

Rekombinantní exprese a studium receptoru dendritických buněk DCL-1

Eliška Pospíšilová

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie

ABSTRAKT

Dendritické buňky, vyskytující se v hojném počtu téměř ve všech tkáních, na svém povrchu exprimují C-lektinový receptor DCL-1 (CD302). Tato molekula se řadí k transmembránovým receptorům první třídy, což znamená, že N-terminální část, na které se nachází signální sekvence a doména typu C-lektinů vázající sacharidové struktury (CTLD), je lokalizována extracelulárně, zatímco C-terminální část, která obsahuje potenciální fosforylační místa a signální sekvenci pro intracelulární transport, se nachází v cytosolu. Jelikož je sekvence tohoto proteinu v rámci všech savců vysoce konzervovaná, lze usuzovat na jeho důležitou fyziologickou úlohu. Přesto je tato molekula stále málo prozkoumaná.

Tato práce se zabývá extracelulární částí receptoru DCL-1, především úsekem obsahujícím CTLD. Abychom se o této molekule více dozvěděli, byl na základě předchozích zkušeností laboratoře vybrán vhodný produkční systém, zahrnující bakteriální buňky *E. coli* BL21 (DE3) Gold, které produkují cílený protein ve formě inkluzních tělísek do cytoplasmy. Dále byly optimalizovány podmínky *in vitro* renaturace a analytickými metodami bylo zkontrolováno, zda je protein v dostatečně nativním stavu pro uskutečnění dalších pokusů.

Molekula byla v dalším kroku značena fluorescenčními barvami NHS-Fluoresceinem a Alexou Fluor, kdy část značená Alexou Fluor byla poslána pro širší vazebné testy se sacharidovými strukturami do Centra pro funkční glykomiku (Consortium for Functional Glycomics). V naší laboratoři jsme s proteinem značeným radioaktivním ¹²⁵I též uskutečnily vazebné testy na určité sacharidy, z jejichž výsledků lze předpokládat možnou vazebnou aktivitu a usuzovat na biologickou funkci tohoto receptoru.