

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Pavel Hanč

Výzkum vzájemné interakce membránových receptorů NKR-P1D a Clrb

Studies on interactions between NKR-P1D and Clrb membrane receptors

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
PAVEL HANČ

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval v první řadě svému školiteli, RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za veškerou pomoc a cenné rady, které mi poskytl i za trpělivost a přátelský přístup. Dále bych rád neméně poděkoval Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost vypracovat tuto diplomovou práci v Laboratoři architektury proteinů MBÚ AV ČR, v.v.i. ve spolupráci s Laboratoří charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR, v.v.i. i za všechny čas, který mi během posledních více než tří let věnoval a za značné rozšíření obzorů, které mi umožnil. Dále mé díky patří všem, kdo se nějakým způsobem podíleli na vzniku této práce, Mgr. Josefu Chmelíkovi, Ph.D. za naměření NMR spekter a vytvoření homologních modelů, Mgr. Haně Šípové, Ph.D. a Prof. Ing. Jiřímu Homolovi, DSc. za naměření SPR dat a Mgr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za naměření dat na analytické ultracentrifuze. V neposlední řadě děkuji všem členům Laboratoří architektury proteinů a charakterizace molekulární struktury za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Především Mgr. Danielu Rozbeskému, Mgr. Danielu Kavanovi, Ph.D., Mgr. Hynku Mrázkovi a RNDr. Petru Manovi, Ph.D., za ochotu kdykoliv pomoci i za mnohé rady. A samozřejmě děkuji i své rodině a blízkým, kteří mě podporovali po celou dobu studia a vždy pro mě byli pouze oporou.

Výzkum vzájemné interakce membránových receptorů NKR-P1D a Clrb

Interakce myších receptorů NKR-P1D a Clrb byla poprvé popsána jako nový typ „MHC class-I independent missing-self recognition“ poskytující ochranu před NK buněčným zabíjením.^[1] Pozdější studie ale přinesla výsledky zpochybňující tato data a naznačující, že NKR-P1D váže Clrb pouze velmi slabě, jestli vůbec.^[2]

Abychom vnesli světlo na tyto diskrepantní výsledky, rekombinantě jsme připravili extracelulární domény obou receptorů v bakteriích *E. coli* a proteiny renaturovali *in vitro*. Kvalita renaturace byla ověřena určením zapojení disulfidických můstků a změřením ¹H/¹⁵N-HSQC spekter. Pomocí gelové filtrace a analytické ultracentrifugy nebylo možno poskytnout přesvědčivé důkazy pro existenci interakce. Slabá, ale specifická interakce byla pozorována za použití SPR techniky. Tato interakce překvapivě vykazovala pH závislost. Interakce mezi proteiny v roztoku byla následně imobilizována pomocí techniky chemického zesítení proteinů. Byla použita činidla EDC, DSG a DSS. Reakční směsi byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a dimery byly štěpeny proteasami v gelu. Pomocí FTMS bylo možné identifikovat peptidy z obou proteinů, které byly spojeny některým ze síťovacích činidel.

Díky nedávno vyřešeným strukturám proteinů NKR-P1A a Clrg, které sdílí s NKR-P1D a Clrb 86% a 76% sekvenční identitu bylo možné vytvořit homologní modely obou proteinů i interagujícího páru dimerů. Část dat získaných síťovacím experimentem dle očekávání zapadala do modelu dvou homodimerů interagujících klasickým „face-to-face“ způsobem. Nezanedbatelná část pozorovaných spojení ale nemohla být vysvětlena tímto modelem, s ohledem na délku ramének použitých činidel. Tato pozorování nás vedla k návrhu modelu, podle kterého jsou tyto proteiny schopny interakce vždy jednoho homodimeru současně se dvěma homodimery proteinu druhého. Toto by navíc vedlo k výraznému zvýšení celkové avidity, i přesto že afinita jednotlivých monomerů může být velmi nízká, jak shodně naznačují gelová filtrace, analytická ultracentrifuga i povrchová plasmonová resonance.

1. Iizuka, K. et. al., Nat. Immunol., 2003, **4**, 801 – 807

2. Carlyle, J. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2004, **101**, 3527 – 3532

Studies on interactions between NKR-P1D and Clrb membrane receptors

Interaction between murine NKR-P1D and Clrb receptors was originally described as a novel type of „MHC class-I independent missing-self recognition“ and was shown to confer protection from killing by natural killer cells.^[1] However, further study brought conflicting results suggesting that NKR-P1D does not binds Clrb strongly if it does at all.^[2]

In order to address the issues arising from these conflicting results, we have recombinantly expressed the extracellular domains of both receptors in *E. coli* cells and refolded the proteins *in vitro*. The quality of refolding was confirmed both by determining the disulphide bonding pattern using FTMS and measuring ¹H/¹⁵N-HSQC spectra. By means of size exclusion chromatography and analytical ultracentrifuge we were unable to provide convincing results for the interaction itself. However, using SPR technique, a weak, specific, pH-dependent interaction was observed. Interaction between the proteins in solution was immobilized using chemical cross-linking technique. Three cross-linking reagents, EDC, DSG and DSS were used. The reaction mixture was separated by means of SDS-PAGE and protein bands corresponding to dimers were digested in gel. Using FT-MS we were able to find peptides from both proteins connected by the cross-linkers.

Using recently resolved structures of extracellular domains of NKR-P1A and Clrg receptors bearing 86% and 76% sequence identity with NKR-P1D and Clrb respectively, we were able to build homology models of both NKR-P1D and Clrb and a model of the interacting pair. Part of the data obtained from cross-linking experiments fitted nicely into the model of homodimers of both proteins interacting in a face-to-face fashion as would be expected; however significant portion of the observed cross-links could not be explained by this model. In order to allow for these data, we suggest that these receptors do not only interact in the face-to-face fashion but also in a chain-like or cluster-like fashion with each homodimer contacting two homodimers of the second protein at the same time. This would also lead to significant increase in the overall avidity even though the affinity of monomeric units might be very small as indicated by size exclusion chromatography, analytical ultracentrifuge and surface plasmon resonance. (Thesis in Czech)

1. Iizuka, K. et. al. Nat. Immunol., 2003, **4**, 801 – 807

2. Carlyle, J. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci, 2004, **101**, 3527 – 3532

Obsah

Abstrakt v českém jazyce	3
Abstrakt v anglickém jazyce	4
Obsah	5
Seznam zkratk	8
1. Teoretický úvod	12
1.1 Imunologie a vývoj chápání imunitního systému	12
1.2 Imunitní systém	14
1.3 NK buňky	15
1.3.1 Vývoj NK buněk	15
1.3.2 Aktivace NK buněk	18
1.3.3 Licencování NK buněk	20
1.3.4 Cytotoxické funkce NK buněk	21
1.3.4.1 Cytotoxicita zprostředkovaná sekrecí cytotoxických granul	21
1.3.4.2. Cytotoxicita zprostředkovaná přímým buněčným kontaktem	23
1.3.5 Regulační funkce NK buněk	24
1.3.5.1 Regulační funkce zprostředkované produkci solubilních molekul	24
1.3.5.2 Interakce NK buněk s dalšími buňkami imunitního systému	25
1.3.6 NK buněčná paměť	27
1.3.7 Manipulace a využití NK buněk pro imunoterapie	27
1.4 NK receptory	28
1.4.1 Signalizace NK receptory	30
1.4.1.1 Signalizace inhibičními NK receptory	30
1.4.1.2 Signalizace aktivačními NK receptory	31
1.4.2 C-lektinové receptory	33
1.4.2.1 Ly49 rodina	33
1.4.2.2 NKG2/CD94 rodina	34
1.4.2.3 NKR-P1 rodina	35

1.4.2.3.1 NKR-P1D	37
1.4.3 Imunoglobulinové receptory	37
1.4.3.1 KIR rodina	38
1.4.3.2 LILR rodina	39
1.4.3.3 NCR – Nkp receptory	39
1.4.4 SLAM rodina receptorů	40
1.5 Clr rodina proteinů	41
1.5.1 Clrb	42
1.6 Interakce NKR-P1D – Clrb	43
2. Cíle práce	45
3. Materiál	46
3.1 Přístroje	46
3.2 Soupravy pro izolaci DNA	48
3.3 Chemikálie	48
3.4 Primery pro PCR	50
3.5 Enzymy	50
3.6 Inhibitory proteas	50
3.7 Vektory	50
3.8 Bakteriální kmeny	51
3.9 Roztoky a pufrы	51
3.10 Média	52
4. Metody	53
4.1 Úprava konstruktů NKR-P1D	53
4.1.1 Zavedení bodové mutace do konstruktů kódujícího NKR-P1D	53
4.1.2 Zkrácení konstruktů kódujícího NKR-P1D	54
4.2 Produkce proteinů, izolace inkluzních tělísek a optimalizace refoldingu	56
4.2.1 Produkce proteinů a izolace inkluzních tělísek	56
4.2.2 Optimalizace refoldingu	56
4.3 Chromatografická separace	57
4.3.1 Ionexová chromatografie	57
4.3.2 Gelová filtrace	58
4.4 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	59
4.5 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	60
4.6 Ověření identity proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie	61

4.7	Ověření kvality renaturace obou proteinů	64
4.7.1	Kontrola zapojení S-S můstků pomocí hmotnostní spektrometrie	64
4.7.2	Kontrola monodisperze foldů pomocí 2D NMR	64
4.8	Funkční testy	65
4.8.1	Gelová filtrace na μ HPLC SMART	65
4.8.2	Analytická ultracentrifuga	65
4.8.3	Povrchová plasmonová resonance	66
4.9	Chemické zesítnění proteinů	68
4.9.1	Optimalizace koncentrace síťovacích činidel	70
4.9.2	MS analýza zesítněných peptidů	70
4.10	Příprava homologních modelů NKR-P1D a Clrb	71
5.	Výsledky	73
5.1	Úprava konstruktů NKR-P1D	75
5.1.1	Zavedení bodové mutace do konstruktů kódujícího NKR-P1D	75
5.1.2	Zkrácení konstruktů kódujícího NKR-P1D	75
5.2	Optimalizace refoldingu NKR-P1D a Clrb	76
5.2.1	NKR-P1D	76
5.2.2	Clrb	79
5.3.	Ověření identity proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie	82
5.3.1	NKR-P1D	82
5.3.2	Clrb	83
5.4	Ověření kvality renaturace	86
5.4.1	Ověření zapojení disulfidických můstků	86
5.4.2	Ověření monodisperze foldu	87
5.5	Funkční testy	88
5.5.1	Gelová filtrace na μ HPLC SMART	88
5.5.2	Analytická ultracentrifuga	89
5.5.3	Povrchová plasmonová resonance	90
5.6	Chemické zesítnění proteinů	91
5.6.1	Optimalizace koncentrace síťovacích činidel	91
5.6.2	MS analýza zesítněných peptidů	92
6.	Diskuse	95
7.	Souhrn výsledků	99
8.	Literatura	100

Seznam zkratek

ADCC	Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)
AICD	Aktivací indukované buněčná smrt (Activation Induced Cell Death)
APC	Antigen prezentující buňka (Antigen Presenting Cell)
bp	Pár bazí (base pair)
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CAD	Nukleasa (DNA fragmentation factor 40)
CCL	Chemokin (Chemokine (C-C motif) Ligand)
CCR	Chemokinový receptor (C-C Chemokine Receptor)
CD	Označení povrchových molekul buněk (Cluster of Differentiation)
Clr	Rodina molekul příbuzných lektinům C-typu (C-type lectin related)
CRACC	Člen rodiny SLAM (CD2-like Receptor-Activating Cytotoxic Cells)
CTL	Cytotoxický T-Lymfocyt
DAMP	Molekulární vzor asociovaný s nebezpečím (Danger Associated Molecular Pattern)
DAP10/12	Adaptorové proteiny (DNAX-Activating Protein of 10/12 kDa)
DC	Dendritická buňka (Dendritic Cell)
DISC	Signalizační komplex indukující buněčnou smrt (Death-Inducing Signalling Complex)
dNTPs	Deoxynukleotidtrifosfáty (DeoxyNucleotideTriPhosphate)
EAT2	Adaptorový protein pro ITSM (Ewing's sarcoma-Activated Transcript-2)
ERT	Adaptorový protein pro ITSM (EAT-2-Related Transducer)
ESI	Ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)
FasL	Ligand stimulující apoptosu (apoptosis stimulating Fragment Ligand)
Fc	Část molekuly protilátky (Fragment Crystallizable)
FT-ICR	Hmotnostní analyzátor využívající iontově cyklotronovou rezonanci a Fourierovu transformaci (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)
Fyn	Kinasa rodiny Src
GM-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
GrA/B	Granzym A/B

Grb2	Adaptorový protein (Growth factor receptor-bound 2)
GVHD	Nemoc způsobená reakcí štěpu proti hostiteli po transplantaci kostní dřeně (Graft Versus Host Disease)
HCMV	Lidský cytomegalovirus (Human CytoMegaloVirus)
HLA	Lidské isoformy MHC (Human Leukocyte Antigen)
hsp60	Heatshock protein 60
H-2	Myší isoformy MHC (Histocompatibility-2)
H60	Myší ligand pro NKG2D (Histocompatibility antigen 60)
ICAD	Inhibitor nukleasy CAD (Inhibitor of CAD)
IFN	InterFeroN
IL	InterLeukin
iNOS	Indukovatelná NO syntasa (inducible Nitrous Oxide Sythase)
IP ₃	Inositol trisfosfát
ITAM	Aktivační motiv využívaný receptory imunitního systému založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif)
ITIM	Inhibiční motiv využívaný receptory imunitního systému založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif)
ITSM	„Přepínatelný“ motiv využívaný receptory imunitního systému založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosin-based Switch Motif)
KIR	Rodina receptorů imunoglobulinového typu (Killer cell Immunoglobulin-like Receptor)
LC/MS	Systém sestávající z kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)
LILR	Rodina receptorů imunoglobulinového typu (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors)
LPS	LipoPolySacharid
LRC	Receptorový komplex leukocytů (Leukocyte Receptor Complex)
LLT1	Ligand lidského NKR-P1 (Lectin-Like Transcript 1)
LT	LymphoToxin
Ly49	Rodina receptorů C-lektinového typu (Lymphocyte antigen 49)
mAB	Monoklonální protilátka (monoclonal AntiBody)
MALDI	Ionizace laserovou desorpcí za přítomnosti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MCMV	Myší cytomegalovirus (Murine CytoMegaloVirus)

MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
MICA/B	Proteiny strukturně podobné MHC molekulám (MHC-class-I-like Chain A/B)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MULT-1	Myší ligand NKG2D (Murine ULBP-like Transcript 1)
NCR	Receptory zprostředkující cytotoxicitu (Natural Cytotoxicity Receptor)
NHS	N-hydroxysukcinimidyl
NK	Zabíječská buňka (Natural Killer)
NK1.1	Antigen NK buněk (Natural Killer antigen 1.1)
NKC	NK genový komplex (NK gene Complex)
NKG2	Rodina receptorů C-lektinového typu (Natural Killer Group 2)
NKG5	NK buněčná forma granulysinu (Natural Killer Group 5)
Nkp	Skupina NK receptorů (Natural Killer protein)
NKR-P1	Rodina receptorů C-lektinového typu (Natural Killer Receptor Protein 1)
NMR	Nukleární Magnetická Resonance
NTB-A	Člen rodiny SLAM (NK, T- and B-cell Antigen)
OCIL	Jiné označení pro protein Clrb (OsteoClast Inhibitory Lectin)
PAMP	Molekulární vzor asociovaný s patogeny (Pathogen Associated Molecular Pattern)
PCR	Polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PEN	Perforin
PI3K	Fosfatidylinositol-3-OH kinasa (Phosphatidylinositol-3-OH Kinase)
PLC- γ	Fosfolipasa C- γ (PhosphoLipase C- γ)
ppm	Způsob vyjádření chyby měření (Parts Per Million)
PRR	Receptor rozpoznávající patogeny (Pathogen Recognition Receptor)
Qa-1	Ligand pro myší inhibiční receptory NKG-2A a C
Rae	Myší ligandy NKG2D (Retinoic Acid Early inducible 1)
RAG	Rekombinasa (Recombinase-Activating Gene)
RANKL	Molekula stimulující tvorbu osteoklastů (Receptor Activator of NF- κ B Ligand)
RPM	Počet otáček za minutu (Revolutions Per Minute)
SAP	Adaptorový protein pro ITSM (SLAM Associated Protein)
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl sulfát sodného (SodiumDodecylSulfate-PolyAcrylamid Gel Electrophoresis)
SH2	Doména vážící sekvence obsahující fosforylovaný tyrosin (Src Homology 2)
SH3	Doména vážící sekvence bohaté na prolin (Src Homology 3)

SHIP	Inositolová fosfatasa (SH2 domain-containing Inositol polyphosphate 5-Phosphatase)
SHP-1/2	Proteintyrosinové fosfatasy (SH2 domain-containing protein tyrosin Phosphatase)
SPR	Povrchová plasmonová resonance (Surface Plasmon Resonance)
Src	Rodina sarkomových tyrosinových kinas (SaRComa)
Syk	Rodina tyrosinových kinas (Spleen Y (tyrosin) Kinase)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin (Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine)
TCR	T buněčný receptor (T Cell Receptor)
TGF- β	Transformující růstový faktor β (Transforming Growth Factor β)
TIL	Tumor infiltrující lymfocyt (Tumor Infiltrating Lymphocyte)
TLA519	T-buněčná forma granulysinu (T-Lymphocyte Antigen 519)
TLR	Receptor podobný receptoru Toll (Toll-Like Receptor)
TNF	Faktor způsobující nekrózu tumorů (Tumor Necrosis Factor)
TOF	Hmotnostní analyzátor využívající dobu letu iontů (Time Of Flight)
TRAIL	Ligand příbuzný TNF spouštějící apoptosu (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)
ULBP	Myší ligandy NKG2D receptoru – proteiny vážící UL16 (UL16 Binding Protein)
UL16	Glykoprotein kódovaný MCMV
XCL	Chemokin (Chemokine (C motif) ligand)
ZAP-70	Tyrosinová kinasa asociovaná se zeta řetězcem (Zeta-chain-Associated Protein kinase 70)

1. Teoretický úvod

1.1 Imunologie a vývoj chápání imunitního systému

Imunitní systém je jeden ze zásadních mechanismů udržení homeostázy v těle. Počátky imunologie jako vědy zabývající se specificky tímto mechanismem, se obvykle datují na přelom 18. a 19. století k Edwardu Jennerovi, který bývá také označován jako zakladatel imunologie.^[1] Jenner se proslavil svými, z dnešního pohledu eticky spornými experimenty, které vedly k objevu očkování proti neštovicím. Jenner, jako i další před ním, zaznamenal, že lidé, kteří prodělali infekci virem *Vaccinie*, se stali rezistentními vůči pravý neštovicím. Jenner však nezůstal pouze u tohoto pasivního pozorování a uskutečnil experiment, který ve své jednoduchosti prokázal správnost této hypotézy a naznačil směr, jímž se medicína ubírala v dalších desetiletích až do samotné eradikace pravých neštovic v roce 1979. Jenner infikoval syna svého zahradníka, osmiletého Jamese Phippse, virem *Vaccinie* a po odeznění příznaků infekce se jej pokusil infikovat virem pravých neštovic. Ani po opakovaném podání infekčního materiálu však dítě neonemocnělo a Jenner tak ukázal světu způsob boje proti této chorobě, která si ročně vyžádala miliony životů.^[2]

Jennerovy výsledky se však zakládaly pouze na empirické zkušenosti a pozorování a postrádaly jakékoliv mechanistické vysvětlení procesů, které za nimi stály. Význam mikroorganismů pro vznik infekčních chorob popsal až Robert Koch ve druhé polovině 19. století. Tento objev byl následován rychlým rozvojem metodiky vakcinace i proti dalším chorobám (například choleře nebo vzteklině) především zásluhou Louise Pasteura.^[1]

Samotné imunologii konce 19. a počátku 20. století vévodily dvě teorie. Buněčná teorie Iliji Mečnikova přikládající hlavní roli v imunitním systému fagocytóze^[3, 4] a imunochemická teorie Paula Ehrlicha připisující hlavní úlohu rozpustným protilátkám cirkulujícím v krvi.^[5] Ačkoliv tyto dvě myšlenkové školy ve své době tvořily protipóly tehdejšího chápání imunitního systému, dnes víme, že obě teorie jsou v principu správné a v obraně jedince před patogeny se doopravdy uplatňují jak Ehrlichovy protilátky, tak Mečnikovova fagocytóza. Oba tak nakonec za své příspěvky k pochopení funkce imunitního systému obdrželi v roce 1908 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.^[3-5]

Dalším důležitým konceptem, jehož formulace byla významným milníkem vývoje imunologie bylo zavedení pojmů „self“ a „nonself“, jež podle Macfarlan Burneta vymezují

svět, jak jej chápe imunitní systém. Podle této teorie imunitní systém rozpoznává mezi entitami těla vlastními („self“) a cizími („nonself“).^[6] Burnet následně svou myšlenku rozšířil do podoby teorie klonální selekce, která říká, že po stimulaci antigenem, dojde k expanzi populace pouze těch lymfocytů, které tento antigen rozpoznaly.^[7] V rámci zajištění směřování imunitní odpovědi pouze proti entitám těla cizím, Burnet a Medawar nakonec do tohoto modelu zapojili i Lederbergův návrh, že autoreaktivní klony lymfocytů jsou odstraněny v rané fázi vývoje.^[8]

Tento model prošel v průběhu následujících let několika úpravami, které do něj inkorporovaly koncept druhého signálu. Podle první z těchto úprav, kterou zavedli Langman a Cohn, B lymfocyty, které pouze rozpoznají antigen, ale nedostanou druhý, podpůrný, signál od T lymfocytu, přechází do apoptosy.^[9]

O další rozšíření tohoto modelu se postarali Lafferty a Cunningham, kteří zavedli koncept další buňky, takzvané antigen prezentující buňky, která poskytuje takový druhý signál T lymfocytům.^[10]

Tato poslední změna byla dlouho opomíjena a ignorována až do roku 1989, kdy Charles Janeway tento koncept rozšířil do podoby takzvaného „Infectious Non-Self“ modelu. Podle tohoto modelu jsou antigen prezentující buňky schopny rozpoznat charakteristické molekulární vzory objevující se konzervovaně na patogenech a iniciovat proti nim imunitní odpověď. Tyto vzory byly označeny jako „PAMPs,“ (Pathogen Associated Molecular Patterns) a receptory, které je rozpoznávají, jako „PRRs“ (Pathogen Recognition Receptors).^[11]

Poslední kapitolou ve vývoji našeho pochopení fungování imunitního systému je takzvaný „Danger“ model, který navrhla Polly Matzinger. Podle tohoto modelu nestojí na počátku imunitní odpovědi pouze jednoduché rozpoznání cizorodých molekulárních vzorů, ale spíše poškození vlastních tkání a následné uvolnění molekul, které byly analogicky označeny jako „DAMPs“ (Danger Associated Molecular Patterns). Tento model je, narozdíl od všech předchozích, schopen vysvětlit některé fenomény, jako například transplantační nebo protinádorovou imunitu, a nabízí zcela nový náhled na funkci imunitního systému.^[12]

Ačkoliv byl „Danger“ model původně koncipován a prezentován jako alternativa, která měla nahradit „Infectious Non-Self“ model^[13], objev a detailní charakterizace prvního PRR v roce 1997^[14, 15] jasně naznačila, že „Infectious Non-Self“ model možná nepopisuje imunitní systém kompletně, ale určitě není principiálně chybný a Matzinger byla nucena v dalších publikacích přistoupit na smířlivější tón.^[12]

Stejně jako objev receptorů rozpoznávajících mikrobiální vzory byl chápán jako důkaz podporující „Infectious Non-Self“ model, nedávný objev receptoru specifického pro DAMPs, přináší důkaz o platnosti „Danger“ modelu.^[16] Dá se tedy říct, že ačkoliv žádný z těchto dvou modelů nemá pravdu sám o sobě, dohromady představují nejpřesnější popis funkce imunitního systému, který je v současné době k dispozici. Jak ukazují některé publikace z poslední doby, je pro silnou aktivaci některých imunitních funkcí ve skutečnosti třeba obou těchto aktivačních signálů – PAMPů i DAMPů.^[17]

1.2 Imunitní systém

Jak bylo nastíněno v předchozí části, pohled vědců na imunitní systém prošel velkým množstvím změn a dá se předpokládat, že ani dnešní pohled zdaleka není konečnou a správnou variantou.

V současné době je, spíše z historických důvodů, imunitní systém dělen na dvě části – vrozenou a adaptivní. Vrozená imunita bývá obvykle považována za základní vrstvu imunitního systému, jejímž hlavním úkolem je pouze rozpoznat přítomnost patogenu a aktivovat imunitu adaptivní. Jak začíná být poslední dobou zřejmé, tato jednoduchost je však pouze iluzorní a vrozená imunita ve skutečnosti představuje velice komplikovaný a dynamický systém, který se nedá shrnout do několika takto zjednodušujících pouček. Za hlavní buněčné složky vrozené imunity jsou obvykle považovány dendritické buňky, makrofágy, polymorfonukleární leukocyty a mastocyty.^[1]

Adaptivní imunitní systém je charakteristický svou klonalitou, což znamená, že každá buňka má svůj vlastní unikátní receptor s unikátní specifitou. Procesy dávající vzniknout takto diverzifikovanému repertoáru byly dlouho neznámé, dokud Susumu Tonegawa neobjevil kombinatorický systém skládání receptorů kombinací různých genových segmentů.^[18] Další procesy dále zvyšující diverzitu byly objeveny později, ale Tonegawa za tento objev obdržel v roce 1987 Nobelovu cenu za medicínu a fyziologii. Mezi buněčné složky adaptivní imunity se obvykle řadí B a T lymfocyty, které se dále dělí do dalších podskupin.^[1]

Podle těchto definic se rozdělení imunitního systému na vrozený a adaptivní jeví jako logické a poměrně přímočaré. Ve skutečnosti je však hranice mezi těmito dvěma systémy velmi nejasná a místy naprosto arbitrárně stanovená. Kromě výše zmíněných buněčných populací jasně spadajících do jedné z takto vymezených oblastí, existují totiž i subpopulace

B a T lymfocytů, které mají značně redukovanou diversitu svých receptorů a v mnoha ohledech vykazují charakter buněk vrozené imunity. Jako příklady těchto buněk se obvykle uvádějí B-1 lymfocyty, $\gamma\delta$ T lymfocyty nebo NK T lymfocyty. Samostatnou skupinou, která stojí na rozhraní adaptivní a vrozené imunity jsou potom NK buňky.^[1]

1.3 NK buňky

NK buňky byly objeveny v roce 1975. Díky své morfologii, expresi mnoha lymfoidních markerů a původu ze společného lymfoidního prekursoru byly klasifikovány jako další typ lymfocytů.^[19] Název NK buněk pochází z anglického „Natural Killer“ a odráží vlastnosti těchto lymfocytů, které byly popsány v prvních pracích – schopnost zabít některé tumorové a virově infikované buňky bez předchozí aktivace.

Konsenzu v klasifikaci NK buněk bylo dosaženo, když byly NK buňky definovány jako velké granulární lymfocyty neexprimující CD3 ani žádné z řetězců TCR, exprimující CD16 a CD56 u lidí a NK-1.1/NK-2.1 u myši a vykazující cytotoxickou aktivitu při absenci MHC třídy I i II.^[20] NK-1.1 antigen však není přítomen na NK buňkách všech myších kmenů, a tak byl v nedávné době jako asi nejcharakterističtější marker NK buněk napříč savčími druhy definován NKp46 receptor.^[21] Později byly popsány i regulační funkce NK buněk, především produkce velkého množství cytokinů a chemokinů. Schopnost zabíjení bez předchozí aktivace byla také přehodnocena, když bylo zjištěno, že i NK buňky vyžadují priming různými faktory, jako například IL-15, IL-12 nebo IL-18. Obecně je aktivita každé NK buňky diktována rovnováhou signálů přicházejících skrze aktivační a inhibiční receptory. V případě převahy inhibičních signálů se nic neděje, zatímco když převáží aktivační signály, NK buňka je aktivována a dochází k zabití buňky která tuto aktivaci způsobila.^[22]

1.3.1 Vývoj NK buněk

Jako základní prekursor myších NK buněk jsou na základě *in vitro* experimentů obecně považovány společné lymfoidní prekursor, které dávají vznik i T a B lymfocytům. Objevily se však i experimenty naznačující možnost vývoje NK buněk z časnějších Flt3⁺ prekursorů, jako například raných lymfoidních prekursorů, které mají schopnost vyvinout se v granulocyty a makrofágy, stejně jako v T a B lymfocyty.^[23]

Primárním místem pro vývoj NK buněk je kostní dřeň, ačkoliv NK buňky s nematurovaným fenotypem se objevují i v játrech a thymu.^[23]

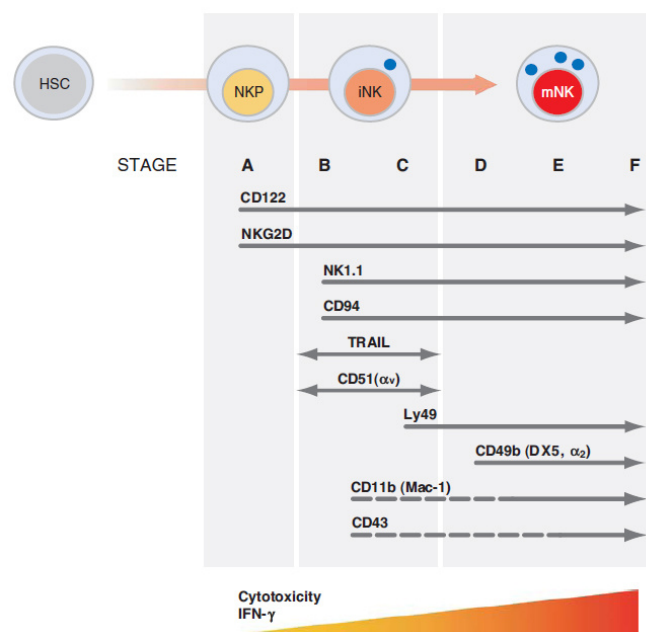
V případě myších NK buněk maturujících v kostní dřeni se objevily dva typy klasifikací jednotlivých vývojových stádií. První navrhl Yokoyama a dělí vývoj do 5 fází označovaných I – V. Prekurzory NK buněk ve fázi I jsou charakteristické expresí CD122. Následující fáze vývoje jsou charakterizovány měnící se expresí různých znaků. Poslední fáze označující maturované buňky je charakteristická úplnou ztrátou exprese α_V a silnou expresí CD43 a Mac-I.^[24]

Druhá klasifikace vychází z práce Di Santa, který dělí vývoj taktéž do 5 fází (Obr. 1.), které ale označuje A – E. Podle této klasifikace jsou prekurzory NK buněk charakteristické expresí CD122 a NKG2D, maturované NK buňky pak upregulací Ly49 a DX5.^[25]

I přes drobné odlišnosti se tyto klasifikace dobře doplňují a shodují se na postupném získávání cytotoxických vlastností i produkce interferonu γ u vyvíjejících se NK buněk.^[24, 25]

Na molekulární úrovni je mechanismus určující komitment k NK buněčnému osudu určen rovnováhou transkripčních faktorů E2A a HEB s Id2, kdy Id2 směřuje buňku k NK buněčnému osudu, kdežto E2A a HEB k T a B komitmentu. Během dalšího vývoje NK buněk hrají důležitou roli další transkripční faktory (T-bet, GATA-3), stejně jako při určení efektorových vlastností již maturovaných NK buněk (MEF, MITF).^[25]

Vývoj NK buněk probíhající v thymu vede ke vzniku populace buněk charakteristických vysokou produkcí prozánětlivých cytokinů a sníženou cytolytickou aktivitou. Tato populace vykazuje sníženou expresi CD11b, CD43, postrádá Ly49 receptory, exprimuje α podjednotku IL-7R a vývoj těchto NK buněk vyžaduje přítomnost IL-7. Zda k jejich vývoji dochází z thymových prekurzorů nebo ze stejných prekurzorů, jako v případě NK buněk v kostní dřeni, zůstává nejasné. Vzhledem ke svým vlastnostem jsou tyto myší NK buňky, které



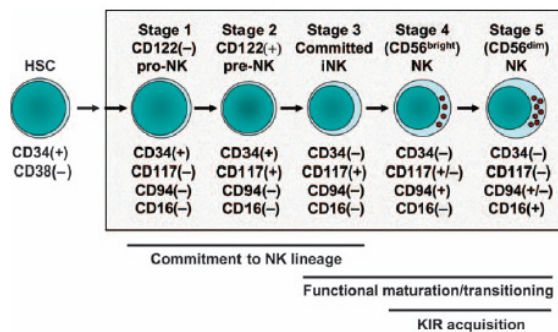
Obr. 1. Schéma jednotlivých vývojových stádií myších NK buněk a jejich expresního profilu. Přejato z [25].

produkují cytokiny a jsou jen slabě cytotoxické, připodobňovány k lidskému NK buněčnému subsetu označovanému CD56^{bright} CD16^{dim}.^[23]

K vývoji lidských NK buněk dochází kromě kostní dřeně také v sekundárních lymfoidních tkáních, především v lymfatických uzlinách a tonzilách.^[26] Vývoj NK buněk v kostní dřeni lze rozdělit do dvou fází. První je závislá na stromálních růstových faktorech, jako KL a FL, a vede k CD34^{bright} IL-2/IL-15⁺ CD56⁻ prekurzorům. Tyto prekurzory se poté pod vlivem IL-15 vyvíjí v maturované CD56^{dim}CD16^{bright} NK buňky vyznačující se silnými cytotoxickými vlastnostmi. Oproti tomu vývoj v lymfatických uzlinách vede k imunoregulačnímu CD56^{bright}CD16^{dim} subsetu charakterizovanému zvýšenou produkcí cytokinů a sníženými cytotoxickými schopnostmi.^[27] Speciální subset hematopoetických prekurzorů s fenotypem CD34^{dim} CD45RA⁺ β_7^{high} byl nalezen v lymfatických uzlinách, kde tvoří naprostou většinu všech CD34⁺ buněk, zatímco v krvi tento subset představuje méně než 6 % a v kostní dřeni méně než 1 %. Předpokládá se, že právě tento subset je prekurzorem pro vznik CD56^{bright}CD16^{dim} NK buněčného subsetu v lymfatických uzlinách.^[28] Nahromaděná data naznačují, že tento prekurzorový subset je generován v kostní dřeni pod vlivem KL a FL a teprve následně migruje do lymfatických uzlin, kde pod vlivem IL-15 diferencuje na CD56^{bright} NK buňky.^[27]

Detailněji zpracovaný model vývoje NK buněk v sekundárních lymfoidních tkáních postuloval Freud et al., když jej rozdělil do 4 fází v závislosti na expresi CD34, CD117 a CD94 (Obr. 2.). První fáze vývoje odpovídá progenitorům popsaným již dříve s charakteristickým fenotypem CD34⁺ CD117⁻ CD94⁻.

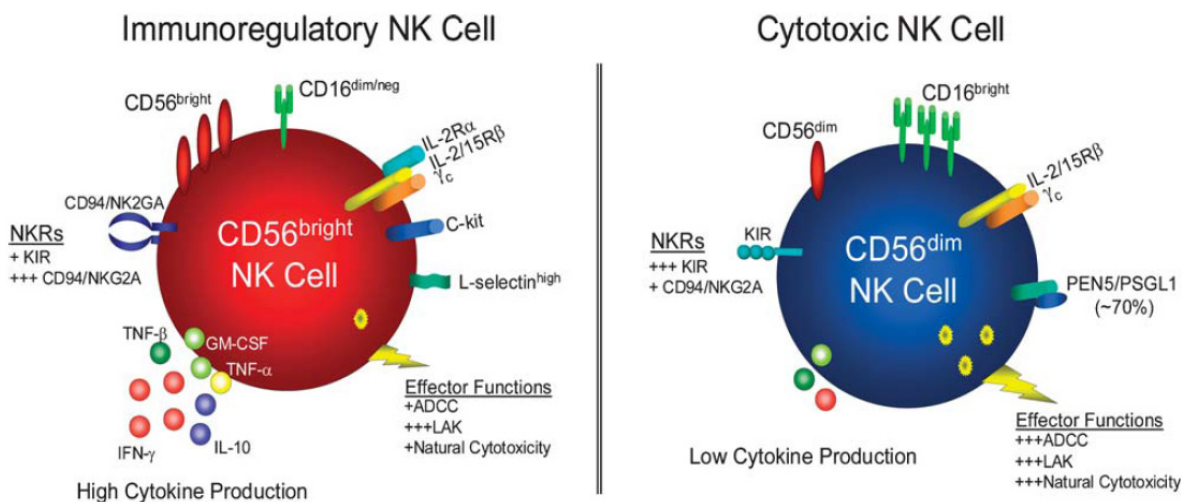
Následná upregulace CD117 vede k dalšímu stádiu vývoje, označovanému jako pre-NK buňky, které jsou definovány svou schopností reagovat na IL-15 a diferencovat na nezralé NK buňky, které představují třetí fázi vývoje. Toto stádium je charakterizováno downregulací CD34 a ztrátou veškeré plasticity, kterou vykazují předchozí vývojové stupně, které jsou schopny kromě NK buněk dát vznik i dalším buněčným typům. Maturované NK buňky, vývojová fáze čtyři, jsou charakterizovány expresí CD94/NKG2 heterodimerů. Podobně jako u myších NK buněk, je pozorována výrazná exprese transkripčního faktoru T-bet.^[26, 29]



Obr. 2. Schématické znázornění vývoje lidských NK buněk. Detaily jsou uvedeny v textu. Přejato z [26].

Přesný vztah mezi maturovanými subtypy $CD56^{\text{bright}}$ a $CD56^{\text{dim}}$ NK buněk však zůstává nejasný, protože ačkoliv některé práce demonstrují, že $CD56^{\text{bright}}$ NK buňky mohou pod vlivem IL-2 získat $CD56^{\text{dim}}$ fenotyp, podle jiných je pod vlivem IL-12 možný proces přesně opačný.^[27] I 25 let poté, co Lanier et. al popsal přechod $CD56^{\text{bright}}$ na $CD56^{\text{dim}}$ buňky jako terminální fázi vývoje NK buněk,^[30] zůstává tedy tento problém stále nedořešen.

Kromě výše zmíněných maturovaných NK buněčných subpopulací (Obr. 3.) byla také nedávno popsána imunoregulační sub populace NK buněk vyznačující se maturovaným aktivovaným fenotypem $CD56^+$ $CD16^+$ $CD161^+$ $CD94^+$ $CD69^+$ $NKG2D^+$ $NKp30^+$ $NKp44^+$ $NKp46^+$ $CCR7^+$ a produkující inhibiční cytokiny IL-10 a IL-21 a T_H2 cytokiny IL-4 a IL-5. Zdá se, že rozhodujícím faktorem pro vývoj tohoto nového subsetu z $CD34^+$ progenitorů je interakce s membránově vázaným IL-15.^[31]



Obr. 3. Schématické znázornění dvou hlavních lidských NK buněčných subpopulací. Přejato z [27].

1.3.2 Aktivace NK buněk

Jak již bylo řečeno výše, obecně bývá pod pojmem aktivace NK buněk chápána aktivace jejich cytotoxických funkcí následující po rozpoznání infikované či nádorově transformované buňky. Jak však již bylo také zmíněno, k plné aktivaci NK buněk včetně proliferace, produkce cytokinů i vlastní cytotoxické aktivity je třeba také vhodného cytokinového prostředí. Pro plnou aktivaci NK buněk je nutná přítomnost prozánětlivých cytokinů (IL-12, IL-15, TNF) a naopak nepřítomnost cytokinů protizánětlivých (IL-10, TGF- β), které blokují proliferaci, aktivaci cytotoxických funkcí i produkci cytokinů.^[32] V případě příhodného cytokinového prostředí bylo obecně popsáno několik scénářů, které vedou k aktivaci NK buněk.

Prvním z nich je takzvaný „missing self“ mechanismus, který byl poprvé navržen ve druhé polovině osmdesátých let.^[33] V tomto modelu jsou NK buňky schopny rozpoznat absenci některých molekul na povrchu cílových buněk. V původním modelu se jedná o MHC molekuly první třídy, které jsou ligandy inhibičních receptorů. Jejich rozpoznání NK buňkou tedy vede k inhibici jejích cytotoxických funkcí. Pokud však na cílové buňce tyto molekuly chybí, nedojde k inhibici NK buňky, a tato cílová buňka je usmrcena.^[34] Později byl objeven ještě alternativní, takzvaný „MHC class I independent missing self“ mechanismus. Jak název napovídá, jedná se o funkčně a mechanisticky identický systém, kde ale ligandy inhibičních receptorů nejsou MHC molekuly první třídy.^[35] Tento mechanismus bude diskutován dále.

NK buněčné „missing self“ rozpoznávání obecně vytváří komplementární mechanismus k funkci cytotoxických T lymfocytů, které rozpoznávají pouze antigeny prezentované na MHC molekulách první třídy. V případě absence těchto molekul na povrchu své cytoplasmatické membrány se tedy taková buňka stává pro cytotoxické lymfocyty „neviditelnou.“^[1] Této strategie je doopravdy využíváno některými viry^[36] i nádory,^[37] které takto unikají před likvidací cytotoxickými T lymfocyty.

Druhým scénářem aktivace NK buněk je takzvané „induced self“ rozpoznávání. V tomto modelu NK buňky pomocí svých aktivačních receptorů rozpoznají charakteristické molekuly, jejichž exprese je výrazně zvýšena na buňkách procházejících genotoxickým i jiným stresem. Takové buňky eliminují díky značné převaze aktivačních signálů nad inhibičními.^[38]

Třetí možností aktivace NK buněk je rozpoznání „non-self“ molekuly na povrchu buňky, například molekuly kódované některými patogeny.^[39] Jako příklad se obvykle uvádí přímé rozpoznání molekul na buňkách napadených myším cytomegalovirem^[40] nebo virem chřipky.^[41] V poslední době se ale objevuje i rostoucí množství důkazů o expresi některých PRR charakteristických například pro makrofágy a dendritické buňky, jako Nod2^[42] nebo TLR různých tříd.^[43] Navíc se zdá, že jsou NK buňky schopny produkce α -defensinů, antimikrobiálních peptidů selektivně narušujících bakteriální buněčnou membránu, a mohou tedy aktivně přispívat i k boji proti extracelulárním patogenům.^[43]

Posledním v současné době známým mechanismem aktivace NK buněk je takzvaná „na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita,“ zkráceně ADCC z anglického „Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity.“ Stejně jako mnohé další buňky imunitního systému jsou NK buňky vybaveny receptorem označovaným jako CD16, který váže Fc část molekuly protilátky. Díky tomu dokáží rozpoznat protilátkami opsonizované cíle a zasáhnout proti nim.^[44]

1.3.3 Licencování NK buněk

Licencování NK buněk bylo navrženo jako koncept, který měl vysvětlit self-toleranci těchto lymfocytů. Podle tohoto modelu se NK buňky dělí do dvou skupin, z nichž jedna exprimuje inhibiční receptory pro vlastní MHC molekuly, a tím pádem rozpoznává vlastní buňky, proti kterým nemá zasahovat, zatímco druhá skupina, která inhibiční receptory neexprimuje, není funkčně kompetentní.^[45]

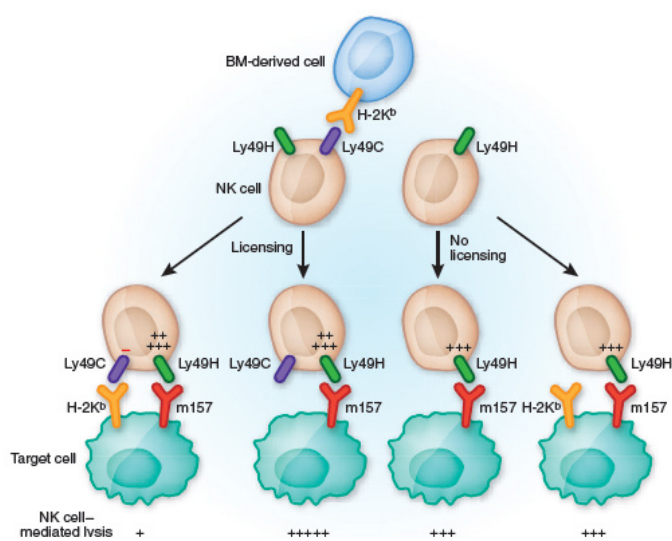
Jak se však ukazuje, tento model není správný, nebo alespoň ne přesný. Nejen, že buňky, které neexprimují inhibiční receptory pro vlastní MHC nejsou funkčně nekompetentní, ukazuje se, že tyto buňky hrají důležitou roli při obraně proti některým virovým infekcím. Při infekci MCMV jsou licencované NK buňky inhibovány svými Ly49 inhibičními receptory rozpoznávajícími MHC molekuly.

Jsou to právě nelicencované NK buňky, které drží virový titr pod kontrolou, jak bylo prokázáno experimenty na myších, které měly depletované licencované nebo nelicencované NK buňky. V případě deplece licencovaných NK buněk nebyla pozorována změna v množství viru. Oproti tomu při depleci nelicencovaných NK buněk virový titr výrazně stoupl.^[46]

Současná verze modelu licencování tedy spíše NK buňky dělí na licencovanou populaci buněk,

kteří mají inhibiční receptory a odpovídají silně cytotoxicky v případě absence ligandů těchto receptorů a nelicencovanou populací, která nemá inhibiční receptory a odpovídá tedy i na buňky, které současně exprimují ligandy aktivačních i inhibičních receptorů. Síla jejich odpovědi je však ve srovnání s licencovanou populací menší (Obr. 4.).^[47]

Jak bylo prokázáno, koncept licencování neplatí pouze pro interakci inhibičních receptorů s MHC molekulami, ale týká se i molekul zapojených do „MHC class I independent missing self recognition“.^[35] Důkaz pro licencování i těmito receptory by přinesen, když bylo pozorováno zvýšení lytických vlastností krysích NK buněk po kokultivaci s dendritickými



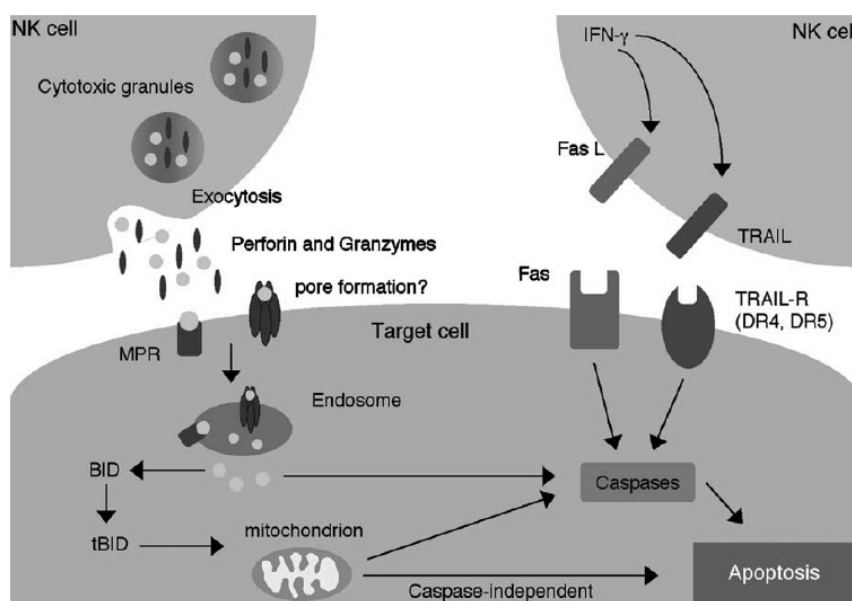
Obr. 4. Licencované NK buňky, ačkoliv teoreticky vykazují silnější cytotoxicitu, nejsou schopny zasáhnout proti virově infikovaným buňkám exprimujícím ligandy inhibičních receptorů. Nelicencované NK buňky oproti tomu dokáží zabít infikované buňky bez ohledu na expresi těchto inhibičních ligandů. Přejato z [47].

buňkami. Toto zvýšení nebylo pozorováno v případě absence inhibičního receptoru NKR-P1B, který má v případě krysy stejnou funkci jako jeho myší homolog.^[48]

1.3.4 Cytotoxické funkce NK buněk

Cytotoxické funkce NK buněk jsou zprostředkovány dvěma hlavními mechanismy - exocytosou granul nebo přímým buněčným kontaktem za použití membránově vázaných členů rodiny TNF. Oba tyto mechanismy vedou ke stejnému výsledku - prostřednictvím různých mechanismů dojde k nastartování procesů apoptozy v cílové buňce (Obr. 5).^[49]

Během vývoje NK buněk jsou tyto mechanismy různě využívány v různých vývojových stádiích. Bylo prokázáno, že nematurované NK buňky charakterizované fenotypem $CD161^+$ $CD56^-$ využívají TRAIL, ale ne FasL ani cytotoxická granula. Oproti tomu maturované $CD56^+$ buňky využívají druhé dvě možnosti.^[50]



Obr. 5. Schématické znázornění cytotoxických funkcí NK buněk.

Přejato z [49].

1.3.4.1 Cytotoxicita zprostředkovaná sekrecí cytotoxických granul

Cytotoxická granula jsou komplexní organely obsahující spektrum mediátorů indukujících smrt cílové buňky v řádu minut, což zajišťuje rychlou likvidaci infikovaných buněk, dříve než se patogen stihne rozmnožit a dále rozšířit.^[49] Morfologicky se tyto sekreční lysosomy skládají z vnější membrány, která obklopuje vesikuly, těsně sbalené proteiny a proteoglykany. Tyto těsně sbalené proteiny tvoří „jádra“ cytotoxických granul a obsahují molekuly zodpovědné za vlastní cytotoxicitu (perforin, granzymy a granulysin). Proteoglykany, většinou serglycinové rodiny, hrají důležité role během sbalování granul, jejich uskladnění a jak se v poslední době začíná ukazovat, i pro vlastní cytotoxickou funkci.^[51] Nejvíce zastoupenými proteiny cytotoxických granul jsou perforin (PEN) a granzym B (GrB),^[52]

ačkoliv dohromady bylo popsáno celkem jedenáct členů rodiny granzymů (A, B, C, D, E, F, G, H, K, M a N). Člověk z těchto jedenácti exprimuje celkem pět – Gr A, B, H, K a M.^[49] Prvním identifikovaným členem rodiny granzymů byl GrA, serinová proteasa trypsinového typu (štěpí za bazickými rezidui) o jejíž přesné funkci v indukci apoptosy je však známo velmi málo.^[51] Předpokládá se, že aktivuje apoptosu na kaspasách nezávislou cestou.^[53]

Jak již bylo řečeno, nejvíce zastoupeným a zároveň i nejlépe prozkoumaným je GrB. Jedná se také o serinovou proteasu, která ale štěpí za kyselinou asparagovou. Substráty této proteasy zahrnují množství prokaspas (2,3,7,8,9,10) a některé antiapoptické proteiny (ICAD, BID).^[51]

Druhým nejabundantnějším proteinem cytotoxických granul je perforin. Tento protein byl popsán v 80. letech jako Ca^{2+} -dependentní cytolytický protein tvořící membránové póry.^[54] Prvotním předpokladem tedy bylo, že indukuje buněčnou smrt podobným způsobem jako proteiny komplementové kaskády, vytvořením pórů v cytoplasmatické membráně, které vedou až k lyse buňky.^[55] Tento předpoklad se však ukázal jako mylný, a proto vznikl model navrhuující, že funkcí perforinu je vytvoření pórů v membráně, jimiž následně mohou difundovat molekuly granzymů, které indukují apoptosu.^[56] V poslední době se však objevují důkazy, že ani tento model není správný. Ukázalo se totiž, že vstup granzymů do buňky je umožněn endocytosou, která není závislá na perforinu.^[57] Poslední studie navíc demonstrují, že granzym se váže na povrch cílové buňky v komplexu s perforinem a glykoproteinem serglycinem, který je následně endocytován jako celek.^[58] Tyto důkazy vedly k hypotéze, že perforin, poté co je endocytován, ve skutečnosti narušuje endosomální trafficking a umožňuje únik granzymů do cytoplasmy, ačkoliv žádné definitivní důkazy ani pro tuto hypotézu zatím nalezeny nebyly.^[49]

Granulysin, třetí z proteinů cytotoxických granul, byl poprvé popsán jako aktivační marker T lymfocytů (TLA519) a krátce nato byla objevena jeho NK buněčná varianta, NKG5, vznikající alternativním sestřihem stejného genového produktu.^[59] Jedná se o kationický protein patřící do rodiny saponinů, proteinů vážících lipidy, u něhož byla prokázána schopnost indukovat apoptosu eukaryotických buněk prostřednictvím zvýšení koncentrace ceramidů. Není jisté, zda tyto ceramidy vznikají působením neutrální sfingomyeliny na plasmatické membráně nebo kyselé lysozomální sfingomyeliny. Vlivem ceramidů však vznikají perturbance mitochondriální membrány vedoucí až k uvolnění cytochromu C, což má za následek aktivaci kaspas.^[60] Granulysin navíc vykazuje i potentní antimikrobiální vlastnosti proti širokému spektru Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií a také hub. Obzvláště silný účinek byl pozorován proti *Mycobacterium tuberculosis*, kde granulysin

usmrtil více než 90% extracelulárních mykobakterií. Není bez zajímavosti, že v kombinaci s perforinem byla pozorována výrazná aktivita i proti intracelulárně lokalizovaným patogenům.^[61]

1.3.4.2 Cytotoxicita zprostředkovaná přímým buněčným kontaktem

Druhou možností NK buněk, jak vyvolat apoptosu cílové buňky, je prostřednictvím receptorů rodiny TNF a jejich ligandů. NK buňky mohou exprimovat dva membránově vázané členy TNF rodiny, TRAIL a CD95L, také známý jako FasL. Receptory těchto proteinů, TRAIL-R a CD-95 (Fas), po interakci shodně iniciují tvorbu signalizačního membránového komplexu známého jako DISC (Death-Inducing Signalling Complex). Důsledkem uspořádání tohoto komplexu je autoproteolytická aktivace iniciátorové kaspasy 8, která následně aktivuje další, efektorové kaspasy, což vede k iniciaci apoptosy.^[62]

U lidí bylo identifikováno pět receptorů pro molekulu TRAIL, z nichž dva, TRAIL-R1 (DR4) a TRAIL-R2 (DR5) přenáší proapoptický signál. Ze zbylých tří receptorů jsou dva membránové (TRAIL-R3, TRAIL-R4), ale postrádají death doménu a poslední (TRAIL-R5) je solubilní, díky čemuž všechny slouží jako „decoy“ receptory a účastní se regulace TRAIlem způsobované apoptosy.^[63] Za zmínku stojí, že zatímco TRAIL je schopen potěně indukovat apoptosu u některých nádorových buněk, byla pozorována pouze malá nebo žádná toxicita vůči normálním buňkám. Důvody této diskrepance jsou v současné době předmětem intenzivního výzkumu, stejně jako způsoby, jimiž si některé nádory zajišťují rezistenci.^[64]

V případě FasL byly identifikovány 2 receptory, aktivní Fas^[65] a „decoy“ receptor DcR3.^[66] Narozdíl od signalizace přes TRAIL receptory však při signalizaci přes Fas nestačí k aktivaci DISCu pouze kontakt na membráně, ale zdá se, že je nutná internalizace celého komplexu prostřednictvím klathrinem zprostředkované endocytosy.^[63] Samotný FasL je charakteristickou molekulou pro sekreční lysozomy, do nichž je cílen prostřednictvím cytoplasmatické proline-rich domény. V případě aktivace NK buňky proběhne fúze sekrečních lysozomů s plasmatickou membránou a dojde tak zároveň k uvolnění jejich obsahu (jak bylo popsáno v části 1.3.4.1) a okamžité translokaci FasL na plasmatickou membránu.^[67] Tato první vlna exprese je následována úbytkem FasL, pravděpodobně v důsledku štěpení metalloproteasami, a následována druhou vlnou exprese *de-novo* nasyntetizovaného FasL.^[68] FasL může také být vypuštěn ze sekrečních lysozomů vázaný v membráně 100 – 200nm velkých mikrosomů. Zdá se ale, že tento mechanismus je využíván především během regulace imunitní odpovědi prostřednictvím tzv. aktivací indukované buněčné smrti

(AICD)^[69] a při ustavení imunologicky privilegovaných oblastí^[70]. Byly popsány i nádory využívající této strategie pro obranu proti tumor infiltrujícím lymfocytům (TIL).^[71]

1.3.5 Regulační funkce NK buněk

Za nejvýznamnější imunoregulační vlastnost NK buněk bývá obvykle považována výrazná produkce IFN- γ , která má zásadní význam především v raných fázích obrany proti patogenům, předtím než se naplno rozběhne odpověď adaptivní imunitní složky.^[72] Kromě produkce IFN- γ jsou však NK buňky schopny produkce celé řady dalších cytokinů a chemokinů. Navíc NK buňky regulují imunitní odpověď přímou interakcí s dalšími buňkami imunitního systému.^[73]

1.3.5.1 Regulační funkce zprostředkované produkcí solubilních molekul

Jak již bylo řečeno, z imunoregulačního hlediska je u NK buněk důležitá především CD56^{bright} subpopulace, která je hlavním producentem NK cytokinů. Bylo prokázáno, že produkce cytokinů CD56^{dim} subpopulací je podstatně nižší.^[74]

Výsadní postavení mezi regulačními funkcemi NK buněk má produkce IFN- γ . V první fázi imunitní odpovědi, po rozeznání patogenu makrofágy, začnou tyto buňky produkovat IL-12, který v NK buňkách indukuje produkci právě IFN- γ . Oba tyto cytokiny poté v synergii směřují vývoj CD4⁺ T lymfocytů k T_H1 osudu, což vede k další produkci IFN- γ . Funkce tohoto cytokinu, který je jediným zástupcem interferonů II typu, jsou velmi pleiotropní. Ovlivňuje prezentaci antigenů tím, že zvyšuje expresi jednotlivých členů dráhy zodpovědné za „loading“ prázdných MHC molekul^[72] a v molekule proteasomu indukuje nahrazení β 1, β 2 a β 5 podjednotek β 1i, β 2i a β 5i podjednotkami, čímž vznikne imunoproteasom, který zvyšuje zastoupení peptidů s bazickými nebo hydrofobními C konci, které jsou obecně lepšími substráty pro MHC molekuly.^[75] Kromě toho navozuje IFN- γ v buňkách stav, který bývá označován jako antivirový – dochází k indukci exprese enzymů, které zavadí mutace do virové dsRNA,^[76] zastavení proteosyntesy^[77] a buněčného cyklu.^[78] Dále IFN- γ zvyšuje citlivost buněk k indukci apoptosy mimo jiné upregulací Fas^[79] nebo TNF- α receptoru.^[80] A v neposlední řadě IFN- γ ovlivňuje velké množství buněk imunitního systému – mimo jiné indukuje expresi iNOS v makrofázích^[81], sekreci komplementových proteinů^[82] a chemoatraktantů pro různé subsety imunocytů.^[83]

Dalšími důležitými cytokiny, které NK buňky produkují jsou členové TNF rodiny. Ačkoliv byla zprvu NK buňkám připisována pouze exprese TNF- α ,^[84] pozdější studie

prokázala i expresi TNF- β (také označovaného jako LT- α) a TNF-C (označovaného jako LT- β).^[85] Zatímco TNF-C je jedním z klíčových regulátorů při vývoji imunitního systému^[86], výčet funkcí TNF- α a β je o poznání delší, a kromě vývoje zahrnuje i regulaci imunitního systému a apoptické i nekrotické působení. Biologické aktivity obou těchto proteinů jsou velmi podobné, ačkoliv TNF- β často vykazuje slabší účinky.^[87] Samotný TNF (směs TNF- α a β) byl popsán jako „endotoxinem indukovaný faktor způsobující nekrosu některých nádorů,“ odtud také název Tumor Necrosis Factor.^[88] Teprve později začaly být postupně objevovány další funkce těchto pleiotropních cytokinů zahrnující mimo jiné silně pro-zánětlivé působení^[89], protivirovou aktivitu^[90], aktivaci neutrofilních granulocytů^[91], T lymfocytů^[92] i monocytů^[93], remodelaci cév^[94] i kostí^[95] nebo stimulaci exprese MHC molekul I i II třídy.^[96] Původní předpoklady, že by TNF mohl být využit při terapii lidských nádorů se nepotvrdily,^[97] naopak byly rozpoznány mnohé negativní účinky zahrnující například septický šok^[89] nebo roli TNF při mnohých autoimunitních onemocněních.^[97]

V závislosti na okolním prostředí, subtypu a stádiu vývoje jsou však NK buňky schopny exprese i proti-zánětlivých cytokinů jako TGF- β ^[98] nebo IL-10^[99], T_{H2} cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13^[31, 100] (jak již bylo zmíněno v sekci 1.3.1.) i hematopoetických faktorů jako GM-CSF.^[101]

Kromě výše zmíněných cytokinů NK buňky produkují i prozánětlivé chemokiny, především CCL3, CCL4, CCL5 a XCL1. První tři jmenované mají společný receptor, CCR5, exprimovaný makrofágy, dendritickými buňkami, NK buňkami a aktivovanými T lymfocyty, které jsou jím všechny atrahovány směrem k místu infekce. Poslední zmíněný je charakteristickým atraktorem pro T lymfocyty.^[102]

1.3.5.2 Interakce NK buněk s dalšími buňkami imunitního systému

Kromě produkce cytokinů jsou NK buňky schopny ovlivňovat imunitní systém i přímou interakcí s dalšími buňkami (dendritickými buňkami, monocyty či makrofágy a B a T lymfocyty), a to především expresí kostimulačních molekul a selektivní cytotoxicitou.^[73]

V případě dendritických buněk může být tento „cross-talk“ pro- i proti-zánětlivý. První, zřejmou funkcí NK buněk je již diskutovaná produkce TNF a IFN- γ vedoucí k aktivaci dendritických buněk a směřování imunitní odpovědi ve směru T_{H1}.^[103] Kromě produkce těchto solubilních mediátorů se však uplatňuje i přímý mezibuněčný kontakt, který je dostačující pro aktivaci DC i při absenci obou cytokinů. Tento efekt je obzvláště patrný v případě, kdy jsou dendritické buňky stimulovány podprahovým množstvím aktivačního stimulu, například LPS.^[104] Druhým mechanismem, kterým NK buňky podporují protektivní

imunitní odpověď je takzvaný „imunoediting.“ NK buňky vykazují zvýšenou cytolytickou aktivitu vůči naivním dendritickým buňkám, zatímco maturované DC jsou vůči NK buňkám rezistentní. Tento mechanismus byl označen jako způsob výběru nejvhodnějších DC, zatímco buňky exprimující nedostatečná množství HLA-E molekul nutných pro antigenní prezentaci jsou eliminovány.^[105] Druhou navrženou alternativou je limitace patologických imunitních odpovědí.^[106] A konečně již dříve zmíněný regulační subset NK buněk^[31] je schopen ovlivnit DC a indukovat u nich tolerogenní fenotyp.^[73]

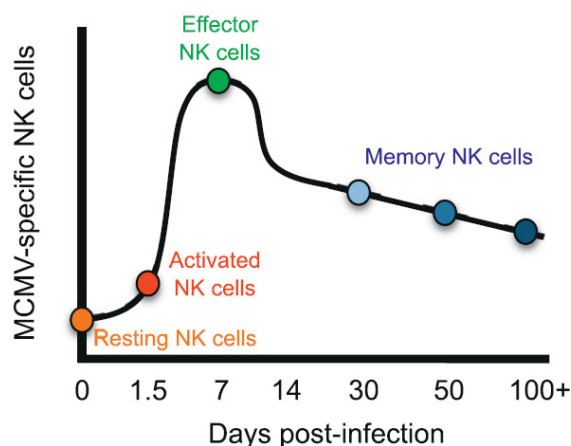
V případě monocytů jsou NK buňky schopny indukovat jejich maturaci prostřednictvím dvojice cytokinů IFN- γ a TNF. Kromě toho jsou však NK buňky exprimující GM-CSF spolu s CD40L schopny indukovat i jejich diferenciaci na dendritické buňky.^[107] CD40L umožňuje navíc i kontaktní aktivaci B lymfocytů.^[108]

I makrofágy jsou ovlivněny IFN- γ a TNF, které opět vedou k aktivaci těchto buněk a expresi iNOS umožňující efektivnější zabíjení fagocytovaných patogenů.^[81] NK buňky fungují i jako regulační mechanismus pro hyperaktivované makrofágy. Makrofágy silně aktivované prostřednictvím svých TLR se stávají citlivými vůči lyse NK buňkami, pravděpodobně jako mechanismus chránící organismus před septickým šokem a hyperaktivací imunitního systému.^[109]

Schéma interakcí mezi NK buňkami a T lymfocyty je o poznání složitější. Nejen že NK buňky aktivované IL-2 exprimují CD86, pokud dojde navíc k aktivaci pomocí aktivačních receptorů začnou exprimovat i OX40L, což jsou kostimulační molekuly indukující proliferaci CD4⁺ T lymfocytů.^[110] Podle některých prací jsou kromě kostimulačních molekul NK buňky navíc schopny i exprese MHC molekul II třídy, CD-16 mediované internalizace imunokomplexů a následné přímé prezentace antigenů CD4⁺ T lymfocytům.^[111] Kromě tohoto aktivačního působení však NK buňky slouží i k negativní regulaci T lymfocytů. Komplikovanost celé situace dokresluje, že jsou NK buňky schopny nejen selektivně rozpoznat a eliminovat aktivované T lymfocyty,^[112] překvapivě ale dokáží přímým buněčným kontaktem i reversibilně indukovat expresi p21 proteinu. p21 blokuje buněčný cyklus a brání tak proliferaci T lymfocytů, přitom ale nedochází k anergii a takto „inhibovaný“ lymfocyt si zachovává svůj aktivovaný fenotyp i potenciál k obnovení proliferační aktivity.^[113] Navíc se NK buňky účastní i vzniku T-buněčné imunitní paměti. Jak bylo prokázáno, exprese Qa-1 molekuly patřící do rodiny neklasických MHC Ib je nezbytná pro vývoj imunitní paměti u CD4⁺ T lymfocytů. Zároveň tato molekula slouží i jako ligand pro inhibiční NK buněčný receptor NKG2A, a chrání tedy T lymfocyty, které mají potenciál stát se paměťovými buňkami před NK buněčnou lysí.^[114]

1.3.6 NK buněčná „paměť“

Imunitní paměť bývá tradičně připisována pouze buňkám adaptivního imunitního systému, T a B lymfocytům, a bývá považována za jeden z určujících rozdílů mezi adaptivní a vrozenou imunitou.^[1] Přesto bylo v poslední době popsáno několik jevů, které vykazují charakteristiky imunitní paměti u evolučně starších organismů, které mají pouze vrozenou imunitu bez jakýchkoliv lymfocytů.^[115, 116] Ve světle těchto faktů asi není zcela zarážející, že i v případě NK buněk, které navíc patří mezi lymfocyty, i když ne adaptivní, a s B a T lymfocyty sdílí společné prekurzory, byl pozorován jev, který se dá označit pouze jako imunitní paměť. Tento efekt, který je v současné době objektem intenzivního výzkumu, byl zatím detailně popsán pouze u myších NK buněk, dá se ale předpokládat, že podobná situace bude i u NK buněk lidských.^[117] U RAG⁻ myši bylo ukázáno, že NK buňky mediuji kontaktní hypersenzitivitu na chemické hapteny. Hypersenzitivní reakce přetrvala více než 4 týdny a byla zaměřena výhradně proti haptenu, kterým bylo zvíře imunizováno.^[118] Obdobně bylo



Obr. 6. Kinetika vývoje populace NK buněk během a po infekci. Přejato z [117].

prokázáno, že populace Ly49H⁺ NK buněk specificky rozpoznávajících MCMV infikované buňky prochází během infekce klonální expanzí. Po odeznění infekce byl pozorován „pool“ dlouhověkých NK buněk schopných opětovné expanze a aktivace silnější než u „naivních“ NK buněk.^[119] Pomocí analýzy mRNA exprese byly nalezeny rozdíly v expresních profilech mezi neaktivovanými a „paměťovými“ NK buňkami. Navíc tato populace byla pozorovatelná po dobu až 6 měsíců po infekci. Celková kinetika vývoje byla analogická s T i B lymfocyty (Obr. 6.).^[117]

1.3.7 Manipulace a využití NK buněk pro imunoterapie

O imunoterapii se zpravidla hovoří v kontextu léčby nádorových onemocnění. Podle teorie imunologického dohledu (immune surveillance), kterou navrhl již počátkem 70. let minulého století Burnet, imunitní systém kontinuálně eliminuje spontánně vznikající mutované buňky s potenciálem způsobit vznik nádoru.^[120] Přestože klinické studie zpočátku

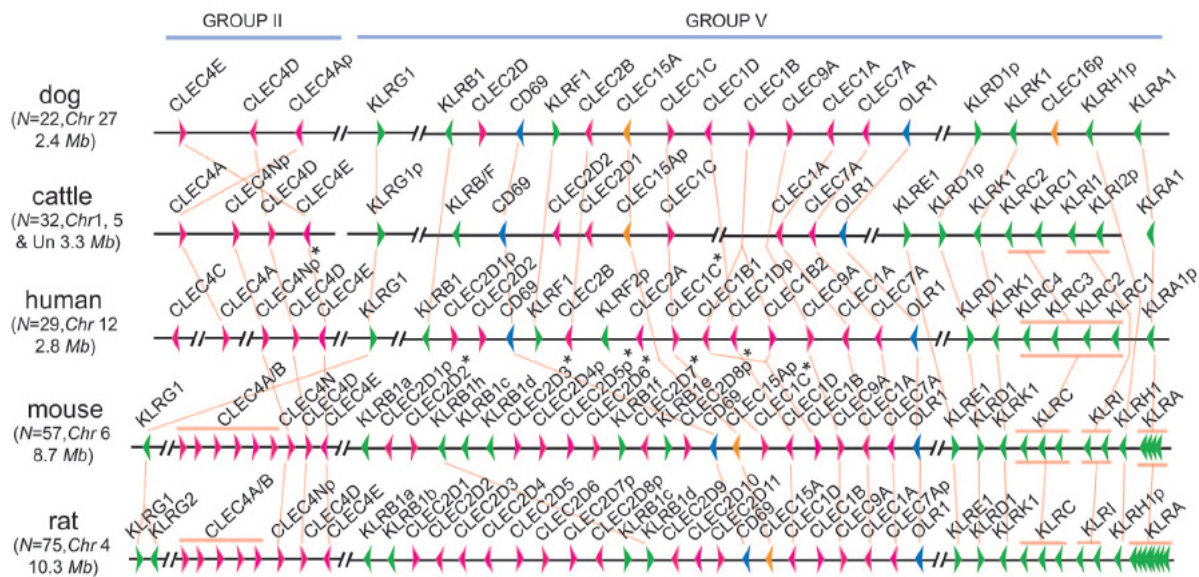
poskytly pouze částečnou podporu tomuto konceptu, bylo prokázáno, že lidé trpící některými typy imunodeficitů jsou citlivější k určitým druhům malignit,^[121, 122] stejně jako silně imunosuprimovaní lidé po transplantaci.^[122] Navíc v nedávné době byla prokázána korelace mezi cytotoxickou aktivitou lymfocytů z periferní krve a incidencí nádorových onemocnění u zdravých jedinců.^[123] Nositeli cytotoxických vlastností v organismu jsou CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty (CTL) a NK buňky. Po dlouhou dobu byly středem zájmu CTL až do zjištění, že NK buňky jsou schopny zabránit relapsu leukémie a ochránit před „Graft versus host disease“ (GVHD) pacienty po transplantaci kostní dřeně.^[124] Poslední dobou se tak začínají objevovat práce popisující možnosti imunoterapie za využití NK buněk i proti typům nádorů, proti nimž reaktivita NK buněk dříve nebyla popsána.^[125] Další možností zesílení aktivity NK buněk je jejich modifikace metodami genetického inženýrství za účelem zesílení reaktivity vůči konkrétním nádorům.^[126] Z terapeutického hlediska není bez zajímavosti, že kromě přímého zabití transformovaných buněk vede aktivita NK buněk i k indukci T buněčné imunitní paměti, pravděpodobně prostřednictvím prezentace antigenů ze zabitých buněk některou z antigen prezentujících buněk přímo T lymfocytům. Imunitní paměť obecně je důležitá pro prevenci infekce stejným patogenem, a v tomto konkrétním případě by mohla napomoci i k prevenci relapsu nádorového onemocnění.^[127]

Další možností využití NK buněk pro imunoterapie jsou transplantace a autoimunitní choroby. V obou těchto případech však role NK buněk zůstává poněkud kontroverzní.^[128, 129]

1.4 NK receptory

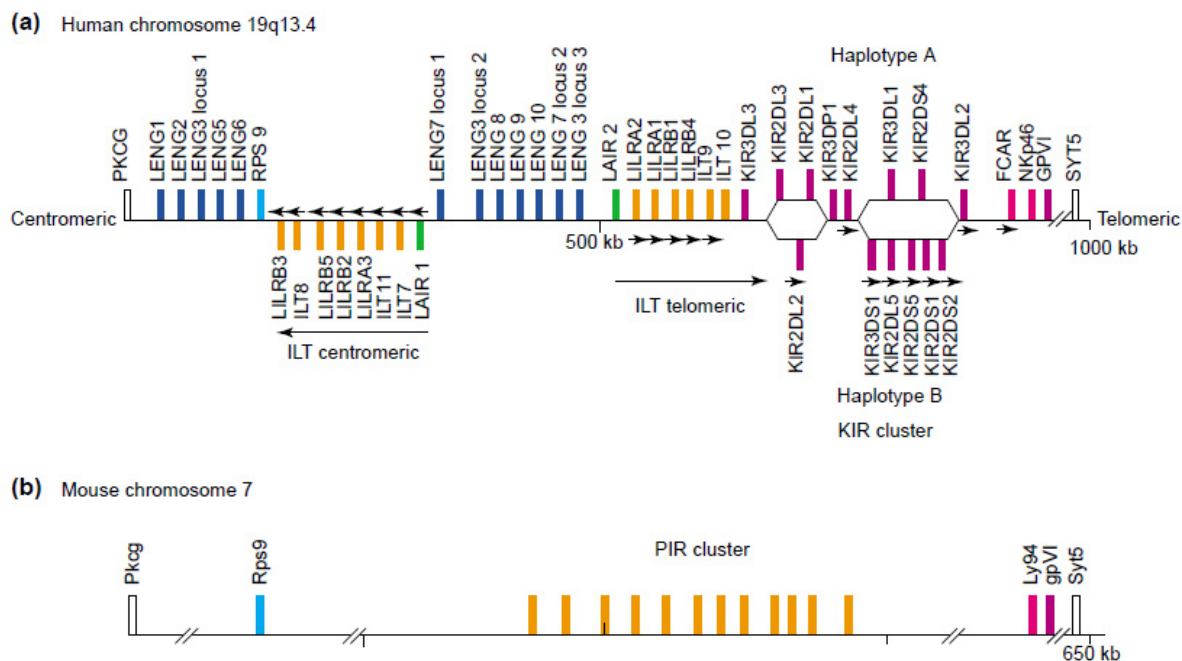
Obecně existují dva způsoby dělení NK receptorů do dvou skupin. První dělení je na základě struktury a rozlišuje NK receptory na C-lektinové a imunoglobulinové; druhé dělení je na základě funkčních vlastností a dělí receptory na aktivační a inhibiční.^[130]

Lektinové NK receptory jsou v genomu kódovány v oblasti, které se říká NK genový komplex (NKC). Tato oblast byla poprvé popsána u myši.^[131] Postupně byly tyto a jim podobné genové komplexy popsány u živočichů od ryb až po člověka.^[132] Komparativní analýzy NKC prokázaly vysokou konzervovanost v rámci orientace, pořadí, pozice i sekvenční homologie jednotlivých genů (Obr. 7.).^[133]



Obr. 7. Srovnání NKC různých živočišných druhů. Geny skupiny V jsou z velké části exprimovány v imunitním systému, zatímco geny skupiny II mají zpravidla jiné funkce. Přejato z [133].

Imunoglobulinové NK receptory byly popsány především u primátů a člověka, a i jejich geny jsou shromážděny v diskretní oblasti genomu, označované jako LRC (Leukocyte Receptor Complex), u lidí umístěné na chromosomu 19 (19q13.4) (Obr. 8).^[134, 135]



Obr. 8. Srovnání LRC člověka a myši. Z genů kódovaných lidským LRC v imunitním systému mají funkci pouze členové rodin KIR a LILR. Přejato z [135].

O obou výše zmíněných skupinách receptorů bude detailněji pojednáno dále v odstavcích 1.4.2 a 1.4.3.

1.4.1 Signalizace NK receptory

V rámci inhibičních i aktivačních receptorů jsou signalizační dráhy dobře konzervované bez ohledu na strukturní skupinu receptorů, a to i napříč druhy.

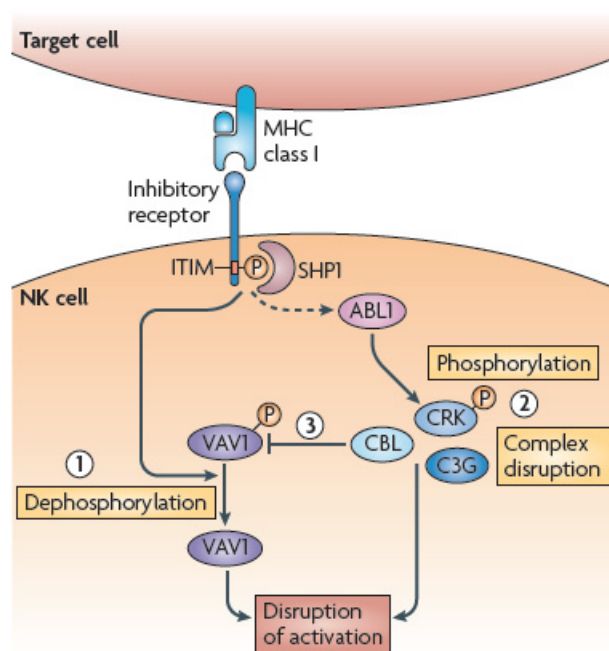
1.4.1.1 Signalizace inhibičními NK receptory

Obecně většina inhibičních receptorů fungujících v imunitním systému ve své cytoplasmatické doméně obsahují takzvaný ITIM. Tento motiv je charakteristický sekvencí (I/L/V/S)_xYxx(L/V), kde x značí kteroukoliv aminokyselinu a lomítka oddělují alternativní aminokyseliny, které mohou být na daném místě. Rozpoznání ligandu těmito receptory vede k jejich agregaci na membráně a fosforylaci tyrosinu v ITIMu některou z kinas rodiny Src. Tato fosforylace vytvoří místo pro navázání jedné z fosfatas obsahujících SH2 doménu. Rozlišujeme dva druhy takovýchto fosfatas – tyrosinové fosfatasy SHP-1 a SHP-2 a inositolovou fosfatasu SHIP. Funkce SHP-1 a SHIP jsou dobře popsány, zatímco role SHP-2 zůstává nejasná.^[136]

SHIP defosforyluje fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PI-3,4,5-P₃) na fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PI-4,5-P₂), což brání membránové lokalizaci kinas rodiny Tec a následné jimi indukované aktivaci signálních kaskád.
[137, 138]

Ačkoli aktivita SHP-1 fosfatasy může být teoreticky zaměřena vůči velkému množství substrátů, v důsledku prostorových restrikcí daných její aktivitou pouze během vazby na ITIM, defosforylace velkého množství různých substrátů není pravděpodobná (Obr. 9).^[139, 140] Přesto není vyloučena existence dalších substrátů, obzvláště s ohledem na regulační aktivitu SHP-1 vůči stimulaci velkým množstvím aktivačních receptorů, jejichž signalizační kaskády se mnohdy liší.^[141]

Narozdíl od například T lymfocytů vede dohromady aktivita všech těchto fosfatas k inhibici NK buněk, která je však pouze



Obr. 9. Schéma signalizace indukované inhibičními receptory. Přejato z [140].

transientní, místně lokalizovaná a nijak neinterferuje se schopností dané buňky být aktivována během další interakce.^[141]

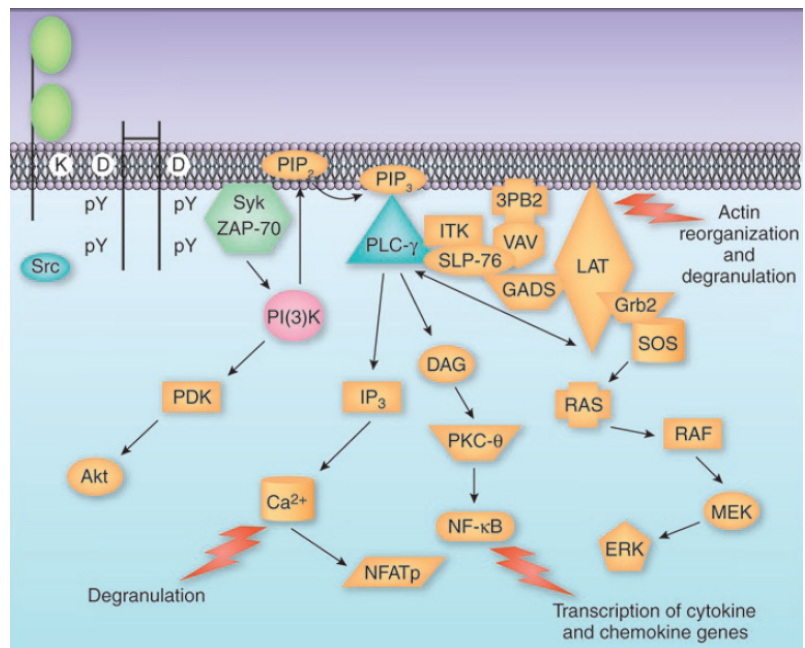
1.4.1.2 Signalizace aktivačními NK receptory

Aktivace NK buněk prostřednictvím aktivačních receptorů není tak přímočará, jako v případě B a T lymfocytů, které mají pouze jeden aktivační receptor a několik kostimulačních. NK buňky disponují širokým spektrem receptorů, jejichž rozdělení do kategorií „aktivační“ a „kostimulační“ je prakticky nemožné. Vzhledem k tomu, že kromě CD16 není samostatně žádný z NK receptorů schopen iniciovat cytolytickou aktivitu ani produkci cytokinů, byl pro ně navržen termín obecný termín „koaktivační“ receptory.^[142]

Ačkoliv lidské i myší NK buňky exprimují velké množství různých aktivačních či koaktivačních receptorů, všechny využívají jednu ze tří následujících signalizačních kaskád.

První, nejrozšířenější, skupina využívá signalizace prostřednictvím ITAMu analogického k dříve diskutovanému ITIMu. Narozdíl od ITIMu, který je přímo součástí cytoplasmatických domén inhibičních receptorů, však cytoplasmatické domény aktivačních receptorů ITAM neobsahují. Tento motiv je součástí molekul adaptorových proteinů, které s aktivačními receptory asociují prostřednictvím nabitých aminokyselin v transmembránové doméně. Receptory jsou vybaveny kladně nabitou aminokyselinou (Lys nebo Arg), zatímco adaptory mají negativně nabitou kyselinu asparagovou.^[141] NK buňky jsou v rámci imunitního systému

jedinečné tím, že exprimují tři takovéto adaptory – FcεRI-γ^[143], CD3-ζ^[144] a DAP12^[145] (také zvaný KARAP), které fungují v podobě disulfidicky vázaných homodimerů (DAP12) nebo heterodimerů (FcεRI-γ, CD3-ζ). Strukturně se jedná o transmembránové proteiny I. typu, jejichž extracelulární domény obsahují pouze dimerizační cystein a intracelulární domény nesou po jednom (FcεRI-γ, DAP12) nebo třech (CD3-ζ) signalizačních motivech. Samotný signalizační motiv je charakteristický sekvencí

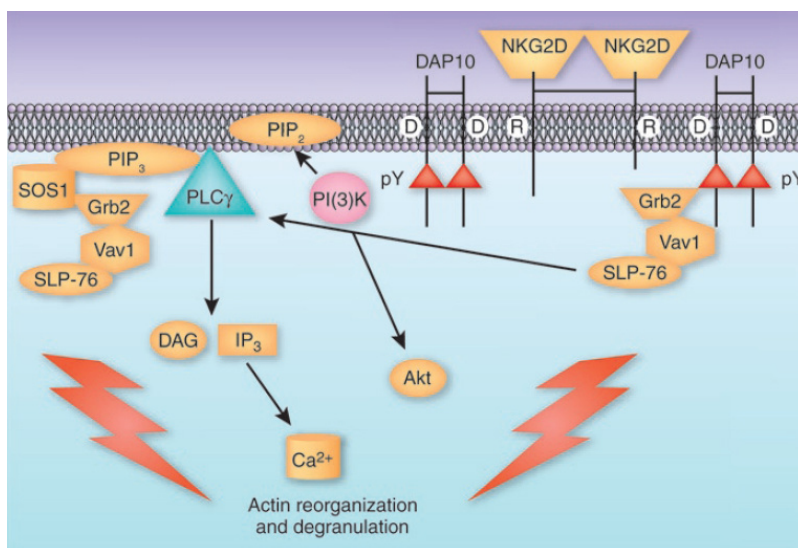


Obr. 10. Schéma kaskády indukované signalizací ITAM motivy. Přejato z [141].

(D/E)_{xx}Y_{xx}(L/I)_{x₆₋₈}Y_{xx}(L/I), kde x značí kteroukoliv aminokyselinu a lomítka oddělují alternativní aminokyseliny, které mohou být na dané pozici. Rozpoznání ligandu receptory vede k fosforylaci tyrosinu tohoto motivu pravděpodobně kinasami rodiny Src, což vede k vazbě Syk a ZAP70 kinas prostřednictvím jejich SH2 domén. Tyto kinasy následně fosforylují další „downstream“ cíle, což ve finále vede k remodelaci aktinového cytoskeletu, degranulaci a transkripci genů kódujících cytokiny i chemokiny (obr. 10).^[130, 141]

Druhá aktivační signalizační kaskáda využívá DAP10 adaptorový protein a je iniciována především NKG2D receptorem.^[146] Objevily se však i práce popisující interakci DAP10 i s jinými receptory^[147]. Stejně jako DAP12, i DAP10 má pouze minimální extracelulární doménu s dimerizačním cysteinem, heterodimery DAP10 – DAP12 však pozorovány nebyly. Krátká cytoplasmatická doména DAP10 obsahuje signalizační motiv YINM. Po fosforylaci tyrosinu tohoto motivu, pravděpodobně některou z kinas rodiny Src,^[148] je DAP10 schopen

vazby p85 podjednotky fosfatidylinositol-3-OH kinasy (PI3K) nebo adaptoru Grb2, které následně vedou k aktivaci dalších „downstream“ molekul (Obr. 11.).^[149] Obě tyto molekuly však využívají překrývající se části motivu a každá molekula DAP10 je tedy vždy schopna vazby pouze jednoho z těchto proteinů. Jak



Obr.11. Schéma kaskády indukované signalizací DAP10 adaptorovým proteinem. Přejato z [141].

bylo demonstrováno mutačními studii, pro vazbu PI3K je nezbytná část YxxM, zatímco Grb2 využívá YxNx motiv.^[150] Narozdíl od DAP12 adaptoru byla původně DAP10 přisuzována funkce pouze při aktivaci cytotoxicity NK buněk,^[151] pozdější studie však demonstrovaly, že i signalizace přes DAP10 je schopna iniciovat produkci cytokinů.^[152]

Třetí typ signalizace využívá takzvaného ITSM definovaného sekvencí TxYxxV/I. Tento motiv je po fosforylaci schopen vazby aktivačních i inhibičních mediátorů.^[153] Celkem byly popsány tři SH2 domény obsahující adaptory vážící se na tento motiv - SAP, EAT-2 a ERT. Obvykle se uvádí, že SAP přenáší aktivační signály, zatímco EAT-2 a ERT signály inhibiční.^[154] Podle novějších studií se však zdá, že situace může být o poznání složitější.^[155]

1.4.2 C-lektinové receptory

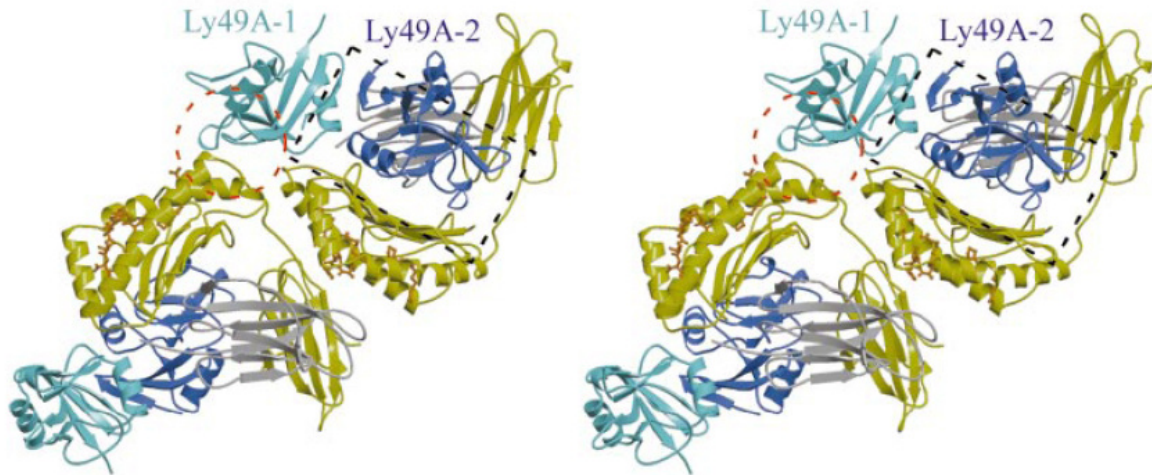
Zástupci C-lektinových rodin Ly49 a NKR-P1 byly jedny z prvních molekul, u nichž byla popsána selektivní a konstitutivní exprese na myších NK buňkách. Pozdější studie identifikovaly příbuzné molekuly u člověka i dalších živočichů. Jak již bylo zmíněno výše, geny kódující tyto receptory jsou shromážděny na jednom místě genomu zvaném NKC. C-lektinové receptory se dělí do rodin, které jsou v rámci NKC kódovány diskretními klastry genů. V rámci rodiny sdílí její zástupci zpravidla >80% aminokyselinovou identitu a s výjimkou propletených klastrů NKR-P1 a Clr jsou jednoznačně vymezeny vůči ostatním rodinám. Mezi různými rodinami je příbuznost na sekvenční úrovni jen velmi vzdálená (<25% identita), ačkoliv všechny receptory sdílí základní strukturní charakteristiku – jedná se o transmembránové proteiny II. třídy. Na membráně se vyskytují ve formě homo či heterodimerů a obsahují C-lektinovou doménu s charakteristickým zapojením disulfidových můstků.^[156]

1.4.2.1 Ly49 rodina

Ly49 rodina je nejlépe prozkoumaná rodina myších C-lektinových receptorů, do níž u myši patří minimálně 16 členů (funkčních i pseudogenů), které byly nalezeny genovým mapováním myšího kmene C57BL/6.^[157] Vyznačuje se však velkým polymorfismem i mezi různými myšími kmeny a ani mezidruhově nejsou Ly49 konzervované. Ačkoliv v případě krysy bylo objeveno velké množství Ly49 receptorů, evolučně vzdálenější člověk má již pouze jediného zástupce označovaného jako Ly49L, který je navíc v důsledku bodové mutace nefunkční.^[158] Celá rodina Ly49 se vyvinula genovou duplikací a genovou konverzí. Genové uspořádání extracelulárních, transmembránových a intracelulárních domén do různých exonů představuje ideální organizaci umožňující snadný rearrangement a diversifikaci.^[159]

Strukturně se jedná o transmembránové proteiny II typu, které se na membráně vyskytují v podobě disulfidicky vázaných homodimerů. V případě myši představuje většina členů Ly49 rodiny inhibiční receptory obsahující ve svých cytoplasmatických doménách klasický ITIM.^[130] Existují i aktivační isoformy, které pomocí argininu v transmembránové doméně asociují s DAP12 adaptorovým proteinem.^[160] Inhibiční Ly49 receptory specificky rozpoznávají H-2K a H-2D subtypy MHC molekul I třídy, jak bylo demonstrováno mnohými biochemickými a imunologickými testy i vyřešením krystalové struktury interagujícího komplexu Ly49A s H-2D^d molekulou (Obr.12).^[161] Zatímco funkční význam těchto inhibičních receptorů je zřejmý, v případě aktivačních receptorů Ly49D,^[162] Ly49P^[163] a Ly49W^[164] které

taktéž rozpoznávají H-2 molekuly je situace o poznání méně jasná. Zajímavým členem Ly49 rodiny je aktivační Ly49H, který zcela ztratil schopnost vázat H-2 molekuly a rozpoznává m157 glykoprotein, který je exprimován na buňkách infikovaných MCMV.^[40]



Obr. 12. Stereografická reprezentace interagujícího komplexu Ly49 – H-2D^d se znázorněním dvou rozdílných interakčních zón. Žlutě je znázorněn H-2D^d, šedě β2 mikroglobulin a modře Ly49A. Přejato z [161].

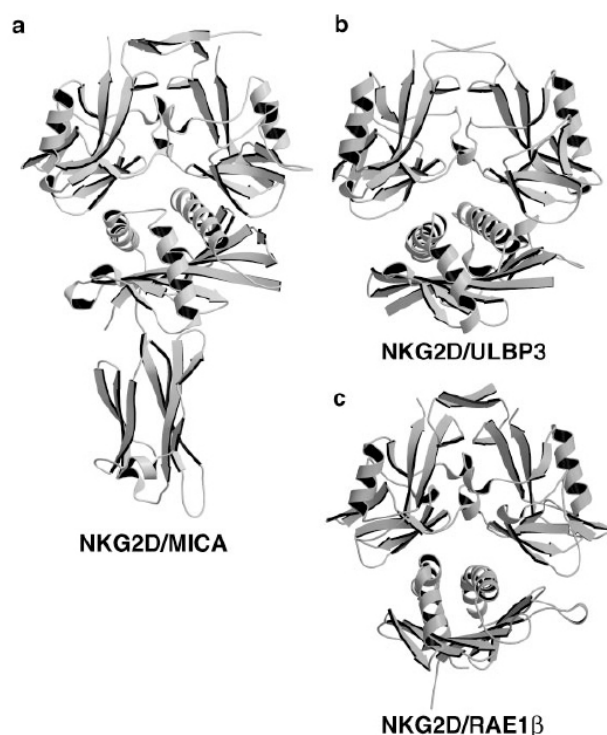
1.4.2.2 NKG2/CD94 rodina

NKG2 rodina receptorů byla popsána u člověka i myši a obsahuje celkem sedm členů. Všechny tyto receptory jsou transmembránové proteiny II třídy, z nichž pět (NKG2A, B, C, E, H) se objevuje na membráně výhradně ve formě heterodimerů s molekulou CD94. Šestý člen této rodiny, NKG2D, tvoří homodimery, s CD94 neinteraguje a bývá často ze skupiny NKG2 receptorů vyčleňován. Proto i zde bude diskutován samostatně. V případě NKG2F je situace ještě komplikovanější a není ani známo, zda se jedná o funkční receptor.^[130]

V lidském genomu je kódováno všech sedm těchto receptorů,^[165-167] u myši byly popsány pouze NKG2A – E.^[168, 169] Narozdíl od Ly49 receptorů vykazují molekuly NKG2 i CD94 pouze minimální polymorfismus a nebyl popsán žádný funkční rozdíl mezi alelickými formami.^[170] Společným znakem všech NKG2 receptorů (s výjimkou NKG2D) je vazba neklasických MHC molekul, HLA-E v případě člověka^[171] a Qa1^b u myši.^[168]

Fyziologický význam toho, že inhibiční receptory NKG2A a B^[172] i aktivační NKG2C, E a H^[167, 168] váží stejné ligandy nebyl doposud jednoznačně vysvětlen. Objevily se však práce naznačující, že se může jednat o mechanismus sloužící k rozpoznání stresovaných buněk na základě odlišné afinity aktivačních a inhibičních forem pro MHC v závislosti na navázaném peptidu.^[173, 174]

Poslední člen NKG2 rodiny, NKG2D, tvoří na membráně disulfidicky vázané homodimery a jeho ligandem jsou homology MHC I molekul, MICA, MICB a ULBP 1-4 u člověka a H60, MULT-1 a RAE-1 α - ϵ u myši (Obr. 13.).^[130] Všechny tyto proteiny patří do kategorie „induced-self“ ligandů diskutovaných v kapitole 1.3.2 a NKG2D je tedy aktivačním receptorem.^[175] U myši existují dvě formy NKG2D vzniklé alternativním sestřihem a liší se přítomností N terminální extenze o délce 13 aminokyselin. Delší forma NKG2D bývá označována jako NKG2D-L a kratší jako NKG2D-S. NKG2D-S váže adaptorové proteiny DAP10 i DAP12. Přítomnost N-terminální extenze se v případě NKG2D-L projevuje neschopností vázat adaptorový protein DAP12, pravděpodobně v důsledku sterického bránění, zatímco vazba DAP10 není ovlivněna. U člověka se vyskytuje pouze NKG2D-L varianta, která, konsistentně s myším modelem, interaguje výhradně s DAP10.^[149, 151] Důležitost NKG2D byla demonstrována především pro ochranu před nádorovou transformací a metastází. Absence NKG2D výrazně zvyšuje náchylnost experimentálních zvířat k indukci nádorů.^[176]



Obr. 13. Struktury interagujících komplexů NKG2D s některými ligandy. Přejato z [176].

1.4.2.3 NKR-P1 rodina

NKR-P1, také označovaný jako CD161, byl prvním známým myším NK buněčným receptorem, byl označen jako NK-1 antigen a byl využíván pro identifikaci a purifikaci NK buněk.^[177] Po vzniku monoklonální protilátky PK136 rozpoznávající specificky NK1.1 alloantigen bylo prokázáno, že NK1.1 se vyskytuje na NK buňkách z CE, B6, NZB, C58, Ma/My, ST a SJL myši, exprese u dalších kmenů (BALB/c, AKR, CBA, C3H, DBA a 129) však pozorována nebyla.^[178] Expresním klonováním NK1.1 antigenu B6 myši bylo prokázáno, že se jedná o produkt genu *Nkrp1c*, jednoho z členů již tehdy známé multigenní

rodiny Nkrp1.^[179] Později byl u jiných kmenů myši identifikován druhý NK1.1 antigen, produkt genu Nkrp1b, dalšího ze členů Nkrp1 rodiny.^[180]

Do dnešní doby bylo popsáno sedm Nkrp1 genů u myši^[181] a pouze jeden, nepolymorfní Nkrp1 gen u člověka.^[182] Tři z myších NKR-P1 receptorů mají funkci aktivačních receptorů, tři inhibičních a gen kódující poslední, sedmý, je defektní a nedochází k jeho transkripci.

Aktivační receptory jsou NKR-P1A, C a F.^[130] V případě NKR-P1C byla popsána interakce s adaptorovým proteinem FcεRI-γ,^[183] u zbylých dvou aktivačních receptorů byla pozorována nabitá aminokyselina v transmembránové doméně a interakce s některým z adaptorových proteinů se tedy dá předpokládat, ačkoliv popsána doposud nebyla.^[130] NKR-P1F specificky rozpoznává Clrg^[35, 184] a Clrc,^[185] členy rodiny Clr (C-type lectin related) taktéž kódované v NKC, ligandy zbylých dvou aktivačních receptorů doposud nebyly nalezeny, ačkoliv na základě analogie s krysími homology se občas předpokládá interakce s dalšími členy Clr rodiny. V případě NKR-P1A byla dokonce prokázána xenoreaktivita vůči buňkám exprimujícím krysí Clr11.^[185]

Dlouhou dobu platilo, že inhibičními NKR-P1 receptory jsou pouze NKR-P1B a NKR-P1D, NKR-P1G byl považován za pseudogen.^[181] Společným ligandem NKR-P1B/D je další z rodiny Clr molekul, Clrb.^[35] O těchto molekulách bude dále pojednáno v kapitolách 1.4.2.3.1 a 1.5.1. V případě NKR-P1G se podle nejnovější studie jedná o funkční molekulu, která rozpoznává další Clr ligandy, konkrétně Clrf, Clrg a Clrd/x. Fyziologická relevance částečného překryvu vazebných specifit aktivačního NKR-P1F a inhibičního NKR-P1G není jasná, ačkoliv podle jedné hypotézy se oba receptory mohou účastnit kontroly globální exprese Clr molekul.^[185]

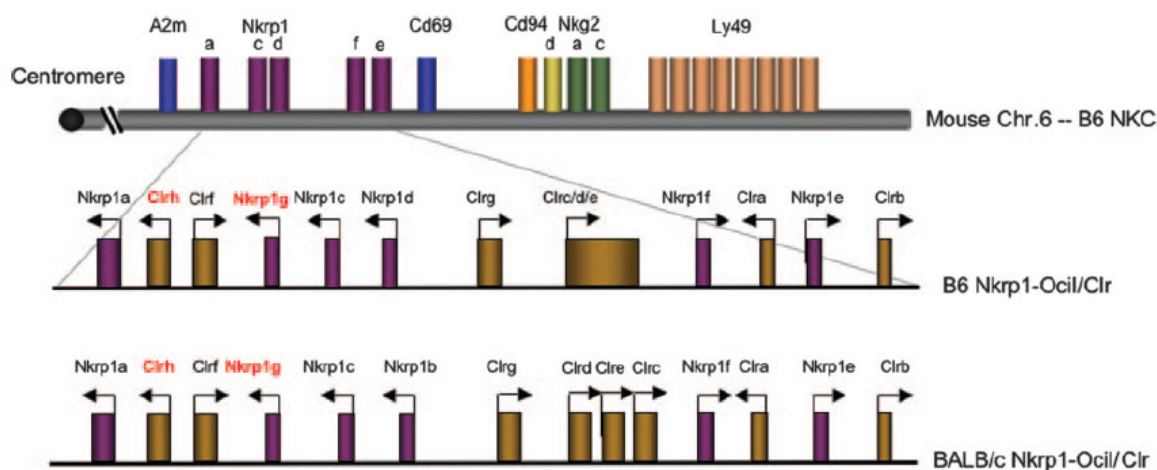
Poslední zástupce Nkrp1 rodiny, Nkrp1e, je kvůli inserci stop kodonu ve třetím exonu a posunu čtecího rámce v pátém exonu pseudogenem a není přepisován.^[186]

V případě lidského hNKR-P1 je situace od počátku nejasná, protože tento receptor neobsahuje nabitou aminokyselinu ve své transmembránové doméně ani ITIM v intracelulární doméně. Jak tedy signalizuje zůstávalo dlouho neznámé.^[130] Novější práce popisuje aktivaci kyselé sfingomyelinasy po aktivaci hNKR-P1 vedoucí ke vzniku druhého posla (N-acyl sfingosinu). Další detaily této signalizační kaskády však zůstávají nedořešeny.^[187] Prvotní pozorování popsala hNKR-P1 jako inhibiční receptor, který blokuje NK buněčnou cytotoxickou aktivitu.^[182] Překvapivě v případě T lymfocytů, které tento receptor taktéž exprimují, hraje hNKR-P1 kostimulační roli.^[188] Ligandem pro hNKR-P1 je molekula označovaná jako LLT1 nebo také CLEC2D, ortolog myších Clr molekul.^[189, 190]

1.4.2.3.1 NKR-P1D

Stejně jako ostatní členové NKR-P1 rodiny, je NKR-P1D transmembránový protein II. typu a čítá celkem 223 aminokyselin. Cytoplasmatická doména sestávající ze 43 aminokyselin obsahuje mezi pozicemi 6 – 11 klasický ITIM (LVYADL), transmembránová doména sestává z 21 a extracelulární doména ze 159 aminokyselin. Gen kódující NKR-P1D je rozdělen do 6 exonů, z nichž první kóduje cytoplasmatickou doménu, druhý transmembránovou doménu, třetí kóduje region označovaný jako „stopka“ (stalk region), kterým je napojena C-lektinová doména kódovaná dalšími třemi exony.^[186]

Po nějakou dobu byl předmětem kontroverze vztah panující mezi dvěma inhibičními NKR-P1B/D receptory. První byl identifikován NKR-P1B, který byl popsán spolu s NKR-P1A a NKR-P1C na NK buňkách myši kmene B6.^[191] Pozdější práce demonstrovaly, že NKR-P1B je inhibiční receptor obsahující NK1.1 epitop, nebyly však schopny potvrdit jeho přítomnost na NK buňkách izolovaných z B6 myši i přesto, že v jiných kmenech, například SJL/J, byla jeho exprese prokázána bez jakýchkoliv pochybností.^[180, 192] Zato byl nalezen^[180] a později i popsán^[186] inhibiční receptor B6 myši sdílející inhibiční funkci s NKR-P1B, který byl označen NKR-P1D. Zda se jedná o alelické formy nebo různé receptory bylo nejasné. Až v roce 2006 Carlyle et al. jasně ukázal, že se jedná o dva různé receptory, které jsou exprimovány vzájemně vylučně u různých kmenů myši (obr. 14.).^[181]



Obr. 14. Srovnání částí NKC kódujících NKR-P1 receptory mezi B6 a BALB/c myšmi. Za povšimnutí stojí absence Nkrp1b v případě B6 myši a absence Nkrp1d v případě BALB/c myši. Přejato z [181].

1.4.3 Imunoglobulinové receptory

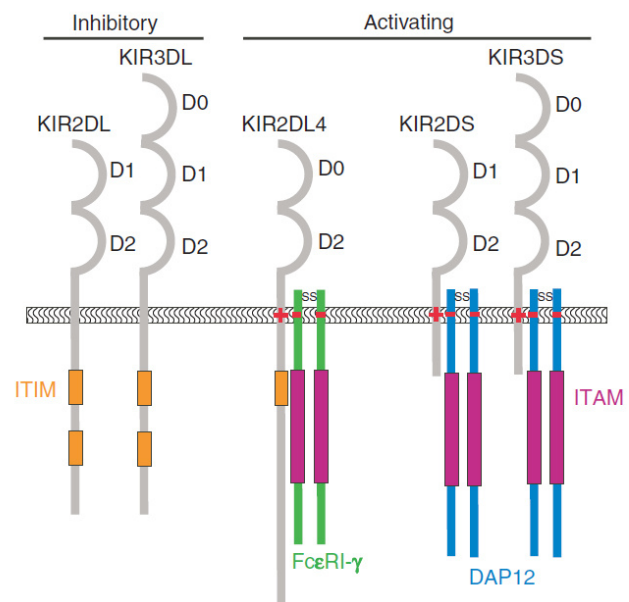
Klasické NK buněčné imunoglobulinové receptory byly doposud nalezeny pouze u člověka a primátů, myš tyto receptory neexprimuje. Lidské NK buňky exprimují dvě rodiny

těchto imunoglobulinových receptorů – KIR a LILR, z nichž prominentnější roli zastávají KIR receptory. Obě skupiny ale sdílí společné ligandy – MHC molekuly I třídy. Zastávají tak úlohu, kterou hrají u myši Ly49 receptory, a představují tak pozoruhodný příklad evoluční konvergence.^[130] Kromě těchto dvou základních rodin exprimují NK buňky, v tomto případě nejen lidské, také skupinu strukturně nepříbuzných aktivačních receptorů obsahujících jednu či více imunoglobulinových domén označovaných jako NCR (Natural Cytotoxicity Receptor).^[193]

1.4.3.1 KIR rodina

Rodina KIR sestává ze čtrnácti vysoce polymorfních genů (2DL1 – 2DL5, 3DL1 – 3DL3, 2DS1 – 2DS5 a 3DS1). Jejich nomenklatura je založena na počtu imunoglobulinových domén (2D/3D) v extracelulární části a na délce cytoplasmatické domény (L/S) (Obr. 15.).^[194]

Všechny inhibiční KIRy mají dlouhou cytoplasmatickou doménu obsahující klasické ITIMy. Oproti tomu KIRy s krátkou doménou představují aktivační receptory a interagují s adaptorovým proteinem DAP12.^[195] Jedinou výjimkou z tohoto pravidla je KIR2DL4, který je i přes svou dlouhou cytoplasmatickou doménu aktivačním receptorem. Ve srovnání s ostatními KIRy je tento receptor potentnějším aktivátorem a jeho exprese je omezena na CD56^{high} subpopulaci NK buněk. Narozdíl od ostatních aktivačních KIRů, asociuje KIR2DL4 s adaptorovým proteinem FcεRI-γ.^[196]



Obr. 15. Schématické znázornění rozdílů mezi různými KIRy. Přejato z [195].

KIRy dosahují vysokého stupně diverzity díky čtyřem stupňům variability.^[195] Produkt každého KIR genu rozpoznává specifický subset MHC-I alotypů.^[197] Rozdílné kombinace čtrnácti KIR genů jsou děděny jako jednotlivé haplotypy a různé haplotypy se mohou lišit v poměru aktivačních a inhibičních receptorů.^[198, 199] Existuje velké množství alel všech KIR genů, které mohou ovlivňovat expresi, afinitu i aviditu daných proteinů.^[200] A konečně diverzita repertoáru NK buněk je dána stochastickou expresí různých kombinací KIR genů, které má každá daná NK buňka k dispozici.^[199]

I u KIRů, podobně jako u dalších, dříve zmíněných, skupin receptorů, dochází k vazbě stejných ligandů aktivačními i inhibičními receptory, přičemž afinita inhibičních receptorů je vyšší než afinita receptorů aktivačních.^[201]

1.4.3.2 LILR rodina

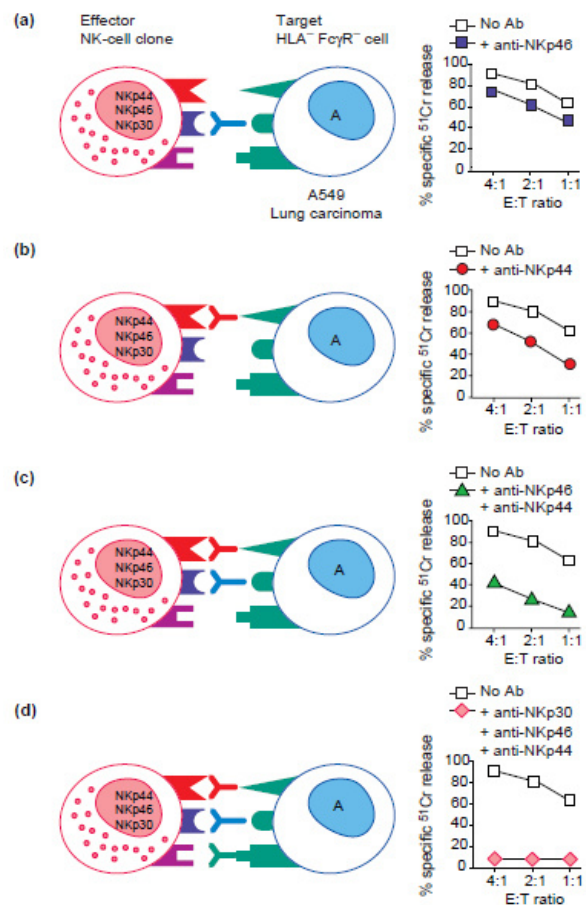
LILR rodina genů čítá celkem třináct členů, z nich však pouze dva (LILRB1 a LILRB2) fungují jako inhibiční receptory rozpoznávající MHC molekuly. Z těchto dvou receptorů pouze LILRB1 je exprimován na NK buňkách.^[202] LILRB1 obsahuje ve své cytoplasmatické části čtyři klasické ITIMy a s nízkou afinitou váže všechny subtypy MHC molekul I. třídy (HLA-A, B, C, E, F, G). Kromě MHC molekul ale LILRB1 váže i UL18 protein kódovaný HCMV, který je strukturně příbuzný MHC molekulám a může tedy sloužit jako decoy ligand tlumící NK buněčnou antivirovou odpověď.^[203] Inhibiční funkce KIR a NKG2 rodiny receptorů hrají však dominantnější roli.^[204]

1.4.3.3 NCR – NKp receptory

Do skupiny NKp receptorů bylo zařazeno několik strukturně nepříbuzných receptorů obsahujících jednu nebo dvě imunoglobulinové domény a řadících se do kategorie NCR.

Aby receptor byl chápán jako NCR, musí splňovat tři podmínky. Jeho exprese musí být omezena pouze na NK buňky, jeho zesítnění pomocí monoklonálních protilátek musí indukovat buněčné zabíjení a jeho blokace musí buněčné zabíjení inhibovat (Obr. 16.).^[193]

Jako první, prototypický NCR, byl identifikován receptor NKp46, který je exprimován aktivovanými i neaktivovanými NK buňkami. Jeho zesítnění vede k aktivaci Ca^{2+} signalizace, aktivaci cytotoxických vlastností i



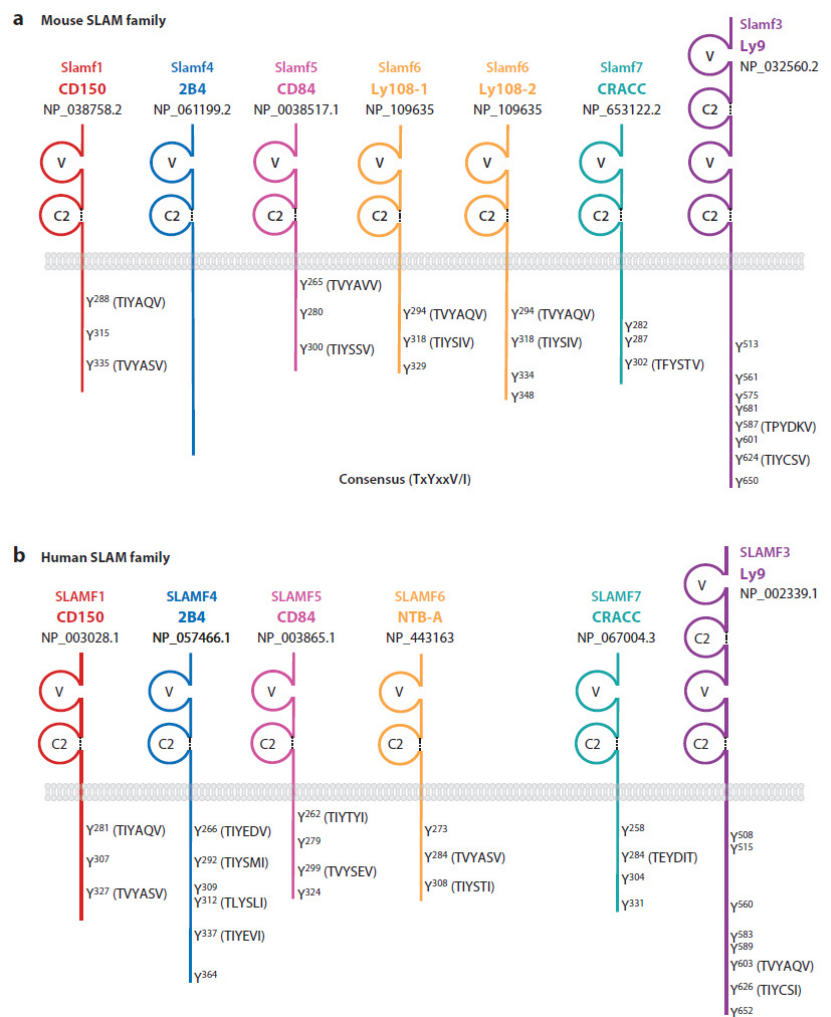
Obr. 16. Synergie mezi různými NCR demonstrována rozdíly v buněčném zabíjení při blokaci jednotlivých NKp receptorů mAB. Přejato z [210].

produkcí cytokinů.^[205] Zdá se, že tento receptor zastává zásadní roli při indukcí cytotoxické odpovědi proti různým autologním, alogenním i xenogenním buňkám a jeho blokáda inhibuje zabíjení většiny nádorových linií. Není bez zajímavosti, že NKp46 je jediným lidským NK buněčným receptorem, který je přímo schopen rozeznávat ligandy i na myších buňkách.^[206] Ze strukturního hlediska se jedná o transmembránový protein I. typu obsahující dvě imunoglobulinové domény a nabitý arginin v transmembránové doméně,^[207] díky němuž interaguje s adaptorovými proteiny CD3 ζ a Fc ϵ RI- γ .^[205, 208] NKp46 je, stejně jako KIR a LILR receptory, kódován na lidském chromosomu 19.^[207] Narozdíl od KIRů, LILRů i ostatních Nkp receptorů však v případě NKp46 byl objeven myší homolog, který je kódován na myším chromosomu 7, syntenním chromosomu k lidskému chromosomu 19.^[209]

Dalšími popsány NCR jsou NKp44, který je specificky exprimován NK buňkami po aktivaci IL-2 a NKp30.^[210]

1.4.4 SLAM rodina receptorů

Receptory rodiny SLAM příliš nezapadají do historického rozdělení NK receptorů na lektinové a imunoglobulinové a často se proto z tohoto dělení vyčleňují, či přímo opomíjejí. Strukturně se jedná o transmembránové glykoproteiny I. typu charakteristické N-terminální Ig doménou, která však postrádá standardní disulfidické vazby a C2 doménou umístěnou v blízkosti membrány (Obr. 17).^[211] Všichni členové SLAM rodiny obsahují jeden či více ITSM motivů, které slouží jako vazebná místa pro adaptorové proteiny rodiny SAP. Všechny lidské NK buňky

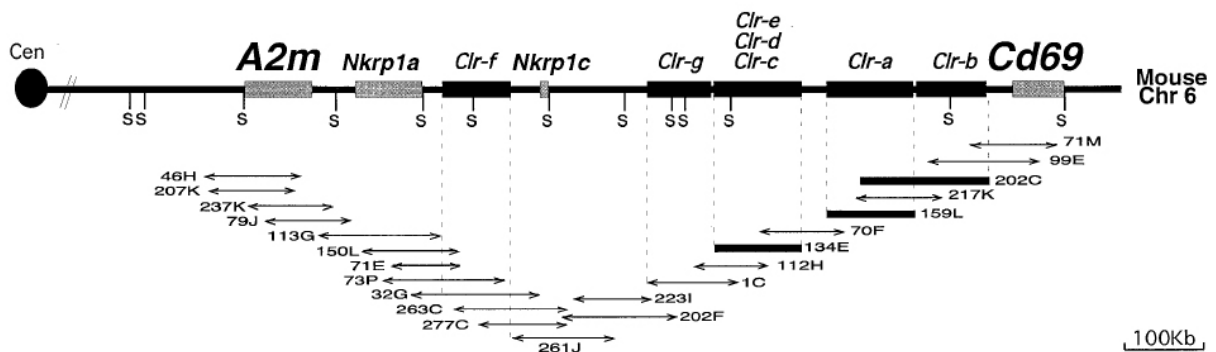


Obr. 17. Schematické znázornění různých členů SLAM rodiny u myši (a) i člověka (b). Přejato z [212].

exprimují tři členy rodiny SLAM: 2B4, NTB-A a CRACC, přičemž jeden ze subsetů navíc exprimuje Ly9. Na myších NK buňkách se taktéž vyskytují 2B4, CRACC a Ly9, narozdíl od lidských ale exprimují i CD84 a neexprimují Ly108 (myší homolog NTB-A).^[212]

1.5 Clr rodina proteinů

Rodina Clr molekul byla objevena v roce 2000 v centromerické oblasti myšího NKC mezi *Nkrp1* a *CD69* lokusy pomocí strategie náhodného sekvenování (Obr. 18.). Ze sedmi takto objevených Clr molekul (a – g) se dva jevily jako pseudogeny, protože obsahovaly pouze poslední jeden (*Clrd*) nebo dva (*Clre*) exony. Standardní genové uspořádání ostatních Clr molekul spočívá v rozdělení do 5 exonů, z nichž první kóduje cytoplasmatickou doménu, druhý extracelulární doménu a zbylé tři kódují extracelulární lektinovou doménu.^[213] Další zástupce Clr rodiny, *Clrh*, byl objeven později, během BAC analýzy celého klastru *Nkrp1* a *Clr* genů.^[181] Poslední Clr molekula, označená *Clrx*, byla popsána před dvěma lety a spolu s *Clrg* se vymyká standardnímu uspořádání Clr molekul, protože jejich cytoplasmatické domény jsou nepříbuzné cytoplasmatickým doménám ostatních členů Clr rodiny a jsou kódovány 2 exony.^[184] Jak se však později ukázalo, *Clrx* je mapován do stejné oblasti genomu jako *Clrd* a jedná se tedy možná o funkční produkt genu, který byl původně považován za pseudogen.^[185]



Obr. 18. Uspořádání Clr genů v rámci myšího NKC. Šipky v dolní části obrázku odpovídají jednotlivým BAC využitým pro sekvenaci a černé čáry odpovídají BAC využitým během náhodného sekvenování. Přejato z [213].

V současné době se zdá, že funkce Clr molekul souvisí hlavně s imunitním systémem, jeho regulací a modulací, ačkoliv v případě *Clrb*, o němž bude pojednáno v další části, byly prokázány funkce i při vývoji a remodelaci kostí.

Detailnější informace jsou zatím k dispozici pouze o Clrb a jeho interakci s NKR-P1B/D, která vede k inhibici buněčného zabíjení a Clrg a jeho interakci s NKR-P1F, která měla vést k aktivaci NK buněk pomocí „induced-self“ mechanismu.^[35] Jak ale naznačují novější publikace, situace pravděpodobně nebude takto jednoduchá, protože i Clrg má signalizační potenciál, který se projevuje například kostimulací Clrg⁺ T lymfocytů NKR-P1F⁺ dendritickými buňkami.^[214]

Podle poslední publikace jsou interakce Clr a NKR-P1 receptorů pravděpodobně ještě složitější a promiskuitnější. Clrg i Clrd/x podle této práce slouží jako ligandy pro NKR-P1F i NKR-P1G, zatímco Clrc je ligandem pouze pro NKR-P1F a Clrf pouze pro NKR-P1G.^[185] Fyziologický význam těchto interakcí zatím nebyl prozkoumán, stejně jako význam posledních dvou zástupců Clr rodiny – Clra a Clrh.

1.5.1 Clrb

Clrb je členem Clr rodiny receptorů. Samotný protein je ze strukturního hlediska transmembránovým proteinem II. typu a skládá se ze 206 aminokyselin, z čehož 143 tvoří extracelulární, 21 transmembránovou a 43 cytoplasmatickou doménu. V extracelulární části jsou tři glykosylační místa na pozicích 74, 100 a 158 a v intracelulární doméně je přítomný myristoylační motiv. Extracelulární doména obsahuje C-lektinovou doménu tvořenou rezidui 80 – 192. Na základě své funkce při vývoji kostí byl Clrb původně označen jako „Osteoclast Inhibitory Lectin“ (OCIL)^[215]

Jak již tento název naznačuje, Clrb se účastní inhibice diferenciací osteoklastů. Zdá se, že Clrb za fyziologických podmínek slouží jako inhibitor signalizace mediované molekulou RANK, která je receptorem pro RANKL.^[215, 216] Clrb^{-/-} myši s výjimkou defektů kostí nevykazují žádný výrazný fenotyp. Abnormality kostí byly pozorovány především ve formě zmenšeného objemu trabekulární kosti způsobeného zvýšenou formací osteoklastů a vedly k osteopenii u dospělých jedinců. Defekty ve funkci imunitního systému pozorovány nebyly.^[217]

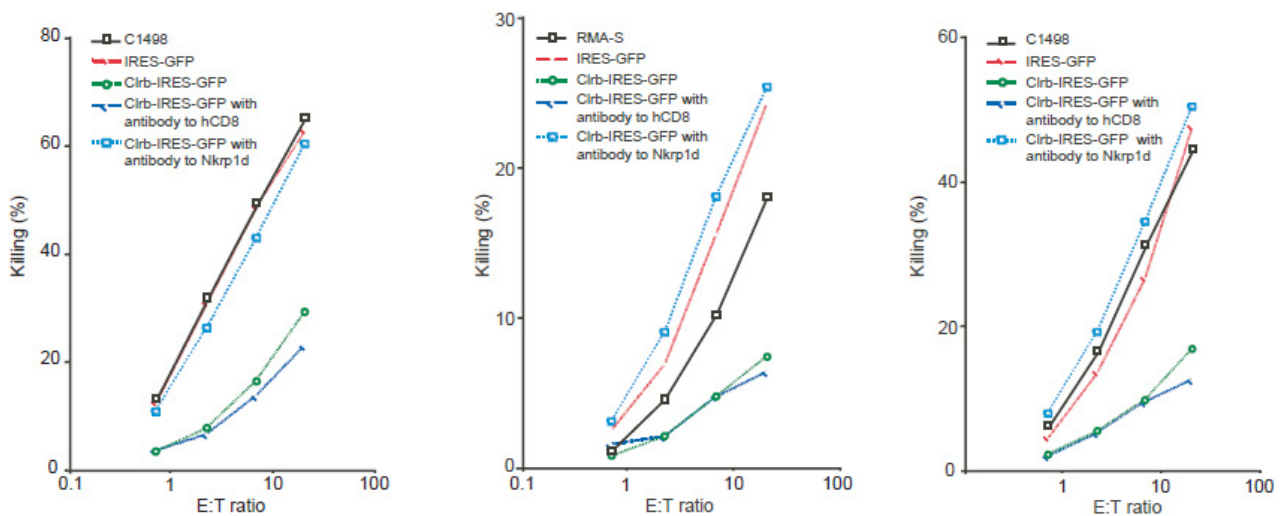
Podobně jako kanonické lektiny C-typu, Clrb rozpoznává Ca²⁺ dependentně některé druhy sacharidů, především sulfatované glykosaminoglykany jako fucoidan a λ-karagenan. Význam těchto interakcí však zůstává nejasný, protože žádným způsobem neinterferují s inhibicí formování osteoklastů ani s funkcemi Clrb v imunitním systému.^[218]

Již první práce popisující funkci Clrb při remodelaci kostí neopoměly konstatovat, že jeho exprese není omezena jen na místa, kde může modulovat přeměnu kostí, a že tedy bude zastávat i další úlohy.^[215] Clrb slouží jako ligand inhibičních NKR-P1 receptorů a stojí za

zmínku, že expresní profil Clrb je velmi podobný expresnímu profilu MHC molekul I třídy. Clrb je exprimován na jaderných buňkách všech tkání a jeho exprese je výrazně snížena některými nádorovými liniemi. To ukazuje, že koncept „MHC-I independent missing self“ rozpoznávání velmi dobře zapadá do celkové koncepce funkce NK buněk. [219]

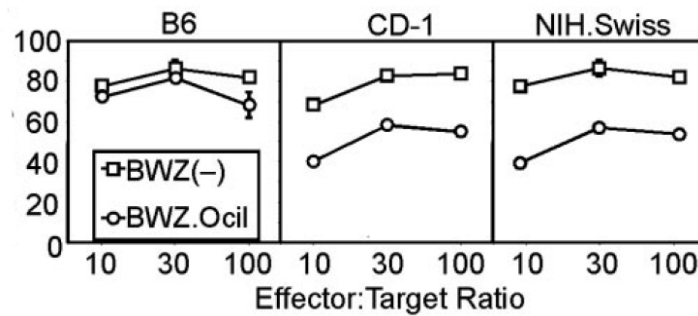
1.6 Interakce NKR-P1D – Clrb

Podobně jako už samotná definice NKR-P1D se nevyhnula rozporům, i popis funkce interakce ligand receptorového páru NKR-P1D : Clrb je dodnes rozporuplný. Že NKR-P1D specificky rozpoznává Clrb, a že tato interakce vede k inhibici NK buněk, poprvé publikovala skupina dr. Yokoyamy. Výsledky této skupiny jasně demonstrovaly, že transfekce buněk různých nádorových linií genem pro Clrb vede k jejich ochraně před zabitím NK buňkami, a že tento jev je závislý na NKR-P1D (Obr. 19.). [35]



Obr. 19. Grafy z publikace Yokoyamovy skupiny popisující interakci NKR-P1D s Clrb znázorňující NKR-P1D dependentní inhibici zabíjení buněk různých tumorových linií NK buňkami. Černá čára představuje zabíjení původní tumorové buněčné linie, zelená zabíjení těžce tumorové linie transfekované Clrb. Světle modrá představuje zabíjení linie transfekované Clrb, ale v přítomnosti blokační protilátky pro NKR-P1D. Červená je nádorová linie transfekovaná GFP jako kontrola vlivu transfekce obecně a tmavě modrá je linie transfekovaná Clrb v přítomnosti protilátky proti CD8 jako kontrola obecného vlivu přítomnosti protilátky. Z grafů je zřejmé, že buňky transfekované Clrb jsou chráněny před zabíjením NK buňkami a tato ochrana je zrušena přítomností blokační protilátky proti NKR-P1D. Tyto efekty nejsou ani obecným důsledkem transfekce tumorové linie ani přítomnosti protilátky, protože kontrolní protilátka ani kontrolní transfekce nemají na zabíjení vliv. Přejato z [35].

Novější práce publikovaná skupinou dr. Carlyla identifikovala NKR-P1B jako další receptor pro Clrb a ačkoliv v jednom pokusu potvrdila i interakci NKR-P1D s Clrb, inhibice cytotoxické aktivity NK buněk z B6 myší vybavených NKR-P1D pozorována nebyla, zatímco NK buňky z CD-1 a NIH myší vybavených NKR-P1B vykazovaly v přítomnosti Clrb nižší lytickou aktivitu. (Obr. 20.).^[181]



Obr. 20. Grafy z publikace Carlylovy skupiny znázorňující inhibici NK buněčného zabíjení tumorové buněčné linie před a po transfekci Clrb. V případě NK buněk z B6 myší je inhibice pouze velmi slabá, kdežto NK buňky z CD-1 a NIH myší jsou inhibovány silně. Přejato z [181].

Poslední, nejnovější, práce dr. Brookse zabývající se touto tematikou opět potvrdila interakci NKR-P1D s Clrb a navíc postulovala dvě funkčně odlišné subpopulace myších NK buněk. NKR-P1D⁺ subpopulace je charakteristická nižší expresí některých Ly49 receptorů a naopak vyšší expresí NKG2/CD94 receptorů než NKR-P1D⁻ subpopulace. Dle očekávání NKR-P1D⁺ subpopulace nebyla schopna zabít buňky transfekované Clrb, kdežto NKR-P1D⁻ populace žádnou inhibici nevykazovala. A konečně NKR-P1D⁺ subpopulace vykazovala po aktivaci vyšší produkci IFN- γ i cytotoxickou aktivitu.^[184] Ačkoliv Brooks pro vysvětlení tohoto posledního bodu navrhuje dvě možnosti, nejpravděpodobnější variantou se zdá být participace NKR-P1D receptoru na licencování NK buněk, podobně jako se inhibiční NKR-P1B účastní licencování krysích NK buněk, jak již bylo zmíněno v odstavci 1.3.3.^[48] Pro definitivní dořešení tohoto problému bude však třeba dalšího výzkumu.

2. Cíle práce

- **Optimalizace *in vitro* renaturace a purifikace proteinů Clrb a NKR-P1D**
- **Ověření správnosti renaturace**
- **Funkční testy interakce**
- **Chemické zesílení proteinů**
- **Vytvoření homologního modelu interakce páru proteinů**

3. Materiál

3.1 Přístroje

- Analytická ultracentrifuga ProteomeLab XL-I *Beckman Coulter, USA*
- Analytické váhy AL54 *Mettler Toledo, ČR*
- Automatické pipety *Gilson; Thermo Fisher, USA*
- Centrifuga Avanti J-26 XP *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga J-6M *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga MiniSpin *Eppendorf, Německo*
- 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*
- Centrifugační koncentrátoři CENTRICON *Millipore, USA*
- Dialyzační trubice Spektra/Por *Spectrum Laboratories, USA*
- DNA sekvenátor ABI Prism 3100 *Applied Biosystems, USA*
- Dokumentační systém na focení gelů G:Box HR *Syngene, UK*
- Hmotnostní spektrometr APEX Qe Ultra *Bruker Daltonics, USA*
- HPLC systém Biosys 510 *Beckman, USA*
- Chladnička *Electrolux, Švédsko*
- Iluminátor BTS-20.LS *UVItec, UK*
- Inkubátor BT-120M *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- Kolona Q-Sepharosa FF (2 × 13,5 cm) *GE Healthcare, USA*
- Kolona Superdex 75 10/300 GL (1 × 30 cm) *GE Healthcare, USA*
- Kolona Superdex 75 PC 3.2/30 (0,32 × 30 cm) *GE Healthcare, USA*
- Kolona MAGIC C18-AQ (0,2 × 150 mm) *Michrom Bioresources, USA*
- Ledovač Ice Flaker *Brema Ice Makers, Itálie*
- Mrazicí box – 80°C (Ultra low) *Revco, USA*
- MicroHPLC SMART *Pharmacia, Švédsko*
- MicroHPLC Agilent 1200 *Agilent, USA*
- Mikrokolonky micro a macrotrap 1x8 a 3x8mm *Michrom Bioresources, USA*

- Napájecí zdroj MP-250V *Major Science, USA*
- Napájecí zdroj ECPS 3000/150 *Pharmacia, Švédsko*
- Magnetická míchačka MM 2A *Laboratorní přístroje Praha, ČR*
- Mikrostříkačky, různé objemy *Hamilton, Švýcarsko*
- NMR spektrometr Avance III 600MHz *Bruker BioSpin, USA*
- pH metr Φ 200 *Beckman Coulter, USA*
- Platereader Sapphire *Tecan, Švýcarsko*
- Ploténkový vaříč *ETA, ČR*
- Předvážky HF-1200G *AND, USA*
- Souprava pro elektroforézu *Sigma-Aldrich, USA*
- Souprava pro elektroforézu *Bio-Rad, USA*
- Souprava pro elektroforézu X-Cell Sure Lock *Invitrogen, USA*
- Souprava pro ultrafiltraci *Millipore, USA*
- Spektrofotometr DU-70 *Beckman Coulter, USA*
- SPR přístroj *ÚFE, ČR*
- Termoblok *Grant, UK*
- Termocyklér Mastercycler Personal *Eppendorf, Německo*
- Termomixér Comfort *Eppendorf, Německo*
- Třepačka na Erlenmeyerovy baňky *Sanyo Gallenkamp Ltd., UK*
- Třepačka na zkumavky BigGer Bill *Thermolyne, USA*
- Ultracentrifuga LE80K Optima *Beckman Coulter, USA*
- Ultrafiltrační membrány *Millipore, USA*
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 *Cole-Parmer Instrum. Co., USA*
- Ultrazvuková lázeň Sonorex *Bandelin, Německo*
- Vodní lázeň *Memmert, Německo*
- Vakuová odparka Speedvac *Jouan, Francie*
- Vakuová odparka Savant SPD 121P Speedvac *Thermo Fisher, USA*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody MilliQ *Millipore, USA*

3.2 Soupravy pro izolaci DNA

- JETQUICK Gel Extraction Spin Kit *Genomed, Německo*
- JETQUICK PCR Purification Kit *Genomed, Německo*
- JETSTAR Plasmid MiniPrep Kit *Genomed, Německo*
- JETSTAR Plasmid MidiPrep Kit *Genomed, Německo*
- JETSTAR Plasmid MaxiPrep Kit *Genomed, Německo*

3.3 Chemikálie

- Acetonitril (LC/MS grade) (AcN) *Merck, Německo*
- Agar *Oxoid, USA*
- Agarosa *Serva, Německo*
- Akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- Amoniumpersulfát (APS) *Sigma-Aldrich, USA*
- Ampicilin (Amp) *Jersey Lab Supply, USA*
- L-Arginin *Sigma-Aldrich, USA*
- Azid sodný *Sigma-Aldrich, USA*
- Bacto-trypton *Oxoid, USA*
- Bacto-yeast extrakt *Oxoid, USA*
- 1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED) *Sigma-Aldrich, USA*
- Coomassie Brilliant Blue G-250 *Serva, Německo*
- Coomassie Brilliant Blue R-250 *Serva, Německo*
- Cystamin dihydrochlorid *Sigma-Aldrich, USA*
- Cysteamin hydrochlorid *Sigma-Aldrich, USA*
- Dihydrofosforečnan draselný *Lachema, ČR*
- Disukcinimidylglutarát (DSG) *Pierce Biotechnology, USA*
- Disukcinimidylsüberát (DSS) *Pierce Biotechnology, USA*
- DNA marker 100 bp; 1 kb *New England Biolabs, USA*
- dNTPs *Promega, USA*
- Dithiothreitol (DTT) *Sigma-Aldrich, USA*
- Ethanol *Lachema, ČR*
- Ethidium bromid (EtBr) *Sigma-Aldrich, USA*

- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) *Pierce Biotechnology, USA*
- Ethylendiamintetraacetát (EDTA) *Sigma-Aldrich, USA*
- 4-Ethylmorfolin *Fluka, Švýcarsko*
- Glukosa *Lachema, ČR*
- Glycin *Sigma-Aldrich, USA*
- Guanidin-HCl *Sigma-Aldrich, USA*
- HEPES *Lachema, ČR*
- Hydrogenfosforečnan sodný *Lachema, ČR*
- Hydroxid sodný *Lachema, ČR*
- Chlorid amonný *Lachema, ČR*
- Chlorid sodný *Lachema, ČR*
- Chlorid vápenatý *Lachema, ČR*
- 4-hydroxo- α -kyanoskořicová kyselina (CCA) *Bruker Daltonics, USA*
- Isopropanol (LC/MS grade) (IPA) *Merck, Německo*
- Jodacetamid (IAA) *Sigma-Aldrich, USA*
- Kanamycin (Kan) *Jersey Lab Supply, USA*
- Kyselina chlorovodíková *Lachema, ČR*
- Kyselina mravenčí (LC/MS grade) (FA) *Fluka, Švýcarsko*
- Kyselina octová (LC/MS grade) (HAc) *Fluka, Švýcarsko*
- Kyselina trifluoroctová (LC/MS grade) (TFA) *Fluka, Švýcarsko*
- Methanol (LC/MS grade) *Merck, Německo*
- N,N'-metylen-bis-akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- Octan amonný *Sigma-Aldrich, USA*
- Pyridin *Fluka, Švýcarsko*
- Síran hořečnatý *Lachema, ČR*
- Sodiumdodecylsulfát (SDS) *Jersey Lab Supply, USA*
- Standardy pro SDS-PAGE *Serva, Německo*
- Tetracyklin (Tet) *Jersey Lab Supply, USA*
- Thiamin-HCl *Sigma-Aldrich, USA*
- Trimethylamin *Fluka, USA*
- Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) *Sigma-Aldrich, USA*

- Tris-HCl *Jersey Lab Supply, USA*
- Ultračistá voda (LC/MS grade) *J.T.Baker, USA*

3.4 Primery pro PCR

- NKRD_{MUT}FW: 5'–TTCCAACACTTGGAAGGAATCTCGAATTGATTGTGATAAAA–3'
- NKRD_{MUT}REV: 5'–TTTTATCACAATCAATTCGAGATTCCTTCCAAGTGTGGAA–3'
- NKRD_{ZKR}FW: 5'–TGCATATGTCAGCTAAGCTAGAGTGCCACAA–3'
- NKRD_{ZKR}REV: 5'–TAAGCTTAGTTTAGTTCCTTTGGCAGATCCAA–3'

Všechny primery byly vyrobeny firmou *Generi Biotech, ČR*

3.5 Enzymy

- AspN (sequencing grade) *Roche, Švýcarsko*
- CIP fosfatasa *New England Biolabs, USA*
- Deep Vent DNA polymerasa *New England Biolabs, USA*
- *DpnI* endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- GluC (sequencing grade) *Roche, Švýcarsko*
- *HindIII* endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- *NdeI* endonukleasa *New England Biolabs, USA*
- Pfu ULTRA HF DNA polymerasa *Stratagene, USA*
- T4 DNA ligasa *Stratagene, USA*
- Trypsin (sequencing grade) *Roche, Švýcarsko*
- *XbaI* endonukleasa *New England Biolabs, USA*

3.6 Inhibitory proteas

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

3.7 Vektory

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

3.8 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*^qZDM15::Tn10] (Tet^R)
Novagen, USA

3.9 Roztoky a pufrы

- **Barvicí roztok pro SDS PAGE:** 45% methanol, 10% HAc, 0,25% CBB R-250
- **Činidlo podle Bradfordové:** 0,5 mg/ml Coomassie Blue G, 25% methanol, 42,5% H₃PO₄
- **Denaturační pufr pro inkluzní tělíska:** 6 M guanidin-HCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, pH 8,0
- **Dialyzační pufr:** 9 mM NaCl, 1 mM NaN₃, 15 mM Tris-HCl, pH 9,0
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE:** 10 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3
- **Chromatografický pufr A pro ionexovou chromatografii:** 9 mM NaCl, 1 mM NaN₃, 15 mM Tris-HCl, pH 9,0
- **Chromatografický pufr B pro ionexovou chromatografii:** 1 M NaCl, 1 mM NaN₃, 15 mM Tris-HCl, pH 9,0
- **Chromatografický pufr pro gelovou filtraci:** 150 mM NaCl, 1 mM NaN₃, 15 mM Tris-HCl, pH 9,0
- **Chromatografický pufr A pro chromatografii na obrácené fázi:** 0,2% FA, 2,5% AcN, 2% IPA
- **Chromatografický pufr B pro chromatografii na obrácené fázi:** 0,16% FA, 90% AcN, 5% IPA
- **Ligační pufr pro T4 DNA ligasu:** komerčně dostupný od firmy *Stratagene*, USA
- **NEB 2 pufr:** komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*, USA
- **Odbarvovací roztok pro SDS PAGE:** 35% ethanol, 10% kyselina octová
- **PBS:** 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄·2H₂O, 0,24 g/l KH₂PO₄, pH 7,4
- **Pufr pro DNA polymerasu Deep Vent:** dostupný od firmy *New England Biolabs*, USA

- **Pufr pro DNA polymerasu Pfu ULTRA:** dostupný od firmy *Stratagene*, USA
- **Pufr pro zesílení pomocí DSG a DSS:** 50 mM triethylamin, 50 mM NaCl, pH 7,5, dotitrováno probubláváním CO₂
- **Pufr pro zesílení pomocí EDC:** 50 mM pyridin, 50 mM NaCl, pH 6,5
- **Renaturační pufr:** 1 M L-Arginin, 10 mM CaCl₂, 3 mM cystamin, 9 mM cysteamin, 1 mM NaN₃, 50 mM Tris-HCl, pH 9,0
- **Roztok akrylamidu:** 29% akrylamid, 1% N,N'-methylen-bis-akrylamid
- **Štěpící pufr pro AspN a trypsin:** 50 mM Ethylmorfolinacetát, 10% AcN, pH 8,4
- **Štěpící pufr pro GluC:** 50 mM NH₄Ac, 10% acetonitril, pH 4,0
- **TAE pufr:** 2 M Tris-HCl, 1 M HAc, 50 mM EDTA, pH 8,0
- **TE pufr:** 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
- **Vzorkový pufr pro SDS PAGE neredukující:** 50 mM Tris-HCl, 12% glycerol, 4% SDS, 0,1% bromfenolová modř
- **Vzorkový pufr pro SDS PAGE redukující:** 50 mM Tris-HCl, 12% glycerol, 4% SDS, 0,1% bromfenolová modř, 100mM DTT

3.10 Média

- **LB agar:** 1,25% agar v LB médiu
- **LB médium:** 1% bacto-tryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 1% NaCl, pH 7,4
- **M9 minimální médium:** 15,1 g/l Na₂HPO₄·12H₂O, 3 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH₄Cl, 4 g/l glukosy, 0,494 g/l MgSO₄, 0,015 g/l CaCl₂, 0,01 g/l thiaminu

4. Metody

4.1 Úprava konstruktů NKR-P1D

Expresní vektory obsahující inserty kódující extracelulární domény obou proteinů (Clrb a NKR-P1D) byly připraveny a bylo jich využito pro produkci proteinů ve formě inkluzí tělísek v rámci mé bakalářské práce.^[220] Proteinový produkt původního konstruktů kódujícího NKR-P1D nebylo možné *in vitro* renaturovat a bylo tedy nutno přistoupit k jeho změně. Jak již bylo dříve publikováno,^[35] cystein na pozici 118 byl nahrazen serinem a 8 C-terminálních aminokyselin obsahujících další cystein bylo odstraněno.

4.1.1 Zavedení bodové mutace do konstruktů kódujícího NKR-P1D

Mutace byla provedena pomocí PCR reakce s mutačními primery obsahujícími změněnou bázi v místě mutace a High Fidelity DNA polymerasou Pfu ULTRA. Sekvence mutačních primerů byly:

fw: 5' – TTC CAA CAC TTG GAA GGA ATC TCG AAT TGA TTG TGA TAA AA – 3'

rev: 5' – TTT TAT CAC AAT CAA TTC GAG ATT CCT TCC AAG TGT TGG AA – 3'

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

Tabulka 1: Složení PCR reakční směsi:

složka	cDNA templát (20 µg/ml)	forward primer (5 µM)	reverse primer (5 µM)	dNTPs (10 mM)	10x Pfu buffer	Pfu ULTRA (2,5 U/µl)	H ₂ O
V(µl)	1	10	10	1	5	1	22
	2,5	10	10	1	5	1	20,5

Tabulka 2: Termální profil PCR reakce:

část	# cyklů	t (°C)	t (min)
1	1	95	0,5
2	12	95	0,5
		60	1
		68	6

Po proběhnutí reakce byl ke směsi přidán 1 μl *DpnI* endonukleasy (20 U/ μl) specificky štěpící *dam* methylovanou DNA a směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Parentální DNA tak byla rozštěpena a nově vzniklá, mutovaná DNA zůstala zachována.

Bakterie *E. coli* kmene Nova Blue byly metodou tepelného šoku^[221] transformovány produktem PCR reakce a kultivovány přes noc při 37 °C na agarových plotnách. Plotny jako selekční markery obsahovaly kanamycin (Kan) o koncentraci 50 mg/l a tetracyklin (Tet) o koncentraci 12,5 mg/l. Další den bylo vybráno 8 narostlých kolonií, které byly přeneseny do 1 ml LB Kan Tet média a inkubovány na třepačce při 37 °C a 250 RPM do stacionární fáze růstu.

Následně byla z narostlých kultur izolována plasmidová DNA pomocí JETQUICK Plasmid Miniprep kitu podle manuálu. Byla provedena kontrolní restriční analýza takto získané DNA za využití *XbaI* (20 U/ μl) a *HindIII* (20 U/ μl) restričních endonukleas a elektroforézy na 1% agarosovém gelu. Jako vizualizační činidlo byl použit ethidiumbromid (EtBr), jehož výsledná koncentrace v gelu byla 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Vybraná kultura obsahující plasmid s insertem správné velikosti byla použita jako inokulum do 100 ml LB Kan Tet média, které bylo následně inkubováno na třepačce při 37 °C přes noc. Další den byla pomocí JETSTAR Plasmid Midiprep kitu dle manuálu izolována zásobní plasmidová DNA pro další práci a opět byla provedena kontrolní restriční analýza za využití *NdeI*, *XbaI* a *HindIII* (20 U/ μl) restričních endonukleas.

4.1.2 Zkrácení konstruktů kódujícího NKR-P1D

Za použití plasmidové DNA se zavedenou bodovou mutací jako templátu byla provedena PCR reakce s využitím primerů o daných sekvencích:

fw: 5' – TGC ATA TGT CAG CTA AGC TAG AGT GCC CAC AA – 3'

rev: 5' – TAA GCT TAG TTT AGT TCC TTT TGG CAG ATC CAA – 3'

Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 3 a profil termální reakce v tabulce 4.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi:

složka	cDNA templát (200 $\mu\text{g/ml}$)	forward primer (5 μM)	reverse primer (5 μM)	dNTPs (10 mM)	MgSO ₄ (100 mM)	10x thermo buffer	Deep Vent (2 U/ μl)	H ₂ O
V(μl)	0,5	10	10	2	2	5	1	19,5

Tabulka 4: Termální profil PCR reakce:

část	# cyklů	t (°C)	t (min)
1	1	95	0,5
2	30	95	0,5
		59	1
		72	1
3	1	72	4

PCR produkt byl purifikován pomocí PCR Product Purification kitu dle manuálu a kontrola jeho velikosti byla provedena elektroforézou na 1% agarosovém gelu s EtBr jako vizualizačním činidlem. Purifikovaný PCR produkt byl ligován do pBS II SK/KS(-) vektoru linearizovaného pomocí *SmaI* endonukleasy a reakční směs byla ponechána přes noc při laboratorní teplotě. Celkové složení směsi je znázorněno v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro ligaci do pBS II SK/KS(-) vektoru:

složka	PCR produkt	pBS (1 mg/ml)	NEB4 pufr	<i>SmaI</i> (20 U/μl)	ATP (20 mM)	T4 DNA ligasa (1 U/μl)
V (μl)	13	1	2	1	1	2

Druhý den byla ligační směs využita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* kmene Nova Blue pomocí tepelného šoku. Buňky byly kultivovány na plotnách s LB agarem obsahujícím ampicilin (Amp) o koncentraci 100 mg/l, tetracyklin (Tet) o koncentraci 12,5 mg/l, XGal (90 mg/l) a IPTG (100 mM) při 37 °C přes noc. Následující den bylo vybráno 8 kolonií, které byly přeneseny každá do 1 ml LB Amp Tet média a inkubovány na třepačce při 37 °C do stacionární fáze. Analogicky k postupu popsanému v odstavci 4.1.1. byla připravena plasmidová DNA, která byla následně zkontrolována restričním štěpením. Vybraná kultura byla použita jako inokulum pro 100 ml LB Amp Tet média. Opět analogicky s dříve popsaným postupem byla připravena a zkontrolována zásobní plasmidová DNA.

Zásobní plasmidová DNA a pET30a(+) vektor byly štěpeny *NdeI* a *HindIII* restričními endonukleasami a vyštěpený kódující fragment a linearizovaný vektor byly separovány pomocí elektroforesy na 1% agarosovém gelu, vyříznuty a pomocí JETQUICK Gel Extraction Spin Kitu purifikovány. DNA fragment kódující zkrácenou verzi NKR-P1D byl poté ligován do linearizovaného pET30a(+) vektoru. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 6. Ligační reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě.

Tabulka 6: Složení ligační směsi pro ligaci do vektoru pET30a(+):

složka	insert	pET30a(+)	pufr pro T4 DNA ligasu	ATP (20 mM)	T4 DNA ligasa (1 U/μl)
V (μl)	6	14	2,5	1	2

Následující den byla ligační směs použita pro transformaci kompetentních buněk Nova Blue, které byly následně pěstovány přes noc při 37 °C na plotnách s LB Kan Tet agarem. Bylo vybráno 8 kolonií, které byly přeneseny do 1 ml LB Kan Tet média a pěstovány do stacionární fáze. Analogicky k již popsanému postupu byla získána plasmidová DNA, která byla zkontrolována restrikčním štěpením pomocí *NdeI* a *HindIII* endonukleas. Kolonie vybraná na základě restrikční analýzy byla využita jako inokulum pro 200 ml LB Kan Tet média, které bylo následně inkubováno na třepačce při 37 °C přes noc.

Druhý den bylo pomocí JETStar Plasmid Maxiprep kitu dle manuálu připraveno zásobní množství plasmidové DNA, jejíž čistota a koncentrace byla zjištěna spektrofotometricky a velikost zkontrolována agarosovou elektroforézou.

Vzorek DNA byl předán do DNA sekvenační laboratoře MBÚ AV ČR, v.v.i. pro kontrolu sekvence.

4.2 Produkce proteinů, izolace inkluzních tělísek a optimalizace refoldingu

4.2.1 Produkce proteinů a izolace inkluzních tělísek

Produkce proteinů a izolace inkluzních tělísek byla v případě Clrb i původního konstruktu NKR-P1D provedena již v rámci mé bakalářské práce a je popsána a diskutována tamtéž.^[220] V případě nového konstruktu NKR-P1D bylo využito identických protokolů a tyto zde tím pádem nebudou diskutovány.

4.2.2 Optimalizace renaturace

K renaturaci obou proteinů byla využita metoda rychlého naředění (rapid dilution) spočívající v pomalém přikapávání (přibližně 1 kapka za sekundu) roztoku denaturovaného proteinu do velkého nadbytku renaturačního pufru.^[222] Výchozí složení renaturačního pufru bylo vybráno na základě bohatých zkušeností Laboratoře Architektury Proteinů s *in vitro* renaturací CD69 a NKR-P1 molekul^[223, 224] a optimalizováno s ohledem na koncentraci

L-Argininu sloužícího jako nízkomolekulární chaperon.^[225] Složení pufrů využitých pro optimalizaci refoldingu je uvedeno v tabulce 7.

Purifikovaná inkluzní tělíska naprodukována bakteriální kulturou pěstovanou ve 200 ml LB média byla solubilizována ve 2 ml denaturačního pufru pro inkluzní tělíska a inkubována po dobu jedné hodiny při 40 °C. Směs byla následně centrifugována v ultracentrifuze Beckman LE80 (rotor 70.1 Ti) rychlostí 45 000 RPM při 20 °C po dobu 30 minut. Čtyři refoldingové pufrы o objemu 50 ml a složení uvedeném v tabulce 7 byly vychlazeny na 4 °C. Za stálého míchání při 4 °C byla do každého z nich zvolna přikapána čtvrtina supernatantu odděleného ultracentrifugací. Roztoky byly dále míchány a inkubovány jednu hodinu při 4 °C. Po uplynutí této doby byly roztoky převedeny do dialyzačních trubic a přes noc dialyzovány v nádobách obsahujících 8 l dialyzačního pufru při 4 °C. Dialyzační pufr byl po 4 hodinách vyměněn za čerstvý.

Tabulka 7: Složení denaturačních pufrů pro optimalizaci refoldingu:

pufr	1	2	3	4
Tris-HCl (mM) pH 9,0	50	50	50	50
CaCl ₂ (mM)	10	10	10	10
cysteamin (mM)	9	9	9	9
cystamin (mM)	3	3	3	3
NaN ₃ (mM)	1	1	1	1
L-Arginin (mM)	1000	750	500	250

Po ukončení dialýzy byly jednotlivé retenáty zakoncentrovány na přibližně 30 ml pomocí ultrafiltrační soupravy s membránou bránící průchodu částic větších než 10 kDa.

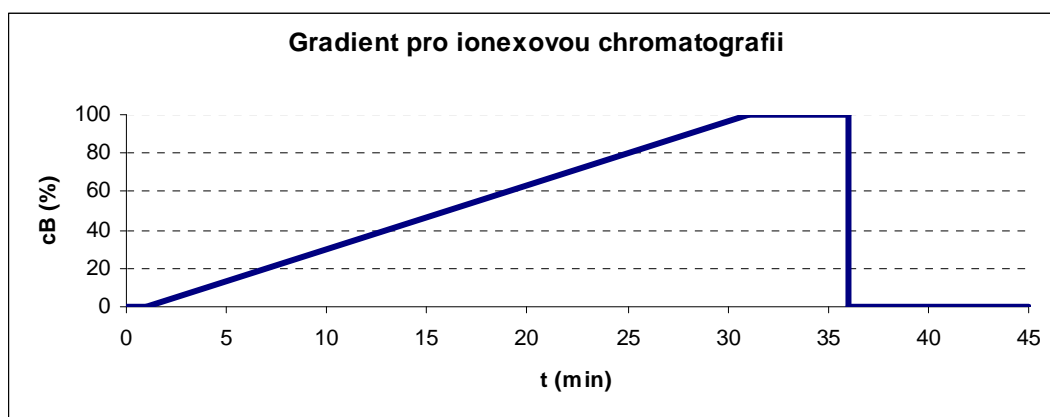
4.3 Chromatografická separace

4.3.1 Ionexová chromatografie

Ionexová, nebo též iontově výměnná chromatografie funguje na principu coulombických interakcí analytu s nosičem. Nosič obsahuje nabitě funkční skupiny, které interagují s nabitými funkčními skupinami analytu. V případě proteinů se jedná o interakci nabitých

postranních řetězců aminokyselin. Dochází tak k imobilizaci analytu na koloně. Zvýšení koncentrace iontů solí v mobilní fázi vede ke kompetici mezi těmito ionty a nabitými aminokyselinami o funkční skupiny nosiče, což způsobí narušení interakcí nosič-analyt a jeho eluci. V závislosti na síle interakce, pH a použitém nosiči má každý protein charakteristický eluční čas daný koncentrací kompetujících solí, která právě stačí pro jeho vytěsnění.^[226]

Zakoncentrované vzorky po dialýze byly naneseny na kolonu Q-Sepharosy FF o rozměrech 2 × 13,5 cm. Kolona byla připojena k HPLC systému Biosys 510 a předem ekvilibrována chromatografickým pufrům A pro ionexovou chromatografii. Po nanesení proteinu na kolonu byly nenavázané proteiny odmyty pufrům A a následně byla spuštěna eluce lineárním gradientem chromatografického pufru B pro ionexovou chromatografii (graf 1.) při rychlosti průtoku 3 ml/min. Detekce eluovaných proteinů byla prováděna fotometrickým detektorem při $\lambda = 280$ nm. Frakce obsahující proteiny byly jímány do zkumavek Falcon a následně koncentrovány pomocí centrifugačních koncentrátorů firmy Millipore.



Graf 1. Schéma elučního gradientu použitého při ionexové chromatografii.

4.3.2. Gelová filtrace

Gelová filtrace je separační metoda dělící makromolekulární látky na základě jejich odlišných molekulových hmotností. Kolona pro gelovou filtraci je vybavena porézním nosičem o určité velikosti pórů. Velikost pórů určuje, jak velké molekuly analytu budou moci těmito póry prostupovat, což určuje rozpětí molekulových hmot, které je daná kolona schopna separovat. Malé molekuly schopné vstupovat do pórů jsou tímto bržděny, zatímco velké molekuly prostupují pouze prostorem mezi částicemi nosiče a jsou tedy z kolony eluovány jako první.^[227]

Frakce najímané z ionexové chromatografie a zakoncentrované do objemu přibližně 300 μ l byly centrifugovány v centrifuze Z333K (rotor 221.10) rychlostí 25 000 RPM při laboratorní teplotě po dobu 20 minut, aby došlo k odstranění případných agregátů vzniklých v důsledku zvýšení koncentrace proteinů v roztoku během zahuštění. Supernatant byl následně pomocí stříkačky Hamilton nastříknut do HPLC systému Biosys 510 s připojenou kolonou Superdex S75 10/300GL o rozměrech 1 \times 30 cm, která byla předem ekvilibrována chromatografickým pufrům pro gelovou filtraci. Průtok byl 0,4 ml/min, proteiny v eluovaných frakcích byly detekovány fotometrickým detektorem při $\lambda = 280$ nm a jímány manuálně.

4.4 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Elektromigrační metody jsou používány pro separaci proteinů na základě jejich mobility v elektrickém poli, která je funkcí délky a molekulové hmotnosti polypeptidového řetězce. K odstínění vlastních nábojů některých aminokyselin a udělení uniformního záporného náboje se využívá SDS. Po nanesení na gel a aplikaci elektrického pole začnou proteiny putovat ke kladně nabitě elektrodě. Rychlost tohoto pohybu je funkcí odporu prostředí, který musí molekuly překonávat, tj. hustoty gelu.^[228] V současné době je obvykle používána diskontinuální modifikace klasické elektroforézy spočívající v použití zaostřovacího a separačního gelu o odlišných pH a velikosti pórů. Tento systém vede k zaostření všech proteinů v zaostřovacím gelu do jediné zóny, což zajišťuje větší přesnost rozdělení.^[229]

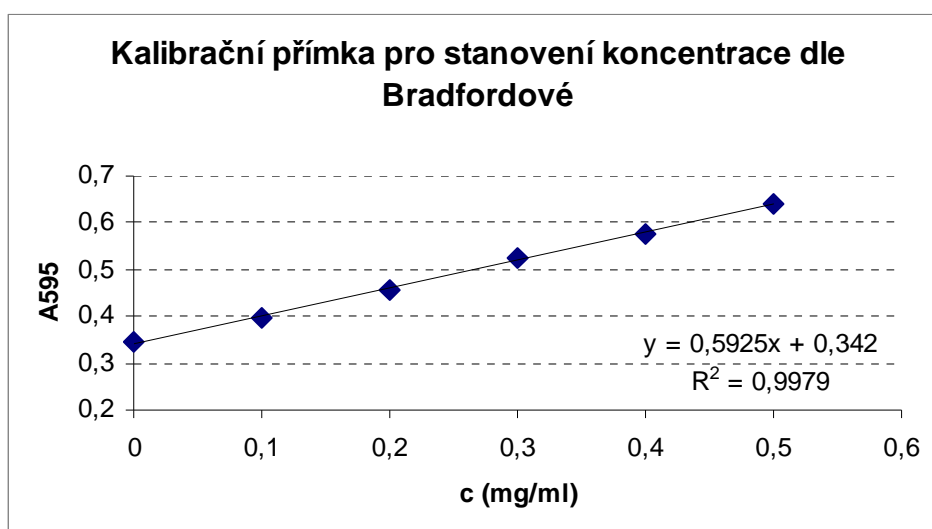
Gely pro SDS-PAGE byly připraveny podle předpisu uvedeného v tabulce 8 a vzorky pocházející z jednotlivých frakcí gelové filtrace byly připraveny pro analýzu v redukujícím i neredukujícím prostředí. 10 μ l vzorků bylo smíšeno s 10 μ l 2 \times koncentrovaného redukujícího nebo neredukujícího vzorkového pufru, směs byla pět minut povařena na vodní lázni a následně 2 minuty centrifugována ve stolní centrifuze Spectrafuge 16M rychlostí 12 000 RPM. Poté byly vzorky nanášeny na připravené gely a elektroforéza byla provedena při napětí nejprve 8 V/cm (hodnota vztažená na vertikální délku gelu) a po zaputování vzorků do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 15 V/cm. Po proběhnutí elektroforézy byl gel nejprve 20 minut ponechán v barvicím roztoku a následně byl odbarven několikerým promytím odbarvovacím roztokem.

Tabulka 8: Složení gelů pro SDS-PAGE:

složka	15% separační gel	5% zaostřovací gel
	V (ml)	
voda	2,3	1,4
rotok akrylamidu	5,0	0,33
1,5 M 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	0,002

4.5 Stanovení koncentrace proteinu ve vzorku dle Bradfordové

Metoda stanovení koncentrace proteinu ve vzorku dle Bradfordové je rychlá a jednoduchá kvantifikační metoda spočívající ve vazbě barvy Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu. Tato vazba způsobí posun absorpčního maxima barvy ze 465 nm na 595 nm. Změna absorbance při 595 nm je tedy funkcí koncentrace proteinu v roztoku. Pro vlastní měření je třeba připravit kalibrační řadu proteinových roztoků o daných koncentracích, na jejichž základě je poté možno za pomoci lineární regrese určit koncentraci vzorku neznámého (Graf 2.).^[230]



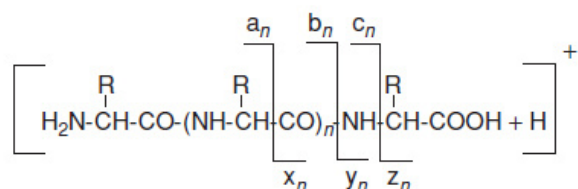
Graf 2. Příklad kalibrační přímky a regresní rovnice použitelné pro stanovení koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové.

V 96-ti jamkové destičce byla v duplikátech připravena kalibrační řada roztoků BSA o koncentracích 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml tak, že do každé jamky bylo napipetováno 200 μ l roztoku činidla dle Bradfordové a přidáno 5 μ l kalibračních roztoků o známých koncentracích. Analogicky byly v duplikátech pro měření připraveny vzorky, frakce najímané v průběhu gelové filtrace, které byly předtím analyzovány pomocí SDS-PAGE. Měření proběhlo v přístroji Sapphire Microplate reader, kde byla určena absorbance každé jamky při 595 nm. Na základě absorbancí kalibračních roztoků byla sestavena kalibrační přímka a podle rovnice regrese byla dopočítána koncentrace proteinů ve vzorcích.

4.6 Ověření identity proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je technika využívající vlivu působení pole na nabitě částice v závislosti na jejich hmotě. Výsledné hmotnostní spektrum je poté graf závislosti intenzity iontového proudu dopadajícího na detektor na hmotnosti iontů. Hmotnost je určena jako poměr m/z , kde m je hmotnost molekuly a z je náboj, který tato molekula nese. Nezbytnou podmínkou pro změření hmotnostního spektra molekuly tedy je, aby tato molekula měla náboj a byla v plynné fázi, tj. byla ionizovaná. Toto je důvodem, proč hmotnostní spektrometrie doznala výrazného rozmachu v analýze biologických makromolekul až v posledních desetiletích, ačkoliv samotná technika hmotnostní spektrometrie je známa podstatně déle. Možnost použití hmotnostní spektrometrie pro biopolymery se objevila teprve poté, co byly vyvinuty „měkké“ ionizační techniky schopné ionizovat molekuly biopolymerů aniž by docházelo k jejich destrukci. Tyto měkké ionizační techniky zahrnují především laserovou desorpci/ionizaci za přítomnosti matrice (MALDI)^[231] a ionizaci elektrosprejem (ESI)^[232], které jsou dnes obě hojně využívány. Vzhledem k obvykle značné velikosti molekul biopolymerů byl další podmínkou pro jejich měření vývoj analyzátorů, z nichž nejlepší jsou v současné době schopny měřit s chybou okolo 1ppm. Analyzátory obecně využívají velké množství fyzikálních principů od zakřivení dráhy nabitě částice při průchodu magnetickým či elektrickým polem (magnetický sektor, quadrupól) přes měření doby letu částice (TOF) až po pohyb iontů po cyklotronové orbitě (FT-ICR). Za nejpřesnější se v současné době považují právě přístroje využívající analyzátorů na bázi iontově cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR), případně orbitrap taktéž využívající Fourierovy transformace. Přístroje s FT analyzátory jsou vybaveny moduly pro izolaci a disociaci vybraného iontu. Tato

technika je známá jako MS/MS a umožňuje získat detailnější informace o složení molekul tím, že jsou naměřena spektra vzniklých fragmentů. K fragmentaci se nejčastěji využívá kolizí analyzovaných molekul s molekulami inertního plynu v kolizní cele. Vznikající fragmenty se podle své struktury označují jako a-, b-, c-, x-, y- a z- ionty (Obr. 21.).^[233]



Obr. 21. Schéma znázorňující strukturu jednotlivých iontů vznikajících během fragmentace. Přejato z [233].

V současné době jsou využívány dva přístupy ke strukturním analýzám proteinů za využití metod hmotnostní spektrometrie. Jedná se o tzv. „bottom-up“ a „top-down“ přístupy. V případě „bottom-up“ přístupu je molekula proteinu denaturována, redukována, definovaně modifikována, aby se zabránilo například náhodné reasociaci disulfidových můstků a nakonec rozštěpena na peptidy. Tato směs peptidů je následně analyzována za využití techniky označované jako LC/MS. Peptidy jsou separovány pomocí chromatografie na reversní fázi a on-line sprejovány z μ HPLC systému přímo do hmotnostního spektrometru. Na základě takto získaných výsledků se odvozuje identita původního proteinu, případně jeho další vlastnosti. Alternativou je „top-down“ přístup během něhož se analyzují celé molekuly proteinů případně velké peptidy.^[234]

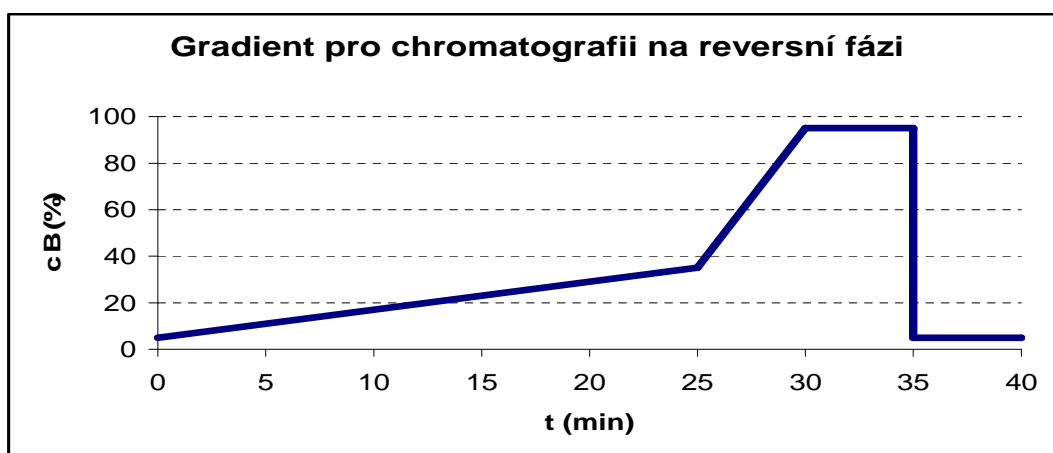
K určení molekulové hmotnosti intaktních proteinů bylo využito ESI-FT-ICR hmotnostního spektrometru. Kolona MicroTrap na bázi chromatografie s reversní fází byla ekvilibrována trojím promytím 1% HAc. Na takto ekvilibrovanou kolonu bylo nanášeno přibližně 10 μ g proteinu, který byl následně odsolen trojím promytím kolony 1% HAc. Odsolený protein byl z kolony eluován 50 μ l směsí 80% AcN s 5% HAc a pomocí ESI sprejován do FT-ICR hmotnostního spektrometru. K fragmentaci proteinů bylo využito srážek s atomy Ar v kolizní cele.

Za účelem využití „bottom-up“ přístupu k potvrzení identity obou proteinů byly oba proteiny nejprve separovány od případných kontaminací pomocí SDS-PAGE a po vizualizaci za použití Coomassie Brilliant Blue R-250 byly části gelů obsahující proteiny vyříznuty. Vyříznuté kousky gelů byly skalpelem rozřezány na kostičky přibližně 1 \times 1 \times 1 mm a odbarveny ve směsi 1:1 ethylmorfolin acetátu (pH 8,3) a AcN. Po odbarvení byly kostičky gelu vysušeny AcN a následně převrstveny 30 mM roztokem TCEPu v ethylmorfolin acetátu a inkubovány 5 minut při 90 °C. Po proběhnutí redukce byl roztok odebrán a kostičky gelu byly opět dehydratovány pomocí AcN. Vysušené kostičky byly následně převrstveny 30 mM roztokem IAA v ethylmorfolin acetátu a inkubovány 45 minut ve tmě při laboratorní teplotě.

Po proběhnutí alkylace byl roztok odebrán a kostičky gelu byly opět vysušeny AcN. Následovalo promytí vodou, opětovná dehydratace AcN a dosušení ve vakuové rotační odparce. Poté byly vysušené kostičky převrstveny štěpícími pufrů obsahujícími proteasy AspN, GluC a trypsin a byly inkubovány přes noc na vodní lázni při 37 °C v případě AspN a trypsinu a při laboratorní teplotě v případě GluC.

Následující den byla provedena extrakce naštěpených peptidů z gelu. Směsi byly 15 s centrifugovány ve stolní centrifuze MiniSpin rychlostí 14 000 RPM a supernatanty byly odebrány. Ke kostičkám gelu bylo následně přidáno 100 μ l 60% AcN a směsi byly sonikovány na vodní lázni po dobu 10 minut. Po další centrifugaci byly supernatanty přidány k příslušným dříve odebraným supernatantům a kostičky byly převrstveny 100 μ l 0,1% TFA. Byl opakován proces sonikace, centrifugace a odebrání a kostičky gelu byly nakonec opět převrstveny 100 μ l 60% AcN. Celý proces byl zopakován a roztoky vzniklé spojením postupně odebraných supernatantů byly odpařeny ve vakuové rotační odparce.

Po vysušení byly sedimenty resuspendovány v 10 μ l roztoku 80% AcN a 5% HAc a doplněny na 200 μ l 1% HAc. Za využití peptidového MicroTrapu byly vzorky odsoleny postupem popsaným výše a postupně analyzovány technikou LC/MS za využití separace na μ HPLC Agilent 1200 s kolonou MAGIC C18-AQ 0,2 \times 150 mm s reversní fází. Vzorky byly nanášeny v chromatografickém pufru A pro chromatografii na reversní fází a eluovány gradientem pufru B (Graf 3.) při průtoku 4 μ l/min. Jednotlivé eluované frakce byly on-line sprejovány do hmotnostního spektrometru. Výsledná spektra byla analyzována pomocí softwaru DataAnalysis 4.0 firmy Bruker Daltonics.



Graf 3. Schéma elučního gradientu použitého při chromatografii na reversní fází.

4.7 Ověření kvality renaturace obou proteinů

4.7.1 Kontrola zapojení S-S můstků pomocí hmotnostní spektrometrie

Disulfidické můstky se účastní tvorby a udržení sekundární struktury proteinů a uniformita jejich zapojení je proto důležitým indikátorem kvality složení proteinů. Za využití protokolu využívajícího modifikované elektroforézy a štěpících podmínek je možno díky hmotnostní spektrometrii identifikovat peptidy, které jsou po enzymatickém štěpení spojeny disulfidovými můstky a identifikovat tak pozice cysteinů, které jsou takto vázány.^[235]

Proteiny byly nejprve separovány od případných kontaminací pomocí SDS-PAGE v neredukujícím prostředí a zóny obsahující proteiny byly z gelu vyříznuty a rozřezány na kostičky. Proces enzymatického štěpení, extrakce, odsolení a analýzy proběhl analogicky k postupu uvedenému výše, jen bez redukčních a alkylačních kroků. Zásadní modifikací byla přítomnost 200 μ M cystaminu jako oxidačního činidla ve všech použitých pufrech.

4.7.2 Kontrola monodisperze foldů pomocí 2D NMR

Technika nukleární magnetické rezonance našla ve strukturní biologii, vzhledem k velikosti a komplexitě molekul, uplatnění především ve formě dvou a třídímních experimentů. Obecně platí, že aby molekula byla viditelná v NMR spektru, musí obsahovat atomy s NMR aktivními jádry. NMR aktivní jádro má nenulový spinový moment hybnosti, a aby bylo použitelné, musí mít také dostatečně velký gyromagnetický poměr γ . V proteinech se z takovýchto prvků přirozeně vyskytuje ^1H , ^{13}C a ^{15}N . Zatímco první zmíněný je dominantním izotopem, druhé dva se vyskytují pouze ve stopových množstvích a pokud mají být využitelné, je nutné jimi testovanou biomakromolekulu uměle nabohatit. K tomuto účelu se v případě rekombinantních proteinů produkovaných v bakteriích využívá M9 minimální médium, kde NH_4Cl a glukosa jsou jedinými zdroji dusíku a uhlíku. V případě použití $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ a ^{13}C glukosy veškeré proteiny, které bakterie vyprodukuje, jsou téměř 100% nabohaceny o tyto izotopy. Jedním z nejrozšířenějších a nejjednodušších NMR experimentů určených pro proteiny je $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) experiment, jehož výsledkem je 2D spektrum s jednou osou pro ^1H a druhou pro ^{15}N . Ve spektru je pak vidět jeden signál za každý vodík navázaný na dusík, který je součástí amidové vazby, ačkoliv aminoskupiny obsažené v některých aminokyselinách také přidávají signály. U monodisperzně a kompaktně složeného proteinu jsou všechny signály obvykle dobře rozlišené a je možno pozorovat navíc i tyto signály odpovídající aminokyselinám, které obsahují další

aminoskupinu – tryptofan v levé dolní části spektra, lysin, asparagin a glutamin vpravo nahoře a arginin uprostřed mírně nahoře.^[236]

Za účelem získání ¹⁵N nabohacených proteinů pro měření 2D-NMR experimentu byly oba proteiny naprodukovány v *E. coli* rostoucích na M9 minimálním médiu, kde ¹⁵NH₄Cl byl jediným zdrojem dusíku. Proteiny naprodukované ve formě inkluzních tělísek byly zpracovány stejným postupem, jaký byl použit i pro neznačené proteiny, a který je popsán výše. Purifikované proteiny byly zakoncentrovány na přibližně 0,5 mM a jejich ¹H/¹⁵N-²D HSQC spektra byla naměřena na NMR spektrometru Bruker Avance III 600 MHz vybaveným TCI kryosondou ve spolupráci s Dr. Josefem Chmelíkem. Těsně před experimentem byla ke vzorkům přidána D₂O do celkové koncentrace 10 %.

4.8 Funkční testy

4.8.1 Gelová filtrace na μ HPLC SMART

Princip gelové filtrace byl již diskutován v odstavci 4.3.2. S ohledem na to, co bylo řečeno, je zřejmé, že komplex dvou proteinů bude mít odlišný eluční čas než proteiny samotné a v případě tvorby stabilního komplexu dojde tedy v chromatogramu k vytvoření nového absorpčního maxima.

7 μ g Clrb bylo v chromatografickém pufru pro gelovou filtraci o celkovém objemu 12 μ l smíšeno se 7 μ g NKR-P1D, což odpovídá finální koncentraci obou proteinů 40 μ M a tedy vzájemnému molárnímu poměru 1:1. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Následně byl vzorek nastříknut do μ HPLC systému SMART s analytickou kolonou Superdex 75 PC3.2/30 o rozměrech 0,32 \times 30 cm ekvilibrovanou chromatografickým pufrům pro gelovou filtraci. Průtok byl 50 μ l/min. Jako kontrola byla použita přibližně stejná množství obou proteinů bez interakčního partnera.

Identický experiment byl zopakován v prostředí 10 mM HEPES pufru o pH 7,4 se 150 mM NaCl a 1 mM NaN₃.

4.8.2 Analytická ultracentrifuga

Princip analytické ultracentrifugace jako metody pro zjištění některých vlastností molekul v roztoku byl popsán již v roce 1925 Theodorem Svedbergem. Od té doby, ačkoliv instrumentace doznala značného vývoje, tento princip zůstal beze změny. Monitorováním

sedimentace makromolekul v závislosti na působící odstředivé síle analytická ultracentrifugace umožňuje získat informace o hydrodynamických a termodynamických vlastnostech molekul přímo v roztoku bez nutnosti imobilizace či jakékoliv interakce s povrchem. V současné době se používají dva typy experimentů – měření sedimentační rychlosti a měření sedimentační rovnováhy makromolekul.

Měření sedimentační rychlosti využívá vysoké rychlosti rotace a měří se koncentrační profily makromolekul v radiálním směru jakožto funkce času. Výsledkem takového měření je distribuční funkce sedimentačních koeficientů. Této techniky se využívá především pro identifikaci stavů oligomerie vzorků, případně stechiometrie interakcí.

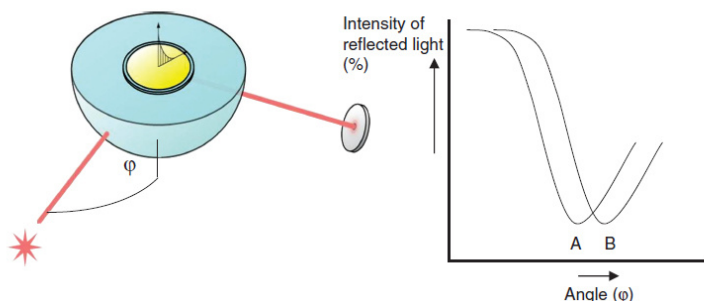
Sedimentační rovnováha naproti tomu využívá nižší rychlosti rotace a takovéto experimenty trvají ve srovnání se sedimentační rychlostí podstatně déle. Konečným stavem je vyrovnání sedimentace makromolekul a difuze vedoucí k ustavení rovnováhy pozorovatelné ve formě neměnné distribuce koncentrací makromolekul v rámci kyvety. Této techniky je možné využít především pro stanovení molekulové hmoty makromolekul a jejich komplexů.^[237]

Ke zjištění v jaké oligomerní formě se proteiny Clrb a NKR-P1D vyskytují v roztoku a ověření zda spolu interagují za vzniku komplexu bylo využito techniky sedimentační rychlosti. Přibližně 0,5 ml roztoků obou proteinů i jejich směsi o takové koncentraci, aby jejich absorbance při $\lambda = 280 \text{ nm} \sim 0,5$ bylo převedeno dialýzou do 10 mM HEPES pufru o pH 7,4 obsahujícího 150 mM NaCl a 1 mM NaN_3 . Experiment byl proveden v analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I s rotorem An 50 Ti při rychlosti 48 000 RPM na katedře biochemie PŘF UK Mgr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D. Bylo naměřeno celkem 60 scanů v pětiminutových intervalech. K určení nezbytných parametrů vzorku bylo využito volně dostupného programu Sednterp 1.09 (<http://www.jphilo.mailway.com/default.htm>) a naměřená data byla vyhodnocena pomocí volně dostupného programu SEDFIT (<http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>). Spočtené parametry byly následující: hustota $\rho = 1,00520 \text{ g/l}$, viskozita $\eta = 1,0020 \cdot 10^{-2} \text{ P}$ a partiální specifický objem $v = 0,7188 \text{ ml/g}$.

4.8.3 Povrchová plasmonová resonance

Během posledních 20 let se povrchová plasmonová resonance vyvinula z obskurního fyzikálního fenoménu do metodiky využívané pro fyzikální, chemický i biologický výzkum. Principem metody je detekce změny velikosti částic (například díky interakci s jinou molekulou z roztoku) imobilizovaných na povrchu čipu, na který je z druhé strany vysílán

intenzivní paprsek polarizovaného světla. Když tento paprsek dopadá na spodní stranu čipu, podle zákona lomu se odráží pod stejným úhlem do detektoru. V závislosti na úhlu, pod



Obr. 22. Schéma základního SPR experimentu. Intenzita odraženého světla je závislá na úhlu odrazu. Změna indexu lomu prostředí na povrchu čipu způsobí posun úhlů odpovídajících maximu i minimu intenzity odraženého světla z A na B. Přejato z [238].

kterým se odráží dochází ale ke změně intenzity odraženého světla (Obr.22.). Tento rozdíl je způsoben vytvořením takzvané evanescentní vlny nebo též pole prostupujícího materiálem čipu. Aby k tomuto jevu došlo, musí být splněny některé fyzikální podmínky pramenící z toho, že

dielektrická konstanta materiálů je ve své podstatě komplexním číslem. Konkrétně je nutné, aby dielektrická konstanta kovu tvořícího čip byla záporná a její velikost musí být větší než velikost dielektrické konstanty sousedního prostředí. Tato podmínka je pro rozhraní kov/vzduch a kov/puftr obvykle splněna pro vzácné kovy jako zlato a stříbro a světlo o vlnové délce spadající do infračervené oblasti. Toto je důvodem, proč se běžně využívají zlaté čipy a IR lasery. Vlastnosti evanescentního pole jsou ovlivněny změnou indexu lomu na povrchu čipu, což zpětně ovlivňuje i intenzitu odraženého světla (viz obrázek 22). Permeace evanescentního pole do prostředí sousedícího s čipem je v řádu poloviny vlnové délky použitého excitačního světla, což vysvětluje senzitivitu SPR vůči povrchově vázaným molekulám a absenci rušení od molekul, které zůstávají v roztoku.^[238]

K naměření SPR dat bylo využito senzorových čipů vyvinutých na Ústavu Fotoniky a Elektroniky Akademie věd ČR, v.v.i. a procesu imobilizace proteinů využívajícího NHS chemie. Na povrch čipu byla aplikována směs C_{11} a C_{16} alkanthiolů rozpuštěných v ethanolu do finální koncentrace 1 mM. C_{16} alkanthioly byly vybaveny karboxylovými skupinami určenými k imobilizaci proteinů, zatímco C_{11} alkanthioly byly zakončeny diethylenglykolovými skupinami a tvořily pozadí. Takto ošetřený čip byl uskladněn 2 dny ve tmě při pokojové teplotě, aby došlo k ustavení monovrstvy (Self Assembled Monolayer). Následně byl čip opláchnut ethanolem a deionizovanou vodou. Terminální karboxylové skupiny C_{16} alkanthiolů byly poté aktivovány do podoby reaktivních N-hydroxysukcinimidových esterů pomocí

N,N,N',N'-tetramethyl-O-(N-sukcinimidyl)uronium tetrafluoroborátu, do jehož roztoku o koncentraci 2 mg/ml byl čip ponořen po dobu jedné hodiny. Poté byl čip usušen a ihned použit k měření. Imobilizace proteinu byla prováděna *in situ* po dobu 35 minut při koncentraci proteinu v pufru 10 µg/ml a při třech různých podmínkách: sodium acetátový pufr o pH 4, sodium acetátový pufr o pH 5 a citrátový pufr o pH 4. Cela byla následně promyta pufrům obsahujícím BSA, aby došlo k deaktivaci případných nezreagovaných aktivovaných karboxylových skupin.^[239] Povrchy s imobilizovaným proteinem Clrb byly následně vystaveny citrátovému pufru o pH 4,0 nebo PBS o pH 7,4 obsahujícím 25 µg/ml NKR-P1D při průtoku celou 30 µl/min.

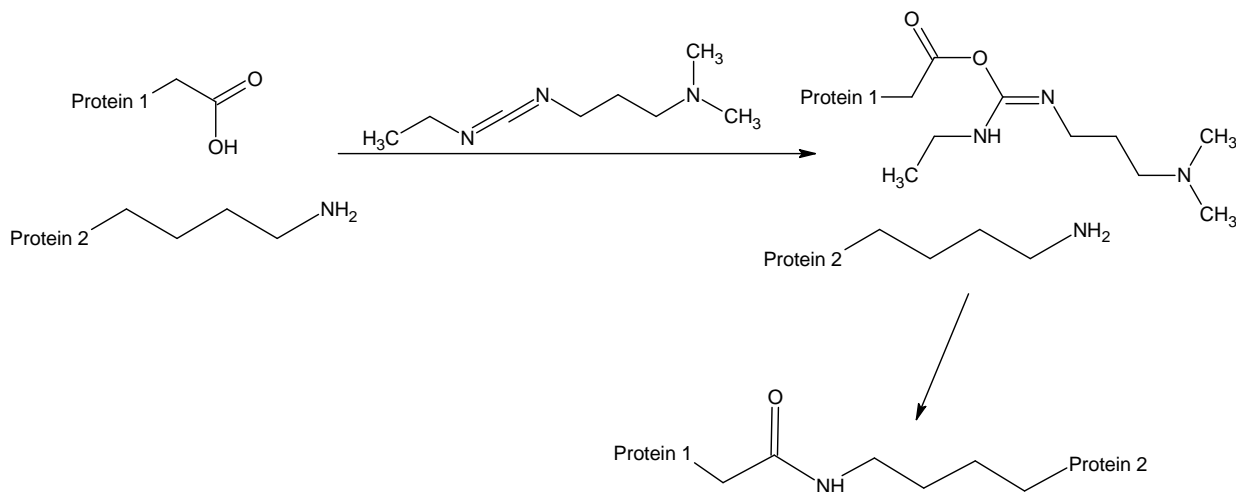
Veškerá práce byla provedena na Ústavu fotoniky a elektroniky AVČR, v.v.i. díky ochotě Prof. Homoly a Dr. Šípové. Data byla naměřena na přístroji postaveném tamtéž.

4.9 Chemické zesíťení proteinů

Metody chemického zesíťení proteinů byly vyvinuty jako rychlá metoda pro získání strukturní informace o nízkém prostorovém rozlišení, zpřesnění homologních modelů, případně získání informací o interakčních partnerech. Princip metody spočívá ve využití homo- či heterobifunkčních činidel schopných specificky reagovat s určitými aminokyselinami, a tak spojit konkrétní místa ve struktuře proteinu. Data takto získaná jsou označována jako „distal constraints,“ tzn. rozmezí vzdáleností, ve kterých se dané aminokyseliny mohou nacházet. Existuje velké množství různých typů síťovacích činidel zahrnující například N-hydroxysukcinimidyl estery, imidoestery, karbodiimidy, aryl azidy a mnohá další. Podobně jako bylo diskutováno už v odstavci 4.6. existují dva základní přístupy – „bottom-up“ a „top-down.“ „Bottom-up“ přístup spočívá v enzymatickém štěpení zesíťených proteinů s následnou chromatografickou separací vzniklých peptidů a identifikací těch peptidů, které jsou spojeny síťovacím činidlem na základě jejich přesných hmot. „Top-down“ přístup využívá možnosti izolovat ion odpovídající zesíťovaným proteinům přímo v hmotnostním spektrometru, různými technikami jej fragmentovat a z takto získaných spekter získat strukturní informaci.

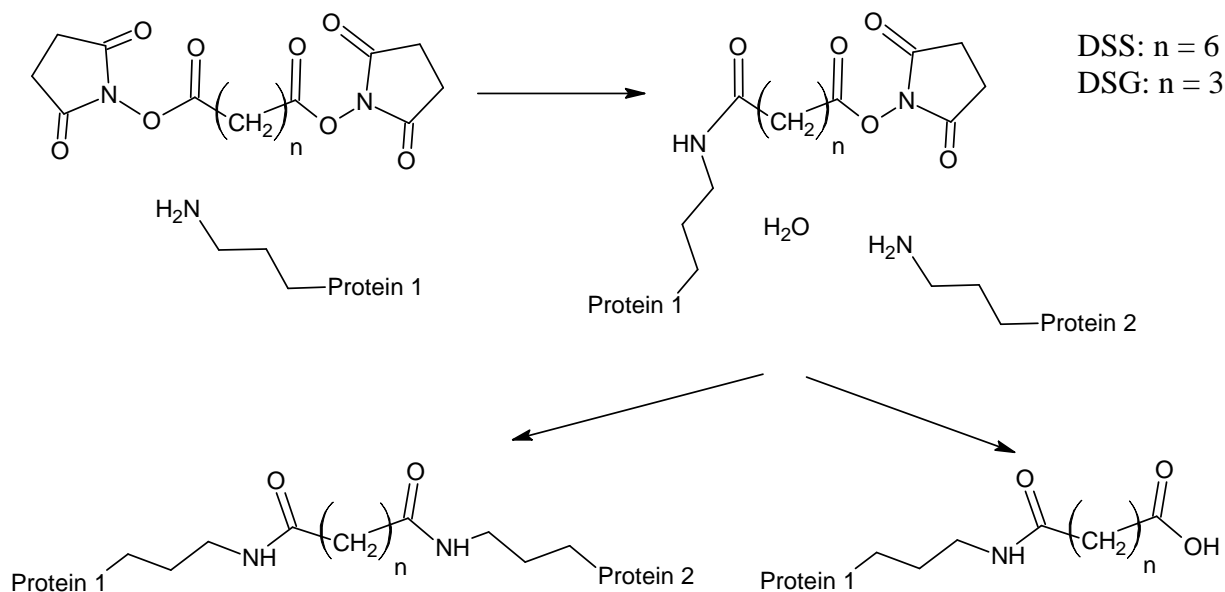
V našem případě jsme použili „bottom-up“ přístup a tři různých síťovacích činidel: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC), disukcinimidyl glutarát (DSG) a disukcinimidyl suberát (DSS).

EDC je heterobifunkční činidlo sítující aminoskupinu lysinu s karboxylovou skupinou kyseliny glutamové nebo asparagové (Obr. 23.). EDC bývá také označováno jako „zero-length cross-linker,“ protože není vybaveno žádným raménkem a spojuje tedy pouze aminokyseliny, které jsou v bezprostřední blízkosti.



Obr. 23. Schéma reakce EDC s funkčními skupinami příslušných aminokyselin.

DSG i DSS jsou homobifunkční činidla interagující s aminoskupinami lysinů (Obr. 24.). Obě činidla jsou vybavena raménkem, které má délku $7,4 \text{ \AA}$ v případě DSG a $11,4 \text{ \AA}$ v případě DSS. To znamená, že vzhledem k mobilitě postranních řetězců aminokyselin jsou tato činidla schopna sítovat aminokyseliny do vzdálenosti přibližně 16 \AA , respektive 20 \AA . [240, 241]



Obr. 24. Schéma reakce DSS a DSG s funkčními skupinami příslušných aminokyselin.

4.9.1 Optimalizace koncentrace síťovacích činidel

V zájmu minimalizace pravděpodobnosti nespecifického zesítnění, je vhodné optimalizovat množství použitých síťovacích činidel i proteinů tak, aby jejich použité koncentrace byly co nejmenší. Přitom je však nutné, aby v průběhu reakce během daného časového úseku vzniklo dostatečné množství zesítněných produktů.

550 μg každého z proteinů bylo pomocí gelové filtrace převedeno do pyridinového síťovacího pufru a oba roztoky byly zahuštěny do výsledné koncentrace proteinů 1 mg/ml. Z obou takto zakonzentrovaných roztoků proteinů bylo odebráno čtyřikrát po 50 μl a tyto alikvoty byly spojeny, takže vznikly 4 alikvoty o objemu 100 μl obsahující oba proteiny, každý o koncentraci 0,5 mg/ml. Do prvních třech zkumavek bylo přidáno EDC, aby jeho celková molární koncentrace byla 100 \times , 200 \times a 500 \times vyšší než koncentrace proteinů. K poslednímu vzorku činidlo přidáno nebylo a vzorek sloužil jako kontrola.

Zbývajících 350 μg obou proteinů v pyridinovém pufru bylo převedeno do triethylamoniumkarbonátového síťovacího pufru a opět zakonzentrováno na 0,5 mg/ml. Proteiny byly rozděleny na alikvoty stejné jako bylo popsáno výše, ke třem bylo přidáno DSG a ke třem DSS. Množství obou síťovacích činidel byla volena tak, aby jejich celková molární koncentrace byla 2 \times , 5 \times a 10 \times vyšší než koncentrace proteinů. Poslední vzorek opět sloužil jako kontrola.

Reakce s DSS a DSG probíhaly po dobu 1 hodiny a byly následně ukončeny přidáním Tris-HCl do výsledné koncentrace 50 mM. Reakce s EDC probíhaly po dobu 5 hodin a poté byly zastaveny stejným způsobem.

Z reakčních směsí bylo odebráno po 15 μl , které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.9.2. MS analýza zesítněných peptidů

Na základě informací zjištěných během optimalizace koncentrace síťovacích činidel bylo možno přistoupit k zesítnění většího množství proteinů za účelem naměření dat. Při vybraných podmínkách bylo síťováno po 100 μg od každého z proteinů v každé reakci. Po ukončení reakcí byly reakční směsi rozděleny pomocí SDS-PAGE na gradientových NuPAGE 4 – 12% Bis-Tris gelech.

Proteinové zóny odpovídající dimerům byly vyříznuty a podle protokolu popsaného v kapitole 4.6 byly vzorky připraveny pro LC/MS analýzu. Jako kontroly byly použity monomery, které prošly síťovací reakcí a proteiny, které zesítněny vůbec nebyly. Před vlastní LC/MS analýzou bylo 0,8 μl od každého vzorku nakápnuto na MALDI terč. Zaschlé vzorky

byly poté převrstveny 0,8 µl roztoku matrice připraveného jako směs nasyceného roztoku CCA s AcN a TFA v poměru 1 : $\frac{1}{3}$: $\frac{2}{3}$. Po zaschnutí byly vzorky zkontrolovány pomocí hmotnostního spektrometru s MALDI ionizací, aby před začátkem LC/MS analýzy bylo jisté, že směs obsahuje peptidy z obou proteinů, a má tedy smysl ji dále analyzovat.

Vlastní data naměřená během LC/MS byla analyzována pomocí softwaru DataAnalysis 4.0 firmy *Bruker Daltonics* a Links (<http://MS3D.org>) za využití dvou odlišných přístupů k exportu dat. Všechny softwarem identifikované signály odpovídající zesíťovaným peptidům byly manuálně zkontrolovány proti kontrolám a potvrzeny.

4.10 Příprava homologních modelů NKR-P1D a Clrb

Homologní modely byly připraveny Dr. Josefem Chmelíkem na základě nedávno rozřešených a dosud nepublikovaných struktur Clrg a NKR-P1A získaných rentgenovou difrakcí a dříve publikovaného homologního modelu NKR-P1A. Sekvenční identita proteinů je 76 % v případě Clrb a Clrg a 86 % v případě NKR-P1D a NKR-P1A.

Sekvenční srovnání vytvořená webovou aplikací ClustalW (dostupnou z <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) jsou zobrazena níže:

```

Clrg  NKTYYAACSKNWTGVGNKCFYFSGYPRNWTFAQAFCAQEAQLARFDNEEELIFLKRFGD 60
Clrb  NKTYYAACPNWIGVENKCFYFSEYPSNWTFAQAFCAQEAQLARFDNDELNFLMRYKAN 60
*****.:** ** ***** ** *****:.* ** *:.:

Clrg  FDCWIGLHRESSEHPWKWTNNTTEYNNMNPILGVGRYAYLSSDRISSSRSYINRMWICKL 120
Clrb  FDSWIGLHRESSEHPWKWTDNTEYNNTIPIRGEERFAYLNNNGISSTRIYSLRMWICKL 120
**.* *****:***** ** * *:.***.: **:* * *****

Clrg  N 121
Clrb  N 121
      *
```



```

NKR-P1A  SAKLECPQDWLSHRDKCFHVSQVSNTWEEGLVDCDGKGATLMLIQDQEELRFLLDSIKEK 60
NKR-P1D  SAKLECPQDWLSHRDKCFHVSQVSNTWKESRIDCDKKGATLLLLIQDQEELRFLLDSIKEK 60
*****
*****:*. :*** *****:*****

NKR-P1A  YNSFWIGLRYTLPDMNWKWINGSTLNSDVLKITGDTENDSCAAISGDKVTFESCNSDNRW 120
NKR-P1D  YNSFWIGLSYTLTDMNWKWINGTAFNSDVLKITGVTENGSCAAISGEKVTSEGCSSDNRW 120
*****
***** ***.*****:.:***** ***.*****:*** *.* *****

NKR-P1A  ICQKELN 127
NKR-P1D  ICQKELN 127
*****

```

Homologní modely obou proteinů a posléze i interagujícího páru dimerů NKR-P1D a Clrb byly vytvořeny pomocí volně dostupných programů Modeller (dostupný z <http://www.salilab.org/modeller/>) a Swiss-Model (dostupný z <http://swissmodel.expasy.org/>). Tyto modely však neprošly žádnou sofistikovanou validací či refinementem a jejich úkolem není poskytnout exaktní strukturní informace, ale pouze sloužit jako platforma, na níž mohou být vizualizována data získaná chemickým zesíťením proteinů.

5. Výsledky

Celá tato práce se zabývá rekombinantně připravenými proteiny odpovídajícími částem extracelulárních domén receptorů NKR-P1D a Clrb. Předtím než bude přistoupeno k vlastním výsledkům, domnívám se, že bude vhodné uvést sekvence celých receptorů a některé základní charakteristiky proteinů, s nimiž bylo pracováno.

NKR-P1D:

MDSTTLVYAD LNLARIQEPK HDSPPSLSPD TCRCPRWHRL ALKFGCAGLI
LLVLVIGLC VLVLSVQKSS VQKICADVQE NRTHTTGCSA KLECPQDWLS
HRDKCFHVSQ VSNTWKECRI DCDKKGATLL LIQDQEELRF LLDSIKEKYN
SFWIGLSYTL TDMNWKWING TAFNSDVLKI TGVTENGSCA AISGEKVTSE
GCSSDNRWIC QKELNHETPC NDS

Zeleně je znázorněna cytoplasmatická doména s **červeně** vyznačeným ITIMem. **Černě** transmembránová doména, **modře** extracelulární doména s **fialově vyznačenou** C-lektinovou doménou. Podtržením je znázorněna sekvence původního konstruktů připraveného v rámci bakalářské práce.

Protein, s nímž bylo v rámci této diplomové práce pracováno, je tedy vymezen aminokyselinami $^{89}\text{S} - ^{215}\text{N}$ a jeho sekvence je:

SAKLECPQDW LSHRDKCFHV SQVSNTWKE**S** RIDCDKKGAT LLLIQDQEEL
RFLLSIKEK YNSFWIGLSY TLTDMNWKWI NGTAFNSDVL KITGVTENGS
CAAISGEKVT SEGGCSSDNRW **IC**QKELN

Oproti původnímu konstruktů byl cystein na pozici 118 nahrazen serinem (žlutě zvýrazněn) a 8 C-terminálních aminokyselin bylo odstraněno.

Monoizotopická molekulová hmotnost tohoto proteinu při redukovaných cysteinech (SH) činí 14 490,05 Da a průměrná 14 499,35 Da. Při zapojených disulfidových můstcích (SS) činí monoizotopická hmotnost 14 484,01 Da a průměrná 14 493,3 Da. Teoretické pI je 5,4.

Clrb:

MCVTKASLPM LSPTGSPQEV EVGKILQGKR HGTISPESCA KLYCYYGVIM
VLTVAVIALS VALSATKTEQ IPVNKTYAAC PQNWIGVENK CFYFSEYPSN
WTFAQAFCMA QEAQLARFDN QDELNFLMRY KANFDSWIGL HRESSEHPWK
WTDNTEYNNT IPIRGEERFA YLNNGISST RIYSLRMWIC SKLNSYSLHC
QTPFFPS

Zeleně je znázorněna cytoplasmatická doména, **černě** transmembránová doména, **modře** doména extracelulární s **fialově vyznačenou** C-lektinovou doménou. Podtržením je znázorněna sekvence produkovaného proteinu. Konstrukt kódující tento protein byl připraven v rámci bakalářské práce a v průběhu diplomové práce nedoznal žádných změn.

Protein, s nímž bylo v rámci této diplomové práce pracováno, je tedy vymezen aminokyselinami $^{74}\text{N} - ^{194}\text{N}$ a jeho sekvence je:

MNKTYAAC**PQ** NWIGVENK**CF** YFSEYPSNWT **FAQAF****CMAQE** AQLARFDN**QD**
ELNFLMRYKA NFD**SWIGLHR** ESSEHPWKWT DNTEYNNT**IP** IRGEER**FAYL**
NNNGIS**STRI** YSLRMW**ICSK** LN

Jak bylo ověřeno již Edmanovým odbouráváním v rámci bakalářské práce i hmotnostní spektrometrií v rámci práce diplomové, bakteriální buňky při expresi tohoto proteinu neodštěpují iniciační methionin, který tím pádem zůstává součástí proteinu jako jeho N-terminální aminokyselina.

Monoizotopická molekulová hmotnost tohoto proteinu při redukovaných cysteinech (SH) činí 14 581,81 Da a průměrná 14 591,36 Da. Při zapojených disulfidových můstcích (SS) činí monoizotopická hmotnost 14 577,78 Da a průměrná 14 587,33 Da. Teoretické pI je 6,1.

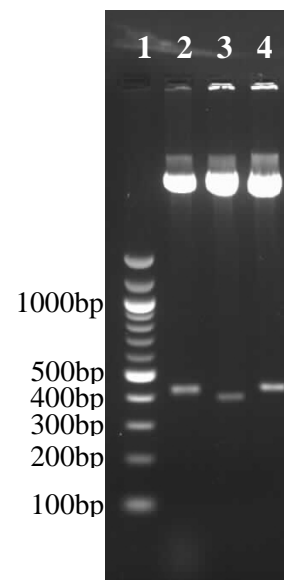
Molekulové hmotnosti byly určeny pomocí programu GPMAW firmy *Lighthouse Data* a teoretické pI bylo vypočteno online na stránkách proteomického serveru ExPASy (<http://expasy.org/>).

5.1 Úprava konstruktů NKR-P1D

5.1.1 Zavedení bodové mutace do konstruktů kódujících NKR-P1D

Bodová mutace do původního konstruktů byla zavedena pomocí PCR reakce s využitím mutačních primerů a následnou amplifikací nově vzniklého konstruktů postupem popsaným v odstavci 4.1.1.

Pro kontrolu zásobní plasmidové DNA získané v posledním kroku metodou midipreparativní izolace bylo použito restriktivního štěpení a elektroforetické separace v 1% agarosovém gelu. Fotografie tohoto gelu je vyobrazena na obrázku 25. Je vidět, že nový konstrukt (dráhy 3 a 4) má stejnou velikost jako konstrukt původní (dráha 2), a sice přibližně 410 párů bazí. Posun mezi dráhami 3 a 4 je způsoben použitím různých restriktivních endonukleas, jejichž štěpící místa na vektoru jsou v různé vzdálenosti od okrajů insertu.



Obr. 25. Fotografie gelu využitého ke kontrole DNA získané metodou midiprepu.

dráha 1: 100 bp marker

dráha 2: původní konstrukt NKR-P1D štěpený *XbaI* + *HindIII*

dráha 3: nový konstrukt NKR-P1D štěpený *NdeI* + *HindIII*

dráha 4: nový konstrukt NKR-P1D štěpený *XbaI* + *HindIII*

5.1.2 Zkrácení konstruktů kódujících NKR-P1D

Ke zkrácení konstruktů NKR-P1D bylo použito PCR reakce dle postupu popsaného v odstavci 4.1.2. Velikost PCR produktu byla ověřena elektroforézou a odpovídala předpokládané hodnotě 390 párů bazí (Obr. 26.).

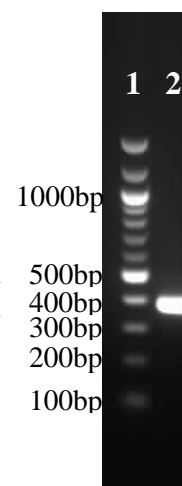
PCR produkt byl „na tupo“ ligován do plasmidového vektoru pBS, který umožňuje selekci správně zaligovaných vektorů. Pokud ligace proběhne, vložení insertu přerušuje gen kódující α podjednotku lacZ proteinu. V genomu kmenu *E. coli* použité pro

transformaci je kódována Ω podjednotka a tyto dvě podjednotky dohromady vytvoří funkční β -galaktosidasu. Bakterie transformované plasmidem, do něhož neproběhla úspěšně ligace tedy exprimují tento enzym a jsou schopny štěpit chromogenní substrát (X-Gal) přidaný do

Obr. 26. Fotografie gelu využitého pro kontrolu velikosti PCR produktu.

dráha 1: 100 bp marker

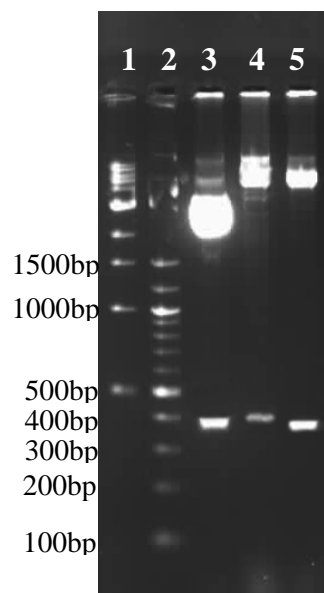
dráha 2: PCR produkt



média. Kolonie takovýchto bakterií jsou potom modré, zatímco kolonie klonů obsahujících vektor s úspěšně zaligovaným insertem jsou bílé.

Po ligaci, transformaci, výběru úspěšně transformovaných klonů a amplifikaci plasmidové DNA byl insert překlonován do produkčního vektoru pET30a(+) a tento nový konstrukt byl amplifikován postupem uvedeným v odstavci 4.1.2.

Nový konstrukt byl po maxiprepu, posledním kroku celého procesu, zkontrolován restričním štěpením (Obr. 27.). Je vidět, že insert překlonovaný z pBS vektoru (dráha 3) do pET vektoru (dráha 5) je menší než insert původní (dráha 4) a má velikost přibližně 390 párů bazí.



Obr. 27. Fotografie gelu využitého pro kontrolu DNA získané metodou maxiprep.

dráha 1: 1 kb marker

dráha 2: 100 bp marker

dráha 3: zkrácený konstrukt NKR-P1D v pBS vektoru štěpený *NdeI* + *HindIII*

dráha 4: původní konstrukt NKR-P1D v pET vektoru štěpený *NdeI* + *HindIII*

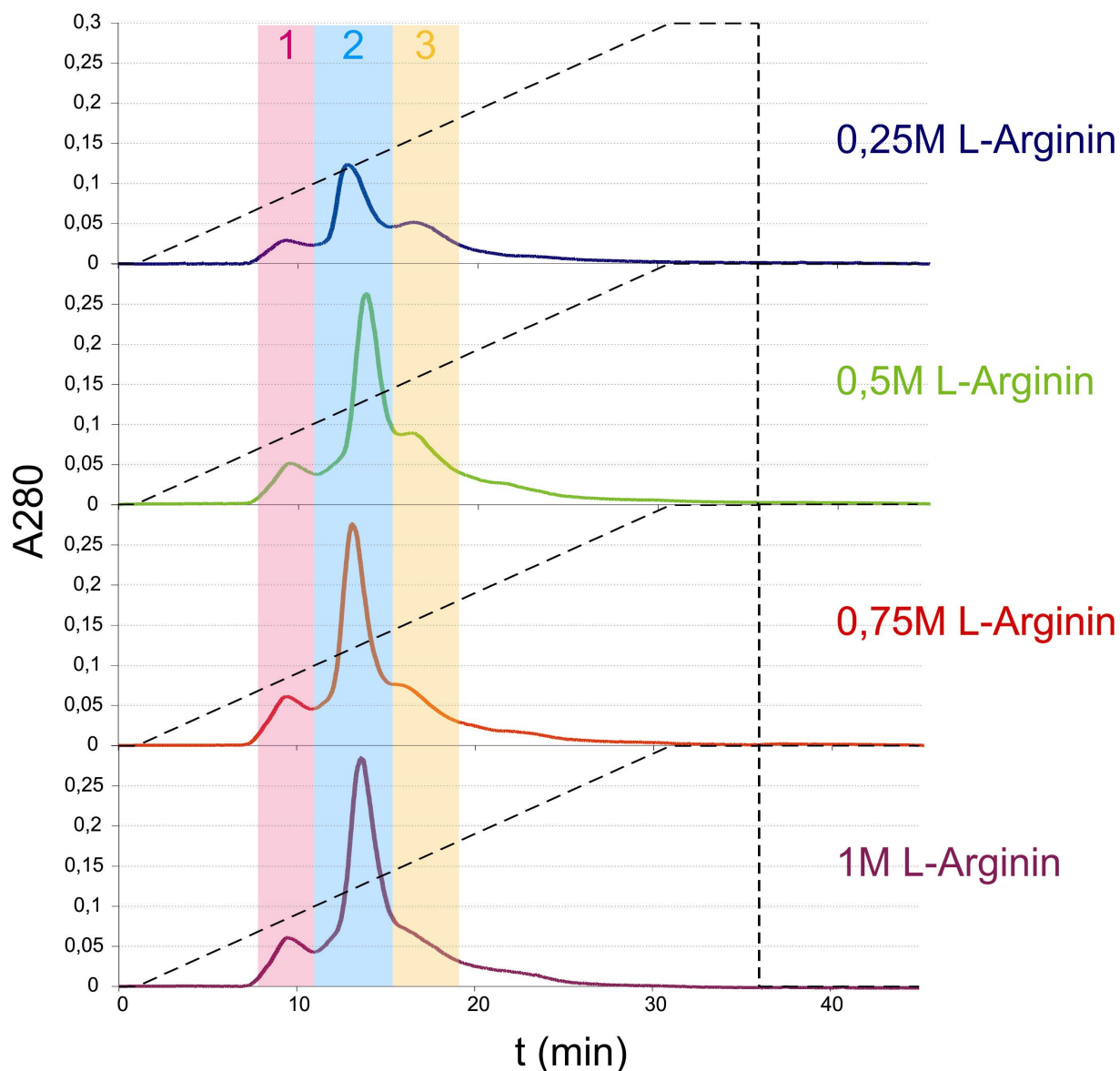
dráha 5: zkrácený konstrukt NKR-P1D v pET vektoru štěpený *NdeI* + *HindIII*

5.2 Optimalizace renaturace NKR-P1D a Clrb

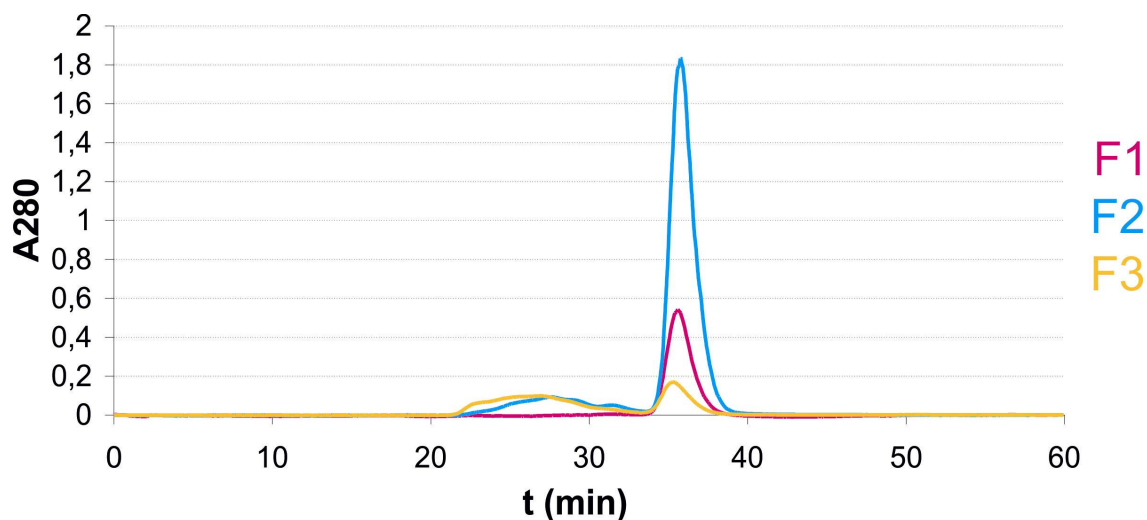
5.2.1 NKR-P1D

Optimalizace refoldingu proběhla postupem popsáním v odstavci 4.2.2 a po zakoncentrování roztoků proteinů po dialýze byly jednotlivé roztoky postupně nanášeny na kolonu Q-Sepharosy. Protein byl pomocí ionexové chromatografie separován do tří částečně se překrývajících chromatografických maxim (1-3), přičemž třetí z nich s přibývajícím koncentrací L-Argininu v renaturačním pufru pozvolna mizí (Obr. 28.).

Frakce 1-3 odpovídající peakům 1-3 z ionexové chromatografie byly pro jednotlivé refoldingové podmínky každá zvlášť zakoncentrovány do přibližně 300 μ l a po centrifugaci postupně nastříknuty do HPLC systému s gelově filtrační kolonou Superdex 75 10/300 GL (celkem 12 vzorků). Podle elučních časů odpovídaly frakce 1 a 2 z ionexu proteinu ve formě monomeru, v případě frakce 2 s malou příměsí agregátů. Třetí peak z ionexu potom odpovídal těmto agregátům s nevelkou příměsí monomerního NKR-P1D proteinu (Obr. 29.).

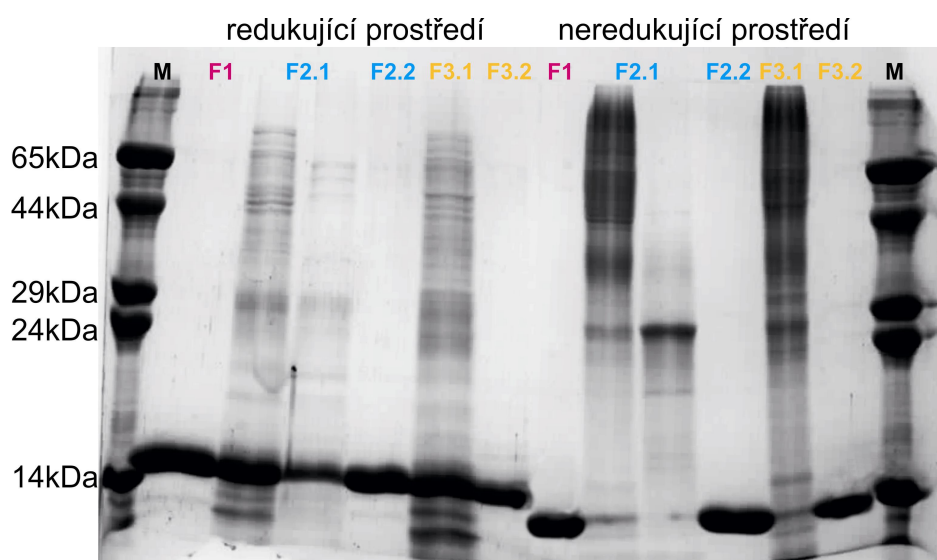


Obr. 28. Srovnání chromatogramů z ionexové chromatografie na koloně Q-Sepharosy FF při průtoku 3 ml/min a znázorněném gradientu pufru B.



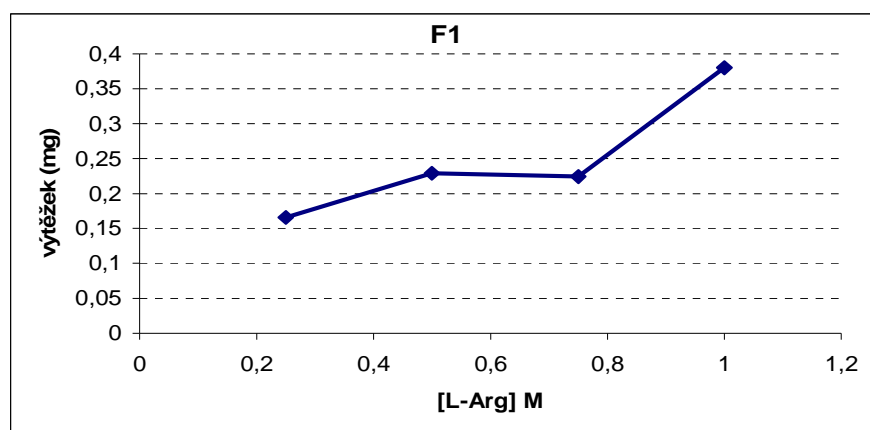
Obr. 29. Srovnání chromatogramů frakcí F1 – F3 z ionexu po gelové filtraci na koloně Superdex 75 10/300 GL při průtoku 0,4 ml/min. Jako příklad bylo v zájmu zachování přehlednosti vybráno pouze srovnání frakcí vycházejících z refoldingu za jedné z podmínek, konkrétně za přítomnosti 1 M L-Argininu.

Předpoklad týkající se forem proteinu vycházející z elučních časů při gelové filtraci byl potvrzen pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí. Bylo ověřeno, že protein obsažený v hlavním chromatografickém maximu, eluovaný z gelové filtrační kolony v čase 34,5 - 38 minut odpovídá čistému monomeru, zatímco proteiny obsažené v dlouhém nízkém maximu s elučním časem 22,5 – 32 minut se skládají ze solubilních agregátů (Obr. 30.).

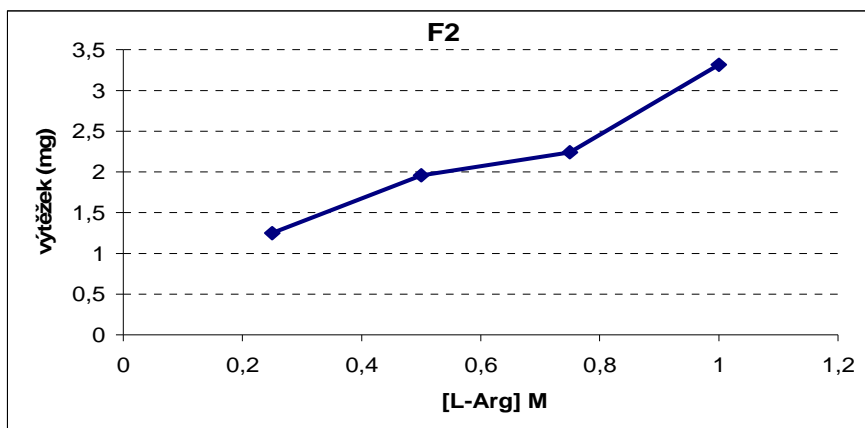


Obr. 30. Fotografie gelu použitého k analýze jednotlivých frakcí po gelové filtraci. Frakce F1, F2.2 a F3.2 odpovídají frakcím pocházejícím z hlavních chromatografických maxim s elučními časy 34,5 – 38 minut, zatímco frakce F2.1 a F3.1 odpovídají frakcím z nízkých maxim s elučními časy 22,5 – 32 minut. Na základě srovnání výsledků za redukujících a neredukujících podmínek, je zřejmé, že hlavní peaky obsahují čistý protein ve formě monomeru.

Na základě výsledku SDS-PAGE byly určeny frakce obsahující čistý monomerní protein a bylo možné stanovit jeho koncentrace ve všech těchto frakcích. Ke stanovení koncentrací bylo využito stanovení dle Bradfordové diskutované v odstavci 4.5. Na základě získaných výsledků bylo možno sestavit křivky popisující výtěžek *in vitro* renaturace v závislosti na koncentraci L-Argininu v renaturačním pufru. (Graf 4. a 5.). Vzhledem k nejasnému důvodu, proč byl monomerní protein během ionexové chromatografie rozdělen do dvou frakcí (F1 a F2), byly tyto výtěžky stanoveny pro obě „formy,“ pro jednoduchost dále označované jako F1 a F2.



Graf 4. Závislost výtěžku NKR-PID formy F1 na koncentraci L-Argininu v renaturačním pufru.



Graf 5. Závislost výtěžku NKR-P1D formy F2 na koncentraci L-Argininu v renaturačním pufru.

Na základě těchto grafů je dobře patrné, že majoritní je forma 2, jejíž výtěžky jsou řádově lepší. Překvapivě i přesto, že eluční profily z ionexové chromatografie se zdály pro vyšší koncentrace L-Argininu být téměř stejné, skutečné konečné výtěžky se výrazně lišily. Jako nejvhodnější renaturační pufr byl vybrán pufr obsahující 1 M L-Arginin. Je možné, že jeho vyšší koncentrace by dále zlepšila výtěžek, vzhledem k ekonomickým aspektům však již toto testováno nebylo.

5.2.2 Clrb

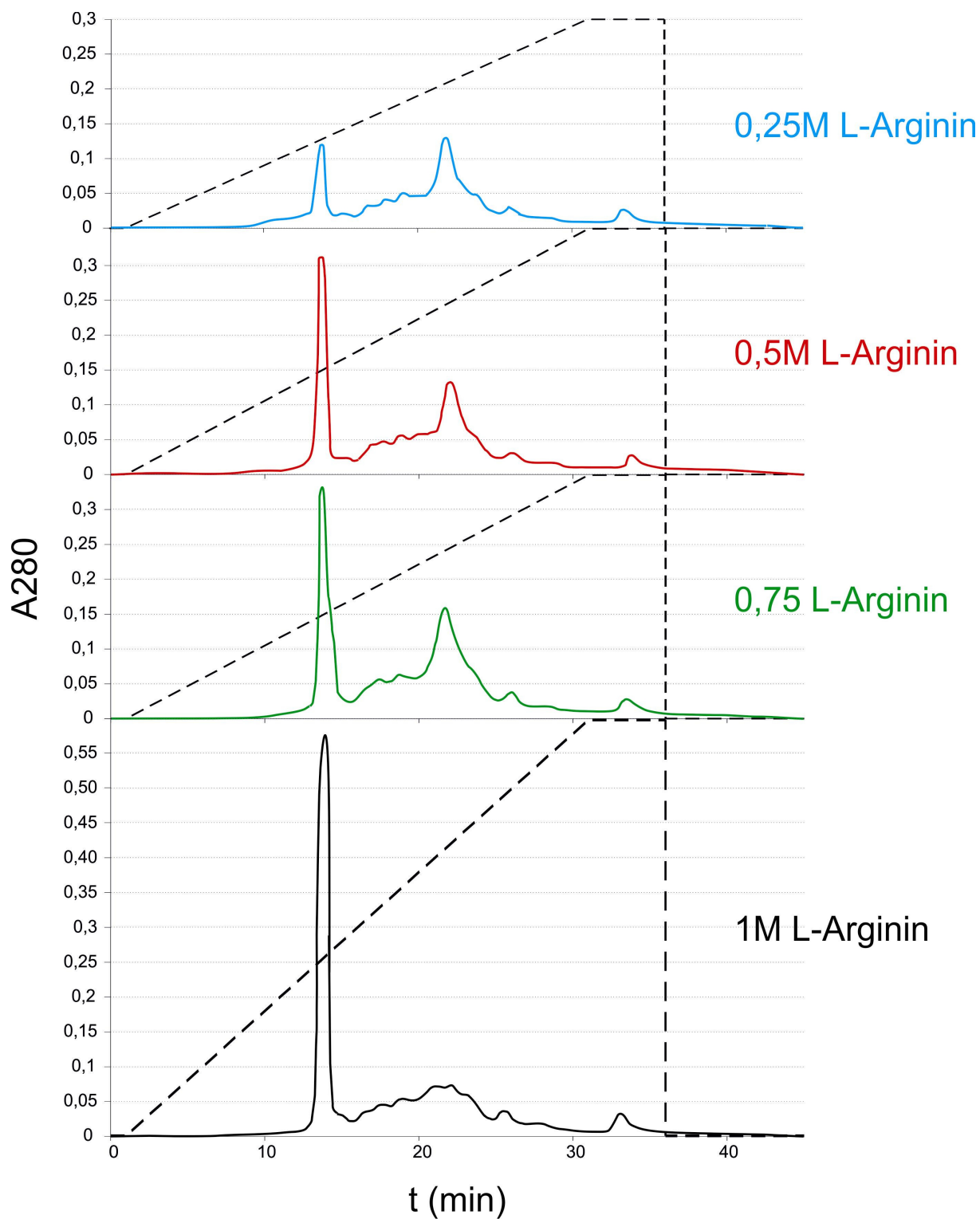
I v případě proteinu Clrb bylo postupováno podle protokolu popsáno v odstavci 4.2.2. Po dialýze a zahuštění byly jednotlivé roztoky nanášeny na kolonu Q-Sepharosy. Narozdíl od dříve uvedeného NKR-P1D byl Clrb z této kolony eluován ve formě dobře rozlišeného výrazného chromatografického maxima následovaného směsí agregátů. Jak je vidět ze srovnání chromatogramů pro různé podmínky renaturace (Obr. 31.), s rostoucí koncentrací L-Argininu klesá zastoupení agregátů a stoupá výtěžek složeného proteinu.

Když byly frakce odpovídající hlavnímu chromatografickému maximu zakonzentrovány a nastříknuty na HPLC s gelově filtrační kolonou Superdex 75 10/300 GL, protein byl eluován ve formě jediného maxima elučním časem odpovídajícího proteinu ve formě monomeru. (Obr. 32.).

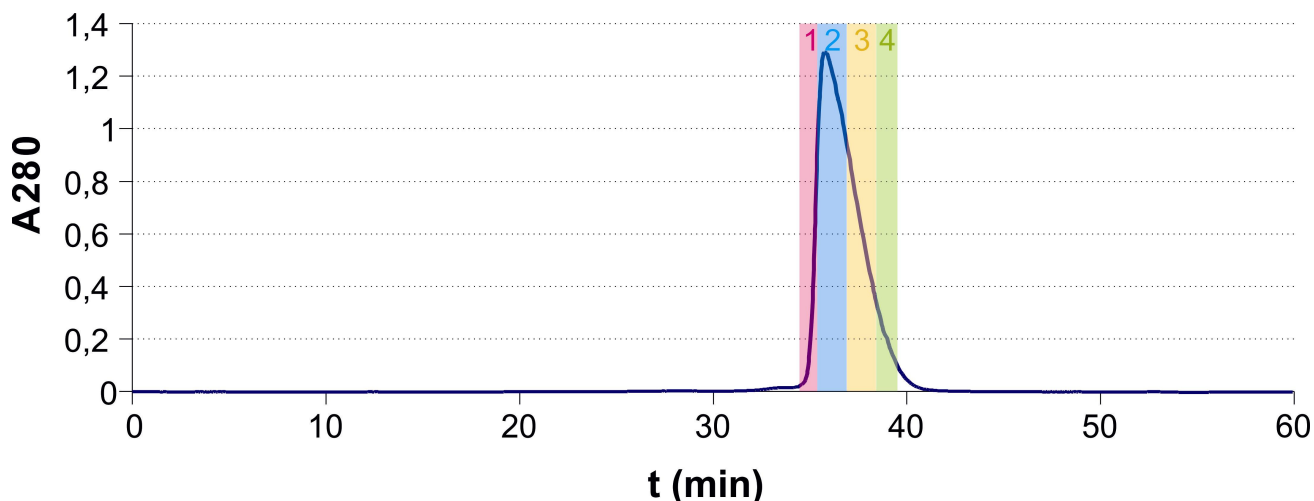
Tento předpoklad byl i potvrzen pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí. Bylo ověřeno, že hlavní chromatografické maximum obsahuje čistý protein Clrb v monomerní formě (Obr. 33.).

Na základě výsledku SDS PAGE potvrzujícího dostatečnou čistotu preparátů bylo možno přistoupit ke stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích metodou dle

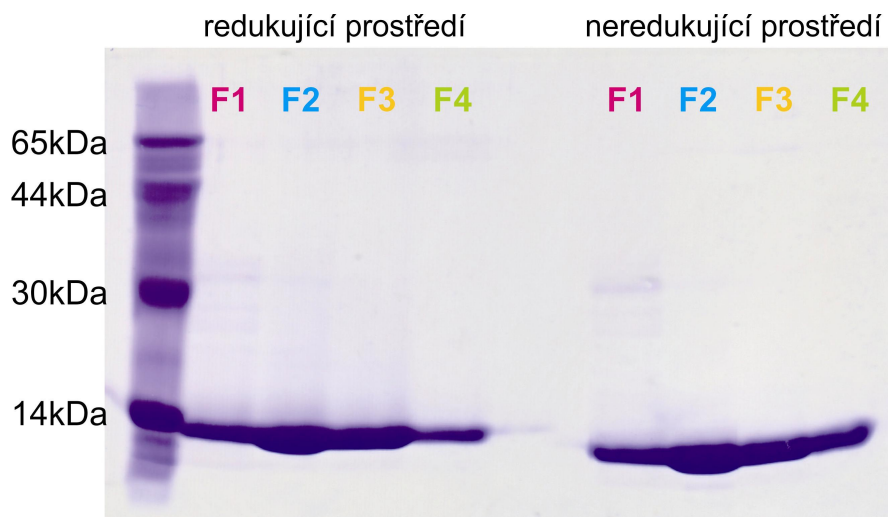
Bradfordové. Na základě získaných výsledků byl sestrojen graf závislosti výtěžku proteinu Clrb na koncentraci L-Argininu v renaturačním pufu (Graf 6.).



Obr. 31. Srovnání chromatogramů z ionexové chromatografie na koloně Q-Sepharosy při průtoku 3 ml/min a znázorněném gradientu pufu B.

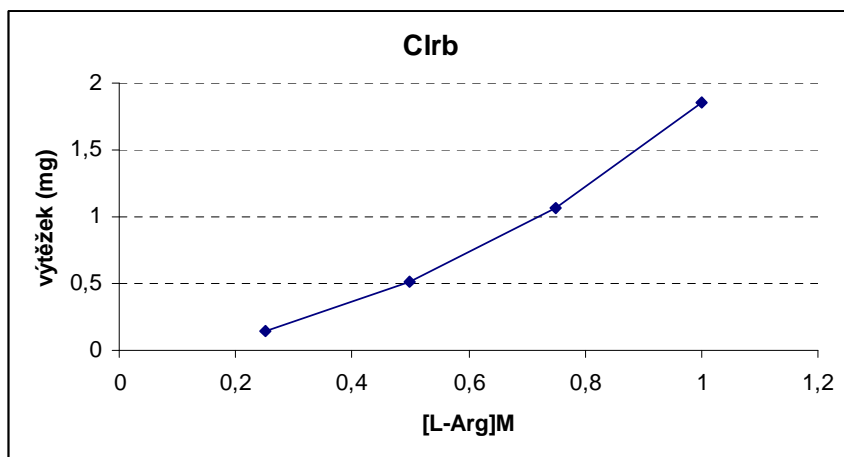


Obr. 32. Příklad chromatogramu z gelové filtrace na koloně Superdex 75 10/300 GL. Analyzována byla frakce odpovídající hlavnímu peaku z ionexové chromatografie. Jako příklad byl v zájmu zachování přehlednosti vybrán pouze chromatogram pro jednu z refoldingových podmínek, konkrétně pro přítomnost 1 M L-Argininu.



Obr. 33. Fotografie gelu použitého k separaci jednotlivých frakcí po gelové filtraci. Je vidět, že protein je ve formě monomeru a vykazuje dostatečnou čistotu.

Z takto sestrojeného grafu je dobře patrné, že stejně jako v případě NKR-P1D, nejlepších výsledku bylo dosaženo v přítomnosti 1 M L-Argininu, přičemž rozdíly ve výtěžku při různých koncentracích se liší výrazněji než u NKR-P1D.



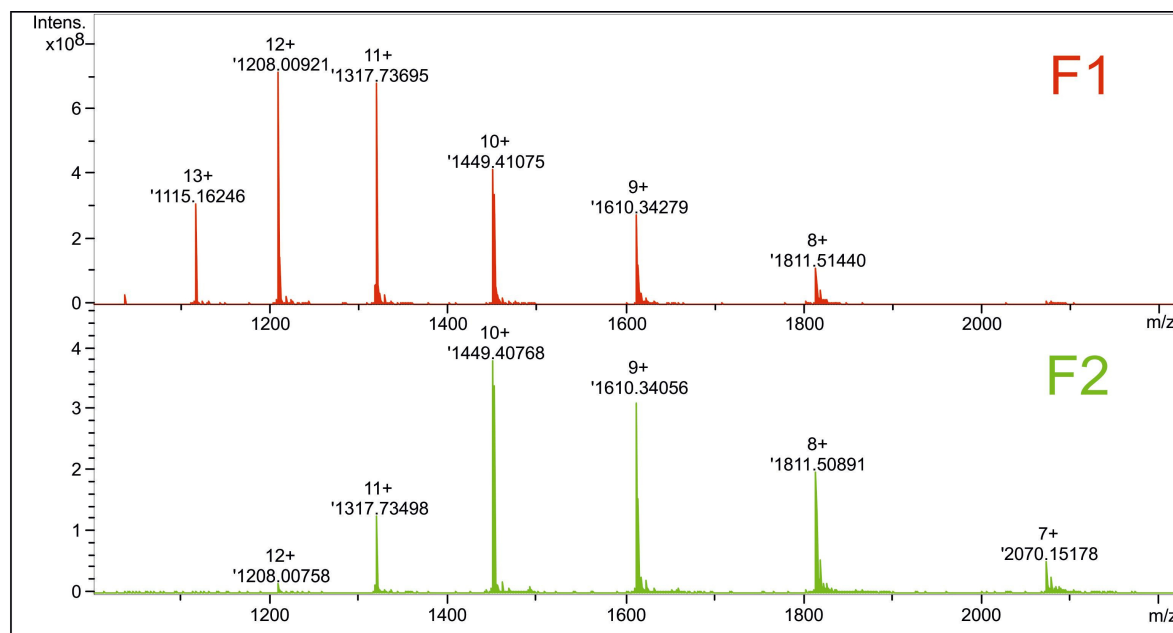
Graf 6 – Závislost výtěžku renaturovaného Clrb na koncentraci L-Argininu v renaturačním pufru.

5.3 Ověření identity proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

5.3.1 NKR-P1D

Roztok proteinu byl odsolen postupem popsáním v kapitole 4.6 a sprejován do FT-ICR spektrometru. Naměřená data byla analyzována pomocí softwaru DataAnalysis 4.0 firmy *Bruker Daltonics*. V případě NKR-P1D byly analyzovány obě formy F1 a F2 (viz bod 5.2.1).

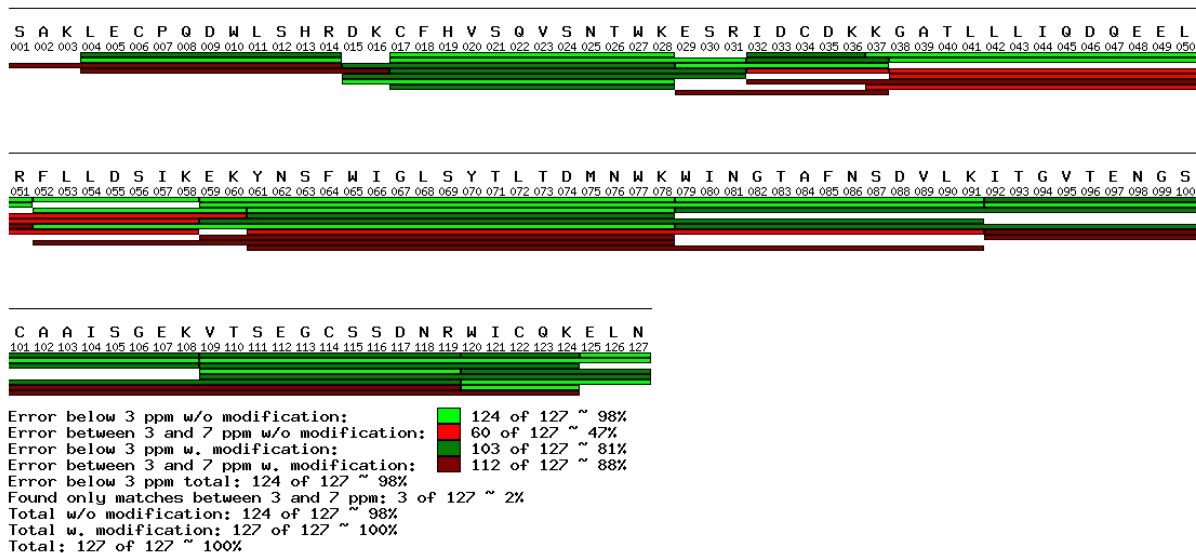
Experimentálně zjištěná monoizotopická molekulová hmotnost proteinů v obou formách byla po dekonvoluci 14 484,0228 Da pro formu F1 a 14 483,9998 Da pro formu F2, což znamená chybu 1,2 ppm respektive 0,4 ppm při teoretické molekulové hmotnosti 14 484,0055 Da. V čem se však formy F1 a F2 liší jsou nábojové stavy, do nichž během ionizace přechází (Obr. 34.). Forma F1 se během ionizace nabíjí do vyššího nábojového stavu, což znamená, že má více přístupných ionizovatelných skupin. Toto pravděpodobně vychází ze strukturálních rozdílů mezi F1 a F2, kdy F1 představuje rozvolněnější, ne zcela složenou formu proteinu. Tento rozdíl mezi F1 a F2 vysvětluje i důvod, proč jsou obě formy eluovány z ionexové chromatografie rozlišený do dvou peaků. V zájmu zachování monodisperzity vzorku bylo dále pracováno s majoritní formou F2, která se jevila kompaktnější a tím pádem pravděpodobně korektněji složená.



Obr. 34. Srovnání hmotnostních spekter proteinů NKR-P1D formy F1 (nahore) a F2 (dole).

Následně byl protein připraven pro „bottom-up“ analýzu postupem opět diskutovaným v odstavci 4.6 a naštěpené peptidy byly analyzovány pomocí LC/MS. Data byla vyhodnocena softwarem DataAnalysis 4.0 firmy *Bruker Daltonics* a vizualizace pokrytí sekvence byla

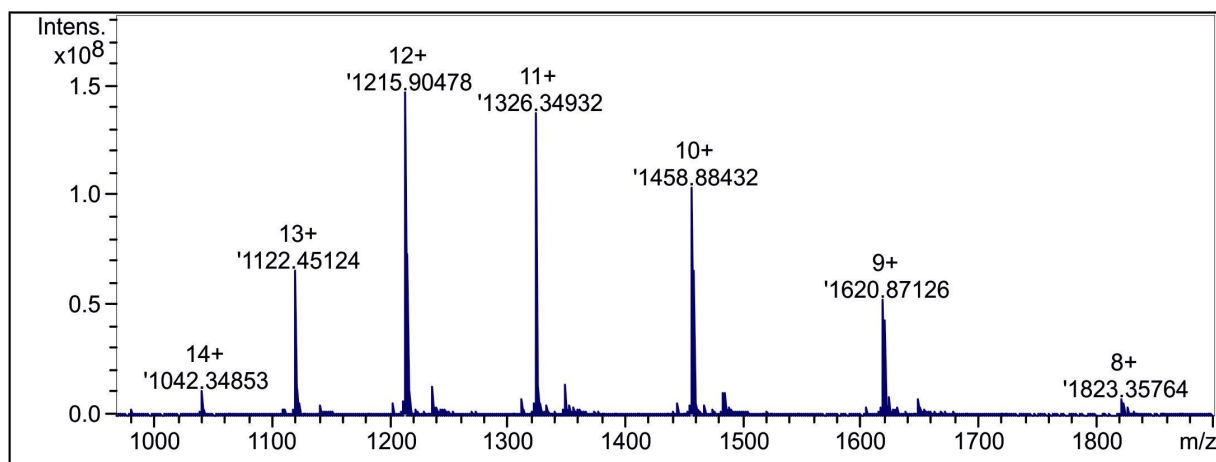
provedena pomocí skriptu vytvořeného Dr. Daniele Kavanem v Laboratoři charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR, v.v.i. Pozorované pokrytí sekvence bylo 100 % (Obr. 35.) a identita proteinu tak byla bez nejmenších pochybností potvrzena včetně přítomnosti mutace C118S.



Obr. 35. Vizualizace pokrytí sekvence proteinu NKR-P1D po štěpení trypsinem.

5.3.2. Clrb

I v případě Clrb bylo prvním krokem stanovení molekulové hmotnosti intaktního proteinu. Experimentálně zjištěná monoizotopická molekulová hmotnost byla po dekonvoluci spektra 14 578,7767 Da (Obr. 36.), přičemž teoretická molekulová hmotnost činí 14 577,7797 Da. Toto by odpovídalo chybě měření téměř 70 ppm a zcela evidentně není správně.



Obr. 36. Hmotnostní spektrum získané pro celou molekulu Clrb.

Aby bylo možno zjistit, čím je tato chyba způsobena, bylo m/z odpovídající 12^+ nabitému proteinu vybráno jako prekurzorová hmota, která byla selektována v iontovém zdroji a v kolizní cele fragmentována. Naměřené kolizní spektrum bylo analyzováno pomocí softwaru DataAnalysis firmy *Bruker Daltonics* a GPMW firmy *Lighthouse Data*. Zatímco pokrytí N-terminální oblasti proteinu b ionty bylo 100% až po první cystein a byly viditelné i vnitřní fragmenty obsahující zapojené disulfidické můstky a pokrývající téměř celou sekvenci, byla pozorována téměř úplná absence y iontů, které by pokrývaly C-terminus, a to včetně iontů vznikajících preferenčním štěpením například u prolinu. Ačkoliv byly pozorovány některé b ionty pokrývající i kompletní C-terminus, jejich intenzita byla o jeden až dva řády nižší než v případě iontů tuto oblast nepokrývajících. Světlo do celé situace přinesl především iont a(24-120), který pokrýval C-terminus s výjimkou posledních 2 aminokyselin a byl o dva řády intenzivnější než fragmenty obsahující i tyto poslední dvě aminokyseliny (tabulka 9).

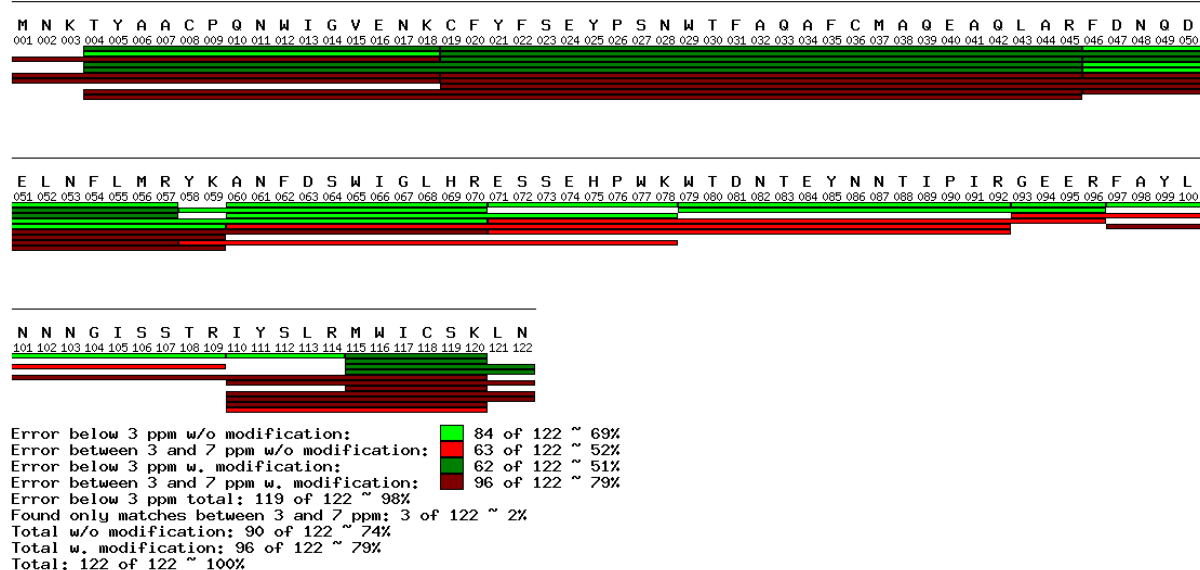
Tabulka 9: Seznam některých hmot pozorovaných v kolizním spektru s přiřazenými sekvencemi a vysvětleným významem, jak tyto hmoty přispěly k osvětlení situace:

exp. hmota	teor. hmota	chyba (ppm)	iont	sekvence	intenzita	význam
638,2958	638,30	2,3	b5	MNKTY	$2,6 \cdot 10^8$	b ionty pokrývající N terminus
709,3337	709,33	0,9	b6	MNKTYA	$4,6 \cdot 10^8$	
780,3708	780,37	0,8	b7	MNKTYAA	$8,0 \cdot 10^8$	
11 594,4668	11 594,46	0,6	a(24-120) + 1S_S - H ₂ O	EYP(---)CSK	$2,5 \cdot 10^8$	a ion o vysoké intenzitě končící těsně před C-koncem
12 102,6582	12 102,68	1,5	y101 + 1S_S - H ₂ O	FSE(---)KLD	$3,8 \cdot 10^7$	y ionty pokrývající C-terminus obsahující kys. asparagovou
12 265,7252	12 265,74	1,0	y102 + 1S_S - H ₂ O	YFS(---)KLD	$1,1 \cdot 10^7$	
12 412,7793	12 412,81	2,3	y103 + 1S_S - H ₂ O	FYF(---)KLD	$3,0 \cdot 10^6$	
11 954,5811	11 954,62	3,5	b(23-122) + 1S_S	SEY(---)KLN	$5,0 \cdot 10^6$	dvojice b iontů pokrývající C-terminus obsahující D i N
11 955,5928	11 955,61	1,2	b(23-122) + 1S_S	SEY(---)KLD	$7,3 \cdot 10^6$	
12 085,6387	12 085,70	4,8	b(22-122) - H ₂ O	FSE(---)KLN	$1,1 \cdot 10^7$	
12 086,6416	12 086,68	3,2	b(22-122) - H ₂ O	FSE(---)KLD	$4,3 \cdot 10^6$	

Posledními dvěma aminokyselinami jsou leucin a asparagin. Zatímco v případě leucinu je jakákoliv modifikace nepravděpodobná, v případě asparaginu může docházet k deaminaci

CONH₂ skupiny postranního řetězce na COOH, což by způsobilo zvýšení molekulové hmotnosti celého proteinu přibližně o 1. Pro protein obsahující deaminovaný asparagin, tedy vlastně kyselinu asparagovou, jako svou C-terminální aminokyselinu se podařilo přiřadit i dříve nepřirazené signály, které, jak se ukázalo, odpovídají sérii y iontů pokrývající celý C-terminus obsahující kys. asparagovou a mají intenzitu mnohdy řádově vyšší než ionty obsahující C-terminální asparagin. Navíc pro každý z iontů obsahujících C-terminální asparagin bylo možno najít i ion s hmotou přibližně o 1 vyšší odpovídající C-terminální kys. asparagové (tabulka 9). Zdá se tedy, že v průběhu přípravy vrorků pravděpodobně dochází k deaminaci C-terminálního asparaginu, která vede k posunu molekulové hmotnosti celého proteinu přibližně o 1. Pro takto modifikovaný protein je teoretická molekulová hmotnost 14 578,7638 Da a experimentálně zjištěná hmotnost má tedy chybu 0,88 ppm.

Následně byl i na protein Clrb aplikován postup „bottom-up“ proteomiky a bylo určeno pokrytí sekvence. I v případě peptidů byla pozorována částečná deaminace terminálního asparaginu a obě formy C-terminálního peptidu, obsahující asparagin i kyselinu asparagovou, byly detekovatelné. Celkové pokrytí sekvence bylo 100% (Obr. 37.) a byla tak ověřena i identita proteinu Clrb.



Obr. 37. Vizualizace pokrytí sekvence proteinu Clrb po štěpení trypsinem.

5.4 Ověření kvality renaturace

5.4.1 Ověření zapojení disulfidických můstků

Přestože v případě Clrb bylo zapojení disulfidových můstků patrné již na základě některých signálů z fragmentového spektra, v rámci ověření těchto výsledků a určení zapojení i v molekule NKR-P1D, byl proveden protokol modifikované elektroforézy a dalších kroků přípravy vzorků pro analýzu popsanych v odstavci 4.7.1. Proteiny byly štěpeny trypsinem, GluC a AspN proteasami a po extrakci a odsolení byla provedena LC/MS analýza. Pro oba proteiny bylo nalezeno větší množství signálů, jejichž hmoty odpovídaly peptidům spojeným přes disulfidové můstky a jejichž několik zástupců je uvedeno v tabulkách 10 a 11. Všechny nalezené disulfidové můstky byly vzájemně konzistentní, nevykazovaly žádnou variabilitu a odpovídaly schématu zapojení charakteristickému pro molekuly C-lektinového typu. V případě NKR-P1D bylo pozorováno spojení prvního cysteinu s druhým, třetího s šestým a čtvrtého s pátým. V molekule Clrb, kde cysteiny homologní se čtvrtým a pátým cysteinem kanonické C-lektinové domény chybí bylo pozorováno spojení prvního cysteinu s druhým a třetího se čtvrtým, který odpovídá šestému cysteinu kanonické C-lektinové domény. Tyto výsledky byly i v souladu s tím, co naznačily některé signály pozorované v kolizním spektru.

Tabulka 10: Seznam některých ze signálů pozorovaných při analýze, na jejichž základě je možné jednoznačně přiřadit zapojení S-S můstků proteinu NKR-P1D:

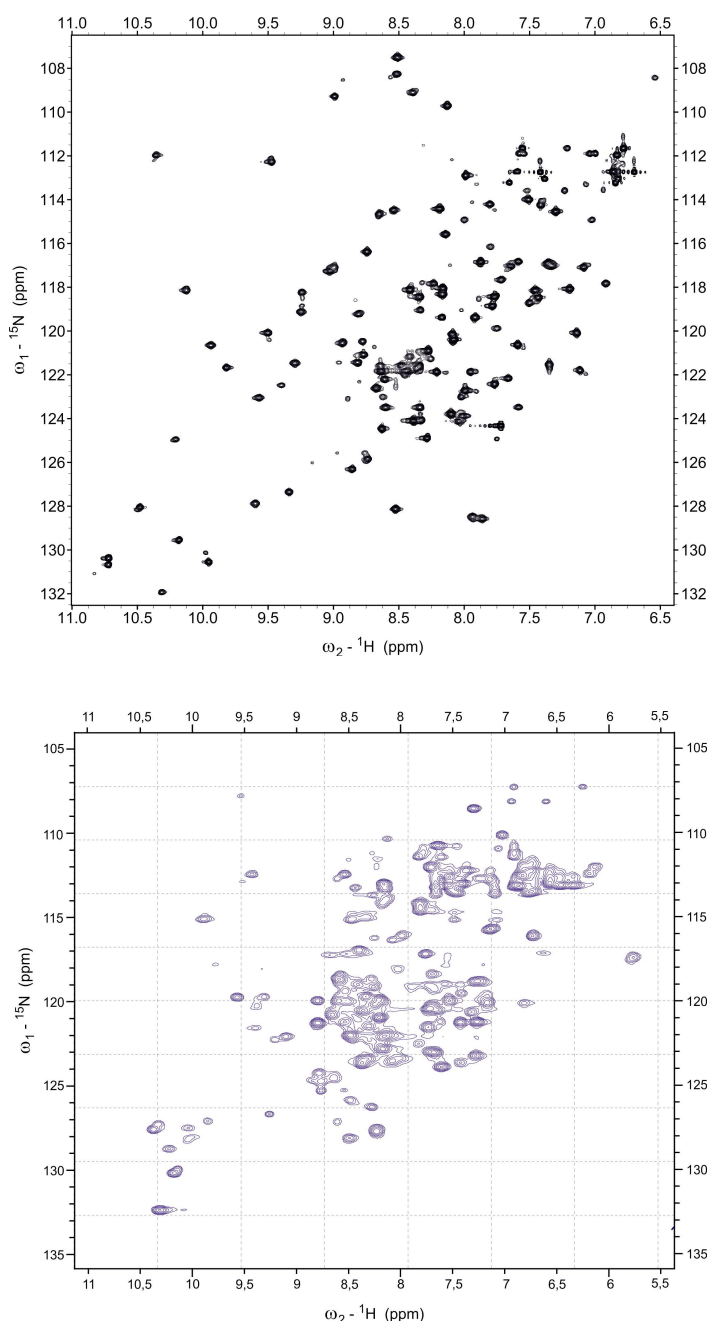
exp. hmota	teor. hmota	chyba (ppm)	sekvence spojených peptidů	spojené části sekvence	spojené cys
3345,5891	3345,5894	0,1	SAKLE ⁹⁴ CPQDWLSHR DK ¹⁰⁵ CFHVSQVSNTWK	89-104 + 103-116	1 + 2
2833,4343	2833,4338	0,2	D ¹²² CDKKGATLLLIQ DNRWI ²¹⁰ CQKELN	121-133 + 205-215	3 + 6
2788,2324	2788,2363	1,4	ITGVTENGSL ¹⁸⁹ CAAISGEK VTSEG ²⁰² CSSDNR	180-196 + 197-207	4 + 5

Tabulka 11: Seznam některých ze signálů pozorovaných při analýze, na jejichž základě je možné jednoznačně přiřadit zapojení S-S můstků proteinu Clrb:

exp. hmota	teor. hmota	chyba (ppm)	sekvence spojených peptidů	spojené části sekvence	spojené cys
2122,9387	2122,9365	1,0	TYAA ⁸⁰ CPQNWIGVENK CFY ⁹¹	76-90 + 91-93	1 + 2
3560,5903	3560,5898	0,2	FSEYPSNWTFAQAF ¹⁰⁸ CMAQEQLAR MWI ¹⁹⁰ CSK	94-117 + 187-192	3 + 4

5.4.2 Ověření monodisperze foldu

Oba proteiny, NKR-P1D i Clrb, byly připraveny ve formě inkluzních tělísek naprodukovaných bakteriemi rostoucími v 0,5 l M9 média obsahujícího $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ jako jediný zdroj dusíku. Tato inkluzní tělíska byla zpracována podle protokolu popsaného v odstavci 4.2.2 v renaturačním pufru vybraném na základě optimalizace refoldingu. Purifikace proběhla standardními postupy taktéž diskutovanými výše (odstavce 4.3.1 a 4.3.2) a $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spektra obou proteinů byla naměřena na 600 MHz NMR spektrometru. Pozorované signály pro oba proteiny vykazovaly dostatečnou disperzi a charakteristické signály některých aminokyselin, především tryptofanu, byly dobře rozlišené (Obr. 38.), což poskytlo další důkaz, že proteiny jsou kompaktně a monodisperzně složené.

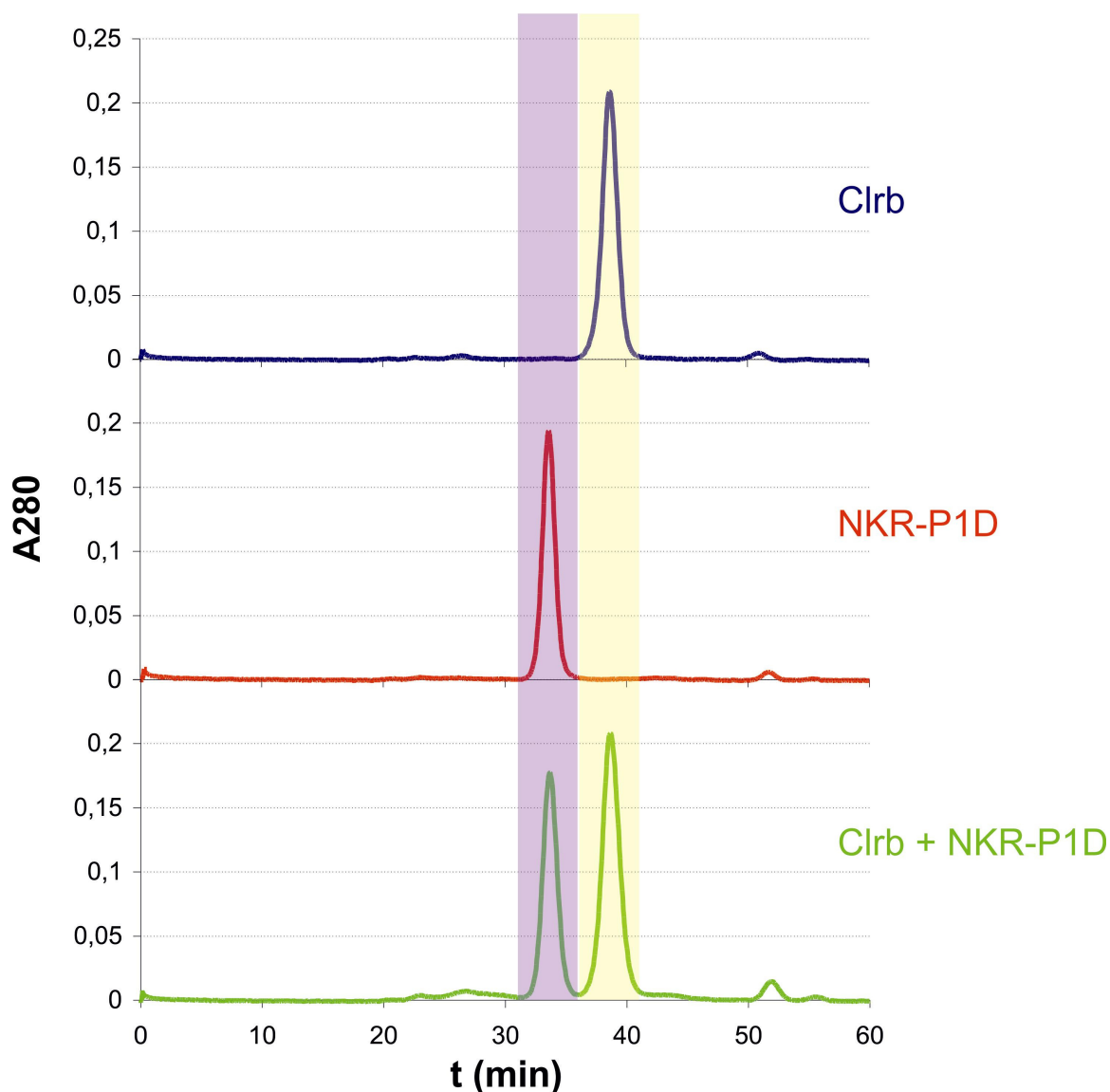


Obr. 38. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ – HSQC spektra proteinu NKR-P1D (nahore) a Clrb (dole). Dostatečná disperze všech signálů potvrdila, že oba proteiny jsou kompaktně a monodisperzně složené.

5.5 Funkční testy

5.5.1 Gelová filtrace na μ HPLC SMART

Gelová filtrace směsi obou proteinů byla provedena na analytické koloně Superdex 75 PC 3.2/30 při průtoku 50 μ l/min na μ HPLC SMART ve dvou různých pufrch. V obou případech byly překvapivě pozorovány rozdílné eluční časy pro oba proteiny, ačkoliv jejich molekulová hmotnost je téměř totožná a eluční časy na preparativní gelově filtrační koloně taktéž. Bez ohledu na tuto diskrepanci lze však konstatovat, že při obou testovaných podmínkách nebylo možné interakci mezi oběma proteiny jasně potvrdit. V chromatogramu směsi proteinů, oproti kontrolám obsahujícím samostatné proteiny, nepřibyl žádný výrazný eluční vrchol ani nebyl pozorován žádný posun elučních časů, ačkoliv došlo ke vzniku velmi nízkého elučního vrcholu přibližně ve 27. minutě a dalšího ve 23. minutě (Obr. 39.). Průtok byl 50 μ l/min.



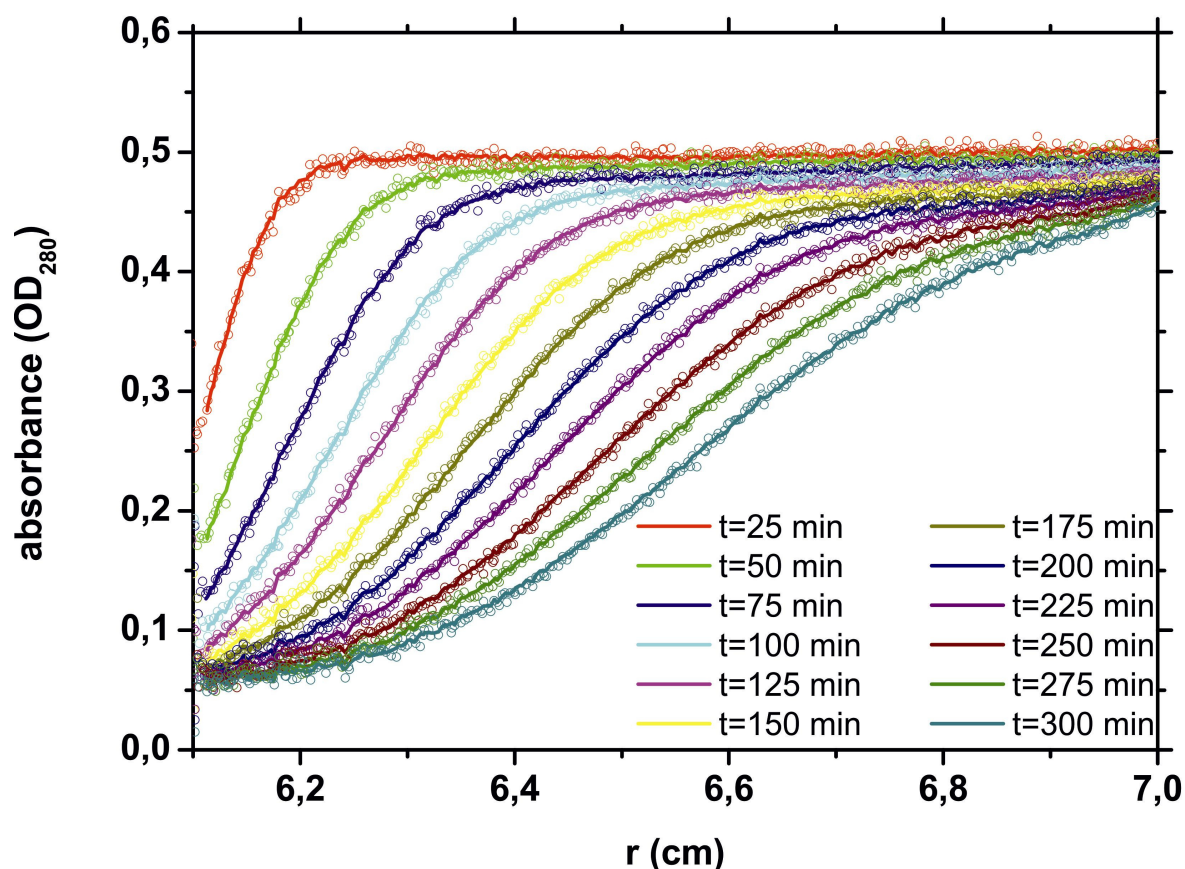
Obr. 39. Srovnání chromatogramů směsi proteinů Clrb a NKR-P1D s kontrolami obsahujícími pouze samotné proteiny. Jako příklad je uveden jeden z více totožných výsledků.

5.5.2 Analytická ultracentrifuga

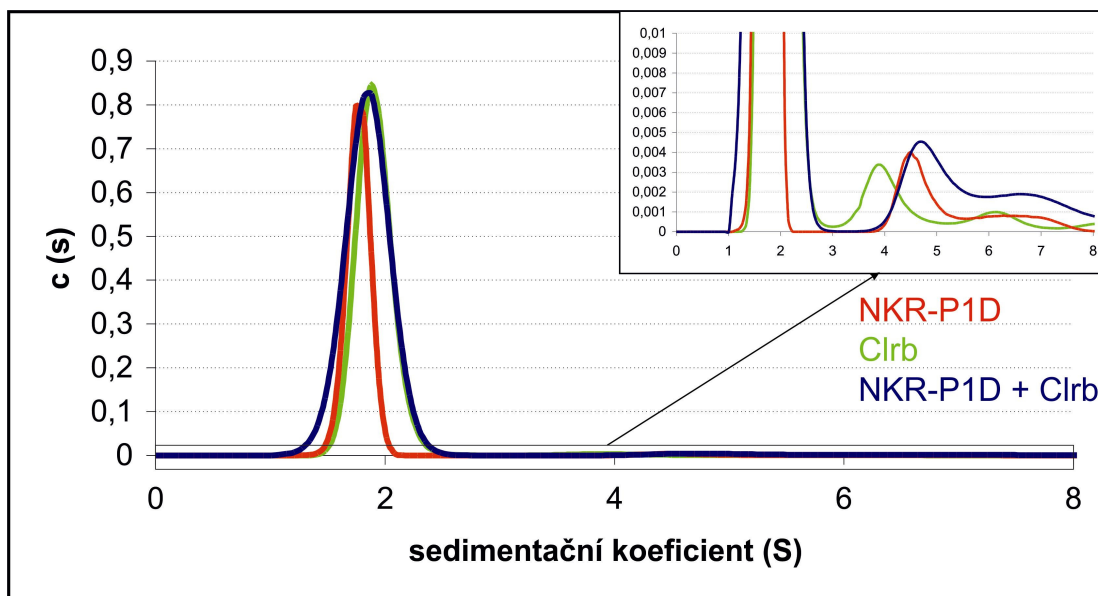
Metodou sedimentační rychlosti při podmínkách popsaných v bodě 4.8.2 byla naměřena data (Obr. 40.), jejichž analýzou pomocí programu SEDFIT byly určeny distribuční funkce popisující chování samotných proteinů Clrb a NKR-P1D i jejich směsi v roztoku. Pro oba proteiny byla pozorována rovnováha mezi majoritní složkou monomerů (99 %) a téměř zanedbatelným množstvím vyšších oligomerů (1 %). Standardizovaný sedimentační koeficient $s^{\circ}_{20,w}$ zjištěný pro Clrb odpovídal 1,91 S a pro NKR-P1D 1,76 S.

V případě směsi obou proteinů byl určen sedimentační koeficient $s^{\circ}_{20,w} = 1,82$ S, který zhruba odpovídá průměru koeficientů zjištěných pro samotné proteiny, přičemž byl pozorován pouze malý přírůstek oligomerů o vyšších sedimentačních koeficientech. Tento roztok obsahoval přibližně 97,5 % monomerů a 2,5 % vyšších oligomerů (Obr. 41.).

Ani za pomoci analytické ultracentrifugy nebylo tedy možné přesvědčivě potvrdit přítomnost interakce mezi monomerními formami proteinů v roztoku, ačkoliv data z analytické ultracentrifugy i gelové filtrace shodně naznačují možnost přítomnosti slabé interakce.



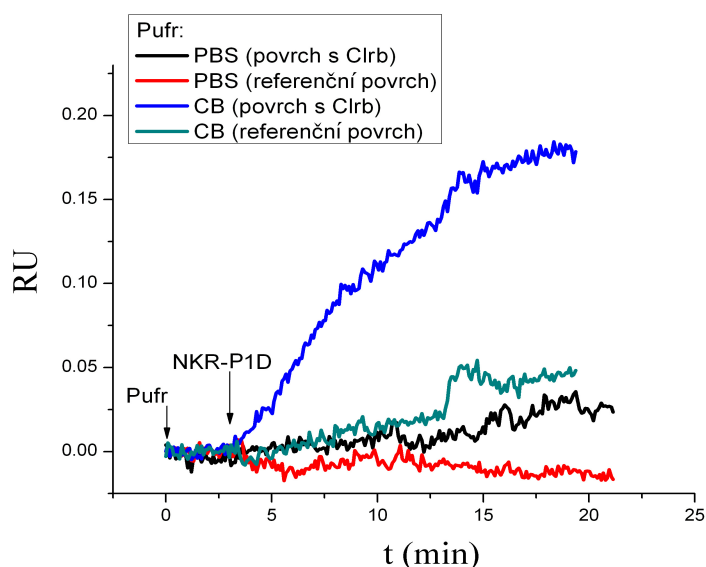
Obr. 40. Ukázka fitu křivek pro jednotlivé scany během měření sedimentační rychlosti směsi NKR-P1D a Clrb. V zájmu zachování přehlednosti jsou znázorněny křivky pouze pro každý 5. scan.



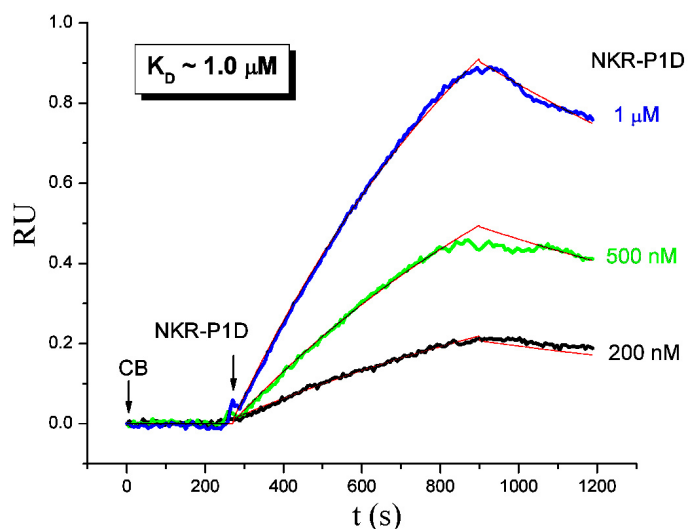
Obr. 41. Srovnání distribučních funkcí sedimentačních koeficientů samotných proteinů NKR-P1D a Clrb a jejich směsi.

5.5.3 Povrchová plasmonová rezonance

Protein Clrb byl imobilizován na čip postupem uvedeným v odstavci 4.8.3 a byla testována jeho interakce s NKR-P1D v citrátovém a PBS pufru. Překvapivě, zatímco v PBS pufru s fyziologickým pH nebyla interakce pozorována, v případě citrátového pufru o pH 4 došlo ke slabé interakci (Obr. 42.). U této interakce bylo možno na základě intezity signálu při různých koncentracích NKR-P1D v roztoku pomocí softwaru BIAevaluation firmy *Biacore* určit K_D interakce (Obr. 43.). Pozorované K_D se pohybovalo v mikromolárním řádu, což odpovídá velice slabé nebo možná dokonce pouze transientní interakci a je pravděpodobně důvodem proč veškeré pokusy o kokystalizaci obou proteinů doposud skončily neúspěšně.



Obr. 42. Srovnání interakce 100nM NKR-P1D s Clrb imobilizovaným na povrchu čipu při různých podmínkách. Je vidět, že zatímco v případě PBS pufru je rozdíl mezi referenčním povrchem s imobilizovaným BSA a povrchem s imobilizovaným Clrb pouze minimální, při použití citrátového pufru (CB) se objevuje interakce NKR-P1D specifická pro imobilizovaný protein Clrb, zatímco kanál s referenčním imobilizovaným BSA zůstává na úrovni šumu.

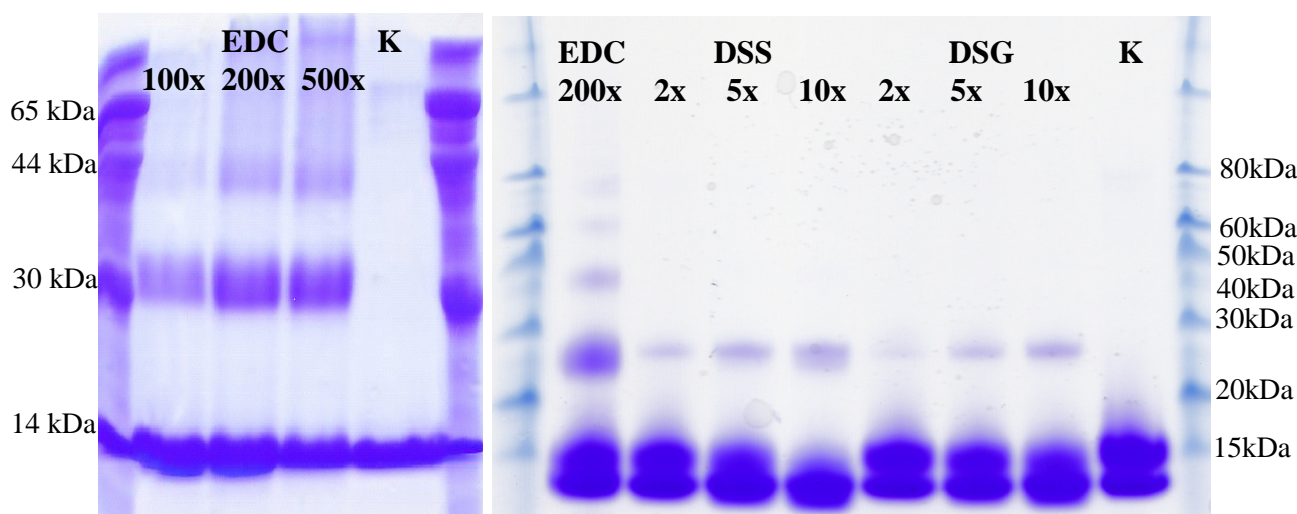


Obr. 43. Srovnání intenzit signálů při použití pufrů s různou koncentrací NKR-P1D. Na základě těchto křivek bylo možno určit K_D přibližně odpovídající $1 \mu\text{M}$.

5.6 Chemické zesílení proteinů

5.6.1 Optimalizace koncentrace síťujících činidel

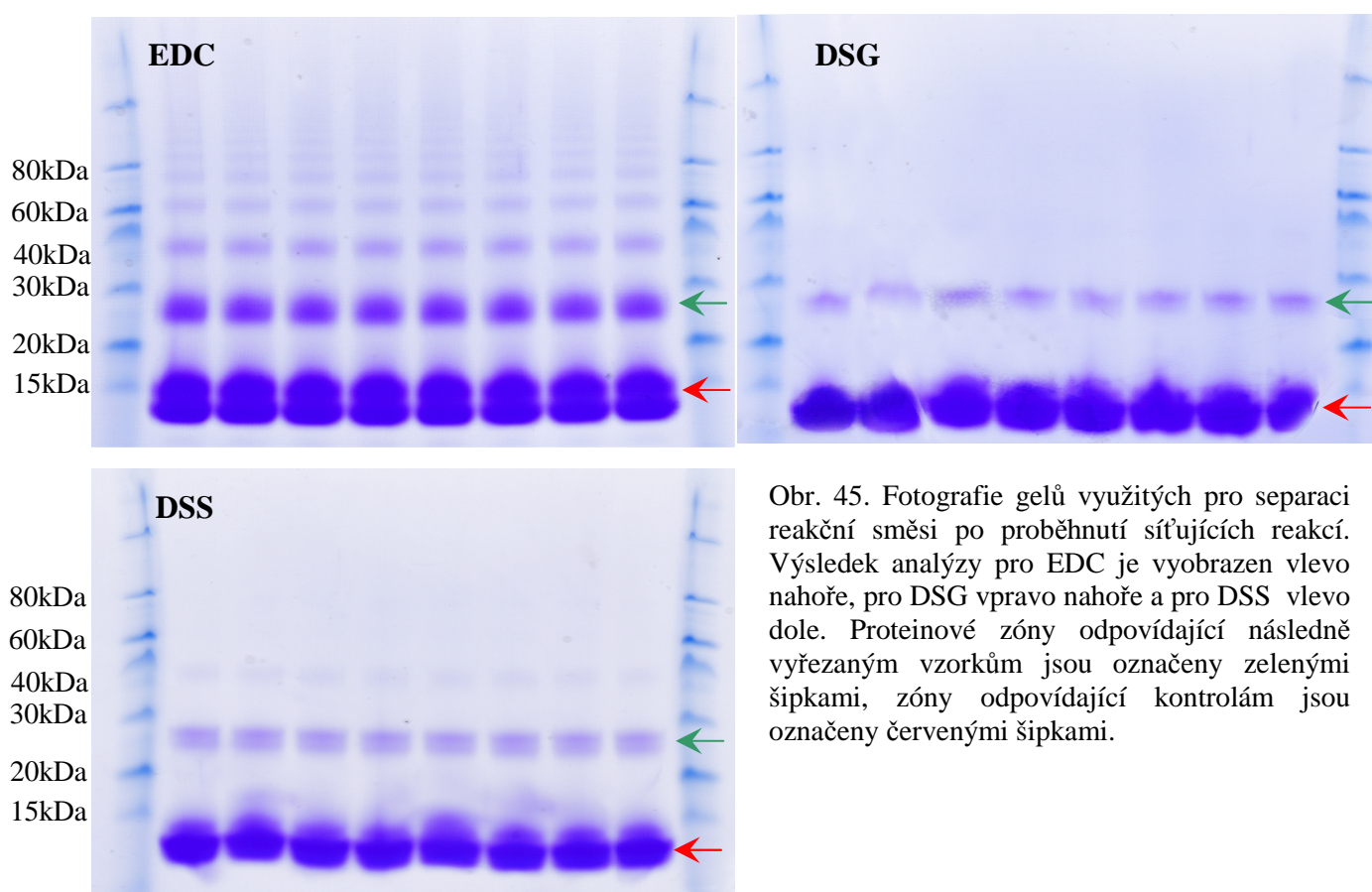
Oba proteiny byly pomocí gelové filtrace převedeny do pyridinového pufru a část dále do triethylamoniumkarbonátového pufru, jak bylo popsáno v odstavci 4.9.1. Síťovací reakce proběhly v případě EDC se 100×, 200× a 500× molárním nadbytkem činidla oproti proteinům a v případě DSG a DSS s 2×, 5× a 10× molárním nadbytkem. Výsledky reakcí byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 44.). Na základě této analýzy byly pro další reakce vybrán 10× molární nadbytek DSG a DSS a 200× molární nadbytek EDC.



Obr 44. Fotografie SDS-PAGE gelů využitých k analýze výsledků síťujících reakcí s činidly v různém nadbytku. Dráha K obsahuje kontrolní vzorek s nezesíťnými proteiny.

5.6.2 MS analýza zesíťených peptidů

Větší množství proteinů bylo síťováno a následně připraveno pro analýzu postupem popsaným v bodě 4.9.2. Na základě analýzy reakční směsi pomocí SDS-PAGE bylo potvrzeno, že síťovací reakce proběhly dle očekávání (Obr. 45.) a mohlo být přistoupeno ke zpracování vzorků pro LC/MS analýzu postupem diskutovaným v bodě 4.9.2. Analýza nalezených signálů za využití dvou rozdílných přístupů k exportu dat odhalila větší množství spojení mezi peptidy obou proteinů, které byly manuálně zkontrolovány oproti oběma kontrolám, a z nichž byly vybrány pouze ty, které byly nalezeny pomocí obou přístupů. Některé spojené peptidy obsahovaly více aminokyselin, kam mohlo být činidlo navázáno. Naštěstí ve většině případů, bez ohledu na to, která z těchto aminokyselin byla vybrána, zapojení stále ukazovala na stejná nebo velmi blízká místa sekvence. Seznam všech nalezených zesíťení je detailně zpracován v tabulce 12.



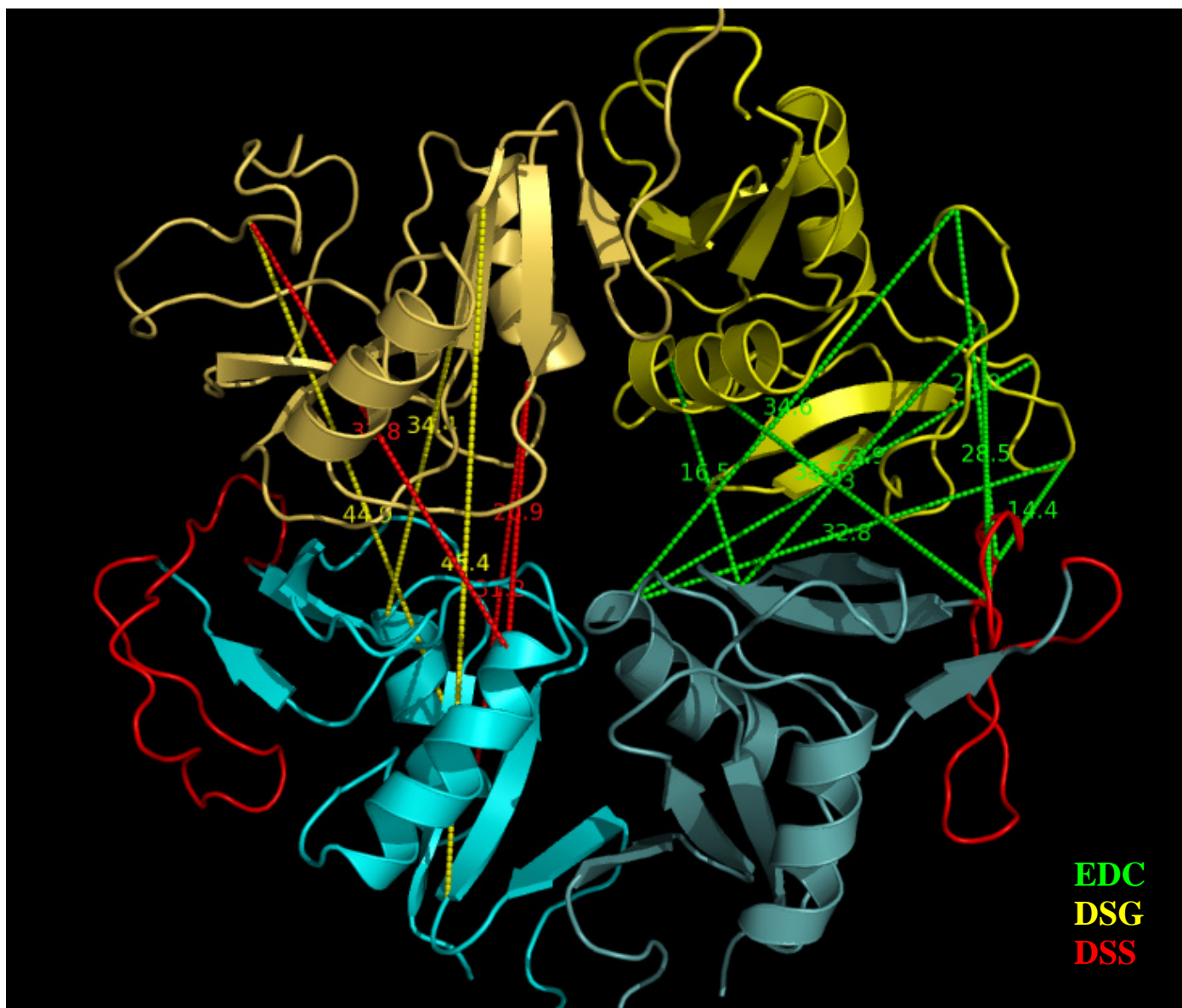
Obr. 45. Fotografie gelů využitých pro separaci reakční směsi po proběhnutí síťujících reakcí. Výsledek analýzy pro EDC je vyobrazen vlevo nahoře, pro DSG vpravo nahoře a pro DSS vlevo dole. Proteinové zóny odpovídající následně vyřezaným vzorkům jsou označeny zelenými šipkami, zóny odpovídající kontrolám jsou označeny červenými šipkami.

Tabulka 12: Seznam nalezených intermolekulárních zesíťení:

exp. hmota	teor. hmota	chyba (ppm)	sekvence	X-linker	délka v modelu (Å)
3052,4348	3052,4553	6,7	<pre> SIKE ----- SWIGLHRESSEHPWKWTDNTE </pre>	EDC	34,6 / 34,3 / 32,8
2460,1140	2460,1252	4,5	<pre> HPWKWTD ----- NGSCAAISGEKVTSE </pre>	EDC	23,9
3503,6321	3503,6387	1,9	<pre> SSEHPWKWTDNTE ----- VLKITGVTEENGSCAAISGE </pre>	EDC	24,0 / 28,5 / 14,4
3281,6145	3281,6011	4,1	<pre> YKANFDSWIGLHR ----- ITGVTEENGSCAAISGEK </pre>	EDC	35,5 / 16,5
3946,9619	3946,9502	3,0	<pre> ESSEHPWKWTDNTEYNNTIPIR ----- FLLDSIKEK </pre>	DSS	32,8
2836,5112	2836,5034	2,7	<pre> YKANFSWIGLHR ----- FLLDSIKEK </pre>	DSS	20,9
2522,2554	2522,25	2,1	<pre> YKANFDSWIGLHR ----- IDCDDKK </pre>	DSS	31,2
4375,0571	4375,0664	2,1	<pre> ESRIDCDKK ----- FDNQDELNFLMRYKANFDSWIGLHR </pre>	DSG	31,2
3590,6646	3590,6497	4,1	<pre> IDCDDKK ----- ESSEHPWKWTDNTEYNNTIPIR </pre>	DSG	44,9
6045,9639	6045,9487	2,5	<pre> WLSHRDKCFHVSQVSNTWKE ----- ERFAYLNNNGISSTRIYSLRMWICKLN </pre>	DSG	45,4 / 34,4

Tato zesíťení byla vizualizována pomocí homologního modelu zmíněného v bodě 4.10 a softwaru PyMOL (Obr. 46.). Zatímco některá zesíťení dobře splňovala omezení, která jsou dána délkou ramének molekul síťovacích činidel, další jasně naznačily, že model není zcela přesný. Aby byl schopen poskytnout přesné strukturní informace, vyžadoval by další zpřesnění. Do první zmíněné skupiny evidentně patří některá zesíťení činidly EDC a DSS, zatímco do druhé spadají především zesíťení činidly DSG a DSS. Kromě těchto dvou skupin se ale objevila další skupina zesíťení, kterou nebylo možno vysvětlit pouhou potřebou dalších úprav modelu. V tomto případě se především jednalo o zesíťení činidlem EDC jdoucí napříč

celým interakčním rozhraním v délce kolem 30 Å. Tato zesíťení by však zcela odpovídala veškerým omezením, kdyby jeden z proteinů byl otočen o 180° okolo vertikální osy.



Obr. 46. Vizualizace nalezených zesíťení na modelu interagujícího páru NKR-P1D (modře) a Clrb (žlutě).

6. Diskuse

Interakce receptorů NKR-P1D a Clrb byla popsána již před osmi lety, do dnešní doby však nebyly charakterizovány ani základní strukturní vlastnosti této interakce. Veškerá pozorování byla doposud prováděna pouze na živých buňkách transfekovaných či přirozeně exprimujících tyto receptory a přítomnost, případně síla interakce byla určována jen na základě míry inhibice buněčného zabíjení. Podle našich znalostí je toto vůbec první práce zabývající se strukturními detaily interakce kteréhokoliv NKR-P1 receptoru s jeho ligandem.

Proteiny Clrb a NKR-P1D byly rekombinantně připraveny v bakteriích *E.coli* ve formě inkluzních tělísek. V souladu s dříve publikovanými výsledky bylo třeba genový konstrukt kódující NKR-P1D upravit zavedením bodové mutace, která změnila aminokyselinu na pozici 118 z cysteinu na serin. Po této úpravě bylo možné oba proteiny renaturovat *in vitro* za využití metody rychlého naředění. Složení renaturačních pufrů bylo optimalizováno. Proteiny se skládaly ve formě monomerů a byly purifikovány pomocí kombinace iontově výměnné a gelově filtrační chromatografie do elektroforetické čistoty. Identita obou proteinů byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie určením molekulové hmoty celých proteinů i peptidovým mapováním. V případě Clrb byla pozorována deaminace terminálního asparaginu, pravděpodobně v průběhu přípravy vzorků a v případě NKR-P1D byly pozorovány dvě různé formy sbalení, které byly separovány iontově výměnnou chromatografií. Minoritní forma odpovídala ne zcela složenému proteinu s rozvolněnější strukturou, zatímco majoritní forma představovala kompaktněji složený protein.

Při absenci enzymatické aktivity nebo jasného vztahu mezi strukturou a vazbou ligandu jsou možnosti pro ověření správnosti foldu získaného během *in vitro* renaturace proteinů velmi omezené a většinou pouze nepřímé. Obvyklým předpokladem je, že když se protein *in vitro* skládá monodisperzně a zůstává solubilní, je to známkou korektnosti složení. Za účelem ověření monodisperzity foldů produkovaných proteinů byly oba proteiny připraveny z inkluzních tělísek získaných z bakterií, které rostly na minimálním M9 médiu, kde jediným zdrojem dusíku byl $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Takto připravené proteiny vykazují téměř 100% nabožení ^{15}N , který je vhodný pro NMR měření. Po renaturaci a purifikaci těchto proteinů byla naměřena $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC NMR spektra obou proteinů a v obou případech byla pozorována dobrá disperze signálů značící, že vzorky vykazují monodisperzní fold.

Dalším důležitým faktorem vypovídajícím o správnosti renaturace je zapojení disulfidových můstků. V případě Clrb a NKR-P1D receptorů je situace usnadněna tím, že oba

proteiny patří do strukturních rodin, u nichž se dá předpokládat, jaké disulfidové můstky by měly být v rámci těchto molekul pozorovány. NKR-P1D patří mezi C-lektinové receptory a dá se tedy předpokládat, že zapojení disulfidických můstků i u tohoto receptoru bude respektovat standardní schéma zapojení pozorované u všech ostatních C-lektinových receptorů. Kanonická doména lektinů C-typu obsahuje šest cysteinů, kdy první cystein je spojen s druhým, třetí s šestým a čtvrtý s pátým. Molekuly patřící do rodiny Clr, které jsou C-lektinům příbuzné, obsahují ve své „lectin-like“ doméně pouze čtyři cysteiny a cysteiny odpovídající sekvenčně čtvrtému a pátému cysteinu kanonické C-lektinové domény chybí. To znamená, že v případě Clrb molekul se dá očekávat zapojení prvního cysteinu s druhým a třetího se čtvrtým, který ale sekvenčně odpovídá cysteinu šestému kanonické C-lektinové domény. Tato hypotéza však doposud nebyla ověřena pro žádného člena Clr rodiny ani pro molekulu NKR-P1D. K určení zapojení disulfidových vazeb bylo využito protokolu modifikované elektroforézy a enzymatického štěpení vzorků využívajícího přítomnosti cystaminu, jakožto oxidujícího činidla ve všech pufrch, s následnou LC/MS analýzou. Tato analýza ověřila, že všechny disulfidické můstky jsou opravdu zapojeny dle předpokladu a nebyla pozorována žádná heterogenita.

Naměřená 2D NMR spektra a potvrzené zapojení disulfidických můstků dohromady představují přesvědčivé důkazy, že Clrb i NKR-P1D proteiny jsou korektně složeny, ačkoliv v obou případech se jedná pouze o důkazy nepřímé.

Pomocí analytické ultracentrifugy bylo ověřeno, že v roztoku pro oba proteiny existuje rovnováha mezi predominantní (99 %) monomerní formou a vyššími oligomerními stavy (1 %). Vlastní interakci mezi těmito monomerními formami NKR-P1D a Clrb v roztoku se však za použití gelové filtrace ani analytické ultracentrifugy přesvědčivě prokázat nepodařilo, ačkoliv byly oběma metodami pozorovány náznaky slabé interakce. Při redukci 3D prostoru na 2D povrch čipu bylo technikou povrchové plasmonové rezonance skutečně možno pozorovat slabou interakci, která překvapivě vykazovala pH závislost. Nejsilnější interakce byla pozorována při pH 4, zatímco při fyziologickém pH při použitých experimentálních podmínkách nebyla interakce prokázána. Zda je tento jev způsoben některou inherentní vlastností proteinů, která je odrazem fyziologické funkce, či se jedná o artefakt způsobený imobilizací proteinu na čip nebylo doposud vyřešeno. V kanálu obsahujícím imobilizovaný BSA jako kontrolu však žádná interakce pozorována nebyla ani při snížení pH, což naznačuje, že pozorovaná interakce mezi Clrb a NKR-P1D byla specifická. Nabízí se atraktivní myšlenka, že stoupající síla interakce proteinů se stoupající kyselostí prostředí může být formou regulace NK buněk, pro podporu této hypotézy však v tuto chvíli chybí další důkazy.

Dále zkoumat takto slabou nebo dokonce pouze transienční interakci ze strukturního hlediska je v současné době velice obtížné a proto bylo využito techniky proteinového síťování, které je schopno zachytit a imobilizovat i takovéto interakce. Jak bylo dříve prezentováno, chemické zesíťování je schopno specificky vázat proteiny interagující s $K_D > 25 \mu\text{M}$ při koncentracích proteinů přibližně $35 \mu\text{M}$ prakticky bez výskytu nespecifických komplexů vzniklých náhodným zesíťováním. Zastoupení nespecifických vedlejších produktů dramaticky narůstá až při dlouhých reakčních dobách (24 hodin) při vyšších koncentracích.^[242]

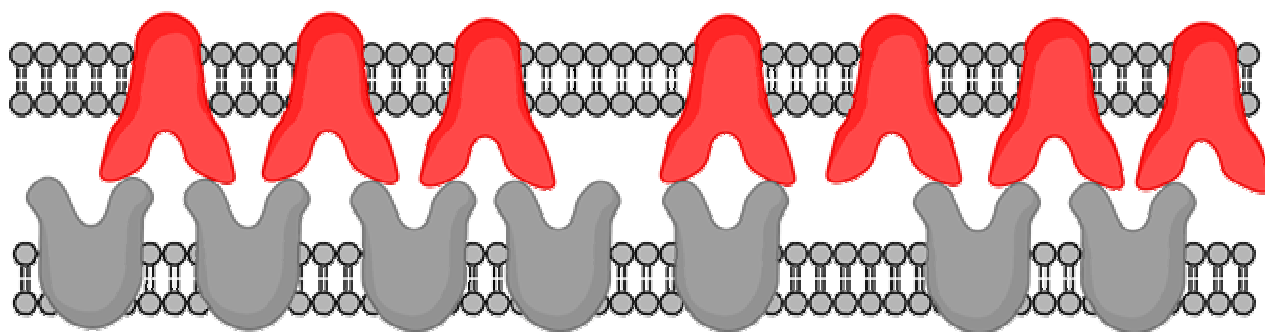
Pro účely síťování NKR-P1D a Clrb bylo využito činidel EDC, DSG a DSS a jejich koncentrace byla optimalizována. Vzhledem k výše uvedenému byly reakční podmínky nastaveny tak, aby pravděpodobnost nespecifického zesíťování byla omezena na minimum a větší množství obou proteinů bylo zesíťováno všemi třemi činidly. Po separaci reakčních směsí pomocí SDS-PAGE, enzymatickém štěpení proteinů a přípravě vzorků byla provedena LC/MS analýza. Po počítačovém zpracování dat byla všechna nalezená intermolekulární spojení manuálně zkontrolována proti kontrolám ve formě nesíťované směsi proteinů a směsi monomerů, které předtím prošly síťovací reakcí.

Zjištěná zesíťování byla vizualizována vytvořením molekulárního modelu interagujícího páru NKR-P1D a Clrb. Z těchto zesíťování některá velmi dobře splňovala strukturní omezení daná délkou rámeček síťovacích činidel, další naznačily, že model by potřeboval další upřesnění. Byla však nalezena i zesíťování, která nemohou splnit daná strukturní omezení bez ohledu na zpřesnění modelu. I tato spojení by ale splňovala veškeré strukturní požadavky, kdyby jeden z proteinů byl rotován o 180° okolo vertikální osy.

Tyto výsledky nás vedou k návrhu alternativního způsobu interakce NKR-P1D – Clrb receptor-ligandového páru. Podle tohoto modelu by jednotlivé dimery obou proteinů byly schopny nejen klasické „face-to-face“ interakce, kdy dimer jednoho proteinu interaguje právě s jedním dimerem druhého proteinu, ale i vytvoření jakéhosi řetězu či shluku, kdy každý dimer jednoho receptoru interaguje současně se dvěma dimery proteinu druhého (Obr. 47.).

Takovýto mechanismus interakce by vedl k signifikantnímu zvýšení celkové avidity, i přes velmi nízkou afinitu jednotlivých monomerních nebo dimerních proteinů, a může tedy vysvětlit nejen všechna pozorovaná zesíťování, ale i velmi nízkou vzájemnou afinitu, která byla demonstrována pro monomerní proteiny v roztoku.

Podle našich znalostí by se jednalo o první takovouto interakci popsanou pro tento typ receptorů, a bude tedy nutné poskytnout další experimentální důkazy předtím než bude možné tento model dále prezentovat.



Obr. 47. Schematické znázornění interakcí navržených na základě pozorovaných intermolekulárních zesíťení. Znázorněna je klasická „face-to-face“ interakce (uprostřed) i řetízky vytvořené nově navrženým typem interakce (vlevo a vpravo).

7. Souhrn výsledků

- Proteiny NKR-P1D a Clrb byly připraveny *in vitro* a jejich renaturace byla optimalizována
- Identita proteinů byla ověřena metodami hmotnostní spektrometrie
- Zapojení disulfidických můstků bylo určeno metodami hmotnostní spektrometrie
- Kvalita renaturace byla zkontrolována pomocí 2D NMR
- Pro oba proteiny byla v roztoku nalezena rovnováha mezi predominantní monomerní formou a minoritními vyššími oligomerními stavy
- Interakce mezi proteiny nebyla v roztoku jednoznačně potvrzena
- Za využití povrchové plasmonové rezonance byla pozorována slabá interakce, která byla pH dependentní.
- Pomocí chemického zesílení byla potvrzena interakce proteinů i v roztoku
- Na základě dat z chemického zesílení byl navržen model popisující interakci NKR-P1D s Clrb

8. Literatura

1. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Janeway's Immunobiology*. 2008, New York: Garland Science.
2. Jenner, E., *The Three Original Publications On Vaccination Against Smallpox*. Vol. 38, Part 4. The Harvard Classics. 1909 - 14, New York: P.F. Collier & Son.
3. Tauber, A. I., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(11): p. 897-901.
4. Gordon, S., *Eur J Immunol*, 2008. **38**(12): p. 3257-64.
5. Silverstein, A. M., *Cell Immunol*, 1999. **194**(2): p. 213-21.
6. Crist, E. and Tauber, A. I., *Biology & Philosophy*, 2000. **15**(4): p. 509-533.
7. Burnet, F. M., *CA Cancer J Clin*, 1976. **26**(2): p. 119-21.
8. Billingham, R. E., Brent, L. and Medawar, P. B., *Nature*, 1953. **172**(4379): p. 603-6.
9. Langman, R. E. and Cohn, M., *Scand J Immunol*, 1996. **44**(6): p. 544-8.
10. Lafferty, K. J. and Cunningham, A. J., *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1975. **53**(1): p. 27-42.
11. Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr., *Semin Immunol*, 1998. **10**(5): p. 351-3.
12. Matzinger, P., *Science*, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
13. Matzinger, P., *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 991-1045.
14. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr., *Nature*, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
15. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B., *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
16. Sancho, D., Joffre, O. P., Keller, A. M., Rogers, N. C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C., *Nature*, 2009. **458**(7240): p. 899-903.
17. Mariathasan, S., *Microbes Infect*, 2007. **9**(5): p. 664-71.
18. Tonegawa, S., Steinberg, C., Dube, S., and Bernardini, A., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(10): p. 4027-31.
19. Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H., *Eur J Immunol*, 1975. **5**(2): p. 112-7.
20. Trinchieri, G., *Adv Immunol*, 1989. **47**: p. 187-376.
21. Walzer, T., Blery, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S. H., Jaeger, S., Andre, P., Gauthier, L., Daniel, L., Chemin, K., Morel, Y., Dalod, M., Imbert, J., Pierres, M., Moretta, A., Romagne, F., and Vivier, E., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): p. 3384-9.
22. Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., and Ugolini, S., *Science*, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
23. Boos, M. D., Ramirez, K. and Kee, B. L., *Immunol Res*, 2008. **40**(3): p. 193-207.
24. Kim, S., Iizuka, K., Kang, H. S., Dokun, A., French, A. R., Greco, S., and Yokoyama, W. M., *Nat Immunol*, 2002. **3**(6): p. 523-8.
25. Di Santo, J. P., *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 257-86.
26. Freud, A. G. and Caligiuri, M. A., *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 56-72.
27. Farag, S. S. and Caligiuri, M. A., *Blood Rev*, 2006. **20**(3): p. 123-37.
28. Freud, A. G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H. C., Ferketich, A. K., Nuovo, G. J., Hughes, T. L., Marburger, T. B., Sung, J., Baiocchi, R. A., Guimond, M., and Caligiuri, M. A., *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 295-304.
29. Freud, A. G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M. T., Mao, H. C., Ferketich, A. K., and Caligiuri, M. A., *J Exp Med*, 2006. **203**(4): p. 1033-43.
30. Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., and Phillips, J. H., *J Immunol*, 1986. **136**(12): p. 4480-6.

31. Giuliani, M., Giron-Michel, J., Negrini, S., Vacca, P., Durali, D., Caignard, A., Le Bousse-Kerdiles, C., Chouaib, S., Devocelle, A., Bahri, R., Durrbach, A., Taoufik, Y., Ferrini, S., Croce, M., Mingari, M. C., Moretta, L., and Azzarone, B., *PLoS One*, 2008. **3**(5): p. e2241.
32. Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P., *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 189-220.
33. Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., and Kiessling, R., *Nature*, 1986. **319**(6055): p. 675-8.
34. Ljunggren, H. G. and Karre, K., *Immunol Today*, 1990. **11**(7): p. 237-44.
35. Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F., Fremont, D. H., and Yokoyama, W. M., *Nat Immunol*, 2003. **4**(8): p. 801-7.
36. Lilley, B. N. and Ploegh, H. L., *Immunol Rev*, 2005. **207**: p. 126-44.
37. Bodmer, W. F., Browning, M. J., Krausa, P., Rowan, A., Bicknell, D. C., and Bodmer, J. G., *Ann N Y Acad Sci*, 1993. **690**: p. 42-9.
38. Raulet, D. H. and Vance, R. E., *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(7): p. 520-31.
39. Gasser, S. and Raulet, D. H., *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 130-42.
40. Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B., and Lanier, L. L., *Science*, 2002. **296**(5571): p. 1323-6.
41. Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., and Porgador, A., *Nature*, 2001. **409**(6823): p. 1055-60.
42. Athie-Morales, V., O'Connor, G. M. and Gardiner, C. M., *J Immunol*, 2008. **180**(6): p. 4082-9.
43. Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J. F., Blaecke, A., Malissard, M., N'Guyen, T., Thieblemont, N., and Delneste, Y., *Blood*, 2004. **104**(6): p. 1778-83.
44. Ravetch, J. V. and Kinet, J. P., *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 457-92.
45. Yokoyama, W. M. and Kim, S., *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 143-54.
46. Orr, M. T., Murphy, W. J. and Lanier, L. L., *Nat Immunol*, 2010. **11**(4): p. 321-7.
47. Cruz-Munoz, M. E. and Veillette, A., *Nat Immunol*, 2010. **11**(4): p. 279-80.
48. Yang, T., Flint, M. S., Webb, K. M., and Chambers, W. H., *Immunol Res*, 2006. **36**(1-3): p. 43-50.
49. Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L., Degli-Esposti, M. A., and Hayakawa, Y., *Mol Immunol*, 2005. **42**(4): p. 501-10.
50. Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S., and Perussia, B., *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2375-80.
51. Lettau, M., Schmidt, H., Kabelitz, D., and Janssen, O., *Immunol Lett*, 2007. **108**(1): p. 10-9.
52. Rousalova, I. and Krepela, E., *Int J Oncol*, 2010. **37**(6): p. 1361-78.
53. Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., Jaju, M., and Lieberman, J., *J Biol Chem*, 2001. **276**(46): p. 43285-93.
54. Masson, D. and Tschopp, J., *J Biol Chem*, 1985. **260**(16): p. 9069-72.
55. Tschopp, J., Masson, D. and Stanley, K. K., *Nature*, 1986. **322**(6082): p. 831-4.
56. Russell, J. H. and Ley, T. J., *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 323-70.
57. Trapani, J. A., Browne, K. A., Smyth, M. J., and Jans, D. A., *J Biol Chem*, 1996. **271**(8): p. 4127-33.
58. Metkar, S. S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S. M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J. A., and Froelich, C. J., *Immunity*, 2002. **16**(3): p. 417-28.
59. Houchins, J. P., Kricek, F., Chujor, C. S., Heise, C. P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F. H., *Immunogenetics*, 1993. **37**(2): p. 102-7.

60. Gamen, S., Hanson, D. A., Kaspar, A., Naval, J., Krensky, A. M., and Anel, A., *J Immunol*, 1998. **161**(4): p. 1758-64.
61. Krensky, A. M., *Biochem Pharmacol*, 2000. **59**(4): p. 317-20.
62. Mahmood, Z. and Shukla, Y., *Exp Cell Res*, 2010. **316**(6): p. 887-99.
63. Andera, L., *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2009. **153**(3): p. 173-80.
64. Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., de Jong, S., and Samali, A., *Cancer Treat Rev*, 2009. **35**(3): p. 280-8.
65. Nagata, S., *Cell*, 1997. **88**(3): p. 355-65.
66. Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., Godowski, P. J., Wood, W. I., Gurney, A. L., Hillan, K. J., Cohen, R. L., Goddard, A. D., Botstein, D., and Ashkenazi, A., *Nature*, 1998. **396**(6712): p. 699-703.
67. Blott, E. J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M., and Griffiths, G. M., *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 13): p. 2405-16.
68. Lettau, M., Qian, J., Kabelitz, D., and Janssen, O., *Signal Transduction*, 2004. **4**(5): p. 206 - 211.
69. Martinez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Gamen, S., Monle n, I., Lasierra, P., Larrad, L., Pineiro, A., Alava, M. A., and Naval, J., *J Immunol*, 1999. **163**(3): p. 1274-81.
70. Frangmyr, L., Baranov, V., Nagaeva, O., Stendahl, U., Kjellberg, L., and Mincheva-Nilsson, L., *Mol Hum Reprod*, 2005. **11**(1): p. 35-41.
71. Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., and Fais, S., *J Exp Med*, 2002. **195**(10): p. 1303-16.
72. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A., *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 163-89.
73. Empson, V. G., McQueen, F. M. and Dalbeth, N., *Immunol Cell Biol*, 2010. **88**(1): p. 24-31.
74. Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E., and Caligiuri, M. A., *Blood*, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
75. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B., *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(12): p. 833-44.
76. Patterson, J. B., Thomis, D. C., Hans, S. L., and Samuel, C. E., *Virology*, 1995. **210**(2): p. 508-11.
77. Domingo-Gil, E., Toribio, R., Najera, J. L., Esteban, M., and Ventoso, I., *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e16711.
78. Ramana, C. V., Grammatikakis, N., Chernov, M., Nguyen, H., Goh, K. C., Williams, B. R., and Stark, G. R., *EMBO J*, 2000. **19**(2): p. 263-72.
79. Xu, X., Fu, X. Y., Plate, J., and Chong, A. S., *Cancer Res*, 1998. **58**(13): p. 2832-7.
80. Tsujimoto, M., Yip, Y. K. and Vilcek, J., *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2441-4.
81. MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C., *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 323-50.
82. Strunk, R. C., Cole, F. S., Perlmutter, D. H., and Colten, H. R., *J Biol Chem*, 1985. **260**(28): p. 15280-5.
83. Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Wang, J. M., Ortaldo, J. R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D. J., and Oppenheim, J. J., *J Exp Med*, 1993. **177**(6): p. 1809-14.
84. Peters, P. M., Ortaldo, J. R., Shalaby, M. R., Svedersky, L. P., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Hass, P. E., Aggarwal, B. B., Herberman, R. B., Goeddel, D. V., and et al., *J Immunol*, 1986. **137**(8): p. 2592-8.

85. Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R. B., Whiteside, T. L., and Vujanovic, N. L., *J Immunol*, 1999. **163**(10): p. 5358-66.
86. Silva-Santos, B., Pennington, D. J. and Hayday, A. C., *Science*, 2005. **307**(5711): p. 925-8.
87. Pfeffer, K., *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(3-4): p. 185-91.
88. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
89. Dellinger, R. P., *Clin Infect Dis*, 2003. **36**(10): p. 1259-65.
90. Kohase, M., Henriksen-DeStefano, D., May, L. T., Vilcek, J., and Sehgal, P. B., *Cell*, 1986. **45**(5): p. 659-66.
91. Klebanoff, S. J., Vadas, M. A., Harlan, J. M., Sparks, L. H., Gamble, J. R., Agosti, J. M., and Waltersdorff, A. M., *J Immunol*, 1986. **136**(11): p. 4220-5.
92. Yokota, S., Geppert, T. D. and Lipsky, P. E., *J Immunol*, 1988. **140**(2): p. 531-6.
93. Philip, R. and Epstein, L. B., *Nature*, 1986. **323**(6083): p. 86-9.
94. Baluk, P., Yao, L. C., Feng, J., Romano, T., Jung, S. S., Schreiter, J. L., Yan, L., Shealy, D. J., and McDonald, D. M., *J Clin Invest*, 2009. **119**(10): p. 2954-64.
95. Bertolini, D. R., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Smith, D. D., and Mundy, G. R., *Nature*, 1986. **319**(6053): p. 516-8.
96. Collins, T., Lapierre, L. A., Fiers, W., Strominger, J. L., and Pober, J. S., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(2): p. 446-50.
97. Efimov, G. A., Kruglov, A. A., Tillib, S. V., Kuprash, D. V., and Nedospasov, S. A., *Mol Immunol*, 2009. **47**(1): p. 19-27.
98. Gray, J. D., Hirokawa, M. and Horwitz, D. A., *J Exp Med*, 1994. **180**(5): p. 1937-42.
99. Grant, L. R., Yao, Z. J., Hedrich, C. M., Wang, F., Moorthy, A., Wilson, K., Ranatunga, D., and Bream, J. H., *Genes Immun*, 2008. **9**(4): p. 316-27.
100. Loza, M. J., Zamai, L., Azzoni, L., Rosati, E., and Perussia, B., *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1273-81.
101. Cuturi, M. C., Anegon, I., Sherman, F., Loudon, R., Clark, S. C., Perussia, B., and Trinchieri, G., *J Exp Med*, 1989. **169**(2): p. 569-83.
102. Dorner, B. G., Smith, H. R., French, A. R., Kim, S., Poursine-Laurent, J., Beckman, D. L., Pingel, J. T., Kroczeck, R. A., and Yokoyama, W. M., *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 3119-31.
103. Morandi, B., Bougras, G., Muller, W. A., Ferlazzo, G., and Munz, C., *Eur J Immunol*, 2006. **36**(9): p. 2394-400.
104. Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G., *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 327-33.
105. Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M. C., and Moretta, A., *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 219-28.
106. Ferlazzo, G. and Munz, C., *J Clin Immunol*, 2009. **29**(3): p. 265-73.
107. Zhang, A. L., Colmenero, P., Purath, U., Teixeira de Matos, C., Hueber, W., Klareskog, L., Tarner, I. H., Engleman, E. G., and Soderstrom, K., *Blood*, 2007. **110**(7): p. 2484-93.
108. Blanca, I. R., Bere, E. W., Young, H. A., and Ortaldo, J. R., *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6132-9.
109. Nedvetzki, S., Sowinski, S., Eagle, R. A., Harris, J., Vely, F., Pende, D., Trowsdale, J., Vivier, E., Gordon, S., and Davis, D. M., *Blood*, 2007. **109**(9): p. 3776-85.
110. Zingoni, A., Sornasse, T., Cocks, B. G., Tanaka, Y., Santoni, A., and Lanier, L. L., *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 3716-24.
111. Hanna, J., Gonen-Gross, T., Fitchett, J., Rowe, T., Daniels, M., Arnon, T. I., Gazit, R., Joseph, A., Schjetne, K. W., Steinle, A., Porgador, A., Mevorach, D., Goldman-Wohl,

- D., Yagel, S., LaBarre, M. J., Buckner, J. H., and Mandelboim, O., *J Clin Invest*, 2004. **114**(11): p. 1612-23.
112. Rabinovich, B. A., Li, J., Shannon, J., Hurren, R., Chalupny, J., Cosman, D., and Miller, R. G., *J Immunol*, 2003. **170**(7): p. 3572-6.
113. Trivedi, P. P., Roberts, P. C., Wolf, N. A., and Swanborg, R. H., *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4590-7.
114. Lu, L., Ikizawa, K., Hu, D., Werneck, M. B., Wucherpfennig, K. W., and Cantor, H., *Immunity*, 2007. **26**(5): p. 593-604.
115. Kurtz, J. and Franz, K., *Nature*, 2003. **425**(6953): p. 37-8.
116. Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R., and Barillas-Mury, C., *Science*, 2010. **329**(5997): p. 1353-5.
117. Sun, J. C., Lopez-Verges, S., Kim, C. C., DeRisi, J. L., and Lanier, L. L., *J Immunol*, 2011. **186**(4): p. 1891-7.
118. O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L., and von Andrian, U. H., *Nat Immunol*, 2006. **7**(5): p. 507-16.
119. Sun, J. C., Beilke, J. N. and Lanier, L. L., *Nature*, 2009. **457**(7229): p. 557-61.
120. Burnet, F. M., *Prog Exp Tumor Res*, 1970. **13**: p. 1-27.
121. Sullivan, J. L., Byron, K. S., Brewster, F. E., and Purtilo, D. T., *Science*, 1980. **210**(4469): p. 543-5.
122. Penn, I., *Clin Exp Immunol*, 1981. **46**(3): p. 459-74.
123. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K., *Lancet*, 2000. **356**(9244): p. 1795-9.
124. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A., *Science*, 2002. **295**(5562): p. 2097-100.
125. Burke, S., Lakshmikanth, T., Colucci, F., and Carbone, E., *Trends Immunol*, 2010. **31**(9): p. 339-45.
126. Li, L., Liu, L. N., Feller, S., Allen, C., Shivakumar, R., Fratantoni, J., Wolfraim, L. A., Fujisaki, H., Campana, D., Chopas, N., Dzekunov, S., and Peshwa, M., *Cancer Gene Ther*, 2010. **17**(3): p. 147-54.
127. Kelly, J. M., Darcy, P. K., Markby, J. L., Godfrey, D. I., Takeda, K., Yagita, H., and Smyth, M. J., *Nat Immunol*, 2002. **3**(1): p. 83-90.
128. Gill, R. G., *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(5): p. 649-54.
129. Schleinitz, N., Vely, F., Harle, J. R., and Vivier, E., *Immunology*, 2010. **131**(4): p. 451-8.
130. Lanier, L. L., *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 225-74.
131. Yokoyama, W. M., Kehn, P. J., Cohen, D. I., and Shevach, E. M., *J Immunol*, 1990. **145**(7): p. 2353-8.
132. Brown, M. G. and Scalzo, A. A., *Semin Immunol*, 2008. **20**(6): p. 361-8.
133. Hao, L., Klein, J. and Nei, M., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(9): p. 3192-7.
134. Colonna, M., Moretta, A., Vely, F., and Vivier, E., *Immunol Today*, 2000. **21**(9): p. 428-31.
135. Martin, A. M., Kulski, J. K., Witt, C., Pontarotti, P., and Christiansen, F. T., *Trends Immunol*, 2002. **23**(2): p. 81-8.
136. Ravetch, J. V. and Lanier, L. L., *Science*, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
137. Scharenberg, A. M., El-Hillal, O., Fruman, D. A., Beitz, L. O., Li, Z., Lin, S., Gout, I., Cantley, L. C., Rawlings, D. J., and Kinet, J. P., *EMBO J*, 1998. **17**(7): p. 1961-72.
138. Andreotti, A. H., Schwartzberg, P. L., Joseph, R. E., and Berg, L. J., *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(7): p. a002287.
139. Long, E. O., *Immunol Rev*, 2008. **224**: p. 70-84.

140. Hoglund, P. and Brodin, P., *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(10): p. 724-34.
141. Lanier, L. L., *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 495-502.
142. Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., and Long, E. O., *Blood*, 2006. **107**(1): p. 159-66.
143. Hibbs, M. L., Selvaraj, P., Carpen, O., Springer, T. A., Kuster, H., Jouvin, M. H., and Kinet, J. P., *Science*, 1989. **246**(4937): p. 1608-11.
144. Anderson, P., Caligiuri, M., Ritz, J., and Schlossman, S. F., *Nature*, 1989. **341**(6238): p. 159-62.
145. Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C., and Phillips, J. H., *Nature*, 1998. **391**(6668): p. 703-7.
146. Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., and Phillips, J. H., *Science*, 1999. **285**(5428): p. 730-2.
147. Anfossi, N., Lucas, M., Diefenbach, A., Buhring, H. J., Raulet, D., Tomasello, E., and Vivier, E., *Eur J Immunol*, 2003. **33**(12): p. 3514-22.
148. Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J., and Leibson, P. J., *Nat Immunol*, 2003. **4**(6): p. 557-64.
149. Lanier, L. L., *Immunol Rev*, 2009. **227**(1): p. 150-60.
150. Upshaw, J. L., Arneson, L. N., Schoon, R. A., Dick, C. J., Billadeau, D. D., and Leibson, P. J., *Nat Immunol*, 2006. **7**(5): p. 524-32.
151. Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsia, J. K., Vivier, E., and Raulet, D. H., *Nat Immunol*, 2002. **3**(12): p. 1142-9.
152. Andre, P., Castriconi, R., Espeli, M., Anfossi, N., Juarez, T., Hue, S., Conway, H., Romagne, F., Dondero, A., Nanni, M., Caillat-Zucman, S., Raulet, D. H., Bottino, C., Vivier, E., Moretta, A., and Paul, P., *Eur J Immunol*, 2004. **34**(4): p. 961-71.
153. Vaidya, S. V. and Mathew, P. A., *Immunol Lett*, 2006. **105**(2): p. 180-4.
154. Ma, C. S., Nichols, K. E. and Tangye, S. G., *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 337-79.
155. Clarkson, N. G., Simmonds, S. J., Puklavec, M. J., and Brown, M. H., *J Biol Chem*, 2007. **282**(35): p. 25385-94.
156. Yokoyama, W. M. and Plougastel, B. F., *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(4): p. 304-16.
157. Wilhelm, B. T., Gagnier, L. and Mager, D. L., *Genomics*, 2002. **80**(6): p. 646-61.
158. Westgaard, I. H., Berg, S. F., Orstavik, S., Fossum, S., and Dissen, E., *Eur J Immunol*, 1998. **28**(6): p. 1839-46.
159. Mehta, I. K., Smith, H. R., Wang, J., Margulies, D. H., and Yokoyama, W. M., *Cell Immunol*, 2001. **209**(1): p. 29-41.
160. Smith, K. M., Wu, J., Bakker, A. B., Phillips, J. H., and Lanier, L. L., *J Immunol*, 1998. **161**(1): p. 7-10.
161. Tormo, J., Natarajan, K., Margulies, D. H., and Mariuzza, R. A., *Nature*, 1999. **402**(6762): p. 623-31.
162. Furukawa, H., Iizuka, K., Poursine-Laurent, J., Shastri, N., and Yokoyama, W. M., *J Immunol*, 2002. **169**(1): p. 126-36.
163. Silver, E. T., Gong, D. E., Chang, C. S., Amrani, A., Santamaria, P., and Kane, K. P., *J Immunol*, 2000. **165**(4): p. 1771-81.
164. Silver, E. T., Gong, D., Hazes, B., and Kane, K. P., *J Immunol*, 2001. **166**(4): p. 2333-41.
165. Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F. H., *J Exp Med*, 1991. **173**(4): p. 1017-20.
166. Plougastel, B. and Trowsdale, J., *Eur J Immunol*, 1997. **27**(11): p. 2835-9.
167. Bellon, T., Heredia, A. B., Llano, M., Minguela, A., Rodriguez, A., Lopez-Botet, M., and Aparicio, P., *J Immunol*, 1999. **162**(7): p. 3996-4002.

168. Vance, R. E., Jamieson, A. M. and Raulet, D. H., *J Exp Med*, 1999. **190**(12): p. 1801-12.
169. Lohwasser, S., Hande, P., Mager, D. L., and Takei, F., *Eur J Immunol*, 1999. **29**(3): p. 755-61.
170. Shum, B. P., Flodin, L. R., Muir, D. G., Rajalingam, R., Khakoo, S. I., Cleland, S., Guethlein, L. A., Uhrberg, M., and Parham, P., *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 240-52.
171. Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and McMichael, A. J., *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
172. Plougastel, B., Jones, T. and Trowsdale, J., *Immunogenetics*, 1996. **44**(4): p. 286-91.
173. Vales-Gomez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A., Lopez-Botet, M., and Strominger, J. L., *EMBO J*, 1999. **18**(15): p. 4250-60.
174. Michaelsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L. L., Karre, K., and Soderstrom, K., *J Exp Med*, 2002. **196**(11): p. 1403-14.
175. Radaev, S. and Sun, P. D., *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2003. **32**: p. 93-114.
176. Smyth, M. J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W. M., and Hayakawa, Y., *J Exp Med*, 2005. **202**(5): p. 583-8.
177. Koo, G. C., Jacobson, J. B., Hammerling, G. J., and Hammerling, U., *J Immunol*, 1980. **125**(3): p. 1003-6.
178. Mesci, A., Ljutic, B., Makrigiannis, A. P., and Carlyle, J. R., *Immunol Res*, 2006. **35**(1-2): p. 13-26.
179. Ryan, J. C., Turck, J., Niemi, E. C., Yokoyama, W. M., and Seaman, W. E., *J Immunol*, 1992. **149**(5): p. 1631-5.
180. Carlyle, J. R., Martin, A., Mehra, A., Attisano, L., Tsui, F. W., and Zuniga-Pflucker, J. C., *J Immunol*, 1999. **162**(10): p. 5917-23.
181. Carlyle, J. R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L. H., Rousselle, E., Troke, A. D., Proteau, M. F., and Makrigiannis, A. P., *J Immunol*, 2006. **176**(12): p. 7511-24.
182. Lanier, L. L., Chang, C. and Phillips, J. H., *J Immunol*, 1994. **153**(6): p. 2417-28.
183. Arase, N., Arase, H., Park, S. Y., Ohno, H., Ra, C., and Saito, T., *J Exp Med*, 1997. **186**(12): p. 1957-63.
184. Aust, J. G., Gays, F., Mickiewicz, K. M., Buchanan, E., and Brooks, C. G., *J Immunol*, 2009. **183**(1): p. 106-16.
185. Kveberg, L., Dai, K. Z., Inngjerdigen, M., Brooks, C. G., Fossum, S., and Vaage, J. T., *Immunogenetics*, 2011.
186. Plougastel, B., Matsumoto, K., Dubbelde, C., and Yokoyama, W. M., *Immunogenetics*, 2001. **53**(7): p. 592-8.
187. Pozo, D., Vales-Gomez, M., Mavaddat, N., Williamson, S. C., Chisholm, S. E., and Reyburn, H., *J Immunol*, 2006. **176**(4): p. 2397-406.
188. Exley, M., Porcelli, S., Furman, M., Garcia, J., and Balk, S., *J Exp Med*, 1998. **188**(5): p. 867-76.
189. Rosen, D. B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P. A., Warren, H. S., and Lanier, L. L., *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 7796-9.
190. Aldemir, H., Prod'homme, V., Dumaurier, M. J., Retiere, C., Poupon, G., Cazareth, J., Bihl, F., and Braud, V. M., *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 7791-5.
191. Giorda, R. and Trucco, M., *J Immunol*, 1991. **147**(5): p. 1701-8.
192. Kung, S. K., Su, R. C., Shannon, J., and Miller, R. G., *J Immunol*, 1999. **162**(10): p. 5876-87.
193. Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., and Moretta, L., *Immunol Today*, 2000. **21**(5): p. 228-34.

194. Marsh, S. G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D. E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L. A., Shilling, H., Garcia, C. A., Hsu, K. C., and Wain, H., *Immunogenetics*, 2003. **55**(4): p. 220-6.
195. Campbell, K. S. and Purdy, A. K., *Immunology*, 2011. **132**(3): p. 315-25.
196. Kikuchi-Maki, A., Catina, T. L. and Campbell, K. S., *J Immunol*, 2005. **174**(7): p. 3859-63.
197. Vilches, C. and Parham, P., *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 217-51.
198. Kelley, J., Walter, L. and Trowsdale, J., *PLoS Genet*, 2005. **1**(2): p. 129-39.
199. Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Parham, P., *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 739-51.
200. Thomas, R., Yamada, E., Alter, G., Martin, M. P., Bashirova, A. A., Norman, P. J., Altfeld, M., Parham, P., Anderson, S. K., McVicar, D. W., and Carrington, M., *J Immunol*, 2008. **180**(10): p. 6743-50.
201. Stewart, C. A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F. A., Moretta, A., Sun, P. D., Ugolini, S., and Vivier, E., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(37): p. 13224-9.
202. Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., and Lopez-Botet, M., *J Exp Med*, 1997. **186**(11): p. 1809-18.
203. Chapman, T. L., Heikeman, A. P. and Bjorkman, P. J., *Immunity*, 1999. **11**(5): p. 603-13.
204. Navarro, F., Llano, M., Bellon, T., Colonna, M., Geraghty, D. E., and Lopez-Botet, M., *Eur J Immunol*, 1999. **29**(1): p. 277-83.
205. Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A., *J Exp Med*, 1997. **186**(7): p. 1129-36.
206. Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., and Moretta, A., *Eur J Immunol*, 1999. **29**(5): p. 1656-66.
207. Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., and Moretta, A., *J Exp Med*, 1998. **188**(5): p. 953-60.
208. Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., and Biassoni, R., *J Exp Med*, 1999. **189**(5): p. 787-96.
209. Biassoni, R., Pessino, A., Bottino, C., Pende, D., Moretta, L., and Moretta, A., *Eur J Immunol*, 1999. **29**(3): p. 1014-20.
210. Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A., *J Exp Med*, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
211. Davis, S. J. and van der Merwe, P. A., *Immunol Today*, 1996. **17**(4): p. 177-87.
212. Cannons, J. L., Tangye, S. G. and Schwartzberg, P. L., *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 665-705.
213. Plougastel, B., Dubbelde, C. and Yokoyama, W. M., *Immunogenetics*, 2001. **53**(3): p. 209-14.
214. Tian, W., Nunez, R., Cheng, S., Ding, Y., Tumang, J., Lyddane, C., Roman, C., and Liou, H. C., *Cell Immunol*, 2005. **234**(1): p. 39-53.
215. Zhou, H., Kartsogiannis, V., Hu, Y. S., Elliott, J., Quinn, J. M., McKinstry, W. J., Gillespie, M. T., and Ng, K. W., *J Biol Chem*, 2001. **276**(18): p. 14916-23.
216. Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X. Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M. B., and Boyle, W. J., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(7): p. 3540-5.

217. 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., and Gillespie, M. T., *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 30850-60.
218. Gange, C. T., Quinn, J. M., Zhou, H., Kartsogiannis, V., Gillespie, M. T., and Ng, K. W., *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 29043-9.
219. Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H., and Raulet, D. H., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(10): p. 3527-32.
220. Hanč, P., *Rekombinantní exprese receptorů myších zabíječských buněk mNKR-P1D a mClrb*, Bakalářská práce, Katedra Biochemie, Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy, Praha, 2009.
221. Sambrook, J., Fritsch E., Maniatis T., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
222. Lilie, H., Schwarz, E. and Rudolph, R., *Curr Opin Biotechnol*, 1998. **9**(5): p. 497-501.
223. Bezouska, K., Nepovim, A., Horvath, O., Pospisil, M., Hamann, J., and Feizi, T., *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **208**(1): p. 68-74.
224. Rozbesky, D., Kavan, D., Chmelik, J., Novak, P., Vanek, O., and Bezouska, K., *Protein Expr Purif*, 2011. **77**(2): p. 178-84.
225. Rudolph, R. and Lilie, H., *FASEB J*, 1996. **10**(1): p. 49-56.
226. Weiss, J., *Handbook of Ion Chromatography*. Vol. 1. 2004, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
227. Wu, C., *Handbook of Size Exclusion Chromatography*. 1995, New York: MARCEL DEKKER, INC.
228. Weber, K. and Osborn, M., *J Biol Chem*, 1969. **244**(16): p. 4406-12.
229. Allen, R. C., Moore, D. J. and Fisher, J. W., *Ann N Y Acad Sci*, 1968. **149**(1): p. 63-70.
230. Bradford, M. M., *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
231. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., and Matsuo, T., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1988. **2**(8): p. 151-153.
232. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M., *Science*, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
233. de Hoffman, E., Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3rd ed. 2007, Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
234. Han, X., Aslanian, A. and Yates, J. R., 3rd, *Curr Opin Chem Biol*, 2008. **12**(5): p. 483-90.
235. Pompach, P., Man, P., Kavan, D., Hofbauerova, K., Kumar, V., Bezouska, K., Havlicek, V., and Novak, P., *J Mass Spectrom*, 2009. **44**(11): p. 1571-8.
236. Rule, G. S., Hitchens, T.K., *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. Focus on Structural Biology, ed. R. Kaptein. 2006, Dordrecht: Springer.
237. Lebowitz, J., Lewis, M. S. and Schuck, P., *Protein Sci*, 2002. **11**(9): p. 2067-79.
238. Schasfoort, R. B. M., Tuddos, A.J., *Handbook of surface plasmon resonance*. 2008, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
239. Vaisocherova, H., Mrkvova, K., Piliarik, M., Jinoch, P., Steinbachova, M., and Homola, J., *Biosens Bioelectron*, 2007. **22**(6): p. 1020-6.
240. Sinz, A., *Mass Spectrom Rev*, 2006. **25**(4): p. 663-82.
241. Sinz, A., *J Mass Spectrom*, 2003. **38**(12): p. 1225-37.
242. Madler, S., Seitz, M., Robinson, J., and Zenobi, R., *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010. **21**(10): p. 1775-83.