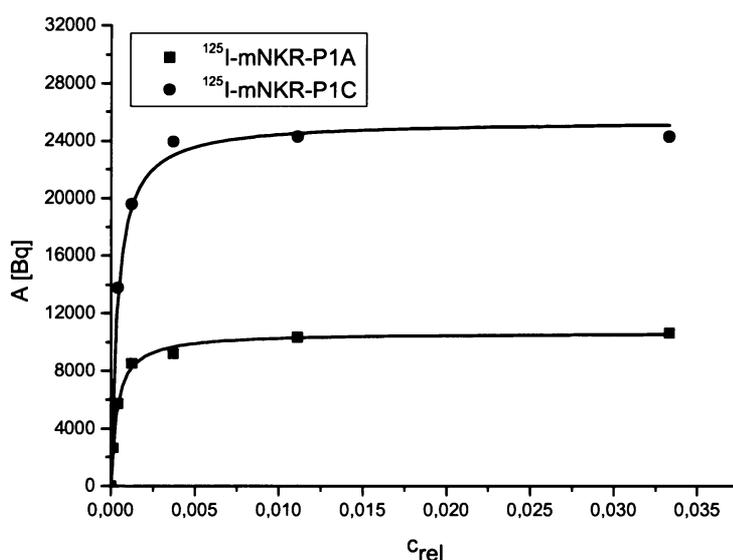
Cílem prvního vazebného experimentu bylo získat základní přehled o vazebné specifitě připravených rekombinantních proteinů a najít vhodný ligand, kterým by mohly být pokryty mikrotitrační destičky v následných inhibičních vazebných testech. Po elektroforetické separaci neoglykoproteinů, přirozených glykoproteinů a BSA (*obr. 32B*), který sloužil jako negativní kontrola, byly testované látky přeneseny na PVDF membránu (*obr. 32A*), blokovány 2% BSA v TBS+C pufru a inkubovány s radioaktivně značenými proteiny  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1A a  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1C. Po inkubaci následovala 24 hodinová expozice a nakonec autoradiografická vizualizace rentgenových filmů. Autoradiogramy znázorněné na *obr. 32C, D* dokumentují vazbu obou proteinů na imobilizovaný  $\beta$ -D-GlcNAc-BSA,  $\beta$ -D-GalNAc-BSA, fetuin a ovomukoid. Protože testované látky nejsou na PVDF membráně distribuované rovnoměrně a některé jsou částečně degradované, není možné na základě intenzity zčernání rentgenového filmu semikvantitativně určit, ke které testované látce mají značené proteiny největší resp. nejmenší afinitu. Za vhodný ligand, který byl následně použit v inhibičních vazebných experimentech, byl z důvodu dostupnosti v laboratoři zvolen  $\beta$ -D-GlcNAc-BSA, který byl připravený Tomášem Semeňukem [209].



*Obr. 32 Vazebný experiment radioaktivně značených mNKR-P1A a mNKR-P1C s neoglykoproteiny a přirozenými glykoproteiny. Testované látky (B) byly přeneseny na PVDF membránu (A), inkubovány s radioaktivně značenými proteiny a vizualizovány autoradiograficky. Autoradiogram  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1A je znázorněn na panelu C a autoradiogram  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1C na panelu D.*

Dalšími vazebnými experimenty byly inhibiční vazebné testy na mikrotitračních destičkách se spektrem sacharidových inhibitorů. Cílem experimentů, které byly realizované podle kapitoly 4.10.2, bylo určit hodnoty  $IC_{50}$  k jednotlivým inhibitorům.

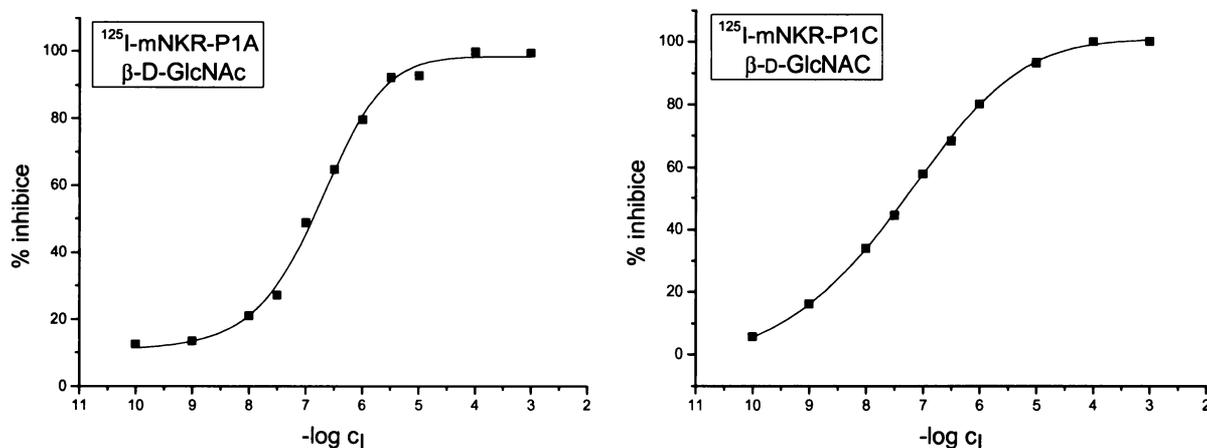
Prvním krokem bylo určení saturační křivky tj. závislost aktivity proteinu navázaného na imobilizovaný  $\beta$ -D-GlcNAc-BSA na relativní koncentraci proteinu naneseného do jamek mikrotitrační destičky. Cílem proměření saturační křivky bylo určit optimální koncentraci radioaktivně značeného proteinu pro následné inhibiční experimenty. Saturační křivky jsou znázorněny na obr. 33, kde  $c_{rel}$  je relativní koncentrace radioaktivně značeného proteinu aplikovaného do jamky mikrotitrační destičky a  $A$  je jeho aktivita po navázání na ligand. Pro inhibiční experimenty byla za optimální relativní koncentraci radioaktivně značených proteinů zvolena taková koncentrace, při které došlo k polovičnímu nasycení imobilizovaného ligandu  $\beta$ -D-GlcNAc-BSA. Pro oba proteiny byla za optimální koncentraci zvolena 2430krát menší koncentrace než byla koncentrace zásobního roztoku značených proteinů.



Obr. 33 Saturační křivky  $^{125}I$ -mNKR-P1A a  $^{125}I$ -mNKR-P1C na imobilizovaný  $\beta$ -D-GlcNAc-BSA.

Po určení saturační křivky byly provedeny inhibiční vazebné experimenty se spektrem inhibitorů. Po proměření aktivity scintilačním detektorem MicroBeta 1450 TriLux bylo pro každou jamku vypočítáno procento inhibice podle vztahu (1) a do grafu vynesena závislost procenta inhibice na záporném dekadickém logaritmu koncentrace inhibitoru. Jednotlivými body byla proložena sigmoida a v programu OriginPro 8 byl spočítán inflexní bod, který

odpovídal hodnotě  $-\log IC_{50}$ . Pro limitovaný rozsah diplomové práce jsou uvedeny jen 2 grafické závislosti procenta inhibice na záporném dekadickém logaritmu koncentrace inhibitoru znázorněné na obr. 34.



Obr. 34 Sigmoidální závislost procenta inhibice radioaktivně značených proteinů na záporném dekadickém logaritmu koncentrace inhibitoru  $\beta$ -D-GlcNAc. Hodnota  $-\log IC_{50}$  byla určena v inflexním bodě sigmoidy.

Ze spektra analyzovaných inhibitorů byla s dobrou reprodukovatelností určena hodnota  $-\log IC_{50}$  jen u osmi. Z hodnot  $-\log IC_{50}$  uvedených v *Tabulce 3* vyplývá, že nejlepším inhibitorem  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1A je inhibitor č. 8 a nejlepším inhibitorem  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1C je inhibitor č. 7. Zajímavým aspektem je rozdílná afinita k sialovým kyselinám, které se liší polohou vazby na laktózu. Každopádně všechny uvedené testované inhibitory je možno považovat za účinné inhibitory receptorů  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1A a  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1C.

Tabulka 3

GlcNAc	6,8	7,5
GalNAc	6,0	5,2
Sia $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 3) Lac	6,3	6,5
Sia $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6) Lac	6,2	5,1
GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)ManNAc	7,7	6,8
GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc <sub>3</sub>	7,5	7,8
GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc <sub>2</sub> $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)ManNAc	8,1	8,7
GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc <sub>2</sub> $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)ManNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ BSA)	8,2	8,1

Vazebná specifita mNKR-P1A a mNKR-P1C byla dále studována pomocí fluorescenčně značených proteinů. Vazebné experimenty realizované podle kapitoly 4.10.3 byly prováděny na transparentní 384 jamkové destičce obsahující spektrum imobilizovaných sacharidů ve formě BSA konjugátů. Tyto sacharidy byly na základě strukturálních vlastností rozděleny do 8 modulů, které jsou uvedeny v *Tabulce 4*. V pozici č. 1 každého modulu se nacházel BSA, který sloužil jako negativní kontrola. Měřeným parametrem při fluorescenčních vazebných experimentech byla intenzita fluorescence, která koreluje s afinitou proteinu k danému sacharidu. Výsledky jsou v grafické podobě pro mNKR-P1A uvedené na *obr. 35* a pro mNKR-P1C na *obr. 36*. Analýza výsledků a porovnání s vazebnou specifitou známých ortologů rodiny NKR-P1 i zasazení vazebných výsledků do širšího kontextu je uvedeno v diskusi.

Tabulka 4

označení	sacharidový ligand	označení	sacharidový ligand
1	BSA	1	BSA
2	BSA- $\alpha$ -D-Glc	2	BSA-Maltobiosa
3	BSA- $\beta$ -D-Glc	3	BSA-Maltotriosa
4	BSA- $\alpha$ -D-Gal	4	BSA-Maltotetraosa
5	BSA- $\beta$ -D-Gal	5	BSA-Cellobiosa
6	BSA- $\alpha$ -L-Fuc	6	BSA-Celotriosa
7	BSA- $\beta$ -L-Xyl	7	BSA-Chitobiosa
8	BSA- $\alpha$ -D-Man	8	BSA-Chitotriosa
9	BSA- $\beta$ -D-Man	9	BSA-Chitotetraosa
10	BSA- $\beta$ -D-GlcNAc	10	BSA-GalNAc $\beta$ 1,4GalNAc
11	BSA- $\alpha$ -D-GalNAc	11	BSA-GalNAc $\beta$ 1,4GalNAc $\beta$ 1,4GalNAc
12	BSA- $\beta$ -D-GalNAc	12	BSA-GalNAc $\beta$ 1,4GalNAc $\beta$ 1,4GalNAc $\beta$ 1,4GalNAc
označení	sacharidový ligand	označení	sacharidový ligand
1	BSA	1	BSA
2	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4GalNAc	2	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,3GlcNAc( $\beta$ 1,4GlcNAc)
3	BSA-ManNAc $\beta$ 1,4GlcNAc	3	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,3GlcNAc( $\beta$ 1,6GlcNAc)
4	BSA-ManNAc $\beta$ 1,4GalNAc	4	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc( $\beta$ 1,6GlcNAc)
5	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GalNAc	5	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,3GlcNAc( $\beta$ 1,4GlcNAc) ( $\beta$ 1,6GlcNAc)

6	BSA-ManNAc $\beta$ 1,1GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc	6	BSA-GalNAc $\beta$ 1,3GalNAc( $\beta$ 1,4GalNAc)
7	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GalNAc	7	BSA-GalNAc $\beta$ 1,3GalNAc( $\beta$ 1,6GalNAc)
8	BSA- ManNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc	8	BSA-GalNAc $\beta$ 1,4GalNAc( $\beta$ 1,6GalNAc)
9	BSA- ManNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GalNAc	9	BSA-GalNAc $\beta$ 1,3GalNAc( $\beta$ 1,4GalNAc) ( $\beta$ 1,6GalNAc)
10	BSA-Man $\beta$ 1,2GlcNAc $\beta$ 1,4Gal	10	BSA-Man $\alpha$ 1,3Man( $\alpha$ 1,6Man)
11	BSA-GalNAc $\beta$ 1-3Gal	11	BSA-Man $\beta$ 1,4GlcNAc( $\alpha$ 1,3Man) ( $\alpha$ 1,6Man)
12	BSA-GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Fuc	12	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4Man $\alpha$ 1,3Man( $\alpha$ 1,6Man)

označení	sacharidový ligand	označení	sacharidový ligand
1	BSA	1	BSA
2	BSA-M <sub>4</sub>	2	BSA- $\alpha$ -Sia
3	BSA-M <sub>6</sub>	3	BSA-Glc $\beta$ 1,4Gal $\alpha$ 2,3Sia
4	BSA-M <sub>9</sub>	4	BSA-Glc $\beta$ 1,4Gal $\alpha$ 2,6Sia
5	BSA-N <sub>2</sub>	5	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4GalNAcA
6	BSA-N <sub>4</sub>	6	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4Gal $\alpha$ 2,3Sia
7	BSA-G <sub>2</sub>	7	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4Gal $\alpha$ 2,6Sia
8	BSA-G <sub>3</sub>	8	BSA-GlcNAc( $\alpha$ 1,3Fuc) $\beta$ 1,4Gal $\alpha$ 2,3Sia
9	BSA-G <sub>4</sub>	9	BSA-GlcNAc( $\alpha$ 1,3Fuc) $\beta$ 1,4Gal $\alpha$ 2,6Sia
10	BSA-G <sub>4</sub> F	10	BSA-GlcNAc( $\alpha$ 1,2Fuc) $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 2,3Sia
11	BSA-G <sub>4</sub> dendrimer	11	BSA-GlcNAc( $\alpha$ 1,2Fuc) $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 2,6Sia
12	BSA-G <sub>8</sub> dendrimer	12	BSA-GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1,3Fuc( $\alpha$ 2,6Sia)

označení	sacharidový ligand	označení	sacharidový ligand
1	BSA	1	BSA
2	BSA-S <sub>2</sub>	2	BSA-GalNAc $\beta$ 1,3UA
3	BSA-S <sub>3</sub>	3	BSA-GalNAc $\beta$ 1,3UA(4S)
4	BSA-S <sub>4</sub>	4	BSA-GalNAc $\beta$ 1,3UA(6S)
5	BSA-S <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	5	BSA-GlcNAc $\beta$ 1,4UA
6	BSA-S <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	6	BSA- GlcNAc $\beta$ 1,4UA(2sulfate)
7	BSA-S <sub>2</sub> NG <sub>2</sub>	7	BSA-GlcNAc(6S) $\beta$ 1,4UA
8	BSA-S <sub>3</sub> NG <sub>3</sub>	8	BSA-GlcN(2S) $\beta$ 1,4UA(2S)
9	BSA-S <sub>4</sub> NG <sub>4</sub>	9	BSA-GlcN(2S)(6S) $\beta$ 1,4UA (2S)
10	BSA- $\alpha$ -GalNAc $\alpha$ 2,6Sia	10	BSA-GlcN(2S)(6S) $\alpha$ 1,4IdoA(2S) $\alpha$ 1,4GlcN(2S)(6S) $\beta$ 1,4UA(2S)
11	BSA-( $\alpha$ -GalNAc $\alpha$ 2,6Sia) <sub>3</sub>	11	BSA-Man $\alpha$ 1,2Man $\alpha$ 1,3Man $\alpha$ 1,2Man (6P)
12	BSA-GalNAc( $\alpha$ 2,6Sia) $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1,3Fuc( $\alpha$ 2,6Sia)	12	BSA-Man $\alpha$ 1,2Man $\alpha$ 1,3Man $\alpha$ 1,3Man $\alpha$ 1,3Man(6P)

**Vysvětlivky:**

**G<sub>2</sub>:** [(Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNA;

**G<sub>3</sub>:** (Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)[Galβ1,4GlcNAcβ1,2(Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Manα1,3]Manβ1,4GlcNAc β1,4GlcNAc

**G<sub>4</sub>:** [(Galβ1,4GlcNAc β1,6)Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6][(Galβ1,4GlcNAcβ1,4) Galβ1,4GlcNAcβ1,2 Manα1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**G<sub>4</sub>F:** [(Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6][(Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,2 Manα1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**G<sub>4</sub> dendrimer:** [(GlcNAcβNH-CS-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-COCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-N-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>;

**GalNAcA:** uronová kyselina odvozená od N-acetylglukosaminu;

**M<sub>4</sub>:** (Manα1,6Manα1,6)Manα1,3Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**M<sub>6</sub>:** [Manα1,3(Manα1,6)Manα1,6] Manα1,3Manα1,3 Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**M<sub>9</sub>:** [Manα1,2Manα1,3(Manα1,2Manα1,6)Manα1,6] Manα1,2Manα1,3Manα1,3Man β1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**N<sub>2</sub>:** [(GlcNAcβ1,2Manα1,6)][GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**N<sub>4</sub>:** [(GlcNAcβ1,6)GlcNAcβ1,2Manα1,6][(GlcNAcβ1,4)GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**S<sub>2</sub>:** [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Man α1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**S<sub>3</sub>:** [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2(Siaα2,3 Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Manα1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**S<sub>4</sub>:** [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Siaα2,3Galβ1,4GlcNAc β1,2Manα1,6][(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3] Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

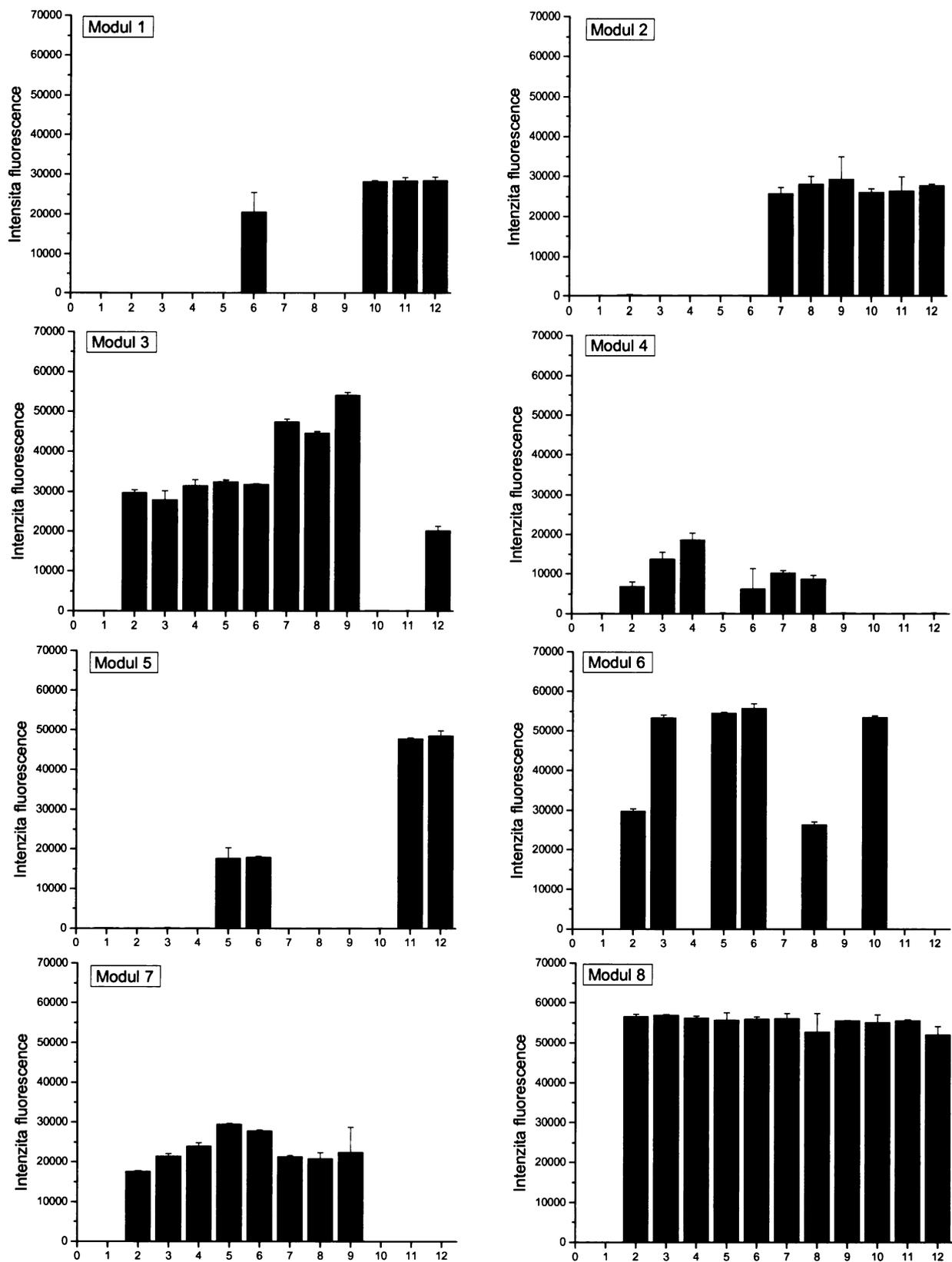
**S<sub>3</sub>N<sub>3</sub>:** [(Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,2(Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Manα1,3] Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc;

**S<sub>4</sub>N<sub>4</sub>:** [(Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6][(Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3] Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc

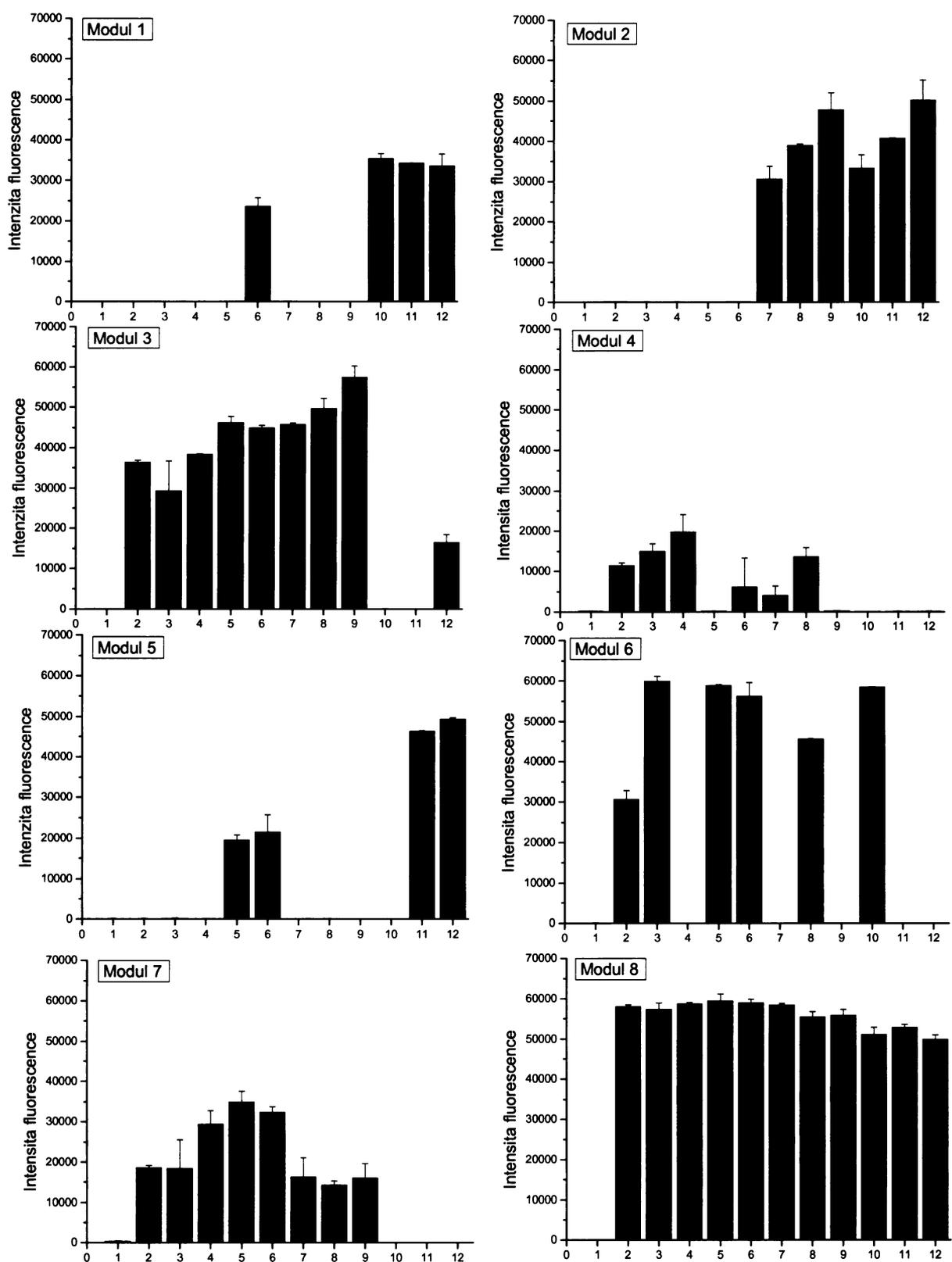
**S<sub>2</sub>NG<sub>2</sub>:** [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc

**S<sub>3</sub>NG<sub>3</sub>:** [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3 Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2; (Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Gal β1,4GlcNAcβ1,4)Manα1,3] Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc

**S<sub>4</sub>NG<sub>4</sub>:** [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6][(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Gal β1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc



Obr. 35 Vazebná specifita mNKR-P1A studovaná fluorescenčně značeným mNKR-P1A. Naměřená intenzita fluorescence koreluje s afinitou proteinu k sacharidům uvedeným v Tabulce 4.

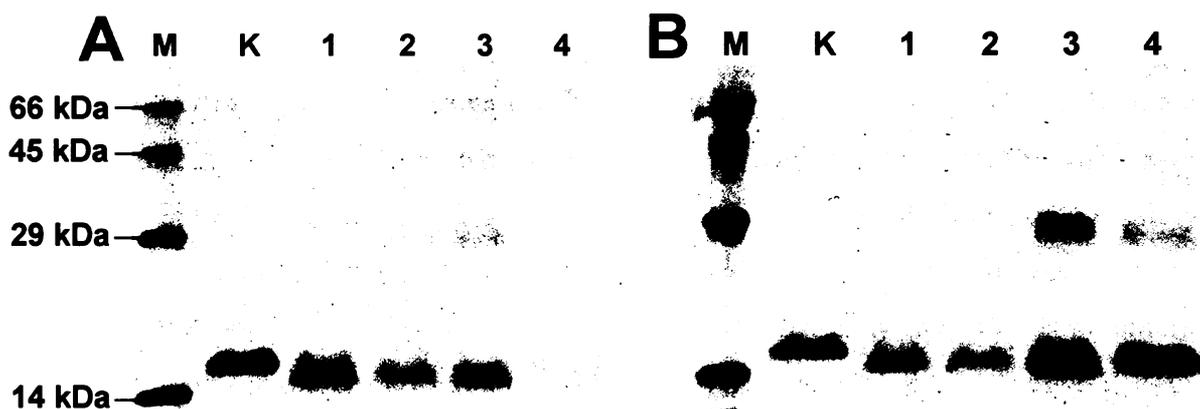


Obr. 36 Vazebná specifita mNKR-PIC studovaná fluorescenčně značeným mNKR-PIC. Naměřená intenzita fluorescence koreluje s afinitou proteinu k sacharidům uvedeným v Tabulce 4.

### 5.10 Síťovací reakce

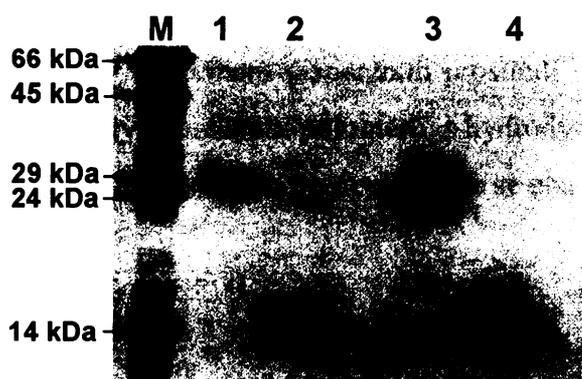
Cílem síťovacích reakcí bylo připravit kovalentní dimer obou proteinů a odseparovat ho od monomeru případně ostatních oligomerů.

Oba rekombinantně připravené proteiny byly síťované heterobifunkčním činidlem EDC podle kapitoly 4.9. Před samotnou reakcí byly proteiny převedeny dialýzou do pyridinového pufru, který neobsahoval žádný primární amin. Protože pH pyridinového pufru bylo blízké k výpočtem určenému izoelektrickému bodu obou proteinů, byla za účelem kontroly monodisperzity provedena gelová chromatografie na Superdexu 75 HR 10/30. Poloha elučního maxima obou proteinů v pyridinovém pufru byla identická s polohou elučního maxima v pufru pro gelovou chromatografii, čímž byla vyloučena proteinová degradace, agregace případně změny oligomerizace.



Obr. 37 Elektroforetická analýza reakční směsi po zesíťování *mNKR-P1A* (A) a *mNKR-P1C* (B) heterobifunkčním síťovacím činidlem EDC. Popis drah je uveden v textu.

Po přidání EDC k roztokům proteinů byla reakční směs inkubovaná 6 hodin a potom analyzovaná SDS elektroforézou. Elektroforeogram reakčních směsí *mNKR-P1A* je znázorněn na obr. 37, kde dráha M obsahuje standardy molekulových hmotností, do dráhy K byl aplikován protein bez EDC jako kontrola, do dráhy 1 a 2 byla aplikována reakční směs s koncentrací proteinu 0,1 mg/ml a dráhy 3 a 4 obsahovaly reakční směs s koncentrací proteinu 1,0 mg/ml. Reakční směs v drahách 1 a 3 disponovala 200 molárním nadbytkem EDC, v drahách 2 a 4 1000 molárním nadbytkem EDC oproti látkovému množství proteinu. Po 6 hodinové inkubaci reakční směsi s EDC byla v obou roztocích pozorována částečná precipitace proteinu. Proto je i na elektroforeogramech viditelné menší množství proteinu



Obr. 38 Elektroforetická analýza frakcí po chromatografické separaci síťovaných dimerů a monomerů mNKR-P1A (dráhy 1, 2) a mNKR-P1C (dráhy 3, 4).

než se očekávalo. Precipitaci proteinu je možno vysvětlit selháním pyridinového pufrčního systému a následným posunem pH k izoelektrickým bodům proteinů po přidání EDC, který působí jako silná kyselina. Nízké pH roztoku proteinů je zároveň příčinou neefektivního zafoksování proteinových zón při SDS elektroforéze. Každopádně, vznik dimerů intramolekulárním síťováním byl pozorován ve všech podmínkách, především s koncentrací proteinu 1,0 mg/ml.

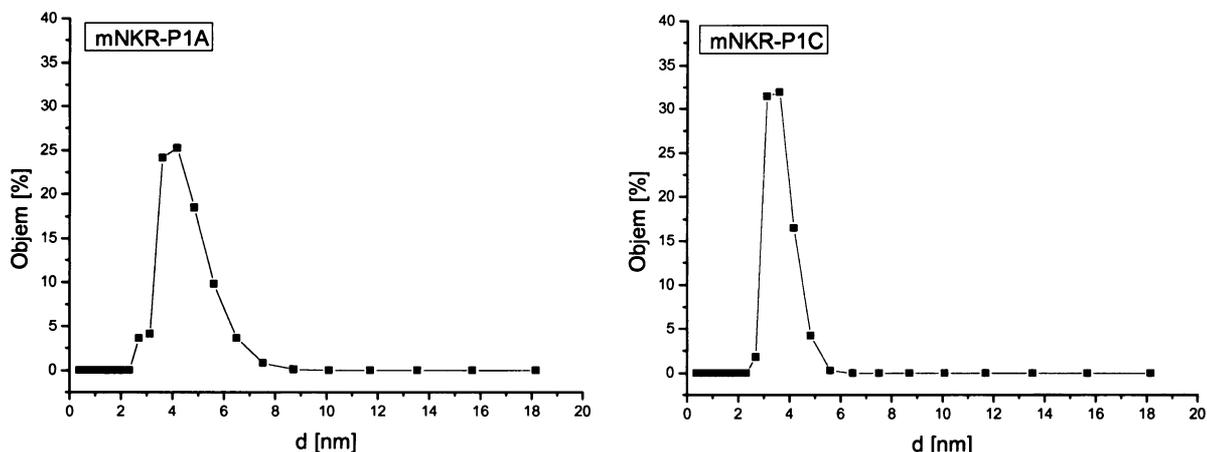
Dalším krokem byl pokus o chromatografickou separaci monomeru a síťovaného dimeru. Monomer a dimer byly separované z reakční směsi obsahující protein o koncentraci 1,0 mg/ml a EDC s 200 molárním nadbytkem oproti látkovému množství proteinu. Chromatografická separace byla provedena na koloně Superdex 75 PC 3,2/30 a mikropurifikačním systému SMART podle kapitoly 4.9. Frakce odpovídající elučním maximům byly analyzovány SDS elektroforézou a gel byl po elektroforéze obarven stříbrem. Elektroforeogram znázorněný na obr. 38 dokumentuje úspěšnost separace dimeru od monomeru. Síťované dimery mNKR-P1A a mNKR-P1C byly následně odevzdány na vazebné experimenty a na hmotnostně spektrometrickou analýzu, která by měla upřesnit některé strukturní aspekty mNKR-P1A.

### 5.11 Studium mNKR-P1A a mNKR-P1C metodami DLS a AUC

Cílem studia mNKR-P1A a mNKR-P1C metodami DLS a AUC bylo získat informace o jejich velikosti, tvaru a některých hydrodynamických parametrech.

Distribuce velikosti částic metodou DLS byla měřena v roztocích proteinů o koncentraci 0,1 mg/ml v HEPES pufru při teplotě 18 °C. Měření bylo prováděno v Ústavu makromolekulární chemie, AV ČR ve spolupráci s Ing. Petrem Kolenkem. Distribuce velikosti mNKR-P1A a mNKR-P1C podle objemu (obr. 39) jsou relativně úzké a potvrzují monodisperzitu obou proteinových preparátů. Hydrodynamický poloměr mNKR-P1A nabýval hodnotu  $R_h = 2,110$  nm a pro mNKR-P1C hodnotu  $R_h = 2,004$  nm, přičemž hydrodynamický

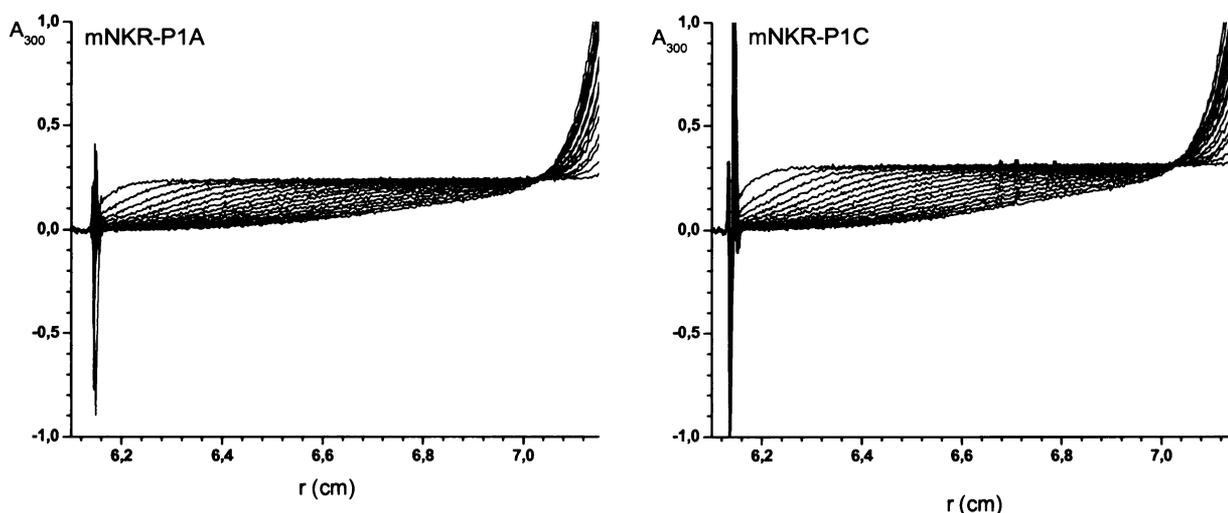
poloměr je definovaný jako poloměr hydrodynamicky ekvivalentní koule, která má za dané teploty ve stejném disperzním prostředí stejný frikční koeficient. Po porovnání stanovených hydrodynamických poloměrů s hydrodynamickým poloměrem příbuzného proteinu CD69 [210], byl vytvořen předpoklad, že se oba proteiny v roztoku nacházejí ve formě monomerů.



Obr. 39 Distribuce velikosti mNKR-P1A a mNKR-P1C podle objemu určená pomocí metody DLS.

Měření sedimentační rychlosti a sedimentační rovnováhy bylo realizované ve spolupráci s Mgr. Ondřejem Vaňkem v analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I použitím absorbanční i laserové interferenční optiky a rotoru An50Ti. Sedimentační profily obou proteinů jsou znázorněny na obr. 40, kde  $r$  je radiální vzdálenost od osy otáčení a  $A_{300}$  je absorbance měřená při 300 nm. Sedimentační koeficient byl z naměřených hodnot vypočítán v programu Sedfit 11.71. Ve výpočtu byla použita hustota pufru o hodnotě  $\rho_{20} = 1,00107 \text{ g/cm}^3$  a parciální specifický objem o hodnotě  $v_{20} = 0,7216 \text{ ml/g}$  pro mNKR-P1A a  $v_{20} = 0,7236 \text{ ml/g}$  pro mNKR-P1C. Hustota pufru i parciální specifický objem rekombinantních proteinů, který byl určen jako součet parciálních objemů aminokyselin daného proteinu, byly vypočítány v programu Sednterp 1.09. Zdánlivý sedimentační koeficient určený metodou sedimentační rychlosti při teplotě  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  a koncentraci proteinu  $0,4 \text{ mg/ml}$  byl pro mNKR-P1A stanoven na  $s_{20} = 1,86 \text{ S}$  a pro mNKR-P1C na  $s_{20} = 1,80 \text{ S}$ . Protože sedimentační koeficient závisí na koncentraci proteinu a na hustotě a viskozitě rozpouštědla, bylo potřeba zdánlivý sedimentační koeficient extrapolovat na nulovou koncentraci proteinu a standardizovat podmínky rozpouštědla na čistou vodu při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po konverzi byl sedimentační koeficient mNKR-P1A určen na  $s_{20,w}^\circ = 1,88 \text{ S}$  a pro mNKR-P1C

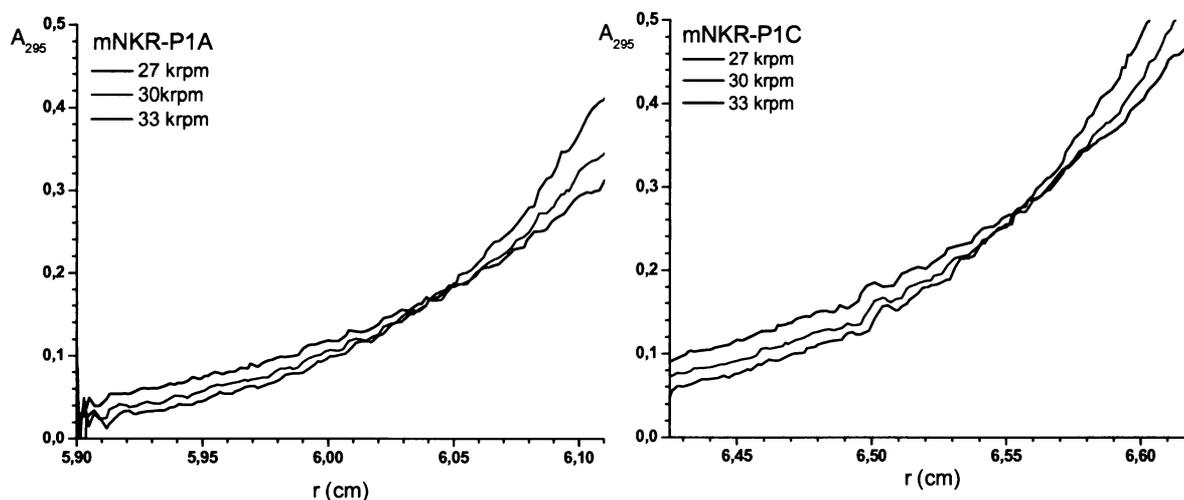
na  $s_{20,w}^{\circ} = 1,82$  S. Dále byl z naměřených hodnot určen frikční poměr  $f/f_0$ , což je poměr frikčního koeficientu dané částice ke koeficientu  $f_0$ , který by odpovídal této částici v kulovém a nesolvovaném tvaru. Frikční poměr pro mNKR-P1A i mNKR-P1C byl stanoven na  $f/f_0 = 1,28$ . Stokesův poloměr vypočítaný ze sedimentačního koeficientu v programu Sednterp 1.09 má pro mNKR-P1A hodnotu  $R_s = 2,09$  nm a pro mNKR-P1C hodnotu  $R_s = 2,07$  nm, což koreluje s hydrodynamickými poloměry stanovenými metodou DLS. Tvar mNKR-P1A byl aproximován Tellerovou metodou jako zploštělý rotační elipsoid (elipsoid, který vznikl rotací kratší osy elipsy označované jako  $b$ ) s délkami os  $2a = 5,27$  nm a  $2b = 2,14$  nm. Analogicky byl i tvar mNKR-P1C aproximovaný Tellerovou metodou jako zploštělý rotační elipsoid s délkami os  $2a = 5,23$  nm a  $2b = 2,08$  nm.



Obr. 40 Sedimentační profily mNKR-P1A a mNKR-P1C naměřené metodou sedimentační rychlosti při koncentraci proteinu 0,4 mg/ml, teplotě 20 °C a 40 000 ot./min za použití absorbní optiky a rotoru An50Ti.

Metoda sedimentační rychlosti byla realizována při koncentraci proteinu 0,1 mg/ml v HEPES pufru, teplotě 20 °C a třech různých rychlostech a to 27 000, 30 000 a 33 000 ot./min. Po 16 hodinách ustalování rovnováhy byla v cele se vzorkem v radiálním směru proměřena absorbance při 295 nm. Koncentrační profily obou proteinů jsou znázorněny na obr. 41. Z naměřených hodnot byly v programu Sedfit 11.71 vypočítány molekulové hmotnosti proteinů. Molekulová hmotnost mNKR-P1A určená jako aritmetický průměr stanovených molekulových hmotností při rychlostech 27 000, 30 000 a 33 000 ot./min měla hodnotu  $15\,848 \pm 201$  Da, pro mNKR-P1C měla hodnotu  $14\,927 \pm 113$  Da. Stanovené molekulové hmotnosti dobře korelují s teoretickými molekulovými hmotnostmi

(15 991 resp. 15 409 Da pro mNKR-P1A resp. mNKR-P1C) a potvrzují, že oba proteiny se za daných podmínek nacházejí v roztoku ve formě monomeru.



Obr. 41 Sedimentační profily mNKR-P1A a mNKR-P1C naměřené po 16 hodinách ustalování rovnováhy při třech různých rychlostech. Hodnoty molekulové hmotnosti vypočítané v programu Sedfit 11.71 korelují s teoreticky vypočítanými hodnotami a potvrzují, že oba proteiny se za daných podmínek nacházejí v roztoku ve formě monomeru.

## 5.12 Určení lokalizace disulfidových vazeb v mNKR-P1A a mNKR-P1C

Disulfidové vazby ve velké míře ovlivňují fold proteinu a jsou významným stabilizačním prvkem proteinové struktury. Lokalizace disulfidových vazeb v mNKR-P1A a mNKR-P1C byla určena Mgr. Petrem Pompachem, Ph.D. Princip určení lokalizace disulfidových vazeb byl založen na štěpení proteinu proteasami trypsin nebo Asp-N, dále na chromatografické separaci peptidových fragmentů na koloně s obrácenou fází a následnou analýzou fragmentů pomocí hmotnostní spektrometrie ESI FT-ICR [211].

U obou proteinů byly lokalizovány tři disulfidové vazby (obr. 42) mezi Cys6/Cys17, Cys34/Cys122 a Cys101/Cys114. Takovéto uspořádání disulfidových vazeb, tj. párování prvního cysteinu s druhým, třetího se šestým a čtvrtého s pátým je charakteristické pro proteiny rodiny C-lektinů.

**mNKR-P1A**

SAKLE<sup>6</sup>CPQDWLSHRDK<sup>17</sup>CFHVSQVSNTWEEGLVD<sup>34</sup>CDGKGATLMLIQD  
 QEELRFLLDSEIKEYNSFWIGLRYTLPDMNWKWINGSTLNSDVLKITGDT  
 ENDS<sup>101</sup>CAAISGDKVTFES<sup>114</sup>CNSDNRWI<sup>122</sup>CQKELYHETLSNYVGYGH

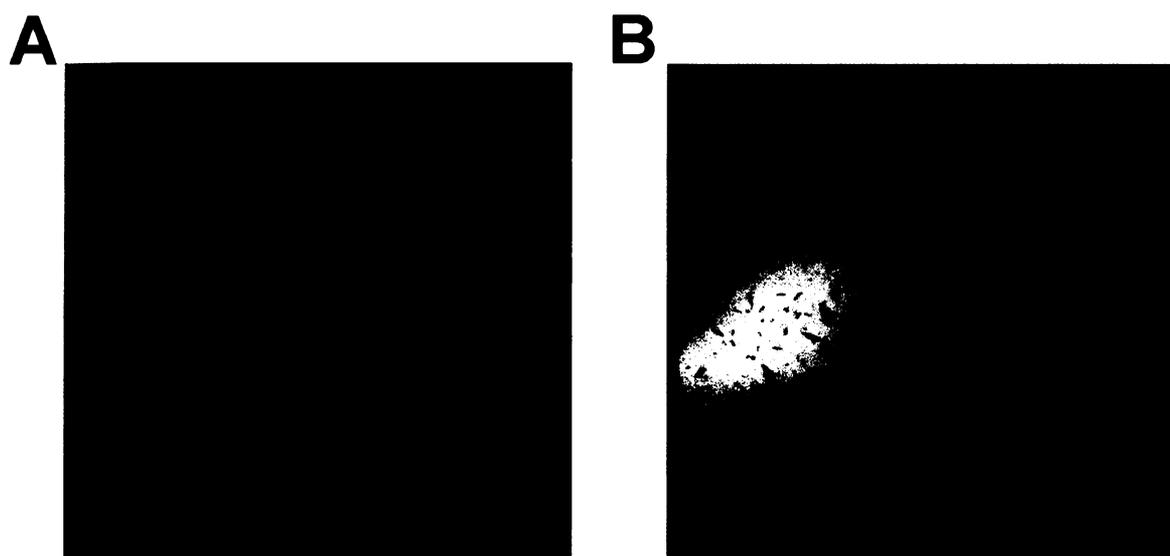
**mNKR-P1C**

SVNLE<sup>6</sup>CPQDWLLHRDK<sup>17</sup>CFHVSQVSNTWEEGQAD<sup>34</sup>CGRKGATLLLIQ  
 DQEELRFLLDSEIKEYNSFWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVLKIT  
 GVTENGS<sup>101</sup>CASILGDKVTPES<sup>114</sup>CASDNRWI<sup>122</sup>CQKELNHETPSNDS

*Obr. 42 Lokalizace disulfidových vazeb v proteinech mNKR-P1A a mNKR-P1C byla určena peptidovým mapováním štěpů pomocí hmotnostní spektrometrie ESI FT-ICR.*

**5.13 Krystalizace proteinů a rentgenová strukturní analýza**

Krystalizace proteinů mNKR-P1A a mNKR-P1C byla prováděna podle kapitoly 4.16 na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR ve spolupráci s Ing. Petrem Kolenkem. Počáteční screening krystalizačních podmínek byl proveden komerčně dostupnými sadami Index Screen, Crystal I Screen a Crystal II Screen. Krystaly byly pozorovány v kapce, která byla připravena smísením 0,4 µl roztoku proteinu o koncentraci 10 mg/ml a 0,4 µl rezervoáru o složení 0,4 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH = 8,5 pro mNKR-P1A a 0,2 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, 0,1 M Bis-Tris, 25% PEG 3350 a pH = 5,5 pro mNKR-P1C. Krystalizační podmínky pro oba proteiny byly následně optimalizovány za účelem připravení monokrystalů vhodných pro rentgenovou strukturní analýzu. Finální optimalizované krystalizační podmínky mNKR-P1A jsou dány pouze 0,3 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 8,5 a 18 °C. Přidání jakéhokoliv činidla nebo aditiva zhoršilo kvalitu krystalů. Krystalizační podmínky mNKR-P1C se doposud nepodařilo optimalizovat. Krystaly mNKR-P1A o velikosti 200 µm i krystaly mNKR-P1C s neoptimalizovanými podmínkami jsou znázorněny na obr. 43.



Obr. 43 Krystaly mNKR-P1A (A) vyrostlé v podmínkách 0,3 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH = 8,5 a 18 °C. Krystalizační podmínky mNKR-P1C (B) se doposud nepodařilo optimalizovat.

Krystaly mNKR-P1A byly podrobeny rentgenově strukturní analýze, kterou zrealizoval Ing. Petr Kolenko. Difrakční data z krystalu mNKR-P1A byla naměřena na synchrotronu BESSY v Berlíně a jejich zpracování v programu XDS potvrdilo, že krystaly jsou meroedricky zdvojitělé. Krystaly mNKR-P1A difraktovaly do rozlišení 2,3 Å. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulového nahrazení použitím struktury CD69 (pdb kód 3CCK). Automatická stavba modelu byla provedena za použití programu ARP/wARP, manuální úpravy modelu pomocí programu COOT a upřesňování modelu bylo průběžně prováděno pomocí programu PHENIX.REFINE. Kontrola kvality výsledného modelu byla uskutečněna programem MOLPROBITY.

Krystalová struktura mNKR-P1A je znázorněna na obr. 44. Obsahem asymetrické jednotky je dimer. Na rozhraní monomerů byla lokalizována  $\text{PO}_4^{3-}$  skupina pocházející z krystalizačních podmínek, která participuje na meziřetězcových interakcích a stabilizaci dimeru (obr. 45). Struktura monomeru mNKR-P1A sestává ze třech  $\alpha$ -helixů ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$ ) a dvou antiparalelních  $\beta$ -listů. Disulfidové vazby jsou vytvořeny mezi Cys6/Cys17, Cys34/Cys122 a Cys101/Cys114. Struktura mNKR-P1A vykazuje velkou podobnost s extracelulární doménou lidského CD69, přičemž nejzajímavějším atributem struktury mNKR-P1A je smyčka nebo chlopeň, která doposud nebyla pozorovaná u žádného C-lektinového receptoru nacházejícího se na povrchu NK buněk. Unikátní chlopeň

lokalizovaná v úseku Thr71 až Ser100 interaguje v krystalu s další symetricky sdruženou molekulou mNKR-P1A. Obdobná smyčka pozorovaná ve struktuře lidského CD69 lokalizovaná v pozici Glu48 a Lys172 je na rozdíl od smyčky mNKR-P1A stočená směrem k extracelulární doméně CD69. Porovnání struktury mNKR-P1A a lidského CD69 v oblasti smyčky je znázorněné na *obr. 46*.



*Obr. 44* Struktura mNKR-P1A rozřešená na úroveň rozlišení 2,3 Å . Unikátním atributem struktury jsou chlopně lokalizované v úseku Thr71 až Ser100.



Obr. 45 Skupina  $PO_4^{3-}$  nacházející se na rozhraní monomerů participuje na meziřetězcových interakcích a stabilizaci dimeru.



Obr. 46 Superpozice struktury mNKR-P1A (modře) a lidského CD69 (fialově) v oblasti chlopně.

## 6. DISKUZE

Receptor mNKR-P1C známý také jako antigen NK1.1 patří spolu s mNKR-P1A mezi nejstarší a nejznámější NK receptory. Ačkoliv od jejich objevu uplynulo téměř 20 let, zůstávaly až doposud zahalené rouškou tajemství. I přes intenzivní výzkum mnoha světových laboratoří se ještě nikomu nepodařilo připravit rozpustnou formu těchto receptorů a charakterizovat je ať už vazebně nebo strukturně. Struktura nebyla až doposud vyřešena pro žádný receptor rodiny NKR-P1. A právě tato diplomová práce předkládá první poznatky o rekombinantní přípravě extracelulární domény mNKR-P1A a mNKR-P1C, dále důkazy o jejich neobvyklé stabilitě, rozsáhlé poznatky v oblasti jejich vazebné specifity a některých strukturních aspektech a nakonec rozřešení struktury mNKR-P1A, která disponuje unikátním proteinovým foldem.

Proteiny mNKR-P1A a mNKR-P1C byly exprimovány v bakteriálních buňkách s použitím expresního vektoru pET-30a(+), ve kterém byly zaklonované fragmenty DNA kódující extracelulární části receptorů. Exprese mNKR-P1A a mNKR-P1C byla potvrzena peptidovým mapováním pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Dalším krokem byla optimalizace proteinové exprese, přičemž optimalizovanými parametry byl jednak čas proteinové produkce, dále teplota produkce a koncentrace induktoru IPTG. Elektroforetickou analýzou frakcí po diferenční centrifugaci buněčného lyzátu bylo zjištěno, že mNKR-P1A je exprimován do inkluzních tělísek, zatímco mNKR-P1C do inkluzních tělísek a částečně i do cytoplazmy. Pokusy o purifikaci rozpustné formy mNKR-P1C z cytoplazmy použitím kombinace chromatografických technik se ukázaly jako neúspěšné. Proto byly oba proteiny izolovány a purifikovány výhradně z inkluzních tělísek. Důsledkem tohoto postupu bylo, že při izolaci inkluzních tělísek mNKR-P1C docházelo k nezanedbatelným ztrátám proteinu do promývacích pufrů, což se projevilo o 19% nižším výtěžkem v porovnání s mNKR-P1A. *In vitro* renaturace rekombinantních proteinů byla realizována metodou rychlého naředění s využitím L-argininu jako nízkomolekulárního chaperonu. Zajímavým aspektem optimalizace renaturace je, že oba proteiny se renaturovaly přibližně se stejnou účinností ve všech testovaných podmínkách, které se lišily koncentrací L-argininu, poměrem cysteamin/cystamin a pH. Tato vlastnost je pro rekombinantně připravované NK receptory poměrně atypická, například lidské a potkaní ortology NKR-P1, případně i ortology CD69 studované ve skupině prof. Bezoušky jsou na podmínky renaturace výrazně senzitivnější. Za optimální podmínky renaturace byly nakonec zvoleny podmínky ekonomicky nejvýhodnější,

tj. obsahující 0,4 M L-arginin. Po renaturaci byly oba proteiny purifikovány na koloně Q-Sepharosy FF a následně na koloně Superdex 75 HR 10/30. Při velkoobjemových produkcích za optimálních podmínek a při velkoobjemových renaturacích za optimálních podmínek se výtěžky z 1 litru buněčné kultury na LB médiu pohybovaly okolo 21 mg pro mNKR-P1A a 17 mg pro mNKR-P1C. Uvedené množství je možné vyrobit za 4-6 dní po transformaci kompetentních buněk. Vysoká čistota proteinových preparátů byla potvrzena hmotnostní spektrometrií FT-ICR. SDS elektroforéza za redukujících a neredukujících podmínek dokumentovala, že oba proteiny jsou homogenně a kompaktně sfoldované. Molekulová hmotnost proteinových preparátů stanovená hmotnostní spektrometrií FT-ICR potvrdila odštěpení iniciačního methioninu z N-terminálního konce a zformování třech disulfidových vazeb. Disulfidové vazby byly následně lokalizovány hmotnostně spektrometrickou analýzou peptidových fragmentů po štěpení proteinů trypsinem a Asp-N. Uspořádání disulfidových vazeb v mNKR-P1A a mNKR-P1C je konzistentní s konzervovaným uspořádáním disulfidů, které je charakteristické pro proteiny rodiny C-lektinů, tj. párování prvního cysteinu s druhým, třetího se šestým a čtvrtého s pátým [212].

Za účelem ověření poskládání proteinových preparátů metodou NMR byly oba proteiny izotopově značeny izotopem dusíku  $^{15}\text{N}$ . Proteiny byly produkovány na M9 minimálním médiu, kde jediným zdrojem dusíku byl  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Po optimalizované produkci, renaturaci a purifikaci bylo z 1 litru M9 minimálního média získáno 1,9 mg  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1A a 1,2 mg  $^{15}\text{N}$ -mNKR-P1C, což představuje 9 a 7% výtěžku z 1 litru LB média. Disperze signálů z  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spekter potvrdila, že oba proteiny jsou kompaktně sbalené.

Oba rekombinantní proteiny disponují výjimečnou stabilitou a rozpustností. Teplota denaturace mNKR-P1A o hodnotě  $T_m = 69,1\text{ }^\circ\text{C}$  a mNKR-P1C o hodnotě  $T_m = 71,6\text{ }^\circ\text{C}$  stanovená diferenční skenovací kalorimetrií je porovnatelná s některými preparáty CD69 [210]. Na rozdíl od preparátů CD69 mají preparáty mNKR-P1A a mNKR-P1C velmi dobrou dlouhodobou stabilitu, což vyplývá z překryvu  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spekter získaných před a po 92 dnech skladování při  $6\text{ }^\circ\text{C}$ , a zároveň i biochemickou stabilitu po 21 dnech inkubace při  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , což vyplývá z SDS elektroforetické analýzy. Pozoruhodná stabilita mNKR-P1A a mNKR-P1C *in vitro* situuje oba proteiny do pozice kandidátů pro potenciální terapeutické účely.

Za účelem prozkoumání vlivu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů na připravené rekombinantní proteiny byly mNKR-P1A a mNKR-P1C renaturovány v renaturačním pufriu s optimalizovanými podmínkami a absencí  $\text{CaCl}_2$ . Po dobu renaturace, purifikace a SDS elektroforézy finálních

preparátů za redukujících a neredukujících podmínek nebyly pozorovány žádné anomálie oproti proteinům skládaným v přítomnosti  $\text{CaCl}_2$ . Otázka vlivu  $\text{Ca}^{2+}$  na vazebnou specifitu a z toho vyplývající postavení mNKR-P1A a mNKR-P1C v rodině C-lektinů však zůstává nezodpovězena.

Velikost a tvar obou proteinů byl studován pomocí několika experimentů. Hydrodynamický poloměr získaný z distribuce velikosti obou proteinů, která byla určena měřeními dynamického rozptylu světla, naznačuje, že se oba proteiny nacházely ve studovaném roztoku ve formě monomeru. Tento fakt byl potvrzen měřeními sedimentační rovnováhy a následným výpočtem molekulové hmotnosti, která dobře korelovala s molekulovou hmotností proteinů v monomerním stavu. Dalším důkazem potvrzujícím monomerní formu obou proteinů je šířka spektrálních čar na  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrech. Tato zjištění ale nejsou konzistentní s výsledky gelové chromatografie, kde poloha elučních maxim odpovídala proteinu o molekulové hmotnosti 31 kDa, což koresponduje s nekovalentním dimerem mNKR-P1A resp. mNKR-P1C. Tuto diskrepanci je možno vysvětlit posunem rovnováhy monomer-dimer v závislosti na iontové síle, která byla pozorována i v případě CD69 v diplomové práci Ondřeje Vaňka [213]. Tato domněnka je založena na skutečnosti, že proteinové preparáty mNKR-P1A a mNKR-P1C byly z kolony Superdex 75 HR10/30 eluovány pufrům, který obsahoval 150 mM chlorid sodný, zatímco měření dynamického rozptylu světla, sedimentační rovnováhy nebo  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spekter bylo prováděno v pufru s 50 mM koncentrací chloridu sodného.

Tvar molekuly mNKR-P1A byl na základě měření sedimentační rychlosti aproximován Tellerovou metodou jako zploštělý rotační elipsoid s délkami os  $2a = 5,27$  nm a  $2b = 2,14$  nm. Analogicky byl i tvar mNKR-P1C aproximován Tellerovou metodou jako zploštělý rotační elipsoid s délkami os  $2a = 5,23$  nm a  $2b = 2,08$  nm.

Dále byly s radioaktivně a fluorescenčně značenými preparáty mNKR-P1A a mNKR-P1C provedeny série vazebných experimentů k sacharidovým ligandům. Základní vazebné experimenty radioaktivně značených proteinů k neoglykoproteinům a přirozeným glykoproteinům imobilizovaným na PVDF membráně prokázaly vazbu na  $\beta$ -D-GlcNAc-BSA,  $\beta$ -D-GalNAc-BSA, fetuin a ovomukoid. V inhibičních vazebných experimentech na mikrotitračních destičkách pokrytých  $\beta$ -D-GlcNAc-BSA byly s dobrou reprodukovatelností určeny hodnoty  $-\log \text{IC}_{50}$  jen u osmi inhibitorů, kde nejlepším inhibitorem proteinu  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1A byl inhibitor č. 8 (Tabulka 3) a nejlepším inhibitorem  $^{125}\text{I}$ -mNKR-P1C byl inhibitor č. 7

(*Tabulka 3*). Zajímavým aspektem byla rozdílná afinita k sialovým kyselinám, které se lišily polohou vazby na laktózu. U obou proteinů byla pozorována vyšší afinita k sialovým kyselinám s vazbou na laktózu  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 3) v porovnání s vazbou  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 6). Dále byla studována vazebná specifita fluorescenčně značených proteinů ke spektru sacharidů imobilizovaných na mikrotitarační destičce ve formě BSA konjugátů. Tyto sacharidy byly na základě strukturních vlastností rozděleny do 8 modulů, které jsou uvedeny v *Tabulce 4*. Modul 1 byl tvořen jednoduchými sacharidy, ze kterých se na oba proteiny s následující afinitou vázaly:  $\beta$ -D-GlcNAc >  $\beta$ -D-GalNAc >  $\alpha$ -D-GalNAc >  $\alpha$ -L-Fuc. V Modulu 2, který tvořily neutrální lineární homooligomery byla pozorována vazba na oligomery chitobiosy a GalNAc $\beta$ 1,4GalNAc, přičemž se zvyšujícím se počtem monomerních jednotek se afinita k receptorům zvyšovala. Na druhou stranu nebyla pozorována vazba k oligomerům maltobiosy a celobiosy, což jasně dokumentuje specifitu receptorů k 2-acetamidosaхарidům. Vazebné experimenty s neutrálními lineárními heterooligomery, které jsou součástí Modulu 3, dokumentují, že afinita receptorů závisí na délce řetězce heterooligomeru a na povaze monosacharidové jednotky na neredukujícím konci. Afinita receptorů k heterooligosacharidům se se zvětšující se délkou řetězce zvyšuje, což dokumentuje klesající afinita GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc- $\beta$ 1,4GalNAc > GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GalNAc > GlcNAc $\beta$ 1,4GalNAc. Oba receptory mají vyšší afinitu k heterooligomerům, které mají na neredukujícím konci GalNAc v porovnání heterooligomery disponujícími GlcNAc. Analogická závislost afinity na délce řetězce a na povaze monosacharidové jednotky na neredukujícím konci byla pozorována i u potkaního ortologu NKR-P1A [214].

Afinita k jednoduše větveným neutrálním oligomerům (Modul 4) je nižší než u lineárních oligomerů, což naznačuje, že mNKR-P1A a mNKR-P1C nemají ve své CTLD doméně dostatečně velkou rýhu pro vazbu větvených sacharidů. Z Modulu 5, který tvoří neutrální komplexně větvené oligomery, byla pozorována vazba s afinitou podobnou k Modulu 4 jen na oligomery, které měly na neredukujícím konci GlcNAc, a to heptasacharid N<sub>2</sub> a nonasacharid N<sub>4</sub> (struktura je uvedena ve vysvětlivkách pod *Tabulkou 4*). Vyšší afinita byla pozorována k dendrimeru G<sub>4</sub> a ještě vyšší afinita k dendrimeru G<sub>8</sub>, který má v porovnání s G<sub>4</sub> dvojnásobný počet antén. Vysokou afinitu k dendrimerům je možné vysvětlit značnou prostorovou flexibilitou sacharidových řetězců. V Modulu 6 byla testována afinita k nabitým lineárním a jednoduše větveným oligomerům. Byla pozorována vazba na GlcNAc $\beta$ 1,4GalNAcA, což je sacharid, který má na konci nabitou N-acetylgalakturonovou

kyselinu. Oba receptory měly výraznou afinitu k sialovým kyselinám, které byly vázané na galaktosu výhradně  $\alpha$  (2→3) vazbou. Na druhou stranu afinita k sialovým kyselinám vázaným na galaktosu  $\alpha$  (2→6) vazbou byla velmi nízká. Afinita ke komplexně větveným nabitým oligomerům (Modul 7) je v porovnání s nabitými lineárními a jednoduše větveným oligomery nižší, což opět poukazuje na rýhu ve struktuře proteinů, která není dostatečně velká pro vazbu větvených sacharidů. Nejvyšší afinita ze všech testovaných látek byla pozorována u Modulu 8, který tvoří nabitě sulfatované oligomery odvozené od heparinu, dále chondroitinsulfát a fosforylované tetra a penta mannosové oligomery. Nevýhodou těchto sacharidů je vysoká cena a nízká stabilita. Podobná specifita k sacharidům Modulu 8 byla pozorována i u potkaního ortologu NKR-P1A [178].

Z vazebných experimentů tedy vyplývá, že mNKR-P1A a mNKR-P1C mají vysokou afinitu k záporně nabitým sacharidům, ať už sulfatovaným, fosforylovaným nebo sialovaným (výhradně s vazbou na galaktózu  $\alpha$  (2→3)) a dále na sacharidy, které mají na neredukujícím konci acetamididosacharid (GlcNAc nebo GalNAc). Afinita dále závisí na délce oligomeru a jeho větvení. Na závěr vazebných experimentů je možno konstatovat, že vazebná specifita mNKR-P1A a mNKR-P1C je podobná specifitě potkaního NKR-P1A.

Dalším krokem byla krystalizace obou rekombinantních proteinů. Krystalizační podmínky mNKR-P1A byly optimalizovány a byly připraveny monokrystaly mNKR-P1A vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu. Na druhou stranu krystalizační podmínky mNKR-P1C se doposud optimalizovat nepodařilo.

Z naměřených difrakčních dat byla metodou molekulového nahrazení vyřešena struktura mNKR-P1A do rozlišení 2,3 Å. Struktura mNKR-P1A, kterou vyřešil Ing. Petr Kolenko je první známá struktura v rodině NKR-P1. Jejím základem je fold do velké míry podobný s foldem CTLD. Podobně jako u CTLD se i v doméně mNKR-P1A nacházejí dva  $\alpha$ -helixy ( $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ ) a dva antiparalelní  $\beta$ -listy. Přítomnost třech disulfidových vazeb zařaduje CTLD doménu mNKR-P1A do tzv. dlouhých domén. V doméně mNKR-P1A bylo pozorováno propojení  $\alpha 1$ -helixu s  $\beta 5$  vláknem prostřednictvím disulfidové vazby mezi Cys34/Cys122, což je jeden z nejkonzervovanějších rysů CTLD domény.

Obsahem asymetrické jednotky je dimer, což však nevylučuje přítomnost monomeru v roztoku. mNKR-P1A se liší od proteinů s CTLD povahou interakcí, které participují na zformování a stabilizaci dimeru. U většiny proteinů s CTLD je dimer stabilizovaný především hydrofobními interakcemi postranních řetězců  $\alpha 2$  helixu a vodíkovými vazbami mezi  $\beta$

vlákny. V krystalové struktuře mNKR-P1A zastává tuto funkci  $\text{PO}_4^{3-}$  skupina, která byla lokalizována na rozhraní monomerů.

Nejzajímavějším atributem struktury mNKR-P1A je smyčka nebo chlopeň extendovaná z konzervované domény proteinu, která disponuje třetím  $\alpha 3$  helixem. Unikátní chlopeň lokalizovaná v úseku Thr71 a Ser100 interaguje v krystalu s další symetricky sdruženou molekulou mNKR-P1A. Chlopeň nebyla doposud pozorována u žádného C-lektinového receptoru nacházejícího se na povrchu NK buněk. Podobná struktura však byla pozorována v CTLD doméně receptoru vázajícího manózu, který se nachází na povrchu makrofágů [215]. Funkce chlopně mNKR-P1A, její flexibilita, případně participace na vázání sacharidu zůstává nevyřešena. Další vazebné a strukturní aspekty mNKR-P1A a mNKR-P1C budou diskutovány v připravovaných článcích.

Poznatky vyplývající z diplomové práce zároveň otevírají spektrum možností pro další výzkum těchto receptorů. Zajímavým námětem může být studium funkce a flexibility pozorované chlopně metodami NMR spektroskopie, dále lokalizace vazebného místa kokrytalizací proteinu s ligandem a následnou rentgenově strukturní analýzou, nebo studium afinity proteinu mNKR-P1A s deletovanou chlopní. Za pozornost by stálo i studium afinity dimerních forem receptorů, které byly připraveny sítováním pomocí EDC, nebo výzkum vazebné specifity k membránám nádorových buněk. Preparáty mNKR-P1A je dále možné použít na výrobu protilátek proti tomuto receptoru. Protilátky proti mNKR-P1A, které doposud neexistují, by mohly být následně aplikovány v detekci fyziologického ligandu tohoto receptoru a mohly by tak poodhalit další tajemství světa NK buněk.

## 7. SOUHRN

- Byla vyvinuta strategie pro rekombinantní přípravu mNKR-P1A a mNKR-P1C.
- Poskládání proteinových preparátů bylo potvrzeno NMR spektroskopii.
- Metodou dynamického rozptylu světla, sedimentační rovnováhy a proteinové NMR spektroskopie bylo zjištěno, že oba proteiny se nacházejí v roztoku ve formě monomeru.
- Tvar mNKR-P1A a mNKR-P1C byl na základě měření sedimentační rychlosti a Tellerovy aproximace odhadnut na zploštělý rotační elipsoid.
- Vyšetření fyzikálně-chemické a biochemické stability *in vitro* podhalilo, že oba proteiny disponují výjimečnou stabilitou.
- Vazebné experimenty prokázaly, že mNKR-P1A a mNKR-P1C mají podobnou vazebnou specifitu jako potkaní NKR-P1A.
- Byly nalezeny krystalizační podmínky mNKR-P1A a Ing. Petrem Kolenkem byla vyřešena struktura mNKR-P1A, která disponuje unikátním proteinovým foldem.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: *Eur. J. Immunol.* 5, 112-117 (1975)
- [2] Trinchieri, G.: *Adv. Immunol.* 47, 187-376 (1989)
- [3] Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M., Biassoni, R., Moretta, L.: *Nat. Immunol.* 1, 6-8 (2002)
- [4] Morreta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M. C., Biassoni, R., Morreta, A.: *Eur. J. Immunol.* 32, 1205-1211 (2002)
- [5] Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J.: *Immunobiology*. Garland Science, New York (2005)
- [6] Raulet, D.H.: *Nat. Immunol.* 5, 996-1002 (2004)
- [7] Lanier, L.L.: *Nat. Immunol.* 9, 495-502 (2008)
- [8] Yokoyama, W.: *Nat. Immunol.* 9, 481-485 (2008)
- [9] Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Grossmann, F. *et al.*: *Immunol. Rev.* 220, 169-182 (2007)
- [10] Zhang, Y., Wallace, D.L., Lara, C.M., Ghattas, H., Asquith, B. *et al.*: *Immunology.* 121, 258-265 (2007)
- [11] Jamieson, A.M., Isnard, P., Dorfman, J.R., Coles, M.C., Raulet, D.H.: *J. Immunol.* 172, 864-870 (2004)
- [12] Walzer, T., Walter, T., Bléry, M., Chaix, J., Fuseri, N., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 3384-3389 (2007)
- [13] Hayakawa, Y., Smyth, M.J.: *J. Immunol.* 176, 1517-1524 (2006)
- [14] Kim, S., Iizuka, K., Kang, H.S., Dokun, A., French, A.R. *et al.*: *Nat. Immunol.* 3, 523-528 (2002)
- [15] Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A.: *Trends Immunol.* 22, 633-640 (2001).
- [16] Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetenynck, S. *et al.*: *Immunity.* 25, 331-342 (2006)
- [17] Ferlazzo, G., Munz, C.: *J. Immunol.* 172, 1333-1339 (2004)
- [18] Chen, S., Kawashima, H., Lowe, J.B., Lanier, L.L., Fukuda, M.: *J. Exp. Med.* 202, 1679-1689 (2005)
- [19] Walzer, T., Chiossone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C. *et al.*: *Nat. Immunol.* 8, 1337-1344 (2007)
- [20] Kim, C.H., Pelus, L.M., Appelbaum, E., Johanson, K., Anzai, N. *et al.*: *Cell. Immunol.* 193, 226-235 (1999)
- [21] Parolini, S., Santoro, A., Marcenaro, E., Luini, W., Massardi, L. *et al.*: *Blood* 109, 3625-3632 (2007)
- [22] Long, E.O.: *Immunity.* 26, 385-387 (2007)
- [23] Ferlazzo, G., Tang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M. *et al.*: *J. Exp. Med.* 195, 343-351 (2002)
- [24] Gerosa, F., Gobi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., Trinchieri, G.: *J. Exp. Med.* 195, 327-333 (2002)
- [25] Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., Valiante, N.M.: *J. Exp. Med.* 195, 335-41 (2002)
- [26] Trinchieri, G.: *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133-146 (2003)
- [27] Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H. *et al.*: *Blood.* 104, 3267-3275 (2004)
- [28] Colonna, M., Trinchieri, G., Liu, Y.J.: *Nat. Immunol.* 5, 1219-1226 (2004)
- [29] Marshall, J.S., Jawdat, D.M.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 21-27 (2004)
- [30] Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 10116-10121 (2004)
- [31] Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F. *et al.*: *Blood.* 101, 3052-3057 (2003)
- [32] Shanker, A., Verdeil, G., Buferne, M., Inderberg-Suso, E.M., Puthier, D. *et al.*: *J. Immunol.* 179, 6651-6662 (2007)
- [33] Laouar, Y., Sutterwala, F.S., Gorelik, L., Flavell, R.A.: *Nat. Immunol.* 6, 600-607 (2005)
- [34] Ghiringhelli, Ménard C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J. *et al.*: *J. Exp. Med.* 202, 1075-1085 (2005)
- [35] Smyth, M.J., Teng, M.W., Swann, J., Kyparissoudis, K., Godfrey, D.I. *et al.*: *J. Immunol.* 176, 1582-1587 (2006)
- [36] Stewart, C.A., Vivier, E.: *How the Immune System Recognizes Self and Nonself: Immunoreceptors and Their Signaling*. Springer, Tokyo (2007).
- [37] Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., Raulet, D.H.: *Nature.* 413, 165-171 (2001)
- [38] Cerwenka, A., Baron, J.L., Lanier, L.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 11521-11522 (2001)
- [39] Kelly, J.M., Darcy, P.K., Markby, J.L., Godfrey, D.I., Takeda, K. *et al.*: *Nat. Immunol.* 3, 83-90 (2002)
- [40] Smyth, M.J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W.M., *et al.*: *J. Exp. Med.* 202, 583-588 (2005)
- [41] Street, S.E., Hayakawa, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., MacGregor, D. *et al.*: *J. Exp. Med.* 199, 879-884 (2004)
- [42] Orange, J.S.: *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6, 399-409 (2006)
- [43] Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., Nakachi, K.: *Lancet.* 356, 1795-1799 (2000)
- [44] Lee, S.H., Miyagi, T., Biron, C.A.: *Trends Immunol.* 28, 252-259 (2007)
- [45] Scalzo, A.A., Corbett, A.J., Rawlinson, W.D., Scott, G.M., Degli-Esposti, M.A.: *Immunol. Cell. Biol.* 85, 46-54 (2007)
- [46] Voigt, S., Mesci, A., Ettinger, J., Fine, J.H., Chen, P., Chou, W., Carlyle, J.R. *et al.*: *Immunity.* 26, 617-627 (2007)

- [47] Smith, H.R., Heusel, J.W., Mehta, I.K., Kim, S., Dorner, B.G. *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 8826–8831 (2002)
- [48] Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B., Lanier, L.L.: Science. 296, 1323–1326 (2002)
- [49] Desrosiers, M.P., Kielczewska, A., Loredó-Osti, J.C., Adam, S.G., Makriganis, A.P. *et al.*: Nat. Genet. 37, 593–599 (2005)
- [50] Moretta, A.: Nat. Rev. Immunol. 2, 957–964 (2002)
- [51] Zitvogel, L.: J. Exp. Med. 195, F9–14 (2002)
- [52] Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Fuchs, A., Colonna, M., Caligiuri, M.A.: Trends Immunol. 25, 47–52 (2004)
- [53] Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., Vivier, E.: Blood, 106, 2252–2258 (2005)
- [54] Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H. *et al.*: Immunity. 19, 561–569 (2003)
- [55] Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M.: J. Exp. Med. 195, 343–351, (2002)
- [56] Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S.: Blood. 107, 2030–2036 (2006)
- [57] Moretta, A., Marcenaro, E., Sivori, S., Della Chiesa, M., Vitale, M. *et al.*: Trends Immunol. 26, 668–675 (2005)
- [58] Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., Moretta, L.: Cell. Death. Differ. 15, 226–233 (2008)
- [59] Martin-Fontecha, A., Thomsen L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M. *et al.*: Nat. Immunol. 5, 1260–1265 (2004)
- [60] Morandi, B., Bougras, G., Müller, W.A., Ferlazzo, G., Munz, C.: Eur. J. Immunol. 36, 2394–2400 (2006)
- [61] Lu, L., Ikizawa, K., Hu, D., Werneck, M.B., Wucherpfennig, K.W., Cantor, H.: Immunity. 26, 593–604 (2007)
- [62] Yoneda, O., Imai, T., Goda, S., Inoue, H., Yamauchi, A. *et al.*: J. Immunol. 164, 4055–4062 (2000)
- [63] Anne Croy, B., van den Heuvel, M.J., Borzychowski, A.M., Tayade, C.: Immunol. Rev. 214, 161–185 (2006)
- [64] Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C. *et al.*: Nat. Med. 12, 1065–1074 (2006)
- [65] Moffett, A., Hiby, S.E.: Placenta. 28, S51–S56 (2007)
- [66] Dunn, C., Brunetto, M., Reynolds, G., Christophides, T., Kennedy, P.T. *et al.*: J. Exp. Med. 204, 667–680 (2007)
- [67] Flodstrom, M., Madaï, A., Balakrishna, D., Cleary, M.M., Yoshimura, A. *et al.*: Nat. Immunol. 3, 373–382 (2002)
- [68] de Matos, C.T., Berg, L., Michaëlsson, J., Felländer-Tsai, L., Kärre, K. *et al.*: Immunology. 122, 291–301 (2007)
- [69] Katchar, K., Soderstrom, K., Wahlstrom, J., Eklund, A., Grunewald, J.: Eur. Respir. J. 26, 77–85 (2005)
- [70] Kerr, A.R., Kirkham, L.A., Kadioglu, A., Andrew, P.W., Garside, P. *et al.*: Microbes Infect. 7, 845–852 (2005)
- [71] Badgwell, B., Parihar, R., Magro, C., Dierksheide, J., Russo, T. *et al.*: Surgery. 132, 205–212 (2002)
- [72] Korbel, D.S., Finney, O.C., Riley, E.M.: Int. J. Parasitol. 34, 1517–1528 (2004)
- [73] Roetynck, S., Baratin, M., Johansson, S., Lemmers, C., Vivier, E. *et al.*: Immunol. Rev. 214, 251–263 (2006)
- [74] Alter, G., Martin, M.P., Teigen, N., Carr, W.H., Suscovich, T.J. *et al.*: J. Exp. Med. 204, 3027–3036 (2007)
- [75] Carr, W.H., Rosen, D.B., Arase, H., Nixon, D.F., Michaelsson, J. *et al.*: J. Immunol. 178, 647–651 (2007)
- [76] Vieillard, V., Strominger, J.L., Debre, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 10981–10986 (2005)
- [77] Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S.: Nat. Immunol. 9, 503–510 (2008)
- [78] Lanier, L.L.: Annu. Rev. Immunol. 23, 225–274 (2005)
- [79] Raulet, D.H., Vance, R.E., McMahon, C.W.: Annu. Rev. Immunol. 19, 291–330 (2001)
- [80] Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C. *et al.*: Annu. Rev. Immunol. 19, 197–223 (2001)
- [81] Ljunggren, H.C., Kärre, K.: Immunol. Today. 11, 237–244 (1990)
- [82] Raulet, D.H., Vance, R.E.: Nat. Rev. Immunol. 6, 520–531 (2006)
- [83] Medzhitov, R., Janeway, C.A.: Science. 296, 298–300 (2002)
- [84] Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R.: Nature. 319, 675–678 (1986)
- [85] Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F., Lagenaur, C.F., Greshman, H.D. *et al.*: Science. 288, 2051–2054
- [86] Raulet, D.H.: Nat. Rev. Immunol. 3, 781–790 (2003)
- [87] Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H. *et al.*: Science. 285, 727–729 (1999)
- [88] Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H. *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 6879–6884 (1999)
- [89] Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., Raulet, D.H.: Nature. 413, 165–171 (2001)
- [90] Vivier, E., Biron, C.A.: Science. 296, 1248–1249 (2002)
- [91] Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R., Beckman, D.L. *et al.*: Science. 292, 934–937 (2001)

- [92] Daniels, K.A., Devora, G., Lai, W.C., O'Donnell, C.L., Bennett, M. *et al.*: *J. Exp. Med.* 194, 29-44 (2001)
- [93] Lee, S.H., Girard, S., Macina, D., Busa, M., Zafer, A. *et al.*: *Nat. Genet.* 28, 42-45 (2001)
- [95] Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N.L., Faust, J.: *J. Immunol.* 133, 180-189 (1984)
- [96] Bix, M., Liao, N.S., Zijlstra, M., Loring, J., Jaenisch, R. *et al.*: *Nature.* 349, 329-331(1991)
- [97] Vély, F., Vivier, E.: *J. Immunol.* 159, 2075 (1997)
- [98] Long, E.O.: *Annu. Rev. Immunol.* 17, 875 (1999)
- [99] Valiante, N.M., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Parham, P.: *J. Exp. Med.* 184, 2243-2250 (1996)
- [100] Binstadt, B.A., Billadeau, D.D., Jevremovic, D., Williams, B.L., Fang, N. *et al.*: *J. Biol. Chem.* 273, 27 518-27 523 (1998)
- [101] Stebbins, C.C., Watzl, C., Billadeau, D.D., Leibson, P.J., Burshtyn, D.N. *et al.*: *Mol. Cell. Biol.* 23:6291-6299 (2003)
- [102] Vivier, E., Nunes, J.A, Vely, F.: *Science.* 306, 1517-1519 (2004)
- [103] Reth, M.: *Nature.* 338, 383-384 (1989)
- [104] Hibbs, M.L., Selvaraj, P., Carpen, O., Springer, T.A., Kuster, H. *et al.*: *Science.* 246,1608-1611 (1989)
- [105] Anderson, P., Caligiuri, M., Ritz, J., Schlossman, S.F.: *Nature.* 341, 159-162 (1989)
- [106] Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., Phillips, J.H.: *Nature.* 391,703-707 (1998)
- [107] Billadeau, D.D., Upshaw, J.L., Schoon, R.A., Dick, C.J., Leibson, P.J.: *Nat. Immunol.* 4, 509-510 (2003)
- [108] Wange, R.L.: *Sci. STKE.* 2000, rel (2000)
- [109] Jevremovic, D., Billadeau, D.D., Schoon, R.A., Dick, C.J., Irvin, B.J. *et al.*: *J. Immunol.* 162, 2453-2456 (1999)
- [110] Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D.L., Corliss, B.C., Hong-Geller, E. *et al.*: *Nat. Immunol.* 1, 419-425 (2000)
- [111] Jevremovic, D., Billadeau, D.D., Schoon, R.A., Leibson, P.J.: *J. Immunol.* 166, 7219- 7228 (2001)
- [112] Millard, P.J., Henkart, M.P., Reynolds, C.W., Henkart, P.A.: *J. Immunol.* 132, 3197-3204 (1984).
- [113] Podack, E.R., Young, J.D., Cohn, Z.A.: *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.* 82, 8629-8633 (1985)
- [114] Tschopp, J., Massom, D., Stanley, K.K.: *Nature.* 322, 831-834 (1986)
- [115] Shi, L., Kraut, R.P., Aebersold, R., Greenberg, A.H.A: *J. Exp. Med.* 175, 553-566 (1992)
- [116] Froelich, C.J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R.: *J. Biol. Chem.* 271, 29073-29079 (1996)
- [117] Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibein, J.A., Caputo, A. *et al.*: *Cell.* 103, 491-500 (2000)
- [118] Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., Ley, T.J.: *Cell.* 76, 977- 987 (1994)
- [119] Nakajima, H., Park, H.L., Henkart, P.A.: *J. Exp. Med.* 181, 1037-1046 (1995)
- [120] Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., Henkart, P.A.: *J. Exp. Med.* 196, 493-503 (2002)
- [121] Hirst, C.E., Buzza, M.S., Bird, C.H., Warren, H.S., Cameron, P.U. *et al.*: *J. Immunol.* 170, 805-815 (2003)
- [122] Degli-Esposti, M.: *J. Leukoc. Biol.* 65, 535-542 (1999)
- [123] Smyth, M.J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrott, R.H., Sedger, L.M. *et al.*: *J. Exp. Med.* 193, 661-670 (2001)
- [124] Bradley, M., Zeytun, A., Rafi-Janajreh, A., Nagarkatti, P.S.: *Blood.* 92, 4248-4255 (1998)
- [125] Screpanti, V., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G., Grandien, A.: *J. Immunol.* 167, 2068-2073 (2001)
- [126] Colonna, M., Samaridis, J.: *Science.* 268, 405-408 (1995)
- [127] Wagtmann, N., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Malnati, M.S. *et al.*: *Immunity.* 2, 439-449 (1995)
- [128] Ferrini, S., Cambiaggi, A., Meazza, R., Sforzini, S., Marciano, S. *et al.*: *Eur. J. Immunol.* 24, 2294-98 (1994)
- [129] Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K. *et al.*: *Immunity.* 7, 753-763 (1997)
- [130] Hoelsbrekken, S.E., Nylenna, O., Saether, P.C., Slettedal, I.O., Ryan, J.C. *et al.*: *J. Immunol.* 170, 2259-2263 (2003)
- [131] Barten, R., Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J., Wilson, M.J.: *Trends in Immunol.*, 22, 52-57 (2001)
- [132] Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J.H., Lanier, L.L.: *J. Exp. Med.* 178, 1321-1336 (1993)
- [133] Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Winter, C.C., Peruzzi, M., Long, E.O.: *Immunity.* 3, 801-809 (1995)
- [134] Dohring, C., Colonna, M.: *Eur. J. Immunol.* 26, 365-369 (1996)
- [135] Malnati, M.S., Peruzzi, M., Parker, K.C., Biddison, W.E., Ciccone, E. *et al.*: *Science.* 267, 1016-1018 (1995)
- [136] Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R.K., Margulies, D.H.: *Annu. Rev. Immunol.* 20, 853-885 (2002)
- [137] Yokoyama, W.M.: *Fundamental Immunology.* Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)
- [138] Mehta, I.K., Wang, J., Roland, J., Margulies, D.H., Yokoyama, W.M.: *Immunogenetics.* 53, 572-583 (2001)
- [139] Wilhelm, B.T., Gagnier, L., Mager, D.L.: *Genomics.* 80, 646-661 (2002)
- [140] Makrigiannis, A.P., Pau, A.T., Saleh, A., Winkler-Pickett, R., Ortaldo, J.R. *et al.*: *J.*

- Immunol. 166, 5034–5043 (2001)
- [141] Yokoyama, W.M., Plougastel, B.F.: *Nat. Rev. Immunol* 3, 304–316 (2003)
- [142] Smith, K.M., Wu, J., Bakker, A., Phillips, J.H., Lanier L.L.: *J. Immunol.* 161, 7–10 (1998)
- [143] Tormo, J., Natarajan, K., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: *Nature.* 402, 623–631 (1999)
- [144] Wang, J., Whitman, M.C., Natarajan, K., Tormo, J., Mariuzza, R.A. *et al.*: *J. Biol. Chem.* 277, 1433–42 (2002)
- [145] Natarajan, K., Boyd, L.F., Schuck, P., Yokoyama, W.M., Eliat, D. *et al.*: *Immunity.* 11, 591–601 (1999)
- [146] Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R., Beckman, D.L. *et al.*: *Science.* 292, 934–937 (2001)
- [147] Daniels, K.A., Devora, G., Lai, W.C., O'Donnell, C.L., Bennett, M. *et al.*: *J. Exp. Med.* 194, 29–44 (2001)
- [148] Lee, S.H., Zafer, A., de Repentigny, Y., Kothary, R., Tremblay, M.L. *et al.*: *J. Exp. Med.* 197, 515–526 (2003)
- [149] Sjolín, H., Tomasello, E., Mousavi-Jazi, M., Bartolazzi, A., Karre, K. *et al.*: *J. Exp. Med.* 195, 825–34 (2002)
- [150] Chang, C., Rodriguez, A., Carretero, M., Lopez-Botet, M., Phillips, J.H. *et al.*: *Eur. J. Immunol.* 25, 2433–2437 (1995)
- [151] Toyama-Sorimachi, N., Taguchi, Y., Yagita, H., Kitamura, F., Kawasaki, A. *et al.*: *J. Immunol.* 166, 3771–79 (2001)
- [152] Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L., Phillips, J.H.: *J. Immunol.* 157, 4741–45 (1996)
- [153] Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F.H.: *J. Exp. Med.* 173, 1017–20 (1991)
- [154] Lohwasser, S., Hande, P., Mager, D.L., Takei, F.: *Eur. J. Immunol.* 29, 755–61 (1999)
- [155] Vance, R.E., Jamieson, A.M., Raulet, D.H.: *J. Exp. Med.* 190: 1801–12 (1999)
- [156] Shum, B.P., Flodin, L.R., Muir, D.G., Rajalingam, R., Khakoo, S.I. *et al.*: *J. Immunol.* 168, 240–52 (2002)
- [157] Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., Phillips, J.H.: *Immunity.* 8, 693–701 (1998)
- [158] Braud, V.M., Allan, D.S.J., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A. *et al.*: *Nature.* 391, 795–98 (1998)
- [159] Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., Brooks, A.G.: *J. Exp. Med.* 187, 813–18 (1998)
- [160] Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 5199–204 (1998)
- [161] Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H. *et al.*: *Science.* 285, 727–30 (1999)
- [162] Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Phillips, J.H., Lanier, L.L.: *J. Exp. Med.* 192, 1059–68 (2000)
- [163] Andre, P., Castriconi, R., Espeli, M., Anfossi, N., Juarez, T. *et al.*: *Eur. J. Immunol.* 34, 961–71 (2004)
- [164] Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B.H., Bauer, S., Groh, V. *et al.*: *Science.* 285, 730–32 (1999)
- [165] Li, P., Morris, D.L., Willcox, B.E., Steinle, A., Spies, T., Strong, R.K.: *Nat. Immunol.* 2, 443–51 (2001)
- [166] Holmes, M.A., Li, P., Petersdorf, E.W., Strong, R.K.: *J. Immunol.* 169, 1395–400 (2002)
- [167] Li, P., McDermott, G., Strong, R.K.: *Immunity.* 16, 77–86 (2002)
- [168] Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T.: *Nature.* 419, 734–38 (2002)
- [169] Yokoyama, W.M., Ryan, J.C., Hunter, J.J., Smith, H.R.C., Stark, M. *et al.*: *J. Immunol.* 147, 3229–36 (1991)
- [170] Giorda, R., Weisberg, E.P., Ip, T.K., Trucco, M.: *J. Immunol.* 149, 1957–63 (1992)
- [171] Ryan, J.C., Turck, J., Niemi, E.C., Yokoyama, W.M., Seaman, W.E.: *J. Immunol.* 149, 1631–35 (1992)
- [172] Koo, G.C., Peppard, J.R.: *Hybridoma.* 3, 301 (1984)
- [173] Giorda, R., Rudert, W.A., Vavassori, C., Chambers, W.H., Hiserodt, J.C. *et al.*: *Science.* 249, 1298–300 (1990)
- [174] Pozo, D., Vales-Gomez, M., Mavaddat, N., Williamson, S.C., Chisholm, S.E. *et al.*: *J. Immunol.* 176, 2397–2407 (2006)
- [175] Arase, H., Arase, N., Saito, T.: *J. Exp. Med.* 183, 2391–96 (1996)
- [176] Arase, N., Arase, H., Park, S.Y., Ohno, H., Saito, T.: *J. Exp. Med.* 186, 1957–63 (1997)
- [177] Ljutic, B., Carlyle, J.R., Philipp, D., Nakagawa, R., Julius, M.: *J. Immunol.* 15, 4789–96 (2005)
- [178] Bezouška, K., Yuen, C.T., O'Brien, J., Childs, R.A., Chai, W. *et al.*: *Nature.* 372, 150–7 (1994)
- [179] Carlyle, J.R., Jamieson, A.M., Gasser, S., Clingan, C.S., Arase, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 3527–32 (2004)
- [180] Plougastel, B., Dubbelde, C., Yokoyama, W.M.: *Immunogenetics.* 53, 209–14 (2001)
- [181] Zhou, H., Kartsogiannis, V., Hu, Y.S., Elliott, J., Quinn, J.M. *et al.*: *J. Biol. Chem.* 276, 14916–23 (2001)
- [182] Hu, Y.S., Zhou, H., Myers, D., Quinn, J.M., Atkins, G.J. *et al.*: *J. Bone Miner. Res.* 19, 89–99 (2004)
- [183] Mathew, P.A., Chuang, S.S., Vaidya, S.V., Kumaresan, P.R., Boles, K.S. *et al.*: *Mol. Immunol.* 40, 1157–63 (2004)
- [184] Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., Rosenberg, S.A.: *J. Exp. Med.* 155, 1823–1841 (1982)
- [185] Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E. *et al.*: *N. Engl. J. Med.* 313, 1485–1492 (1985)
- [186] Rodella, L., Zamai, L., Rezzani, R., Artico, M., Peri, G. *et al.*: *Br. J. Haematol.* 115, 442–450

- (2001)
- [187] Koh, C.Y., Blazar, B.R., George, T., Welniak, L.A., Capitini, C.M. *et al.*: *Blood*. 97, 3132–3137 (2001)
- [188] Sheridan, C.: *Nat. Biotechnol.* 24, 597 (2006)
- [189] Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D. *et al.*: *Science*. 295, 2097–2100 (2002)
- [190] Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S. *et al.*: *Blood*. 102, 814–819 (2003)
- [191] Miller, J.S., Cooley, S., Parham, P., Farag, S.S., Verneris, M.R. *et al.*: *Blood*. 109, 5058–5061 (2007)
- [192] Passweg, J.R., Stern, M., Koehl, U., Uharek, L., Tichelli, A.: *Bone Marrow Transplant.* 35, 637–643 (2005)
- [193] Passweg, J.R., Tichelli, A., Meyer-Monard, S., Heim, D., Stern, M. *et al.*: *Leukemia*. 18, 1835–1838 (2004)
- [194] Carter, P.J.: *Nat. Rev. Immunol.* 6, 343–357 (2006)
- [195] Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P. *et al.*: *Blood*. 99, 754–758 (2002)
- [196] Weng, W.K., Levy, R.: *J. Clin. Oncol.* 21, 3940–3947 (2003)
- [197] Shahied, L.S., Tang, Y., Alpaugh, R.K., Somer, R., Greenspon, D. *et al.*: *J. Biol. Chem.* 279, 53907–53914 (2004)
- [198] Smyth, M.J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J.J. *et al.*: *Immunity*. 18, 1–6 (2003)
- [199] Daniel, D., Yang, B., Lawrence, D.A., Totpal, K., Balter, I. *et al.*: *Blood*. 110, 4037–4046 (2007)
- [200] Caminschi, I., Ahmet, F., Heger, K., Brady, J., Nutt, S.L. *et al.*: *J. Exp. Med.* 204, 2579–2590 (2007)
- [201] Bonmort, M., Ullrich, E., Mignot, G., Jacobs, B., Chaput, N. *et al.*: *Biochimie*. 89, 872–877 (2007)
- [202] Pilla, L., Patuzzo, R., Rivoltini, L., Maio, M., Pennacchioli, E. *et al.*: *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 958–968 (2006)
- [203] Borg, C., Terme, M., Taieb, J., Menard, C., Flament, C. *et al.*: *J. Clin. Invest.* 114, 379–388 (2004)
- [204] Davies, F.E., Raje, N., Hideshima, T., Lentzsch, S., Young, G. *et al.*: *Blood*. 98, 210–216 (2001)
- [205] Brune, M., Castaigne, S., Catalano, J., Gehlsen, K., Ho, A.D. *et al.*: *Blood*. 108, 88–96 (2006)
- [206] Mazodier, K., Marin, V., Novick, D., Farnarier, C., Robitail, S. *et al.*: *Blood* 106, 3483–3489 (2005)
- [207] Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N.F., Chaput, N., Zitvogel, L.: *Nat. Immunol.* 9, 486–94 (2008)
- [208] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
- [209] Semenuk, T., Krist, P., Pavlíček, J., Bezouska, K. *et al.*: *Glycoconj J.* 18, 817–26 (2001)
- [210] Vanek, O., Nalezkova, M., Kavan, D., Borovickova, I., Bezouska, K. *et al.*: *FEBS J.* 275, 5589–606 (2008)
- [211] Pompach, P., Man, P., Kavan, D., Hofbauerova, K., Bezouska, K. *et al.*: *J. Mass. Spectrom.* v přípravě
- [212] Zelensky, A.N., Gready, J.E.: *Proteins*. 52, 466–477 (2003)
- [213] Vaněk, O.: *Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie* (2005)
- [214] Krist, P., Herkommerova-Rajnochova, E., Raulvolfova, J., Semenuk, T., Bezouska, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 11–20 (2001)
- [215] Feinberg, H., Park-Snyder, S., Kolatkar, A.R., Heise, C.T., Taylor, M.E. *et al.*: *J. Biol. Chem.* 275, 21539–48 (2000)

