**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

# Rekombinantní exprese a studium receptoru rNKR-P1A

**Diplomová práce**

**Němcová Petra**

**Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.**

**Školitel: Mgr. Ondřej Vaněk**

**Praha 2009**

# Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracování diplomové práce a za cenné připomínky a rady. Také bych tímto chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Ondřeji Vaňkovi za odborné vedení a poskytnuté rady při vypracovávání této diplomové práce. Všem členům Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR, kde probíhala část experimentů, děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu kdykoliv pomoci. Za měření a interpretaci hmotnostních spekter děkuji Mgr. Hynku Mrázkovi a Mgr. Petru Novákovi, Ph.D. Za měření a vyhodnocení DCDR spekter děkuji RNDr. Kateřině Hofbauerové, Ph.D. a RNDr. Vladimíru Kopeckému, Ph.D. a Ing. Petru Kolenkovi za pomoc při měření dynamického rozptylu světla. Děkuji také svým rodičům za jejich podporu poskytovanou po celou dobu mého studia.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a Mgr. Ondřeje Vaňka a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 29. dubna 2009

Petra Němcová

# Obsah

Seznam použitých zkratek ..... 7
**1. LITERÁRNÍ ÚVOD ..... 9**
1.1. Imunitní systém ..... 9
1.1.1. Mechanismy imunitního systému ..... 9
1.1.2. Buňky imunitního systému ..... 9
1.2. NK buňky ..... 11
1.2.1. NK buněčné rozpoznávání ..... 12
1.2.2. Cytotoxické mechanismy NK buněk ..... 13
1.2.3. Funkce NK buněk ..... 13
1.3. Receptory NK buněk ..... 14
1.3.1. Geny kódující receptory NK buněk ..... 16
1.3.2. Receptory imunoglobulinové superrodiny ..... 16
1.3.3. Receptory C-lektinového typu ..... 18
1.3.3.1. Rodina receptorů Ly-49 ..... 19
1.3.3.2. Rodina receptorů NKG2 ..... 20
1.3.3.3. Rodina receptorů příbuzných s molekulou CD69 ..... 21
1.3.3.4. Rodina receptorů NKR-P1 ..... 21
1.4. rNKR-P1A ..... 23
**2. CÍL PRÁCE ..... 26**
**3. MATERIÁL ..... 27**
3.1. Přístroje a pomůcky ..... 27
3.2. Chemikálie ..... 28
3.2.1. Enzymy ..... 29
3.2.2. Bakteriální kmeny ..... 30
3.2.3. Vektory ..... 30
3.2.4. Primery pro PCR ..... 30
3.2.5. Roztoky a média ..... 31
**4. METODY ..... 33**
4.1. Příprava expresního vektoru ..... 33
4.1.1. PCR ..... 33
4.1.2. Agarosová gelová elektroforéza ..... 33

4.1.3. Extrakce DNA směsí fenol/chloroform a precipitace DNA ..... 34
4.1.4. Ligace do vektoru pBluescript SK+ ..... 34
4.1.5. Transformace bakterií ..... 34
4.1.6. Selekce klonů ..... 35
4.1.7. Izolace plasmidové DNA ..... 35
4.1.8. Příprava insertu a linearizovaného plasmidu pET-30a(+) ..... 36
4.1.9. Preparativní elektroforéza ..... 36
4.1.10. Extrakce DNA z gelu ..... 36
4.1.11. Ligace do vektoru pET-30a(+) ..... 37
4.1.12. Příprava zásobního množství plasmidu ..... 37
4.1.13. Stanovení koncentrace DNA ..... 38
4.1.14. Sekvenování DNA ..... 38
4.2. Příprava proteinu ..... 38
4.2.1. Transformace bakterií ..... 38
4.2.2. Selekce produkčního klonu ..... 39
4.2.3. SDS-PAGE ..... 39
4.2.4. Velkoobjemová produkce proteinu ..... 40
4.2.5. Izolace inkluzních tělísek ..... 40
4.3. Renaturace proteinu ..... 41
4.4. Purifikace proteinu ..... 41
4.4.1. Ionexová chromatografie I ..... 41
4.4.2. Gelová chromatografie ..... 41
4.4.3. Ionexová chromatografie II ..... 42
4.4.4. Stanovení koncentrace purifikovaného proteinu ..... 42
4.5. Identifikace proteinu ..... 42
4.5.1. Proteinové sekvenování ..... 42
4.5.2. Identifikace proteinu metodou peptidového mapování ..... 43
4.5.3. Analýza vzorku pomocí ESI-FT-ICR hmotnostní spektrometrie ..... 43
4.6. Charakterizace proteinu ..... 44
4.6.1. Dynamický rozptyl světla ..... 44
4.6.2. Analytická ultracentifugace ..... 44
4.6.3. Měření Ramanova rozptylu ..... 45
4.7. Vazebné experimenty ..... 45

4.7.1. Vazebné experimenty s radioaktivně značeným proteinem ..... 45
4.7.2. Vazebné experimenty s fluorescenčně značeným proteinem ..... 47
**5. VÝSLEDKY ..... 48**
5.1. Příprava expresního vektoru ..... 48
5.2. Produkce proteinu srNKR-P1A ..... 52
5.3. Renaturace proteinu srNKR-P1A ..... 53
5.4. Purifikace proteinu srNKR-P1A ..... 54
5.5. Identifikace proteinu srNKR-P1A ..... 57
5.6. Charakterizace proteinu srNKR-P1A ..... 58
5.6.1. Dynamický rozptyl světla ..... 58
5.6.2. Analytická ultracentrifugace ..... 59
5.6.3. Ramanova spektroskopie ..... 61
5.7. Vazebné experimenty ..... 62
5.7.1. Vazebné experimenty s radioaktivně značeným proteinem ..... 62
5.7.2. Vazebné experimenty s fluorescenčně značeným proteinem ..... 66
**6. DISKUSE ..... 69**
**7. SOUHRN ..... 73**
**8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ..... 74**

# Seznam použitých zkratek

Sacharidy a aminokyseliny jsou označeny standardními zkratkami dle doporučení IUPAC.

| | |
|---|---|
| **ADCC** | buněčná cytotoxicita závislá na protilátce (**A**ntibody-**D**ependent **C**ellular **C**ytotoxicity) |
| **AICL** | označení povrchového leukocytárního receptoru (**A**ctivation-**I**nduced **C**-type **L**ectin) |
| **APC** | buňka předkládající antigen (**A**ntigen-**P**resenting **C**ell) |
| **APS** | persíran amonný |
| **bp** | počet párů bazí, jednotka délky řetězce DNA |
| **BSA** | hovězí sérový albumin |
| **CBB R-250** | barva Coomassie Brilliant Blue R-250 |
| **CD** | označení povrchových molekul leukocytů (**C**luster of **D**ifferentiation) |
| **Clr** | molekula příbuzná lektinům C-typu (**C**-**L**ectin **R**elated **P**rotein) |
| **CRD** | lektinová doména vázající sacharid (**C**arbohydrate-**R**ecognition **D**omain) |
| **CTLD** | doména podobná lektinům C-typu (**C**-**T**ype **L**ectin-like **D**omain) |
| **DCDR** | Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (**D**rop **C**oating **D**eposition **R**aman) |
| **dd** | destilovaný, deionizovaný |
| **DMSO** | dimethylsulfoxid |
| **dNTP** | směs deoxyribonukleotidtrifosfátů |
| **DTT** | dithiothreitol |
| **EDTA** | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| **ESI** | ionizace elektrosprejem (**E**lectro**S**pray **I**onization) |
| **Fc** | fragment imunoglobulinu po štěpení papainem |
| **FcγRIII** | receptor III pro Fc část IgG |
| **FcεRIγ** | receptor pro Fc část IgE |
| **FT-ICR** | iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací |
| **H-2** | hlavní histokompatibilní myší komplex |
| **HEPES** | 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina |
| **HLA** | hlavní histokompatibilní lidský antigen (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen) |
| **HPLC** | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| **IFN** | interferon |
| **Ig** | imunoglobulin |
| **IL** | interleukin |
| **IPTG** | isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid |
| **ITAM** | aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (**I**mmunoreceptor **T**yrosin-based **A**ctivation **M**otif) |
| **ITIM** | inhibiční motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (**I**mmunoreceptor **T**yrosin-based **I**nhibition **M**otif) |
| **KIR** | zabíječský receptor imunoglobulinového typu (**K**iller **I**g-like **R**eceptor) |

| | |
|---|---|
| **KLRB** | označení povrchového leukocytárního receptoru (**K**iller Cell **L**ectin-like **R**eceptor Subfamily **B**) |
| **LAIR** | označení imunoglobulinům podobných receptorů leukocytů (**L**eukocyte-**A**ssociated **I**g-like **R**eceptors) |
| **LB** | název média (**L**uria-**B**ertani) |
| **LCR** | komplex genů leukocytárních receptorů (**L**eukocyte-**R**eceptor **C**omplex) |
| **LILR (LIR)** | imunoglobulinům podobné receptory leukocytů (**L**eukocyte **I**g-like **R**eceptors) |
| **LLT1** | lektinům podobný transkript 1 (**L**ectin-like **T**ranscript **1**) |
| **MALDI** | desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onization) |
| **MHC** | hlavní histokompatibilní komplex (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex) |
| **NCR** | receptory odpovědné za spontánní cytotoxicitu NK buněk (**N**atural **C**ytotoxicity **R**eceptors) |
| **NHS** | N-hydroxysukcinimid |
| **NK** | přirozený zabíječ (**N**atural **K**iller) |
| **NKC** | komplex genů NK buněčných receptorů (**N**atural **K**iller **C**omplex) |
| **NKD** | NK buněčná doména (**N**atural **K**iller **D**omain) |
| **NKR-P1** | označení povrchového leukocytárního receptoru (**N**atural **K**iller **R**eceptor-**P**rotein **1**) |
| **NK-T** | přirozeně zabíječské T buňky |
| **Ocil** | alternativní název pro receptory Clr (**O**steoclast **I**nhibitory **L**ectin) |
| **OD** | optická hustota (**O**ptical **D**ensity) |
| **PCR** | polymerasová řetězová reakce (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) |
| **PMSF** | fenylmethylsulfonylfluorid |
| **PVDF** | polyvinylidendifluorid |
| **SDS** | dodecylsulfát sodný |
| **SDS-PAGE** | SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza |
| **SHIP** | inositol polyfosfát 5' fosfatasa (**SH2**-Domain Containing **I**nositol **P**olyphosphate 5' **P**hosphatase) |
| **SHP** | protein tyrosin fosfatasa (**SH2**-Domain-Containing Tyrosin **P**hosphatase) |
| **$T_C$** | cytotoxické T-lymfocyty (**C**ytotoxic **T** Cell) |
| **$T_H$** | pomocné T-lymfocyty (**H**elper **T** Cell) |
| **TCR** | antigenní receptor T-lymfocytů (**T**-Cell **R**eceptor) |
| **TEMED** | N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin |
| **TNF** | faktor nekrotizující nádory |
| **TOF** | doba letu částice (**T**ime **O**f **F**light) |
| **Tris** | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| **uNK** | podskupina přirozených zabíječů (**U**terine **N**atural **K**iller) |
| **X-gal** | 5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid |

# 1. Literární úvod

## 1.1. Imunitní systém

Imunitní systém udržuje integritu organismu, rozeznává škodlivé látky od neškodných, a tím chrání organismus od škodlivin vnitřního i vnějšího původu [1].

### 1.1.1. Mechanismy imunitního systému

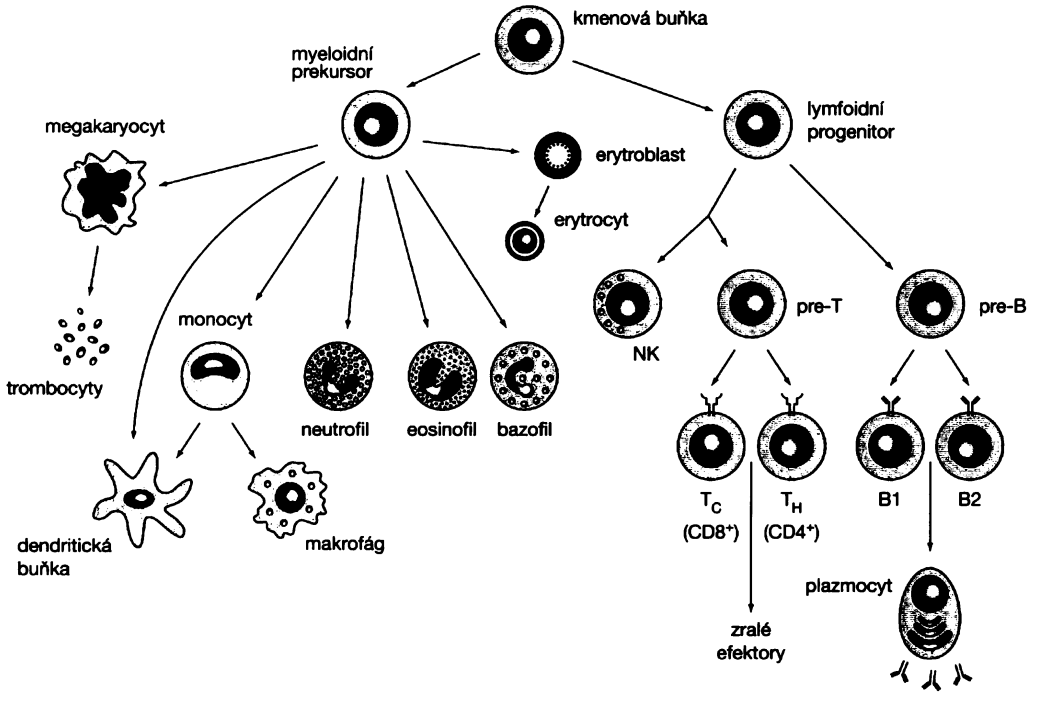
Imunitní systém pracuje na základě dvou mechanismů, prvním z nich je neadaptivní mechanismus. Neadaptivní (nespecifický, vrozený) mechanismus je evolučně starší a je zajišťován buněčnými i humorálními složkami. Mezi buněčné složky patří fagocytující a NK buňky. Humorálními složkami jsou interferony, komplementový systém, lektiny a jiné sérové proteiny. Tyto molekuly a buňky jsou v organismu připravené předem a reagují na společné strukturní nebo funkční rysy škodlivin velmi rychle, řádově v minutách. Nemají tzv. imunologickou paměť. Zatímco neadaptivní mechanismus je znám u všech mnohobuněčných organismů, druhý, adaptivní (antigenně specifický), mechanismus je přítomný až u obratlovců. Specifické molekuly adaptivního mechanismu (protilátky, antigenně specifické receptory T-lymfocytů) reagují na cizorodé látky až po setkání s daným antigenem, mají tzv. imunologickou paměť. Rozvoj imunitní reakce nastává za několik dní až týdnů. Pro obratlovce jsou oba uvedené mechanismy nezbytné a vzájemně spolupracují [1].

### 1.1.2. Buňky imunitního systému

Reakce imunitního systému jsou zajišťovány pomocí různých druhů buněk a molekul a jejich vzájemnými interakcemi. Hlavní součástí imunitního systému jsou různé druhy bílých krvinek (leukocyty). Leukocyty vznikají z pluripotentních kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni. Pro tyto buňky je charakteristická přítomnost adhezivní molekuly CD34. Pod vlivem různých faktorů se kmenové buňky diferencují na dvě základní linie – myeloidní a lymfoidní (obr. 1.1, str. 10).

Z myeloidní linie se tvoří monocyty (cirkulují v krvi, ve tkáních se diferencují na makrofágy), tři druhy granulocytů – neutrofily, eozinofily a bazofily a dendritické buňky. Tyto buňky tvoří základ nespecifické části imunitního systému a většina z těchto buněk má schopnost fagocytózy a produkce cytokinů. Z myeloidní linie dále vznikají červené krvinky (erytrocyty) a krevní destičky (trombocyty). Dendritické buňky, monocyty a makrofágy mohou být součástí antigenně specifické části imunitního systému, mohou totiž působit jako buňky prezentující antigen (APC) pro T-lymfocyty.

Z lymfoidní linie se tvoří NK buňky, B a T-lymfocyty. Vývoj B-lymfocytů se uskutečňuje v kostní dřeni a dokončuje se v sekundárních lymfoidních orgánech po setkání s antigenem, konečným stadiem jsou plazmatické buňky produkující protilátky. Vývoj T-lymfocytů probíhá z hlavní části v brzlíku, kde vznikají prekurzory pomocných T-lymfocytů ($T_H$) nesoucí receptor CD4 a prekurzory cytotoxických T-lymfocytů ($T_C$), které mají receptor CD8. Tyto prekurzory se mění na zralé efektorové buňky po setkání s antigenem na povrchu APC. Po setkání s antigenem se část B a T-lymfocytů mění v paměťové buňky, které jsou odpovědné za tzv. imunologickou paměť [1].




**Obr. 1.1: Diferenciace leukocytů z kmenové buňky [1].**

## 1.2. NK buňky

NK buňky (z angl. natural killer) byly prvotně charakterizovány v roce 1975 jako lymfocyty, které mají schopnost zabíjet nádorové buňky bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciace [2]. Z morfologického hlediska jsou NK buňky velké granulární lymfocyty. NK buňky se diferencují společně s B a T-lymfocyty z pluripotentních kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni. Od B a T-lymfocytů se odlišují absencí antigenně specifických receptorů, řadí se proto mezi antigenně nespecifické mechanismy imunitního systému [1]. NK buňky byly původně popsány u myší a člověka, později byly tyto buňky izolovány i z dalších obratlovců [3]. NK buňky se v organismu nacházejí zejména v periferní krvi, slezině, kostní dřeni a játrech, ve většině tkání NK buňky reprezentují minoritní frakci lymfoidních buněk (například v lidské periferní krvi představují 2-18 % všech lymfoidních buněk) [4]. NK buňky jsou definovány pomocí molekul exprimovaných na jejich povrchu. Myší NK buňky jsou definovány jako $CD3^-$ NKR-$P1C^+$ či jako $CD3^-$ $DX5^+$ dle myšího kmene [5, 6]. Lidské NK buňky jsou fenotypově charakterizovány jako $CD3^-$ $CD56^+$, tzn. že na svém povrchu exprimují adhezivní molekulu imunoglobinové rodiny CD56, ale neexprimují molekulu CD3. Na základě odlišné míry exprese molekuly CD56 rozlišujeme tzv. $CD56^{dim}$ a $CD56^{bright}$ NK buňky. $CD56^{dim}$ NK buňky tvoří majoritní složku (přibližně 90 %) lidských NK buněk a oproti $CD56^{bright}$ NK buňkám vykazují nízkou míru exprese povrchové molekuly CD56, exprimují molekulu CD16 (FcγRIII, receptor pro Fc část IgG), vykazují vyšší cytotoxicitu a naopak produkují menší množství cytokinů. $CD56^{bright}$ NK buňky mohou být dále dle exprese molekuly CD16 rozděleny na $CD56^{bright}$ $CD16^{dim}$ nebo $CD16^-$ NK buňky [7]. Na základě rozdílného repertoáru produkovaných cytokinů navrhl Peritt a kol. klasifikaci lidských NK buněk na dvě podskupiny: NK1 a NK2. Toto rozdělení vychází z analogie s $T_H1$ a $T_H2$-lymfocyty. Lidské NK buňky po kultivaci v přítomnosti IL-12 (NK1) produkovaly IL-10 a IFN-γ, zatímco NK buňky po kultivaci v přítomnosti IL-4 (NK2) produkovaly IL-5 a IL-13. Identifikace těchto podskupin ukázala na roli NK buněk v procesu zánětlivé reakce a na jejich efekt na adaptivní část imunitního systému [8].

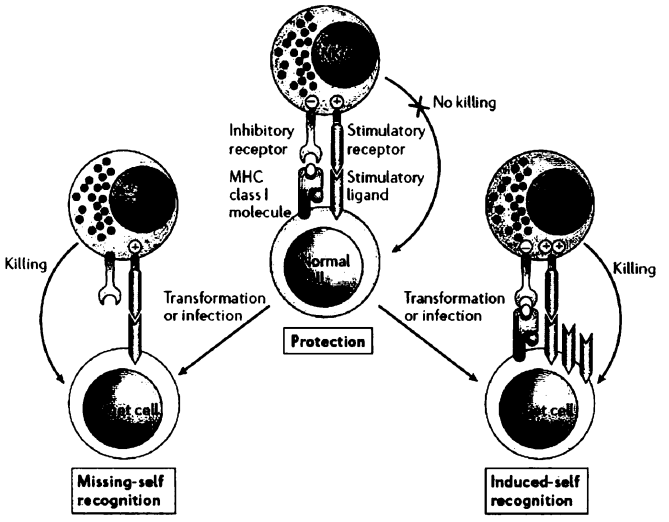
Zvláštní typ buněk představují NK-T lymfocyty. Tyto buňky mají receptor TCR (z angl. T-cell receptor) typu αβ, který je charakteristický pro povrch T-lymfocytů, ale zároveň na svém povrchu nesou celou řadu receptorů, které jsou typické pro NK buňky (například receptor NKR-P1A). NK-T lymfocyty jsou značně heterogenní ve fenotypové

charakterizaci i funkci. Tyto lymfocyty jsou například zdrojem cytokinů (například IFN-γ a IL-4) a mají regulační funkce [1, 9].

### 1.2.1. NK buněčné rozpoznávání

Mechanismus rozpoznávání abnormálních buněk vysvětluje „missing self" hypotéza [10]. Podle této hypotézy NK buňky rozeznávají buňky, které mají na svém povrchu abnormálně malé množství MHC molekul I. třídy (z angl. major histocompability complex). Funkcí MHC glykoproteinů je vázat peptidové fragmenty proteinů produkovaných buňkou (MHC I. třídy), případně buňkou pohlcených (MHC II. třídy). Lidské MHC molekuly se nazývají HLA (z angl. human leukocyte antigen), homologické myší molekuly H-2. Nádorové a i některé viry infikované buňky se brání napadení $T_C$- lymfocyty tím, že snižují povrchovou expresi MHC glykoproteinů I. třídy [1].

Po setkání NK buňky s jinou buňkou může dojít k aktivaci nebo inhibici NK buněčné činnosti, podle toho zda převáží stimulační nebo inhibiční signály. Pokud má buňka na svém povrchu normální množství MHC molekul I. třídy, dochází k převaze negativních signálů a NK buňka není aktivována. Má-li buňka abnormálně málo MHC glykoproteinů I. třídy, pak je cílová buňka NK buňkou cytotoxicky zabita. Cílová buňka však může být NK buňkou cytotoxicky zabita také, pokud se na jejím povrchu objeví zvýšené množství ligandů aktivačních receptorů – tzv. „induced self" hypotéza (obr. 1.2). Příkladem mohou být neklasické MHC glykoproteiny MICA, MICB a ULBP na stresovaných či virově infikovaných buňkách [1, 11].




**Obr. 1.2: Znázornění „missing self" a „induced self" hypotézy [11].**

### 1.2.2. Cytotoxické mechanismy NK buněk

Hlavním cytotoxickým nástrojem NK buněk jsou cytotoxické granule, ve kterých se nachází protein perforin a proteasy zvané granzymy. Poté co je rozpoznána abnormální buňka, dochází k migraci cytotoxických granulí k plazmatické membráně v místě kontaktu buněk, tyto granule fúzují s membránou a jejich obsah je uvolněn do úzké štěrbiny mezi buňkami. Perforin vytváří póry, kterými se do buňky dostanou granzymy. Ty štěpí v cytoplazmě prekurzory proteas ze skupiny tzv. kaspas, čímž dochází k jejich aktivaci. Kaspasy spustí sled reakcí, který končí apoptotickou smrtí buňky [1].

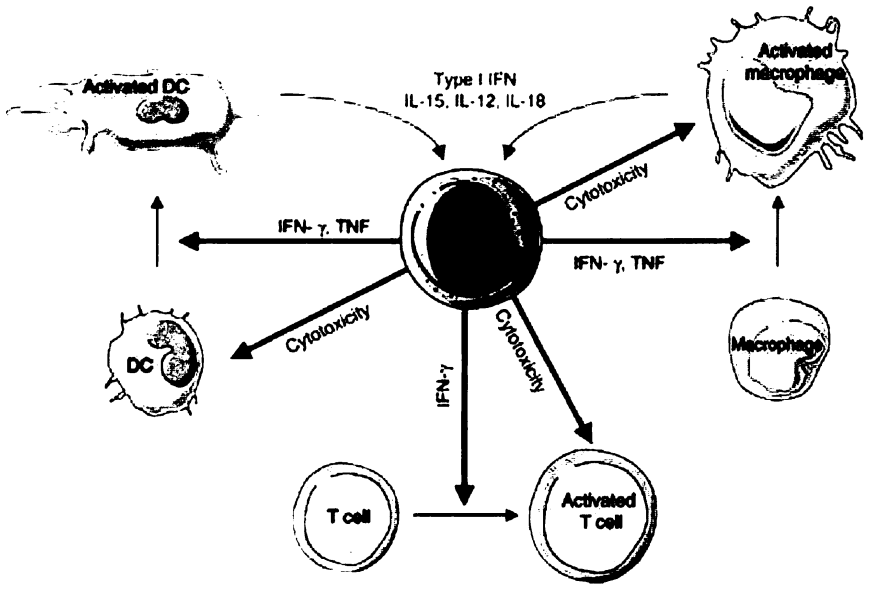
Druhým cytotoxickým mechanismem je Fas-Fas ligand cesta. Na povrchu NK buněk se nachází protein zvaný Fas-ligand. Fas-ligand patří do rodiny TNF (z angl. tumor necrosis factor), váže se na apoptotický receptor Fas (známý také jako CD95 či APO-1), který je přítomný na povrchu mnoha různých buněk. Signály se přenášejí přes receptor Fas do buňky, kaskádou reakcí dochází k apoptotické smrti buňky [1, 12].

Třetím cytotoxickým mechanismem je cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC, z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity). ADCC je zprostředkována specifickým receptorem NK buněk – FcγRIII, prostřednictvím tohoto receptoru se NK buňka váže na konstantní část protilátek třídy IgG. Navázání NK buňky na buňku opsonizovanou protilátkami třídy IgG způsobí agregaci receptorů a následně aktivaci cytotoxických mechanismů [1, 3].

### 1.2.3. Funkce NK buněk

NK buňky nemají úlohu jen v protinádorovém imunitním dohledu, ale hrají i roli v obraně proti některým virům. NK buňky se účastní časné fáze obrany proti virům, jejich aktivita je stimulována pomocí cytokinů IFN-α, IFN-β a IL-12. NK buňky kontrolují replikaci viru během doby, která je potřebná k aktivaci, proliferaci a diferenciaci prekurzorů cytotoxických T-lymfocytů na zralé efektorové buňky [13].

NK buňky hrají roli v regulačních mechanismech imunitního systému, jejich regulační funkce je zprostředkována především produkcí cytokinů (obr. 1.3, str. 14). NK buňky mají regulační vliv na řadu buněk organismu (například na dendritické buňky, T-lymfocyty, B-lymfocyty a endoteliální buňky) [14].




**Obr. 1.3: Regulační funkce NK buněk.** Po působení řady cytokinů (například IL-15, IL-12, IL-18, zelené šipky) mohou NK buňky působit na zrání a aktivaci dendritických buněk (DC), makrofágů a T-lymfocytů (červené šipky), regulace je umožněna produkcí cytokinů. NK buňky mohou také cytotoxicky zabíjet nezralé dendritické buňky, aktivované $CD4^+$ T-lymfocyty a hyperaktivované makrofágy (modré šipky) [14].

NK buňky hrají roli i v těhotenství, v děloze těhotných žen se nachází zvláštní podskupina NK buněk tzv. uNK buňky (z angl. uterine NK cells), které tvoří až 70 % přítomných lymfocytů a jsou tedy hlavní složkou v imunitní kontrole těhotenství. Tyto NK buňky se podílejí na remodelaci spirálních arterií v místě uhnízdění oplodněného vajíčka a na tvorbě placenty [14, 15].

NK buňky hrají roli při transplantaci hematopoetických kmenových buněk - podporují tzv. přihojení. Výzkumy dále naznačují, že NK buňky hrají roli při kontrole infekcí způsobených parazity (*Plasmodium falciparum, Toxoplasma gondii, Trypanosoma cruzi, Leishmania major*), dále při kontrole HIV infekce, v regulaci autoimunitních reakcí, při orgánových transplantacích a také při astmatu [14].

## 1.3. Receptory NK buněk

NK buňky mají dva typy povrchových receptorů, a to receptory aktivační a inhibiční. Působení NK buněk je zprostředkované zapojením inhibičních a aktivačních signálů vysílaných povrchovými receptory po interakci s ligandem [1].

Aktivační receptory obsahují nejčastěji ve své transmembránové části aminokyseliny s pozitivně nabitým postranním řetězcem (lysin či arginin). Prostřednictvím

těchto aminokyselin aktivační receptory interagují s adaptorovými proteiny DAP10, DAP12, FcεRIγ a CD3ζ. Tyto adaptorové proteiny mají ve své transmembránové části kyselinu asparagovou, která je zapotřebí pro stabilní asociaci s receptory. Adaptorové proteiny DAP12, FcεRIγ a CD3ζ dále obsahují motiv ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Jedná se o sekvenci aminokyselin D/ExxYxxL/I oddělenou 6-8 aminokyselinami od sekvence YxxL/I, x označuje libovolnou aminokyselinu. Proteiny DAP12 a FcεRIγ obsahují jeden ITAM motiv, zatímco CD3ζ má tyto motivy tři. Interakce ligandu s aktivačním receptorem způsobí přenos signálu, dojde k fosforylaci tyrosinů v ITAM motivu prostřednictvím kinas z rodiny Src a následně k aktivaci protein tyrosin kinas Syk a ZAP-70 [16, 17]. Molekula DAP10 neobsahuje v cytoplazmatické doméně motiv ITAM, ale krátkou signalizační sekvenci YxxM. Po navázání ligandu dochází k fosforylaci YxxM motivu a aktivaci p85 podjednotky fosfatidylinositol-3-kinasy [18]. Mezi aktivační receptory patří například lidské receptory KIR2DS2, NKG2C-CD94, které vysílají signály skrze asociaci s adaptorovou molekulou DAP12, dále například receptor NKG2D asociující s proteinem DAP10, receptor CD16 asociující s FcεRIγ a/nebo CD3ζ [17]. Mezi aktivační receptory se dále řadí skupina receptorů zodpovědných za spontánní cytotoxicitu NK buněk tzv. NCR (z angl. natural cytotoxicity receptors). Mezi NCR patří NKp46 a NKp30, které asociují s FcεRIγ a/nebo CD3ζ, dále NKp44 asociující s adaptorovým proteinem DAP12 [19, 20].

Inhibiční receptory obsahují motiv ITIM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Tento motiv (V/IxYxxL/V) se vyskytuje v cytoplazmatické doméně těchto receptorů v jedné nebo více kopiích. Motiv ITIM byl nalezen u všech inhibičních receptorů NK buněk a na mnoha dalších receptorech exprimovaných na hematopoetických buňkách. Po vazbě ligandu na receptor dochází k fosforylaci tyrosinu v ITIM motivu kinasou Src rodiny. Na ITIM sekvenci se váže protein tyrosin fosfatasa 1 (SHP1) a další fosfatasy jako SHP2 a SHIP (inositol polyfosfát 5' fosfatasa) v závislosti na zkoumaném receptoru. Zapojením fosfatas SHP1 a SHP2 dochází ke snížení fosforylace různých intracelulárních signálních proteinů například FcεRIγ, Syk, fosfolipasa C γ, Vav1. Funkcí SHIP je defosforylovat fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát [21]. Mezi inhibiční receptory patří například některé myší receptory rodiny Ly-49, lidské receptory KIR2DL či KIR3DL, CD94-NKG2A [22].

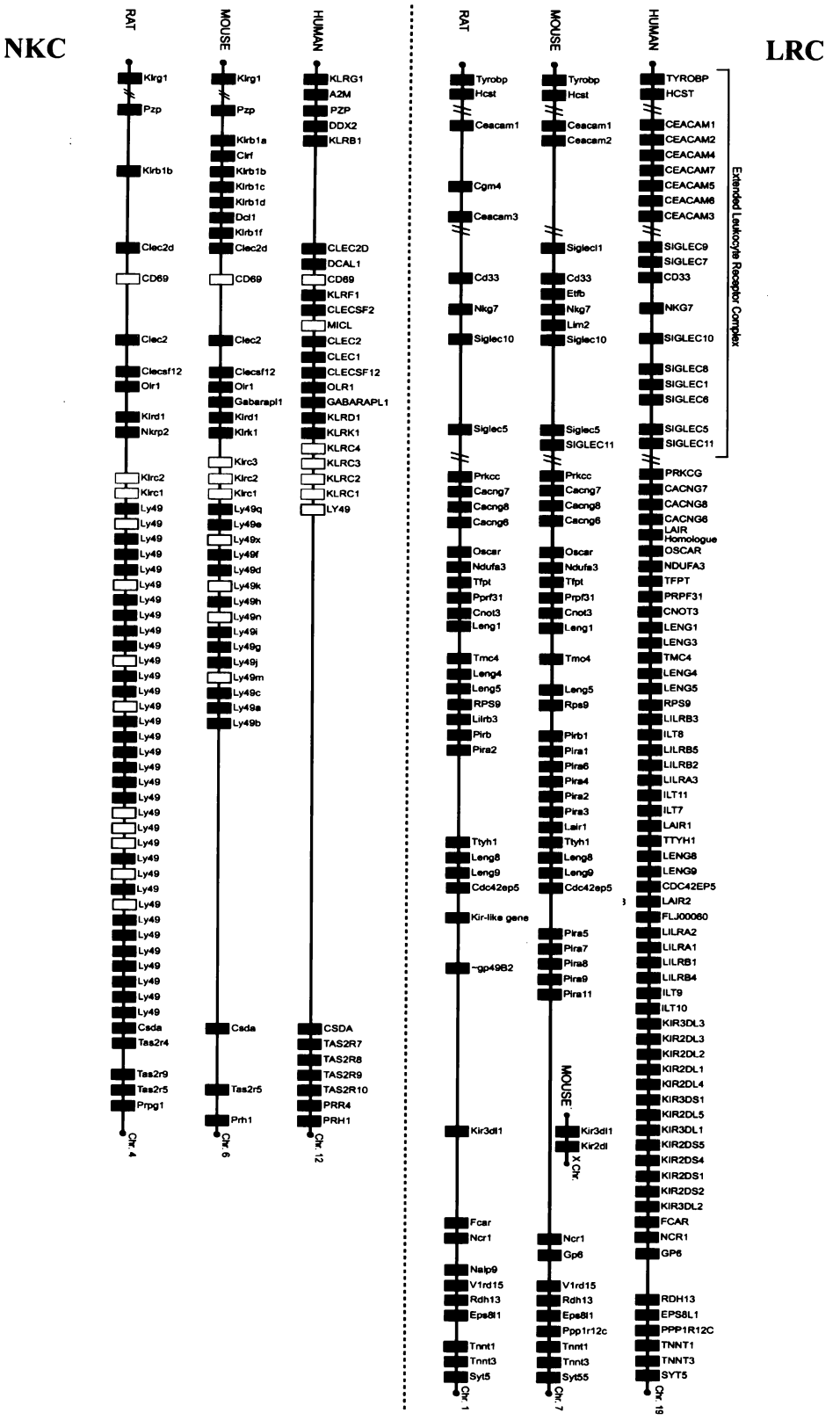
### 1.3.1. Geny kódující receptory NK buněk

Receptory NK buněk jsou kódovány geny lokalizovánými ve dvou odlišných regionech: NK genovém komplexu (NKC, z angl. natural killer complex) a komplexu receptorů leukocytů (LCR, z angl. leukocyte-receptor complex). NKC kóduje lektinové receptory C-typu. NKC byl poprvé definován Yokohamou a kol. jako skupinu genů na myším chromosomu 6, geny NKC se dále nacházejí u potkanů na chromosomu 4 a u lidí na chromosomu 12p12-13. LRC kóduje receptory imunoglobulinové superrodiny, geny LRC se nacházejí u myší na chromosomu 7, u potkanů na chromosomu 1 a u lidí na chromosomu 19q13.4 [23, 24]. Lineární srovnání NKC a LRC genů u myši, potkana a člověka je uvedeno na str. 17 obr. 1.4. Receptory NK buněk tedy dle struktury dělíme do dvou skupin: imunoglobulinové a C-lektinové.

### 1.3.2. Receptory imunoglobulinové superrodiny

Mezi receptory imunoglobulinové superrodiny patří například lidské receptory LILR (z angl. leukocyte Ig-like receptors, tyto receptory jsou také označovány jako LIR či ILT), receptory LAIR (z angl. leukocyte-associated Ig-like receptors), ale především se sem řadí receptory KIR (z angl. killer Ig-like receptor) [24]. Tyto receptory jsou u člověka kódovány LCR komplexem, který se nachází na 19. chromosomu.

Receptory KIR jsou transmembránové proteiny I. typu, jsou charakterizovány počtem imunoglobulinových domén, KIR2D obsahují dvě domény imunoglobulinového typu (označené jako D1, D2), zatímco KIR3D mají tyto domény tři (označené jako D0, D1, D2). Receptory KIR jsou dále charakterizovány délkou cytoplazmatické domény. Receptory KIR s dlouhou cytoplazmatickou doménou (KIR2DL nebo KIR3DL) obsahují ITIM motiv a jsou zodpovědné za inhibiční funkci těchto molekul, receptory s krátkou cytoplazmatickou doménou (KIR2DS nebo KIR3DS) tento motiv nemají a vysílají aktivační signály skrze asociaci adaptorové signální molekuly DAP12 a nabitého transmembránového úseku. Některé receptory KIR mají specifické ligandy, kterými jsou klasické molekuly HLA-A, HLA-B, HLA-C. Byl však objeven i ligand HLA-G pro receptor KIR2DL4, který patří mezi neklasické MHC molekuly I. třídy [22, 25, 26].




**Obr. 1.4: Lineární srovnání NKC a LRC genů u myši, potkana a člověka.** Obrázek není v přesném měřítku. Barvy naznačují geny příbuzné genovou organizací, strukturou a fylogenezí. Šedá barva odpovídá genům, které nekódují receptory NK buněk. Bílá barva odpovídá pseudogenům. Lomítko reprezentuje velké vzdálenosti. Geny označené otazníkem odpovídají genům, jejichž specifická pozice v odpovídajícím chromosomu není známá. Gen s označením X není homologní s geny v jeho vertikální pozici [24].

### 1.3.3. Receptory C-lektinového typu

Lektiny C-typu (a jejich podskupina C-lektinových receptorů NK buněk) jsou významnou rodinou lektinů.

Lektiny jsou proteiny nebo glykoproteiny neimunoglobulinové a neenzymové povahy, které mají schopnost specificky vázat sacharidy beze změny jejich struktury [27,28]. První lektin byl izolován na konci 19. století ze semen skočce obecného (*Ricinus communis*), tento lektin byl pojmenován ricin. Název lektin pochází z latinského slova *legere* (vybrat, zvolit si), toto označení zavedl Boyd a Shapleigh v roce 1954 na základě schopnosti lektinů specificky aglutinovat (shlukovat, srážet) erytrocyty odlišných krevních skupin. Lektiny můžeme najít u mnoha organismů: u virů, bakterií, rostlin a živočichů [29]. Vlastní sacharidová vazebná aktivita je lokalizována pouze v části polypeptidového řetězce lektinu – v globulárním proteinovém modulu, tento modul byl nazván jako sacharid rozpoznávající doména (CRD, z angl. carbohydrate-recognition domain). Živočišné lektiny lze na základě strukturní odlišnosti jejich CRD domén rozdělit na několik podskupin zahrnujících kalnexin, lektiny L-typu a P-typu, které jsou ve většině případů lokalizovány intracelulárně. Mezi další podskupiny patří lektiny C-typu, I-typu, R-typu a galektiny, které jsou lokalizovány v plazmatické membráně nebo sekretovány do extracelulárního prostoru.Výše uvedený výčet skupin není kompletní a nezahrnuje některé další skupiny [30]. V imunitním systému má interakce lektin-sacharid řadu důležitých funkcí (rozpoznání a neutralizace patogenů, přirozené zabíjení různých buněčných cílů, atd.) [27].

Lektiny C-typu jsou nejvíce rozšířenou skupinou živočišných lektinů, jejich název (z angl. Calcium-type lectins) pochází ze skutečnosti, že jejich vazebná aktivita je závislá na přítomnosti vápenatých iontů [27, 31]. Na základě homologie aminokyselinové sekvence byly lektiny C-typu rozděleny do 7 skupin [27, 32]:

I. Proteoglykany
II. Transmembránové receptory II. typu
III. Kolektiny
IV. Selektiny
V. Receptory NK buněk
VI. Mannosové receptory makrofágů
VII. Volné sacharid vázající domény

Klasifikace byla dále v roce 2002 doplněna o dalších 7 skupin zahrnujících například IX. Tetranektiny, X. Polycystin 1 a XI. Attraktiny [32]. Velikost CRD domény lektinů C-typu je asi 130 aminokyselin, 18 aminokyselin je vysoce konzervovaných a pozice 14 aminokyselin je invariantní, tato doména se skládá ze dvou α-helixů, tří antiparalelních β-listů a smyček neuspořádané struktury [27, 28, 33].

Pátou skupinu lektinů C-typu představují receptory NK buněk. Jsou to transmembránové proteiny II. typu (mají C-konec extracelulární a N-konec je lokalizován v cytoplazmě). Lektinové receptory C-typu jsou na povrchu buněk prezentovány jako kovalentně (disulfidicky) vázané dimery [1, 34]. Nejčastěji jsou to homodimery, je však znám i heterodimer molekul NKG2 a CD94 [35]. Jejich struktura kromě C-terminální domény, ve které se zpravidla nachází šest cysteinových zbytků tvořících disulfidové můstky, dále obsahuje krček variabilní délky, transmembránovou část a doménu intracelulární [34]. Intracelulární část je zodpovědná za signalizaci, v závislosti na peptidovém motivu v intracelulární části mohou tyto proteiny asociovat s protein tyrosin kinasami, protein fosfatasami nebo s různými adaptorovými proteiny. Skupina C-lektinových receptorů NK buněk od ostatních skupin C-lektinů odlišuje v aminokyselinových sekvencích CRD a to i absencí některých konzervovaných aminokyselin klíčových pro vazbu vápníku. C-terminální doména těchto receptorů se nazývá NK buněčná doména (NKD, z angl. natural killer domain), tato doména tvoří podskupinu CTLD domén (z angl. C-type lectin-like domain). Druhou podskupinu CTLD domén reprezentuje CRD doména, která je doménou klasických lektinů C-typu. CTLD i NKD domény jsou evolučně uzpůsobeny tak, aby vyhovovaly velkému množství strukturně odlišných potenciálních ligandů. Ligandy pro CRD domény jsou pouze sacharidy a vápník [27, 36].

Mezi významné rodiny receptorů C-lektinového typu patří rodina receptorů NKR-P1, Ly-49, NKG2 a také rodina receptorů strukturně podobných molekule CD69 [34].

### 1.3.3.1. Rodina receptorů Ly-49

Rodina receptorů Ly-49 byla nejlépe charakterizována u myši, kde ji kóduje nejméně 16 genů a pseudogenů. Receptor Ly-49A byl prvním inhibičním receptorem specifickým pro MHC glykoproteiny I. třídy, který byl definován na molekulární úrovni. Ly-49A je prototypickým členem rodiny, která kóduje transmembránové glykoproteiny II. typu, tyto receptory jsou exprimovány na NK buňkách a paměťových T-lymfocytech.

Tato rodina receptorů zahrnuje inhibiční i aktivační varianty receptorů. Ligandy pro většinu inhibičních receptorů jsou klasické MHC molekuly I. třídy – myší H-2 molekuly. Aby tyto molekuly mohly být rozpoznány a navázány, je vyžadována přítomnost peptidu v rýze H-2 molekuly [21, 34]. Receptory Ly-49D a Ly-49H obsahují ve své transmembránové části pozitivně nabitý arginin, který umožňuje interakci s adaptorovým proteinem DAP12 obsahujícím motiv ITAM. Za absence molekuly DAP12 nebyly tyto receptory stabilně exprimovány na buněčném povrchu [37]. Aktivační receptory vážou klasické MHC molekuly I. třídy se značně nižší afinitou. Některé studie naznačují, že ligandy pro některé aktivační receptory Ly-49 by mohly být odlišné od klasických MHC molekul I. třídy [38]. Mezi nejvýznamnější inhibiční varianty patří receptory Ly-49A, Ly-49C a Ly-49I, inhibiční receptory nesou ve své cytoplazmatické části motiv ITIM. Tyto receptory byly nalezeny také u potkanů, u kterých bylo objeveno více než 26 členů. U člověka byl nalezen jeden gen známý jako Ly-49L, který je sice přepisován, ale zdá se, že díky bodové mutaci kóduje nefunkční molekulu [21, 34, 38]. Receptory Ly-49 u hlodavců, ačkoliv strukturně odlišné, jsou běžně vnímány jako funkční homology lidských receptorů KIR. K tomuto předpokladu vedla podobná specifita pro ligandy, přítomnost aktivačních i inhibičních variant, blízké signální dráhy u myších a potkaních Ly-49 receptorů a lidských KIR receptorů. Identifikace KIR homologních molekul u myší (KIR3DL1 a KIRL2) a potkanů (KIR3DL1) tomuto názoru neodpovídá. Doposud získané důkazy však nejsou dostatečné pro pochopení funkční role KIR receptorů u hlodavců, tato problematika bude vyžadovat další zkoumání [38].

### 1.3.3.2. Rodina receptorů NKG2

Také rodina receptorů NKG2 je tvořena jak aktivačními tak inhibičními variantami. Receptory NKG2 byly poprvé identifikovány u člověka, dále byly nalezeny u myší a potkanů. Aby došlo k jejich expresi na buněčném povrchu a mohla být plněna jejich funkce, musí tyto receptory dimerizovat s molekulou CD94 (výjimku tvoří receptor NKG2D). Molekula CD94 patřící také mezi receptory C-lektinového typu má krátkou cytoplazmatickou část a neobsahuje žádnou známou signální sekvenci. Lidské receptory NKG2A a NKG2B (sestřihová varianta NKG2A) fungují, díky přítomnosti ITIM motivu, jako inhibiční receptory. Molekuly NKG2C, E a H ( NKG2H je opět sestřihovou variantou NKG2E) fungují jako aktivační receptory skrze asociaci s adaptorovou molekulou DAP12.

Receptor NKG2F obsahuje oproti ostatním receptorům této rodiny neobvyklé prvky: nabitý transmembránový zbytek a cytoplazmatickou doménu obsahující sekvenci podobnou ITIM a naopak neobsahuje CTLD [21, 34]. Myší receptory CD94-NKG2A, C, E rozeznávají neklasické MHC glykoproteiny I.třídy – $Qa1^b$ [39, 40]. Lidské receptory CD94-NKG2A, B, C rozeznávají neklasické MHC glykoproteiny I.třídy – HLA-E [41].

Aktivační receptor NKG2D tvoří oproti ostatním zástupcům této rodiny disulfidicky vázané homodimery. U myší rozeznáváme dvě izoformy tohoto receptoru, které se odlišují délkou cytoplazmatické domény. Kratší forma receptoru NKG2D může asociovat s adaptorovým proteinem DAP12, delší forma s tímto adaptorem neinteraguje. Obě formy pak mohou asociovat s adaptorovou molekulou DAP10. U lidí se kratší forma nevyskytuje a asociace probíhá skrze molekulu DAP10. Ligandy receptoru NKG2D patří do skupiny molekul strukturně podobných MHC glykoproteinům I. třídy, které však ztratily schopnost vázat peptidy či jiné malé antigenní fragmenty: MICA, MICB a ULBP1 až ULBP4, RAET1G u lidí a Rae1α až Rae1ε, H60 a MULT1 u myší [42].

### 1.3.3.3. Rodina receptorů příbuzných s molekulou CD69

Mezi další receptory kódované NK genovým komplexem patří lidské receptory LLT1 (z angl. lectin-like transcript), AICL (z angl. activation-induced C-type lectin) a myší Clr (z angl. C-lectin related protein) [43, 44, 45]. Tyto molekuly tvoří další rodinu receptorů, která je strukturně podobná molekule CD69 [34]. Tento receptor patří mezi první molekuly exprimované během aktivace NK buněk, T-lymfocytů a dalších buněk hematopoetického původu [46]. Fyziologická funkce receptoru CD69 není zatím zcela objasněna [34]. Poměrně nedávno bylo prokázáno, že zástupci rodiny receptorů příbuzných s molekulou CD69 interagují s receptory C-lektinového typu – receptor AICL s molekulou NKp80 (též nazývaná KLRF1) [47] a LLT1 a Clr molekuly s receptory z rodiny NKR-P1 (bude popsáno níže).

### 1.3.3.4. Rodina receptorů NKR-P1

Do skupiny receptorů C-lektinového typu patří také rodina receptorů NKR-P1. Mezi tyto receptory patří i rNKR-P1A studovaný v této práci. Proteiny NKR-P1

(z angl. natural killer receptor-protein 1) jsou označovány také jako CD161 (z angl. cluster of differentation) či jako KLRB1 (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1). Receptory NKR-P1 jsou exprimovány jako disulfidicky vázané homodimery na povrchu většiny NK buněk a podskupiny T buněk, receptor NKR-P1 nalézáme také na lidských monocytech a též na lidských a potkaních dendritických buňkách [22, 48, 49]. Tyto receptory byly identifikovány u myší, potkanů a člověka [34], homology těchto receptorů byly nalezeny také u skotu [50]. V roce 2005 byl identifikován pravděpodobně první nesavčí receptor NK buněk – kuřecí receptor B-NK, který je homologní s lidským receptorem NKR-P1A [51].

Na myších NK buňkách se vyskytuje pět receptorů z rodiny NKR-P1. Receptory NKR-P1A, C, F patří mezi aktivační receptory, obsahují nabitý transmembránový úsek, který je důležitý pro asociaci s adaptorovým proteinem FcεRIγ. Inhibiční receptory NKR-P1B a NKR-P1D ve své cytoplazmatické doméně obsahují motiv ITIM [34]. U potkanů byly identifikovány tři proteiny patřící do této rodiny, NKR-P1A a dva receptory s odlišnými sekvencemi, které jsou v GenBank uvedeny pod označením NKR-P1B, respektive U56936 a X97477. U56936 na rozdíl od X97477 obsahuje ITIM motiv. Sekvence X97477 byla označena jako NKR-P1D [52, 53]. Doposud byl nalezen pouze jeden lidský homolog, který nese označení NKR-P1A, porovnáním aminokyselinového složení lidského receptoru NKR-P1A s myšími a potkaními receptory NKR-P1 byla zjištěna 46 % homologie [54]. U všech hlodavčích receptorů NKR-P1 se nachází CxCP motiv, který byl také nalezen v cytoplazmatické doméně CD4 a CD8 receptorů, kde interaguje s protein tyrosin kinasou rodiny Src – $p56^{lck}$. Lidský receptor NKR-P1A tento motiv neobsahuje [22]. Campbell a Giorda dokázali, že $p56^{lck}$ asociuje s potkaním receptorem NKR-P1A [55]. Dále bylo prokázáno, že také myší receptory NKR-P1B a NKR-P1C asociují s $p56^{lck}$, a že tato asociace je nezbytná pro spuštění následné signální kaskády [56].

V letech 2003-2004 byly identifikovány fyziologické ligandy pro některé myší receptory NKR-P1, jedná se o již zmiňované molekuly Clr. Inhibiční receptory NKR-P1B a NKR-P1D rozeznávají protein Clr-b, zatímco NKR-P1F rozeznává Clr-g [57, 58]. Receptory Clr se řadí do skupiny C-lektinových receptorů kódovaných NKC. Molekula Clr-b je exprimována téměř na všech buňkách hematopoetického původu, výjimku tvoří erytrocyty. Molekula Clr-g je preferenčně exprimována na NK buňkách [45, 58] . Alternativním názvem pro molekulu Clr-b je Ocil (z angl. osteoclast inhibitory lectin), Clr-g je známá pod označením Ocilrp2. Tyto názvy vychází z možné role při kontrole osteoklastogeneze,

resp. inhibice tvorby osteoklastů [59]. Na základě identifikace těchto ligandů byl definován ligand pro lidský receptor NKR-P1A. Je jím receptor LLT1 exprimovaný na NK, T a B buňkách, který vykazuje 43 až 48 % homologii aminokyselinové sekvence s proteiny Clr [60, 61]. Bylo prokázáno, že protein LLT1 se specificky váže na receptor NKR-P1A, tato interakce je zajímavá, neboť spouští opačné signály v T a NK buňkách, ačkoliv se jedná o stejné proteiny v obou typech buněk. V případě NK buněk se jednalo o snížení jejich cytotoxicity a produkce IFN-γ, naopak produkce IFN-γ se u T-lymfocytů zvýšila. Způsob, kterým je umožněna rozdílná funkce receptoru NKR-P1A na T a NK buňkách, zůstává doposud záhadou [60]. Identifikace ligandů ze skupiny C-lektinových receptorů pro zástupce rodiny NKR-P1 ukazuje na důležitou roli těchto receptorů v imunitním systému. Interakce mezi těmito molekulami jsou unikátní – nezávislé na MHC glykoproteinech I. třídy [59]. Fyziologické ligandy pro ostatní receptory rodiny NKR-P1 dosud nebyly nalezeny.

## 1.4. rNKR-P1A

Do výše popsané rodiny receptorů NKR-P1 patří také receptor studovaný v této práci – rNKR-P1A. Molekula rNKR-P1A byla identifikována na povrchu potkaních NK buněk prostřednictvím monoklonální protilátky 3.2.3 již v roce 1989 [62]. Receptor rNKR-P1A je transmembránový protein II. typu, na povrchu buněk je prezentován jako disulfidicky vázaný homodimer o velikosti 60 kDa [63]. rNKR-P1A je exprimovaný na povrchu potkaních NK buněk, NK-T buněk a na dendritických buňkách [49,64]. Receptor rNKR-P1A je kódován NK genovým komplexem, gen pro tento receptor se nachází na 4. chromomosomu (4q42). V databázi GenBank můžeme nukleotidovou sekvenci receptoru rNKR-P1A nalézt pod označením M62891.

Jako zástupce superrodiny receptorů C-lektinového typu vykazuje i jejich strukturu, která byla popsána v odstavci 1.3.3. Celková velikost molekuly rNKR-P1A je 223 aminokyselin. Lektinová doména tohoto receptoru obsahuje dvě disulfidové vazby mezi $Cys_{122}$ a $Cys_{210}$ resp. $Cys_{189}$ a $Cys_{202}$, které korespondují s CRD doménou klasických C-lektinů [65]. Některé CRD domény nazývané pak jako „dlouhé“ obsahují další dva disulfidicky vázané cysteinové zbytky blíže N-terminální části [66]. Třetí disulfidová vazba mezi $Cys_{94}$ a $Cys_{105}$ lektinovou doménu tohoto receptoru řadí mezi „dlouhou“ doménu [67]. Krček obsahuje cystein ($Cys_{75}$), který je zodpovědný za dimerizaci tohoto receptoru

prostřednictvím tvorby interdisulfidové vazby, na dimerizaci se podílejí i tři cysteiny nacházející se v C-terminální části [68].

Funkčními studiemi bylo dokázáno, že receptor rNKR-P1A patří mezi aktivační receptory NK buněk. Navázání monoklonální protilátky 3.2.3 indukovovalo tvorbu inositolfosfátů, zvýšení intracelulární koncentrace vápníku, následně degranulaci a cytotoxicitu NK buněk [69]. Pro objasnění role receptoru rNKR-P1A v procesu přirozeného zabíjení Ryan a kol. použil mutantní linii NK buněk, která neexprimovala na svém povrchu proteiny NKR-P1A. Pozoroval, že tato linie nemá schopnost zabíjet některé nádorové buňky. Po reexpresi receptoru rNKR-P1A byla schopnost zabíjet nádorové buňky obnovena [70]. Signalizační dráha, kterou receptor rNKR-P1A spouští cytotoxickou aktivitu NK buněk, ještě není dostatečně prozkoumána, byla prokázána asociace s protein tyrosin kinasou rodiny Src – $p56^{lck}$ (viz výše) [55].

Studie tohoto receptoru se zabývají jeho molekulární stavbou a vazebnými vlastnostmi, jsou vyhledávány sacharidové ligandy pro tento receptor a zkoumána je také vazba vápníku. Počáteční biochemické studie týkající se vazby vápníku ukazovaly, že vápník je nezbytný pro správné sbalení proteinu in vitro. Po renaturaci proteinu se ukázalo, že vápník je nedílnou součástí jeho lektinové domény, tato vazba se navíc vyznačovala neobvyklou pevností, vápník nebylo možné odstranit ani chelatačními činidly [68]. Jiné studie vykonané pracovní skupinou v Harrow tento názor vyvracejí, protein rNKR-P1A se podařilo poskládat i bez přítomnosti $Ca^{2+}$. Tyto výsledky naopak naznačují, že lektinová doména tohoto receptoru vázat $Ca^{2+}$ nebude [67].

Identifikace ligandů receptoru rNKR-P1A je nezbytná pro pochopení toho, jak tento protein participuje na aktivaci NK buněčné činnosti. Doposud byla objevena celá řada sacharidových ligandů, jedná se o acetylované hexosaminy: N-acetyl-D-mannosamin, N-acetyl-D-galaktosamin a N-acetyl-D-glukosamin. Afinita některých oligosacharidů založených na N-acetylhexosaminech se významně zvýšila v porovnání s monosacharidy. Maximální afinity bylo dosaženo na úrovni chitotetraosy. Modifikací těchto chitooligomerních sekvencí na redukujícím i neredukujícím konci byly identifikovány silné neutrální sacharidové ligandy: disacharid GalNAcβ1→4ManNAc a trisacharid GalNAcβ1→4GlcNAcβ1→4ManNAc. Mimo tyto sacharidové struktury byly objeveny vysoce afinitní ligandy obsahující oligosacharidové motivy krevních skupin, gangliosidů a glykosaminoglykanů. Preinkubace nádorových buněk s liposomy nesoucí tyto sacharidové ligandy pro receptor rNKR-P1A může výrazně zvýšit zabíjení těchto buněk.

Tyto přirozené ligandy mají však řadu nevýhod, příkladem je omezená dostupnost, nízká stabilita a vysoká cena. Výzkum byl zaměřen na sloučeniny kombinující monosacharidovou strukturu se syntetickou (polyamidoaminovou nebo polylysinovou) kostrou. V počátečních experimentech s těmito sacharidovými dendrimery se ukázalo, že jsou účinnými ligandy pro receptor rNKR-P1A in vitro. U těchto sacharidových dendrimerů byla prokázána účinnost v experimentálních nádorových terapiích [27]. Fyziologický ligand receptoru rNKR-P1A zůstává stále neznámý, stejně jako trojrozměrná struktura tohoto receptoru.

Protein rNKR-P1A patří v Laboratoři architektury proteinů MBÚ AV ČR mezi nejdéle studované receptory lektinového typu. Již dříve zde byl připraven konstrukt zahrnující část extracelulární domény tohoto receptoru ($Glu_{81}$-$Lys_{215}$). Příprava tohoto rekombinantního proteinu v dostatečném množství i čistotě však nebyla reprodukovatelná. Na základě studie vykonané pracovní skupinou v Harrow [67] byl navržen nový konstrukt odpovídající samotné CTLD doméně. Tento konstrukt odpovídá aminokyselinovému rozmezí $Ala_{90}$-$Lys_{215}$ a nese pracovní označení srNKR-P1A (short rat NKR-P1A). Příprava rekombinantního proteinu srNKR-P1A a jeho studium je úkolem této diplomové práce.

# 2. Cíl práce

- příprava expresního vektoru kódující část extracelulární domény proteinu rNKR-P1A v rozmezí aminokyselin $Ala_{90}$ až $Lys_{215}$

- rekombinantní příprava, renaturace a purifikace proteinu srNKR-P1A

- ověření správnosti připraveného proteinu

- charakterizace proteinu srNKR-P1A pomocí různých fyzikálně chemických metod

- provedení vazebných testů proteinu srNKR-P1A

# 3. Materiál

## 3.1. Přístroje a pomůcky

| | |
|---|---|
| • Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I | *Beckman Coulter,* USA |
| • Analytické váhy | *AND,* USA |
| • Automatické pipety | *Gilson,* USA |
| • Automatický sekvenátor Procise 491 | *Applied Biosystems,* USA |
| • Centrifuga Allegra X-22R | *Beckman Coulter,* USA |
| • Centrifuga K 70D | *MLW,* Německo |
| • Centrifuga MPW-375 | *Mechanika Precyzyjna,* Polsko |
| • Centrifuga VSMC-13 | *Shelton scientific,* USA |
| • Centrifuga Z 233 MK-2 | *Hermle,* Německo |
| • Čtečka destiček – SAFIRE | *TECAN,* Rakousko |
| • Detektor Microbeta 1450 Trilux | *Wallac,* Finsko |
| • Dialyzační membrána (10000 Da) | *Sigma-Aldrich,* USA |
| • Filtry PVDF 0,22 μm | *Sigma-Aldrich,* USA |
| • HPLC systém ÄKTAbasic | *Amersham Biosciences,* Švédsko |
| • JETQUICK Gel Extraction Spin Kit | *Genomed,* Německo |
| • JETQUICK Plasmid Purification Spin Kit | *Genomed,* Německo |
| • JETSPIN Plasmid Midiprep Kit | *Genomed,* Německo |
| • Kolona SOURCE 15Q 4.6/100 PE | *Amersham Biosciences,* Švédsko |
| • Kolona Superdex 200 10/300 GL | *GE Healthcare,* Švédsko |
| • Kolona Superformance plněná Q Sepharosou FF | *Götec-Labortechnik,* Německo |
| • Koncentrátory Amicon Ultra | *Millipore,* USA |
| • Luminescentní analyzátor LAS-1000 CH | *Fuji photo film,* Japonsko |
| • Magnetická míchačka MM 2A | *Lab.přístroje Praha,* ČR |
| • pH metr Φ 200 | *Beckman,* USA |
| • Předvážky HF-1200 G | *AND,* USA |
| • Rentgenový film MEDIX XBU | *Foma,* ČR |
| • Rotační vakuová odparka | *Trigon,* Francie |
| • Souprava pro agarosovou elektroforézu | *Sigma,* USA |

- Souprava pro elektropřenos — *Biometra,* Německo
- Souprava pro filtraci za sníženého tlaku — *Sigma-Aldrich,* USA
- Souprava pro SDS-PAGE — *Bio-Rad,* Německo
- Spektrofotometr DU-70 — *Beckman,* USA
- Termocykler — *Eppendorf,* Německo
- Termostat BT 120M — *Lab.přístroje Praha,* ČR
- Třepačka — *VELP Scientifica,* Itálie
- Ultrazvuková sonda Sonoplus HD 3100 — *Bandelin,* Německo
- Ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30H — *Elma,* Německo
- UV lampa UVGL-58 — *Science Company,* USA
- Vortexový mixér — *VELP Scientifica,* Itálie
- Zdroj napětí BM 551 — *Tesla,* ČR

## 3.2. Chemikálie

*Všechny použité chemikálie byly minimálně čistoty p.a.*

- Agar — *Oxoid,* Anglie
- Agarosa — *Jersey Lab Supply,* USA
- Akrylamid — *Sigma,* USA
- Ampicilin — *Biotika,* SR
- APS — *Serva,* USA
- L-Arginin hydrochlorid — *Serva,* USA
- Azid sodný — *Serva,* USA
- Bromfenolová modř — *Lachema, ČR*
- BSA — *New England Biolabs,* USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250 — *Serva,* USA
- Cystamin — *Sigma,* USA
- Cysteamin — *Sigma,* USA
- Činidlo dle Bradfordové — *Bio-Rad,* Německo
- DMSO — *Jersey Lab Supply,* USA
- dNTP — *Fermentas,* Kanada
- DTT — *Serva,* USA
- EDTA — *Jersey Lab Supply,* USA
- Ethidiumbromid — *Jersey Lab Supply,* USA

- Glycin — *Fluka,* Švýcarsko
- Guanidin hydrochlorid — *Jersey Lab Supply,* USA
- HEPES — *Serva,* USA
- Chloramfenikol — *Jersey Lab Supply,* USA
- IPTG — *Sigma,* USA
- Kanamycin — *Serva,* USA
- Kvasničný extrakt — *Imuna Pharm*, ČR
- 2-merkaptoethanol — *Sigma,* USA
- $Na^{125}I$ — *Lacomed,* ČR
- NHS-fluorescein — *Pierce,* USA
- N,N'-methylen-bis-akrylamid — *Sigma,* USA
- Pepstatin — *Serva,* USA
- PMSF — *Sigma,* USA
- SDS — *Jersey Lab Supply,* USA
- Q Sepharosa FF — *Amersham Biosciences,* Švédsko
- Scintilační roztok — *Amersham Biosciences,* Švédsko
- Sephadex G-15 — *Pharmacia,* Švédsko
- Standard pro agarosovou elektroforézu — *New England Biolabs,* USA
- Standard pro SDS-PAGE — *Serva,* USA
- TEMED — *Serva,* USA
- Tetracyklin — *Lab scientific,* USA
- Tris — *Serva,* USA
- Trypton — *Oxoid*, Anglie
- Ustalovač — *Kodak,* USA
- Vývojka — *Kodak,* USA
- X-gal — *Serva,* USA
- Ostatní běžné chemikálie — *Lachema,* ČR

Sacharidy používané při vazebných experimentech byly obdrženy od Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc.

### 3.2.1. Enzymy

- BamH I (20000 U/ml) — *New England Biolabs,* USA

- Deep Vent DNA polymerasa (2000 U/ml) *New England Biolabs,* USA
- DNAasa I (100 U/μl) *Sigma,* USA
- EcoR I (20000 U/ml) *New England Biolabs,* USA
- Hind III (20000 U/ml) *New England Biolabs,* USA
- Lysozym *Fluka,* Švýcarsko
- Nde I (20000 U/ml) *New England Biolabs,* USA
- RNAasa A (10 mg/ml) *Serva,* USA
- Sma I (20000 U/ml) *New England Biolabs,* USA
- T4 DNA ligasa (1000 U/μl) *Fermentas,* Kanada
- Xba I (20000 U/ml) *New England Biolabs,* USA

### 3.2.2. Bakteriální kmeny

- *E. coli*: XL1-BLUE *E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI*$^q$*ZΔM15 Tn10* (Tet$^r$)] *Stratagene,* USA
- *E. coli*: NovaBlue *E. coli endA1 hsdR17*($r_{K12}^-$ $m_{K12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F '[proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*$^q$ *ZΔM15 ::Tn10] (Tet*$^R$*)* *Novagen,* USA
- *E. coli*: BL21-CodonPlus(DE3)RIPL *E. coli* B F$^-$ *ompT hsdS*($r_B^-$ $m_B^-$) *dcm*$^+$ Tet$^r$ *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU proL*Cam$^r$] [*argU ileY leuW* Strep/Spec$^r$] *Stratagene,* USA

### 3.2.3. Vektory

pBluescript SK+ (1 μg/μl) *Stratagene,* USA
pET-30a(+) (1 μg/μl) *Novagen,* USA
pRSET B (1 μg/μl) *Invitrogen,* USA

### 3.2.4. Primery pro PCR

- Reverzní primer pRSET BRE*62B2 *Invitrogen,* USA

5′ TAG TTA TTG CTC AGC GGT GGC AGC 3′

- Přímý primer *415T1 RM2 PRBFW *Generi Biotech,* ČR

5′- ACATATGGCTAAGTTAAAGTGCCCAAAAGAC - 3′

### 3.2.5. Roztoky a média

- **LB agar:** 1,5 % agar v LB médiu
- **LB médium:** 1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH = 7,4

- použité koncentrace antibiotik:

ampicilin 150 μg/ml (zásobní koncentrace 150 mg/ml)

chloramfenikol 35 μg/ml (zásobní koncentrace 100 mg/ml)

kanamycin 50 μg/ml (zásobní koncentrace 50 mg/ml)

tetracyklin 12,5 μg/ml (zásobní koncentrace 5 mg/ml)

- **EP pufr:** 10 mM Tris (pH = 8,0), 1 mM EDTA, 15 % sacharosa, 2 mg/ml lysozym, 0,2 mg/ml RNAasa, 0,1 mg/ml BSA
- **Pufr pro T4 DNA ligasu** – 1 x koncentrovaný: 50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μg/ml BSA, pH = 7,5 (*Fermentas,* Kanada)
- **NEB2 pufr** – 1 x koncentrovaný: 10 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH = 7,9 (*New England Biolabs,* USA)
- **Pufr pro EcoR I** – 1 x koncentrovaný: 100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,025 % Triton X-100, pH = 7,5 (*New England Biolabs,* USA)
- **PCR pufr** – Thermo pol, 1 x koncentrovaný: 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris, 2 mM $MgSO_4$, 0,1 % Triton X-100, pH = 8,8 (*New England Biolabs,* USA)
- **Roztok L1:** $NaClO_4$, octan sodný, TBE (*Genomed,* Německo)
- **Roztok L2:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris (*Genomed,* Německo)
- **Roztok G1, F1:** 50 mM Tris (pH = 8,0), 10 mM EDTA, 100 μg/ml RNAasa A (*Genomed,* Německo)
- **Roztok G2, F2:** 200 mM NaOH, 1 % SDS (*Genomed,* Německo)
- **Roztok G3, F3:** guanidin hydrochlorid, octan sodný (*Genomed,* Německo)
- **Roztok GX:** guanidin hydrochlorid (*Genomed,* Německo)
- **Roztok G4, F4:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris (*Genomed,* Německo)
- **Pufr pro agarosovou elektroforézu** – TAE pufr, 1 x koncentrovaný: 40 mM Tris, 20 mM $CH_3COOH$, 1 mM EDTA
- **STOP pufr:** 30 % glycerol, bromfenolová modř, TE pufr
- **TE pufr:** 10 mM Tris, 0,5 mM EDTA, pH = 8,0
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující** – 2 x koncentrovaný: 100 mM Tris, 20 % glycerol, 4 % SDS, 0,2 % bromfenolová modř, 100 mM DTT, pH = 6,8

- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující** – 2 x koncentrovaný: 100 mM Tris, 20 % glycerol, 4 % SDS, 0,2 % bromfenolová modř, pH = 6,8
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE** – 10 x koncentrovaný: 3 % Tris, 14,4 % glycin, 1 % SDS, pH = 8,3
- **AA:** 30 % akrylamid, 1 % N,N'-methylen-bis-akrylamid
- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,25 % CBB R-250
- **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35 % ethanol, 10 % $CH_3COOH$
- **TES pufr:** 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 8,0
- **Guanidinový pufr:** 6 M guanidin.HCl, 100 mM Tris, 1 mM $NaN_3$, pH = 8,3
- **Renaturační pufr:** 1 M arginin.HCl, 100 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris, 3 mM cystamin, 9 mM cysteamin, 1 mM $NaN_3$, pH = 9,0
- **Dialyzační pufr:** 15 mM Tris, 9 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 9,0
- **Pufr A pro ionexovou chromatografii I:** 20 mM Tris, 10 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 9,0
- **Pufr B pro ionexovou chromatografii I:** 20 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 9,0
- **Pufr pro gelovou chromatografii**: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 8,0
- **Pufr A pro ionexovou chromatografii II:** 50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 7,5
- **Pufr B pro ionexovou chromatografii II:** 50 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 10 mM $NaN_3$, pH = 7,5
- **Pufr pro elektropřenos:** 25 mM Tris, 192 mM glycin, pH = 8,3
- **Odbarvovací roztok pro PVDF membrány:** 45 % methanol, 10 % $CH_3COOH$
- **TBS + C pufr:** 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$, 10 mM $CaCl_2$, pH = 7,4
- **PBS pufr:** 10 mM $Na_2HPO_4$, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM $KH_2PO_4$, pH = 7,4

# 4. Metody

## 4.1. Příprava expresního vektoru [71]

### 4.1.1. PCR

Byla připravena reakční směs pro PCR, která obsahovala 29,5 µl $ddH_2O$, 1,5 µl 100 mM $MgSO_4$, 5 µl PCR pufru (10 x koncentrovaný), 1,5 µl 10 mM dNTP, 5 µl 5 µM přímého primeru *415T1 RM2 PRBFW, 5 µl 5 µM reverzního primeru pRSET BRE*62B2, 1 µl templátu, 0,5 µl Deep Vent DNA polymerasy. PCR proběhla v termocykleru. Program pro PCR byl nastaven následovně:

1) 94°C 2 min
2) 35 cyklů: 94°C – 30 s, 52°C – 30 s, 72°C – 60 s
3) 72°C 10 min

Po těchto krocích se teplota snížila na 4°C, až do té doby než byl produkt z termocykleru vyjmut. PCR byla provedena dvakrát kvůli získání dostatečného množství PCR produktu. Výsledný produkt PCR byl detekován pomocí agarosové elektroforézy. K 5 µl PCR produktu byly přidány 3 µl STOP pufru.

### 4.1.2. Agarosová gelová elektroforéza

Gel pro agarosovou elektroforézu byl připraven rozpuštěním 0,5 g agarosy ve 40 ml TAE pufru, tato směs byla povařena a po zchladnutí asi na 50°C byly přidány 2 µl ethidiumbromidu o koncentraci 10 mg/ml. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické aparatury s TAE pufrem a do jednotlivých jamek byly napipetovány analyzované vzorky a standard. Elektroforéza byla vždy, pokud není uvedeno jinak, ponechána probíhat 30 min při 120 V. K vizualizaci DNA byla využita fluorescence komplexu DNA a interkalovaného ethidiumbromidu po ozáření UV lampou.

### 4.1.3. Extrakce DNA směsí fenol/chloroform a precipitace DNA

Zbylý PCR produkt byl extrahován stejným objemem směsi fenolu a chloroformu (1 : 1), směs byla promíchána 30 s na vortexovém mixéru a odstředěna při 12000 x g 5 min. Horní vrstva byla odebrána, k této vrstvě byl přidán stejný objem směsi chloroformu/isoamylalkoholu (49 : 1), směs byla promíchána na vortexovém mixéru a odstředěna při 12000 x g po dobu 5 min. Opět byla odebrána horní vrstva, ke které byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 násobek objemu 100 % ethanolu. Roztok byl promíchán a uložen na 30 min do mrazícího boxu, -20°C. Poté byla provedena centrifugace při 12000 x g, 0°C, 5 min, supernatant byl odstraněn, peleta byla opláchnuta 70 % ethanolem a ponechána vyschnout v rotační vakuové odparce. Peleta byla rozpuštěna v 10 µl $ddH_2O$.

### 4.1.4. Ligace do vektoru pBluescript SK+

K ligaci produktu PCR do vektoru pBluescript SK+ byla použita T4 DNA ligasa. Ligační směs byla připravena z 6 µl $ddH_2O$, 1 µl ligačního pufru (10 x koncentrovaný), 1 µl plasmidu (c = 1 µg/µl), 1 µl PCR produktu, 0,5 µl T4 DNA ligasy a 0,5 µl enzymu Sma I. Ligační pufr byl připraven smísením 1 dílu pufru pro T4 DNA ligasu a 4 dílů NEB2 pufru. Ligace byla ponechána probíhat při laboratorní teplotě přes noc.

### 4.1.5. Transformace bakterií

Pro transformaci bakterií bylo využito metody tepelného šoku. Kompetentní buňky *E. coli* kmen XL1-BLUE uchovávané při -80°C byly ponechány roztát na ledu. K 200 µl těchto buněk byla přidána ligační směs. Směs byla inkubována 30 min na ledu. Poté byla směs ponořena na 50 s do vodní lázně o teplotě 42°C a ihned uložena na led. Po 1 min byl přidán 1 ml sterilního LB média a směs byla ponechána inkubovat 1 hod při 37°C. Po ukončení inkubace byla směs odstředěna při 1500 x g 2 min, bylo ponecháno přibližně 100 µl supernatantu, v němž byly pelety resuspendovány. Poté byly naneseny na Petriho misku obsahující LB agar, do kterého byly přidány antibiotika (ampicilin a tetracyklin), X-gal (rozpuštěn v DMSO, finální koncentrace 90 µg/ml) a IPTG (finální koncentrace

0,1 mM). Bakterie byly ponechány inkubovat při 37°C 17 hod. Misky s vyrostlými koloniemi byly uchovávány při 4°C v chladničce.

### 4.1.6. Selekce klonů

Třináct bílých kolonií bylo naočkováno do 5 ml LB média s příslušnými antibiotiky a ponecháno třepat rychlostí 200 ot./min při 37°C přes noc. Bakteriální kultury byly uloženy v chladničce při 4°C. Byl odebrán 1 ml kultury, odstředěn při 12000 x g 5 min. Pelety byly resuspendovány pomocí vortexového mixéru ve 30 µl EP pufru (z angl. easy prep), suspenze byly ponechány 10 min na ledu a 5 min povařeny. Suspenze byly odstředěny (3 min, 12000 x g). K 10 µl supernatantu bylo přidáno 1,2 µl pufru pro EcoR I (10 x koncentrovaný), 0,5 µl enzymu EcoR I a 0,5 µl enzymu BamH I. Roztoky byly ponechány inkubovat 0,5 hod při 37°C, poté k nim byly přidány 3 µl STOP pufru. Vzorky byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Byly vybrány buněčné klony s plasmidy obsahujícími insert.

### 4.1.7. Izolace plasmidové DNA

Vybraná bakteriální kultura byla odstředěna (12000 x g, 2 min), z pelety byla izolována DNA pomocí komerčně dodávané soupravy JETQUICK Plasmid Purification Spin Kit. K peletě bylo přidáno 250 µl roztoku G1, peleta byla resuspendována pomocí pipety. K suspenzi bylo přidáno 250 µl roztoku G2, směs byla opatrně promíchána a ponechána inkubovat 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 350 µl roztoku G3, směs byla opět opatrně promíchána a odstředěna při 12000 x g po dobu 10 min. Supernatant byl převeden do kolonky uložené v mikrozkumavce, odstředěn při 12000 x g 1 min. Do kolonky bylo dále přidáno 500 µl roztoku GX, roztok byl odstředěn 1 min při 12000 x g. Poté bylo do kolonky napipetováno 500 µl roztoku G4 a odstředěno 1 min při 12000 x g. Na závěr bylo přidáno 50 µl $ddH_2O$, odstředěno 1 min při 12000 x g. Supernatant byl uchováván při -20°C.

Kontrolní restrikční štěpení bylo provedeno s dvojicí enzymů EcoR I, BamH I. Byl připraven roztok obsahující 0,5 µl uvedených enzymů, 1 µl pufru pro EcoR I (10 x koncentrovaný) a 8 µl plasmidu, následovala inkubace 1 hod při 37°C. Po inkubaci byly přidány 3 µl STOP pufru a vzorek byl analyzován pomocí agarosové elektroforézy.

### 4.1.8. Příprava insertu a linearizovaného plasmidu pET-30a(+)

Insert pro následnou ligaci byl připraven následovně, k 20 µl plasmidové DNA (viz odstavec 4.1.7.) byly přidány 3 µl enzymu Nde I, 3 µl NEB2 pufru (10 x koncentrovaný) a 2,5 µl $ddH_2O$. Směs byla ponechána inkubovat při 37°C přes noc, poté bylo přidáno 1,5 µl enzymu Hind III a ponecháno inkubovat 3 hod při 37°C. Plasmid byl linearizován analogickým postupem, k 5 µl plasmidu pET-30a(+) o c = 1 µg/µl, bylo napipetováno 1,5 µl NEB2 pufru (10 x koncentrovaný), 1 µl enzymu Nde I, 1 µl enzymu Hind III a 6,5 µl $ddH_2O$.

### 4.1.9. Preparativní elektroforéza

K 15 µl linearizovaného plasmidu pET-30a(+) bylo přidáno 5 µl STOP pufru, 10 µl pufru bylo také přidáno ke 30 µl insertu. Takto připravené vzorky byly naneseny do jamek agarosového gelu. Elektroforéza byla ponechána probíhat po dobu 30 min nejdříve při 40 V, poté bylo napětí zvýšeno na 80 V. Výsledky byly detekovány pod dlouhovlnnou UV lampou, byla vyříznuta část gelu obsahující linearizovaný plasmid a insert.

### 4.1.10. Extrakce DNA z gelu

Extrakce DNA z gelu pomocí soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit byla provedena dle instrukcí od výrobce. K vyříznutým vzorkům gelu bylo přidáno 900 µl roztoku L1 a vzorky byly ponechány inkubovat při 50°C 15 min. Vzorky byly napipetovány do příslušných kolonek vložených v mikrozkumavce a byla provedena centrifugace (12000 x g, 1 min). Následně byly kolonky promyty 500 µl roztoku L2 a opět byla provedena centrifugace (12000 x g, 1 min). Vzorky DNA byly vymyty 50 µl $ddH_2O$ a odstředěny při 12000 x g 2 min. Získaná DNA odpovídající insertu byla vysrážena pomocí ethanolu, postup viz 4.1.3. Získaná peleta byla rozpuštěna ve 20 µl $ddH_2O$.

### 4.1.11. Ligace do vektoru pET-30a(+)

Ligační směs byla tvořena 2 µl $ddH_2O$, 1,5 µl pufru pro DNA ligasu (10 x koncentrovaný), 1 µl linearizovaného plasmidu, 10 µl insertu, 0,5 µl T4 DNA ligasy. Ligace byla ponechána probíhat při laboratorní teplotě přes noc. Po ligaci následovala transformace, která byla provedena dle protokolu v odstavci 4.1.5. Byly použity kompetentní buňky *E. coli* kmen NovaBlue. Resuspendované pelety byly naneseny na Petriho misku obsahující LB agar, kanamycin a tetracyklin. Bakterie byly ponechány inkubovat při 37°C 17 hod. Dvanáct kolonií bylo naočkováno do 2 ml LB média s příslušnými antibiotiky a ponecháno třepat rychlostí 200 ot./min při 37°C přes noc. Následovala rychlá izolace plasmidové DNA dle postupu v odstavci 4.1.6. Zbylé bakteriální kultury byly uchovávány v chladničce, 4°C. Kontrolní restrikce probíhaly s enzymy Xba I a Hind III. K 8 µl supernatantu byl přidán 1 µl pufru NEB2 (10 x koncentrovaný), 0,5 µl enzymu Xba I, 0,5 µl enzymu Hind III a 0,1 µl BSA (100 x koncentrovaný). Roztoky byly ponechány inkubovat 0,5 hod při 37°C, poté k nim byly přidány 3 µl STOP pufru. Vzorky byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy.

### 4.1.12. Příprava zásobního množství plasmidu

1 ml uschované kultury (viz odstavec 4.1.11.) byl zaočkován do 100 ml LB média s příslušnými antibiotiky a směs byla ponechána třepat rychlostí 200 ot./min při 37°C přes noc. Při přípravě zásobního množství bylo využito komerčně dodávané soupravy JETSPIN Plasmid Midiprep Kit od firmy Genomed. Bylo postupováno dle návodu od výrobce. Nejdříve byla bakteriální kultura odstředěna při 3600 x g 10 min, supernatant byl odstraněn. Peleta byla resuspendována v 6 ml roztoku F1, poté bylo přidáno 6 ml roztoku F2 a směs byla inkubována 5 min za laboratorní teploty. Po ukončení inkubace bylo přidáno 8 ml roztoku F3 a směs byla odstředěna při 12000 x g 15 min. Poté byl supernatant převeden do kolonky vložené v 50 ml polypropylenové zkumavce a byla provedena centrifugace 5000 x g 2 min. Následně bylo do kolonky přidáno 15 ml roztoku F4, byla provedena centrifugace 5000 x g 2 min. Pro odstranění zbytkového roztoku F4 byla opět provedena centrifugace 5000 x g 5 min. Kolonka byla převedena do čisté 50 ml polypropylenové zkumavky, byly přidány 4 ml $ddH_2O$ a byla provedena centrifugace 5000 x g, 2 min. Získaná DNA byla vysrážena pomocí ethanolu, postup viz odstavec

4.1.3., peleta byla rozpuštěna ve 100 µl $ddH_2O$. Zásobní roztok plasmidu s pracovním označením pETNKRA byl uchováván v mrazícím boxu při -20°C. Byly provedeny kontrolní restrikce s dvojicí enzymů Xba I a Hind III, reakční směs byla složena z 1 µl plasmidu, 1 µl pufru NEB2 (10 x koncentrovaný), 0,5 µl enzymu Xba I, 0,5 µl enzymu Hind III a 0,1 µl BSA (100 x koncentrovaný). Roztoky byly ponechány inkubovat 0,5 hod při 37°C, poté k nim byly přidány 3 µl STOP pufru. Vzorky byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy.

### 4.1.13. Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace a čistota DNA byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance roztoku při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Na výpočet koncentrace DNA byl použit empirický vztah, dle kterého má roztok dvouřetězcové DNA o koncentraci 50 µg/ml absorbanci rovnou 1. Měření absorbance bylo použito i ke stanovení čistoty DNA. Pro čistou DNA je poměr $A_{260}/A_{280}$ roven přibližně 1,8. Na měření byl roztok 200 x naředěn $ddH_2O$.

### 4.1.14. Sekvenování DNA

Sekvenace získaného plasmidu pETNKRA o koncentaci 1 µg/µl byla provedena Dr. Jürgenem Felsbergem, CSc. na MBÚ AV ČR pomocí automatického sekvenátoru ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems,* USA).

## 4.2. Příprava proteinu

### 4.2.1. Transformace bakterií

Prvním krokem při přípravě rekombinantního proteinu byla transformace bakterií, pro kterou bylo využito metody tepelného šoku. Kompetentní buňky *E. coli* kmen BL21-CodonPlus(DE3)RIPL uchovávané při -80°C byly nechány roztát na ledu. K 200 µl těchto buněk byl přidán 1 µl plasmidu pETNKRA (c = 1 µg/µl). Směs byla inkubována 30 min na ledu. Poté byla směs ponořena na 45 s do vodní lázně o teplotě 42°C a ihned

uložena na led. Po 1 min byl přidán 1 ml sterilního LB média a směs byla ponechána inkubovat 1 hod při 37°C. Po ukončení inkubace byla směs odstředěna při 1500 x g 2 min, bylo ponecháno přibližně 100 µl supernatantu, v němž byla peleta resuspendována. Poté byla suspenze nanesena na Petriho misku obsahující tuhé LB médium, kanamycin, chloramfenikol a tetracyklin. Bakterie byly ponechány inkubovat při 37°C 17 hod. Miska s vyrostlými koloniemi byla uchovávána při 4°C v chladničce.

### 4.2.2. Selekce produkčního klonu

Čtyři kolonie byly zaočkovány do 3 ml LB média s příslušnými antibiotiky. Zkumavky byly ponechány třepat rychlostí 220 ot./min při 37°C do prvního viditelného zákalu. Poté byl z každé zkumavky odebrán 2 x 1 ml kultury do připravených sterilních zkumavek a zbytek kultury byl uchováván v chladničce při 4°C pro následnou velkoobjemovou produkci proteinu. Do jedné poloviny zkumavek byl přidán induktor IPTG do výsledné koncentrace 1 mM, do druhé poloviny zkumavek nebyl přidán žádný induktor. Kultury byly ponechány třepat rychlostí 220 ot./min při 28°C po dobu 6 hod. Následně byly bakteriální kultury odstředěny 22000 x g, 2 min při laboratorní teplotě, supernatant byl odstraněn. Analýza byla provedena pomocí SDS-PAGE.

### 4.2.3. SDS-PAGE

Vzorky pro SDS-PAGE byly připravovány následovně: pevné vzorky (pelety z bakteriálních kultur či malý kousek pelety inkluzních tělísek) byly připraveny resuspendováním ve 200 µl redukujícího vzorkového pufru a kapalné vzorky byly připraveny smísením s 2 x koncentrovaným vzorkovým pufrem (redukujícím či neredukujícím) v poměru 1 : 1. Následně byly vzorky 5 min povařeny a odstředěny 2 min, 22000 x g při laboratorní teplotě. Takto připravené vzorky se nanášely na gel společně s 5 µg standardu. 15 % spodní gel byl připraven napipetováním 1,8 ml destilované $H_2O$, 4 ml 30 % AA, 2 ml 1,5 M Tris o pH = 8,8, 80 µl 10 % SDS, 80 µl 10 % APS a 4 µl TEMED. Zaostřovací gel byl připraven smísením 1,4 ml destilované $H_2O$, 0,5 ml 30 % AA, 0,25 ml 1 M roztoku Tris o pH = 6,8, 20 µl 10 % SDS, 20 µl 10 % APS a 3 µl TEMED. Množství jsou vždy uvedena pro 2 gely. Elektroforéza byla ponechána probíhat

při 200 V po dobu 50 min. Po skončení elektroforézy byly gely barveny 10 min v barvicí lázni a následně odbarveny v odbarvovací lázni do úplného odbarvení pozadí gelu [72].

### 4.2.4. Velkoobjemová produkce proteinu

Velkoobjemová produkce byla prováděna ve 2 l Erlenmeyerových baňkách: 0,5 l sterilního LB média s příslušnými antibiotiky bylo zaočkováno 0,5 ml uschované bakteriální kultury (viz odstavec 4.2.2.). Kultura byla ponechána narůst do OD (absorbance při 550 nm) = 0,8 za třepání 220 ot./min, 37°C. Poté byla teplota snížena na 28°C a byl přidán induktor IPTG do výsledné koncentrace 0,5 mM. Produkce probíhala 6 hod při 28°C za třepání, 220 ot./min. Bakteriální kultura byla odstředěna v 1 l kyvetách po dobu 20 min, 3000 x g, 4°C. Pelety z 1 l bakteriální kultury byly resuspendovány ve 20 ml TES pufru, přeneseny do 30 ml polypropylenových kyvet a odstředěny 20 min, 19600 x g, 4°C. Pelety byly uchovávány při -20°C. Analýza byla provedena pomocí SDS-PAGE. Na analýzu byl odebrán 1 ml kultury před indukcí a 1 ml kultury po ukončení produkce.

### 4.2.5. Izolace inkluzních tělísek

K bakteriálním peletám ( z 1 l kultury) bylo přidáno 20 ml pufru o složení 0,3 M NaCl, 50 mM Tris, 1 mM $NaN_3$, pH = 8,0, dále 20 µl 1mM pepstatinu, 200 µl 100 mM PMSF a 16 µl 2-merkaptoethanolu, pelety byly resuspendovány pomocí vortexového mixéru. Suspenze byla zmrazena (-80°C, 20 min). Po rozmrazení v sonikační lázni bylo přidáno 20 mg lysozymu, 2,2 ml 1 M $MgCl_2$, 8 µl DNAasy I (100 U/µl) a 22 µl RNAasy A (10 mg/ml). Po 15 min inkubaci za laboratorní teploty byla provedena sonikace sonikační sondou 5 x 30 s vždy s 30 s přestávkou na ledu. Směs byla odstředěna 15 min, 10500 x g, 4°C. Pelety byly resuspendovány ve stejném pufru s inhibitory proteas jako na počátku, pomocí sonikační sondy byla provedena sonikace 5 x 30 s vždy s 30 s přestávkou na ledu. Suspenze byla odstředěna 15 min, 10500 x g, 4°C. Získané pelety inkluzních tělísek byly uchovávány při -20°C. Kontrola byla provedena pomocí SDS-PAGE.

## 4.3. Renaturace proteinu

Inkluzní tělíska z 1 l bakteriální kultury byla rozpuštěna v 5 ml guanidinového pufru, dále byl přidán roztok DTT do výsledné koncentrace 100 mM. Tato směs byla inkubována při 40°C a po 1 hod odstředěna 30 min při 20000 x g. Supernatant byl po kapkách za míchání přidáván do renaturačního pufru s přídavkem inhibitorů proteas (PMSF do výsledné koncentrace 1 mM, pepstatin do výsledné koncentrace 1 μM) vychlazeného na 4°C. Roztok byl 1 hod ponechán mírně míchat při 4°C a poté byl převeden do dialyzační trubice a dialyzován proti 4 l dialyzačního pufru při 4°C 7 hod za mírného míchání. Druhá dialýza byla ponechána probíhat 12 hod za stejných podmínek.

## 4.4. Purifikace proteinu

### 4.4.1. Ionexová chromatografie I

Roztok po dialýze byl centrifugován 1 hod, 3900 x g, 4°C a poté přefiltrován přes filtrační papír za sníženého tlaku. Takto připravený roztok zrenaturovaného proteinu byl nanesen rychlostí 7 ml/min na kolonu Q Sepharosy FF. Kolona byla připojena na HPLC systém a promyta postupně destilovanou vodou, 1 M roztokem NaOH, destilovanou vodou, pufrem A, pufrem B a ekvilibrována pufrem A pro ionexovou chromatografii. Po nanesení veškerého množství proteinu byla kolona promyta pufrem A a následně byl spuštěn gradient do 100 % pufru B při průtoku 3 ml/min trvající 20 min. Manuálně byly jímány frakce, které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Kolona byla promyta 1 M NaOH, destilovanou vodou a 20 % ethanolem.

### 4.4.2. Gelová chromatografie

Po promytí HPLC systému destilovanou vodou byla při průtoku 0,5 ml/min připojena kolona Superdex 200 10/300 GL, která byla promyta destilovanou vodou, 1 M NaOH, vodou a pufrem pro gelovou chromatografii. Frakce z předcházející ionexové chromatografie obsahující protein byly zakoncentrovány pomocí koncentrátorů Amicon Ultra, s membránou propustnou pro molekuly o $M_r < 10000$, v centrifuze (3000 x g, 20°C)

na objem 200 µl. Takto připravený vzorek byl nastříknut na ekvilibrovanou kolonu. Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Kolona i systém byly po promytí uchovávány ve 20 % ethanolu.

### 4.4.3. Ionexová chromatografie II

Frakce z gelové chromatografie obsahující protein byla zředěna 10 x pufrem A pro ionexovou chromatografii II, tento vzorek byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu SOURCE 15Q 4.6/100 PE rychlostí 1 ml/min. Kolona byla připojena na HPLC systém a promyta postupně destilovanou vodou, 1 M NaOH, destilovanou vodou, pufrem A, pufrem B a na závěr pufrem A pro ionexovou chromatografii II. Po nanesení proteinu a promytí kolony pufrem A byl nastaven lineární gradient: 0-40 % B, 0,5 ml/min, 30 min. Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Kolona a HPLC systém byly promyty 20 % ethanolem, ve kterém byly uchovávány.

### 4.4.4. Stanovení koncentrace purifikovaného proteinu

Stanovení koncentrace purifikovaného proteinu bylo prováděno metodou dle Bradfordové. Stanovení bylo provedeno na 96 jamkové destičce. Byla sestrojena kalibrační řada pomocí roztoků BSA v rozmezí koncentrací 0-1 mg/ml. K 5 µl standardu BSA či stanovovaného vzorku bylo napipetováno 200 µl činidla dle Bradfordové, směs byla ponechána 5 min inkubovat za laboratorní teploty. Stanovení přibližné koncentrace proteinu bylo provedeno vizuálně porovnáním s kalibrační řadou [73].

## 4.5. Identifikace proteinu

### 4.5.1. Proteinové sekvenování

Stanovení deseti koncových aminokyselin od N-konce proteinu bylo prováděno na automatickém sekvenátoru Procise 491. Vzorek proteinu na SDS-PAGE byl připraven v duplikátu, rovněž i SDS-PAGE byla provedena duplikátně. Po ukončení elektroforézy byl jeden gel zpracován standardním způsobem, druhý gel určený pro elektropřenos

(tzv. metoda western blot) byl 20 minut inkubován v pufru pro elektropřenos. Do soupravy pro elektropřenos byly vloženy tři vrstvy filtračního papíru navlhčené pufrem pro elektropřenos, dále PVDF membrána, která byla 5 s namočena v methanolu, 2 min v destilované vodě a 5 min v pufru pro elektropřenos. Na membránu byl položen gel, který byl opět převrstven třemi vrstvami navlhčeného filtračního papíru. Elektropřenos byl prováděn 40 min při 4mA/cm$^2$ gelu. Membrána byla obarvena barvicím roztokem pro SDS-PAGE, odbarvena odbarvovacím roztokem pro PVDF membrány a vysušena. Proužek proteinu byl vyříznut a takto připravený vzorek byl analyzován na automatickém sekvenátoru [74].

### 4.5.2. Identifikace proteinu metodou peptidového mapování

Analýza hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF (BIFLEX II, *Bruker*, Německo) i příprava vzorku pro toto měření byla provedena Mgr. Hynkem Mrázkem na MBÚ AV ČR. Měření zahrnuje, stručně shrnuto, následující kroky. Příslušný proužek proteinu byl z polyakrylamidového gelu vyříznut a nakrájen na malé kostičky. Po odbarvení byl přidán roztok trypsinu, po inkubaci byly peptidy extrahovány a následně byl vzorek smíchán s matricí, nanesen na terčík a ponechán vykrystalizovat. Naměřené hodnoty m/z získaných peptidů byly vloženy do databáze Mascot a porovnány s peptidy známých proteinů [75].

### 4.5.3. Analýza vzorku pomocí ESI-FT-ICR hmotnostní spektrometrie

Pro analýzu bylo odebráno 10 μg proteinu srNKR-P1A z frakce po ionexové chromatografii II. Vzorek byl předán Mgr. P. Novákovi, Ph.D. z MBÚ AV ČR, který prováděl vlastní měření i interpretaci spektra. Vzorek proteinu byl před analýzou odsolen na koloně s reverzní fází (MicroTrap, *Michrom Bioresources*, USA).

## 4.6. Charakterizace proteinu

### 4.6.1. Dynamický rozptyl světla

Měření distribuce velikosti částic v roztoku proteinu srNKR-P1A pomocí dynamického rozptylu světla proběhlo na ÚMCH AV ČR pod vedením Ing. Petra Kolenka. Do křemenné kyvety bylo naneseno 20 µl roztoku proteinu o koncentraci c = 1 mg/ml v pufru o složení 20 mM Tris (pH = 8,0), 150 mM NaCl a 1 mM $NaN_3$. Měření proběhlo na přístroji Zetasizer Nano (*Malvern Instruments,* Anglie), ve kterém byl vzorek nejdříve ekvilibrován na teplotu 18°C. Pro potvrzení správnosti měření a reprodukovatelnosti získaných výsledků bylo měření čtyřikrát opakováno.

### 4.6.2. Analytická ultracentrifugace

*Příprava vzorku pro analytickou ultracentrifugaci :*

0,5 ml roztoku proteinu srNKR-P1A o c = 0,2 mg/ml v pufru o složení 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 7,5 bylo dialyzováno za míchání proti 0,5 l pufru o složení 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 8,0 po dobu 18 hod při 4°C. Poté byl roztok proteinu po dialýze zakoncentrován pomocí koncentrátorů Amicon Ultra v centrifuze (3000 x g, 20°C) na koncentraci 0,2 mg/ml. Pufr po dialýze byl uschován a následně byl použit jako reference.

*Metoda sedimentační rovnováhy:*

Měření bylo provedeno na analytické ultracentrifuze Proteomelab XL-I. Při této metodě byl použit roztok proteinu srNKR-P1A o třech koncentracích 0,2, 0,1 a 0,05 mg/ml. Do šestikomorové cely bylo vždy napipetováno 3 x 110 µl roztoku proteinu o uvedených koncentracích a 3 x 125 µl reference. Měření probíhalo při třech rychlostech 18000, 21000 a 24000 ot./min (rotor An-50 Ti, *Beckman Coulter*, USA) a při teplotě 20°C. Vyhodnocení měření provedl Mgr. Ondřej Vaněk.

*Metoda sedimentační rychlosti:*

Při této metodě byla využita dvoukomorová cela. Do jednoho sektoru bylo napipetováno 400 µl roztoku proteinu o c = 0,1 mg/ml, do druhého sektoru 400 µl reference. Měření probíhalo při rychlosti 47000 ot./min (rotor An-50 Ti, *Beckman Coulter*, USA) a při teplotě 20°C. Vyhodnocení měření provedl Mgr. Ondřej Vaněk.

### 4.6.3. Měření Ramanova rozptylu

Příprava vzorku pro DCDR měření zahrnovala převedení roztoku proteinu srNKR-P1A do čisté vody. 2 µl roztoku proteinu srNKR-P1A o c = 1,5 mg/ml v pufru o složení 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH = 7,5 byly dialyzovány proti $ddH_2O$. Na dialýzu byla použita nitrocelulósová membrána pro mikrodialýzu (0,025 µm, *Millipore*, USA). Dialýza byla ponechána probíhat 30 min za laboratorní teploty, poté byly odebrány 2 µl předialyzovaného roztoku proteinu a přeneseny na standardní DCDR destičku SpectRIM (*Tienta Sciences*, USA). Po vyschnutí roztoku proteinu za pokojové teploty (asi 20 min) byla snímána Ramanova spektra z viditelného kroužku proteinu za využití Ramanova mikroskopu LabRAM HR 800 (*Horiba Jobin Yvon*, USA) [76]. Laserový svazek He-Ne laseru (632,82 nm/ 20 mW) byl fokusován za využití objektivu mikroskopu s 50 x zvětšením do průměru přibližně 2 µm na kroužek vzorku. Svazek byl rozložen na mřížce (600 vrypů/mm) a snímán CCD detektorem chlazeným kapalným dusíkem (1024 x 256 pixelů). Měření bylo prováděno na Fyzikálním ústavu MFF UK, měření a vyhodnocení DCDR spekter bylo provedeno RNDr. Kateřinou Hofbauerovou, Ph.D. a RNDr. Vladimírem Kopeckým, Ph.D.

## 4.7. Vazebné experimenty

### 4.7.1. Vazebné experimenty s radioaktivně značeným proteinem

*Test vazby různých sacharidových struktur:*

Vzorky neoglykoproteinů a přirozených glykoproteinů byly naneseny na 10 % SDS-PAGE gel (5 µg na jamku, příprava je obdobná viz odstavec 4.2.3.). Po ukončení elektroforézy byl gel 10 minut inkubován v pufru pro elektropřenos. Podmínky elektropřenosu jsou popsány v kapitole 4.5.1., po ukončení elektropřenosu byla membrána obarvena barvicím roztokem pro SDS-PAGE, odbarvena odbarvovacím roztokem pro

PVDF membrány a po 2 hod blokována v 2 % roztoku BSA. Následně byl přidán protein srNKR-P1A značený pomocí $Na^{125}I$, značení prováděl Prof. K. Bezouška, DSc., membrána byla inkubována přes noc při 4°C. Poté byla membrána omyta 3 x 1 min pufrem TBS + C a vysušena. Výsledek byl detekován autoradiograficky (film vyvolán po 15 hod expozici).

*Saturační křivka:*

Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 µl BSA-chitobiosy (c = 10 µg/ml) v TBS + C pufru a destička byla ponechána inkubovat přes noc při 4°C. Poté byla BSA-chitobiosa odstraněna a destička promyta 3 x destilovanou vodou. Do jamek mikrotitrační destičky bylo dále napipetováno blokovací činidlo – 150 µl 2 % roztoku BSA. Po 2 hod inkubace při 4°C byl roztok BSA odstraněn a destička byla opět promyta 3 x destilovanou vodou. Do jamek bylo naneseno 100 µl radioaktivně značeného proteinu srNKR-P1A o šesti různých koncentracích – protein byl ředěn pufrem TBS + C tzv. trojkovou řadou. Destička byla ponechána inkubovat 2 hod při 4°C, po odstranění proteinu byla destička 3 x promyta pufrem TBS + C a ponechána vysušit přes noc při 37°C. Do jamek bylo dále přidáno 100 µl scintilačního roztoku a aktivita byla změřena scintilačním detektorem. Z naměřených hodnot byla sestrojena saturační křivka, měření probíhalo v duplikátech.

*Inhibiční vazebné experimenty:*

Mikrotitrační destičky byly pokryty 100 µl BSA-chitobiosy (c = 10 µg/ml) v TBS+C pufru na jamku a byly ponechány inkubovat přes noc při 4°C. Poté byla BSA-chitobiosa odstraněna a destičky promyty 3 x TBS + C pufrem. Do jamek mikrotitračních destiček bylo dále napipetováno blokovací činidlo – 150 µl 2 % roztoku BSA. Po 2 hod inkubace při 4°C byl roztok BSA odstraněn a destičky byly opět promyty TBS + C pufrem. Do jamek bylo naneseno 50 µl inhibitorů o výsledných koncentracích $1.10^{-5}$ – $1.10^{-10}$ mol/l a 50 µl radioaktivně značeného proteinu srNKR-P1A o koncentraci odpovídající 50 % saturaci ligandem. Destičky byly ponechány inkubovat 2 hod při 4°C, poté byly destičky 3 x promyty pufrem TBS + C a ponechány vysušit přes noc při 37°C. Do jamek bylo dále přidáno 100 µl scintilačního roztoku a destičky byly změřeny pomocí scintilačního detektoru. Měření probíhala v duplikátech. Po vypočtení % inhibice byla stanovena tzv. $IC_{50}$, což je molární koncentrace látky, která způsobí 50 % inhibici vazby proteinu na ligand. Procento inhibice bylo vypočteno dle vztahu:

$$\% \text{ inhibice} = 100 - \% \text{ vazby}$$

$$\% \text{ vazby} = [(A - A_{POZ})/(A_{MAX} - A_{POZ})] \times 100$$

A.....Aktivita naměřená u jednotlivých vzorků (Bq)

$A_{POZ}$.....Aktivita pozadí (Bq)

$A_{MAX}$.....Maximální naměřená aktivita (Bq)

## 4.7.2. Vazebné experimenty s fluorescenčně značeným proteinem

*Fluorescenční značení proteinu srNKR-P1A:*

Pro fluorescenční naznačení proteinu srNKR-P1A byl použit NHS-fluorescein. K 90 μg proteinu srNKR-P1A v pufru o složení 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 7,5 byl přidán 1 mg NHS-fluoresceinu (v 50 μl DMSO), reakční směs byla ponechána inkubovat při 40°C 1 hod. Nezreagovaný NHS-fluorescein byl odstraněn gelovou filtrací na kolonce plněné Sephadexem G-15.

*Přímé vazebné experimenty:*

Do jamek polystyrenové destičky, které byly pokryty různými BSA-sacharidovými konjugáty, bylo napipetováno 50 μl 2 % roztoku BSA v PBS pufru a destička byla ponechána inkubovat 2 hod při 4°C. Poté byla destička 3 x promyta PBS pufrem a do každé jamky bylo napipetováno 20 μl fluorescenčně značeného proteinu srNKR-P1A. Po 2 hod inkubaci byla destička promyta 3 x PBS pufrem a vysušena při 37°C. Následně byl protein disociován z vazby s ligandem za použití 0,1 M acetátového pufru (pH = 4,2) s obsahem 150 mM NaCl, 0,1 % oktyl-β-D-glukopyranosidu, 0,1 % Tritonu X-100 a 0,1 % 3-(benzyldimethylamonium)propansulfonátu. Disociace byla ponechána probíhat přes noc při 4°C. Dále byla změřena intenzita fluorescence odpovídající množství vázaného proteinu pomocí čtečky destiček Safire ($\lambda_{excitace}/\lambda_{emise}$ = 495/525 nm). Experiment byl proveden v duplikátu.

# 5. Výsledky

## 5.1. Příprava expresního vektoru

Prvním krokem při přípravě expresního vektoru byla polymerasová řetězová reakce. Jako templát pro PCR byl použit plasmid pRSET B, který obsahoval sekvenci kódující protein rNKR-P1A v rozmezí aminokyselin $Glu_{81}$ až $Lys_{215}$, tato sekvence je vyznačena modře a oranžově na obr. 5.1. Cílem bylo připravit takový expresní vektor, který by obsahoval insert o sekvenci kódující protein srNKR-P1A začínající $Ala_{90}$ a končící $Lys_{215}$, na obr. 5.1 znázorněno oranžově.

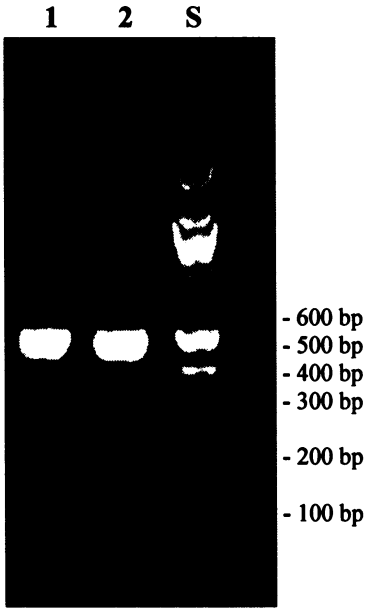
**MDTARVYLSLKPSKTAAGAQCVSPPSLPPDACRCPRSHRLALKLSCAGLILLV**
**LALVGMSILVRVLVQKPSVEPCRVLIQE[redacted]LSKTGSPAKLKCPKDWLSHRDKC**
**FHVSQTSITWKESLADCGGKGATLLLVQDQEELRFLR[redacted]LTKRISSSFWIGLSY**
**TLSDENWKWI[redacted]GSTLNSDVLSITGDTEKDSCASVSQDKVLSESCDSDNIWVCQ**
**KELKCECMC[redacted]DS**

**Obr. 5.1: Sekvence aminokyselin potkaního receptoru NKR-P1A. Zeleně** intracelulární část, **červeně** transmembránový úsek, **modře** sekvence obsažená v původním konstruktu rM1NKR-P1A, o kterou byl nový konstrukt zkrácen, oranžově nový konstrukt srNKR-P1A, **žlutě** cysteiny tvořící disulfidické můstky, [redacted] potenciální místa N-glykosylace.

Na amplifikaci požadovaného fragmentu DNA byly použity dva primery, přímý primer *415T1 RM2 PRBFW a univerzální reverzní primer pro vektor pRSET B s označením pRSET BRE*62B2. Tyto primery vymezují velikost PCR produktu. Správnost připraveného produktu PCR byla ověřena na základě porovnání se standardem pomocí agarosové elektroforézy, nachází se mezi fragmenty standardu o velikosti 400 a 500 bp, což odpovídá očekávané velikosti 450 bp (obr. 5.2, str. 49). Pro získání dostatečného množství produktu byla PCR provedena dvakrát. Produkt PCR byl dále extrahován směsí fenolu a chloroformu a následně zakoncentrován srážením pomocí ethanolu.

Po amplifikaci pomocí PCR následovala ligace PCR produktu do klonovacího vektoru pBluescript SK+. Tento plasmid obsahuje selekční marker, který je zodpovědný za

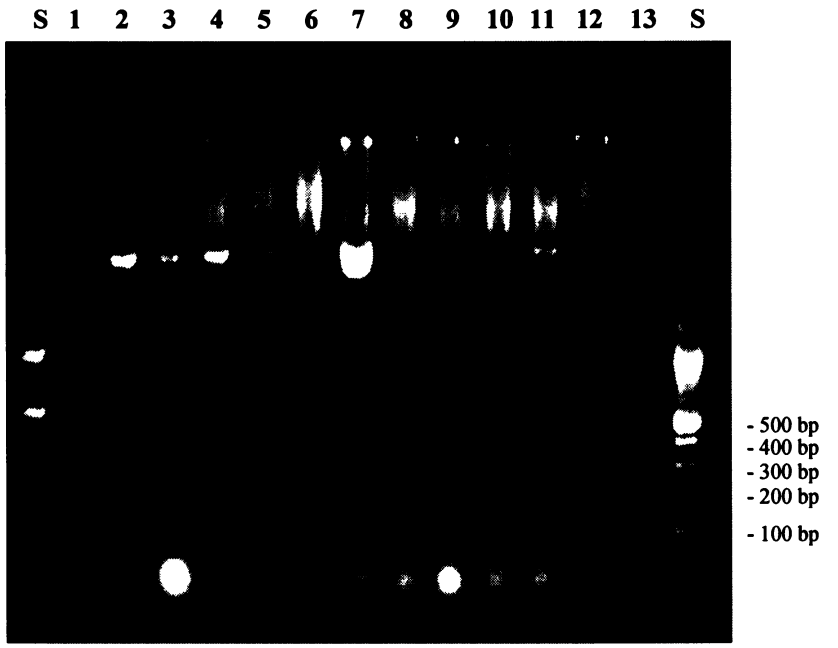
rezistenci vůči ampicilinu. Ligace fragmentů s „tupými" konci byla provedena dle postupu v kapitole 4.1.4., bylo využito restrikční endonukleasy Sma I. Enzym Sma I štěpí plasmid pBluescript SK+ a umožňuje spojení produktu PCR s otevřeným plasmidem pomocí T4 DNA ligasy. Po vložení PCR produktu dojde k porušení štěpicího místa enzymu Sma I a plasmid není touto endonukleasou dále štěpen.




**Obr. 5.2: Výsledek PCR na agarosovém gelu.** Dráhy 1, 2 označují produkty PCR, dráha S standard.

Produktem ligace byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* (kmen XL1-BLUE). Tento kmen nese rezistenci proti antibiotiku tetracyklinu. Klonovací vektor pBluescript SK+ obsahuje krátký segment laktosového operonu *E. coli*, který obsahuje regulační sekvence a část genu pro β-galaktosidasu (lacZ'). Do tohoto úseku je začleněno polyklonovací místo nepřerušující čtecí rámec. Buňky *E. coli* (kmen XL1-BLUE) kódují C-koncový fragment β-galaktosidasy. Pro identifikaci kolonií obsahujících plasmid s insertem byla využita metoda tzv. α-komplementace. Kolonie obsahující plasmid s insertem jsou bílé barvy, zatímco kolonie obsahující plasmid bez insertu jsou modré barvy. Bakterie, do nichž je vložen plasmid bez insertu, tvoří aktivní β-galaktosidasu, ta rozkládá substrát X-gal za vzniku produktu, který zbarvuje kolonie modře [77]. Transformace bakterií byla provedena dle postupu v kapitole 4.1.5. Na misce vyrostlo asi 200 kolonií, z toho 30 % bylo bílých, zbytek byly kolonie modré. Bylo vybráno 13 bílých kolonií, které byly zaočkovány do zkumavek s LB médiem, ampicilinem a tetracyklinem. Poté byla

z buněčné kultury získána plasmidová DNA využitím EP pufru, plasmidová DNA byla štěpena restrikčními endonukleasami EcoR I a BamH I. Tato dvojice enzymů poskytuje fragment DNA v délce 468 bp. Tento krok sloužil k selekci buněk nesoucích plasmid s insertem. Na základě agarosové elektroforézy (obr. 5.3) byl identifikován plasmid pocházející z kolonie č. 7 jako správný vektor nesoucí insert. Pokud plasmidy insert neobsahovaly, na agarosovém gelu se po vizualizaci neobjevily charakteristické proužky.




**Obr. 5.3: Selekce buněk nesoucích plasmid s insertem pomocí agarosové elektroforézy.** Dráha S označuje standard, dráhy 1-13 kolonie, ze kterých pocházely jednotlivé plasmidy. Jako správný vektor nesoucí insert byl identifikován plasmid č. 7.

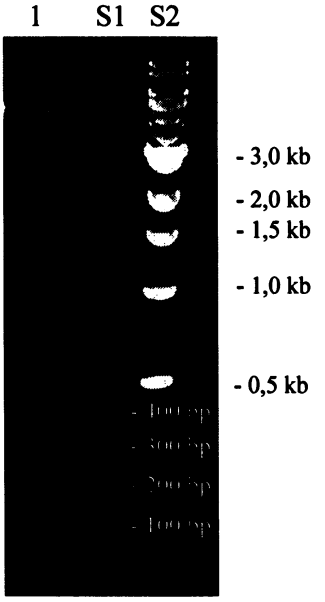
Na základě předchozí selekce byla z kultury č. 7 izolována plasmidová DNA. Pro izolaci plasmidové DNA od zbytku buněčného obsahu bylo využito tzv. minipreparace, která byla provedena pomocí kitu firmy Genomed. V předchozí metodě s využitím EP pufru se totiž jedná spíše o zpřístupnění obsahu buněk, než o izolaci plazmidové DNA. Získaná DNA by pak byla značně kontaminována zbylým obsahem buněk. Správnost připraveného plasmidu byla potvrzena ještě jednou pomocí stejných restrikčních endonukleas, postup popsán v metodické části 4.1.7.

Příprava expresního vektoru zahrnuje vložení požadovaného fragmentu DNA – insertu do vektoru, kterým je v tomto případě plasmid pET-30a(+). Insert i linearizovaný plasmid byl získán dle postupu v kapitole 4.1.8. Kompatibilní konce pro ligaci byly získány štěpením stejnými restrikčními endonukleasami – Nde I a Hind III. Protože ligace

je možná pouze s čistou molekulou DNA, byl plasmid a insert podroben preparativní elektroforéze, DNA byla získána z agarosového gelu pomocí kitu firmy Genomed. K ligaci získaného linearizovaného plasmidu a insertu byla použita T4 DNA ligasa.

Připraveným vektorem byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* (kmen NovaBlue). Transformace bakterií byla provedena metodou tepelného šoku, bakterie byly vysety na misky s LB agarem obsahující antibiotika kanamycin a tetracyklin. Na misce vyrostlo asi 150 kolonií. Selekce buněk nesoucích plasmid s insertem byla provedena dle postupu v kapitole 4.1.11., na základě agarosové elektroforézy (obr. neuveden) bylo zjištěno, že všechny testované kolonie obsahovaly plasmid s insertem. Pro další práci byl vybrán pouze plasmid pocházející z kolonie č. 12.

Dále bylo připraveno zásobní množství plasmidu s pracovním označením pETNKRA dle postupu uvedeného v metodické části (odstavec 4.1.12.), ke kontrole sloužily restrikce s dvojicí enzymů Xba I a Hind III. Uvedená dvojice endonukleas poskytuje fragment DNA o velikosti 422 bp, obr. 5.4.




**Obr. 5.4: Kontrolní restrikční štěpení.** Štěpení probíhalo s enzymy Xba I a Hind III (422 bp) v dráze 1. V dráze S1, S2 se nachází standard.

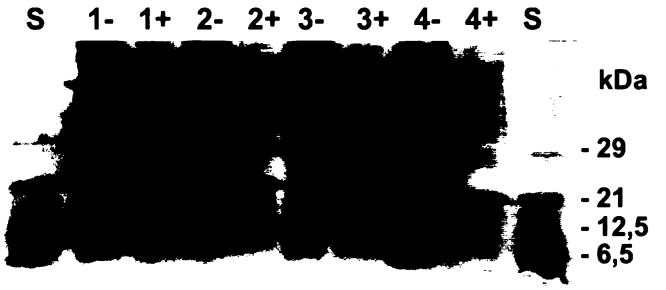
Pro určení čistoty a množství získané plasmidové DNA byla měřena absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm. Dle empirického vztahu byla určena koncentrace roztoku 1,2 μg/μl. Bylo získáno 120 μg DNA. Poměr $A_{260}/A_{280}$ charakterizuje čistotu plasmidové DNA, hodnota 1,72 odpovídá čisté DNA.

Roztok zásobního množství plasmidu byl předán na sekvenaci Dr. Jürgenovi Felsbergovi. Porovnání nukletidové sekvence osekvenovaného insertu srNKR-P1A s nukleotidovou sekvencí rNKR-P1A v databázi GenBank potvrdilo správnost připraveného insertu.

## 5.2. Produkce proteinu srNKR-P1A

Připravený expresní vektor pETNKRA byl použit pro rekombinantní expresi proteinu s pracovním označením srNKR-P1A. Protein srNKR-P1A odpovídá části extracelulární domény (obr. 5.1, str. 48) potkaního receptoru NKR-P1A.

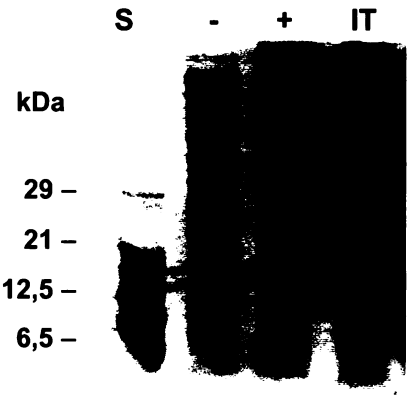
Plasmidem pETNKRA byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* kmen BL21-CodonPlus(DE3)RIPL. Tento kmen nese rezistenci proti antibiotikům tetracyklinu a chloramfenikolu, plasmid pET-30a(+) obsahuje selekční marker, který je zodpovědný za rezistenci vůči kanamycinu. Transformace bakterií byla provedena metodou tepelného šoku. Na LB agaru obsahujícím kanamycin, tetracyklin a chloramfenikol vyrostlo v Petriho misce asi 100 kolonií. Selekce produkčního klonu byla provedena tzv. plus/minus pokusem. Vybrané kolonie byly zaočkovány do zkumavek s LB médiem a příslušnými antibiotiky, po objevení prvního viditelného zákalu (přibližně 5 hod) byl z každé zkumavky odebrán 2 x 1 ml kultury a zbytek kultury byl uschován pro následnou velkoobjemovou produkci proteinu. Do jedné poloviny zkumavek označených + byl přidán induktor, kterým je IPTG (finální koncentrace 1 mM). IPTG v tomto případě indukuje syntézu T7 RNA polymerasy, ta specificky transkribuje geny umístěné za T7 promotor. Do druhé poloviny zkumavek označených – nebyl přidán žádný induktor. Produkce trvala 6 hod při 28°C. Produkční klony byly vybrány pomocí SDS-PAGE (obr. 5.5)




**Obr. 5.5: Selekce produkčního klonu.** V drahách + se nacházejí vzorky indukované IPTG, v drahách – neindukované vzorky, dráha S označuje standard.

Z analýzy pomocí SDS-PAGE je zřejmé, že všechny vybrané klony protein srNKR-P1A produkují, k expresi dochází po přidání induktoru IPTG. Po selekci produkčního klonu byla provedena velkoobjemová produkce proteinu srNKR-P1A. Velkoobjemová produkce byla provedena dle protokolu viz odstavec 4.2.4. Buněčná kultura byla indukována při dosažení OD (absorbance při 550 nm) = 0,8 pomocí IPTG o výsledné koncentraci 0,5 mM, produkce proteinu trvala 6 hod při 28°C. Velkoobjemová produkce byla dle potřeby provedena opakovaně pro získání dostatečného množství proteinu. Kontrola exprese byla provedena pomocí SDS-PAGE, Vzorek – byl odebrán před indukcí, vzorek + byl odebrán po ukončení produkce (obr. 5.6).

Protože protein je produkován ve formě inkluzních tělísek, následovala jejich izolace. Postup izolace je popsán v kapitole 4.2.5., kontrola byla provedena pomocí SDS-PAGE (dráha IT na obr. 5.6). Po izolaci inkluzních tělísek následovala jejich solubilizace v guanidinovém pufru, bylo přidáno redukční činidlo DTT, které zajistí redukci disulfidových vazeb před renaturací proteinu.




**Obr. 5.6: Kontrola exprese proteinu srNKR-P1A a inkluzních tělísek.** Dráha – obsahuje vzorek odebraný před indukcí, dráha + po ukončení produkce, v dráze IT se nachází vzorek izolovaných inkluzních tělísek. Dráha S označuje standard.

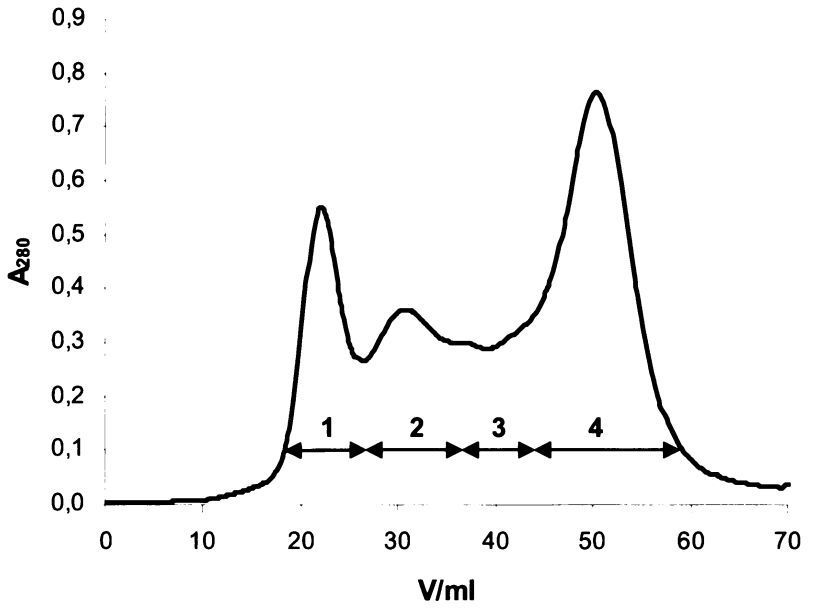
## 5.3. Renaturace proteinu srNKR-P1A

Renaturace proteinu srNKR-P1A byla provedena metodou naředění roztoku proteinu do renaturačního pufru. Renaturace byla provedena dle protokolu v kapitole 4.3. Renaturační pufr byl složen z L-arginin hydrochloridu (napomáhá sbalení proteinu), redoxního systému cysteamin/cystamin (zajišťující tvorbu disulfidových vazeb), pufr dále

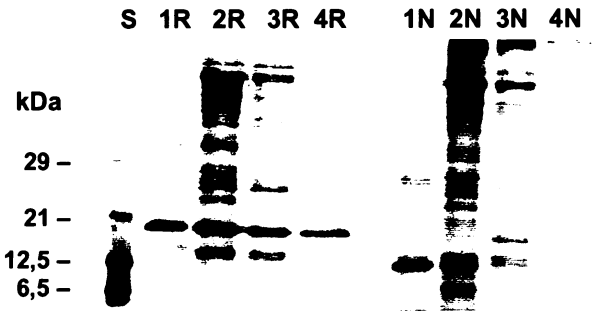
obsahoval Tris (udržující pH), vápenaté ionty (protein rNKR-P1A se řadí mezi C-lektiny, je předpokládaná vazba $Ca^{2-}$), azid sodný (ochrana před mikroorganismy), pepstatin a PMSF (ochrana před proteasami). Po renaturaci proteinu následovala dialýza a případné agregáty byly následně odstraněny centrifugací a filtrací. Renaturace a následná purifikace proteinu srNKR-P1A byla provedena několikrát pro získání dostatečného množství proteinu. Část proteinu byla na počátku spotřebována na optimalizaci purifikační strategie, jejíž výsledná podoba je uvedena níže.

## 5.4. Purifikace proteinu srNKR-P1A

Prvním krokem při purifikaci proteinu srNKR-P1A byla ionexová chromatografie na koloně Q Sepharosy FF. Tento krok sloužil rovněž k zakoncentrování roztoku proteinu po dialýze. Eluce proteinu byla provedena lineárním gradientem iontové síly. Gradient z 20 mM NaCl do 1 M NaCl trval 20 min při průtoku 3 ml/min. Eluce proteinu byla monitorována spektrofotometricky – byla měřena absorbance roztoku při 280 nm (obr. 5.7). Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (obr. 5.8, str. 55).

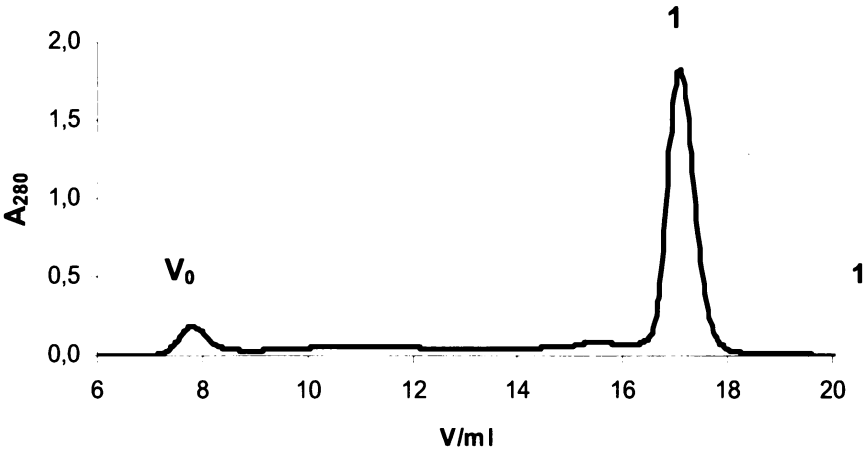



**Obr. 5.7: Záznam z ionexové chromatografie I proteinu rNKR-P1A.** Eluční profil, šipky 1 až 4 označují jímané frakce.



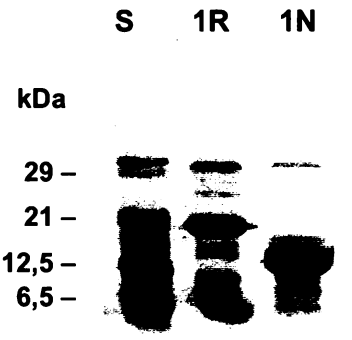

**Obr. 5.8: Analýza jímaných frakcí z ionexové chromatografie I.** V drahách R jsou vzorky v redukujícím prostředí, vzorky v drahách N jsou v prostředí neredukujícím.V dráze S se nachází standard.

Dalším krokem při purifikaci proteinu byla gelová chromatografie. Frakce z předcházející ionexové chromatografie I obsahující protein srNKR-P1A (frakce 1) byla zakoncentrována (protein srNKR-P1A byl obsažen i ve frakci 2, avšak v neredukujícím prostředí je vidět, že se jedná spíše o agregáty tohoto proteinu). Takto připravený roztok proteinu byl nanesen na kolonu Superdex 200 10/300 GL ekvilibrovanou v pufru o složení 20 mM Tris (pH = 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$. Průběh chromatografie byl monitorován měřením absorbance při 280 nm (obr. 5.9), jímaná frakce byla analyzována pomocí SDS-PAGE (obr. 5.10).




**Obr. 5.9: Záznam z gelové chromatografie proteinu srNKR-P1A.**

$V_0$ je mrtvý objem kolony, 1 je jímaná frakce.



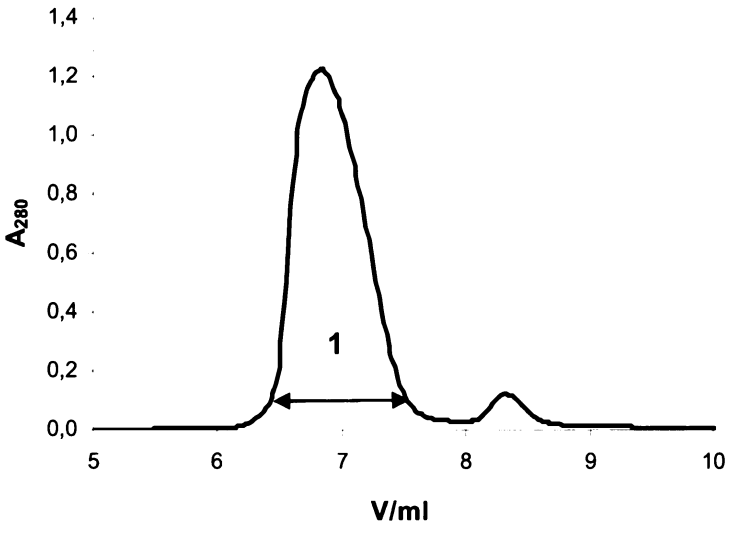

**Obr. 5.10: Analýza jímané frakce z gelové chromatografie.**

R- redukující prostředí

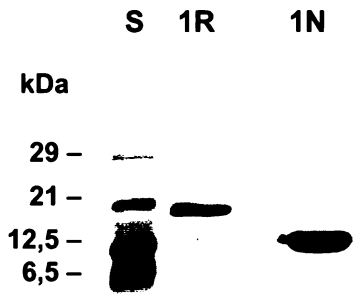
N- neredukující prostředí

S - standard

Frakce z předcházející gelové chromatografie obsahovala kromě proteinu srNKR-P1A i další proteiny, proto bylo nutné tento protein ještě purifikovat. Dalším purifikačním krokem byla iontexová chromatografie na koloně SOURCE 15Q 4.6/100 PE. Frakce obsahující protein srNKR-P1A byla zředěna 10 x pufrem A o složení 50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM $NaN_3$, pH = 7,5, aby došlo ke snížení iontové síly. Takto připravený roztok proteinu byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu. Eluce proteinu byla uskutečněna lineárním gradientem iontové síly. Byl nastaven gradient z 10 mM NaCl do 0,2 M NaCl , který při průtokové rychlosti 0,5 ml/min trval 30 min. Průběh chromatografie byl opět monitorován měřením absorbance při 280 nm (obr. 5.11). Jímaná frakce byla analyzována pomocí SDS-PAGE (obr. 5.12). Ve frakci purifikovaného proteinu byla stanovena přibližná koncentrace metodou dle Bradfordové. Stanovení koncentrace proteinu srNKR-P1A bylo provedeno vizuálně porovnáním s barevnou řadou standardů BSA. Bylo získáno 0,5 mg proteinu srNKR-P1A (z 1 l LB média). Renaturace a purifikace proteinu byla provedena několikrát pro získání dostatečného množství proteinu, z 1 l LB média se vždy podařilo získat 0,5 až 1 mg proteinu srNKR-P1A.




**Obr. 5.11: Záznam z iontexové chromatografie II proteinu srNKR-P1A.** Eluční profil, 1 označuje jímanou frakci.

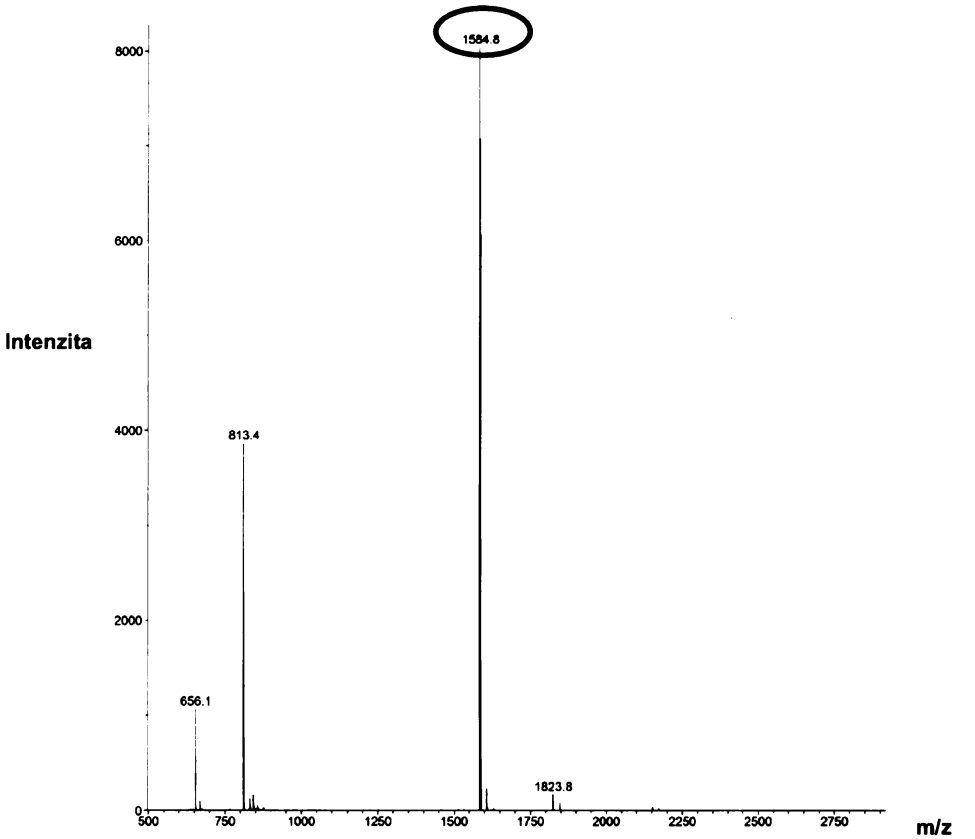



**Obr. 5.12: Analýza jímané frakce z iontexové chromatografie II.**
R- redukující prostředí
N- neredukující prostředí
S - standard

## 5.5. Identifikace proteinu srNKR-P1A

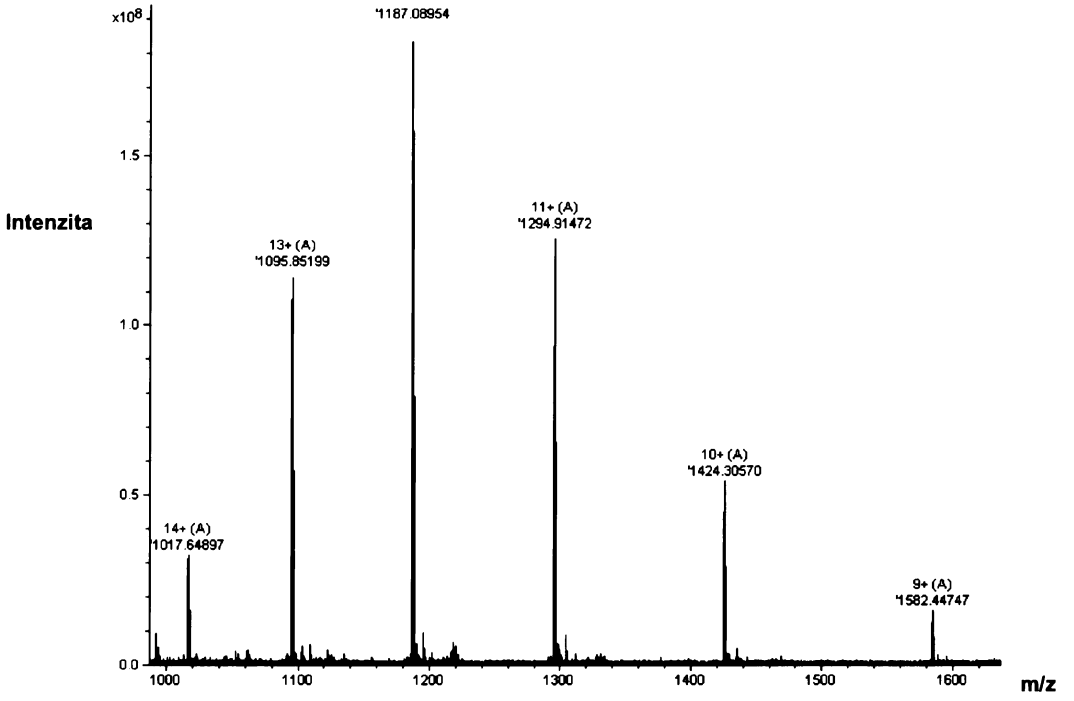
Identifikace deseti koncových aminokyselin od N-konce proteinu byla provedena pomocí automatického sekvenátoru, příprava vzorku na toto měření je uvedena v odstavci 4.5.1. Ze záznamu automatického sekvenátoru byla odečtena následující sekvence proteinu: AKLK?PKDWL. Tato sekvence odpovídá prvním deseti N-koncovým aminokyselinám proteinu srNKR-P1A. Aminokyselina s označením ? v této sekvenci by měla být cystein, avšak tuto aminokyselinu nelze identifikovat ani v používaném aminokyselinovém standardu.

Pro ověření identity proteinu byla dále využita MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, respektive metoda peptidového mapování. Přípravu vzorku na toto měření i samotné měření prováděl Mgr. Hynek Mrázek. Bylo změřeno hmotnostní spektrum tryptických štěpů proteinu srNKR-P1A (obr. 5.13). Porovnáním změřených hodnot m/z s velikostí teoretických peptidů proteinu srNKR-P1A byla potvrzena identita tohoto proteinu. Změřená hodnota m/z = 1584,8 se podařila přiřadit peptidu o sekvenci GATLL LVQDQEELR o teoretické hmotě 1584,77.




**Obr. 5.13: MALDI-TOF hmotnostní spektrum tryptických štěpů proteinu srNKR-P1A.** Červeně je označen iont, jehož hodnota m/z se podařila přiřadit teoretické hmotě peptidů srNKR-P1A.

Výsledný purifikovaný protein srNKR-P1A byl analyzován pomocí ESI-FT-ICR hmotnostní spektrometrie (obr. 5.14). Tuto analýzu provedl Mgr. Petr Novák, Ph.D. Byla stanovena celková hmota proteinu $[M+H]^+$ = 14233,99. Tato hmota odpovídá sekvenci proteinu srNKR-P1A včetně správného uzavření disulfidových můstků.

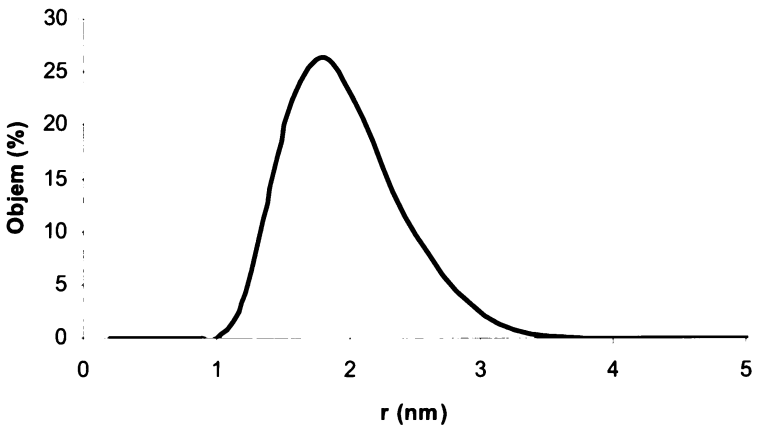



**Obr. 5.14: ESI-FT-ICR hmotnostní spektrum proteinu srNKR-P1A.** Dekonvolucí naměřeného spektra byla vypočtena celková hmota proteinu $[M+H]^+$ = 14233,99,

## 5.6. Charakterizace proteinu srNKR-P1A

### 5.6.1. Dynamický rozptyl světla

Na základě měření dynamického rozptylu světla bylo určeno, že gyrační poloměr molekul má velikost 1,87 nm. Porovnáním výsledků vypočítaných pomocí programu HYDROPRO [78] pro oligomery extracelulární domény proteinu CD69 (sekvenčně nejbližší homolog se známou strukturou) [79] bylo zjištěno, že molekuly srNKR-P1A se v roztoku dominantně vyskytují ve formě monomerů. Distribuce velikosti částic proteinu srNKR-P1A je uvedena na obr. 5.15, str. 59.

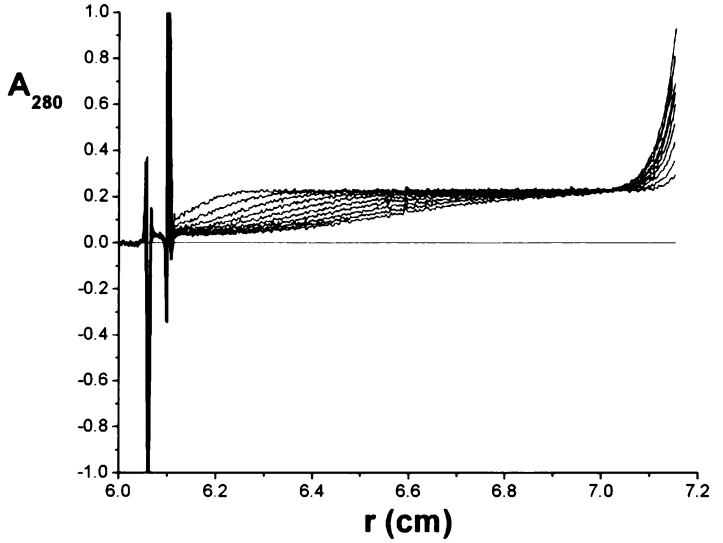



**Obr. 5.15: Distribuce velikosti částic proteinu srNKR-P1A měřená pomocí dynamického rozptylu světla.**

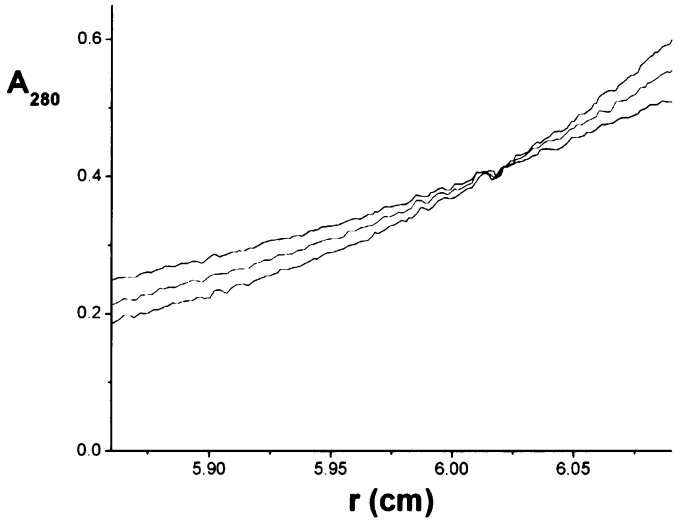
## 5.6.2. Analytická ultracentrifugace

Sedimentační koeficient a molekulová hmotnost proteinu srNKR-P1A byly stanoveny měřením metodou sedimentační rychlosti resp. sedimentační rovnováhy na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I. Vyhodnocení měření provedl Mgr. Ondřej Vaněk. Analýzou dat naměřených metodou sedimentační rychlosti při 47000 ot./min (rotor An-50 Ti), 20°C a koncentraci proteinu srNKR-P1A 0,1 mg/ml byl určen v programu SEDFIT [80] (verze 11.71) zdánlivý sedimentační koeficient $s_{20}$ = 1,65 S. Pro výpočet sedimentačního koeficientu byly použity hustota pufru $\rho_{20}$ = 1,00499 g/cm$^3$ a parciální specifický objem proteinu srNKR-P1A $\upsilon_{20}$ = 0,7288 cm$^3$/g , tyto hodnoty byly vypočteny v programu SEDNTERP [81] (verze 1.09). Sedimentační koeficient závisí na koncentraci proteinu, hustotě a viskozitě rozpouštědla, proto byl zdánlivý sedimentační koeficient extrapolován na nulovou koncentraci proteinu, rozpouštědlo – čistá voda, 20°C. Sedimentační koeficient byl $s°_{20,w}$ = 1,75 S. Z naměřených hodnot byl dále určen frikční poměr $f/f_0$ = 1,19. Tento poměr udává, jak se daná částice liší tvarem od koule. Záznam z analytické ultracentrifugace proteinu srNKR-P1A získaný měřením metodou sedimentační rychlosti je uveden na obr. 5.16, str. 60. Molekulová hmotnost byla stanovena s využitím metody sedimentační rovnováhy (záznam na obr. 5.17, str.60). Měření probíhalo při třech různých rychlostech 18000, 21000 a 24000 ot./min, 20°C, rovnováha byla ponechána ustalovat 20 hod. Analýza sedimentačních dat byla provedena v programu SEDPHAT (verze 6.21) [82] umožňujícím tzv. globální fit dat pocházejících

z různých experimentů a zahrnovala jak data ze sedimentačně rychlostního experimentu, tak z měření sedimentační rovnováhy pro 3 různé rychlosti (18000, 21000 a 24000 ot./min) a 3 různá ředění vzorku (0,2, 0,1 a 0,05 mg/ml), statistické zpracování bylo provedeno v programu SEDPHAT metodou Monte-Carlo pro nelineární regresi. Výsledkem je molekulová hmotnost 14280 ± 195 Da (interval spolehlivosti 95 %). Stanovená molekulová hmotnost odpovídá teoretické molekulové hmotnosti 14242 Da a potvrzuje, že se protein srNKR-P1A nachází v roztoku ve formě monomeru.




**Obr. 5.16: Záznam z analytické ultracentrifugace proteinu srNKR-P1A získaný měřením metodou sedimentační rychlosti.** r označuje radiální vzdálenost od osy otáčení.



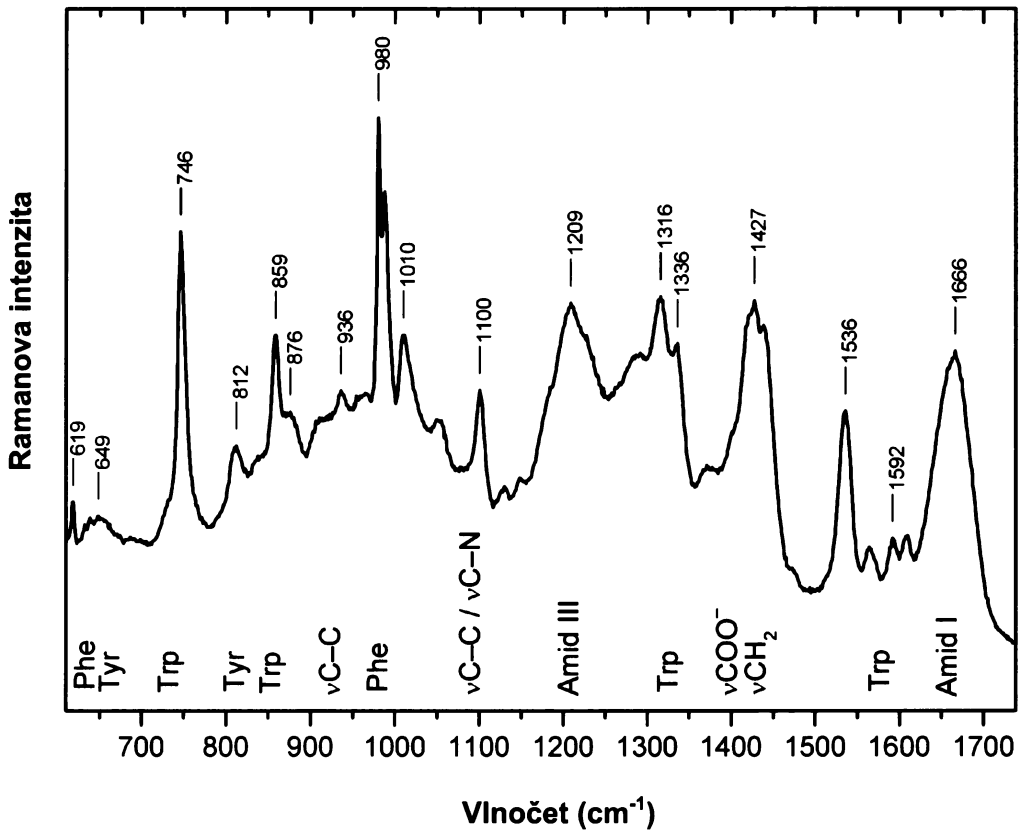

**Obr. 5.17: Záznam z analytické ultracentrifugace proteinu srNKR-P1A získaný měřením metodou sedimentační rovnováhy.** Data byla získána po 20 hod ustalování rovnováhy pro koncentraci proteinu 0,2 mg/ml. Červená křivka odpovídá měření při 18000 ot./min, zelená při 21000 ot./min a modrá křivka byla získána z měření při 24000 ot./min. r označuje radiální vzdálenost od osy otáčení.

## 5.6.3. Ramanova spektroskopie

Pro zjištění zastoupení prvků sekundární struktury proteinu srNKR-P1A bylo použito metody DCDR Ramanovy spektroskopie. Měření (za podmínek uvedených v metodické části) a vyhodnocení DCDR spekter bylo provedeno RNDr. Kateřinou Hofbauerovou, Ph.D. a RNDr. Vladimírem Kopeckým, Ph.D. Zastoupení prvků sekundární struktury bylo určeno s využitím publikovaných metod [83, 84, 85]. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1, DCDR spektrum proteinu srNKR-P1A je na obr. 5.18 (str. 62). Výsledky získané z DCDR spektra proteinu srNKR-P1A byly porovnány s výsledky z krystalové struktury proteinu CD69 (sekvenčně nejbližší homolog se známou strukturou) [79]. Na základě tohoto porovnání se jako pravděpodobně nejpřesnější stanovení jeví analýza pásu amidu I metodou referenčních intenzitních profilů (v tab. 1 metoda s označením C3 a C4, při použití této metody je struktura β-ohybu zahrnuta ve struktuře β-listu). Jedná se však pouze o odhad, protože krystalová struktura proteinu rNKR-P1A není známa. Zastoupení jednotlivých struktur u proteinu CD69 je následující: α-helix 21 %, β-list 36 %, β-ohyb 14 % a jiná struktura 29 %.

**Tab. 1: Odhad zastoupení prvků sekundární struktury proteinu srNKR-P1A z DCDR spektra.** Sekundární struktura stanovena A – analýzou maxima pásu amidu I [83], B – analýzou pásu amidu I a III metodou nejmenších čtverců [84], C – analýzou pásu amidu I metodou referenčních intenzitních profilů (metoda s označením 3 a 4 se vztahuje k použitým profilům) [85]. Dané standardní odchylky jsou vypočteny jako standardní odchylky použitého referenčního setu, nevypovídají nic o kvalitě fitu.

| Struktura | Amid I [A] | Amid I [B] | Amid III [B] | Amid I [C3] | Amid I [C4] |
|---|---|---|---|---|---|
| **α-helix** | 34,0 ± 14,3 % | 23,3 ± 5 % | 39,7 ± 5 % | 18,4 ± 2,5 % | 21,8 ± 2,5 % |
| **β-list** | 35,7 ± 11,0 % | 39,6 ± 4 % | 31,7 ± 6 % | 54,2 ± 2,8 % | 55,5 ± 2,8 % |
| **β-ohyb** | 18,5 ± 4,0 % | 15,4 ± 2 % | 19,0 ± 5 % | --- | --- |
| **Jiná** | 11,6 ± 2,4 % | 7,7 ± 2 % | 8,5 ± 4 % | 27,4 ± 2,6% | 22,7 ± 2,6 % |
| **Suma** | 99,8 % | 86 % | 98,9 % | 100 % | 100 % |

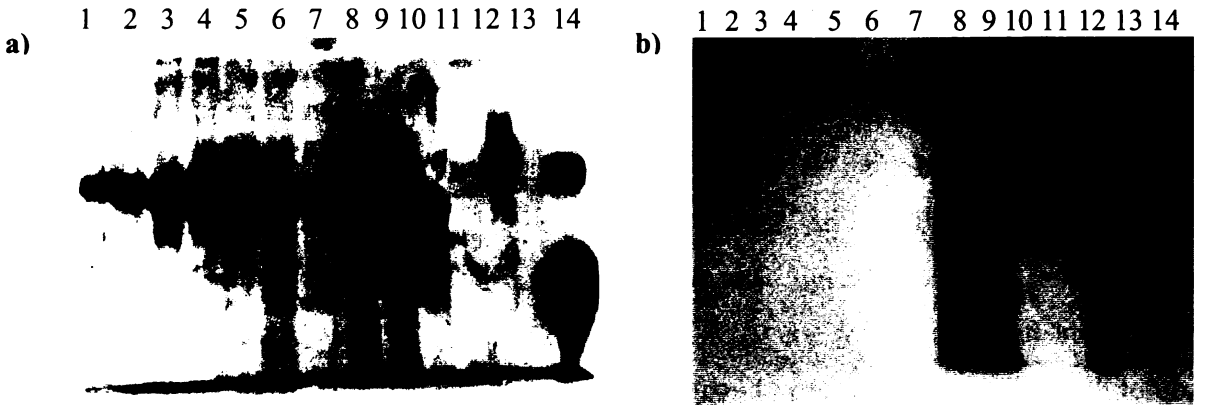



**Obr. 5.18: DCDR spektrum proteinu srNKR-P1A.** Ve spektru je vyznačeno přiřazení jednotlivých pásů.

## 5.7. Vazebné experimenty

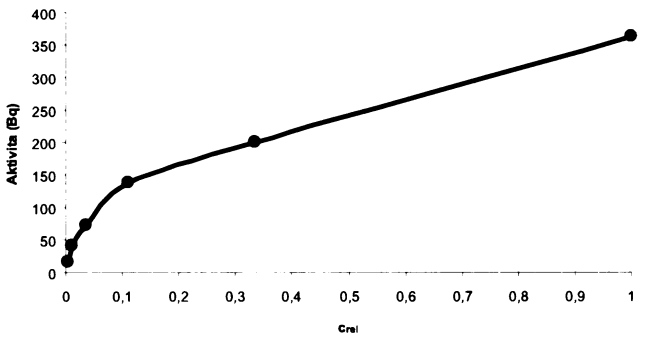
### 5.7.1. Vazebné experimenty s radioaktivně značeným proteinem

Prvním krokem při vazebných experimentech bylo rozdělení neoglykoproteinů a přirozených glykoproteinů pomocí SDS-PAGE, následovalo jejich přenesení na PVDF membránu (obr. 5.19 a, str. 63). Vazebná místa na membráně byla zablokována pomocí BSA, aby nedocházelo ke vzniku nespecifických vazeb. Poté byla membrána inkubována s proteinem srNKR-P1A značeným pomocí $Na^{125}I$, zbytky nenavázaného proteinu byly odstraněny a navázaný protein byl detekován autoradiograficky (obr. 5.19 b, str. 63). Byla prokázána vazba na BSA-β-D-GlcNAc, BSA-chitobiosu a ovomukoid z vaječného bílku.



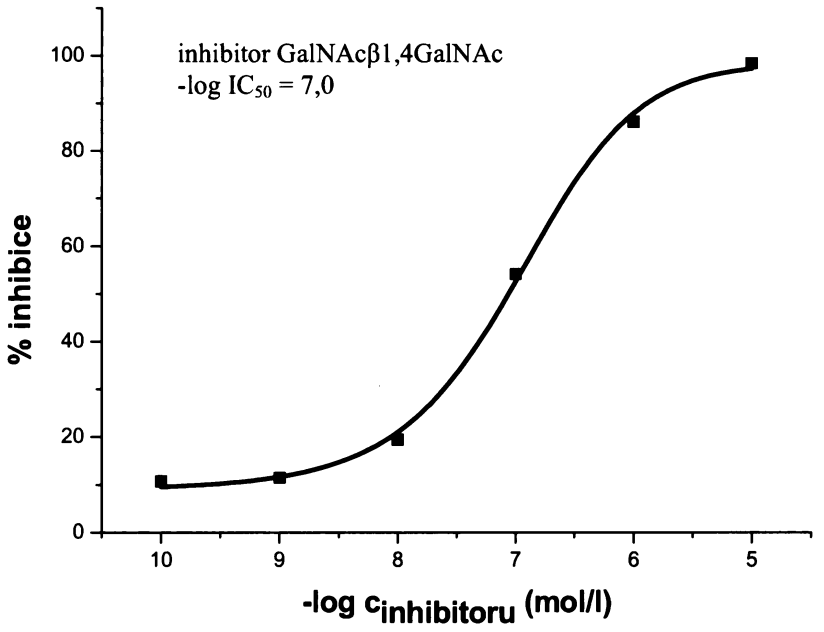

**Obr. 5.19: a) Neoglykoproteiny a přirozené glykoproteiny přenesené na PVDF membránu. b) Autoradiografická detekce vazby proteinu srNKR-P1A a uvedených sacharidových struktur.** V 1. dráze BSA, 2. BSA-α-D-Glc, 3. BSA-β-D-Glc, 4. BSA-α-D-Gal, 5. BSA-β-D-Gal, 6. BSA-α-L-Fuc, 7. BSA-α-D-Man, 8.+ 9. BSA-β-D-GlcNAc, 10. fetuin, 11. transferin, 12. BSA-chitobiosa, 13. BSA-heparin, 14. ovomukoid.

Dále bylo potřeba stanovit optimální koncentraci radioaktivně značeného proteinu používanou při následných inhibičních testech. Tato koncentrace radioaktivně značeného proteinu odpovídá 50 % saturaci proteinu ligandem. Jamky mikrotitrační destičky byly pokryty ligandem (na základě předchozího experimentu byla zvolena BSA-chitobiosa), po zablokování vazebných míst byl do jamek přidán radioaktivně značený protein o vzrůstající koncentraci. Z naměřených hodnot aktivity odpovídající množství navázaného proteinu na imobilizovaný ligand a použité koncentrace radioaktivně značeného proteinu byla sestrojena saturační křivka (obr. 5.20).




**Obr. 5.20: Saturační křivka.** Naměřené hodnoty aktivity odpovídají množství navázaného proteinu na imobilizovaný ligand, $c_{rel}$ je relativní koncentrace radioaktivně značeného proteinu srNKR-P1A.

Inhibiční experimenty byly uskutečněny při koncentraci proteinu srNKR-P1A odpovídající 50 % saturaci ligandem (zásobní roztok radioaktivně značeného proteinu byl 10 x naředěn roztokem 2 % BSA). Jamky mikrotitrační destičky byly pokryty ligandem (BSA-chitobiosa), po zablokování vazebných míst byly do jamek přidány inhibitory o různých koncentracích a radioaktivně značený protein srNKR-P1A. Bylo vypočteno procento inhibice vazby proteinu na imobilizovaný ligand různými sacharidovými strukturními motivy. Následně byla stanovena tzv. $IC_{50}$, což je molární koncentrace látky, která způsobí 50 % inhibici vazby proteinu na ligand, v tomto případě BSA-chitobiosu (výsledky jsou uvedeny v tab. 2 na str. 65). Podle hodnoty $IC_{50}$ resp. -log $IC_{50}$ můžeme použité inhibitory rozdělit do několika skupin: neúčinné inhibitory (-log $IC_{50}$ >5), málo účinné inhibitory (-log $IC_{50}$ = 5-6,8), účinné inhibitory (-log $IC_{50}$ = 6,9-10) a velmi účinné inhibitory (-log $IC_{50}$ <10). Na obr. 5.21 je uveden příklad inhibice vazby proteinu srNKR-P1A na ligand disacharidem GalNAcβ1,4GalNAc – inhibitor č. 11.




**Obr. 5.21: Příklad inhibice vazby proteinu srNKR-P1A na ligand disacharidem GalNAcβ1,4GalNAc.**

**Tab. 2: Výsledky inhibičních vazebných studií. Žlutě** jsou označeny neúčinné inhibitory, [redacted] málo účinné, bíle účinné a [redacted] velmi účinné inhibitory. Uvedené sacharidy jsou D-konfigurace.

| Číslo inhibitoru | Sacharidová struktura inhibitoru | -log $IC_{50}$ |
|---|---|---|
| **1** | **Man** | **>5** |
| [redacted] | | |
| 3 | GalNAc | 6,9 |
| 4 | ManNAc | 8,0 |
| 5 | Chitobiosa | 7,0 |
| 6 | Chitotriosa | 7,3 |
| 7 | Chitotetraosa | 7,9 |
| 8 | Chitopentaosa | 7,1 |
| [redacted] | | |
| 11 | GalNAcβ1,4GalNAc | 7,0 |
| [redacted] | | |
| 14 | GalNAcβ1,4GlcNAc | 7,2 |
| 15 | GlcNAcβ1,4ManNAc | 7,1 |
| 16 | GalNAcβ1,4ManNAc | 8,0 |
| 17 | GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4ManNAc | 8,5 |
| 18 | GalNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc | 9,0 |
| 19 | GalNAcβ1,4GlcNAcβ1,4ManNAc | 9,2 |
| 20 | GalNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc | 9,5 |
| 21 | GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4ManNAc | 9,4 |
| [redacted] | | |
| 23 | GalNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4ManNAc-NH-CS-$NH_2$ | 9,4 |
| 24 | (GalNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4ManNAc-NH-CS-$NH)_2$ $(CH_2)_2$ | 9,5 |
| [redacted] | | |
| 30 | (GalNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4ManNAc-NH-CS-$NH)_2$ $(CH_2)_{14}$ | 9,6 |
| [redacted] | | |
| **32** | **GlcNAcβ1,3(GlcNAcβ1,6)GlcNAc** | **>5** |
| [redacted] | | |
| 36 | (GlcNAc-NH-CS-$NH)_2$ $(CH_2)_6$ | 8,6 |
| 37 | (GlcNAc-NH-CS-$NH)_2$ $(CH_2)_8$ | 7,5 |
| 38 | (GlcNAc-NH-CS-$NH)_2$ $(CH_2)_{10}$ | 7,3 |
| [redacted] | | |
| 40 | (GalNAcβ1,4GlcNAc-NH-CS-$NH)_2$ $(CH_2)_2$ | 8,5 |
| 41 | (GalNAcAβ1,4GlcNAc-NH-CS-$NH)_2$ $(CH_2)_2$ | 9,4 |
| 42 | G4 GlcNAc dendrimer | 8,2 |
| 43 | G8 GlcNAc dendrimer | 9,2 |

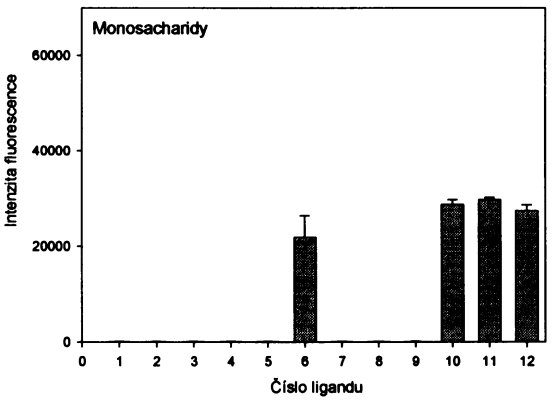
## 5.7.2. Vazebné experimenty s fluorescenčně značeným proteinem

Protein srNKR-P1A byl naznačen molekulou NHS-fluoresceinu. S fluorescenčně značeným proteinem byly provedeny přímé vazebné testy. Byla sledována vazba proteinu na různé imobilizované sacharidové ligandy. Ligandy byly rozděleny do jednotlivých modulů dle typu sacharidu, všechny uvedené sacharidy byly ve formě konjugátů s BSA. Výsledek těchto experimentů spolu se sacharidovou strukturou ligandu je uveden na str. 67-68. V tab. 3 jsou vysvětleny zkratky jednotlivých ligandů použité při těchto testech.

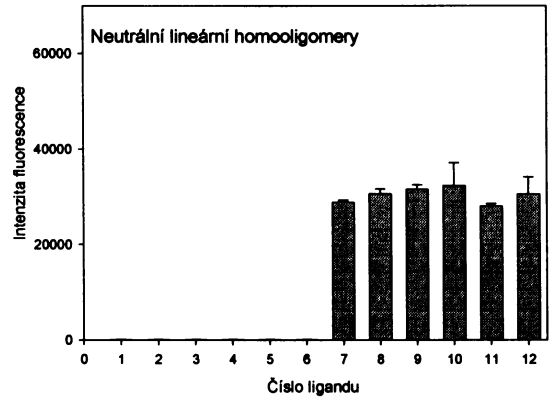
**Tab. 3: Vysvětlení zkratek ligandů použitých při přímých vazebných testech.** Uvedené sacharidy byly ve formě konjugátů s BSA a D-konfigurace.

| Zkratka | Sacharidová struktura |
|---|---|
| $M_4$ | (Manα1,6Manα1,6)Manα1,3Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc |
| $M_6$ | [Manα1,3(Manα1,6)Manα1,6]Manα1,3Manα1,3Manβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc |
| $M_9$ | [Manα1,2Manα1,3(Manα1,2Manα1,6)Manα1,6]Manα1,2Manα1,3Manα1,3Manβ1,4GlcNAcβ1,4 GlcNAc |
| $N_2$ | [(GlcNAcβ1,2Manα1,6)][GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $N_4$ | [(GlcNAcβ1,6)GlcNAcβ1,2Manα1,6][(GlcNAcβ1,4)GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4 GlcNAc |
| $G_2$ | [(Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $G_3$ | [(Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Galβ1,4GlcNAcβ1,2(Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Manα1,3]Manβ1,4 GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $G_4$ | [(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6][(Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,2 Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $G_4F$ | [(Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6][(Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Galβ1,4 GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| G4 dendrimer | [(GlcNAcβNH-CS-NH-$CH_2$-$CH_2$-NH-CO-$CH_2$-$CH_2$)$_2$N-$CH_2$-$CH_2$-NH-$COCH_2$-CH2]$_2$-NH-$(CH_2)_6$-$NH_2$ |
| $S_2$ | [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4 GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $S_3$ | [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAc β1,4)Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $S_4$ | [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6][(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAc β1,4)Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $S_3N_3$ | [(Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAc β1,2(Siaα2,3(GalNAcβ1,4)Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $S_4N_4$ | [(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)Galβ1,4GlcNAcb1,2Manα1,3] Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $S_2NG_2$ | [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4 GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |
| $S_3NG_3$ | [(Siaα2,3Galb1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Manα1,6)][Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4 GlcNAcβ1,2(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4 GlcNAc |
| $S_4NG_4$ | [(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAc β1,2Manα1,6][(Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,4)Siaα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Gal β1,4GlcNAcβ1,2Manα1,3]Manβ1,4GlcNacβ1,4GlcNAc |

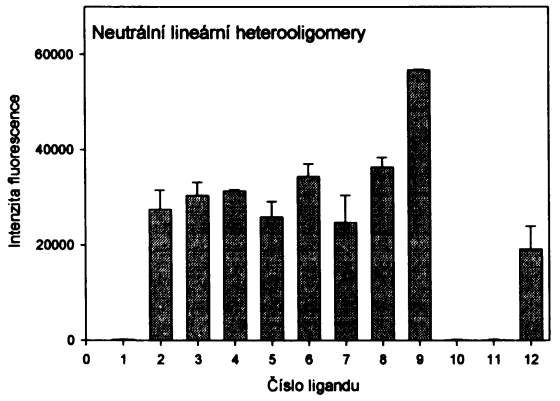
Poznámka: Dendrimer G8 má stejnou strukturu jako dendrimer G4, ale obsahuje dvojnásobný počet koncových „antén“



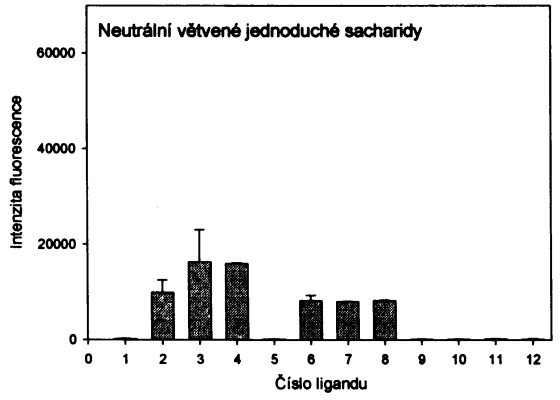

1 BSA
2 BSA-α-D-Glc
3 BSA-β-D-Glc
4 BSA-α-D-Gal
5 BSA-β-D-Gal
6 BSA-α-L-Fuc
7 BSA-β-L-Xyl
8 BSA-α-D-Man
9 BSA-β-D-Man
10 BSA-β-D-GlcNAc
11 BSA-α-D-GalNAc
12 BSA-β-D-GalNAc




1 BSA
2 BSA-Maltobiosa
3 BSA-Maltotriosa
4 BSA-Maltotetraosa
5 BSA-Cellobiosa
6 BSA-Cellotriosa
7 BSA-Chitobiosa
8 BSA-Chitotriosa
9 BSA-Chitotetraosa
10 BSA-GalNAcβ1,4GalNAc
11 BSA-GalNAcβ1,4GalNAcβ1,4GalNAc
12 BSA-GalNAcβ1,4GalNAcβ1,4GalNAcβ1,4GalNAc

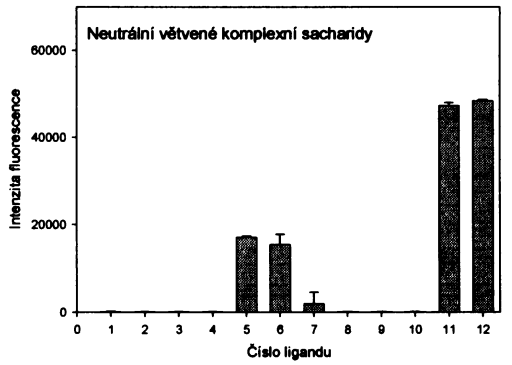



1 BSA
2 BSA-GlcNAcβ1,4GalNAc
3 BSA-ManNAcβ1,4GlcNAc
4 BSA-ManNAcβ1,4GalNAc
5 BSA-GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GalNAc
6 BSA-ManNAcβ1,1GlcNAcβ1,4GlcNAc
7 BSA-GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GalNAc
8 BSA-ManNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAc
9 BSA-ManNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GalNAc
10 BSA-Manβ1,2GlcNAcβ1,4Gal
11 BSA-GalNAcβ1,3Gal
12 BSA-GalNAcβ1,3Galα1,3Fuc

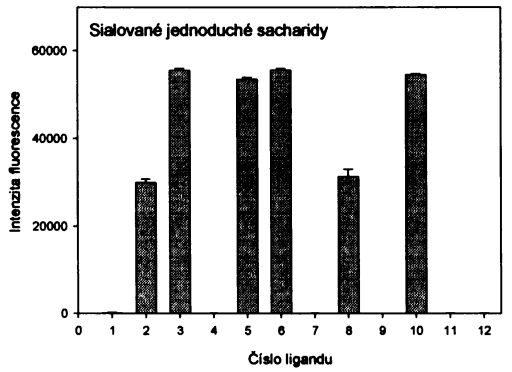



1 BSA
2 BSA-GlcNAcβ1,3GlcNAc(β1,4GlcNAc)
3 BSA-GlcNAcβ1,3GlcNAc(β1,6GlcNAc)
4 BSA-GlcNAcβ1,4GlcNAc(β1,6GlcNAc)
5 BSA-GlcNAcβ1,3GlcNAc(β1,4GlcNAc)(β1,6GlcNAc)
6 BSA-GalNAcβ1,3GalNAc(β1,4GalNAc)
7 BSA-GalNAcβ1,3GalNAc(β1,6GalNAc)
8 BSA-GalNAcβ1,4GalNAc(β1,6GalNAc)
9 BSA-GalNAcβ1,3GalNAc(β1,4GalNAc)(β1,6GalNAc)
10 BSA-Manα1,3Man(α1,6Man)
11 BSA-Manβ1,4GlcNAc(α1,3Man)(α1,6Man)
12 BSA-GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4 Manα1,3Man(α1,6Man)

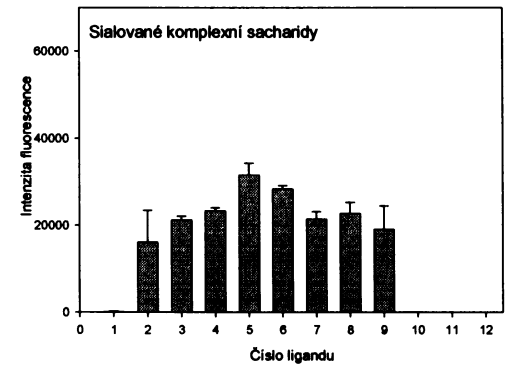
**Obr. 5.22: Výsledky přímých vazebných studií s fluorescenčně značeným proteinem srNKR-P1A.**



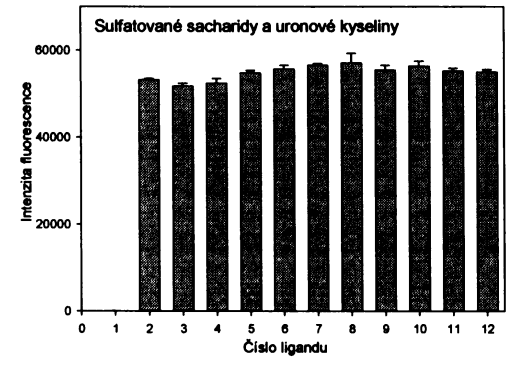

1 BSA
2 BSA-$M_4$
3 BSA-$M_6$
4 BSA-$M_9$
5 BSA-$N_2$
6 BSA-$N_4$
7 BSA-$G_2$
8 BSA-$G_3$
9 BSA-$G_4$
10 BSA-$G_4F$
11 BSA-G4 GlcNAc dendrimer
12 BSA-G8 GlcNAc dendrimer




1 BSA
2 BSA-α-Sia
3 BSA-Glcβ1,4Galα2,3Sia
4 BSA-Glcβ1,4Galα2,6Sia
5 BSA-GlcNAcβ1,4GalNAcA
6 BSA-GlcNAcβ1,4Galα2,3Sia
7 BSA-GlcNAcβ1,4Galα2,6Sia
8 BSA-GlcNAc(α1,3Fuc)β1,4Galα2,3Sia
9 BSA-GlcNAc(α1,3Fuc)β1,4Galα2,6Sia
10 BSA-GlcNAc(α1,2Fuc)β1,3Galα2,3Sia
11 BSA-GlcNAc(α1,2Fuc)β1,3Galα2,6Sia
12 BSA-GalNAcβ1,3Galα1,3Fuc(α2,6Sia)




1 BSA
2 BSA-$S_2$
3 BSA-$S_3$
4 BSA-$S_4$
5 BSA-$S_3N_3$
6 BSA-$S_4N_4$
7 BSA-$S_2NG_2$
8 BSA-$S_3NG_3$
9 BSA-$S_4NG_4$
10 BSA-α-GalNAcα2,6Sia
11 BSA-(-α-GalNAcα2,6Sia)$_3$
12 BSA-GalNAc(α2,6Sia)β1,3Galα1,3Fuc(α2,6Sia)




1 BSA
2 BSA-GalNAcβ1,3UA
3 BSA-GalNAcβ1,3UA(4S)
4 BSA-GalNAcβ1,3UA(6S)
5 BSA-GlcNAcβ1,4UA
6 BSA- GlcNAcβ1,4UA(2S)
7 BSA-GlcNAc(6S)β1,4UA
8 BSA-GlcN(2S)β1,4UA(2S)
9 BSA-GlcN(2S)(6S)β1,4UA(2S)
10 BSA-GlcN(2S)(6S)α1,4IdoA(2S)α1,4GlcN(2S)(6S)β1,4UA(2S)
11 BSA-Manα1,2Manα1,3Manα1,2Man(6P)
12 BSA-Manα1,2Manα1,3Manα1,3Manα1,3Man(6P)

**Obr. 5.22: Výsledky přímých vazebných studií s fluorescenčně značeným proteinem srNKR-P1A – pokračování.** Intenzita fluorescence odpovídá množství navázaného proteinu na imobilizovaný ligand. Sacharidy byly ve formě konjugátů s BSA a D-konfigurace s výjimkou L-Fuc a L-Xyl. Zkratky ligandů jsou vysvětleny v tab. 3 str. 66, UA označuje uronovou kyselinu (glukuronovou či iduronovou, nespecifikováno).

# 6. Diskuse

Tato diplomová práce doplňuje studie prováděné v Laboratoři architektury proteinů, které se týkají struktury a vazebných vlastností lektinových receptorů NK buněk. Receptor potkaních NK buněk rNKR-P1A patří mezi nejdéle studované receptory C-lektinového typu nejen v pracovní skupině Prof. Bezoušky. Již dříve zde byl připraven konstrukt zahrnující část extracelulární domény tohoto receptoru ($Glu_{81}$-$Lys_{215}$). Tento rekombinantní protein se však nepodařilo reprodukovatelně připravit v dostatečném množství ani čistotě. Mezi pokusy, které jsem vykonala v rámci diplomové práce, patřila příprava proteinu rNKR-P1A o uvedeném aminokyselinovém složení ($Glu_{81}$-$Lys_{215}$), avšak s tzv. histidinovou kotvou na N-konci proteinu. Cílem bylo usnadnění purifikace proteinu rNKR-P1A pomocí afinitiní chromatografie, resp. specifické interakce histidinové kotvy a vázaných $Ni^{2+}$ iontů. Modifikovaný plasmid pET-30a(+) obsahující insert kódující zmíněnou část proteinu rNKR-P1A a sekvenci pro C3 proteasu nutnou k odštěpení histidinové kotvy jsem obdržela od Mgr. Ondřeje Vaňka. Po rekombinantní expresi tohoto proteinu následovala renaturace. Renaturace probíhala v různých experimentálních podmínkách a v různém uspořádání zahrnující renaturaci metodou naředění do renaturačního pufru a renaturaci na koloně Ni-NTA Sepharosy. Avšak ani v jednom z případů se nepodařilo získat renaturovaný protein rNKR-P1A. Na základě studie vykonané pracovní skupinou v Harrow [67] byl navržen nový konstrukt odpovídající samotné CTLD doméně. Tento konstrukt odpovídá aminokyselinovému rozmezí $Ala_{90}$-$Lys_{215}$. Mým úkolem bylo tedy připravit vektor kódující tuto část extracelulární domény proteinu rNKR-P1A, dále připravit dostatečné množství rekombinantního proteinu pracovně označeného srNKR-P1A pro navazující strukturní a vazebné studie.

Úkolem první části diplomové práce byla příprava vektoru pro rekombinantní expresi proteinu srNKR-P1A. Tento vektor se podařilo připravit dle následující strategie. Po amplifikaci pomocí PCR byla provedena ligace do klonovacího vektoru pBluescript SK+ s využitím enzymu Sma I a T4 DNA ligasy. Následovalo překlonování insertu do expresního vektoru pET-30a(+), přičemž kompatibilní konce pro ligaci insertu a vektoru byly získány štěpením stejnými restrikčními endonukleasami Nde I a Hind III. Bylo připraveno zásobní množství plasmidu s pracovním označením pETNKRA, správnost připraveného plasmidu byla ověřena sekvenací. Bylo získáno 120 μg DNA, toto množství

je odpovídající použitému protokolu a dostatečné pro provedení mnoha expresních experimentů pro přípravu proteinu.

Při rekombinantní expresi proteinu srNKR-P1A se osvědčily kompetentní buňky *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIPL. Podmínky pro velkoobjemovou produkci proteinu byly převzaty z naší laboratoře, za podmínek uvedených v metodické části jsou úspěšně produkovány i jiné receptory C-lektinového typu zkoumané v laboratoři Prof. Bezoušky. Protein srNKR-P1A je produkován ve formě inkluzních tělísek, jejich izolace probíhala za podmínek uvedených v sekci metody. Tento postup se jevil jako nejlepší, podmínky této izolace byly částečně převzaty z pokusů vykonaných skupinou H. Kogelberg [67]. Pro renaturaci proteinu byla zvolena metoda naředění do renaturačního pufru, tato metoda i podmínky renaturace se prokázaly jako dostatečně účinné již dříve. Purifikace proteinu srNKR-P1A probíhala třístupňovým procesem. Jako první krok byla zařazena ionexová chromatografie na koloně Q-Sepharosy, tato chromatografie sloužila zároveň k zakoncentrování roztoku proteinu. Druhým krokem při purifikaci proteinu byla gelová chromatografie, při které docházelo k značnému, ne však úplnému, načištění proteinu. Byl tedy hledán další purifikační krok, byla zkoušena například chromatografie na reverzní fázi, ale jako nejlepší z hlediska čistoty získaného proteinu se jevila ionexová chromatografie na koloně SOURCE 15Q 4.6/100 PE. Renaturace a purifikace byla provedena několikrát pro získání dostatečného množství proteinu srNKR-P1A, z 1 l LB média se podařilo získat kolem 0,5 až 1 mg proteinu srNKR-P1A. Identita proteinu srNKR-P1A byla potvrzena automatickým sekvenováním a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Výsledný purifikovaný protein srNKR-P1A byl analyzován pomocí ESI-FT-ICR hmotnostní spektrometrie Byla stanovena celková hmota proteinu, která odpovídala sekvenci proteinu srNKR-P1A včetně správného uzavření disulfidových můstků. Získané množství proteinu bylo dostačující pro provedení strukturních i vazebných studií.

S proteinem srNKR-P1A byly provedeny některé další experimenty. Metodou dynamického rozptylu světla bylo zjištěno, že molekuly proteinu srNKR-P1A se v roztoku vyskytují ve formě monomerů. Tento výsledek byl potvrzen také analýzou dat z analytické ultracentrifugace a je v souladu s výsledkem publikovaným v článku H. Kogelberg [67]. Dále bylo změřeno Ramanovo spektrum metodou DCDR, touto metodou bylo zjištěno zastoupení jednotlivých prvků sekundární struktury, které pravděpodobně odpovídá nativní konformaci proteinu.

S proteinem srNKR-P1A byly provedeny vazebné inhibiční experimenty. Pro tyto studie byl použit protein srNKR-P1A značený izotopem $^{125}I$. Byla zkoumána inhibice vazby tohoto proteinu na ligand – BSA-chitobiosu. Nejlepším monosacharidovým inhibitorem této vazby byl N-acetyl-D-mannosamin. Dále byla zkoumána inhibice vazby lineárními chitooligomerními sacharidy – chitobiosou až chitopentaosou, tedy sacharidy obsahujícími N-acetyl-D-glukosaminové jednotky vázané β1→4 vazbou. Byla prokázána zvyšující se afinita se stoupajícím počtem N-acetyl-D-glukosaminových jednotek do úrovně chitotetraosy, u chitopentaosy došlo ke snížení afinity. V případě testovaných disacharidů s jiným typem vazby než β1→4 došlo vždy ke snížení afinity oproti stejnému disacharidu s β1→4 vazbou. Dále byly testovány lineární chitooligomerní sacharidy s modifikacemi na neredukujícím/redukujícím konci. Záměnou GlcNAc za epimer GalNAc na neredukujícím konci se afinita zvýšila stejně jako záměnou GlcNAc na ManNAc na konci redukujícím. Nejvyšší afinity bylo vždy dosaženo pokud byly modifikovány oba konce oligosacharidu. Nejlepším oligosacharidovým inhibitorem byl tetrasacharid GalNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4ManNAc. Získané výsledky odpovídají výsledkům publikovaným pro rekombinantní rozpustnou dimerní formu receptoru rNKR-P1A [86]. Dalšími testovanými látkami byla tzv. molekulární pravítka, což jsou lineární molekuly obsahující na obou koncích sacharidovou strukturu a různý počet spojovacích atomů uhlíku. Látky typu $(GalNAc\beta1,4GlcNAc\beta1,4GlcNAc\beta1,4ManNAc\text{-}NH\text{-}CS\text{-}NH)_2\ (CH_2)_x$ byly velmi účinnými inhibitory, -log $IC_{50}$ bylo ve většině případů < 10, tyto sloučeniny budou podrobeny dalšímu testování. Slabými inhibitory byly větvené oligosacharidy, molekulárním modelováním sacharid vázající domény receptoru rNKR-P1A byla prokázána existence vazebné rýhy pro lineární oligosacharidy [87], to vysvětluje nízký stupeň inhibice větvenými oligosacharidy. Posledním typem testovaných látek byly sloučeniny typu dendrimerů obsahující β-N-glykosidicky vázaný GlcNAc, které se jevily jako účinné inhibitory vazby proteinu srNKR-P1A na ligand BSA-chitobiosu.

S fluorescenčně značeným proteinem byly vykonány přímé vazebné experimenty. Jednotlivé testované potencionální ligandy byly rozděleny do osmi modulů dle typu sacharidové struktury. V prvním modulu byly testovány monosacharidové ligandy, byla prokázána vazba na N-acetylované hexosaminy a také na L-Fuc. V modulu neutrálních lineárních homooligomerních sacharidů byla opět zjištěna stoupající afinita ligandů chitobiosa až chitotetraosa, také byla prokázána afinita k N-acetyl-D-galaktosaminovým jednotkám vázaných β1→4 vazbou. Naopak nebyla prokázána vazba v řadě maltobiosa až

maltotetraosa, vazba nebyla prokázána ani v případě cellobiosy. Tento výsledek je v souladu s již publikovanými výsledky [86] – 2-deoxy-2-acylamidová skupina je pro vazbu rozhodující. V třetím modulu byly testovány neutrální lineární heterooligomery, nejvyšší afinitu měl opět tetrasacharid GalNAcβ1,4GlcNAcβ1,4GlcNAcβ1,4ManNAc. Neutrální větvené jednoduché sacharidy vykazovaly slabou afinitu. Větvení sacharidu afinitu k proteinu rNKR-P1A snižuje [87]. V dalším modulu (neutrální větvené komplexní sacharidy) byla prokázána vazba sloučenin typu dendrimerů obsahujících β-N-glykosidicky vázaný GlcNAc. Nízkou afinitu vykazovaly rovněž sacharidy s označením $N_2$ a $N_4$. Jedná se o větvený heptasacharid resp. dekasacharid zakončený N-acetyl-D-glukosaminem. V ostatních modulech byly použity nikoliv neutrální, ale nabité sacharidy (obsahující sulfátovou, fosfátovou či karboxylovou skupinu). V případě sialovaných jednoduchých sacharidů byla prokázana vysoká afinita ligandů s α2→3 vázanou kyselinou sialovou. Naopak pokud byla kyselina sialová vázána α2→6 vazbou k vazbě ligandu nedocházelo. Zvýšení afinity v případě sialovaných jednoduchých sacharidů a preference α2→3 vázané kyseliny sialové odpovídá již publikovaným výsledkům [88]. V tomto modulu byla testována také sloučenina GlcNAcβ1,4GalNAcA, která vykazovala rovněž vysokou afinitu. U sialovaných komplexních sacharidů byly výsledky obdobné, ale afinita těchto ligandů byla výrazně nižší. V posledním modulu byly testovány látky odvozené od chondroitinsulfátu a heparinu, vysoká afinita těchto ligandů byla prokázána již dříve [88], avšak tyto ligandy mají řadu nevýhod, příkladem je nízká stabilita a vysoká cena. V laboratoři Prof. Bezoušky se s nimi příliš nepracuje, i přesto byly součástí těchto experimentů.

Část proteinu srNKR-P1A byla předána Ing. Petru Kolenkovi z ÚMCH AV ČR k provedení krystalizačních pokusů. Doposud bylo vyzkoušeno mnoho krystalizačních podmínek, ale prozatím bezúspěšně, a to jak s předchozím delším konstruktem tohoto proteinu (kde bylo ovšem vždy limitujícím faktorem omezené množství i čistota proteinu), tak i mnou připravenou kratší variantou srNKR-P1A vyšší čistoty. Proto byla provedena methylace lysinových zbytků proteinu srNKR-P1A dle postupu popsaného v literatuře [89], metoda methylace lysinových zbytků je běžně využívanou „záchrannou“ metodou u proteinů, jejichž krystaly se nepodařilo získat [89]. Methylovaný protein srNKR-P1A byl podroben mnoha krystalizačním experimentům, ale vhodné podmínky nebyly ani v tomto případě doposud nalezeny, jejich hledání stále pokračuje.

# 7. Souhrn

- byl připraven expresní vektor kódující část extracelulární domény proteinu rNKR-P1A v rozmezí aminokyselin $Ala_{90}$ až $Lys_{215}$

- správnost připraveného vektoru byla ověřena restrikčním štěpením a DNA sekvenováním

- byl připraven, renaturován a purifikován rekombinantní protein srNKR-P1A

- protein srNKR-P1A byl získán v množství dostatečném pro další studie

- správnost připraveného proteinu byla potvrzena sekvenováním a hmotnostní spektrometrií

- protein srNKR-P1A byl charakterizován pomocí fyzikálně chemických metod

- s proteinem srNKR-P1A byly provedeny vazebné experimenty

# 8. Seznam citované literatury


1. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie. Triton, Praha (2005)
2. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: Eur. J. Immunol. 5, 112-117 (1975)
3. Robertson, M. J., Ritz, J.: Blood 76, 2421-2438 (1990)
4. Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., Walzer, T.: Immunol. Rev. 220, 169-182 (2007)
5. Lai, L., Alaverdi, N., Maltais, L., Morse, H. C.: J. Immunol. 160, 3861-3868 (1998)
6. Hallett, W. H. D., Murphy, W. J.: Semin. Cancer. Biol. 5, 367-382 (2006)
7. Cooper, M. A, Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A.: Trends Immunol. 22, 633-640 (2001)
8. Perrit, D., Robertson, S., Gri, G., Showe, L., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G.: J. Immunol. 161, 5821-5824 (1998)
9. Kronenberg, M., Gapin, L.: Nat. Rev. Immunol. 8, 557-568 (2002)
10. Ljunggren, H. G., Karre, K.: Immunol. Today 11, 237-244 (1990)
11. Raulet, D. H., Vance, R. E.: Nat. Rev. Immunol. 7, 520-531 (2006)
12. Nagata, S.: Cell 88, 355-365 (1997)
13. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J.: Immunology, 5th Edition. W. H. Freeman and Company, New York (2003)
14. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin., M., Walzer, T., Ugolini, S.: Nat. Immunol. 9, 503-510 (2008)
15. Zhang, J., Croy, B. A., Tian, Z.: Cell. Mol. Immunol. 2, 123-129 (2005)
16. Vivier, E., Nunès, J. A., Vély, F.: Science 306, 1517-1519 (2004)
17. Lanier, L. L.: Nat. Immunol. 9, 495-502 (2008)
18. Ryan, J. C., Naper, C., Hayashi, S., Daws, M. R.: Immunol. Rev. 181, 126-137 (2001)
19. Tomasello, E., Bléry, M., Vély, F., Vivier, E.: Semin. Immunol. 12, 139-147 (2000)
20. Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., Moretta, L.: Immunol. Today 21, 228-234 (2000)
21. Lanier, L. L.: Annu. Rev. Immunol. 23, 225-274 (2005)
22. Lanier, L. L.: Annu. Rev. Immunol. 16, 359-393 (1998)
23. Barten, R., Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J., Wilson, J. M.: Trends Immunol. 22, 52-57 (2001)

24. Kelley, J., Walter, L., Trowsdale, J.: PLoS Genet. 1, 129-139 (2005)
25. McQueen, K. L., Parham, P.: Curr. Opin. Immunol. 14, 615-621 (2002)
26. Boyington, J. C., Sun, D.: Mol. Immunol. 38, 1007-1021 (2001)
27. Bezouška, K.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 535-563 (2004)
28. Drickamer, K.: J. Biol. Chem. 263, 9557-9560 (1988)
29. Sharon, N., Lis, H.: Glycobiology 14, 53-62 (2004)
30. Dodd, R. B., Drickamer, K.: Glycobiology 11, 71-79 (2001)
31. Drickamer, K., Taylor, M. E.: Annu. Rev. Cell. Biol. 9, 237-264 (1993)
32. Zelensky, A. N., Gready, J. E.: FEBS J. 272, 6179-6217 (2005)
33. Gabius, H. J.: Eur. J. Biochem. 243, 543-576 (1997)
34. Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F. M.: Nat. Rev. Immunol. 3, 304-316 (2003)
35. Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L., Phillips, J. H.: J. Immunol. 157, 4741-4745 (1996)
36. Weis, W. I., Taylor, M. E., Drickamer, K.: Immunol. Rev. 163, 19-34 (1998)
37. Smith, K. M., Wu, J., Bakker, A. B. H., Phillips, J. H., Lanier, L. L.: J. Immunol. 161, 7-10 (1998)
38. Dissen, E., Fossum, S., Hoelsbrekken, S. E., Saether, P. C.: Semin. Immunol., 20, 369-375 (2008)
39. Vance, R. E., Kraft, J. R., Altman, J. D., Jensen, P. E., Raulet, D. H.: J. Exp. Med. 188, 1841-1848 (1998)
40. Vance, R. E., Jamieson, A. M., Raulet, D. H.: J. Exp. Med. 190, 1801-1812 (1999)
41. Braud, V. M., Allan, D. S. J., O'Callaghan, C. A., Söderström, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., McMichael, A. J.: Nature 391, 795-799 (1998)
42. Mistry, A. R., O'Callaghan, C. A.: Immunology 121, 439-447 (2007)
43. Boles, K. S., Barten, R., Kumaresan, P. R., Trowsdale, J., Mathew, P. A.: Immunogenetics 50, 1-7 (1999)
44. Hamann, J., Montgomery, K. T., Kucherlapati, S. L. R., van Lier, R. A. W.: Immunogenetics 45, 295-300 (1997)
45. Plougastel, B., Dubbelde, C., Yokoyama, W. M.: Immunogenetics 53, 209-214 (2001)
46. Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., Santoni, A.: Immunol. Today 15, 479-483 (1994)

47. Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., Steinle, A.: Nat. Immunol. 7, 1334-1342 (2006)
48. Poggi, A., Rubartelli, A., Moretta, L., Zocchi, M. R.: Eur. J. Immunol. 27, 2965-2970 (1997)
49. Josien, R., Heslan, M., Soulillou, J. P., Cuturi, M. C.: J. Exp. Med. 186, 467-472 (1997)
50. Govaerts, M. M., Goddeeris, B. M.: Vet. Immunol. Immunopathol. 80, 339-344 (2001)
51. Rogers, S. L., Göbel, T. W., Viertlboeck, B. C., Milne, S., Beck, S., Kaufman, J.: J. Immunol. 174, 3475-3483 (2005)
52. Appasamy, P. M., Kenninston, T. W., Brissete-Storkus, C. S., Chambers, W. H.: Nat. Immunol. 15, 259-268 (1996)
53. Li, J., Rabinovich, B. A., Harren, R., Shannon, J., Miller, R.G.: Int. Immunol. 15, 411-416 (2003)
54. Lanier, L. L., Chang, C., Phillips, J. H.: J. Immunol. 153, 2417-2428 (1994)
55. Campbell, K. S., Giorda, R.: Eur. J. Immunol. 27, 72-77 (1997)
56. Ljutic, B., Carlyle, J. R., Filipp, D., Nakagawa, R., Michael, J., Zúñiga-Pflücker, J. C.: J. Immunol. 174, 4789-4796 (2005)
57. Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M.: Nat. Immunol. 4, 801-807 (2003)
58. Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H., Rulet, D. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 3527-3532 (2004)
59. Plougastel, B. F. M., Yokoyama, W. M.: Curr. Top. Microbiol. Immunol. 298, 77-89 (2006)
60. Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M.-J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., Braud, V. M.: J. Immunol. 176, 7791-7795 (2005)
61. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. A., Warren, H. S., Lanier, L. L.: J. Immunol. 176, 7796-7799 (2005)
62. Chambers, W. H., Vujanovic, N. L., Deleo, A. B., Olszowy, R., Herberman, R. B., Hiserodt, J. C.: J. Exp. Med. 169, 1373-1378 (1989)
63. Giorda, R., Rudert, W. A., Vavassori, C., Chambers, W. H., Hiserodt, J. C., Trucco, M.: Science 249, 1298-1300 (1990)

64. Brissette-Storkus, C., Kaufman, C. L., Pasewicz, L., Worsey, H. M., Lakomy, R., Ildstad, S. T., Chambers, W. H.: J. Immunol. 152, 388-396 (1994)
65. Drickamer, K.: Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 393-400 (1993)
66. Day, A. J.: Biochem. Soc. Trans. 22, 83-88 (1994)
67. Kogelberg, H., Lawson, A. M., Muskett, F. W., Carruthers, R. A., Feizi, T.: Protein Expr. Purif. 20, 10-20 (2000)
68. Bezouška, K., Vlahas, G., Horváth, O., Jinochová, G., Fišerová, A., Giorda, R., Chambers, W. H., Feizi, T., Pospíšil, M.: J. Biol. Chem. 269, 16945-16952 (1994)
69. Ryan, J. C., Niemi, E. C., Goldfien, R. D., Hiserodt, J. C., Seaman, W. E.: J. Immunol. 147, 3244-3250 (1991)
70. Ryan, J. C., Niemi, E. C., Nakamura, M. C., Seaman, W. E.: J. Exp. Med. 181, 1911-1915 (1995)
71. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York (1989)
72. Laemmli, U. K.: Nature 227, 680-685 (1970)
73. Bradford, M. M.: Anal. Biochem. 72, 248–254 (1976)
74. Edman, P.: Acta Chem. Scand. 4, 283-293 (1950)
75. Billeci, T. M., Stults, J. T.: Anal. Chem. 65, 1709-1716 (1993)
76. Zhang, D., Xie, Y., Mrozek, M. F., Ortiz, C., Davisson, V. J., Ben-Amotz, D.: Anal. Chem. 75, 5703-5709 (2003)
77. Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J: Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, Brno, str. 34 (2005)
78. de la Torre, J. G., Huertas, M. L., Carrasco, B.: Biophys. J. 78, 719-730 (2000)
79. Vaněk, O., Nálezková, M., Kavan, D., Borovičková, I., Pompach, P., Novák, P., Kumar, V., Vannucci, L., Hudeček, J., Hofbauerová, K., Kopecký, V., Brynda, J., Kolenko, P., Dohnálek, J., Kadeřávek, P., Chmelík, J., Gorčík, L., Žídek, L., Sklenář, V., Bezouška, K.: FEBS J. 275, 5589-5606 (2008)
80. Schuck, P.: Biophys. J. 78, 1606-1619 (2000)
81. Philo, J., Gates, D., Laue, T.: www.jphilo.mailway.com/download.htm
82. Schuck, P.: Anal. Biochem. 320, 104-124 (2003)
83. Alix, A. J. P., Pedanou, G., Berjot, M.: J. Mol. Struct. 174, 159-164 (1988)
84. Williams, R. W.: Methods Enzymol. 130, 311-331 (1986)
85. Berjot, M., Marx, J., Alix, J. P.: J. Raman Spectrosc. 18, 289-300 (1987)

86. Krist, P., Herkommerová-Rajnochová, E., Rauvolfová, J., Semeňuk, T., Vavrušková, P., Pavlíček, J., Bezouška, K., Petruš, L., Křen, V.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 287, 11-20 (2001)
87. Plíhal, O., Byrtusová, P., Pavlíček, J., Mihók, L., Ettrich, R., Man, P., Pompach, P., Havlíček, V., Hušáková, L., Bezouška, K.: Czech. Chem. Commun. 69, 631-644 (2004)
88. Bezouška, K., Yuen, C. T., O'Brien, J., Childs, R. A., Chai, W., Lawson, A. M., Drbal, K., Fišerová, A., Pospíšil, M., Feizi, T.: Nature 372, 150-157 (1994)
89. Walter, T. S., Meier, C., Assenberg, R., Au, K. F., Ren, J., Verma, A., Nettleship, J. E., Owens, R. J., Stuart, D. I., Grimes, M.: Structure 14, 1617-1622 (2006)

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

| Jméno, adresa | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|---|---|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |