

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie



Příprava vektoru pro rekombinantní expresi proteinu

NKR-P1B, receptoru potkaních NK buněk

Bakalářská práce

Novotná Lenka

Školitel: Mgr. Ondřej Vaněk

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Praha 2008

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

pr.č. 129 b/08 stud
(broch)

BP biochemie 2008 jaro

Purchartová

KW: silymarin, antioxidanty, hepatotoxicita, lipoperoxidace
obory: biochemie, farmakologie, xenobiochemie

Růžička

KW: epitopy, imunizace, predikce imunogenicity
obory: biochemie, imunologie, xenobiochemie

Řádek

KW: fotosyntetická reakční centra, pigmentproteinové komplexy
obory: biochemie, fyziologie rostlin

Novotná

KW: rekombinantá proteiny, NK buňky, buněčné receptory, apoptosa
Obory: biochemie, molekulární biologie, imunologie

Petrovičová

KW: indukované přizpůsobení, docking, cytochromy P450, naftoflavon
Obory: obory: biochemie, biofyzika, xenobiochemie

Poděkování

Touto cestou bych ráda vyjádřila poděkování svému školiteli Mgr. Ondřeji Vaňkovi za odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při vypracovávání mé bakalářské práce, cenné rady a připomínky.


Dále mé poděkování patří vedoucímu bakalářské práce Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracování bakalářské práce. Děkuji i všem členům Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR za vytvoření příjemného a tvůrčího pracovního prostředí.

Rovněž děkuji svým rodičům, kteří mne podporovali po dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele Mgr. Ondřeje Vaňka a všechny použité prameny, z nichž jsem pro svou práci čerpala způsobem ve vědecké práci obvyklým, jsem řádně citovala.

V Praze dne 16. 5. 2008



Podpis

Lenka Novotná v.r.

Seznam použitých zkratek

| | |
|----------------|--|
| ADCC | cytotoxická reakce založená na protilátkách (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) |
| bp | počet párů bazí, jednotka délky řetězce DNA |
| BSA | hovězí sérový albumin |
| CD | označení povrchových molekul leukocytů |
| Clr | protein příbuzný lektinům C-typu (C-type lectin related) |
| CRD | lektinová doména rozpoznávající sacharid (Carbohydrate-Recognition Domain) |
| CTLD | doména podobná lektinům C-typu (C-Type Lectin-like Domain) |
| dd | destilovaný, deionizovaný |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | směs deoxynukleotidtrifosfátů |
| DTT | dithiothreitol |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylenediamine tetraacetic acid) |
| EtOH | ethanol |
| Fc | fragment imunoglobulinu po štěpení papainem |
| FcγRIII | receptor III pro Fc část IgG |
| H-2 | hlavní histokompatibilní myší komplex |
| HLA | hlavní histokompatibilní lidský komplex (Human Leukocyte Antigen) |
| IFN | interferon |
| IL | interleukin |
| Ig G | imunoglobulin G |
| ITAM | imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif) |
| ITIM | imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif) |
| KIR | zabíječský receptor imunoglobulinového typu (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors) |
| LAK | lymfokinem aktivované buňky |
| LB | název média dle Luria-Bertaniho |

| | |
|----------------------|---|
| LCR | komplex genů leukocytárních receptorů |
| M | mol.dm ⁻³ |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex (M ajor H istocompatibility C omplex) |
| NaAc | octan sodný |
| NK | přirozený zabijec (Natural Killer) |
| NKC | komplex genů NK buněčných receptorů (Natural Killer Complex) |
| NKD | NK buněčná doména |
| NKR-P | protein receptoru NK buňky (Natural Killer cell Receptor Protein) |
| NK-T | přirozeně zabíječské T buňky |
| PCR | polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) |
| RCMV | potkaní cytomegalovirus (Rat cytomegalovirus) |
| RCTL | potkaní lektinům C-typu podobný genový produkt (Rat C-type Lectin-like gene produkt) |
| rpm | počet otáček za minutu |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| Tc | prekurzor cytotoxických T lymfocytů (Cytotoxic T cell precursor) |
| T_H | pomocný T lymfocyt (Helper T Cell) |
| TCR | antigenní receptor T lymfocytů (T-Cell Receptor) |
| TNF | faktor nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Factor) |
| Tris | 2-amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (trishydroxymethylaminomethane) |

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Seznam použitých zkratk | 4 |
| Předmluva | 8 |
| 1. LITERÁRNÍ ÚVOD | 9 |
| 1.1. Imunitní systém | 9 |
| 1.2. NK buňky | 11 |
| 1.3. Funkce NK buněk v imunitním systému | 12 |
| 1.4. Receptory NK buněk | 14 |
| 1.4.1. Receptory C-lektinového typu | 15 |
| 1.4.2. Receptory imunoglobulinové rodiny | 16 |
| 1.4.3. Rodina receptorů NKR-P1 | 17 |
| 1.5. rNKR-P1B | 18 |
| 2. CÍL PRÁCE | 20 |
| 3. MATERIÁL | 21 |
| 3.1. Přístroje a pomůcky | 21 |
| 3.2. Chemikálie | 22 |
| 3.2.1. Enzymy | 23 |
| 3.2.2. Bakteriální kmeny | 23 |
| 3.2.3. Vektory | 23 |
| 3.2.4. Primery pro PCR | 23 |
| 3.2.5. Roztoky a média | 24 |
| 4. METODY | 26 |
| 4.1. Fosforylace primeru | 26 |
| 4.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 26 |
| 4.3. Agarosová elektroforéza | 26 |
| 4.4. Srážení PCR produktu | 27 |
| 4.5. Úprava insertu restrikčním štěpením | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6. Příprava linearizovaného plasmidu | 27 |
| 4.7. Preparativní elektroforéza | 28 |
| 4.8. Extrakce DNA z gelu pomocí kitu | 28 |
| 4.9. Ligace | 29 |
| 4.10. Transformace expresního vektoru do buněk | 29 |
| 4.11. Rychlá izolace plasmidové DNA | 30 |
| 4.12. Štěpení restričními endonukleasami Hind III, Nde I | 30 |
| 4.13. Mini-preparativní izolace plasmidové DNA | 30 |
| 4.14. Kontrolní restriční štěpení | 31 |
| 4.15. Maxipreparace plasmidové DNA..... | 31 |
| 4.16. Kontrolní restriční štěpení zásobního roztoku plasmidu..... | 33 |
| 4.17. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA..... | 34 |
| 4.18. Automatické sekvenování DNA | 34 |
| 5. VÝSLEDKY | 35 |
| 5.1. Příprava expresního vektoru | 35 |
| 5.2. Ověření správnosti připraveného vektoru restričním štěpením | 39 |
| 5.3. Příprava zásobního množství plasmidu..... | 40 |
| 5.4. Sekvence insertu rNKR-P1 | 42 |
| 6. DISKUSE | 43 |
| 7. ZÁVĚR..... | 45 |
| 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 46 |

Předmluva

NK (z angl. natural killer) buňky představovaly po mnoho let záhadu, v posledních době dochází k dramatickému obratu a NK buňky se zařazují mezi hlavní předměty zájmu imunologie.

NK buňky jsou buňky imunitního systému, jenž mají schopnost zabíjet buňky se sníženou expresí MHC molekul I. třídy (z angl. major histocompatibility complex). Sníženou produkcí těchto molekul se buňky brání před napadáním cytotoxickými lymfocyty. Snížená exprese je vykazována především u nádorových buněk a viry infikovaných buněk. NK buňky nemají na svém povrchu žádné antigenně specifické receptory. Disponují však receptory, pomocí kterých kontrolují povrchovou expresi MHC I jiných buněk. Jedním z takovýchto receptorů NK buněk je receptor rNKR-P1B.

Poznatky o receptorech NK buněk nejsou zajímavé jen z vědeckého hlediska, ale mohou najít uplatnění například při již zmiňované imunoterapii některých nádorových onemocnění. Prvním krokem k objasnění některých tajů tohoto receptoru by mohla být právě tato bakalářská práce, jejímž hlavním cílem bylo připravit rekombinantní plasmid, který by kódoval receptor rNKR-P1B. Ten by se mohl v dalších experimentech použít na přípravu expresních konstruktů, které by kódovaly část extracelulární domény receptoru rNKR-P1B. Následně by mohl být využit na přípravu rekombinantního proteinu, který by po renaturaci a purifikaci mohl sloužit ke studiu vazebných a strukturních charakteristik tohoto receptoru.

1. Literární úvod

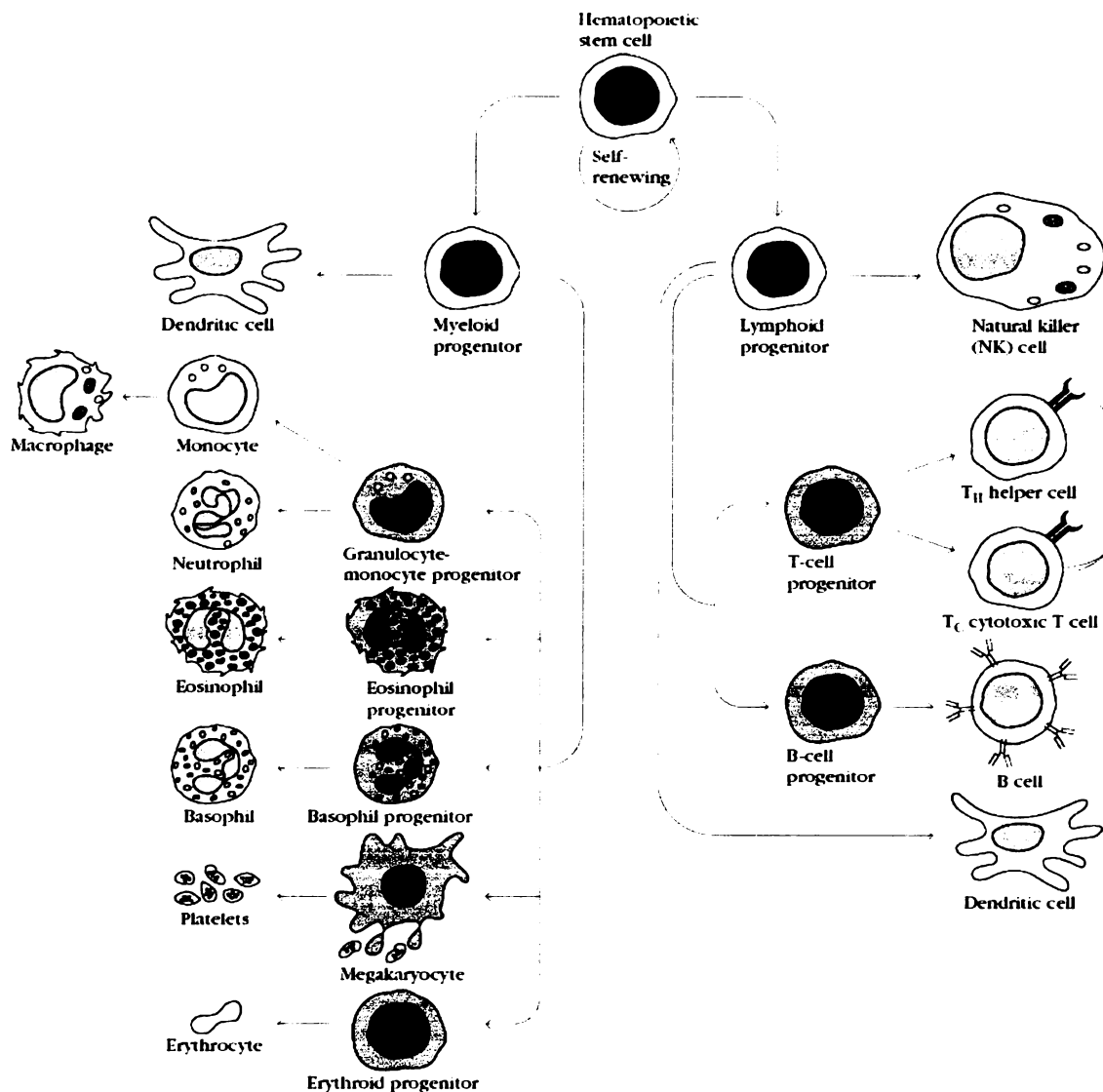
1.1. Imunitní systém

Imunitní systém patří mezi nejdůležitější homeostatické mechanismy organismu. Jeho základní funkcí je rozpoznávat škodlivé látky od neškodných, a tím chránit organismus od cizích či vlastních potencionálně škodlivých struktur jejich likvidací. Tato funkce se projevuje jako obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled¹.

Hlavní komponentou imunitního systému jsou buňky imunitního systému (imunocyty). Všechny krevní buňky, včetně různých druhů bílých krvinek (leukocyty) tvořících podstatnou část imunocytů, vznikají z pluripotentních kmenových buněk uložených v kostní dřeni. Z kmenových buněk vznikají dvě základní linie, a to myeloidní a lymfoidní (obr. 1, str. 10). Během vývoje daných linií se kmenové buňky diferencují na progenitorové buňky, které postrádají schopnost dělení a sebeobnovování¹.

Z myeloidní linie vznikají buňky, které tvoří základ nespecifické (neadaptivní) části imunitního systému. U většiny těchto buněk nalézáme schopnost fagocytózy a produkce cytokinů. Jedná se o monocyty, dále pak o tři druhy granulocytů: neutrofilů, eozinofilů a bazofilů. Do této linie se také zařazují dendritické buňky vznikající z monocytů, erytrocyty a trombocyty, jejichž hlavní funkce nesouvisí s imunitním systémem.

Z lymfoidních progenitorových buněk se diferencují B, T a NK buňky. Vývin B lymfocytů probíhá u lidí v kostní dřeni a dokončuje se po střetnutí s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Konečným stádiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky, které produkují protilátky. Hlavní část vývinu T lymfocytů, jejichž název je odvozen od místa dozrávání, se odehrává v thymu čili brzlíku (z latin. thymus), kde vznikají prekurzory pomocných T buněk (T_H) a prekurzory cytotoxických T buněk (T_C)¹.



Obr. 1: Diferenciace různých druhů imunocytů z kmenové buňky. Převzato z [2].

Imunitní systém využívá dvou základních mechanismů, a to neadaptivního (nespecifického) mechanismu a adaptivního (antigenně specifického) mechanismu. Pro obratlovce jsou oba uvedené mechanismy nezbytné a vzájemně spolupracují.

Prvně zmiňovaný neadaptivní, též nespecifický, mechanismus je evolučně starší, v určité formě jej nalzáme u všech mnohobuněčných organismů. Základní složky tohoto mechanismu tvoří zejména buněčný a humorální systém. Mezi buněčné složky řadíme fagocytující a přirozeně cytotoxické (NK) buňky. Humorální systém je reprezentován komplementovým systémem, interferony, lektiny a dalšími sérovými proteiny. Tyto

molekuly a buňky, nemající tzv. imunologickou paměť, jsou v organismu připravené předem. Jejich reakce na společné strukturní nebo funkční rysy škodlivin je velmi rychlá, řádově probíhá v minutách ¹.

Oproti neadaptivnímu mechanismu je adaptivní mechanismus evolučně mladší, přítomný až od obratlovců. Využívá tzv. imunologickou paměť, kdy specifické molekuly adaptivního mechanismu (protilátky, antigenně specifické receptory T-lymfocytů) reagují na cizorodé látky až po setkání s daným antigenem. Rozvoj imunitní reakce je pomalejší, řádově nastává za několik dnů až týdnů ¹.

1.2. NK buňky

Třetí subpopulací lymfocytů jsou NK (z angl. natural killer) buňky, které jsou vývojově bližší T lymfocytům než B lymfocytům a diferencují se společně s B a T buňkami z lymfoidní linie z pluripotentních kmenových buněk vyskytujících se v kostní dřeni. Oproti T a B lymfocytům NK buňky vykazují absenci antigenně specifických receptorů, z tohoto důvodu se zařazují mezi antigenně nespecifické (neadaptivní, vrozené) obranné mechanismy imunitního systému ³.

NK buňky jako první charakterizoval Kiessling se spolupracovníky v roce 1975. Názvem NK buňky byly prvotně charakterizovány cytotoxické buňky, které měly schopnost zabít některé nádorové buňky bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciace ⁴.

Původně byla buněčná aktivita NK popsána u myši a lidí, později byly tyto buňky izolovány z mnoha dalších obratlovců, včetně opic, potkanů, křečků, koček, psů, ptáků a ryb. NK buňky zastupují 10-20 % všech krevních lymfocytů. Nacházejí se především ve slezině, kostní dřeni, játrech, plicích, střevech a rovněž v periferní krvi ³.

Z morfologického hlediska jsou NK buňky velké granulární lymfocyty, z tohoto důvodu bývají označovány zkratkou LGL (z angl. large granular lymphocytes). Charakteristickými rysy jsou velké, kulaté jádro, dále cytoplazma bohatá na různé organely (Golgiho aparát, mitochondrie, cytotoxické granule) ⁵.

Hlavním cytotoxickým nástrojem jsou cytotoxické granule obsahující perforin a granzymy. Perforin je monomerní, na Ca^{2+} závislý protein schopný vytvářet homopolymerní cirkulární póry. Jsou známy případy, kdy tyto póry mohou zcela proděravět membránu a způsobit smrt buňky osmotickou lýzou. Granzymy jsou serinové

proteasy, které na základě rozštěpení různých substrátů spustí signalizační kaskády, které v konečném důsledku vedou k apoptické smrti cílové buňky².

1.3. Funkce NK buněk v imunitním systému

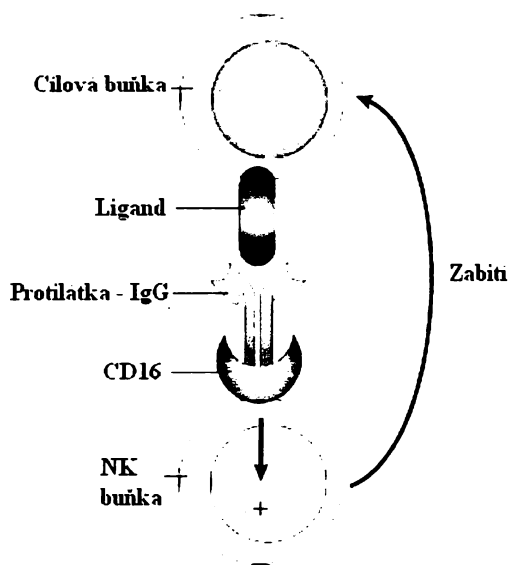
Vykonávat imunitní dozor, rozeznávat a cytotoxicky zabíjet nádorové buňky a viry infikované buňky jsou hlavními funkcemi NK buněk. Děj se odehrává velmi rychle bez předchozí stimulace, diferenciace a proliferace. Mechanismus rozeznávání abnormálních buněk vysvětluje „*missing-self recognition*“ hypotéza. Podle této hypotézy NK buňky rozpoznávají především buňky, které mají na svém povrchu abnormálně málo MHC molekul I. třídy (z angl. major histocompatibility complex). Interakce mezi NK buňkou a cílovou buňkou, s potlačenou expresí MHC glykoproteinů I třídy, vede k apoptóze a nekróze cílové buňky¹.

Hlavní histokompatibilní komplex je skupina genů, jejichž produkty zastávají zásadní úlohu v mezibuněčném rozeznávání vlastního od cizího. U lidí je MHC, hlavní histokompatibilní komplex, nazýván HLA (z angl. human leukocyte antigen). Ten je umístěn na chromosomu 6. Homologické myší molekuly jsou označovány H-2 a nachází se na chromosomu 17. V obou případech je MHC organizován do oblastí kódujících dva hlavní typy molekul MHC².

Poté, co je rozpoznána abnormální buňka, dochází k aktivaci NK buněčné činnosti na základě převahy stimulačních signálů. NK buňky používají tři druhy cytotoxických mechanismů. Cytotoxické granule, obsahující již zmiňovaný perforin a granzymy, migrují k plazmatické membráně v místě kontaktu buněk, fúzí s membránou a jejich obsah je uvolněn do úzké štěrbině mezi buňkami. Tato štěrbině bývá často označovaná jako imunologická synapse. Perforin vytváří cirkulární póry o průměru 16 nm, které slouží k tomu aby se do buňky dostaly granzymy. Ty štěpí v cytoplazmě prekurzory proteas ze skupiny tzv. kaspas, čímž dochází k jejich aktivaci. Kaspasy následně spustí sled reakcí, který končí apoptotickou smrtí buňky¹.

Druhým cytotoxickým mechanismem je cytotoxická reakce závislá na protilátkách označovaná ADCC (z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity) (obr. 2, str. 13), kdy NK buňky na svém povrchu exprimují specifické receptory CD16 a CD56. Charakteristická molekula NK buňky CD16 je FcγRIII receptor, který váže Fc (konstantní část protilátek) třídy IgG^{1,3}. NK buňky rozpoznávají buňky opsonizované protilátkami

IgG, vzhledem k výše uvedené interakci Fc části IgG s receptorem CD16. Tato interakce způsobuje agregaci receptorů, přenos signálu a aktivaci cytotoxické reakce ADCC ⁶. Molekula CD16 se nachází i na povrchu neutrofilů, makrofágů a některých T lymfocytů. CD56 je neutrální adhezivní molekula imunoglobulinové skupiny. Molekuly CD16 a CD56 jsou v současné době považovány za věrohodné markery lidských NK buněk, a to i přes skutečnost jejich minoritního výskytu na T lymfocytech. ⁷.



Obr. 2: Znárodnění ADCC. Převzato ze [6].

Na závěr zmiňovaným, třetím cytotoxickým mechanismem je Fas-Fas ligandová cesta, kterou lze vysvětlit následujícím způsobem. Na povrchu NK buněk se nachází protein zvaný Fas-ligand, který patří do rodiny TNF (z angl. tumor necrosis factor). Jako ligand se váže na apoptotický receptor Fas, přítomný na povrchu mnoha různých buněk. Signály jsou vedeny přes receptor Fas do buňky a kaskádou reakcí dochází k apoptotické smrti buňky ¹.

Vedle „likvidační“ funkce mají NK buňky i regulační funkce, ať už pozitivní či negativní. Pozitivní reakce je například podporování imunitní reakce typu T_{H1} produkcí IFN- γ . Výsledkem negativní regulace NK buněk jsou různá autoimunitní onemocnění. Regulační funkce jsou zprostředkovány produkcí cytokinů. Mezi nejvíce studované cytokiny patří interferony (IFN) a IL-2. Interferony α , β a γ mohou zvyšovat cytotoxickou aktivitu NK buněk, přičemž interferony α a β stimulují aktivitu NK buněk ve větší míře než IFN- γ . Interferony nezpůsobují proliferaci NK buněk, ale zdá se, že inhibují NK

buněčnou proliferaci, která je vyvolaná IL-2. Na druhé straně IFN a IL-2 synergicky zvyšují cytotoxicitu NK buněk ³.

1.4. Receptory NK buněk

NK buňky mají dva typy povrchových receptorů, které regulují aktivitu NK buněk. Jedná se o aktivační a inhibiční receptory. Aktivační receptory stimulují NK buňku v její cytotoxické aktivitě, inhibiční receptory naopak NK buňku v použití cytotoxických mechanismů inhibují. Výsledná reakce NK buňky po setkání s jinou buňkou je dána tím, převáží-li aktivační nebo inhibiční signály. Aktivační i inhibiční receptory lze rozdělit do dvou strukturních skupin, a to imunoglobulinové rodiny a rodiny C-lektinového typu .

Mechanismus působení aktivačního a inhibičního receptoru je následující. Po interakci aktivačního receptoru s ligandem dochází k přenosu aktivačního signálu. Stimulační receptory jsou charakteristické krátkou cytoplazmatickou doménou bez signál přenášejších prvků. Nepřenášejí tedy signál samy, ale pomocí oblastí bohatých na nabitě aminokyseliny, ležící v transmembránové části receptoru. Prostřednictvím nabitých zbytků, lokalizovaných v intracelulární části, nekovalentně asociují s transmembránovými adaptorovými proteiny, které jsou často potřebné pro jejich optimální povrchovou expresi. Významné adaptorové, transmembránové molekuly jsou například DAP12, FcεRIγ a CD3ζ. Aktivační receptory obsahují charakteristický imunoreceptorový tyrosin vázající aktivační motiv ITAM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Jedná se o sekvenci aminokyselin D/E-x-x-Y-x-x-L/I oddělenou 6-8 aminokyselinami od sekvence YxxL/I (Asp/Glu-x-x-Tyr-x-x-Leu-Ile-x₆₋₈-tyr-x-x-Leu/Ile). K aktivaci NK buněk dochází kaskádou fosforylačních reakcí ⁶.

Většina dosud známých inhibičních receptorů obsahuje imunoreceptorový tyrosin vázající inhibiční motiv ITIM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Tento motiv se sekvencí (V/I-x-Y-x-x-L/V) (Ile/Val/Leu/Ser/-x-Tyr-x-x-Leu/Val), kde „x“ označuje libovolnou aminokyselinu, se vyskytuje v cytoplazmatické doméně těchto receptorů v jedné či více kopiích. Po navázání ligandu na povrchový receptor je tyrosinový zbytek ITIM motivu fosforylován pravděpodobně kinasou Src rodiny. Dojde k aktivaci fosfatasy (SHP1) a další fosfatasy jako SHP2 nebo SHIP1 (inositol polyfosfát 5'fosfatasa). Fosfatasy snižují míru fosforylace různých intracelulárních signálních proteinů a tak je inhibována signalizační kaskáda ⁶.

Aktivační i inhibiční receptory jsou kódovány geny, které jsou uspořádány do dvou odlišných regionů: NK genový komplex (NKC, z angl. natural killer complex) a komplex receptorů leukocytů (z angl. leucocyte-receptor complex) LCR komplex ⁶.

NKC jako první definoval Yokohama a kol. jako skupinu genů nacházejících se u myši na chromosomu 6 ⁸. Analogický komplex byl u potkanů lokalizován na chromosomu 4 a na lidském chromosomu 12p13.1. NKC kóduje většinou lektinové receptory C-typu. Geny LRC se u lidí vyskytují na 19q13,4, u myši na chromosomu 7 a u potkanů na chromosomu 1. Receptory imunoglobulinové rodiny jsou kódovány právě tímto LCR komplexem ^{6,9}. Aktivační i inhibiční receptory dělíme do dvou strukturních skupin na imunoglobulinové rodiny a rodiny C-lektinového typu.

1.4.1. Receptory C-lektinového typu

Lektinové receptory C-typu jsou transmembránové proteiny II. typu, mající C-konec extracelulární a N-konec je lokalizován v cytoplazmě. Jsou klasifikovány, na základě homologie aminokyselinové sekvence, jako V. skupina C-lektinové rodiny z celkově sedmi odlišných skupin. Lektiny lze definovat jako malé globulární bílkoviny se sacharid rozpoznávající doménou, neboli CRD doménou (z angl. carbohydrate-recognition domain) o velikosti pohybující se okolo 130 aminokyselin ¹⁰. Lektiny mají schopnost specificky rozpoznávat a vázat sacharidy beze změny jejich struktury. Označení C-lektiny získaly na základě skutečnosti, že jejich vazebná aktivita je podmíněna přítomností Ca²⁺ iontů (z angl. Calcium type lectins). Klasické ligandy pro CRD domény jsou sacharidy a vápník.

Lektinové receptory C-typu se na povrchu buněk vyskytují jako disulfidicky, kovalentně, vázané dimery. V extracelulární části mívají většinou několik cysteinových zbytků pomocí kterých tvoří disulfidové můstky. Jejich struktura se skládá z lektinové CRD domény C-typu, dále obsahuje krček variabilní délky, transmembránovou část a krátký intracelulární řetězec ^{6,11}.

Mezi nejvýznamnější zástupce receptorů C-lektinového typu patří rodiny receptorů Ly-49, NKG2 a NKR-P1 (bude popsáno níže). Nejlépe charakterizovanou skupinou NKC komplexu jsou geny kódující rodinu receptorů Ly-49. Extracelulární, ligand vázající, doména těchto receptorů je nejlépe zřejmá u myši, u kterých bylo charakterizováno nejméně 24 genů a pseudogenů ¹². Jsou známy aktivační varianty (Ly-49d a Ly-49h) těchto

receptorů, přesto většina členů této rodiny má inhibiční funkci. Aktivační varianty receptorů Ly-49 byly nalezeny také u potkanů. Tyto formy mají v transmembránové doméně kladně nabitý arginin, který dovoluje interakci s negativně nabitým řetězcem kyseliny asparágové proteinu DAP-12 nesoucím ITAM motiv. Nejvýznamnější inhibiční varianty (Ly-49a, Ly-49c, Ly-49g, Ly-49i) v cytoplazmatické doméně obsahují ITIM motiv¹³.

Také rodina receptorů NKG2 je složena z aktivačních i inhibičních receptorů. Do této rodiny patří nejméně šest receptorů (NKG-2A až NKG-2F). Jedná se o transmembránové proteiny II. typu. Aby došlo k jejich expresi na buněčném povrchu a mohla být plněna jejich funkce, musí tyto receptory dimerizovat s molekulou CD94. Z této rodiny se vymyká receptor NKG-2D, neboť je jen omezeně homologní s jinými molekulami NKG-2 (28% shoda aminokyselin lektinů podobné domény). Oproti tomu ostatní molekuly NKG-2 jsou vysoce příbuzné (vykazují 70% shodu)⁶.

V posledních letech byly identifikovány další molekuly kódované NKC. Jedná se o lidský lektinům podobný transkript 1 označený LLT1 (z angl. lectin-like transcript), dále lidský aktivací indukovaný lektin C-typu označený AICL (z angl. activation-induced C-type lectin) a nakonec myší protein příbuzný C-lektinům označený Clr (z angl. C-lectin related protein). Tyto molekuly tvoří další rodinu receptorů, která je strukturně příbuzná molekule CD69. Daný receptor patří mezi první molekuly exprimované během aktivace NK buňky⁶.

1.4.2. Receptory imunoglobulinové rodiny

Zástupci receptorů druhé strukturní skupiny jsou membránové receptory NK buněk FcγRIII a CD2, ale zejména receptory KIR (z angl. killer Ig-like receptor). Receptory imunoglobulinové rodiny jsou kódovány LRC geny (z angl. leukocyte receptor komplex).

Tito nejvýznamnější představitelé receptorů KIR jsou transmembránovými proteiny I. typu, mají tedy N-konec lokalizovaný extracelulárně. Receptory jsou charakterizovány počtem imunoglobulinových domén. Podle počtu extracelulárních Ig-like domén se klasifikují dvě podrodiny, a to KIR2D, obsahující dvě domény imunoglobulinového typu, zatímco KIR3D disponuje třemi doménami. Receptory obou podrodin KIR jsou dále charakterizovány délkou cytoplazmatické domény, jež může být buď dlouhá (L) nebo krátká (S) a souvisí s funkcí receptoru. 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 prostřednictvím asociace nabitého lysinového zbytku konzervovaného v transmembránovém úseku s adaptorovým proteinem DAP12.

Některé receptory KIR mají specifické ligandy, kterými jsou klasické molekuly HLA (z angl. human leukocyte antigen). Byly nalezeny homology těchto receptorů u primátů, avšak myši nebo potkaní homology, které by rozeznávaly H-2, zatím nebyly identifikovány a jejich funkci u hlodavců tak pravděpodobně plní receptory rodiny Ly-49⁹.

¹⁴

1.4.3. Rodina receptorů NKR-P1

Další významnou rodinou receptorů kódovanou NKC je rodina NKR-P1. Receptory NKR-P1 patří do strukturní skupiny lektinů C-typu, jsou exprimovány jako disulfidicky vázané homodimery na povrchu většiny NK buněk a podskupiny T buněk⁹.

NKR-P1 je označení používané pro proteinový receptor NK buněk č.1 (z angl. natural killer receptor - protein 1), označovaný též jako CD161 (z angl. cluster of differentiation) nebo Klrb1 (z angl. Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1).

NKR-P1 byl prvním lektinovým receptorem nalezeným na povrchu NK buněk¹⁵. Tyto receptory byly identifikovány u myši, potkanů a člověka. Na myších NK buňkách se vyskytuje pět členů receptorů z rodiny NKR-P1. Receptory NKR-P1A, C, F patří mezi aktivační varianty, obsahují nabitý transmembránový úsek, který je důležitý pro asociaci s adaptorovou molekulou FcεRIγ. Naopak inhibiční receptory NKR-P1B a NKR-P1D ve své cytoplazmatické doméně obsahují motiv ITIM⁶. U potkanů byly nalezeny tři proteiny patřící do této rodiny, NKR-P1-A a dva receptory s odlišnými sekvencemi, které jsou v databázi GenBank uvedeny pod označením NKR-P1B, respektive U56936 a X97477. U56936 narušil od X97477 obsahuje ITIM motiv. Sekvence X97477 byla označena jako NKR-P1D^{16, 17}. Naproti tomu lidský gen pro NKR-P1 byl nalezen pouze v jedné funkční formě a označuje se jako NKR-P1A. Srovnáním aminokyselin lidského a myšičího NKR-P1 byla zjištěna podobnost v 46%¹⁸.

U všech hlodavčích receptorů NKR-P1 se nachází CxCP motiv, který byl také lokalizován v cytoplazmatických doménách receptorů CD4 a CD8, kde interaguje s protein tyrosin kinasou rodiny Src – p56^{lck}. Lidský receptor NKR-P1A tento motiv neobsahuje⁹.

Nedávno bylo zjištěno, že někteří příslušníci této rodiny interagují s molekulami příbuznými lektinům C typu, označených jako Clr (z angl. C-lectin related). Byly nalezeny fyziologické ligandy pro myší receptory NKR-P1B a rozeznávající Clr-b a NKR-P1F asociující s Clr-g¹⁹. Byl identifikován rovněž ligand pro lidský receptor hNKR-P1, kterým je LLT1 (z angl. lectin-like transcript)²⁰. Fyziologické ligandy pro ostatní receptory rodiny NKR-P1 dosud nebyly nalezeny⁹.

1.5. rNKR-P1B

Potkaní receptor NKR-P1B je součástí rodiny receptorů NKR-P1, která se zařazuje do superrodiny receptorů C-lektinového typu. U potkanů byly identifikovány tři isoformy rodiny NKR-P1, nesoucí označení A, B, D. rNKR-P1B je homodimerní transmembránový protein II. typu o velikosti 50kDa, který je exprimovaný především na povrchu NK buněk, ale i na povrchu NKT lymfocytů a aktivovaných CD8⁺ lymfocytů. Intracelulární doména obsahuje 43 aminokyselin, transmembránový úsek má délku 23 aminokyselin a extracelulární doména pozůstává z 157 aminokyselin⁶.

Gen kódující rNKR-P1B se nachází na 4 chromozomu (4q42), je součástí NKC komplexu a jeho nukleotidová sekvence je označena v databázi Genbank jako U56936. Sekvence NKR-P1B je značně konzervovaná u ptáků, hlodavců a jiných savců včetně člověka, což podporuje hypotézu, že sehrává signifikantní úlohu v přirozené imunitě²¹.

Protein NKR-P1B se zařazuje mezi inhibiční receptory, neboť signály, které NK buňka přes tento receptor dostane, participují na utlumení cytotoxických mechanismů. Inhibiční funkce receptoru byla predikována na základě přítomnosti charakteristické ITIM sekvence v cytoplazmatické doméně tohoto receptoru, absence nabitých aminokyselin v transmembránovém segmentu, možnosti exprese bez adaptorových molekul a na základě experimentů s intracelulárním influxem Ca²⁺²².

Identifikace ligandů receptoru NKR-P1B je nezbytná pro pochopení funkce a vlivu tohoto receptoru na NK buňky. Na základě prvotních výsledků výzkumu původně panoval názor, že tento receptor rozeznává přítomnost vápenatých iontů a sacharidové ligandy. Další výzkum v oblasti NK receptorů ukázal, že fyziologickým ligandem pro myší receptor

NKR-P1B je protein rodiny Clr isoforma b, který je známý také pod označením Ocil (z angl. osteoclast inhibitory lectin). Protein Clr patří do rodiny C-lektinového typu, jeho gen je součástí NKC komplexu a jeho exprese byla pozorovaná na osteoklastech a téměř všech hematopoetických buňkách s výjimkou erytrocytů²³. Podobně jako u molekul MHC I. třídy bylo i v případě Clr-b pozorováno markantní potlačení exprese na nádorových buněčných liniích, což podporuje tzv. MHC nezávislou „missing-self recognition“ hypotézu²⁴.

Signifikantní homologii k ligandu rClr-b vykazuje C-lektinový protein RCTL (z angl. rat C-type lectin-like gene produkt), který je kódovaný potkaním cytomegalovirem RCMV (z angl. rat cytomegalovirus). Ve snaze vyhnout se cytotoxickému působení NK buněk byla u RCMV pozorována unikátní strategie: výsledkem infekce RCMV je potlačení exprese rClr-b a na druhé straně výrazná stimulace exprese RCTL, který interaguje s rNKR-P1B a následně navozuje inhibici cytotoxických mechanismů NK buněk²⁵. Carlyle et. al. na základě uvedené strategie vysvětluje alelickou divergenci hlodavčích NKR-P1 receptorů, která se podle jeho hypotézy vyvíjí právě pod selekčním tlakem ve snaze vyhnout se únikové strategii viru .

U jednotlivých kmenů myši alelická divergence genů NKR-P1 způsobuje různou reaktivitu NK buněk vůči monoklonální protilátce PK136 (rozpoznávající epitop na povrchu receptoru NKR-P1B, historicky označovaný jako tzv. NK1.1 antigen), která je nejlépe pozorovatelná mezi kmeny B6 a BALB/c. Dochází k ní díky mutaci v jedné aminokyselině receptoru NKR-P1B, kdy je serin v pozici 191 (kmen B6) nahrazen threoninem (kmen BALB/c, sekvence odpovídající receptoru NKR-P1D). Nedochozí však ke změně ligandové specificity (receptor NKR-P1B pořád váže svůj ligand Clr-b). Velký počet alelických forem jednotlivých kmenů je pravděpodobně příčinou značné aloreaktivity NK buněk mezi jednotlivými kmeny.

Výzkum jednotlivých alelických forem tedy ukázal podstatný fakt, že isoforma D receptoru NKR-P1 reprezentuje divergující alelu genu receptoru NKR-P1B a ne jiný specifický receptor, jak se původně myslelo. Tyto skutečnosti se povedlo odhalit skupině vědců pod vedením J. R. Carlyla. Jejich výsledky potvrzují významnou úlohu interakce systémů NKR-P1 a Clr v rámci hranic jednotlivých kmenů, jako i jednotlivých druhů. Proto lze očekávat podobnost i u potkanů a jejich jednotlivých kmenů²⁶.

2. Cíl práce

- připravit expresní vektor pro protein rNKR-P1B
- ověřit správnost připraveného plasmidu restrikčním štěpením
- připravit zásobní množství plasmidu
- ověřit nukleotidovou sekvenci připraveného fragmentu DNA sekvenací

3. Materiál

3.1. Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy *AND, USA*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga Allegra X-22R *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga MPW-375 *Mechanika Precyzyjna, Polsko*
- Centrifuga VSMC-13 *Shelton scientific, USA*
- Centrifuga Z 233 MK-2 *Hermle, Německo*
- Centrifuga stolní, Spectrofuge 16M *Edison, USA*
- Chladnička *Zanussi, Itálie*
- JETQUICK Gel Extraction Spin Kit *Genomed, Německo*
- JETQUICK Plasmid Purification Spin Kit *Genomed, Německo*
- Ledovač UBE 50-35 *Ziegra, Německo*
- Luminescentní analyzátor LAS-1000 CH *Fuji photo film, Japonsko*
- Magnetická míchačka MM 2A *Lab.přístroje Praha, ČR*
- Mrazicí box (-80°C) Bio Freezer *Forma scientific, USA*
- Mrazicí box (-20°C) *Zanussi, Itálie*
- pH metr Φ 200 *Beckman, Německo*
- Předvážky HF-1200 G *AND, USA*
- Rotační vakuová odparka *Trigon, Francie*
- Souprava pro agarosovou elektroforézu *Sigma, USA*
- Spektrofotometr DU-70 *Beckman, Německo*
- Termocykler *Eppendorf, Německo*
- Termostat BT 120M *Lab.přístroje Praha, ČR*
- Třepačka *VELP Scientifica, Itálie*
- UV lampa UVGL-58 *Science Company, USA*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody Milli Q *Millipore, USA*
- Zdroj napětí BM 551 *Tesla, ČR*

3.2. Chemikálie

| | |
|---|---------------------------------|
| • Agar | <i>Oxoid, Anglie</i> |
| • Agarosa | <i>Jersey Lab Supply, USA</i> |
| • Ampicilin | <i>Biotika, SR</i> |
| • Bromfenolová modř | <i>Sigma, USA</i> |
| • BSA | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| • dNTP | <i>Fermentas, Kanada</i> |
| • EDTA | <i>Fluka, Švýcarsko</i> |
| • Ethanol | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Ethidiumbromid | <i>Jersey Lab Supply, USA</i> |
| • Fenol | <i>Reactiva, Rumunsko</i> |
| • Glukosa | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Glycerol | <i>Sigma, USA</i> |
| • Chlorid sodný | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Chloroform | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Isoamylalkohol | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Isopropylalkohol | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Kvasničný extrakt | <i>Imuna Pharm, ČR</i> |
| • Kyselina octová | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Octan sodný (NaAc) | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Polyethylenglykol (PEG) $M_r = 8000$ | <i>Fluka, Švýcarsko</i> |
| • Sacharosa | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Síran hořečnatý | <i>Lachema, ČR</i> |
| • Standard pro agarosovou elektroforézu | <i>New England Biolabs, USA</i> |
| • Tetracyklin | <i>Lab scientific, USA</i> |
| • Tris | <i>Serva, USA</i> |
| • Trypton | <i>Oxoid, Anglie</i> |

Všechny použité chemikálie byly nejvyšší komerčně dostupné čistoty, nejméně však čistot p. a. Byly použity bez dalšího přičištění.

3.2.1. Enzymy

- BstX I (10000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Dde I (10000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Deep Vent DNA polymerasa (2000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Hind III (20000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Klenowův fragment *Fermentas, Kanada*
- Lysozym *Fluka, Švýcarsko*
- Nde I (20000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- RNAasa A (10 mg/ml) *Sigma, USA*
- T4 DNA ligasa (5 U/μl) *Fermentas, Kanada*
- T4 polynukleotidkinasa (10000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Xba I (20000 U/ml) *New England Biolabs, USA*

3.2.2. Bakteriální kmeny

- *E. coli*: XL 1-BLUE STRAIN *E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^rZΔM15 Tn10 (Tet^r)]* *Stratagene, USA*

3.2.3. Vektory

- 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 RNKRP1 FW M2 *Generi Biotech, ČR*
5' TGG CTA AGT TAA AGT GCC CAA AAG AC 3'

3.2.5. Roztoky a média

- **LB agar:** 1,5 % agar v LB médiu

- použité koncentrace antibiotik:

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

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

- **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)

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

- **Pufř pro T4 DNA ligasu** - 1 x koncentrovaný: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, pH = 7,5 (*Fermentas, Kanada*)

- **EP pufř:** 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

- **NEB2 pufř:** 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH = 7,9 (*New England Biolabs, USA*)

- **NEB3 pufř:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH = 7,9 (*New England Biolabs, USA*)

- **PCR pufř** - Thermo pol, 1 x koncentrovaný: 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100, pH = 8,8 (*New England Biolabs, USA*)

- **Roztok L1:** NaClO₄, octan sodný, TBE (*Genomed, Německo*)

- **Roztok L2:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl (*Genomed, Německo*)

- **Roztok G1:** 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAasa A (*Genomed, Německo*)

- **Roztok G2:** 200 mM NaOH, 1 % SDS (*Genomed, Německo*)

- **Roztok G3:** guanidin hydrochlorid, octan sodný (*Genomed, Německo*)

- **Roztok GX:** guanidin hydrochlorid (*Genomed, Německo*)

- **Roztok G4:** ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl (*Genomed, Německo*)

- **Gel pro agarosovou elektroforézu:** 1 % agarosa v TAE pufřu, 2 µl ethidiumbromid, resp. 1,1 % agarosa v TAE pufřu, 4 µl ethidiumbromid pro preparativní elektroforézu

- **Pufř pro agarosovou elektroforézu** - TAE pufř, 1 x koncentrovaný: 40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA

- **STOP pufř:** 50 % glycerol, bromfenolová modř, ethanol, TE pufř

- **TE pufr:** 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH = 8,0
- **Roztok I:** 50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA
- **Roztok II:** 3 mM octan sodný, 10 % CH₃COOH

4. Metody²⁷

4.1. Fosforylace primeru

Pro fosforylaci přímého primeru RNKRP1 FW M2 byla použita T4 polynukleotidkinasa. Reakční směs obsahovala následující složky: 42 μ l ddH₂O, 2 μ l 0,1 mM primeru RNKRP1 FW M2, 5 μ l pufru pro T4 DNA ligasu (10 x koncentrovaný) a 1 μ l T4 polynukleotidkinasy. Směs byla inkubována po dobu 30 min při 37°C.

4.2. Polymerásová řetězová reakce (PCR)

Byla připravena reakční směs pro PCR obsahující: 29,5 μ l ddH₂O, 1,5 μ l 100 mM MgSO₄, 5 μ l PCR pufru (10 x koncentrovaný), 1,5 μ l 10 mM dNTP, 6 μ l 4 μ M fosforylovaného primeru RNKRP1 FW M2, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru pRSET BRE*62B2, 1 μ l templátu, 0,5 μ l Deep Vent DNA polymerasy.

PCR reakce proběhla v automatickém termocykleru. Nastavení programu PCR reakce:

- 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

Následně byla teplota snížena na 4°C, až do té doby než byl produkt z termocykleru vyjmut.

4.3. Agarosová elektroforéza

Výsledný produkt PCR byl detekován pomocí agarosové elektroforézy. K 2 μ l PCR produktu bylo přidáno 8 μ l STOP pufru. Tato směs byla nanesena do jamky agarosového gelu, do druhé jamky bylo vneseno 2 μ l standardu. Elektroforéza probíhala po dobu 30 min. Použité napětí bylo 120 V.

Jako marker byl použit plasmid pRSET B naštěpený restriční endonukleasou Nde I. Tento standard byl získán smícháním 10 μ l plasmidu pRSET B, 26 μ l Tris-HCl pufru

(pH = 8), 4 μ l NEB3 pufru, 1 μ l enzymu Nde I. Tato směs byla inkubována při 37 °C 4 hod., po ukončení inkubace bylo přidáno 12 μ l STOP pufru.

4.4. Srážení PCR produktu

Ke zbylému produktu bylo napipetováno 5 μ l 3 M NaAc (pH = 5,2) a 125 μ l 100 % EtOH. Směs byla ponechána srážet při -80°C zhruba 2 hod. Následovala centrifugace v předchlazeném rotoru po dobu 20 min při 12000 x g.

Kvůli získání dostatečného množství PCR produktu, jsem tento postup dvakrát zopakovala.

4.5. Úprava inzertu restrikčním štěpením

Výsledný produkt PCR reakce byl štěpen pomocí restrikční endonukleasy Hind III, takto upravený produkt byl dále použit pro ligaci. Restrikční enzymy byly uchovávány při -20°C. Pro zachování jejich aktivity byly při práci umístěny do ledu. Ke sraženině PCR produktu bylo přidáno 34 μ l ddH₂O, dále 4 μ l NEB2 pufru a 2 μ l enzymu Hind III. Směs byla inkubována 3 hod při teplotě 37°C.

4.6. Příprava linearizovaného plasmidu

Pro ligaci bylo potřeba získat linearizovaný plasmid pRSET B. Linearizace proběhla v několika krocích.

1) Restrikční štěpení pomocí enzymu Nde I.

K 1 μ l plasmidu pRSET B bylo přidáno 16 μ l ddH₂O, 2 μ l NEB2 pufru a 1,5 μ l enzymu Nde I. Směs byla inkubována po dobu 3 hod při teplotě 37°C.

2) Zarovnání Nde I místa Klenowovým fragmentem.

Byla připravena směs obsahující 6 μ l ddH₂O, 1 μ l NEB2 pufru, 3 μ l 333 μ M dNTP, 1 μ l Klenowova fragmentu a 20 μ l linearizovaného plasmidu pRSET B (získaného krokem č.1). Navázala inkubace 15 min při 25°C a následně inaktivace 20 min při 75°C.

3) Štěpení pomocí restrikčního enzymu Hind III.

Směs obsahující 9 μl ddH₂O, 1 μl NEB2 pufru, 1,5 μl enzymu Hind III a 30 μl linearizovaného plasmidu pRSET B (z kroku č.2) byla ponechána inkubovat 3 hod při teplotě 37°C.

4.7. Preparativní elektroforéza

Ke 40 μl připraveného linearizovaného plasmidu pRSET B bylo přidáno 10 μl STOP pufru. Do vzorkovací jamky bylo ve výsledku aplikováno 50 μl roztoku.

Stejně množství STOP pufru, tedy objem 10 μl , bylo také přidáno ke 40 μl naštěpeného PCR produktu, jenž byl štěpen pomocí restrikční endonukleasy Hind III. Takto připravený vzorek byl nanesen do jamky agarosového gelu. Naštěpený PCR produkt bude nadále označován jen insert.

Ke kontrole přibližného určení molekulové hmotnosti byl zvolen nenaštěpený plasmid pRSET B. 1 μl tohoto plasmidu byl napipetován spolu s 2 μl STOP pufru a 5 μl ddH₂O do jedné ze vzorkovacích jamek.

Elektroforéza probíhala po dobu 30 min nejdříve při napětí 40 V, poté bylo napětí zvýšeno na 80 V.

K vizualizaci byla využita fluorescence komplexu DNA a interkalovaného ethidium bromidu pod osvětlením dlouhovlnnou UV lampou. Části agarosového gelu obsahující linearizovaný plasmid a insert byly vyříznuty skalpelem a přeneseny do mikrozkušavky.

4.8. Extrakce DNA z gelu pomocí kitu

K extrakci byl použit kit dodávaný společností Genomed. Během extrakce DNA z gelu pomocí kitu byl přesně dodržen pracovní postup dodaný výrobcem. K vyříznutým vzorkům gelu bylo přidáno 900 μl roztoku L1 a vzorky byly ponechány inkubovat při 50°C po dobu 15 min. Vzorky byly napipetovány do příslušných kolonek vložených v mikrozkušavce 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). Po odstranění filtrátu byla centrifugace provedena ještě jednou pro odstranění zbytků roztoku L2. Vzorky DNA byly vymyty 50 μl ddH₂O a odstředěny při 12000 x g 2 min.

4.9. Ligace

Pro ligaci byl použit insert a linearizovaný plasmid získaný v předchozím kroku. Složení ligační směsi: 6 μl ddH₂O, 2 μl pufru pro T4 DNA ligasu, 2 μl linearizovaného plasmidu, 10 μl insertu a 1 μl T4 DNA ligasy. Ligace probíhala v chladničce při 4 °C po dobu 70 hodin.

4.10. Transformace expresního vektoru do buněk

Transformace byla prováděna metodou tepelného šoku. Kompetentní buňky uchovávané při -80°C byly nejprve ponechány roztát na ledu.

- 150 μl těchto buněk bylo přidáno k ligační směsi, mikrozkušavka byla inkubována 30 min na ledu.
- Poté byla směs ponořena na 50 vteřin do vodní lázně o teplotě 42°C a ihned uložena zpátky na led.
- Po 1 min byl přidán 1 ml sterilního LB média a směs byla inkubována 1 hod při 37°C.
- Transformované buňky byly odstředěny centrifugací při 1500 x g 2 min. Zachováno zhruba 100 μl supernatantu, ve kterém byly pelety resuspendovány. Nesuspendované pelety byly následně naneseny na Petriho misku obsahující tuhé LB médium s antibiotiky (ampicilin a tetracyklin). Bakterie byly ponechány inkubovat při 37°C po dobu 16 hod. Misky s narostlými koloniemi byly uskladněny při 4°C v chladničce.

Vybraných deset kolonií bylo naočkováno do 2 ml LB média s příslušnými antibiotiky a ponecháno třepat rychlostí 200 rpm při 37°C přes noc. Z takto připraveného vzorku byl odebrán 1 ml kultury, odstředěn při 12000 x g 5 min. Pelety byly uchovávány v chladničce při 4°C.

Zbytkem kultury bylo zaočkováno 10 ml LB média s příslušnými antibiotiky, následovalo třepání ve sterilních zkumavkách rychlostí 200 rpm při 37°C přes noc. Bakteriální kultury byly ponechány v chladícím boxu, 4°C.

4.11. Rychlá izolace plasmidové DNA

Pelety transformovaných buněk byly resuspendovány pomocí vortexového mixéru ve 30 μ l EP pufru (z angl. easy prep), suspenze byly ponechány 10 min na ledu a 5 min povařeny na vodní lázni. Suspenze byly odstředěny (3 min, 12000 x g).

4.12. Štěpení restrikčními endonukleasami Hind III, Nde I

Do každé zkumavky bylo pipetováno: 10 μ l supernatantu, 1 μ l NEB2 pufru, 0,2 μ l enzymu Hind III a 0,2 μ l enzymu Nde I. Roztoky byly ponechány inkubovat 3 hod při 37°C. Následovalo ukončení štěpení přidáním 3 μ l STOP pufru. Pro detekci byla použita agarosová elektroforesa v délce trvání 30 min při napětí 120 V.

Na základě výsledků restrikcí, byly vybrány buňky se správně vneseným plasmidem.

4.13. Minipreperativní izolace plasmidové DNA

Vybrané bakteriální kultury (uložené v chladícím boxu) byly odstředěny (12000 x g, 2 min). Pro izolaci byla použita komerčně dostupná sada společnosti Genomed. Byl přesně dodržen návod k použití dodávaný výrobcem.

K peletám bylo přidáno 250 μ l roztoku G1, pelety byly resuspendovány pomocí pipety. K suspenzi bylo přidáno 250 μ l roztoku G2, směs byla opatrně promíchána a ponechána inkubovat 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 350 μ l roztoku G3, směs byla opět opatrně promíchána a odstředěna při 12000 x g po dobu 10 min. Supernatant byl převeden do kolonky uložené v mikrozkuhavce, zcentrifugován při 12000 x g 1 min. Do kolonky bylo dále přidáno 500 μ l roztoku GX, roztok byl odstředěn při 12000 x g 1 min. Poté bylo do kolonky napipetováno 500 μ l roztoku G4 a odstředěno při 12000 x g 1 min.

Na konec byla plasmidová DNA z kolony eluována pomocí 75 μ l ddH₂O odstředěním 12000 x g 2 min. Supernatanty byly uchovávány zmrazené na -20°C.

4.14. Kontrolní restriční štěpení

Kontrolní restriční štěpení expresního vektoru bylo provedeno s dvojicí enzymů v pufru doporučeném pro zvolené enzymy:

- Nde I a Hind III
- BstX I a Hind III
- Xba I a Hind III



Obr. 3 : Schéma vhodných restričních endonukleas štěpicích pRSET B s insertem rNKR-P1B

Byly připraveny roztoky obsahující 0,2 μ l jednotlivých enzymů a 1 μ l NEB2 pufru, k třetímu roztoku bylo pipetováno ještě 0,2 μ l BSA. K těmto roztokům bylo přidáno 10 μ l plasmidu. Směs obsahující enzym BstX I byla inkubována 1 hod při 55°C a 1 hod při 37°C. Ostatní směsi byly inkubovány 2 hod při 37°C. Ukončení štěpení bylo provedeno přidáním 3 μ l STOP pufru. Vzorky byly detekovány pomocí agarosové elektroforézy na základě porovnání se standardem, který byl pipetován v objemu 2 μ l. Agarosová elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 30 min.

4.15. Maxipreparace plasmidové DNA

- Prvním krokem při přípravě zásobního množství plasmidu byla transformace bakterií, která byla prováděna metodou tepelného šoku. Kompetentní buňky uchovávané při -80°C byly ponechány nejprve roztát na ledu. K 40 μ l těchto buněk bylo přidáno 10 μ l plasmidu. Směs byla inkubována 1 hod na ledu. Poté byly buňky vystaveny tepelnému šoku, ponořením do lázně o teplotě 42°C na dobu 45 s a po uplynutí časového úseku byly ihned umístěny zpět na led. Po 2 min byl přidán 1 ml

sterilního LB média a vzniklá suspenze byla inkubována 1 hod při 37°C na třepačce při 200 rpm. Potom byly buňky odstředěny při 1000 x g 3 min. Bylo odebráno 800 µl supernatantu, ve zbylém supernatantu byly vzniklé pelety resuspendovány. Vzniklá suspenze se pomocí vyžíhané, vychlazené skleněné tyčinky rozetřela po povrchu LB agaru s příslušnými antibiotiky v Petriho misce. Misky byly inkubovány při 37°C přes noc. Misky s vyrostlými koloniemi byly dále uchovávány při 4°C v chladničce.

- Na misku s vyrostlými koloniemi bylo aplikováno 5 ml sterilního LB média, v němž byly buňky resuspendovány pomocí bakteriální kličky, suspenze byla následně přenesena do 200 ml sterilního LB média s příslušnými antibiotiky. Bakteriální kultura byla ponechána růst na třepačce při 36°C a 200 rpm přes noc. Poté byla odstředěna při 12000 x g 10 min a zmrazena při -20°C.
- K peletě bylo přidáno 10 ml roztoku I, a dále byla resuspendována pomocí vortexového mixéru. Po převedení suspenze do kyvety byla provedena centrifugace po dobu 10 min při 2300 x g a 4°C. K supernatantu v čisté zkumavce bylo přidáno 3,5 ml roztoku I obohaceného o lysozym (c = 5 mg/ml). Směs byla promíchána na vortexu a enzym byl ponechán působit 5 min při laboratorní teplotě.
- Ke směsi bylo přidáno 7 ml lyzačního roztoku (0,2 M NaOH v 1 % SDS). Směs byla promíchána na vortexu a ihned převedena na led na dobu 10 min.
- Poté bylo přidáno 5,2 ml roztoku II, směs byla promíchána na vortexu a převedena na led. Po 10 min byla provedena centrifugace při 12000 x g při 4°C po dobu 30 min. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky.
- K získanému supernatantu bylo přidáno 10 ml isopropanolu. Po 15 min stání při laboratorní teplotě byla provedena centrifugace při 12000 x g po dobu 30 min. Získaný pelet byl omyt 70% EtOH a volně dosušen na vzduchu.
- Po vyschnutí kyvety bylo přidáno 0,5 ml TE pufru a 10 µl RNAasyA (c = 10mg/ml). Inkubace probíhala 30 min při laboratorní teplotě.
- Dále byla provedena extrakce v 0,5 ml směsi fenol/chloroform (1:1), směs byla promíchána po dobu 30 s na vortexu a centrifugována při 12000 x g 5 min. Horní vrstva byla odebrána do čisté zkumavky a dále zpracovávána.
- K této vrstvě bylo přidáno 0,5 ml směsi chloroform/isoamylalkohol (49:1), směs byla promíchána na vortexovém mixéru a odstředěna při 12000 x g po dobu 5 min. Opět byla odebrána horní vrstva.

- Následovalo přidání 50 μl NaAc (3 M, pH = 5,2) a 1250 μl 100 % Et OH. Roztok byl promíchán a uložen na 30 min do mrazícího boxu při teplotě -78°C . Poté byla provedena centrifugace při 12000 x g po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn, peleta byla promyta 70 % EtOH a ponechána vyschnout v rotační vakuové odparce. Dále byla peleta resuspendována ve 160 μl ddH₂O.
- Poté bylo přidáno 40 μl 4 M NaCl a 200 μl 13 % PEG ($M_r = 8000$ g/mol), směs byla ponechána srážet v chladničce při 4°C , po dobu zhruba 60 hod. Vysrážená směs byla odstředěna při 4°C , 12000 x g po dobu 30 min, supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována ve 100 μl TE pufru.
- Dále byly extrahovány proteiny od plasmidové DNA a to postupně pomocí: 100 μl fenolu, 100 μl směsi fenol/chloroformu a 100 μl směsi chloroform/isoamylalkoholu. Směs byla vždy promíchána na vortexu, odstředěna při 12000 x g po dobu 10 min. Po každé extrakci byla odebrána horní vrstva, která byla nadále zpracovávána.
- Na závěr bylo k horní vrstvě přidáno 10 μl NaAc (3 M, pH = 5,2) a 250 μl 100 % EtOH. Směs byla promíchána, inkubována při teplotě -78°C po dobu 30 min a následně odstředěna při 12000 x g 5 min. Supernatant byl odstraněn, peleta omyta 100 μl 70 % EtOH. Ethanol byl odstraněn a peleta dosušena v rotační vakuové odparce. Peleta byla resuspendována v 300 μl TE pufru. Zásobní roztok plasmidu byl uchováván v mrazícím boxu při -20°C .

4.16. Kontrolní restrikční štěpení zásobního roztoku plasmidu

Kontrolní restrikční štěpení bylo provedeno se zásobním roztokem plasmidu a s dvojicí enzymů BstX I a Hind III, Nde I a Hind III. Vždy byl připraven roztok obsahující 2 μl ddH₂O, 2 μl NEB2 pufru, 1 μl jednotlivých enzymů a 5 μl roztoku plasmidu. Roztok obsahující enzymy Nde I a Hind III byl inkubován při 37°C po dobu 1 hod. Roztok obsahující enzymy BstX I a Hind III byl inkubován při teplotě 55°C půl hodiny ve vodní lázni a následně při 37°C další 0,5 hod. Po inkubaci bylo přidáno 5 μl STOP pufru a vzorky byly naneseny na start agarosového gelu společně se 4 μl markeru. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 30 min.

4.17. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA ²⁸

Koncentrace DNA a její čistota byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance vhodně zředěného roztoku při vlnové délce 260 nm a 280 nm v křemenné kyvetě s optickou délkou 1 cm. Na výpočet koncentrace byl použit empirický vztah, podle kterého je poměr A_{260}/A_{280} pro čistou DNA roven přibližně 1,8. Pokud je DNA znečištěna proteiny bude tento poměr nižší vlivem vzrůstající absorpce proteinů při vlnové délce 280 nm. 5 μ l plasmidu získaného z předchozího kroku bylo naředěno 1 ml ddH₂O. Následně byla změřena absorbance roztoku při vlnových délkách 260 a 280 nm. Jako srovnávací vzorek byl použit roztok 5 μ l TE pufru v 1 ml vody.

4.18. Automatické sekvenování DNA

Sekvenace byla provedena ve Středisku sekvenování DNA na MBÚ AV ČR, v.v.i.
Dr. Jürgenem Felsbergem, CSc.

5. Výsledky

5.1. Příprava expresního vektoru

Příprava expresního vektoru zahrnuje vložení požadovaného fragmentu DNA – insertu do vektoru, kterým je v tomto případě plasmid. Insert byl připraven pomocí PCR reakce. Při přípravě insertu se vycházelo z plasmidu pRSET B, který obsahoval sekvenci kódující protein rNKR-P1B v rozmezí aminokyselin Glu₈₁ – Lys₂₁₅, tento plasmid byl použit jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci. Plasmid pRSET B obsahuje gen *bla* zodpovědný za rezistenci vůči ampicilinu, která byla využita jako selekční marker.

Cílem této bakalářské práce bylo získat plasmid jako expresní vektor s vnesenou sekvencí kódující přesně vymezený úsek extracelulární části buněčného receptoru rNKR-P1B, který začíná Ala₉₀ a končí Lys₂₁₅, což je na obr. 4 znázorněno oranžovou barvou.

MDTAVVYADLHLARTGEPKREPPPSLSPDTCQCPRWHRLALKLGCACLILLV
LSVIGLGVLVLTLLQKPLIQNSPADVQE■RTKTTDSPA KLKCPKDWHS HQDK
CFHVSQTSITWKGSLADCGGKGATLLLVQDQEELRFLR■LTKRISSSFWIGLS
YTLSDEKWKWI■GSTLNSDAL■ITGDTEKDSCASVSQDKVLSESCDS DNIWIC
QKELKRESTC■DS

Obr. 4: Sekvence aminokyselin potkaního receptoru NKR-P1B. Zeleně intracelulární část, **červeně** transmembránový úsek, **modře** současný konstrukt rM1NKR-P1B (RNKRP1B-RG), **oranžově** nový konstrukt rM2NKR-P1B, **žlutě** cysteiny tvořící disulfidické můstky, ■ **potenciální místa N-glykosylace.**

Pomocí PCR reakce byl replikován nový, zkrácený úsek extracelulární části rNKR-P1B. Před samotným provedením PCR reakce byl navržen přímý primer RNKRP1 FW M2, který bylo třeba před použitím fosforylovat pomocí T4 polynukleotidkinasy. Díky fosforylaci tohoto primeru zůstane fosfátová skupina na 5' konci syntetizovaného řetězce a při ligaci umožní správné spojení insertu s plasmidem. Dále byl použit univerzální reverzní primer pRSET BRE*62B2. Tyto primery vymezují velikost PCR produktu.

Pro získání dostatečného množství insertů k další práci byl celý postup PCR reakce proveden dvakrát. Jako kontrola správného provedení byla použita agarosová elektroforéza. (obr. 5). Velikost PCR produktu byla určena na základě porovnání s markerem, nachází se mezi fragmenty standardu o velikosti 409 a 540 bp, což odpovídá očekávané velikosti 450 bp.

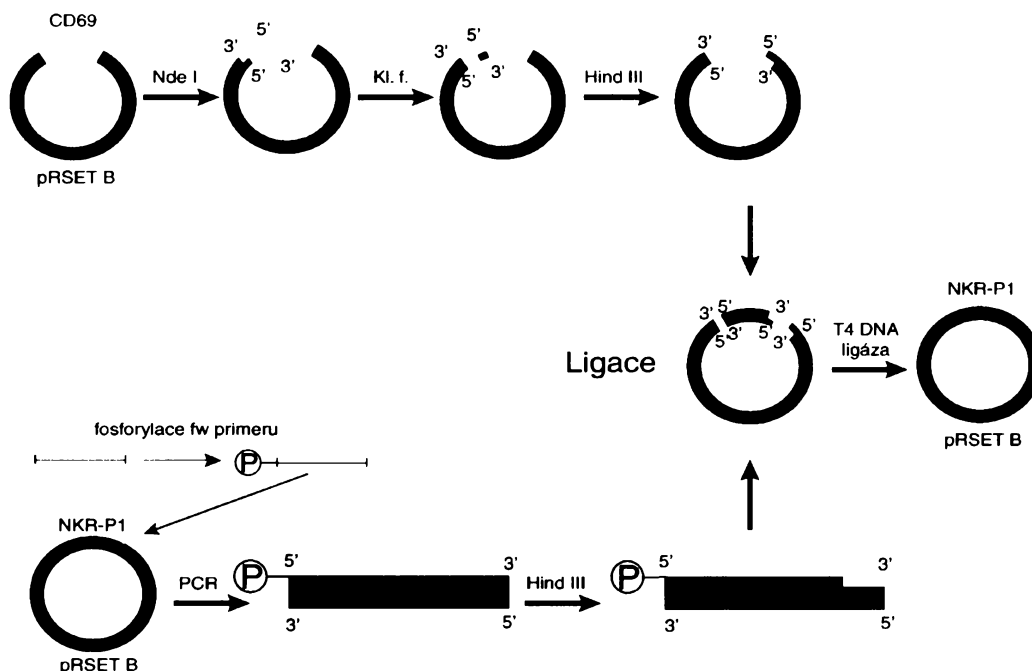


Obr. 5: Výsledek PCR reakce na agarosovém gelu. Dráha B označuje produkt PCR, M marker.

Produkt PCR byl dále zakoncentrován srážením. Pro správnou orientaci při ligaci byl jeden konec získaného insertu štěpen pomocí restriční endonukleasy Hind III. Takto získaný fragment DNA představoval požadovaný insert o velikosti 380 bp.

Pro vložení požadovaného fragmentu DNA do plasmidu je nutné tento vektor rozštěpit restriční endonukleasou. Linearizovaný plasmid pRSET B byl získán dle postupu uvedeného v metodické části (odstavec 4.6.). Při přípravě linearizovaného plasmidu se vycházelo z plasmidu pRSET B, který obsahoval sekvenci kódující část

extracelulární domény receptoru CD 69. Plasmid pRSET B byl nejdříve štěpen restriční endonukleasou Nde I, pro úpravu 5' přesahujícího konce byl použit Klenowův fragment. Plasmid byl dále naštěpen restriční endonukleasou Hind III. Takto byly získány kompatibilní konce pro ligaci linearizovaného plasmidu s insertem. Plasmid i připravený insert byl přečištěn preparativní elektroforézou a vyextrahovaný z gelu. Poté následovala vlastní ligace získaného linearizovaného plasmidu a insertu za použití T4 DNA ligasy.

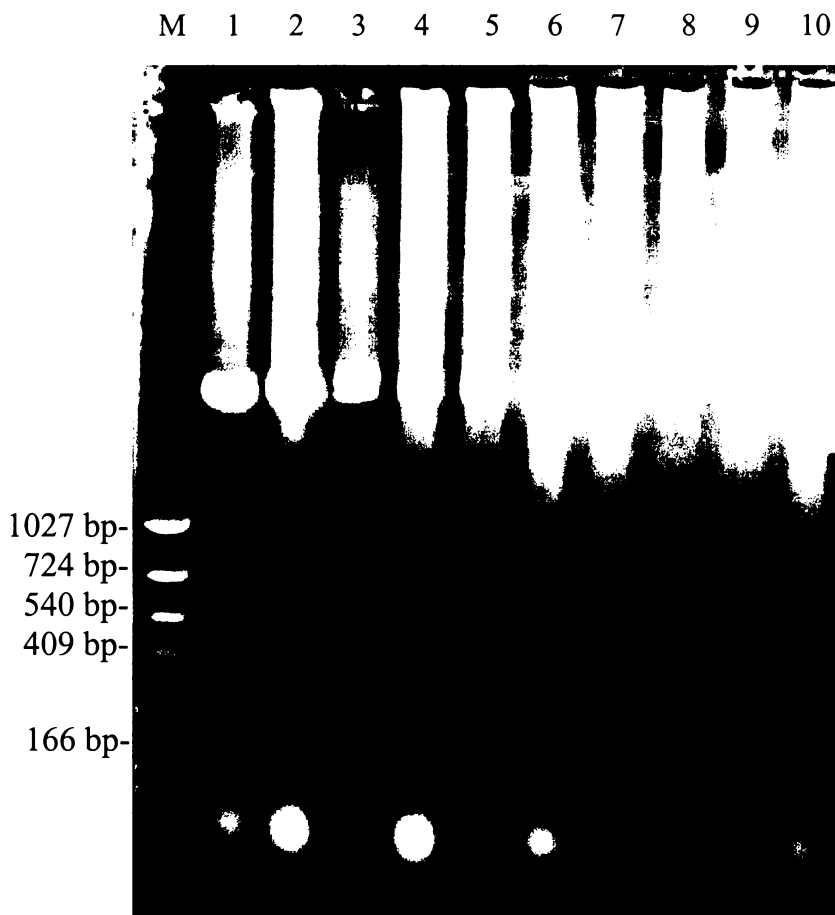


Obr. 6: Schématické znázornění procesu úprav a následné ligace pRSET B a insertu rNKR-P1B

Takto připraveným vektorem byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* XL 1-BLUE. Tento kmen nese rezistenci proti antibiotiku tetracyklinu. Transformace bakterií byla provedena metodou tepelného šoku. Bakterie byly vysety na misky s LB agarem obsahující antibiotika ampicilin a tetracyklin. Buňky rostly zhruba 15 hodin. Což se ukázalo, být příliš dlouhou dobou. Na misce vyrostlo kolem 170 kolonií, z nichž většina již měla kolem sebe patrné sekundární kolonie. Sterilním párátkem bylo vybráno 10 ojediněle rostoucích primárních kolonií, které byly zaočkovány do zkumavek s 2 ml LB média a příslušnými antibiotiky. Kolonie bakterií byly rozpěstovány do viditelného zákalu.

Bakteriální kultury byly rozděleny na dvě části. Z první části byla izolována plasmidová DNA využitím EP pufru, plasmidová DNA byla štěpena restričními

endonukleasami Nde I a Hind III. Tento krok sloužil k selekci buněk. U správně transformovaných buněk mělo dojít k vštěpení vneseného insertu z plasmidu. Výsledky byly detekovány pomocí agarosové elektroforézy (obr. 7). Pro další práci byl jako správný vektor nesoucí insert vybrán plasmid pocházející z kolonie 3. Pokud plasmidy insert neobsahovaly, na agarosovém gelu se po vizualizaci neobjevily charakteristické proužky.



Obr. 7: Selekcce buněk nesoucích plasmid s insertem pomocí agarosové elektroforézy. Dráha M označuje marker, dráhy 1-10 kolonie, ze kterých pocházely jednotlivé plasmidy. Jako správný plasmid nesoucí insert byl identifikován plasmid označený číslem 3.

Druhá část kultury byla převedena do 10 x 10 ml LB média obsahujícího příslušná antibiotika. Na základě předchozí selekce byla z kultury číslo 3 izolována plasmidová DNA. Pro izolaci plasmidové DNA od zbytku buněčného obsahu bylo využito tzv. minipreparace, která byla provedena pomocí kitu firmy Genomed.

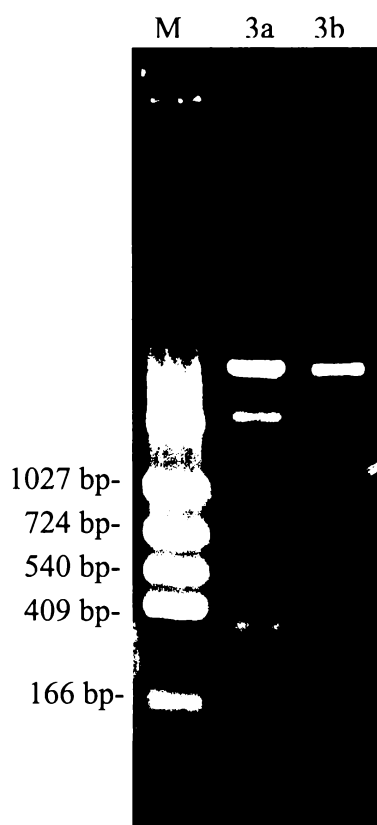
5.2. Ověření správnosti připraveného vektoru restričním štěpením

K ověření správnosti připraveného plasmidu bylo využito štěpení stejnými restričními endonukleasami, kterými byla upravena koncová místa plasmidu pRSET B i insertu, tedy enzymy Nde I a Hind III. Naštěpený plasmid byl nanesen na agarosový gel. Pokud by plasmid obsahoval insert, objevil by se v oblasti 382 bp proužek (obr. 8)



Obr. 8: Kontrolní restriční štěpení enzymy Nde I a Hind III. Dráha M označuje marker, dráha 3 štěpený plasmid pocházející z kolonie číslo 3. Správnost připraveného plasmidu byla potvrzena proužkem v oblasti 382 bp.

Kontrolní restriční štěpení bylo provedeno i s dalšími enzymy – BstX I a Hind III, dále s Xba I a HindIII. Štěpící místo pro enzym BstX I je obsaženo v sekvenci insertu, štěpící místo pro enzym Xba I je přítomné díky původnímu plasmidu pRSET B. Štěpení pomocí restričních endonukleas BstX I a Hind III poskytuje fragment DNA o velikosti 355 bp, na obr. 9 proužek v dráze 3a. Štěpení restričními endonukleasami Xba I a Hind III poskytuje fragment DNA o velikosti 422 bp, na obr. 9 proužek v dráze 3b.



Obr. 9: Kontrolní restriční štěpení. Štěpení probíhalo s enzymy BstX I a Hind III (dráha 3a), Xba I a Hind III (dráha 3b). Velikost fragmentů DNA byla určena na základě porovnání s markerem (dráha M). Správnost připraveného plasmidu byla potvrzena proužkem v oblasti 355 bp (3a) a 422 bp (3b).

5.3. Příprava zásobního množství plasmidu

Prvním krokem při přípravě zásobního množství plasmidu byla transformace bakterií (*E.coli*, kmen XL 1-BLUE) metodou tepelného šoku. Bakterie byly vysety na misky s LB agarem a antibiotiky ampicilinem a tetracyklinem. Na misce vyrostlo přibližně 1000 kolonií. Tyto kolonie byly zaočkovány do LB média s příslušnými antibiotiky.

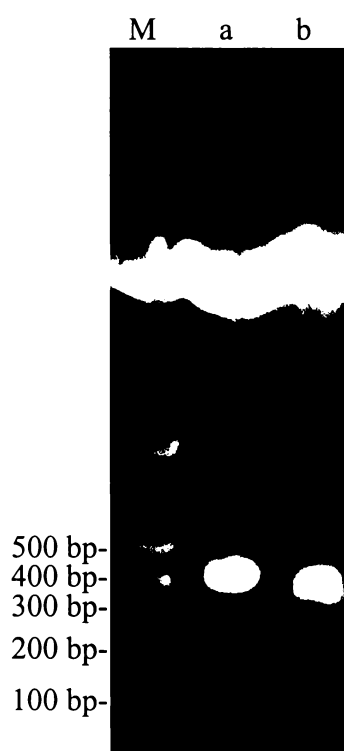
Plasmidová DNA byla získána sledem reakcí označovaných jako tzv. maxipreparace. Postup je uveden v metodické části (odstavec 4.15.). Pro určení čistoty a množství získané plasmidové DNA byla měřena absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1. Poměr A_{260}/A_{280} charakterizuje čistotu plasmidové DNA, hodnota 1,8 odpovídá čisté DNA. Získaný roztok plasmidu měl poměr absorbancí A_{260}/A_{280} roven 1,24 – pravděpodobně tedy došlo během izolace plasmidové DNA ke kontaminaci proteiny.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty absorbance zásobního roztoku plasmidu.

| A_{260} | A_{280} | A_{260}/A_{280} |
|-----------|-----------|-------------------|
| 0,1475 | 0,1832 | 1,24 |

Byl připraven roztok plasmidové DNA o $c = 1,47$ mg/ml, bylo získáno 0,4 mg DNA.

Správnost připraveného plasmidu byla potvrzena pomocí restrikčních štěpení. První restrikční štěpení probíhalo s enzymy Nde I a Hind III, které poskytují fragment DNA



Obr. 10: Kontrolní restrikční štěpení II. Štěpení probíhalo s enzymy Nde I a Hind III (dráha a), Bst XI a Hind III (dráha b). Velikost fragmentů DNA byla určena na základě porovnání s markerem (dráha M).

o velikosti 378 bp (na obr. 10 dráha a, str. 41). Druhé restriční štěpení proběhlo v přítomnosti enzymů BstX I a Hind III, tyto enzymy poskytují fragment DNA o velikosti 355 bp (na obr. 10 dráha b, str. 41).

5.4. Sekvence insertu rNKR-P1B

Sekvence připraveného insertu rNKR-P1B a části plasmidové DNA provedená Dr. Jürgenem Felsbergem, CSc. (obr.11) odpovídá sekvenci výchozí DNA označené jako NM_173292 v databázi GenBank. Odlišnosti v tripletech báží jsou patrné ve dvou úsecích CTN a TGT. Triplet CTN má být podle výchozí sekvence zapsán jako CTC. Ze záznamu automatického sekvenátoru nelze vyčíst, zda-li se jedná o triplet CTC nebo CTA. Oba triplety kódují stejnou aminokyselinu leucin. Druhý lišící se triplet (TGT) je ve výchozí sekvenci zapsán jako TGC a kóduje aminokyselinu cystein. Oba triplety však opět kódují stejnou aminokyselinu. Z výsledku je zřejmé, že v obou případech vzniklé mutace neovlivní aminokyselinovou sekvenci proteinu.

[redacted] TTTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACATA
TGGCTAAGTTAAAGTGCCCAAAGACTGGCATTACACCAAGATAAATGC
 TTTCATGTTTCTCAAACCTCCATCACTTGGAAGGGGAAGTCTAGCTGACTGT
 GGTGGAAAAGGAGCCACGTTGCTG [redacted] GTTCAAGACCAAGAAGAACTGAG
 ATTCCTACGGAACCTTGACAAAGAGAATAAGCAGCTCATTCTGGATTGGAT
 TAAGTTACACATTGTCAGACGAGAAGTGGAAAGTGGATAAACGGCTCGACT
 TAAATTCTGATGCATTAACATCACTGGTGACTGAAAAGGACAGCTG
 TGCCTCCGTCTCACAGGACAAAGTGCTTTCTGAGAGCTGTGATTCAGACA
 ATATATGGATC [redacted] CAAAAGGAACTAAAATGAAAGCTTGGCTAAGTTAAAG
 TGCCCAAAGACTGGCATTACACCAAGATAAATGCTTTTCATGTTTCTCAAACCT
 TCCATCACTTGGAAGGGGAAGTCTAGCTGACTGTGGTGGAAAAGGAGCCACGTT
 GCTGCTCGTTCAAGACCAAGAAGAAGACTGAGATTCTACGGAACCTTGACAAAGA
 GAATAAGCAGCTCATTCTGGATTGGATTAAGTTACACATTGTCAGACGAGAAG

Obr. 11: Záznam nukleotidové sekvence připraveného insertu rNKR-P1B a části plasmidové DNA. Šedou plochou jsou označena místa nejistých sekvencí. Sekvence CATATG obsahuje štěpící místo pro enzym NdeI a start kodon. CTN, TGT jsou odlišná místa od výchozí sekvence DNA. Triplet AAA je koncová aminokyselina (lysin). Triplet TGA představuje Stop kodon. Sekvence AAGCTT obsahuje štěpící místo pro enzym Hind III.

6. Diskuse

Tato bakalářská práce doplňuje studie prováděné v Laboratoři architektury proteinů, které se týkají struktury a vazebných vlastností receptorů buněk imunitního systému. Receptor potkaních NK buněk rNKR-P1B patří mezi dlouhodobě studované receptory C-lektinového typu nejen v pracovní skupině Prof. Bezoušky.

Pracovním záměrem bylo připravit dostatečné množství expresního vektoru pro následující rekombinantní expresi proteinu rNKR-P1B a navazující strukturní a vazebné studie. Cílem bylo získat takový vektor, jenž by obsahoval insert o sekvenci kódující protein rNKR-P1B v rozsahu aminokyselin Ala₉₀ – Lys₂₁₅. V Laboratoři architektury proteinů byly již dříve připraveny vektory obsahující sekvenci kódující podobný, ale delší, úsek extracelulární části tohoto receptoru. Avšak proteiny získané z těchto vektorů nebyly dostatečně stabilní, pravděpodobně obsahovaly nejen CTLD doménu, ale i tzv. krček. Mým úkolem bylo tedy vytvoření vektoru, který by kódoval pouze CTLD doménu proteinu rNKR-P1B. Sekvence aminokyselin Ala₉₀ – Lys₂₁₅ byla vybrána na základě porovnání s proteinem CD 69, jehož struktura již byla rozřešena²⁹.

Pro přípravu expresního vektoru byl použit plasmid pRSET B, který obsahoval sekvenci kódující část extracelulární domény receptoru CD 69. Tato sekvence byla do plasmidu vložena pomocí restrikčních endonukleas Nde I a Hind III. Protein CD 69 byl pomocí těchto restrikčních míst opět vyštěpen, takto byl získán linearizovaný plasmid pRSET B, který byl připraven k ligaci s novým insertem. Oba konce linearizovaného plasmidu by po štěpení restrikčními endonukleasami obsahovaly jednovláknové přesahy, což by mohlo způsobit špatnou orientaci vkládaného insertu během ligace. Proto byl konec po štěpení enzymem Nde I zarovnan Klenowovým fragmentem, ten byl následně tepelně inhibován a až poté byl z linearizovaného plasmidu zcela odstraněn protein CD 69 vyštěpením enzymem Hind III. Linearizovaný plasmid tak obsahoval jeden tupý konec a jeden s jednovláknovým přesahem, čímž byla zajištěna správná orientace insertu během ligace.

Insert byl připraven metodou PCR z původního vektoru kódujícího delší sekvenci extracelulární domény proteinu rNKR-P1B (Glu₈₁ – Lys₂₁₅). Přímý primer použitý pro metodu PCR bylo nutné před vlastním provedením PCR fosforylovat. Díky tomu byla na 5' koncích získaného insertu navázána fosfátová skupina, která následně umožnila ligaci

s linearizovaným plasmidem. Bez přítomnosti fosfátové skupiny by ligace pravděpodobně vůbec neproběhla, nebo jen s malým výtěžkem.

Připraveným plasmidem byly transformovány kompetentní buňky *E.coli* kmen XL-1 BLUE metodou tepelného šoku. Buňky tohoto kmene patří k široce používaným pro klonování a amplifikaci rekombinantní DNA. Kolonie se správně transformovaným plasmidem byly identifikovány restričním štěpením jejich plasmidové DNA (získané pomocí rychlé izolace) enzymy Nde I a Hind III. Při využití této metody se jedná spíše o rozbití buněk a zpřístupnění jejich obsahu, než o skutečnou izolaci plasmidové DNA. Avšak tato metoda je velice rychlá a dostupná, umožňuje rychlé orientační prozkoumání většího množství vzorků.

Z vybrané kolonie byla izolována DNA metodou tzv. minipreparace a správnost připraveného plasmidu byla ověřena pomocí stejných restričních endonukleas. Z vybrané kolonie bylo připraveno zásobní množství plasmidu. Získané množství 0,4 mg plasmidové DNA lze považovat za dobrý výsledek, neboť je dostačující pro provedení mnoha expresních experimentů za účelem přípravy proteinu a jeho dalších studií. Dle předběžného plánu měl předpokládaný výtěžek činit zhruba 0,5 mg. Dále proběhlo ověření nukleotidové sekvence připraveného fragmentu DNA sekvencí. Sekvence mnou připraveného insertu rNKR-P1B a části plasmidové DNA provedená Dr. Jürgenem Felsbergem, CSc. (obr.11) odpovídá sekvenci výchozí DNA označené jako NM_173292 v databázi GenBank. Dle záznamu sekvenátoru jsou v sekvenci insertu přítomny dvě bodové mutace nukleotidů, obě však nemění smysl čtení při překladu do aminokyselin proteinu a tak lze připravený plasmid bez dalších oprav přímo použít k testování exprese proteinu rNKR-P1B v různých bakteriálních kmenech.

7. Závěr

- podařilo se připravit expresní vektor pro část proteinu rNKR-P1B v rozmezí aminokyselin Ala₉₀–Lys₂₁₅
- správnost připraveného vektoru byla ověřena restrikcčním štěpením a DNA sekvenováním
- byl připraven roztok plasmidové DNA o $c = 1,47$ mg/ml, bylo získáno 0,4 mg DNA

8. Seznam citované literatury

1. Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. Triton, Praha (2005)
2. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J.: *Immunology*, 5th Edition. W.H. Freeman and Company, New York (2003)
3. Robertson, M. J., Ritz, J.: *Blood* 76, 2421-2438 (1990)
4. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: *Eur. J. Immunol.* 5, 112-117 (1975)
5. Trinchieri, G.: *Adv. Immunol.* 47, 187-376 (1989)
6. Yokoyama, W. M., Plougastel, B. F. M.: *Nat. Rev. Immunol.* 3, 304-316 (2003)
7. Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., Roitt, I.: *Immunobiology*. Mosby, (2006)
8. Barten R., Trokar M., Haude A., Trowsdale J., Wilson M.J.: *Trends Immunol.* 22, 52-57 (2001)
9. Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* 16, 359-393 (1998)
10. Wies, W. I., Taylor, M. E., Drickamer, K.: *Immunol. Rev.* 163, 19-34 (1998)
11. Bezouška, K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 535-563 (2004)
12. Backstrom, E., Kristensson, K., Ljunggren, H. G.: *Scand. J. Immunol.* 60, 14-22 (2004)
13. Kelley, J., Walter, L., Trowsdale, J.: *PLoS Genet.* 1, 129-139 (2005)
14. McQueen, K. L., Parham, P.: *Curr. Opin. Immunol.* 14, 615-621 (2002)
15. Lanier, L. L, Chang, C., Phillips, J. H.: *J. Immunol.* 153, 2417-28 (1994)
16. Appasamy, P. M., Kenninston, T. W., Brissete-Storkus, C. S., Chambers, W. H.: *Nat. Immun.* 15, 259-268 (1996)
17. Li, J., Rabinovich, B. A., Harren, R., Shannon, J., Miller, R.G.: *Int. Immunol.* 15, 411-416 (2003)
18. Aldemir, H., Prod'homme V., Dumaurier M-J., Retiere, Ch., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., Braud, V. M.: *Immunol.* 176, 7791-7795 (2005)
19. Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M.: *Nat. Immunol.* 4, 801-807 (2003)
20. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. a., Warren, H. S., Lanier, L. L.: *J. Immunol.* 176, 7796-7799 (2005)
21. Hao, L., Klein, J., Nei, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3192-3197 (2006)

22. Li, J., Rabinovich, B. A., Hurren, R., Shannon, J., Miller, R. G.: *Int Immunol.* 15 (3), 411-6 (2003)
23. Carlyle, J.R., Jamieson, A.M., Gasser, S., Clingan, C.S., Arase, H., Rulet, D.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 101, 3527-32 (2004)
24. Mesci, A., Carlyle, J. R.: *J. Immunol. Methods* 10, 1016 (2007)
25. Voingt, S., Mesci, A., Ettinger, J., Fine, J. H., Chen, P., Chou, W., Carlyle, J. R.: *Immunity* 26 (5), 617-27 (2007)
26. Carlyle, J. R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L. H., Rousselle, E, Troke, A. D., Proteau, M. F., Makrigiannis, A. P.: *J. Immunol.* 176, 7511-7524 (2006)
27. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York (1989)
28. Warburg, O., Christian, W.: *Biochem. Z.* 310, 384-421 (1942)
29. Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A.: *Biochemistry* 39, 14779-14786 (2000)

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

Tabulka 2: Seznam vypůjčovateli

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