

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Příprava dimerní formy myšního NK
buněčného receptoru NKR-P1C**

Preparation of dimeric form of mouse NK cell receptor NKR-P1C

Bakalářská práce

Autor práce: Helena Pucholtová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

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

V Praze dne:

.....

Helena Pucholtová

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce a trpělivé vysvětlování dotazů a také Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za umožnění vykonání bakalářské práce. Dále pak všem členům laboratoře 204 za příjemné prostředí a vzájemnou výpomoc. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům a všem, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

Obsah

Seznam zkratk	6
1. Úvod	9
2. Literární úvod	10
2.1. Imunitní systém	10
2.1.1. Druhy imunitních mechanismů	10
2.1.2. Buňky imunitního systému	12
2.2. NK buňky	13
2.2.1. Funkce NK buněk	14
2.2.2. Buněčné rozpoznávání	14
2.2.3. Cytotoxicita NK buněk	17
2.2.4. Receptory NK buněk	19
2.2.4.1. Receptory rodiny NKR-P1	21
3. Cíle práce	23
4. Materiál	24
4.1. Přístroje a pomůcky	24
4.2. Chemikálie	25
4.3. Enzymy	27
4.4. Bakteriální kmeny a buněčné linie	27
4.5. Vektory	27
4.6. Roztoky a média	27
5. Metody	29
5.1. Rozmrazování buněčné linie HEK293S	29
5.2. Suspenzní kultivace	29
5.3. Počítání buněk	30
5.4. Tranzientní transfekce	30
5.5. Purifikace pomocí kolony HiTrap MabSelect SuRe	31
5.6. Gelová permeační chromatografie	31
5.7. Štěpení TEV proteázou	31
5.8. Chelatační chromatografie	32
5.9. SDS elektroforéza	32
5.10. Transformace bakterií	33

5.11. Kultivace bakterií a produkce NKR-P1C	33
5.12. Autoindukční médium	34
5.13. Izolace inkluzních tělísek	35
5.14. Rozpuštění inkluzních tělísek	35
5.15. Renaturace proteinu	35
5.16. Ionexová chromatografie	36
5.17 Stanovení koncentrace proteinu	36
6. Výsledky	37
6.1. Fúzní konstrukt NKR-P1C v plazmidu pYD5	37
6.2. Příprava proteinu expresí v buněčné linii HEK293	38
6.3. Purifikace proteinu připraveného v buněčné linii HEK293	39
6.4. Příprava NKR-P1C proteinu renaturací z inkluzních tělísek exprimovaných v buňkách <i>E. coli</i> BL-21 Gold	43
7. Diskuze	50
8. Závěr	54
9. Seznam citované literatury	55

Seznam zkratek:

AA	akrylamid
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách, angl. <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AK	aminokyselina
AI	autoindukční médium
APC	antigen prezentující buňky, angl. <i>antigen presenting cells</i>
APS	persíran amonný, angl. <i>ammonium persulfate</i>
BSA	hovězí sérový albumin, angl. <i>bovine serum albumin</i>
CBB R-250	barva Coomassie Brilliant Blue R-250
CD	označení povrchových molekul leukocytů, angl. <i>cluster of differentiation</i> ,
CRD	lektinová doména vázající sacharid, angl. <i>carbohydrate-recognition domain</i>
CTL	cytotoxické T lymfocyty, angl. <i>cytotoxic T lymphocytes</i>
DAP12	12kDa adaptorový protein jinak nazývaný KARAP
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	směs deoxynukleotidtrifosfátů
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ExCELL	médium pro tkáňové kultury
F17	médium pro tkáňové kultury
Fas/FasL	typ transmembránového proteinu CD95/CD95L, L= ligand
Fc	část molekuly protilátky, angl. <i>fragment, crystallizable</i>
FcεRIγ	vysokoafinitní receptor pro IgE, angl. <i>Fc epsilon receptor type I gamma chain</i>
GPC	gelová permeační chromatografie
GPC/TEV	gelová permeační chromatografie po odštěpení Fc fragmentu TEV proteázou
H-2	myší MHC gp I.
HEK293	lidské embryonální ledvinné buňky, číslo 293 značí číslo pokusu, angl. <i>human embryonic kidney</i>
HEPES	pufr, N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina

HLA	lidský leukocytární antigen, angl. <i>human leukocyte antigens</i>
HPLC	vysokoúčinná kapalinná chromatografie, angl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
ILT	imunoglobulinový transkript, angl. <i>Ig-like transcript</i>
IPTG	induktor, angl. <i>isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i>
ITAM	imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv, angl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv, angl. <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
KARAP	též DAP12, protein asociovaný s aktivačními receptory zabíječských buněk, angl. <i>killer activating receptor associated protein</i>
KIR	imunoglobulinový receptor zabíječských buněk, angl. <i>killer cell Ig-like receptor</i>
LAK	zabíječská aktivita aktivovaná lymfokiny, angl. <i>lymfokine-activated killer Aktivita</i>
LB	název média podle Luria-Bertaniho
LCR	komplex genů pro receptory leukocytů, angl. <i>leukocyte receptor complex</i>
LGL	velké granulární lymfocyty, angl. <i>large granular lymphocytes</i>
LIR	imunoglobulinový receptor leukocytů, angl. <i>leukocyte immunoglobulin-like receptor</i>
Ly-49	rodina lymfocytárních receptorů C-lektinového typu, angl. <i>lymphocyte antigen 49</i>
M-CSF	faktor stimulující tvorbu makrofágů, angl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
ME	merkptoethanol
MES	pufr, 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MHC gp I.	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy, angl. <i>major histocompatibility complex type I. glycoproteins</i>
NK	„přirození zabíječi“, buňky imunitního systému, angl. <i>natural killers</i>

NKR-P1	rodina receptorů NK buněk C-lektinového typu, angl. <i>natural killer receptor - protein 1</i>
NKG2	rodina C-lektinových receptorů NK buněk, angl. <i>natural killer group 2</i>
PBS	fosfátový pufr, angl. <i>phosphate buffered saline</i>
PEI	polyethylenimin
PI3	fosfatidylinositol-3'-kináza
PK136	označení monoklonální protilátky rozpoznávající NKRP-1 receptor
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluorid
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
SH2	tyrosinová fosfatáza
SHP	proteinová tyrosinová fosfatáza, angl. <i>SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
Syk	tyrosin kináza ve slezině, angl. <i>spleen tyrosine kinase</i>
TCR	receptory T-lymfocytů, angl. <i>T cells receptors</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylen diamin
TEV	virus tabákové mazaiky, angl. <i>tobacco etch virus protease</i>
TK	tkáňové kultury
TNF	faktor nekrotizující nádory, angl. <i>tumor necrosis factor</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZAP70	protein kináza 70 asociovaná se zeta-řetězcem TCR, angl. <i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

1. Úvod

NK buňky jsou buňky imunitního systému, které zprostředkovávají vrozenou imunitu proti patogenům a nádorům, aniž by musely být předem vystaveny antigenu. Mohou tak zastávat okamžitou protivirovou obranu již během počáteční fáze před zahájením tvorby protilátek a před vývojem specifických cytotoxických T-lymfocytů. NK buňky mají na svém povrchu širokou škálu inhibičních a aktivačních receptorů, z nichž významnou rodinu tvoří receptory C-lektinového typu, z nichž byla první objevena právě rodina NKR-P1.

Byly zde porovnávány různé způsoby přípravy dimerní formy myšího NK buněčného aktivačního receptoru NKR-P1C. Dimerní rozpustná forma NKR-P1C byla připravena rekombinantní expresí nejprve pomocí tranziční transfekce buněčné linie HEK293 (human embryonic kidney 293) jako IgG-Fc fúzní protein z něž bylo možno po afinitní purifikaci, štěpení TEV proteázou a následnou HPLC chromatografií získat čistý dimer NKR-P1C. Posléze byla optimalizována i bakteriální exprese v buňkách *E. coli* kmene BL-21 Gold v LB i v ZYP-5052 autoindukčním médiu, následná izolace inkluzních tělísek, renaturace a purifikace dimerního proteinu.

Klíčová slova:

NKR-P1C, lektin, receptor, dimer, HEK293, LB medium, ZYP-5052, inkluzní tělíska

Key words:

NKR-P1C, lectin, receptor, dimer, HEK293, LB medium, ZYP-5052, inclusion bodies

2. Literární úvod

2.1. Imunitní systém

Imunitní systém je vysoce specifický obranný systém, který rozpoznává, eliminuje a zapamatovává si cizí makromolekuly a buňky.¹ Podílí se na zachování celistvosti organismu.² Jeho funkcí je udržování integrity organismu, ochrana proti patogenům, schopnost rozpoznat a eliminovat tkáně a buňky, které byly poškozeny, infikovány nebo usmrceny.

Funkce imunitního systému se projevuje jako: obranyschopnost – imunitní systém rozpoznává vnější škodliviny a chrání organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům; autotolerance – při níž imunitní systém rozpoznává vlastní tkáně a udržuje vůči nim toleranci; imunitní dohled – kdy imunitní systém rozpoznává vnitřní škodliviny, průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé změněné (mutované) buňky.²

2.1.1. Druhy imunitních mechanismů

Imunitní systém zajišťuje vzájemnou provázanost mechanismů imunity antigeně specifické (adaptivní) a nespecifické (neadaptivní, vrozené).^{2, 3} Funkci imunitního systému vykonávají humorální faktory, nebo krevní buňky. Buňky kolují v krevním a mízním oběhu a v případě potřeby vycestují do tkáně, kde je jich potřeba. Některé buňky imunitního systému jsou usazeny ve tkáních a necestují. Humorální faktory jsou součástí krevního séra, jsou to protilátky, krevní bílkoviny nazývané se komplement a celá řada dalších bílkovin, které se účastní v akutní fázi zánětu.³ Působí jako opsoniny, tj. látky, které vazbou na mikroorganismus usnadní jeho pohlcení fagocytujícími buňkami.^{2,3} Podle toho, zda se v reakci více uplatní humorální faktory nebo buňky, se složky imunity rozdělují na humorální a buněčné (tab. 1, str. 11).³

Tab. 1: Srovnání humorální a buněčné imunity.³

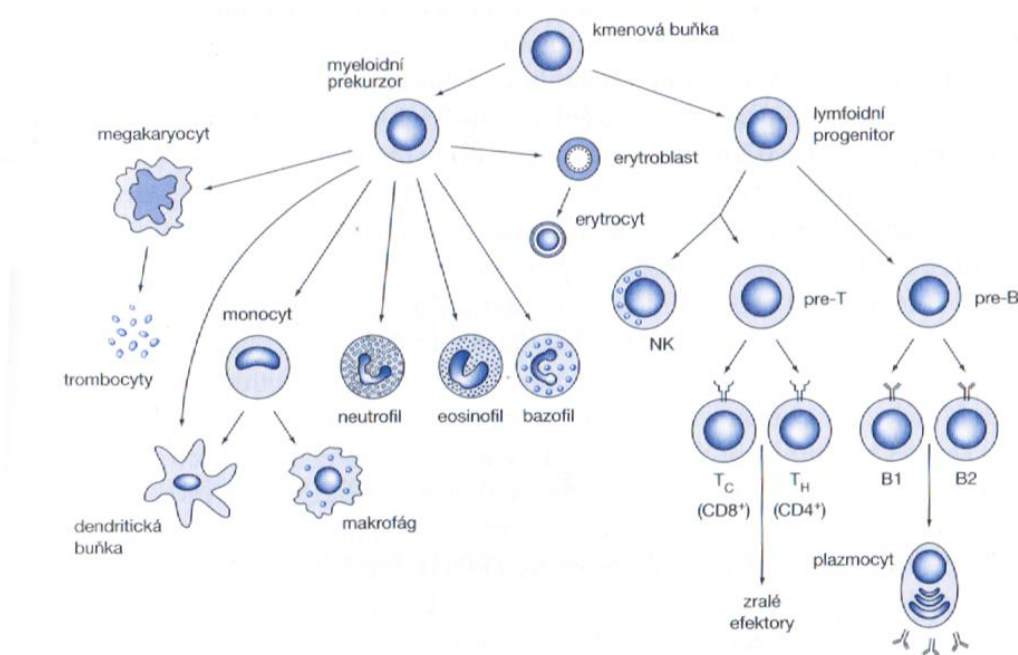
	Humorální	Buněčná
Nespecifické složky	Proteiny akutní fáze, komplement	NK buňky, neutrofilní leukocyty, monocyty, makrofágy
Specifické složky	Protilátky	T-lymfocyty, B-lymfocyty
Hlavní funkce	Obrana proti extracelulárně žijícím mikroorganismům	Obrana proti intracelulárně žijícím mikroorganismům, u neutrofilů i obrana proti extracelulárním org., zánětlivá reakce
Materiál na vyšetření	Sérum, plazma a jiné tekutiny (sliny, mozkomíšni mok)	Nesrážlivá krev, bioptické vzorky tkání, eventuálně jiné zdroje (mozkomíšni mok)

Specifické mechanismy reagují na cizorodé struktury prostřednictvím vysoce specifických molekul, jako jsou protilátky pro humorální složky, nebo antigenně specifické T-a B-lymfocyty, které se po diferenciaci do plazmatických buněk stávají producenty protilátek.^{2,3} Aktivují se až po setkání s daným antigenem. Jejich charakteristickým rysem je imunologická paměť, což je ovlivnění předchozím setkáním se škodlivinou. Jsou pomalejší než mechanismy nespecifické, k rozvoji reakce je třeba několik dní až týdnů.²

Nespecifické mechanismy jsou vrozené, a jsou evolučně starší. Tvoří je humorální a buněčné složky. Buněčné nespecifické systémy jsou reprezentovány fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami (NK buňky, „natural killer cells“). Nespecifické složky nemají imunologickou paměť, na přítomnost škodliviny reagují rychle (minuty).²

2.1.2. Buňky imunitního systému

Část imunitního systému je tvořena různými druhy bílých krvinek (leukocyty).² Všechny druhy leukocytů pocházejí z multipotentních (univerzálních) kmenových buněk, které jsou přítomny v kostní dřeni po celý život.^{2,3} Vlivem různých faktorů se jich část diferencuje na různé typy leukocytů (obr.1). Takto způsobený úbytek kmenových buněk je kompenzován jejich dělením. Ve zralých stádiích se pak nacházejí v krevním oběhu, kde mohou zůstat, nebo vycestovat do tkáně.⁴



Obr. 1: Diferenciace různých druhů leukocytů z kmenové buňky.²

Z kmenové buňky vznikají dvě základní linie – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie vznikají myeloblasty, z nichž dále vznikají monocyty (cirkulují v krvi a ve tkáních, kde se diferencují na makrofágy, jsou to důležité antigen prezentující buňky (APC, „antigen presenting cells“) pro T-lymfocyty, jsou součástí antigenně specifické části imunitního systému²) a tři druhy granulocytů: bazofily, eozinofily a neutrofil. Dalšími druhy myeloidních buněk jsou erythrocyty (červené krvinky) vyvinuté z erythroblastů a megakaryocyty, které se diferencují na trombocyty.² Všechny druhy myeloidních buněk tvoří základ nespecifické části imunitního systému. Většina je schopná fagocytózy a jsou producenty cytokinů.²

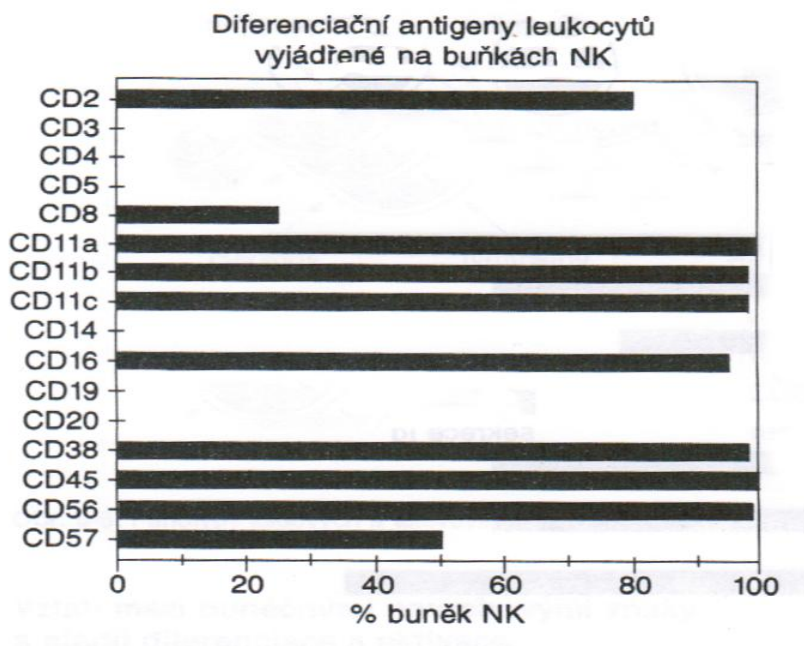
Buňky z lymfoidní linie se diferencují na NK buňky (velké granulární lymfocyty) a na T- a B-lymfocyty (malé lymfocyty).² B-lymfocyty se vyvíjejí v kostní dřeni a dokončení vývoje probíhá až po setkání s antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech jako je slezina nebo lymfatické uzliny.^{2,3} T-lymfocyty se vyvíjejí v brzlíku (thymus), některé subpopulace i mimo něj. Brzlík opouštějí buď jako Th-prekurzory pomocných T-buněk nebo Tc-prekurzory cytotoxických T-buněk, které se po setkání s antigenem na povrchu APC diferencují na zralé efektorové buňky.² Po aktivaci tyto buňky produkují rozpustné mediátory zvané cytokiny, které aktivují další složky imunity, nebo samy sebe. Stávají se z nich buňky cytotoxické nebo regulační.³

2.2. NK buňky

NK buňky (natural killers) byly objeveny v roce 1975 a pojmenovány podle schopnosti rychle rozpoznávat a zabíjet nádorové a virově infikované buňky *in vitro*, bez předchozí stimulace, proliferace či diferenciaci.^{2,5,6} Nejčastěji se vyskytují v nelymfoidních orgánech, jako jsou plíce nebo játra. Dále se nachází v krvi, kostní dřeni nebo ve slezině a občas se vyskytují i v mízních uzlinách a v brzlíku. U normálních jedinců tvoří NK buňky 10-15 % lymfocytů v periferní krvi a 1-2 % lymfocytů nacházejících se ve slezině.^{7,8}

NK buňky jsou velké granulární lymfocyty (LGL), které nejsou ani T- ani B-lymfocyty, avšak vývojově bližší jsou T-lymfocytům.^{2,3,7} Na rozdíl od T-lymfocytů se NK buňky mohou vyvinout nezávisle na brzlíku.^{4,9} Patří do systému nespecifické imunity.³ Pro vývoj a rozšíření NK buněk je důležitý interleukin 15 (IL15).¹⁰

Můžeme je od cytotoxických T-lymfocytů odlišit podle povrchových antigenně specifických receptorů a podle toho, že NK buňky nemají imunologickou paměť.^{2,7} NK buňky mohou být identifikovány podle některých charakteristických diferenciačních antigenů (obr. 2, str. 14). Pro všechny buňky NK jsou charakteristické molekuly CD16 (receptor pro Fc část protilátky) a CD56 a také to, že neexprimují T-buněčný receptor CD3 (TCR, „T-cell receptor“).^{3,7}



Obr. 2: Antigeny vyjádřené na NK buňkách.⁷

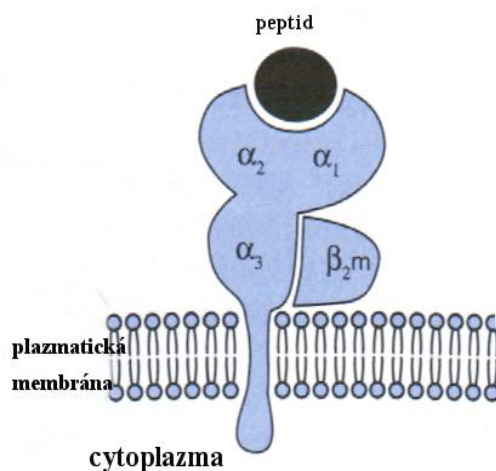
2.2.1. Funkce NK buněk

NK buňky jsou díky své cytotoxicitě schopny zabít nádorové buňky, aniž by byl hostitel předem danými nádorovými buňkami záměrně imunizován, tvoří tak důležitou složku obrany před virovou infekcí a nádory. Zabíjejí buňky transformované, infikované, pokryté vrstvou protilátek, transplantované či stresované buňky.^{4,7,11} Jelikož NK buňky reagují, aniž by musely být předem vystaveny antigenu, mohou zastávat okamžitou protivirovou obranu již během počáteční - latentní fáze před zahájením tvorby protilátek a před vývojem specifických cytotoxických T-lymfocytů (CTL, „cytotoxic T-lymphocytes“).⁷ NK buňky mají i důležité regulační funkce – jsou zdrojem cytokinů IFN- γ , IL-3, M-CSF a mnohých dalších. Tyto látky ovlivňují diferenciaci efektorových Th buněk, ale také krvetvorbu (hematopoézu).²

2.2.2. Buněčné rozpoznávání

Dlouho se nevědělo, jak NK buňky rozeznávají abnormální buňky, když nemají antigenně specifické receptory.² Nyní víme, že na rozdíl od většiny CTL buňky NK rozpoznávají a zabíjejí jak vlastní buňky (autologní), tak alogenní nádory,⁷ které mají

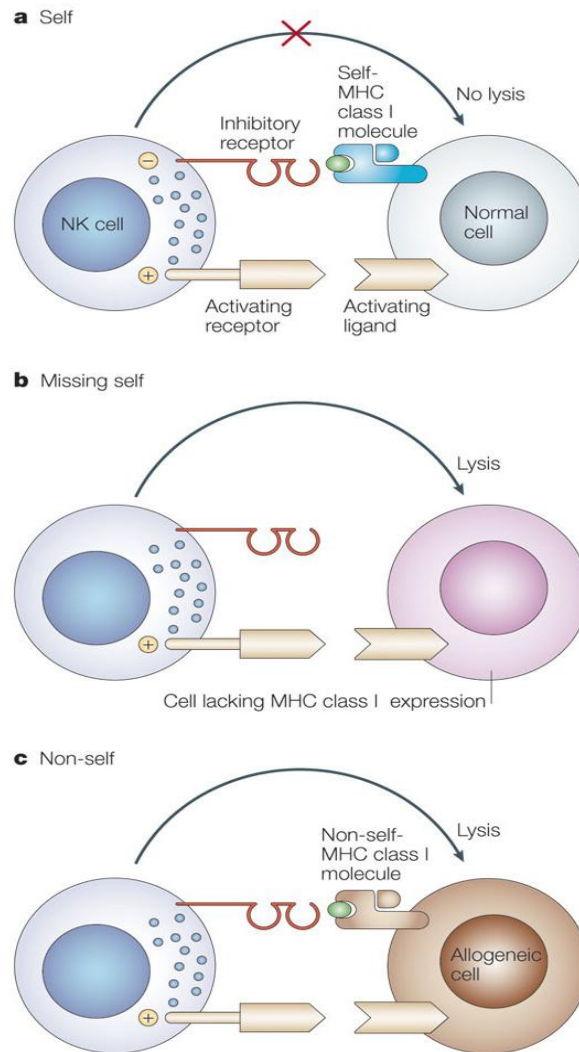
na povrchu abnormálně málo MHC glykoproteinů I. třídy (obr. 3); lidské MHC se označují jako HLA, myši jako H-2 komplex.^{2,3,13} MHC glykoproteiny I. třídy jsou složeny ze dvou polypeptidových řetězců – dlouhého transmembránového řetězce α a s ním nekovalentně asociovaného krátkého řetězce β , který se nazývá β_2 -mikroglobulin.^{2,14} V řetězci α lze rozlišit tři domény: dvě N-terminální, α_1 a α_2 , které vytvářejí vazebné místo pro peptidy. Třetí doména α_3 a β_2 m jsou strukturně podobné imunoglobulinovým doménám.²



Obr. 3: Znárodnění struktury MHC glykoproteinů I. třídy.²

MHC glykoproteiny I třídy jsou přítomny na všech zdravých jaderných buňkách organismu (na somatických buňkách se průměrně nachází několik desítek tisíc MHC molekul a na různých druzích leukocytů – hlavně APC – ještě řádově více).² Základní funkcí MHC gp I. je vázat peptidové fragmenty proteinů produkovaných buňkou a vystavovat je na buněčný povrch tak, aby byly potenciálně rozeznatelné pro T-lymfocyty (pomocí jejich antigenně specifických receptorů TCR).²

Buňky s expresí MHC gp. I jsou před NK buňkami chráněny, ale pokud u těchto buněk k expresi MHC gp. I nedochází, jsou NK buňkou vyhledány a zničeny. Tento případ nastává právě u buněk infikovaných virem nebo nádorových buněk, kde je exprese MHC gp. I potlačena. Pro tento mechanismus NK buněčného rozpoznávání se proto vžil název „missing-self“ hypotéza (obr. 4, str. 16).¹³



Obr. 4: Odpověď NK buněk vyvolaná chybějícím MHC gp. I na povrchu cílových buněk.

a) interakce s normální, autologní cílovou buňkou: NK buňka přijme signál a jelikož cílová buňka má na svém povrchu vlastní MHC gp. I, nedojde k zabití buňky důsledkem inhibičních signálů

b) pokud cílové buňky mají snížené množství MHC gp. I důsledkem virové infekce nebo transformace, nedojde k vazbě inhibičních receptorů s NK buňkou, která tak nemá inhibované cytotoxické mechanismy a vnímá cílovou buňku jako „missing-self“ a dojde k zničení cílové buňky

c) při alogenní transplantaci hostitelské NK buňky reagují s buňkami dárce, které mají cizí „non-self“ MHC gp. I, ve většině případů u těchto cizích MHC gp. I molekul nedojde k správné funkci všech inhibičních receptorů na povrchu hostitelské buňky, což vede k lýze alogenních buněk.¹⁵

2.2.3. Cytotoxicita NK buněk

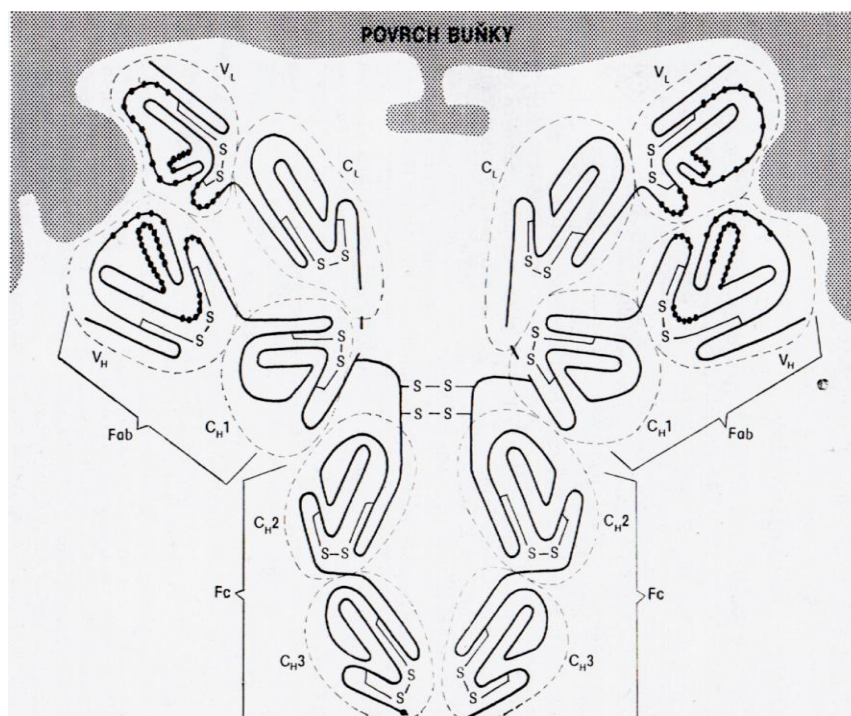
NK buňky se aktivují interferony α a β , které jsou produkovány různými buňkami imunitního systému po virové infekci a zvyšují rezistenci normálních buněk na virovou infekci. Interferony α a β inhibují replikaci viru a v dosud neinfikovaných buňkách navozují antivirový stav bránící rozvoji infekce. Interferon α a v menší míře i interferon γ zvyšují cytotoxickou aktivitu NK buněk.^{2,7} Na aktivaci se dále podílejí receptory na povrchu buněk, adhezivní molekuly a receptory cytokinů.¹² Například infikované makrofágy produkují aktivátor NK buněk – IL-2. Po vystavení IL-2 v tkáňové kultuře získají buňky NK významnou schopnost zabít buňky všech typů nádorů, aniž by poškozovaly většinu normálních tkání. Tomuto jevu se říká zabíječská aktivita aktivovaná lymfokiny (LAK). IL-2 kromě toho, že zvyšuje cytotoxickou aktivitu, působí také jako růstový faktor a vyvolává hojné množení NK buněk.^{2,7}

Hlavními cytotoxickými nástroji NK buněk, které využívají i CTL a CD8⁺ T-lymfocyty, jsou cytotoxická granula (specializované lysozomy) obsahující protein perforin a proteázy zvané granzymy.^{2,3,11} Po rozeznání poškozené buňky cytotoxická granula migrují k plazmatické membráně v místě kontaktu obou buněk, fúzí s ní a jejich obsah je uvolňován za přítomnosti Ca²⁺ do úzké štěrbině mezi buňkami (tzv. degranulace).^{2,16} Perforin vytváří v cytoplazmatické membráně póry, které způsobují proděravění membrány, což může vést až k smrti buňky osmotickou lýzou.² Většinou jsou však tyto póry malé a slouží k tomu, že se jimi do poškozené buňky dostanou granzymy, které pak štěpí v cytoplazmě prekurzory proteáz ze skupiny kaspáz, které se tím aktivují. Kaspázy pak spustí kaskádu reakcí, která vede k apoptotické smrti buňky.²

Dalším spouštěcím mechanismem cytotoxické aktivity NK buněk je systém Fas-ligand (FasL), který patří do rodiny receptorů TNF molekul a váže se na „apoptotický receptor“ Fas (CD95) přítomný na povrchu mnoho různých typů buněk. Signály, které se přenášejí přes receptor Fas do buňky aktivují kaspázy, které spustí kaskádu reakcí, což vede k apoptotické smrti cílové buňky. Tento mechanismus není závislý na přítomnosti Ca²⁺ iontů.^{2,16} Kromě cytotoxické aktivity NK buňky vykazují i buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC). Cytotoxická výkonná buňka zabije cílovou buňku, jejíž povrch je pokryt navázanými protilátkami.⁷ Vazba cílové a výkonné buňky a převod signálu se děje prostřednictvím povrchového buněčného

receptoru, který se nachází na cytotoxické výkonné buňce a který váže Fc oblast imunoglobulinu IgG. Tyto výkonné buňky v ADCC se dříve nazývaly buňkami K „killer cells“.⁷ Většinu ADCC v obíhající krvi vyvolávají NK buňky a malá podskupina T-lymfocytů, pomocí receptoru CD16, který specificky rozpoznává Fc fragment IgG. Při setkání s buňkou, která váže na svém povrchu protilátky IgG, se imunocyty pomocí CD16 naváží na Fc fragment těchto protilátek. To pak způsobí agregaci receptorů, přenos signálů a degranulaci buňky.^{2,7}

Jako obrana proti cytopatickým virům se nejvíce uplatňují protilátky, které brání infekci dalších buněk.² Molekula každého Ig se skládá ze 4 řetězců: dvou lehkých řetězců (L) a dvou těžkých řetězců (H), přičemž celá molekula Ig je tvořena dimerem dvojice L a H řetězců (obr. 5). Podle typu a zastoupení řetězců vznikají různé třídy Ig (IgG, IgM, IgA, IgD a IgE). Lehké řetězce mají 220 AK a těžké řetězce 450-575 AK. Určité oblasti v Ig jsou variabilní (V_H a V_L), jiné jsou stálé (C_H a C_L). Jednotlivé oblasti Ig jsou tvořeny smyčkami o 60-70 AK, ohraničenými intramolekulární –S–S– vazbou. V molekule každého Ig jsou dvě vazebná místa pro antigen v oblastech V_H a V_L .¹⁷



Obr. 5: Struktura molekuly imunoglobulinu.

Fab, fragment rozpoznávající antigen; Fc, krystalizovatelný (též konstantní) fragment; V, variabilní části a C, konstantní části lehkého (L) a těžkého (H) řetězce.¹⁷

Na sliznicích se uplatňují protilátky IgA blokací adheze viru na mukózní epitel (hlavní obrana proti respiračním virům). V případě, že virus pronikne do krevního oběhu, uplatňují se neutralizační protilátky IgM a následně IgG, který vzniká na daný antigenní podmět po vytvoření IgM. V komplexu s antigenem je schopen vázat komplement (bílkoviny v krevní plazmě, které se aktivují vazbou protilátky na antigen) a lyticky narušit membránu cizorodé buňky.^{2,17}

2.2.4. Receptory NK buněk

NK buňky mají na svém povrchu velké množství receptorů, které můžeme obecně rozdělit na dva typy. Receptory, které stimulují aktivitu NK buněk – aktivační, nebo receptory které tlumí aktivitu NK buněk – inhibiční.^{2,18} Všechny inhibiční receptory NK buněk mají ve své cytoplazmatické doméně jednu nebo více kopií tzv. inhibičního ITIM motivu („immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif“) se sekvencí: Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val, kde x označuje jakoukoliv aminokyselinu.¹⁹ Po navázání ligandu je tyrosin z ITIM motivu fosforylován prostřednictvím kinázy z rodiny Src, což vede k aktivaci fosfatázy SH2-domény; v závislosti na daném receptoru to mohou být proteinové tyrosinové fosfatasy SHP1 nebo SHP2. Aktivace SHP1 a SHP2 vede ke snížení fosforylace různých intracelulárních signálních proteinů, např. FcεRIγ, ZAP70, Syk. Tyto aktivované cytoplazmatické fosfatázy asociují s inhibičními receptory a ruší signalizační dráhy zahájené stimulačními receptory asociovanými s protein-kinázami.^{2,19} Inhibiční receptory NK buněk jsou dvojího typu: imunoglobulinové receptory a C-lektinové receptory. Nemají univerzální receptor, který by byl schopen rozeznat všechny izotypy a alelické formy MHC gp. I, který je vysoce polymorfní.^{2,20}

Inhibiční receptory patřící do imunoglobulinové skupiny se nazývají KIR („killer inhibitor receptors“). Doposud byly nalezeny jen na lidských NK buňkách. Vytváří velice rozmanité imunitní odpovědi, v závislosti na konkrétním patogenu. KIR jsou kódovány v oblasti 150 kb na chromozomu 19q13.4 v komplexu genů pro receptory leukocytů (LCR). KIR rozpoznávají různé molekuly HLA I. třídy.^{2,21} Další inhibiční receptory z imunoglobulinové skupiny jsou LIR, resp. ILT (CD85). Jsou přítomny na povrchu různých druhů leukocytů a zřejmě pomáhají tlumit jejich přílišnou aktivitu.²

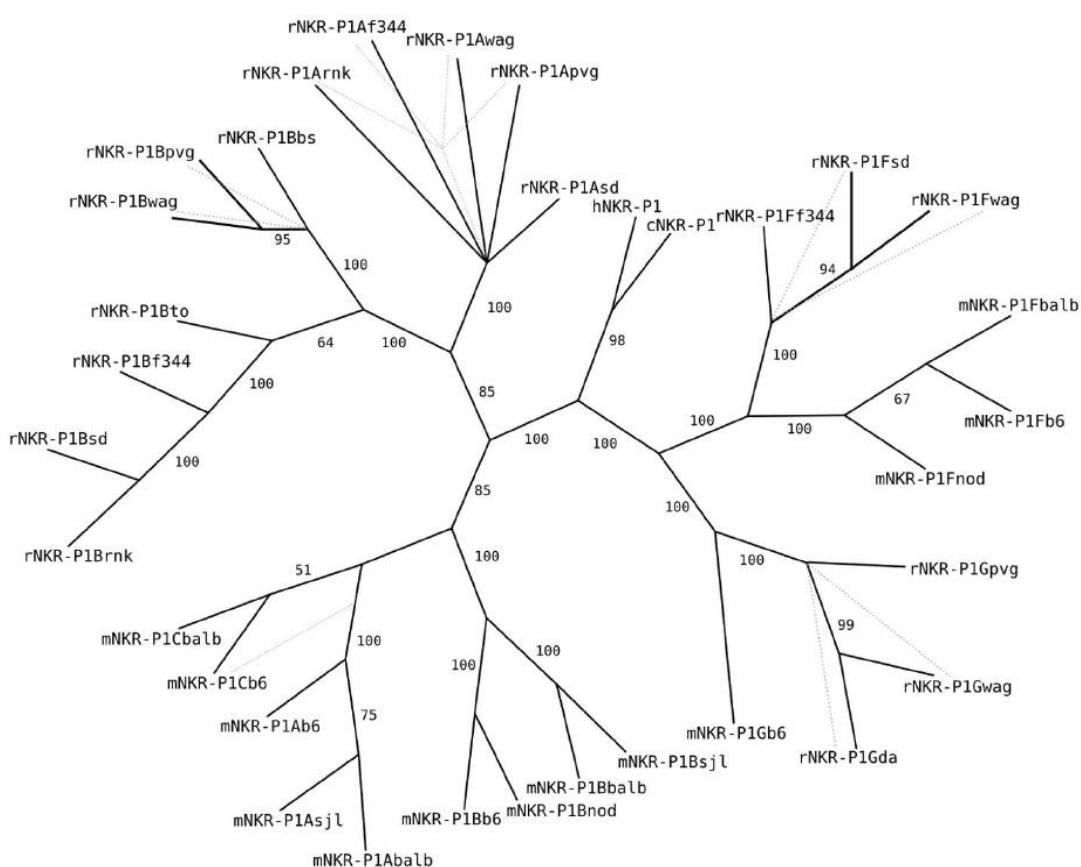
Inhibiční receptory C-lektinové skupiny jsou známy jak u myši (např. skupina receptorů Ly-49, NKR-P1), tak lidských NK buněk (heterodimer CD94/NKG2A).^{2,15} Jsou to multidoménové proteiny, na které se díky doméně CRD („carbohydrate-recognition domain“) váží sacharidy. Řada z nich však lektinovou aktivitu ztratila a namísto sacharidů rozpoznávají ligandy jiné povahy, zejména proteiny.

Lektiny obsahující CRD můžeme rozdělit na dvě skupiny. První jsou lektiny vyskytující se převážně intracelulárně v lumbálních kompartmentech. Jejich funkcí je třídění glykoproteinů v sekrečních cestách. Druhá skupina zahrnuje takové lektiny, které fungují mimo buňku a jsou tedy buď sekretované, nebo lokalizované na buněčném povrchu v plazmatické membráně. Patří sem i lektiny C-typu, pro jejichž CRD je typické, že pro vazbu sacharidů je nezbytná přítomnost Ca^{2+} iontů. Vazba sacharidu na CRD pak zahájí širokou škálu biologických procesů, jako je např. adheze, endocytóza, nebo neutralizace patogenů.²²

Aktivační receptory postrádají intracelulární ITIM motiv a naopak často obsahují motiv ITAM („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) s charakteristickou sekvencí Asp/Glu-x-x-Tyr-x-x-Leu/Ile-x₍₆₋₈₎-Tyr-x-x-Leu/Ile, kde x představuje libovolnou AA.^{19,20} NK buňky exprimují tři adaptorové proteiny obsahující ITAM motiv: FcεRIγ, CD3ζ a DAP12, nazýván také jako KARAP („killer activating receptor associated protein“). Lidský CD16 se může vázat s FcεRIγ nebo CD3ζ, zatímco myši CD16 interaguje jen s FcεRIγ.¹⁹ Navázáním ligandu na aktivační receptory dojde k fosforylaci tyrosinu v ITAM, čímž se aktivují tyrosinové kinázy Syk a ZAP70 prostřednictvím SH2. Dojde ke kaskádě reakcí, která způsobí přísun Ca^{2+} důležitých pro aktivaci NK buněk.^{19,24} Dalším signálním řetězcem vyskytujícím se u aktivačních receptorů NK buněk je DAP10, který nemá ITAM motiv. Místo něj obsahuje pouze krátkou sekvenci aminokyselin Tyr-x-x-Met. Tyrosin se fosforyluje, čímž se aktivuje fosfatáza SH2 a vytvoří se aktivační místo pro PI3 kinázu (fosfatidylinositol-3'-kináza). Ta dále aktivuje GTPázy z rodiny Rho a fosfolipázu C. Signalizační kaskáda vede k aktivaci NK buňky.^{23,24} S DAP10 tvoří komplex například NKG2D²⁴, nebo receptor KIR se váže v komplex s DAP12. Fosforylovaný DAP12 pak váže i protein tyrosin kinázy ZAP70 a Syk.²⁵

2.2.4.1. Receptory rodiny NKR-P1

Rodina receptorů NKR-P1 („natural killer receptor-protein 1“, CD161) kódovaná geny *klrb* („killer cell lectin-like receptor subfamily B“) zahrnuje aktivační i inhibiční receptory NK buněk C-lektinového typu.²⁶ Geny pro receptory NKR-P1 se nachází v NK genovém komplexu (NKC) na chromozomu 6 u myši, chromozomu 4 u potkanů a chromozomu 12 u lidí.^{27,29} Lidský NKR-P1 má velmi stabilní genomickou organizaci a v rámci daného druhu je nepolymorfní, na rozdíl od NKR-P1 u hlodavců, jejichž NKR-P1 receptory jsou vysoce polymorfní (obr. 6).³⁰



Obr. 6: Rodokmen receptorů NKR-P1.

Znázornění příbuznosti receptorů NKR-P1 pro potkana (**r**), myš (**m**), kuře (**c**) a lidské (**h**) receptory. Dvou až tří písmenné zkratky za receptorem značí kmene hlodavců. Číslo u jednotlivých „větvi“ značí pravděpodobnost příbuznosti vyjádřenou v %.³¹

Potkaní NKR-P1 bylo prvně identifikováno pomocí monoklonální protilátky 3.2.3, konkrétně se jednalo o aktivační receptor NKR-P1A³², který se užívá i jako rozlišovací znak potkaních NK buněk.²⁶ U myši byly NK buňky charakterizovány pomocí vazby protilátky PK136 na tzv. NK1.1 antigen. Později bylo zjištěno, že tímto antigenem byl myší NK buněčný aktivační receptor NKR-P1C a některé formy inhibičních receptorů NKR-P1B/D.³⁵

Homologní molekuly známé u myši jsou aktivační NKR-P1A/C/F a inhibiční receptor NKR-P1D, jehož gen je alelou NKR-P1B.^{32,34,35} V různých myších kmenech je známo několik alelických forem NKR-P1B.³³ NKR-P1E je pseudogen (gen, který v buňce již není přepisován, je však příbuzný jiným, funkčním genům).^{32,34}

Receptory NKR-P1F a NKR-P1B/D specificky rozpoznávají a váží ligandy z rodiny genů Ocil/Clr („osteoclast inhibitory lectin/C-type lectin-related“).^{34,35} Jde o podobný způsob rozpoznávání jako u „missing-self“ hypotézy, kde je místo MHC gp I. rozpoznávána molekula Clr, která se vyskytuje na povrchu různých buněk, ale u buněk nádorových je její povrchová exprese snížena.^{33,36} Ligand(y) pro NKR-P1C jsou zatím neznámé.^{27,36}

NKR-P1C (B6) je jeden z nejrozšířenějších povrchových znaků NK a NKT buněk myšího kmene C57BL/6.^{28,29} Myší NKR-P1C (mNKR-P1C), známý také jako NK1.1 antigen, je disulfidickým můstkem spojený homodimerní transmembránový glykoprotein typu II (mají jediný transmembránový helix a C-konec je vně buňky). Je složen z extracelulární domény podobné lektinům C-typu, která je spojena dimerizačním krčkem s transmembránovou částí a cytoplazmatickou doménou.^{28,29} Myší NKR-P1C receptor stimuluje NK buňky přes FcR γ molekuly, které převádí signály pro Fc γ RIII (CD16) a pro Fc ϵ RI.^{37,38}

3. Cíle práce

- Příprava dimerní rozpustné formy lektinového receptoru NKR-P1C rekombinantní expresí pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293
- Příprava NKR-P1C proteinu renaturací z inkluzních tělísek exprimovaných v buňkách *E. coli* BL-21 Gold kultivovaných v LB médiu s induktorem IPTG
- Příprava NKR-P1C proteinu renaturací z inkluzních tělísek exprimovaných v buňkách *E. coli* BL-21 Gold kultivovaných v autoindukčním médiu ZYP-5052
- Porovnání těchto způsobů přípravy dimerní rozpustné formy lektinového receptoru NKR-P1C

4. Materiál

4.1. Přístroje a pomůcky

Adhezivní podložka na třepačku Sticky Pad	New Brunswick Scientific, USA
Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I	Beckman Coulter, USA
Analytické váhy	AND, USA
Aparatura pro filtraci	Sigma-Aldrich, Německo
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	H+P Labortechnik GmbH, Německo
Automatické pipety Discovery	HTL, Polsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12 R	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Čtečka mikrotitračních destiček Sunrise V 4.51	Tecan, Německo
Dialyzační střeva	Sigma Aldrich, Německo
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	Corning, Německo
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570 (16,1 MPix)	SONY, Japonsko
Hemocytometr	INCYTO, Korea
HPLC systém ÄKTAbasic	Amersham Biosciences, Švédsko
Incubátor CO ₂ pro tkáňové kultury, 18AIC	Sanyo, Japonsko
Kahan Fuego SCS	VERKON, ČR
Kahan	závod Votice, ČR
Kolona Hitrap MabSelect SuRe	GE Healthcare, Švédsko
Kolona Q-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, Švédsko
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Švédsko
Kolona s Talonem	Merck, Německo
Kolona Tricorn Source 15S 4.6/100 PE	GE Healthcare, Švédsko
Koncentrátory Amicon	Millipore, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	Schott Duran, Německo
Laminární box Clean Air Technik B.V.	PMV a Telstar company, Belgie
Lednice 225 R (4 °C)	Calex, ČR
Magnetická míchačka MM 2A	Lab. přístroje Praha, ČR
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, USA
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mrazicí box (-20 °C)	Calex, ČR
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
pH metr ino Lab	Schoeller, Německo

Pipetovací nástavec Midiplus	Biohit, USA
Plastik pro tkáňové kultury	Corning, Německo
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler 0,5 ml x 20	Techne, UK
Termocykler 0,2 ml x 25	Techne, UK
Termostat LS1	VLM, Německo
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	Gallenkamp
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, Švýcarsko
Ultrazvuková sonda Sonoplus HD 3100	Bandelin, Německo
Ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30H	Elma, Německo
UV/Vis spektrometr UV2 Series	Unicam, UK
Vařič	ETA, ČR
Vodní lázeň	Memmert, Německo
Vodní lázeň TW2	Julabo, Německo
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí EC 250-90	EC Apparatus Corporation, UK
Zdroj napětí PS 251-2	Sigma-Aldrich, USA

4.2. Chemikálie

Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Sigma, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Ampicilin 100 mg/ml	Biotika, SR
APS	Serva, USA
Azid sodný	Serva, USA
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
BSA	New England Biolabs, USA
Cystamine	Sigma, Německo
Cysteamine	Sigma, Německo
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, USA
Činidlo dle Bradfordové	Bio-Rad, Německo
dNTPs, 10mM	Top-Bio, ČR
DTT	Serva, USA
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
ExCELL293 médium	Sigma, USA
Ethanol	Lach-Ner, ČR

Freestyle F17 médium	Gibco Invitrogen, USA
IPTG	Serva, USA
L-glutamin	Sigma, USA
Leupeptin	Sigma, USA
Glukóza	Penta, ČR
Glycerol	Lach-Ner, ČR
Chlorid sodný	Lach-Ner, ČR
Kanamycin	Serva, USA
KH_2PO_4	Chemapol, ČR
Kvasničný autolyzát	Imuna Pharm, SR
Kyselina octová	Lach-Ner, ČR
Laktóza	Roth, Německo
lineární PEI 25 kDa	Polysciences, USA
2-merkptoethanol	Sigma, USA
MgSO_4	New England Biolabs, USA
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	Lach-ner, ČR
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Chemapol, ČR
Nosič pro chromatografii Talon	Clontech, USA
Nosič Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Švédsko
Nosič Q-Sepharosa Fast Flow	GE Healthcare, Švédsko
Nosič Tricorn Source 15S 4.6/100 PE	GE Healthcare, Švédsko
Penicillin G Sodium	Duchefa Biochemie, Nizozemsko
Pepstatin	Serva, USA
PMSF	Sigma, USA
Protein-A-agaróza	Sigma, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Streptomycin sulfat	Serva, USA
TEMED	Serva, USA
Tetracyklin	Lab scientific, USA
Triton X-100	Serva, USA
Tris	Roth, Německo
Trypanová modř	Sigma, USA
Trypton	Oxoid, Anglie
Trypton N1	Organo Technie, Kanada
Ostatní běžné chemikálie:	Lach-Ner, ČR

4.3. Enzymy

RNAsa	Serva, USA
DNAsa	Fermentas, Kanada

4.4. Bakteriální kmeny a buněčné linie

E. coli DH5 α	RNDr. Marek Ingr Ph.D., PřF UK, Praha
E. coli BL21 Gold	Stratagene, USA
HEK293S GNTI	Americká sbírka buněčných linií (ATCC)

4.5. Vektory

pYD5	Dr. Yves Durocher, CNRC, Kanada
pET30	Mgr. Daniel Rozbeský, PřF UK, Praha

4.6. Roztoky a média

- **AA:** 29% akrylamid, 1% N,N'-methylen-bis-akrylamid
- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE:** 45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% CBB R-250
- **Citrátový pufr:** 0,1M NaCitrát, 0,15M NaCl, 10mM NaN₃, pH = 3,0
- **Dialyzační pufr:** 15mM Tris, 9mM NaCl, 1mM NaN₃, pH = 6,0
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE** – 10 \times koncentrovaný: 3% Tris, 14,4% glycin, 1% SDS, pH = 8,3
- **ExCELL293 médium:** zakoupeno hotové médium (Sigma, USA) a před použitím doplněno o L-glutamin (výsl. konc. 4mM)
- **Guanidinový pufr:** 6M guanidin, 100mM Tris-HCl, 1mM NaN₃, 10mM DTT, pH = 8 + inhibitory proteáz: 1 μ M leupeptin, 1mM PMSF
- **LB agar:** 1,5% agar v LB médiu
- **LB médium:** 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH = 7,4
 - použité koncentrace antibiotik:
 - tetracyklin 12,5 μ g/ml (zásobní koncentrace 5 mg/ml)
 - kanamycin 50 μ g/ml (zásobní koncentrace 50 mg/ml)
- **MES pufr:** 20mM MES, 100mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 5,0

- **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:** 35% ethanol, 10% CH₃COOH
- **PBS pufr:** 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 7,0
- **PBS pufr s imidazolem:** 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, 250mM imidazol, pH = 7,0
- **PBS-TK pufr:** 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH = 7,0
- **Pufr pro ionexovou chromatografii A:** 15mM Tris, 9mM NaCl, 1mM NaN₃, pH = 8,5
- **Pufr pro ionexovou chromatografii B:** 15mM Tris, 1M NaCl, 1mM NaN₃, pH = 8,5
- **Pufr pro gelovou permeační chromatografii:** 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 7,5
- **Promývací pufr:** 50mM Tris-HCl, 0,5M Guanidin-HCl, 1mM NaN₃, pH = 8,0 + inhibitory proteáz: 1μM leupeptin, 1mM PMSF
- **Renaturační roztok:** 50mM Tris, 100mM CaCl₂, 1M L-arginin, 1mM NaN₃, pH = 9,0
- **Sacharózový pufr:** 25% sacharóza, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM NaN₃, pH = 7,4 + inhibitory proteáz: 1μM leupeptin, 1μM pepstatin, 1mM PMSF
- **Tritonový pufr:** 0,5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 0,1% NaN₃, 1mM 2-ME, pH = 8 + inhibitory proteáz: 1μM leupeptin, 1mM PMSF
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující – 2× koncentrovaný:** 100mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, pH = 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující – 2× koncentrovaný:** 100mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, 100mM DTT, pH = 6,8

5. Metody

5.1. Rozmrazování buněčné linie HEK293S

Do 15 ml sterilní zkumavky s víčkem bylo pipetováno 10 ml na 37 °C předehřátého kultivačního média - byla používána směs médií ExCELL293 a F17 v objemovém poměru 1:1. Kryozkumavka alikvotu buněk obsahující 1 ml suspenze o hustotě $5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ byla rychle rozmrazena ve vodní lázni vyhřáté na teplotu 37 °C a obsah přenesen do připraveného média. Výsledná suspenze byla jemně promíchána a centrifugována při $200 \times g$, 3 min. Supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 10 ml média a přeneseny na 10 cm Petriho misku.

5.2. Suspenzní kultivace

Buňky byly rutinně kultivovány v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ v ExCELL293/F17 (1:1) médiu a subkultivovány ředěním čerstvým médiem tak, aby se jejich hustota pohybovala přibližně mezi 0,2 a $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ a to jak na Petriho miskách, tak ve čtverhranných láhvích na třepačce. Běžný postup vypadal následovně: 2-3 dny po rozmrazení buňky na 10 cm Petriho misce dosáhly hustotu kolem $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$, byly rozmíchány 10 ml pipetou pomocí pipetovacího nástavce a zředěny čerstvým médiem 1:3 na celkem $3 \times 10 \text{ cm}$ Petriho misky. Další 2-3 dny poté byly buňky stejným postupem převedeny do 75 ml média ve 250 ml čtverhranné láhvi s víčkem s prodyšným filtrem a třepány na orbitální třepačce (Orbit 1000, Labnet, USA) vybavené adhezivní podložkou (Sticky Pad, New Brunswick Scientific, USA) rychlostí 135 ot./min (rotační průměr 19 mm) uvnitř inkubátoru, optimální objem média je za těchto podmínek 30-40 % objemu láhve. O další 2-3 dny později byla suspenze přenesena do 1000 ml čtverhranné láhve a zředěna na 400 ml čerstvým médiem a jakmile buněčná hustota dosáhla požadované hodnoty pro transfekci ($1-2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$), byla provedena transfekce (viz 5.4) nebo byla suspenze subkultivována dále.

5.3. Počítání buněk

Buňky byly počítány manuálně pomocí hemocytometru. Bylo odebráno 20 μl buněčné suspenze, která se v mikrozkušavce smíchala s 20 μl 0,4% roztoku trypanové modři v PBS-TK a po 5min inkubaci bylo 20 μl směsi pipetováno do hemocytometru. Živé (průhledné) i mrtvé (modré) buňky byly spočítány ve všech devíti čtvercích zvlášť. Tyto hodnoty byly sečteny, vynásobeny faktorem ředění 2 a faktorem 1.10^4 a poděleny počtem čtverců 9. Tato průměrná hodnota na čtverec odpovídá buněčné hustotě v jednotkách 10^6 ml^{-1} . Procento živých buněk (viabilita) odpovídá podílu počtu živých buněk a součtu všech buněk vynásobeného stem

5.4. Tranzientní transfekce

U buněk rostoucích ve čtverhranné láhvi s prodyšným víčkem na třepačce byla spočítána buněčná hustota a poté byl pomocí 25 ml pipety a pipetovacího nástavce odebrán požadovaný objem suspenze. Buňky byly postupně centrifugovány v 50 ml sterilních zkumavkách s víčkem při 20 °C, 200 \times g, 5 min. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v takovém objemu média ExCELL293, aby výsledná buněčná hustota během transfekce byla 20.10^6 ml^{-1} , a převeden do čtyřhranné lahve ve které bude produkce probíhat.

Pro přípravu transfekční směsi bylo potřebné množství plasmidu (podle zvoleného celkového počtu buněk; 1 μg DNA na 10^6 buněk) sterilizováno filtrací přes 0,22 μm filtr, který byl promyt 1 ml PBS-TK a dále bylo přidáno příslušné množství roztoku PEI (1 mg/ml, v hmotnostním poměru DNA:PEI 1:5). Výsledný roztok byl důkladně protřepán a inkubován 25 min a poté byl přidán k připravené buněčné suspenzi, která byla následně inkubována po dobu 4 hodin na třepačce v inkubátoru. Poté bylo k suspenzi přidáno ExCELL293 médium o takovém objemu, aby výsledná počáteční produkční buněčná hustota byla 1.10^6 ml^{-1} , a dále byly přidány 4 ml antibiotika penicilin (1000 U/ml) a streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Produkce probíhala následujících 4-6 dní, kdy po 2-3 dnech byl pro dodání živin do média přidán trypton N1 do 0,5% výsledné koncentrace. Vodítkem pro ukončení produkce je spočtení viability živých buněk, která by neměla klesnout pod 70 %. Médium bylo centrifugováno při 4000 \times g, 60 min, 4 °C. Médium bylo zmrazeno a uchováváno při -20 °C nebo ihned zpracováno.

5.5. Purifikace pomocí kolony HiTrap MabSelect SuRe

Po připojení nízkotlaké kolony k HPLC systému byl nastaven tlakový limit 0,3 MPa. Kolona byla nejprve promyta 0,1M NaOH, destilovanou vodou a PBS pufrem (pH = 7) o průtoku 1 ml/min. Po promytí byl na kolonu aplikován vzorek média přefiltrovaný přes 0,22 μm filtr o rychlosti průtoku 5 ml/min. Po aplikování veškerého vzorku byl na kolonu opět přiváděn PBS pufr dokud neklesla absorbance pozorovaná při 280 nm na původní hladinu. Proteiny zachycené na koloně přes Fc fragment byly eluovány pomocí elučního citrátového pufru (pH = 3) za průtoku 1 ml/min a frakce byly sbírány do zkumavek s víčkem. Po eluci byla kolona i systém promyta nejprve krátce 0,1M NaOH, potom PBS pufrem, destilovanou vodou a byla uchovávána v 20% čistém ethanolu. Eluční frakce byla zneutralizována 1,5M Tris (pH = 8,8) na pH \approx 7 (vzhledem k pH elučního pufru bylo přidáno 1/10 objemu frakce).

5.6. Gelová permeační chromatografie

Frakce byly zakoncentrovány pomocí centrifugačních koncentrátorů Amicon s membránou propustnou pro molekuly o $M_r < 10000$, v centrifuze při $4000 \times g$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$ na objem do 200 μl . Při skladování jsou koncentrátory naplněny vodou, aby membrána nevysychala a uchovávány v lednici při $4\text{ }^\circ\text{C}$. K HPLC systému byla při průtoku 0,5 ml/min destilované vody připojena kolona Superdex 200 10/300 GL, a byl nastaven tlakový limit 1,5 MPa. Kolona byla promyta destilovanou vodou, 1M NaOH, opět destilovanou vodou a pufrem pro gelovou permeační chromatografii. Vzorek připravený zakoncentrováním frakcí byl aplikován na ekvilibrovanou kolonu a byly jímány frakce. Kolona i systém byly po promytí uchovávány ve 20% čistém ethanolu.

5.7. Štěpení TEV proteázou

Do frakcí získaných z gelové permeační chromatografie byla pro odštěpení Fc fragmentu z fúzního proteinu přidána TEV proteáza ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) v množství odpovídajícím 1/100 hmotnosti fúzního proteinu. Frakce byly dobře promíchány, krátce zcentrifugovány a štěpení probíhalo při $4\text{ }^\circ\text{C}$ přes noc nebo i několik dnů.

5.8. Chelatační chromatografie

Pro chelatační chromatografii byl použit kobaltnatými ionty nabitý nosič (TALON[®] Metal Affinity Resin, *Clontech*, USA), který na sebe přes histidinovou kotvu navázal TEV proteázu. Do frakcí byl přidán nosič v množství 1 ml na 5 mg proteinu a byl inkubován na třepačce při 110 ot./min, 30 min za laboratorní teploty a následně zcentrifugován. Frakce byly odpipetovány do čisté zkumavky s víčkem a byla k nim přidána protein A agaróza pro navázání odštěpeného Fc fragmentu. Po aktivní inkubaci 15 minut na třepačce a centrifugaci byly frakce znovu přepipetovány do čisté zkumavky s víčkem. Pro vyvázání TEV proteázy z nosiče byl k němu napipetován PBS pufr s imidazolem, zcentrifugován, odpipetován supernatant a přečištěn PBS pufrem, destilovanou vodou, MES pufrem, znovu destilovanou vodou a skladován v 20% ethanolu. Fc fragment byl z protein A agarózy uvolněn elucí citrátovým pufrem a po zcentrifugování odpipetován. Protein A agaróza byla promyta 0,1M NaOH, PBS pufrem, destilovanou vodou a uchovávána v 20% ethanolu.

5.9. SDS elektroforéza ³⁹

Pro přípravu dvou 15% separačních gelů bylo pipetováno: 1,8 ml ddH₂O, 4 ml AA, 2 ml 1,5M Tris o pH = 8,8, 80 μ l 10% SDS, 80 μ l 10% APS a 4 μ l TEMED. Zaostřovací gel byl připraven pipetováním 1,4 ml ddH₂O, 0,5 ml AA, 0,25 ml 1M roztoku Tris o pH = 6,8, 20 μ l 10% SDS, 20 μ l 10% APS a 3 μ l TEMED.

Vzorky pro SDS elektroforézu byly připraveny v redukujícím a neredukujícím prostředí. Redukující vzorek byl připraven smícháním supernatantu s 2 \times koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrem v poměru 1:1, neredukující vzorek smícháním supernatantu s 2 \times koncentrovaným neredukujícím vzorkovým pufrem v poměru 1:1. Následně byly vzorky 5 min povařeny a odstředěny při 18000 \times g, 5 min za laboratorní teploty. Z takto připravených vzorků bylo na gel nanášeno 10 μ l vzorků a 5 μ g standardu. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 50 min. Následně byly gely obarveny 20 min v barvicí lázni na třepačce a poté odbarveny v odbarvovací lázni do úplného odbarvení pozadí gelu.

5.10. Transformace bakterií

Kompetentní buňky *E. coli* kmen BL21 Gold uchovávané při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly rozmrazeny stáním na ledu. K těmto buňkám bylo přidáno $5\text{ }\mu\text{l}$ plazmidu pET30 s vloženou sekvencí NKR-P1C. Následovala 30 min inkubace na ledu. Poté byla směs ponořena na 1 min do vodní lázně o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ihned umístěna zpět na led. Dále byl přidán 1 ml sterilního LB média a směs byla inkubována 45-60 min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla směs odstředěna při $1500 \times g$, 5 min a většina supernatantu byla odstraněna. Ve zbývajících cca $100\text{ }\mu\text{l}$ supernatantu byl pelet resuspendován a nanesen na Petriho misku obsahující LB agar, do kterého byly přidány odpovídající antibiotika – tetracyklin ($12,5\text{ }\mu\text{g/ml}$) a kanamycin ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$). Bakterie byly inkubovány 16-24 hod při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Misky s narostlými koloniemi byly uchovávány v chladničce při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.11. Kultivace bakterií a produkce NKR-P1C

Do 50ml zkumavky s víčkem obsahující 10 ml LB media bylo z Petriho misky přeneseno několik kolonií a přidáno příslušné množství kanamycinu ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) a tetracyklinu ($12,5\text{ }\mu\text{g/ml}$). Zkumavky byly inkubovány na třepačce při 220 ot./min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 hodin. Následně byla provedena inokulace $4 \times 0,5\text{ l}$ LB média s kanamycinem a tetracyklinem $4 \times 2\text{ ml}$ noční kultury. Kultury byly inkubovány na třepačce při 220 ot./min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ do optické hustoty (A_{550}) cca 0,7. Následně bylo přidáno $50\text{ }\mu\text{l}$ induktoru IPTG (do výsledné koncentrace $0,1\text{ mM}$). Produkce probíhala za třepání při 220 ot./min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 hod. Poté bylo médium odstředěno při $4000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a diferenčně byla změřena hmotnost pelety.

Do připraveného autoindukčního média (viz. 5.12) byly přidány 2 ml noční kultury a kultura byla inkubována na třepačce při 220 ot./min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 hodin. Poté bylo médium odstředěno při $4000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a diferenčně byla změřena hmotnost pelety.

5.12. Autoindukční médium⁴⁰

Tab. 2: Roztoky pro přípravu autoindukčního média ZYP-5250.

ZY	Objem 940 ml
trypton	10,0 g
kvasničný autolyzát	5,0 g
destilovaná voda	925 ml
20x NPS, pH = 6,75	Objem 250 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	16,5 g
KH ₂ PO ₄	34,0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	90,0 g
destilovaná voda	225 ml
50x 5052	Objem 100 ml
glycerol	25,0 g
glukóza	2,5 g
laktóza	10,0 g
destilovaná voda	73 ml

Dále bylo připraveno 100 ml 1M MgSO₄ a všechny roztoky byly sterilizovány v autoklávu a další práce probíhala sterilně v laminárním boxu.

Tab. 3: Autoindukční médium ZYP-5250.

ZYP-5250	Objem 500 ml
ZY	464,0 ml
20x NPS	25,0 ml
50x 5250	10,0 ml
1M MgSO ₄	0,5 ml
Antibiotikum	Objem 500 ml
Kanamycin	500 µl
Tetracyklin	1,25 ml

5.13. Izolace inkluzních tělísek

Pelety bakterií byly resuspendovány v sacharózovém lyzačním pufru (20 ml pufru na 1 l média) s inhibitory proteáz. Tato buněčná suspenze byla 4× zmrazena na -80 °C a následně rozmrazena v ultrazvukové vodní lázni. Do suspenze bylo přidáno 400 µl 1M MgCl₂, 30 µl DNAsy (10 U/µl), 2,5 µl RNAsy (20 mg/ml). Tato směs byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě. Směs byla sonikována ultrazvukovou sondou 5 × 30 sekund s přestávkou 30 sekund na ledu a odstředěna 15 minut při 8000 × g, při teplotě 4 °C. K peletám byl přidán tritonový pufr (20 ml pufru na 1 l média) s inhibitory proteáz, resuspendován sonikací a zcentrifugován 15 min při 8000 × g, 4 °C. Supernatant byl odebrán a pelety byly resuspendovány v promývacím pufru (10 ml pufru na 1 l média) s inhibitory proteáz a centrifugovány jako v předchozím případě. Tyto pelety obsahovaly převážně agregovanou formu proteinu, tzv. inkluzní tělíška. Byly uchovávány při -20 °C.

5.14. Rozpuštění inkluzních tělísek

Pomocí pipety a vortexu byla inkluzní tělíška resuspendována v guanidinovém pufru s inhibitory proteáz v poměru 2 ml pufru na 500 ml produkčního média. Roztok byl inkubován 1 hodinu při 40 °C na vodní lázni a následně centrifugován při 15300 × g, 20 °C po dobu 45 minut. Supernatant byl použit pro renaturaci proteinu.

5.15. Renaturace proteinu^{41,42}

Pro renaturaci bylo použito 200 ml renaturačního roztoku na 500 ml produkčního média. Renaturační roztok byl vychlazen v chladové místnosti a těsně před renaturací byl přidán PMSF do 1mM koncentrace. Dále byl připraven 1 ml cysteaminu a 1 ml cystaminu o takových koncentracích, aby po nakapání těchto roztoků do celého objemu renaturačního pufru byly jejich koncentrace 9mM pro cysteamin a 3mM pro cystamin. Tyto roztoky byly přikapány až po nakapání veškerého denaturovaného proteinu, protože opačný postup by vedl k snížení výtežku dimerního proteinu. Do renaturačního pufru byl za stálého míchání přikapáván rychlostí přibližně 1 ml za minutu

denaturovaný roztok proteinu (supernatant po centrifugaci, viz 5.14.). Po renaturaci veškerého proteinu byl po kapkách přikapán připravený roztok cysteaminu a cystaminu. Roztok byl další 1 hodinu míchán v chladové místnosti. Následně byla v chladové místnosti během dvou dní provedena dvojitá dialýza proti 2×10 l dialyzačního pufru.

5.16. Ionexová chromatografie

Pro ionexovou chromatografii byla k HPLC systému připojena kolona naplněná nosičem Q-Sepharosa Fast Flow a systém byl promyt 1M NaOH, 1M HCl a destilovanou vodou. Následovalo promytí nejprve pufrem B a poté pufrem A pro ionexovou chromatografii. Na kolonu byl potom nanesen při průtoku 5 ml/min celý objem dialyzátu předem zfiltrovaného přes 0,22 μ m filtr. Promytím pufrem A se odstranily nečistoty. Pufrem B byla provedena eluce navázaných proteinů rychlostí 3 ml/min s gradientem 0-100 % B za 20 min. Frakce byly jímány do zkumavek manuálně. Kolona byla promyta 1M NaOH, 1M HCl a destilovanou vodou a uchovávána v 20% čistém ethanolu.

Pro druhou ionexovou chromatografii byla použita kolona Tricorn Source 15S 4.6/100 PE. Vzorek byl pro svůj malý objem naředěn malým množstvím pufru A (10 ml). Postup je totožný jako u první ionexové chromatografie. Nanesení vzorku na kolonu však bylo provedeno rychlostí 2 ml/min a eluce pufrem B probíhala 30 min gradientem 0-50 %.

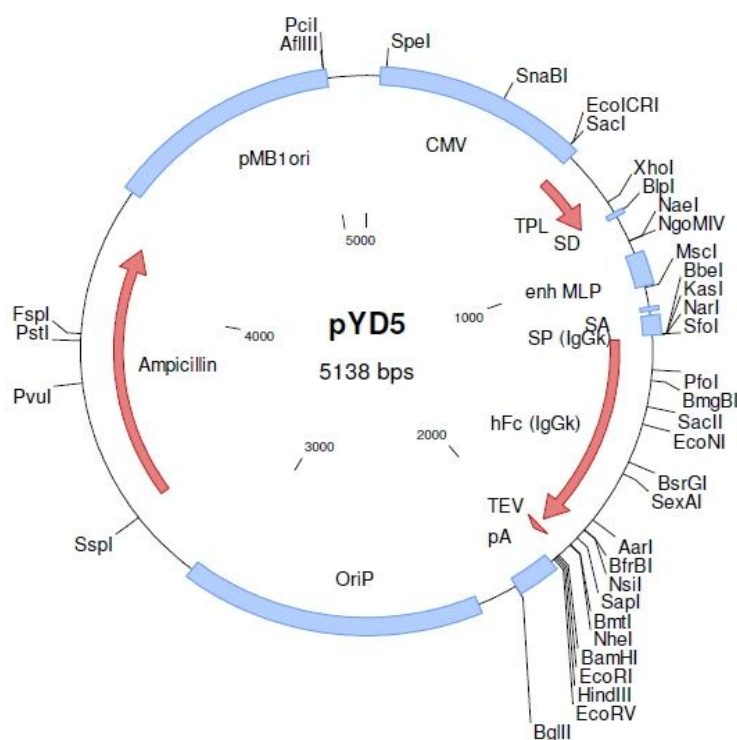
5.17. Stanovení koncentrace proteinu⁴³

Koncentrace přečištěného proteinu byla orientačně stanovena metodou dle Bradfordové. Stanovení bylo provedeno na 96ti jamkové destičce, ke 200 μ l činidla dle Bradfordové bylo vždy přidáno 5 μ l roztoku proteinu a směs byla inkubována 5-15 min za laboratorní teploty. Pomocí roztoků BSA v rozmezí koncentrací 0-1 mg/ml byla sestrojena kalibrační řada a absorbance vzorků při 595 nm byla změřena čtečkou mikrotitračních destiček Tecan Sunrise V 4.51.

6. Výsledky

6.1. Fúzní konstrukt NKR-P1C v plazmidu pYD5

Pro rekombinantní expresi proteinů byl používán v laboratoři školitele již dříve připravený plazmid nesoucí pracovní označení pYD5-N1. Jeho základem je plazmid pYD5 (obr. 7, poskytl Dr. Yves Durocher, CNRC Montreal, Kanada), který byl upraven tak, aby obsahoval vhodná klonovací místa a byla do něj vložena sekvence receptoru NKR-P1C z kmene myši C57BL/6 v rozmezí AK Q67 až S223, nesoucí pracovní označení konstrukt N1, která odpovídá jeho extracelulární části a zahrnuje tedy jak doménu podobnou lektinům C-typu, tak i dimerizační krček (obr. 8, str. 38). Tento plazmid obsahuje sekreční signál, Fc fragment lidského IgG, sekvenci rozpoznávanou TEV proteázou a náš vložený úsek NKR-P1C receptoru, vlastní konstrukt pYD5-N1 je tedy fúzní protein, který lze rozštěpit TEV proteázou (obr. 9 a 10, str. 38). Tato strategie přípravy NKR-P1C jako fúzního proteinu s Fc IgG, který přirozeně tvoří dimer, měla napomoci tvorbě dimeru také jeho fúzního partnera, NKR-P1C.



Obr. 7: Mapa plazmidu pYD5.

MDTASIYLGLKPPRTLGAWHESPPSLPPDACRCPRSHRLALKLSCAGLILLVLTIG
MSVLVRLVQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSN
TWEEGQADCGRKGATLLLIQDQEELRFLLDSEIKEYNSFWIGLRFTLPDMNWKWI
NGTTFNSDVLKITGVTENGSCASILGDKVTPESCASDNRWICQKELNHETPSNDS

Obr. 8: Sekvence mNKR-P1C. Barevně je zvýrazněn **transmembránový úsek**, **konstrukt N1**, v němž jsou zvýrazněny **cysteiny** a potenciální místa **N-glykosylace**.

METDTLLLWVLLWVPGSTGAGSTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKASGAGSTTENLYFQGTGQKPSREKCCV
FIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSN TWEEGQADCGRKGATLL
LIQDQEELRFLLDSEIKEYNSFWIGLRFTLPDMNWKWI NGTTFNSDVLKITGVTE
NGSCASILGDKVTPESCASDNRWICQKELNHETPSNDSGT

Obr. 9: Sekvence konstruktů pYD5-N1. **Sekreční signál**, následující část sekvence odpovídá Fc fragmentu lidského IgG, na nějž navazuje sekvence, kterou rozpoznává **TEV proteáza**, po ní **konstrukt N1**, v němž jsou zvýrazněny **cysteiny** a potenciální místa **N-glykosylace**.

GTGQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSN TWEEG
QADCGRKGATLLLIQDQEELRFLLDSEIKEYNSFWIGLRFTLPDMNWKWI NGTTFN
SDVLKITGVTENGSCASILGDKVTPESCASDNRWICQKELNHETPSNDSGT

Obr. 10: Finální produkt NKR-P1C po odštěpení Fc fragmentu TEV proteázou.

Předpokládá se, že Cys11, Cys12 a Cys25 v krčku jsou dimerizační. Cysteiny Cys31 – Cys42, Cys59 – Cys147, Cys126 – Cys139 jsou spojené disulfidickými můstky.

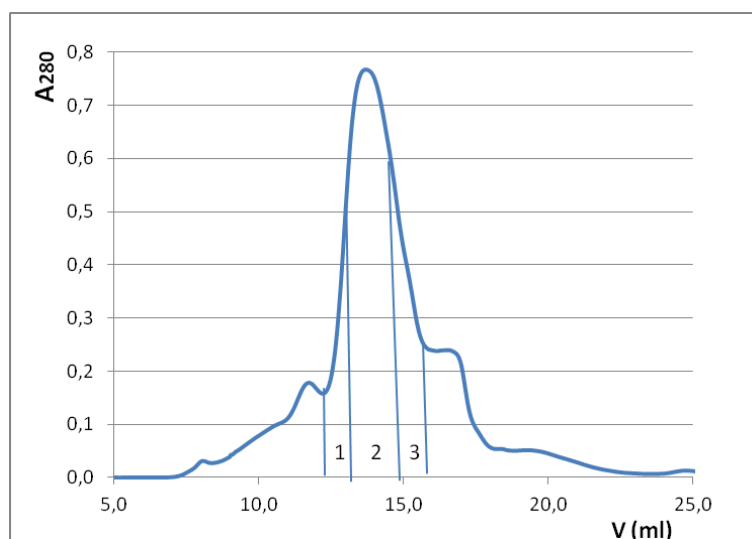
6.2. Příprava proteinu expresí v buněčné linii HEK293

Pro transfekci byla nejprve spočítána buněčná hustota v lahvích (1. lahev cca $4,0 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$, 2. lahev cca $3,0 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a přepočtena na celkový počet buněk. Pro transfekci bylo k dispozici $2100 \cdot 10^6$ buněk (příprava 4×1 l lahví, každá obsahuje objem 400 ml media). Byla provedena transfekce podle bodu 5.4. Zcentrifugované buňky byly resuspendovány v 93 ml ExCell293 média. Transfekční směs byla připravena

odebráním 646 μl plazmidu pYD5-N1 o koncentraci 3,25 $\mu\text{g/ml}$, přefiltrována přes 0,22 μm filtr, promyta 1 ml PBS a smíchána s 10,5 ml PEI. Tímto postupem bylo dosaženo výsledného množství 20.10⁶ buněk na mililitr. Po rozdělení do 4 lahví, smíchání transfekční směsi s buňkami a 4hod. inkubaci byly láhve doplněny na 400 ml ExCell293 médiem a byly přidány 4 ml antibiotik. Po 3 dnech byl přidán trypton N1 do 0,5% výsledné koncentrace a po následujících 3 dnech byla produkce sklizena. Viabilita buněk byla 94 % a buněčná hustota se ve všech lahvích pohybovala okolo 4.10⁶ ml⁻¹.

6.3. Purifikace proteinu připraveného v buněčné linii HEK293

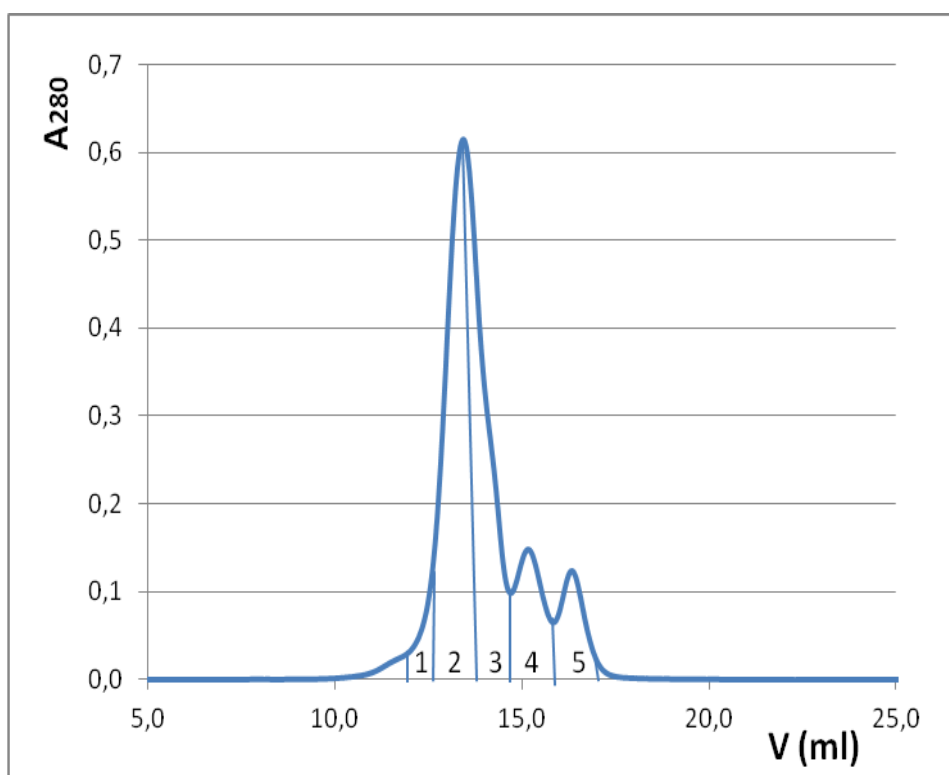
Médium bylo rozmrazeno a zfiltrováno přes 0,22 μm filtr. Protein byl zachycen na kolonce „HiTrap mAb Select Sure“ s protein A agarózou postupem popsáným v bodě 5.5. Eluce proteinu byla provedena citrátovým pufrům o pH = 3. Protein byl nyní v 10 ml tohoto pufru. Následovala neutralizace frakce a zakoncentrování proteinů (popsáno v kapitole 5.6). Vzorčky byly nastříknuty na kolonu Superdex 200 10/300 GL. V průběhu gelové permeační chromatografie (GPC) (obr. 11) byla sledována absorbance při 280 nm. Před dalším postupem bylo odebráno malé množství vzorku na SDS elektroforézu (obr. 13, str. 41).



Obr. 11: Gelová permeační chromatografie pYD5-N1 (GPC).

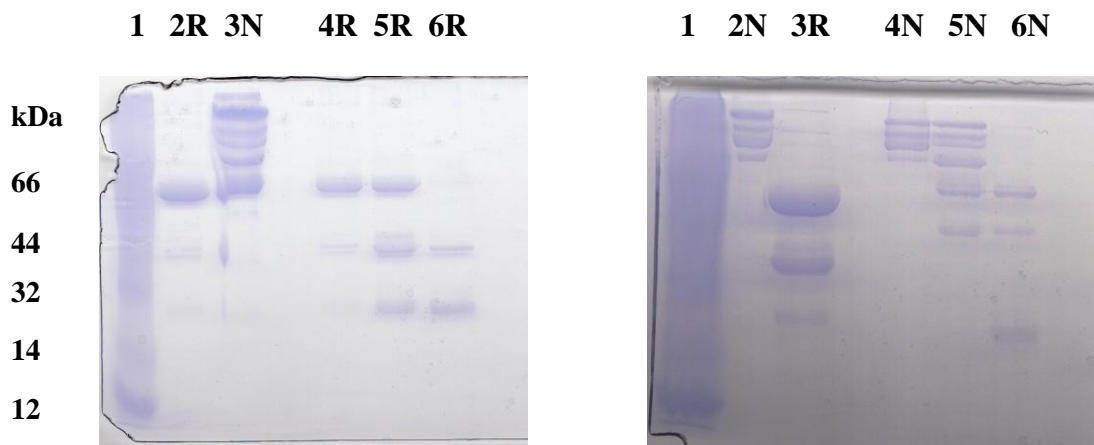
Separace proběhla na koloně Superdex 200 10/300 GL, čísla značí jednotlivé frakce.

Frakce 1, 2 a 3 byly spojeny a štěpeny 30 μ l TEV proteázy přes noc (viz 5.7). Následovala chelatační chromatografie s 200 μ l chelatačního nosiče Talon a 200 μ l protein A agarózy postupem popsaným v bodě 5.8. Následně byla provedena další gelová permeační chromatografie (GPC/TEV), kde měl být již čistý protein bez Fc fragmentu. Ze záznamu GPC/TEV (obr. 12) je však vidět, že většina Fc fragmentu nebyla odštěpena od proteinu. Byla provedena SDS elektroforéza postupem popsaným v bodě 5.9 (obr. 13, str. 41).



Obr. 12: Gelová permeační chromatografie pYD5-N1 po štěpení TEV proteázou (GPC/TEV).

Separace proběhla na koloně Superdex 200 10/300 GL, čísla značí jednotlivé frakce: 2 a 3 je stále nerozštěpený fúzní protein pYD5-N1, frakce 4 je dimer NKR-P1C bez Fc fragmentu, frakce 5 je monomer NKR-P1C.

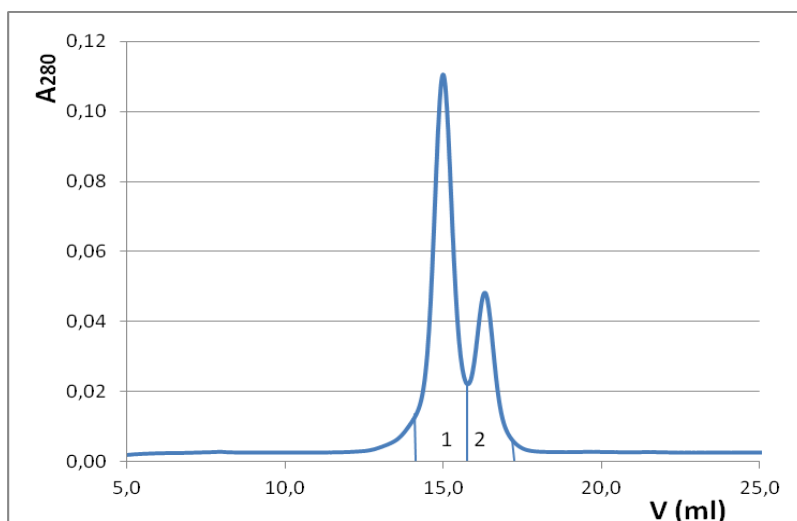


Obr. 13: SDS-PAGE vzorků zachycující průběh purifikace proteinu.

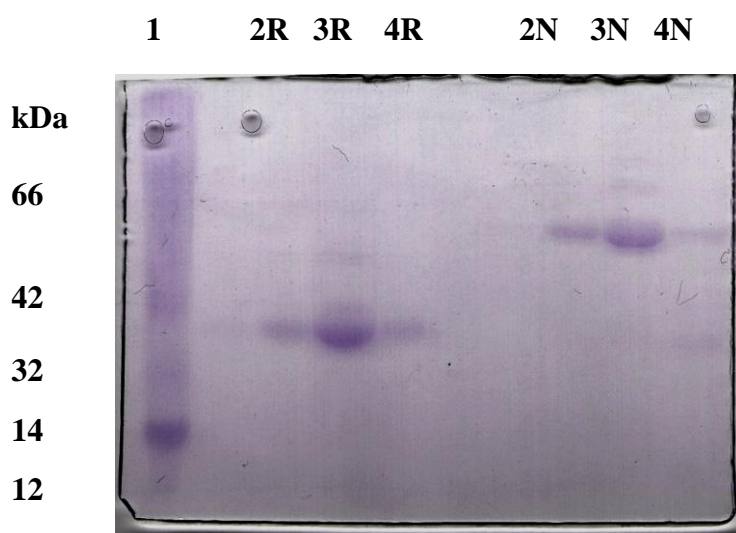
Vlevo jsou vzorky v redukujícím pufru (R) (až na vzorek 3 – omylem prohozen), vpravo jsou vzorky v neredučujícím pufru (N) (vzorek 3 – prohozen).

1 – marker, 2 – vzorek z GPC, fúzní protein (52 kDa v R) 3 – vzorek Fc fragmentu (pro ustálení pH bylo přidáno malé množství Tris), 4,5,6 – vzorky z GPC/TEV, 4 – frakce 2 (neodštěpil se Fc fragment), 5 – frakce 4, je zde viditelný dimer (46 kDa v R), 6 – frakce 5 z gelové permeační chromatografie, monomer (23 kDa v R)

Frakce 2 a 3 z GPC/TEV, byly spojeny a bylo zopakováno štěpení TEV proteázou ve větším množství, aby byl všechen Fc fragment od proteinu odštěpen. Na 1 ml bylo přidáno 50 μ l TEV proteázy a štěpení probíhalo 5 dní při 4 °C. Chelatační chromatografie byla provedena s 1 ml TALONu a 1 ml protein A agarózy stejně jako v předchozím případě. Následovala gelová permeační chromatografie GPC/TEV 2 (obr. 14, str. 42) a SDS elektroforéza (obr. 15, str. 42).



Obr. 14: Gelová permeační chromatografie GPC/TEV 2 štěpeného proteinu pYD5-N1. Frakce 1 je čistý dimer, frakce 2 monomer.



Obr. 15: Frakce vzorků z gelové permeační chromatografie (GPC/TEV 2).

1 – marker, 2 – frakce 1, dimer (46 kDa v R), 3 – zakoncentrovaná frakce 1 z GPC/TEV 2, 4 – frakce 2 je monomer (23 kDa v R), R – redukující vzorkový pufr, N – neredukující vzorkový pufr

Získaná frakce 1 z gelové permeační chromatografie GPC/TEV 2 je dimerní forma proteinu NKR-P1C vysoké čistoty o velikosti elučního vrcholu $A_{280} = 0,11$. Frakce byla zkonzentrována na 200 μ l a metodou dle Bradfordové byla změřena její koncentrace (viz. 5.17), která byla 0,85 mg/ml. Frakce byla skladována při -20 °C.

6.4. Příprava NKR-P1C proteinu renaturací z inkluzních tělísek exprimovaných v buňkách *E. coli* BL-21 Gold

Pracovní postup pro přípravu dimerní formy mNKR-P1C z prokaryotních buněk byl převzat z diplomové práce Bc. Davida Adámka (Katedra biochemie PřF UK, 2012). Byl použit plazmid pET30, do kterého byla vložena sekvence receptoru mNKR-P1C (obr. 16). Plazmid poskytl Mgr. Daniel Rozbeský (PřF UK, Praha).

SREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSNTWEEGQADCG
RKGATLLLIQDQEELRFLLDSEKYNFWSWIGLRFTLPDMNWKWINGTTFNSDVL
KITGVTENGSCASILGDKVTPESCASDNRWICQKELNHETPSNDS

Obr. 16: Sekvence mNKR-P1C vložená do plazmidu pET30.

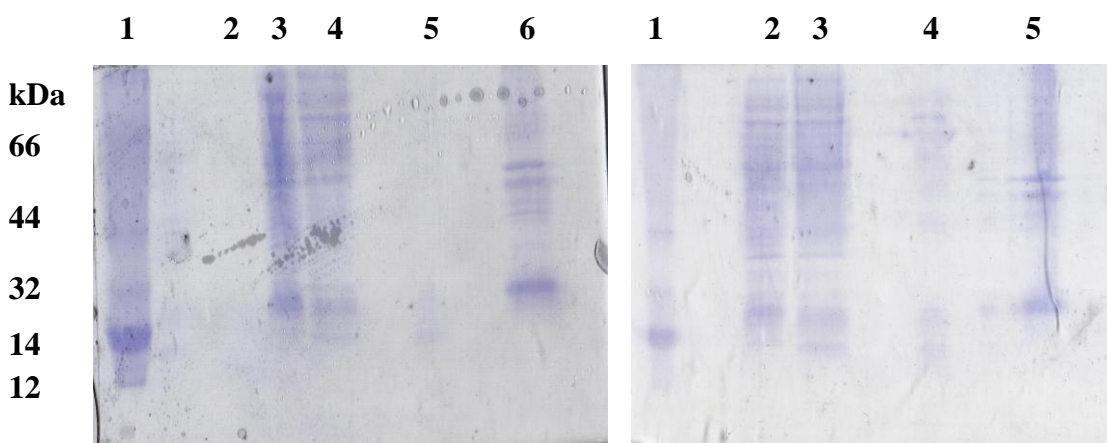
Zvýrazněny jsou **cysteiny**, první dvojice tvoří můstek sama se sebou, třetí cystein je zodpovědný za tvorbu dimeru a zbylých šest cysteinů vytváří tři klasické intramolekulární disulfidické můstky uvnitř lektinové domény s obvyklou strukturou zapojení 1-2, 3-6 a 4-5.

Buňky *E. coli* BL21 Gold skladované při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly pozvolna rozmrazeny na ledu. K buňkám bylo přidáno $5\text{ }\mu\text{l}$ plazmidu pET30 s vloženou sekvencí NKR-P1C a byla provedena transformace podle bodu 5.10. S několika koloniemi z Petriho misky byla provedena kultivace do malého množství LB média (viz. 5.11) a kultura byla přes noc inkubována na třepačce při 220 ot./min , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 hodin. Následně byla noční kultura rozdělena na $4 \times 2\text{ ml}$ pro produkce v $4 \times 0,5\text{ l}$ LB média a zbylé 2 ml noční kultury byly přeneseny do $0,5\text{ l}$ namíchaného autoindukčního média (AI) podle bodu 5.12. AI médium využívá „autoindukce“ proteinu bez nutnosti přidání induktoru IPTG. Bakterie využívají jako prvotní zdroj živin glukózu. Po jejím vyčerpání vstupuje do buněk laktóza, která indukuje expresi proteinu řízenou laktózovým operonem. Kultury byly třepány rychlostí 220 ot./min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. U kultury rostoucí v LB médiu byla sledována optická denzita při 550 nm . Při dosažení absorbance kolem $0,7$ byl přidán induktor IPTG do každé lahve do výsledné koncentrace $0,1\text{ mM}$ a od této doby byla kultura třepána další 3 hod do sklizení. Autoindukční médium bylo sklizeno po 20 hodinách kultivace. Po zcentrifugování byl odebrán vzorek média a byla zvážena hmotnost pelety (tab. 4, str. 44) a odebráno malé množství vzorku pro SDS elektroforézu (obr. 17 a obr. 18, str. 44).

Tab.4: Hmotnost pelety po sklizení kultur

Produkce	Objem produkce	Hmotnost pelety
LB s IPTG	2,0 l	3,8 g
AI	0,5 l	4,8 g

Následně byla provedena izolace inkluzí popsaná v bodě 5.13. Postupně byly odebírány vzorky na SDS elektroforézu (obr. 17 a obr. 18). Byl odebrán vzorek sacharózového pufru po všech zmrazeních a centrifugaci, vzorek tritonového pufru po centrifugaci, vzorek promývacího pufru po centrifugaci a troška pelety (inkluzí). Všechny vzorky byly připraveny v neredukujícím pufru.

**Obr. 17:** SDS-PAGE vzorků zachycující průběh izolace inkluzí (LB)

1 – marker, 2 – LB medium po centrifugaci buněk, 3 – sacharózový pufr, 4 – tritonový pufr, 5 – promývací pufr, 6 – pelet z inkluze

Obr. 18: SDS-PAGE vzorků zachycující průběh izolace inkluzí (AI)

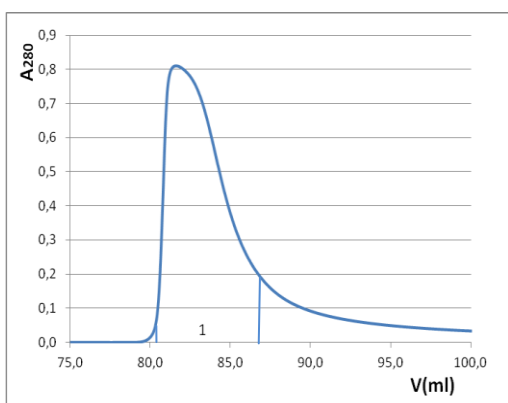
1 – marker, 2 – sacharózový pufr, 3 – tritonový pufr, 4 – promývací pufr, 5 – pelet z inkluze

Inkluze byly zváženy (tab. 5), aby bylo možné odhadnout množství renaturačního roztoku.

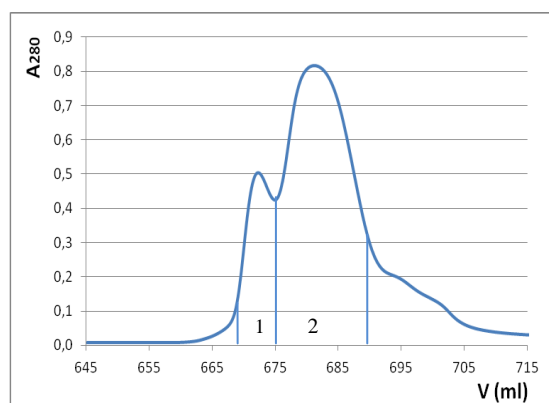
Tab. 5: Hmotnost inkluzních tělísek

Produkce	Objem produkce	Hmotnost inkluzních tělísek
LB s IPTG	2,0 l	1,33 g
AI	0,5 l	3,39 g

V dalším kroku byla inkluzní tělíska rozpuštěna v guanidinovém pufru postupem popsaným v bodě 5.14. Pro usnadnění práce byla v tomto kroku polovina supernatantu (pro LB medium s IPTG i pro AI medium) zmrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro případné další zpracování. Dále byly zpracovávány inkluzní tělíska pocházející z 1 l LB media s IPTG pro něž bylo připraveno 400 ml renaturačního roztoku. Protože hmotnost inkluzních tělísek z produkce v AI mediu byla přibližně $2,5\times$ větší, bylo připraveno úměrné množství (1 litr) renaturačního roztoku, ačkoliv bylo pracováno s množstvím inkluzí vzniklých pouze z 250 ml produkčního objemu. Byla provedena renaturace metodou rychlého naředění, kdy jako tzv. „nízkomolekulární chaperon“ byl použit L-arginin.HCl a následně byla provedena dialýza (viz. 5.15 a 5.16). Dialyzačního pufru bylo připraveno celkem 40 litrů. Každý renaturační roztok byl dialyzován proti 10 l dialyzačního pufru po dobu 16 hod a po této době byly dialyzační trubice přeneseny do dalších 10 l dialyzačního pufru a ponechány dalších 20 hod dialyzovat. Po ukončení dialýzy byly roztoky zfiltrány nejdříve jen přes filtrační papír pro zachycení nejhrubších nečistot a poté přes $0,22\text{ }\mu\text{m}$ filtr. Roztoky byly postupně v celém svém objemu nanášeny na ionexovou kolonu naplněnou Q-Sepharózou FF (viz 5.17) a při eluci pomocí NaCl byly jímány frakce. Pro produkci z LB media (obr. 19) byla eluce bez gradientu průtokem 3 ml/min. U produkce z AI média (obr. 20) byl již proveden gradient 20 min 0-100 % pufru B, průtok 3 ml/min. Díky gradientu je vidět lepší separace nečistot. Ze vzorků byla provedena SDS elektroforéza (obr. 21, str. 46).



Obr. 19: Ionexová chromatografie na koloně Q-Sepharózy FF (LB). Eluce bez gradientu 3 ml/min.



Obr. 20: Ionexová chromatografie na koloně Q-Sepharózy FF (AI). Eluce gradientem 0-100 % B, 20 min, průtok 3 ml/min.

kDa 1 2R 3R 4R 2N 3N 4N

66
44
32
14
12

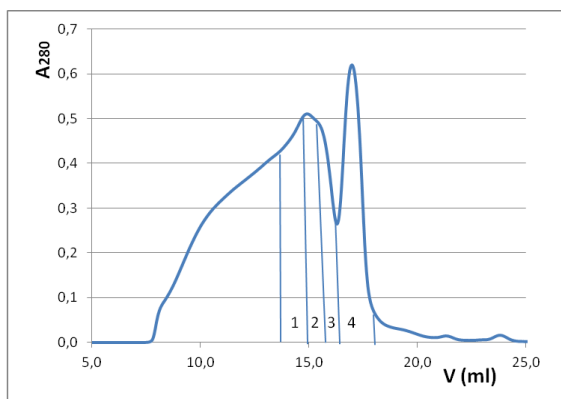


1 – marker,
2 – frakce 1 z LB media,
3 – frakce 1 z AI,
4 – frakce 2 z AI
R – v redukujícím pufru,
N – v nerdukujícím pufru

Obr.21: SDS-PAGE vzorků z ionexové chromatografie.

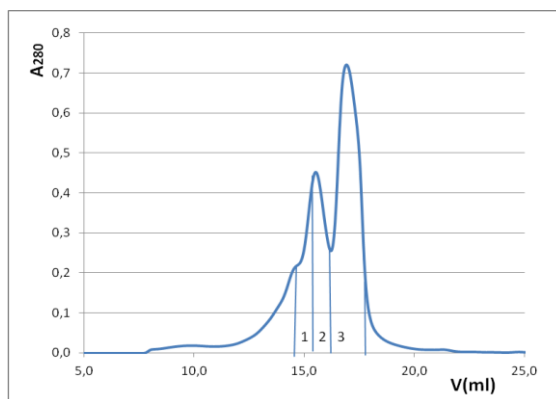
Jelikož vzorky byly v roztoku soli, po povaření se srážely, do jamky 2R se ani nepodařilo napipetovat vzorek. Z elektroforézy je vidět, že renaturací vznikl monomer (18 kDa), dimer (36 kDa) i malé množství trimeru (54 kDa).

Následovala gelová permeační chromatografie (GPC; obr. 22 a 23) a SDS elektroforéza (obr. 24 a 25, str. 47). U vzorku frakce 2 po ionexové chromatografii (AI) bylo pomocí gelové permeační chromatografie zjištěno, že neobsahuje mNKR-P1C, frakce byly pro jistotu ověřeny na SDS elektroforéze (výsledky neuvedeny).

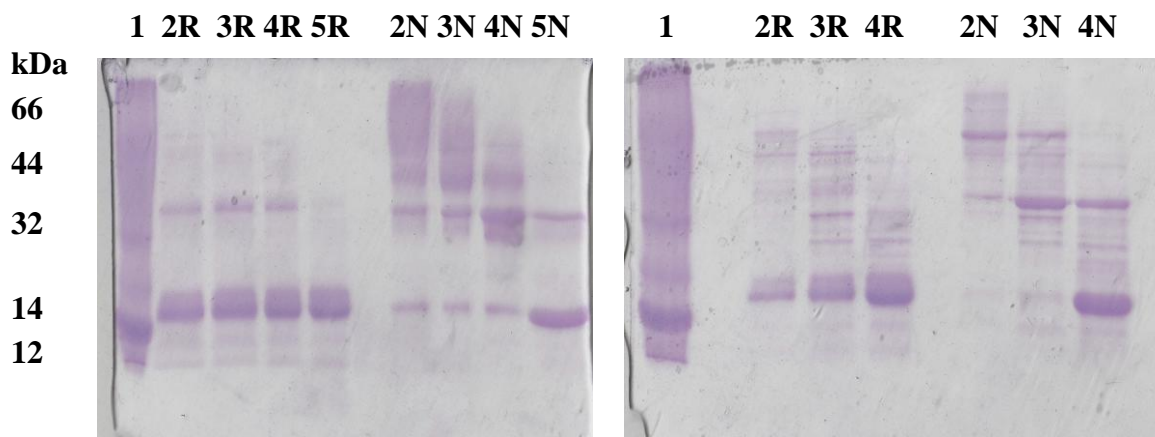


Obr. 22: GPC eluátu z ionexové chromatografie (LB).

V elučním objemu dimeru (frakce 2 a 3) je vidět horší separace způsobená průběhem aniontové chromatografie bez gradientu pufru B.



Obr. 23: GPC frakce 1 z ionexové chromatografie (AI).



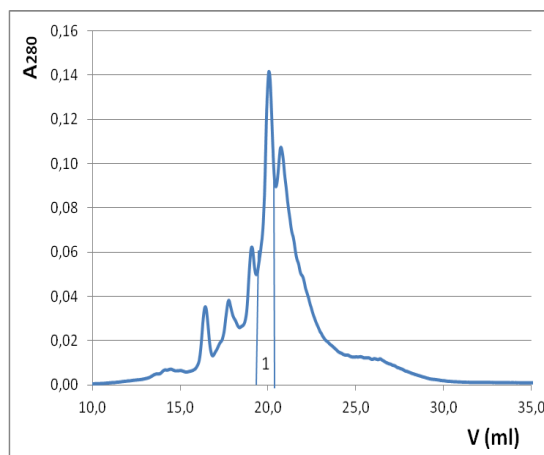
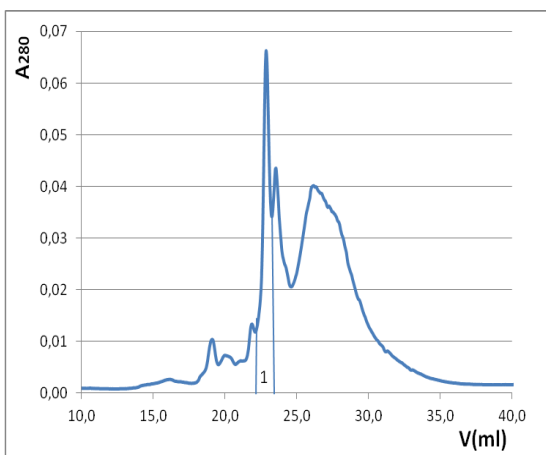
Obr. 24: Vzorky z GPC chromatografie (produkce v LB)

1 – marker,
 2 – frakce 1,
 3 – frakce 2 – obsahuje dimer (36kDa)
 4 – frakce 3 – největší množství dimeru
 5 – frakce 4 – monomer (18 kDa)
 R – v redukující pufru, N – v neredukujícím pufru

Obr. 25: Vzorky z GPC chromatografie (produkce v AI)

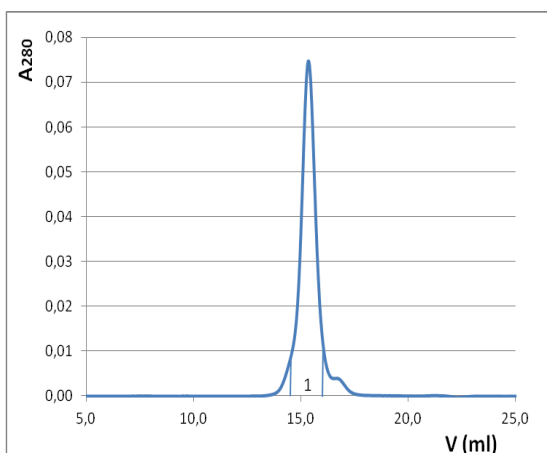
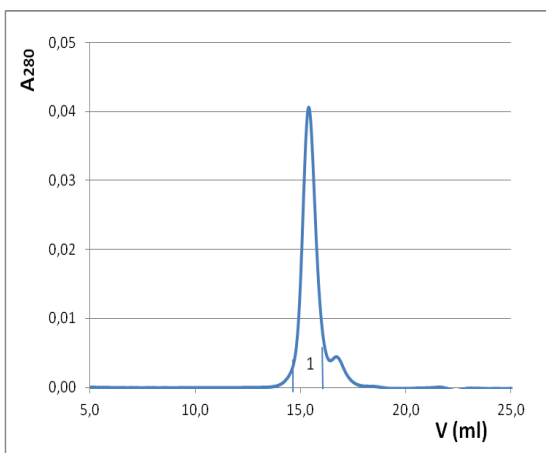
1 – marker
 2 – frakce 1
 3 – frakce 2 – největší množství dimeru (36 kDa)
 4 – frakce 3 – monomer (18 kDa)

Jelikož proteiny nebyly stále čisté, byly vybrány frakce 2 a 3 z produkce v LB médiu a frakce 2 z AI média získané z GPC. Ty byly naředěny do 10 ml pufru A a naneseny na ionexovou kolonku Tricorn Source 15S 4.6/100 PE (viz. 5.21.2). Eluce byla provedena 30min gradientem pufru B 0-50 % o rychlosti průtoku 1 ml/min. Záznam z ionexové chromatografie z frakce 2 (LB), získané z předešlé GPC (obr. 24) byl obdobný, jako ionexová chromatografie pro frakci 3 (obr. 26, str. 48), která byla také získána z předešlé GPC, proto není uveden. Získané frakce dimerního NKR-P1C z ionexových chromatografií proteinu produkovaného v LB médiu byly spojeny. Společně s frakcí dimerního NKR-P1C vzniklého produkci v AI médiu (obr. 27, str. 48) byla provedena poslední GPC (obr. 28 a 29, str. 48).



Obr. 26: Ionexová chromatografie 2 (LB). Eluce 30min gradientem pufru B 0-50 %, průtok 1 ml/min.

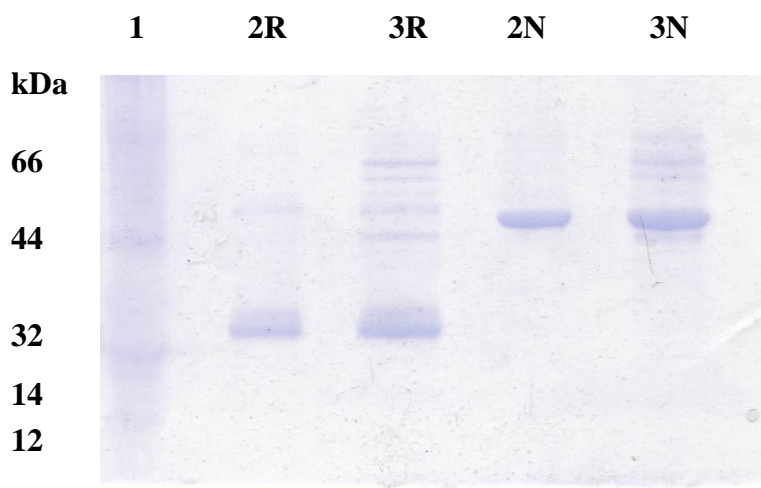
Obr. 27: Ionexová chromatografie 2 (AI). Eluce 30min gradientem pufru B 0-50 %, průtok 1 ml/min.



Obr. 28: Konečný výsledek z GPC dimerní formy proteinu NKR-P1C produkované v LB médiu.

Obr. 29: Konečný výsledek z GPC dimerní formy proteinu NKR-P1C produkované v AI médiu.

Z frakcí zakoncentrovaných na 150 μ l byla provedena SDS elektroforéza pro zjištění čistoty proteinů (obr. 30, str. 49).



Obr. 30: SDS elektroforéza ze vzorků z GPC (obr. 28 a 29) ukazující čistotu dimerní formy NKR-P1C produkovaného v LB médiu s IPTG a v AI médiu.

1 – marker, 2 – dimerní NKR-P1C produkované v LB médiu s IPTG (36 kDa v R)

3 – dimerní NKR-P1C produkované v AI médiu (36 kDa v R)

R – vzorky v redukujícím pufru, N – vzorky v neredukujícím pufru

Pro zkoncentrované vzorky byla změřena koncentrace metodou dle Bradfordové na čtečce mikrotitračních destiček SUNRISE (viz. 5.22) při vlnové délce 595 nm. Z kalibrační řady roztoků byla sestrojena kalibrační přímka, z níž byla zjištěna odpovídající koncentrace proteinů (tab. 6)

Tab. 6: Porovnání výtěžku dimerní formy NKR-P1C produkované v bakteriálních buňkách:

Způsob kultivace	objem kultury	koncentrace
dimerní NKR-P1C produkované v LB médiu	1000 ml	0,75 mg/ml
dimerní NKR-P1C produkované v AI médiu	250 ml	0,80 mg/ml

7. Diskuze

Hlavním cílem této práce byla příprava dimerní rozpustné formy myšního receptoru NKR-P1C. Receptory rodiny NKR-P1 se v nativní formě vyskytují jako homodimery. Pro tvorbu dimeru je důležitá oblast „krčku“ spojující transmembránovou část a C-lektinovou doménu.²⁷ Díky cysteinům v krčku (obr. 31) dochází k dimerizaci – oblast krčku je znázorněna rámečkem (podrobný popis sekvence je uveden v kapitole 5.1). Předpokládá se, že dimerizace je způsobena díky cysteinu C25 a cysteiny jdoucí v sekvenci po sobě, tedy C11 a C12, tvoří disulfidický můstek.

```
GTGQKPSREKCCVFIQENLNKTTDCSVNLECPQDWLLHRDKCFHVSQVSNT  
WEEGQADCGRKGATLLLIQDQEELRFLLSIKEKYNSFWIGLRFTLPDMNW  
KWINGTTFNSDVLKITGVTEGSCASILGDKVTPESCASDNRWICQKELNHET  
PSNDSGT
```

Obr. 31: Sekvence finálního produktu mNKR-P1C z plazmidu pYD5 po štěpení TEV proteázou, rámečkem je znázorněna oblast „krčku“.

Nejčastější metodou v strukturní biologii je výroba proteinů bakteriální expresí v *Escherichia coli*. Nicméně, prokaryotické expresní systémy nedokáží vždy správně vytvářet složené funkční formy mnoha proteinů a proto je velké množství proteinů vyráběno v eukaryotních expresních systémech.⁴⁴ V této práci byly uvedeny výsledky přípravy proteinu z obou expresních systémů. Savčí buňky mají tu výhodu, že mají na rozdíl od bakterií složitý proteosyntetický aparát, což vede k správné expresi posttranslačně modifikovaných proteinů a jejich správnému uspořádání.⁴⁵ V případě bakterií bývají rekombinantní proteiny často denaturovány ve formě inkluzních tělísek, které lze ale snadno izolovat. Protein, který je v tělíscích obsažen, je však potřeba renaturovat. Ve správné renaturaci proteinu bývá často problém, zvláště když má molekula proteinu větší množství cysteinů, které mají vytvořit disulfidické můstky.⁴⁵

V mé práci jsem nejprve mNKR-P1C protein připravila rekombinantní expresí pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293. Standardní postup, kterým byly purifikovány i jiné proteiny na stejném principu zahrnuje afinitní chromatografii, kdy je protein oddělen díky navázání Fc fragmentu na nosič protein A agarózu, gelovou

permeační chromatografii a štěpení TEV proteázou, která odštěpí Fc fragment. Díky chelatační chromatografii na nosiči Talon, který je nabitý kobaltnatými ionty je TEV protéza zachycena přes svou histidinovou kotvu a Fc fragment je v dalším kroku opět navázán na protein A agarózu. Následnou gelovou permeační chromatografií, kde je oddělen dimer od monomeru, by měl být získán čistý dimerní protein. V tomto případě nastal problém, jak je vidět z Obr. 12 (str. 40), kde dominantní pík je stále nerozštěpený fúzní protein a pouze zanedbatelná část byla rozštěpena. Příčinou mohlo být nedostatečné množství přidané TEV proteázy, nebo krátká doba štěpení. Z frakcí, kde nebyl Fc fragment odštěpen byl proto zopakován stejný postup jen s větším množstvím TEV proteázy, aby byl nyní rozštěpen již všechen fúzní protein a štěpení pro jistotu probíhalo delší dobu (5 dní). Nadbytek TEV proteázy však může mít i negativní vliv, kdy po odštěpení veškerého Fc fragmentu může protéza začít interagovat i s proteinem. Tyto výsledky vedly k závěru, že je potřeba udělat optimalizaci množství a doby štěpení proteinu TEV proteázou. Byla snaha připravit zásobní množství vlastní proteázy, což se ale bohužel i po několika pokusech prozatím nepodařilo v takové čistotě, aby optimalizace mohla být provedena (optimalizace a příprava TEV proteázy nejsou součástí této bakalářské práce).

U přípravy mNKR-P1C proteinu renaturací z inkluzních tělísek exprimovaných v buňkách *E. coli* BL-21 Gold byla provedena kultivace v LB médiu, kde je nutná indukce IPTG po dosažení určité optické hustoty buněk odpovídající exponenciální fázi růstu bakteriální kultury. Bylo vyzkoušeno i autoindukční médium, kde k indukci dojde po určité době samovolně, když bakterie v médiu spotřebují veškerou glukózu, kterou využívají jako primární zdroj živin (jelikož je energeticky výhodnější než laktóza) a začnou využívat v médiu přítomnou laktózu, což vede k indukci exprese proteinu.

Po izolaci inkluzí a jejich rozpuštění byla provedena renaturace. Po následné dialýze byl očekáván mnohem větší zákal způsobený agregáty obvykle vzniklými po refoldingu. Z SDS elektroforézy na obrázku 17 a 18 (str. 44) je vidět, že inkluzí nebylo příliš mnoho. I přes to bylo získáno větší množství inkluzí z autoindukčního média, kde byla navíc kultivace prováděna pouze v 1/4 objemu na rozdíl od LB média s IPTG. Nicméně je pravděpodobné, že se spíše jednalo jen o větší množství biomasy a množství inkluzí bylo srovnatelné - i produkci v AI médiu by bylo vhodné optimalizovat. Po provedení všech přečišťovacích procesů a gelových permeačních

chromatografií byl získán dimerní protein NKR-P1C z obou kultivačních médií o přibližně stejné koncentraci (tab. 7.). Výtěžek proteinu z autoindukčního média vztažený na kultivační objem by však byl 4× vyšší, neboť kultivace byla prováděna jen zkusmo v malém objemu AI média.

Tab.7: Porovnání výtěžků proteinu mNKR-P1C z různých způsobů přípravy:

způsob kultivace	objem kultury	koncentrace	finální objem proteinu	výtěžek proteinu
Transfekce v HEK293	2000 ml	0,85 mg/ml	200 µl	170 µg
Produkce v LB médiu	1000 ml	0,75 mg/ml	150 µl	112,5 µg
Produkce v AI médiu	250 ml	0,80 mg/ml	150 µl	120 µg

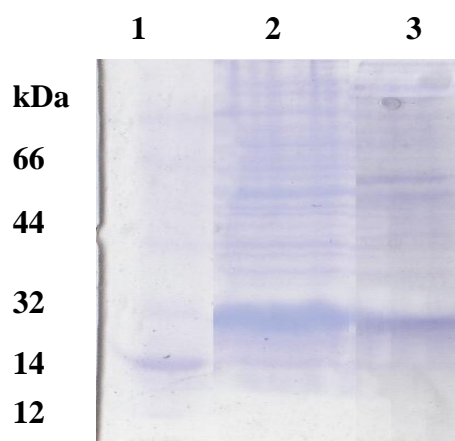
Z tabulky vyplývá, že nejúspěšnější se zdá být bakteriální příprava v AI médiu, kde můžeme čistě hypoteticky říci, že při kultivaci v objemu stejném jako byla provedena transfekce v buněčné linii HEK293 bychom měli získat alespoň 1 mg proteinu.

Výtěžky u bakteriální přípravy by však mohly být patrně ještě vyšší. Jelikož již v dřívější době byl problém s používáním produkčních kmenů (špatně připraveny, již dlouho zmrazeny atd.), byl proto dovezen z Mikrobiologického Ústavu AV ČR, v.v.i. nově připravený stejný produkční kmen *E. coli* BL 21 Gold. Byla provedena transformace a kultivace v autoindukčním médiu. Po 16 hodinách byl odebrán vzorek inkluzí na SDS elektroforézu (obr. 32, str. 53) a byl porovnán s množstvím inkluzí získaném při produkci v našem stávajícím produkčním kmenu *E. coli* BL 21 Gold, kde bylo inkluzních tělísek méně.

Při porovnání čistoty připravených proteinů lze říci, že čistota proteinu připraveného pomocí transienční transfekce v buněčné linii HEK293 je srovnatelná s čistotou proteinu připraveného renaturací z inkluzních tělísek exprimovaných v buňkách *E. coli* BL-21 Gold kultivovaných v LB médiu s induktorem IPTG. Protein z kultivace v AI médiu je o něco nižší čistoty, což lze do budoucna pravděpodobně minimalizovat provedením

optimalizace doby kultivace v AI médiu a hlavně důkladným přečištěním inkluzních tělísek. Při sledování růstu kultury lze vypočítat, za jakou dobu bude v kultuře největší počet živých bakterií. Tím lze zjistit, kdy získáme největší množství inkluzních tělísek a kdy je již vhodné produkci ukončit. Pokud bude kultura sklizena v době, kdy bude viabilita buněk vysoká, tím méně bude v médiu buněčného „balastu“ a tím snadnější bude čištění inkluzí při izolaci proteinu a lepší výsledná čistota.

Tato optimalizace bude provedena nad rámec bakalářské práce a bude snaha o připravení velkého množství proteinu NKR-P1C renaturací z inkluzních tělísek exprimovaných v buňkách *E. coli* BL-21 Gold kultivovaných v autoindukčním médiu ZYP-5052 pro účely proteinové krystalografie.



Obr. 32: Porovnání inkluzí.

1 – marker, 2 – inkluze z dovezených produkčních kmenů,

3 – inkluze ze stávajících produkčních kmenů (z nich byly získány výsledky)

8. Závěr

Byl připraven dimerní myší rozpustný protein NKR-P1C rekombinantní expresí pomocí tranzientní transfekce buněčné linie HEK293 v množství 170 μg o relativně dobré čistotě z celkem 2l produkce.

Protein připravený renaturací z inkluzních tělísek a exprimovaný v buňkách *E. coli* BL-21 Gold kultivovaných v LB médiu s induktorem IPTG byl obdobné čistoty v množství 112,5 μg . Toto množství bylo získáno z 1 l kultury.

Protein kultivovaný v autoindukčním médiu ZYP-5052 byl sice o něco horší čistoty, ale vzhledem k objemu média, ve kterém byl produkován, se tento postup jeví jako nejlepší pro přípravu mNKR-P1C. Tímto postupem bylo získáno 120 μg z celkem 250 ml buněčné kultury.

9. Seznam citované literatury

1. Vodrážka, Z.: *Biochemie [1]*, Praha, Academia 1992
2. Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, 4. Vydání, Praha, Triton 2009
3. Bartůňková, J., Paulík, M. a kol.: *Vyšetřovací metody v imunologii*, Praha, Grada Publishing a.s. 2005
4. Bier, O. G., Silva, W. D., Götze, D., Mota, I.: *Fundamentals of immunology*, New York-Heidelberg-Berlin, Springer-Verlag 1981
5. Vivier, E., Raulet, D. H., Morreta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., Ugolini, S.: Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells, *Science* **331**, 44–49 (2011) cit. dle: Herberman, R. B., Nunn, M. E., Lavrin, D. H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity, *International Journal of Cancer* **16**, 216–229 [PubMed: 50294] (1975)
6. Trinchieri, G.: Biology of natural killer cells, *Advances in Immunology* **47**, 187–376 (1989)
7. Stites, D. P., Terr, A. I.: *Basic and Clinical Immunology*, Praha, Victoria Publishing 1991
8. Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., Walzer, T.: The trafficking of natural killer cells, *Immunological Reviews* **220**, 169–182 (2007)
9. Spits, H., Blom, B., Jaleco, A. C., Weijer, K., Verschuren, M. C., van Dongen, J. J., Heemskerk, M. H., Res, P. C.: Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells., *Immunological Reviews* **165**, 75–86 (1998)
10. Colonna, M., Moretta, A., Vély, F., Vivier, E.: A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and fiction, *Immunology Today* **21**, 428–431 (2000)
11. Hao, L., Klein, J., Nei, M.: Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**, 3192–3197 (2006)
12. Vély, F., Vivier, E.: Natural Killer Cell Receptor Signaling Pathway, *Science Signaling STKE*, Issue 292, p. cm6, (2005)
13. Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Partheniou, F., Little, A. M., Parham, P.: MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response, *Blood Journal of the American Society of Hematology* **112**, 2369–2380 (2008)

14. Mayer, G., Nyland, J.: Major histocompatibility komplex (MHC) and T-cell receptors – role in immune responses, *Mikrobiology and Immunology, University of South Carolina School of Medicine* (2010), dostupné z URL:
< <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/mhc.htm> > [cit. 21.4.2012]
15. Kumar, V., McNerney, E. M.: A new self: MHC-class-I-independent Natural-killer-cell self-tolerance, *Nature Reviews Immunology* **5**, 363-374 (2005)
16. Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S., Perussia, B.: Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells, *The Journal of Experimental Medicine* **188**, 2375-2380 (1998)
17. Musil, J.: *Základy biochemie chorobných procesů*, Praha, Avicenum 1981
18. Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Wayne M. Yokoyama, W. M., Ugolini, S.: Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells, *Science* **331**(6013), 44–49 (2011)
19. Lanier, L. L.: NK cell recognition, *Annual Reviews Immunology* **23**, 225-274 (2005)
20. Trowsdale, J.: Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes, *Immunity* **15**, 363-374 (2001)
21. Jamil, K. M., Khakoo, S. I.: KIR/HLA Interactions and Pathogen Immunity, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 298348, 9 pages, (2011)
22. Dodd, R. B., Drickamer, K.: Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity, *Glycobiology* **11**, 71R-79R (2001)
23. Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., Phillips, J. H.: An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10, *Science* **285**, 730-732 (1999)
24. Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J., Leibson, P. J.: NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway, *Nature Immunology* **4**, 557-564 (2003)
25. Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C., Phillips, J. H.: Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells, *Nature* **391**, 703-707 (1998)
26. Kveberg, L., Bäck, C. J., Dai, K. Z., Inngjerdigen, M., Rolstad B., Ryan, J. C., Vaage, J. T., Naper, C.: The Novel Inhibitory NKR-P1C Receptor and Ly49s3 Identify Two Complementary, Functionally Distinct NK Cell Subsets in Rats, *Journal of Immunology* **176**, 4133-4140 (2006)

27. Rozbeský, D., Kavan, D., Chmelík, J., Novák, P., Vaněk, O., Bezouška, K.: High-level expression of soluble form of mouse natural killer cell receptor NKR-P1C(B6) in *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification* **77**, 178–184 (2011) cit. dle: Ryan, J. C., Seaman, W. E.: Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells, *Immunological Reviews* **155**, 79–89 (1997) a dále cit. dle: Yokoyama W. M., Ryan, J. C., Hunter, J. J., Smith, H. R., Stark, M., Seaman, W. E.: CDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with LY-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6, *Journal of Immunology* **147**, 3229–3236 (1991)
28. Giorda, R., Trucco, M.: Mouse NKR-P1. A family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine-activated killer cells, *Journal of Immunology* **147**, 1701–1708 (1991)
29. Ryan, J. C., Turck, J., Niemi, E. C., Yokoyama, W. M., Seaman, W.E.: Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules, *Journal of Immunology* **149**, 1631–1635 (1992)
30. Carlyle, J. R., Mesci, A., Fine, J. H., Chen, P., Belanger, S., Tai, L-H., Makrigiannis, A. P.: Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems, *Seminars in Immunology* **20**, 321–330 (2008)
31. Sovová, Ž., Kopecký, V. Jr., Pazderka, T., Hofbauerová, K., Rozbeský, D., Vaněk, O., Bezouška, K., Ettrich, R.: Structural analysis of natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) extracellular domains suggests a conserved long loop region involved in ligand specificity, *Journal of Molecular Modeling* **17**, 1353–1370 (2011)
32. Li, J., Rabinovich, B. A., Hurren, R., Shannon, J., Miller, R. G.: Expression cloning and function of the rat NK activating and inhibitory receptors NKR-P1A and -P1B, *International Immunology* **15** (3), 411–416 (2003)
33. Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, Ch. S., Arase, H., Raulet, D. H.: Missing self-recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**(10), 3527–3532 (2004)
34. Plougastel, B., Matsumoto, K., Dubbelde, C. and Yokoyama, W. M.: Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse Nkrp1 cluster of genes: cloning of three new Nkrp1 members, Nkrp1d, Nkrp1e, and Nkrp1f, *Immunogenetics* **53**, 592–598 (2001)
35. Carlyle, J. R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L-H., Rousselle, E., Troke, A. D., Proteau, M-F., Makrigiannis, A. P.: Molecular and Genetic Basis for Strain-Dependent NK1.1 Alloreactivity of Mouse NK Cells, *Journal of Immunology* **176**, 7511–7524 (2006)

36. Aust, J. G., Gays, F., Mickiewicz, K. M., Buchanan, E., Brooks, C. G.: The Expression and Function of the NKR-P1 Receptor Family in C57BL/6 Mice, *Journal of Immunology* **183**, 106–116 (2009)
37. Mesci, A., Ljubic, B., Makrigiannis, A. P., Carlyle, J. R.: NKR-P1 Biology, *Immunology Research* **35**, 1–2, 13–26 (2006)
38. Arase, N., Arase, H., Park, S. Y., Ohno, H., Ra, C., Saito, T.: Association with Fc γ Is Essential for Activation Signal through NKR-P1 (CD161) in Natural Killer (NK) Cells and NK1.1⁺ T Cells, *The Journal of Experimental Medicine* **186**, 1957–1963 (1997)
39. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–685 (1970)
40. Altman Laboratory, Studier Method for Autoinduction of Protein Expression in the T7 System, dostupné z URL:
<http://www.microbiology.emory.edu/altman/jdaWebSite_v3/index.shtml> [cit. 6.5.2012]
41. Singh, S. M., Panda, A. K.: Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **4**, 303–310 (2005)
42. Pierce Protein Research Products, Dialysis Methods for Protein Research, Thermo scientific, dostupné z URL: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=5753AFD9-5056-8A76-4E13-5F9E9B4324DA#procedure>> [cit. 6.5.2012]
43. Bradford, M. M.: Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (1976)
44. Aricescu, A. R., Lu, W., Jones, E. Y.: A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells, *Acta Crystallographica D Biological Crystallography* **62**(10), 1243–1250 (2006)
45. de Marco, A.: Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*, *Microbial Cell Factories* **8**, 26 (2009)

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka