

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

REKOMBINANTNÍ PŘÍPRAVA ISOTOPOVĚ ZNAČENÉHO
RECEPTORU rNKR-P1A PRO STUDIUM METODAMI NMR

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

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

Školitel: Mgr. Daniel Rozbeský

Praha 2010

Martin Čonka

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a MSM0021620808.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením vedoucího této práce Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a školitele Mgr. Daniela Rozbeského a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2010.

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu bakalářské práce Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost pracovat na této práci a za cenné rady při jejím vypracování. Dále bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Danielu Rozbeskému za trpělivost a všechny praktické rady při řešení práce. Také bych rád poděkoval Mgr. Josefu Chmelíkovi, Ph.D. a Mgr. Danielu Kavanovi za NMR a MALDI-TOF MS měření. V neposlední řadě děkuji také ostatním členům laboratoře za příjemné pracovní prostředí. Na závěr děkuji svým rodičům za neustálou podporu v době mého studia.

Obsah

| | |
|--|----|
| Prohlášení..... | 2 |
| Poděkování..... | 3 |
| Seznam symbolů a zkratk | 6 |
| Abstrakt..... | 8 |
| Klíčová slova | 9 |
| 1. LITERÁRNÍ ÚVOD..... | 10 |
| 1.1 Imunitní systém – funkce a mechanismy..... | 10 |
| 1.2 Složení imunitního systému..... | 11 |
| 1.3 NK buňky..... | 12 |
| 1.4 Receptory NK buněk | 13 |
| 1.5 Rozpoznávací mechanismy NK buněk | 14 |
| 1.6 Rodina receptorů NKR-P1 | 16 |
| 1.7 Potkaní NKR-P1A (rNKR-P1A) | 17 |
| 2. CÍL PRÁCE | 19 |
| 3. MATERIÁL..... | 20 |
| 3.1 Přístroje a pomůcky | 20 |
| 3.2 Chemikálie | 21 |
| 3.3 Enzymy | 22 |
| 3.4 Bakteriální kmeny..... | 22 |
| 3.5 Roztoky..... | 22 |
| 3.6 Média | 23 |
| 4. METODY..... | 24 |
| 4.1 Transformace kompetentních buněk..... | 24 |
| 4.2 Selekcce produkčního klonu..... | 24 |
| 4.3 SDS-PAGE | 25 |
| 4.4 Identifikace produkovaného proteinu | 25 |
| 4.5 Optimalizace produkce | 26 |
| 4.6 Velkoobjemová produkce | 27 |
| 4.7 Izolace inkluzních tělísek..... | 28 |
| 4.8 Renaturace proteinu | 28 |
| 4.9 Ionexová chromatografie na Q Sepharose | 29 |
| 4.10 Gelová chromatografie na Superdexu 200..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 4.11 Stanovení koncentrace proteinu podle Bradfordové..... | 30 |
| 4.12 Produkce isotopově značených proteinů..... | 30 |
| 5. VÝSLEDKY | 31 |
| 5.1 Transformace kompetentních buněk..... | 31 |
| 5.2 Selektce produkčního klonu..... | 31 |
| 5.3 Identifikace produkovaného proteinu | 32 |
| 5.4 Optimalizace produkce | 33 |
| 5.5 Velkoobjemová produkce, izolace inkluzních tělísek a renaturace proteinu..... | 34 |
| 5.6 Ionexová chromatografie na Q Sepharose | 35 |
| 5.7 Gelová chromatografie na Superdexu 200..... | 36 |
| 5.8 Stanovení koncentrace proteinu podle Bradfordové..... | 38 |
| 5.9 Produkce isotopově značených proteinů..... | 39 |
| 6. DISKUSE..... | 40 |
| 7. ZÁVĚR | 42 |
| 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 43 |

Seznam symbolů a zkratek

Symboly

| | |
|----------|---|
| A | absorbance |
| c | koncentrace (mol/l, mg/ml) |
| g | gravitační zrychlení ($9,80665 \text{ m sec}^{-2}$) |
| t | čas (min) |
| T | teplota ($^{\circ}\text{C}$) |

Zkratky

| | |
|----------------|---|
| ADCC | cytotoxická reakce založená na protilátkách (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) |
| APC | buňky prezentující antigen (Antigen Presenting Cells) |
| APS | peroxodisíran amonný (Amonium PerSulfate) |
| BSA | hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin) |
| CD | diferenciační antigen (Cluster of Differentiation) |
| Clr | protein příbuzný C-lektinům (C-Lektin Related Protein) |
| CRD | lektinová doména (Carbohydrate Recognition Domain) |
| DTT | dithiothreitol |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| FcγRIII | receptor III pro Fc část IgG |
| GM-CSF | faktor stimuluující kolonie granulocytů a makrofágů (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| IFN | interferon |
| IgG | imunoglobulin typu G |
| IPTG | isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid |
| ITAM | imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif) |

| | |
|----------------------|---|
| ITIM | imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu (I mmunoreceptor T yrosin-based I nhibition M otif) |
| KIR | zabíječský receptor imunoglobulinového typu (K iller cell I mmunoglobulin-like R eceptors) |
| LB medium | Luria-Bertani medium |
| LGL | velké granulární lymfocyty (L arge G ranular L ymphocytes) |
| LLT1 | lektinům podobný transkript (L ektin-like T ranscript 1) |
| MALDI | desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (M atrix A ssisted L aser D esorption I onization) |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex (M ajor H istocompatibility C omplex) |
| MS | hmotnostní spektrometrie (M ass S pectrometry) |
| NK | přirozený zabíječ (N atural K iller) |
| NKC | genový komplex přirozených zabíječů (N atural K iller C omplex) |
| NKR-P1 | rodina receptorů NK buněk (N atural K iller R eceptor- P rotein 1) |
| OD | optická densita (O ptical D ensity) |
| PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (P oly A krylamide G el E lectroforesis) |
| PMSF | fenylmethylsulfonylfluorid |
| PVDF | polyvinylidendifluorid |
| SDS | dodecylsírán sodný (S odium D odecyl S ulfate) |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin |
| TFA | trifluoroctová kyselina (T ri F luoroacetic A cid) |
| T_C | cytotoxický T lymfocyt (C ytotoxic T C ell) |
| T_H | pomocný T lymfocyt (H elper T C ell) |
| TNF | faktor nekrotizující nádory (T umor N ecrosis F actor) |
| TOF | doba letu částice (T ime O f F light) |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |

Abstrakt

NK buňky patří mezi populaci lymfocytů, která je schopná cytotoxicky usmrtit některé nádorové a viry infikované buňky. Tato bakalářská práce se zaměřuje na potkaní receptor NK buněk, konkrétně rNKR-P1A. Tento protein patří mezi aktivační receptory a je schopen aktivovat cytotoxickou funkci NK buněk. Jeho fyziologický ligand a trojrozměrná struktura nebyly zatím rozřešeny. Cílem práce bylo optimalizovat produkci rNKR-P1A v minimálním médiu a následně produkovat isotopově značené proteiny. Isotopově značené proteiny by s využitím metod NMR mohly přispět k rozřešení trojrozměrné struktury tohoto potkaního receptoru.

NK cells belong to the population of cells which are able to cytotoxic kill certain tumor and cells infected by viruses. This bachelor thesis focuses on the rat's NK cell receptor, especially rNKR-P1A. This protein belongs to the activating receptors and is able to activate the cytotoxic function of NK cells. Physiological ligand and three-dimensional structure of this protein has not been resolved yet. The aim of this work was optimalization of production rNKR-P1A in minimal medium and thereafter producing isotope-labeled proteins. Isotope-labeled proteins could contribute to solving the three-dimensional structure of this rat receptor by using NMR methods.

Klíčová slova

NK buňky

receptory NK buněk

potkani receptor NKR-P1A

řešení struktury NMR spektroskopii

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 Imunitní systém – funkce a mechanismy

Imunitní systém udržuje integritu organismu tak, že rozpoznává škodlivé látky od látek neškodných. Tímto způsobem chrání organismus před škodlivinami vnějšího i vnitřního původu [1].

Imunitní systém má tři hlavní funkce:

- 1) Obranyschopnost – schopnost rozpoznávat škodliviny z vnějšího prostředí a zabránit množení patogenních mikroorganismů v těle hostitele a také zabránit působení jejich toxických produktů
- 2) Autotolerance – schopnost rozpoznávat tkáně a buňky vlastního organismu a udržovat toleranci vůči nim
- 3) Imunitní dohled – schopnost rozpoznávat vnitřní škodliviny, jako jsou např. poškozené nebo mutované buňky organismu, které budou následně odstraněny [1]

Obrana organismu proti škodlivinám je zprostředkována dvěma hlavními typy imunitních mechanismů. Jedná se o přirozenou imunitu a adaptivní imunitu. Přirozená imunita (antigenně nespecifická, vrozená) představuje první obranou bariéru organismu a skládá se ze dvou hlavních složek: buněčných a humorálních. Fagocytující buňky (neutrofilů a makrofágy) a tzv. přirození zabíječi (NK buňky, z angl. Natural killers) zastupují buněčné složky přirozené imunity. Naopak mezi humorální složky se řadí např. sérové proteiny, komplementový systém, cytokiny, interferony a další látky. Hlavním cílem přirozené imunity je vznik zánětlivé reakce, která zabraňuje dalšímu působení škodliviny v organismu [1, 2].

Adaptivní (antigenně specifická) imunita je v porovnání s přirozenou imunitou evolučně mladší. Skládá se z humorální imunity a buněčně zprostředkované imunity. Humorální imunita je založená na protilátkách. Protilátky jsou produkty B lymfocytů. Rozpoznávají antigen (látka vyvolávající imunitní odpověď) a navazují se na danou škodlivinu. Naproti tomu buněčně zprostředkovaná imunita je založena na T lymfocytech. Některé viry a bakterie mohou uniknout působení B lymfocytů resp. protilátek tím, že přežívají uvnitř fagocytujících buněk. Právě tyto buňky jsou působením T lymfocytů cytotoxicky zabity a je tak zabráněno šíření infekce. Výhodou adaptivní imunity je

imunologická paměť, kdy imunitní systém dokáže rychleji reagovat na škodlivinu, se kterou se v minulosti setkal [2].

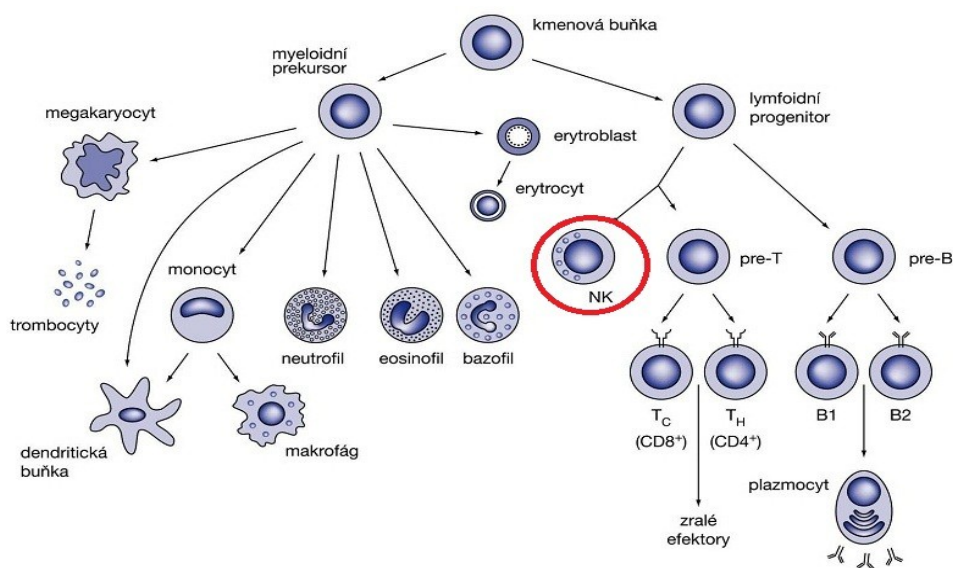
Rozvoj přirozené imunitní reakce trvá relativně krátkou dobu (hodiny) zatímco k rozvoji adaptivní imunitní reakce dochází zpravidla v řádu dní. Oba typy imunitních mechanismů spolu kooperují a navzájem se doplňují [2].

1.2 Složení imunitního systému

Imunitní reakce organismu probíhají pomocí interakcí různých druhů buněk imunitního systému (imunocytů) a charakteristických molekul. Mezi tyto molekuly patří například MHC glykoproteiny I. a II. třídy, antigenně specifické receptory B a T lymfocytů, Fc receptory, imunoglobuliny (protilátky), cytokiny, složky komplementu a v neposlední řadě také různé adhezivní a kostimulační molekuly [2, 3].

Imunitní systém je z majoritní části tvořen různými druhy bílých krvinek (leukocytů). Bílé krvinky se tvoří z pluripotentních kmenových buněk, které se nacházejí v kostní dřeni a je pro ně charakteristická adhezivní molekula CD34. Z kmenových buněk vznikají progenitory, které se dále vlivem různých faktorů diferencují do dvou základních linií: myeloidní a lymfoidní (Obr. 1, str. 12) [1].

Z myeloidní linie se dále diferencují monocyty, ze kterých mohou následně vzniknout makrofágy nebo dendritické buňky. Makrofágy a dendritické buňky se řadí mezi buňky prezentující antigen (APC). Dále z této linie mohou vznikat také neutrofil, eozinofil, bazofil, trombocyt a erytrocyt. Z lymfoidního progenitoru se diferencují B a T lymfocyty a NK buňky. B lymfocyty se vyvíjí v kostní dřeni a po střetnutí s antigenem z nich vznikají plazmatické buňky, které jsou konečným stádiem jejich vývoje a jsou schopny produkovat protilátky. Vývoj T lymfocytů probíhá v brzlíku (thymu). Mohou zde vznikat dva fenotypově odlišné typy těchto buněk: prekurzory pomocných T lymfocytů (T_H), pro které je charakteristický receptor CD4, a prekurzory cytotoxických T lymfocytů (T_C), pro které je charakteristický receptor CD8 [1].



Obr. 1: Rozdělení buněk imunitního systému (vyznačeny NK buňky). Upraveno podle [1].

1.3 NK buňky

Kiessling a kol. jako první v roce 1975 charakterizoval populaci lymfocytů, která byla schopná bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci zabíjet některé typy nádorových buněk. Tyto lymfocyty byly označeny jako NK buňky (z angl. Natural Killers) [4]. NK buňky hrají zásadní roli v obraně proti některým typům virů, zejména herpesvirům. Po dlouhou dobu od jejich objevení zůstával mechanismus jejich působení neznámý [5].

Z morfologického hlediska jsou NK buňky velké granulózní lymfocyty, které obsahují velké množství cytotoxických granul. Bývají proto označovány zkratkou LGL (z angl. Large Granular Lymphocytes) [6]. Reprezentují populaci lymfocytů, která na povrchu buněk neexprimuje receptory pro antigen. V imunitním systému působí, díky rozpoznávání buněk se sníženou expresí MHC glykoproteinů I. třídy, komplementárně s cytotoxickými T lymfocyty [5, 6].

Jsou charakterizovány fenotypem $CD3^-$, $CD16^+$, $CD56^+$, $CD161^{+/-}$. Na svém povrchu tedy exprimují molekulu CD16, což je $Fc\gamma RIII$ receptor rozpoznávající Fc části IgG a podílející se tak na aktivaci NK buněk pomocí ADCC (z angl. Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity). Dále exprimují CD56, což je adhezivní molekula imunoglobulinového typu a mohou také exprimovat molekulu CD161 (receptor NKRP1A), která je tématem této bakalářské práce, resp. její potkaní zástupce. Výskyt těchto receptorů

byl pozorován i na některých T lymfocytech [5, 6]. Specifičtější diferenciační znaky NK buněk proto představují receptory NKp46 a NKp30, které jsou pro ně velmi specifické a vyskytují se na nich pokud jsou aktivované či nikoli [5].

Za normálních okolností jsou NK buňky přítomné zejména v plicích, játrech, periferní krvi, slezině, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a v thymu, kde jsou však téměř neprokazatelné. Z těchto orgánů migrují dle potřeby do zanícených tkání [5, 7].

Produkují také řadu cytokinů např. IFN- γ , GM-CSF, TNF- β a další. Tyto cytokiny se dále podílejí na imunitní odpovědi organismu a mají také vliv na funkci některých buněk imunitního systému. IFN- γ například podporuje aktivaci makrofágů. NK buňky mají tedy kromě své cytotoxické funkce i funkci regulační [8, 9].

Cytotoxicita NK buněk je zajišťována pomocí cytotoxických granulí, které obsahují protein perforin a proteasy granzymy. Po aktivaci NK buňka vyloučí tyto granule do prostoru mezi ní a cílovou buňku. Perforin formuje póry v cytoplasmatické membráně cílové buňky a umožňuje tak vstup granzymů, které následně indukují apoptosu této buňky [1].

1.4 Receptory NK buněk

NK buněčné receptory lze rozdělit podle funkce na aktivační, inhibiční a kostimulační. Podle převažujících signálů z aktivačních nebo inhibičních receptorů dojde k aktivaci resp. inhibici cytotoxických mechanismů NK buněk. Kostimulační receptory sami neposkytují aktivační signál. Mohou však výrazně zesílit signál aktivačních receptorů a nepřímou tak podpořit aktivaci NK buněk [10].

Aktivační receptory kooperují s adaptorovými proteiny za vzniku aktivačních komplexů na povrchu NK buněk. Mezi adaptorové proteiny patří DAP12, Fc ϵ RI γ , CD3 ζ a DAP10. První dva obsahují jeden ITAM motiv, který se vyznačuje sekvencí YxxL/Ix₆- ζ YxxL/I. CD3 ζ obsahuje tři ITAM motivy a DAP10 obsahuje, namísto ITAM motivu, motiv se sekvencí YxxM, kde x značí libovolnou aminokyselinu. Adaptorové proteiny obsahují ve své transmembránové části kyselinu asparagovou nesoucí záporný náboj. Naproti tomu aktivační receptory mají v transmembránové části kladně nabitý arginin nebo lysin. Komplex receptor-adaptorový protein je tak spojen elektrostatickou interakcí. Tyrosin v ITAM motivu je po rozpoznání aktivačního ligandu fosforylován kinasami rodiny Src. S fosforylovanými tyrosiny následně reagují protein-tyrosin-kinasy

Syk a ZAP-70, které se účastní signalizační kaskády. Výsledkem této kaskády je aktivace efektorových funkcí NK buňky a spuštění cytotoxického účinku [11, 12].

Inhibiční receptory obsahují v jejich cytoplasmatické části vždy minimálně jeden nebo více ITIM motivů. ITIM motiv obsahuje sekvenci I/L/V/SxYxxL/V, kde x opět značí libovolnou aminokyselinu. Po interakci receptoru s daným ligandem (např. MHC glykoproteinem I. třídy) dojde k fosforylaci tyrosinu v ITIM motivu prostřednictvím kinas rodiny Src. Po fosforylaci tyrosinu dochází k aktivaci dvojice fosfatas (SHP-1 a SHP-2), které defosforylují intracelulární signalizační proteiny. Zabraňují tímto způsobem jejich zapojení do signalizační kaskády a dochází k potlačení aktivity NK buněk [11, 12].

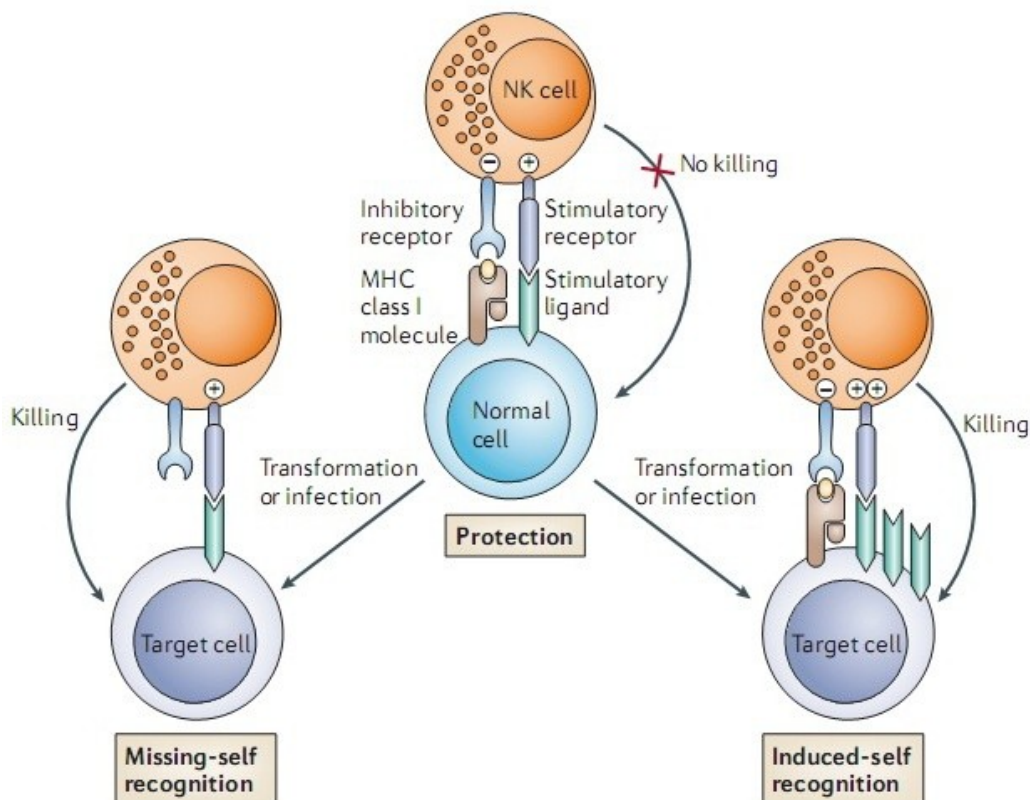
Všechny receptory NK buněk se dají také rozdělit podle struktury na dvě hlavní skupiny: imunoglobulinové a C-lektinové. Mezi imunoglobulinové receptory se řadí hlavně inhibiční receptory zvané KIR (z angl. Killer cell Immunoglobulin-like Receptor). Jednotlivé KIR se navzájem liší v počtu imunoglobulinových řetězců v jejich extracelulární části [13]. C-lektinové receptory obsahují v jejich extracelulární části lektinovou doménu označovanou CRD (z angl. Carbohydrate Recognition Domain), která se vyznačuje schopností vázat cukry. Vazebnost této lektinové domény je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Mezi zástupce této skupiny receptorů patří například receptorové rodiny NKR-P1 a Ly49 [10].

1.5 Rozpoznávací mechanismy NK buněk

V současné době existuje několik hypotéz, jakým způsobem rozpoznávají NK buňky cílové (nádorové nebo viry infikované) buňky.

Jednou z těchto hypotéz je „missing self recognition“ (Obr. 2, str. 15). Kdy důležitou vlastností NK buněk je jejich schopnost rozpoznávat cílové buňky, které se od ostatních buněk liší sníženou expresí MHC glykoproteinů I. třídy a chtějí se tímto způsobem vyhnout působení cytotoxických T lymfocytů. Inhibiční receptory na povrchu NK buněk se váží na MHC glykoproteiny cílových buněk. Tato interakce zvyšuje aktivitu fosfatas, které defosforylují další signalizační proteiny, což vede k inhibici signalizačních kaskád vedoucích k indukci efektorových funkcí NK buněk. U cílových buněk se sníženou expresí MHC glykoproteinů I. třídy se tedy nemůže tato inhibiční dráha uplatnit a takové buňky jsou potom vůči přirozenému zabíjení více citlivé [14, 15].

Další hypotéza se nazývá „induced self recognition“ (Obr. 2). Podle této hypotézy NK buňky rozpoznávají buňky se zvýšenou expresí vlastních proteinů (ligandů aktivačních receptorů) na svém povrchu. Exprese těchto ligandů může být vyvolána např. stresem nebo maligní transformací. Aktivaci efektorových funkcí vyvolává interakce mezi aktivačními receptory NK buněk a jejich ligandy na cílových buňkách. Zda dojde k aktivaci cytotoxických mechanismů NK buněk nebo nikoli, záleží na převažujících aktivačních resp. inhibičních signálech [9].



Obr. 2: Znárodnění „missing self“ a „induced self“ hypotéz [15].

Dalšími rozpoznávanými buňkami mohou být buňky exprimující na svém povrchu exogenní molekuly, které jsou součástí různých patogenů. Tato hypotéza je známá jako „infectious non self recognition“ a je zatím nejméně prozkoumána [9].

Posledním dosud známým způsobem jak může dojít k aktivaci, je cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC). Zde dochází k interakci mezi buňkou opsonizovanou protilátkami typu IgG a receptorem FcγRIII (CD16), který se váže na Fc fragment IgG a dojde k signalizační kaskádě vyvolávající cytotoxickou aktivitu NK buněk [6, 16].

1.6 Rodina receptorů NKR-P1

Receptory rodiny NKR-P1 (z angl. natural killer receptor - protein 1), označované také jako KLRB1 (z angl. killer lectin-like receptor subfamily B, protein 1), byly objeveny před více než 20 lety. Ze strukturního hlediska se jedná o disulfidicky vázané homodimerní transmembránové proteiny II. typu, které patří mezi C-lektinové receptory. Geny kódující tuto receptorovou rodinu se nachází v NKC genovém komplexu. Výskyt těchto receptorů je pozorován zejména u myši, potkanů a člověka, a to na všech typech NK buněk, některých NK-T buňkách, T lymfocytech a dendritických buňkách [10, 17, 18].

Jako první receptor patřící do této rodiny byl objeven myši NKR-P1C, známý také jako NK1.1. Tento protein byl po dlouhou dobu považován za diferenciační znak NK buněk některých myších kmenů. Dále byly u myši objeveny také NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1D a NKR-P1F. Nedávno byl objeven i NKR-P1G. NKR-P1A, C a F mají ve své transmembránové části pozitivně nabitý arginin a zároveň neobsahují ITIM motiv. Jsou tak považovány za aktivační receptory. Naopak přítomnost ITIM motivu v cytoplasmatické doméně receptorů NKR-P1B a D svědčí o jejich inhibiční funkci [18].

Ligandy receptorů NKR-P1B a D patří do rodiny proteinů Clr, konkrétně jde o Clr-b. Naproti tomu Clr-g je ligandem receptoru NKR-P1F. Geny kódující tyto proteiny se nacházejí mezi geny rodiny NKR-P1. Fyziologické ligandy ostatních receptorů této rodiny zůstávají zatím záhadou [18].

Funkce lidského NKR-P1A, stejně jako molekulární mechanismy přenosu signálu přes tento receptor, nejsou zatím přesně známy. Zjistilo se však, že tento receptor je schopen reagovat s kyselou sfingomyelinasou (aSMasa), která se dále podílí na tvorbě druhých posílů – ceramidů [19]. Ligandem tohoto receptoru je protein LLT1, což je ortholog proteinu Clr [20].

U hlodavců je signalizační kaskáda těchto receptorů daleko více prozkoumána. U všech proteinů patřících do rodiny NKR-P1 se předpokládá interakce prostřednictvím jejich cytoplasmatického motivu CxCP s protein-tyrosin-kinázou rodiny Src, konkrétně p56^{lck}. Motiv CxCP (x značí libovolnou aminokyselinu) se vyskytuje na všech hlodavčích receptorech této rodiny i na receptorech CD4 a CD8, nevyskytuje se však na lidském NKR-P1A [19].

1.7 Potkaní NKR-P1A (rNKR-P1A)

Potkaní NK buněčný receptor rNKR-P1A je předmětem této bakalářské práce. Tento protein byl objeven v roce 1989 pomocí monoklonální protilátky 3.2.3 (anti-NKR-P1). Ukázalo se, že tato molekula se vyskytuje na povrchu potkaních NK buněk s velkou četností. Nachází se však v menší míře i na některých T lymfocytech a dendritických buňkách. Gen kódující tento receptor se nachází u potkana na 4. chromosomu v NKC genovém komplexu [21, 22].

Ze strukturního hlediska je rNKR-P1A disulfidicky vázaný homodimerní transmembránový protein II. typu o velikosti 60 kDa. Primární strukturu zobrazuje Obr. 3. Tento receptor obsahuje lektinovou doménu, jejíž vazebnost k sacharidům je závislá na přítomnosti vápníku. Díky tomuto faktu jej řadíme mezi receptory C-lektinového typu [22]. Tato lektinová doména (CRD) obsahuje tři disulfidické můstky a nachází se blíže C-terminální části v extracelulárním prostoru. Transmembránovou část receptoru a jeho lektinovou doménu spojuje tzv. krček, který poskytuje pružné spojení mezi těmito částmi. Krček je zároveň místem, kde dochází k dimerizaci proteinu. N-konec tohoto receptoru se nachází v cytoplasmě [10, 23].

MDTARVYLSLKP SKTAAGAQC VSPPSLP PDACRCPRSHRLALKL SCAGLI
LLV LALVGM SILVRV FVQKPSVE PCRVL IQENLSKTGSPAKLKCPKDWLS
HRDKCFHVSQTSITWKE SLADCGGKGATLLLVQDQEELRFLRNLTKRIS S
SFWIGLSYTLSDENWKWINGSTLNSDVLSITGDTEKDSCASVSQDKVLSE
SCDSDNIWVCQKELKCECMCND S

Obr. 3: Aminokyselinová sekvence rNKR-P1A. Modře vyznačena cytoplazmatická část, zeleně transmembránová část a červeně extracelulární část. Složení připravovaného proteinu je podtržené. Upraveno podle [24].

rNKR-P1A se řadí mezi aktivační receptory, což potvrzuje i přítomnost pozitivně nabitého argininu v jeho transmembránové části a nepřítomnost ITIM motivu v cytoplazmatické části (kap. 1.4) [12]. V roce 1991 bylo toto tvrzení dokázáno pomocí monoklonální protilátky 3.2.3. Po této interakci došlo k degranulaci a cytotoxickému působení NK buněk, tedy jejich aktivaci [25]. Toto tvrzení bylo potvrzeno i na mutantní linii NK buněk. Tato buněčná linie postrádala na svém povrchu právě receptor rNKR-P1A.

Takto upravené buňky nebyly schopné zabíjet některé nádorové buňky. Oproti tomu NK buňky exprimující na svém povrchu rNKR-P1A byly schopné tyto nádorové buňky cytotoxicky usmrtit [26].

Mezi ligandy tohoto receptoru patří samotné monosacharidy (fukosa), acetylované monosacharidy (N-acetyl-D-galaktosamin a N-acetyl-D-glukosamin) a nejvyšší afinitu vykazují oligosacharidy složené z acetylovaných monosacharidů (chitotetraosa). Byla také pozorována afinita k oligosacharidům odvozeným od heparinu a chondroitin sulfátu [23, 27]. Různými substitucemi byl nalezen strukturně optimální trisacharid GalNAc β (1→4)GlcNAc β (1→4)ManNAc, který aktivuje tento buněčný receptor [28].

Přes veškerou snahu zůstává fyziologický ligand rNKR-P1A stále neznámý, stejně jako trojrozměrná struktura tohoto proteinu. Právě k rozřešení trojrozměrné struktury (resp. části obsahující lektinovou doménu) by mohla přispět tato bakalářská práce.

2. CÍL PRÁCE

- optimalizace produkce rNKR-P1A v M9 minimálním médiu
- produkce rNKR-P1A ve třech typech M9 minimálního média a porovnání výtěžků
- produkce isotopově značených proteinů ^{15}N -rNKR-P1A a ^{15}N - ^{13}C -rNKR-P1A
- ověření poskládání takto připravených proteinů metodami NMR

3. MATERIÁL

3.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy AL54 *Mettler Toledo, ČR*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga Avanti J-26 XP *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga Z 233 MK-2 *Hermle, Německo*
- Centrifugační koncentrátor Amicon Ultra (cut off 10 kDa) *Millipore, USA*
- Dialyzační trubice Spektra/Por *Spektrum Lab., USA*
- HPLC systém BioSys 510 *Beckman Coulter, USA*
- Kolona Q Sepharosa FF *Amersham Biosc., Švédsko*
- Kolona Superdex 200 10/300 GL *Healthcare, Švédsko*
- Magnetická míchačka MM 2A *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- Monochromátorová čtečka destiček Safire *Tecan, Švýcarsko*
- Napájecí zdroj MP-250V *AND, USA*
- pH metr Φ200 *Beckman Coulter, USA*
- Předvážky HF-1200G *AND, USA*
- PVDF membrána *Pall Corp., USA*
- Souprava pro SDS-PAGE *Bio-Rad, Německo*
- Souprava pro elektropřenos *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro ultrafiltraci *Sigma-Aldrich, USA*
- Třepačka na Erlenmeyerovy baňky *Gallenkamp Ltd., UK*
- Třepačka na zkumavky BigGer Bill *Thermolyne, USA*
- Ultracentrifuga Optima LE-80K *Beckman Coulter, USA*
- Ultrafiltrační membrány (cut off 10 kDa) *Sigma-Aldrich, USA*
- Ultrazvuková lázeň *KRAINTEK, Slovensko*
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 *Cole-Parmer instrum. Co., USA*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody MilliQ *Millipore, USA*

3.2 Chemikálie

| | |
|---|------------------------------------|
| ▪ Acetonitril | <i>Merck, Německo</i> |
| ▪ Agar | <i>Oxoid, USA</i> |
| ▪ Akrylamid | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ L-Arginin hydrochlorid | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Azid sodný | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ D-biotin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ ¹⁵ N chlorid amonný | <i>Cambridge Isotope Lab., USA</i> |
| ▪ Coomassie Brilliant Blue R-250 | <i>Serva, Německo</i> |
| ▪ Cystamin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Cysteamin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Činidlo pro stanovení dle Bradfordové | <i>Bio-Rad, Německo</i> |
| ▪ Dodecylsírán sodný | <i>Jersey Lab Supply, USA</i> |
| ▪ DTT | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ EDTA | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ N-ethylmorpholin acetát | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ ¹³ C Glukosa | <i>Cambridge Isotope Lab., USA</i> |
| ▪ Glycin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Guanidin hydrochlorid | <i>Jersey Lab Supply, USA</i> |
| ▪ Hovězí sérový albumin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Chloramfenikol | <i>Jersey lab Supply, USA</i> |
| ▪ Cholinchlorid | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ IPTG | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Kanamycin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Kvasničný extrakt | <i>Imuna Pharm, ČR</i> |
| ▪ Kyselina p-aminobenzoová | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Kyselina listová | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Kyselina D-panthothenová | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Leupeptin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Niacinamid | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Pepstatin | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ Peroxodisírán amonný | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |
| ▪ PMSF | <i>Sigma-Aldrich, USA</i> |

- Pyridoxin *Sigma-Aldrich, USA*
- Riboflavin *Sigma-Aldrich, USA*
- Standardy pro SDS-PAGE *Serva, Německo*
- TEMED *Serva, Německo*
- Tetracyklin *Jersey Lab Supply, USA*
- Thiamin hydrochlorid *Sigma-Aldrich, USA*
- Tris *Jersey Lab Supply, USA*
- Triton X-100 *Sigma-Aldrich, USA*
- Trypton *Oxoid, USA*
- Ostatní běžné chemikálie *Lachema, ČR*

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

3.3 Enzymy

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

3.4 Bakteriální kmeny

- *E. coli*: BL21-CodonPlus(DE3)RIPL *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r gal λ(DE3) *endA Hte* [*argU proLCam*^r] [*argU ileY leuW Strep/Spec*^r] *Stratagene, USA*

3.5 Roztoky

- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,25 % (w/v) CBB R-250
- **Dialyzační pufr:** 15 mM Tris-HCl, 9 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE:** 10 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3

- **Fixační a odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) kyselina octová
- **Guanidinový pufr:** 6 M Guanidin-HCl, 10 mM DTT, pH 8,0
- **Odbarvovací roztok pro PVDF membrány:** 45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová
- **Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkaptoethanol, 1 mM NaN₃, pH 7,4
- **Pufr A pro ionexovou chromatografii:** 15 mM Tris-HCl, 9 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0
- **Pufr B pro ionexovou chromatografii:** 15 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM NaN₃, pH 9,0
- **Pufr pro elektropřenos:** 10 mM Tris-HCl, 150 mM glycin, 20 % (v/v) methanol, pH 8,4
- **Pufr pro gelovou chromatografii:** 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH 8,0
- **Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek:** 0,5% (w/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkaptoethanol, 1 mM NaN₃, pH 7,4
- **Renaturační pufr:** 50 mM Tris-HCl, 1 M arginin-HCl, 100 mM CaCl₂, 3 mM cystamin, 9 mM cysteamin, 1 mM NaN₃, pH 9,0
- **Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 25 % (w/v) sacharosa, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující:** 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující:** 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 2 % (v/v) β-merkaptoethanol, pH 6,8

3.6 Média

- **LB agar:** 1,25 % (w/v) agar v LB médiu
- **LB médium:** 1 % (w/v) trypton, 0,5 % (w/v) kvasničný extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4
- **M9 minimální médium:** 42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8,6 mM NaCl, 18,7 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 22 mM glukosa, 1 mM thiamin-HCl

4. METODY

4.1 Transformace kompetentních buněk

Kompetentní buňky *E. coli* kmen BL21-CodonPlus(DE3)Gold RIPL (uchovávané při - 80 °C) byly ponechány rozmrazit na ledu. Ke 200 µl rozmražených buněk bylo přidáno 0,5 µl plasmidu pETNKRA (zás. koncentrace 1 µg/µl), který byl připraven Mgr. Petrou Němcovou. Poté byly buňky ponechány 30 minut stát na ledu. Po uplynutí této doby byla mikrozkuhavka s buňkami ponořena na 45 s do vodní lázně o teplotě 42 °C. Dále byl přidán 1 ml LB média bez antibiotik a mikrozkuhavka byla vložena na 1 h do termostatu o teplotě 37 °C. Následovala centrifugace při 1 500×g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Z mikrozkuhavky bylo odstraněno 1000 µl a zbylými 200 µl byla zaočkována předem připravená miska s LB agarem obsahujícím antibiotika - chloramfenikol (výsledná c = 35 µg/ml), kanamycin (výsledná c = 50 µg/ml) a tetracyklin (výsledná c = 12,5 µg/ml). Miska s takto transformovanými bakteriemi a miska s bakteriemi bez plasmidu (kontrola) byly ponechány 20 hodin inkubovat při 37 °C. Po této době byly misky uchovávány v chladničce při 4 °C.

4.2 Selektce produkčního klonu

Do 8 sterilních zkumavek bylo napipetováno po 2 ml M9 minimálního média obsahujícího antibiotika o stejných koncentracích jako v kap. 4.1. Sterilním párátkem byla do každé zkumavky asepticky přidána 1 kolonie bakterií vypěstovaná na misce s agarem (kap. 4.1). Zkumavky byly ponechány třepat přes noc při 37 °C a 220 ot./min. Dále bylo do 16 zkumavek napipetováno 1 ml M9 média a přidáno 50 µl nočních kultur (1 kultura do 2 zkumavek). Všechny zkumavky byly ponechány třepat při 37 °C a 220 ot./min po dobu 3 hodin. Po této době byly ponechány vytemperovat na 28 °C a při OD₅₅₀ ~ 0,7 byl do poloviny zkumavek označených jako plus přidán induktor IPTG do výsledné koncentrace 1 mM a všechny zkumavky byly ponechány třepat při 28 °C po dobu 6 hodin. Kultury byly centrifugovány při 5 000×g po dobu 10 minut za laboratorní teploty. Následně byl odstraněn supernatant odsátím a sediment byl rozsuspendován ve 100 µl redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Takto připravené vzorky byly povařeny 5 minut na vodní lázni, centrifugovány při 10 000×g po dobu 10 min za laboratorní teploty a analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.3 SDS-PAGE

SDS elektroforéza byla prováděna v 15 % polyakrylamidovém gelu. Složení separačního a zaostřovacího gelu přibližují Tab. 1 a Tab. 2. Nejprve byl mezi skla nalit separační gel a převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí byla voda slita a nalit zaostřovací gel, do kterého byl zanořen hřeben. Po ztuhnutí tohoto gelu byl hřeben vyjmut, byla složena aparatura pro elektroforézu a mezi skla byl nalit elektroodový pufr pro SDS-PAGE. Poté byly nanášeny připravené vzorky (podle kap. 4.2) a do první dráhy standard molekulových hmotností (marker). Nanášený objem byl zpravidla 10 μ l vzorků a 5 μ l markeru. Poté byla aparatura uzavřena a separace proteinů probíhala při 200 V asi 50 minut. Po ukončení separace byly gely vizualizovány 15 minut v barvicím roztoku pro SDS-PAGE. Následně byly gely odbarvovány ve fixačním a odbarvovacím roztoku pro SDS-PAGE.

Tab. 1: Složení 15 % separačního polyakrylamidového gelu (množství potřebné na 2 gely)

| <i>Látka</i> | <i>V</i> ml |
|------------------------|----------------|
| dd H ₂ O | 2,3 |
| 30 % Akrylamidová směs | 5,0 |
| 1,5 M Tris (pH 8,8) | 2,5 |
| 10 % SDS | 0,1 |
| 10 % APS | 0,1 |
| TEMED | 0,004 |

Tab. 2: Složení 15 % zaostřovacího polyakrylamidového gelu (množství potřebné na 2 gely)

| <i>Látka</i> | <i>V</i> ml |
|------------------------|----------------|
| dd H ₂ O | 1,4 |
| 30 % Akrylamidová směs | 0,33 |
| 1,5 M Tris (pH 6,8) | 0,25 |
| 10 % SDS | 0,02 |
| 10 % APS | 0,02 |
| TEMED | 0,004 |

4.4 Identifikace produkovaného proteinu

Produkovaný protein byl identifikován pomocí Edmanova odbourávání a MALDI-TOF MS analýzou tryptických štěpů.

Edmanovým odbouráváním bylo stanoveno prvních 12 aminokyselin od N-konce proteinu. Protein byl z polyakrylamidového gelu přenesen elektropřenosem na PVDF membránu. Do soupravy pro elektropřenos bylo nejprve na sebe navrstveno 6 filtračních

papírů namočených v pufru pro elektropřenos. Na filtrační papíry byla umístěna PVDF membrána namočená v methanolu. Na membránu byl položen polyakrylamidový gel z předešlé SDS-PAGE a na něj potom dalších 6 filtračních papírů namočených v pufru pro elektropřenos. Souprava byla uzavřena a na elektrody byl vložen proud o velikosti 40 mA (proudová hustota = 0,8 mA/cm²). Po 50 minutách byla membrána vyjmuta a barvena 1 minutu v barvicím roztoku pro SDS-PAGE. Následně byla odbarvena v odbarvovacím roztoku pro PVDF membrány a předána Prof. Karlu Bezouškovi, který provedl sekvenaci.

Dalším krokem byla příprava vzorku pro MALDI-TOF MS analýzu tryptických štěpů. Proužek produkovaného proteinu byl vyříznut z gelu po SDS-PAGE a rozřezán na malé kousky. K těmto kouskům bylo v mikrozkuhavce přidáno 100 µl acetonitrilu a 100 µl 100 mM N-ethylmorpholinoacetátového pufru (pH 8,4). Vzorek byl ponechán 3 hodiny stát při laboratorní teplotě. Poté byl roztok odstraněn pipetou a vzorek byl promyt 3×100 µl destilované vody v 5 minutových intervalech. Po posledním promytí následovalo přidání 100 µl acetonitrilu, který byl po 5 minutách opět odstraněn a vzorek byl ponechán sušit na vzduchu asi 10 minut. Poté bylo přidáno 35 µl 100 mM N-ethylmorpholinoacetátového pufru s 10 % acetonitrem, 2 µl trypsinového roztoku o koncentraci 100 µg/ml a 6,5 µl ze směsi TFA a acetonitrilu (1 µl TFA a 19 µl acetonitrilu). Vzorek byl 15 minut sonikován a předán Mgr. Danielu Kavanovi, který změřil hmotnostní spektrum.

4.5 Optimalizace produkce

Byly optimalizovány 3 parametry: koncentrace induktoru IPTG (0,01 – 5,0 mM), teplota (28, 30 a 37 °C) a doba produkce (1 – 24 hodin). Do 21 zkumavek bylo napipetováno 1 ml M9 minimálního média a 50 µl noční kultury připravené v kap. 4.2.

Do 9 takto připravených zkumavek byl přidán induktor IPTG do výsledných koncentrací: 0 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 0,7 mM; 1,0 mM; 3,0 mM a 5,0 mM. Zkumavky byly ponechány třepat rychlostí 220 ot./min při 28 °C po dobu 6 hodin.

Pro optimalizaci teploty byly použity 3 zkumavky. Do všech zkumavek byl přidán induktor IPTG do výsledné koncentrace 1 mM. První zkumavka byla ponechána třepat rychlostí 220 ot./min při 28 °C po dobu 6 hodin. Druhá potom při 30 °C a třetí při 37 °C po stejnou dobu.

K optimalizaci doby produkce bylo použito 9 zkumavek s M9 minimálním médiem

a noční kulturou. Do všech zkumavek byl přidán induktor IPTG do výsledné koncentrace 1 mM a byly ponechány třepat rychlostí 220 ot./min při 28 °C po doby: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h a 24 h.

Vzorky ze všech optimalizací byly vyhodnocovány pomocí SDS-PAGE (kap. 4.3).

4.6 Velkoobjemová produkce

Velkoobjemová produkce byla prováděna ve 2 l Erlenmeyerových baňkách se třemi typy M9 minimálních médií o objemech 500 ml s příslušnými antibiotiky. Tyto typy minimálních médií byly připravovány podle publikace z roku 2007 [29]. První M9 minimální médium obsahovalo navíc kovy, konkrétně Fe (výsledná $c = 14 \mu\text{g/ml}$), Zn (výsledná $c = 1,4 \mu\text{g/ml}$) a Mn (výsledná $c = 0,06 \mu\text{g/ml}$). Druhé M9 minimální médium obsahovalo navíc stejné kovy o stejných koncentracích jako první médium a vitaminový mix (Tab. 3). Třetí M9 minimální médium bylo ponecháno samotné bez jakéhokoliv přídavku.

Tab. 3: Složení vitaminového mixu a výsledné koncentrace jednotlivých vitaminů ve druhém M9 minimálním médiu

| <i>Látka</i> | <i>c</i> $\mu\text{g/ml}$ |
|--------------------------|------------------------------|
| D-biotin | 1 |
| Cholinchlorid | 1 |
| Kyselina listová | 1 |
| Niacinamid | 1 |
| Kyselina D-panthothenová | 1 |
| Pyridoxal | 1 |
| Riboflavin | 0,1 |
| Kyselina p-aminobenzoová | 0,1 |

Každé médium bylo zaočkováno 500 μl produkčního klonu (tisícinou produkovaného objemu) a média byla ponechána třepat rychlostí 220 ot./min při 37 °C. Při $\text{OD}_{550} \sim 0,7$ byl přidán induktor IPTG do výsledné optimální koncentrace a média byla ponechána dále třepat stejnou rychlostí při optimální teplotě po optimální dobu. Tyto parametry byly

stanoveny v kap. 4.5. Před přidáním IPTG a po ukončení inkubace byl ze všech médií odebrán 1 ml pro kontrolu.

4.7 Izolace inkluzních tělísek

Všechny tři 500 ml kultury byly po skončení inkubace nejprve centrifugovány při 10 000×g 10 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl vždy slit a sediment byl rozsuspendován ve 20 ml sacharosového lyzačního pufru. Byly přidány inhibitory: leupeptin (výsledná c = 1 μM), pepstatin (výsledná c = 1 μM) a PMSF (výsledná c = 1 mM). Následovalo vortexování a sonikace 3×30 s. Následně byl obsah kyvet 4× zmražen a rozmražen. Po posledním rozmražení bylo přidáno 400 μl MgCl₂, 2 μl deoxyribonukleasy o koncentraci 100 U/μl a 5 μl ribonukleasy o koncentraci 10 mg/ml. Směs byla ponechána 20 minut při laboratorní teplotě. Následovala sonikace 3×30 s a centrifugace při 15 000×g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Ze supernatantu bylo odebráno 100 μl do mikrozkušavky pro kontrolu a zbytek byl slit. Sediment byl opět rozsuspendován ve 20 ml pufru s detergentem. Byly přidány inhibitory do stejných výsledných koncentrací (viz. výše). Následovalo opět vortexování a sonikace 3×30 s. Poté byl obsah kyvet opět centrifugován při 15 000×g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Ze supernatantu bylo opět odebráno 100 μl a zbytek byl slit. Sediment byl rozsuspendován v 10 ml promývacího pufru bez detergentu a byly opět přidány inhibitory. Dále bylo postupováno jako v předchozím případě (vortexování, sonikace, centrifugace a slití supernatantu). Z jednotlivých sedimentů byly odebřány vzorky pro kontrolu. Všechny kontrolní vzorky (před přidáním IPTG, po skončení inkubace, jednotlivé supernatanty a sedimenty inkluzních tělísek) byly vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE.

4.8 Renaturace proteinu

Jednotlivé sedimenty inkluzních tělísek byly rozsuspendovány ve 2 ml guanidinového pufru a byly přidány inhibitory do stejných výsledných koncentrací jako v kap. 4.7. Poté byly kyvety umístěny do plováku a ponechány 1 hodinu stát na vodní lázni o teplotě 40 °C. Následně byl obsah kyvet převeden do kyvet pro ultracentrifugaci. Ultracentrifugace probíhala při 185 000×g po dobu 30 minut při teplotě 20 °C. Protein byl renaturován metodou rychlého naředění do 1 M L-argininu, který zde představoval nízkomolekulární chaperon. Supernatant z jednotlivých kyvet byl po ultracentrifugaci pomalu přikapáván

(v chladové místnosti při 4 °C za stálého míchání) do 100 ml renaturačního pufru, který obsahoval PMSF (výsledná c = 1 mM). Poté byly roztoky ponechány 1 hodinu stát při 4 °C. Jednotlivé roztoky byly nality do dialyzačních trubic a za míchání dialyzovány proti 8 litrům dialyzačního pufru po dobu 6 hodin při teplotě 4 °C. Po ulynutí této doby následovala druhá dialýza za stejných podmínek proti novému dialyzačnímu pufru.

4.9 Ionexová chromatografie na Q Sepharose

Po dialýze byly obsahy dialyzačních trubic přelity do kádinek a zakoncentrovány ultrafiltrací na objem 30 ml. Do soupravy pro ultrafiltraci byla vložena ultrafiltrační membrána o průměru 76 mm s limitem propustnosti (cut off) 10 kDa. Zakoncentrování proteinu probíhalo za laboratorní teploty, míchání a tlaku inertního plynu (dusíku) 0,5 MPa.

Po zakoncentrování proteinu byla provedena separace na koloně Q Sepharosy FF (o rozměrech 1×6 cm) pomocí HPLC systému BioSys 510 s fotometrickým detektorem měřícím při vlnové délce 280 nm. Zakoncentrovaný protein byl nejprve centrifugován při 15 000×g po dobu 10 minut při teplotě 20 °C. Následovala filtrace přes filtr o velikosti póru 22 μm a nanesení vzorku na kolonu. Před nanesením vzorku byla kolona propláchnuta nejprve puftrem B pro ionexovou chromatografii a následně puftrem A pro ionexovou chromatografii. Nanášení vzorku probíhalo rychlostí 2 ml/min a po celou dobu byla jímána frakce. Po nanesení byla spuštěna metoda s lineárním gradientem NaCl, který začínal na koncentraci 9 mM NaCl a po 60 minutách dosáhl koncentrace 1 M NaCl. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min. Frakce byly jímány manuálně a následně vyhodnocovány pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí. Po skončení separace byla kolona propláchnuta 20% (v/v) roztokem ethanolu.

4.10 Gelová chromatografie na Superdexu 200

Po vyhodnocení SDS-PAGE byly frakce obsahující hledaný protein zakoncentrovány pomocí centrifugačního koncentrátoru s limitem propustnosti 10 kDa na objem 500 μl. Koncentrování probíhalo při 2 000×g 20 minut při teplotě 20 °C. Retenát byl promíchán opakovaným pipetováním, převeden do mikrozkušavky a centrifugován při 10 000×g po dobu 2 minut při laboratorní teplotě.

Gelová chromatografie probíhala na koloně Superdex 200 10/300 GL opět v HPLC systému BioSys 510. Kolona byla nejprve promyta pufrům pro gelovou chromatografii a následně byl nanesen vzorek. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,4 ml/min. Byly jímány frakce, které byly vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí. Po skončení separace byla kolona propláchnuta 20% (v/v) roztokem ethanolu.

4.11 Stanovení koncentrace proteinu podle Bradfordové

Frakce z gelové chromatografie obsahující hledaný protein byly zakoncentrovány pomocí centrifugačního koncentrátoru (kap. 4.10) na objem 500 μ l a převedeny do mikrozkušavek. Na mikrotitrační destičku byly napipetovány standardy BSA (o koncentracích 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml a 0,5 mg/ml), destilovaná voda a jednotlivé frakce hledaného proteinu. Pipetovaný objem všech vzorků byl 5 μ l. Ke všem vzorkům bylo přidáno 200 μ l činidla pro stanovení dle Bradfordové obsahujícího Coomassie Brilliant Blue G-250. Po 5 minutách byla změřena absorbance při 595 nm (vlnová délka, při které absorbuje činidlo navázané na proteiny) pomocí nonochromátorové čtečky destiček Safire. Všechny vzorky byly stanoveny dvakrát kvůli eliminaci chyb. Z naměřených hodnot standardů BSA byla sestrojena kalibrační křivka a z ní pak odečtena koncentrace jednotlivých frakcí obsahujících hledaný protein. Byly porovnány výtěžky produkovaného proteinu ve třech typech médií.

Následně byly všechny frakce proteinu ze všech tří typů médií spojeny, zakoncentrovány na 500 μ l a předány na NMR měření Mgr. Josefovi Chmelíkovi, Ph.D., který změřil ^1H protonové spektrum. Toto měření sloužilo pro počáteční odhad kvality poskládání proteinu.

4.12 Produkce isotopově značených proteinů

Isotopově značené proteiny ^{15}N -rNKR-P1A a ^{15}N - ^{13}C -rNKR-P1A byly produkovány ve 2 l M9 minimálního média, ve kterém byl pozorován nejvyšší výtěžek. Zdrojem ^{15}N byl v M9 minimálním médiu $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ a zdrojem ^{13}C byla plně značená ^{13}C glukosa. Bylo postupováno stejně jako při produkci neznačeného proteinu. Po stanovení koncentrace byly oba proteiny předány na NMR měření ^1H - ^{15}N -HSQC spekter a další strukturní charakterizaci Mgr. Josefovi Chmelíkovi, Ph.D.

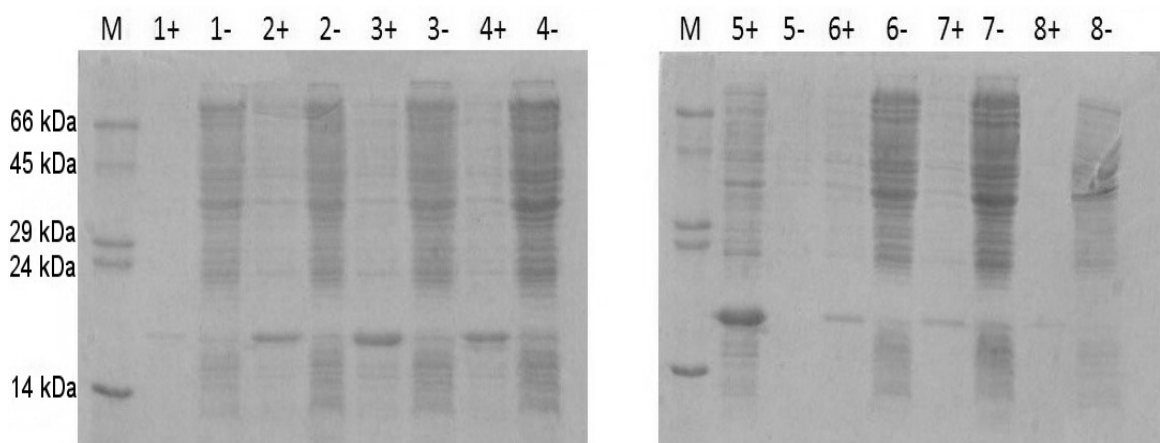
5. VÝSLEDKY

5.1 Transformace kompetentních buněk

Podle kap. 4.1 byla provedena transformace kompetentních buněk *E. coli* kmen BL21-CodonPlus(DE3)Gold RIPL plasmidem pETNKRA, který byl připraven Mgr. Petrou Němcovou. Transformace proběhla metodou tepelného šoku. Na LB agaru vyrostlo 35 bakteriálních kolonií. Na kontrolním LB agaru nevyrostly žádné kolonie, protože buňky neobsahovaly zmíněný plasmid a neměly tak resistenci na příslušné antibiotikum obsažené v LB agaru.

5.2 Selektce produkčního klonu

Druhým krokem byla selektce produkčního klonu popsána v kap. 4.2. K 1 ml M9 minimálního média bylo přidáno 50 μ l nočních kultur. Směs byla ponechána 3 hodiny třepat rychlostí 220 ot./min při 37 °C. Poté byly vzorky vytemperovány na 28 °C a do zkumavek označených + byl přidán induktor IPTG, který indukoval expresi rNKR-P1A. Do vzorků označených - nebyl přidán induktor a zde se exprese proteinu neprojevila. Vzorky byly ponechány dále třepat po dobu 6 hodin při 28 °C a následně vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE v redukujícím prostředí (Obr. 4).



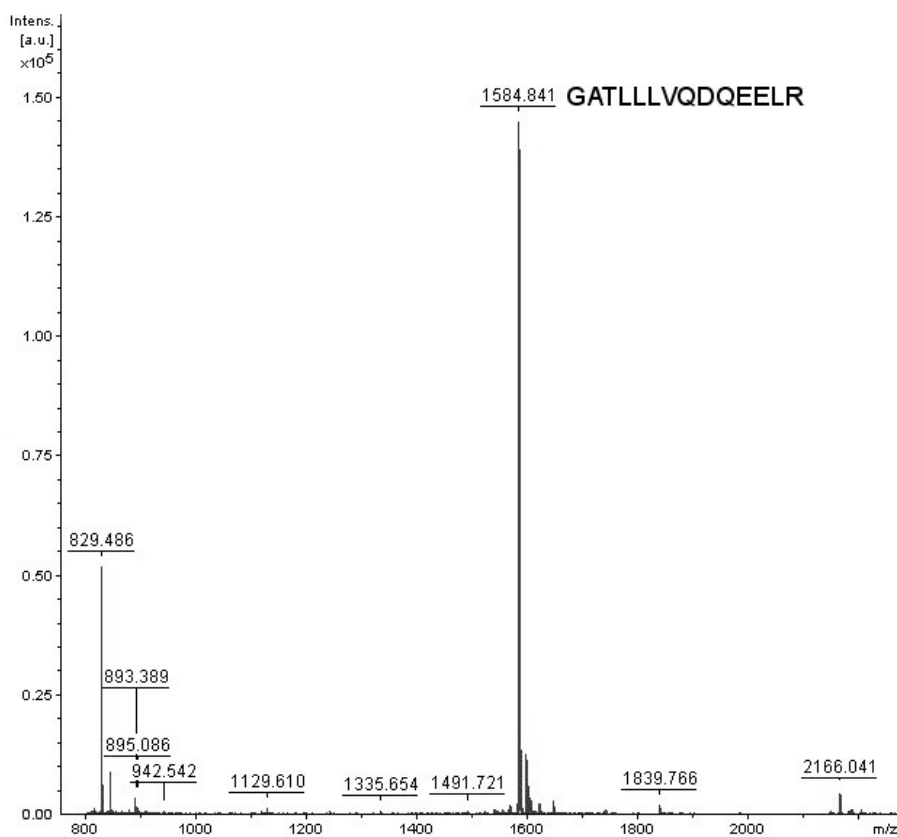
Obr. 4: Selektce produkčního klonu. Dráhu označenou M představuje standard molekulových hmotností (marker). Dráhy označené + představují vzorky obsahující induktor IPTG, dráhy označené - představují vzorky bez přídavku IPTG.

Jako produkční klon byl zvolen klon č. 3 z důvodu nejvyššího obsahu požadovaného proteinu ze všech drah.

5.3 Identifikace produkovaného proteinu

Produkovaný protein byl identifikován pomocí Edmanova odbourávání a MALDI-TOF MS analýzou tryptických štěpů. Obě metody byly popsány v kap. 4.4. Edmanovým odbouráváním bylo stanoveno prvních 12 aminokyselin od N-konce proteinu. Protein byl přenesen elektropřenosem z polyakrylamidového gelu po SDS-PAGE na PVDF membránu. PVDF membrána byla předána Prof. Karlu Bezouškovi, který provedl sekvenaci. Odečtená sekvence AKLKXPKDWLSH (X značí cystein, který se nepodařilo identifikovat) potvrdila, že se s velkou pravděpodobností jedná o rNKR-P1A a také ukázala odštěpení formyl methioninu z N-konce proteinu.

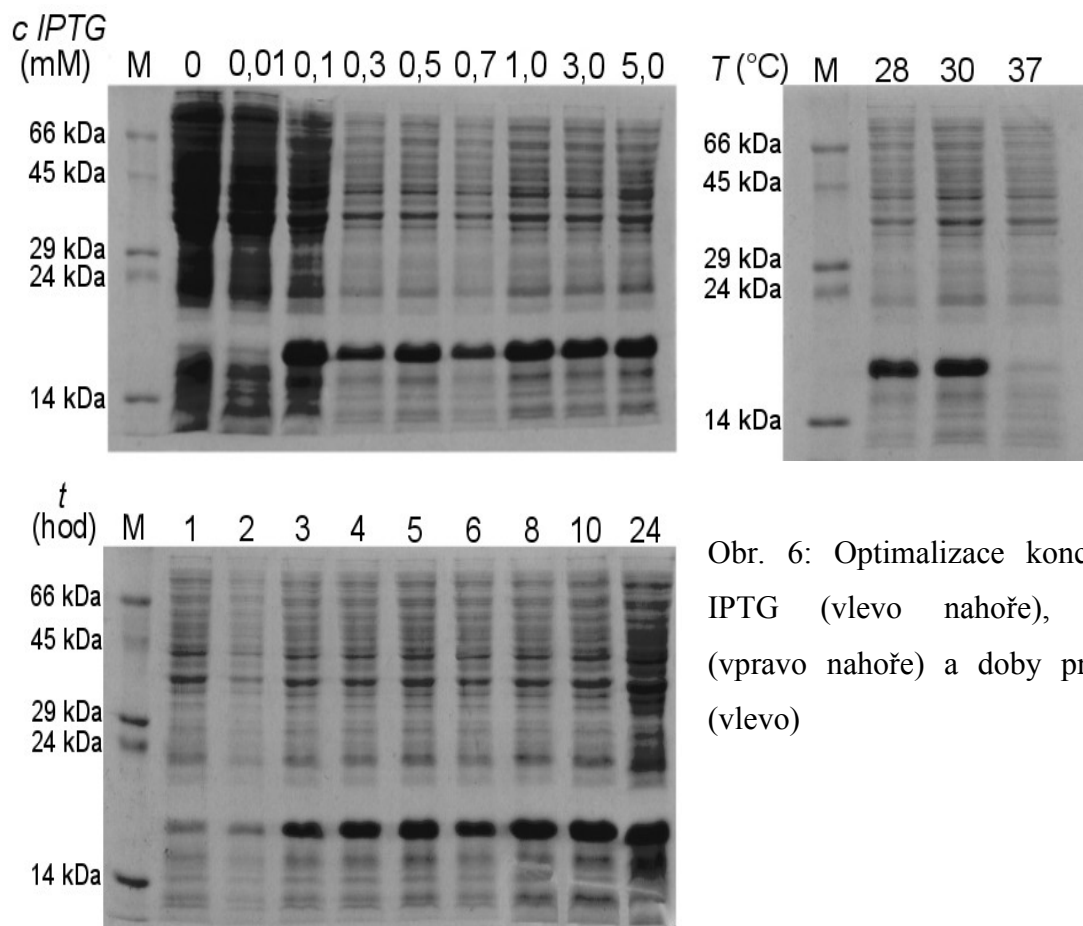
Vzorek na MALDI-TOF MS analýzu tryptických štěpů byl připraven vyříznutím proužku proteinu z polyakrylamidového gelu po stanovení produkčního klonu (z dráhy 3+). Následně byl protein rozštěpen trypsinem a předán Mgr. Danielu Kavanovi, který provedl analýzu. Porovnání naměřených hodnot s databází Mascot potvrdilo, že analyzovaný protein odpovídá produkovanému rNKR-P1A. Hmotnostní spektrum je znázorněno na Obr. 5.



Obr. 5: Hmotnostní spektrum proteinu analyzovaného MALDI-TOF MS analýzou tryptických štěpů. Vyznačen peptid, který byl nejvíce ionizován.

5.4 Optimalizace produkce

V tomto kroku byla provedena optimalizace produkce rNKR-P1A podle postupu v kap. 4.5. Byly optimalizovány 3 parametry: koncentrace induktoru IPTG, teplota a doba produkce. Nalezení optimálních hodnot všech tří parametrů bylo nezbytné pro dosažení co nejvyšších výtěžků proteinu při velkoobjemové produkci v M9 minimálním médiu. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí SDS-PAGE (Obr. 6).



Obr. 6: Optimalizace koncentrace IPTG (vlevo nahoře), teploty (vpravo nahoře) a doby produkce (vlevo)

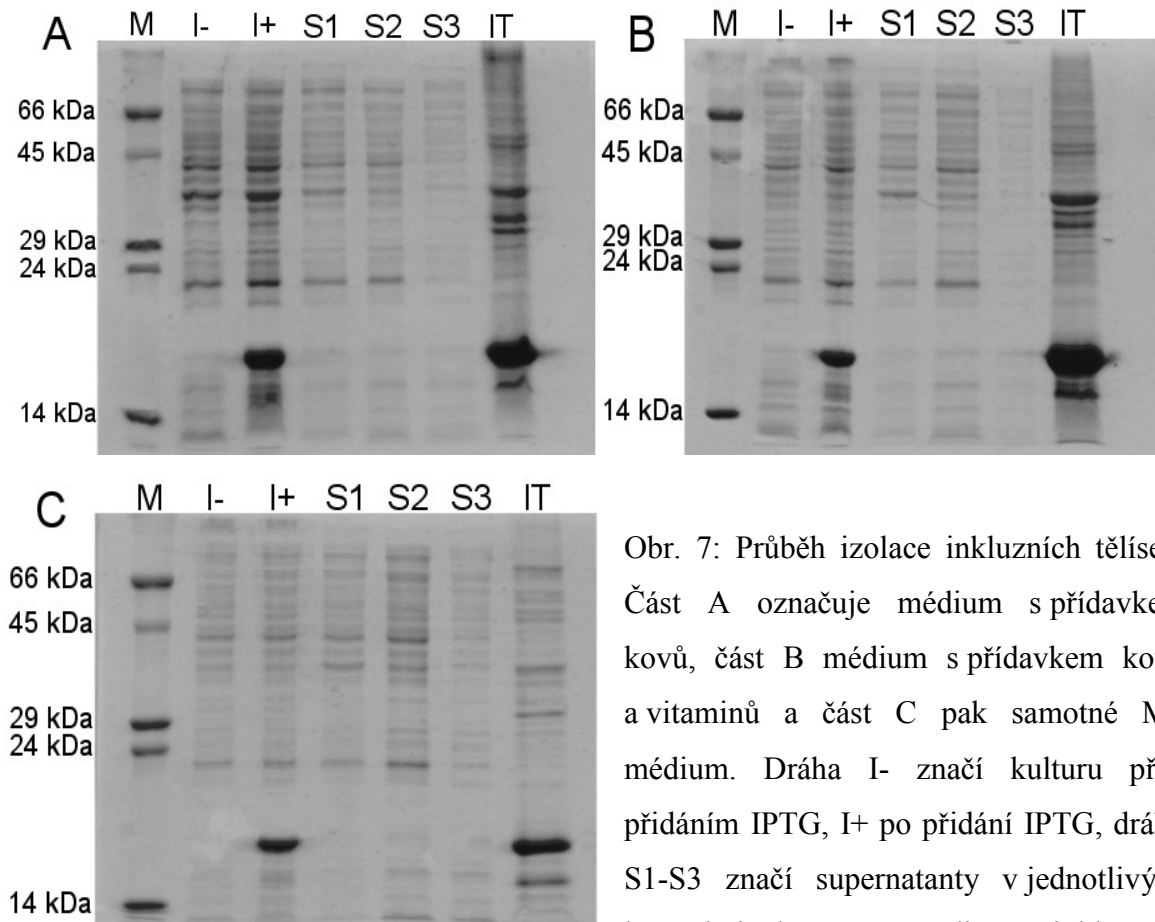
Jako optimální koncentrace IPTG byla zvolena koncentrace 0,5 mM, při které již byla pozorována dostatečná exprese proteinu.

Optimální teplotou byla zvolena teplota 28 °C, při které byla vysoká exprese produkovaného proteinu a nižší exprese ostatních bakteriálních proteinů. Je zajímavé, že při 37 °C došlo k minimální expresi rNKR-P1A.

Expese produkovaného proteinu byla pozorována již po jedné hodině od přidavku induktoru IPTG. Optimální produkce byla pozorována po 5 hodinách od přidavku IPTG.

5.5 Velkoobjemová produkce, izolace inkluzních tělísek a renaturace proteinu

Po nalezení optimálních parametrů bylo postupováno podle kapitol 4.6 - 4.8. rNKR-P1A byl produkován ve třech typech M9 minimálního média o objemu 500 ml. Tyto typy minimálních médií byly připravovány podle publikace z roku 2007 [29]. První médium obsahovalo navíc kovy (Fe, Zn a Mn), druhé médium obsahovalo (kromě kovů jako první médium) vitamínový mix a třetí médium bylo ponechané bez přídavku. Protein byl produkován při 28 °C po dobu 5 hodin od přídavku induktoru IPTG, který byl přidán do koncentrace 0,5 mM. Po uplynutí této doby proběhla izolace inkluzních tělísek (buněčných částí, do kterých bakterie ukládá produkováný protein). Došlo k rozbití buněk sacharosovým lyzačním pufrem v kombinaci se sonikací a promývání sedimentu v pufru s detergentem a bez detergentu. Průběh izolace inkluzních tělísek byl sledován pomocí SDS-PAGE v redukujícím prostředí (Obr. 7).



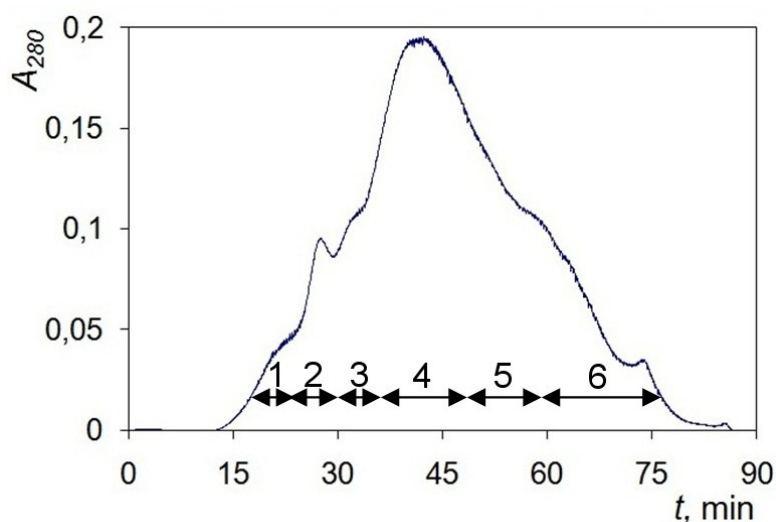
Obr. 7: Průběh izolace inkluzních tělísek. Část A označuje médium s přídavkem kovů, část B médium s přídavkem kovů a vitamínů a část C pak samotné M9 médium. Dráha I- značí kulturu před přidáním IPTG, I+ po přidání IPTG, dráhy S1-S3 značí supernatanty v jednotlivých krocích izolace a IT sediment inkluzních tělísek.

Z kontrolní SDS-PAGE bylo patrné, že izolace inkluzních tělísek proběhla v pořádku, jelikož se produkováný protein nacházel pouze ve vzorcích po přidání IPTG (I+) a v sedimentu inkluzních tělísek (IT).

Dalším krokem byla renaturace proteinu popsaná v kap. 4.8. Sediment inkluzních tělísek byl nejprve rozsuspendován v guanidinovém pufru obsahujícím inhibitory proteas. Následovala hodinová inkubace při teplotě 40 °C a poté ultracentrifugace. Vlastní renaturace proteinu byla provedena metodou rychlého naředění supernatantu po ultracentrifugaci do renaturačního pufru obsahujícího 1M L-arginin při 4 °C. Následovala hodinová inkubace při této teplotě a poté dialýza oproti dialyzačnímu pufru. Po dialýze byl roztok zakoncentrován ultrafiltrací a purifikován nanesením na kolonu Q Sepharose FF.

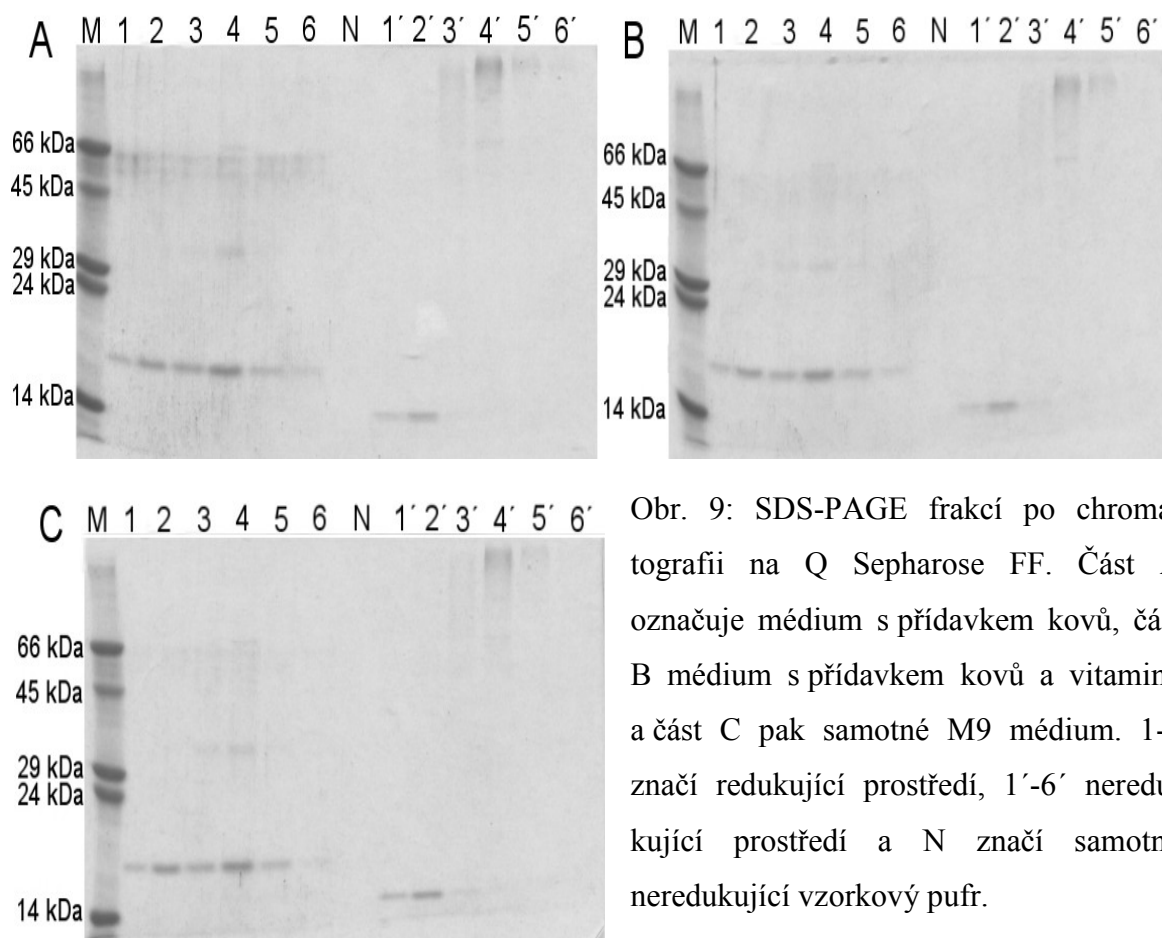
5.6 Ionexová chromatografie na Q Sepharose

Zakoncentrovaný roztok proteinu po ultrafiltraci byl centrifugován, přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 22 µm a nanesen na kolonu Q Sepharose FF podle kap. 4.9. Ionexová chromatografie probíhala s gradientem NaCl z počáteční 9 mM koncentrace do konečné 1 M koncentrace během 60 minut. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Eluční profily produkovaného proteinu naznačuje Obr. 8. Eluční profily proteinů produkovaných v dalších dvou médiích vypadaly téměř totožně.



Obr. 8: Eluční profil rNKR-P1A (produkovaného v M9 minimálním médiu s přídavkem kovů) po chromatografii na Q Sepharose FF. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Jímané frakce jsou naznačeny šipkami.

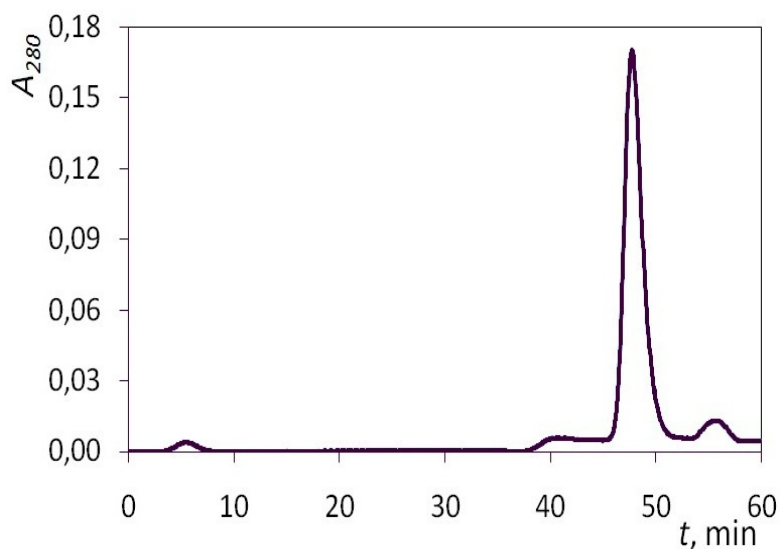
Jednotlivé frakce byly vyhodnocovány pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí (Obr. 9, str. 36).



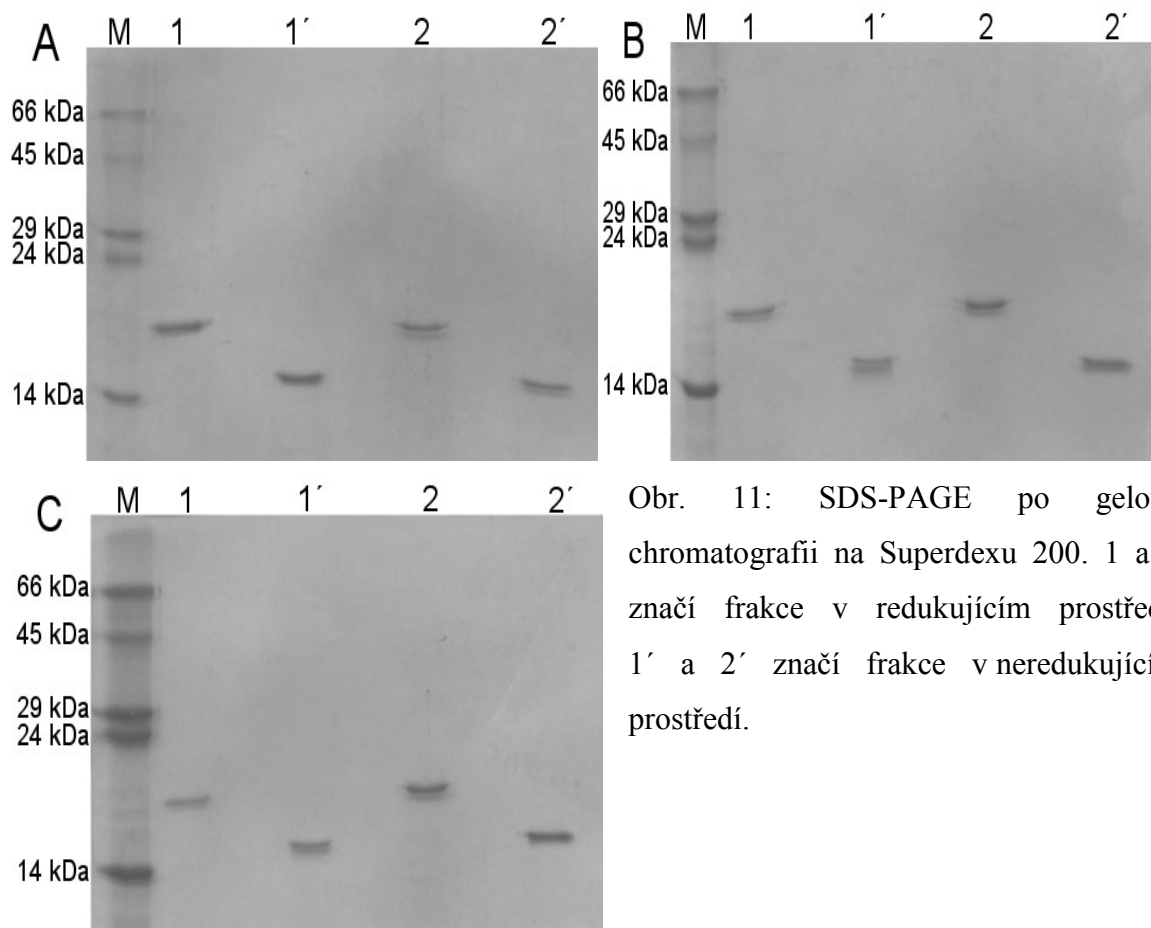
Z SDS-PAGE bylo patrné, že pouze frakce 1 a 2 obsahovaly rNKR-P1A. Ostatní frakce obsahovaly pouze agregáty tohoto proteinu, což je vidět v neredukujícím prostředí.

5.7 Gelová chromatografie na Superdexu 200

Frakce 1 a 2 po ionexové chromatografii byly zakoncentrovány pomocí centrifugačního koncentrátoru na objem 500 μ l a naneseny na kolonu Superdex 200 10/300 GL. Bylo postupováno podle kap. 4.10. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Eluční profily produkovaného proteinu naznačuje Obr. 10 na str. 37. Eluční profily proteinů produkovaných v dalších dvou médiích vypadaly téměř totožně. Jímaná frakce byla vyhodnocena pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí (Obr. 11, str. 37).



Obr. 10: Eluční profil rNKR-P1A (produkovaného v M9 minimálním médiu) po gelové chromatografii na Superdexu 200. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min.

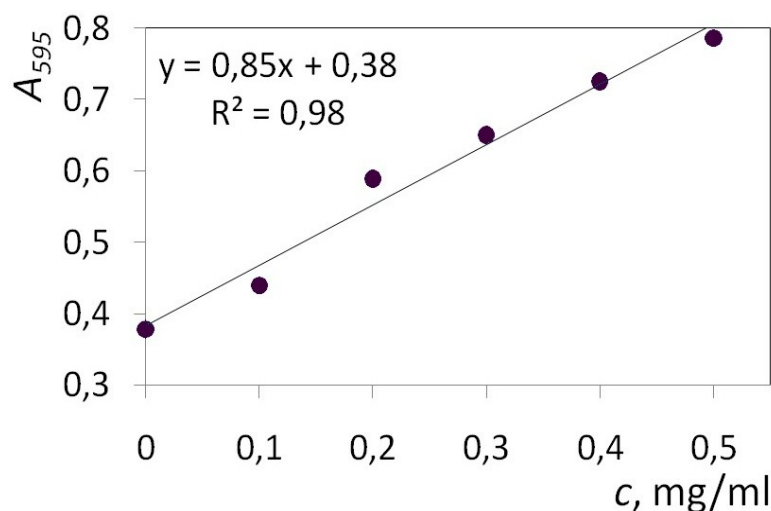


Obr. 11: SDS-PAGE po gelové chromatografii na Superdexu 200. 1 a 2 značí frakce v redukujícím prostředí, 1' a 2' značí frakce v neredukujícím prostředí.

Z jednotlivých gelů bylo patrné, že se podařilo rNKR-P1A produkovat v dostatečné čistotě. Posun zón proteinu při použití neredukujícího vzorkového pufru zároveň prokázal uzavření disulfidových můstků, což vedlo k tvorbě kompaktnější molekuly s větší pohyblivostí.

5.8 Stanovení koncentrace proteinu podle Bradfordové

Frakce proteinu 1 a 2 (produkované v jednom typu M9 minimálního média) byly zakonzentrovány na 500 μl . Bylo postupováno podle kap. 4.11. Ze zakonzentrováných vzorků bylo napipetováno 5 μl na mikrotitrační destičku a přidáno 200 μl činidla pro stanovení dle Bradfordové. Po 5 minutách byla změřena absorbance při 595 nm. Ze standardů BSA byla vytvořena kalibrační křivka (Obr. 12). Odečtením z kalibrační křivky byly nalezeny koncentrace jednotlivých frakcí produkovaného proteinu v jednotlivých typech médií. Výtěžky proteinu z jednotlivých typů médií byly porovnány. Vypočtené koncentrace jednotlivých frakcí přibližuje Tab. 4.

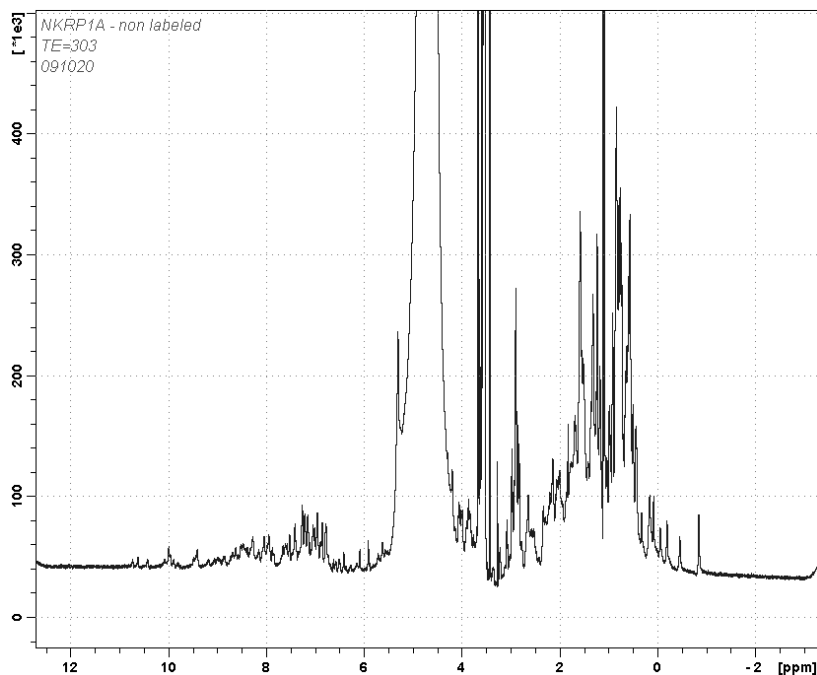


Obr. 12: Kalibrační křivka standardů BSA.

Tab. 4: Vypočtené koncentrace frakcí proteinu a výtěžky proteinu z jednotlivých médií.

| <i>Médium</i> | <i>Popis média</i> | <i>Frakce</i> | <i>c</i> mg/ml | <i>V</i> μl | <i>Množství proteinu</i> mg | |
|---------------|----------------------|---------------|-------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------|
| 1 | M9 + kovy | 1F1 | 0,29 | 390 | 0,11 | 0,23 |
| | | 1F2 | 0,29 | 400 | 0,12 | |
| 2 | M9 + kovy + vit. mix | 2F1 | 0,27 | 390 | 0,11 | 0,25 |
| | | 2F2 | 0,38 | 380 | 0,14 | |
| 3 | pouze M9 | 3F1 | 0,29 | 425 | 0,12 | 0,28 |
| | | 3F2 | 0,40 | 400 | 0,16 | |

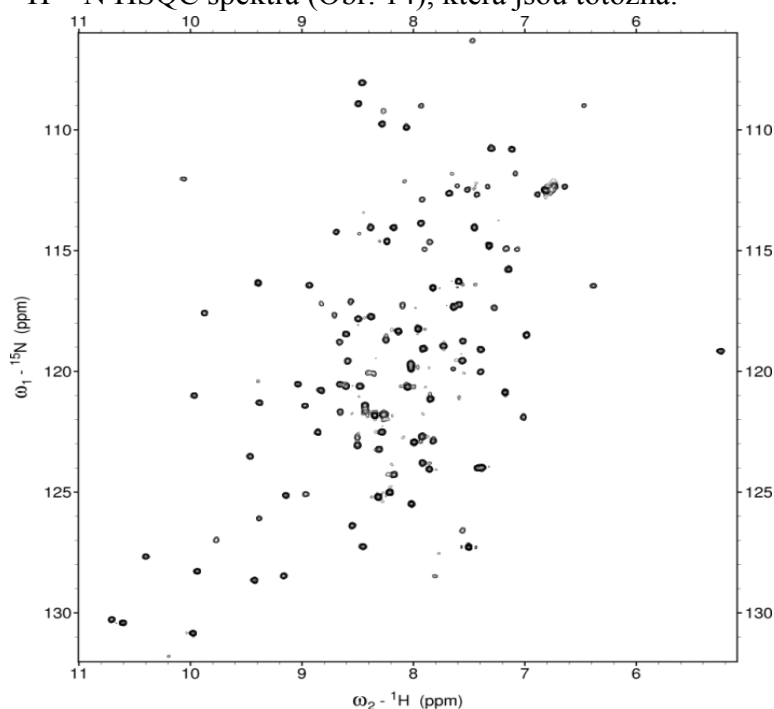
Z Tab. 4 je patrné, že největšího výtěžku rNKR-P1A bylo dosaženo při produkci v samotném M9 minimálním médiu. Všechny frakce proteinu byly spojeny a předány Mgr. Josefovi Chmelíkovi, Ph.D., který změřil ^1H protonové NMR spektrum (Obr. 13, str. 39). Z rozložení a charakteru signálů mezi 6 ppm a 10 ppm je patrné, že analyzovaný protein byl poskládaný.



Obr. 13: ^1H protonové NMR spektrum rNKR-P1A. Z disperze signálů ve spektru je patrné, že produkovaný protein byl poskládaný.

5.9 Produkce isotopově značených proteinů

Isotopově značené proteiny ^{15}N -rNKR-P1A a ^{15}N - ^{13}C -rNKR-P1A byly produkovány ve 2 l M9 minimálního média, ve kterém byl pozorován největší výtěžek. Bylo postupováno stejně jako při produkci neznačeného proteinu. ^{15}N -rNKR-P1A se podařilo vyprodukovat pouze 0,23 mg a výtěžek ^{15}N - ^{13}C -rNKR-P1A byl 1,31 mg. Oba proteiny byly předány na NMR měření Mgr. Josefovi Chmelíkovi, Ph.D., který změřil ^1H - ^{15}N HSQC spektra (Obr. 14), která jsou totožná.



Obr. 14: ^1H - ^{15}N HSQC spektrum ^{15}N - ^{13}C -rNKR-P1A. Každý signál ve spektru představuje N-H skupinu. Z disperze signálů plyne, že produkovaný protein byl poskládaný, jelikož signály jsou umístěny po celém spektru.

6. DISKUSE

Úkolem této bakalářské práce bylo optimalizovat produkci rNKR-P1A v M9 minimálním médiu, porovnat produkci tohoto proteinu ve třech typech M9 minimálního média a připravit isotopově značené proteiny ^{15}N -rNKR-P1A a ^{15}N - ^{13}C -rNKR-P1A pro studium metodami NMR.

Prvním krokem byla transformace kompetentních buněk. Pro transformaci byl použit plasmid s označením pETNKRA připravený Mgr. Petrou Němcovou. Dalším krokem byla identifikace exprimovaného proteinu Edmanovým odbouráváním prvních 12 aminokyselin od N-konce proteinu a MALDI-TOF MS analýzou tryptických štěpů. V obou případech bylo potvrzeno, že se jednalo skutečně o rNKR-P1A. Následovala optimalizace produkce, kdy byly nalezeny optimální parametry pro velkoobjemovou produkci proteinu. Optimální koncentrací induktoru IPTG byla stanovena koncentrace 0,5 mM, optimální teplotou pak teplota 28 °C a optimální doba produkce byla 5 hodin. V dalším kroku byl protein produkován ve třech typech M9 minimálního média o objemech 0,5 l. Tato minimální média byla připravována podle publikace z roku 2007 [29]. První médium obsahovalo kovy (Fe, Zn, Mn), druhé opět kovy a vitaminový mix a třetím médiem bylo samotné M9 minimální médium. Následovala izolace inkluzních tělísek, renaturace proteinu v 1M L-argininu, který plnil funkci nízkomolárního chaperonu, a purifikace proteinu. rNKR-P1A byl nejprve purifikován ionexovou chromatografií na Q Sepharose FF a následně gelovou chromatografií na koleně Superdexu 200 10/300 GL. Nejvyššího výtěžku proteinu bylo dosaženo při produkci v samotném M9 minimálním médiu (0,5 l) a to 0,28 mg proteinu. Nejnižšího výtěžku proteinu pak bylo dosaženo při produkci v M9 médiu s přidavkem kovů, což neodpovídá zmíněné publikaci, podle které by měl být právě zde nejvyšší výtěžek. Výtěžek z 0,5 l LB média se pohybuje mezi 0,25 – 0,5 mg [24]. Z uvedeného vyplývá, že se podařilo vyprodukovat protein na minimálním médiu s téměř stejnými výtěžky jako při produkci na LB médiu. Poskládání produkováného proteinu bylo potvrzeno z disperze signálů v ^1H protonovém NMR spektru, které naměřil Mgr. Josef Chmelík, Ph.D. Dalším krokem byla příprava isotopově značených proteinů. Výtěžek ^{15}N -rNKR-P1A byl pouze 0,23 mg a výtěžek ^{15}N - ^{13}C -rNKR-P1A byl 1,31 mg. Rozdíl v obou výtěžcích mohl být způsobený nutností zařadit při purifikaci ^{15}N -rNKR-P1A další ionexovou a gelovou chromatografií. Oba proteiny byly předány na NMR měření Mgr. Josefovi Chmelíkovi, Ph.D., který změřil ^1H - ^{15}N HSQC spektra. Z disperze signálů ve spektrech bylo patrné, že byly produkováné proteiny poskládané.

Isotopově značené proteiny budou dále zkoumány metodami NMR. Dvojitě značení proteinového preparátu zároveň umožňuje provedení detailního výzkumu trojrozměrné struktury rNKR-P1A (resp. jeho extracelulární části obsahující lektinovou doménu) pomocí mnohorozměrných NMR experimentů. Tyto analýzy probíhají v současné době na MBÚ AV ČR.

7. ZÁVĚR

- byly optimalizovány parametry (koncentrace induktoru IPTG, teplota a doba produkce) pro velkoobjemovou produkci rNKR-P1A v M9 minimálním médiu
- rNKR-P1A byl produkován ve třech typech M9 minimálního média s dosažením nejvyššího výtěžku v samotném M9 minimálním médiu
- byly produkovány isotopově značené proteiny ^{15}N -rNKR-P1A a ^{15}N - ^{13}C -rNKR-P1A
- metodami NMR bylo ověřeno poskládání všech produkováných proteinů
- získané proteinové preparáty poslouží k detailnímu výzkumu trojrozměrné struktury tohoto receptoru

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Hořejší, V.; Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha, Triton 2005.
- [2] Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S.: *Cellular and Molecular Immunology*. 6TH edit. Philadelphia, Saunders 2007.
- [3] Male, D.; Brostoff, J.; Roth, D. B.; Roitt, I.: *Immunology*. 7TH edit. Amsterdam, Elsevier 2006.
- [4] Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H.: *Eur. J. Immunol.* **5**, 112 (1975).
- [5] Moretta, A.; Bottino, C.; Mingari, M. C.; Biassoni, R.; Moretta, L.: *Nat. Immunol.* **1**, 6 (2002).
- [6] Trinchieri, G.: *Adv. Immunol.* **47**, 187 (1989).
- [7] Grégoire, C.; Chasson, L.; Luci, C.; Tomasello, E.; Grossmann, F. a kol.: *Immunol. Rev.* **220**, 169 (2007).
- [8] Biron, C. A.; Nguyen, K. B.; Pien, G. C.; Cousens, L. P.; Salazar-Mather, T. P.: *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 189 (1999).
- [9] Zhang, C.; Zhang, J.; Tian, Z.: *Cell. Mol. Immunol.* **3**, 241 (2006).
- [10] Yokoyama, W. M.; Plougastel, B. F. M.: *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 304 (2003).
- [11] Vivier, E.; Nunès, J. A.; Vély, F.: *Science*. **306**, 1517 (2004).
- [12] Lanier, L. L.: *Nat. Immunol.* **9**, 495 (2008).
- [13] Lanier, L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 359 (1998).
- [14] Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Cantoni, C. a kol.: *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 197 (2001).
- [15] Raulet, D. H.; Vance, R. E.: *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 520 (2006).
- [16] Perussia, B.; Trinchieri, G.; Jackson, A.; Warner, N. L.; Faust, J.: *J. Immunol.* **133**, 180 (1984).
- [17] Yokoyama, W. M.; Ryan, J. C.; Hunter, J. J.; Smith, H. R.; Stark, M.: *J. Immunol.* **147**, 3229 (1991)
- [18] Aust, J. G.; Gays, F.; Mickiewicz, K. M.; Buchanan, E.; Brooks C. G.: *J. Immunol.* **183**, 106 (2009).
- [19] Pozo D.; Valés-Gómez, M.; Mavaddat, N.; Williamson, S. C.; Chisholm, S. E.; Reyburn, H.: *J. Immunol.* **176**, 2397 (2006).
- [20] Rosen, D. B.; Bettadapura, J.; Alsharifi, M.; Mathew, P. A.; Warren, H. S.; Lanier L. L.: *J. Immunol.* **175**, 7796 (2005).

- [21] Chambers, W. H.; Vujanovic, N. L.; DeLeo, A. B.; Olszowy, M. W.; Herberman, R. B.; Hiserodt, J. C.: *J. Exp. Med.* **169**, 1373 (1989).
- [22] Josien, R.; Heslan, M.; Soulillou, J. P.; Cuturi, M. C.: *J. Exp. Med.* **186**, 467 (1997).
- [23] Bezouška, K.; Vlahas, G.; Horvath, O.; Jinochová, G.; Fišerová, A.; Giorda, R.; Chambers, W. H.; Feizi, T.; Pospíšil M.: *J. Biol. Chem.* **269**, 6945 (1994).
- [24] Němcová, P.: *Diplomová práce*. Praha 2009.
- [25] Ryan, J. C.; Niemi, E. C.; Goldfien, R. D.; Hiserodt, J. C.; Seaman, W. E.: *J. Immunol.* **147**, 3244 (1991).
- [26] Ryan, J. C.; Niemi, E. C.; Nakamura, M. C.; Seaman, W. E.: *J. Exp. Med.* **181**, 1911 (1995).
- [27] Bezouška, K.; Yuen, C. T.; O'Brien, J.; Childs, R. A.; Chai, W.; Lawson, A. M.; Drbal, K.; Fišerová, A.; Pospíšil, M.; Feizi, T.: *Nature*. **372**, 150 (1994).
- [28] Křen, V.; Dvořáková, J.; Sedmera, P.; Bezouška, K.: *Chem.Listy*. **92**, 936 (1998).
- [29] Paliy, O.; Gunasekera, T. S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1169 (2007).