

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

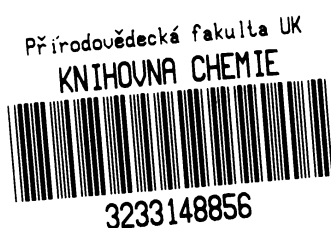


Rekombinantní exprese receptorů myších zabíječských buněk mNKR-P1D a mClrb

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

PRAHA 2009



PAVEL HANČ

Prohlášení

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

V Praze dne 27.5.09.....


.....

PAVEL HANČ

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 21

fi. e. 14.8/09 stud

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval v první řadě prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracovat bakalářskou práci v Laboratoři architektury proteinů, za jeho trpělivost, ochotu a cenné rady. Dále všem členům Laboratoře architektury proteinů za vytvoření příjemného pracovního prostředí a především Mgr. Danielu Kavanovi, Mgr. Hynku Mrázkovi a Danielu Rozbeskému za ochotu kdykoliv pomoci a za mnohé rady, jež mi poskytli. Dále bych rád poděkoval Mgr. Ondřeji Vaňkovi za navržení a obstarání specifických primerů. V neposlední řadě mé poděkování patří mé rodině a blízkým, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

OBSAH

Obsah	3
Seznam zkratk	5
1. Literární úvod	
1.1 Imunitní systém	7
1.2 NK buňky	8
1.3 NK receptory	10
1.4 NKR-P1D	13
1.5 Clrb	14
2. Cíle práce	16
3. Materiál	
3.1 Přístroje	17
3.2 Chemikálie	18
3.3 Primery pro PCR	19
3.4 Enzymy	20
3.5 Inhibitory proteas	20
3.6 Vektory	20
3.7 Bakteriální kmeny	20
3.8 Roztoky a pufry	21
3.9 Média	21
4. Metody	
4.1 Příprava insertu pomocí PCR amplifikace	22
4.2 Ligace insertů to pBS vektoru a transformace kompetentních buněk	23
4.3 Příprava DNA a její restrikční analýza	24
4.4 Příprava velkého množství plasmidové DNA	24
4.5 Konstrukce pET vektorů a transformace kompetentních buněk	26
4.6 Příprava DNA a její restrikční analýza	26
4.7 Příprava velkého množství plasmidové DNA	26
4.8 Kontrola DNA sekvence sekvenací	27

4.9 Výběr produkčních klonů NKR-P1D a Clrb („Plus-mínus pokus“)	27
4.10 Optimalizace produkce NKR-P1D a Clrb	28
4.11 Příprava inkluzních tělísek NKR-P1D a Clrb	28
4.12 Přenos proteinů na PVDF membránu a kontrola AK sekvence sekvenací	29
5. Výsledky	
5.1 PCR amplifikace insertů kódujících NKR-P1D a Clrb	30
5.2 Ligace insertů do pBS vektoru a transformace kompetentních buněk	30
5.3 Restrikční analýza insertů v pBS	32
5.4 Příprava většího množství plasmidové DNA (pBS) a její kontrola restrikční analýzou	32
5.5 Ligace insertů do pET vektoru a transformace kompetentních buněk	33
5.6 Restrikční analýza insertů v pET	35
5.7 Příprava většího množství plasmidové DNA (pET) a její kontrola restrikční analýzou	36
5.8 Kontrola DNA sekvence konstruktů sekvenací	36
5.9 Výběr produkčních klonů („Plus-mínus pokus“)	37
5.10 Optimalizace produkce NKR-P1D a Clrb	37
5.11 Příprava inkluzních tělísek	39
5.12 Kontrola AK sekvence sekvenací	40
6. Diskuse	41
7. Závěr	42
8. Literatura	43
9. Přílohy	

SEZNAM ZKRATEK

- ADCC – Na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (z angl. „Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity“)
- AK – AminoKyselina
- APS – peroxodisíran amonný (z Amonium PerSulfát)
- BAC – Bacterial Artificial Chromosome
- BSA – Bovinní Sérový Albumin
- bp – pár bazí (z angl. „Base Pair“)
- CIP – fosfatasa z telecích střev (z ang. „Calf Intestine Phosphatase“)
- Clr – C-type lectin-related
- cDNA – komplementární DNA (z angl. „Complementary DNA“)
- CTL – Cytotoxický T Lymfocyt
- DAP10/12 - DNAX-Activating Protein 10/12
- DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. „DeoxyriboNucleid Acid“)
- DTT – DiThio Threitol
- EDTA – Etylen Diamin TetraAcetát
- EtBr – Ethidium Bromid
- FasL – ligand receptoru Fas
- HLA – Human Leukocyte Antigen
- IFN – InterFeroN
- IL – InterLeukin
- ITAM – Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif
- ITIM – Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif
- kan – kanamycin
- KARAP –Killer cell Activating Receptor-Associated Protein
- kDa – kiloDalton, jednotka odpovídající relativní molekulové hmotnosti 1000
- KIR – Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
- IPTG – IsoPropyl β -D-1-ThioGalalaktosid
- KIR – Killer Immunoglobulin-like Receptor
- LGL – Velký granulární lymfocyt (z angl. „Large Granular Lymphocyte“)
- LILR – Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor

LLT1 – Lectin-Like Transcript 1
MCS – část vektoru obsahující štěpící místa pro endonukleasy (z angl. „Multiple Cloning Site“)
MHC – Major Histocompatibility Complex
MICA/MICB – MHC class I-related Chain A/B
NK – Natural Killer
NKC – NK gene Complex
NOD – Nuclear Oligomerisation Domain
Ocil – Osteoclast Inhibitory Lectin
OD₅₅₀ – optická hustota při vlnové délce použitého světla 550nm (z angl. „Optical Density“)
PCR – polymerasová řetězová reakce (z angl. „Polymerase Chain Reaction“)
PIP₂ – Inositol difosfát
PIP₃ – Inositol trifosfát
PMSF – PhenylMethylSulphonyl Fluorid
PRR – Pathogen Recognition Receptor
PTH – PhenylThioHydantoin
PVDF – PolyVinyliden Fluorid
RAE – Retinoic Acid Early-inducible
RT PCR – PCR s reversní tranškriptasou (z angl. „Reverse Transcriptase PCR“)
SDS – Sodium Dodecyl Sulfát
SDS-PAGE – elektroforesa v polyakrylamidovém gelu obsahujícím SDS (z angl. „SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis“)
SHIP – SH2-containing Inositol Phosphatase
SHP – SH2-containing Phosphatase
TCR – T buněčný receptor (z angl. „T-Cell Receptor“)
TEMED – N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
tet – tetracyklin
TLR – Toll Like Receptor
TNF – Tumor Necrosis Factor
ULBP – UL16-binding protein

1. Teoretický úvod

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je jeden z hlavních mechanismů udržujících homeostázu. Aby dokázal účinně reagovat, musí plnit několik základních úloh:

- rozpoznání – imunitní systém musí mít aparát, který mu umožní rozpoznat přítomnost cizorodých látek a organismů i patogenní změny vlastních buněk
- efektorové funkce – imunitní systém musí být schopen odpovídajícím způsobem zareagovat na přítomnost rozpoznaných patogenů a musí být schopen tuto reakci regulovat
- autotolerance – imunitní systém musí být schopen rozpoznat vlastní tkáň organismu a udržovat vůči nim toleranci
- imunitní paměť – poté, co se imunitní systém jednou setká s infekčním agens, je při příštím setkání schopen rychlejší a silnější reakce.

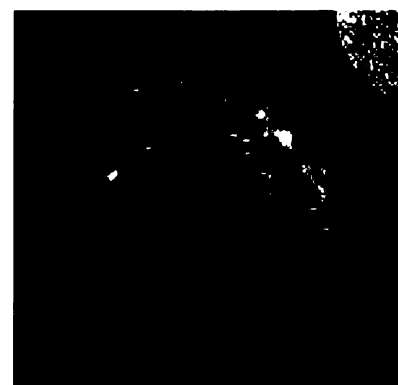
Vlastní imunitní systém se podle funkce dělí do dvou hlavních částí, adaptivní a neadaptivní. Neadaptivní imunitní systém je charakterizován neměnnou specifitou receptorů vůči konkrétním antigenům. Na druhou stranu receptory buněk adaptivního imunitního systému prochází složitým procesem, jehož výsledkem je vznik receptorů, jejichž specifita může zahrnovat jakoukoliv strukturu i přesto, že se s ní organismus nikdy dříve neseťkal.

Neadaptivní imunitní systém tvoří první obranu proti invazi patogenů a zároveň aktivuje adaptivní imunitní systém. Jeho hlavní buněčnou složku představují neutrofilní, basofilní a eosinofilní granulocyty, makrofágy a žírné buňky.

Buněčné složky adaptivního imunitního systému, T a B lymfocyty, tvoří po aktivaci hlavní mechanismus eliminace patogenů, proti nimž je specifita jejich receptorů zaměřena.^{[1],[2]}

1.2 NK buňky

NK buňky (obr.1.) byly poprvé popsány v myši slezině v roce 1975 jako nový typ lymfocytů odlišný od T i B lymfocytů se specifitou pro některé leukemické buňky. Podle své schopnosti zabíjet tyto buňky byla tato nová skupina lymfocytů nazvána jako „natural“ killer cells.^[3]



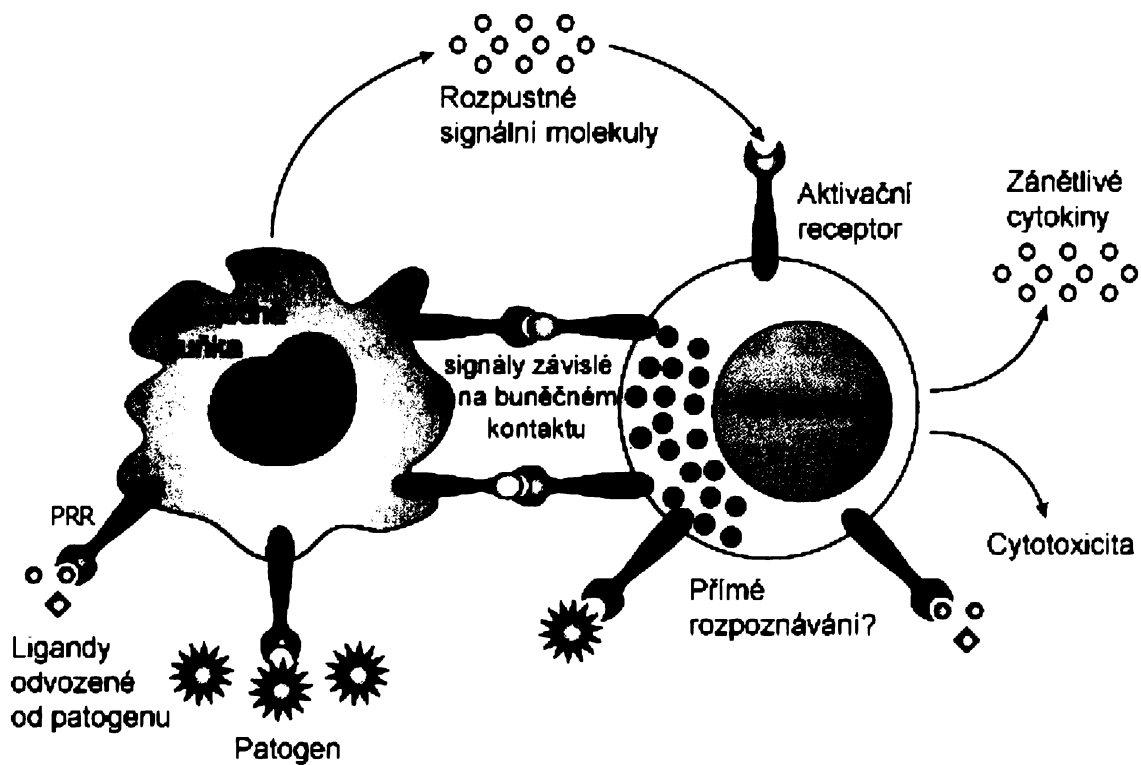
obr.1. NK buňka vypouštějící cytotoxické granule na cílovou buňku. Přejato z [4]

Konsenzu v klasifikaci NK buněk bylo dosaženo v roce 1988 na pátém mezinárodním workshopu o NK buňkách. NK buňky byly definovány jako velké granulární lymfocyty (LGL, „Large Granular Lymphocytes“) neexprimující CD3 ani žádné z řetězců TCR ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), exprimující povrchové molekuly CD16 a NKH-1 (CD56) u lidí a NK-1.1/NK-2.1 u myši a vykazující cytotoxickou aktivitu i při absenci MHC glykoproteinů třídy I i II.^[5]

I přes své pojmenování založené na cytotoxické aktivitě bylo u NK buněk brzy rozeznáno množství dalších funkcí, jako produkce cytokinů, regulace adaptivního imunitního systému a hematopoesy nebo ochranná funkce proti mikrobiálním infekcím a růstu nádorů.^[6]

Aby NK buňka byla schopna uskutečňovat své funkce, musí dojít k její aktivaci. Jak ukázali Kärre et al., NK buňky jsou schopny rychlé a specifické, na thymu nezávislé, eliminace buněk deficientních v MHC glykoproteinech třídy I.^[7] Tato pozorování vedla k formulaci tzv. „missing self“ hypotézy. Jak tato hypotéza navrhovala, a jak bylo později prokázáno, NK buňky opravdu pomocí svých inhibičních receptorů specificky rozpoznávají MHC třídy I na povrchu buněk a tímto kontaktem dostávají signál, který brání jejich aktivaci. V případě absence MHC molekul na povrchu cílové buňky nedojde k inhibici a aktivovaná NK buňka cílovou buňku usmrtí pomocí svých cytotoxických mechanismů.^[8]

Jak bylo zjištěno později, existují i další způsoby aktivace NK buněk. Jedná se konkrétně o takzvanou „induced self“ a „non self“ aktivaci. „Induced self“ aktivace vychází ze skutečnosti, že somatické buňky, které jsou vystaveny stresovým podmínkám, exprimují některé specifické povrchové molekuly. Tyto specifické molekuly mohou sloužit jako ligandy pro aktivační receptory NK buněk, čímž napomáhají rozpoznání a eliminaci poškozených nebo pozměněných buněk.^{[9],[10]} „Non self“ aktivace NK buněk, spočívající v přímém rozeznání patogenní struktury, často vyžaduje účast dalších imunokompetentních buněk (obr.2), které po rozeznání cizorodého patogenu dokáží přímým kontaktem aktivovat NK buňky. Jedná se o takzvanou „accessory-cell-dependent“ aktivaci.^[11] NK buňky jsou ale pomocí některých svých receptorů schopny přímo rozeznat produkty cizorodých



obr.2. Schéma „non self“ „accessory-cell-dependent„ aktivace NK buňky. NK buňka dostává aktivační signál o rozpoznání cizorodého patogenu prostřednictvím další, pomocné, buňky
Upraveno dle [11]

organismů.^[10] Navíc, jak začíná být v poslední době zřejmé, NK buňky konstitutivně exprimují i některé PRR („Pathogen Recognition Receptors“ = receptory rozpoznávající struktury charakteristické pro patogeny) známé například u makrofágů či dendritických buněk, například NOD1 a 2^[12] nebo TLR různých tříd.^{[13],[14]}

Poslední způsob rozpoznávání NK buňkami je zprostředkován protilátkami. Jedná se o takzvanou „na protilátkách závislou buněčnou cytotoxicitu“ (ADCC). NK buňky jsou schopny pomocí specifických receptorů rozeznat konstantní Fc doménu protilátek a jsou tedy schopny rozpoznat protilátkami opsonizované cíle a účinně proti nim zasáhnout.^[15]

Vlastní mechanismus cytotoxicity NK buněk je stejný jako v případě cytotoxických T lymfocytů, dochází k navození smrti cílové buňky kombinací nekrotických a apoptických procesů. Tento proces se dá spustit třemi způsoby, pomocí exocytosy perforinů a granzymů, pomocí interakce Fas s FasL a nebo pomocí zesíťování TNF a receptoru pro TNF typu I.^[16]

1.3 NK receptory

Somatická diversita NK receptorů je dána pouze zárodečně. Během vývoje NK buňky nedochází ke genovému přeuspořádání jako například u T nebo B lymfocytů. Receptory na povrchu NK buněk jsou dvou základních typů, aktivační a inhibiční. Výsledná reakce NK buňky po setkání s jinou buňkou je závislá na poměru signálů, které obdrží prostřednictvím těchto receptorů. V případě převahy aktivačních signálů dochází k aktivaci cytotoxických vlastností NK buňky. V případě převahy inhibičních signálů se nic neděje a NK buňka, narozdíl od T nebo B lymfocytů, které po obdržení inhibičních signálů přechází do stavu anergie, pokračuje k další potenciální cílové buňce.^{[1],[2]}

Inhibiční receptory obecně obsahují ve své cytoplasmatické doméně takzvaný ITIM (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif). Tento motiv je charakterizován sekvencí L/V/I/SxYxxL/I/V, kde x značí jakoukoliv aminokyselinu a lomítko značí, že na tom konkrétním místě může být kterákoliv z aminokyselin lomítkem oddělených.^[17] Tyrosin v tomto motivu slouží jako místo fosforylace. Když je tyrosin fosforylován, dochází k asociaci s SH2 doménou obsahujícími fosfatasami (SHP1, SHP2 a SHIP).^[18] SHP je protein tyrosin fosfatasa, odštěpuje fosfát z tyrosinu, čímž ruší účinek aktivačních protein tyrosin kinas. SHIP je inositol fosfatasa, odštěpuje fosfát z PIP₃ za vzniku PIP₂.

Aktivační receptory nemají ve svých cytoplasmatických doménách žádný takovýto motiv, a proto musí asociovat s adaptorovými proteiny. Tyto adaptorové proteiny obsahují takzvaný ITAM (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif). Charakteristická sekvence aminokyselin pro tento motiv je D/ExxYxxL/I x₆₋₈ YxxL/I, kde x značí jakoukoliv aminokyselinu a lomítko značí, že na tom konkrétním místě může být kterákoliv z aminokyselin lomítkem oddělených. Asociace receptorů s adaptorovými proteiny probíhá prostřednictvím nabitých aminokyselin v transmembránové doméně. Transmembránové domény adaptorových proteinů obsahují Asp zatímco transmembránové domény receptorů obsahují Lys nebo Arg. Vlastní adaptory jsou transmembránové proteiny I. třídy s pouze minimální extracelulární doménou, která v principu obsahuje pouze Cys, pomocí kterého dochází k dimerizaci. V NK buňkách se vyskytují 3 adaptory obsahující ITAM. Jedná se o DAP12 (také známý jako KARAP), FcεRIγ a CD3ζ. Kromě těchto 3 adaptorů existuje ještě čtvrtý, DAP10, který však místo ITAMu obsahuje signalizační motiv YINM.^[17]

Obecně se NK receptory dělí do dvou hlavních strukturních skupin, imunoglobulinové a C-lektinové.

Receptory imunoglobulinové povahy byly zatím rozpoznány pouze na lidských NK buňkách, kde se vyskytují dvě jejich rodiny. První z nich je rodina KIR („Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor“), druhá LILR (Leukocyte Immunoglobuline-like Receptor).^[19]

Z těchto dvou zastávají důležitější úlohu „KIRy.“ Celkově jich je v lidském genomu (konkrétně na chromosomu 19q13.4) kódováno 17, z čehož dva jsou pravděpodobně pseudogeny.^[20] Tyto receptory jsou kromě NK buněk exprimovány i $\gamma\sigma$ TCR⁺ T buňkami a některými CD4⁺ a CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺ T buňkami.^[21] Jedná se o transmembránové proteiny I. třídy se dvěma (KIR2D) nebo třemi (KIR3D) imunoglobulinovými doménami.^{[22]. [23]. [24]} Podle délky intracelulární domény se „KIRy“ dále dělí na „krátké“ (KIR2DS a KIR3DS) a „dlouhé“ (KIR2DL a KIR3DL). „Dlouhé KIRy“ obsahují ve své intracelulární doméně ITIM a slouží tedy jako inhibiční receptory. „Krátké KIRy“ jsou asociovány s adaptorovým proteinem DAP12 a jedná se tedy o receptory aktivační. Ligandy „KIRů“ jsou obecně HLA molekuly.^[19]

Skupina C-lektinových receptorů je tvořena několika rodinami homo nebo heterodimerických receptorů, jejichž různí zástupci se vyskytují na myších i lidských NK buňkách. Obecně se jedná o transmembránové proteiny II. typu.^[19]

Členové rodiny Ly49 receptorů jsou funkčním analogem lidských „KIRů“ u myši. Jedná se o rodinu homodimerických receptorů, jejíž jednotliví členové mají aktivační i inhibiční funkce. Aktivační receptory asociují s DAP12 adaptorovým proteinem^[25], inhibiční obsahují ve své intracelulární části ITIM. Ligandy Ly49 receptorů jsou, podobně jako u „KIRů“, MHC glykoproteiny třídy I. Rodiny Ly49 a KIR receptorů jsou tedy výborným příkladem konvergentnosti evoluce, kdy receptory dvou úplně odlišných rodin zastávají totožné funkce.^[19]

Další C-lektinovou rodinou je rodina NKG2 receptorů. Tato rodina vyskytující se u lidí i myši se skládá z 6 členů, z nichž 5 (NKG2A, -B, -C, -E a -F) si je velmi podobných a tvoří disulfidově vázané heterodimery s molekulou CD94. V lidském genomu jsou konkrétně kódovány NKG2A, -B, -C, -E a -F^[26], přičemž NKG2A a B jsou pouze odlišně sestřižené produkty téhož genu.^[27] V myším genomu jsou kódovány NKG2A, -C a -E.^[28] Ligandy těchto receptorů jsou neklasické MHC molekuly (HLA-E u lidí a Qa1^b u myši). Receptory NKG2A/B obsahují ve své intracelulární doméně ITIM, jedná se tedy o inhibiční receptory. NKG2C/E asociují s adaptorovým proteinem DAP12 a jedná se tedy o receptory aktivační.^[29] Molekula NKG2F má pouze cytoplasmatickou doménu a transmembránovou část, extracelulární doména chybí v důsledku chybně umístěného stop kodonu.^[30] NKG2 – CD94 heterodimery jsou kromě NK buněk exprimovány i na $\gamma\sigma$ TCR⁺ T buňkách a některých

skupinách CD8⁺ αβTCR⁺ T buněk.^{[31],[32]} Na povrchu NK buněk se objevují i homodimery CD94, které však postrádají cytoplasmatické domény a neváží HLA-E/Qa1^b.^{[29],[33]}

Poslední člen této rodiny, NKG2D, který se však často vyčleňuje, tvoří disulfidově vázané homodimery.^[34] Jeho ligandy tvoří rodina strukturních analogů MHC třídy I. U lidí se jedná o MICA, MICB a ULBP1 – 4, myšími ligandy jsou tzv. RAE molekuly. V obou případech se jedná o tzv. „induced self“ ligandy.^[35] U myši byly objeveny dvě verze NKG2D receptoru vzniklé odlišným sestřihem. Jedná se o delší NKG2D-L a kratší NKG2D-S varianty lišící se o 13 aminokyselin v N-terminální cytoplasmatické doméně. NKG2D-L asociuje s DAP10 adaptorovým proteinem, zatímco NKG2D-S asociuje s DAP12.^[36] U lidí se vyskytuje pouze delší NKG2D-L verze, která taktéž asociuje s DAP10 adaptorem.^[37]

Poslední větší rodinou C-lektinových receptorů je rodina NKR-P1 receptorů. U myši tato rodina čítá celkem 7 zástupců, NKR-P1A – G. Dva členové této rodiny, NKR-P1B a NKR-P1D obsahují ve svých cytoplasmatických doménách ITIM a jedná se tedy o receptory inhibiční. Zbývající funkční členové rodiny - NKR-P1A, C a F jsou aktivační receptory.^[38] Další identifikovaný člen této rodiny, NKR-P1E, je pseudogen.^[39] O NKR-P1G není kromě jeho existence zatím známo prakticky nic.^[40] V případě aktivačního NKR-P1C dochází k asociaci s adaptorem FcεRIγ^[41], u NKR-P1A a -F zatím nebyla asociace s žádným adaptorem prokázána, ale vzhledem k tomu, že transmembránové části receptorů obsahují nabitě aminokyseliny, dají se takovéto interakce předpokládat.^[19] Narozdíl od myši se u člověka objevuje pouze jediný zástupce této rodiny, NKR-P1A. hNKR-P1 nemá ve své cytoplasmatické části ITIM a v transmembránové doméně nemá nabitě aminokyseliny.^[42] Zda a jak tedy signalizuje, nebylo dlouho jasné. Novější publikace naznačují asociaci receptoru s enzymem kyselou sfingomyelinasou vedoucí k tvorbě ceramidů a následně dalších signálních molekul.^[43]

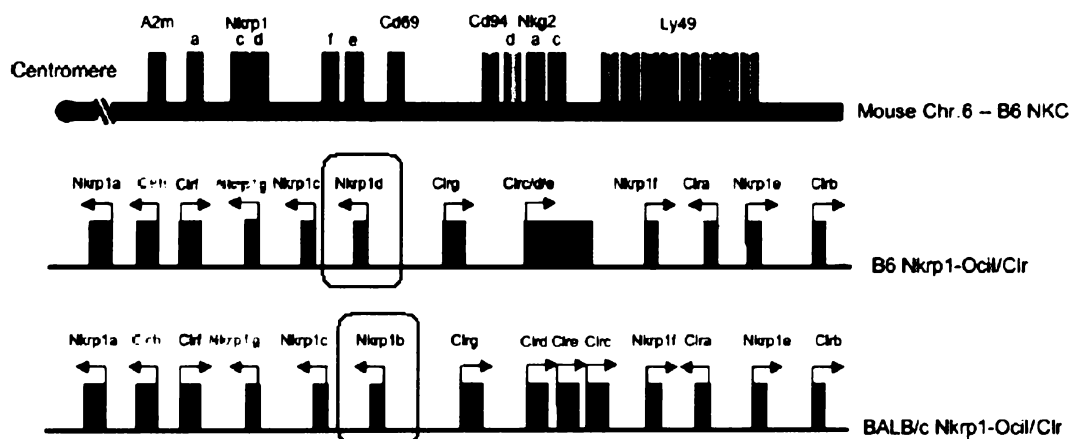
1.4 NKR-P1D

Rodina myších NKR-P1 receptorů byla poprvé popsána počátkem 90. let jakožto homolog krysích NKR-P1 několika výzkumnými skupinami^{[44],[45],[46]} ve formě třech svých zástupců, NKR-P1A, B a C.^[47] Další dva funkční zástupci, NKR-P1D a F, a jeden pseudogen, NKR-P1E, byli popsáni o 10 let později.^[39] Poslední zástupce, NKR-P1G, byl popsán teprve před třemi lety.^[40] Geny kódující všechny zástupce NKR-P1 rodiny jsou uloženy na myším chromosomu 6 v oblasti, která byla označena jako NKC (NK gene Complex).^[44] Geny kódující NKR-P1 receptory jsou rozděleny do 6 exonů, z nichž první kóduje cytoplasmatickou doménu, druhý transmembránovou doménu, třetí „stopku“ („stalk region“) a zbylé tři extracelulární doménu.^[39] NKR-P1 receptory jsou transmembránové proteiny II. třídy s charakteristickou lektinovou doménou podobnou dalším C-lektinovým receptorům.^[48]

Samotný NKR-P1D je 223 aminokyselin dlouhý transmembránový protein II. typu s cytoplasmatickou doménou o předpokládané délce 43 aminokyselin, transmembránovou o délce 21 aminokyselin a extracelulární o délce 159 aminokyselin. Jak již bylo zmíněno dříve, NKR-P1D je inhibiční receptor, jehož cytoplasmatická doména obsahuje klasický ITIM mezi pozicemi 6 a 11.^[39]

Jak naznačily již některé dřívější práce, receptory NKR-P1D a NKR-P1B by mohly představovat různé receptory o stejné funkci, kódované u různých myších linií na podobných místech NKC, které se však nevyskytují současně.^{[49],[39]} (obr.3) Že tomu tak opravdu je, prokázali v roce 2006 Carlyle et al., když zjistili, že gen kódující NKR-P1D získaný z NK buněk B6 myší linie má oproti genu kódujícímu NKR-P1B získanému z NK buněk BALB/c myší linie 21 nesynonymních substitucí, což je úroveň divergence pozorovaná i mezi ostatními členy NKR-P1 rodiny. V genomu B6 myší však nebyl nalezen gen kódující NKR-P1B a naopak v genomu BALB/c myší nebyl nalezen gen kódující NKR-P1D.^[40] Rozdíly mezi těmito receptory jsou i u dalších myších linií, jak ukazuje například fakt, že NKR-P1D získaný ze 129 myší linie je podobný NKR-P1B^{BALB/c} více než NKR-P1D^{B6}.^[50]

Bez ohledu na odlišnosti extracelulárních domén všechny NKR-P1B i NKR-P1D sdílí společný ligand, Clrb (viz níže). Bylo prokázáno, že tato interakce vede k ochraně cílové buňky před cytotoxickými vlastnostmi NK buněk. Jedná se tedy o příklad výše zmíněné „missing self recognition.“^{[50],[51]} Dlouho uznávaný předpoklad, že tento způsob rozpoznávání je charakteristický pro MHC třídy I^[8] se tedy ukázal jako neplatný. Do celkového konceptu „missing self“ hypotézy však interakce NKR-P1D/B – Clrb zapadá velmi dobře. Vzhledem k tomu, že rozšíření MHC třídy I a Clrb jsou velmi podobná, a navíc byla u buněk tumorů



Obr.3. Schéma rozložení jednotlivých genů na NKC různých myších linií. Umístění NKR-P1B a NKR-P1D označeno.
Upraveno dle [40].

pozorována výrazná downregulace Clrb, je evidentní, že tento nově objevený model „missing self“ rozpoznávání tvoří jen další paralelní systém k systému již dříve známému.^[51]

Jak ale naznačuje práce, kterou uveřejnili Yang et al. v roce 2006, situace nejspíše nebude pouze takto jednoduchá. Po společné kultivaci krysích NK buněk s dendritickými buňkami, získávají NK buňky lepší lytické schopnosti proti cílovým buňkám. V případě vyřazení NKR-P1B však k tomuto zlepšení lytických schopností nedochází. Tyto výsledky naznačují, že NKR-P1B může sloužit k vzájemné koaktivaci NK buněk a dendritických buněk. Přesný mechanismus tohoto procesu však zatím není znám.^[52]

1.5 Clrb

Clrb je členem rodiny takzvaných „C-type lectin-related“ molekul. Tato rodina je kódována na myším NKC komplexu a byla poprvé popsána v roce 2000 pomocí náhodného sekvenování tohoto komplexu (Clra,b,c,d a e) a RT-PCR mRNA NK buněk vystavených IL-12 (Clrb,f a g).^[53] Poslední člen této rodiny, Clrh, byl objeven později pomocí BAC analýzy za použití primerů specifických pro Clrb.^[40]

Nukleotidové sekvence genových úseků získaných náhodným sekvenováním vykazovaly 80 – 90% vzájemnou homologii, homologie s jinými, do té doby známými, molekulami však nebyla pozorována. Po překladu do aminokyselinové sekvence se projevila 40% identita s lektinovou doménou NK receptoru CD69.

Nukleotidové sekvence úseků získaných RT-PCR vykazovaly vzájemnou 90% homologii. Na aminokyselinové úrovni se jednalo o vzájemnou identitu 49-67% a 43-48% identitu s produkty lidského genu LLT1^[53], který slouží jako ligand hNKR-P1A.^[54]

Genové uspořádání všech Clr molekul je stejné. Gen kódující každého zástupce je rozdělen do 5 exonů, z nichž první kóduje cytoplasmatickou doménu, druhý transmembránovou doménu a zbývající 3 exony kódují extracelulární doménu.^[53]

Samotný Clrb je 207 aminokyselin dlouhý transmembránový protein II. třídy s cytoplasmatickou doménou o předpokládané délce 43 aminokyselin, transmembránovou o délce 21 aminokyselin a extracelulární o délce 143 aminokyselin. Extracelulární doména má 5 cysteinů a 3 N-glykosylační místa na pozicích 74, 100 a 158.^[55]

Alternativní název pro Clrb je Ocil, což je zkratka vycházející z názvu „Osteoclast Inhibitory Lectin“. Jak již tento název napovídá, Clrb za fyziologických podmínek slouží k inhibici tvorby osteoklastů.^[55] Ocil^{-/-} myši neprojevují s výjimkou abnormalit ve stavbě kostí žádné další defekty. Bylo pozorováno pouze snížení objemu trámcových částí kostí u mladých jedinců a osteopenie u dospělých jedinců, jakožto důsledek vyššího výskytu osteoklastů a snížení tvorby kostí.^[56]

Clrb, stejně jako ostatní lektiny, také rozpoznává sacharidy. Tyto interakce se sacharidy nemají však za následek inhibici tvorby osteoklastů. Konkrétně bylo prokázáno rozpoznání sulfatovaných cukrů dextran sulfátu, fukoidanu a λ -carrageenanu. Nesulfatovaný dextran však rozpoznáván není. Podobně není rozpoznávána ani kyselina hyaluronová obsahující zbytky kyseliny sialové, což nasvědčuje specifickému rozpoznávání sulfatovaných cukrů, spíše než nespecifické interakci s jejich záporně nabitými složkami. Rozpoznávané sacharidy se in vivo vyskytují v pojivové tkáni, což může naznačovat význam Clrb při rozpoznávání extracelulární matrix, popřípadě adhezi.^[57]

Hlavním receptorem pro Clrb je NKR-P1D, interakce s nímž vede k negativní regulaci NK buněk (viz výše).

2. Cíle práce

- amplifikace insertů kódujících vybrané extracelulární úseky NKR-P1D a Clrb receptorů
- ligace insertů do vektoru pBS a následně produkčního pET vektoru
- transformace kompetentních bakteriálních buněk
- ověření správnosti DNA sekvencí sekvenací
- výběr optimálního producenta
- optimalizace produkce proteinů
- příprava inkluzních tělísek
- kontrola správnosti aminokyselinové sekvence produkováných proteinů N-terminální sekvenací

3. Materiál

3.1 Přístroje

- Analytické váhy AL54 *Mettler Toledo, ČR*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga Avanti J-26 XP *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga MPW 375 *MPW Med. Instruments, Polsko*
- Centrifuga Spectrafuge 16M *Edison, USA*
- Centrifuga VSMC-13 *Shelton Scientific, USA*
- Centrifuga Z 233 MK-2 *Hermle, Německo*
- DNA sekvenátor ABI Prism 3100 *Applied Biosystems, USA*
- Dokumentační systém na focení gelů G:Box HR *Syngene, UK*
- Chladnička *Electrolux, Švédsko*
- Chladnička *Skandiluxe, Dánsko*
- Iluminátor BTS-20.LS *UVItec, UK*
- Inkubátor BT-120M *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- JETQUICK Gel Extraction Spin Kit *Genomed, Německo*
- Ledovač Ice Flaker *Brema Ice Makers, Itálie*
- Mrazící box – 80°C (Ultra low) *Revco, USA*
- Napájecí zdroj MP-250V *Major Science, USA*
- Napájecí zdroj ECPS 3000/150 *Pharmacia, Švédsko*
- Magnetická míchačka MM 2A *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- pH metr Φ200 *Beckman Coulter, USA*
- Ploténkový vařič *ETA, ČR*
- Proteinový sekvenátor Procise *Applied Biosystems, USA*
- Předvážky HF-1200G *AND, USA*
- PVDF membrány *Pall Corp., USA*
- Skener Astra 4700 *UMAX, ČR*
- Souprava pro elektroforesu *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro elektroforesu *Bio-Rrad, USA*

- Souprava pro elektropřenos (Semi-dry blotter) *Sigma-Aldrich, USA*
- Spektrofotometr DU-70 *Beckman Coulter, USA*
- Termocyklér Mastercycler Personal *Eppendorf, Německo*
- Thermomixer Comfort *Eppendorf, Německo*
- Třepačka na Erlenmeyerovy baňky *Sanyo Gallenkamp Ltd., UK*
- Třepačka na zkumavky BigGer Bill *Thermolyne, USA*
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 *Cole-Parmer Instrum. Co., USA*
- Vakuová odparka Speedvac *Jouan, Francie*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody MilliQ *Millipore, USA*

3.2 Chemikálie

- Agar *Oxoid, USA*
- Agarosa *Serva, Německo*
- Akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- Ampicilin *Jersey Lab Supply, USA*
- Azid sodný *Sigma-Aldrich, USA*
- Bacto-tryptone *Oxoid, USA*
- Bacto-yeast extrakt *Oxoid, USA*
- Bromfenolová modř *Sigma-Aldrich, USA*
- BSA *Sigma-Aldrich, USA*
- Coomassie Brilliant Blue R-250 *Serva, Německo*
- DNA marker 100 bp, 1 kb *New England Biolabs, USA*
- dNTPs *Promega, USA*
- DTT *Sigma-Aldrich, USA*
- EDTA *Sigma-Aldrich, USA*
- Ethanol *Lachema, ČR*
- Ethidium bromid *Sigma-Aldrich, USA*
- Fenol *Lachema, ČR*
- Glukosa *Lachema, ČR*
- Glycin *Sigma-Aldrich, USA*
- Hydroxid sodný *Lachema, ČR*

- Chlorid sodný *Lachema, ČR*
- Chlorid hořečnatý *Lachema, ČR*
- Chloroform *Lachema, ČR*
- IPTG *Sigma-Aldrich, USA*
- Isopropanol *Lachema, ČR*
- Kanamycin *Sigma-Aldrich, USA*
- Kyselina chlorovodíková *Lachema, ČR*
- Kyselina octová *Lachema, ČR*
- β -merkapttoethanol *Sigma-Aldrich, USA*
- Methanol *Lachema, ČR*
- N,N'-metylen-bis-akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- PEG (všech molekulových hmotností) *Sigma-Aldrich, USA*
- Sacharosa *Lachema, ČR*
- SDS *Jersey Lab Supply, USA*
- Síran hořečnatý *Lachema, ČR*
- Standardy pro SDS-PAGE *Serva, Německo*
- TEMED *Serva, Německo*
- Tetracyklin *Jersey Lab Supply, USA*
- Tris-HCl *Jersey Lab Supply, USA*
- Triton X-100 *Sigma-Aldrich, USA*
- X-Gal *Serva, Německo*

Všechny použité chemikálie byly v nejvyšší komerčně dostupné čistotě.

3.3 Primery pro PCR

- NKRDFW: 5' – TGC ATA TGT CAG CTA AGC TAG AGT GCC CAC AA – 3'
(*456I7)
- NKRDRE: 5' – TAA GCT TAG GAG TCA TTA CAC GGG GTT TCA T – 3'
(*421A4)
- CLRBFW: 5' – TGC ATA TGA ACA AGA CCT ATG CTG CTT GCC – 3'
(*456I9)
- CLRBRE: 5' – AAG CTT AGT TGA GCT TGC TAC AGA TCC ACA T – 3'
(*456J5)

3.4 Enzymy

- BamHI endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- CIP fosfatasa *New England Biolabs, USA*
- Deep Vent DNA polymerasa *New England Biolabs, USA*
- DNAsI (deoxyribonukleasa I) *Sigma-Aldrich, USA*
- HindIII endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- Lysosym *Jersey Lab Supply, USA*
- NdeI endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- PstI endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- RNAsI (ribonukleasa I) *Sigma-Aldrich, USA*
- SmaI endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- T4 DNA ligasa *Stratagene, USA*
- XbaI endonukleasa *New England Biolabs, USA*

3.5 Inhibitory proteas

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

3.6 Vektory

- pET-30a-(+) *Novagen, USA*
- pBS II SK/KS (-) *Stratagene, USA*

3.7 Bakteriální kmeny

- BL21-Gold (DE3) *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(rB⁻ mB⁻) *dcm*⁺ Tetr gal λ(DE3) *endA Hte*
Stratagene, USA
- NovaBlue *endA1 hsdR17* (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*
F'[*proA' B' lacI'*ZDM15::*Tn10*] (Tet^R) *Novagen, USA*

3.8 Roztoky a pufrы

- **Barvicí roztok pro SDS PAGE a PVDF membrány:** 45 % methanol, 10 % kys. octová, 0,25 % CBB R-250
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE:** 10mM Tris-HCl, 250mM glycin, 0,1% SDS, pH=8,3
- **Ligační pufr pro T4 DNA ligasu** – komerčně dostupný od firmy *Stratagene*
- **NEB 2 pufr** – komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*
- **NEB 3 pufr** – komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*
- **NEB 4 pufr** – komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*
- **Odbarvovací roztok pro PVDF membrány:** 45% methanol, 10% kys. octová
- **Odbarvovací roztok pro SDS PAGE:** 35% ethanol, 10% kyselina octová
- **Pufr pro DNA polymerasu Deep Vent** - dostupný od firmy *New England Biolabs*
- **Pufr pro elektropřenos:** 10mM Tris-HCl, 150mM glycin, 20% methanol, pH = 8,4
- **Roztok akrylamidu:** 30% akrylamid, 1% N,N'-methylen-bis-akrylamid
- **Sol. I pro maxiprep:** 50mM glukosa, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH = 8,0
- **Sol. II pro maxiprep:** 44ml H₂O, 1ml 10M NaOH, 5ml 10% SDS
- **Sol. III pro maxiprep:** 147,2g KAc, 57,5ml ledové HAc, doplnit H₂O do 500ml
- **STE pufr** – 10mM Tris-HCl, 0,1M NaCl, 1mM EDTA, pH = 8,0
- **TAE pufr:** 2M Tris-HCl, 1M HAc, 50mM EDTA, pH = 8,0
- **TE pufr:** 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH = 7,5
- **TES pufr:** 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1 mM merkptoethanol, 1 mM NaN₃, pH=7,4
- **TES pufr se sacharosou:** 25% sacharosa, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, pH=7,4
- **TES pufr s detergentem:** 0,1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM merkptoethanol, 1 mM NaN₃, pH=7,4
- **Vzorkový pufr pro SDS PAGE redukující:** 50mM Tris-HCl, 12 % glycerol, 4% SDS, 0,1% bromfenolová modř, 2% β-merkptoethanol, pH = 6,8

3.9 Média

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

4 Metody

4.1 Příprava insertu pomocí PCR amplifikace

Inserty kódující receptory NKR-P1D^[58] a Clrb^[59] (příloha 1) byly amplifikovány pomocí PCR reakce. Primery, které byly použity, navrhoval Mgr. Ondřej Vaněk a byly dodány firmou *Generi Biotech*.

V případě NKR-P1D se jednalo o forward primer:

5' – TGC ATA TGT CAG CTA AGC TAG AGT GCC CAC AA – 3' (*456I7)

a reverse primer:

5' – TAA GCT TAG GAG TCA TTA CAC GGG GTT TCA T – 3' (*421A4)

V případě Clrb se jednalo o forward primer:

5' – TGC ATA TGA ACA AGA CCT ATG CTG CTT GCC – 3' (*456I9)

a reverse primer:

5' – AAG CTT AGT TGA GCT TGC TAC AGA TCC ACA T – 3' (*456J5)

Pomocí primerů a cDNA získané z RNA izolované ze slezin myši linie C57BL/6^{[58],[59]} byly amplifikovány úseky o 421 párech bazí v případě NKR-P1D a 377 párech bazí v případě Clrb.

Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 1 a termální profil reakce v tabulce 2.

Tabulka 1: Složení PCR reakční směsi:

složka	cDNA templát (100ng)	Deep Vent DNA pol (1M)	forward primer (5μM)	reverse primer (5μM)	dNTPs (10mM)	MgSO ₄ 100mM	10x pufr	H ₂ O
V (μl)	1	1	10	10	2	2	5	19

Tabulka 2: Termální profil PCR reakce:

	teplota (°C)*	čas (min)	
denaturace	95	1	celkem 30x
denaturace	95	0,5	
nasedání primerů	54	0,5	
polymerace	72	1	
polymerace	72	4	

* teplota víčka: 105°C

Produkt PCR reakce byl extrahován fenolem a chloroformem, precipitován ethanolem v prostředí 3M acetátového pufru o pH=5,2, promyt ethanolem, chlazen a centrifugován v centrifuze MPW 375, rotor 11316 při 12000ot/min a 4°C, znovu promyt ethanolem a znovu centrifugován. Supernatant byl odstraněn a peleta byla vysušena pod vakuem. Přibližná délka vzniklého insertu byla ověřena elektroforesou na 1% agarosovém gelu v prostředí TAE pufru s použitím ethidium bromidu jakožto vizualizačního činidla. EtBr interkaluje do DNA a v UV světle fluoreskuje. Nafocení gelu bylo provedeno dokumentačním systémem firmy *Syngene*.

4.2 Ligace připravených insertů do pBS vektoru a transformace kompetentních buněk

1μl komerčního vektoru pBS II SK/KS(-) firmy *Stratagene*^[60] byl linearizován pomocí restriční endonukleasy *SmaI*. Linearizovaný vektor byl přidán k nadbytku předem amplifikovaných úseků ve standardní ligační reakci. Reakce probíhala po 2 hodiny při laboratorní teplotě.

Tabulka 3: Složení ligační směsi pro ligaci do vektoru pBS:

složka	insert	vektor pBS	pufr*	<i>SmaI</i>
V (μl)	8	1	1	0,5

* směs 20% T4 DNA ligačního pufru a 80% NEB 4 pufru

Poté byla směs obsahující plasmidy přidána ke kompetentním buňkám *E. coli* kmene Nova Blue. Bakterie byly transformovány metodou teplotního šoku. Nejdříve 20 – 30 min stály na ledu, poté byly na 1 minutu zahřáty na 42°C a následně byly dalších 5 minut inkubovány na ledu. Nakonec bylo přidáno 0,4ml LB média bez antibiotik, směs byla

protřepána a umístěna na 30 minut do inkubátoru při 37°C. Po inkubaci byly bakterie centrifugovány, supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována ve 100μl LB média. Směs byla sterilně nanášena na LB agarové plotny obsahující ampicilin (150μg/ml), X-gal (90mg/l) a IPTG (100mM). Misky byly inkubovány přes noc při 37°C. Druhý den byly pozorovány bílé a modré kolonie bakterií. Bylo vybráno několik úspěšně transformovaných kolonií, které byly přeneseny každá do 1ml LB média obsahujícího ampicilin (150μg/ml) a byla připravena stacionární kultura.

4.3. Příprava DNA a její restrikční analýza

0,8 ml stacionární kultury obsahující bakterie transformované správným plasmidem bylo zpracováno metodou EasyPrep.^[61] Směs byla cetrifugována v centrifuze USMC-13 při 14000ot/min a laboratorní teplotě. Peleta byla resuspendována ve 30μl STE pufru a směs byla ponechána při laboratorní teplotě. Po uplynutí 5 minut byla směs 90s povařena a dalších 10 minut ponechána při laboratorní teplotě. Výsledná směs byla centrifugována v centrifuze MPW 375, rotor 11316 při 14000ot/min. DNA obsažená v supernatantu byla štěpena pomocí restrikčních endonukleas PstI + BamHI a štěpy byly analyzovány elektroforesou na 1% agarosovém gelu

4.4. Příprava většího množství plasmidové DNA

K přípravě velkého množství plasmidové DNA za účelem uskladnění do zásoby bylo využito protokolu takzvaného maxiprepu.^[62] Princip tohoto protokolu spočívá v odstranění proteinů a RNA ze směsi vzniklé lýzou bakterií a následné purifikaci DNA pomocí promývek fenolem a chloroformem.

1ml kultury bakterií ve stacionární fázi byl zaočkován do 200ml LB media s ampicilinem (150μg/ml) a byla napěstována „noční“ stacionární kultura.

Druhý den byla kultura sklizena centrifugací v centrifuze Avanti J-26XP, rotor JLA16-250, při 8000ot/min, 4°C po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována ve 20ml *Sol.I*. Směs byla centrifugována v centrifuze Z233K, rotor 221.10, při 8000ot/min, 4°C, po dobu 10 minut, supernatant byl slit a peleta byla resuspendována ve 3,5 ml *Sol.I* s 5mg/ml lysozymem. Po pětiminutovém odstání za laboratorní teploty bylo přidáno 7ml *Sol.II*. Takto vzniklá směs byla ponechána 10 minut na ledu a poté bylo přidáno 5,2ml *Sol.III*, směs byla promíchána, ponechána dalších 10 minut na ledu a centrifugována v centrifuze Z233K, rotor 221.10, při 12000ot/min, 4°C, po dobu 30 minut.

Supernatant byl přenesen do čistých kyvet v objemu 15ml na kyvetu a do každé kyvety bylo přidáno 10ml isopropanolu. Po patnáctiminutové inkubaci za laboratorní teploty byly roztoky centrifugovány v centrifuze Avanti J-26XP, rotor J25.55, při 12000ot/min, 20°C po dobu 30 minut. Supernatant byl odstraněn, peleta byla opláchnuta ethanolem a po zakrytí hrdel kyvet perforovaným parafilmem byly kyvety umístěny do vakua na 15 minut.

Po vysušení byla peleta resuspendována ve 2ml TE pufru, bylo přidáno 10μl RNasy a směs byla 30 minut inkubována při 37°C. Poté byly přidány 2ml fenolu. Roztok byl protřepán a centrifugován v centrifuze MPW 375, rotor 11324, při 12000ot/min, 4°C po dobu 5 minut. Vrchní fáze byla odebrána a byl k ní přidán 1ml fenolu a 1ml chloroformu. Po opětovné centrifugaci a odebrání horní fáze byly přidány 2ml chloroformu. Směs byla opět centrifugována a opět byla odebrána horní frakce. K ní byla přidána 1/5 objemu NaAc pufru o pH=5,2, 2,5 objemu 95% ethanolu a celá směs byla zmrazena na -20°C. Po 30 minutách byla směs rozmrazena a centrifugována v centrifuze MPW 375, rotor 11324 při 12000ot/min, 4°C po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta byla omyta 70% ethanolem a sušena pod vakuem. Suchá sraženina byla přenesena do mikrozkušavky a resuspendována ve 160μl H₂O. K roztoku bylo přidáno 40μl 4M NaCl a 200μl roztoku polyethylenglykolu a výsledný roztok byl ponechán 1 hodinu na ledu. Poté byla směs centrifugována v centrifuze MPW 375, rotor 11316 při 12000ot/min, 4°C po dobu 10 minut. Supernatant byl slit a sraženina byla rozpuštěna ve 100μl TE pufru. Byla zopakována extrakce fenolem, směsí fenolu s chloroformem a pouze chloroformem, precipitace pomocí NaAc a ethanolu a nakonec zamražení na -70°C. Po rozmražení byla směs centrifugována v centrifuze MPW 375, rotor 11316 při 12000ot/min, -9°C po dobu 10 minut, peleta byla promyta ethanolem, vysušena pod vakuem a nakonec resuspendována v 55μl TE pufru. Koncentrace a čistota připravené DNA byla stanovena spektrofotometricky. Poměr absorbancí vzorku při 260 a 280 nm by měl být přibližně roven 1,8. Nižší poměr naznačuje obsah proteinů ve vzorku, vyšší kontaminaci RNA. Koncentrace byla nakonec upravena na hodnotu 1μg/μl a roztok byl zamražen při -20°C.

Kontrolní restriční štěpení bylo provedeno restričními endonukleasami NdeI + HindIII a PstI + BamHI.

4.5. Konstrukce pET vektorů a transformace kompetentních buněk

DNA insertů byla pomocí restrikčních endonukleas NdeI a HindIII vyštěpena z pBS vektoru a rozdělena pomocí elektroforesy na 1% agarosovém gelu. Získané DNA fragmenty byly poté ligovány do pET30a(+) vektoru.^{[63],[64]}

K 8μl plasmidové DNA (pBS) získané metodou EasyPrepu byly přidány 2μl NEB2 pufru, 10μl vody, 1,2μl NdeI a 0,8μl HindIII restrikčních endonukleas. Směs byla 1 hodinu inkubována při 37°C. Komerční vektor pET-30a(+) firmy *Novagen* byl linearizován za stejných podmínek. Po uplynutí 1 hodiny bylo k linearizovanému vektoru přidáno 0,5μl CIP a směs byla inkubována další hodinu při 37°C. Vzorek obsahující vyštěpené inserty byl rozdělen elektroforesou na 1% agarosovém gelu, inserty DNA byly z gelu vyříznuty a purifikovány pomocí JETQUICK Gel Extraction Spin Kitu firmy *Genomed* dle návodu přiloženému ke kitu.^[65] Byla připravena směs pro ligační reakci o složení znázorněném v tabulce 4. Směs byla inkubována 3,5 hodiny při 20°C.

Tabulka 4: Složení ligační směsi pro ligaci do vektoru pET:

složka	insert	vektor pET	10x ligační pufr	T4 DNA ligasa
V (μl)	10	2	2	1

Ke 100μl kompetentních buněk *E. coli* kmene Gold bylo přidáno 10μl ligační směsi a bakterie byly podrobeny transformaci teplotním šokem popsané již v bodě 4.2. Směsi s transformovanými bakteriemi byly naneseny na misky s LB agarem obsahujícím kanamycin (5μg/ml) a tetracyklin (50μg/ml) a inkubovány přes noc při 37°C.

4.6. Příprava DNA a její restrikční analýza

0,8 ml stacionární kultury obsahující bakterie transformované správným plasmidem bylo zpracováno metodou EasyPrep dle postupu popsaného již v bodě 4.3. Ze vzniklé DNA byla provedeno restrikční štěpení pomocí restrikčních endonukleas XbaI + HindIII a NdeI + HindIII. K analýze byla využita elektroforesa na 1% agarosovém gelu.

4.7. Plasmid Maxiprep

Větší množství plasmidové DNA v pET vektoru bylo připraveno protokolem shodným s postupem popsaným v bodě 4.4. Kontrolní štěpení bylo provedeno restrikčními endonukleasami NdeI + HindIII a XbaI + HindIII.

4.8 Kontrola DNA sekvencí sekvenací

Misky s narostlými koloniemi bakterií obsahující inserty v pBS i pET vektorech byly odeslány do DNA sekvenační laboratoře MBÚ AV ČR v.v.i. dr. Jurgenu Felsbergovi, který provedl analýzu dideoxynukleotidovou metodou na sekvenátoru ABI Prism 3100 firmy *Applied Biosystems*.

4.9 Výběr produkčních klonů NKR-P1D a Clrb („Plus-mínus pokus“)

200 μ l kompetentních buněk *E. coli* kmene Gold bylo transformováno 0,5 μ l zásobní plasmidové DNA získané metodou maxiprepu v bodě 4.7. Po noční kultivaci na miskách s LB agarem obsahujícím kanamycin (5 μ g/ml) a tetracyklin (50 μ g/ml) v inkubátoru při 37°C byly vybrány 4 kolonie z každé misky a každá byla zaočkována do 1ml LB media obsahujícího kanamycin (5 μ g/ml) a tetracyklin (50 μ g/ml). Třepáním při 37°C byly připraveny stacionární kultury. Z každé stacionární kultury bylo odebráno dvakrát 10 μ l a zaočkováno do 1ml čerstvého LB Kan Tet media. 8 takto vzniklých kultur bylo kultivováno na třepačce při 37°C do $OD_{550} \cong 0,7$. Poté byla z dvojice identických kultur vždy jedna indukována IPTG do celkové koncentrace 0,1mM. Po dalších pěti hodinách kultivace bylo z každé kultury odebráno 200 μ l. Vzorek byl centrifugován na stolní centrifuze Spectrafuge 16M při 14000ot/min po dobu 10 minut. Supernatant byl odsát a peleta byla resuspendována ve 20 μ l 1x koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru na SDS elektroforesu. Směs byla povařena na vodní lázni, sonikována, znovu centrifugována a následně byla provedena analýza pomocí SDS PAGE na 15% gelu o složení znázorněném v tabulce 5. Na základě množství produkovaného proteinu byl vybrán optimální producent pro každý protein.

Tabulka 5: Složení gelu pro SDS-PAGE:

	15% separační gel	5% zaostřovací gel
	V (ml)	
voda	2,3	1,4
roztok akrylamidu	5,0	0,33
1,5M Tris-HCl	2,5; pH 8,8	0,25; pH 6,8
10% SDS	0,1	0,02
10% APS	0,1	0,02
TEMED	0,004	0,004

4.10 Optimalizace produkce NKR-P1D a Clrb

Ze stacionárních kultur optimálních producentů získaných v bodě 4.9 bylo zaočkováním 10 μ l kultury do 1ml čerstvého LB Kan Tet media připraveno 36 kultur, které byly kultivovány na třepačce při 37°C do OD₅₅₀ \cong 1,0. Poté byly kultury indukovány IPTG do celkové koncentrace uvedené v tabulce 6 a kultivovány při teplotách a po doby uvedené tamtéž.

Tabulka 6: Schéma indukce a následné kultivace jednotlivých kultur

		3 hodiny						6 hodin						
37°C	B	0,003 mM	0,01 mM	0,03 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,9 mM	0,003 mM	0,01 mM	0,03 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,9 mM	vz 1-12
	D	0,003 mM	0,01 mM	0,03 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,9 mM	0,003 mM	0,01 mM	0,03 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,9 mM	vz 25-36
		4 hodiny						8 hodin						
28°C	B	0,003 mM	0,01 mM	0,03 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,9 mM	0,003 mM	0,01 mM	0,03 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,9 mM	vz 13-24

Po uplynutí stanovených časů byly všechny kolonie sklizeny a byla provedena analýza pomocí SDS PAGE na 15% gelu. Na základě množství produkovaného proteinu byly vybrány optimální podmínky produkce.

4.11 Příprava inkluzních tělísek NKR-P1D a Clrb

Ze stacionární kultury optimálních producentů byly zaočkováním 40 μ l kultury do 4ml čerstvého LB Kan Tet media a následnou kultivovací na třepačce při 37°C připraveny startery. Poté byly tyto kultury zaočkovány do 1l čerstvého LB Kan Tet media a kultivovány na třepačce při 37°C do OD₅₅₀ \cong 1,0. Následně byly kultury indukovány 0,03mM (Clrb) a 0,3mM (NKR-P1D) IPTG a ponechány na třepačce při 37°C. Po uplynutí 6 hodin byly kultury sklizeny centrifugací v centrifuze Beckman J-6 při 3600ot/min, 4°C po dobu 10 minut. Supernatant byl slit a peleta byla resuspendována ve 20ml TES pufru pH7,4. Směs byla přenesena do centrifugačních kyvet JA25.50 a centrifugována v centrifuze Avanti J-26 XP (rotor JA-25.50) při 10 000ot/min, 4°C po dobu 15 minut. Supernatant byl slit a peleta byla resuspendována ve 20ml TES pufru obsahujícího 25% sacharosu, 1mM PMSF, 1 μ M leupeptin a 1 μ M pepstatin a krátce sonikována. Poté byl obsah kyvet zamražen na -80°C. Po opětovném rozmražení byl přidán MgCl₂ do celkové koncentrace 10mM, 10 μ l DNAsy a 10 μ l RNAsy. Vzorky byly na ledu sonikovány 6 x 30s a následně centrifugovány v centrifuze Avanti J-26 XP (rotor JA-25.50) při 18 000ot/min, 4°C po dobu 15 minut. Supernatant byl slit

a peleta byla resuspendována v TES pufru s 0,1% Tritonem. Směs byla centrifugována za stejných podmínek jako předtím. Promývka TES puftrem s Tritonem byla zopakována celkem třikrát. Nakonec byly vzorky dvakrát promyty TES puftrem bez Tritonu a pelety byly zamraženy k dalšímu použití. Supernatanty z jednotlivých promývek i výsledné inkluze byly analyzovány pomocí SDS PAGE na 15% gelu.

4.12 Přenos proteinu na PVDF membránu a kontrola aminokyselinové sekvence sekvenací

Na spodní desku přístroje Semi-dry blotter byla umístěna plastová šablona s otvorem zhruba velikosti elektroforetického gelu, na ni bylo položeno 6 filtračních papírů o rozměrech 6x8 cm navlhčených v MetOH transfer pufru. Na filtrační papíry byla umístěna PVDF membrána předem ošetřená methanolem, na ni gel z SDS elektroforesy obsahující proteiny, které měly být analyzovány a navrch dalších 6 navlhčených filtračních papírků o stejném rozměru. Přístroj byl uzavřen a připojen ke zdroji stejnosměrného napětí tak, aby proteiny vyputovaly z gelu a zachytily se na membránu. Přenos probíhal přibližně 30 minut při 40mA.

Proteiny z membrány byly analyzovány Edmanovým odbouráváním na proteinovém sekvenátoru Procise firmy *Applied Biosystems* na UK-PřF panem profesorem Bezouškou.

5 Výsledky

5.1 PCR amplifikace insertů kódujících NKR-P1D a Clrb

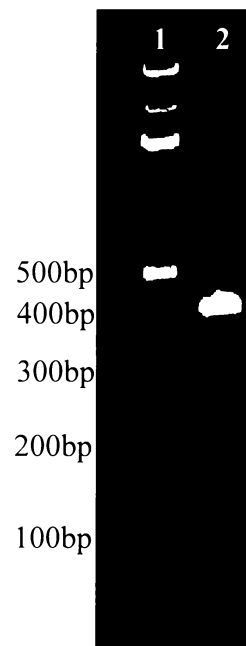
K PCR amplifikaci insertů kódujících části receptorů NKR-P1D a Clrb bylo využito primerů popsanych v části „Metody“. Jako templát byla použita cDNA získaná kolegyněmi Celadovou a Holubovou přepisem RNA ze slezin myši linie C57BL/6^[58, 59].

Analýza amplifikovaných insertů byla provedena pomocí elektroforesy na 1% agarosovém gelu v prostředí TAE pufru. K detekci byl využit EtBr a UV iluminátor.

obr. 4: Fotografie gelu využitého ke kontrole velikosti vzniklého produktu.

dráha 1: 1kb žebřík

dráha 2: NKR-P1D insert



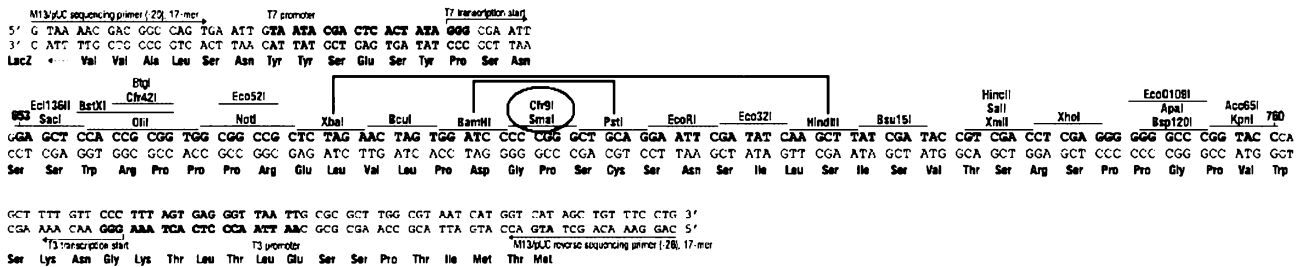
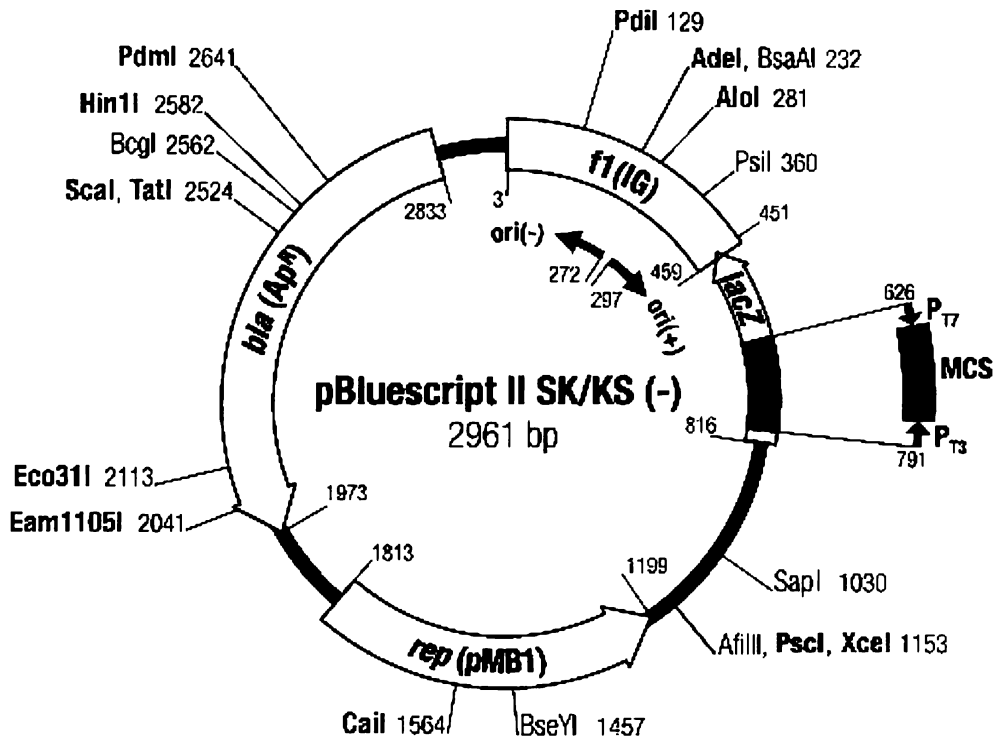
Z obrázku je vidět, že délka vzniklého PCR produktu odpovídá předpokládané délce 422 bp. Dá se tedy předpokládat, že PCR amplifikace proběhla v pořádku.

5.2 Ligace připravených insertů do pBS vektoru a transformace kompetentních buněk

Geny získané PCR amplifikací byly zaligovány do linearizovaného vektoru pBS II SK/KS(-) firmy *Stratagene*. (obr. 5) Po standardní ligační reakci a transformaci kompetentních buněk *E. coli* kmene Nova Blue podle standardního protokolu teplotního šoku byly buňky rozetřeny na agarové plotny obsahující ampicilin (150 μ g/ml), X-gal (90mg/l) a IPTG (100mM) a ponechány přes noc při 37°C.

Ráno byl proveden „blue-white screening“, speciální vlastnost pBS vektoru umožňující rozpoznat bakterie transformované plasmidem obsahujícím úspěšně zaligovaný insert. Při úspěšné transformaci dojde totiž k přerušení oblasti kódující α podjednotku lacZ proteinu (viz obr. 5). DNA bakterie obsahuje geny kódující Ω podjednotku. Tyto dvě podjednotky dohromady tvoří funkční β -galaktosidasu. Pokud došlo k úspěšné ligaci, a tedy přerušení genu pro α podjednotku lacZ proteinu, není bakterie schopna metabolizovat galaktosu. Toto je zjišťováno pomocí chromogenního substrátu zvaného X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid), jehož štěpný produkt je jasně modrý. Kolonie

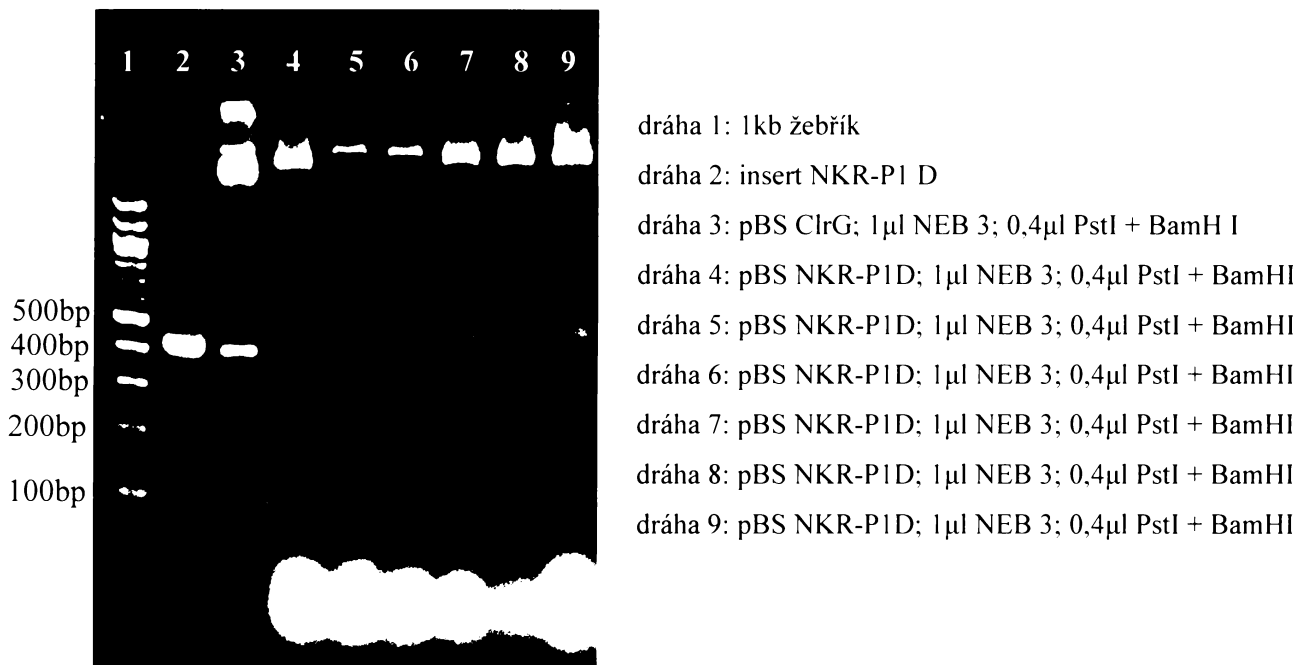
bakterií schopných metabolisovat galaktosu se tedy barví do modra, zatímco kolonie bakterií obsahující úspěšně zaligovaný plasmid zůstávají bílé.^[60]



obr. 5: Vektorová mapa pBS II SK/KS (-) vektoru se znázorněným SmaI místem, kam je vkládán insert a páry restričních endonukleas užitých pro restriční analýzy. Upraveno dle [66]

5.3 Restrikční analýza insertů v pBS

Z 0,8 ml „noční kultury“ byla pomocí metody EasyPrepu získána plasmidová DNA, která byla následně analyzována pomocí restrikčních endonukleas PstI a BamHI (obr. 6)

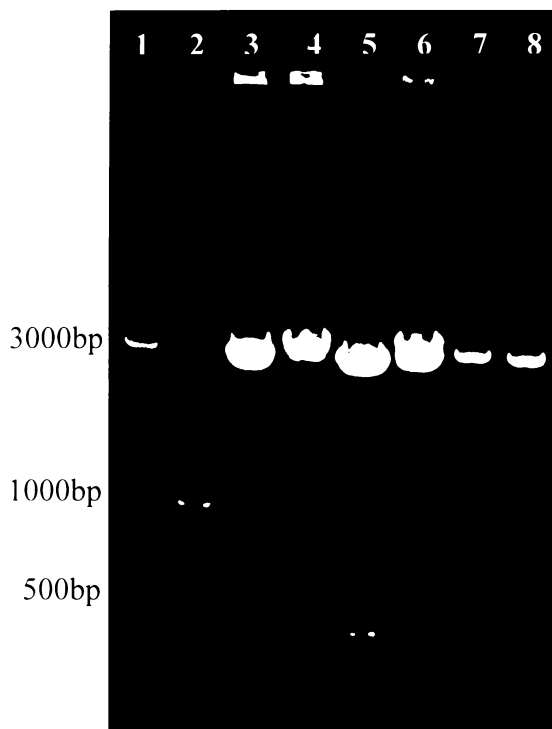


Obr. 6: Fotografie gelu použitého ke kontrole ligace insertu NKR-P1D do pBS vektoru.

Jako pozitivní se jeví klony ve drahách 4, 6, 7, 8 a 9. Pro další práci byly vybrány klony ze drah 4, 7 a 8.

5.4 Příprava většího množství plasmidové DNA (pBS) metodou Maxiprep a její kontrola restrikční analýzou

200ml „noční“ kultury bylo sklizeno a zpracováno podle standardního protokolu Maxiprep^[62]. Kvalita preparátu byla následně zkontrolována restrikčním štěpením pomocí restrikčních endonukleas PstI + BamHI a XbaI + HindIII (obr.7)



dráha 1: 1 kb žebřík

dráha 2: 100bp žebřík

dráha 3: pBS Clrb; 1μl NEB 3; 0,4μl PstI + BamHI

dráha 4: pBS Clrb; 1μl NEB 3; 0,4μl NdeI + HindIII

dráha 5: pBS Clrg; 1μl NEB 3; 0,4μl PstI + BamHI

dráha 6: pBS Clrg; 1μl NEB 3; 0,4μl NdeI + HindIII

dráha 7: pBS NKR-P1D; 1μl NEB 3; 0,4μl PstI + BamHI

dráha 8: pBS NKR-P1D; 1μl NEB 3; 0,4μl NdeI + HindIII

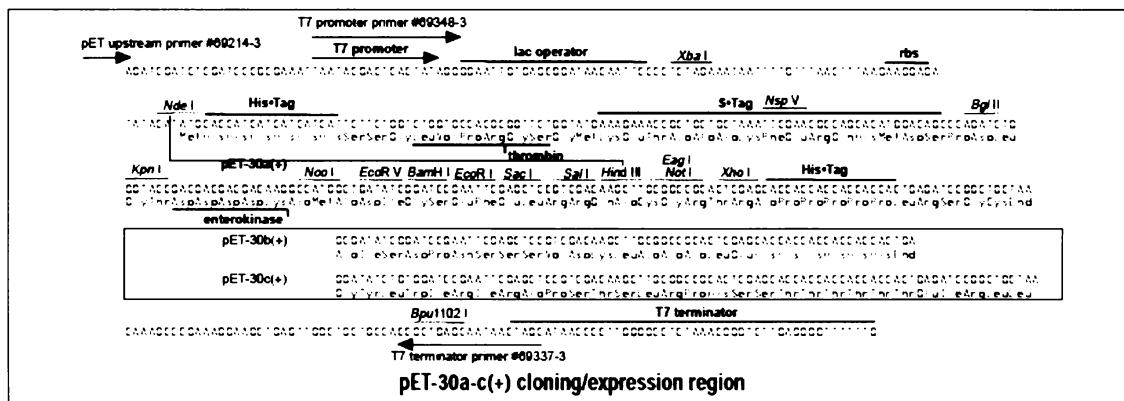
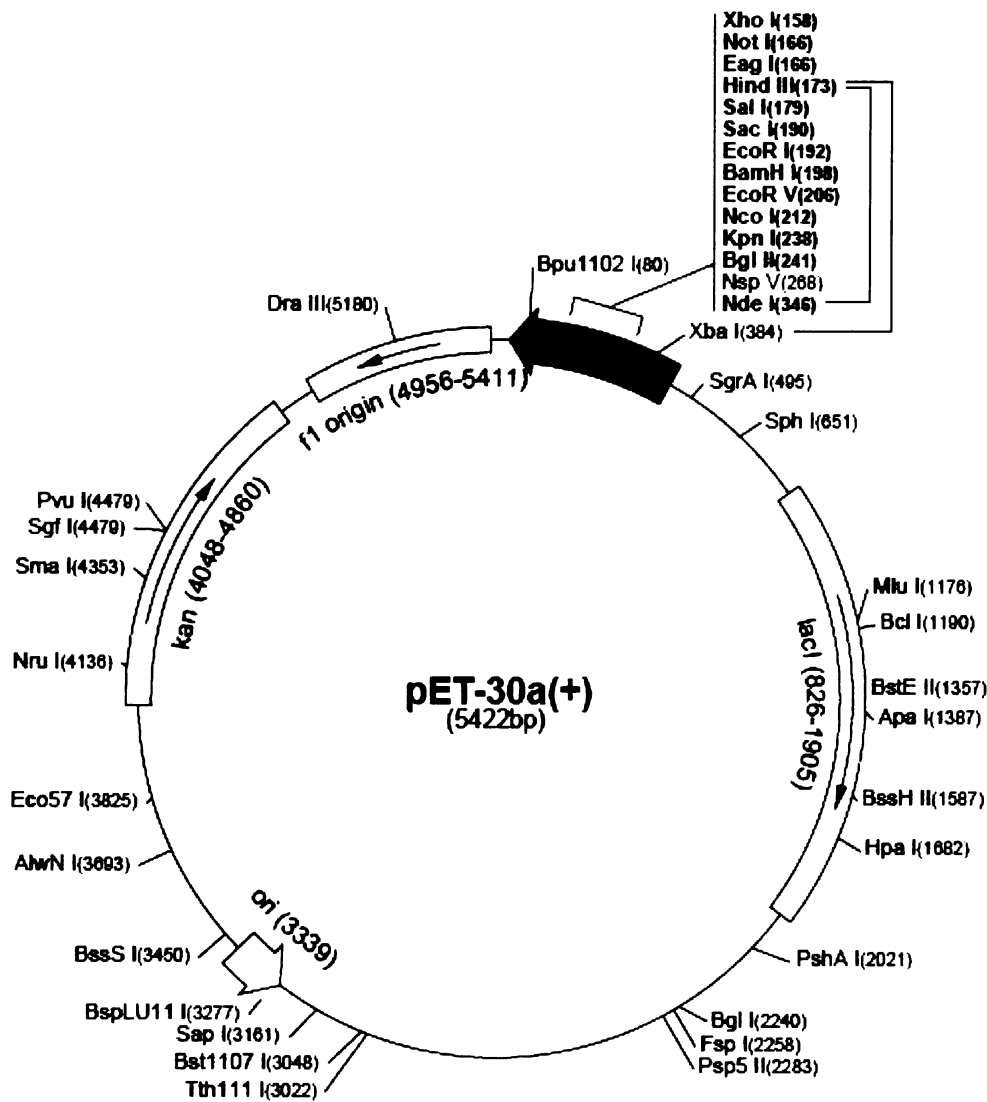
Obr. 7: Fotografie gelu použitého ke kontrole plasmidové DNA získané metodou Maxiprep

Jak je vidět, velikosti jednotlivých vzorků odpovídají délce kterou by měly mít příslušné inserty, dá se tedy usuzovat, že příprava DNA pomocí Maxiprepu proběhla v pořádku.

5.5 Ligace insertů do pET vektoru a transformace kompetentních buněk

Plasmidová DNA obsahující požadované inserty v pBS vektoru byla získána metodou Easyprep a štěpena pomocí restrikčních endonukleas NdeI a HindIII. Výsledná směs byla rozdělena elektroforesou na 1% agarosovém gelu a inserty byly purifikovány pomocí JET QUICK Gel Extraction Spin Kitu firmy Genomed.

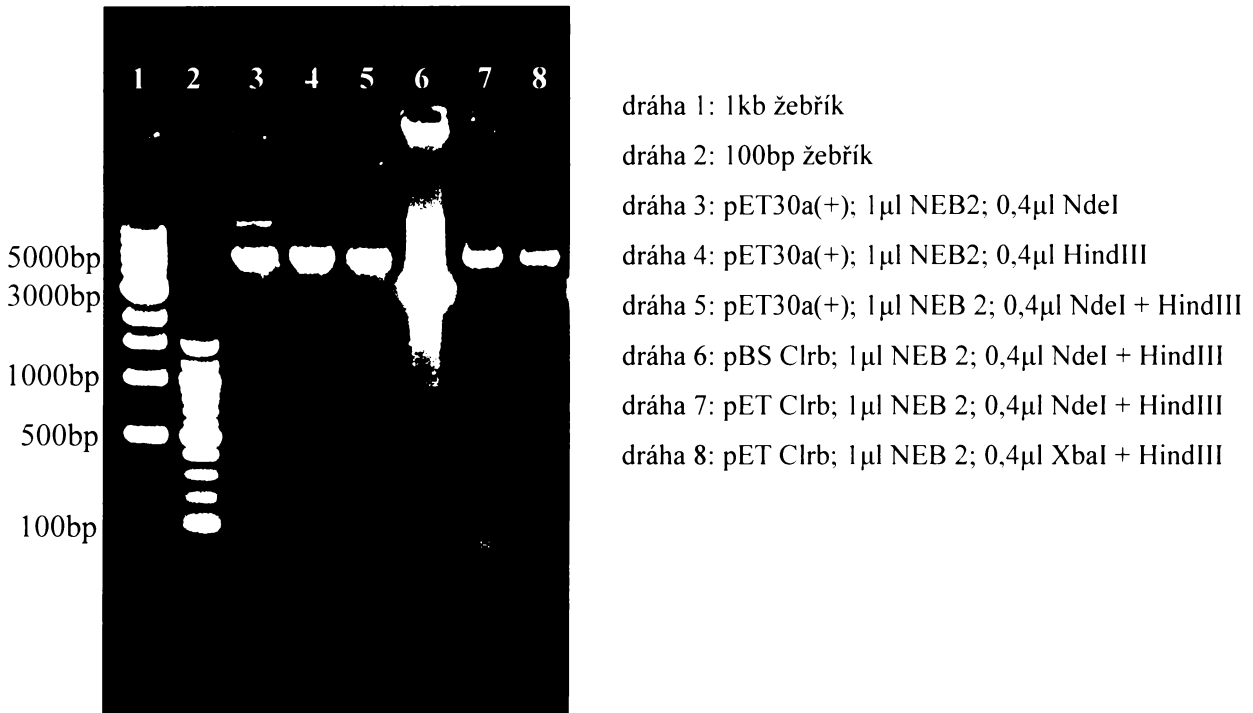
Přečištěné inserty byly ve standardní ligační reakci ligovány do vektoru pET-30a(+) firmy Novagen (obr. 8). Kompetentní buňky byly transformovány ligační směsí, naneseny na misky LB agaru obsahujícího kanamycin (5μg/ml) a tetracyklin (50μg/ml) a inkubovány při 37°C.



Obr. 8: Vektorová mapa pET-30a(+) vektoru se znázorněným místem, kam je vkládán insert (mezi NdeI a HindIII štěpící místa) a páry restričních endonukleas užitých pro restriční analýzy. Upraveno dle [64]

5.6. Restrikční analýza insertů v pET:

Z 0,8 ml „noční kultury“ byla pomocí metody EasyPrepu získána plasmidová DNA, která byla následně analyzována pomocí restrikčních endonukleas NdeI + HindIII a XbaI + HindIII. (obr. 9)

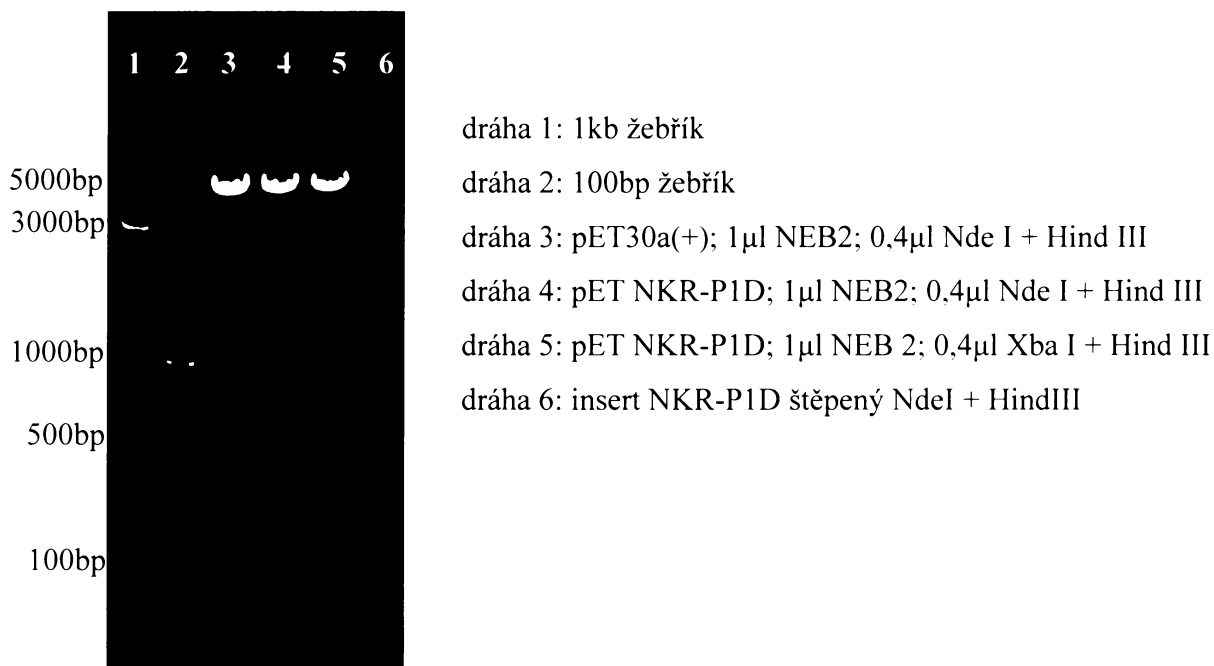


Obr. 9: Fotografie gelu použitého ke kontrole ligace insertu Clrb do pET vektoru.

Ze srovnání se standardy v podobě insertu ligovaného v pBS vektoru (dráha 6) a prázdných pET-30a(+) vektorů (dráhy 3-5) je vidět, že ligace do pET vektoru proběhla úspěšně (dráhy 7 a 8).

5.7 Příprava většího množství plasmidové (pET) DNA metodou Maxiprep a její kontrola restrikční analýzou

200ml „noční“ kultury bylo sklizeno a zpracováno podle standardního protokolu Maxiprepu. Kvalita preparátu byla následně zkontrolována restrikčním štěpením pomocí endonukleas Nde I + Hind III a Xba I + Hind III (obr.10)



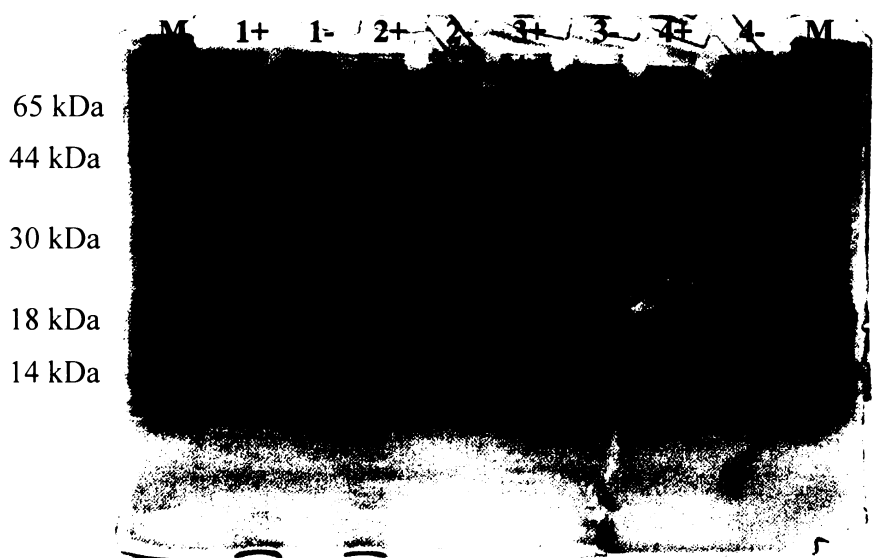
Obr. 10: Fotografie gelu použitého ke kontrole plasmidové DNA získané metodou Maxiprep

5.8 Kontrola DNA sekvencí sekvenací

Sekvence plasmidů v pBS i pET vektorech byly zjištěny na sekvenátoru ABI Prism 3100 firmy *Applied Biosystems* a ověřeny porovnáním s publikovanými sekvencemi prostřednictvím databází ExPASy a BLAST. Sekvence kódující NKR-P1D byly ve 100% shodě s publikovanými sekvencemi. V sekvenci kódující Clrb se objevila jedna bodová mutace, když thymin v poloze 132 byl substituován cytosinem. Tato mutace způsobila změnu tripletu GCT na GCC. Oba tyto kodóny ovšem kódují alanin, takže tato bodová mutace je pro výsledný protein zcela nepodstatná a může být ignorována. Na příkladu získaného elektroforeogramu (Příloha 2) je dobře vidět sekvenci expresního vektoru až po restrikční místo NdeI (v pozici 113 – 118). Za ním následuje sekvence insertu až po restrikční místo HindIII (v pozici 483 – 488) a poté další část expresního vektoru.

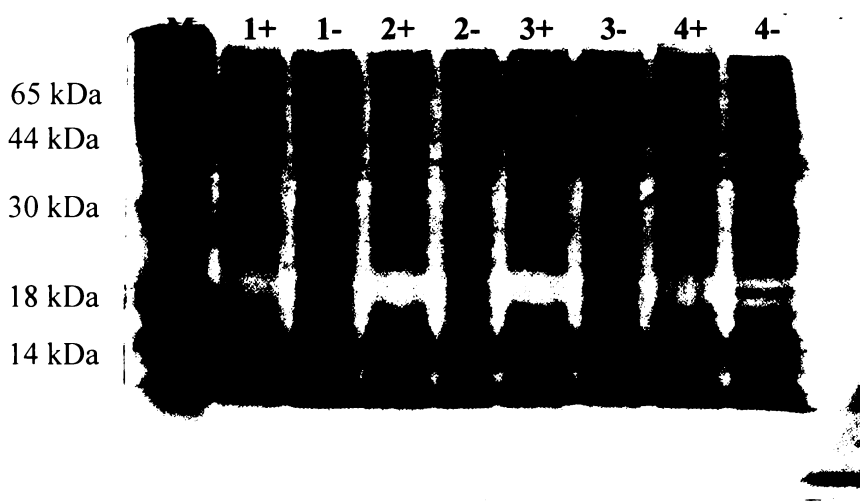
5.9 Výběr produkčních klonů („Plus-mínus pokus“)

Z kultur narostlých na miskách s LB Kan Tet agarem byly vybrány 4 kolonie, z nichž byly připraveny v LB Kan Tet médiu stacionární kultury. Z každé stacionární kultury byly zaočkovány dvě nové kultury, a když dorostly do $OD_{550} \approx 0,7$, jedna z nich byla indukována IPTG (isopropyl-thiogalaktosid). Všechny kultury byly poté inkubovány dalších 5 hodin a nakonec byla provedena analýza pomocí SDS-PAGE na 15% gelu. (obr. 11 a 12). Jako optimální producent byl vybrán producent 1 pro Clrb a producent 3 pro NKR-P1D



Obr.11: Fotografie gelu použitého k výběru optimálního producenta Clrb.

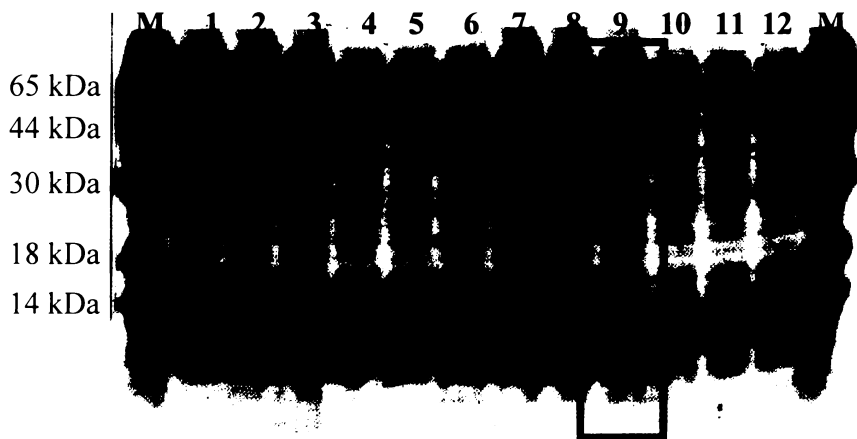
V lichých drahách je vidět proteinové složení bakterií, které nebyly indukovány IPTG, v sudých drahách je vidět vliv IPTG na produkci proteinů. V krajních drahách jsou markery.



Obr.12: Fotografie gelu použitého k výběru optimálního producenta NKR-P1D. Rozložení drah je stejné jako u obr. 11, jenom v poslední dráze chybí marker.

5.10 Optimalizace produkce NKR-P1D a Clrb

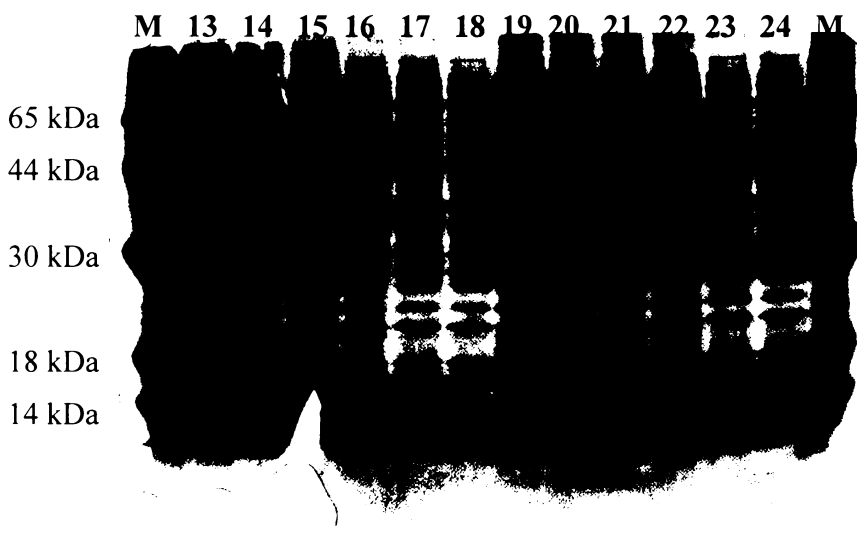
Ze stacionárních kultur optimálních producentů byly připraveny kultury, které byly po dosažení $OD_{550} \approx 1,0$ indukovány a dále s nimi bylo nakládáno dle tabulky 6 v bodě 4.10. Analýza všech kultur byla provedena pomocí SDS-PAGE na 15% gelu. (obr. 12 a 13)



Obr.13: Fotografie gelu použitého pro určení optimálních podmínek produkce Clrb.

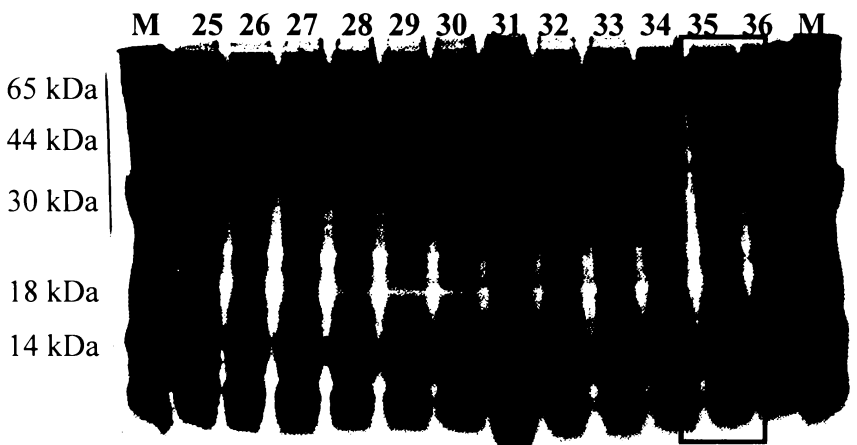
V drahách jsou postupně vzorky 1 – 12 (viz tabulka 6 v bodě 4.10). V krajních drahách jsou markery.

Dráha odpovídající vybraným optimálním podmínkám (37°C; 6 hodin; 0,03mM IPTG) je označena.



Obr.14: Fotografie gelu použitého pro určení optimálních podmínek produkce Clrb.

V drahách jsou postupně vzorky 13 – 24 (viz tabulka 6 v bodě 4.10). V krajních drahách jsou markery.



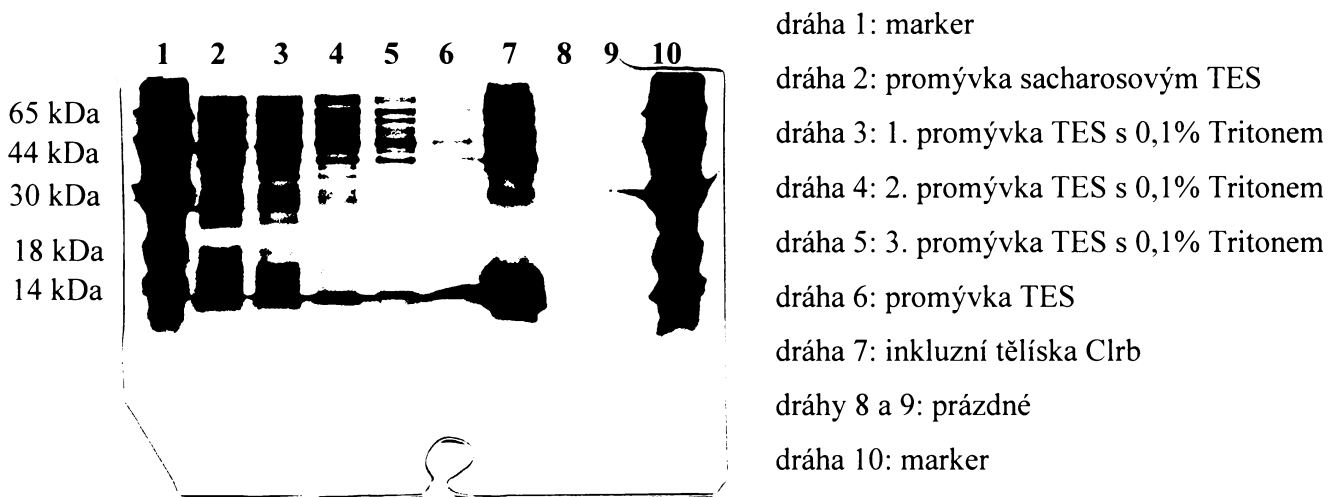
Obr.15: Fotografie gelu použitého pro určení optimálních podmínek produkce NKR-P1D.

V drahách jsou postupně vzorky 25-36. (viz tabulka 6 v bodě 4.10). V krajních drahách jsou markery.

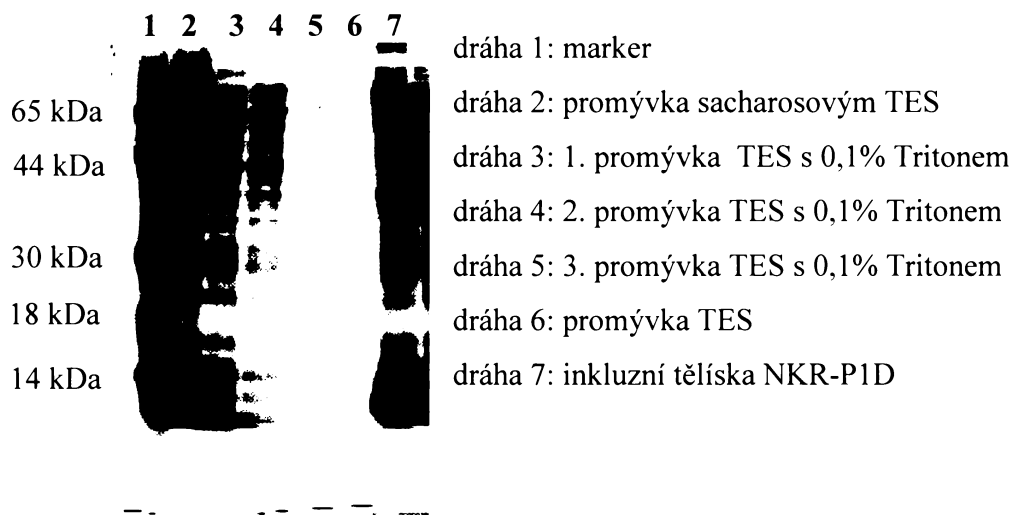
Dráha odpovídající vybraným optimálním podmínkám (37°C; 6 hodin; 0,3mM IPTG) je označena.

5.11 Příprava inkluzních tělísek

Produkční klony kompetentních buněk byly napěstovány v 1l LB Kan Tet média do $OD_{550} \approx 1,0$ a poté byly indukovány IPTG do odpovídající koncentrace. Po indukci byly kultury ponechány dalších 6 hodin na třepačce a nakonec sklizeny centrifugací. Z pelet byla standardním protokolem izolována inkluzní tělíska.



Obr.16: Fotografie gelu použitého pro kontrolu inkluzních tělísek Clrb.



Obr. 17 Fotografie gelu použitého pro kontrolu inkluzních tělísek NKR-P1D

5.12 Přenos proteinu na PVDF membránu a kontrola aminokyselinové sekvence sekvenací

Proteiny z elektroforetického gelu byly na PVDF membránu přeneseny prostřednictvím tzv. přenosu (z anglického blotting) a jejich aminokyselinová sekvence byla ověřena sekvenací na proteinovém sekvenátoru Procise. Pro příklad sekvenačních dat, viz příloha 3. Výsledky ukázaly, že N-terminální aminokyselinou byl methionin pocházející z expresního konstruktů, který nebyl v daném případě bakteriální buňkou odštěpen. Následujících 9 aminokyselin odpovídalo publikovaným sekvencím. Výjimkou je cystein v pozici 8, který není použitou metodou detekovatelný a cyklus odpovídající této pozici se tedy jeví jako prázdný. Toto se děje v důsledku vysoké reaktivity thiolové skupiny, která vede k takřka úplné degradaci PTH cysteinu a vzniku velkého množství nedekovatelných vedlejších produktů.

6. Diskuse

Hlavním cílem práce bylo rekombinantně připravit extracelulární části receptorů myších NK buněk NKR-P1D a Clrb.

Vzhledem k tomu, že cDNA ze slezin myši kmene C57BL/6 byla již získána dříve kolegyněmi Celadou a Holubovou v rámci jejich bakalářských prací^{[58],[59]}, prvním krokem byla PCR amplifikace insertů kódujících příslušné receptory. Takto amplifikované inserty byly poté vloženy do pBS II SK/KS(-) a následně pET-30a(+) vektorů.

Oba konstrukty byly zkontrolovány sekvenací. Zjištěné sekvence NKR-P1D přesně odpovídaly publikované sekvenci. V sekvencích Clrb se objevila jedna bodová mutace, ve které je thymin v pozici 132 (pozice 1 odpovídá A iniciačního kodonu) nahrazen cytosinem. Tato bodová mutace však po přeložení do proteinu nemění aminokyselinovou sekvenci a není tudíž důležitá. Vznik této mutace popsala již kolegyně Celadová ve své bakalářské práci, kde vyjádřila předpoklad, že tato mutace vznikla v důsledku chyby použité DNA polymerasy při PCR amplifikaci insertů.^[59] Dalším možným zdrojem mutace by mohla být chyba reversní transkriptasy při přepisu RNA do cDNA během RT PCR nebo mutace přímo v NK buňkách, z nichž byla RNA izolována.

Připravenými pET-30a(+) plasmidy obsahujícími správné inserty byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* kmene Gold a byl vybrán optimální producent. Následně byla provedena optimalizace produkce obou proteinů s ohledem na délku a teplotu inkubace po indukci a koncentraci induktoru (IPTG). Po analýze buněčného obsahu pomocí SDS-PAGE byly vybrány podmínky, za nichž vzniklo největší množství žádaných proteinů a co nejméně proteinů kontaminujících.

Oba proteiny byly bakteriemi produkovány do cytoplasmy ve formě inkluzních tělísek. Tato inkluzní tělíska byla izolována a purifikována. Aminokyselinová sekvence proteinů byla ověřena sekvenací.

Dalšími úkoly je v současné době refolding proteinů z inkluzních tělísek do nativní konformace, jeho optimalizace a purifikace proteinů. V delším horizontu potom strukturální a funkční studie se speciálním zaměřením na párovou lektin-lektinovou interakci mezi molekulami NKR-P1D a Clrb.

7. Souhrn výsledků

- byly amplifikovány inserty kódující vybrané extracelulární úseky NKR-P1D a Clrb receptorů
- inserty byly ligovány do pBS II SK/KS (-) a pET-30a(+) vektorů
- vzniklými plasmidy byly transformovány kompetentní buňky *E.coli* kmene Gold
- správnost DNA konstruktů byla ověřena sekvenací
- byl vybrán optimální producent
- produkce proteinů byla optimalizována
- byla připravena inkluzní tělíska
- správnost aminokyselinové sekvence produkovaných proteinů byla ověřena N-terminální sekvenací

8. Literatura

1. Hořejší, V., Bartůňková, J., *Základy imunologie*. 2005, Praha: TRITON. 279.
2. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. 2008, New York: Garland Science.
3. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 5, 112-7, 1975.
4. Knightley, R., Russell Knightley Media. [staženo 15.12. 2008]; Dostupné z: <http://www.rkm.com.au/IMMUNOLOGY/index.html>.
5. Trinchieri, G., *Biology of natural killer cells*. *Adv Immunol*, 47, 187-376, 1989.
6. Trinchieri, G., Perussia, B., *Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects*. *Lab Invest*, 50, 489-513, 1984.
7. Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., Kiessling, R., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. *Nature*, 319, 675-8, 1986.
8. Ljunggren, H. G., Karre, K., *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. *Immunol Today*, 11, 237-44, 1990.
9. Lopez-Larrea, C., Suarez-Alvarez, B., Lopez-Soto, A., Lopez-Vazquez, A., Gonzalez, S., *The NKG2D receptor: sensing stressed cells*. *Trends Mol Med*, 14, 179-89, 2008.
10. Luci, C., Tomasello, E., *Natural killer cells: detectors of stress*. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2335-40, 2008.
11. Newman, K. C., Riley, E. M., *Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens*. *Nat Rev Immunol*, 7, 279-91, 2007.
12. Athie-Morales, V., O'Connor, G. M., Gardiner, C. M., *Activation of human NK cells by the bacterial pathogen-associated molecular pattern muramyl dipeptide*. *J Immunol*, 180, 4082-9, 2008.
13. Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J. F., Blaecke, A., Malissard, M., N'Guyen, T., Thieblemont, N., Delneste, Y., *Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production*. *Blood*, 104, 1778-83, 2004.
14. Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., Moretta, A., *CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10116-21, 2004.
15. Ravetch, J. V., Bolland, S., *IgG Fc receptors*. *Annu Rev Immunol*, 19, 275-90, 2001.
16. Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., Lascurain, R., *Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes*. *Cell Mol Immunol*, 6, 15-25, 2009.
17. Lanier, L. L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*. *Nat Immunol*, 9, 495-502, 2008.
18. Ravetch, J. V., Lanier, L. L., *Immune inhibitory receptors*. *Science*, 290, 84-9, 2000.
19. Lanier, L. L., *NK cell recognition*. *Annu Rev Immunol*, 23, 225-74, 2005.
20. Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L. L., Parham, P., *Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes*. *Immunity*, 7, 753-63, 1997.
21. Phillips, J. H., Gumperz, J. E., Parham, P., Lanier, L. L., *Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes*. *Science*, 268, 403-5, 1995.

22. Colonna, M., Samaridis, J., *Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells*. Science, 268, 405-8, 1995.
23. Wagtmann, N., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Malnati, M. S., Vitale, M., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., Long, E. O., *Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains*. Immunity, 2, 439-49, 1995.
24. D'Andrea, A., Chang, C., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Phillips, J. H., Lanier, L. L., *Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes*. J Immunol, 155, 2306-10, 1995.
25. Smith, K. M., Wu, J., Bakker, A. B., Phillips, J. H., Lanier, L. L., *Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors*. J Immunol, 161, 7-10, 1998.
26. Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F. H., *DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells*. J Exp Med, 173, 1017-20, 1991.
27. Lieto, L. D., Maasho, K., West, D., Borrego, F., Coligan, J. E., *The human CD94 gene encodes multiple, expressible transcripts including a new partner of NKG2A/B*. Genes Immun, 7, 36-43, 2006.
28. Lohwasser, S., Hande, P., Mager, D. L., Takei, F., *Cloning of murine NKG2A, B and C: second family of C-type lectin receptors on murine NK cells*. Eur J Immunol, 29, 755-61, 1999.
29. Vance, R. E., Jamieson, A. M., Raulet, D. H., *Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells*. J Exp Med, 190, 1801-12, 1999.
30. Plougastel, B., Trowsdale, J., *Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes*. Eur J Immunol, 27, 2835-9, 1997.
31. Aramburu, J., Balboa, M. A., Ramirez, A., Silva, A., Acevedo, A., Sanchez-Madrid, F., De Landazuri, M. O., Lopez-Botet, M., *A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody*. J Immunol, 144, 3238-47, 1990.
32. Toyama-Sorimachi, N., Taguchi, Y., Yagita, H., Kitamura, F., Kawasaki, A., Koyasu, S., Karasuyama, H., *Mouse CD94 participates in Qa-1-mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49*. J Immunol, 166, 3771-9, 2001.
33. Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L., Phillips, J. H., *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits*. J Immunol, 157, 4741-5, 1996.
34. Jamieson, A. M., Diefenbach, A., McMahan, C. W., Xiong, N., Carlyle, J. R., Raulet, D. H., *The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing*. Immunity, 17, 19-29, 2002.
35. Radaev, S., Sun, P. D., *Structure and function of natural killer cell surface receptors*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 32, 93-114, 2003.
36. Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsia, J. K., Vivier, E., Raulet, D. H., *Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D*. Nat Immunol, 3, 1142-9, 2002.
37. Rosen, D. B., Araki, M., Hamerman, J. A., Chen, T., Yamamura, T., Lanier, L. L., *A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D*. J Immunol, 173, 2470-8, 2004.

38. Mesci, A., Ljutic, B., Makrigiannis, A. P., Carlyle, J. R., *NKR-P1 biology: from prototype to missing self*. Immunol Res, 35, 13-26, 2006.
39. Plougastel, B., Matsumoto, K., Dubbelde, C., Yokoyama, W. M., *Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse Nkrp1 cluster of genes: cloning of three new Nkrp1 members, Nkrp1d, Nkrp1e, and Nkrp1f*. Immunogenetics, 53, 592-8, 2001.
40. Carlyle, J. R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L. H., Rousselle, E., Troke, A. D., Proteau, M. F., Makrigiannis, A. P., *Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells*. J Immunol, 176, 7511-24, 2006.
41. Arase, N., Arase, H., Park, S. Y., Ohno, H., Ra, C., Saito, T., *Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells*. J Exp Med, 186, 1957-63, 1997.
42. Lanier, L. L., Chang, C., Phillips, J. H., *Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes*. J Immunol, 153, 2417-28, 1994.
43. Pozo, D., Vales-Gomez, M., Mavaddat, N., Williamson, S. C., Chisholm, S. E., Reyburn, H., *CD161 (human NKR-P1A) signaling in NK cells involves the activation of acid sphingomyelinase*. J Immunol, 176, 2397-406, 2006.
44. Yokoyama, W. M., Ryan, J. C., Hunter, J. J., Smith, H. R., Stark, M., Seaman, W. E., *cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with LY-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6*. J Immunol, 147, 3229-36, 1991.
45. Ryan, J. C., Turck, J., Niemi, E. C., Yokoyama, W. M., Seaman, W. E., *Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules*. J Immunol, 149, 1631-5, 1992.
46. Giorda, R., Weisberg, E. P., Ip, T. K., Trucco, M., *Genomic structure and strain-specific expression of the natural killer cell receptor NKR-P1*. J Immunol, 149, 1957-63, 1992.
47. Giorda, R., Trucco, M., *Mouse NKR-P1. A family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine-activated killer cells*. J Immunol, 147, 1701-8, 1991.
48. Giorda, R., Rudert, W. A., Vavassori, C., Chambers, W. H., Hiserodt, J. C., Trucco, M., *NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells*. Science, 249, 1298-300, 1990.
49. Kung, S. K., Su, R. C., Shannon, J., Miller, R. G., *The NKR-P1B gene product is an inhibitory receptor on SJJ/JNK cells*. J Immunol, 162, 5876-87, 1999.
50. Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F., Fremont, D. H., Yokoyama, W. M., *Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR-P1 family of natural killer cell receptors*. Nat Immunol, 4, 801-7, 2003.
51. Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H., Raulet, D. H., *Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 3527-32, 2004.
52. Yang, T., Flint, M. S., Webb, K. M., Chambers, W. H., *CD161B:ClrB interactions mediate activation of enhanced lysis of tumor target cells following NK cell:DC co-culture*. Immunol Res, 36, 43-50, 2006.
53. Plougastel, B., Dubbelde, C., Yokoyama, W. M., *Cloning of Clr, a new family of lectin-like genes localized between mouse Nkrp1a and Cd69*. Immunogenetics, 53, 209-14, 2001.
54. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. A., Warren, H. S., Lanier, L. L., *Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor*. J Immunol, 175, 7796-9, 2005.

55. Zhou, H., Kartsogiannis, V., Hu, Y. S., Elliott, J., Quinn, J. M., McKinsty, W. J., Gillespie, M. T., Ng, K. W., *A novel osteoblast-derived C-type lectin that inhibits osteoclast formation*. J Biol Chem, 276, 14916-23, 2001.
56. Kartsogiannis, V., Sims, N. A., Quinn, J. M., Ly, C., Cipetic, M., Poulton, I. J., Walker, E. C., Saleh, H., McGregor, N. E., Wallace, M. E., Smyth, M. J., Martin, T. J., Zhou, H., Ng, K. W., Gillespie, M. T., *Osteoclast inhibitory lectin, an immune cell product that is required for normal bone physiology in vivo*. J Biol Chem, 283, 30850-60, 2008.
57. Gange, C. T., Quinn, J. M., Zhou, H., Kartsogiannis, V., Gillespie, M. T., Ng, K. W., *Characterization of sugar binding by osteoclast inhibitory lectin*. J Biol Chem, 279, 29043-9, 2004.
58. Holubová, M., *Klonování a amplifikace isoform B, D a F proteinu NKR-P1, receptoru myších NK buněk*: Bakalářská práce PřF-UK, katedra biochemie, 2008
59. Celadová, P., *Klonování a amplifikace isoform b/g genu Clr, ligandu pro receptory Nkrp1 myších NK buněk*: Bakalářská práce PřF-UK, katedra biochemie, 2008
60. Stratagene, *pBluescript II Phagemid Vectors - INSTRUCTION MANUAL*. 2008. 23.
61. Berghammer, H., Auer, B., *"Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in E. coli*. Biotechniques, 14, 524, 528, 1993.
62. Sambrook, J., F., Fritsch E., T., Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
63. Novagen, *pET System Manual*, 11th. 2006. 80.
64. Novagen, *pET-30a-c(+) Vectors*. 1998. 2.
65. GENOMED, *JETquick Spin Column Technique: Plasmid Miniprep, Gel Extraction, PCR Purification*. 2005. 9-13.
66. Fermentas LIFE SCIENCES. [staženo 7.1. 2009]; Dostupné z: <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappbluescriptiiskks.htm>.

9. Přílohy

Příloha 1: Sekvence získané sekvenací jednotlivých plasmidů

Clrb

forward:

pBS II SK/KS

část kódující protein

část plasmidu

Nde I restrikční místo

HindIII restrikční místo

zbytky SmaI restrikčního místa využitého k ligaci do vektoru

reverse primer *456J5

```
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGANNAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
AACTAGTGGATCCCCC[REDACTED]CGCAAACCTGGATTG
GAGTTGAAAATAAATGTTTTTATTTTTCTGAATACCCAAGTAACTGGACATTCGCCCAGG
CCTTCTGCATGGACAAGAGGCCCAACTAGC[REDACTED]CGGTTTGACAACCAGGATGAGCTGAATT
TCCTAATGAGATAACAAGGCGAATTTTGATTCTGGATTGGCCTGCACAGAGAGTCGTCAG
AGCACCTTGGAAGTGGACAGACAACACTGAGTATAACAACACGATTCCCATCCGGGGAG
AGGAAAGATTTGCCTACCTGAACAACAACGGGATCAGCAGTACCAGGATCTATTTCACTTC
GGATGTGGATCTGTAGCAAGCTCAACTAAGCTTGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTT
ATCGATAACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTA
TTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTAC
CCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
CCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTG
TAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC
CAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCNTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCG
CTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTANN
NNACCTCNACCCCAAAAACCTTGATTAGGGNGATGGTTACGTTANTGGGNCATCNCCCTGA
TAGANGNTTTTTCNCCCTTTGNCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNGANANNNTNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNTTTGATTNNNNNNNNNTTNNNCNATTNGNNNNNN
NANNNNNNNNGNNNNNAANTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNNTANNNNNNNNNNNNGNNNGNNN
```

NKR-P1D

forward

pBS II SK/KS

část kódující protein

část plasmidu

Nde I restrikční místo

HindIII restrikční místo

zbytky SmaI restrikčního místa využitého k ligaci do vektoru

reverse primer *421A4

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNGGGCGATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGT
ATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCC **CATATG**
GGACTGGCTTTCACACCGAGATAAGTGCTTTCACGTTTCTCAAGTTTCCAACACTTGGAA
GGAATGTCGAATTGATTGTGATAAAAAAGGAGCCACTTTGCTGCTCATTCAAGACCAAGAAG
AACTGAGATTCC TACTGGACTCAATAAAGGAAAAATACAATTCATTTTGGATTGGACTAAGT
TACACATTAACAGACATGAACTGGAAGTGGATAAATGGCACAGCTTTC AATTCTGATGTACT
AAAAATCACTGGTGTCACTGAAAATGGCAGCTGTGCCGCCATCTCAGGAGAAAAAGTGA CTT
CTGAGGGCTGTTCTTCAGACAACCGTTGGATCTGCCAAAAGGAACTAAACCATGAAACCCCG
TGTAATGACTCCTAAGCTTNGGGGNNNC NNNNTNNTNNTNANNGGCCNCCNCCNNGNNGNAN
NTCCNNNTTTNGTNCNTTNNNNGAGGNTNANTNGC NNNNTNGNNNNANN CNNGGNCNTANN
NGTTNCNNGNGNNAATNGTNATCCGNTCACANTTCNCACANCNTACNANCCGNANNCNTA
AANNGTAAAGCCNGGGGNGCCTANNGAGTGANCTANCTCACNTTANTTGCGTTGCGCTCACN
GCCCNTTTCCNNNCGNAANCCNGNCNNGCCANNTGNNTTANNANNCGGCCAACGCGCGG
GNAGAGGCGGTTNGCGTATNGGGNGCTCTTCCGCTNCCTCGNTCACTGACTCGCTGCGCTCN
NTCGTNCGNNTGNGGNNAGCGGNATCAGCTCANTCNANGGNGGNNATNCNNTNCCACAGAA
TCNGGGANNNCNCNNNAANANNNNNNAGCAANNNNAGCNANNNNNNGNANNCGNAAANGNNN
NTNNTNNTTNNNNNNNNNNNCNCCCCNNNNNNNCATCNNAANNCGN CNNNNNNGNNNNNG
NNNNNNNCCNNNNNNNTNNNNNNCCNGNNNTCCNCCNTNNAGCTCNNNNNNNNNNNANNN
NNNNNNNTN CNNGN CNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNANNN

Clrb
forward

pET-30

část kódující protein
část plasmidu
Nde I restrikční místo
HindIII restrikční místo
[redacted]
reverse primer *456J5
[redacted]

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNANNNNTACGACTCNNATAGGGGAATTGTGAGCGGAT
ACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATA [redacted]

M N K

[redacted]GCAAAACTGGATTGGAGTTGAAAATAAATGTTTTTATTTTTCTGA

T Y A A C P Q N W I G V E N K C F Y F S E
ATACCCAAGTAACTGGACATTCGCCAGGCCTTCTGCATGGCACAAGAGGCCCAACTAGC

Y P S N W T F A Q A F C M A Q E A Q L A
GGTTTGACAACCAGGATGAGCTGAATTTCTAATGAGATACAAGGCGAATTTTGATTCCTGG

R F D N Q D E L N F L M R Y K A N F D S W
ATTGGCCTGCACAGAGAGTCGTCAGAGCACCCCTTGAAGTGGACAGACAACACTGAGTATAA

I G L H R E S S E H P W K W T D N T E Y N
CAACACGATTCCCATCCGGGGAGAGGAAAGATTTGCCTACCTGAACAACAACGGGATCAGCA

N T I P I R G E E R F A Y L N N N G I S
GTACCAGGATCTATTTCACTTCGGATGTGGATCTGTAGCAAGCTCAACTAAGCTTGCGGCCGC

S T R I Y S L R M W I C S K L N Stop

ACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTG
AGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTC

TTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGT
AGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAG

CGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTC
CCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTC

GACCCCNAAAACCTGATTAGGGTGTGTTTACGTAGNGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT
TTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACNTTCTTTANTAGTGGNNTCTNGNCCNAANTNGNN

CANNCTCAACCCNATCTCGGNNTNTNTTTNATTNNNNNNNTTTCNNANTTNNNNNNNTNNN

NKR-P1D

forward

pET-30

část kódující protein

část plasmidu

Nde I restrikční místo

HindIII restrikční místo

reverse primer *421A4

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNANTATACTCTATAGGGGAATTGTGAGCGGAT
AACAAATCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATA

M S A

GACTGGCTTTCACACCGAGATAAGTGCTTTCACGTTTCTCAAGT

K L E C P Q D W L S H R D K C F H V S Q V

TTCCAACACTTGGAAGGAATGTCGAATTGATTGTGATAAAAAAGGAGCCACTTTGCTGCTCA

S N T W K E C R I D C D K K G A T L L L

TTCAAGACCAAGAAGAACTGAGATTCCCTACTGGACTCAATAAAGGAAAAATACAATTCATTT

I Q D Q E E L R F L L D S I K E K Y N S F

TGGATTGGACTAAGTTACACATTAACAGACATGAACTGGAAGTGGATAAATGGCACAGCTTT

W I G L S Y T L T D M N W K W I N G T A F

CAATTCTGATGTACTAAAAATCACTGGTGCTACTGAAAATGGCAGCTGTGCCGCCATCTCAG

N S D V L K I T G V T E N G S C A A I S

GAGAAAAGTGACTTCTGAGGGCTGTTCTTCAGACAACCGTTGGATCTGCCAAAAGGAACTA

G E K V T S E G C S S D N R W I C Q K E L

AACCATGAAACCCCGTGTAATGACTCCTAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACC

N H E T P C N D S Stop

ACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCT

GAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAA

AGGAGGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAGCGCGGC

GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTT

TCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGG

GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGNTTAG

GGTGATGGNNCACGTAGTGGGNCATCGCCCTGATAGANGGTTTTTCNCCNTTTGNNGNNNNAG

TCNNNNNNCTTNANNNNNNNTNTNNNNCNANNNNNNNNANNNTNNNNCNNNNNNNNGNNNNNTNNT

Příloha 3: Příklad N-terminální sekvenace proteinu Clrb z PVDF blotu purifikovaných inkluzí. Uveden je chromatogram znázorňující separaci PTH-AK standardů a dále chromatogramy pro prvních 10 cyklů Edmanova odbourávání.

